



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση έξυπνων θεραπευτικών και  
θεραγωγιστικών μορίων στοχεύοντας τον καρκίνο**

**Ειρηναίος Βρέττος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**2021**

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση έξυπνων θεραπευτικών και  
θεραγωγιστικών μορίων στοχεύοντας τον καρκίνο**

**Ειρηναίος Βρέττος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

2021

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα**  
**Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,**  
**Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν.  
5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: ...958<sup>A</sup>/ 3-11-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

**Επιβλέπων:**

Τζάκος Ανδρέας, *Αναπληρωτής Καθηγητής*

**Μέλη:**

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, *Καθηγητής*

Μαυρομούστακος Θωμάς, *Καθηγητής*

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **1013/14-02-2020**

Θέμα: «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση έξυπνων θεραπευτικών και θεραγωγιστικών μορίων στοχεύοντας τον καρκίνο»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1038<sup>A</sup>/28-05-2021

1. Τζάκος Ανδρέας, *Αναπληρωτής Καθηγητής*
2. Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, *Καθηγητής*
3. Μαυρομούστακος Θωμάς, *Καθηγητής*
4. Σίσκος Μιχαήλ, *Αναπληρωτής Καθηγητής*
5. Χατζηαράπογλου Λάζαρος, *Καθηγητής*
6. Χριστοφορίδης Σάββας, *Καθηγητής*
7. Τσίκαρης Βασίλειος, *Καθηγητής*

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-06-2021

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ξανθή Τουτουτζόγλου



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Ανδρέας Τζάκος  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Τηλ.: 26510-08387  
e-mail: atzakos@uoi.gr

Ιωάννινα 29-06-2021

Μιρος: 1 η 1 ραμματεία του 1 μνηματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Θέμα: «Κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Ειρηναίου Βρέττου»**

Σήμερα την 29<sup>η</sup> Ιουνίου 2021 και ώρα 12:30 η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε από την Γενική Συνέλευση του Τμήματος Χημείας παρακολούθησε την προφορική παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής του κ. Ειρηναίου Βρέττου με θέμα «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση έξυπνων θεραπευτικών και θεραγνωστικών μορίων στοχεύοντας τον καρκίνο».

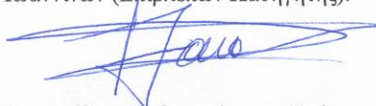
Η επιτροπή έκρινε ότι το περιεχόμενο της διδακτορικής διατριβής είναι πρωτότυπο και συμβάλλει θετικά στο πεδίο της Χημείας. Τα αποτελέσματα της διατριβής που παρουσίασε ο υποψήφιος αποτέλεσαν αντικείμενο πολλών δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.

Ο υποψήφιος έκανε πολύ καλή προφορική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της διατριβής της και απάντησε επιτυχώς σε ερωτήσεις που του υποβλήθηκαν από τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Κατόπιν των παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποδέχεται τη διδακτορική διατριβή του κ. Ειρηναίου Βρέττου και εισηγείται, μετά από πρόταση του Επιβλέποντος Καθηγητή, το βαθμό «**Άριστα**».

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

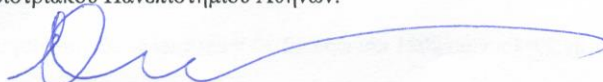
Ανδρέας Τζάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Επιβλέπων Καθηγητής).



Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.



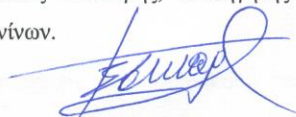
Μιχαήλ Σίσκος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



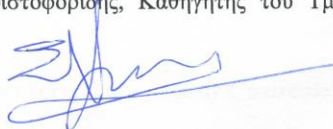
Λάζαρος Χατζηαράπογλου, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



## Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα από τον Νοέμβριο του 2017 έως τον Μάιο του 2021 και ο σκοπός ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η βιολογική αξιολόγηση θεραπευτικών και θεραγνωστικών μορίων που στοχεύουν τον καρκίνο. Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών – ΙΚΥ στα πλαίσια ενίσχυσης του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο για την ανάθεση του θέματος και τη σωστή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η αμέριστη στήριξη και βοήθεια του κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Μου δίδαξε πόσο σημαντικό είναι να προβληματίζομαι και να ανταπεξέρχομαι σε δύσκολες καταστάσεις με επιτυχία. Η συνεργασία μας ήταν εξαιρετική όλα αυτά τα χρόνια και με ώθησε να γίνω καλύτερος άνθρωπος, να ανακαλύψω νέες πτυχές του εαυτού μου και να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη και κ. Θωμά Μαυρομούστακο για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, καθώς και για την αποδοχή τους να ανήκουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μιχαήλ Σίσκο, τον κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου, τον κ. Βασίλειο Τσίκαρη και τον κ. Σάββα Χριστοφορίδη που αποδέχτηκαν να συμμετάσχουν στην επταμελή μου επιτροπή και να κρίνουν την διδακτορική μου διατριβή, και για τις γνώσεις που μου έχουν μεταλαμπαδεύσει.

Πέραν των προαναφερθέντων, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους υπόλοιπους Καθηγητές του Τμήματος για τις γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια, και ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιο και την Καθηγήτρια κα. Θεοδώρου Βασιλική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους Καθηγητές και τις ερευνητικές τους ομάδες που συνεργαστήκαμε κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής: Το εργαστήριο του κ. Σάββα Χριστοφορίδη στο IMBB, το εργαστήριο του κ. Θεόδωρου Φώτη και της κα. Carol Murphy στο IMBB (πραγματοποίησαν τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας της παρούσας διδακτορικής διατριβής), του κ. Κωνσταντίνου Ξανθόπουλου και της κα. Δήμητρας Ντάφου στο ΑΠΘ, του κ. Κωνσταντίνου Ταμβακόπουλου στο ΠΒΕΑΑ, του κ. Ερμή Ιατρού στο ΕΚΠΑ (πραγματοποίησαν τα πειράματα εγκλεισμού σε πολυμερικά συστήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής), της κα. Petra Heffeter στο Institute of Cancer Research της Αυστρίας (πραγματοποίησαν τα πειράματα ανασταλτικής δράσης σε κατάσταση υποξίας της παρούσας διδακτορικής διατριβής), της κα. Dipshikha Chakravorty στο Indian Institute of Science στο Bangalore της Ινδίας (πραγματοποίησαν

τα *in vivo* πειράματα για τις ουσίες με βακτηριοστατική δράση της παρούσας διδακτορικής διατριβής), του κ. Andrej Babic στο Πανεπιστήμιο της Γενεύης στην Ελβετία, του κ. Giacomo Parigi, κ. Marco Fragai και κ. Claudio Luchinat στο CERM του Πανεπιστημίου της Φλωρεντίας, του κ. Krzysztof Rolka στο Πανεπιστήμιο του Gdansk (πραγματοποίησαν τα *in vitro* πειράματα για τις ουσίες με βακτηριοστατική δράση της παρούσας διδακτορικής διατριβής), του κ. Thomas Mindt στο Πανεπιστήμιο της Βασιλείας στην Ελβετία, του κ. Robert Widdop στο Monash University στην Αυστραλία και τους κ. Timothy Crook και κα. Nelofer Syed στο Imperial College στο Λονδίνο, την κα. Ester Hammond στο Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης και τον κ. Robert Elmes στο Maynooth University της Ιρλανδίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το κέντρο φασματοσκοπίας NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη πρόσβαση στις υποδομές και το κέντρο φασματομετρίας μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των μαζών.

Ευχαριστώ τους φίλους και συνεργάτες Γεωργία Παππά, Κική Βαδόλα, Ιωάννη Γεροντίτη, Γιώργο Βλάσση-Δημάκο, Λία Κουταλιά, Βίκυ Κακαέ, Σταυρούλα Κύρκου, Δημήτρη Διαμαντή, Βασίλη Γκάλπινο, Αντώνη Τσιαϊλάνη, Χρήστο Χατζηγιάννη, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Μαρία Χατζηαθανασιάδου, Ευγένιο Στύλο, Χριστίνα Παπαεμμανουήλ, Βίκυ Παπακανάκη, Ιωάννα Παπαδοπούλου, Σοφία Φαρμάκη, Σπύρο Κατσάκο, Αναστασία Κουγιουμτζή, Βασιλική Αναγνώστου και Νίκο Παρίση. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου από τη Χαλκίδα (Αλέξη, Ανδρέα, Απόστολο, Γιάννη, Θάνο) για τη στήριξή τους και την αγάπη τους προς το πρόσωπό μου για πάνω από 20 χρόνια.

Ιδιαίτερω, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Πηνελόπη Βούλγαρη για την στήριξή της και την αγάπη της που με βοηθούσε καθημερινά να αντιμετωπίσω τις δυσκολίες, το άγχος και την πίεση που συνεπάγεται η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου Ιωάννη και Ευαγγελία για την απλόχερη αγάπη τους, την υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς της ζωής μου και τη δύναμη που μου προσφέρουν καθημερινά παροτρύνοντας με να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

Βρέττος Ειρηναίος,  
Ιωάννινα, 2021



«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



## Περίληψη

---

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας με σταδιακά αυξανόμενο ρυθμό. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος θεωρείται η δεύτερη πιο θανατηφόρα ασθένεια παγκοσμίως, μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων διαταράσσει την ομοιόσταση και οδηγεί στη δημιουργία νεοπλασματικών κυττάρων (καρκινικών κυττάρων) τα οποία φέρουν διακριτά λειτουργικά χαρακτηριστικά τα οποία εξασφαλίζουν την επιβίωση και την εξέλιξη των νεοπλασματικών κυττάρων, και τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να παρουσιάζουν διαφοροποιημένο μικροπεριβάλλον. Η αντιμετώπιση του καρκίνου έγκειται στην έγκυρη διάγνωση του και μετέπειτα στην αποτελεσματική του θεραπεία, συνήθως μέσω εγχείρησης, χημειοθεραπείας και ακτινοβολίας, ή μέσω του συνδυασμού αυτών.

Βασιζόμενοι στις διαφορές του μικροπεριβάλλοντος μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (π.χ. υπερέκφραση ενζύμων), αναπτύξαμε διαφορετικές 'βιοδραστικές πλατφόρμες' που δύνανται να χρησιμοποιηθούν ποικιλοτρόπως είτε για τη θεραπεία είτε για την ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου. Με βάση της νέες αυτές 'πλατφόρμες' που στοιχειοθετήσαμε, συνθέσαμε καινοτόμα θεραπευτικά και θεραπευτικά προφάρμακα (ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση), τα οποία στοχεύουν εκλεκτικά το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων και απελευθερώνουν τοξικά αντικαρκινικά φάρμακα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα αντικαρκινικά φάρμακα γεμισιταβίνη, πακλιταξέλη και SN-38, τα οποία είναι εξαιρετικά τοξικά, καθιστώντας τα ιδανικά για τη στοχευμένη προσέγγιση που χρησιμοποιήσαμε. Επίσης, συντέθηκαν διάφορες φθορίζουσες ενώσεις (π.χ. NIR χρωστικές που δρουν στο εγγύς υπέρυθρο) που συντέλεσαν στην αποτελεσματική οπτικοποίηση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν ομάδες που αλληλεπιδρούν με διαφορετικά ερεθίσματα που υφίστανται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (π.χ. υποξία, αυξημένα επίπεδα ενζύμων και γλουταθειόνης) και μόρια-σκελετοί με ενσωματωμένους αυτο-διασπώμενους συνδέτες που διαθέτουν την ικανότητα να απελευθερώνουν εκλεκτικά και ταχέως τα αντικαρκινικά φάρμακα στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα μόρια που προσδίδουν στόχευση προς τα καρκινικά κύτταρα όπως η D-βιοτίνη, το TPP<sup>+</sup> και το πεπτίδιο D-Lys<sup>6</sup>-GnRH.

Μέσω ποικίλων συνδυασμών των προαναφερθέντων επιμέρους μορίων, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως 9 θεραπευτικά και 8 θεραπευτικά προφάρμακα. Όλες οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις (95 συνολικά) καθαρίστηκαν με κατάλληλες τεχνικές όπως χρωματογραφία στήλης και RP-HPLC, ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία 1D/2D NMR και φασματομετρία μάζας, και μελετήθηκαν ως προς τα φωτοφυσικές τους ιδιότητες στις περιπτώσεις όπου υπήρχε φθορισμός (τελικά θεραπευτικά μόρια). Επιπλέον, όλα τα τελικά μόρια μελετήθηκαν χρονικά ως προς τη σταθερότητά τους σε ένα μεγάλο εύρος pH και σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος με χρήση

εξατομικευμένης μεθοδολογίας HPLC που αναπτύχθηκε ξεχωριστά για κάθε προφάρμακο. Τέλος, όλα τα προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης της κυτταροτοξικότητας τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, του ελέγχου της απόκρισης τους υπό την επίδραση του κατάλληλου ερεθίσματος (π.χ. υποξία) και της εξερεύνησης του ακριβή τρόπου ενδοκύττωσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Μέσω του κατάλληλου βιολογικού ελέγχου επαληθεύτηκε η αποτελεσματικότητα των εν λόγω 'βιοδραστικών πλατφορμών'.

## Abstract

---

Cancer constitutes one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, at an increasing rate. According to the World Health Organization, cancer is considered the second fatal disease in the world, after cardiovascular diseases. The accumulation of genetic alterations disrupts homeostasis and leads to the formation of neoplastic cells (cancer cells) which have distinct functional characteristics that ensure the survival and development of neoplastic cells, which in turn result in a differentiated tumor microenvironment. The treatment of cancer lies in its valid diagnosis and subsequent effective therapy, usually through surgery, chemotherapy and radiation, or a combination of these.

Based on the differences of the microenvironment between healthy and cancer cells (e.g. overexpression of enzymes), we developed multiple 'bioactive platforms' that can be utilized in various ways either for cancer therapy or for simultaneous cancer diagnosis and therapy. Based on these 'platforms' we synthesized novel therapeutic and theragnostic prodrugs (simultaneous therapy and diagnosis), which selectively target the microenvironment of cancer cells and release the toxic anticancer drugs. Towards this aim, the anticancer drugs gemcitabine, paclitaxel and SN-38 were exploited, which are highly toxic, rendering them ideal for the targeted approach utilized. Also, we synthesized various fluorescent compounds (e.g. NIR dyes that emit in near infrared region) that contributed to the effective diagnosis of the tumor microenvironment. In addition, we used groups that can interact with different stimuli of the cancer microenvironment (e.g. hypoxia, elevated enzyme and glutathione concentrations) and cores with built-in self-immolative linkers capable of releasing rapidly and selectively anticancer drugs within the cancer microenvironment. Finally, various molecules that target cancer cells such as D-biotin, TPP<sup>+</sup> and the tumor-homing peptide D-Lys<sup>6</sup>-GnRH were utilized.

Through various combinations of the aforementioned moieties, 9 therapeutic and 8 theragnostic prodrugs were successfully synthesized and characterized. All intermediates and final compounds (95 in total) were purified by appropriate techniques such as column chromatography and RP-HPLC, characterized by 1D/2D NMR spectroscopy, mass spectrometry, and studied regarding their photophysical properties when applicable (final theragnostic compounds). In addition, the final compounds were evaluated over time regarding their stability within a wide pH range and in human blood plasma, using specified HPLC methodologies (each HPLC method was sculpted specifically for each prodrug). Finally, all prodrugs were tested for their biological profile including measurement of their cytotoxicity against cancer cell lines, their response upon encountering a specific stimulus (e.g. hypoxia), and their exploration of endocytosis pathways by confocal microscopy. The efficiency of the reported 'bioactive platforms' has been verified through the appropriate biological evaluation.





## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	7
Περίληψη	10
Abstract	12
Συντμήσεις	22
Σκοπός της εργασίας	24
<b>1 Εισαγωγή</b>	<b>27</b>
1.1 Καρκίνος	27
1.2 Καρκινογένεση	28
1.2.1 Χαρακτηριστικά του καρκίνου	29
1.2.2 Διαφοροποιημένο μικροπεριβάλλον του καρκίνου	34
1.3 Θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου	46
1.3.1 Αντικαρκινικές θεραπείες	46
1.3.1.1 Ανάλυση συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων	53
1.3.1.1.1 Αντικαρκινικό φάρμακο ‘γεμισιταβίνη’	53
1.3.1.1.1.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία της γεμισιταβίνης	53
1.3.1.1.1.2 Μεταφορά της γεμισιταβίνης	55
1.3.1.1.1.3 Μεταβολισμός της γεμισιταβίνης	57
1.3.1.1.1.4 Μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης	59
1.3.1.1.1.5 Αντίσταση στη γεμισιταβίνη	62
1.3.1.1.1.6 Χημεία της γεμισιταβίνης	64
1.3.1.1.2 Αντικαρκινικό φάρμακο ‘πακλιταξέλη’	66
1.3.1.1.2.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία της πακλιταξέλης	66
1.3.1.1.2.2 Ολική σύνθεση της πακλιταξέλης	67
1.3.1.1.2.3 Μηχανισμός δράσης της πακλιταξέλης	69
1.3.1.1.2.4 Φαρμακογενετική της πακλιταξέλης	72
1.3.1.1.2.5 Αντίσταση στη πακλιταξέλη	74
1.3.1.1.2.6 Χημεία της πακλιταξέλης	75
1.3.1.1.3 Αντικαρκινικό φάρμακο ‘SN-38	76
1.3.1.1.3.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία του SN-38	76
1.3.1.1.3.2 Μεταβολισμός και μηχανισμός δράσης του SN-38	77
1.3.1.1.3.3 Αντίσταση στο SN-38	78
1.3.1.2 Προφάρμακα	79

1.3.2	Διάγνωση του καρκίνου	81
1.3.3	Στοχευμένη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου	84
1.3.4	Θεραγωγικά μόρια	89
1.3.5	Κατηγορίες συνδεδετών που χρησιμοποιούνται στα προφάρμακα	90
<b>2</b>	<b>Συζήτηση αποτελεσμάτων</b>	<b>94</b>
<b>2.1</b>	<b>Θεραπευτικά προφάρμακα</b>	<b>94</b>
2.1.1	Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης που ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση (ALP)	94
2.1.2	Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης που ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση (ενώσεις <b>4β</b> και <b>5β</b> )	108
2.1.2.1	Απόκριση των προφαρμάκων στην αλκαλική φωσφατάση	108
2.1.2.2	Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των προφαρμάκων <b>4β</b> και <b>5β</b> έναντι των καρκινικών σειρών HeLa και A549	109
2.1.2.3	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των προφαρμάκων <b>4β</b> και <b>5β</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	111
2.1.2.4	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των προφαρμάκων <b>4β</b> και <b>5β</b> σε εύρος τιμών pH	113
2.1.2.5	Έλεγχος της υδατοδιαλυτότητας των προφαρμάκων <b>4β</b> και <b>5β</b> σε σύγκριση με τη γεμισιταβίνη	113
2.1.3	Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στη γλουταθειόνη (GSH)	114
2.1.4	Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στη γλουταθειόνη (ενώσεις <b>9</b> και <b>10</b> )	124
2.1.4.1	Μελέτη της απόκρισης των προφαρμάκων στη γλουταθειόνη	124
2.1.4.2	Μέτρηση της <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων γεμισιταβίνη και πακλιταξέλη, και των προφαρμάκων <b>9</b> και <b>10</b> σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και A549	125
2.1.4.3	Μελέτη της <i>in vitro</i> σταθερότητας των προφαρμάκων <b>9</b> και <b>10</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	128
2.1.4.4	Μελέτη της <i>in vitro</i> σταθερότητας των προφαρμάκων <b>9</b> και <b>10</b> σε εύρος τιμών pH	131
2.1.5	Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποξία	133
2.1.6	Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποξία (ενώσεις <b>13β</b> , <b>14β</b> , <b>15β</b> , <b>16</b> και <b>24</b> )	159
2.1.6.1	Χημική αναγωγή της νιτρο ομάδας των προφαρμάκων	159
2.1.6.2	Μελέτη της <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων και των προφαρμάκων <b>13β</b> , <b>14β</b> , <b>15β</b> και <b>16</b> σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και A549	160
2.1.6.3	Μελέτη της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>13β</b> , <b>14β</b> , <b>15β</b> , <b>16</b> και <b>24</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	162



2.1.6.4	Μελέτη της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>13β, 14β, 15β, 16</b> και <b>24</b> σε εύρος τιμών pH	166
<b>2.2</b>	<b>Θεραγωγιστικά προφάρμακα</b>	<b>169</b>
	Θεραγωγιστικά προφάρμακα της γεμισταβίνης	169
2.2.1	1 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Γεμισταβίνη-Φλουορεσκεΐνη)	169
2.2.1.1	Βιολογική αξιολόγηση του <b>Θεραγωγιστικού 1</b> της γεμισταβίνης	173
2.2.1.2	Μελέτη του τρόπου εισόδου του <b>Θεραγωγιστικού 1</b> στα κύτταρα με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας	173
2.2.1.3	Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του <b>Θεραγωγιστικού 1</b> έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549	176
2.2.2	2 <sup>ο</sup> & 3 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Γεμισταβίνη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική)	177
2.2.2.1	Βιολογική αξιολόγηση των <b>Θεραγωγιστικών 2</b> και <b>3</b> (προφάρμακα της γεμισταβίνης)	186
2.2.2.2	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 2</b> και <b>3</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	187
2.2.2.3	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 2</b> και <b>3</b> σε διάφορες τιμές pH	188
2.2.2.4	Φωτοφυσικές ιδιότητες των <b>Θεραγωγιστικών 2</b> και <b>3</b>	189
2.2.2.5	Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των <b>Θεραγωγιστικών 2</b> και <b>3</b> σε κατάσταση υποξίας	189
	Θεραγωγιστικό προφάρμακο του SN-38	191
2.2.3	4 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (SN-38-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-D-Βιοτίνη)	191
2.2.3.1	Βιολογική αξιολόγηση του <b>Θεραγωγιστικού 4</b> (προφάρμακο του SN-38)	195
2.2.3.2	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας του <b>Θεραγωγιστικού 4</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	195
2.2.3.3	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας του <b>Θεραγωγιστικού 4</b> σε διάφορες τιμές pH	196
2.2.3.4	Φωτοφυσικές ιδιότητες του <b>Θεραγωγιστικού 4</b>	198
2.2.3.5	Μελέτη της ανασταλτικής δράσης του <b>Θεραγωγιστικού 4</b> σε κατάσταση υποξίας	200
	Θεραγωγιστικά προφάρμακα της πακλιταξέλης	201
2.2.4	5 <sup>ο</sup> & 6 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-Χρωστική)	201
2.2.4.1	Βιολογική αξιολόγηση των <b>Θεραγωγιστικών 5</b> και <b>6</b> (προφάρμακα της πακλιταξέλης)	207
1.1.1.1	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 5</b> και <b>6</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	209
1.1.1.2	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 5</b> και <b>6</b> σε διάφορες τιμές pH	210

<b>1.1.1.3</b>	Φωτοφυσικές ιδιότητες των <b>Θεραγωγιστικών 5 και 6</b>	211
<b>1.1.1.4</b>	Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των <b>Θεραγωγιστικών 5 και 6</b>	212
1.1.2	7 <sup>ο</sup> & 8 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική-Βιοτίνη/TPP <sup>+</sup> )	212
1.1.2.1	Βιολογική αξιολόγηση των <b>Θεραγωγιστικών 7 και 8</b> (προφάρμακα της πακλιταξέλης)	220
1.1.2.2	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 7 και 8</b> σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος	221
1.1.2.3	Έλεγχος της <i>in vitro</i> σταθερότητας των <b>Θεραγωγιστικών 7 και 8</b> σε διάφορες τιμές pH	222
<b>1.1.2.4</b>	Φωτοφυσικές ιδιότητες των <b>Θεραγωγιστικών 7 και 8</b>	223
1.1.2.5	Μελέτη της ανασταλτικής δράσης του <b>Θεραγωγιστικού 7</b> σε κατάσταση υποξίας	224
1.1.3	9 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική-GnRH πεπτίδιο)	225
	Θεραγωγιστικά προφάρμακα του DOTA	231
1.1.4	10 <sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (DOTA-αυτοδιασπώμενος συνδέτης-EGFR πεπτίδιο)	231
<b>3</b>	<b>Πειραματικό μέρος</b>	234
	Σύνθεση της ένωσης 1:	236
	Σύνθεση της ένωσης 2	237
	Σύνθεση της ένωσης 3	238
	Σύνθεση της ένωσης 4α	239
	Σύνθεση της ένωσης 4β	240
	Σύνθεση της ένωσης 5α	241
	Σύνθεση της ένωσης 5β	242
	Σύνθεση της ένωσης 6 (4-υδροξυβενζυλική αλκοόλη)	243
	Σύνθεση της ένωσης 7	243
	Σύνθεση της ένωσης 8	244
	Σύνθεση της ένωσης 9	245
	Σύνθεση της ένωσης 10	246
	Σύνθεση της ένωσης 11 (4-νιτροβενζυλική αλκοόλη)	248
	Σύνθεση της ένωσης 12 (4-νιτροβενζυλο βρωμίδιο)	248
	Σύνθεση της ένωσης 13α	249
	Σύνθεση της ένωσης 13β	250
	Σύνθεση της ένωσης 14α	251

Σύνθεση της ένωσης 14β	252
Σύνθεση της ένωσης 15α	253
Σύνθεση της ένωσης 15β	254
Σύνθεση της ένωσης 16	255
Σύνθεση της ένωσης 17	256
Σύνθεση της ένωσης 18	257
Σύνθεση της ένωσης 19	258
Σύνθεση της ένωσης 20	259
Σύνθεση της ένωσης 21	260
Σύνθεση της ένωσης 22 (2-αζιδοαιθυλ-1-αμίνη)	261
Σύνθεση της ένωσης 23	261
Σύνθεση της ένωσης 24	262
Σύνθεση της ένωσης 25 (5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη)	264
Σύνθεση της ένωσης 26 (Θεραγωγαστικό 1)	265
Σύνθεση της ένωσης 27	266
Σύνθεση της ένωσης 28	266
Σύνθεση της ένωσης 29	267
Σύνθεση της ένωσης 30 (4-αζιδοβενζαλδεϋδη)	268
Σύνθεση της ένωσης 31 (DCM-N <sub>3</sub> )	268
Σύνθεση της ένωσης 32	269
Σύνθεση των ενώσεων 33 και 34	269
Σύνθεση της ένωσης 35 (Θεραγωγαστικό 2)	270
Σύνθεση της ένωσης 36 (Θεραγωγαστικό 3)	271
Σύνθεση της ένωσης 36	273
Σύνθεση της ένωσης 38 (Θεραγωγαστικό 4)	274
Σύνθεση της ένωσης 39 (Κουμαρίνη-N <sub>3</sub> )	275
Σύνθεση της ένωσης 40 (Θεραγωγαστικό 5)	276
Σύνθεση της ένωσης 41 (Θεραγωγαστικό 6)	277
Σύνθεση της ένωσης 42	279
Σύνθεση της ένωσης 45	279
Σύνθεση της ένωσης 46	280
<b>4 Συμπεράσματα</b>	<b>281</b>
<b>5 Βιβλιογραφία</b>	<b>284</b>





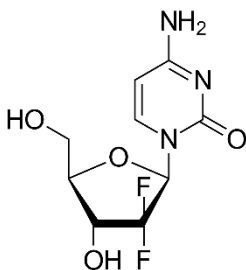
## Συντμήσεις

<u>Συντμήσεις</u>	<u>Ονομασία</u>
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Boc	Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα
CNTs	Συγκεντρωτικοί νουκλεοσιδικοί μεταφορείς
CuAc	Οξικός χαλκός
CuI	Ιωδίδιο του χαλκού
Cys	Κυστεΐνη
DCC	N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
DCU	N,N-δικυκλοεξυλουρία
dFdC	2',2'-διφθορο-δεοξυκυτιδίνη
dFdU	2',2'-διφθορο-δεοξουριδίνη
DIC	N,N-δισοπροπυλο-καρβοδιμίδιο
DIPEA	Δισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMAP	4-διμεθυλαμινο-πυριδίνη
DMPA	2,2-διμεθοξυ-2-φαινυλακετοφαινόνη
DMF	N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNBS	2,4-δινιτροβενζοσουλφονυλο χλωρίδιο
eq.	Ισοδύναμα
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Αιθανόλη
ENTs	Εξισορροπητικοί νουκλεοσιδικοί μεταφορείς
FDA	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
Fmoc	9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονυλομάδα
GnRH	Εκλυτική Ορμόνη των Γοναδοτροπινών
GSH	Γλουταθειόνη
H <sub>2</sub> O	Νερό
HATU	N-[(διμεθυλαμινο)-1H-1,2,3-τριαζο[4,5-β]πυριδινο-1-υλομεθυλενο]-N-μεθυλομεθαναμινικό εξαφωσφορικό N-οξείδιο
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
HOBt	1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ανθρακικό κάλιο
KOH	Υδροξείδιο του καλίου
Lys	Λυσίνη
MeCN	Ακετονιτρίλιο
MeOH	Μεθανόλη
MS	Φασματομετρία Μάζας

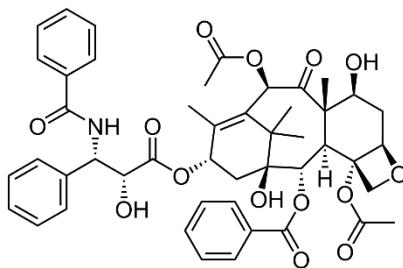
MW	Μικροκύματα
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Θεικό νάτριο
NaBH <sub>4</sub>	Βοροϋδρίδιο του νατρίου
NaN <sub>3</sub>	Νατραζίδιο
NHS	N-υδροξυσουκινιμίδιο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NTR	Νιτροαναγωγή
PBr <sub>3</sub>	Τριβρωμιούχος φωσφόρος
PyBOP	Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλοξυτρικ-πυρρολιδινο-φωσφονίου
R <sub>f</sub>	Συντελεστής συγκράτησης
ROS	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
RP-HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης Ανάστροφης φάσης
rt	Θερμοκρασία δωματίου
tBu	Τριτοταγής βουτυλομάδα
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
THF	Τετραυδροφουράνιο
TIS	Τρισοπροπυλοσιλάνιο
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TMSBr	Τριμεθυλοσιλάνιο βρωμίδιο
TEA	Τριαιθυλαμίνη
UV	Υπεριώδες

## Σκοπός της εργασίας

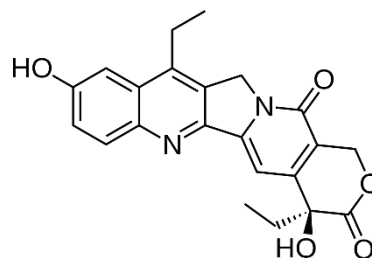
Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη θεραπευτικών και θεραγνωστικών προφαρμάκων τριών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων: της γεμισιταβίνης, της πακλιταξέλης και του SN-38, των οποίων οι δομές φαίνονται παρακάτω:



**Γεμισιταβίνη**



**Πακλιταξέλη**



**SN-38**

Τα τρία αυτά αντικαρκινικά φάρμακα χορηγούνται σε ασθενείς κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, και ειδικότερα στα τελευταία στάδια, λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους. Ωστόσο, δεν έχουν την ικανότητα να διακρίνουν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να θανατώνουν και δυο, οδηγώντας σε σοβαρές παρενέργειες.

Επομένως, βασικός μας στόχος ήταν η σύνθεση προφαρμάκων που να απελευθερώνουν τα τοξικά μόρια εκλεκτικά στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, θανατώνοντας μόνο τα καρκινικά κύτταρα και όχι τα υγιή.

Έτσι, αρχικά σχεδιάστηκε η ανάπτυξη θεραπευτικών προφαρμάκων που να έχουν ως στόχο τη στοχευμένη θεραπεία. Έπειτα, σχεδιάστηκε η ανάπτυξη θεραγνωστικών προφαρμάκων που έχουν ως στόχο την ταυτόχρονη στοχευμένη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου (ταυτόχρονη χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων και χρωστικών που εκπέμπουν στο εγγύς υπέρυθρο).

Για την ανάπτυξη των θεραπευτικών και θεραγνωστικών προφαρμάκων ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Ο σχεδιασμός των νέων προφαρμάκων, ώστε να ανταποκρίνονται εκλεκτικά στα καρκινικό μικροπεριβάλλον. Τα νέα προφάρμακα έπρεπε να φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες, οι οποίες ονομάζονται σκανδάλες και παρουσιάζονται με μωβ χρώμα σε ολόκληρη τη διδακτορική διατριβή, που να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες ώστε να αλληλεπιδρούν με ένα συγκεκριμένο ερέθισμα που υπερεκφράζεται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, όπως αλκαλική φωσφατάση, γλουταθειόνη και νιτροαναγωγάσες. Μόλις το προφάρμακο βρεθεί στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, η «σκανδάλη» θα



αλληλεπιδρά με το κατάλληλο ερέθισμα και θα προκαλεί την ταχεία απελευθέρωση του τοξικού μητρικού φαρμάκου. Στη περίπτωση των θεραγνωστικών προφαρμάκων, απαιτήθηκε ο κατάλληλος σχεδιασμός ώστε να πραγματοποιείται ταυτόχρονα η απελευθέρωση του φαρμάκου και η αύξηση της έντασης του φθορισμού προερχόμενη από τη χρωστική. Επιπρόσθετα, σε ορισμένες περιπτώσεις σχεδιάστηκε η προσάρτηση επιπλέον μορίων που προσφέρουν στόχευση στο καρκινικό μικροπεριβάλλον όπως πεπτίδια, D-βιοτίνη και TPP<sup>+</sup>.

Κατά τη διάρκεια του σχεδιασμού, λήφθηκαν υπόψιν και τα βασικά μειονεκτήματα του εκάστοτε φαρμάκου:

- Οι διαφορετικοί μηχανισμοί αντίστασης που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα στη χρήση του εκάστοτε φαρμάκου (π.χ. μείωση της έκφρασης των νουκλεοσιδικών μεταφορέων που είναι υπεύθυνοι για τη συσσώρευση της γεμισιταβίνης στο εσωτερικό των κυττάρων).
  - Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα
  - Η ενζυμική και χημική αστάθεια (π.χ. απαμίνωση της γεμισιταβίνης στην -NH<sub>2</sub> ή γλυκουρονιδίωση του SN-38 στη φαινολική -OH προς ανενεργούς μεταβολίτες)
2. Η σύνθεση (με κλασσικές συνθήκες ή χρήση μικροκυμάτων), ο καθαρισμός (κυρίως με χρωματογραφία στήλης ή RP-HPLC) και ο χαρακτηρισμός των νέων προφαρμάκων (με φασματοσκοπία 1D/2D NMR, φασματομετρία μάζας, UV-Vis και φθορισμό).
  3. Η *in vitro* ή *in vivo* αξιολόγηση τους κυρίως ως προς τη σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και σε ένα εύρος τιμών pH (2-9), την απόκρισή τους ως προς το κατάλληλο ερέθισμα (π.χ. αλκαλική φωσφατάση), τον μηχανισμό εισόδου στα κύτταρα και τις ανασταλτικές τους ιδιότητες κατά καρκινικών κυττάρων.

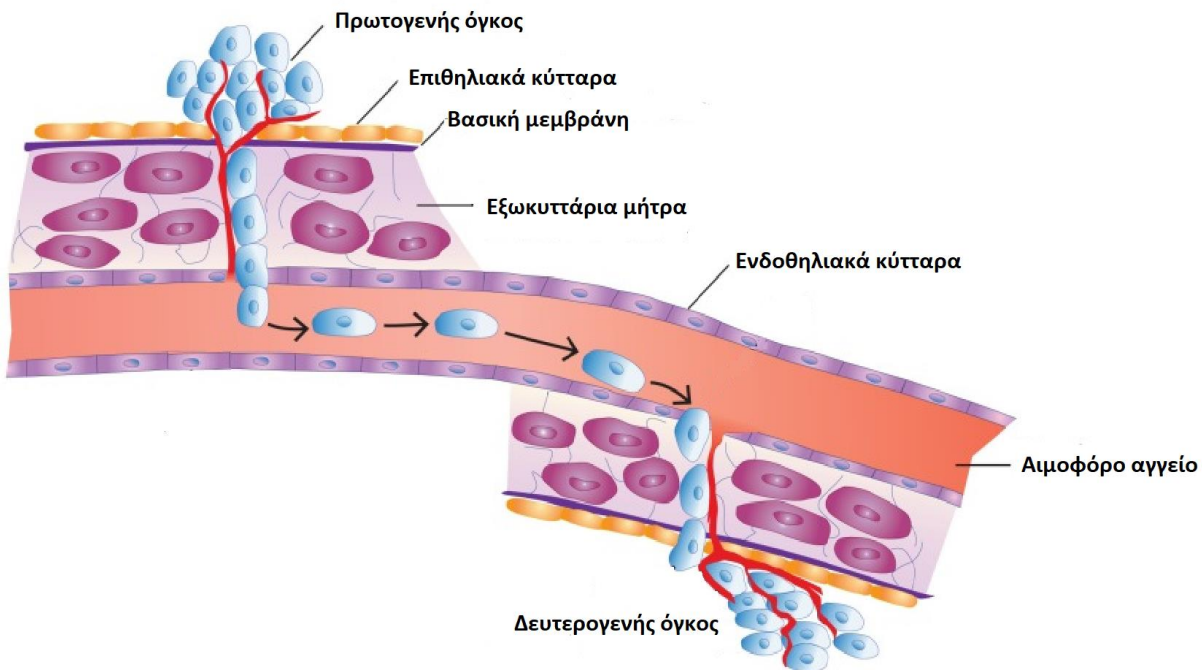


# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, με σταδιακά αυξανόμενο ρυθμό. Η πρώτη χρήση του όρου καρκίνος αποδίδεται στον Ιπποκράτη, ενώ στη συνέχεια ο Ρωμαίος ιατρός Κέλσος μετέφρασε το λέξη στα λατινικά ως cancer. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος θεωρείται η δεύτερη πιο θανατηφόρα ασθένεια μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις, με το 20% των ολικών ετήσιων θανάτων παγκοσμίως να καταλογίζεται σε αυτόν <sup>1</sup>. Συγκεκριμένα, το 2017 πιστώθηκαν 9.56 εκατομμύρια θάνατοι στον καρκίνο και 17.79 εκατομμύρια στις καρδιαγγειακές παθήσεις παγκοσμίως. Όσον αφορά την Ελλάδα, το 2017 σημειώθηκαν 31245 θάνατοι λόγω του καρκίνου και 50895 θάνατοι λόγω των διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων <sup>2</sup>. Ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι τύποι καρκίνου σε άντρες και γυναίκες αντίστοιχα, ενώ οι περισσότεροι θάνατοι λόγω καρκίνου καταλογίζονται στους καρκίνους της τραχείας, του βρόγχου και του πνεύμονα. Δυστυχώς, ο αριθμός των νέων περιπτώσεων αναμένεται να εκτοξευθεί κατά 70%, φτάνοντας έως και πάνω από 30 εκατομμύρια έως το 2040 <sup>3</sup>.

Γιατί όμως δεν μπορούμε να περιορίσουμε αισθητά την εξάπλωση του; Ο όρος «καρκίνος» αφορά μια ομάδα ασθενειών, που χαρακτηρίζονται από την ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη, και δεν αποδίδεται σε μια μόνο ασθένεια. Τα καρκινικά κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στα σήματα που ελέγχουν τη φυσιολογική κυτταρική συμπεριφορά, αλλά πολλαπλασιάζονται με ταχύ και ανεξέλεγκτο ρυθμό. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία μαζών (όγκων), που διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με βάση τη βιολογική τους συμπεριφορά, καθώς και συγκεκριμένα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά όπως τον βαθμό διαφοροποίησης, την αναπλαστικότητα και τον ρυθμό ανάπτυξης. Ακόμη, οι καλοήθεις όγκοι συνήθως δεν προκαλούν σοβαρά προβλήματα, εκτός αν λόγω του μεγάλου μεγέθους τους πιέζουν γειτονικούς νευρώνες ή όργανα. Αντίθετα, οι κακοήθεις όγκοι (συνήθως αυτοί αντιστοιχούν στον όρο «καρκίνος») χαρακτηρίζονται από την πιθανότητα εισβολής σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς ή διάδοσης ακόμη και σε όλο το σώμα, δημιουργώντας δευτερογενείς όγκους (μετάσταση, **Εικόνα 1.1**). Η μετάσταση αποτελεί έναν από τους κύριους λόγους της αδυναμίας ολικής αντιμετώπισης του καρκίνου από την επιστημονική κοινότητα. Ο καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε κύτταρα σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα, οδηγώντας έτσι σε περισσότερους από εκατό διαφορετικούς τύπους καρκίνου οι οποίοι συνήθως διαφέρουν μεταξύ τους στην εξέλιξη και την απόκριση τους στη θεραπεία. Επομένως, κάθε τύπος καρκίνου μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαφορετική ασθένεια, δεδομένης της διαφορετικότητας του, καθιστώντας έτσι σαφές ότι ο όρος «καρκίνος» αποτελεί μια πολύπλοκη και ταυτόχρονα επικίνδυνη ομάδα ασθενειών.



**Εικόνα 1.1** Μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Καρκινικά κύτταρα δραπέτεύουν από τον πρωτογενή όγκο διαπερνώντας τη βασική μεμβράνη και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος εγκαθίστανται σε νέα θέση, δημιουργώντας τον δευτερογενή όγκο <sup>4</sup>.

## 1.2 Καρκινογένεση

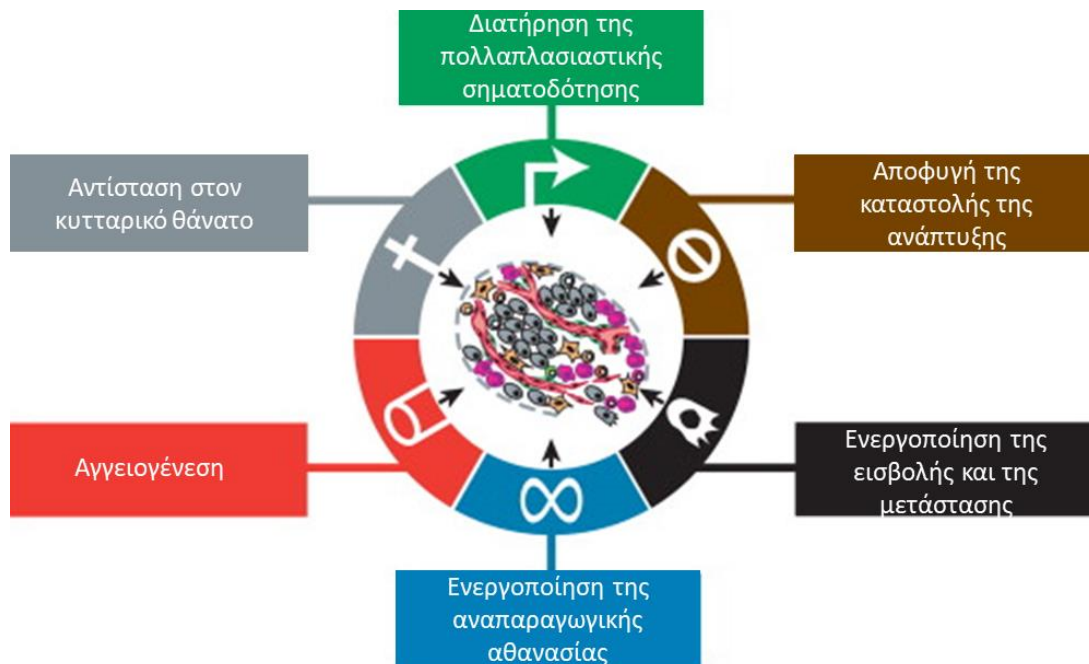
Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν προκαθορισμένο ρόλο με συγκεκριμένη λειτουργία, πολλαπλασιάζονται με ελεγχόμενο ρυθμό, και στο τέλος οδηγούνται σε απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Ο όρος καρκινογένεση (ή ογκογένεση) αναφέρεται στη μακροχρόνια διαδικασία πολλών σταδίων κατά την οποία ορισμένα φυσιολογικά κύτταρα παρεκκλίνουν από την προδιαγεγραμμένη πορεία τους λόγω μη θανατηφόρων γενετικών βλαβών (μεταλλάξεις) <sup>5</sup>. Τα διάφορα φαινοτυπικά στάδια ανάπτυξης του καρκίνου αντανακλούν γενετικού τύπου αλλοιώσεις, οι οποίες συσσωρεύονται αθροιστικά και οδηγούν στη διαταραχή της ομοιόστασης. Οι αλλοιώσεις αυτές μπορεί να αποτελούν αμιγώς γενετικές αλλαγές (π.χ. απαλείψεις τμημάτων ή σημειακές μεταλλάξεις) ή επιγενετικές τροποποιήσεις (π.χ. μεθυλίωση της γουανίνης) στο γονιδίωμα. Για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό πρέπει να λάβουν χώρα μία ή περισσότερες μεταλλάξεις σε γονίδια. Συνήθως απαιτείται συσσώρευση πολλαπλών μεταλλάξεων για να δημιουργηθεί ένας όγκος, καθώς το ανοσοποιητικό μας σύστημα αντιλαμβάνεται και εξουδετερώνει τα περισσότερα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω ογκογενετικών αποκρίσεων. Οι κύριοι καρκινογόνοι παράγοντες που προωθούν την ανάπτυξη κακοηθειών περιλαμβάνουν τα χημικά καρκινογόνα (π.χ. αλκυλιωτικοί και ακυλιωτικοί παράγοντες, φυτοφάρμακα), την παχυσαρκία, την ηλικία, την ακτινοβολία (π.χ. υπεριώδεις και ιονίζουσα) και τους ογκογόνους μικροοργανισμούς (κυρίως ιοί όπως π.χ. ιοί του θηλώματος του ανθρώπου).

Τα κύρια φυσιολογικά γονίδια που σχετίζονται με τις γενετικές βλάβες είναι 1) τα πρωτοογκογονίδια που επάγουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, 2) τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον τερματισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και 3) τα επιδιορθωτικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη θανάτωση νεοπλασματικών κυττάρων <sup>6</sup>.

- 1) Πρωτοογκογονίδια: Τα πρωτοογκογονίδια προάγουν την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη, κυρίως μέσω παραγωγής ορμονών και αυξητικών παραγόντων. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων, μετατρέποντας τα σε ογκογονίδια, συμβάλλει στην καρκινογένεση λόγω μεγάλης αύξησης της ποσότητας παραγόμενων πρωτεϊνών που συμβάλλουν στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ογκογονιδίων αποτελούν τα μέλη της οικογένειας RAS και το υβριδικό γονίδιο BCR-ABL.
- 2) Ογκοκατασταλτικά γονίδια: Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτρέπουν την κυτταρική ανάπτυξη και αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αδρανοποιούνται κατά την καρκινογένεση προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική αποδιαφοροποίηση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν τα RB (retinoblastoma), TP53 και BRCA1/2.
- 3) Επιδιορθωτικά γονίδια: Τα επιδιορθωτικά γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο και την επιδιόρθωση του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Η απενεργοποίηση τους οδηγεί σε αυξημένο αριθμό μεταλλαγμένων γονιδίων υποβοηθώντας την καρκινογένεση.

### 1.2.1 Χαρακτηριστικά του καρκίνου

Η συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων διαταράσσει την ομοιόσταση και οδηγεί στη δημιουργία νεοπλασματικών κυττάρων (καρκινικών κυττάρων) τα οποία φέρουν διακριτά λειτουργικά χαρακτηριστικά (hallmarks), τα οποία εξασφαλίζουν την επιβίωση και την εξέλιξη τους. Σύμφωνα με τους Hannah και Weinberg, τα 6 βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.2** και αναλύονται παρακάτω <sup>7</sup>.



**Εικόνα 1.2.** Τα 6 βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά <sup>7,8</sup>.

### 1) Διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης

Αναμφίβολα το πιο θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αφορά την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται διαρκώς. Οι φυσιολογικοί ιστοί απελευθερώνουν ελεγχόμενα σήματα για την παραγωγή και την ανάπτυξη των κυττάρων τους, διασφαλίζοντας έτσι την ομοιόσταση, και συνεπώς τη διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής των ιστών και τη λειτουργία τους. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα να διατηρούν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση μέσω μιας σειράς εναλλακτικών τρόπων: Παράγουν αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς στο ίδιο κύτταρο, δημιουργώντας έτσι αυτοκρινή σηματοδότηση. Δηλαδή, το σήμα παράγεται από το σηματοδοτικό κύτταρο και συνδέεται στους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς στο ίδιο το σηματοδοτικό κύτταρο. Ακόμη, μπορεί να απορρυθμιστεί η σηματοδότηση του δέκτη μέσω αύξησης των επιπέδων πρωτεϊνικών υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, καθιστώντας έτσι τα κύτταρα υπερευαίσθητα στους αντίστοιχους αυξητικούς παράγοντες-προσδέτες που σηματοδοτούν την κυτταρική ανάπτυξη. Επιπρόσθετα, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων μπορεί να προέρχεται από μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή ενός πρωτοογκογονιδίου ή χρωμοσωμικές αναδιατάξεις του πρωτοογκογονιδίου, μετατρέποντάς το σε ογκογονίδιο το οποίο ευθύνεται για την υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τον πολλαπλασιασμό.

## **2) Αποφυγή της καταστολής της ανάπτυξης**

Εκτός από την ικανότητα πρόκλησης και διατήρησης της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης, τα καρκινικά κύτταρα παρακάμπτουν σήματα τα οποία ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση, τα κύτταρα δέχονται και σήματα που διακόπτουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που αποτρέπουν τη κυτταρική διαίρεση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια RB (retinoblastoma) και TP53 τα οποία συμμετέχουν σε διαφορετικές βιοχημικές οδούς ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή ενεργοποιώντας οδούς κυτταρικής γήρανσης.

## **3) Αντίσταση στο κυτταρικό θάνατο - Αποφυγή απόπτωσης**

Τα φυσιολογικά κύτταρα ελέγχονται συνεχώς για τη κατάσταση τους. Πιθανές βλάβες ή δυσλειτουργίες οδηγούν σε κυτταρικούς μηχανισμούς που καθορίζουν αν θα πραγματοποιηθεί επιδιόρθωση από τα κατάλληλα ένζυμα ή θα ενεργοποιηθεί η οδός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Η ενεργοποίηση της απόπτωσης εξασφαλίζει τη θανάτωση κυττάρων με μεγάλο αριθμό αλλοιώσεων και διαταραχών, λειτουργώντας ως φραγμός στη καρκινογένεση. Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να αποφεύγουν την απόπτωση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Ο πιο κοινός τρόπος αφορά την απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα p53 (η απώλεια του έχει καταγραφεί σχεδόν στους μισούς τύπους καρκίνου) που δρα ως ανιχνευτής βλαβών στο DNA και ενεργοποιεί μηχανισμούς επιδιόρθωσης ή η οδός της απόπτωσης εφόσον ανιχνεύσει ανεπανόρθωτες βλάβες. Εναλλακτικά, οι όγκοι μπορούν να επιτύχουν τα ίδια αποτελέσματα αυξάνοντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών ρυθμιστών (Bcl-2, Bcl-xL) ή των σημάτων επιβίωσης (Igf1/2) και με απορρύθμιση προαποπτωτικών παραγόντων (Bax, Bim, Puma).

Αντίστοιχες διαδικασίες κυτταρικού θανάτου που έχουν παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα αποτελούν:

- 1) Η αυτοφαγία, που ενεργοποιείται όταν υπάρξει έλλειψη θρεπτικών συστατικών και περιλαμβάνει την κατανάλωση οργανιδίων και την ανακύκλωση των δομών και των μεταβολιτών του κυττάρου. Έχει παρατηρηθεί πως σε προχωρημένα στάδια καρκινογένεσης λειτουργεί προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα.
- 2) Η νέκρωση, που περιγράφεται ως παθητικός μη προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και προάγει την καρκινογένεση καθώς προκαλεί έκλυση παραγόντων φλεγμονής και παραγόντων επιβίωσης.

## **4) Ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας**

Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα αναδιπλασιασμού καθώς διαιρούνται με ένα πεπερασμένο αριθμό διαιρέσεων. Τα φυσιολογικά κύτταρα σταματούν να διαιρούνται λόγω της ελάτωσης του μήκους των άκρων των χρωμοσωμάτων (τελομερών) που

εξασφαλίζουν τη σωστή αντιγραφή και την αποφυγή ανώμαλης συνένωσης χρωμοσωμικών άκρων. Η προοδευτική βράχυνση του μήκους των χρωμοσωμάτων συνεχίζεται μέχρι να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της απόπτωσης λόγω έλλειψης τελομερών. Εν αντιθέσει, τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν την τελομεράση, ένα ένζυμο που διατηρεί το μήκος των τελομερών, προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων και επιτρέπει στο κύτταρο να πολλαπλασιάζεται ασταμάτητα (αθανатоποίηση). Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν το μήκος των τελομερών μεγαλύτερο από ένα κρίσιμο σημείο στο οποίο ενεργοποιείται η απόπτωση, με αποτέλεσμα να μπορούν να διαιρούνται επ' αόριστον.

### **5) Αγγειογένεση**

Όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, οι όγκοι χρειάζονται τροφή για να συντηρηθούν και να αναπτυχθούν, την οποία λαμβάνουν με τη μορφή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό, η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση ή νέο-αγγειογένεση) είναι εξαιρετικά σημαντική για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου, καθώς μέσω των νέων αγγείων τροφοδοτείται ο όγκος με πληθώρα θρεπτικών στοιχείων ή κατορθώνει να μεταφερθεί σε διαφορετική περιοχή (μετάσταση). Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων και ξεκινά όταν ενεργοποιηθεί ο λεγόμενος “αγγειογενετικός διακόπτης”, που συνήθως συνδυάζεται με την υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων όπως του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) και/ή του όξιου και αλκαλικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGF, Fibroblast Growth Factor) που δρουν μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων. Ακόμη, σε πολλούς όγκους έχει παρατηρηθεί η υποέκφραση του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), λόγω της απώλειας λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

### **6) Ενεργοποίηση της εισβολής και της μετάστασης**

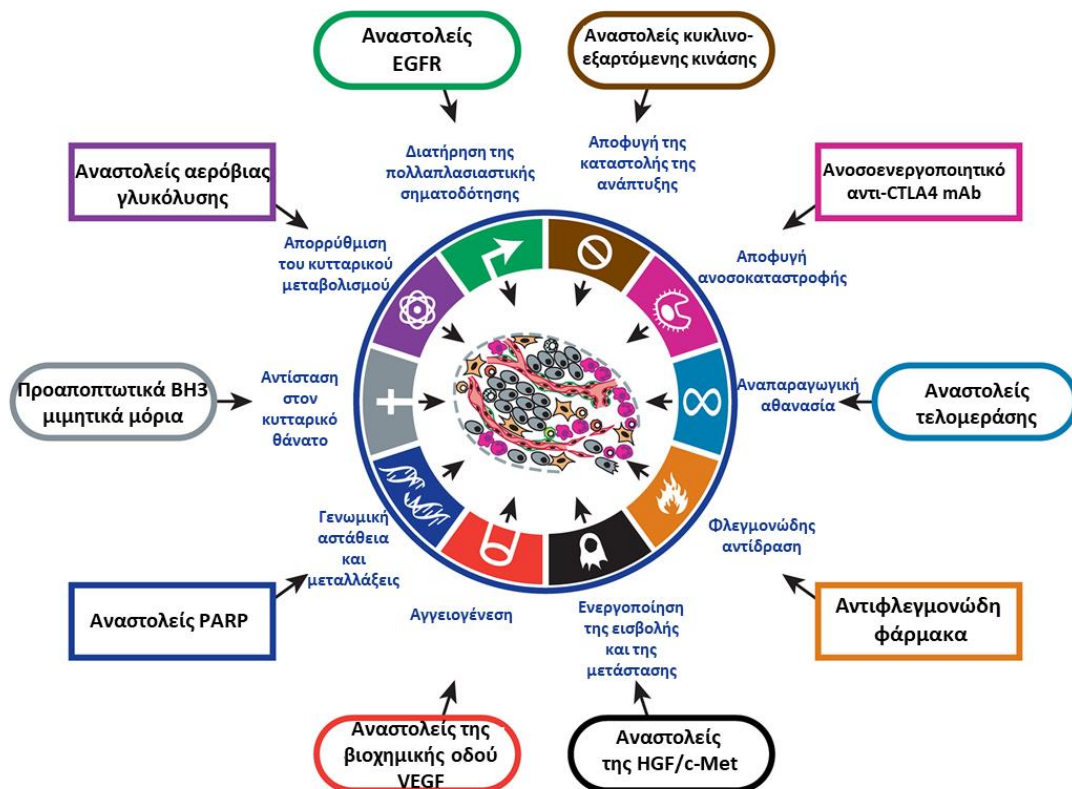
Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν τη δυνατότητα εισβολής σε γειτονικούς ιστούς και μετάστασης ακόμα και σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος που υποβοηθάται από την αγγειογένεση. Η διαδικασία της εισβολής και της μετάστασης δεν ήταν καθόλου κατανοητή έως το 2000, αλλά τα τελευταία χρόνια θεωρείται ως μια διαδικασία πολλαπλών διακριτών βημάτων, με διαδοχικές κυτταροβιολογικές αλλαγές. Ξεκινάει από την τοπική εισβολή, ακολουθεί η εισβολή καρκινικών κυττάρων σε κοντινά αγγεία διαπερνώντας τη βασική μεμβράνη, προάγεται η διέλευση των καρκινικών κυττάρων μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων ακολουθούμενη από τη διαφυγή καρκινικών κυττάρων από τον αυλό αυτών στο παρέγχυμα μακρινών ιστών (εξαγγείωση), και στο τέλος παρατηρείται η ανάπτυξη μικρομεταστατικών βλαβών σε μακροσκοπικούς όγκους (αποικισμός).

Εκτός από τα προαναφερθέντα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, τα τελευταία χρόνια έχουν προστεθεί επιπλέον χαρακτηριστικά από τους Hannah και Weinberg <sup>8</sup>:



- 7) **Το στρεσογόνο περιβάλλον:** Ο καρκίνος αναπτύσσεται και εξελίσσεται σε στρεσογόνο περιβάλλον το οποίο περιλαμβάνει το οξειδωτικό στρες (αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου – ROS), το μιτωτικό στρες, το πρωτεοτοξικό στρες, το μεταβολικό στρες, το στρες αντιγραφής και τις βλάβες στο DNA.
- 8) **Αναδυόμενες ιδιότητες του καρκίνου:** Περιλαμβάνουν την ικανότητα διαφυγής από μηχανισμούς ανοσοεπιτήρησης του οργανισμού (αποφυγή εξουδετέρωσης τους από την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού) και απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος).
- 9) **Επικουρικές ιδιότητες του καρκίνου:** Περιλαμβάνουν τη γενωμική αστάθεια (αυξημένη τάση του γονιδιώματος για νέες μεταλλάξεις) και τη φλεγμονώδη αντίδραση σχετιζόμενη με τον όγκο (το φλεγμονώδες διήθημα βοηθά στην ανάπτυξη του καρκίνου παρέχοντας του βιοενεργά μόρια όπως αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες επιβίωσης και προαγγειογενετικούς παράγοντες).

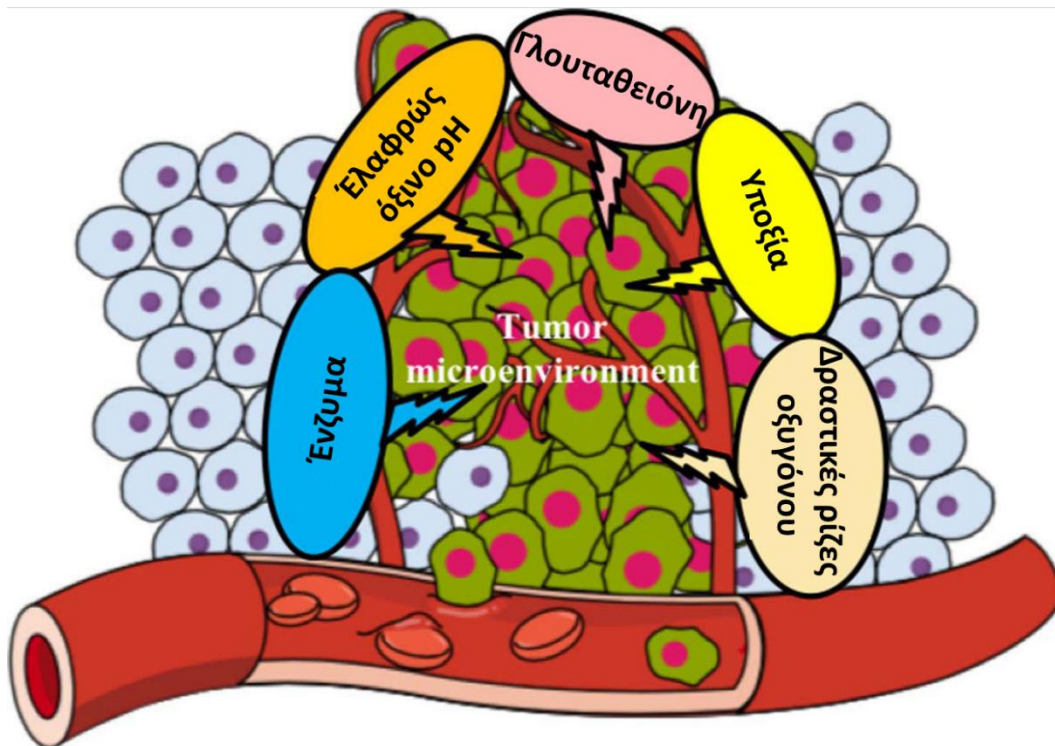
Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.3**, όπου παρουσιάζονται επίσης χαρακτηριστικά παραδείγματα θεραπευτικών προσεγγίσεων για το εκάστοτε χαρακτηριστικό.



**Εικόνα 1.3.** Τα ολικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων και ορισμένες χαρακτηριστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη στόχευσή τους <sup>8</sup>.

### 1.2.2 Διαφοροποιημένο μικροπεριβάλλον του καρκίνου

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων στον μεταβολισμό και τη συμπεριφορά τους έχουν ως αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να παρουσιάζουν ένα διαφοροποιημένο μικροπεριβάλλον. Το μικροπεριβάλλον αποτελείται από καρκινικά κύτταρα, στρωματικά καρκινικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων στρωματικών ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων και ανοσοκυττάρων όπως τα μικρογλοιακά, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, και μη κυτταρικά περιεχόμενα της εξωκυτταρικής μήτρας (Extracellular Matrix - ECM) όπως το κολλαγόνο, η ιννεκτίνη, η υαλουρονάνη και η λαμινίνη. Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου αποτελεί μια εξαιρετικά σημαντική συνιστώσα για την εξέλιξη, την επιβίωση και τη μετάσταση του όγκου, και γι' αυτό τον λόγο η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στη μελέτη του. Οι διακριτές διαφορές μεταξύ του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων και των υγιών κυττάρων αποτελούν θεμελιώδη σημεία αναφοράς για τη στοχευμένη θεραπεία. Τέτοιες διαφορές που μπορούν να εκμεταλλευτούν οι επιστήμονες αποτελούν η υποξία, τα επίπεδα ROS, το pH και διάφορα ένζυμα και υποδοχείς, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.4**. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά που διαφέρουν μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων περιγράφονται παρακάτω:



**Εικόνα 1.4.** Ορισμένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων<sup>9</sup>.

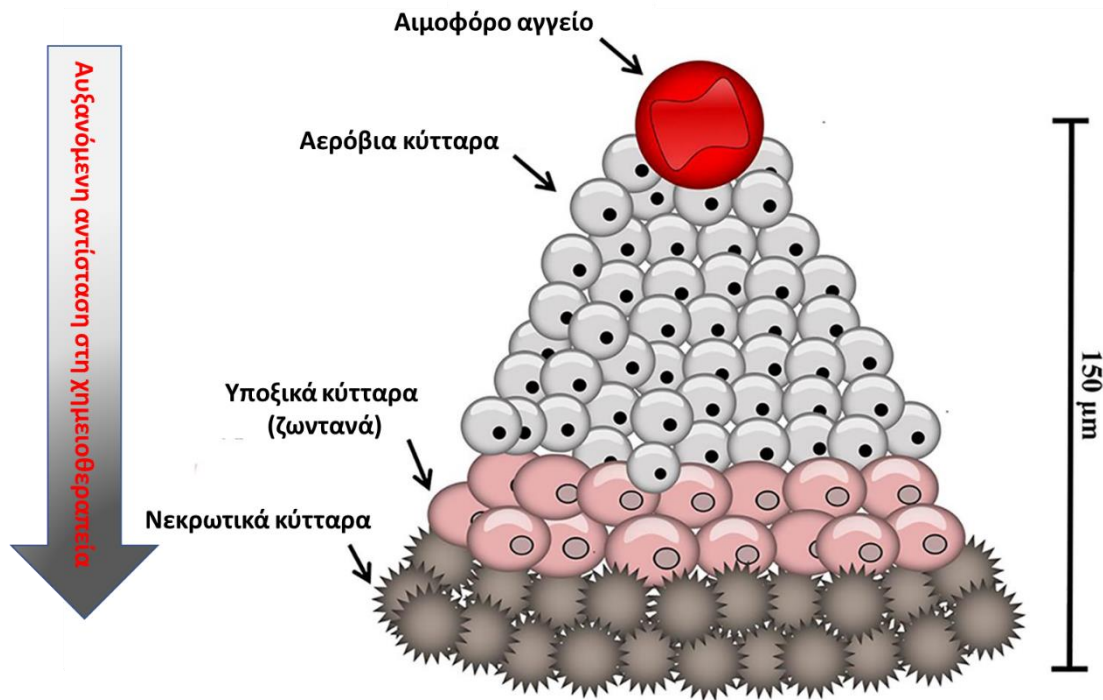
**Φαινόμενο Warburg:** Περίπου στο 1920 ο Otto Warburg παρατήρησε ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλότερους ρυθμούς πρόσληψης γλυκόζης και έκκρισης γαλακτικού οξέος σε σχέση με

τα φυσιολογικά κύτταρα, χωρίς την υποχρεωτική παρουσία οξυγόνου (αναερόβια γλυκόλυση). Αργότερα, το 1931, τιμήθηκε με το βραβείο Nobel για την έρευνα του σχετικά με τη σχέση οξυγόνου και καρκίνου. Τα φυσιολογικά κύτταρα παράγουν ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης ακολουθούμενη από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα παράγουν την ενέργειά τους κυρίως μέσω μιας υψηλού ρυθμού γλυκόλυσης που ακολουθείται από τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος, ακόμη και παρουσία άφθονου οξυγόνου. Η «αναερόβια γλυκόλυση» είναι λιγότερο αποτελεσματική από την οξειδωτική φωσφορυλίωση όσον αφορά την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Συγκεκριμένα, τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να παράγουν 36-38 μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης, ενώ τα καρκινικά κύτταρα χρειάζονται 19 μόρια γλυκόζης για να παράγουν τις ίδιες ποσότητες ATP (2 moles ATP κάθε ένα mole γλυκόζης). Επομένως, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες γλυκόζης, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, προκειμένου να κορέσουν τις ανάγκες τους, που ακολουθείται από την παραγωγή γαλακτικού οξέος και πρωτονίων. Σε αυτή την υπερκατανάλωση γλυκόζης έχει βασιστεί και η PET μεθοδολογία (Positron Emission Tomography) που αφορά τη διάγνωση του καρκίνου και στην οποία χρησιμοποιούνται μόρια γλυκόζης επισημασμένα με  $^{18}\text{F}$ .

Επίσης, το γαλακτικό οξύ και τα πρωτόνια που παράγονται κατά την αναερόβια γλυκόλυση εξέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα και δημιουργούν ένα ελαφρώς όξινο μικροπεριβάλλον <sup>10</sup>. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλότερο εξωκυτταρικό pH (pHe) από τα κανονικά ομόλογα κύτταρα αλλά παραδόξως υψηλότερο ενδοκυτταρικό. Για να διατηρηθεί το ενδοκυτταρικό pH (pHi), που είναι ελαφρώς αλκαλικό (~pH=7.4), τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν αρκετούς μηχανισμούς εξώθησης πρωτονίων όπως την αντλία  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NH Exchanger), τον μεταφορέα  $\text{HCO}_3^-$ , την καρβονική ανυδράση IX και την  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ΑΤΡαση <sup>11</sup>. Η ακριβής τιμή εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, αλλά σε γενικές γραμμές παρουσιάζουν περίπου 0.5-1 μονάδα διαφορά. Σε ορισμένους τύπους όγκων, όπως το ανθρώπινο καρκίνωμα του μαστού MCF-7, το pHe έχει βρεθεί να είναι 6.44.

Αυτή η διαφοροποίηση έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος στοχευμένης θεραπείας και διάγνωσης ενάντια του καρκίνου με χρήση δεσμών (π.χ. υδραζόνη) ή μορίων μεταφοράς (π.χ. λιποσώματα, νανοσωματίδια) τα οποία είναι ευαίσθητα στο ελαφρώς όξινο pH <sup>12</sup>.

**Υποξία:** Η υποξία (hypoxia) αναφέρεται στο φαινόμενο έλλειψης οξυγόνου ολόκληρου του σώματος ή ενός μέρους του. Τα καρκινικά κύτταρα λόγω της συσσωμάτωσής τους σχηματίζοντας συμπαγείς όγκους, στερούνται επαρκούς οξυγόνωσης σε κάποια μέρη τους, καθώς αναφέρεται πως το πιο κοντινό λειτουργικό αιμοφόρο αγγείο βρίσκεται σε απόσταση περίπου 100  $\mu\text{m}$  (**Εικόνα 1.5**). Ωστόσο, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός τους δεν επηρεάζονται βάσει του φαινομένου Warburg, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία χρειάζονται οξυγόνο για την επιβίωσή τους. Σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς όπου η ένταση οξυγόνου συνήθως υπερβαίνει τα 40 mmHg, σε όγκους μπορεί να παραμείνει 0-20 mmHg <sup>13</sup>.

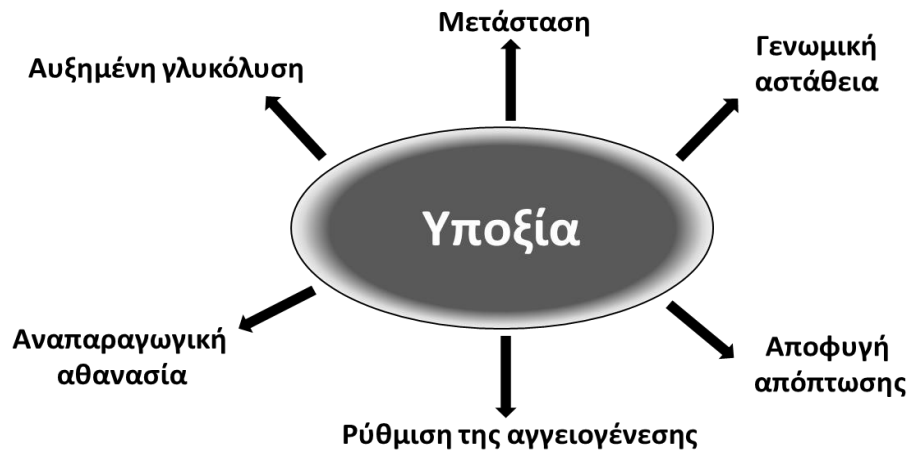


**Εικόνα 1.5.** Περιοχές με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου σε συμπαγείς όγκους. Οι όγκοι αποτελούνται από περιοχές οξυγονωμένων κυττάρων, που βρίσκονται κοντά στα αιμοφόρα αγγεία (αερόβια κύτταρα), οι οποίες μετατρέπονται σε περισσότερο υποξικές όταν αυξάνεται η απόσταση από τα αιμοφόρα αγγεία (υποξικά κύτταρα) <sup>14</sup>.

Η υποξία στους όγκους έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως: (i) Αδυναμία αγγειογένεσης που να συμβαδίζει με την ταχεία ανάπτυξη του όγκου (οι απαιτήσεις της κακοήθους κυτταρικής μάζας σε οξυγόνο ξεπερνούν την ικανότητα του αγγειακού συστήματος να της παρέχει οξυγονωμένο αίμα), (ii) αποδιοργανωμένη δομή των αγγείων και μη φυσιολογικές αγγειακές συνδέσεις εντός όγκων που οδηγούν σε ισχαιμία (ελλιπής αιμάτωση), και (iii) αυξημένη υδροστατική πίεση εντός του όγκου που οδηγεί σε συμπίεση του μικροαγγειακού συστήματος.

Η υποξία προκαλεί πρωτεομική και γονιδιωματικές αλλαγές εντός των καρκινικών κυττάρων και παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς συμβάλει στην επιβίωση και αναπαραγωγή τους μέσω διαφόρων βιοχημικών οδών. Σε υποξικές συνθήκες, ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων υφίσταται μεγάλες αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της γλυκόλυσης έναντι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, η υποξία ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και υποστηρίζει την αποφυγή της απόπτωσης. Επιπλέον, η υποξία συμβάλλει στις αλλαγές που παρέχουν απεριόριστες δυνατότητες αναπαραγωγής και στην έκφραση γονιδίων, επιτρέποντας την εισβολή και τη μετάσταση (**Εικόνα 1.6**). Ακόμη, η υποξία βοηθάει τα καρκινικά κύτταρα να αντισταθούν στη χημειοθεραπεία καθώς ενισχύει την αθανατοποίηση και την αντίσταση στην απόπτωση. Αξίζει να σημειωθεί πως τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χορηγούνται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος δεν μπορούν να φτάσουν στα υποξικά κύτταρα λόγω της μεγάλης

απόστασης τους από τα αιμοφόρα αγγεία, ενώ ορισμένα φάρμακα αδρανοποιούνται ή/και καταστρέφονται ελλείψει οξυγόνου (Εικόνα 1.6).

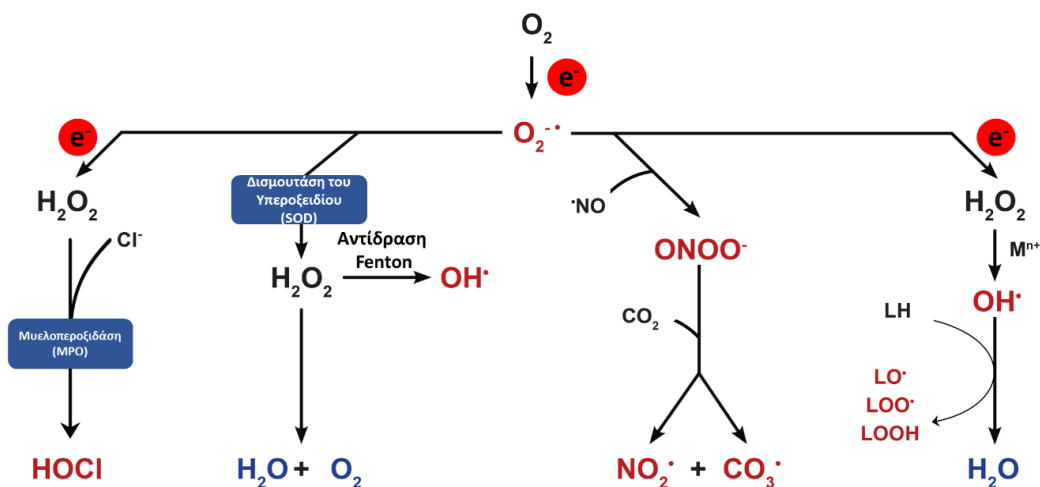


*Εικόνα 1.6. Ο ρόλος της υποξίας στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων.*

Σε μοριακό επίπεδο, η προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό στρες ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον επαγόμενο από υποξία παράγοντα (Hypoxia-Inducible Factor - HIF), έναν παράγοντα μεταγραφής που συσσωρεύεται ως απόκριση στα μειωμένα επίπεδα κυτταρικού οξυγόνου. Έχουν ταυτοποιηθεί τρία ανθρώπινα μέλη της οικογένειας HIF: HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Τα ετεροδιμερή αυτά αποτελούνται από την  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδα, οι οποίες διαχωρίζονται παρουσία οξυγόνου. Από τις τρεις ισομορφές, συνήθως ο HIF-1 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα <sup>15</sup>. Η μεταγραφή του HIF-1 $\alpha$  δεν απαιτεί οξυγόνο, ωστόσο, παρουσία οξυγόνου, ο HIF-1 $\alpha$  αποδομείται γρήγορα, μια διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω της ουμπικιτίνης, που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη καταστολής όγκου pVHL (πρωτεΐνη Von-Hippel-Lindau) <sup>16</sup>. Σε αντίθεση, ο HIF-1 $\beta$  δεν εξαρτάται από το οξυγόνο και είναι συνεχώς παρόν. Σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, ο HIF-1 $\alpha$  σταθεροποιείται και μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου συνδέεται με τον ετεροδιμερικό του HIF-1 $\beta$  προκαλώντας μια διαμορφωτική αλλαγή και τον σχηματισμό του ενεργού HIF-1 <sup>17</sup>. Πάνω από 100 γονίδια ρυθμίζονται άμεσα και έμμεσα από τον HIF <sup>14</sup>. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε πληθώρα λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της προώθησης της αγγειογένεσης, της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της εισβολής/μετάστασης και της μεταβολικής προσαρμογής <sup>18</sup>. Πολλά από τα γονίδια που επηρεάζονται από τον HIF-1 υπερεκφράζονται στους όγκους σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς (π.χ. ο VEGF και οι μεταφορείς γλυκόζης 1 και 2). Ο συνδυασμός των HIF-1, c-MYC και p53 έχει περιγραφεί ως η «τριάδα» των μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση του μεταβολισμού της ενέργειας στους όγκους <sup>19</sup>. Ακόμη, η οδός της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K) μέσω της ενεργοποίησης-φωσφορυλίωσης του Akt (γνωστό και ως πρωτεϊνική κινάση B) έχει επίσης εμπλακεί στη γένεση του φαινομένου Warburg μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του HIF-1 <sup>20</sup>. Στην πραγματικότητα, η απώλεια των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53, PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) και VHL, ή η ενεργοποίηση ογκογόνων, όπως των Ras, SRC και PI3K, προκαλούν συσσώρευση του HIF-1

ανεξάρτητα από την ποσότητα του οξυγόνου<sup>21</sup>. Σε υποξικό περιβάλλον ευνοείται η υπερέκφραση αναγωγασών (όπως της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P450), οι οποίες ανάγουν κυρίως αρωματικές νιτρο- ομάδες προς τις αντίστοιχες υδροξυλαμίνες/αμίνες. Υπάρχουν διάφορα θεραπευτικά μόρια που βασίζονται στο φαινόμενο της υποξίας και έχουν βρεθεί σε κλινικές μελέτες, όπως η τιραπαζαμίνη (TPZ) και η ανθρακινόνη (AQ4N)<sup>22</sup>.

**Αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS):** Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι χημικά δραστικά μόρια που περιέχουν οξυγόνο, τα οποία παράγονται φυσικά στο ανθρώπινο σώμα ως αναπόφευκτο υποπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα των ROS ρυθμίζονται προσεκτικά και λειτουργούν ως αγγελιοφόροι στη φυσιολογική μεταγωγή κυτταρικού σήματος, στην έκφραση γονιδίων και στην οξειδοαναγωγική ισορροπία. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αποδειχθεί ότι η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που εντείνουν την ανάπτυξη, την πρόοδο και τη μετάσταση του καρκίνου στα ανθρώπινα κύτταρα. Αυτή η διαταραχή της ομοιόστασης προκαλείται από τις αυξημένες ελεύθερες ρίζες, κυρίως δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικές. Οι κύριες ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν κυρίως τα μιτοχόνδρια, τα φλεγμονώδη κύτταρα και διάφορα ενζυμικά κυτταρικά σύμπλοκα, ενώ οι εξωγενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν την ακτινοβολία και ποικίλες χημικές ενώσεις. Τέτοιες ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε διάφορα σημαντικά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και βλάβη διάφορων ανθρώπινων ιστών. Οι ROS μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και μη ριζικές ROS. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), τη ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ) και του οξειδίου του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ), και οργανικές ρίζες ( $R^{\cdot}$ ). Μη ριζικές ROS περιλαμβάνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το οξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1O_2$ ), και το όζον ( $O_3$ ). Μεταξύ αυτών, οι ρίζες υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και υδροξυλίου έχουν μελετηθεί περισσότερο όσον αφορά τον καρκίνο (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Τα κύρια προϊόντα ROS που προκύπτουν απ' την αναγωγή του στοιχειακού οξυγόνου.

Στα καρκινικά κύτταρα, τα υψηλά επίπεδα ROS μπορεί να προκύψουν από την αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την αυξημένη σηματοδότηση κυτταρικών υποδοχέων, τη δραστηριότητα ογκογονιδίων κ.α. Το σύμπλοκο I και III της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, υπό υψηλό δυναμικό μεμβράνης, θεωρούνται ότι είναι τα κύρια σημεία προέλευσης των ROS, αν και άλλες οδοί μπορούν επίσης να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο στις αυξημένες ποσότητες των ROS, όπως η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση, το μιτοχονδριακό p66<sup>Shc</sup>, και Nrf2 (erythroid-derived 2)-like-2 factor). Η αυξημένη παραγωγή ROS ή/και ο ελαττωματικός αμυντικός μηχανισμός οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες που αυτά με τη σειρά τους οδηγούν σε διαφορετικές επικίνδυνες παθολογικές καταστάσεις. Το οξειδωτικό στρες είναι μία από τις κύριες αιτίες τοξικότητας, που αποδίδεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις των ROS με μακρομόρια όπως DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες <sup>23</sup>.

Τα επίπεδα ROS στα καρκινικά κύτταρα είναι συνυφασμένα με την ύπαρξη υποξίας, καθώς έχει παρατηρηθεί πως η υποξία παράγει ROS, τα οποία ενεργοποιούν την υπομονάδα HIF1α, απενεργοποιώντας τον αναστολέα της, PHD (Prolyl Hydroxylase Domain). Ακόμη, τα ROS που βασίζονται στην υποξία ενεργοποιούν και άλλους παράγοντες μεταγραφής όπως ο NRF2, ο οποίος κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα <sup>24</sup>.

Οι επιστήμονες εκμεταλλεύονται τα αυξημένα επίπεδα ROS των καρκινικών κυττάρων για αναπτύξουν φαρμακευτικά μόρια τα οποία ανταποκρίνονται εκλεκτικά στα ROS, όπως τα αρυλοβορονικά οξέα και οι εστέρες τους που αλληλεπιδρούν και διασπώνται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ένα από τα κλασσικά ROS στα καρκινικά κύτταρα <sup>25</sup>.

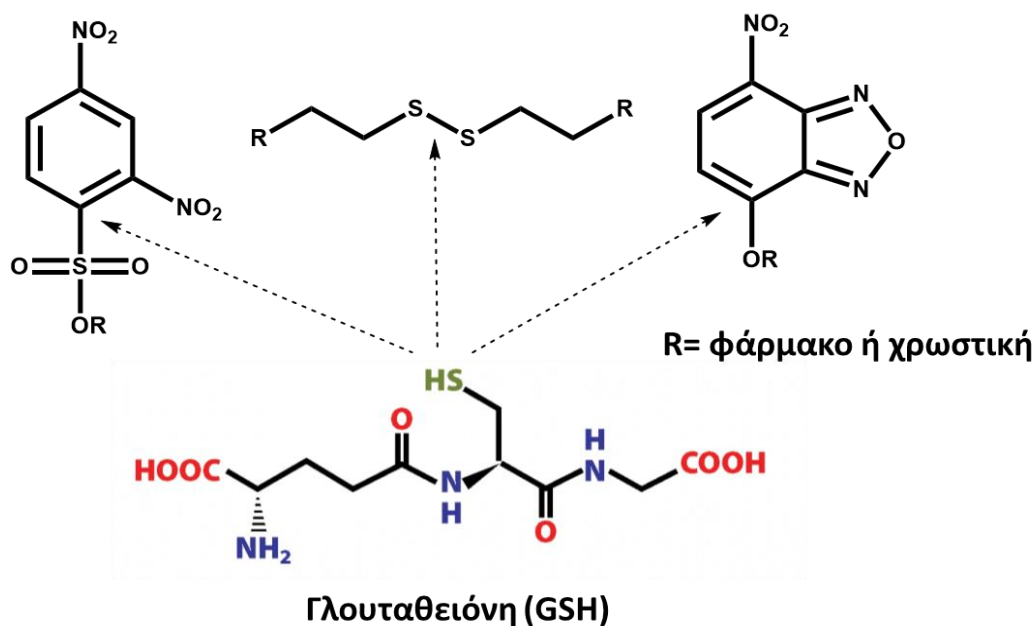
**Αυξημένη διαπερατότητα και κατακράτηση των μεμβρανών των καρκινικών κυττάρων (EPR Φαινόμενο):** Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αγγειογένεση ώστε να τροφοδοτούνται διαρκώς με τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, τα νεοσυντιθέμενα αγγεία έχουν δομικές ανωμαλίες όπως διανοίξεις, ελαττωματικές μεμβράνες και στερούνται της παρουσίας λεμφοκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι επιστήμονες να εκμεταλλεύονται τα προαναφερθέντα ελαττώματα για την ανάπτυξη στοχευμένης θεραπείας ή/και διάγνωσης. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια μεγέθους 10-100 nm έχουν την ικανότητα να διαπερνούν από τα κενά στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων λόγω της κακής αρχιτεκτονικής και να συσσωρεύονται στη περιοχή του όγκου.

**Αυξημένη συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH):** Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται ενδοκυτταρικά μέσω δύο σταδίων, που καταναλώνουν ATP, τα οποία καταλύονται από την συνθετάση γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS) και τη συνθάση GSH, και αποτελείται από τρία αμινοξέα: L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη και L-γλυκίνη (**Εικόνα 1.7**) Η γλουταθειόνη συμμετέχει στην ανάπτυξη και τη συντήρηση των πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών, στη μεταφορά αμινοξέων μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και στην αποτοξίνωση. Λόγω της

ελεύθερης διόλης που περιέχει, αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού που τον προστατεύει από τα ROS. Η GSH υφίσταται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, ενώ οι συγκεντρώσεις της έχει παρατηρηθεί ότι είναι ανεβασμένες σε ποικίλους όγκους.

Στα υγιή κύτταρα, η γλουταθειόνη υπάρχει σε δύο καταστάσεις: Την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG) μορφή. Στην ανηγμένη κατάσταση, η GSH είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό που εξουδετερώνει τις ROS. Καθώς δίνει το ένα ηλεκτρόνιο της, η ίδια η GSH γίνεται ενεργή και αντιδράει εύκολα με άλλα μόρια GSH για να σχηματίσει το μόριο GSSG με κατάλυση από την περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Η παρακολούθηση της αναλογίας της ανηγμένης GSH ως προς την οξειδωμένη GSSG μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της κατάστασης οξειδοαναγωγής των κυττάρων και των ιστών. Υπό κανονικές συνθήκες, η GSH σε κύτταρα θηλαστικών κυμαίνεται συνήθως σε συγκέντρωση από 1 - 10 nM, με τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας να έχουν μοριακές αναλογίες GSH:GSSG που υπερβαίνουν τα 100: 1. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, η GSSG συσσωρεύεται και η αναλογία GSH/GSSG μειώνεται σε αναλογίες τόσο χαμηλές όσο 10:1, ή ακόμη και 1:1. Ως εκ τούτου, η παρακολούθηση των επιπέδων GSH/GSSG σε βιολογικά δείγματα έχει καταστεί χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων και των ιστών και των κυτταρικών τραυματισμών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

Δεδομένης της υπερέκφρασης της γλουταθειόνης στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες οι οποίες αλληλεπιδρούν με αυτή και ελευθερώνουν το φάρμακο ή τη χρωστική εκλεκτικά στον όγκο. Τέτοιες χαρακτηριστικές ομάδες αποτελούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί και ηλεκτρονιόφιλα μόρια όπως ο 2,4-δινιτροσουλφονικός εστέρας<sup>26</sup> (Εικόνα 1.7).



**Εικόνα 1.7.** Η δομή της γλουταθειόνης και τριών κλασικών ομάδων αλληλεπίδρασης με την γλουταθειόνη. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία πυρηνόφιλης προσβολής της θειόλης της γλουταθειόνης.



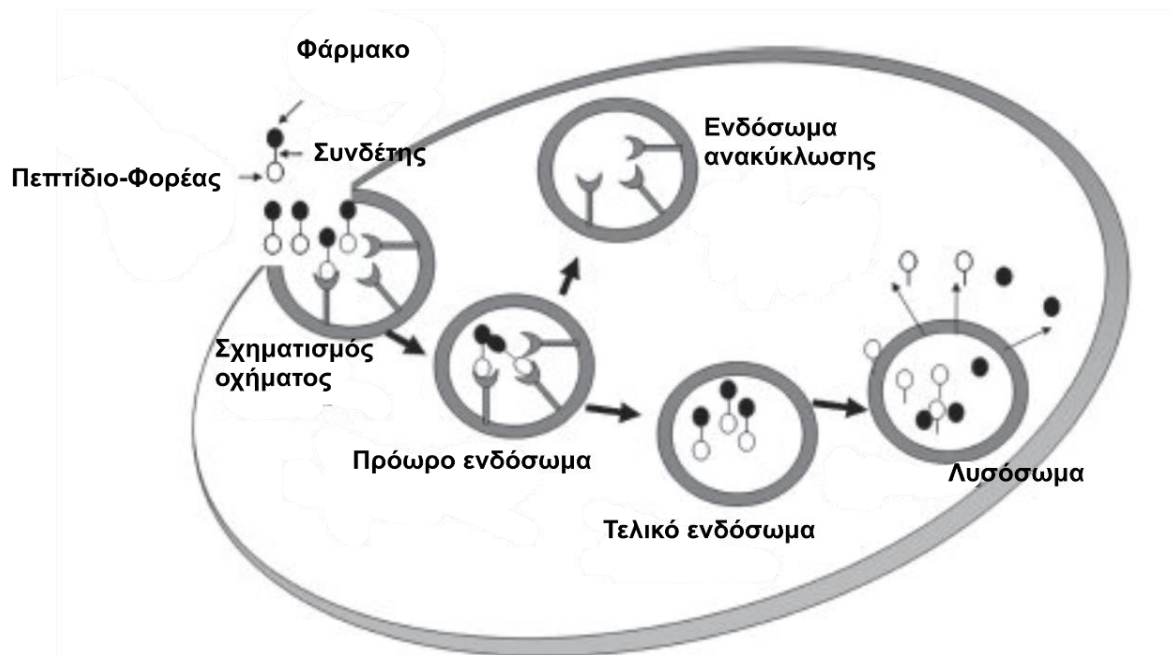
**Υπερέκφραση υποδοχέων:** Χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η υπερέκφραση υποδοχέων που βρίσκονται είτε εξωκυττάρια είτε ενδοκυττάρια. Η επιστημονική κοινότητα εκμεταλλεύεται συγκεκριμένα μόρια (π.χ. πεπτίδια) τα οποία προσδένονται εκλεκτικά στους υποδοχείς αυτούς και έπειτα ακολουθεί η διαδικασία της ενδοκύττωσης, δηλαδή της εσωτερίκευσης του εξωκυτταρικού υλικού σε ενδοκυτταρικά κυστίδια με αποτέλεσμα τα πεπτίδια να καταλήγουν στα λυσοσώματα (**Εικόνα 1.8**). Αυτή η κυτταρική οδός επιτρέπει στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης τη μεταφορά των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων προς το εσωτερικό του κυττάρου, και την εκκίνηση της σηματοδότησης. Η μεταφορά στα πρώιμα ενδοσώματα συμβαίνει μέσα σε λίγα λεπτά. Λόγω του χαμηλού pH, περίπου 5.5-6.5, στο εσωτερικό του ενδοσώματος, ο συνδέτης μπορεί να απελευθερωθεί από τον υποδοχέα και να μεταφερθεί περαιτέρω στα τελικά ενδοσώματα. Τα πρόωρα ενδοσώματα είναι επίσης υπεύθυνα για τη λεγόμενη ‘διαλογή του υποδοχέα’, η οποία καθορίζει την τύχη του. Εάν το κύτταρο χρειάζεται να απευαισθητοποιηθεί, δηλαδή, να εξαλειφθεί το ερέθισμα, οι υποδοχείς ταξινομούνται σε τελικά ενδοσώματα και στη συνέχεια σε λυσοσώματα για την αποικοδόμηση. Εάν το κύτταρο χρειάζεται να ξαναευαισθητοποιηθεί, δηλαδή να συνεχίσει να αποκρίνεται στο ερέθισμα, οι υποδοχείς οδηγούνται πίσω προς την μεμβράνη του πλάσματος απευθείας ή μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Η οδός διαλογής του υποδοχέα προσδιορίζεται από τον τύπο του υποδοχέα και το επίπεδο της ενεργοποίησης. Τελικά, τα συζεύγματα καταλήγουν στο λυσοσώμα όπου υπερεκφράζεται πληθώρα ενζύμων (π.χ. εστεράσες και αμιδάσες) και οι τιμές pH κυμαίνονται στο 4.5-5.5.

Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν:

**A.** Ο υποδοχέας της Εκλυτικής Ορμόνης των Γοναδοτροπινών (GnRHR), γνωστός και ως υποδοχέας ορμόνης απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRHR), είναι μέλος της οικογένειας των επτά-διαμεμβρανικών υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (G-Protein Coupled Receptor - GPCR). Είναι ο υποδοχέας της ορμόνης που απελευθερώνει γοναδοτροπίνη. Ο GnRHR εκφράζεται στην επιφάνεια των γοναδοτροπικών κυττάρων της υπόφυσης καθώς και των λεμφοκυττάρων, του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη. Αποτελεί έναν υποδοχέα συζευγμένο με μια G-πρωτεΐνη με συνολικό μοριακό βάρος 60 kDa και βρίσκεται κυρίως στην υπόφυση.

**B.** Ο υποδοχέας του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελεί υποδοχέα για τα μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (οικογένεια EGF) εξωκυτταρικών πρωτεϊνών-προσδετών. Αποτελεί μέλος της οικογένειας υποδοχέων ErbB, μια υποοικογένεια τεσσάρων στενά συγγενών υποδοχέων τυροσινικών κινασών: EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), HER 3 (ErbB-3) και HER 4 (ErbB-4). Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση ή τη δραστηριότητα του EGFR οδηγούν συχνά σε καρκίνο.

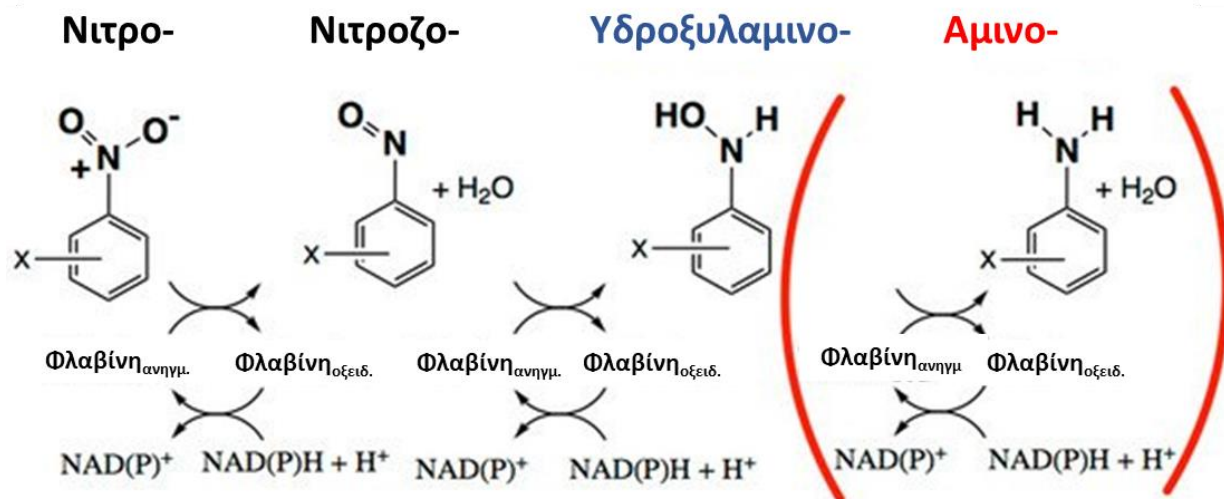
Γ. Οι υποδοχείς των ιντεγκρινών (Integrin Receptors), γνωστοί και ως ιντεγκρίνες, είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που διευκολύνουν την πρόσφυση κυττάρων και μεταξύ κυττάρων και της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Κατά τη σύνδεση ενός προσδέτη, οι ιντεγκρίνες ενεργοποιούν τις οδούς μεταγωγής σήματος όπως ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, οργάνωση του ενδοκυτταρικού κυτταροσκελετού και έκφραση νέων υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη. Φυσικοί προσδέτες για τις ιντεγκρίνες αποτελούν η ινονηκτίνη, η βιτρονεκτίνη, το κολλαγόνο και η λαμινίνη.



**Εικόνα 1.8.** Γενικός τρόπος δράσης συζευγμάτων πεπτιδίων που προσδέονται εκλεκτικά σε συγκεκριμένους υποδοχείς που υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και ύστερα από ενδοκύττωση, καταλήγουν στο λυσόσωμα.<sup>27</sup>

**Ένζυμα:** Τα ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως μακρομοριακοί βιολογικοί καταλύτες στην πλειονότητα των μεταβολικών διεργασιών. Η παθολογία πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου σχετίζεται με τη δυσλειτουργία ενζύμων ή τη διαφοροποίηση της έκφρασής τους. Τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων ενζύμων έχουν παρατηρηθεί αυξημένα σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα ομόλογα φυσιολογικά κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων ενζύμων στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στοχευμένη ενεργοποίηση ενός προφαρμάκου στην επιθυμητή θέση-στόχο. Τα πιο συνηθισμένα ένζυμα που σχετίζονται με τον καρκίνο και έχουν χρησιμοποιηθεί από την επιστημονική κοινότητα είναι οι μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMPs), η καθεψίνη B, η νιτροαναγωγή και η αλκαλική φωσφατάση.

- Νιτροαναγωγάσες:** Οι νιτροαναγωγάσες (Nitroreductases – NTRs) είναι οξειδοαναγωγικές φλαβοπρωτεΐνες που καταλύουν την αναγωγή νιτροομάδων διαδοχικά σε νιτροζο-, υδροξυλαμινο- και αμινο- ομάδες αρωματικών δακτυλίων παρουσία NAD(P)H (φωσφορικό δινουκλεοτιδικό β-νικοτιναμίδιο αδενίνης) ως δότη ηλεκτρονίων (**Σχήμα 1.2**). Είναι κοινώς αποδεκτό πως σε καταστάσεις υποξίας υπερεκφράζονται διάφορα ένζυμα όπως νιτροαναγωγάσες, αζοαναγωγή και DT-διαφοράση.



**Σχήμα 1.2.** Βιοχημική αναγωγή νιτροαρωματικών ομάδων σε διαδοχικά στάδια δύο ηλεκτρονίων που καταλύονται από νιτροαναγωγάσες (NTRs). Οι δύο πρώτες αναγωγές υφίστανται σε κάθε περίπτωση, ενώ η τρίτη αποτελεί περιστασιακή αναγωγή και η εμφάνισή της δεν είναι τόσο κατανοητή ακόμα<sup>28</sup>.

Οι νιτροαναγωγάσες χωρίζονται σε δύο ομάδες:

**A)** NTRs τύπου I που δεν είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο και μπορούν να πραγματοποιούν αναγωγές παρουσία μοριακού οξυγόνου,

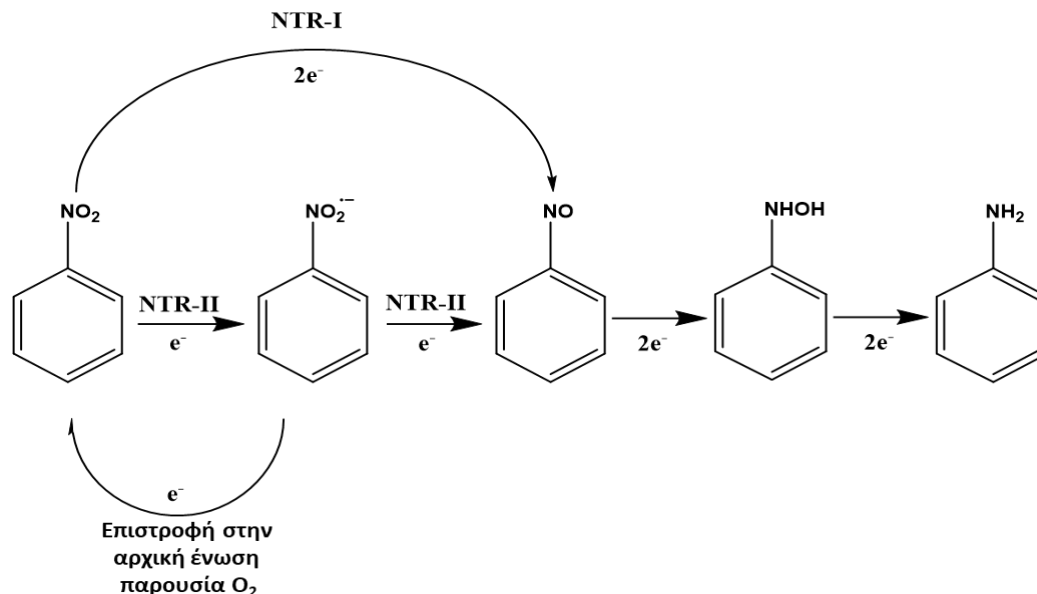
και

**B)** NTRs τύπου II που είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο και μπορούν να καταλύουν αναγωγές μόνο απουσία οξυγόνου.

Οι NTR-I, που δεν είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο, περιλαμβάνουν δύο διαδοχικές αναγωγές μέσω μεταφορών δύο ηλεκτρονίων προς υδροξυλαμινο- ομάδα, ενώ οι NTR-II, που είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο, ανάγουν τις νιτρο- ομάδες μέσω μεταφορών μονήρων ηλεκτρονίων που δίνουν ενδιάμεσες νιτρο- ρίζες που μπορούν είτε να οξειδωθούν πίσω στις αρχικές τους μορφές από μοριακό οξυγόνο είτε να αναχθούν σε νιτροζο- ομάδες (**Σχήμα 1.3**).

Η αναγωγή σε υδροξυλαμίνη ή αμίνη οδηγεί σε αλλαγή από ηλεκτρονιακής άποψης, καθώς η νιτροομάδα είναι ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων (συζυγιακά), ενώ οι υδροξυλαμίνη και η αμίνη

είναι δότες ηλεκτρονίων (συζυγικά). Η αλλαγή αυτή παρέχει έναν επιλεκτικό «διακόπτη» για την ενεργοποίηση μιας αδρανούς ένωσης που οδηγεί στην επακόλουθη απελευθέρωση του δραστικού παράγοντα (π.χ. φάρμακο ή χρωστική).

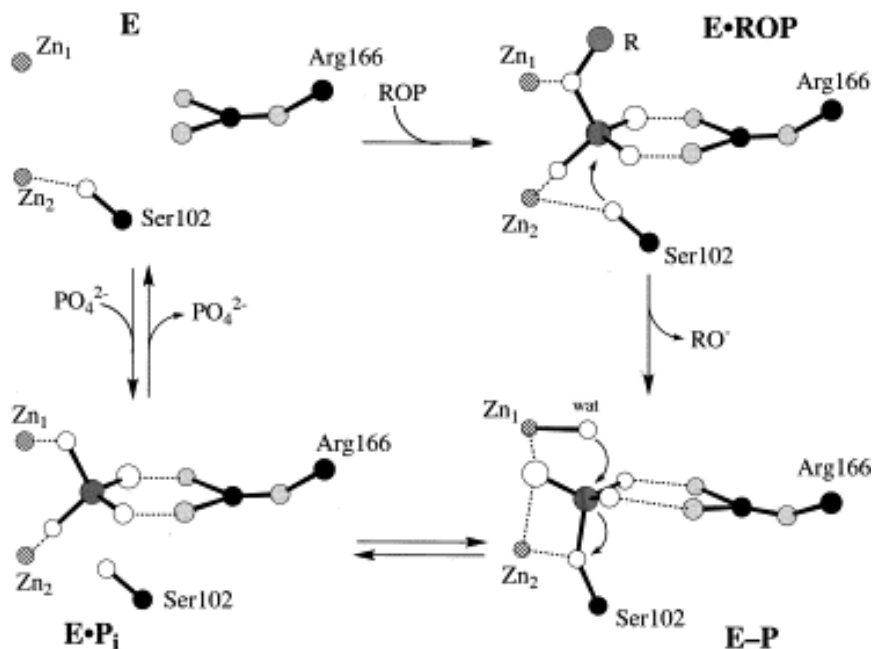


**Σχήμα 1.3.** Απεικόνιση της αναγωγής ενός νιτροαρωματικού υποστρώματος με νιτροαναγωγάσες τύπου I (ανεξάρτητη από το οξυγόνο) μέσω ενός βήματος απευθείας μεταφοράς 2e<sup>-</sup> και τύπου II (εξαρτώμενη από το οξυγόνο) με 2 διαδοχικά βήματα μεταφοράς 1e<sup>-</sup>.<sup>29</sup>

- Αλκαλική Φωσφατάση:** Η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase – ALP) είναι ένα ομοδιμερές μεταλλοένζυμο μοριακού βάρους 86 kD. Κάθε μονομερές περιέχει πέντε υπολείμματα κυστεΐνης, δύο άτομα ψευδαργύρου και ένα άτομο μαγνησίου ζωτικής σημασίας για την καταλυτική του λειτουργία, και είναι βέλτιστα ενεργό σε περιβάλλοντα αλκαλικού pH. Ανήκει στην κατηγορία των υδρολασών και η φυσιολογική της λειτουργία περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση, κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων. Στους ανθρώπους, η αλκαλική φωσφατάση υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ιστούς σε όλο το σώμα, αλλά συγκεντρώνεται ιδιαίτερα στο ήπαρ, τους χολικούς αγωγούς, τα νεφρά, τα οστά, τον εντερικό βλεννογόνο και τον πλακούντα. Στον ορό του αίματος κυριαρχούν δύο τύποι ισοενζύμων αλκαλικής φωσφατάσης: Ο σκελετικός και ο ηπατικός. Κατά την παιδική ηλικία, η πλειονότητα της αλκαλικής φωσφατάσης είναι σκελετικής προέλευσης. Οι άνθρωποι γενικά περιέχουν τις ακόλουθες αλκαλικές φωσφατάσες:
  - ALPI - εντερική (Intestinal ALP)
  - ALPL - μη ειδική ιστική (Tissue-nonspecific ALP)
  - ALPP - πλακουντιακή (Placental ALP)
  - ALPG – μικροβιακή (Germ ALP)

Τέσσερα γονίδια κωδικοποιούν τα τέσσερα ισοένζυμα. Το γονίδιο για τη μη ειδική ιστική αλκαλική φωσφατάση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 και τα γονίδια για τις άλλες τρεις ισομορφές βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2.

Ο μηχανισμός δράσης της ALP κατά την υδρόλυση ενός φωσφορικού μονοεστέρα (ROP) προς την αντίστοιχη αλκοόλη (RO<sup>-</sup>) παρατίθεται στο **Σχήμα 1.4**. Τα αμινοξέα τα οποία είναι απαραίτητα για την αποφωσφορυλίωση είναι η Ser<sup>102</sup>, η Arg<sup>166</sup>, το Asp<sup>327</sup> και η His<sup>412</sup>. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (E-ROP) περιλαμβάνει τη συναρμογή του οξυγόνου του εστέρα με τον Zn<sub>1</sub>, και επιπλέον αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μη γεφυρωτικών ατόμων οξυγόνου του υποστρώματος, του Zn<sub>2</sub> και της γουανιδινομάδας της Arg<sup>166</sup>. Η Ser<sup>102</sup> καταλαμβάνει τη θέση απέναντι από την ομάδα αποχώρησης. Κατά τον σχηματισμό του ομοιοπολικού ενδιάμεσου E-P (Ενζυμο-Φωσφορικό άλας), το φωσφορικό άλας κινείται ελαφρώς μέσα στην κοιλότητα της ενεργού θέσης του ενζύμου διατηρώντας αλληλεπιδράσεις τόσο με την Arg<sup>166</sup> όσο και με τα ιόντα ψευδαργύρου. Σε αλκαλικό pH, ένα πυρηνόφιλο υδροξείδιο που συντονίζεται με τον Zn<sub>1</sub> προσβάλλει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο E-P σχηματίζοντας το μη ομοιοπολικό σύμπλοκο E-Pi. Η αργή διάσπαση της φωσφορικής ομάδας από αυτό το σύμπλοκο αποτελεί το αργό βήμα που καθορίζει τον ρυθμό της αντίδρασης υπό αλκαλικές συνθήκες.



**Σχήμα 1.4.** Προτεινόμενος μηχανισμός κατάλυσης της ALP στην υδρόλυση των φωσφορικών μονοεστέρων. Οι γεωμετρίες του συμπλόκου E-Pi και του ενδιάμεσου E-P έχουν βρεθεί από τις κρυσταλλικές δομές ακτινών-X των φυσικών ενζύμων και των ενζύμων υποκατεστημένων με Cd, αντίστοιχα. Τα άτομα υδρογόνου, το ιόν μαγνησίου και οι προσδέτες προς τα Zn<sub>1</sub> και Zn<sub>2</sub> δεν παρουσιάζονται <sup>30</sup>.

Η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου διαθέτει σημαντική διαγνωστική αξία για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών όπως ηπατικών νόσων, οστικών βλαβών, απόφραξη των χολών, χοληδόχου κύστης και καρκίνων. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ALP στο αίμα μπορούν να αυξηθούν σημαντικά σε περιπτώσεις όπου ένας ή περισσότεροι χοληφόροι αγωγοί είναι αποκλεισμένοι. Αυτό μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα φλεγμονής της χοληδόχου κύστης (χολοκυστίτιδας) ή χολόλιθων. Μικρότερες αυξήσεις της ALP στο αίμα παρατηρούνται στον καρκίνο και στην κίρρωση του ήπατος. Οποιαδήποτε κατάσταση που προκαλεί υπερβολικό σχηματισμό οστών, συμπεριλαμβανομένων διαταραχών των οστών όπως η νόσος του Paget, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα ALP. Για παράδειγμα, τα παιδιά και οι έφηβοι έχουν συνήθως υψηλότερα επίπεδα ALP στο αίμα επειδή τα οστά τους εξακολουθούν να αυξάνονται και ως εκ τούτου, η δοκιμή ALP πρέπει να ερμηνεύεται με διαφορετικές τιμές αναφοράς. Εάν η τιμή της ALP είναι αυξημένη αλλά δεν είναι σαφές εάν αυτό οφείλεται σε ηπατική ή οστική νόσο, μπορούν να γίνουν μελέτες για τα ισοένζυμα της που οδηγούν στον προσδιορισμό της ακριβούς αιτίας. Η ολική αλκαλική φωσφατάση προσδιορίζεται με μεθόδους όπως η φασματοφωτομετρική μέθοδος των Bowers και McComb <sup>31</sup>, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για τη μέτρηση της ALP όπως χρωματομετρικές και ηλεκτροχημικές, Raman (SERRS - Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy) <sup>32</sup>, αλλά και τεχνικές φθορισμού <sup>33</sup>.

### 1.3 Θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου

Για την αντιμετώπιση του καρκίνου απαιτείται η έγκαιρη διάγνωση και έπειτα η κατάλληλη θεραπεία. Η αναγνώριση του νεοπλασματικών κυττάρων σε πρώιμο στάδιο επιτρέπει συνήθως και την αποτελεσματική θεραπεία στη πλειοψηφία των περιπτώσεων. Οι βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται αποτελούν η χειρουργική αφαίρεση, η ακτινοβολία, η χημειοθεραπεία και ο συνδυασμός αυτών. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου αποτελεί το πρώτο βήμα στη θεραπεία, με τη προϋπόθεση όμως ότι ο όγκος είναι μικρός σε μέγεθος και χωροταξικά εντοπισμένος. Η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αποτελεί την αναπόφευκτη μέθοδο όταν υπάρχει διασπορά των καρκινικών κυττάρων ή όταν το σημείο που εμφανίζεται ο όγκος δεν είναι χειρουργήσιμο.

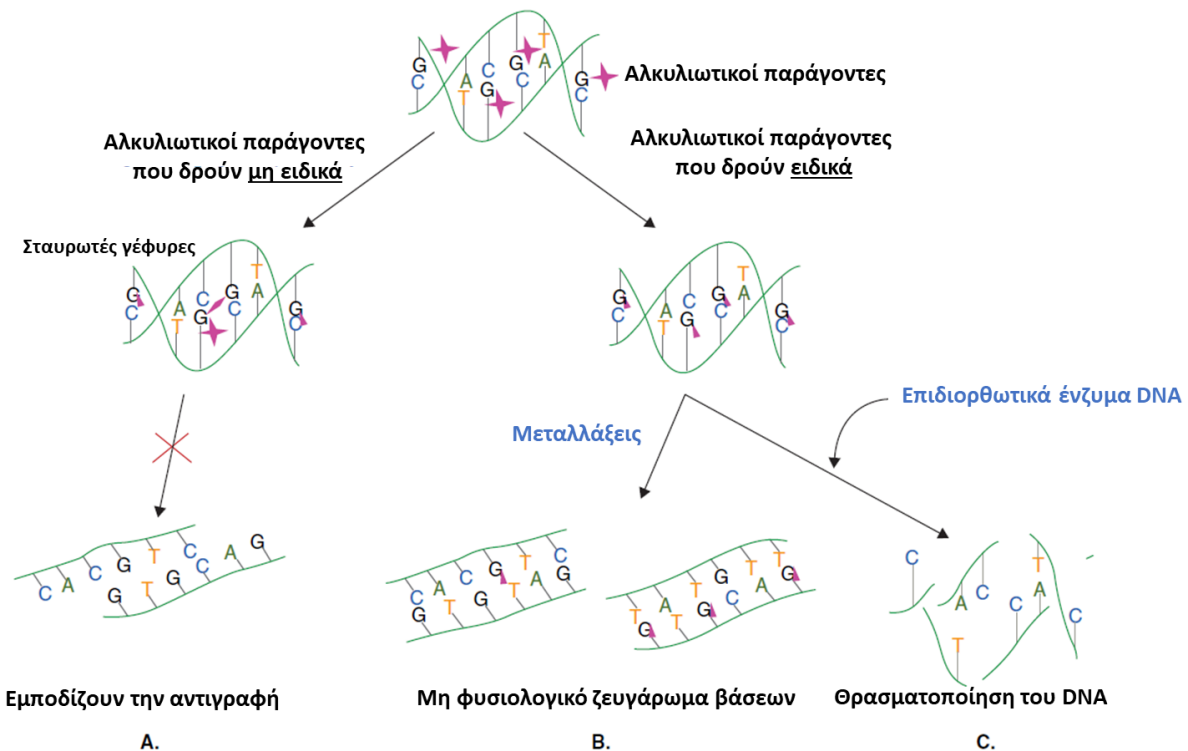
#### 1.3.1 Αντικαρκινικές θεραπείες

Τα αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 μεγάλες κατηγορίες οι οποίες έπειτα μπορούν να διαιρεθούν σε υποκατηγορίες. Οι κύριες κατηγορίες αντικαρκινικών θεραπειών είναι τα κυτταροτοξικά φάρμακα (π.χ. αντιμεταβολίτες, αλκυλιωτικοί παράγοντες), τα στοχευμένα φάρμακα (π.χ. αναστολής τυροσινικής κινάσης, μονόκλιωνα αντισώματα) και τα ορμονικά φάρμακα (π.χ. γλυκοκορτικοειδή, προγεστίνες). Παρακάτω επεξηγούνται οι υποκατηγορίες και ο τρόπος δράσης των κυτταροτοξικών φαρμάκων:

## Κυτταροτοξικά φάρμακα

### A. Αλκυλιωτικοί παράγοντες

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες αποτελούν μια από τις πρώτες κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν ενάντια του καρκίνου περίπου στις αρχές του 1940 από τον Δρ. Cornelius Packard Rhoads<sup>33</sup>. Πριν από τη χρήση τους στη χημειοθεραπεία, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες ήταν γνωστοί για τη χρήση τους ως χημικά όπλα στον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο (γνωστά ως mustard gas). Αυτοί οι παράγοντες δρουν απευθείας στο DNA οδηγώντας σε μη φυσιολογικό ζευγάρωμα των βάσεων και σπάσιμο των ελίκων, αναστέλλοντας, εν τέλει, την κυτταρική διαίρεση και οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 1.9**). Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες αντιδρούν με την γουανίνη, που αποτελεί βάση του DNA, προσθέτοντας μια ομάδα αλκυλίου στη θέση N-7 του δακτυλίου της πουρίνης. Αυτό καθιστά τις έλικες ανήμπορες να ξετυλιχθούν και να διαχωριστούν<sup>34</sup>. Καθώς αυτό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση στην αντιγραφή του DNA, τα κύτταρα δεν μπορούν πλέον να διαιρεθούν (**Εικόνα 1.9**). Τα αντικαρκινικά φάρμακα αλκυλίωσης είναι αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μιας ευρείας ποικιλίας καρκίνων.



**Εικόνα 1.9.** Μηχανισμός δράσης των αλκυλιωτικών παραγόντων. **A.** Σχηματισμός σταυρωτών γεφυρών με δεσμούς μεταξύ των βάσεων του DNA που οδηγεί σε αναστολή της αντιγραφής ή της μεταγραφής. **B.** Οι αλκυλιωμένες βάσεις γουανίνης μπορούν να αντιστοιχηθούν λανθασμένα με θυμίνες. Εάν αυτό το αλλοιωμένο ζεύγος δεν διορθωθεί, μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη μετάλλαξη.

*Γ. Η θραυσματοποίηση του DNA μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της απόπειρας αντικατάστασης των αλκυλιωμένων βάσεων από τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA* <sup>34</sup>.

Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, κατά κανόνα, γρηγορότερα και με μικρότερη δράση των επιδιορθωτικών ενζύμων σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στις βλάβες του DNA από τους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, είναι τοξικά και για τα φυσιολογικά κύτταρα, ιδιαίτερα για τα κύτταρα που διαιρούνται συχνά, όπως αυτά του γαστρεντερικού σωλήνα, του μυελού των οστών, των όρχεων και των ωοθηκών. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών τύπων καρκίνων, δρουν σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου και οι κύριοι εκπρόσωποί τους είναι η χλωραμβουκίλη (chlorambucil), η μελφαλάνη (melphalan) και η καρμουστίνη (carmustin).

### **B. Αντιμεταβολίτες**

Οι αντιμεταβολίτες αντιπροσωπεύουν μια σχετικά μεγάλη ομάδα αντικαρκινικών παραγόντων που ομοιάζουν δομικά με φυσικά υποστρώματα, αλλά διαφέρουν αρκετά ώστε να παρεμποδίζουν τον μεταβολισμό τους <sup>35</sup>. Περιλαμβάνονται οι ανταγωνιστές του φυλικού οξέος όπως η μεθοτρεξάτη, αντιμεταβολίτες πουρίνης όπως η 6-μερκαπτοπουρίνη, η 6-θειογουανίνη, η φωσφορική φλουδαραβίνη, η πεντοστατίνη και η κλαδριβίνη, και οι αντιμεταβολίτες της πυριμιδίνης όπως η 5-φθοροουρακίλη, η 5-φθοροδεοξουριδίνη και η γεμισταβίνη. Οι αντιμεταβολίτες διαταράσσουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων παρεμβαίνοντας στην παραγωγή ενός κύριου μεταβολίτη νουκλεοτιδίων ή αντικαθιστώντας τον φυσικό μεταβολίτη <sup>36</sup>. Όπως και οι περισσότεροι κυτταροτοξικοί αντικαρκινικοί παράγοντες, οι αντιμεταβολίτες είναι τοξικοί για τα φυσιολογικά κύτταρα, ειδικά για εκείνα που αναπτύσσονται γρήγορα συμπεριλαμβανομένων αυτών του μυελού των οστών και του γαστρεντερικού σωλήνα <sup>35</sup>. Η δράση τους υφίσταται στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου, σε αντίθεση με τους αλκυλιωτικούς παράγοντες που δεν δρουν ειδικά σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου.

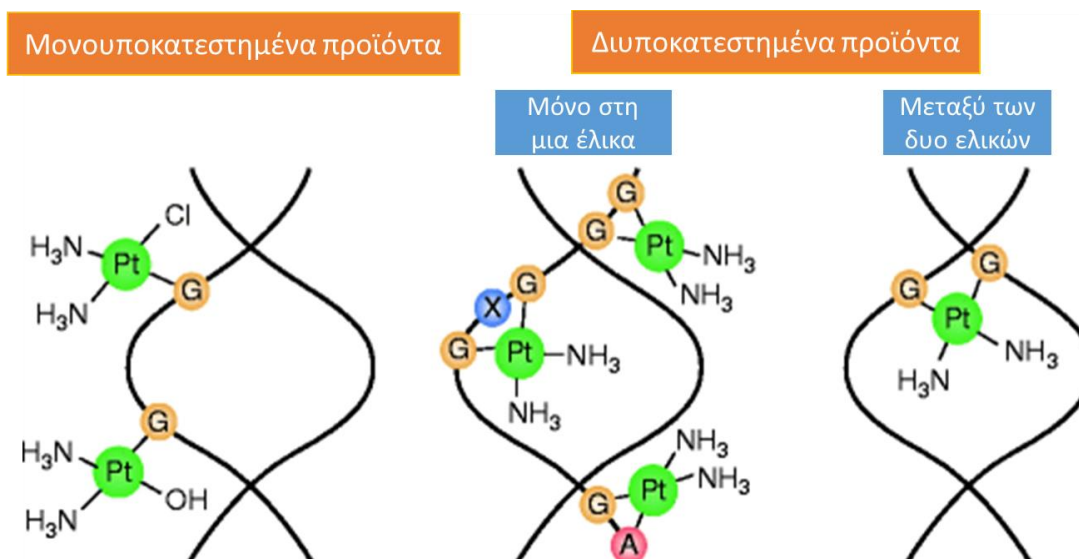
### **Γ. Φάρμακα με βάση τον λευκόχρυσο**

Τα περισσότερα από τα σύμπλοκα της πλατίνας είναι μη φορτισμένα *cis*-διαμορφωμένα τετραγωνικά σύμπλοκα του λευκόχρυσου (II) που μπορούν να περιγραφούν από τον γενικό τύπο *cis*-[PtA<sub>2</sub>X<sub>2</sub>], με το A<sub>2</sub> να είναι είτε δύο μονοδοντικοί είτε ένας διδοντικός σταθερός προσδέτης αμίνης, και X<sub>2</sub> είτε δυο μονοδοντικές είτε μια διδοντική ανιοντική αποχωρούσα ομάδα <sup>36</sup>. Το 1844, η Michele Peyrone συνέθεσε τη σισπλατίνη (*cis*-platinum (II)-διαμίνο-διχλωρίδιο) χωρίς να γνωρίζει την αντικαρκινική του δράση. Στα μέσα της δεκαετίας του 1960 ο Barnett Rosenberg ανακάλυψε την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης παρουσία της σισπλατίνης. Λόγω της εξαιρετικής αποτελεσματικότητάς του στη θεραπεία πολλών όγκων, η σισπλατίνη έγινε το πρωτότυπο για μια νέα κατηγορία αντινεοπλασματικών παραγόντων. Ωστόσο, η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω των παρενεργειών τους και της ανάπτυξης αντοχής.

Το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα είναι κυρίως συνέπεια του σχηματισμού προϊόντων πλατίνας-DNA. Ο κύριος στόχος είναι η θέση N7 της πουρίνης λόγω της υψηλής



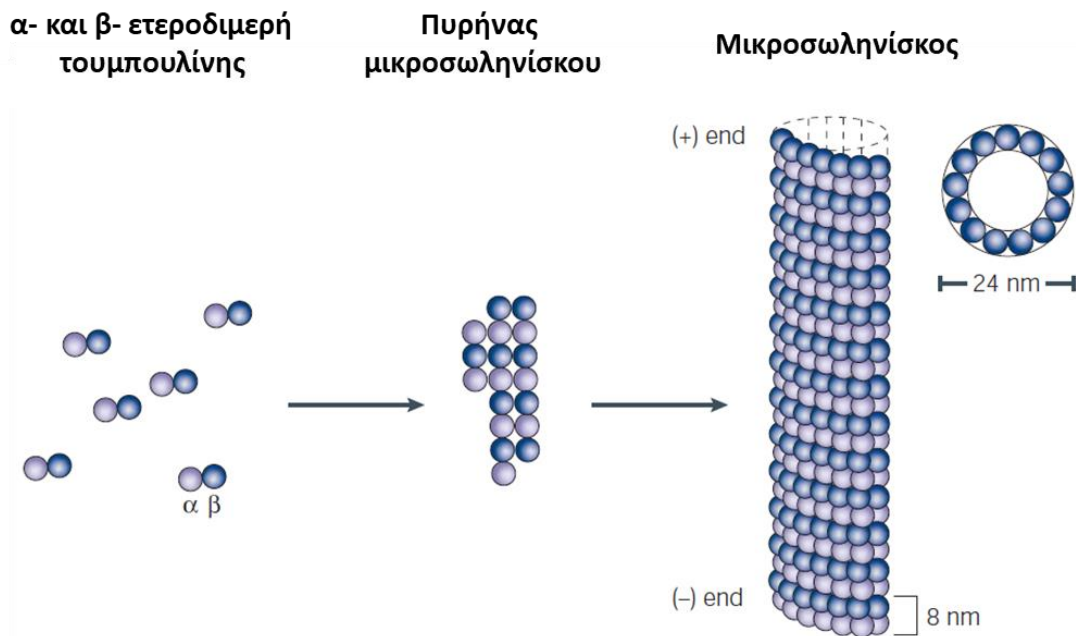
πυρηνοφιλικότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Εκτός από τα μονο-προϊόντα, η σισπλατίνη σχηματίζει διασυνδέσεις στην ίδια έλικα ή μεταξύ των 2 ελίκων (**Εικόνα 1.10**)<sup>37</sup>.



**Εικόνα 1.10.** Προϊόντα προσθήκης μεταξύ της γουανίνης του DNA και της σισπλατίνης<sup>37</sup>.

#### Δ. Φάρμακα που στοχεύουν τους μικροσωληνίσκους

Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν βασικά συστατικά του κυτταροσκελετού και δομικά είναι μακρά, νηματώδη, πρωτεϊνικά πολυμερή σχήματος σωλήνα<sup>38</sup>. Είναι ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη και τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, στη μεταφορά κυστιδίων, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και άλλων οργανιδίων, στην κυτταρική σηματοδότηση και στη διαδικασία της διαίρεσης και της μίτωσης. Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από δυο ετεροδιμερή α-τουμπουλίνης και β-τουμπουλίνης (διαστάσεων 4 nm × 5 nm × 8 nm και 100,000 daltons σε μάζα) διατεταγμένα με τη μορφή λεπτών νηματοειδών σωλήνων που μπορεί να έχουν μήκος πολλών μικρομέτρων (**Εικόνα 1.11**)<sup>39</sup>. Η σημασία των μικροσωληνίσκων στη διαδικασία της μίτωσης και της κυτταρικής διαίρεσης τους καθιστούν από τους πιο σημαντικούς στόχους για διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα. Τα πιο κλασσικά αντικαρκινικά φάρμακα που εμφανίζουν δράση μέσω των μικροσωληνίσκων αποτελούν οι ταξόλες (π.χ. πακλιταξέλη και δοσεταξέλη) και τα αλκαλοειδή της Vinca (π.χ. βινβλαστίνη και βινκριστίνη)<sup>40</sup>. Τα αντικαρκινικά αυτά φάρμακα αναφέρονται συχνά και ως μιτωτικοί αναστολείς καθώς αλληλεπιδρώντας με τους μικροσωληνίσκους αναστέλλουν τη διαδικασία της μίτωσης (κυτταρική διαίρεση)<sup>41</sup>.



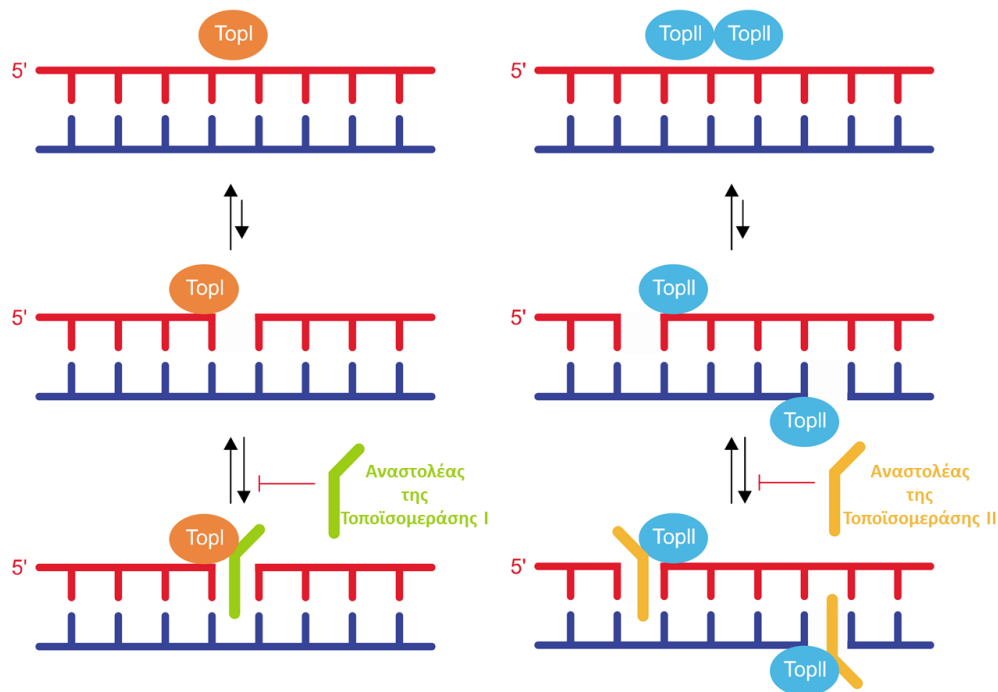
**Εικόνα 1.11.** Ο πολυμερισμός των μικροσωληνίσκων. Τα ετεροδιμερή α- και β-τουμπουλίνης συγκεντρώνονται για τον σχηματισμό ενός μικρού πυρήνα μικροσωληνίσκων. Ακολουθείται από την επιμήκυνση του μικροσωληνίσκου και στα δύο άκρα για να σχηματιστεί ένας κύλινδρος που αποτελείται από ετεροδιμερή τουμπουλίνης διατεταγμένα από το κεφάλι προς την ουρά. Κάθε μικροσωληνίσκος έχει το λεγόμενο άκρο συν (+), με β-τουμπουλίνη να βλέπει τον διαλύτη και ένα μείον άκρο (-), με την α-τουμπουλίνη να βλέπει τον διαλύτη<sup>39</sup>.

### Ε. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης (I ή II)

Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, πρέπει να γίνει αποδιάταξη (ξετύλιγμα) της διπλής έλικας σε ειδικές θέσεις ώστε να υπάρχει πρόσβαση στις βάσεις και να αρχίσει η διαδικασία της αντιγραφής. Όμως, το τοπικό ξετύλιγμα σε μια περιοχή οδηγεί σε υπερσπείρωση των κοντινών περιοχών. Ειδικά ένζυμα που ονομάζονται τοποϊσομεράσες εισάγουν αρνητικά υπερσπειράματα και ευνοούν τον διαχωρισμό των κλώνων παρεμποδίζοντας τις τάσεις που αναπτύσσονται. Η αντικαρκινική θεραπεία στοχεύει δυο τύπους τοποϊσομερασών: Τοποϊσομεράσες τύπου I και τοποϊσομεράσες τύπου II. Οι τοποϊσομεράσες τύπου I διασπών τον ένα κλώνο DNA, ενώ οι τοποϊσομεράσες τύπου II διασπών και τους δύο κλώνους. Και οι δυο τύποι είναι εξαιρετικά σημαντικοί στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA. Υπάρχουν ποικίλα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία αναστέλλουν τη λειτουργία της τοποϊσομεράσης I (π.χ. καμπτοθεκίνη και SN-38) και άλλα που αναστέλλουν τη λειτουργία της τοποϊσομεράσης II (π.χ. ετοποσίδη και δοξορουβικίνη), εμποδίζοντας το στάδιο της κατά το οποίο δημιουργούνται διασπάσεις στις έλικες του DNA, οδηγώντας έτσι σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι τοποϊσομεράσες πραγματοποιούν τη διάσπαση και την επανασύνδεση των ελίκων του DNA πολύ γρήγορα, καθώς οι αντιδράσεις επανασύνδεσης εμφανίζονται ταχύτερες από τις αντιδράσεις διάσπασης, επομένως τα σύμπλοκα τοποϊσομεράσης-DNA θεωρούνται παροδικά. Ένας αριθμός αναστολέων τοποϊσομερασών έχει αποδειχθεί ότι

εμφανίζει αντικαρκινικά αποτελέσματα μέσω σταθεροποίησης των συμπλόκων τοποϊσομεράσης-DNA μέσω ειδικής δέσμευσης στη διεπαφή των συμπλόκων (Εικόνα 1.12) <sup>42</sup>. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I σταθεροποιούν τα σύμπλοκα διάσπασης της τοποϊσομεράσης I και του DNA, αποτρέπουν την επανασύνδεση του DNA και προκαλούν επομένως θανάσιμες θραύσεις στους κλώνους του DNA <sup>43</sup>. Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των ωοθηκών, του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του τραχήλου της μήτρας. Αντίθετα, οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II παγιδεύουν τα συμπλέγματα της τοποϊσομεράσης II και του DNA και χρησιμοποιούνται κυρίως για το λέμφωμα, τη λευχαιμία, και τον καρκίνο του πνεύμονα <sup>44</sup>.

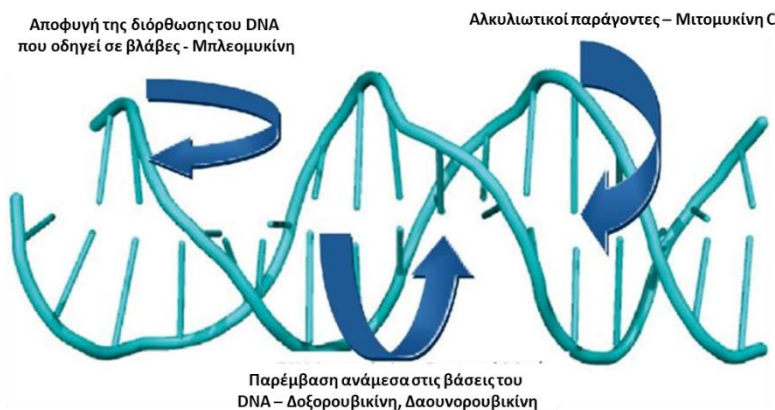


**Εικόνα 1.12.** Τρόπος δράσης των αναστολέων των τοποϊσομερασών I & II (TopoI & TopoII, αντίστοιχα) μέσω σταθεροποίησης των συμπλόκων τους με τους κλώνους του DNA <sup>42</sup>.

### ΣΤ. Αντικαρκινικά αντιβιοτικά

Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες με αντικαρκινική δράση, που παράγονται από μικροοργανισμούς. Πρόκειται κυρίως για πεπτίδια και ανθρακινόνες, με ανασταλτική δράση στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την επιθετική ανάπτυξη και τη μετάσταση κακοήθων καρκίνων. Η ταξινόμηση των αντικαρκινικών αντιβιοτικών περιλαμβάνει κυρίως ανθρακυκλίνες, τη μιτομυκίνη, τη μπλεομυκίνη και τη ακτινομυκίνη (Εικόνα 1.13) <sup>45</sup>. Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά των ανθρακυκλινών περιλαμβάνουν κυρίως τη δαουνορουβικίνη και τη δοξορουβικίνη. Η δοξορουβικίνη, το πιο γνωστό φάρμακο της κατηγορίας, παρουσιάζει ένα πολύ ευρύ κλινικό αντικαρκινικό φάσμα και χρησιμοποιείται για συμπαγείς καρκίνους και είναι εξαιρετικά αποτελεσματική κατά του κακοήθους λεμφώματος, του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του ήπατος, του καρκίνου του στομάχου και του

σαρκώματος μαλακών ιστών. Τόσο η δαουνορουβικίνη όσο και η δοξορουβικίνη μπορούν να εισαχθούν μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA και να συνδεθούν με το DNA, καθιστώντας εμπόδιο της χωρικής δομής του DNA, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση του. Ταυτόχρονα, μπορούν να αναστείλουν τη δραστηριότητα της πυρηνικής τοποϊσομεράσης, να επηρεάσουν την αντίδραση επανασύνδεσης του DNA που προκαλείται από την τοποϊσομεράση, οδηγώντας σε διάσπαση του διπλού κλώνου του DNA, καθώς και διάσπαση του μονοκλωνικού DNA (Εικόνα 1.13) <sup>45</sup>.



**Εικόνα 1.13.** Τρόπος δράσης των σημαντικότερων αντικαρκινικών αντιβιοτικών ουσιών <sup>46</sup>.

## **Z. Διάφορα άλλα**

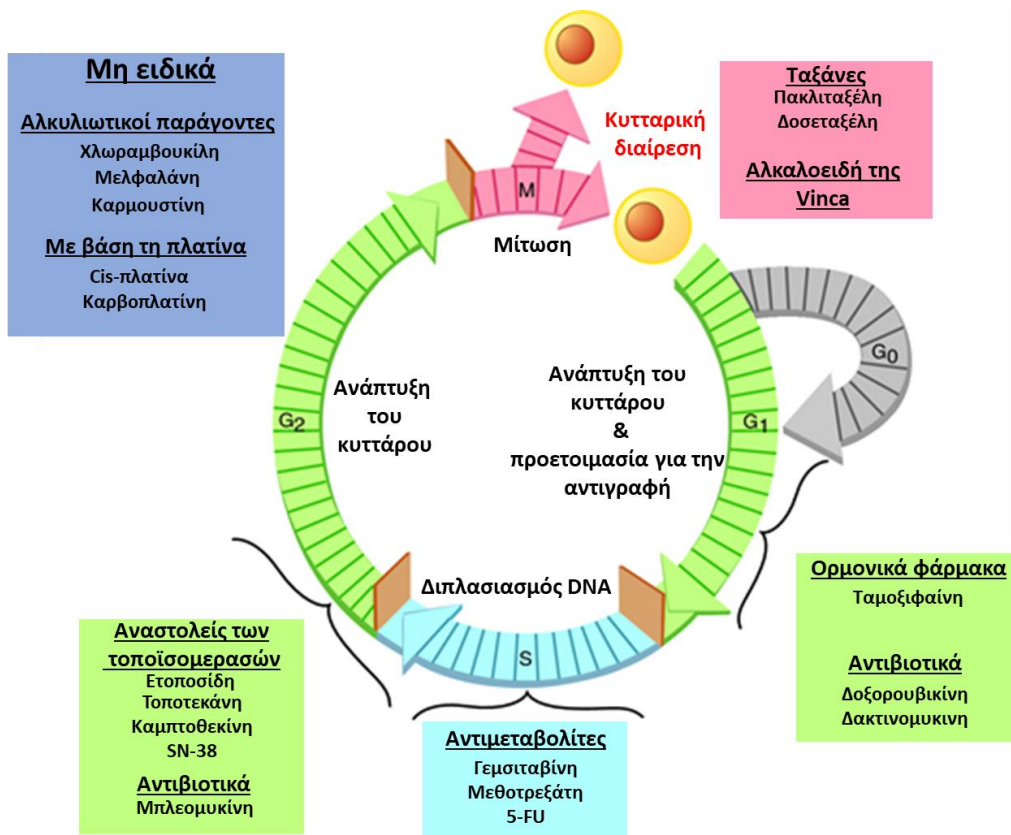
Υπάρχουν κάποια αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία δεν κατανέμονται στις προαναφερθείσες κατηγορίες βάσει του τρόπου δράσης τους όπως:

**A.** Η υδροξουρία (ή υδροξυκαρβαμίδιο) που χρησιμοποιείται ενάντια της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας <sup>47</sup>.

**B.** Η L-ασπαραγινάση η οποία είναι δραστική ενάντια της λεμφοβλαστικής λευχαιμίας <sup>48</sup>. Υδρολύει την ασπαραγίνη σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία και επειδή τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν μειωμένη έκφραση της συνθετάσης της ασπαραγίνης δεν μπορούν να αναπληρώσουν τις ποσότητες της ασπαραγίνης και οδηγούνται στον θάνατο <sup>48</sup>. Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό καθώς μπορούν και συνθέτουν ασπαραγίνη.

**Γ.** Η τρετινοΐνη (*trans*-ρετινοϊκό οξύ) και το τριοξείδιο του αρσενικού ( $As_2O_3$ ) που χρησιμοποιούνται ενάντια της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας <sup>49</sup>.

Η εκάστοτε αντικαρκινική θεραπεία μπορεί να επέμβει σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.14).



**Εικόνα 1.14.** Παρουσίαση των διαφορετικών κατηγοριών αντικαρκινικών θεραπειών και οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις οποίες παρεμβαίνουν. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες και τα φάρμακα με βάση τη πλατίνα μπορούν και δρουν σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου <sup>50</sup>.

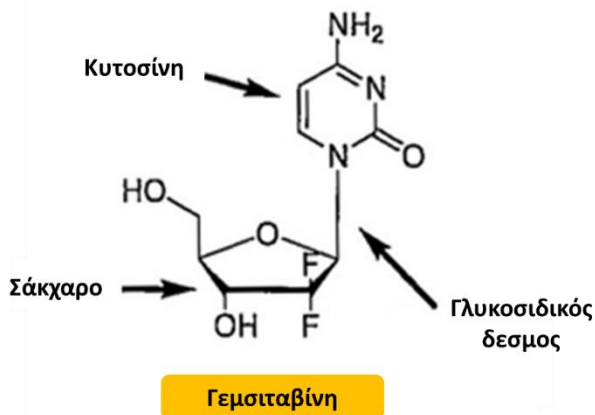
### 1.3.1.1 Ανάλυση συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Μερικά από τα αντικαρκινικά κυτταροτοξικά φάρμακα αναλύονται παρακάτω ως προς τον μηχανισμό δράσης τους, τον μεταβολισμό τους, τα μειονεκτήματά τους και τη χημεία που μπορεί να πραγματοποιηθεί βάσει της δομής τους.

#### 1.3.1.1.1 Αντικαρκινικό φάρμακο ‘γемσιταβίνη’

##### 1.3.1.1.1.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία της γемσιταβίνης

Η γемσιταβίνη αποτελεί ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην οικογένεια των αντιμεταβολιτών καθώς ομοιάζει με τη δεοξυκυτιδίνη. Αποτελείται από μια αζωτούχο βάση (κυτοσίνη) και ένα σάκχαρο 5-ατόμων άνθρακα όπου δύο άτομα υδρογόνου από την θέση 2' έχουν αντικατασταθεί από 2 άτομα φθορίου (**Εικόνα 1.15**). Η ενσωμάτωση των ατόμων φθορίου ενισχύει τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της γемσιταβίνης και δεν μεταβάλλει το σχήμα και το μέγεθος αυτού του μορίου σημαντικά.



*Εικόνα 1.15. Η διδιάστατη δομή της γεμισιταβίνης.*

Η γεμισιταβίνη χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες (π.χ. σισπλατίνη) και παρουσιάζει αντικαρκινική δραστηριότητα σε ένα ευρύ φάσμα στερεών όγκων όπως ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος, ο καρκίνος του πνεύμονα, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης, του μαστού, του προστάτη και των ωοθηκών<sup>51</sup>. Πωλείται με το όνομα Gemzar από την εταιρεία Eli Lilly.

Η γεμισιταβίνη συντέθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο του Larry Hertel από τον Eli Lilly κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980. Προοριζόταν για χρήση ως ένα αντικό φάρμακο, αλλά οι προκλινικές δοκιμές έδειξαν ότι μπορούσε να σκοτώνει τα κύτταρα της λευχαιμίας *in vitro*. Η γεμισιταβίνη κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1983 και εγκρίθηκε για ιατρική χρήση το 1995. Έγινε πρώτης γραμμής θεραπεία για καρκίνο της ουροδόχου κύστης τέταρτου σταδίου με μεταστάσεις σε συνδυασμό με τη σισπλατίνη μετά από μια μελέτη που έγινε το 2000 με τη βοήθεια 405 ασθενών που έδειξε παρόμοια αποτελεσματικότητα αλλά μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τη προηγούμενη θεραπευτική αγωγή MVAC (χρήση μεθοτρεξάτης, βινμπλαστίνης, δοξορουβικίνης, *cis*-πλατίνης).

Το 1996, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη για χρήση σε συνδυασμό με την σισπλατίνη ως πρώτης γραμμής θεραπεία ασθενών με ανεγχείρητο, τοπικά προχωρημένο (στάδιο IIIA ή IIIB) ή μεταστατικό (στάδιο IV) μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Την ίδια χρονολογία, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη ως πρώτης γραμμής θεραπεία για ασθενείς με τοπικά προχωρημένο (μη εγχειρήσιμο, σταδίου II ή III) ή μεταστατικό (σταδίου IV) αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, καθώς και σε ασθενείς οι οποίοι είχαν προηγουμένως λάβει θεραπεία με φθοριοουρακίλη (5-FU).

Το 2004, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη για ένεση σε συνδυασμό με την πακλιταξέλη για τη πρώτης γραμμής θεραπεία ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, μετά την αποτυχία της ανθρακυκλίνης, ενώ το 2006 εγκρίθηκε για τη θεραπεία των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, σε συνδυασμό με τη καρβοπλατίνη, που έχουν υποτροπιάσει τουλάχιστον έξι μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με ανάλογα της πλατίνης (π.χ. σκέτη καρβοπλατίνη ή σισπλατίνη).

Η υδροχλωρική γεμισιταβίνη είναι ένα λευκό στερεό, διαλυτό στο νερό, ελαφρώς διαλυτό σε μεθανόλη, και πρακτικά αδιάλυτο σε αιθανόλη και πολικούς οργανικούς διαλύτες. Το κλινικό σκεύασμα παρέχεται σε αποστειρωμένη μορφή μόνο για ενδοφλέβια χρήση. Οι πιο συχνές παρενέργειες, λόγω της τοξικότητάς της, που συνοδεύουν τη χρήση της περιλαμβάνουν ναυτία/έμετο, αναιμία, ηπατική τρανσαμινίτιδα, ουδετεροπενία, αυξημένη αλκαλική φωσφατάση, πρωτεϊνουρία, πυρετό, αιματοουρία, εξάνθημα, θρομβοπενία, δύσπνοια και περιφερικό οίδημα.

#### 1.3.1.1.1.2 Μεταφορά της γεμισιταβίνης

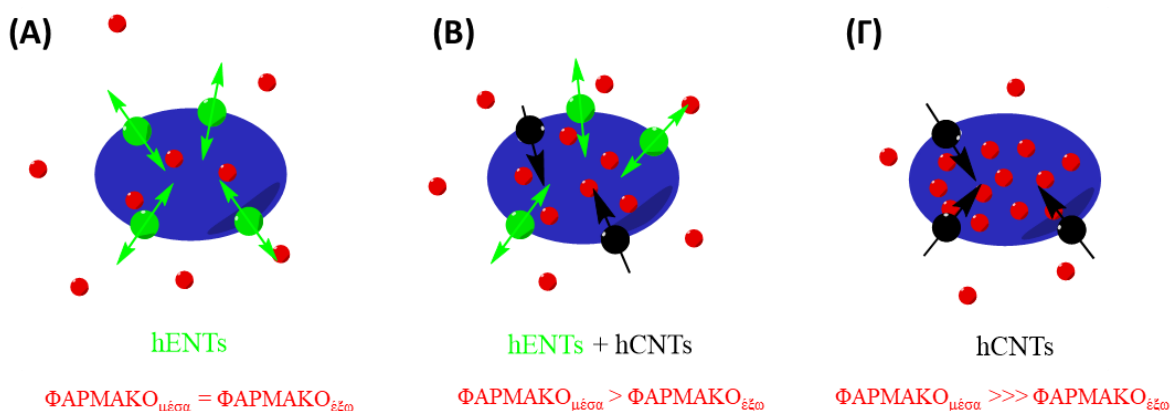
Η γεμισιταβίνη μεταφέρεται εντός της μεμβράνης των κυττάρων από νουκλεοσιδικούς μεταφορείς. Υπάρχουν δύο οικογένειες τέτοιων μεταφορέων που διαφέρουν με βάση την λειτουργία τους:

- 1) Οι εξισορροπητικοί νουκλεοσιδικοί μεταφορείς (ENTs - Equilibrative Nucleoside Transporters) που είναι οι hENT1, hENT2, hENT3 και hENT4, οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι του νατρίου<sup>49, 50</sup>.
- 2) Οι συγκεντρωτικοί νουκλεοσιδικοί μεταφορείς (CNTs - Concentrative Nucleoside Transporters) που είναι hCNT1, hCNT2 και hCNT3, οι οποίοι είναι εξαρτώμενοι από το νάτριο και είναι ικανοί να μεταφέρουν το νουκλεοσίδιο έναντι της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης<sup>52, 53</sup>.

Οι άνθρωποι μεταφορείς hENT1 και hENT2 (human Equilibrative Nucleoside Transporters 1 & 2) είναι τα δύο μέλη της οικογένειας ENT που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους σε αναστολή από τη νιτροβενζυλομερκαπτανοπουρίνη (NBMPR). Ο hENT1 είναι ένας ευαίσθητος μεταφορέας NBMPR ενώ ο hENT2 είναι ένας μη ευαίσθητος μεταφορέας NBMPR. Επίσης, είναι ικανοί να μεταφέρουν τις νουκλεοβάσεις. Ο εξισορροπητικός μεταφορέας, hENT3, αναγνωρίστηκε το 2001 και ο hENT4 προστέθηκε στην οικογένεια ENT το 2002. Τα τέσσερα ισόμορφα των εξισορροπητικών νουκλεοσιδικών μεταφορέων είναι παρόντα σε διαφορετικά επίπεδα σε διαφορετικούς ιστούς. Η υψηλότερη συγκέντρωση του hENT2 είναι παρούσα στον σκελετικό μυ, ενώ οι ENT1 και ENT2 βρίσκονται στην βασεοπλευρική διαμεμβράνη μαζί με τους CNTs. Οι εξαρτώμενοι από το νάτριο hCNT1, hCNT2 και hCNT3 διαφέρουν στις εξειδικεύσεις του υποστρώματος τους: Ο hCNT1 μεταφέρει πυριμιδινικά νουκλεοσίδια, ενώ ο hCNT2 μεταφέρει πουρινικά, καθώς και ουριδίνη. Ο hCNT3 μεταφέρει τόσο τα πυριμιδινικά όσο και τα πουρινικά νουκλεοσίδια. Ο hCNT1 είναι παρών σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι άνθρωποι CNT2 και CNT3 είναι παρόντες σε όλους τους ιστούς. Τα επίπεδα των CNTs είναι συγκριτικά μικρότερα από ό,τι των ENT.

Η μεταφορά της γεμισιταβίνης κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών ενεργών μεταφορέων της μεμβράνης των κυττάρων του πλάσματος<sup>54</sup>. Και οι ENTs και οι CNTs εμπλέκονται στην πρόσληψη της γεμισιταβίνης<sup>54, 55</sup>. Συγκεκριμένα, η γεμισιταβίνη αποτελεί υπόστρωμα για πέντε μεταφορείς: δύο του εξισορροπητικού τύπου (hENT1, hENT2) και τρεις του συγκεντρωτικού τύπου (hCNT1, hCNT2, hCNT3)<sup>54-56</sup>. Η περισσότερη

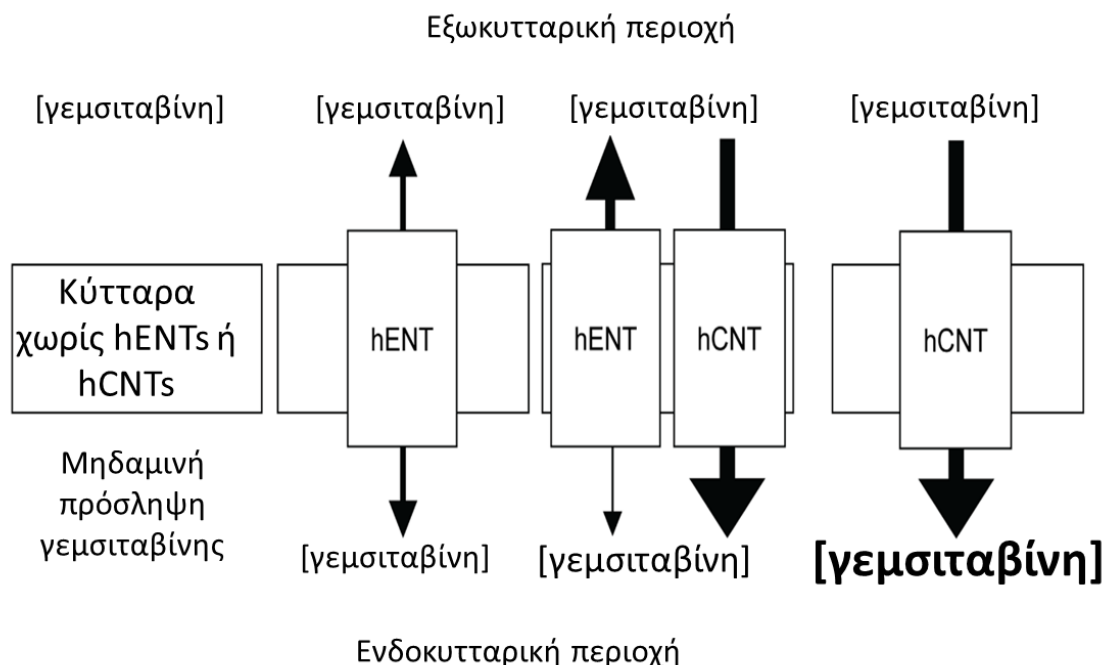
πρόσληψη της γεμισιταβίνης λαμβάνει χώρα από τον μεταφορέα hENT1 και λιγότερο από τους hENT2, hCNT1 και hCNT3<sup>54, 55, 57, 58</sup> ενώ είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλων για τη δραστηριότητα της γεμισιταβίνης. Συγκεκριμένα, η γεμισιταβίνη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω των ENTs, φθάνει σε ισορροπία μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της μεμβράνης του πλάσματος. Ωστόσο, οι CNTs αυξάνουν τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο εσωτερικό των κυττάρων με συσσώρευση ενάντια της κλίσης της συγκέντρωσης (**Εικόνα 1.16**).



**Εικόνα 1.16.** Σχηματική απεικόνιση της συσσώρευσης της γεμισιταβίνης (**A**) παρουσία μόνο hENTs όπου η συγκέντρωση στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του κυττάρου είναι εξισορροπημένη, (**B**) παρουσία hENTs και hCNTs, όπου η συγκέντρωση είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου και (**Γ**) παρουσία μόνο hCNTs, όπου η συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου.

Κατά τη σύγκριση των διαφόρων νουκλεοσιδικών μεταφορέων (NTs) ως δυνάμει θεραπευτικά μέσα για την αύξηση της πρόσληψης τοξικών αναλόγων νουκλεοσιδικών φαρμάκων, ο hCNT3 παρουσιάζει πολλαπλά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων NTs. Πραγματικά, ένας hCNT, μπορεί να συγκεντρώσει νουκλεοσιδικά φάρμακα μέσα στα κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι οι hENTs. Σε σύγκριση με τον hCNT1, ο hCNT3 συν-μεταφέρει ένα επιπλέον ιόν νατρίου (δύο συνολικά) με κάθε νουκλεοσίδιο, παρέχοντας θεωρητικά πρόσθετη ηλεκτροχημική κλίση για τη διατήρηση της νουκλεοσιδικής μεταφοράς. Ο hCNT3 είναι επίσης ο μόνος hCNT σε θέση να χρησιμοποιεί τα πρωτόνια ως κατιόντα για την καθοδήγηση της μεταφοράς, δεδομένου πως οι όγκοι έχουν περιοχές με σχετικά χαμηλό pH, παρέχοντας τα επιπλέον κατιόντα για την μεταφορά του νουκλεοσιδίου. Τέλος, ο hCNT3 είναι ο μόνος hCNT που είναι ικανός να μεταφέρει φάρμακα που είναι νουκλεοσιδικά ανάλογα και της πουρίνης και της πυριμιδίνης, επιτρέποντας τη μεταφορά πολλών και διαφόρων κλινικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της γεμισιταβίνης, της κλαδριβίνης, της κλοφαραβίνης και της φλουδαραβίνης<sup>59</sup> (**Εικόνα 1.17**).





**Εικόνα 1.17.** Το μοντέλο της πρόσληψης της γεμισιταβίνης από νουκλεοσιδικούς μεταφορείς. Η γεμισιταβίνη είναι ένα υδρόφιλο φάρμακο που απαιτεί νουκλεοζιτικούς μεταφορείς (hENT1/2 ή hCNT1/3) για αποτελεσματική πρόσληψη. Οι hENTs μπορούν να ισορροπήσουν τα επίπεδα γεμισιταβίνης κατά μήκος των μεμβρανών, αλλά δεν μπορούν να συσσωρεύσουν ενεργά το φάρμακο μέσα στα κύτταρα. Οι hCNT3 μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη συγκέντρωση του διαμεμβρανικού  $\text{Na}^+$  (ή  $\text{H}^+$  για hCNT3) κατιόντος για να συσσωρεύονται υψηλότερα επίπεδα της γεμισιταβίνης μέσα στα κύτταρα. Για τα κύτταρα με σημαντικά επίπεδα hENTs και hCNTs, οι hCNTs μεταφέρουν ενεργά την γεμισιταβίνη στο εσωτερικό των κυττάρων, αλλά οι hENTs θα εκκρέουν γεμισιταβίνη με σκοπό την εξισορρόπηση των επιπέδων του φαρμάκου κατά μήκος των μεμβρανών, προκαλώντας μειωμένη πρόσληψη γεμισιταβίνης σε σύγκριση με κύτταρα με μόνο hCNTs. Τα hENT1-αρνητικά καρκινικά κύτταρα (τα οποία συσχετίζονται με την αντίσταση προς την γεμισιταβίνη) θεωρείται ότι έχουν σχετικά χαμηλή δραστηριότητα hENT<sup>59</sup>.

#### 1.3.1.1.1.3 Μεταβολισμός της γεμισιταβίνης

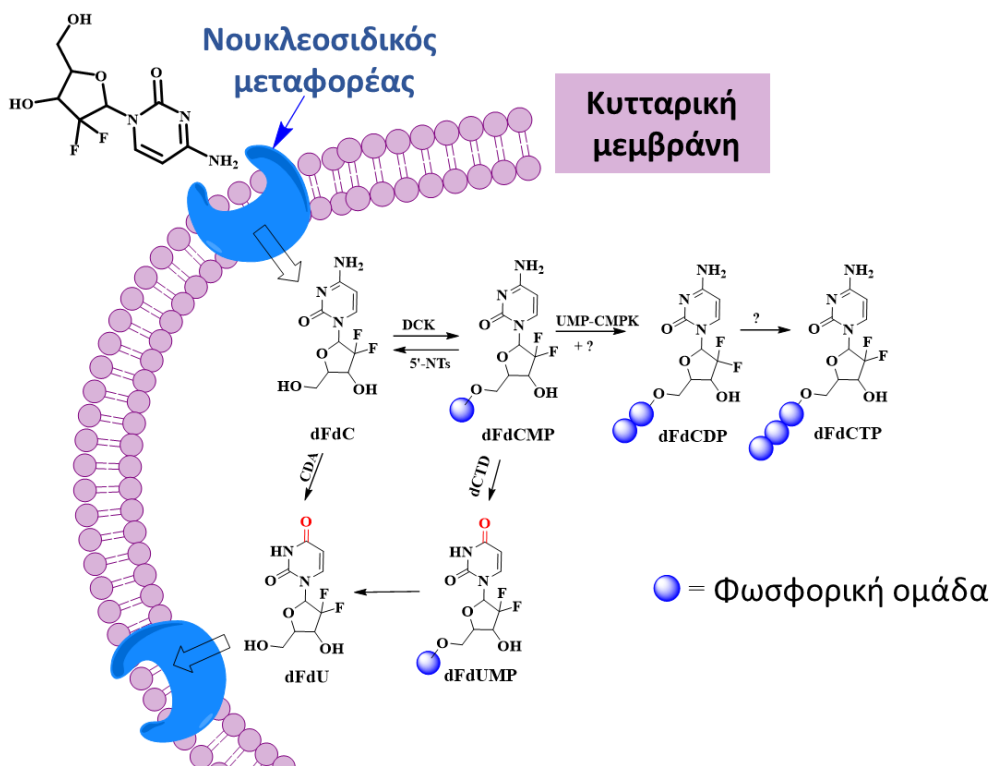
Λόγω της υδρόφιλης φύσης της γεμισιταβίνης (dFdC) δεν μπορεί να προσληφθεί απ' τα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, αλλά προσλαμβάνεται μέσω των νουκλεοσιδικών μεταφορέων και έπειτα υφίσταται ενδοκυτταρική διαδοχική φωσφορυλίωση από κινάσες στην υδροξυλομάδα 5-OH, δίνοντας διαδοχικά μονο- (dFdCMP - d), δι- (dFdCDP) και τρι- φωσφορικά (dFdCTP) νουκλεοτίδια, τα οποία αποτελούν τους δραστικούς μεταβολίτες της γεμισιταβίνης (Σχήμα 1.5). Απ' αυτούς τους μεταβολίτες, ο dFdCDP και ο dFdCTP είναι οι πιο σημαντικοί που είναι υπεύθυνοι για την κυτταροτοξικότητα της γεμισιταβίνης<sup>60</sup>.

Συγκεκριμένα, μόλις εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου η γεμισιταβίνη, φωσφορυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα από την κινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCK) προς τον

μονοφωσφορικό μεταβολίτη (dFdCMP) και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται εκ νέου αλλά αυτή τη φορά από τη μονοφωσφορική κινάση του νουκλεοσιδίου της πυριμιδίνης (UMP-CMP κινάση) για να παράγει την διφωσφορική γεμισαβίνη (dFdCDP) <sup>61-64</sup>, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.5**. Άλλα ένζυμα, τα οποία είναι ακόμα άγνωστα, μπορούν επίσης να εκτελέσουν τη δεύτερη φωσφορυλίωση <sup>65</sup>, καθώς όπως έχει αναφερθεί, η αύξηση ή μείωση της UMP-CMP κινάσης δεν επηρεάζει τα επίπεδα των dFdCDP και dFdCTP <sup>65</sup>. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το τελικό στάδιο φωσφορυλίωσης (DFdCDP προς τον δραστικό μεταβολίτη (dFdCTP) είναι ασαφές, αν και η διφωσφορική κινάση νουκλεοσιδίου μπορεί να διαδραματίσει αυτόν τον ρόλο <sup>66</sup>. Η πρώτη φωσφορυλίωση από την dCK θεωρείται το καθοριστικό στάδιο για την ταχύτητα της παραγωγής dFdCDP και dFdCTP <sup>67, 68</sup>.

Η γεμισαβίνη μπορεί να αδρανοποιηθεί μέσω απαμίνωσης από την απαμινάση της κυτιδίνης (CDA). Το προϊόν της απαμίνωσης της γεμισαβίνης από την CDA είναι η 2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη (dFdU), που έχει αρκετούς ενδοκυτταρικούς ρόλους, όπως να ρυθμίζει τη μεταφορά, τη συσσώρευση και την κυτταροτοξικότητα της γεμισαβίνης, αλλά εκκρίνεται από το κύτταρο <sup>68-71</sup>. Επίσης, η μονοφωσφορυλιωμένη γεμισαβίνη (dFdCMP) μπορεί να απαμινωθεί από την απαμινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCTD) σχηματίζοντας τον μεταβολίτη της ουρακίλης (dFdUMP), ο οποίος μπορεί να αναστείλει την δραστηριότητα της θυμιδυλικής συνθάσης, επηρεάζοντας άμεσα το τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) <sup>72</sup>.

Η γεμισαβίνη μπορεί επίσης να καταστεί αδρανοποιημένη μέσω της αποφωσφορυλίωσης της μονοφωσφορικής της μορφής από 5'-νουκλεοτιδάσες (5'-NTs), μετατρέποντας τα νουκλεοτίδια πίσω σε νουκλεοσίδια (**Σχήμα 1.5**) <sup>73-75</sup>. Τα ένζυμα αυτά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ισορροπία των δεξαμενών dNTP και, ως εκ τούτου, στον μεταβολισμό της γεμισαβίνης. Με τον τρόπο αυτό, το περιοριστικό στάδιο όσον αφορά τον ρυθμό της φωσφορυλίωσης από την dCK μπορεί επίσης να επηρεαστεί και έτσι να θέσει σε κίνδυνο τη συνολική ευεργετική κυτταροτοξικότητα της γεμισαβίνης.



**Σχήμα 1.5.** Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών μεταβολικών οδών της γεμισιταβίνης στο εσωτερικό των κυττάρων. CDA: Απαμινάση της κυτιδίνης, DCK: Κινάση της δεοξυκυτιδίνης, UMP-CMPK: Ουριδίνη μονοφωσφορική-Κινάση της μονοφωσφορικής κυτιδίνης, dCTD: Απαμινάση της μονοφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης, dFdC: γεμισιταβίνη, dFdCDP: διφωσφορική γεμισιταβίνη, dFdCMP: μονοφωσφορική γεμισιταβίνη, dFdCTP: τριφωσφορική γεμισιταβίνη, dFdU: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη, dFdUMP: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη μονοφωσφορική.

#### 1.3.1.1.1.4 Μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης

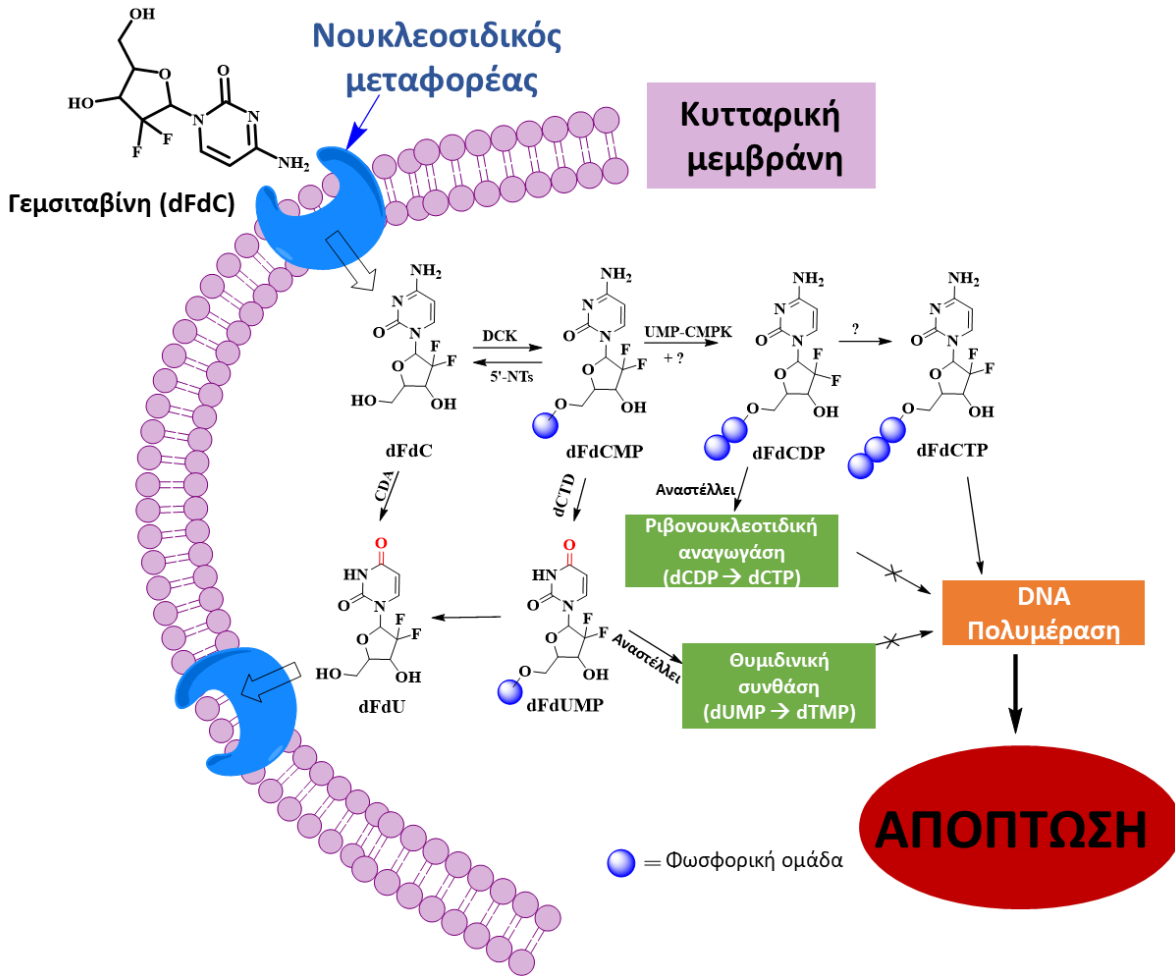
Ο κύριος μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης αποτελεί η αναστολή της σύνθεσης του DNA <sup>76</sup>. Ο ενεργός τριφωσφορικός μεταβολίτης dFdCTP ομοιάζει με το νουκλεοτίδιο της κυτιδίνης με αποτέλεσμα να μπορεί να ενσωματώνεται στο DNA στη θέση αυτού. Έπειτα, το επόμενο δεοξυριβονουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στην αλληλουχία του DNA, καθιστώντας την DNA πολυμεράση ανήμπορη να προχωρήσει λόγω σφάλματος, με αποτέλεσμα τη διακοπή της επιμήκυνσης της αλυσίδας (**Σχήμα 1.6, Εικόνα 1.18A**) <sup>77</sup>. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως 'masked chain-termination' <sup>76</sup>.

Ένας επιπλέον μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης είναι η αυτοενίσχυση (self-potentiation) με αναστολή της δράσης των ενζύμων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Ένα από αυτά τα ένζυμα, το dCTD, αναστέλλεται άμεσα από τον μεταβολίτη dFdCTP και έμμεσα από τον dFdCDP <sup>78</sup>. Αυτή η έμμεση αναστολή του dCTD από το dFdCDP οφείλεται σε μια μείωση της τιμής του ενδοκυτταρικού dNTP. Η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή (RR), η οποία καταλύει την αναγωγή ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια,

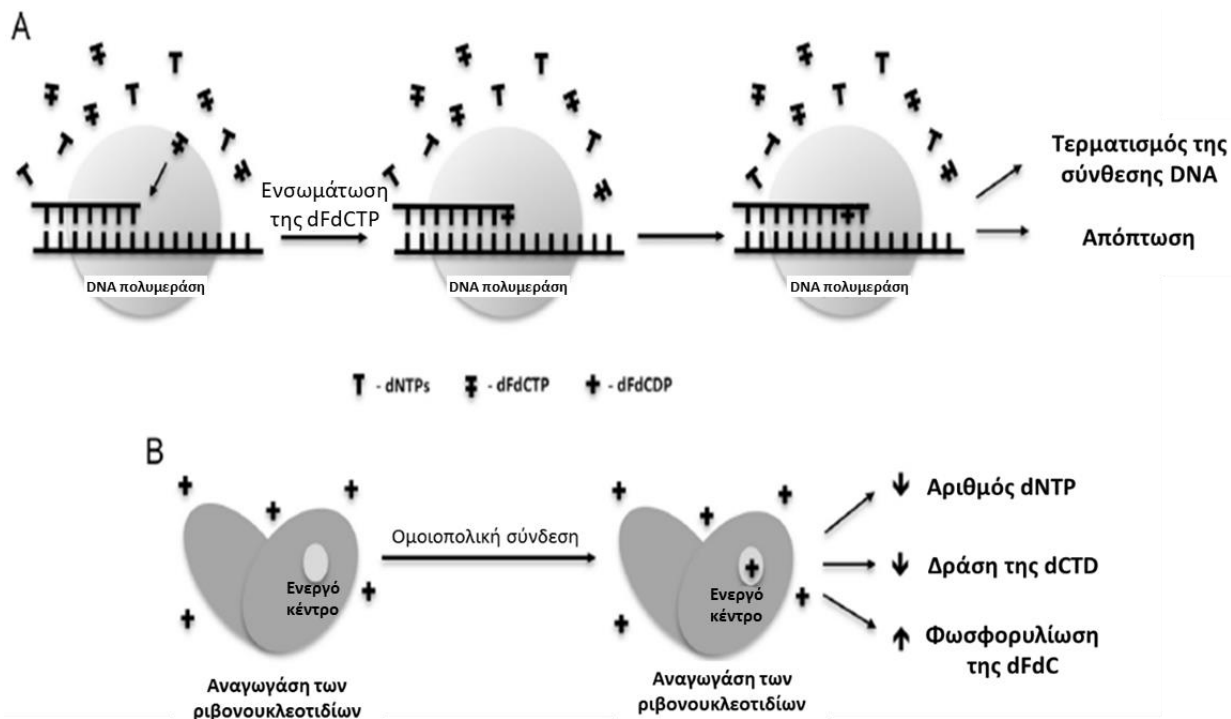
αναστέλλεται από το dFdCDP μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης στο ενεργό κέντρο , μειώνοντας το dNTP και κατά συνέπεια προκαλείται μείωση της δραστηριότητας του dCTD <sup>78</sup>. Επιπλέον, δεδομένου ότι η δραστηριότητα της dCK ρυθμίζεται από το dCTP <sup>79-81</sup>, μειώνοντας το dNTP προωθείται η φωσφορυλίωση του dFdC, αυξάνοντας έτσι το επίπεδο της dFdCTP και την αναλογία του dCTP, καθιστώντας την dFdCTP πιο πιθανό να ενσωματωθεί στο DNA (**Σχήμα 1.6, Εικόνα 1.18B**).

Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω σηματοδότησης της κασπάσης είναι επίσης ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός δράσης <sup>82-84</sup>. Η γεμισιταβίνη ενεργοποιεί την p38 πρωτεϊνική κινάση (MAPK - Mitrogen Activated Protein Kinase) για να προκαλέσει την απόπτωση σε απόκριση προς το κυτταρικό στρες στα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι στα φυσιολογικά κύτταρα <sup>83-85</sup>. Πράγματι, η δραστηριότητα της MAPK-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MK2), ένας p38-MAPK τελεστής, φαίνεται να απαιτείται για τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τη γεμισιταβίνη *in vitro*. Η αναστολή της MK2 οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος όταν πραγματοποιείται αγωγή με γεμισιταβίνη, λόγω δραστηριότητας της πολυμεράσης μετάφρασης <sup>86</sup>. Αντιστρόφως, η ενεργοποίηση της p38-MAPK και της MK2 από τη γεμισιταβίνη μπορεί να προκαλέσει φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 27 (Hsp27), πρωτεΐνες-συνοδούς που σχετίζονται με την ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη, οδηγώντας σε καταστολή της ανάπτυξης *in vitro* <sup>87</sup>. Αρκετές μελέτες που χρησιμοποιούν πρωτεωμική ανάλυση και προσεγγίσεις αναστολής των Hsp27 έχουν δείξει ότι η αντίσταση προς τη γεμισιταβίνη σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της Hsp27 και της φωσφορυλίωσης <sup>88</sup>. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα είναι σε αντίθεση με την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση της γεμισιταβίνης στις φωσφορυλιωμένες Hsp27 <sup>87</sup>. Αυτά τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για να διευκρινιστεί ο ακριβής ρόλος της Hsp27 στην αντίσταση ως προς την γεμισιταβίνη.

Ο μεταβολισμός και ο μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης μόλις εισέλθει στο κύτταρο συνοψίζονται στο **Σχήμα 1.6**:



**Σχήμα 1.6.** Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού και του μηχανισμού δράσης της γεμισταβίνης. CDA: Απαμινάση της κυτιδίνης, DCK: Κινάση της δεοξυκυτιδίνης, UMP-CMPK: Ουριδίνη μονοφωσφορική-Κινάση της μονοφωσφορικής κυτιδίνης, dCTD: Απαμινάση της μονοφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης dCDP: διφωσφορική δεοξυκυτιδίνη, dCTP: τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη, dFdC: γεμισταβίνη, dFdCDP: διφωσφορική γεμισταβίνη, dFdCMP: μονοφωσφορική γεμισταβίνη, dFdCTP: τριφωσφορική γεμισταβίνη, dFdU: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη, dFdUMP: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη μονοφωσφορική, dTMP: δεοξυθυμίνη μονοφωσφορική, dUMP: δεοξουριδίνη μονοφωσφορική<sup>89</sup>.



**Εικόνα 1.18.** Σχηματική απεικόνιση των κύριων μηχανισμών δράσης της γεμισιταβίνης. **(A)** Απεικόνιση του καλυμμένου τερματισμού της αλυσίδας (*masked chain-termination*). Σε αυτόν τον μηχανισμό, η DNA πολυμεράση ενσωματώνει την τριφωσφορική γεμισιταβίνη (*dFdCTP*) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Στη συνέχεια, ένα άλλο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (*dNTP*) έχει ενσωματωθεί, καθιστώντας την πολυμεράση ανήμπορη να προχωρήσει και στη συνέχεια η επιμήκυνση της αλυσίδας σταματά. **(B)** Αυτοπολλαπλασιασμός (*autoprofitation*) της γεμισιταβίνης. Ομοιοπολική πρόσδεση της διφωσφορικής γεμισιταβίνης (*dFdCDP*) οδηγεί σε αδρανοποίηση της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης (*RR*), μια σημαντική πρωτεΐνη για την ισορροπία της συγκέντρωσης *dNTP*. Η αναστολή της *RR* μειώνει τη συγκέντρωση του *dNTP* και τη δραστηριότητα της απαμινάσης της δεοξυκυτιδίνης (*dCTD*), καθιστώντας τη γεμισιταβίνη πιο πιθανό να ενεργοποιηθεί από ένζυμα που μεταβολίζουν νουκλεοτίδια και ως εκ τούτου να ενσωματωθεί στο DNA <sup>90</sup>.

#### 1.3.1.1.1.5 Αντίσταση στη γεμισιταβίνη

Όπως πολλά άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία, η αντίσταση στη γεμισιταβίνη μπορεί να είναι εγγενής ή να αποκτηθεί από κάθε ασθενή ξεχωριστά κατά τη διάρκεια των κύκλων της θεραπείας. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την αντίσταση και την ευαισθησία στην γεμισιταβίνη όπως το χημικό περιβάλλον του καρκίνου, οι πρωτεΐνες που ευθύνονται για την μεταφορά της γεμισιταβίνης, η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή κ.α. <sup>90</sup>. Κάποιοι μηχανισμοί έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και φαίνονται στον **Πίνακα 1.1**.

Ωστόσο, επειδή πολλές απ' αυτές τις διεργασίες είναι πολύπλοκες, μπορεί να είναι δύσκολο να κατανοήσουμε τους ακριβείς ρόλους, και επομένως, τις συνέπειες στην χημειοαντίσταση. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος που εμφανίζουν αντίσταση τα καρκινικά κύτταρα

αφορά τη μείωση των επιπέδων των μεταφορέων hENT1 στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εισέρχονται λιγότερα μόρια γεμισιταβίνης στα καρκινικά κύτταρα, οπότε μειώνεται αισθητά η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας.

**Πίνακας 1.1** Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται πιο συχνά με την αντίσταση της γεμισιταβίνης σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

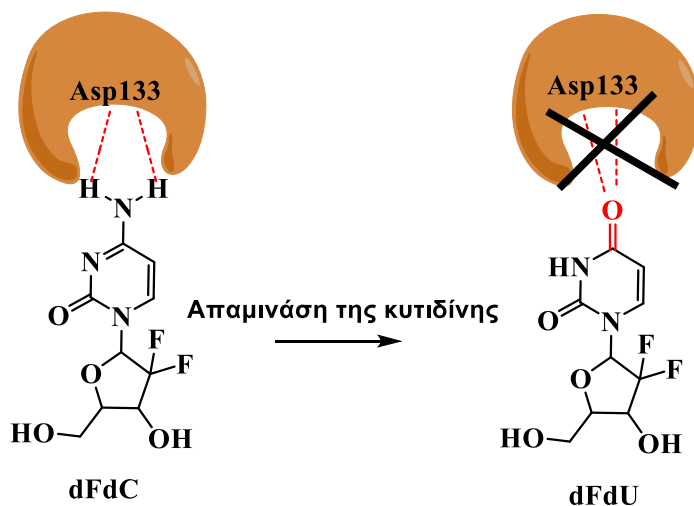
<u>Πρωτεΐνη</u>	<u>Επίπεδα</u>	<u>Τύπος καρκινικών κυττάρων</u>	<u>Αναφορές</u>
hENT1	Ελαττωμένα	Πάγκρεας	Giovannetti et al., 2006; Farrell et al., 2009
hCNT1	Ελαττωμένα	Πάγκρεας	Skrypek et al., 2013
dCK	Ελαττωμένα	Ωοθηκών, πάγκρεας	Ohhashi et al., 2008; Ruiz van Haperen et al., 1994
RRM1	Αυξημένα	Χολή,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

*dCK*: κινάση της δεοξυκυτιδίνης, *hCNT1*: Ανθρώπινος συγκεντρωτικός νουκλεοσιδικός μεταφορέας I, *hENT1*: Ανθρώπινος εξισορροπητικός νουκλεοσιδικός μεταφορέας I, *NSCL*: Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, *RRM1*: ριβονουκλεοτιδική αναγωγή I, *RRM2*: ριβονουκλεοτιδική αναγωγή II.

Ένας άλλος μηχανισμός αντίστασης στη γεμισιταβίνη είναι η υψηλή έκφραση αντλιών εκροής φαρμάκων, όπως μεταφορείς της οικογένειας πρωτεϊνών ABC. Αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται ιδιαίτερα σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και έχουν αποδειχθεί ότι τα προστατεύουν από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η αντίσταση στη γεμισιταβίνη σχετίζεται επίσης με πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες. Αλλαγές σε ένα ή περισσότερα γονίδια παραμένουν ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Υπάρχουν ενδείξεις που δείχνουν ότι οι βιοχημικοί οδοί NF-κB, AKT, MAPK και HIF-1α εμπλέκονται στην αντίσταση στη γεμισιταβίνη είτε *in vitro* είτε *in vivo* <sup>91</sup>.

Η γεμισιταβίνη στερείται βέλτιστης φαρμακοκινητικής διότι έχει μειωμένη σταθερότητα στο πλάσμα του αίματος και στο σπύκωτι <sup>92</sup> λόγω της ταχείας μετατροπής της στον ανενεργό μεταβολίτη της 2',2'-δεοξυδιφθοροουριδίνη (dFdU) μέσω υδρολυτικής απαμίνωσης στην 4-αμίνη από το ένζυμο απαμινάση της κυτιδίνης. Αυτή η απαμίνωση αποτελεί τεράστιο εμπόδιο στην αναγνώριση ενζύμου-υποστρώματος από την κινάση που φωσφορυλιώνει-ενεργοποιεί την γεμισιταβίνη (κινάση της δεοξυκυτιδίνης), δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πλέον δεσμοί υδρογόνου με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Asp133) και της ομάδας 4-O του dFdU <sup>93</sup> (**Σχήμα 1.7**). Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και τη γαστρεντερική τοξικότητα της γεμισιταβίνης. Για να ξεπεραστεί η αστάθεια στο πλάσμα (χρόνος ημιζώης μόνο 1,5 ώρες) <sup>93</sup>, η γεμισιταβίνη παρέχεται με ενδοφλέβια ένεση αντί της δια στόματος χορήγησης <sup>94</sup>.

### Κινάση της δεοξυκυτιδίνης



**Σχήμα 1.7.** Σχηματική απεικόνιση της ενζυματικής αναγνώρισης της γεμισιταβίνης από την κινάση της δεοξυκυτιδίνης.

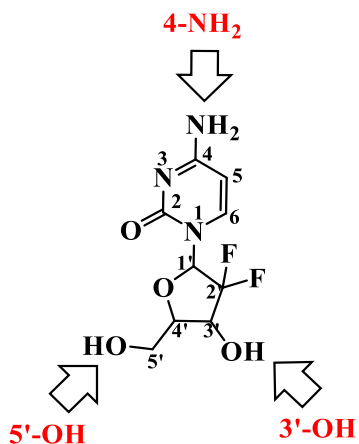
Εν κατακλείδι, τα κύρια μειονεκτήματα στη χρήση της γεμισιταβίνης έγκεινται **(1)** στην ανεξέλεγκτη παράπλευρη κυτταροτοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα λόγω έλλειψης στόχευσης, **(2)** στη ταχεία απαμίνωση της προς τον μεταβολίτη dFdU μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά της και **(3)** στην εμφάνιση αντίστασης των καρκινικών κυττάρων.

#### 1.3.1.1.1.6 Χημεία της γεμισιταβίνης

Οι προαναφερθέντες περιορισμοί της γεμισιταβίνης μπορούν να ξεπεραστούν είτε με την εφαρμογή της στρατηγικής των προφαρμάκων είτε μέσω σύζευξης με μόρια πλοηγούς (π.χ. πεπτίδια) είτε με ενσωμάτωση σε υπερμόρια (π.χ. καλυκένια).

Η γεμισιταβίνη διαθέτει τρεις λειτουργικές ομάδες (δραστικές θέσεις για διεξαχθούν αντιδράσεις): (A) την πρωτοταγή υδροξυλομάδα (5'-OH), (B) τη δευτεροταγή υδροξυλομάδα (3'-OH) και (Γ) την αμινομάδα (4-NH<sub>2</sub>) (**Εικόνα 1.19**).

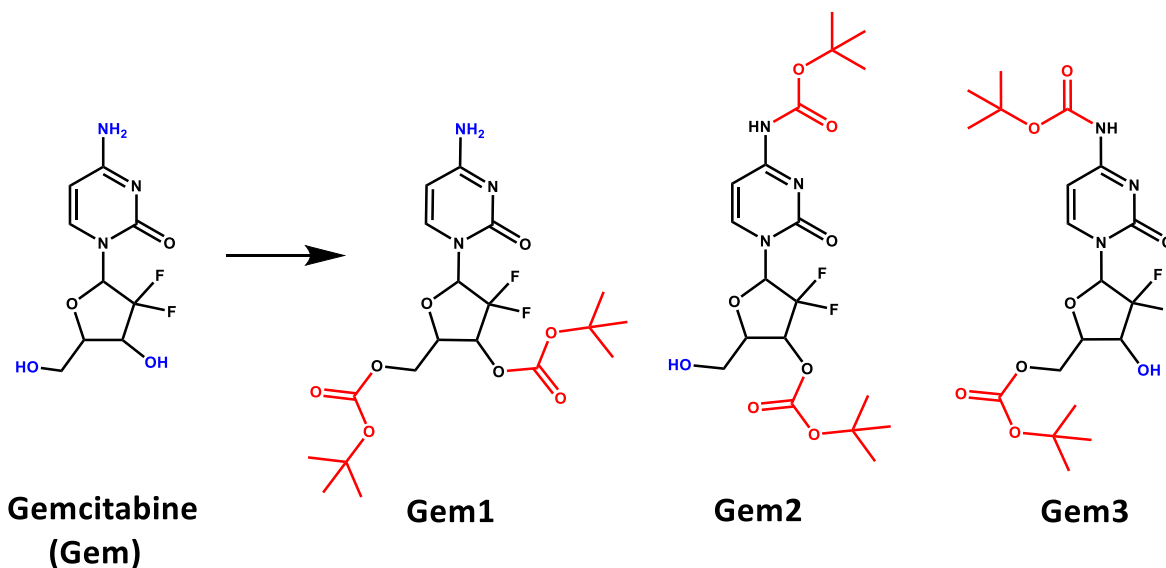




**Εικόνα 1.19.** Δομή και χαρακτηριστικές-δραστικές ομάδες της γεμισιταβίνης.

Για να επιτευχθεί μια τοποεκλεκτική σύζευξη σε μία απ' τις θέσεις (5'-OH, 3'-OH ή 4-NH<sub>2</sub>) θα πρέπει συνήθως να πραγματοποιηθούν επιλεκτικές προστασίες/αποπροστασίες με διάφορες προστατευτικές ομάδες όπως τόσυλο-, βενζύλο-, Boc- κ.α.

Μέσα από τους διάφορους τρόπους προστασίας, ο πιο κλασικός είναι η Boc- προστασία (*tert*-βουτυλοξυκαρβονυλο προστασία)<sup>95</sup>, συνθέτοντας διαφορετικούς συνδυασμούς, μερικοί απ' τους οποίους παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1.8**.



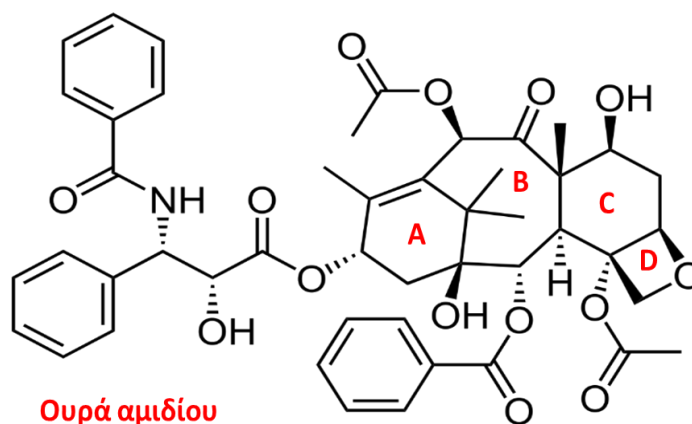
**Σχήμα 1.8.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα Boc- προστατευμένων αναλόγων της γεμισιταβίνης. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι Boc- ομάδες και με μπλε χρώμα οι ελεύθερες χαρακτηριστικές ομάδες.

### 1.3.1.1.2 Αντικαρκινικό φάρμακο ‘πακλιταξέλη’

#### 1.3.1.1.2.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία της πακλιταξέλης

Η πακλιταξέλη (Paclitaxel – PTX, γνωστή και ως ταξόλη) είναι ένας αντινεοπλαστικός αντιμιτωτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής κατά του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, των ωοθηκών, και του παχέος εντέρου, και ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για το σάρκωμα Kaposi. Το μόριο της πακλιταξέλης αποτελείται από έναν τετρακυκλικό πυρήνα που ονομάζεται μπακκατίνη III και μια ‘ουρά’ αμιδίου (**Εικόνα 1.20**). Οι βασικοί δακτύλιοι ονομάζονται (από αριστερά προς τα δεξιά) δακτύλιος A (ένα κυκλοεξένιο), δακτύλιος B (ένα κυκλοοκτάνιο), δακτύλιος C (ένα κυκλοεξάνιο) και δακτύλιος D (ένα οξετάνιο).

Αναφέρεται ως αντιμικροσωληνικός παράγοντας ο οποίος διαφέρει από τα φάρμακα που προκαλούν την αποσυναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων όπως τα αλκαλοειδή της νίνεα, καθώς η πακλιταξέλη προάγει τη συναρμολόγηση μικροσωληνίσκων από τα διμερή της τουμποουλίνης και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους, αποτρέποντας τον αποπολυμερισμό τους, παρεμβαίνοντας έτσι στον κύκλο της τουμποουλίνης <sup>96</sup>.



**Εικόνα 1.20.** Η διδιάστατη δομή της πακλιταξέλης.

Η πακλιταξέλη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν ταξανίου που εξήχθη αρχικά το 1967 από το δέντρο τάξος ο ραγώδης (*Taxus baccata*) ύστερα από διαλογή φυτών και χρησιμοποιήθηκε για ιατρικούς λόγους για πρώτη φορά μερικά χρόνια αργότερα. Στις προκλινικές δοκιμές η ταξόλη παρουσίασε μέτρια αποτελέσματα κυρίως λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της και δεν θεωρήθηκε το πιο υποσχόμενο φυσικό προϊόν, αν και προχώρησε σε κλινικές δοκιμές το 1984 <sup>97</sup>. <sup>98</sup>. Ωστόσο, αρκετές κλινικές μελέτες καθυστέρησαν λόγω έλλειψης της ταξόλης, καθώς η μόνη πηγή λήψης ήταν το βραδέως αναπτυσσόμενο δένδρο *T. Brevifolia*, το οποίο αναπόφευκτα είχε αρχίσει να εξαντλείται, εφόσον η αφαίρεση του φλοιού κατέστρεφε τα δέντρα. Το 1991 το NCI αποφάσισε να αναθέσει την εμπορευματοποίηση της ταξόλης στη φαρμακευτική εταιρεία Bristol-Myers Squibb (BMS). Το 1992 η BMS δίνει στην ταξόλη τη νέα της ονομασία, πακλιταξέλη και την ίδια χρονολογία ο FDA την εγκρίνει για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών. Το 1994 ο

FDA εγκρίνει τη πακλιταξέλη για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού και το 1999 για τη θεραπεία του NSCLC.

Αξίζει να σημειωθεί πως η ταξόλη είναι το πιο κερδοφόρο φάρμακο χημειοθεραπείας στην ιστορία με πωλήσεις άνω του 1 δισεκατομμυρίου δολαρίων το 1997, και το μόνο φάρμακο σε κλινική χρήση που ταυτοποιήθηκε από το πρόγραμμα επιλογής φυτών<sup>99</sup>.

Το πιο γνωστό ανάλογο της πακλιταξέλης είναι η πακλιταξέλη δεσμευμένη με αλβουμίνη (εμπορική ονομασία Abraxane, που ονομάζεται επίσης nab-paclitaxel). Η Abraxis BioScience ανέπτυξε το Abraxane, στο οποίο η πακλιταξέλη συνδέεται με την αλβουμίνη ως μέσο παράδοσης και εγκρίθηκε από τον FDA τον Ιανουάριο του 2005 για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Έκτοτε έχει εγκριθεί για τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Οι συνθετικές προσεγγίσεις για την παραγωγή της πακλιταξέλης οδήγησαν στην ανάπτυξη της ντοσεταξέλης (Docetaxel) που έχει παρόμοιες κλινικές χρήσεις με τη πακλιταξέλη και διατίθεται στο εμπόριο με την επωνυμία Taxotere.

#### 1.3.1.1.2.2 Ολική σύνθεση της πακλιταξέλης

Δομικά, αυτό το πολυκυκλικό διτερπενοειδές αποτελεί μια πρόκληση για την ολική σύνθεση λόγω των πολλών κοντινών λειτουργικών ομάδων που απαιτεί μεγάλη ακρίβεια και στους χειρισμούς. Οποιαδήποτε πορεία για τη σύνθεση ενός τέτοιου μορίου θα πρέπει να αντιμετωπίσει το ζήτημα του διαμορφωτικά εύκαμπτου κεντρικού οκταμελούς δακτυλίου, το οποίο καθιστά απρόβλεπτη τη δραστηριότητα των διαφόρων γειτονικών λειτουργικών ομάδων. Επιπλέον, η συμμόρφωση που υπάρχει λόγω των δευτεροταγών αλκοολών με παρόμοια δραστηριότητα δημιουργεί ένα δύσκολο παζλ χημειοεκλεκτικότητας. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, τουλάχιστον 30 ομάδες προσπάθησαν να αποκτήσουν το 'στέμμα' του τερματισμού για την πρώτη ολική συνθετική προσέγγιση, και όλες οι ολοκληρωμένες συνθέσεις, ανεξάρτητα από τη χρονολογία, έχουν αναφερθεί επάξια ως σημαντικά επιτεύγματα στα χρονικά του οργανικής χημείας.

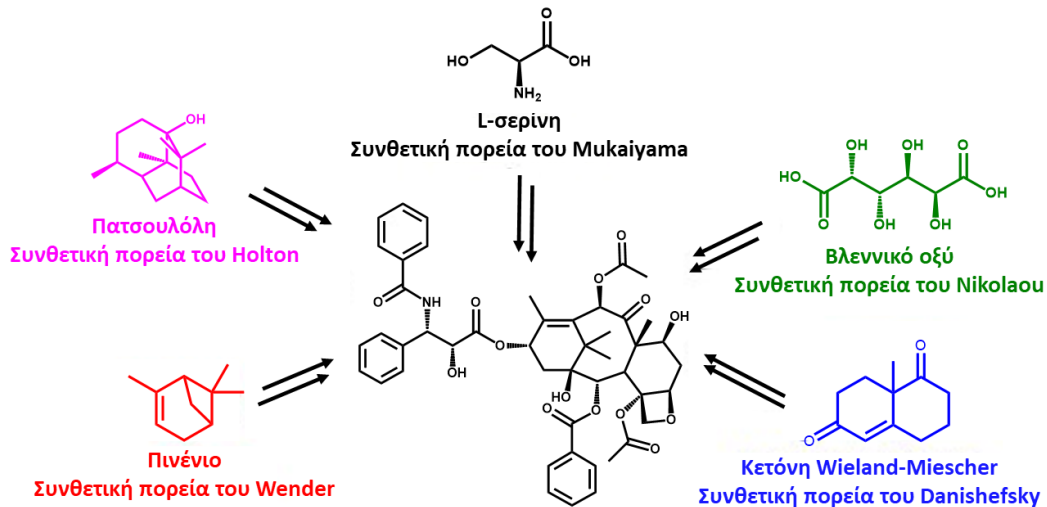
Το 1994 ολοκληρώθηκε η ολική σύνθεση της ταξόλης για πρώτη φορά από δυο διαφορετικές ομάδες με δυο διαφορετικούς τρόπους που άνοιξε τον δρόμο για την μεγάλης κλίμακας σύνθεση του φαρμάκου:

- 1) **Σύνθεση του Holton:** Η ομάδα του Holton δημοσίευσε 1 Φεβρουαρίου 1994 στο περιοδικό JACS την γραμμική συνθετική πορεία της ταξόλης ( $A \rightarrow AB \rightarrow ABC \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας από πατσουλόλη (patchoulol)<sup>100</sup> (**Εικόνα 1.21**). Η ολική σύνθεση Holton είναι ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα γραμμικής σύνθεσης ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη οξειδίου του πατσουλενίου. Αυτό το εποξείδιο μπορεί να ληφθεί σε δύο στάδια από το τερπένιο πατσουλόλη και τη βορνεόλη. Η αντίδραση είναι εναντιοεκλεκτική, συνθέτοντας (+) - Ταξόλη από (-) - οξείδιο του πατουλουλενίου ή (-) - Ταξόλη από (-) - βορνεόλη. Η συνθετική

πορεία του Holton είναι σχετικά μικρή σε σύγκριση με εκείνη των άλλων ομάδων (46 γραμμικά βήματα από το οξειδίο του πατσουλενίου).

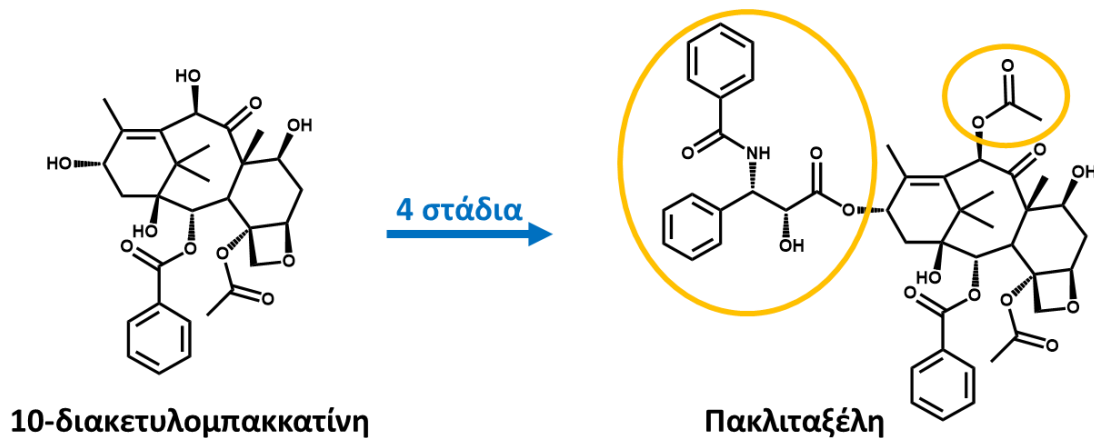
- 2) **Σύνθεση του Nikolaou:** Η ομάδα του KC Nikolaou δημοσίευσε 17 Φεβρουαρίου 1994 στο περιοδικό Nature τη συγκλίνουσα συνθετική πορεία της ταξόλης ( $A+C \rightarrow AC+B \rightarrow ABC+D \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας από βλεννικό οξύ (mucic acid)<sup>101</sup> (**Εικόνα 1.21**). Η σύνθεση του KC Νικόλαου είναι ένα παράδειγμα συγκλίνουσας σύνθεσης επειδή το τελικό μόριο συναρμολογείται από τρία προ-συναρμολογημένα συνθόνια. Δύο κύρια μέρη αποτελούν οι δακτύλιοι A και C που συνδέονται με δύο μικρές γέφυρες δημιουργώντας έναν 8-μελή δακτύλιο στη μέση (δακτύλιος B). Το τρίτο προ-συναρμολογημένο τμήμα είναι μια ουρά αμιδίου. Ο δακτύλιος D είναι ένας δακτύλιος οξετάνης. Δύο βασικοί χημικοί μετασχηματισμοί είναι η αντίδραση Shapiro (ή αποσύνθεση τοσυλοϋδραζόνης) και η αντίδραση σύζευξης της πινακόλης.  
Αργότερα δημοσιεύθηκαν και άλλες συνθετικές προσεγγίσεις:
- 3) Σύνθεση του Danishefsky (1996) – Η σύνθεση του Danishefsky είναι ένα παράδειγμα συγκλίνουσας σύνθεσης ( $C+D \rightarrow CD+AB \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας με τη κετόνη Wieland-Miescher (δικυκλική κετόνη) (**Εικόνα 1.21**)<sup>102</sup>.
- 4) Σύνθεση του Wender (1997) – Η σύνθεση του Wender είναι ένα παράδειγμα γραμμικής σύνθεσης ( $A+B \rightarrow AB+C \rightarrow ABC+D \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας με το πινένιο (**Εικόνα 1.21**)<sup>103</sup>.
- 5) Σύνθεση Kuwajima (1998) – Η σύνθεση του Kuwajima είναι ένα παράδειγμα γραμμικής σύνθεσης ( $A+B \rightarrow AB+C \rightarrow ABC+D \rightarrow ABCD$ ) μέσω της στρατηγικής των συνθετικών δομικών μονάδων<sup>104</sup>.
- 6) Σύνθεση Mukaiyama (1998) – Η σύνθεση του Mukaiyama είναι ένα παράδειγμα γραμμικής σύνθεσης ( $B+C \rightarrow BC+A \rightarrow ABC+D \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας με την L-σερίνη (**Εικόνα 1.21**)<sup>105</sup>.
- 7) Σύνθεση Takahashi (2006) – Η σύνθεση του Takahashi είναι ένα παράδειγμα συγκλίνουσας σύνθεσης ( $AB+C \rightarrow ABC+D \rightarrow ABCD$ ) ξεκινώντας με την γερανιόλη<sup>106</sup>.
- 8) Σύνθεση Sato-Chida (2015) μέσω του ενδιαμέσου Takahashi<sup>107</sup>.
- 9) Σύνθεση Nakada Taxol (2015) μέσω του ενδιαμέσου Takahashi<sup>108</sup>.
- 10) Σύνθεση Baran (2020) μέσω αποκλίνουσας συνθετικής προσέγγισης δυο φάσεων<sup>109</sup>.

Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί διάφορες συνθετικές προσεγγίσεις για την ολική σύνθεση της πακλιταξέλης ενώ οι προσπάθειες συνεχίζονται έως και σήμερα (τελευταία δημοσιευμένη ολική σύνθεση αποτελεί η σύνθεση του Baran που δημοσιεύθηκε το 2020).



*Εικόνα 1.21. Παραδείγματα συνθετικών προσεγγίσεων για την ολική σύνθεση της πακλιταξέλης.*

Μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για τη σύνθεση της πακλιταξέλης είναι η ημι-συνθετική προσέγγιση η οποία αφορά τη λήψη ενός τμήματος από τη φύση και τη σύνθεση του υπολοίπου (**Εικόνα 1.22**). Σε αντίθεση με την πακλιταξέλη, η οποία βρίσκεται σε μικρές ποσότητες και σε ασυνήθιστα δέντρα, μια ένωση γνωστή ως 10-διακετυλομπακκατίνη (10-DAB) μπορεί να απομονωθεί σε πολύ μεγαλύτερη κλίμακα από τις βελόνες του κοινού αγγλικού θάμνου (English yew shrub)<sup>110</sup>. Έτσι, μέσω μιας διαδικασίας τεσσάρων βημάτων για τη μετατροπή της 10-διακετυλομπακκατίνης σε πακλιταξέλη σε υψηλή απόδοση χωρίς να χρειάζεται να κόβουμε δέντρα στην πορεία.



*Εικόνα 1.22. Απεικόνιση της ημι-συνθετικής προσέγγισης της πακλιταξέλης.*

#### 1.3.1.1.2.3 Μηχανισμός δράσης της πακλιταξέλης

Η πακλιταξέλη διαθέτει διάφορους μηχανιστικούς τρόπους για να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (**Εικόνα 1.23**) οι οποίοι αναλύονται παρακάτω:

## **(I) Η πακλιταξέλη ως παράγοντας πολυμερισμού**

Η πακλιταξέλη συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους στη θέση των διμερών της τουμπουλίνης και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (πολυμερισμός) προωθώντας τη συναρμολόγηση των υπομονάδων άλφα και βήτα τουμπουλίνης, τα δομικά στοιχεία των μικροσωληνίσκων. Το φάρμακο μειώνει την κρίσιμη συγκέντρωση της τουμπουλίνης που απαιτείται για τη συναρμολόγηση της, προωθώντας έτσι την επιμήκυνση του πολυμερούς τουμπουλίνης. Η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων επηρεάζει την δυναμική τους. Επομένως, η ικανότητα διαίρεσης του κυττάρου διακόπτεται λόγω ανεπαρκών απαιτήσεων του μιτωτικού σημείου ελέγχου. Ως εκ τούτου, η κυτταρική διαίρεση σταματά στη φάση G2 ή M. Οι πολυμερισμένοι και σταθεροί μικροσωληνίσκοι παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστοι από ψυχρές θερμοκρασίες και από το ασβέστιο. Η παρουσία ασβεστίου μειώνει τη συνάφεια της ταξόλης για την τουμπουλίνη. Επομένως, η ισορροπία του πολυμερισμού/αποπολυμερισμού μετατοπίζεται προς πολυμερισμό για να αντισταθμιστεί αυτό το αποτέλεσμα. Επιπλέον, τα χονδροκύτταρα δείχνουν ότι η πακλιταξέλη προκαλεί κυτταροσκελετικές ανωμαλίες στις οποίες οι μικροσωληνίσκοι γίνονται κοντόχοντροι και ευθείς στο κυτταρόπλασμα, με τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο σε αντίθεση με τα λεπτά, κοίλα νημάτια στη φυσιολογική τους μορφή. Αυτές οι αλλαγές συνεχίζονται για 48 ώρες μετά την αφαίρεση της πακλιταξέλης. Οι τροποποιημένοι μικροσωληνίσκοι αποσυνδέουν τα ριβοσώματα από το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και βοηθούν στη σύντηξη των γειτονικών ενδοπλασματικών συμπλόκων. Η πακλιταξέλη πολυμερίζει μόνο ελεύθερους μικροσωληνίσκους που δεν συνδέονται ή που προϋπάρχουν στα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων (Microtubule Organizing Centers - MTOC). Οι προσκολλημένοι μικροσωληνίσκοι εξαφανίζονται παρουσία πακλιταξέλης. Η πακλιταξέλη παρεμβαίνει στη δυναμική των μικροσωληνίσκων και του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και καθυστερεί την εξέλιξη της μίτωσης προκαλώντας αποτυχία στο χρωμοσωμικό διαχωρισμό, τα οποία τελικά οδηγούν στην πρόκληση απόπτωσης και μιτωτικής σύλληψης.

## **(II) Η πακλιταξέλη επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 (B-lymphoma 2)**

Η κυτταροτοξικότητα της πακλιταξέλης έγκειται στην ικανότητά της να προκαλεί υπερφωσφορυλίωση της Bcl-2 (πρωτεΐνη που ρυθμίζει την απόπτωση) μέσω ενεργοποίησης της Raf-1 κινάσης, οδηγώντας εν τέλει στον κυτταρικό θάνατο <sup>111</sup>. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η διάρκεια της έκθεσης στη πακλιταξέλη καθώς και η συγκέντρωση της που χρησιμοποιείται <sup>112</sup>. Η ενεργοποίηση της Raf-1 κινάσης από την πακλιταξέλη συνδέεται με τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Η επίδραση αμβλύνεται σε κύτταρα που είναι ανθεκτικά στην πακλιταξέλη, η τουμπουλίνη των οποίων δεν πολυμερίζεται μετά την προσθήκη της πακλιταξέλης. Αντίθετα, η βινκριστίνη και η βινμπλαστίνη, φάρμακα στα οποία είναι ευαίσθητα τα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στην πακλιταξέλη, ήταν ικανά να επιφέρουν φωσφορυλίωση της Raf-1 κινάσης. Επομένως, υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ πολυμερισμού της τουμπουλίνης, της φωσφορυλίωσης Raf-1/bcl-2 και της κυτταροτοξικότητας

<sup>111</sup>.

### **(III) Η πακλιταξέλη επηρεάζει τη σηματοδότηση του ασβεστίου**

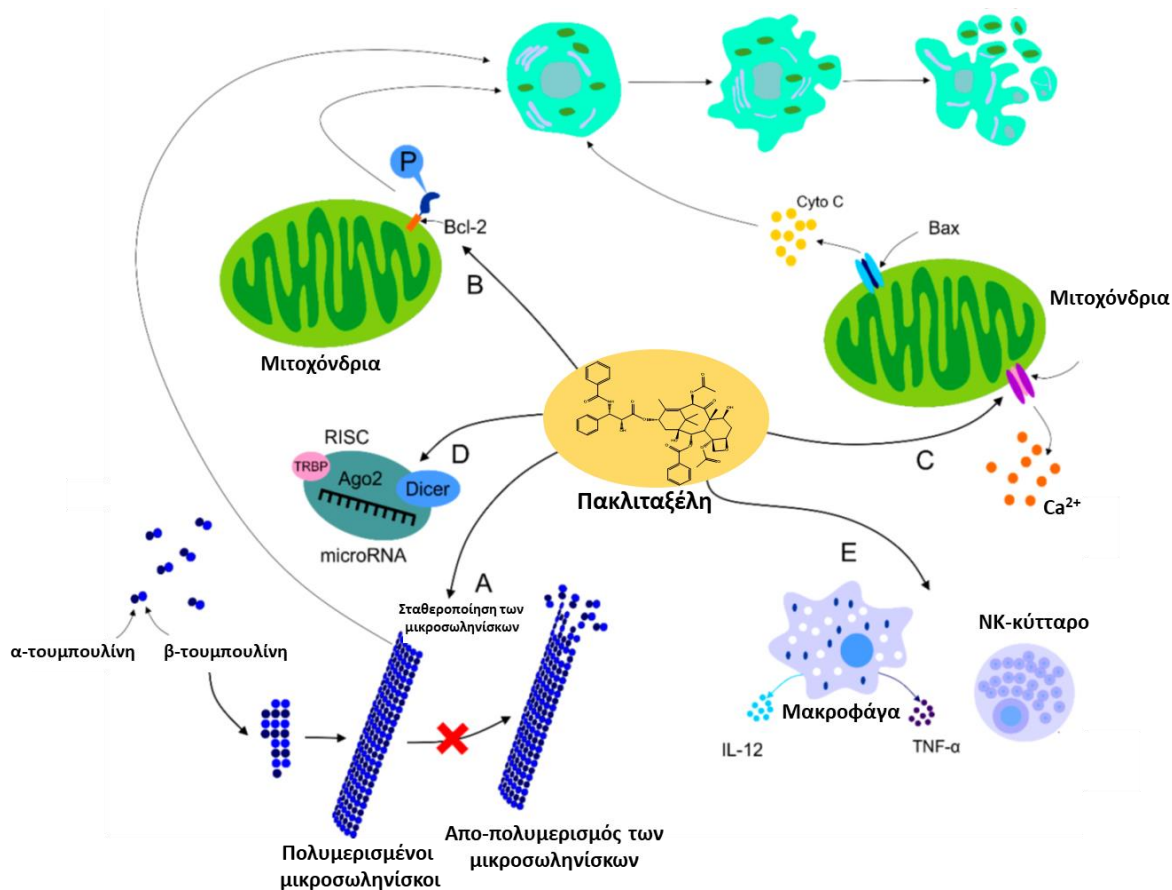
Η πακλιταξέλη προκαλεί την εξάντληση των ιόντων ασβεστίου από το μιτοχονδριακό απόθεμα μέσω του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (PTP). Το ασβέστιο που εξαντλείται προκαλεί την απελευθέρωση του αποπτωτικού παράγοντα κυτοχρώματος C (cyto C) από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο οδηγώντας έτσι σε απόπτωση. Πιστεύεται ότι οι παρενέργειες των αντιμιτωτικών φαρμάκων σχετίζονται με τον ρόλο αυτών στη σηματοδοτική οδό του ασβεστίου<sup>113</sup>.

### **(IV) Η επίδραση της πακλιταξέλης στα προφίλ έκφρασης microRNA**

Το miRNA, μικρό μη-κωδικό RNA με ρυθμιστική λειτουργία στην έκφραση γονιδίων, μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορα αντινεοπλαστικά φάρμακα συμπεριλαμβανομένης της πακλιταξέλης. Αρκετές μελέτες που εστιάζονται στην έκφραση του miRNA απέδειξαν τη σύνδεση μεταξύ του φαρμάκου και των μεταβολών στο προφίλ έκφρασης miRNA<sup>114</sup>.

### **(V) Οι ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις της πακλιταξέλης**

Ο ρόλος της πακλιταξέλης στον τομέα της ανοσορρύθμισης εμφανίζεται και με ενεργοποίηση αλλά και με καταστολή παραγωγής των ανοσοκυττάρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων<sup>115</sup>. Έχει αποδειχτεί η συμμετοχή της πακλιταξέλης στη ρύθμιση της ανοσίας του ξενιστή μέσω διέγερσης των μακροφάγων που οδηγούν σε έκκριση κυτοκίνης συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ή Ιντερλευκίνη-12 που προκαλούν την ενεργοποίηση των φυσικών δολοφόρων (Natural Killers - NK), δενδριτικών κυττάρων και κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων.



**Εικόνα 1.23.** Απεικόνιση των διαφόρων μηχανισμών δράσης της πακλιταξέλης. **(Α)** Αντικαρκινικός μηχανισμός δράσης που οδηγεί σε σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, διακοπή μίτωσης και επακόλουθη απόπτωση, **(Β)** Απενεργοποίηση της Bcl-2 μέσω υπερφωσφορυλίωσης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την απόπτωση, **(C)** Ρύθμιση της σηματοδότησης ασβεστίου από η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του cyto C από τα μιτοχόνδρια και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, **(D)** Συμμετοχή της πακλιταξέλης στη ρύθμιση ορισμένων miRNAs που σχετίζονται με τη ρύθμιση της εξέλιξης του όγκου, **(E)** Ενεργοποίηση της ανοσοποιητικής απόκρισης του σώματος που συμβάλλει στην εξάλειψη του όγκου<sup>113</sup>.

#### 1.3.1.1.2.4 Φαρμακογενετική της πακλιταξέλης

Οι κύριοι λόγοι για την καθυστέρηση της κλινικής ανάπτυξης της πακλιταξέλης είναι η χαμηλή της υδατοδιαλυτότητα (0.7 mg/mL) και η χημική της αστάθεια. Για την αντιμετώπιση της υδροφοβικότητας της, είχε αρχικά αραιωθεί με τον διαλύτη Cremophor EL<sup>®</sup>, ένα πολυοξυαιθυλιωμένο λάδι αναμειγμένο με αιθανόλη 1:1. Ωστόσο, αν και αυτό έλυσε το πρόβλημα της υδατοδιαλυτότητας, δημιούργησε το πρόβλημα των αντιδράσεων υπερευαισθησίας στο Cremophor EL<sup>®</sup>.



### **i. Φαρμακοκινητική**

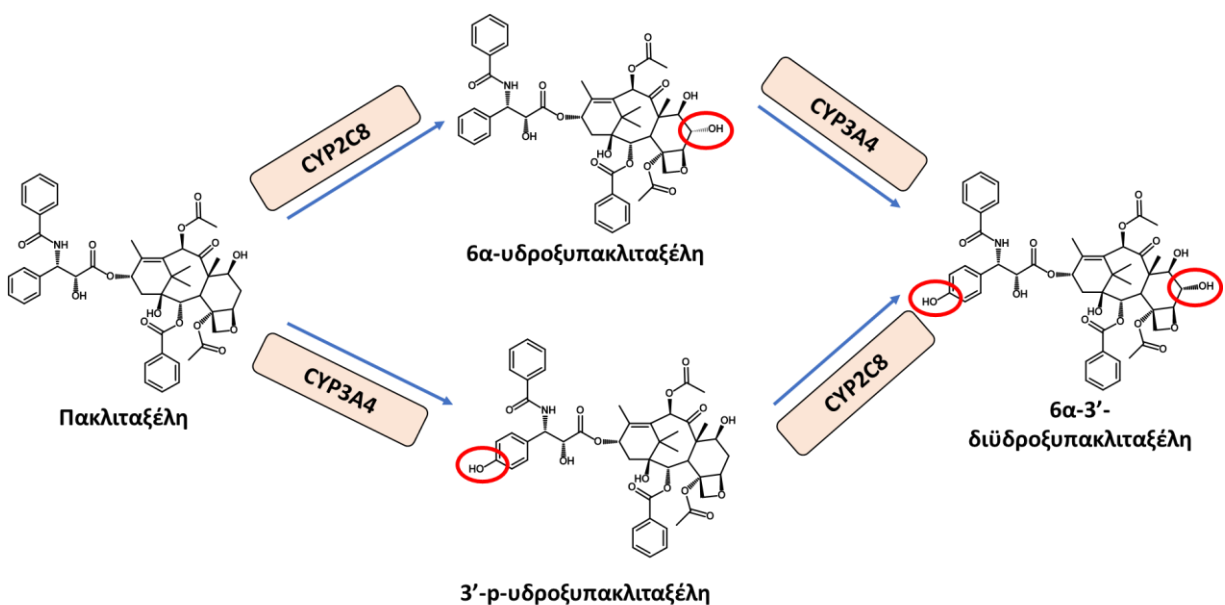
Η πακλιταξέλη είναι γνωστό πως συνδέεται με πρωτεΐνες του πλάσματος, με ιστούς και με τις τουμπουλίνες. Το ποσοστό δέσμευσης στις πρωτεΐνες αυτές φτάνει μέχρι και το 98%. Επιπλέον, έχει τη τάση να διανέμεται σε συγκεκριμένους τύπους ιστών, όπως νεφρά, πνεύμονα και σπλήνα. Παρά το γεγονός ότι η πακλιταξέλη δεσμεύεται στο πλάσμα και στους ιστούς, η αποβολή της γίνεται εύκολα και συσχετίζεται με τη γνωστή χαμηλή και αναστρέψιμη συγγένεια σύνδεσης. Η κύρια οδός αποβολής είναι η απέκκριση της χολής, όπου το ένα πέμπτο της δόσης της πακλιταξέλης ανακτάται εντός 24 ωρών μετά τη χορήγηση. Οι μεταβολίτες της πακλιταξέλης είναι επίσης μετρήσιμοι στη χολή που αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα της αποβολής του φαρμάκου από το σώμα. Σε *in vivo* μετρήσεις βρέθηκε πως οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της πακλιταξέλης υπερβαίνουν κατά πολύ τις συγκεντρώσεις της πατρικής ένωσης πακλιταξέλης στη χολή. Στους ανθρώπους, η νεφρική απέκκριση και άλλοι μηχανισμοί εξωηπατικής απέκκρισης αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% της αποβολής της πακλιταξέλης.

### **ii. Φαρμακοδυναμική**

Ο κύριος λόγος για τη διερεύνηση και κατανόηση της φαρμακοκινητικής ενός φαρμάκου είναι να προσδιοριστεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φαρμακοκινητικής του, της αποτελεσματικότητας του και της τοξικότητάς του. Στην περίπτωση της πακλιταξέλης, έχει βρεθεί σχέση μεταξύ της φαρμακοκινητικής της και της τοξικότητάς της. Το καλύτερο μοντέλο για την πρόβλεψη της σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης της πακλιταξέλης στο πλάσμα και της τοξικότητας της είναι το μοντέλο 'threshold', στο οποίο το χρονικό διάστημα που η συγκέντρωση της πακλιταξέλης υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο όριο συγκέντρωσης αποτελεί προγνωστικό τοξικότητας. Οι κύριες παρενέργειες της πακλιταξέλης είναι η μυελοκαταστολή, και ιδίως η ουδετεροπενία και η νευροπάθεια.

### **iii. Μεταβολισμός**

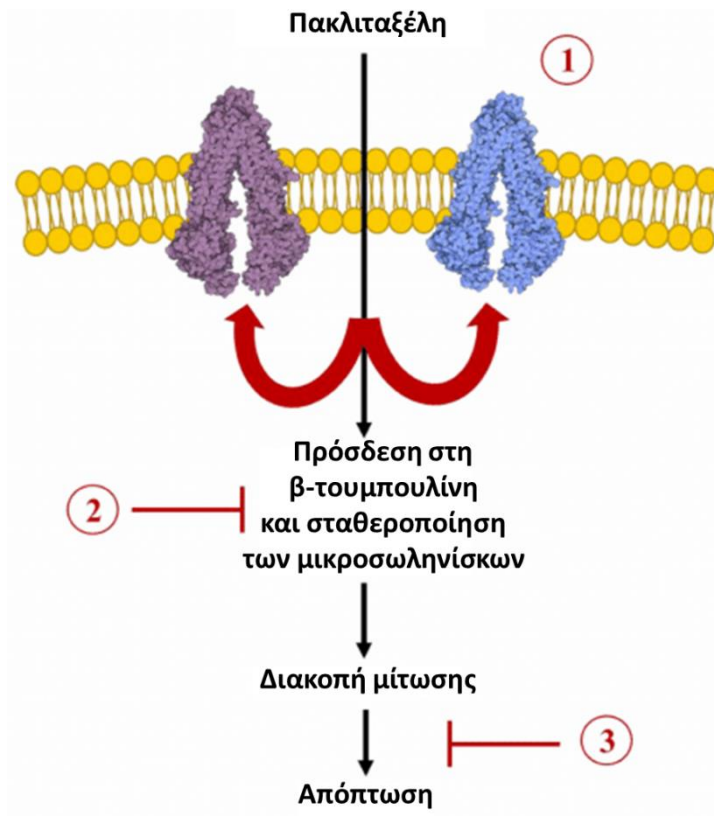
Ο μεταβολισμός της πακλιταξέλης οφείλεται κυρίως στον οξειδωτικό μεταβολισμό και την απέκκριση της χολής, ενώ μόνο το 5-10% της πακλιταξέλης αποβάλλεται μέσω των νεφρών. Η μελέτη του μεταβολισμού της πακλιταξέλης σε αρουραίους και ανθρώπους οδήγησε στη ταυτοποίηση εννέα μεταβολιτών σε αρουραίους και πέντε μεταβολίτες σε έναν ασθενή που είχε εξωτερική χολική αποστράγγιση<sup>116, 117</sup>. Αξίζει να σημειωθεί πως όλοι οι μεταβολίτες ήταν υδροξυλιωμένοι, αν και υπήρχαν διαφορές στο σημείο της υδροξυλίωσης αλλά και στις αναλογίες των μεταβολιτών που βρέθηκαν στη χολή. Ο κύριος μεταβολίτης που βρέθηκε στους ανθρώπους ήταν η 6α-υδροξυπακλιταξέλη. Αυτός ο μεταβολίτης δεν σχηματίζεται σε αρουραίους και προκύπτει από την πακλιταξέλη μέσω στερεοειδικής υδροξυλίωσης στη θέση 6 του δακτυλίου της ταξάνης, όπως προσδιορίστηκε από μελέτες NMR. Δύο άλλοι σημαντικοί μεταβολίτες είναι η 3'-p-υδροξυπακλιταξέλη, καθώς και ο διυδροξυλιωμένος μεταβολίτης 6α,3'-p-διυδροξυπακλιταξέλη. Η πακλιταξέλη μεταβολίζεται κυρίως από το κυτόχρωμα P450 (CYP) 2C8 στον κυρίως ανενεργό μεταβολίτη 6α-υδροξυπακλιταξέλη και σε μικρότερο βαθμό από το CYP3A4 προς την 3'-p-υδροξυπακλιταξέλη (Εικόνα 1.24).



**Εικόνα 1.24.** Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού της πακλιταξέλης από τα κυτοχρώματα CYP2C8 και CYP3A4. Οι θέσεις υδροξυλίωσης τονίζονται με κόκκινους κύκλους <sup>118</sup>.

#### 1.3.1.1.2.5 Αντίσταση στη πακλιταξέλη

Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια για τις αντικαρκινικές θεραπείες είναι η ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα. Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στη χημειοαντίσταση περιλαμβάνουν: μεταβολές στα λιπίδια της μεμβράνης, διαμερισματοποίηση (σε ενδοκυτταρικά κυστίδια), επαγωγή στοιχείων απόκρισης έκτακτης ανάγκης, τροποποίηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, μεταβολή των στόχων των φαρμάκων, μεταβολισμό (βιο-απενεργοποίηση), αυξημένη επιδιόρθωση βλαβών του DNA, μειωμένη πρόσληψη (μέσω μειωμένης ρύθμισης ενός υποδοχέα) και αυξημένη εκροή (από υπερεκφρασμένους μεταφορείς ABC). Συγκεκριμένα, η πακλιταξέλη έχει βρεθεί ότι προκαλεί αντοχή μέσω κυτταρικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν: υπερέκφραση των μεταφορέων δέσμευσης ATP (ABC), μεταλλάξεις της τουμπουλίνης και μεταβολές σε περιοχές σύνδεσης αυτής, μειωμένη λειτουργία σημαντικών πρωτεϊνών απόπτωσης (όπως Bcl-2 και p53), και μεταβολές στην έκφραση κυτοκινών (π.χ. Ιντερλευκίνη-6) (**Εικόνα 1.25**).



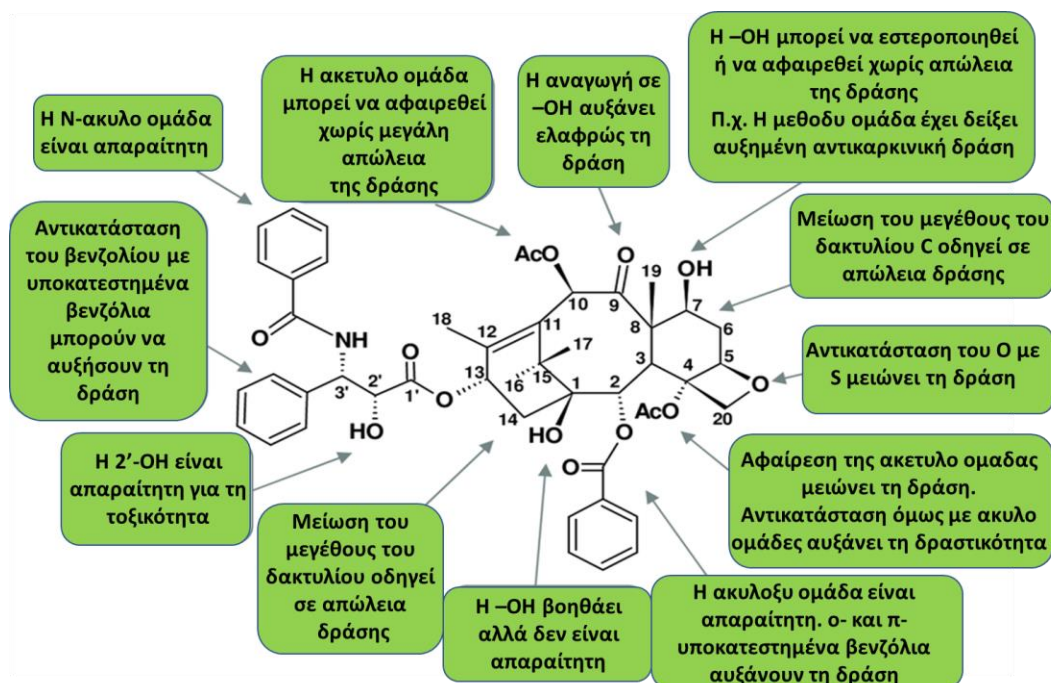
**Εικόνα 1.25.** Οι κύριοι μηχανισμοί αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στην πακλιταξέλη. Ο κυτταρικός μηχανισμός δράσης με τον οποίο η πακλιταξέλη δρα ως αντικαρκινικό φάρμακο φαίνεται με μαύρα βέλη. Η πακλιταξέλη εισέρχεται στο κύτταρο με παθητική διάχυση και συνδέεται με τη β-τουμπουλίνη στην εσωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων. Αυτό σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα να διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G2/M και συνεπώς να οδηγούμαστε σε απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν τη δράση της πακλιταξέλης μέσω τριών βασικών μηχανισμών (φαίνονται με κόκκινο χρώμα): **(1)** Μέσω υπερέκφρασης των διαμεμβρανικών μεταφορέων εκροής, ειδικά των *ABCB1* και *ABCC10*, **(2)** Μέσω μεταλλάξεων της τουμπουλίνης, και **(3)** Μέσω της μειωμένης λειτουργίας σημαντικών αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η *Bcl-2* και η *p53*<sup>119</sup>.

Εν κατακλείδι, τα κύρια μειονεκτήματα στη χρήση της πακλιταξέλης έγκεινται **(1)** στην ανεξέλεγκτη παράπλευρη κυτταροτοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα λόγω έλλειψης στόχευσης, **(2)** στη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και δομική αστάθεια που μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της, **(3)** στον ταχύ μεταβολισμό της προς τους υδροξυλιωμένους ανενεργούς μεταβολίτες της, **(4)** στην εμφάνιση αντίστασης των καρκινικών κυττάρων.

#### 1.3.1.1.2.6 Χημεία της πακλιταξέλης

Η πακλιταξέλη διαθέτει πολλές ομάδες όπως υδροξυλομάδες, ακετυλο ομάδες και βενζολικούς δακτυλίους που κατά καιρούς έχουν τροποποιηθεί για να σχηματιστούν ανάλογα της με σκοπό της εύρεσης ενός φαρμάκου με καλύτερο βιολογικό προφίλ. Ύστερα από τη σύνθεση

και τη βιολογική αξιολόγηση των διαφόρων τροποποιημένων αναλόγων της πακλιταξέλης προέκυψαν διάφορα συμπεράσματα για την επίδραση της κάθε χαρακτηριστικής ομάδας (**Εικόνα 1.26**).



**Εικόνα 1.26.** Σχέση δομής-δράσης διαφόρων τμημάτων της πακλιταξέλης <sup>120</sup>.

Η 2'-OH και η 7-OH αποτελούν τις δυο δραστικές ομάδες της πακλιταξέλης που χρησιμοποιούνται για σύζευξη. Η 2'-OH είναι πιο δραστική με αποτέλεσμα η πλειοψηφία των συζευγμάτων της πακλιταξέλης να σχετίζονται με αυτή. Για τη πραγματοποίηση αντίδρασης στην 7-OH απαιτείται προστασία της 2'-OH.

### 1.3.1.1.3 Αντικαρκινικό φάρμακο 'SN-38

#### 1.3.1.1.3.1 Βιολογικό υπόβαθρο και ιστορικά στοιχεία του SN-38

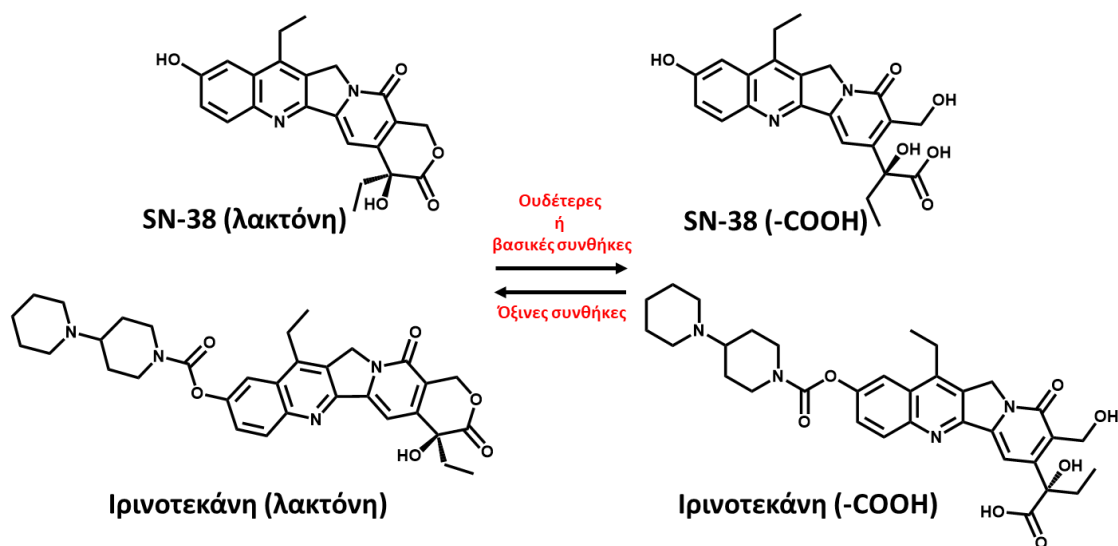
Ο αντινεοπλαστικός παράγοντας SN-38 ή αλλιώς 7-αιθυλο-10-υδροξυ-καμπτοθεκίνη αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της ιρινοτεκάνης, ενός αναλόγου του κλασσικού αντικαρκινικού παράγοντα καμπτοθεκίνη. Η καμπτοθεκίνη είναι ένα φυτικό αλκαλοειδές που λαμβάνεται από το δέντρο *Camptotheca acuminata* και έχει δείξει σημαντική αντικαρκινική δράση *in vitro*. Ωστόσο, αυτή η ένωση ήταν απογοητευτική στις πρώτες κλινικές δοκιμές λόγω του χαμηλού ποσοστού απόκρισης, χαμηλής υδατοδιαλυτότητας και της σοβαρής τοξικότητας που προκαλούσε, συμπεριλαμβανομένης της αιμορραγικής κυστίτιδας <sup>121</sup>. Επομένως, οι προσπάθειες κατευθύνθηκαν προς τη σύνθεση νέων παραγώγων με βελτιωμένο προφίλ και λιγότερη

τοξικότητα, και ταυτόχρονα διατηρώντας την αντικαρκινική δράση. Αυτές οι προσπάθειες οδήγησαν στο ημι-συνθετικό ανάλογο ιρινοτεκάνη που έδειξε ισχυρή αντικαρκινική δράση κατά διαφόρων όγκων, ακόμα και όγκων ανθεκτικών στη καμπτοθεκίνη. Η ιρινοτεκάνη μετά την υδρόλυσή της από καρβοξυλεστεράσες οδηγεί στον σχηματισμό του μεταβολίτη SN-38. Η ιρινοτεκάνη, και επομένως το SN-38, έχουν δείξει καλή κλινική εικόνα έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας και των ωοθηκών.

#### 1.3.1.1.3.2 Μεταβολισμός και μηχανισμός δράσης του SN-38

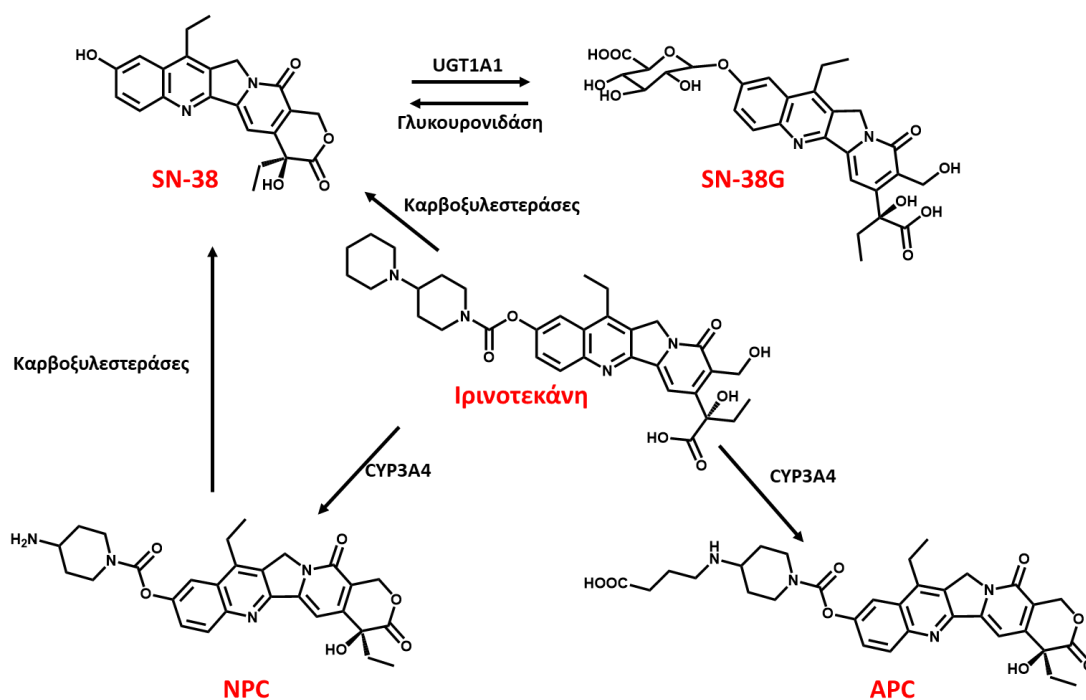
Ο μηχανισμός δράσης της ιρινοτεκάνης και του SN-38 περιλαμβάνει την παρεμπόδιση του ξετυλίγματος του DNA αναστέλλοντας την DNA τοποϊσομεράση IB (TOPIB). Σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλεγμα φαρμάκου-TOPIB-DNA<sup>122</sup>. Αυτό προκαλεί λανθασμένη ευθυγράμμιση του DNA, οδηγώντας σε συσσώρευση μονοκλωνικών ρηγμάτων στο DNA. Τα μονοκλωνικά ρήγματα από μόνα τους δεν είναι κυτταροτοξικά, επειδή είναι αναστρέψιμα και μπορούν να επιδιορθωθούν γρήγορα όταν αφαιρεθεί το φάρμακο. Η σύγκρουση του πιρουινίου του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής με το τριμερές σύμπλεγμα προκαλεί θανατηφόρες, μη αναστρέψιμες διασπάσεις του διπλού κλώνου<sup>122</sup>. Αυτά τα δικλωνικά ρήγματα οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο αυτοί οι παράγοντες αναφέρονται επίσης ως δηλητήρια τοποϊσομεράσης. Το SN-38 είναι έως και 100 φορές πιο ισχυρός προσδέτης της DNA τοποϊσομεράσης και γι' αυτό χρησιμοποιείται κατά κόρον τα τελευταία χρόνια κατά του καρκίνου.

Οι δομές της ιρινοτεκάνης και του SN-38 περιέχουν έναν κλειστό δακτύλιο α-υδροξυ-δ-λακτόνης, που μπορεί να υδρολυθεί και να σχηματίσει το αντίστοιχο καρβοξυλικό άλας οξύ (Σχήμα 1.9). Ωστόσο, η λακτόνη έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου με την DNA τοποϊσομεράση I, και ότι η ογκοανασταλτική τους δράση είναι σημαντικά μεγαλύτερη όταν περιέχουν την λακτόνη σε σύγκριση με καρβοξυλικό οξύ<sup>123</sup>.



Σχήμα 1.9. Οι διδιάστατες δομές της ιρινοτεκάνης και του SN-38.

Στους ανθρώπους, η ιρινοτεκάνη μεταβολίζεται από μια ενδογενή καρβοξυλεστεράση (υπάρχει στον εντερικό βλεννογόνο, στο πλάσμα και στο ήπαρ) σε έναν πολύ ενεργό κυτταροτοξικό μεταβολίτη, τον SN-38 (Σχήμα 1.10). Ο μεταβολίτης SN-38 έπειτα μετατρέπεται στο ανενεργό γλυκουρονίδιο (SN-38G, Σχήμα 1.10) από το UGT1A (διφωσφορική ουριδίνη γλυκουρονυλοτρανσφεράση). Η αξιοσημείωτη δράση του SN-38 είναι καθοριστική για τη δραστηριότητα της ιρινοτεκάνης παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα του SN-38 στο πλάσμα παρατηρήθηκε ότι ήταν περίπου 100 φορές χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα ιρινοτεκάνης. Η σχέση μεταξύ των SN-38 και SN-38G έχουν αποδειχθεί σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες της τοξικότητας σε κλινικό επίπεδο. Άλλη μεταβολική οδός της ιρινοτεκάνης περιλαμβάνει την οξείδωση της από το CYP3A4 προς τους μεταβολίτες APC (7-αιθυλ-10-[4-N-(5-αμινοπεντανοϊκό οξύ)-1-πιπεριδινο]καρβονυλοξυκαμπτοθεκίνη) και NPC [7-αιθυλ-10-(4-αμινο-1-πιπεριδινο)καρβονυλοξυκαμπτοθεκίνη] (Σχήμα 1.10), οι οποίοι είναι αδύναμοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης I. Ωστόσο, ο μεταβολίτης NPC μπορεί να μετατραπεί στο SN-38 από καρβοξυλεστεράσες (Σχήμα 1.10).



Σχήμα 1.10. Μεταβολικές οδοί της ιρινοτεκάνης προς τον ενεργό της μεταβολίτη SN-38<sup>123</sup>.

### 1.3.1.1.3.3 Αντίσταση στο SN-38

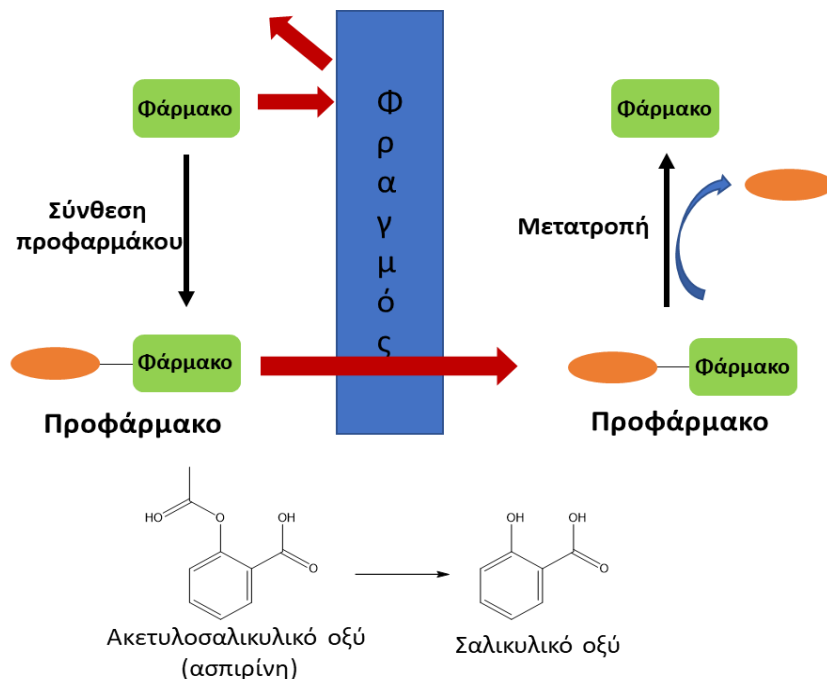
Έχουν περιγραφεί ορισμένοι μηχανισμοί αντίστασης του SN-38, που σχετίζονται κυρίως με τη μεταφορά και τον μεταβολισμό του, καθώς και με τον στόχο του (TOPI). Η οικογένεια των μεταφορέων ABC διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εκροή της ιρινοτεκάνης και του SN-38, τα οποία είναι υποστρώματα για τουλάχιστον τρεις από τις οικογένειες των μεταφορέων ABC,

που είναι οι B, C και G, και οι οποίοι υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική εκροή τους απ' τα κύτταρα που οδηγεί σε μείωση της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού φαρμάκου και επομένως της αντίστασης<sup>122</sup>. Ακόμη, η πρόληψη του σχηματισμού του τριπλού συμπλόκου SN-38-TOPIB-DNA μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση. Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τον σχηματισμό του συμπλόκου είναι οι μεταλλάξεις στην TOPI, η μειωμένη έκφραση της, οι μεταφραστικές μεταβολές της και η αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες.

### 1.3.1.2 Προφάρμακα

Μια σημαντική τροποποίηση των προαναφερθέντων φαρμάκων αποτελεί η σύνθεση προφαρμάκων. Το προφάρμακο είναι ουσιαστικά ένα δυνάμει φάρμακο ή μια ένωση που μετά τη χορήγηση μεταβολίζεται σε ένα φαρμακολογικά ενεργό φάρμακο. Δηλαδή, αντί να χορηγείται απευθείας ένα φάρμακο, χορηγείται το προφάρμακό του με σκοπό τη βελτίωση της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης του φαρμάκου (ADME). Η μετατροπή του προφαρμάκου στο ενεργό φάρμακο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ενζυμικά είτε χημικά.

Ο βασικός στόχος, δηλαδή, των προφαρμάκων είναι να επιλύσει ορισμένες ανεπιθύμητες ιδιότητες του φαρμάκου όπως τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και επιλεκτικότητα μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, τη χημική και ενζυμική αστάθεια κ.α. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, και ένα από τα πρώτα προφάρμακα, αποτελεί η κοινή ασπιρίνη (ακετυλο-σαλικυλικό οξύ) που αποτελεί προφάρμακο του σαλικυλικού οξέος. Η γενική χρήση του προφαρμάκου φαίνεται στην **Εικόνα 1.27**.



**Εικόνα 1.27.** Σύνθεση προφαρμάκου για την αντιμετώπιση φραγμών όπως χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, μη εκλεκτική τοξικότητα, ενζυμική και χημική αστάθεια<sup>124</sup>.

Τα πιο βασικά χαρακτηριστικά που βελτιώνονται με τη στρατηγική του προφαρμάκου παρουσιάζονται παρακάτω <sup>125</sup>:

- **Βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας**

Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για τη δραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου <sup>126</sup>. Η επίτευξη της βέλτιστης υδατοδιαλυτότητας είναι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Η σύνθεση προφαρμάκων έχει χρησιμοποιηθεί για να υπερνικηθεί αυτό το εμπόδιο, ενσωματώνοντας ομάδες που προσδίδουν υδατοδιαλυτότητα όπως όπως φωσφορικές ομάδες, αμινοξέα και σάκχαρα <sup>127</sup>.

- **Βελτίωση της διαπερατότητας και της απορρόφησης**

Κατά τη διαδικασία μεταφοράς φαρμάκου στη θέση δράσης του, απαιτείται συνήθως διέλευση μέσω αρκετών βιολογικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα η διαπερατότητα του να αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη δράση του. Για να μπορέσει ένα φάρμακο να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω παθητικής διάχυσης θα πρέπει να είναι λιπόφιλο. Η λιποφιλικότητα ενός φαρμάκου μπορεί να βελτιωθεί με την κάλυψη των πολικών και ιοντισμένων ομάδων με αλκυλεστέρες ή αρυλεστέρες.

- **Βελτίωση της μεταβολικής και χημικής σταθερότητας**

Η μεταβολική αστάθεια, που οφείλεται κυρίως στον ηπατικό μεταβολισμό, μπορεί να μειώσει σημαντικά τη συγκέντρωση του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία και, επομένως στη θέση-στόχο του. Η στρατηγική του προφαρμάκου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προστασία μεταβολικά ευαίσθητων ομάδων, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση του μεταβολισμού (π.χ. προστασία της 4-N θέσης της γεμισιταβίνης που είναι υπεύθυνη για την απαμίνωση της προς τον ανενεργό μεταβολίτη dFdU). Η χημική αστάθεια αναφέρεται στις διάφορες τιμές pH που μπορεί να συναντήσει το φάρμακο κατά τη διέλευσή του στα διάφορα οργανίδια και μέρη του σώματος. Επομένως, αναλόγως του τρόπου χορήγησης του προφαρμάκου, απαιτείται χημική σταθερότητα στην αντίστοιχη τιμή pH (π.χ. ενδοφλέβια ένεση του προφαρμάκου προϋποθέτει την απαραίτητη χημική σταθερότητα σε pH 7.4).

- **Στοχευμένη δράση που συνδυάζεται με λιγότερες παρενέργειες**

Η στοχευμένη δράση ενός φαρμάκου μπορεί να επιτευχθεί είτε με στοχευμένη παράδοση είτε με στοχευμένη βιο-ενεργοποίηση στη θέση-στόχο. Όπως θα δούμε και παρακάτω, η προσκόλληση μιας ομάδας ή ενός μορίου που προσφέρει στοχευμένη ελευθέρωση του φαρμάκου στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, ανήκει στη στρατηγική των προφαρμάκων. Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, ένα προφάρμακο μπορεί να διαπερνά όλο το σώμα αλλά να ενεργοποιείται επιλεκτικά στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Αυτό συνεπάγεται και



ελαχιστοποίηση των παρενεργειών στον ασθενή, καθώς δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό τα φυσιολογικά κύτταρα.

Επομένως, οι ιδανικές ιδιότητες ενός προφαρμάκου περιλαμβάνουν: (i) την επαρκή υδατική διαλυτότητα και διαπερατότητα μεμβράνης, (ii) την επαρκή χημική και ενζυμική σταθερότητα μέχρι να φτάσει στη θέση-στόχο, (iii) την ελεγχόμενη απελευθέρωση του μητρικού φαρμάκου στη θέση-στόχο, (iv) την ολοκληρωμένη μετατροπή του προφαρμάκου προς το μητρικό φάρμακο.

### 1.3.2 Διάγνωση του καρκίνου

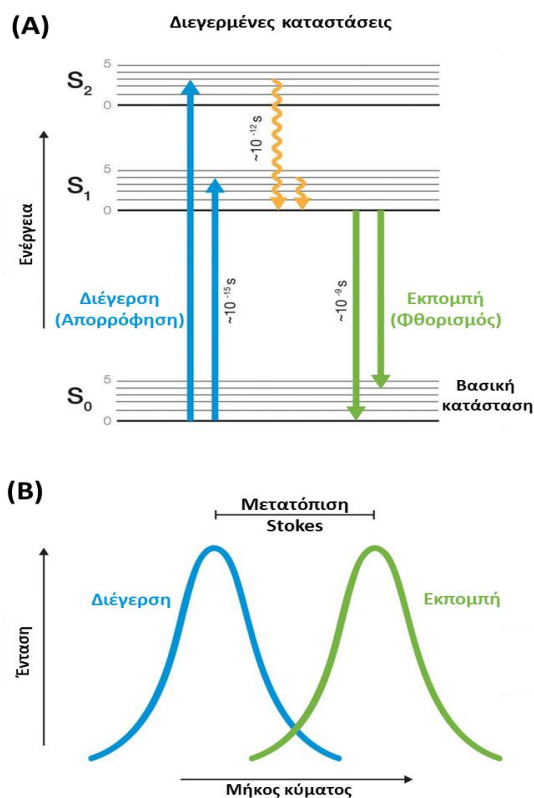
Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την αντιμετώπιση της μάστιγας του καρκίνου αποτελεί η έγκυρη διάγνωση του, που είναι άρρητα συνδεδεμένη με τη θεραπεία. Εφόσον ο ασθενής διαγνωσθεί έγκαιρα (σε πρώιμα στάδια) με την ύπαρξη κακοηθών όγκων, η θεραπεία μπορεί να είναι πολύ πιο αποτελεσματική ή ακόμη και να μην χρειαστεί εφόσον είναι ακόμα σε μικρό μέγεθος και μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά. Ένας από τους βασικούς τρόπους διάγνωσης του καρκίνου αποτελεί η χρήση χρωστικών ουσιών ή επισημασμένων μορίων (όπως  $^{18}\text{F}$ -γλυκόζη που χρησιμοποιείται στη τεχνική PET) που μαρτυρούν την ύπαρξη ή/και την ακριβή θέση των καρκινικών κυττάρων. Οι χρωστικές (ή βαφές) μπορούν να βοηθήσουν τους ογκολόγους κατά τη διάρκεια της χειρουργικής αφαίρεσης υποδεικνύοντας την ακριβή θέση των καρκινικών κυττάρων, ώστε να αφαιρεθούν αποτελεσματικά. Αξίζει να σημειωθεί πως πολλές χρωστικές μπορεί να διαθέτουν και αντικαρκινική δράση συμβάλλοντας με διπλό τρόπο στη καταπολέμηση του καρκίνου <sup>128</sup>.

Οι αρχαίες βαφές προέρχονταν από τη φύση και συχνά χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Ο Διοσκουρίδης, Έλληνας γιατρός και βοτανολόγος, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά εκχυλίσματα από το φθινοπωρινό φυτό κρόκος ενάντια σε καρκινικές αναπτύξεις τον πρώτο αιώνα μ.Χ. Πολύ αργότερα, η γέννηση των συνθετικών χρωμάτων ενίσχυσε περαιτέρω τη σχέση μεταξύ βαφών και καρκίνου. Το 1856 ο William Perkin ανέπτυξε την πρώτη συνθετική βαφή Mauve από παράγωγα ανιλίνης από την πίσσα. Η πρώτη ιατρική χρήση αυτών των πρόσφατα διαθέσιμων χρωμάτων ήταν η οπτικοποίηση των κυττάρων στη μικροσκοπία, αλλά αμέσως έγινε εμφανές ότι η επιλεκτική πρόσληψη των βαφών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός παράγοντας για να διακρίνει συγκεκριμένα κύτταρα και δομικά χαρακτηριστικά <sup>128</sup>. Συνδυάζοντας την παρατήρηση ότι ορισμένες βαφές είχαν αντιμικροβιακές ιδιότητες, ο νομπελίστας Paul Ehrlich αιτιολόγησε ότι οι βαφές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων, αναπτύσσοντας την έννοια της επιλεκτικής τοξικότητας. Ο Ehrlich χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τη βαφή αρσφαιναμίνη (arsphenamine) με βάση το αρσενικό για τη θεραπεία της σύφιλης, αλλά έπειτα το εφάρμοσε κατά του καρκίνου <sup>129</sup>. Στη συνέχεια, άρχισαν να ελέγχονται πολλές παρόμοιες ενώσεις για παρόμοιες ιδιότητες στόχευσης όγκων, προαναγγέλλοντας την αρχή της σύγχρονης θεραπείας και διάγνωσης.

Οι συνθετικές βαφές είναι οργανικές ενώσεις που παράγουν χρώμα με επιλεκτική απορρόφηση και σκέδαση συγκεκριμένων μηκών κύματος φωτός. Η ιδανική βαφή θα πρέπει να φέρει διάφορα χαρακτηριστικά όπως υψηλή εκλεκτικότητα προς τους όγκους, ελάχιστη συστηματική τοξικότητα, να είναι οικονομικά αποδοτική στην παραγωγή, να έχει μεγάλη κβαντική απόδοση, μεγάλη μετατόπιση Stokes, να παραμένει σταθερή σε συνθήκες αποθήκευσης και χρήσης, και να εφαρμόζεται εύκολα.

Οι κλασικές βαφές χρησιμοποιούνται κατά μήκος του φάσματος του φωτός που κυμαίνεται από το υπεριώδες (μήκος κύματος 10 nm – 400 nm) έως το ορατό (400 nm – 700 nm) και στην υπέρυθη περιοχή (700 nm – 1000 nm) <sup>130</sup>. Οι βαφές μπορούν να παρέχουν ένα ορισμένο χρώμα ή φθορισμό σε συγκεκριμένες συνθήκες. Υπάρχουν πολλές φθορίζουσες βαφές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον, συμπεριλαμβανομένων των ξανθινίων (όπως φλουορεσκεΐνη, ροδαμίνη), των κουμαρινών, των πυρανίων και των κυανινών.

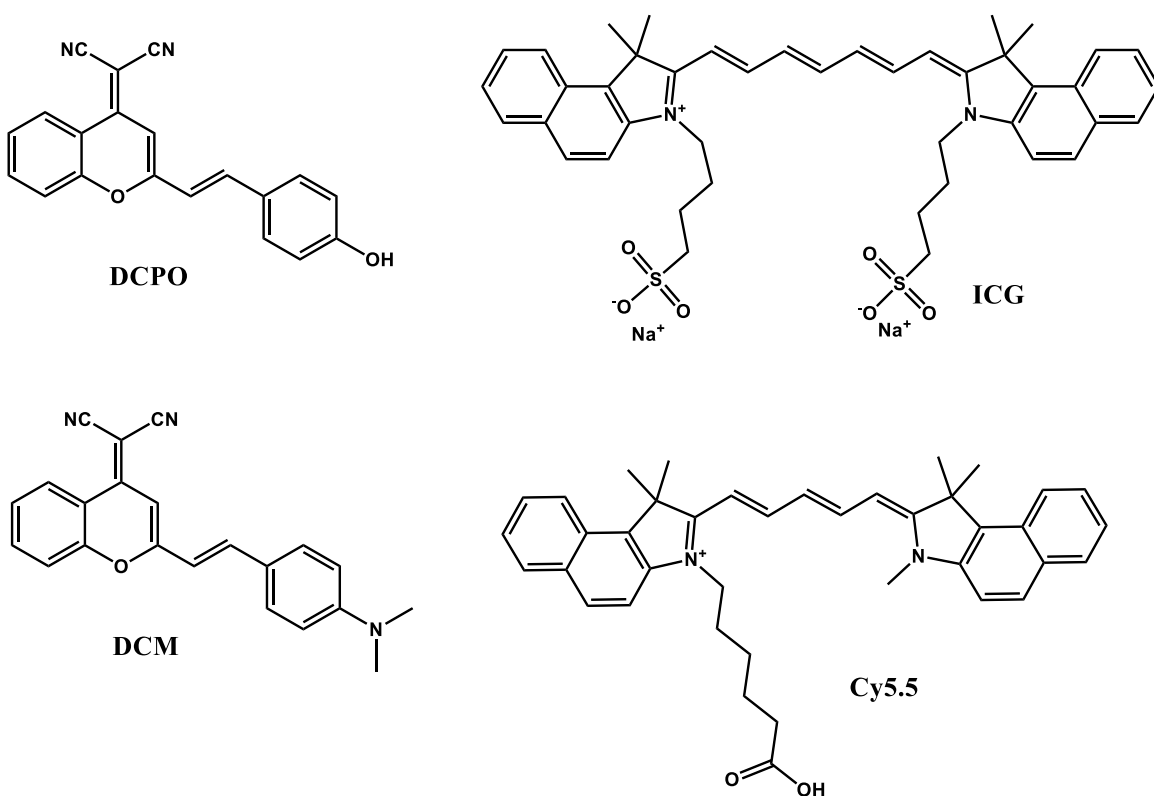
Ήταν γνωστό από παλιά πως ορισμένα υλικά έχουν την ικανότητα να ακτινοβολούν μετά την έκθεσή τους στο φως, όμως ο Stokes (Φυσικός στο Πανεπιστήμιο του Cambridge) ήταν αυτός που περιέγραψε πως το εκπεμπόμενο φως είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος από το προσπίπτον λόγω απώλειας ενέργειας στην διεγερμένη κατάσταση. Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά τον φθορισμό είναι ίδιος και κυμαίνεται μεταξύ  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  δευτερόλεπτα. Τα βασικά χαρακτηριστικά του φθορισμού παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.28**.



**Εικόνα 1.28.** Βασικά χαρακτηριστικά του φθορισμού. (A) Ένα απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski που αποτυπώνει τις ενεργειακές καταστάσεις, και (B) ένα τυπικό φάσμα φθορισμού όπου φαίνεται και η μετατόπιση Stokes.

Ένα σημαντικό φαινόμενο που χρησιμοποιείται κατά κόρον στα διαγνωστικά μόρια κατά του καρκίνου αποτελεί η απόσβεση του φθορισμού (μείωση της έντασης του φθορισμού). Αυτό παρατηρείται συνήθως είτε με παρεμπόδιση των ηλεκτρονιοδοτών (με χρήση βιοενεργοποιούμενων ομάδων βάσει της στρατηγικής των προφαρμάκων) είτε με χρήση ενός αποσβέστη (quencher).

Μεταξύ των φθορίζουσών χρωστικών, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση σε αυτές που λειτουργούν στο εγγύς υπέρυθρο φως (Near Infrared - NIR), το οποίο μπορεί και διεισδύει σε μεγάλο βάθος (από χιλιοστά έως εκατοστά) λόγω του μεγάλου μήκους κύματος (700-900 nm). Επομένως, οι χρωστικές NIR επιτρέπουν την οπτικοποίηση βαθύτερων ιστών με λιγότερο αυτοφθορισμό υποβάθρου, λόγω ελάχιστης διασποράς. Είναι ενδιαφέρον ότι δύο από τις πιο κοινές φθορίζουσες χρωστικές που είναι εγκεκριμένες από τον FDA, το πράσινο της ινδοκυανίνης (ICG) και το μπλε του μεθυλενίου (MB), αμφότερες φθορίζουν στο NIR. Οι πιο συνηθισμένες ομάδες χρωστικών NIR είναι οι κυανίνες, όπως η ICG και η Cy5.5, και οι χρωστικές που βασίζονται στο 4H-πυράνιο, όπως η DCPO και η DCM (Σχήμα 1.11).



**Σχήμα 1.11.** Κλασικές χρωστικές που λειτουργούν στο εγγύς υπέρυθρο, όπως ανάλογα του 4H-πυρανίου (DCPO & DCM, αριστερά) και ανάλογα της κυανίνης (ICG & Cy5.5, δεξιά).

Οι φθορίζουσες χρωστικές που εκμεταλλεύεται η επιστημονική κοινότητα για τη μελέτη του φθορισμού αποτελούνται συνήθως από πολλούς αρωματικούς δακτυλίους με μεγάλη συζυγία.

Τα βαρέα μέταλλα όπως το βρώμιο και το ιώδιο επιδρούν σημαντικά στο φθορισμό λόγω μετάβασης σε τριπλές καταστάσεις. Στις περισσότερες χρωστικές NIR υπάρχουν ομάδες που δίνουν ηλεκτρόνια (π.χ. -NH<sub>2</sub>, -OH) και ομάδες που δέχονται ηλεκτρόνια (π.χ. -NO<sub>2</sub>, -CN), όπως για παράδειγμα στη χρωστική DCPO του **Σχήματος 1.11** υπάρχει η -OH ως δότης και δυο -CN ως δέκτες ηλεκτρονίων. Αυτή η μεταφορά φορτίου μετά του δότη και του δέκτη ηλεκτρονίων ονομάζεται ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer - ICT) και πραγματοποιείται μέσω των π δεσμών του μορίου. Η ICT συμβάλει στην εμφάνιση μιας μπάντας σε υψηλές τιμές nm στις χρωστικές NIR, ενώ συνήθως παρατηρείται μια μετατόπιση προς το μπλε (blueshift) όταν κάποια διεργασία ή κάποιο μόριο απενεργοποιήσει την ICT. Το φαινόμενο της απόσβεσης, που αναφέρθηκε παραπάνω, και του φαινομένου ICT χρησιμοποιείται στα στοχευμένα διαγνωστικά μόρια κατά του καρκίνου όπως θα εξετάσουμε παρακάτω.

Τα τελευταία χρόνια έχει προστεθεί η περιοχή NIR-II που αφορά μήκος κύματος περίπου 1000-1700 nm (επίσης γνωστή ως ζώνη υπέρυθρων βραχέος μήκους κύματος, SWIR 1-2 μm), η οποία μπορεί να υποδιαιρεθεί σε NIR-IIa (1000–1300 nm), NIR-IIa (1300–1400 nm), and NIR-IIb (1500–1700 nm)<sup>131</sup>. Πολλές τέτοιες καινούριες χρωστικές είναι ορατές μόνο υπό το φως NIR, το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης όταν το χειρουργικό πεδίο παραμένει αναλλοίωτο υπό το κανονικό λευκό φως, ενώ εξειδικευμένες κάμερες μπορούν να παρέχουν απεικόνιση με φθορισμό NIR για συγκεκριμένες δομές.

### 1.3.3 Στοχευμένη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου

Αποτελεί σύνηθες φαινόμενο η χημειοθεραπεία να μην αποδίδει τα αναμενόμενα αποτελέσματα είτε λόγω ανεπαρκούς δράσης των εκάστοτε φαρμάκων είτε λόγω εμφάνισης σοβαρών παρενεργειών στους ασθενείς. Η κύρια αιτία ανεπαρκούς δράσης αποδίδεται στην καθυστερημένη διάγνωση του καρκίνου με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο, όπου εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια. Η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε τέτοιες περιπτώσεις αποσκοπεί στην αποσταθεροποίηση του γενωμικού προφίλ του όγκου και στη πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, συχνά οδηγεί σε κυτταρικούς κλώνους με βελτιωμένη ικανότητα επιβίωσης, καθώς τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να τροποποιούν τις βιοχημικές τους οδούς για να ανταπεξέλθουν στη προσπάθεια αποσταθεροποίησης της ομοιόστασης τους. Αυτό αναφέρεται ως αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (drug resistance).

Τα περισσότερα από τα προαναφερθέντα κυτταροτοξικά φάρμακα όπως η γεμισιταβίνη (GEM), η δοξορουβικίνη (DOX), η μεθοτρεξάτη (MTX), η καμπτοθεκίνη (CPT), η πακλιταξέλη (PTX) και το SN-38 δεν αποδίδουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους κυρίως λόγω χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας, χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, δομικής αστάθειας, μετατροπής σε ανενεργούς μεταβολίτες και παράπλευρης τοξικότητας. Η μειωμένη δραστηριότητα των φαρμάκων έναντι του καρκίνου οδηγεί στη χρήση υψηλότερων δόσεων με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη τοξικότητα σε διάφορα μέρη του ανθρώπινου σώματος. Για να αποφευχθεί η παράπλευρη τοξικότητα που εμφανίζεται με τη μορφή έντονων παρενεργειών στους ασθενείς, και ταυτόχρονα να αυξηθεί η

αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές στοχευμένης θεραπείας και διάγνωσης.

Οι στοχευμένες θεραπείες για τον καρκίνο αποτελούνται από φάρμακα ή άλλες ουσίες που εμποδίζουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου παρεμβαίνοντας σε συγκεκριμένα μόρια ("μοριακοί στόχοι") που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και την εξάπλωση του καρκίνου. Οι στοχευμένες θεραπείες για τον καρκίνο συχνά απαντώνται ως "μοριακά στοχευμένα φάρμακα", "μοριακά στοχευμένες θεραπείες", "φάρμακα ακριβείας" ή παρόμοια ονόματα.

Οι στοχευμένες θεραπείες διαφέρουν από την τυπική χημειοθεραπεία με ποικίλους τρόπους:

- Οι στοχευμένες θεραπείες δρουν σε συγκεκριμένους μοριακούς στόχους που σχετίζονται με τον καρκίνο, ενώ οι περισσότερες τυποποιημένες χημειοθεραπείες δρουν σε όλα τα ταχέως διαιρούμενα και φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.
- Οι στοχευμένες θεραπείες επιλέγονται σκόπιμα ή σχεδιάζονται κατάλληλα για να αλληλεπιδρούν με τον στόχο τους, ενώ τα περισσότερα τυπικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται επειδή σκοτώνουν αποτελεσματικά τα κύτταρα.
- Οι στοχευμένες θεραπείες είναι συχνά κυτταροστατικές (δηλαδή, εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων), ενώ οι τυπικοί παράγοντες χημειοθεραπείας είναι κυτταροτοξικοί (δηλαδή, σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα).

Οι στοχευμένες θεραπείες αποτελούν επί του παρόντος το επίκεντρο της αντικαρκινικής ανάπτυξης φαρμάκων. Αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της εξατομικευμένης ιατρικής, μια μορφή αγωγής που χρησιμοποιεί πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια και τις πρωτεΐνες ενός συγκεκριμένου ατόμου για την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών.

Οι περισσότεροι τύποι στοχευμένης θεραπείας βοηθούν στη θεραπεία του καρκίνου παρεμβαίνοντας σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους που βοηθούν τους όγκους να αναπτυχθούν και να εξαπλωθούν σε όλο το σώμα. Μπορούν να αντιμετωπίσουν τον καρκίνο με ποικίλους τρόπους:

**Μπορούν να βοηθήσουν το ανοσοποιητικό μας σύστημα να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα (ανοσοθεραπεία).** Ένας λόγος που τα καρκινικά κύτταρα ευδοκιμούν είναι επειδή μπορούν να 'κρυφτούν' από το ανοσοποιητικό σας σύστημα. Οι ανοσοθεραπείες ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό μας σύστημα για να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Ορισμένες ανοσοθεραπείες αποτελούνται από μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Η δέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος στο μόριο-στόχο έχει ως αποτέλεσμα την ανοσολογική καταστροφή κυττάρων που εκφράζουν αυτό το μόριο-στόχο. Άλλα μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται με ορισμένα ανοσοκύτταρα για να βοηθήσουν αυτά τα κύτταρα να σκοτώσουν καλύτερα τα καρκινικά κύτταρα.

**Μπορούν να σταματήσουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.** Τα υγιή κύτταρα στο σώμα σας διαιρούνται προς νέα κύτταρα μόνο όταν λαμβάνουν ισχυρά σήματα. Αυτά τα σήματα συνδέονται με πρωτεΐνες στην κυτταρική επιφάνεια, σηματοδοτώντας τα κύτταρα να διαιρεθούν όταν υπάρχει ανάγκη. Όμως, τα καρκινικά κύτταρα φέρουν αλλαγές στις πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους που σηματοδοτούν τη κυτταρική διαίρεση ανεξάρτητα από την ύπαρξη κατάλληλου σήματος ή όχι. Ορισμένες στοχευμένες θεραπείες παρεμβαίνουν σε αυτές τις πρωτεΐνες, αποτρέποντάς την σηματοδότησή τους. Αυτή η διαδικασία βοηθά στην επιβράδυνση της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης του καρκίνου.

**Μπορούν να σταματήσουν τα σήματα που βοηθούν στη δημιουργία αιμοφόρων αγγείων.** Οι όγκοι χρειάζονται να σχηματίσουν νέα αιμοφόρα αγγεία (αγγειογένεση) για να συνεχίσουν να αναπτύσσονται πέρα από ένα ορισμένο μέγεθος. Αυτά τα νέα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται ως απόκριση σε σήματα από τον όγκο. Ορισμένες στοχευμένες θεραπείες χρησιμοποιούν αναστολείς της αγγειογένεσης αποτρέποντας την επιπλέον παροχή αίματος και επομένως θρεπτικών συστατικών. Χωρίς παροχή αίματος, οι όγκοι παραμένουν μικροί σε μέγεθος και εν τέλει θανατώνονται λόγω μη επαρκούς τροφοδοσίας.

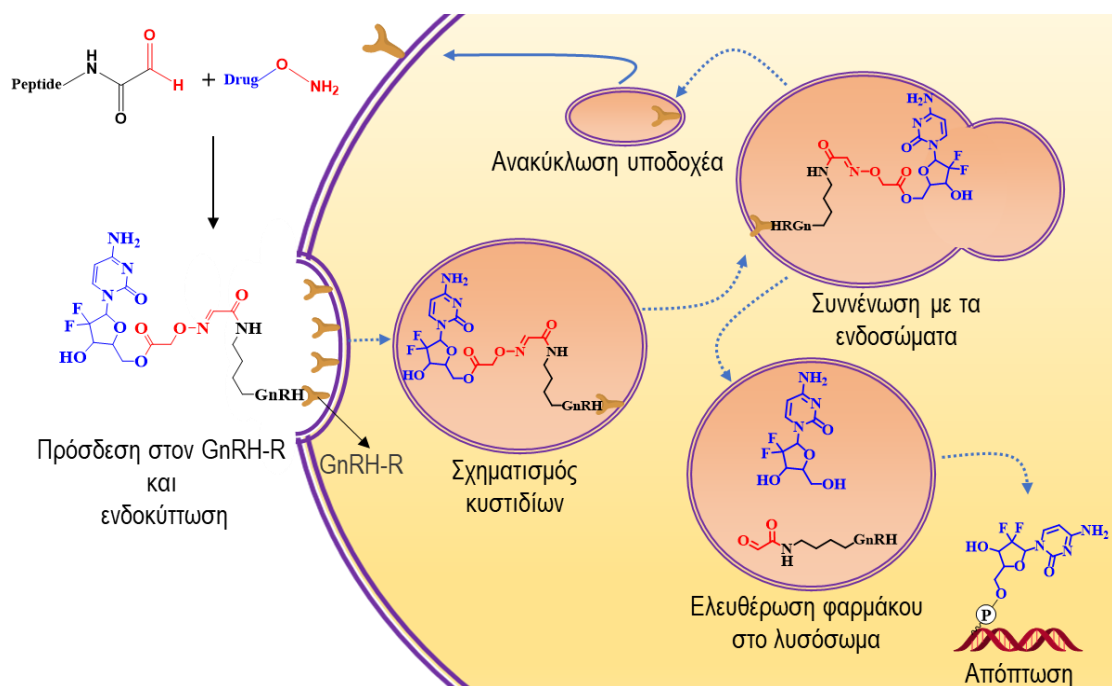
**Μπορούν να σταματήσουν την παραγωγή ορμονών που χρειάζονται μερικοί καρκίνοι για να αναπτυχθούν,** όπως μερικοί καρκίνοι του μαστού και του προστάτη, ή να απενεργοποιήσουν την φυσιολογική δράση των συγκεκριμένων ορμονών.

**Μπορούν να επάγουν τον μηχανισμό της απόπτωσης.** Ορισμένες στοχευμένες θεραπείες προκαλούν στα καρκινικά κύτταρα κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Η απόπτωση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί ο οργανισμός για να απαλλαγεί από περιττά ή μη φυσιολογικά κύτταρα, αλλά τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ιδιότητες για την αποφυγή της απόπτωσης. Οι επαγωγείς απόπτωσης μπορούν να ξεπεράσουν αυτές τις στρατηγικές για να προκαλέσουν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

**Μπορούν να παραδώσουν στοχευμένα ουσίες που θανατώνουν τα καρκινικά κύτταρα.** Μονοκλωνικά αντισώματα, πεπτίδια και βιταμίνες συνδυάζονται με χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Μόλις αυτά τα προσκολληθούν σε υποδοχείς-στόχους στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, τα κύτταρα προσλαμβάνουν τις τοξικές ουσίες (συνήθως με ενδοκύτωση) και αναπόφευκτα θανατώνονται. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στοχευμένου θεραπευτικού συζεύγματος παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.29**. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν τον υποδοχέα-στόχο δεν θα υποστούν βλάβη.

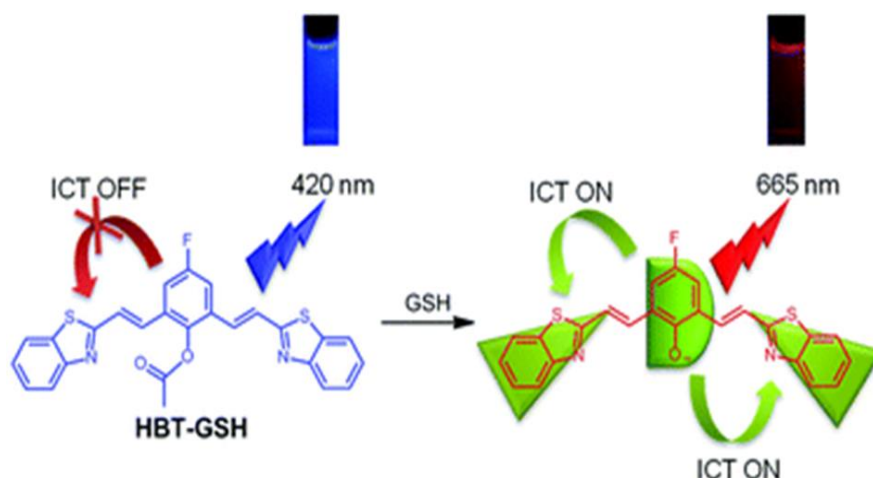
**Μπορούν να απελευθερώσουν τοξικές ουσίες στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου.** Ορισμένες τεχνικές στοχευμένης θεραπείας εκμεταλλεύονται συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος του καρκινικού όγκου όπως την υποξία, τα αυξημένα επίπεδα ROS και

θειολών, την υπερέκφραση ενζύμων όπως αλκαλική φωσφατάση και νιτροαναγωγή, και το όξινο pH.



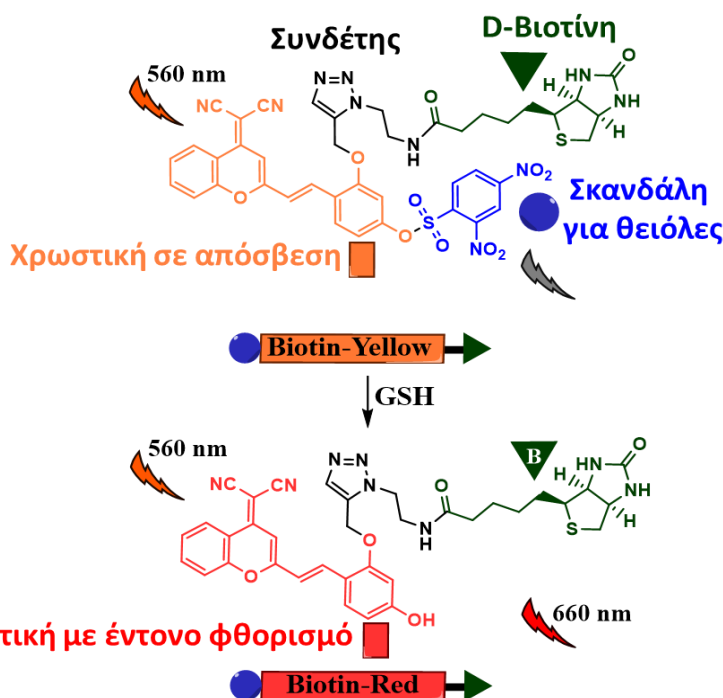
**Εικόνα 1.29.** Απεικόνιση στοχευμένης παράδοσης του κυτταροτοξικού φαρμάκου γεμισταβίνη (μπλε χρώμα) στα καρκινικά κύτταρα με χρήση του πεπτιδίου GnRH (μαύρο χρώμα) ως μόριο στόχευσης. Ο συνδέτης (κόκκινο χρώμα) περιέχει δεσμό οξίμης ο οποίος είναι ευαίσθητος στο όξινο pH και συνεισφέρει στην εκλεκτική απελευθέρωση του φαρμάκου στο όξινο μικροπεριβάλλον του καρκίνου  
132

Αντίστοιχα με την στοχευμένη θεραπεία λειτουργεί και η στοχευμένη διάγνωση, όπου οι επιστήμονες εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά του καρκίνου για να παραδώσουν στοχευμένα την χρωστική στο μικροπεριβάλλον αυτού. Η χρωστική συνήθως βρίσκεται σε απόσβεση (χαμηλό σήμα φθορισμού ή/και μετατόπιση κορυφής φθορισμού) και ενεργοποιείται όταν απελευθερωθεί στο καρκινικό μικροπεριβάλλον δίνοντας πληροφορίες για την ακριβή τοποθεσία των καρκινικών κυττάρων. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα στοχευμένου διαγνωστικού μορίου που εκμεταλλεύεται και το φαινόμενο ICT που επεξηγήθηκε παραπάνω παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.30**, όπου ύστερα από αλληλεπίδραση με γλουταθειόνη (GSH), η χρωστική ‘ανάβει’, ενώ προηγουμένως βρισκόταν σε απόσβεση λόγω προστασίας του ηλεκτρονιοδότη -OH, εμφανίζοντας φθορισμό στην περιοχή NIR λόγω ενεργοποίησης του φαινομένου ICT.



**Εικόνα 1.30.** Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαγνωστικού μορίου που εκπέμπει στο εγγύς υπέρυθρο λόγω του φαινομένου ICT ύστερα από ενεργοποίηση από τη γλουταθειόνη<sup>133</sup>.

Η σύζευξη μιας χρωστικής με μόριο-προσδέτη (π.χ. πεπτίδιο, D-βιοτίνη) το οποίο μπορεί και προσδένεται εκλεκτικά σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων οδηγεί στην εκλεκτική ενδοκύττωση της χρωστικής στα καρκινικά κύτταρα (**Εικόνα 1.31**). Για παράδειγμα, τα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα απαιτούν βιταμίνες για να διατηρήσουν την ταχεία ανάπτυξή τους, τις οποίες προσλαμβάνουν μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων. Επομένως, αυτοί οι υποδοχείς βιταμινών χρησιμεύουν για την απεικόνιση των καρκινικών κυττάρων, αλλά και για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων.



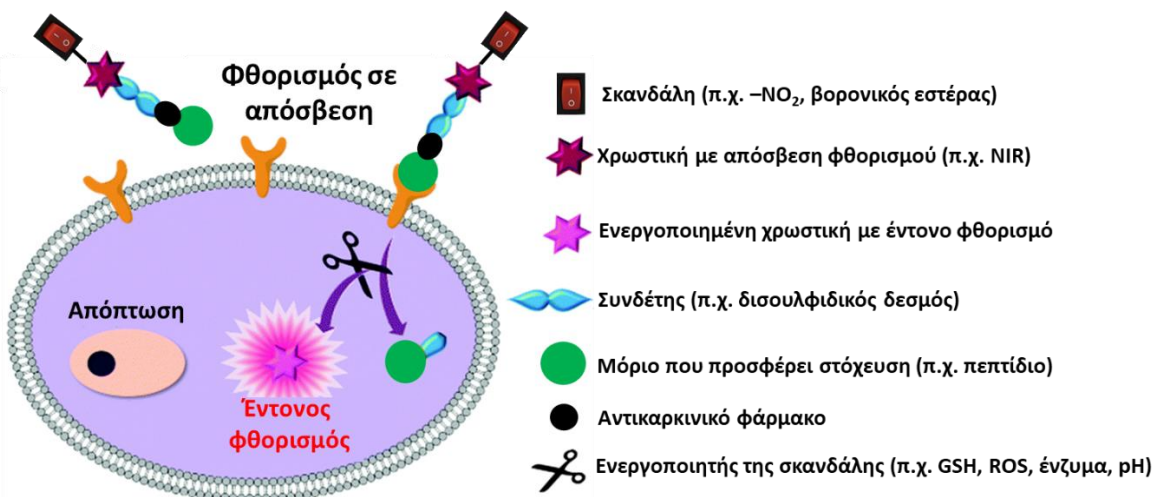
**Εικόνα 1.31.** Διαγνωστικό μόριο που απαρτίζεται από μια NIR χρωστική που βρίσκεται σε απόσβεση (πορτοκαλί), τον συνδέτη που (μαύρο) που συνδέει το μόριο που προσδίδει στόχευση (D-



βιοτίνη, πράσινο) καθώς προσδέεται εκλεκτικά στον υποδοχέα βιοτίνης που υπερεκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, και την «σκανδάλη» που αλληλεπιδρά με θειόλες (μπλε). Μετά την αλληλεπίδραση με τις θειόλες απελευθερώνεται η ενεργή χρωστική (κόκκινο) <sup>134</sup>.

### 1.3.4 Θεραγωγικά μόρια

Μια νέα εξατομικευμένη στοχευμένη προσέγγιση συνδυάζει την ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση. Τα μόρια αυτά ονομάζονται θεραπευτικά (θεραπεία + διάγνωση) και αποτελούνται πάντα από έναν κυτταροτοξικό παράγοντα (θεραπεία) και έναν παράγοντα απεικόνισης (διάγνωση). Στην ιδανική περίπτωση, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.32**, ένα θεραπευτικό μόριο απαρτίζεται από ένα μόριο στόχευσης (πράσινο χρώμα, π.χ. πεπτίδιο), ένα ή περισσότερα φάρμακα (μαύρο χρώμα, π.χ. γεμισιταβίνη), έναν ή περισσότερους αυτο-διασπώμενους συνδέτες (γαλάζιο χρώμα, π.χ. δισουλφιδικός δεσμός), μια χρωστική με απόσβεση φθορισμού (μωβ χρώμα, π.χ. χρωστική NIR) και μια ομάδα αλληλεπίδρασης με το καρκινικό μικροπεριβάλλον (διακόπτης, π.χ. βορονικός εστέρας που αποκόπτεται από ROS). Στα θεραπευτικά μόρια αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση ο φθορισμός να βρίσκεται σε απόσβεση και να αυξάνεται δραματικά όταν ελευθερωθεί ο κυτταροτοξικός παράγοντας. Σε μια τέτοια περίπτωση είναι δυνατό να παρακολουθούμε χωροχρονικά την απελευθέρωση του φαρμάκου και να γνωρίζουμε την ακριβή τοποθεσία των κακοηθών όγκων. Η χρήση αυτο-διασπώμενων συνδετών είναι πλέον οι βασικοί συνδέτες σε τέτοια μόρια καθώς επιτρέπουν την ταυτόχρονη απελευθέρωση του φαρμάκου και της χρωστικής μόλις το θεραπευτικό μόριο αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένο ερέθισμα του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου. Επίσης, ορισμένες φορές τα θεραπευτικά μόρια ενσωματώνονται σε πολυμερή ή νανοσωματίδια κυρίως για να αυξήσουν τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητά τους.



**Εικόνα 1.32.** Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός ιδανικού θεραπευτικού μορίου <sup>135</sup>.

### 1.3.5 Κατηγορίες συνδετών που χρησιμοποιούνται στα προφάρμακα

Ένας σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη στη διαδικασία σχεδιασμού και σύνθεσης θεραπευτικών, διαγνωστικών και θεραπευτικών προφαρμάκων είναι ο συνδέτης που ενώνει το φάρμακο ή τη χρωστική με το μόριο στόχευσης/βιοαναγνώρισης ή με το μόριο κορμό. Παρόλο που ο συνδέτης συνήθως αποτελεί ένα μικρό μέρος του εκάστοτε μορίου θεωρείται ως ένας από τους πιο κρίσιμους παράγοντες για την ολική βιοδραστικότητα και τη φαρμακοκινητική. Ο συνδέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν τα δυο μόρια που χρειάζεται να συνδεθούν δεν διαθέτουν κατάλληλες χαρακτηριστικές ομάδες για τη σύζευξη τους (π.χ. διαθέτουν και τα 2 ελεύθερα καρβοξυλικά οξέα) ή για να προσδώσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως ελεγχόμενη ελευθέρωση στο όξινο pH ή παρουσία συγκεκριμένου ενζύμου.

Οι συνδέτες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και διαφέρουν ανάλογα με το μήκος, τη σταθερότητα, τον μηχανισμό απελευθέρωσης, τις λειτουργικές ομάδες, την υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα κ.λπ. Γενικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: **(1)** Διασπώμενους, **(2)** Μη-διασπώμενους και **(3)** Αυτο-διασπώμενους

## 1. Διασπώμενοι συνδέτες

Οι διασπώμενοι συνδέτες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία ενός προφαρμάκου, καθώς συνήθως είναι αρκετά σταθεροί στη κυκλοφορία του αίματος για κάποιες ώρες και διασπώνται αποτελεσματικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου ελευθερώνοντας το ενεργό μόριο (φάρμακο ή χρωστική).

Οι διασπώμενοι συνδέτες χωρίζονται σε δυο επιπλέον κατηγορίες: Τους χημικά και τους ενζυμικά διασπώμενους:

### 1.1 Χημικά διασπώμενοι συνδέτες

Περιλαμβάνουν τους συνδέτες που είναι ευαίσθητοι στο όξινο pH του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου (π.χ. υδραζόνη, οξίμη) και αυτούς που μπορούν να βιο-αναχθούν (π.χ. δισουλφιδικός). Οι συνδέτες που διασπώνται σε όξινες συνθήκες, όπως η υδραζόνη και η οξίμη, έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να παραμένουν σταθεροί στο ουδέτερο pH της κυκλοφορίας του αίματος, αλλά να υφίστανται υδρόλυση και να απελευθερώνουν το ενεργό μόριο στο όξινο μικροπεριβάλλον του καρκίνου ή στο όξινο περιβάλλον των διαφόρων διαμερισμάτων του κυττάρου (π.χ. ενδόσωμα και λυσόσωμα)<sup>132</sup>. Οι βιο-αναγωγίσιμοι συνδέτες εκμεταλλεύονται τη διαφορά στο δυναμικό αναγωγής στον ενδοκυτταρικό χώρο έναντι του πλάσματος. Η ανηγμένη γλουταθειόνη που εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων είναι έως 1000 φορές υψηλότερη από αυτή που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών κυττάρων<sup>136</sup>. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα περιέχουν ένζυμα της οικογένειας πρωτεϊνών της δισουλφιδικής ισομεράσης, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν στην αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού σε κυτταρικά διαμερίσματα. Οι συνδέτες που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς διατηρούνται άθικτοι κατά τη διάρκεια της συστηματικής κυκλοφορίας και διασπώνται επιλεκτικά από την

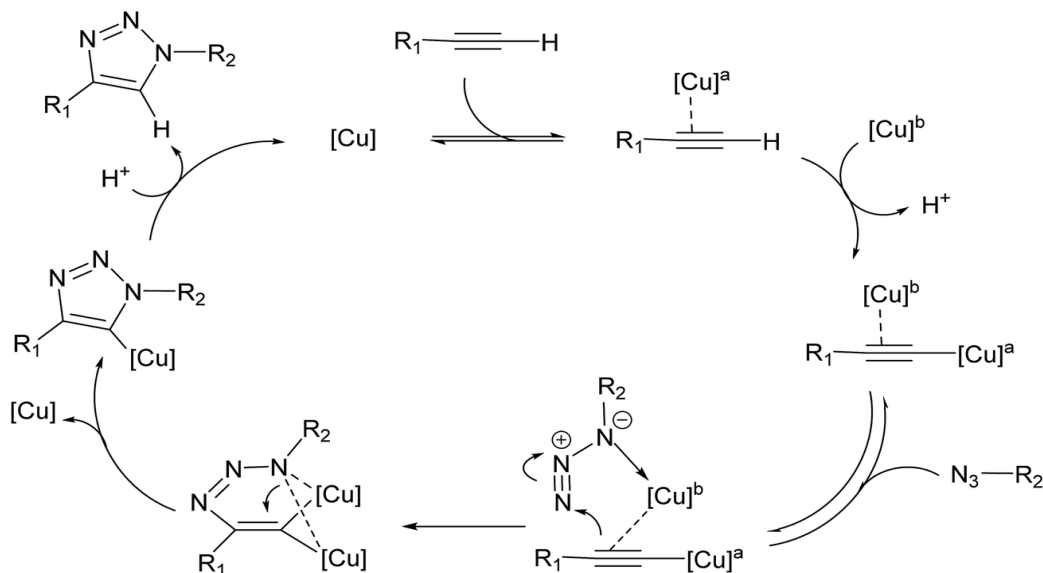
υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση γλουταθειόνης, με επακόλουθη απελευθέρωση των δραστικών ενώσεων από τα προφάρμακα στις θέσεις του όγκου.

### 1.2 Ενζυμικά διασπώμενοι συνδέτες

Σε αντίθεση με τους χημικά ασταθείς συνδέτες που συζητήθηκαν παραπάνω, οι ενζυμικά διασπώμενοι συνδέτες επωφελούνται την αφθονία των υδρολυτικών ενζύμων με την εξειδίκευση να αναγνωρίζονται συγκεκριμένες πεπτιδικές αλληλουχίες ή μοτίβα υδατανθράκων προκειμένου να αποικοδομηθούν. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις τέτοιων ενζύμων μεταξύ του αίματος και των ενδοκυτταρικών οργανιδίων (π.χ. λυσόσωμα) διασφαλίζουν μια εκλεκτική απελευθέρωση στο εσωτερικό του κυττάρου. Περιλαμβάνουν τους συνδέτες που αποτελούνται από μια πεπτιδική αλληλουχία η οποία αναγνωρίζεται και υδρολύεται εκλεκτικά από συγκεκριμένα υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. η καθεψίνη-B αναγνωρίζει και υδρολύει την αλληλουχία βαλίνης-κιτρουλίνης). Ένας άλλος τύπος ενζυμικά διασπώμενου συνδέτη αποτελεί το β-γλυκουρονίδιο που διασπάται από τη β-γλυκουρονιδάση, ένα ένζυμο που υπάρχει στα λυσοσώματα και υπερεκφράζεται σε ορισμένους όγκους <sup>137</sup>.

### 2. Μη-διασπώμενοι συνδέτες

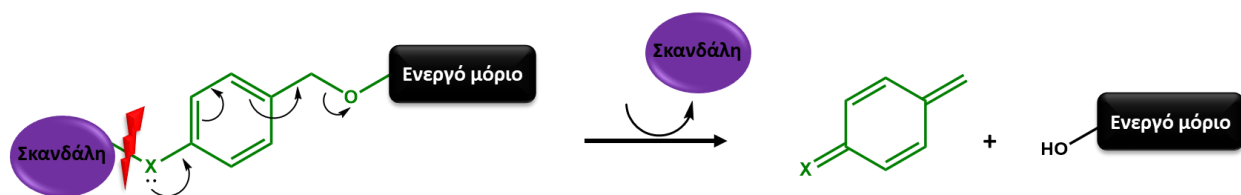
Πολλοί μη-διασπώμενοι συνδέτες έχουν διερευνηθεί στην ανάπτυξη προφαρμάκων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των μη-διασπώμενων συνδετών, σε σύγκριση με τους διασπώμενους συνδέτες, είναι η αυξημένη σταθερότητα στο πλάσμα του αίματος. Ωστόσο, ο δεσμός αυτός δεν θα πρέπει να ενώνει το φάρμακο αλλά τα υπόλοιπα στοιχεία του προφαρμάκου, καθώς απαιτείται απελευθέρωση του ενεργού φαρμάκου στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Οι μη-διασπώμενοι σύνδεσμοι μπορούν δυνητικά να παρέχουν ένα ευρύτερο θεραπευτικό φάσμα σε σύγκριση με τους διασπώμενους συνδέσμους λόγω μειωμένης παράπλευρης τοξικότητας αλλά η χρήση τους θα πρέπει να βασίζεται σε ορθό σχεδιασμό για να αποφευχθεί η μη απελευθέρωση του φαρμάκου. Στους μη-διασπώμενους συνδέτες ανήκουν αυτοί που περιέχουν αιθερικούς, αμινικούς και θειοαιθερικούς δεσμούς. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν και οι τριαζολικοί δακτύλιοι οι οποίοι προήρθαν από την ανθρώπινη επέμβαση και δεν υφίστανται στη φύση. Επομένως, δεν υπάρχουν ένζυμα που να δύνανται να τους διασπάσουν. Η πιο συνηθισμένη μορφή τριαζολικών δακτυλίων αποτελούν οι 1,4-υποκατεστημένοι 1,2,3-τριαζολικοί δακτύλιοι που συντίθενται μέσω [3+2] κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκυνίου καταλυόμενη από χαλκό I (**Σχήμα 1.12**).



**Σχήμα 1.12.** Μηχανισμός που προτάθηκε από τον Fokin για τη σύνθεση 1,4-διυποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολικού δακτυλίου καταλυόμενη από χαλκό (I). Δύο άτομα χαλκού λειτουργούν σε δυο διακριτούς εξειδικευμένους ρόλους: το ένα λειτουργεί ως σ-προσδέτης, και το άλλο ενεργεί αποκλειστικά μέσω ασθενούς π-συμπλοκοποίησης<sup>138</sup>.

### 3. Αυτο-διασπώμενοι συνδέτες

Μια νέα κατηγορία συνδετών αποτελούν οι αυτό-διασπώμενοι συνδέτες (self-immolative linkers) οι οποίοι πλέον χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις συνθετικές προσεγγίσεις προφαρμάκων. Η αυτό-διασπώμενη απόσπαση εμπεριέχει την αυθόρμητη και μη αναστρέψιμη αποσυναρμολόγηση μιας σύνθεσης πολλών συστατικών προς τα συστατικά της μέσω μιας συνεχόμενης διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται πιο συχνά σε πολύ-υποκατεστημένους αρωματικούς δακτυλίους πλούσιους σε ηλεκτρόνια που διαθέτουν έναν ηλεκτρονιοδότη υποκαταστάτη (π.χ.  $-OH$  ή  $-NH_2$ ) που είναι σε συζυγία με μια κατάλληλη αποχωρούσα (σε ορθο- ή παρα- θέση). Ο ηλεκτρονιοδότης υποκαταστάτης απαιτείται συνήθως για τη μείωση του ενεργειακού φραγμού της απο-αρωματικοποίησης. Ωστόσο, για ενώσεις αυτού του τύπου, συχνά απαιτείται η ενσωμάτωση μιας προστατευτικής ομάδας ή «σκανδάλης» (trigger) για τον έλεγχο της αυθόρμητης διάσπασης σε φυσιολογικές συνθήκες. Ένα τυπικό παράδειγμα αυτο-διασπώμενου συνδέτη φαίνεται στο **Σχήμα 1.13**, όπου ύστερα από ενεργοποίηση της «σκανδάλης» (μπλε χρώμα) από κάποιο ερέθισμα (π.χ. ένζυμο, pH) ενεργοποιείται η αυθόρμητη 1,6-απόσπαση του ενεργού μορίου (πορτοκαλί χρώμα) λόγω συζυγίας μέσω του αυτό-διασπώμενου συνδέτη (μαύρο χρώμα). Συνήθως απαιτείται ένας μη-διασπώμενος δεσμός ανάμεσα στο ενεργό μόριο και τον αυτό-διασπώμενο συνδέτη (π.χ. αιθερικός δεσμός) για να αποφευχθεί τυχόν πρόωρη απελευθέρωση του ενεργού μορίου.



$X = O, S \text{ ή } NH$

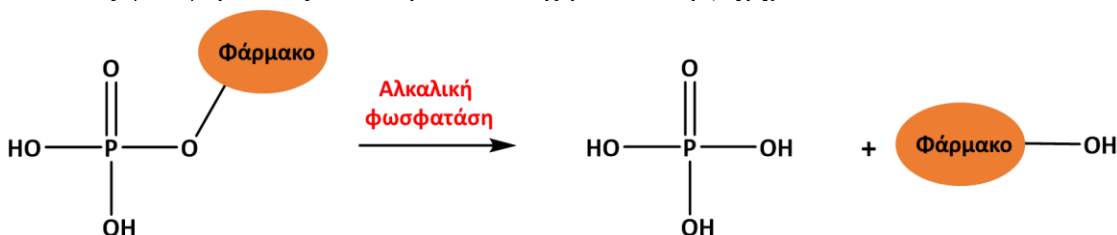
**Σχήμα 1.13.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης ενός αυτο-διασπώμενου συνδέτη (πράσινο χρώμα) για την απελευθέρωση του ενεργού μορίου (μαύρο χρώμα) μετά την αποκοπή της «σκανδάλης» (μωβ χρώμα).

## 2 Συζήτηση αποτελεσμάτων

### 2.1 Θεραπευτικά προφάρμακα

2.1.1 Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης που ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση (ALP)

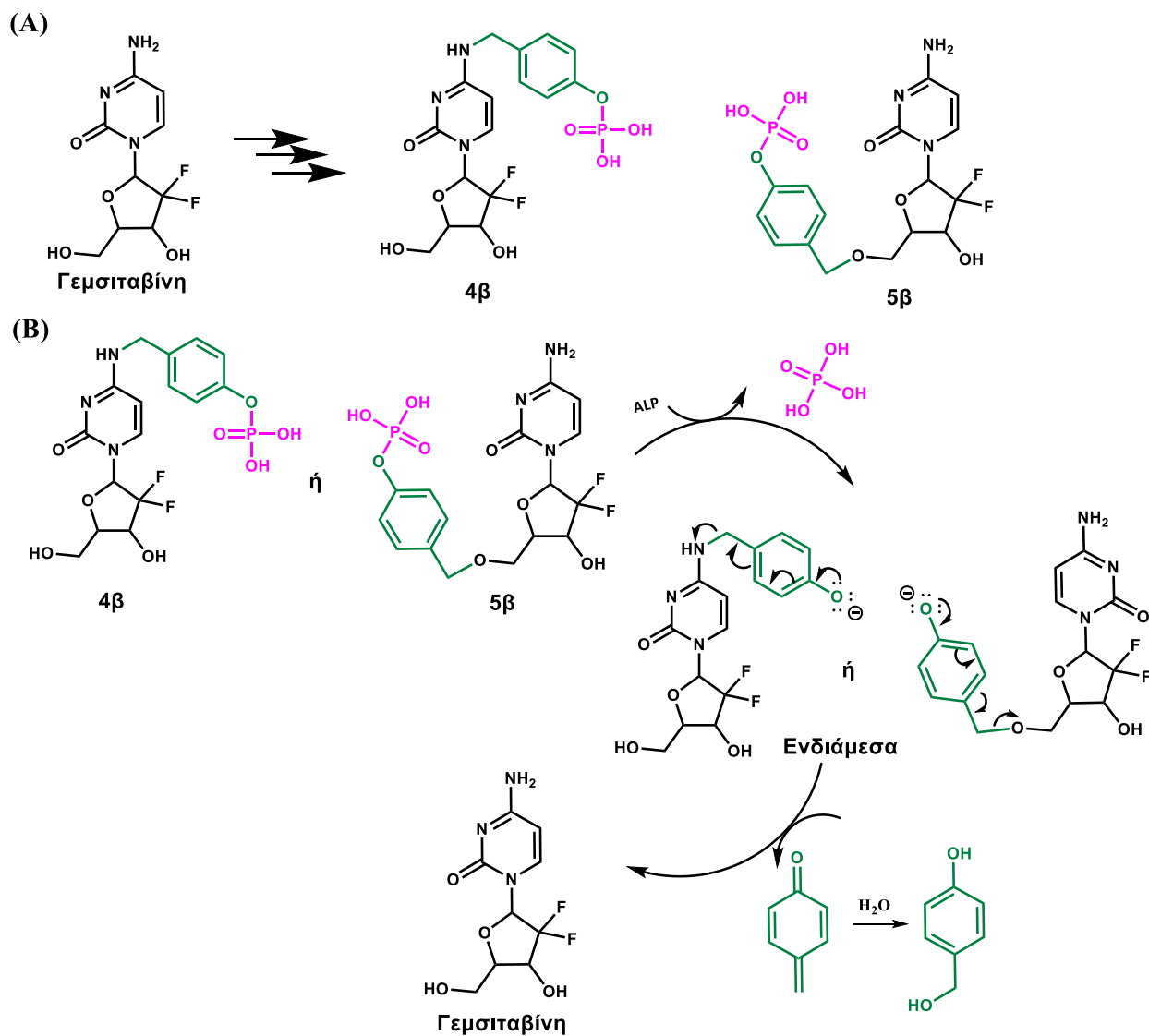
Η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase – ALP) αποτελεί ένα ένζυμο που υφίσταται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ορισμένους τύπους καρκίνου και έχει εκμεταλλευθεί στη στρατηγική των προφαρμάκων. Η ALP υδρολύει σχεδόν όλους τους τύπους φωσφορικού εστέρα ελευθερώνοντας φωσφορικό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη (**Σχήμα 2.1.1**).



**Σχήμα 2.1.1** Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής του προφαρμάκου προς το μητρικό φάρμακο μέσω της υδρόλυσης του φωσφορικού εστέρα από την αλκαλική φωσφατάση.

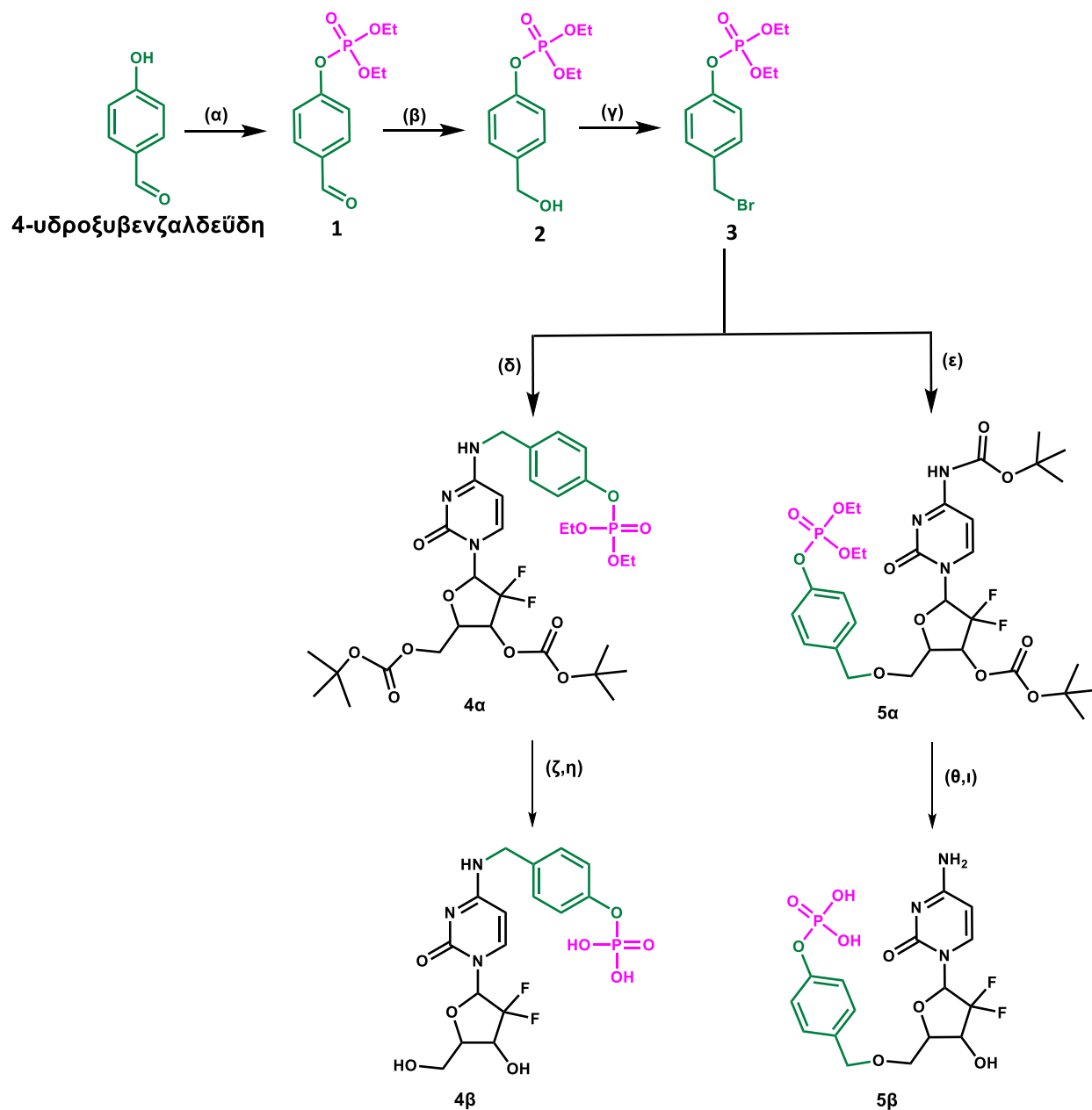
Η φωσφορική ομάδα μπορεί να συνδεθεί με το μητρικό φάρμακο είτε απευθείας εάν διαθέτει κατάλληλη χαρακτηριστική ομάδα (π.χ. -OH), είτε μέσω συνδέτη (συνήθως αυτο-διασπώμενου) που βοηθάει και στη μετρίαση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων για την ανεμπόδιστη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα προφάρμακα με φωσφορικούς εστέρες παρουσιάζουν χημική σταθερότητα και επαρκή βιο-μετατροπή προς το μητρικό φάρμακο. Ακόμη, οι φωσφορικοί εστέρες συνήθως προσδίδουν αυξημένη υδατοδιαλυτότητα στο μητρικό φάρμακο βελτιώνοντας την ολική βιοδιαθεσιμότητα του.

Βασισμένοι στα προαναφερθέντα στοιχεία, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε 2 θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**4β** και **5β**) μέσω σύζευξης του φαρμάκου με έναν αυτο-διασπώμενο σύνδεσμο (παρα-υδροξυβενζυλική αλκοόλη) που περιέχει τον φωσφορικό εστέρα. Η χρήση του αυτο-διασπώμενου συνδέτη μειώνει τη στερική παρεμπόδιση, διευκολύνοντας την προσβασιμότητα του προφαρμάκου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και αυξάνει τη ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου σε σύγκριση με την απευθείας σύζευξη της φωσφορικής ομάδας στο μητρικό φάρμακο. Οι δομές των προφαρμάκων **4β** και **5β** φαίνονται στο **Σχήμα 2.1.2A**, ενώ ο μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου ύστερα από αλληλεπίδραση με την αλκαλική φωσφατάση παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.1.2B**. Η μετατροπή είναι μία διαδικασία 2 σταδίων, όπου αρχικά το προφάρμακο αποφωσφορυλιώνεται από την αλκαλική φωσφατάση και στη συνέχεια μέσω μιας ταχείας αυθόρμητης 1,6-απόσπασης απελευθερώνεται το αντικαρκινικό φάρμακο. Δεδομένης της υπερέκφρασης του ενζύμου στο καρκινικό μικροπεριβάλλον συγκριτικά με το μικροπεριβάλλον των υγιών κυττάρων, η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται εκλεκτικά στους όγκους.



**Σχήμα 2.1.2.** (A) Δομές των 2 προφαρμάκων της γεμισιταβίνης που ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση (γεμισιταβίνη = μαύρο, αυτο-διασπώμενος συνδέτης = πράσινο, φωσφορικός εστέρας («σκανδάλη») = μωβ), (B) Μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου γεμισιταβίνη με ταυτόχρονη απελευθέρωση του συνδέτη, ο οποίος ύστερα από πυρηνόφιλη προσβολή ενός μορίου νερού μετατρέπεται σε 4-υδροξυβενζυλική αλκοόλη.

Τα προφάρμακα **4β** και **5β** της γεμισιταβίνης παρασκευάστηκαν σε έξι συνολικά βήματα με χρήση συγκλίνουσας πορείας (Σχήμα 2.1.3).

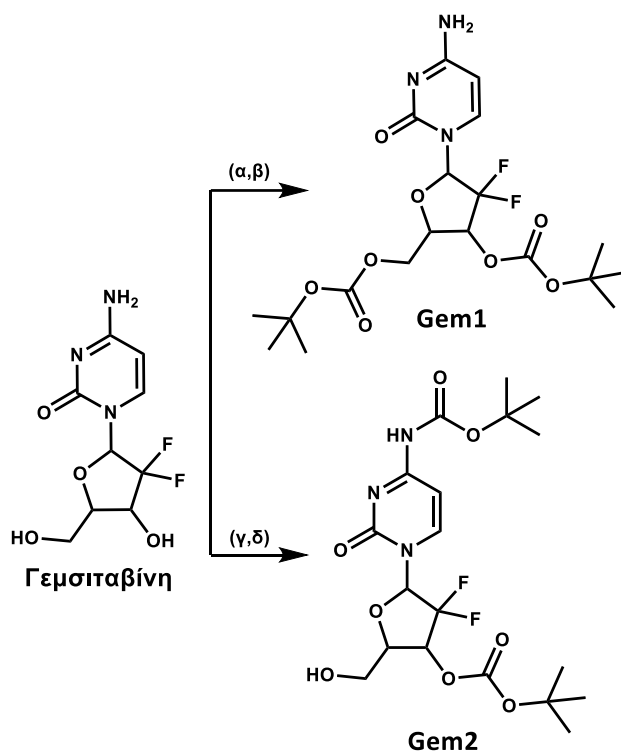


**Σχήμα 2.1.3.** Οι συνθετικές πορείες για την παρασκευή των προφαρμάκων **4β** και **5β**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α)  $(C_2H_5O)_2P(O)Cl$ , DIPEA, άνυδρο THF, rt, 3 ώρες, (β)  $NaBH_4$ , απόλυτη EtOH, rt, 2 ώρες, (γ)  $PBr_3$ , άνυδρο  $CH_2Cl_2$ , rt, 4 ώρες, (δ) Gem1,  $K_2CO_3$ , άνυδρο MeCN, rt, 12 ώρες, (ε) TFA,  $CH_2Cl_2$ , rt, 1 ώρα, (ζ) (1) TMSBr, άνυδρο MeCN, MW (80 °C, 60 W), 10 λεπτά, (2)  $H_2O$ , rt, 2 ώρες, (η) Gem2,  $K_2CO_3$ , άνυδρο MeCN, rt, 12 ώρες; (θ) TFA,  $CH_2Cl_2$ , rt, 1 ώρα, (ι) (1) TMSBr, άνυδρο MeCN, MW (80 °C, 60 W), 10 λεπτά, (2)  $H_2O$ , rt, 2 ώρες.

Αρχικά, έπρεπε να πραγματοποιηθεί εκλεκτική προστασία της γεμισιταβίνης με Boc-ομάδες ώστε μετέπειτα να διεξαχθούν τοποεκλεκτικές αντιδράσεις και να ληφθούν τα δυο διαφορετικά προφάρμακα. Η προστασία έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο προστασίας της

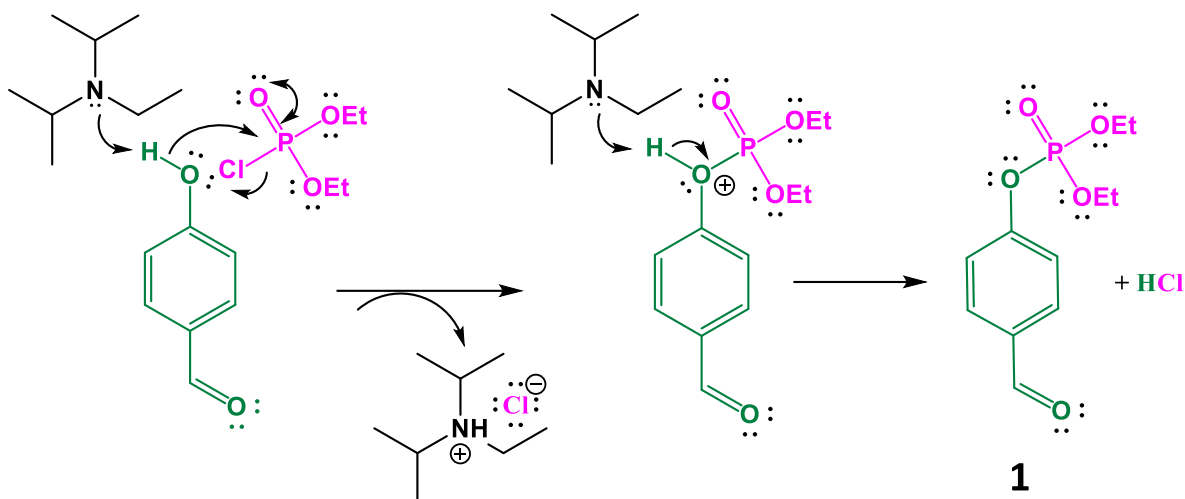


γεμισταβίνης που προτάθηκε από τους Zhi-wei Guo και James M. Gallo <sup>139</sup> όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1.4.



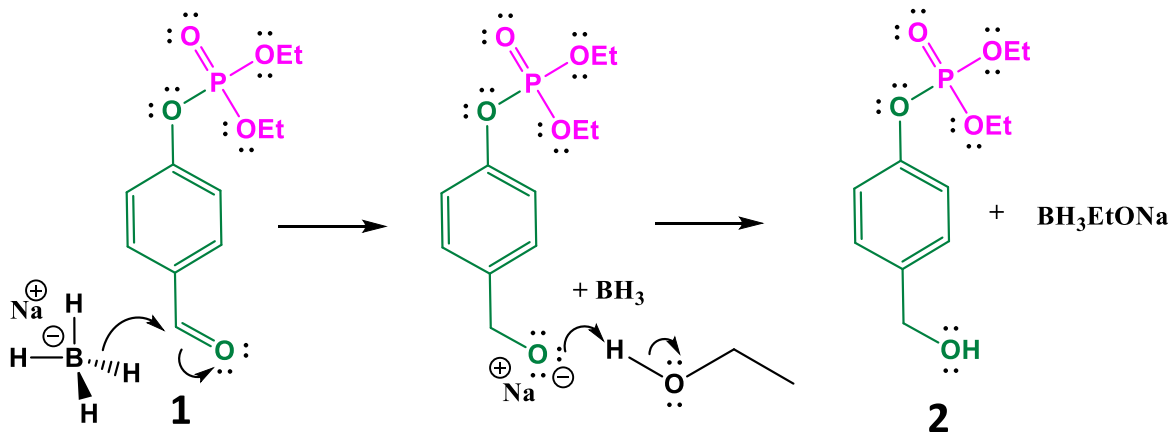
**Σχήμα 2.1.4.** Οι συνθετικές πορείες για την παρασκευή των προστατευμένων αναλόγων της γεμισταβίνης. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) DBDC, διοξάνιο-1 M KOH (1/1), rt, 40 λεπτά, (β) DBDC, διοξάνιο, έπειτα 1 M υδατικό διάλυμα KOH (1/1), rt, 30 λεπτά, (γ) DBDC, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, διοξάνιο- H<sub>2</sub>O (80:20), rt, 48 ώρες, (δ) DBDC, διοξάνιο, 37 °C, 72 ώρες.

Όσον αφορά τη σύνθεση του τμήματος του συνδέτη και της «σκανδάλης», η 4-υδροξυβενζαλδεΰδη αντέδρασε με το χλωρίδιο του διαιθυλοφωσφορικού εστέρα υπό βασικές συνθήκες για να παραχθεί, μέσω μιας πυρηνόφιλης άκυλο υποκατάστασης (Σχήμα 2.1.5), ο φωσφορικός εστέρας **1** ο οποίος ύστερα από την επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε στην επόμενη αντίδραση δίχως περαιτέρω καθαρισμό:



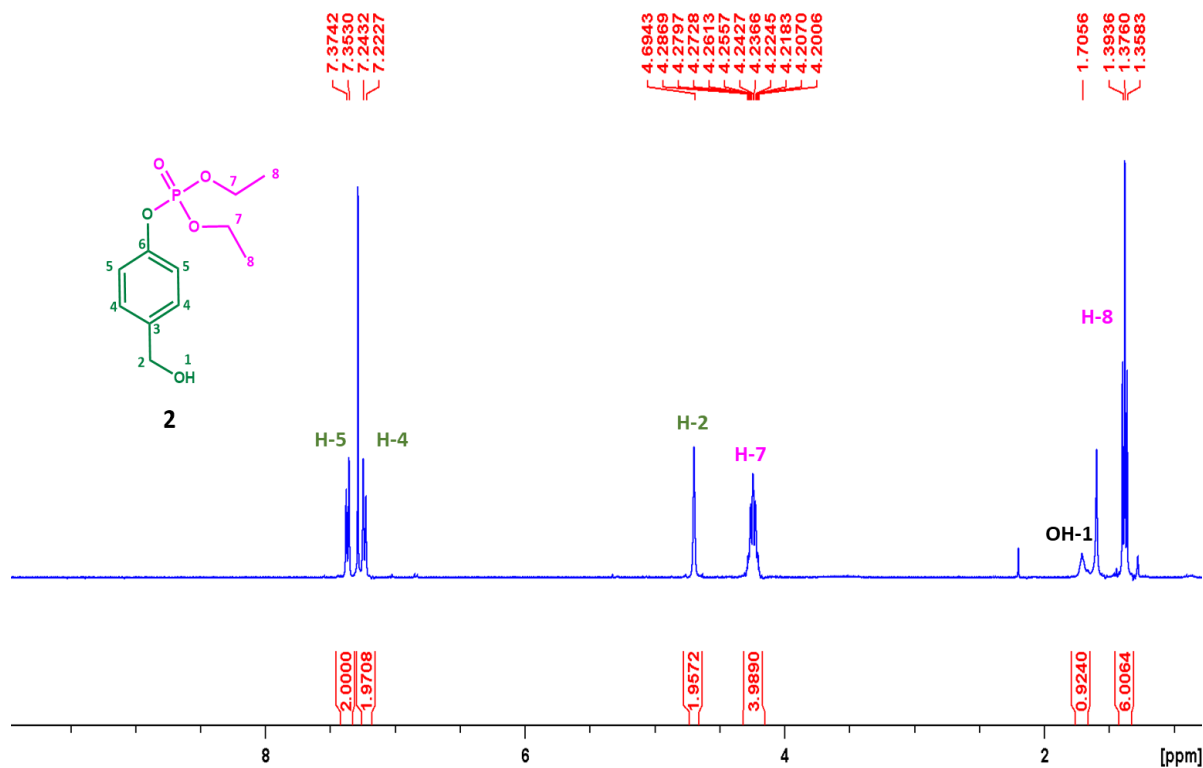
**Σχήμα 2.1.5.** Μηχανισμός πυρηνόφιλης άκυκλο υποκατάστασης της 4-υδροξυβενζαλδεύδης για να προκύψει η ένωση **1**.

Ύστερα, η ένωση **1** ανάχθηκε στην αντίστοιχη αλκοόλη **2** ποσοτικά με βοροϋδρίδιο του νατρίου σε αιθανόλη (Σχήμα 2.1.6):



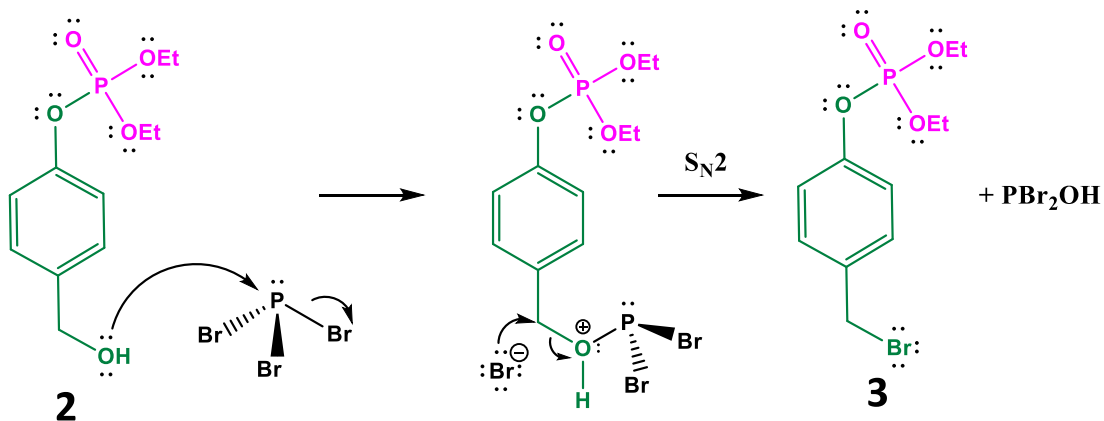
**Σχήμα 2.1.6.** Μηχανισμός αναγωγής της ένωσης **1** προς την ένωση **2** με χρήση  $\text{NaBH}_4$  σε αιθανόλη.

Η λήψη φάσματος  $^1\text{H NMR}$  έδειξε την ύπαρξη της πολλαπλής κορυφής στα 4.28-4.20 ppm και της τριπλής στα 1.37 ppm προερχόμενες από τις δυο αιθυλομάδες του φωσφορικού εστέρα, καθώς και της τριπλής κορυφής στα 1.70 ppm που προέρχεται από την πρωτοταγή -OH (Εικόνα 2.1.1). Επίσης, δεν υφίσταται κορυφή που να αντιστοιχεί στην αλδεϋδη.



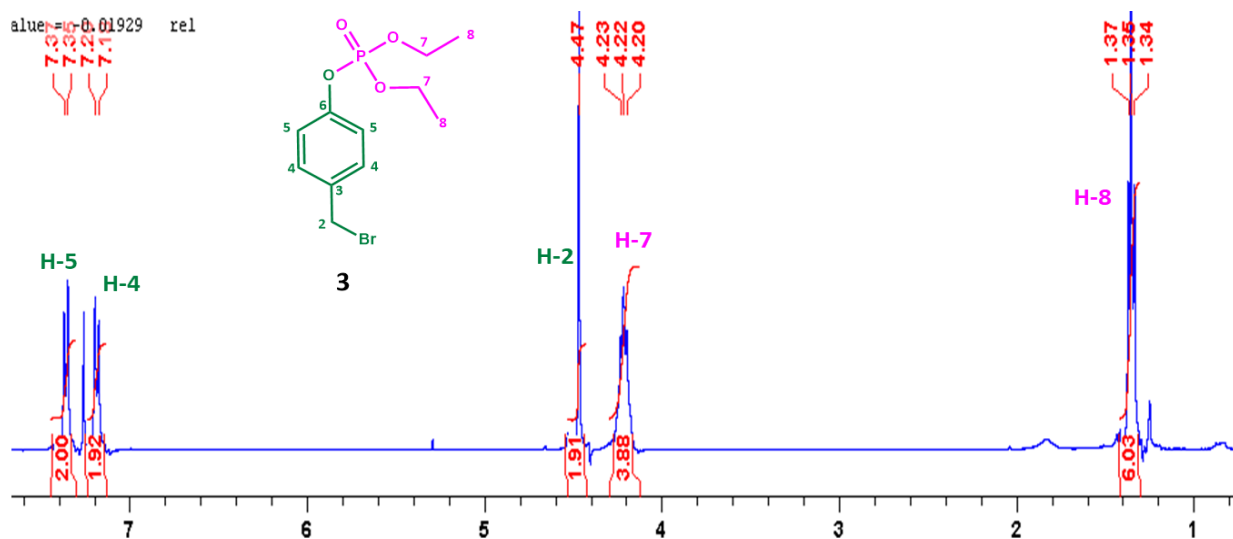
**Εικόνα 2.1.1.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης **2** σε CDCl<sub>3</sub>, (400 MHz, 25 °C).

Η ένωση **2** μετατράπηκε ποσοτικά στο αντίστοιχο αλκυλαλογονίδιο **3** χρησιμοποιώντας τριβρωμιούχο φωσφόρο μέσω μιας αντίδρασης δυο σταδίων, που περιλαμβάνει ένα στάδιο πυρηνόφιλης υποκατάστασης (**Σχήμα 2.1.7**). Στο πρώτο στάδιο η πυρηνόφιλη προσβολή της πρωτοταγούς -OH στον φωσφόρο οδηγεί στη δημιουργία μιας εύκολα αποχωρούσας ομάδας και στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται μια πυρηνόφιλη υποκατάσταση, πιθανώς τύπου S<sub>N</sub>2, του βρωμίου.



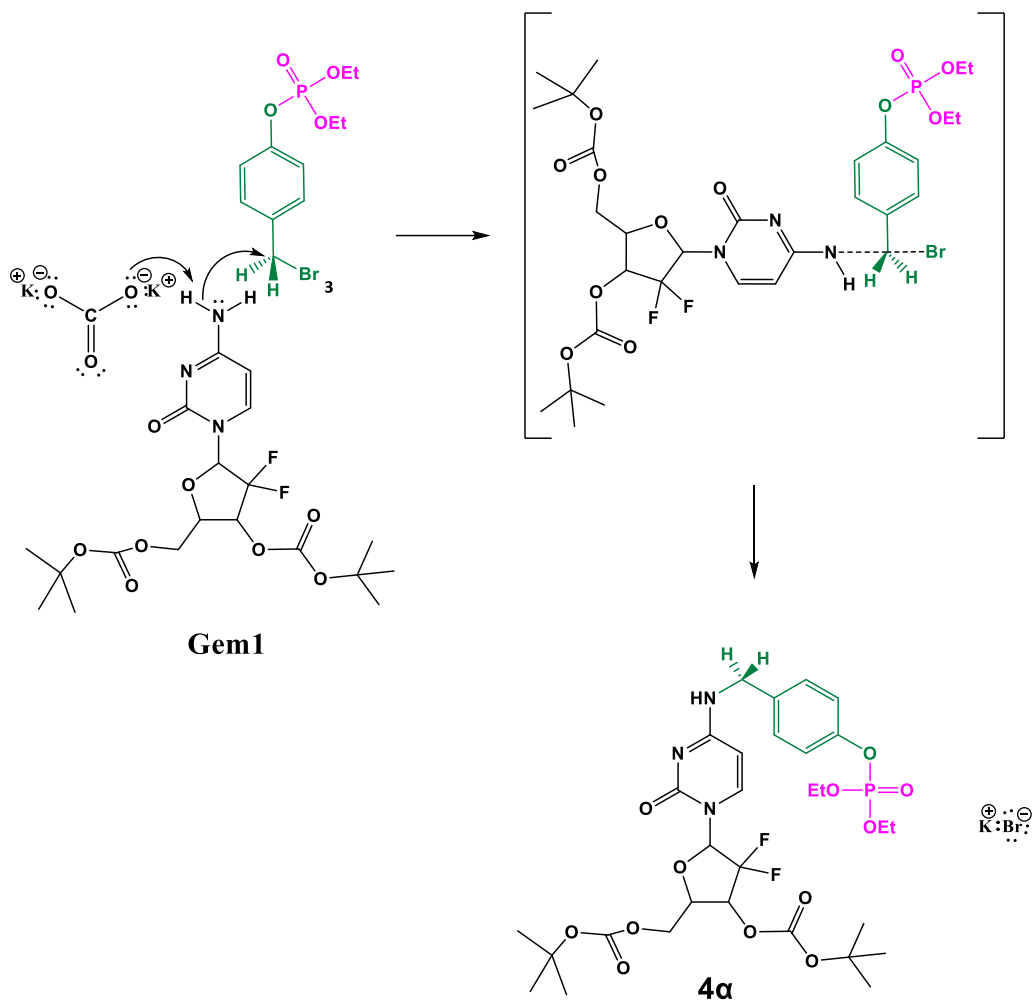
**Σχήμα 2.1.7.** Πιθανός μηχανισμός βρωμίωσης της ένωσης **2** για να ληφθεί η ένωση **3** με χρήση PBr<sub>3</sub> σε διχλωρομεθάνιο.

Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR έδειξε τη μετατόπιση της κορυφής που προέχεται από το  $-\text{CH}_2$  από τα 4.66 ppm στα 4.47 ppm, καθώς και την εξαφάνιση της τριπλής κορυφής που προερχόταν από την πρωτοταγή  $-\text{OH}$  (Εικόνα 2.1.2).



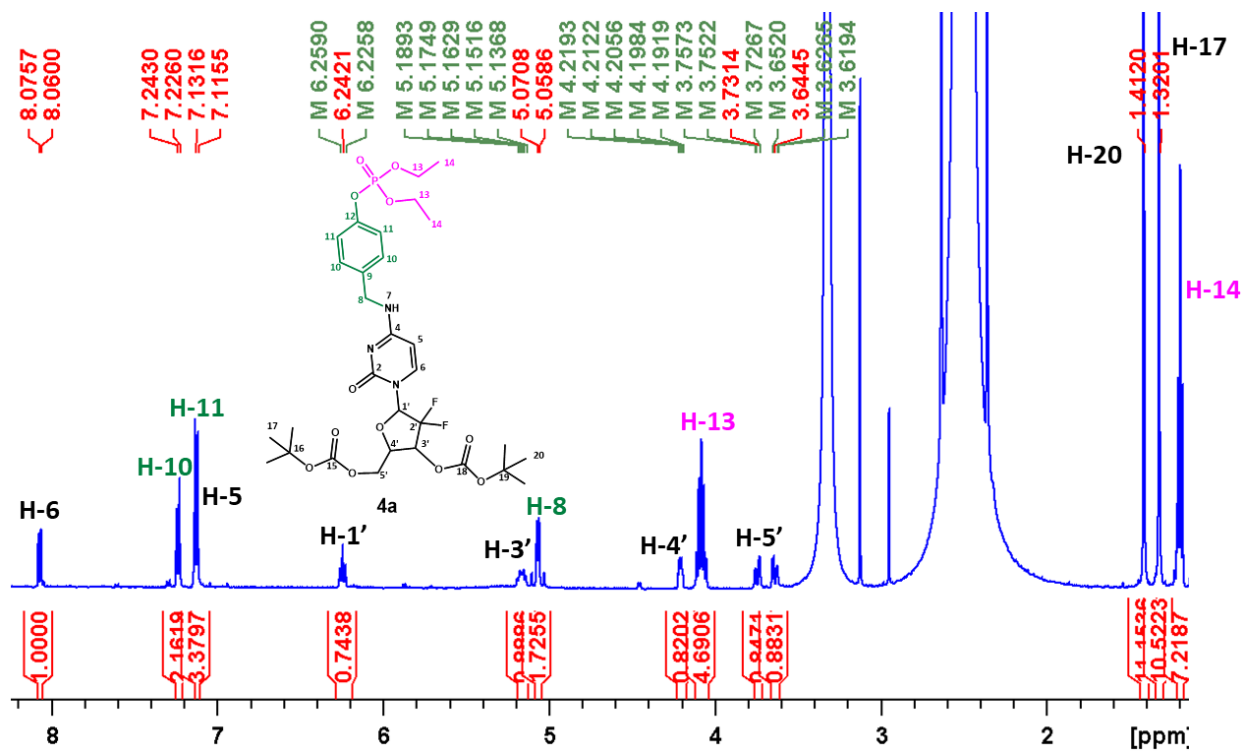
Εικόνα 2.1.2. Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR της ένωσης **3** σε  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz, 25 °C).

Η ένωση **3** στη συνέχεια αντέδρασε με την **Gem1** σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσία ανθρακικού καλίου ως βάση για να προκύψει η ένωση **4a**, μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης (πιθανώς  $\text{S}_{\text{N}}2$ ) (Σχήμα 2.1.8):



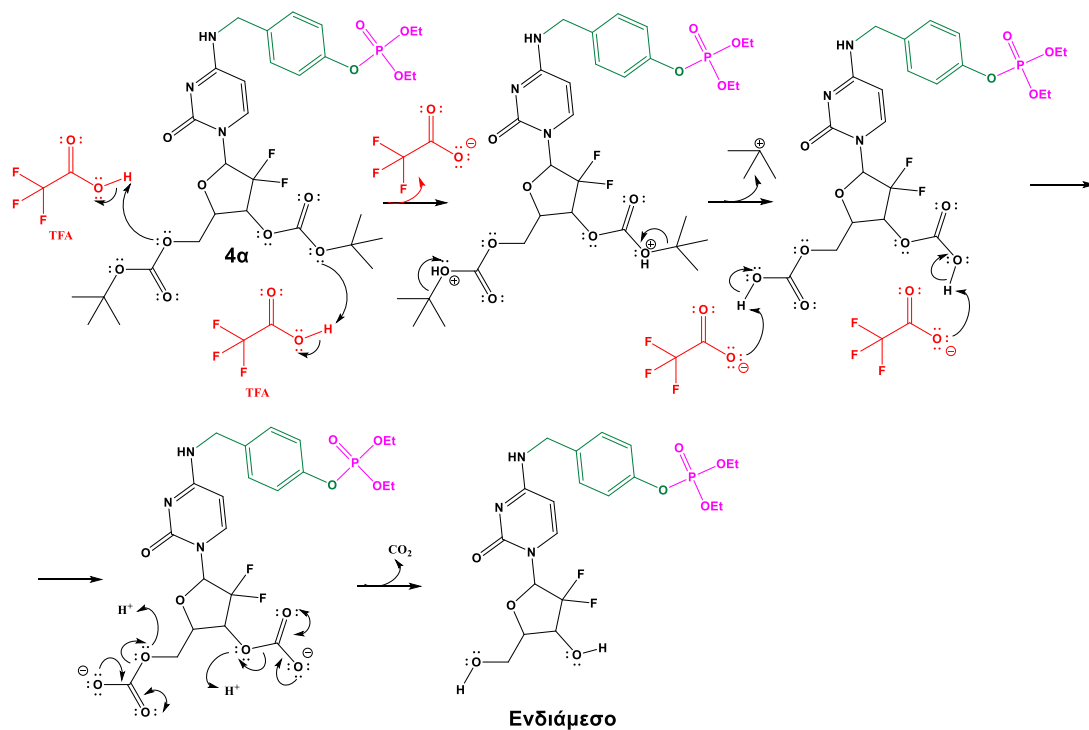
**Σχήμα 2.1.8.** Πιθανός μηχανισμός πυρηνόφιλης υποκατάστασης ( $S_N2$ ) με χρήση  $K_2CO_3$  σε ακετονιτρίλιο για να ληφθεί η ένωση **4a**.

Η ένωση **4a** ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}$ NMR όπου έδειξε την ύπαρξη όλων των κορυφών της ένωσης **3** (με χαρακτηριστικές τις πολλαπλές που προέρχονται από τις αιθυλο ομάδες του φωσφορικού εστέρα) και της **Gem1** με την ταυτόχρονη έλλειψη της  $-\text{NH}_2$  ομάδας της **Gem1** (Εικόνα 2.1.3).

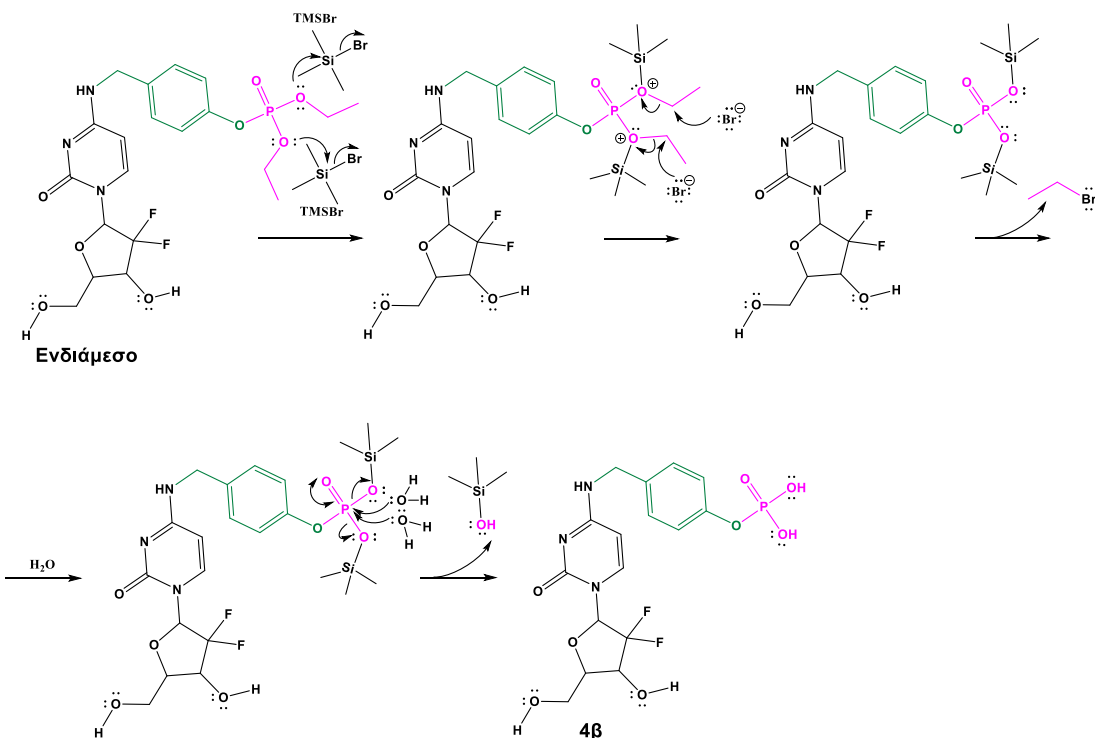


Εικόνα 2.1.3. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **4a** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz, 24 °C).

Η ένωση **4a** κατεργάστηκε αρχικά με τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο για την αποπροστασία των *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδων (ο μηχανισμός παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.9) και στη συνέχεια *in situ* με (βρωμο)(τριμεθυλο)σιλάνιο χρησιμοποιώντας μικροκύματα για την αποκοπή των αιθυλο ομάδων. Το τελικό στάδιο περιλάμβανε την προσθήκη νερού για να ληφθεί η τελική ένωση **4b** (ο μηχανισμός παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.10).

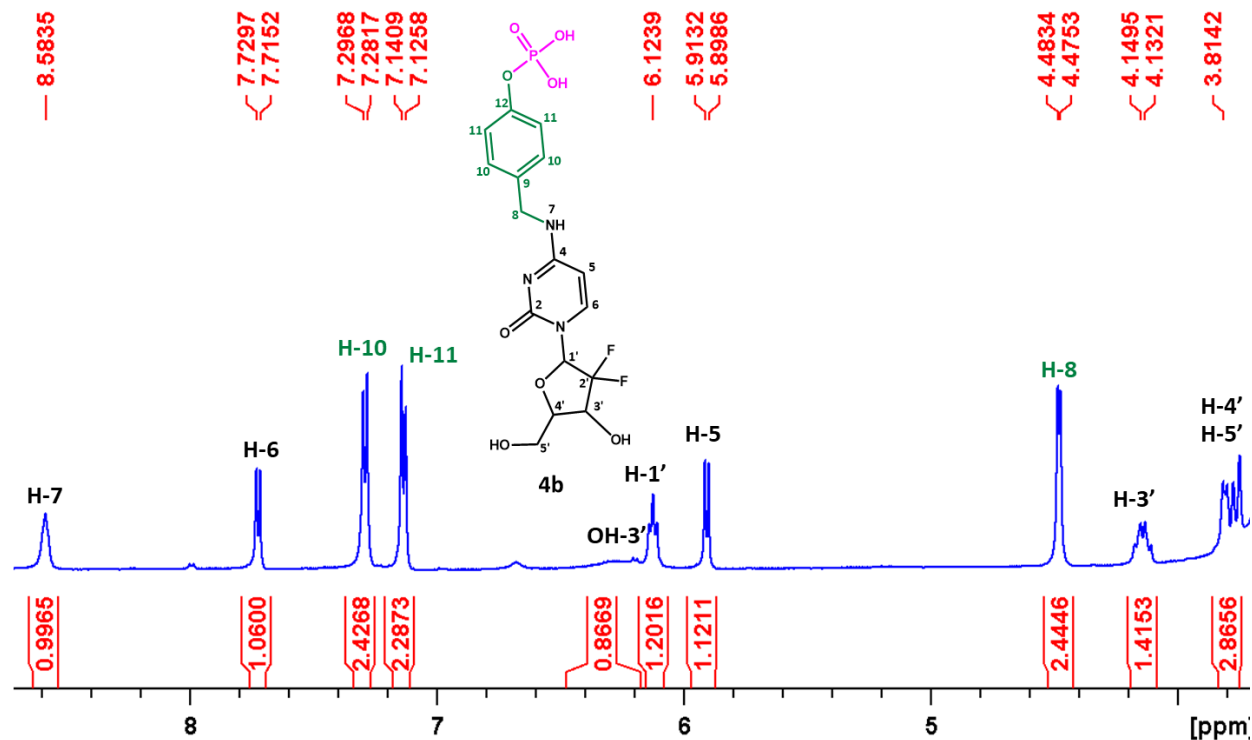


**Σχήμα 2.1.9.** Μηχανισμός αποκοπής των *Boc*- ομάδων της ένωσης **4α** με χρήση τριφθοροξικού οξέος (*TFA*) σε διχλωρομεθάνιο.



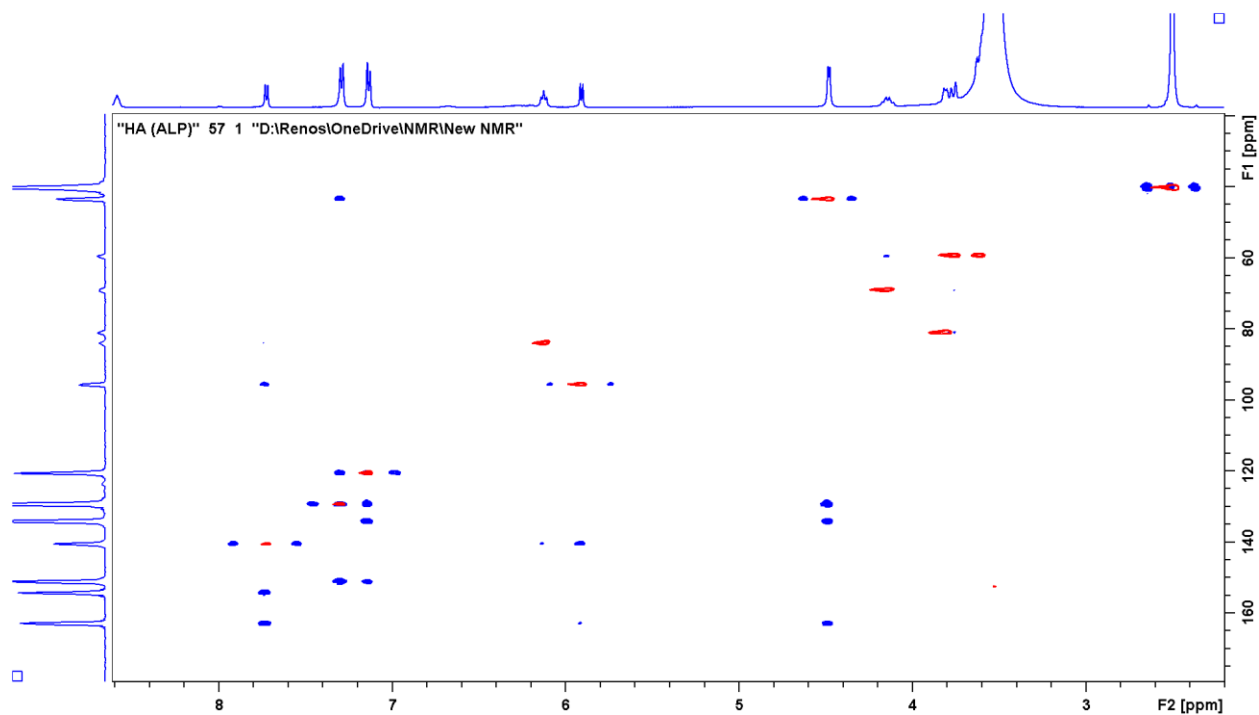
**Σχήμα 2.1.10.** Μηχανισμός αποκοπής των αιθυλομάδων του φωσφορικού εστέρα του ενδιάμεσου της ένωσης **4α** με διαδοχική χρήση (i) (βρωμο)(τριμεθυλο)σιλάνιο σε ακετονιτρίλιο (ii) νερό για να ληφθεί η τελική ένωση **4β**.

Η τελική ένωση **4b** ταυτοποιήθηκε με χρήση  $^1\text{H}$  NMR στο οποίο παρατηρήθηκε η έλλειψη των κορυφών που προεχόντουσαν από τις αιθυλο και τις *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδες (Εικόνα 2.1.4), με φασματοσκοπία 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC που βοήθησε στον ολικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 2.1.5) και με φασματομετρία μάζας όπου παρατηρήθηκαν τα ιόντα 450.0873  $[\text{M}+\text{H}]^+$  και 472.0691  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . (Εικόνα 2.1.6).



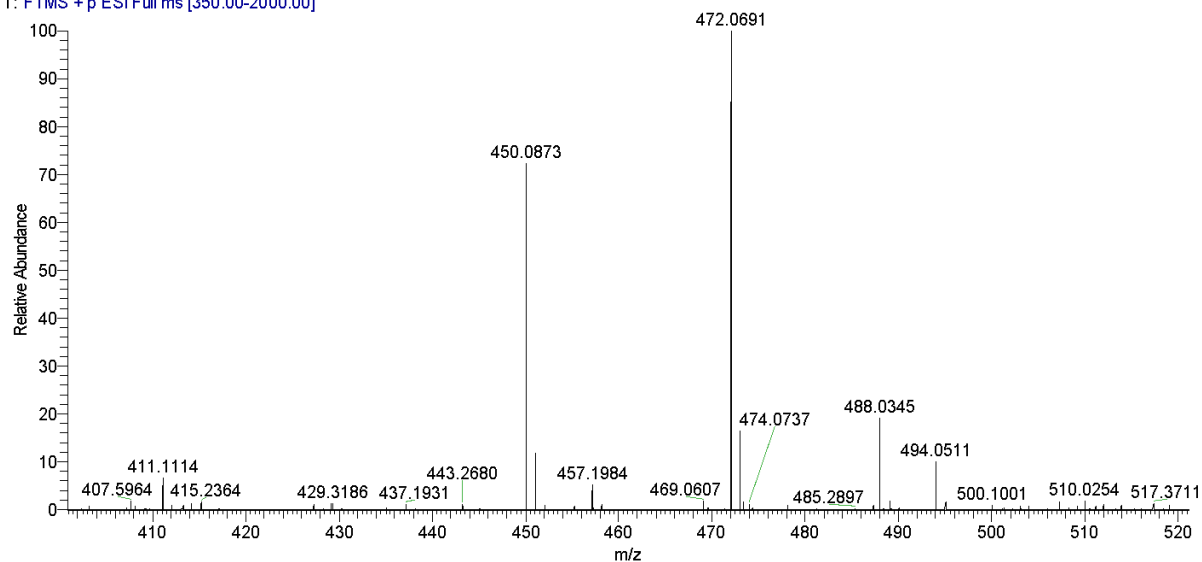
Εικόνα 2.1.4. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **4b** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).





**Εικόνα 2.1.5.** Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **4β** σε  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz, 25 °C).

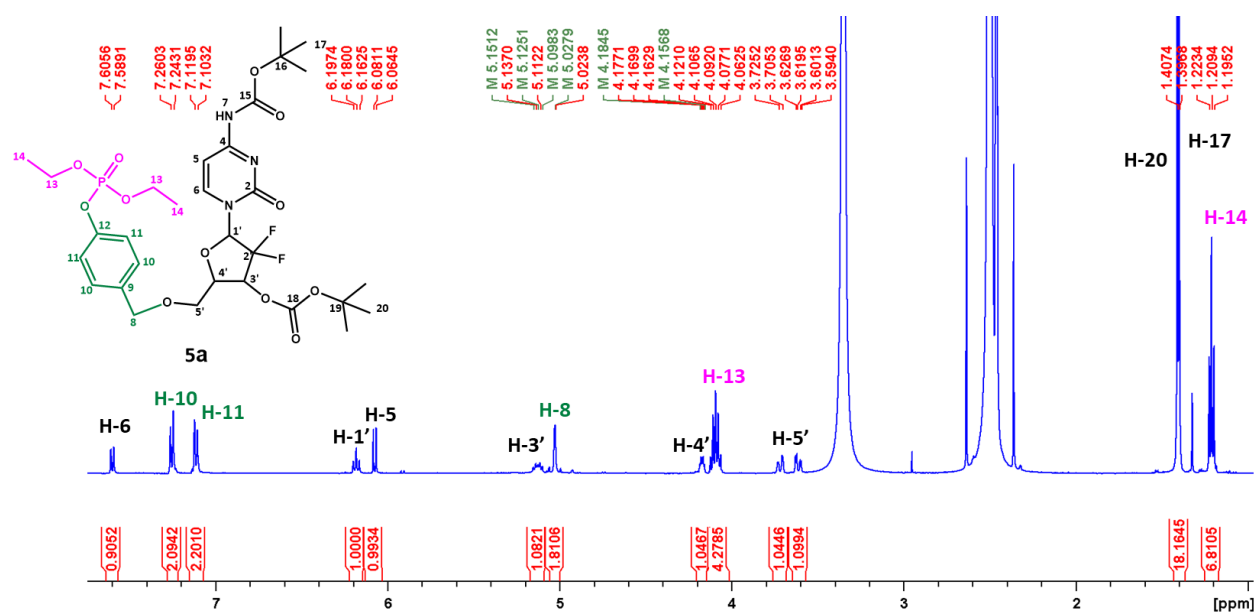
HA\_105\_191018104048 #5-6 RT: 0.06-0.08 AV: 2 NL: 8.28E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



**Εικόνα 2.1.6.** Φάσμα μάζας της ένωσης **4β**.

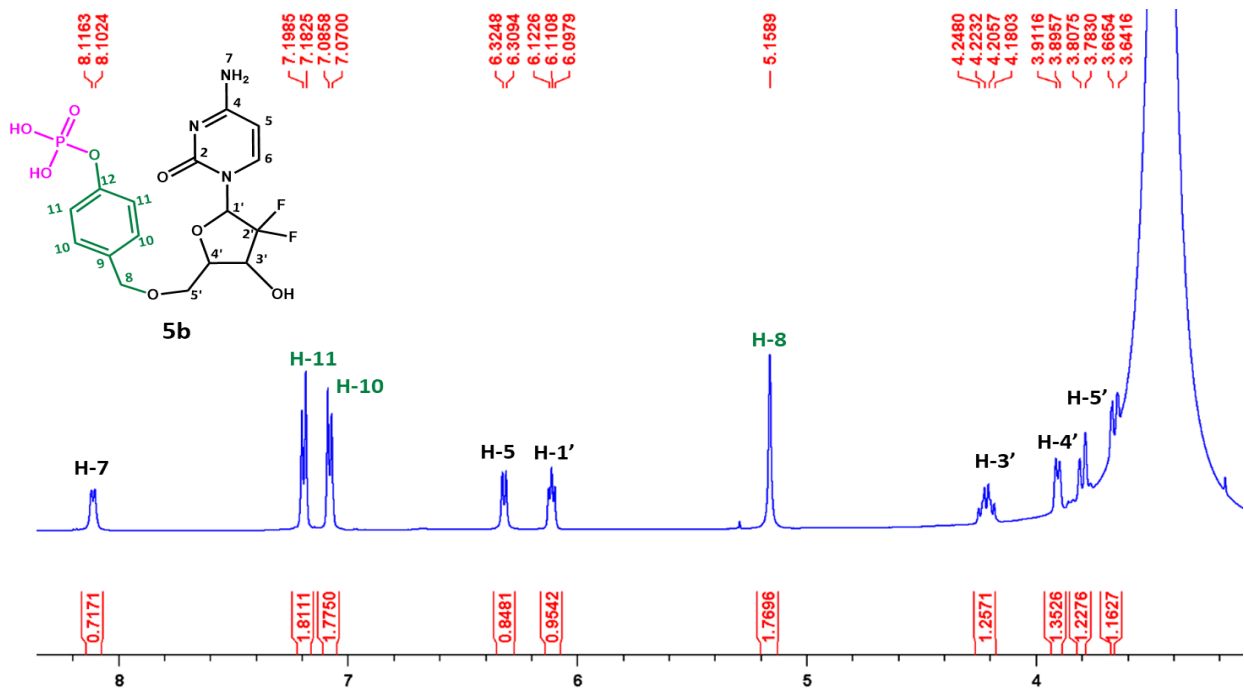
Ομοίως, η ένωση **3** αντέδρασε με την **Gem2** σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσία ανθρακικού καλίου ως βάση για να προκύψει η ένωση **5α**, μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης όπως και για την ένωση **4α**, η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά με  $^1\text{H}$ NMR όπου έδειξε την ύπαρξη όλων των κορυφών της ένωσης **3** (με χαρακτηριστικές τις πολλαπλές που προέρχονται από τις

αίθυλο ομάδες του φωσφορικού εστέρα) και της **Gem2** με την ταυτόχρονη έλλειψη της 5'-OH της **Gem2** (Εικόνα 2.1.7).

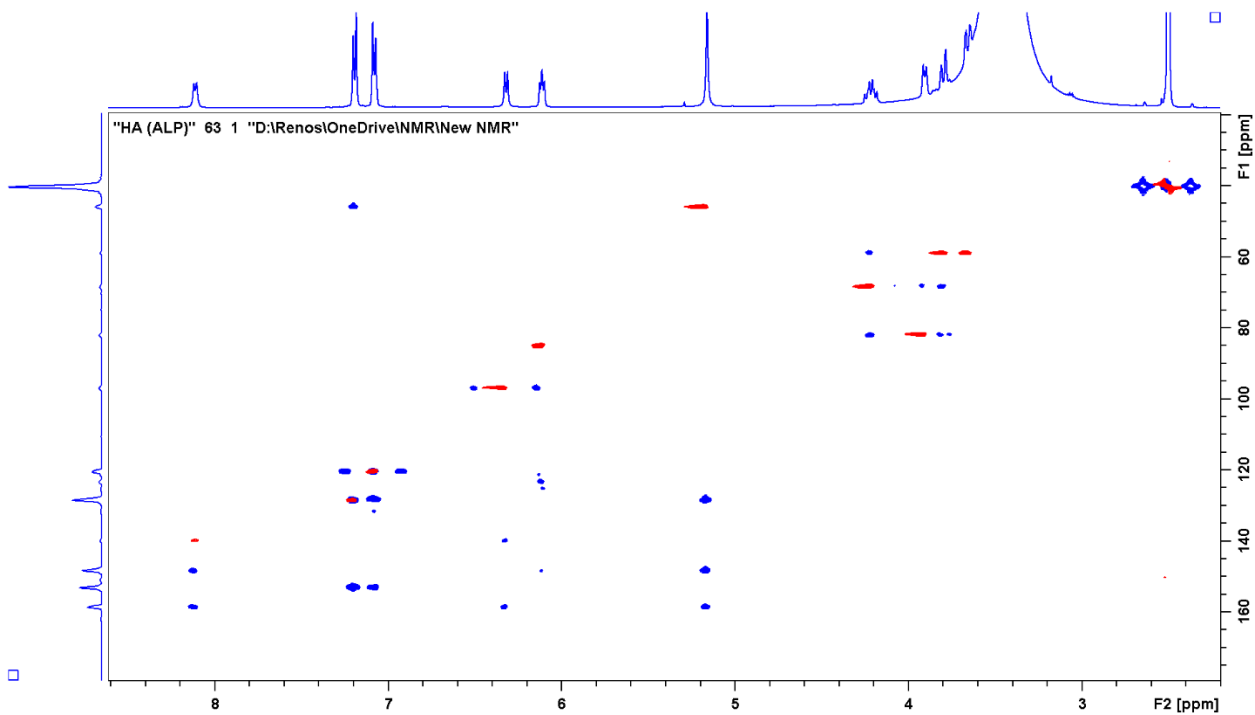


Εικόνα 2.1.7. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **5a** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz, 25 °C).

Ομοίως με την ένωση **4β**, η ένωση **5β** προέκυψε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες αλλά από την ένωση **5a** (κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ, *in situ* αντίδραση (βρωμο)(τριμεθυλο)σιλάνιο και προσθήκη νερού) και ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}$  NMR το οποίο έδειξε την έλλειψη των κορυφών που προεχόντουσαν από τις αίθυλο και τις *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδες (Εικόνα 2.1.8), με φασματοσκοπία 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC που βοήθησε στον ολικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 2.1.9), και με φασματομετρία μάζας όπου έδειξε τα ιόντα 450.0872  $[\text{M}+\text{H}]^+$  και 899.1683  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  (Εικόνα 2.1.10).

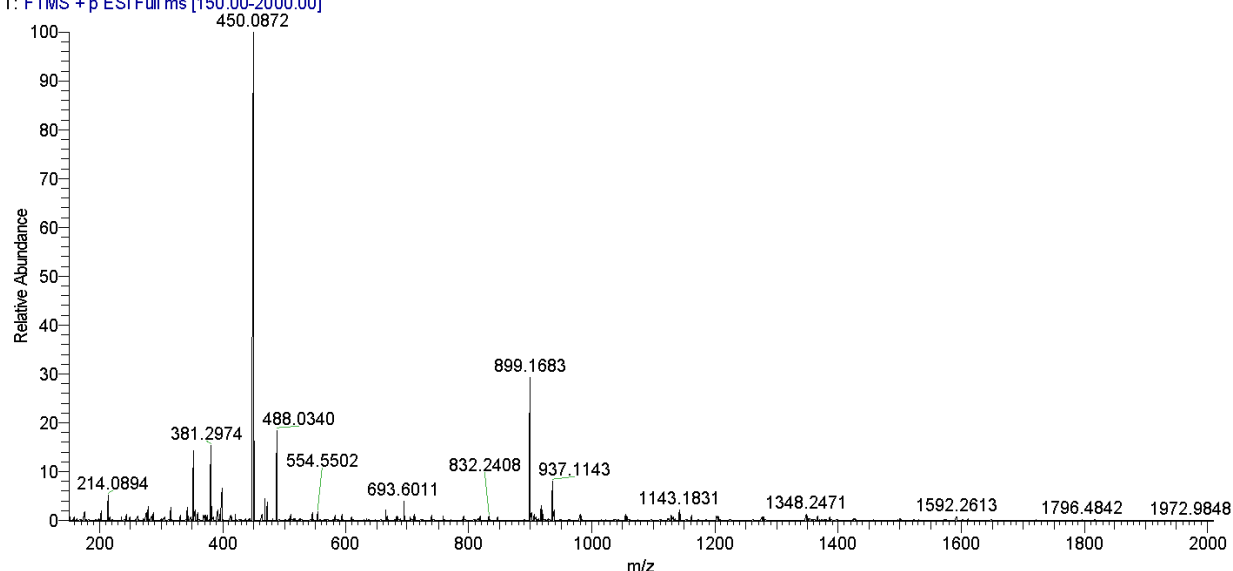


Εικόνα 2.1.8. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **5b** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).



Εικόνα 2.1.9. Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  NMR HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **5b** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).

HA99\_3\_180711100626 #2-3 RT: 0.03-0.04 AV: 2 NL: 2.26E7  
T: FTMS +p ESI Full ms [150.00-2000.00]



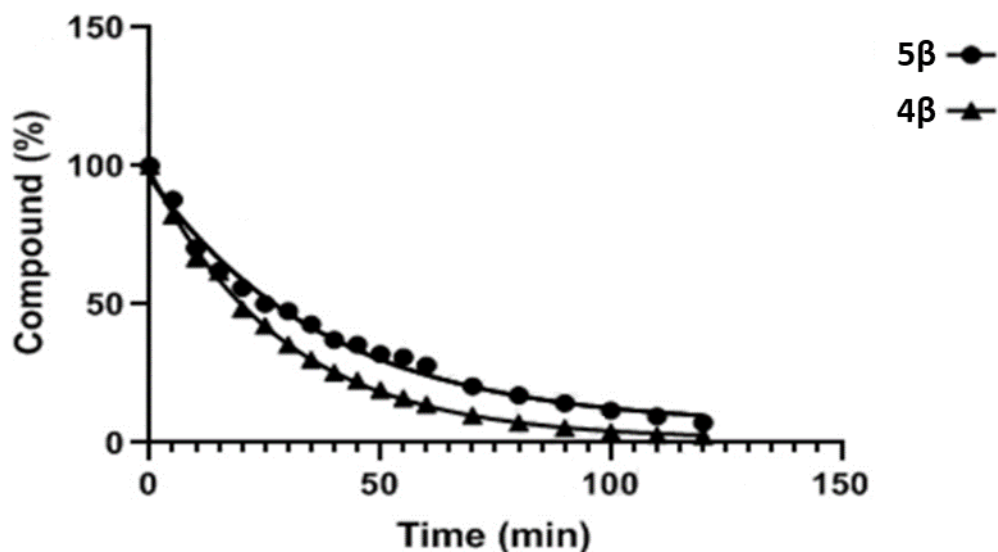
*Εικόνα 2.1.10. Φάσμα μάζας της ένωσης 5β.*

## 2.1.2 Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισταβίνης που ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση (ενώσεις **4β** και **5β**)

Τα δύο θεραπευτικά προφάρμακα **4β** και **5β** της γεμισταβίνης μελετήθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε 1) η απόκριση τους ως προς το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης σε συνάρτηση με το χρόνο, 2) η κυτταροτοξικότητά τους σε καρκινικές σειρές HeLa και A549, 3) η σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και 4) η σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH και 5) η υδατοδιαλυτότητά τους σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη.

### 2.1.2.1 Απόκριση των προφαρμάκων στην αλκαλική φωσφατάση

Το πρώτο βήμα στη βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων **4β** και **5β** ήταν ο έλεγχος της απόκρισης τους στην αλκαλική φωσφατάση (**Εικόνα 2.1.11**). Τα προφάρμακα θα πρέπει να αναγνωρίζονται από την αλκαλική φωσφατάση ώστε να γίνεται υδρόλυση του φωσφορικού εστέρα με επακόλουθη απελευθέρωση της γεμισταβίνης.



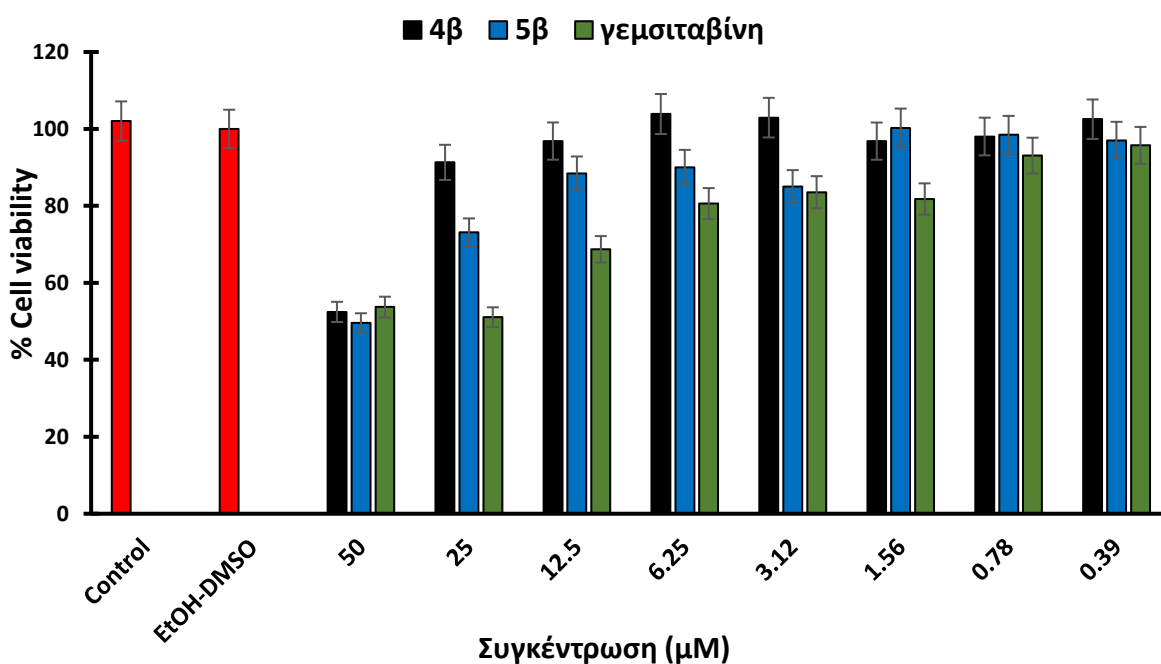
*Εικόνα 2.1.11. Καμπύλη απόκρισης των αναλόγων 4β και 5β στην αλκαλική φωσφατάση (0.5 U) σε συνάρτηση με τον χρόνο.*

Η πλήρης αποικοδόμηση των προφαρμάκων 4β και 5β πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 2 ωρών, επαληθεύοντας ότι και τα δυο αποτελούν εξαιρετικά υποστρώματα για την αλκαλική φωσφατάση. Το ανάλογο 4β φαίνεται να έχει ελαφρώς καλύτερη απόκριση στο ένζυμο.

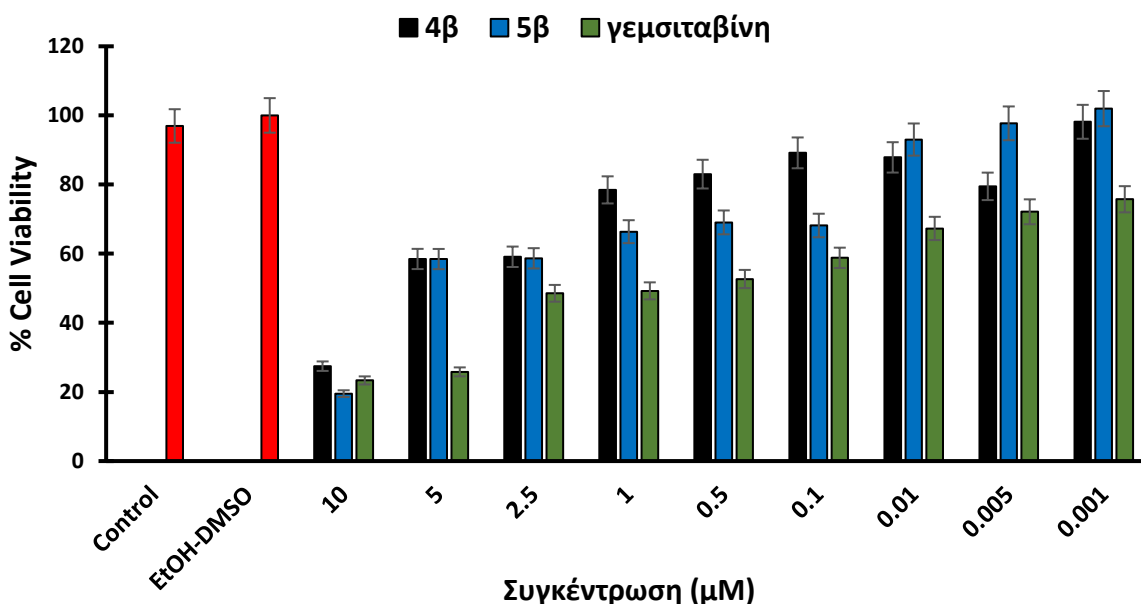
#### 2.1.2.2 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των προφαρμάκων 4β και 5β έναντι των καρκινικών σειρών HeLa και A549

Το επόμενο βήμα αποτέλεσε ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των δυο προφαρμάκων έναντι δυο διαφορετικών καρκινικών σειρών, των HeLa (καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας) και των A549 (αδενοκαρκίνωμα ανθρώπινου πνεύμονα). Αξίζει να σημειωθεί πως τα καρκινικά κύτταρα HeLa αποτέλεσαν τα πρώτα θάνατα ανθρώπινα κύτταρα που ανακαλύφθηκαν και είναι εξαιρετικά επιθετικά και ανθεκτικά<sup>140</sup>. Το όνομα τους προέρχεται από την πρώτη γυναίκα απ' την οποία απομονώθηκαν (Henrietta Lacks - HeLa). Τα συγκεκριμένα κύτταρα επιλέχθηκαν καθώς βάσει βιβλιογραφίας εκφράζουν σε σημαντικό ποσοστό την αλκαλική φωσφατάση και επίσης η γεμισιταβίνη είναι δραστική κατά των κυττάρων αυτών<sup>141</sup>.

Για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία της γεμισιταβίνης και των δύο αναλόγων μορίων της, 4β και 5β, χρησιμοποιήθηκε η γενική μέθοδος που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 και 50 μΜ. Ακολουθούν τα ραβδογράμματα της κυτταροτοξικότητας των προφαρμάκων 4β και 5β και της γεμισιταβίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο σε διάφορες συγκεντρώσεις σε σειρές HeLa (Εικόνα 2.1.12) και A549 (Εικόνα 2.1.13).



*Εικόνα 2.1.12. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων 4β (μαύρο χρώμα) και 5β (μπλε χρώμα) σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη (πράσινο χρώμα) σε HeLa καρκινική κυτταρική σειρά.*



*Εικόνα 2.1.13. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων 4β (μαύρο χρώμα) και 5β (μπλε χρώμα) σε σύγκριση με τη γεμισταβίνη (πράσινο χρώμα) σε A549 καρκινική κυτταρική σειρά.*

Από τα δυο ραβδογράμματα προκύπτει πως τα ανάλογα **4β** και **5β** διαθέτουν ελαφρώς χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τη σκέτη γεμισιταβίνη. Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τη γεμισιταβίνη και τα δυο ανάλογα κατά της κυτταρικής σειράς A549 (για τα HeLa δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός της τιμής IC<sub>50</sub> λόγω χαμηλής δράσης) φαίνονται στον κάτωθι πίνακα (**Πίνακας 2.1**).

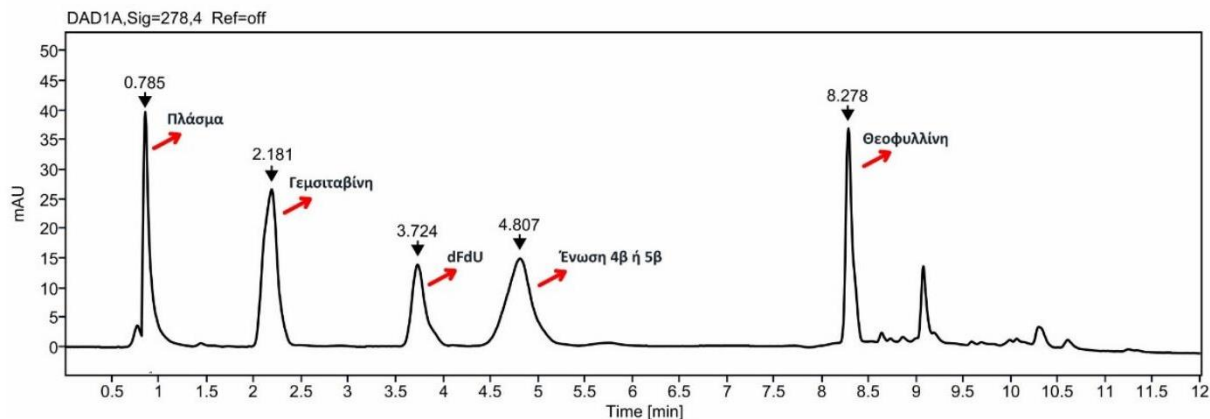
**Πίνακας 2.1.** Τιμές IC<sub>50</sub> του φαρμάκου γεμισιταβίνη και των προφαρμάκων **4β** και **5β** έναντι της καρκινικής σειράς A549.

<b>Ένωση</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>StDev (nM)</b>	<b>Κυτταρική σειρά</b>
Γεμισιταβίνη	59.5	±10	A549
Ένωση <b>4β</b>	1900	±0.1	A549
Ένωση <b>5β</b>	1200	±0.1	A549

#### 2.1.2.3 Έλεγχος της in vitro σταθερότητας των προφαρμάκων **4β** και **5β** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος

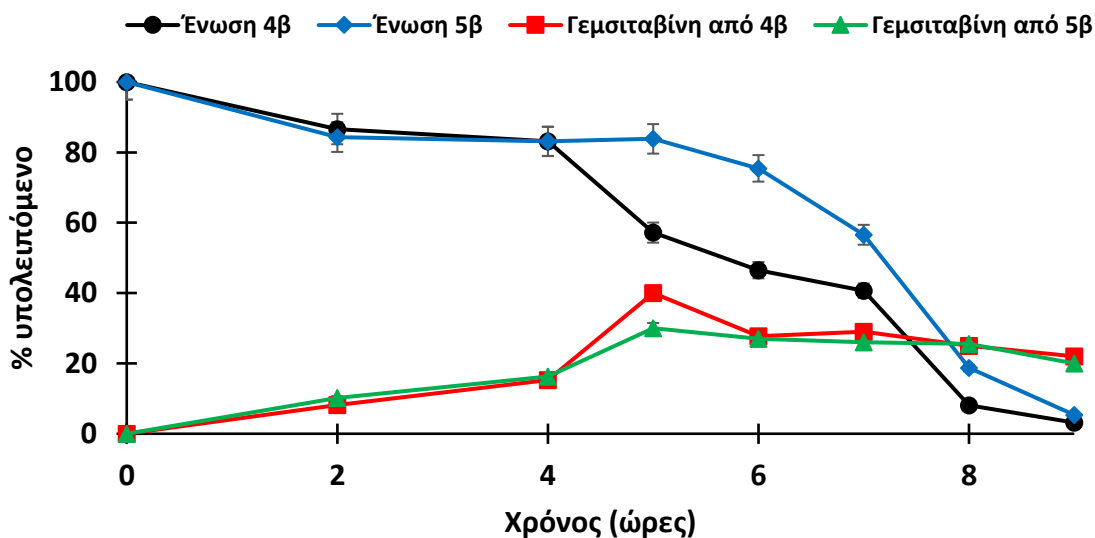
Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των προφαρμάκων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρακολουθώντας τον ρυθμό της υδρόλυσής τους, καθώς και τα επίπεδα της σχηματιζόμενης γεμισιταβίνης και του μεταβολίτη της (dFdU), σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού της γεμισιταβίνης, του μεταβολίτη dFdU, του προφαρμάκου, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος. Η δυσκολία σε αυτό το εγχείρημα έγκειται στο γεγονός πως η γεμισιταβίνη, το dFdU και τα δυο προφάρμακα είναι υδρόφιλα μόρια με παρόμοιες ιδιότητες. Ωστόσο, ύστερα από πολλαπλές προσπάθειες βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 6 λεπτά έως 30/70 για άλλα 6 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 278 nm. Το πρότυπο χρωματογράφημα φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.1.14**.



**Εικόνα 2.1.14.** Χρωματογράφημα HPLC των ενώσεων **4β** και **5β** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία γεμισταβίνης, dFdU και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας των δυο θεραπευτικών προφαρμάκων (**Εικόνα 2.1.15**) όπου παρατηρούμε πως το **4β** διαθέτει ελάχιστα χαμηλότερη σταθερότητα από το **5β** (μεγαλύτερος ρυθμός διάσπασης στο διάστημα 5-7 ωρών).



**Εικόνα 2.1.15.** Καμπύλες σταθερότητας των προφαρμάκων **4β** (μαύρο χρώμα) και **5β** (μπλε χρώμα) και καμπύλες σχηματισμού της γεμισταβίνης και από τα 2 (από το **4β** φαίνεται με κόκκινο χρώμα και από το **5β** φαίνεται με πράσινο χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

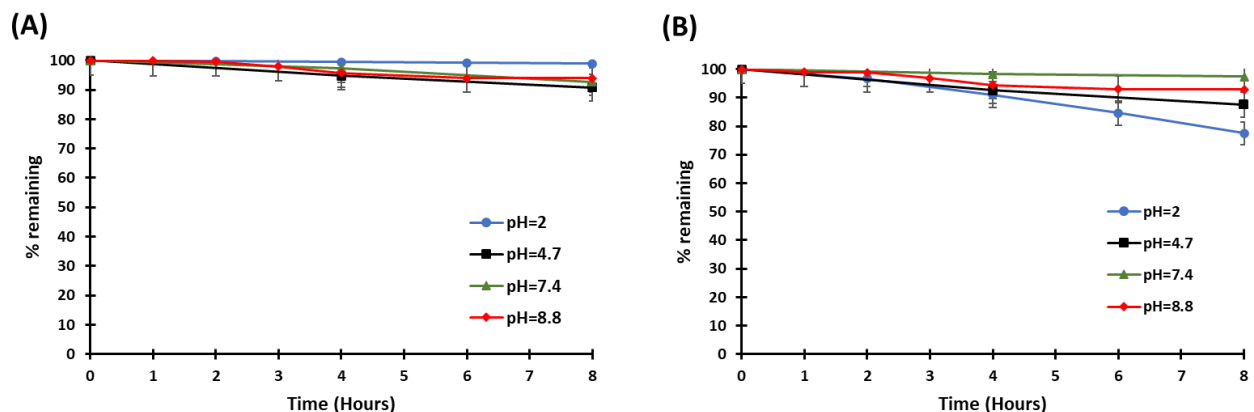


Και τα δυο είναι σχετικά σταθερά τις πρώτες 4 ώρες, ενώ φαίνεται να αποικοδομούνται σχεδόν πλήρως μετά το πέρας των 8 ωρών. Επίσης, και τα δυο ανάλογα ελευθερώνουν σχεδόν την ίδια ποσότητα γεμισιταβίνης με μία μικρή διαφορά στις 5 ώρες, όπου το **4β** υφίσταται μεγαλύτερη αποικοδόμηση με αποτέλεσμα να δίνει και μεγαλύτερη ποσότητα γεμισιταβίνης. Ένα σημαντικό εύρημα από τη συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί πως δεν παρατηρήθηκε ούτε ίχνος του ανενεργού μεταβολίτη dFdU.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα αποτελέσματα της απόκρισης στην αλκαλική φωσφατάση (**Εικόνα 2.1.11**) συμφωνούν με τα αποτελέσματα της *in vitro* σταθερότητας των αναλόγων στο πλάσμα (**Εικόνα 2.1.15**). Συγκεκριμένα, το ανάλογο **4β** έδειξε ελαφρώς καλύτερη απόκριση στο ένζυμο και βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης σταθερότητας είναι και πιο ασταθές στο πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε σύγκριση με το ανάλογο **5β**.

#### 2.1.2.4 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των προφαρμάκων **4β** και **5β** σε εύρος τιμών pH

Η σταθερότητα των 2 προφαρμάκων μελετήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH, σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Η μελέτη της σταθερότητας των δυο προφαρμάκων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το σύστημα που παρουσιάστηκε στην **Εικόνα 2.1.14**. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.1.16**.



**Εικόνα 2.1.16.** Καμπύλη σταθερότητας (A) του **4β** και (B) του **5β** σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Παρατηρούμε πως και τα 2 προφάρμακα είναι σταθερά σε όλο το εύρος τιμών pH (2 έως 8.8) το οποίο είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς μπορεί να αποφευχθεί μια πρόωμη απελευθέρωση του φαρμάκου.

#### 2.1.2.5 Έλεγχος της υδατοδιαλυτότητας των προφαρμάκων **4β** και **5β** σε σύγκριση με τη γεμισιταβίνη

Η ενσωμάτωση μιας φωσφορικής ομάδας είναι μια συνήθης τεχνική που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της υδατοδιαλυτότητας ενός φαρμάκου. Η γεμισιταβίνη διαθέτει υδατοδιαλυτότητα 22.3 mg/mL σύμφωνα με το hmdb.ca (Βάση δεδομένων). Με στόχο την

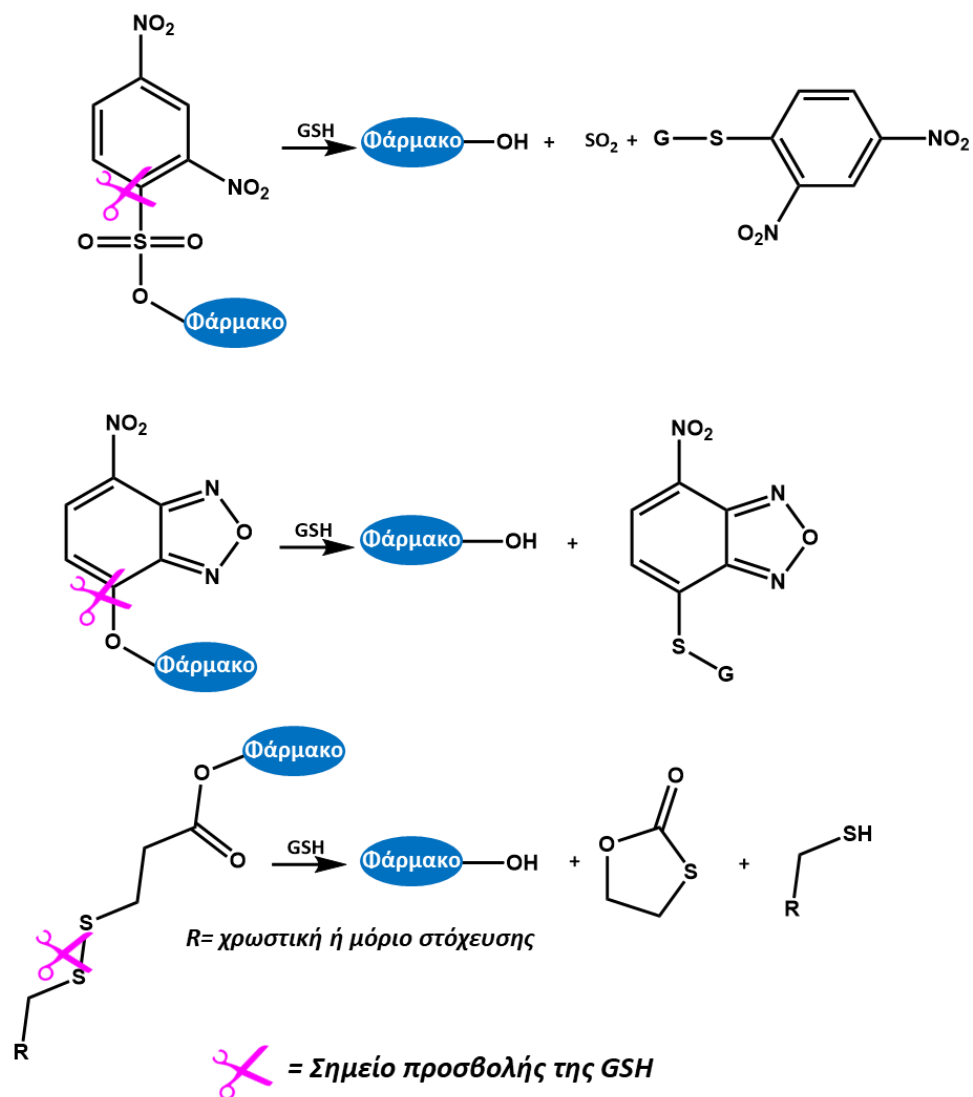
επικύρωση της συγκεκριμένης τιμής και τη σύγκριση της με τις αντίστοιχες τιμές των δυο προφαρμάκων, προχωρήσαμε στη μέτρηση της υδατοδιαλυτότητας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σταδιακή προσθήκη γεμισιταβίνης ή του εκάστοτε προφαρμάκου σε διασπασταμένο νερό έως ότου παρατηρηθεί κορεσμός του διαλύματος. Η χρήση υπερήχων δεν οδήγησε στη διαλυτοποίηση του αιωρήματος. Έπειτα, επαναλήφθηκε η διαδικασία με τις ίδιες συνθήκες αλλά σε τιμές κοντινές στο σημείο κορεσμού, ύστερα από κάθε προσθήκη ουσίας πραγματοποιήθηκε έντονη ανακίνηση, διήθηση μέσω φίλτρου (0.45 μm, Millipore) και το διήθημα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας αναλυτική RP-HPLC. Έτσι, βρέθηκε πως η γεμισιταβίνη έχει υδατοδιαλυτότητα 22.0 mg/mL, ενώ τα προφάρμακα **4β** και **5β** παρουσίασαν υδατοδιαλυτότητα 275 mg/mL (αύξηση 12.3 φορές) και 275 (αύξηση 11.5 φορές), αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε δύο θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**4β** και **5β**) τα οποία ανταποκρίνονται πλήρως στην αλκαλική φωσφατάση. Τα προφάρμακα αυτά βρέθηκαν πλήρως σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH το οποίο υποδηλώνει ότι μπορούν να χορηγηθούν και δια στόματος σε ασθενείς. Ακόμη, και τα δυο εμφανίστηκαν αρκετά σταθερά σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, αποφεύγοντας πιθανώς έτσι την ανεπιθύμητη απελευθέρωση του φαρμάκου στη κυκλοφορία του αίματος. Ακόμη, τα δυο προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους κατά δυο καρκινικών σειρών, εμφανίζοντας ασθενέστερη δράση σε σύγκριση με το μητρικό φάρμακο, το οποίο ήταν πλήρως αναμενόμενο λόγω της στρατηγικής του προφαρμάκου που εφαρμόσαμε. Τέλος, τα δυο προφάρμακα εμφάνισαν υψηλή υδατοδιαλυτότητα: ~12 φορές αύξηση σε σύγκριση με τη γεμισιταβίνη. Στο προσεχές μέλλον, πρόκειται να πραγματοποιηθούν πειράματα *in vivo* σε ποντικούς.

### 2.1.3 Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στη γλουταθειόνη (GSH)

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) υφίσταται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα καρκινικά κύτταρα και γι' αυτό θεωρείται ένας από τους πιο ελκυστικούς στόχους στον σχεδιασμό προφαρμάκων ενάντια του καρκίνου. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε ακόμη υψηλότερη συγκέντρωση στις υποξικές περιοχές των όγκων, όπου τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα αναγωγικών ενζύμων και συνεπώς υψηλότερες συγκεντρώσεις GSH.

Η εισαγωγή ενός δισουλφιδικού δεσμού ή μιας ομάδας που λειτουργεί ως υπόστρωμα της γλουταθειόνης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική προφαρμάκων για στοχευμένη απελευθέρωση προφαρμάκων στη περιοχή του όγκου. Όταν το προφάρμακο βρεθεί στο καρκινικό κυτταρικό περιβάλλον, η υπερεκφρασμένη GSH αναγνωρίζει το υπόστρωμα («σκανδάλη»), πυροδοτώντας την απελευθέρωση του μητρικού φαρμάκου με ελεγχόμενο τρόπο όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1.11** όπου παρουσιάζονται διαφορικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με την GSH.

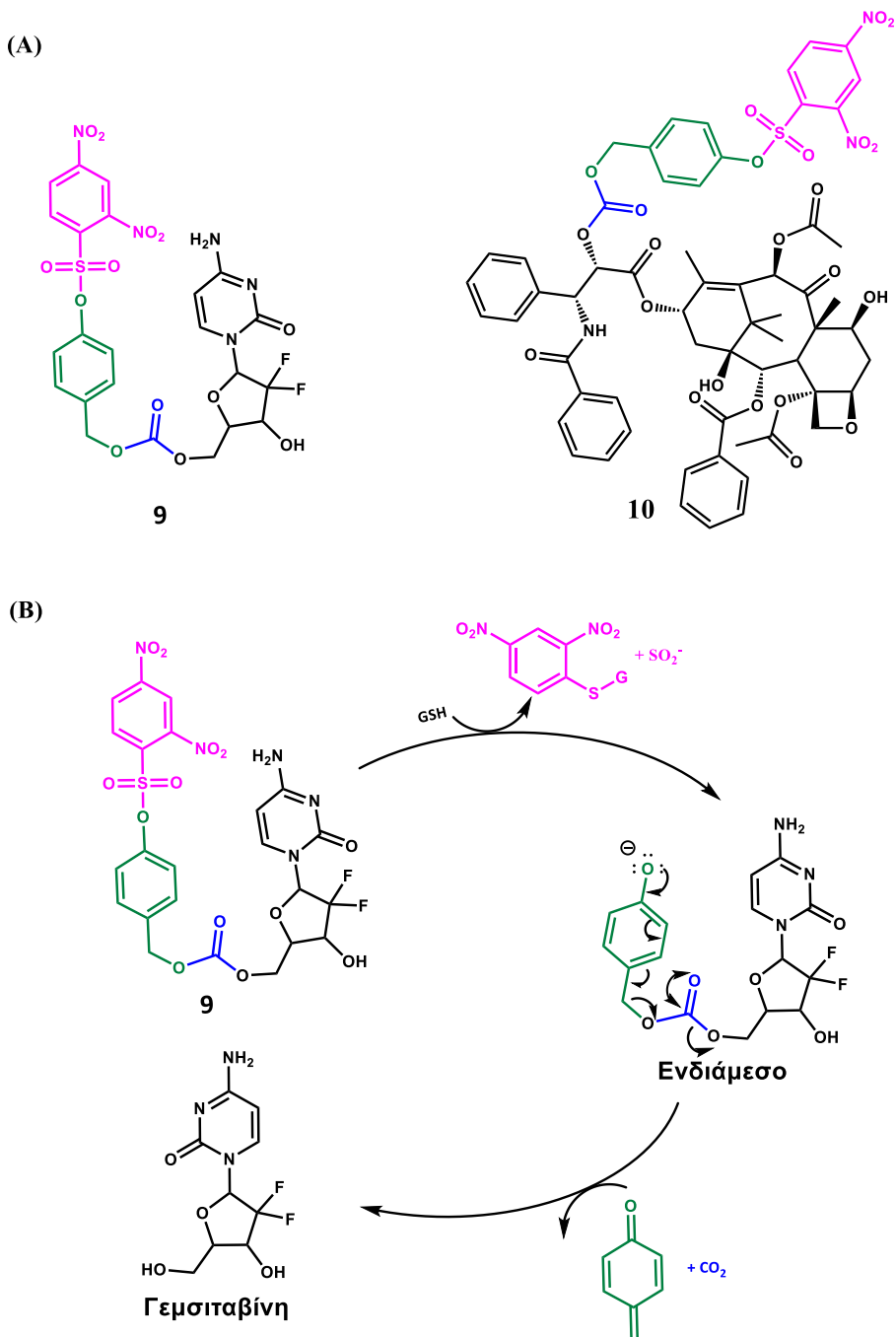


**Σχήμα 2.1.11.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ομάδων που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τη γλουταθειόνη (GSH).

Βασισμένοι στα προαναφερθέντα στοιχεία, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε 1 θεραπευτικό προφάρμακο της γεμισιταβίνης (ένωση **9**) και 1 της πακλιταξέλης (ένωση **10**) μέσω σύζευξης των φαρμάκων με έναν αυτο-διασπώμενο σύνδεσμο (παρα-υδροξυβενζυλική αλκοόλη) που περιέχει το DNBS ως μονάδα ενεργοποίησης («σκανδάλη»). Εκτός από υπόστρωμα της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε και για την «προστασία» της υδροξυλομάδας του αυτό-διασπώμενου συνδέσμου.

Η χρήση του αυτο-διασπώμενου συνδέτη μειώνει τη στερική παρεμπόδιση διευκολύνοντας την προσβασιμότητα της γλουταθειόνης και αυξάνει τη ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου σε σύγκριση με την απευθείας σύζευξη της «σκανδάλης» στο μητρικό φάρμακο. Οι δομές των

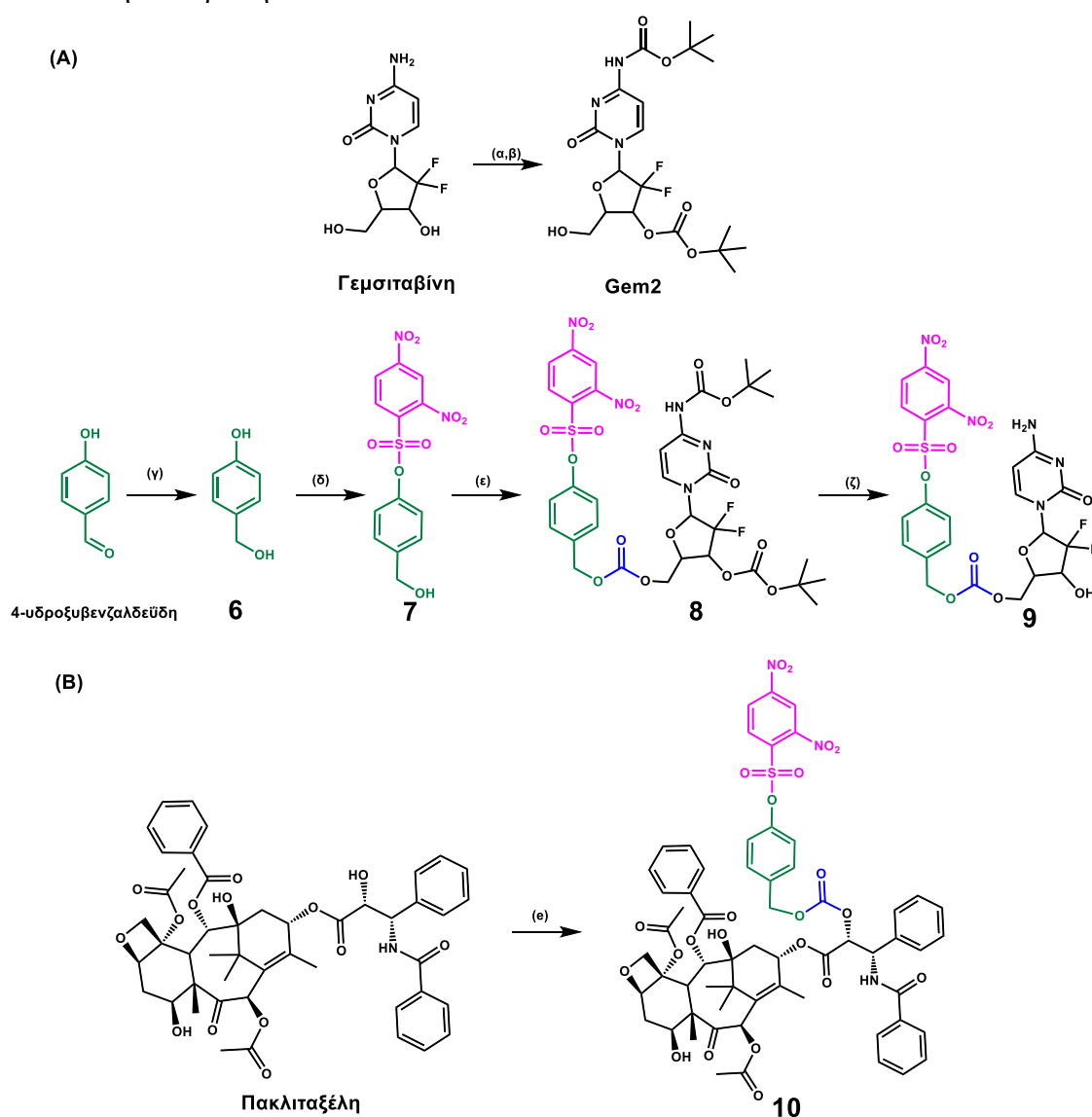
προφαρμάκων **9** και **10** φαίνονται στο **Σχήμα 2.1.12A**, ενώ ο ενδεικτικός μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου από την ένωση **9** ύστερα από αλληλεπίδραση με την γλουταθειόνη (μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης S<sub>N</sub>Ar) παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.1.12B** (ο ίδιος μηχανισμός ισχύει και για την ένωση **10** με απελευθέρωση πακλιταξέλης).



**Σχήμα 2.1.12.** (A) Δομές των 2 προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στη γλουταθειόνη (γεμισιταβίνη = μαύρο, αυτο-διασπώμενος συνδέτης = πράσινο, DNBS («σκανδάλη») = μωβ, μη ανιχνεύσιμος συνδέτης = μπλε), (B) Μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου γεμισιταβίνη με ταυτόχρονη απελευθέρωση των 2 συνδετών.

Η μετατροπή είναι μία διεργασία 2 σταδίων, όπου αρχικά το προφάρμακο αλληλεπιδρά με τη γλουταθειόνη και στη συνέχεια μέσω μιας ταχείας αυθόρμητης 1,6-απόσπασης απελευθερώνεται το αντικαρκινικό φάρμακο. Δεδομένης της υπερέκφρασης της γλουταθειόνης στους όγκους συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς, η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται εκλεκτικά στους όγκους.

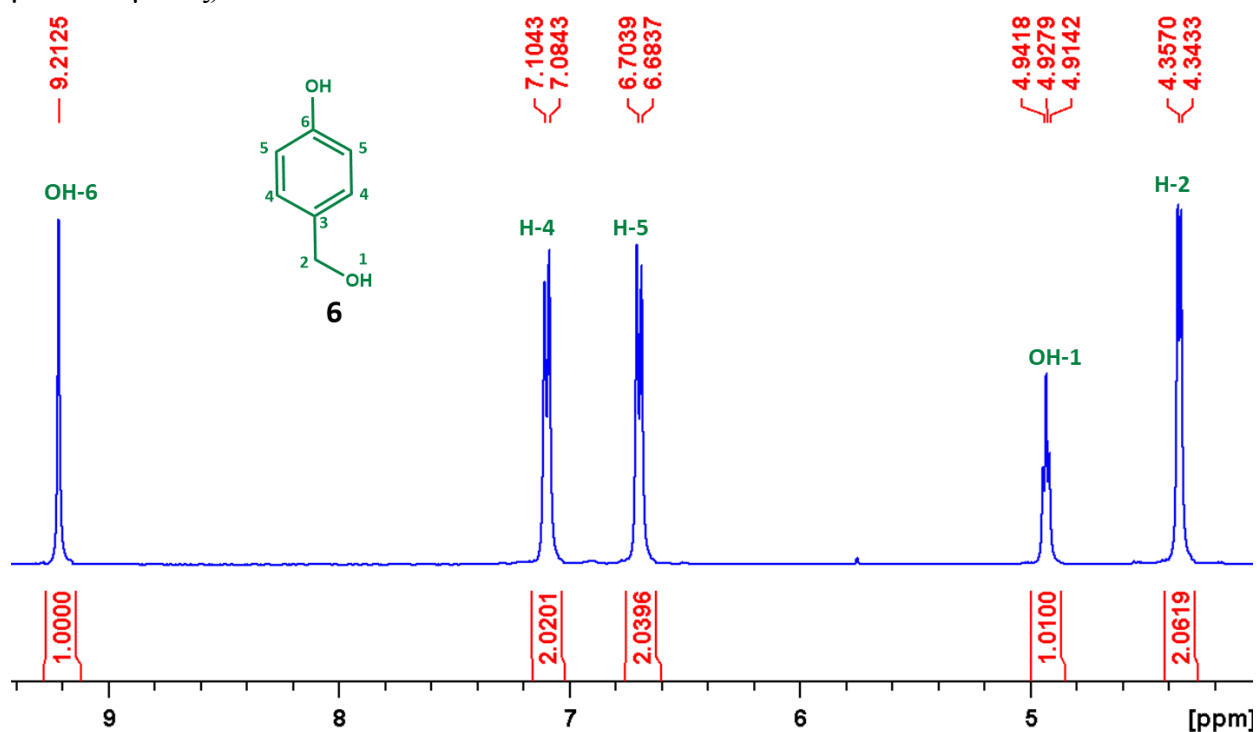
Τα προφάρμακα **9** και **10** παρασκευάστηκαν σε 5 και 3 συνολικά βήματα, αντίστοιχα (Σχήμα 2.1.13). Όσον αφορά το προφάρμακο της γεμισιταβίνης, έπρεπε αρχικά να πραγματοποιηθεί εκλεκτική προστασία της γεμισιταβίνης με Boc- ομάδες για να προκύψει η ένωση **Gem2**, όπως έγινε και για το προφάρμακο **5β** προηγουμένως, ώστε μετέπειτα να γίνει τοποεκλεκτική αντίδραση.



Σχήμα 2.1.13. Η συνθετική πορεία για την παρασκευή (A) του προφαρμάκου **9** της γεμισιταβίνης και (B) του προφαρμάκου **10** της πακλιταξέλης. Αντιδραστήρια και διαλύτες: (α) DBDC,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,

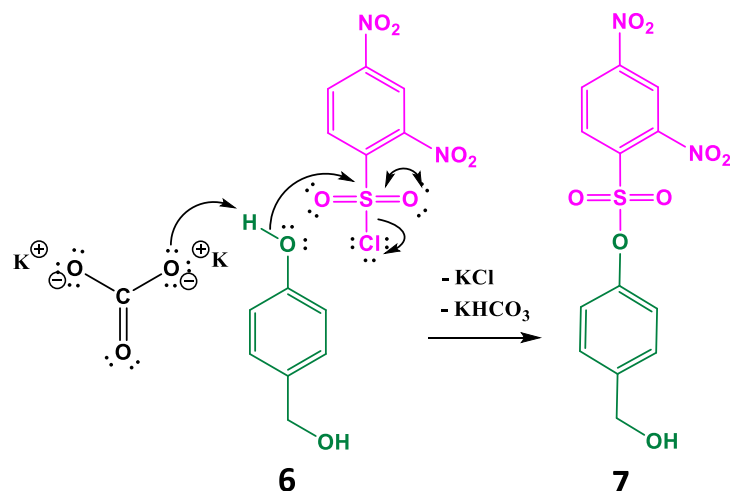
διοξάνιο-H<sub>2</sub>O (80:20), rt, 48 ώρες, (β) DBDC, διοξάνιο, 37 °C, 72 ώρες, (γ) NaBH<sub>4</sub>, απόλυτη EtOH, rt, 2 ώρες, (δ) DNBS, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, άνυδρο MeCN, rt, 12 ώρες, (ε) (i) BNPC, DMAP, άνυδρο MeCN, 40 °C, 12 ώρες, (ii) **7**, άνυδρο MeCN, rt, 12 ώρες, (ζ) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 ώρα.

Όσον αφορά τη σύνθεση του τμήματος του αυτο-διασπώμενου συνδέτη και της «σκανδάλης», αρχικά η 4-υδροξυβενζαλδεΐδη ανάχθηκε προς την αντίστοιχη βενζυλική αλκοόλη **6** με χρήση NaBH<sub>4</sub> σε αιθανόλη με παρόμοιο μηχανισμό με αυτόν που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Η ένωση **6** ταυτοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR (Εικόνα 2.1.17) που έδειξε την εξαφάνιση της κορυφής που αντιστοιχούσε στην αλδεϋδομάδα (-CHO) που συντονιζόταν στα 9.80 ppm, και την εμφάνιση μιας τριπλής κορυφής στα 4.92 ppm προερχόμενη από την πρωτοταγή -OH (εμφανίζεται ως τριπλή λόγω των 2 γειτονικών υδρογόνων της μεθυλενομάδας).



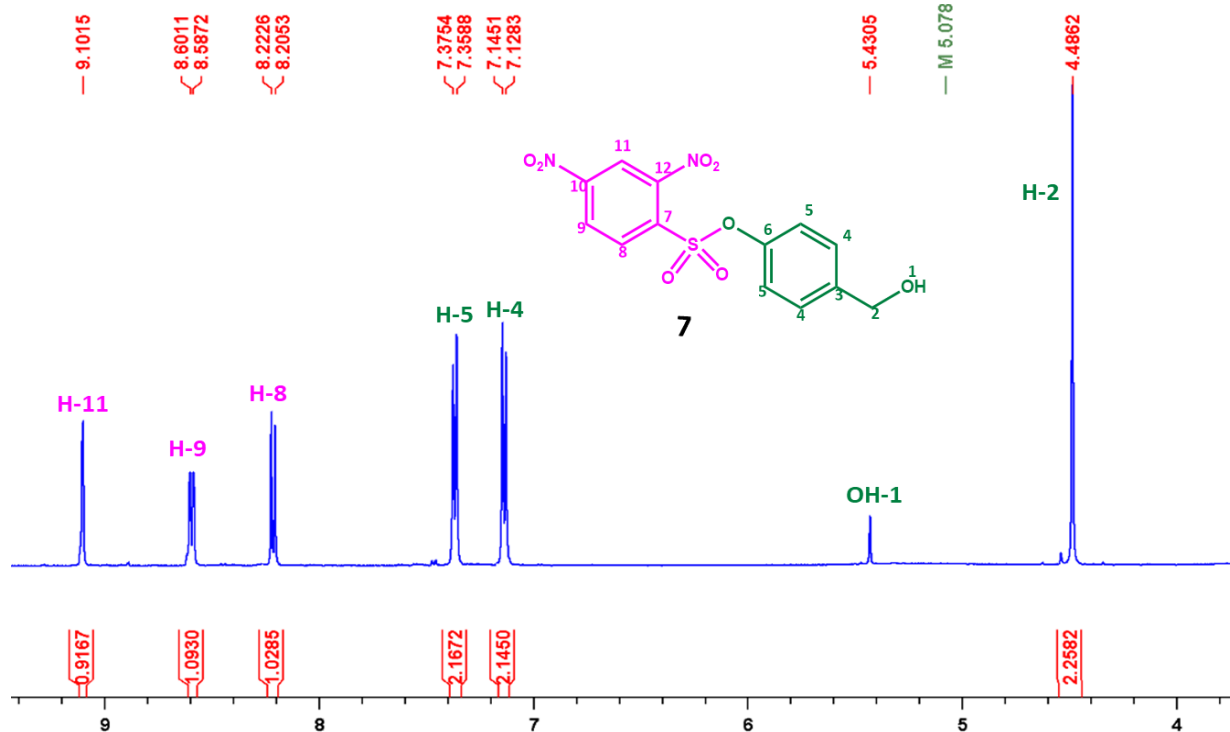
Εικόνα 2.1.17. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης **6** σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).

Έπειτα, στην ένωση **6** πραγματοποιήθηκε μια πυρηνόφιλη άκυλο υποκατάσταση στο σουλφονυλο χλωρίδιο του αντιδραστήριου DNBS (2,4-δινιτροβενζοσουλφονυλο χλωρίδιο) σε βασικές συνθήκες για να προκύψει η ένωση **7** (ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο Σχήμα 2.1.14).



**Σχήμα 2.1.14.** Μηχανισμός πυρηνόφιλης άκυκλο υποκατάστασης της ένωσης **6** με χρήση του αντιδραστηρίου DNBS, υπό βασικές συνθήκες.

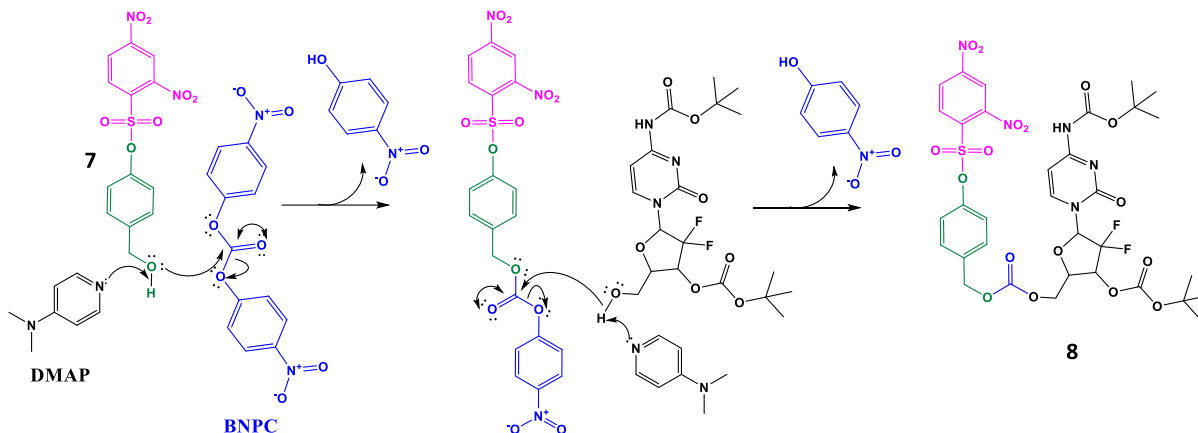
Η ένωση **7** ταυτοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR (**Εικόνα 2.1.18**) που έδειξε την εξαφάνιση της κορυφής που αντιστοιχούσε στην φαινόλη και συντονιζόταν στα 9.21 ppm, και την εμφάνιση τριών νέων κορυφών που προέρχονται από τα αρωματικά πρωτόνια του DNBS.



**Εικόνα 2.1.18.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **7** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

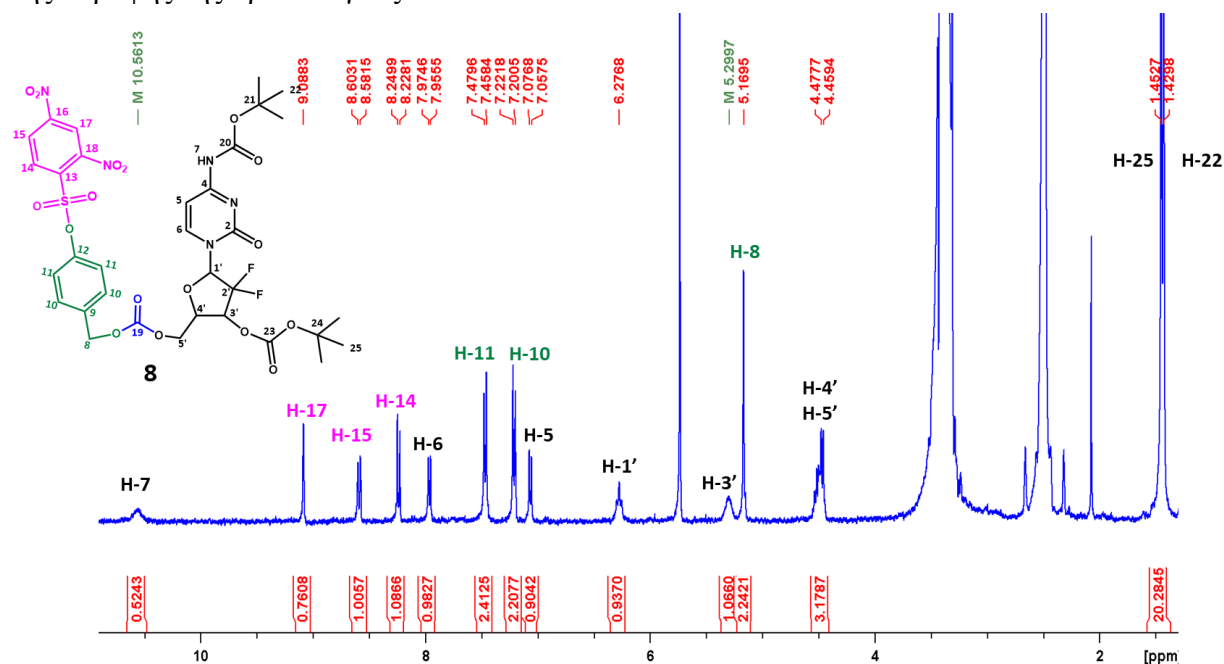
Το επόμενο βήμα περιλάμβανε τη συνένωση της ένωσης **7** με την Boc- προστατευμένη γεμισταβίνη (**Gem2**) μέσω ενός καρβοξυ εστερικού συνδέτη (ονομάζεται μη ανιχνεύσιμος

συνδέτης γιατί μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου οδηγεί σε απελευθέρωση CO<sub>2</sub>) μετά από δυο διαδοχικών αντιδράσεων άκυλο υποκατάστασης υπό βασικές συνθήκες σε ακετονιτρίλιο. Για την εισαγωγή του συνδέτη αυτού χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BNPC (δισ-4-νιτροφαινυλο καρβοξυ εστέρας), οπότε στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση της ένωσης **7** και ύστερα *in situ* προστέθηκε η **Gem2** για να ληφθεί η ένωση **8** όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1.15**.



**Σχήμα 2.1.15.** Μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **8** με χρήση του αντιδραστηρίου BNPC μέσω δυο άκυλο υποκαταστάσεων υπό βασικές συνθήκες.

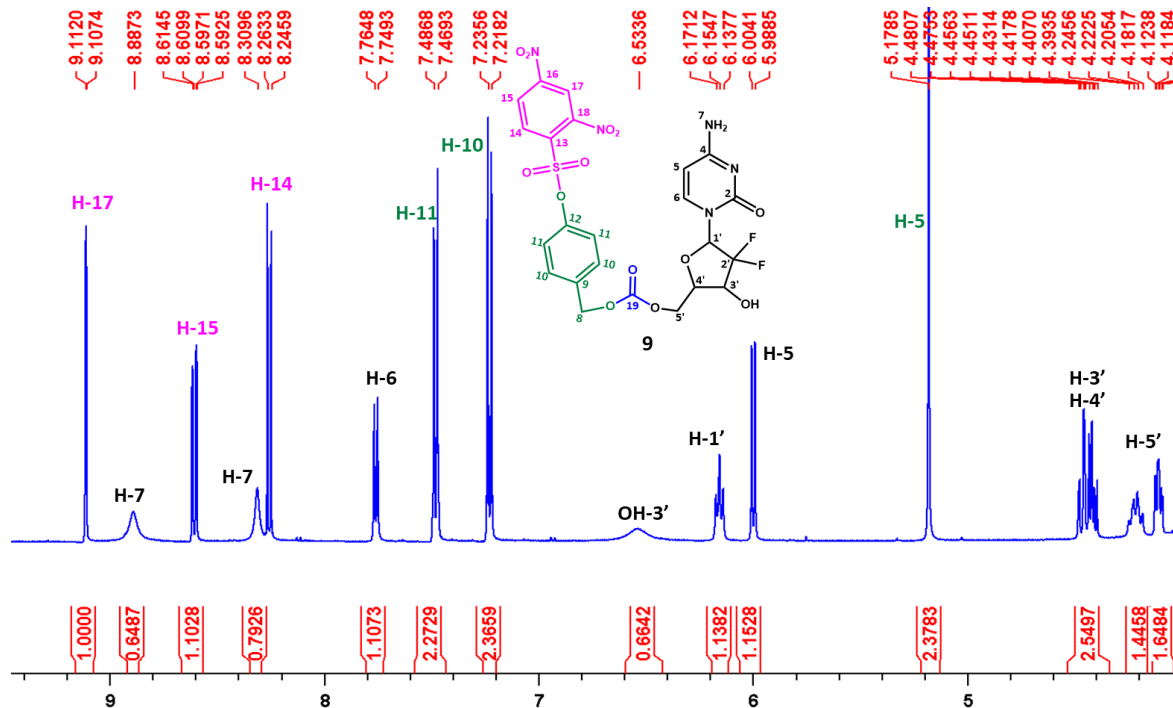
Η ένωση **8** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR (**Εικόνα 2.1.19**) που έδειξε την ύπαρξη των χαρακτηριστικών κορυφών της **Gem2** (όπως την κορυφή από την -NH ομάδα στα 10.58 ppm, τις 2 απλές κορυφές από τις Boc- ομάδες στα 1.46 ppm και 1.43 ppm), καθώς και τις κορυφές που προέρχονται από την ένωση **8** και υπήρχαν στο προηγούμενο <sup>1</sup>H NMR, με έλλειψη της κορυφής της πρωτοταγούς -OH.



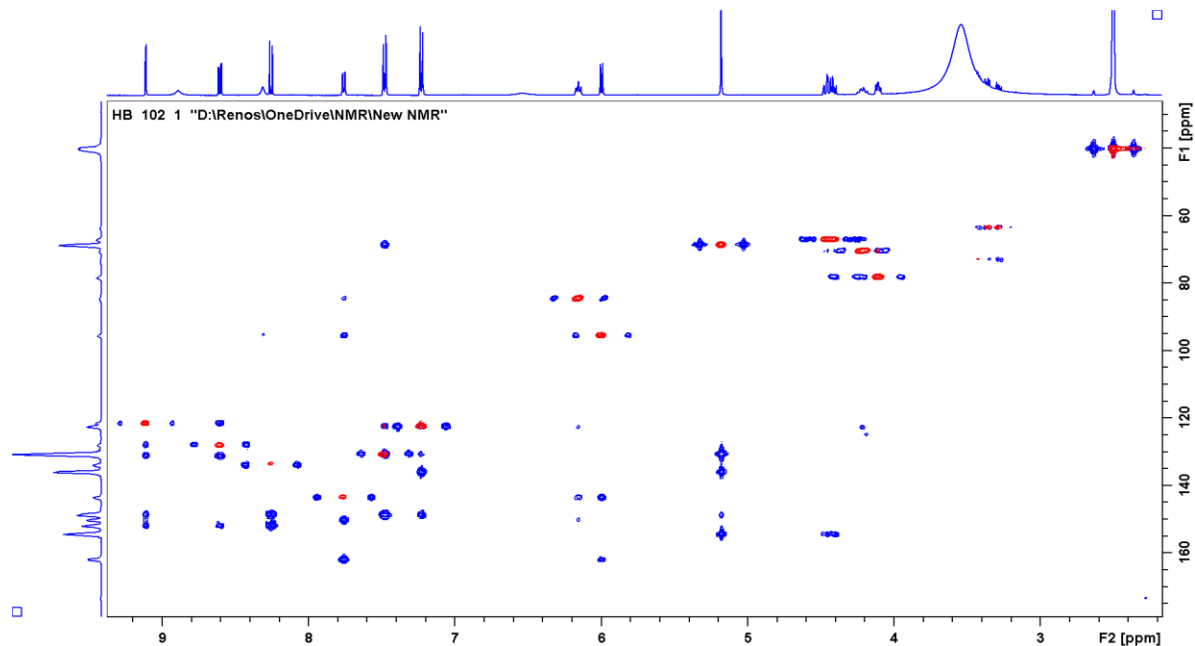
**Εικόνα 2.1.19.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης **8** σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).



Το τελικό στάδιο για την παραλαβή του τελικού προϊόντος **9** περιλάμβανε την αποπροστασία των Boc- ομάδων σε όξινες συνθήκες με χρήση τριφθοροξικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο. Το τελικό προϊόν **9** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία 1D/2D NMR ( $^1\text{H}$ NMR – **Εικόνα 2.1.20**, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC & HMBC – **Εικόνα 2.1.21**) και φασματομετρία μάζας (**Εικόνα 2.1.22**).

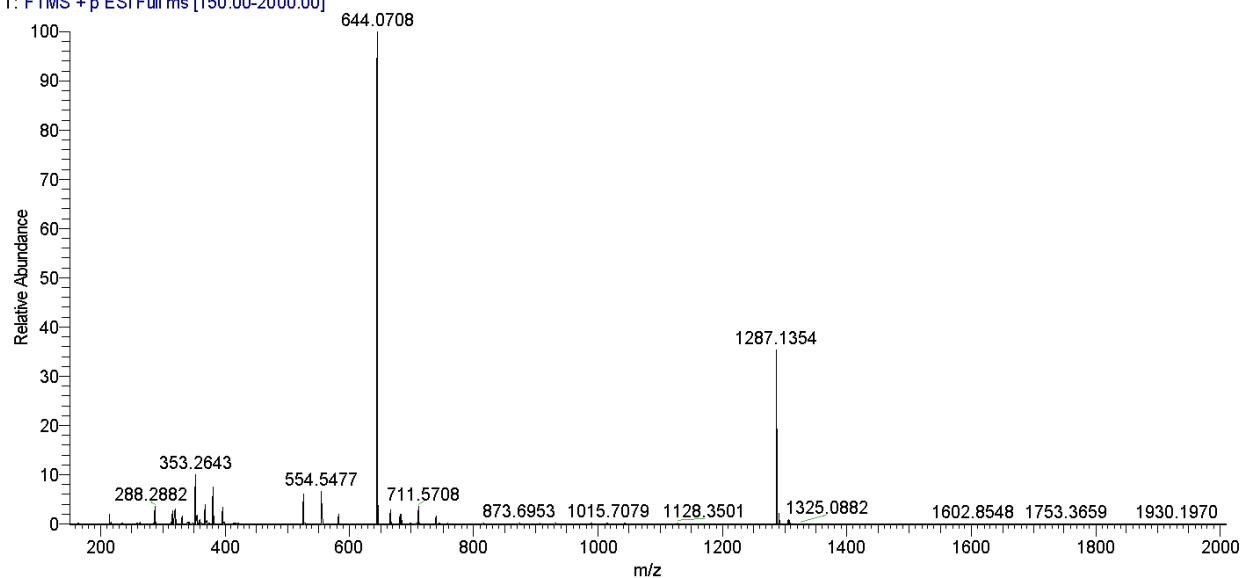


**Εικόνα 2.1.20.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **9** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).



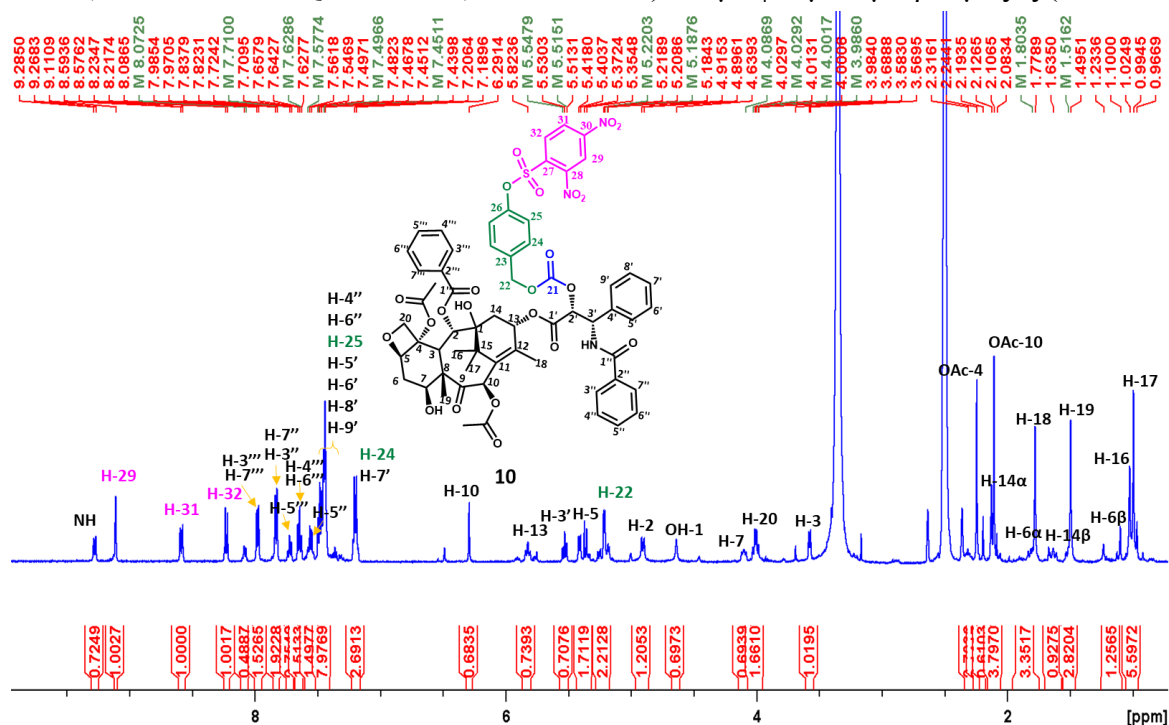
**Εικόνα 2.1.21.** Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **9** σε  $\text{DMSO}-d_6$ , (500 MHz, 25 °C).

HB118\_200711153021 #3-4 RT: 0.03-0.05 AV: 2 NL: 1.17E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

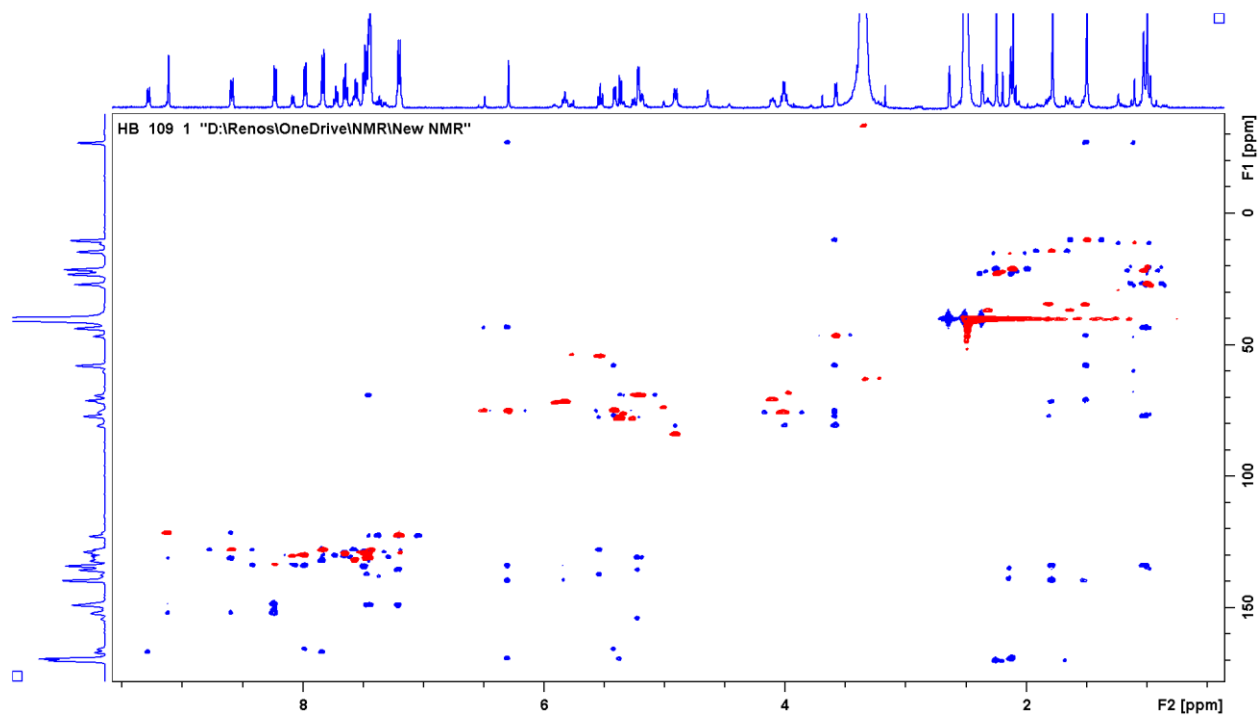


Εικόνα 2.1.22. Φάσμα μάζας της ένωσης 9.

Όσον αφορά τη σύνθεση της τελικής ένωσης **10**, χρησιμοποιήθηκε η ένωση **7** και η πακλιταξέλη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου BNPC σε βασικές συνθήκες σε ακετονιτρίλιο. Η ένωση **10** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.23),  $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC (Εικόνα 2.1.24) και με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.1.25).

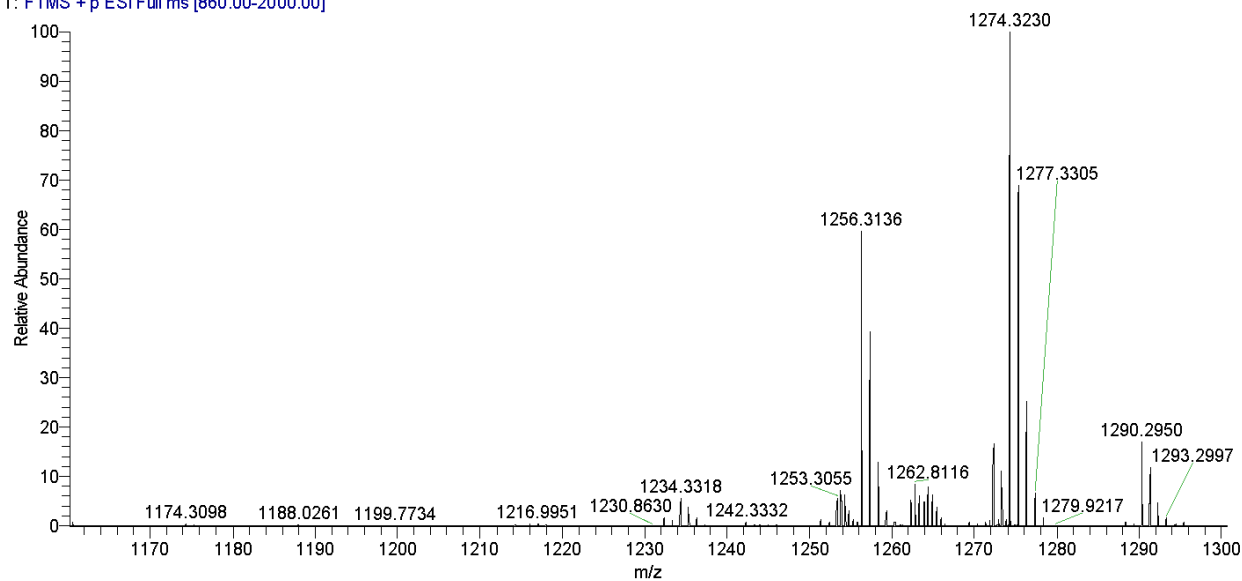


Εικόνα 2.1.23. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **10** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.1.24.** Υπέρθυση φασμάτων  $2D^1H-^{13}C$  NMR HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **10** σε  $DMSO-d_6$  (500 MHz, 25 °C).

HB119\_200612160720 #39-44 RT: 0.35-0.43 AV: 6 NL: 5.01E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [860.00-2000.00]



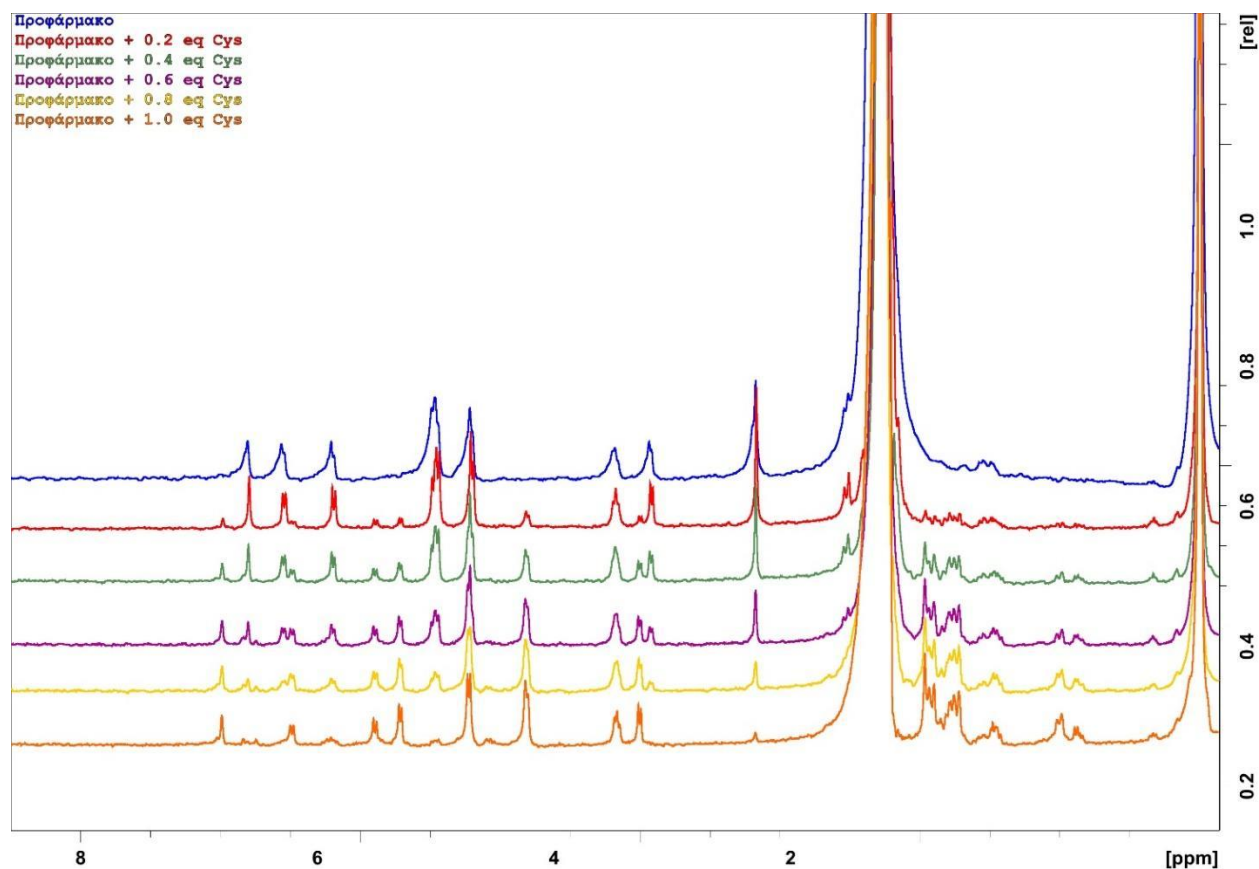
**Εικόνα 2.1.25.** Φάσμα μάζας της ένωσης **10**.

## 2.1.4 Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στη γλουταθειόνη (ενώσεις **9** και **10**)

Τα δύο θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**9**) και της πακλιταξέλης (**10**) μελετήθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε 1) η απόκριση τους ως προς την γλουταθειόνη με χρήση  $^1\text{H}$  NMR, 2) η κυτταροτοξικότητά τους σε καρκινικές σειρές HeLa και A549, 3) η σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH και 4) η σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.

### 2.1.4.1 Μελέτη της απόκρισης των προφαρμάκων στη γλουταθειόνη

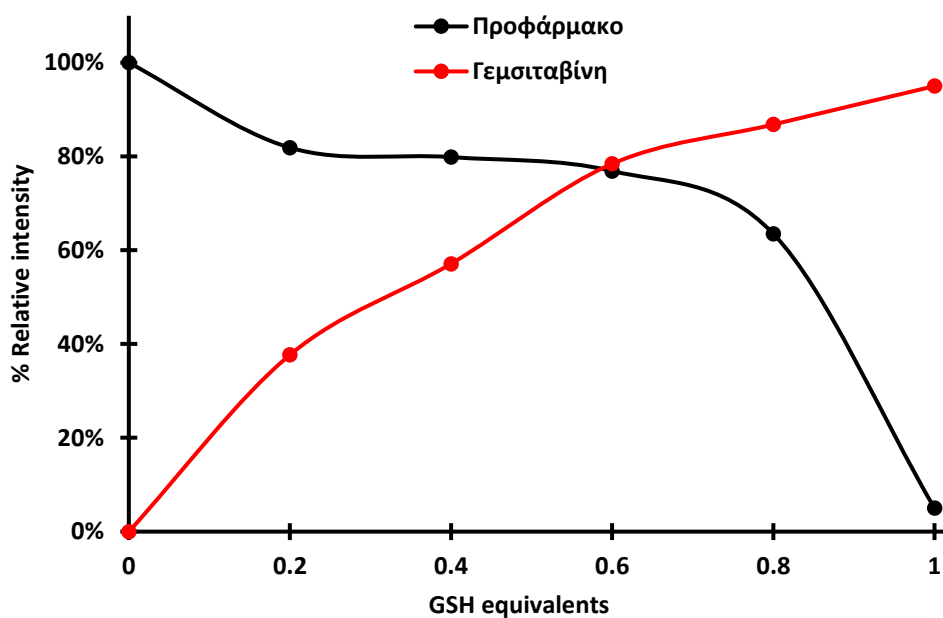
Η μελέτη της απόκρισης στη γλουταθειόνη έγινε με τιτλοδότηση και λήψη φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR. Ωστόσο, αντί για γλουταθειόνη χρησιμοποιήσαμε σε πρώτη φάση κυστεΐνη για να προσομοιάσουμε την αντίδραση. Σε 2 mM προφαρμάκου σε MeCN-d<sub>3</sub> - PBS pH 7.4 (1:1) πραγματοποιήθηκε σταδιακή προσθήκη 0,2 ισοδυνάμων γλουταθειόνης έως και 1 ισοδύναμο, και λήψη φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.1.26**.



**Εικόνα 2.1.26.** Υπέρθθεση φασμάτων  $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, 25 °C) της ένωσης **9** σε MeCN-d<sub>3</sub> - PBS pH 7.4 (1:1), μετά από σταδιακή προσθήκη 0,2 ισοδυνάμων κυστεΐνης. Με μπλε χρώμα φαίνεται μόνο του το προφάρμακο **9**, με κόκκινο χρώμα μετά τη συνολική προσθήκη 0,2 ισοδυνάμων κυστεΐνης, με πράσινο χρώμα μετά τη συνολική προσθήκη 0,4 ισοδυνάμων, με μωβ χρώμα μετά τη

συνολική προσθήκη 0,6 ισοδυνάμων, με κίτρινο χρώμα μετά τη συνολική προσθήκη 0,8 ισοδυνάμων και με πορτοκαλί χρώμα μετά τη συνολική προσθήκη 1 ισοδύναμου κυστεΐνης.

Η ολοκλήρωση μιας χαρακτηριστικής κορυφής του προφαρμάκου **9** που αντιστοιχεί σε ένα πρωτόνιο μετά από κάθε τιτλοδότηση οδήγησε στις καμπύλες διάσπασης του προφαρμάκου και σχηματισμού της γεμισταβίνης που φαίνονται στην **Εικόνα 2.1.27**. Η σταδιακή προσθήκη 0,2 ισοδυνάμων γλουταθειόνης οδηγεί στην αποικοδόμηση του προφαρμάκου **9**. Στο 1 ισοδύναμο, το προφάρμακο έχει αποικοδομηθεί σχεδόν πλήρως, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούμε τον σχηματισμό του φαρμάκου της γεμισταβίνης με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο της διάσπασης του προφαρμάκου.

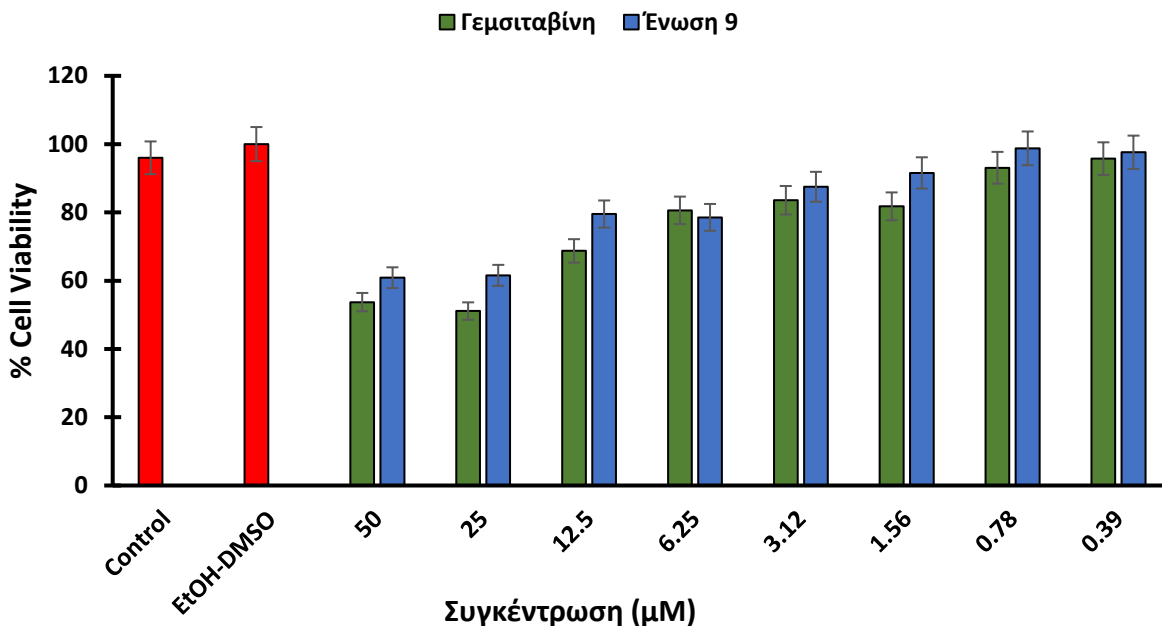


**Εικόνα 2.1.27.** Καμπύλη σταθερότητας του προφαρμάκου **9** και καμπύλη σχηματισμού της γεμισταβίνης βάσει ολοκλήρωσης των κορυφών των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR της **Εικόνας 2.1.26**.

#### 2.1.4.2 Μέτρηση της in vitro κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων γεμισταβίνη και πακλιταξέλη, και των προφαρμάκων **9** και **10** σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και A549

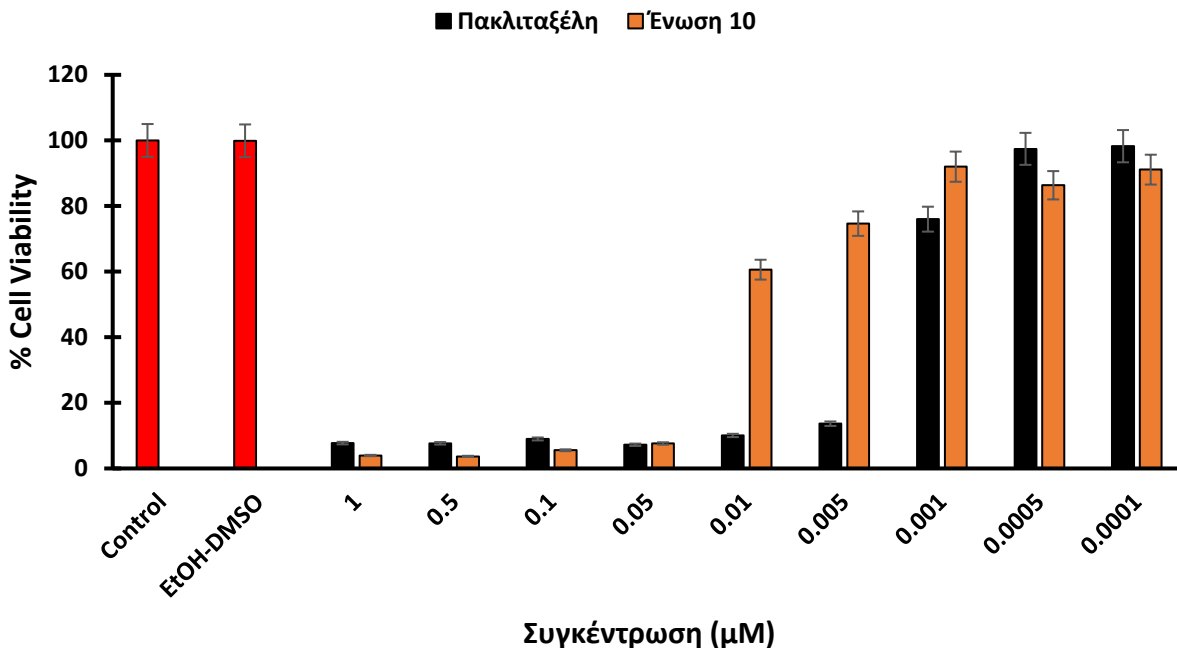
Για τη μέτρηση της βιοσιμότητας των κυττάρων HeLa παρουσία της γεμισταβίνης και του προφαρμάκου **9**, χρησιμοποιήθηκε η γενική μέθοδος που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 και 50  $\mu\text{M}$ . Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο σε διάφορες συγκεντρώσεις

συνοψίζονται στα παρακάτω ραβδογράμματα. Στην **Εικόνα 2.1.28** φαίνονται τα αποτελέσματα της γεμισιταβίνης και του προφαρμάκου **9** κατά της καρκινικής σειράς HeLa:

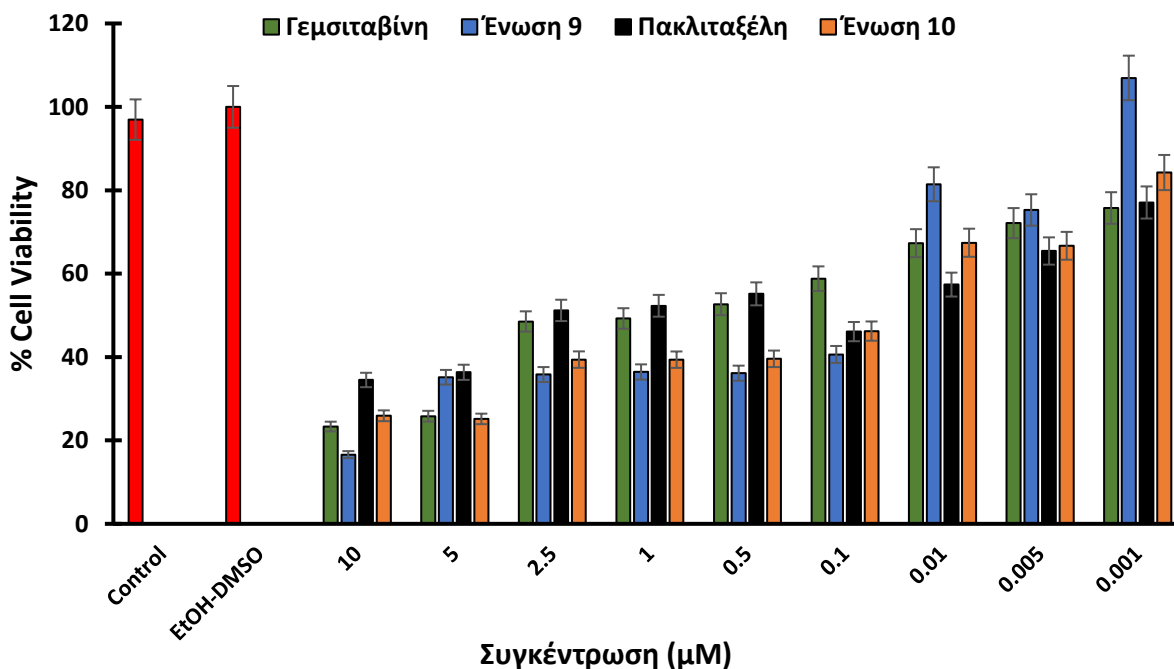


**Εικόνα 2.1.28.** Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας του αναλόγου **9** (μπλε χρώμα) και της γεμισιταβίνης (πράσινο χρώμα) κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa.

Ομοίως, για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων HeLa παρουσία της πακλιταξέλης και του προφαρμάκου **10**, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος. Ωστόσο, οι μετρούμενες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις: 0.0001, 0.0005, 0.001, 0,005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 και 1 μM. Για τη καρκινική κυτταρική σειρά A549 μετρήθηκαν τα δυο μητρικά φάρμακα (γεμισιταβίνη και πακλιταξέλη) και τα δυο προφάρμακά τους (ενώσεις **9** και **10**) σε συγκεντρώσεις 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 μM. Στην **Εικόνα 2.1.29** φαίνονται τα αποτελέσματα της πακλιταξέλης και του προφαρμάκου **10** έναντι της καρκινικής σειράς HeLa και στην **Εικόνα 2.1.30** φαίνονται τα αποτελέσματα των δυο μητρικών φαρμάκων και των δυο προφαρμάκων έναντι της καρκινικής σειράς A549.



*Εικόνα 2.1.29. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας του αναλόγου 10 (πορτοκαλί χρώμα) και πακλιταξέλης (μαύρο χρώμα) κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa.*



*Εικόνα 2.1.30. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων 9 (μπλε χρώμα) και 10 (πορτοκαλί χρώμα) της γεμισαβίνης (πράσινο χρώμα) και της πακλιταξέλης (μαύρο χρώμα) κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549.*

Οι τιμές  $IC_{50}$  που υπολογίστηκαν φαίνονται στον κάτωθι πίνακα (**Πίνακας 2.2**). Στην καρκινική κυτταρική σειρά HeLa η γεμισιταβίνη και το προφάρμακο **9** δεν είχαν ισχυρή δράση με αποτέλεσμα να μην μπορέσουμε να υπολογίσουμε την τιμή  $IC_{50}$ , ενώ στη σειρά A549 έδειξαν σχεδόν ίδια δράση. Ομοίως, η πακλιταξέλη και το προφάρμακο **10** στη κυτταρική σειρά A549 έδειξαν ίδια δράση ενώ στην HeLa η πακλιταξέλη είχε ελαφρώς καλύτερη δράση. Οι παρόμοιες τιμές φαρμάκου-προφαρμάκου πιθανώς οφείλονται στη χαμηλή ενζυμική σταθερότητα των συγκεκριμένων προφαρμάκων.

**Πίνακας 2.2.** Τιμές  $IC_{50}$  των φαρμάκων γεμισιταβίνη και πακλιταξέλη, καθώς και των προφαρμάκων **9** και **10** κατά των καρκινικών σειρών HeLa και A549.

<b>Ένωση</b>	<b><math>IC_{50}</math> (nM)</b>	<b>StDev (nM)</b>	<b>Κυτταρική σειρά</b>
Πακλιταξέλη	2.26	±0.1	HeLa
Ένωση <b>10</b>	12.05	±1.5	HeLa
Πακλιταξέλη	12.95	±4.1	A549
Ένωση <b>10</b>	19.4	±2.7	A549
Γεμισιταβίνη	59.5	±10	A549
Ένωση <b>9</b>	67.4	±9.1	A549

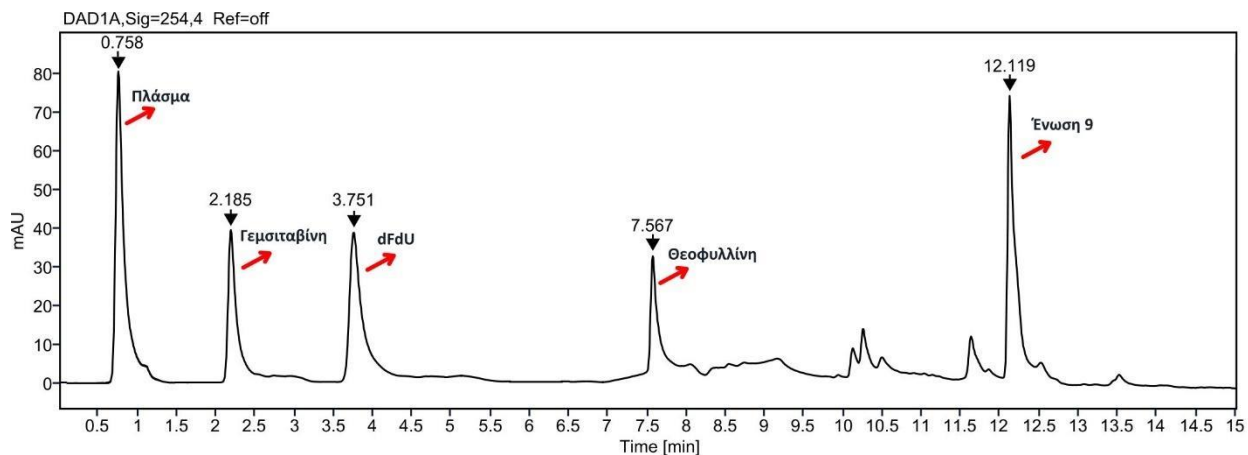
#### 2.1.4.3 Μελέτη της *in vitro* σταθερότητας των προφαρμάκων **9** και **10** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των δυο προφαρμάκων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού των φαρμάκων, των προφαρμάκων, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος.

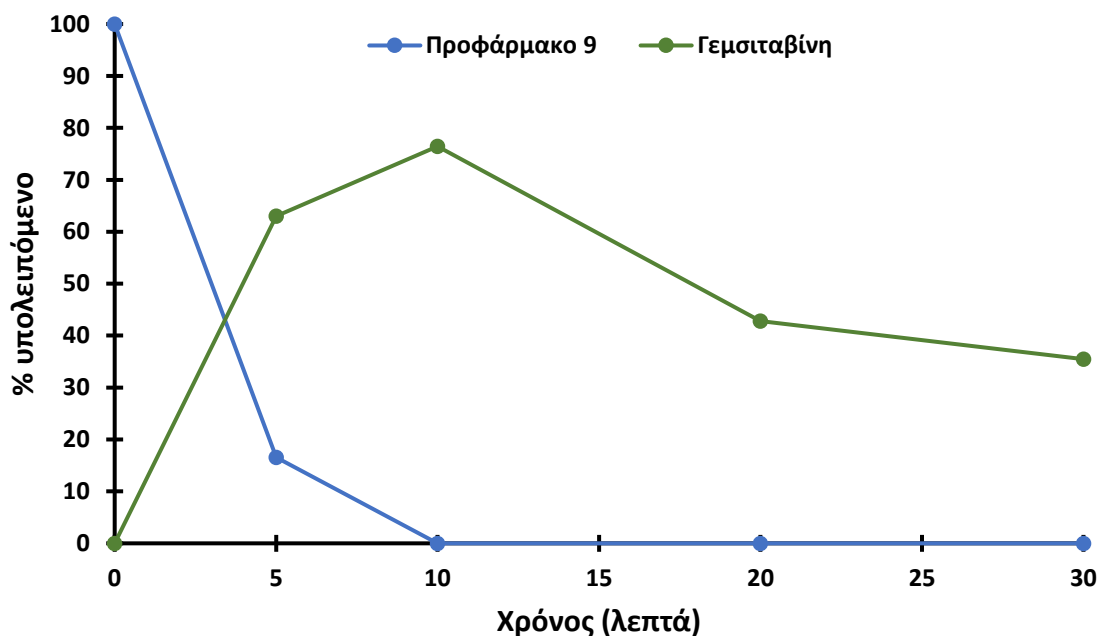
Όσον αφορά το προφάρμακο **9** της γεμισιταβίνης, το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυναδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 5 λεπτά, έπειτα βαθμιδωτό έως 10/90 για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 254 nm. Το πρότυπο χρωματογράφημα φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.1.31**.





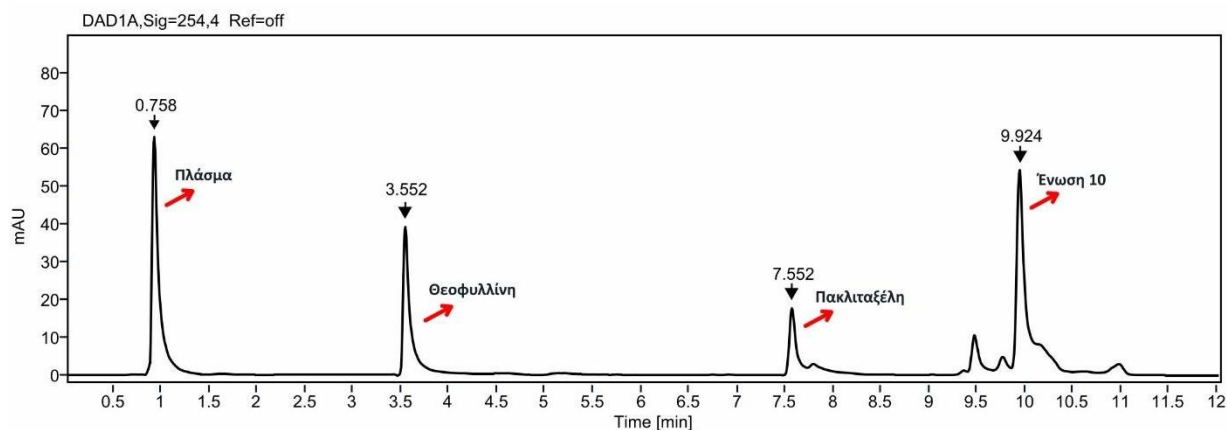
**Εικόνα 2.1.31.** Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **9** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία γεμισταβίνης, dFdU και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας του θεραπευτικού προφαρμάκου **9** (Εικόνα 2.1.32) όπου παρατηρούμε πως διαθέτει χαμηλή σταθερότητα με χρόνο ημιζωής  $t_{1/2} = \sim 4$  λεπτά, ενώ έχει αποσυναρμολογηθεί πλήρως σε 10 λεπτά. Παρόλο που η σταθερότητά του σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος είναι ελάχιστη, τα επίπεδα της γεμισταβίνης που παράγονται από το προφάρμακο είναι σημαντικά υψηλά. Αξίζει να σημειωθεί, πως δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του ανεπιθύμητου μεταβολίτη dFdU.



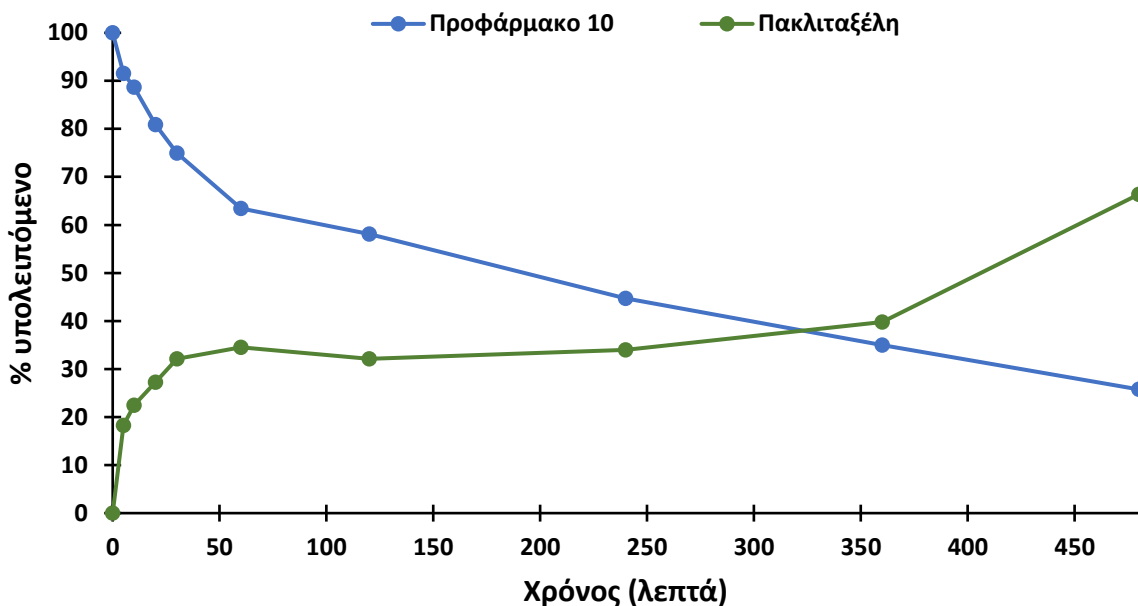
**Εικόνα 2.1.32.** Καμπύλη σταθερότητας του προφαρμάκου **9** (μπλε χρώμα) και καμπύλης σχηματισμού της γεμισταβίνης (πράσινο χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Όσον αφορά το προφάρμακο **10** της πακλιταξέλης, το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 2 λεπτά και έπειτα σύστημα σταδιακής αύξησης από 70/30 έως 10/90 για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 254 nm. Το πρότυπο χρωματογράφημα φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.1.33**.



**Εικόνα 2.1.33.** Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **10** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία πακλιταξέλης και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας του θεραπευτικού προφαρμάκου **10** (**Εικόνα 2.1.34**) όπου παρατηρούμε πως διαθέτει αρκετά υψηλότερη σταθερότητα σε σχέση με το αντίστοιχο προφάρμακο της γεμισιταβίνης (**9**) με χρόνο ημιζωής  $t_{1/2} = \sim 200$  λεπτά. Τα επίπεδα της πακλιταξέλης που παράγονται από το προφάρμακο είναι σημαντικά υψηλά.

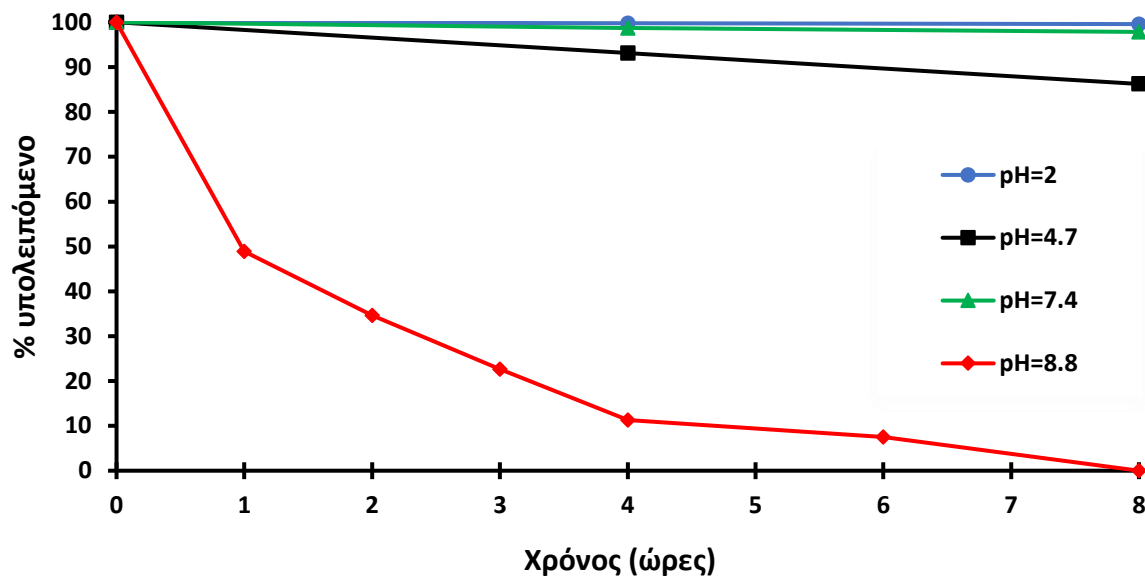


**Εικόνα 2.1.34.** Καμπύλη σταθερότητας του προφαρμάκου **10** (μπλε χρώμα) και καμπύλης σχηματισμού της πακλιταξέλης (πράσινο χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

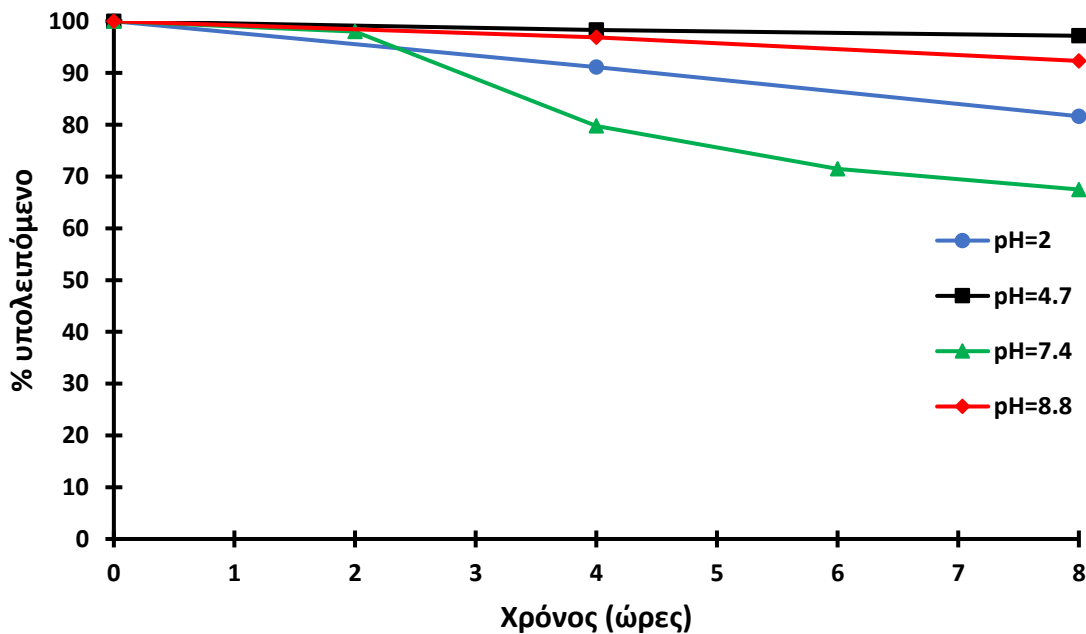
Γενικά αναμέναμε ο ρυθμός διάσπασης των δυο προφαρμάκων για την γλουταθειόνη να είναι υψηλός λόγω της ύπαρξης σημαντικής συγκέντρωσης γλουταθειόνης στο ανθρώπινο αίμα. Η μεγάλη διαφορά στη σταθερότητα μεταξύ των προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης μπορεί να οφείλεται είτε σε στερική παρεμπόδιση λόγω του μεγάλου μεγέθους της πακλιταξέλης και των ομάδων που την αποτελούν είτε σε αλληλεπιδράσεις της πακλιταξέλης με ένζυμα ή πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη) που την προστατεύουν <sup>142</sup>.

#### 2.1.4.4 Μελέτη της *in vitro* σταθερότητας των προφαρμάκων **9** και **10** σε εύρος τιμών pH

Η σταθερότητα των 2 προφαρμάκων μελετήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5, και ακετονιτρίλιο, και η εκάστοτε μέθοδος είναι αντίστοιχη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη του κάθε προφαρμάκου σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος:



Εικόνα 2.1.35. Καμπύλη σταθερότητας του προφαρμάκου 9 της γεμισιταβίνης συναρτήσει χρόνου σε διάφορες τιμές pH.



Εικόνα 2.1.36. Καμπύλη σταθερότητας του προφαρμάκου 10 της πακλιταξέλης συναρτήσει χρόνου σε διάφορες τιμές pH.

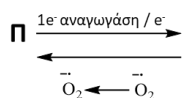
Παρατηρούμε πως και τα δυο προφάρμακα είναι αρκετά σταθερά. Το προφάρμακο **9** είναι ασταθές μόνο στο βασικό pH 8.8 πιθανότατα λόγω του καρβοξυεστερικού δεσμού που περιλαμβάνει και υφίσταται βασική υδρόλυση. Το προφάρμακο **10** είναι αρκετά σταθερό σε όλες τις τιμές pH (παρατηρείται μία μείωση περίπου 30 % σε pH = 7.4, ενώ στις υπόλοιπες τιμές pH παραμένει σχετικά σταθερό). Πιθανότατα παραμένει σταθερό στο pH 8.8 παρόλο που περιλαμβάνει και αυτό καρβοξυεστερικό δεσμό λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε δύο θεραπευτικά προφάρμακα που ανταποκρίνονται στα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης με βάση τη γεμισιταβίνη (**9**) και τη πακλιταξέλη (**10**) τα οποία ανταποκρίνονται πλήρως στο εν λόγω ερέθισμα. Τα δυο προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους κατά δυο καρκινικών σειρών, εμφανίζοντας ελαφρώς ασθενέστερη δράση σε σύγκριση με το μητρικό φάρμακο, το οποίο ήταν πλήρως αναμενόμενο λόγω της στρατηγικής του προφαρμάκου που εφαρμόσαμε. Τα προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς την σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος με τη πάροδο του χρόνου, όπου εμφανίστηκαν σχετικά ασταθή. Όσον αφορά τη μελέτη σταθερότητά τους σε pH, το προφάρμακο **9** εμφανίστηκαν ασταθές σε βασικό pH, ενώ το προφάρμακο **10** εμφανίστηκε πιο σταθερό συγκριτικά.

#### 2.1.5 Σχεδιασμός και σύνθεση θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποξία

Ένας σημαντικός στόχος που εκμεταλλεύονται οι επιστήμονες είναι τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία) στους στερεούς όγκους. Για τον σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί προφάρμακα που ενεργοποιούνται από την υποξία (Hypoxia Activated Prodrugs - HAPs)<sup>143</sup>, τα οποία είναι ανενεργά σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου αλλά σε κατάσταση υποξίας υφίστανται αναγωγή ελευθερώνοντας το μητρικό δραστικό φάρμακο (**Σχήμα 2.1.16**). Η μείωση του οξυγόνου στους όγκους οδηγεί στην αύξηση του αναγωγικού στρες, και επομένως στην υπερέκφραση διαφόρων αναγωγικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των νιτροαναγωγασών (NTRs) όπως της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P450. Για τον λόγο αυτό τα προφάρμακα αυτά ονομάζονται και βιο-αναγωγή (bio-reductive) προφάρμακα. Τα προφάρμακα που ενεργοποιούνται σε υποξικό περιβάλλον συνήθως αποτελούνται από 3 στοιχεία: Μια «σκανδάλη» που ανάγεται στην υποξία, ένα φάρμακο και έναν συνδέτη.

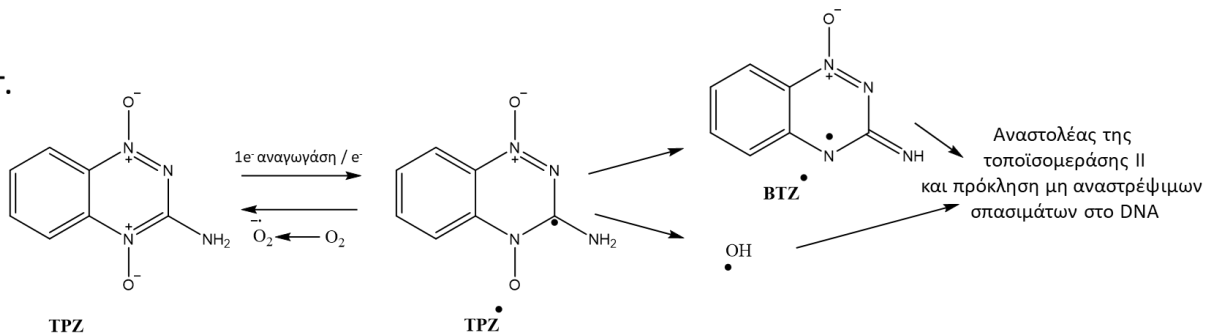
**A. Φυσιολογικά κύτταρα**



**B. Υποξικά κύτταρα**

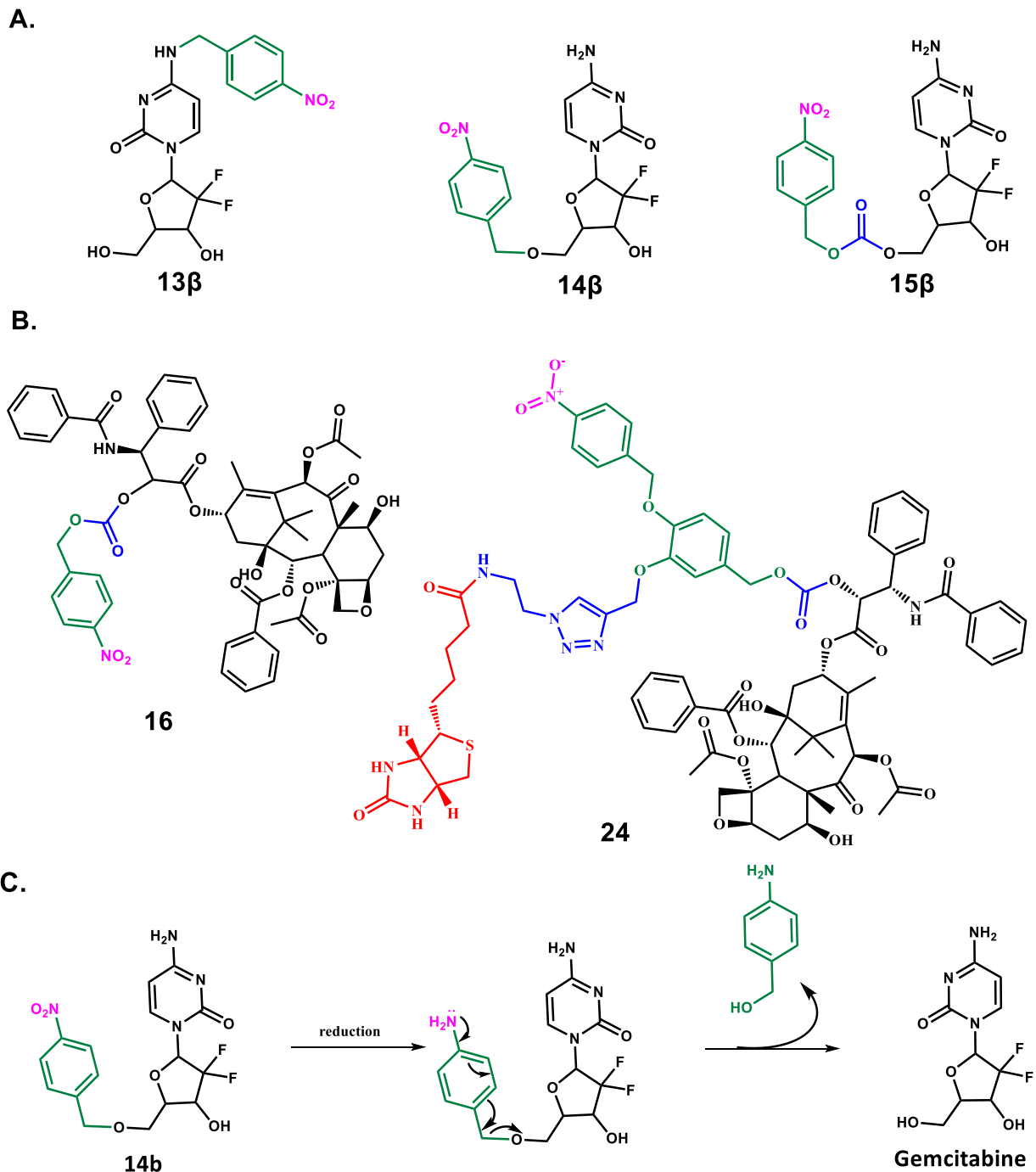


**Γ.**



**Σχήμα 2.1.16.** Μετατροπή του προφαρμάκου (Π) προς το φάρμακο (Φ). **A.** Στα φυσιολογικά κύτταρα η διαδικασία είναι αναστρέψιμη καθώς μπορεί να επιστρέψει στο αρχικό προφάρμακο παρουσία οξυγόνου. **B.** Η διαδικασία στο υποξικό περιβάλλον είναι μη αναστρέψιμη απελευθερώνοντας το τοξικό φάρμακο. **Γ.** Παράδειγμα ενός προφαρμάκου (Τιραπαζαμίνη – TPZ) που έχει βρεθεί σε κλινικές μελέτες και ενεργοποιείται εκλεκτικά σε υποξικό περιβάλλον. <sup>22</sup>

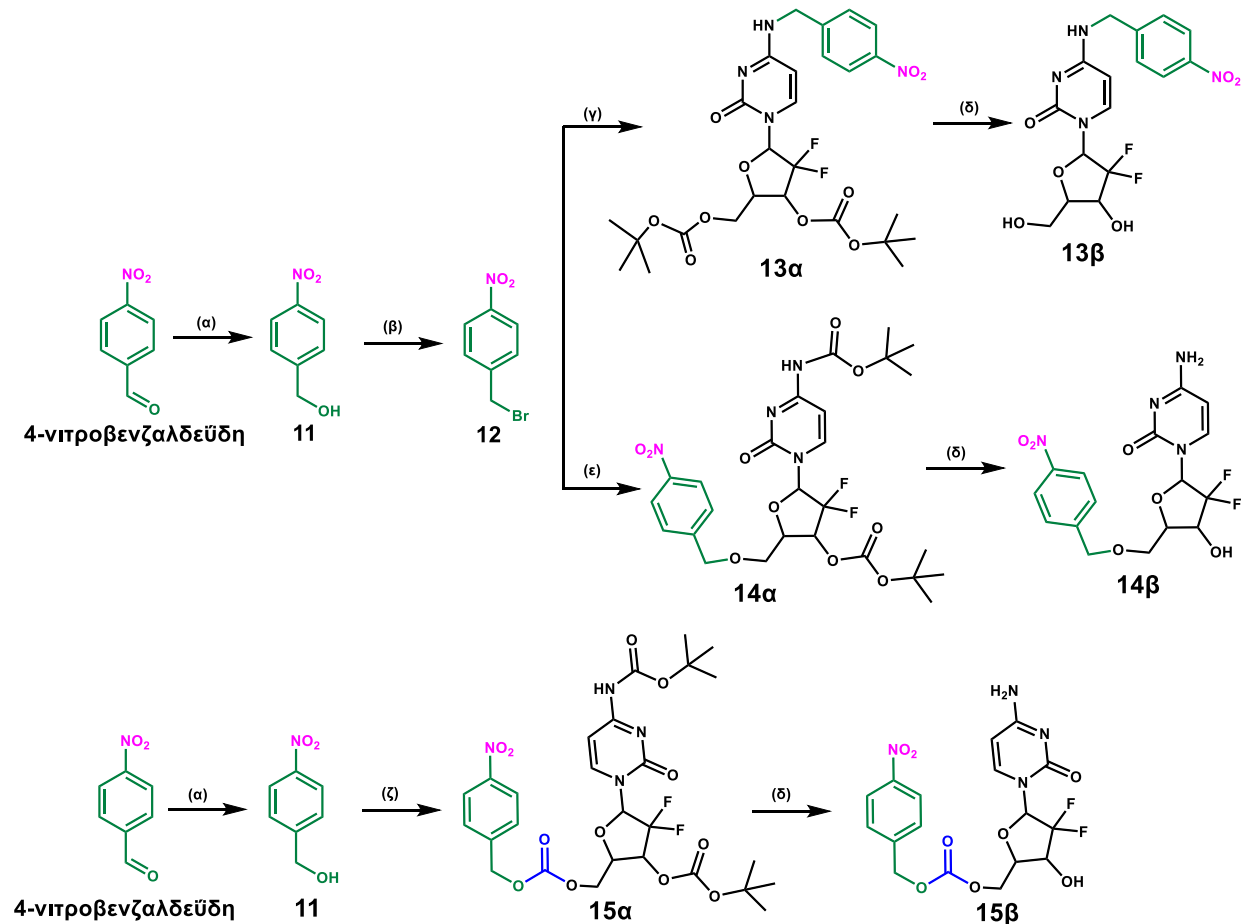
Βασισμένοι στα προαναφερθέντα στοιχεία, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε 3 θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης και 2 της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποξία απελευθερώνοντας τα μητρικά τοξικά φάρμακα. Για τον σχηματισμό των προφαρμάκων αυτών χρησιμοποιήθηκε ένας αυτο-διασπώμενος σύνδεσμος (παρα-υδροξυβενζυλική αλκοόλη) που περιέχει μια νιτρο ομάδα, η οποία μετά από αναγωγή σε υποξικό περιβάλλον πυροδοτεί την απελευθέρωση του φαρμάκου. Το ένα προφάρμακο της πακλιταξέλης εμπεριέχει και τη D-βιοτίνη που προσφέρει εκλεκτική στόχευση των καρκινικών κυττάρων. Οι δομές των συγκεκριμένων 5 προφαρμάκων φαίνονται στο **Σχήμα 2.1.17A** για τα προφάρμακα της γεμισιταβίνης και στο **Σχήμα 2.1.17B** για τα προφάρμακα της πακλιταξέλης, ενώ ο μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου ύστερα από αλληλεπίδραση με νιτροαναγωγή παρουσιάζεται ενδεικτικά για ένα από τα προφάρμακα στο **Σχήμα 2.1.17Γ**.



**Σχήμα 2.1.17.** (A) Δομές των 3 προφαρμάκων της γεμισταβίνης και (B) δομές των 2 προφαρμάκων της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποζία (γεμισταβίνη/πακλιταξέλη = μαύρο, αυτο-διασπώμενος συνδέτης = πράσινο, Νιτρο ομάδα («σκανδάλη») = μωβ, συνδέτης = μπλε, μόριο στόχευσης = κόκκινο), (Γ) Μηχανισμός απελευθέρωσης του μητρικού φαρμάκου γεμισταβίνη με ταυτόχρονη απελευθέρωση του αυτό-διασπώμενου συνδέτη από το προφάρμακο **14β**.

Η μετατροπή είναι μία διαδικασία 2 σταδίων, όπου αρχικά η νιτρο ομάδα του προφαρμάκου ανάγεται προς και στη συνέχεια μέσω μιας ταχείας αυθόρμητης 1,6-απόσπασης απελευθερώνεται το αντικαρκινικό φάρμακο. Δεδομένης της υποξίας στο καρκινικό περιβάλλον συγκριτικά με τα επίπεδα οξυγόνου στα υγιή κύτταρα, η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται εκλεκτικά στους όγκους.

Τα θεραπευτικά προφάρμακα **13β**, **14β** και **15β** της γεμισιταβίνης παρασκευάστηκαν σε 6 και 5 συνολικά βήματα, αντίστοιχα, με χρήση συγκλίνουσας πορείας (Σχήμα 2.1.18).

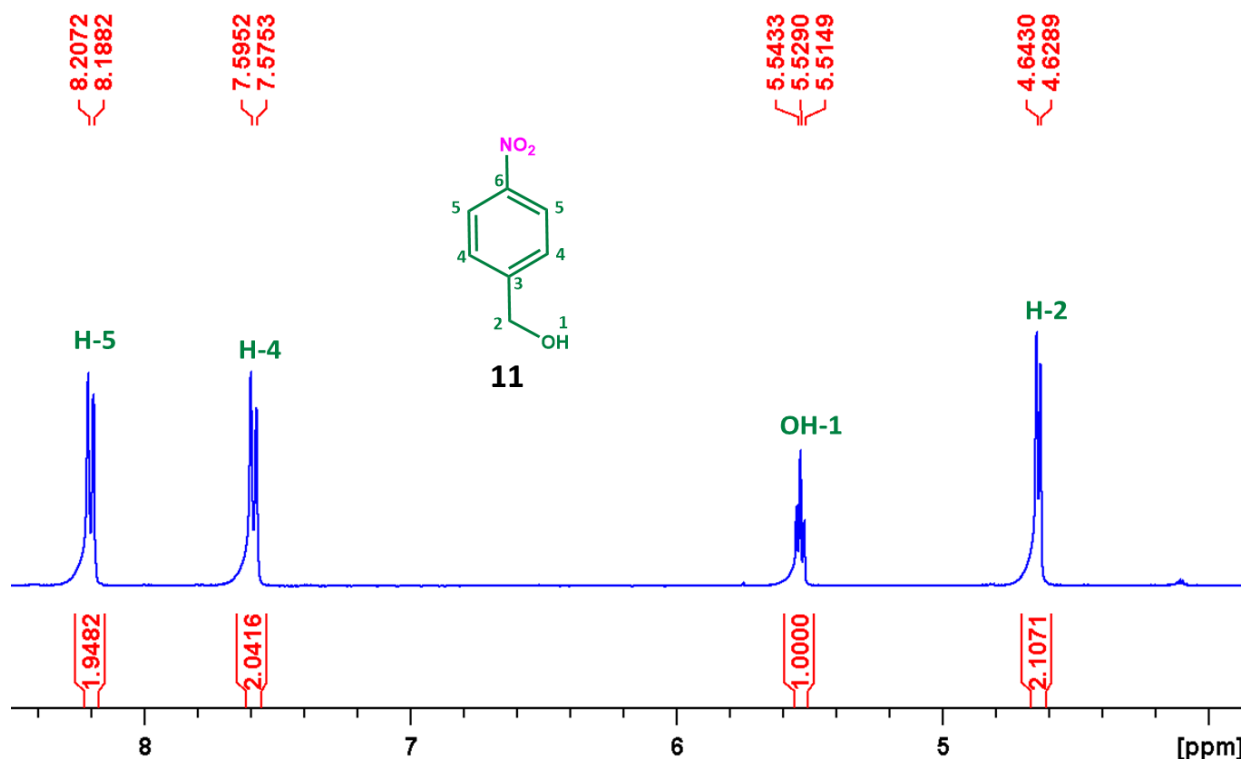


**Σχήμα 2.1.18.** Σχηματική απεικόνιση των συνθετικών πορειών για την παρασκευή των προφαρμάκων **13β**, **14β** και **15β**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α)  $\text{NaBH}_4$ , απόλυτη  $\text{EtOH}$ ,  $rt$ , 2 ώρες, (β)  $\text{PBr}_3$ , άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 4 h, (γ) *Gem1*,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , άνυδρο  $\text{MeCN}$ ,  $rt$ , 12 ώρες, (δ)  $\text{TFA}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 1 ώρα; (ε) *Gem2*,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , άνυδρο  $\text{MeCN}$ ,  $rt$ , 12 ώρες, (ζ) (i) *BNPC*, *DMAP*, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 12 ώρες, (ii) *Gem2*, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 12 ώρες.

Αρχικά, έπρεπε να πραγματοποιηθεί εκλεκτική προστασία της γεμισιταβίνης με *Boc*-ομάδες για να λάβουμε τα **Gem1** και **Gem2** όπως είδαμε και προηγουμένως.



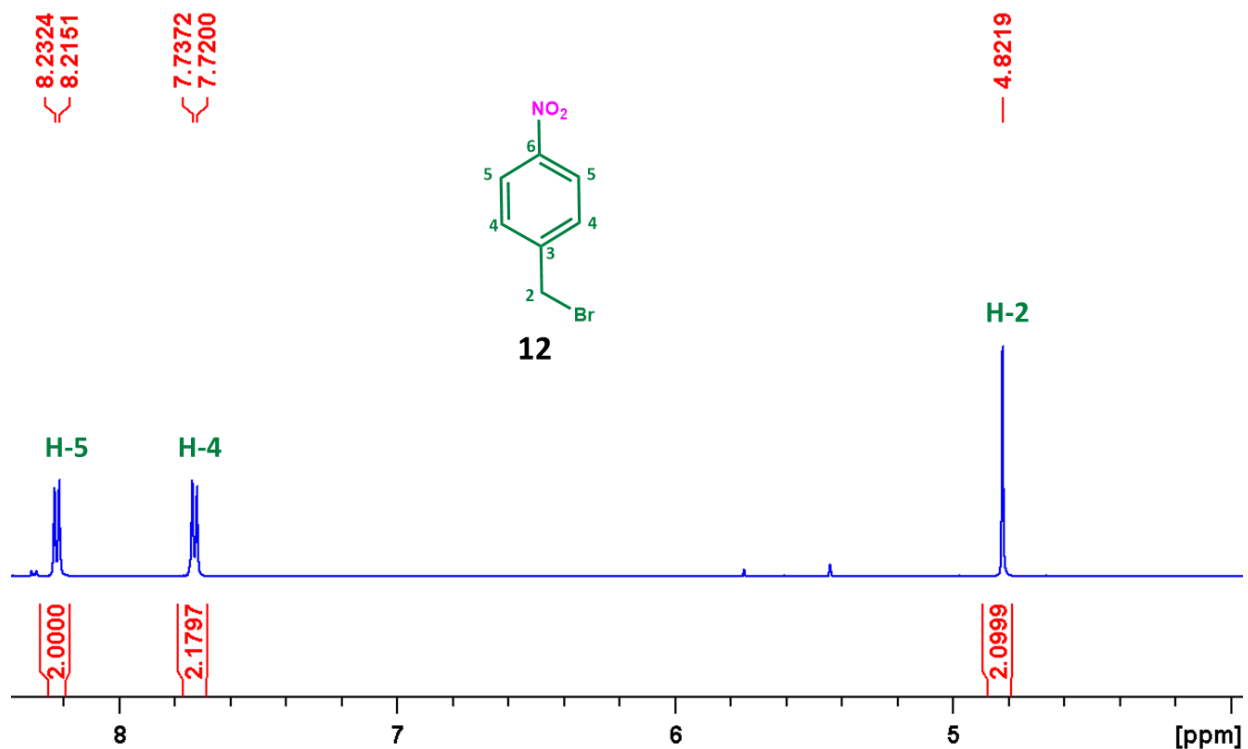
Όσον αφορά τη σύνθεση του τμήματος του αυτο-διασπώμενου συνδέτη και της «σκανδάλης» για όλα τα προφάρμακα, αρχικά η 4-νιτροβενζαλδεΰδη ανάχθηκε προς την αντίστοιχη βενζυλική αλκοόλη **11** με χρήση  $\text{NaBH}_4$  σε αιθανόλη με μηχανισμό με αυτόν που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Η λήψη φάσματος  $^1\text{H NMR}$  έδειξε την ύπαρξη δυο διπλών κορυφών με ολοκλήρωση 2 στη περιοχή των αρωματικών πρωτονίων προερχόμενες από τον βενζολικό δακτύλιο, μιας τριπλής κορυφής στα 5.52 ppm προερχόμενη από την  $-\text{OH}$  (τριπλή λόγω των δυο γειτονικών υδρογόνων της μεθυλενομάδας) και μιας διπλής κορυφής στα 4.63 ppm με ολοκλήρωση 2 προερχόμενη από την μεθυλενομάδα (διπλή λόγω της  $-\text{OH}$  σε γειτονική θέση) (Εικόνα 2.1.37). Επίσης, δεν υφίσταται κορυφή που να αντιστοιχεί στην αλδεΰδη.



Εικόνα 2.1.37. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης **11** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Η ένωση **11** μετατράπηκε ποσοτικά στο αντίστοιχο αλκυλαλογονίδιο **12** χρησιμοποιώντας τριβρωμιούχο φωσφόρο μέσω μιας αντίδρασης δυο διαδοχικών βημάτων που περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή της πρωτοταγούς  $-\text{OH}$  στον φωσφόρο του  $\text{PBr}_3$  και έπειτα τον σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης (ο μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν που παρουσιάστηκε για τη σύνθεση της ένωσης **3**). Η λήψη φάσματος  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης **12** έδειξε την ύπαρξη δυο διπλών κορυφών με ολοκλήρωση 2 στη περιοχή των αρωματικών πρωτονίων προερχόμενες από τον βενζολικό δακτύλιο, την εξαφάνιση της τριπλής κορυφής στα 5.52 ppm που προερχόταν από την  $-\text{OH}$  και μιας απλής κορυφής στα 4.82 ppm με

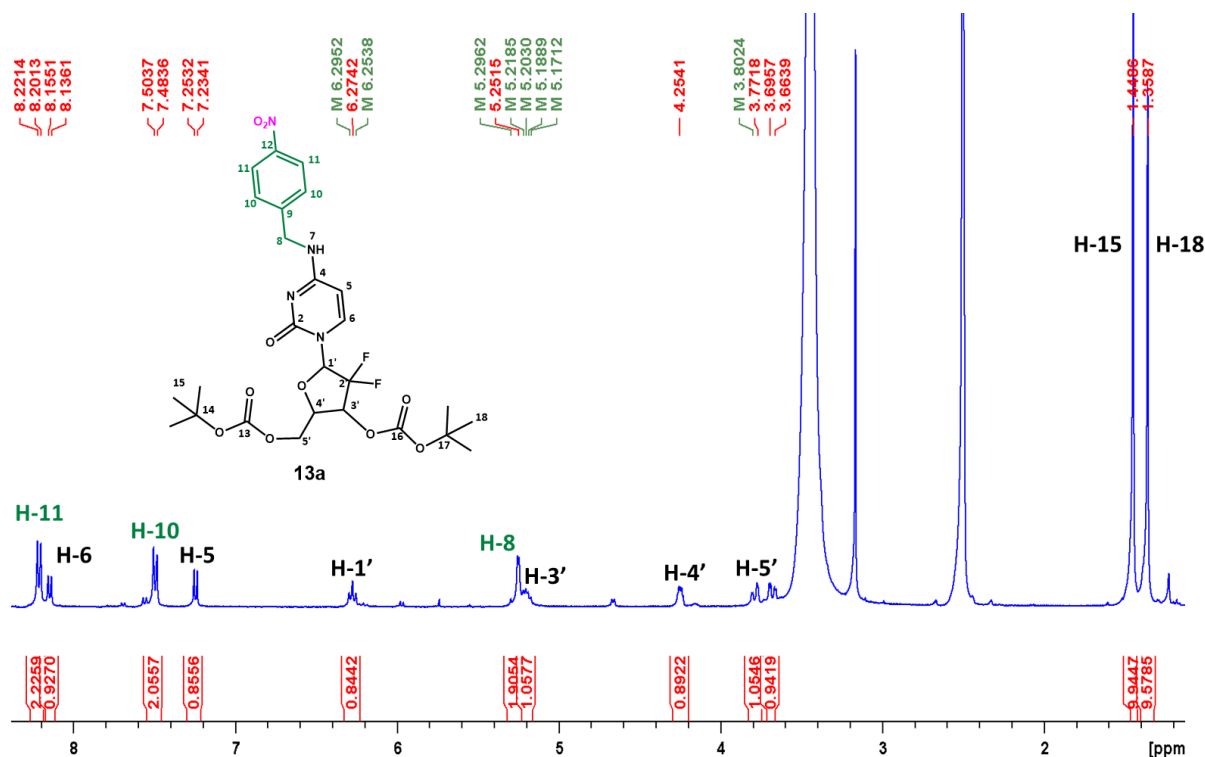
ολοκλήρωση 2 προερχόμενη από την μεθυλενομάδα (στην ένωση **11** ήταν διπλή ενώ στην ένωση **12** απλή λόγω μη ύπαρξης γειτονικού πρωτονίου) (Εικόνα 2.1.38).



Εικόνα 2.1.38. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **12** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

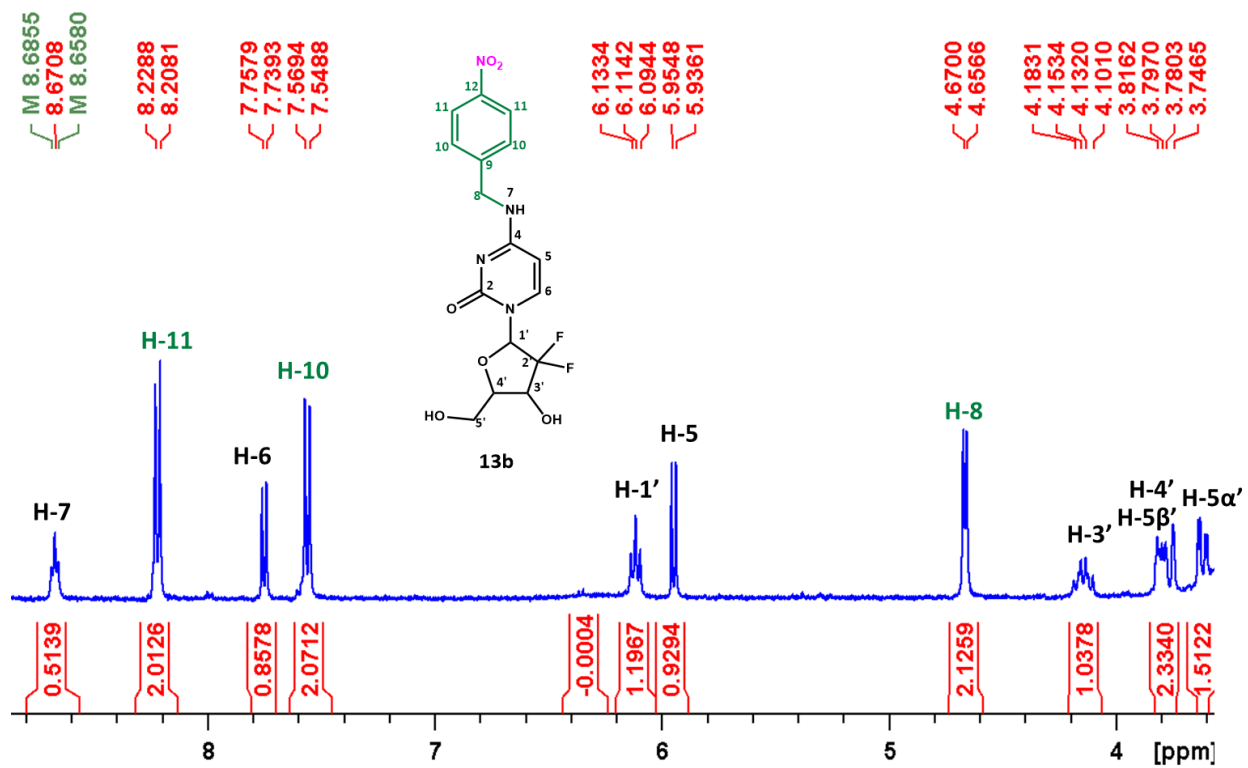
Η ένωση **12** στη συνέχεια αντέδρασε με την **Gem1** σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσία ανθρακικού καλίου ως βάση για να προκύψει η ένωση **13a**, μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης (πιθανώς  $\text{S}_{\text{N}}2$  όπως για την ένωση **4a**).

Η ένωση **13a** ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}$  NMR όπου έδειξε την ύπαρξη όλων των κορυφών της ένωσης **12** και της **Gem1** με την ταυτόχρονη έλλειψη της  $-\text{NH}_2$  ομάδας της **Gem1** (Εικόνα 2.1.39).

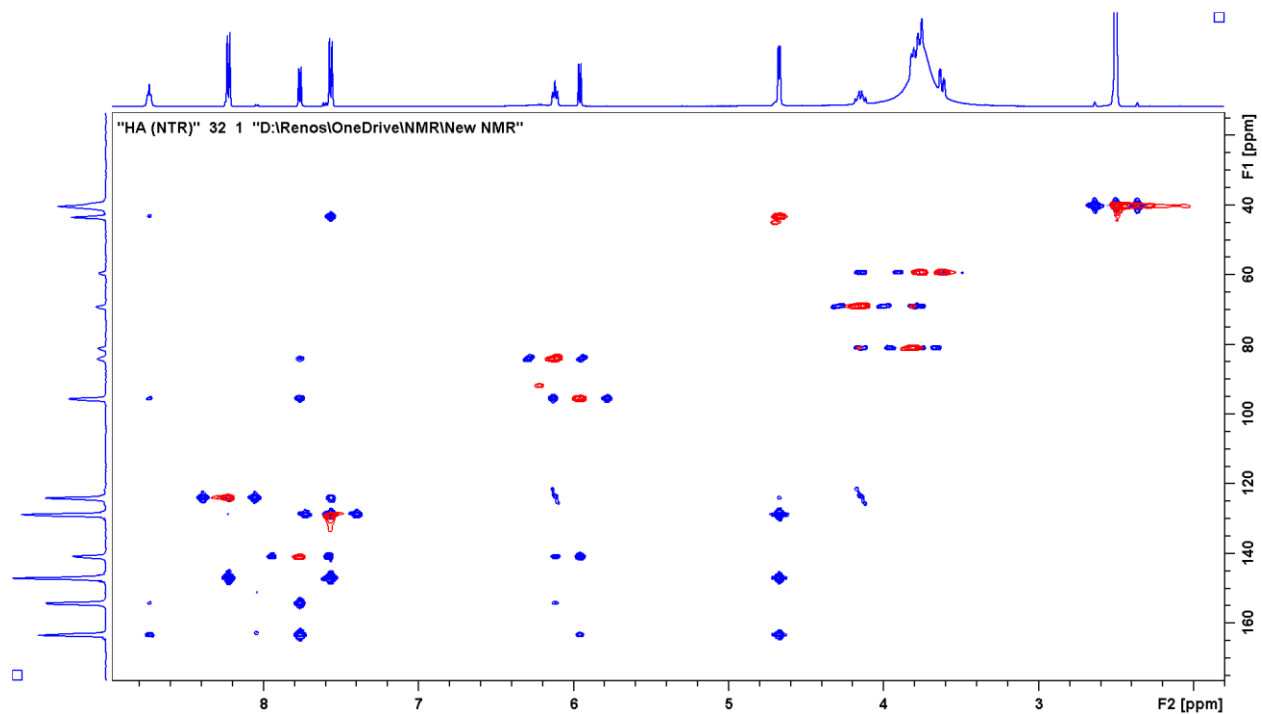


Εικόνα 2.1.39. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **13a** σε  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz, 25 °C).

Η ένωση **13a** κατεργάστηκε με τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο για την αποπροστασία των *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδων για να ληφθεί η τελική ένωση **13β**. Η τελική ένωση **13β** ταυτοποιήθηκε με χρήση  $^1\text{H}$  NMR το οποίο έδειξε την έλλειψη των κορυφών που προεχόντουσαν από τις *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδες (Εικόνα 2.1.40), με φασματοσκοπία 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC που βοήθησε στον ολικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 2.1.41) και με φασματομετρία μάζας όπου έδειξε τα ιόντα 399.1098  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 437.0654  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 797.2137  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 835.1689  $[2\text{M}+\text{K}]^+$ . (Εικόνα 2.1.42).

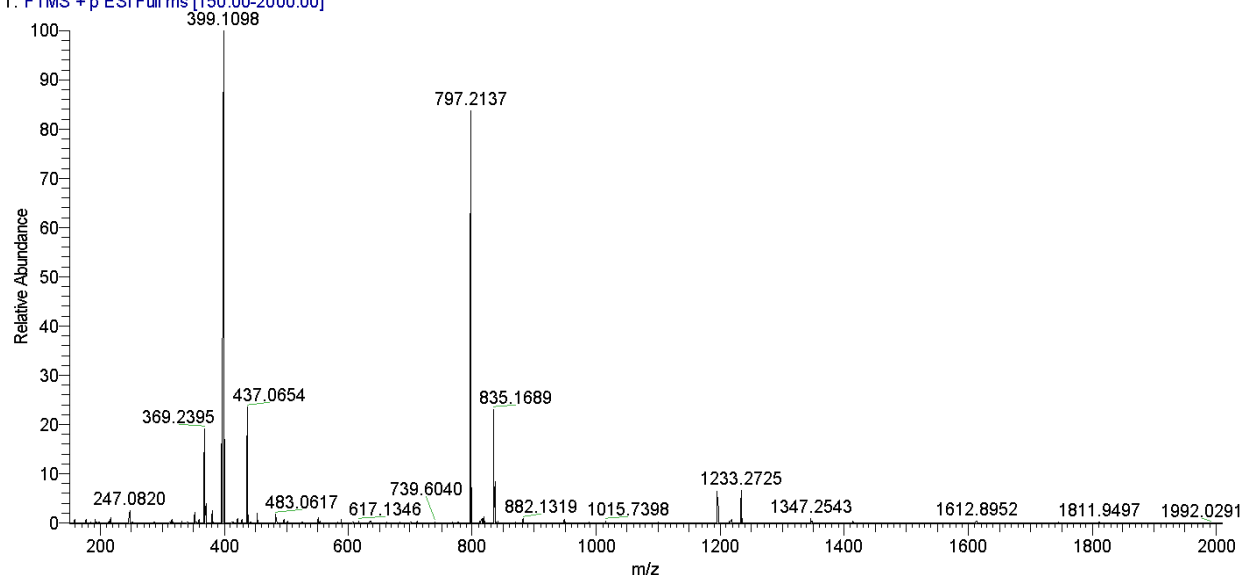


Εικόνα 2.1.40. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **13β** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).



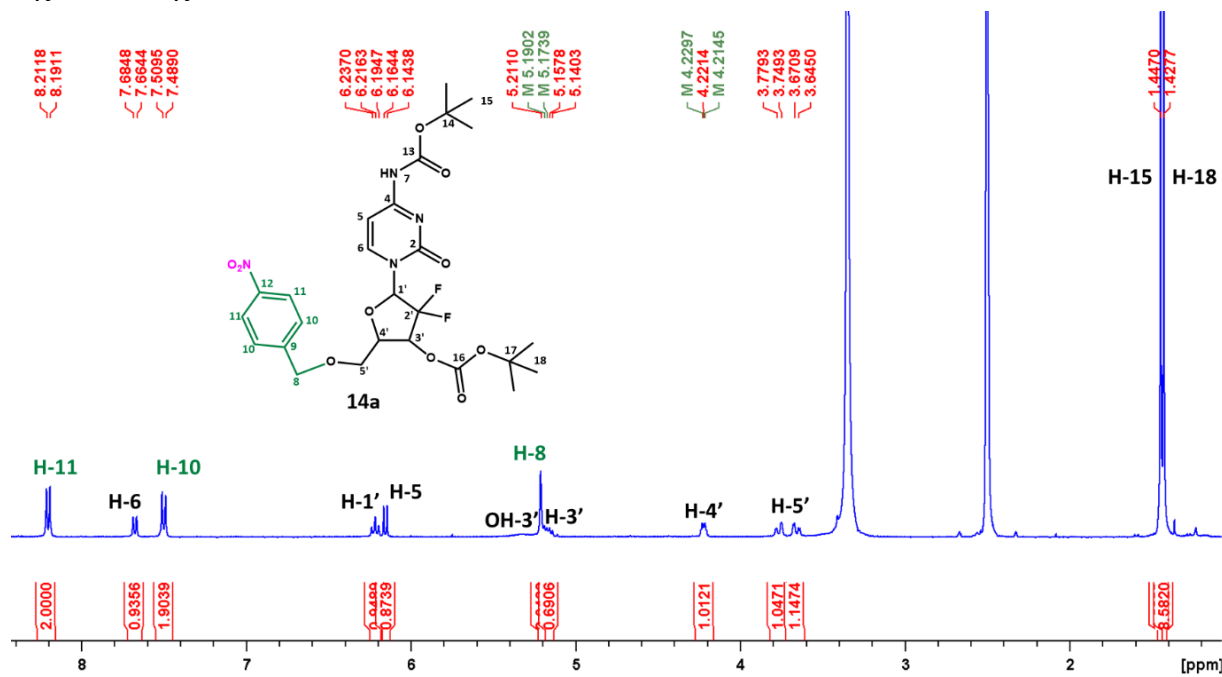
Εικόνα 2.1.41. Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **13β** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).

HA131\_170507032303 #3-4 RT: 0.03-0.05 AV: 2 NL: 8.59E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



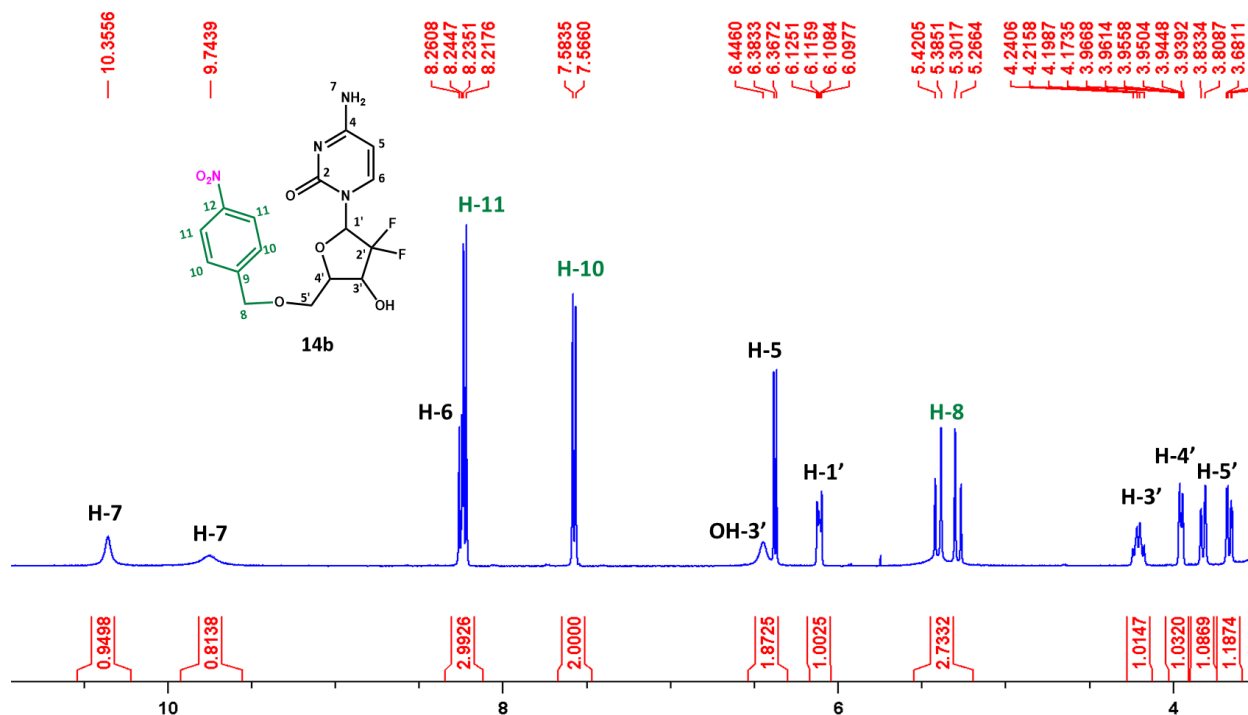
**Εικόνα 2.1.42.** Φάσμα μάζας της ένωσης **13β**.

Ομοίως για την ένωση **14a**, η ένωση **12** αντέδρασε με την **Gem2** σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσία ανθρακικού καλίου ως βάση για να προκύψει η ένωση **14a**, μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης όπως και για την ένωση **13a**, η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά με  $^1\text{H}$ NMR όπου έδειξε την ύπαρξη όλων των κορυφών της ένωσης **12** και της **Gem2** με την ταυτόχρονη έλλειψη της 5'-OH της **Gem2** (Εικόνα 2.1.43).

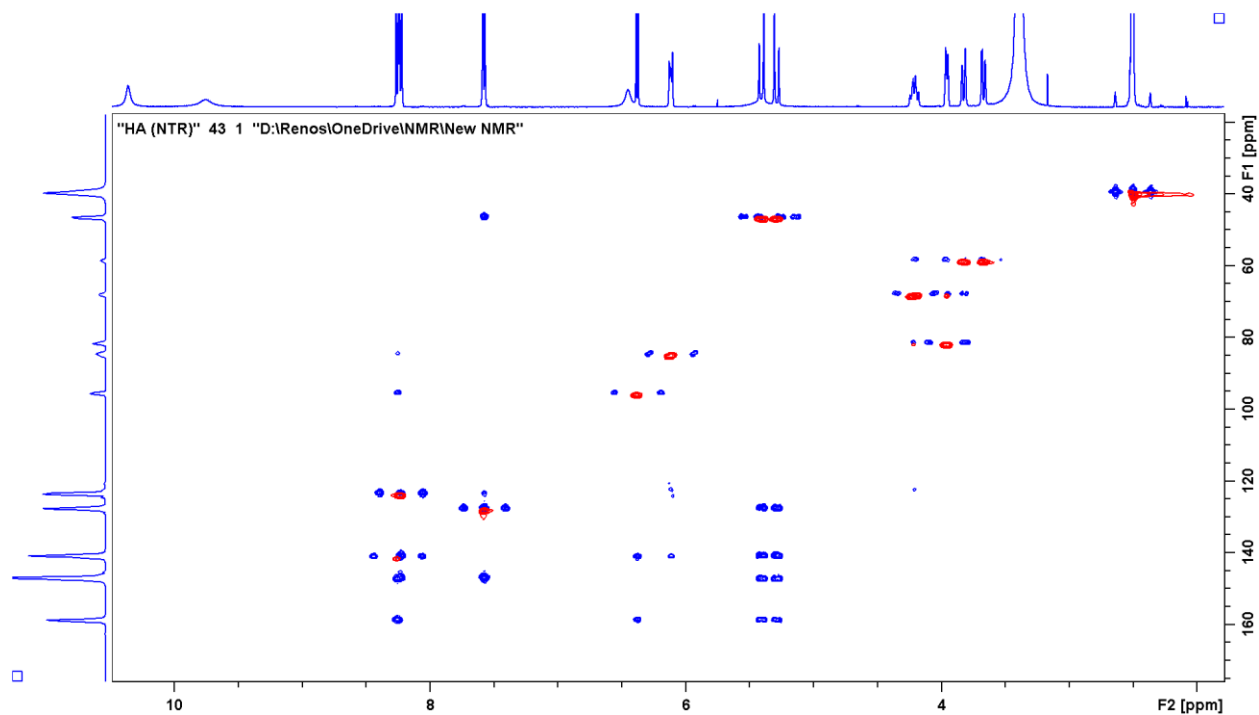


**Εικόνα 2.1.43.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **14a** σε  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz, 25 °C).

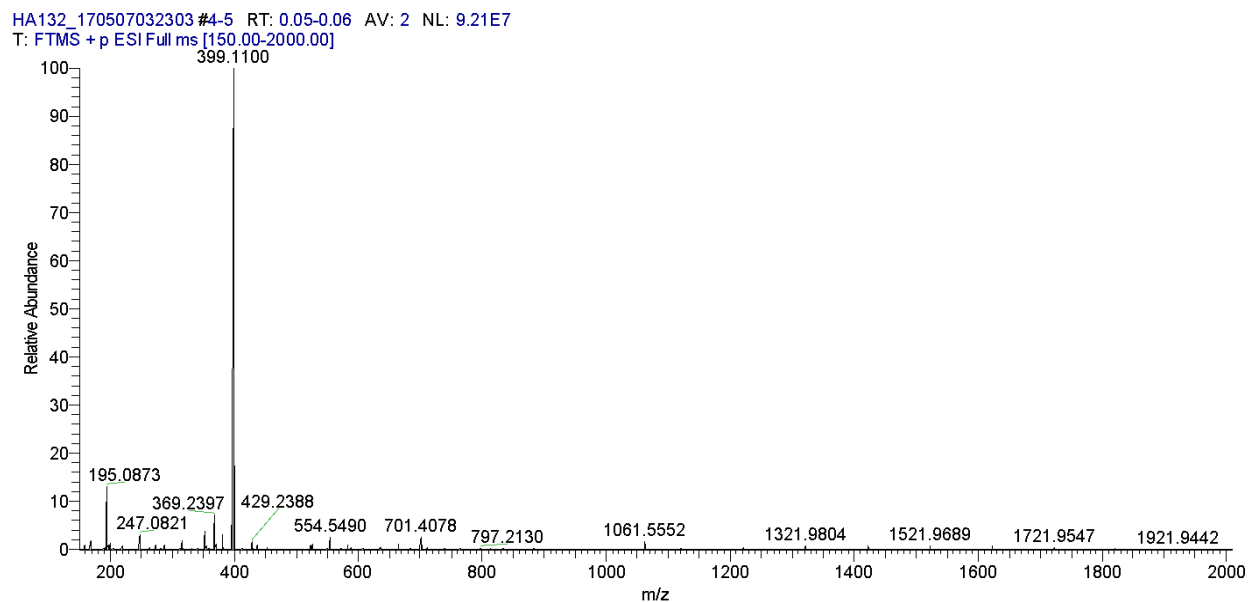
Ομοίως με την ένωση **13β**, η ένωση **14β** προέκυψε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες αλλά από την ένωση **14α** (κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ) και ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}$  NMR το οποίο έδειξε την έλλειψη των κορυφών που προεχόντουσαν από τις *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδες (Εικόνα 2.1.44), με φασματοσκοπία 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC που βοήθησε στον ολικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 2.1.45), και με φασματομετρία μάζας όπου έδειξε τη κορυφή 399.1100  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Εικόνα 2.1.46).



Εικόνα 2.1.44. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **14β** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.1.45.** Υπέρθυση φασμάτων  $2D^1H-^{13}C$  NMR HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης **14β** σε  $DMSO-d_6$  (500 MHz, 25 °C).

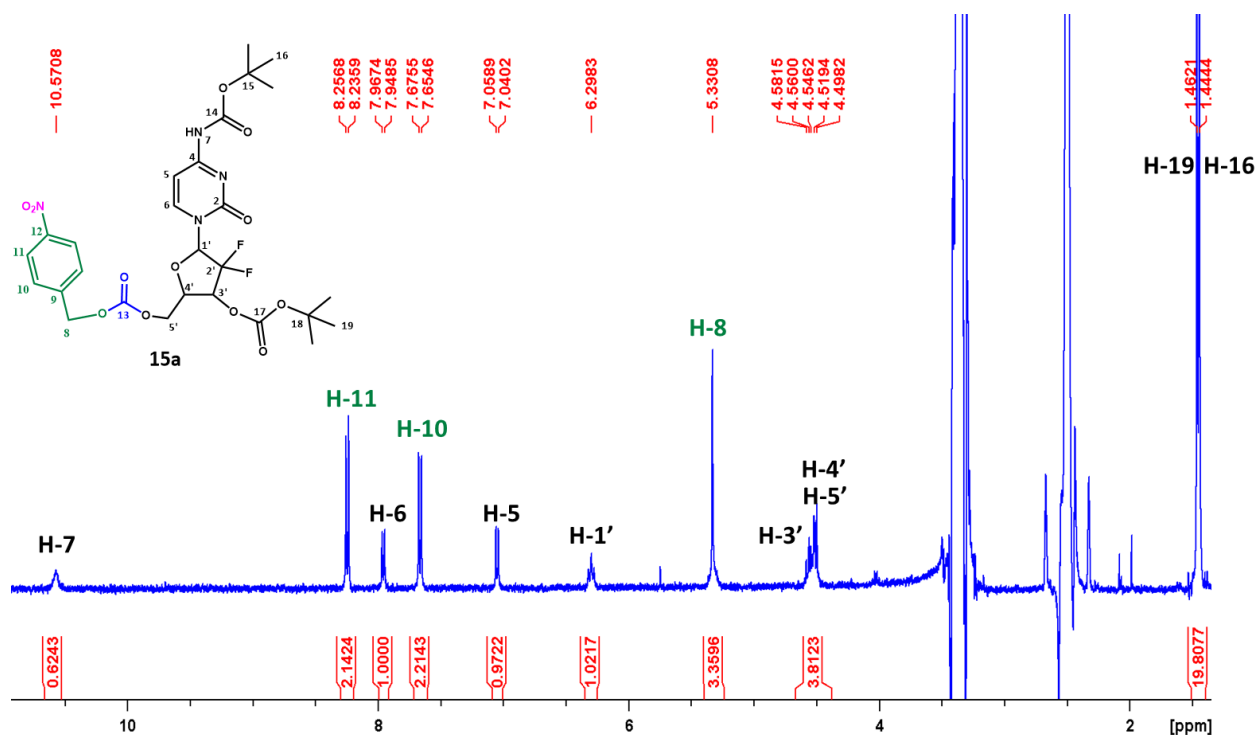


**Εικόνα 2.1.46.** Φάσμα μάζας της ένωσης **14β**.

Για τη σύνθεση της ένωσης **15a** χρησιμοποιήθηκε η ένωση **11**, η οποία προέκυψε από αναγωγή της 4-νιτροβενζαλδεΐδης. Η ένωση **11** συνενώθηκε με τη Boc-προστατευμένη γεμισταβίνη (**Gem2**) μέσω ενός καρβοξυ εστερικού συνδέτη μετά από δύο διαδοχικές αντιδράσεις

άκυλο υποκαταστάσεων υπό βασικές συνθήκες σε ακετονιτρίλιο. Για την εισαγωγή του συνδέτη αυτού χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BNPC (δισ-4-νιτροφαινυλο καρβοξυ εστέρας), οπότε στην πρώτη αντίδραση πραγματοποιήθηκε η ενεργοποίηση της ένωσης **11** και ύστερα προστέθηκε *in situ* η **Gem2** για να ληφθεί η ένωση **15a** με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που παρουσιάστηκε για την ένωση **8**.

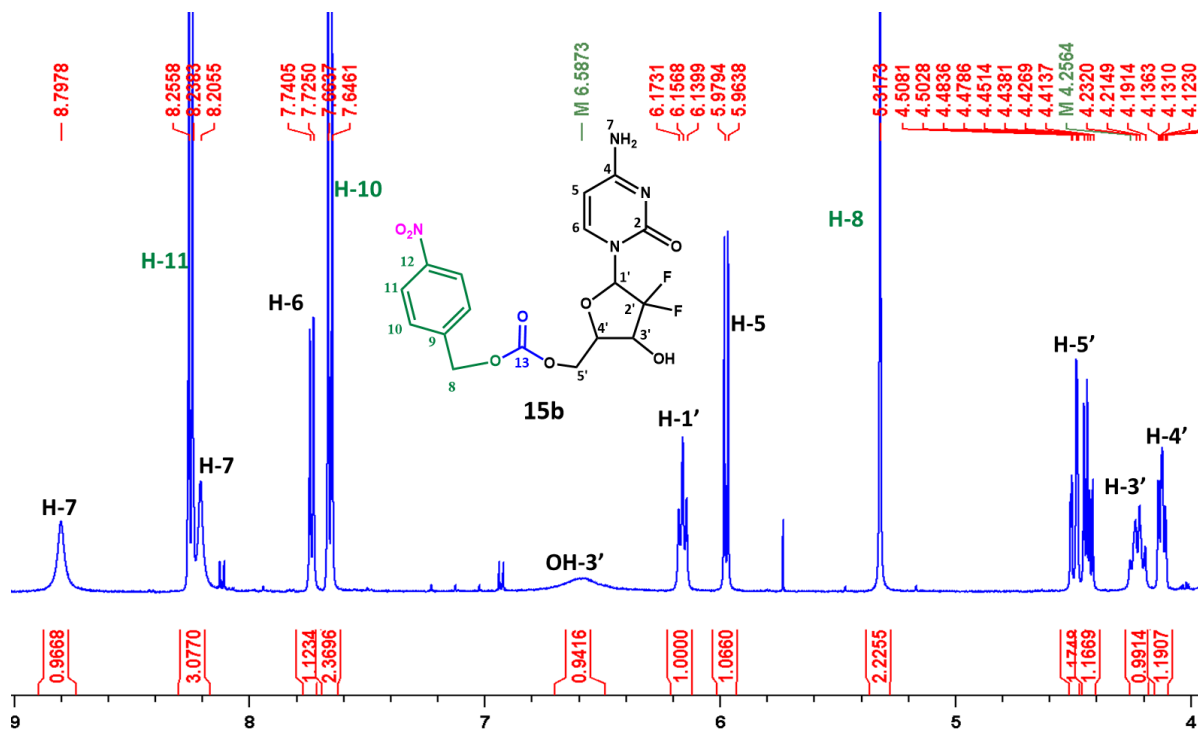
Η ένωση **15a** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.47) που έδειξε την ύπαρξη των χαρακτηριστικών κορυφών της **Gem2** (όπως την κορυφή από το -NH στα 10.57 ppm, τις 2 απλές κορυφές από τις Boc- ομάδες στα 1.46 ppm και 1.44 ppm), καθώς και τις κορυφές που προέρχονται από την ένωση **11**, με έλλειψη της κορυφής που προερχόταν από την πρωτοταγή -OH.



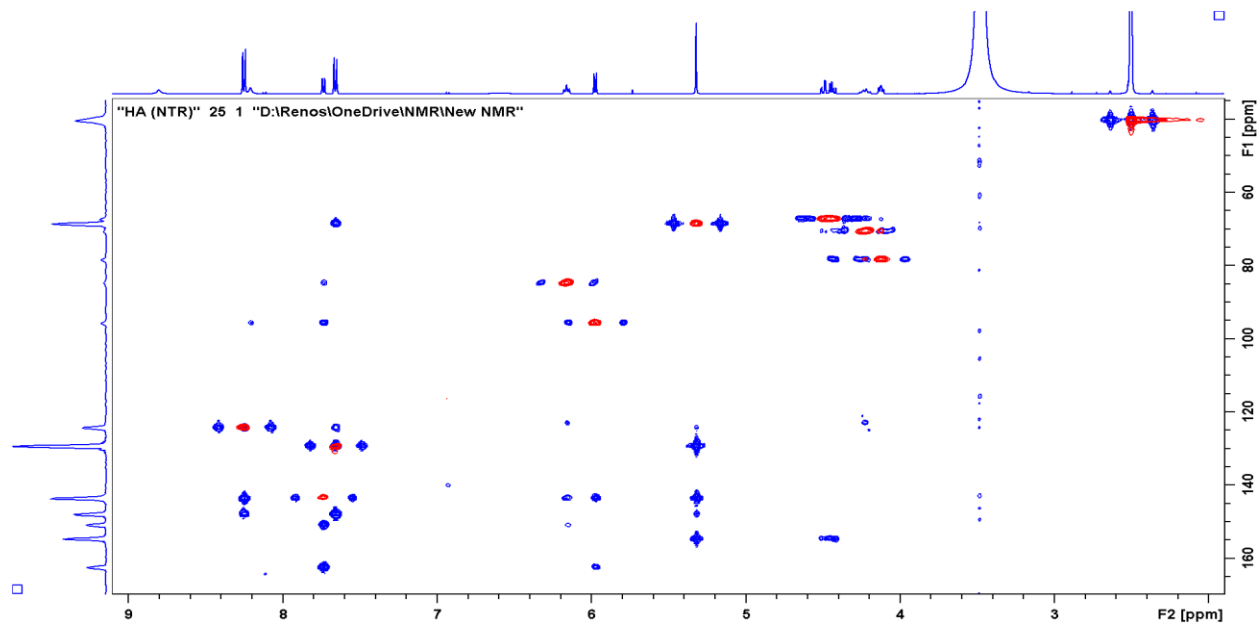
Εικόνα 2.1.47. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **15a** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Η ένωσης **15a** κατεργάστηκε με τριφθοροξικό οξύ για την απομάκρυνση των *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδων, ώστε να προκύψει η τελική ένωση **15β**. Ο μηχανισμός αποκοπής των *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδων είναι ίδιος με αυτόν που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Η ένωση **15β** ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}$  NMR το οποίο έδειξε την έλλειψη των κορυφών που προερχόντουσαν από τις *tert*-βουτοξυκαρβονυλο ομάδες (Εικόνα 2.1.48), με φασματοσκοπία 2D  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC που βοήθησε στον ολικό χαρακτηρισμό (Εικόνα 2.1.49), και με φασματομετρία μάζας όπου έδειξε τα ιόντα 443.0994  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 885.1921  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  (Εικόνα 2.1.50).



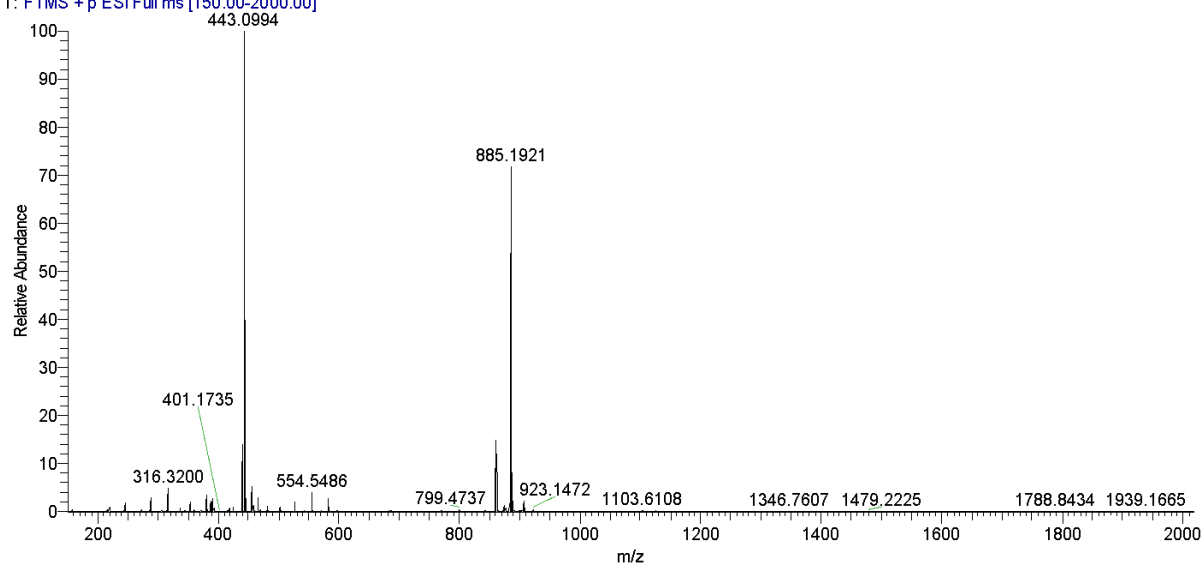


Εικόνα 2.1.48. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **15b** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz, 25 °C).



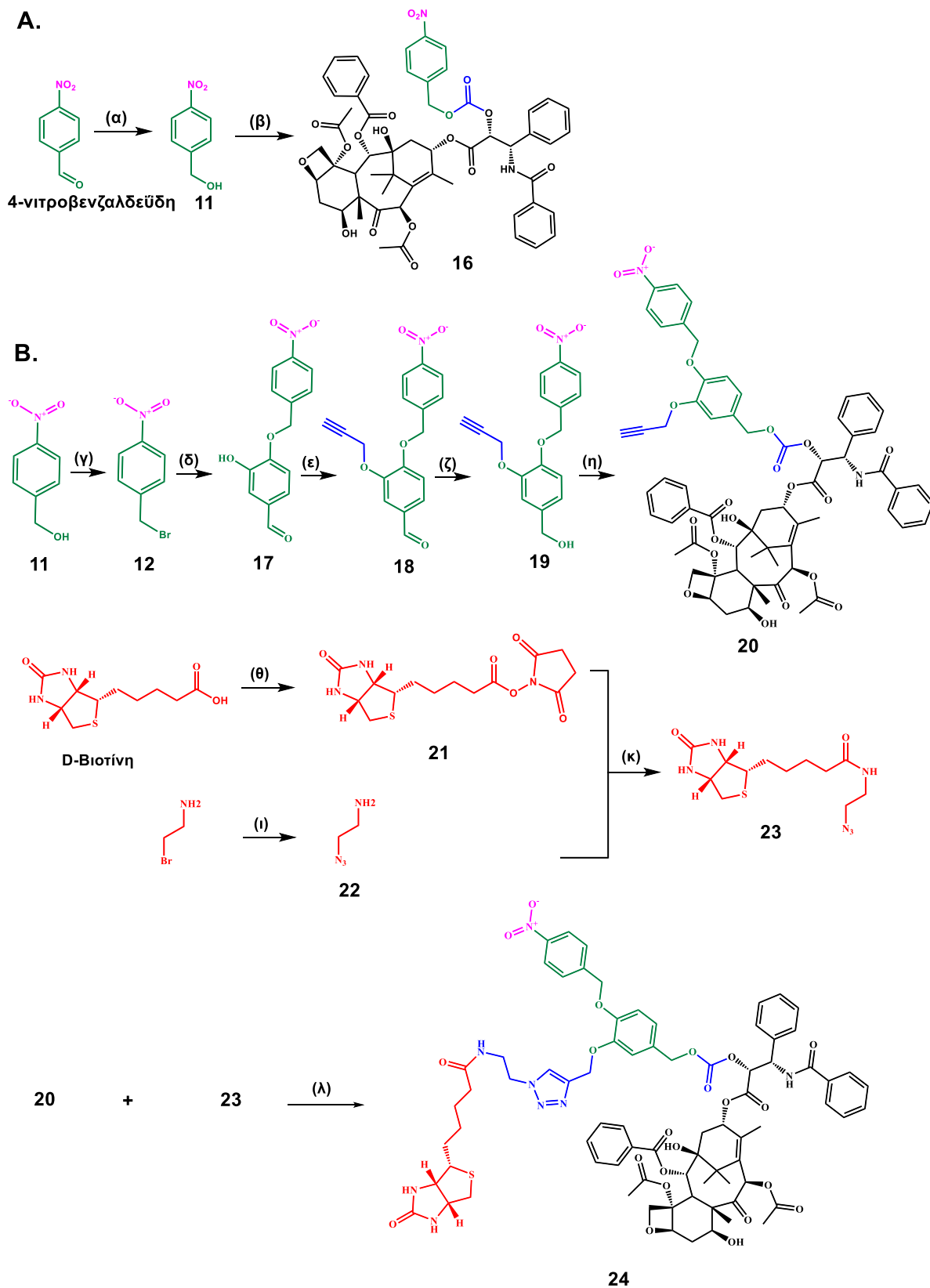
Εικόνα 2.1.49. Υπέρθεση φασμάτων  $2\text{D } ^1\text{H-}^{13}\text{C}$  NMR HSQC(κόκκινο)-HMBC(μπλε) της ένωσης **15b** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz, 25 °C).

HA126\_200612160720 #4-5 RT: 0.03-0.03 AV: 2 NL: 7.35E7  
T: FTMS +p ESI Full ms [150.00-2000.00]



*Εικόνα 2.1.50. Φάσμα μάζας της ένωσης 15β.*

Όσον αφορά τα θεραπευτικά προφάρμακα της πακλιταξέλης, το ανάλογο **16** συντέθηκε σε 2 βήματα μέσω γραμμικής σύνθεσης (**Σχήμα 2.1.19A**), ενώ το **24** σε 9 βήματα μέσω συγκλίνουσας σύνθεσης (**Σχήμα 2.1.19B**).



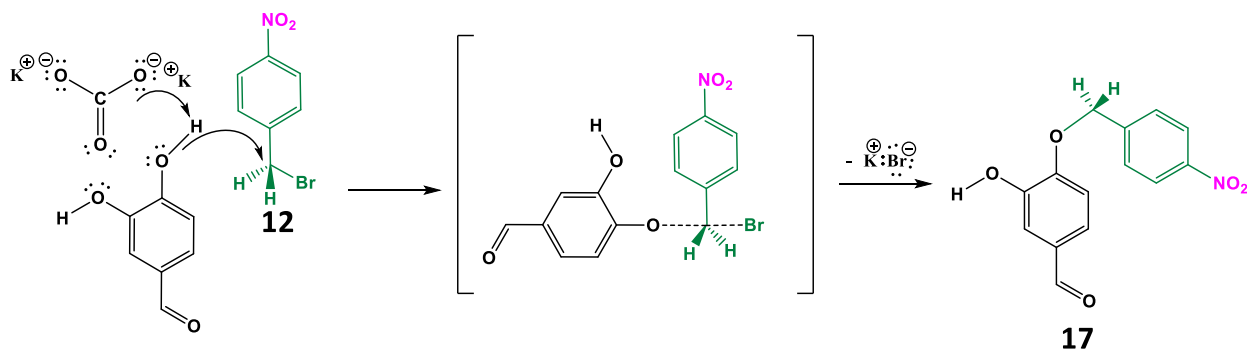
**Σχήμα 2.1.19.** Σχηματική απεικόνιση των συνθετικών πορειών για την παρασκευή **A.** Του προφαρμάκου **16** και **B.** του προφαρμάκου **24**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α)  $\text{NaBH}_4$ , απόλυτη

*EtOH*, *rt*, 2 ώρες, (β) (i) *BNPC*, *DMAP*, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *rt*, 12 ώρες, (ii) Πακλιταξέλη, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *rt*, 12 ώρες, (γ)  $\text{PBr}_3$ , άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *rt*, 2 ώρες, (d) 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ακετόνη, *rt*, 12 ώρες, (ε) 3-βρωμοπροπύλιο,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ακετόνη, 40 °C, 12 ώρες, (ζ)  $\text{NaBH}_4$ , απόλυτη *EtOH*, *rt*, 3 ώρες, (η) (i) *BNPC*, *DMAP*, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *rt*, 12 ώρες, (ii) Πακλιταξέλη, άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 40 °C, 12 ώρες, (θ) *NHS*, *DCC*, άνυδρο *DMF*, 50 °C, 12 ώρες (i)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 85 °C, 12 ώρες, (κ) *TEA*, άνυδρο *DMF*, *rt*, 12 ώρες, (λ) *CuI*, *TEA*, *MeOH/CH}\_2\text{Cl}\_2 (1:2), *rt*, 12 ώρες.*

Το προφάρμακο **16** συντέθηκε ξεκινώντας από την 4-νιτροβενζαλδεΐδη, η οποία αρχικά ανάχθηκε με χρήση  $\text{NaBH}_4$  σε απόλυτη αιθανόλη για να ληφθεί η ένωση **11** όπως περιεγράφηκε και προηγουμένως για τα αντίστοιχα προφάρμακα της γεμισιταβίνης. Έπειτα, η ένωση **11** αντέδρασε με το αντιδραστήριο *BNPC* (δισ-4-νιτροφαινυλο καρβοξυ εστέρας) μέσω άκυλο υποκατάστασης για να δημιουργηθεί το αντίστοιχο ενεργοποιημένο ενδιάμεσο το οποίο έπειτα αντέδρασε *in situ* με την πακλιταξέλη σε διχλωρομεθάνιο σε βασικές συνθήκες για να δώσει το τελικό προϊόν **16** μέσω μιας άκυλο υποκατάστασης, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της ένωσης **8**.

Το προφάρμακο **24** συντέθηκε με συγκλίνουσα πορεία συνθέτοντας το μόριο-κορμό μαζί με τη «σκανδάλη» και το φάρμακο και τελικά συνδέοντας τη τροποποιημένη D-βιοτίνη που προσφέρει στόχευση στα καρκινικά κύτταρα. Η σύνθεση ξεκινά με την 4-νιτροβενζαλδεΐδη η οποία ανάχθηκε με  $\text{NaBH}_4$  προς την ένωση **11**, η οποία έπειτα μετατράπηκε στην ένωση **12** με χρήση  $\text{PBr}_3$  σε διχλωρομεθάνιο όπως είδαμε προηγουμένως.

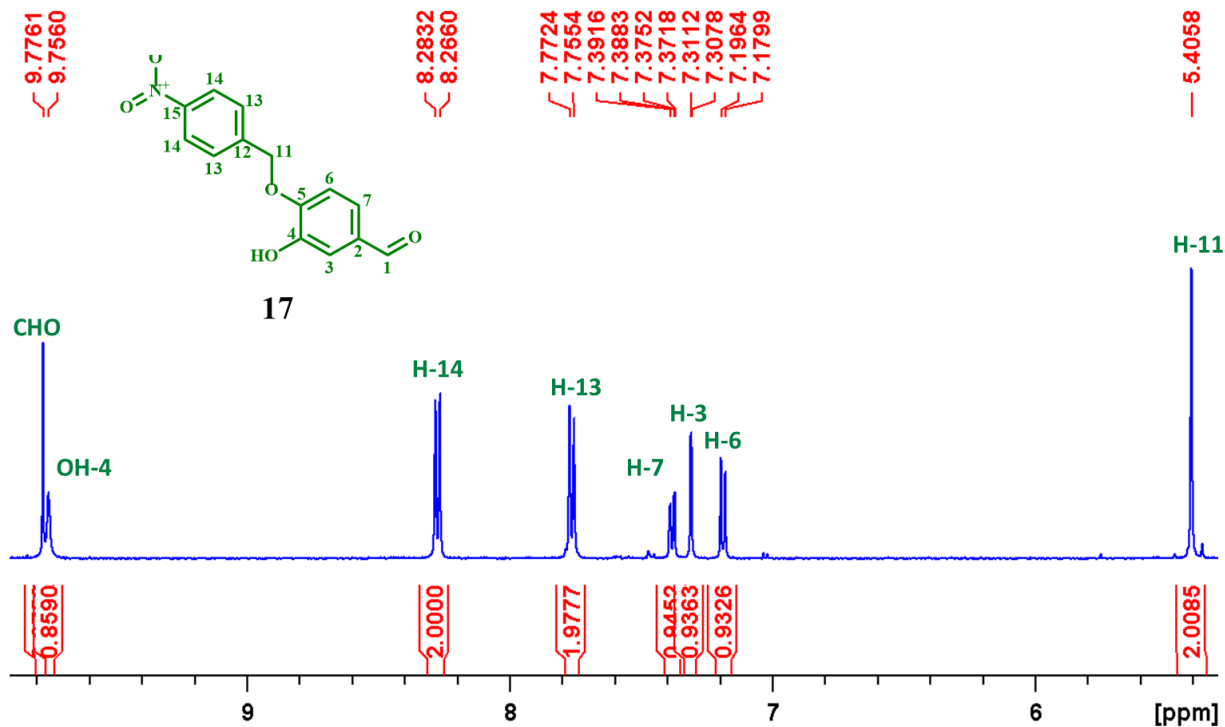
Η ένωση **12** έπειτα αντέδρασε με την 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη υπό βασικές συνθήκες σε ακετόνη για να προκύψει η ένωση **17** μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης (πιθανώς  $\text{S}_\text{N}2$ ), της οποίας ο μηχανισμός φαίνεται στο **Σχήμα 2.1.20** (λόγω συζυγίας, το υδρογόνο της 4-OH είναι πιο όξινο).



**Σχήμα 2.1.20.** Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **17** μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_\text{N}2$ .

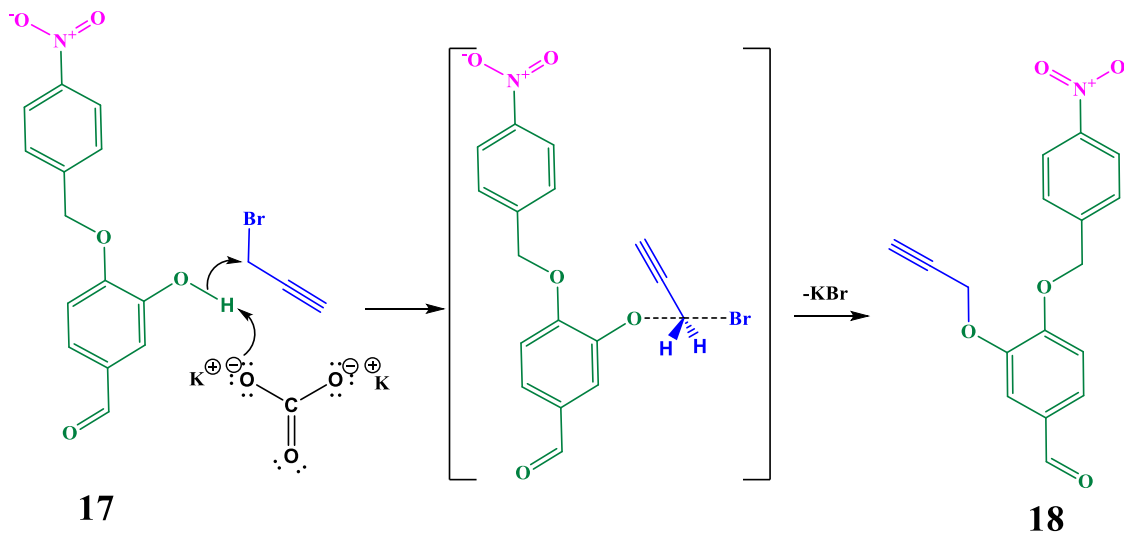
Η ένωση **17** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H NMR}$  (**Εικόνα 2.1.51**) που έδειξε την ύπαρξη της αλδεΐδης στα 9.77 ppm ως οξεία κορυφή και μιας φαινολικής -OH στα 9.75 ppm ως ευρεία κορυφή. Στα 8.27 και 7.76 ppm εμφανίστηκαν τα τέσσερα αρωματικά πρωτόνια από τον νιτρο-υποκατεστημένο βενζολικό δακτύλιο. Επίσης, εμφανίστηκαν 3 κορυφές στην αρωματική

περιοχή προερχόμενες από τον άλλο βενζολικό δακτύλιο και μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 5.40 ppm προερχόμενη από την μεθυλενομάδα.



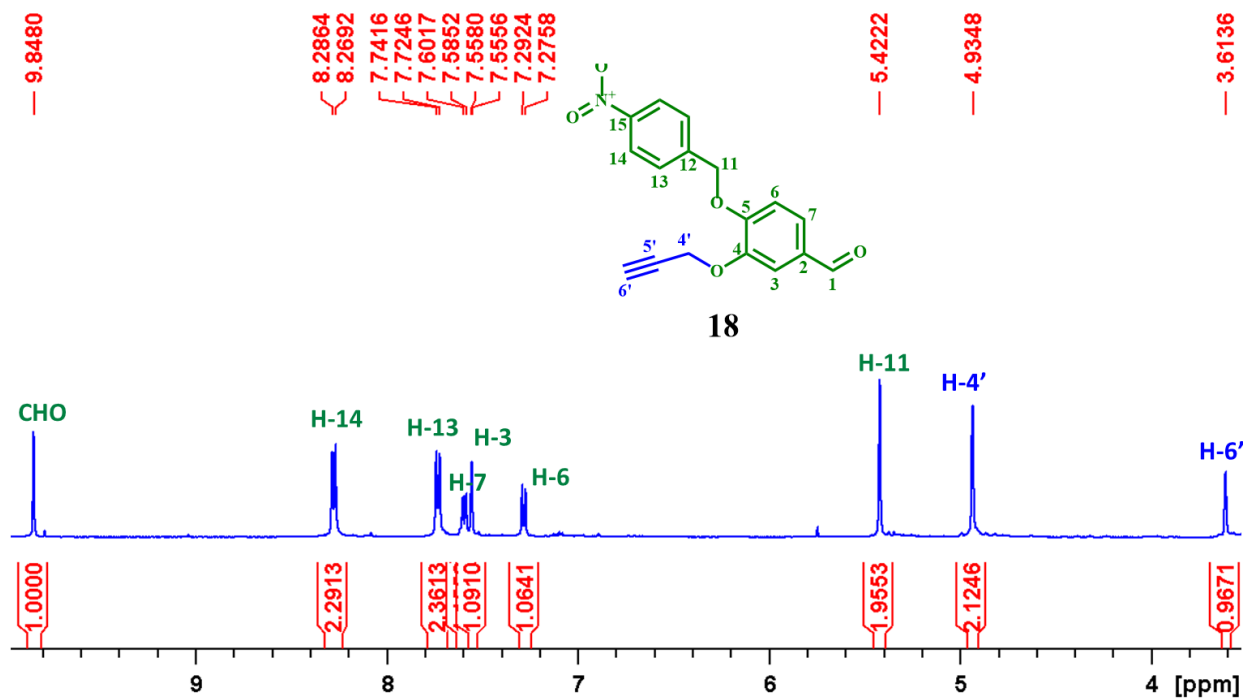
Εικόνα 2.1.51. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **17** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz, 25 °C).

Έπειτα ακολούθησε μια ακόμα πυρηνόφιλη υποκατάσταση  $\text{S}_{\text{N}}2$  της ένωσης **17** ώστε να προκύψει η ένωση **18** η οποία φέρει ελεύθερο ακραίο αλκύνιο με τον μηχανισμό που απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1.21.



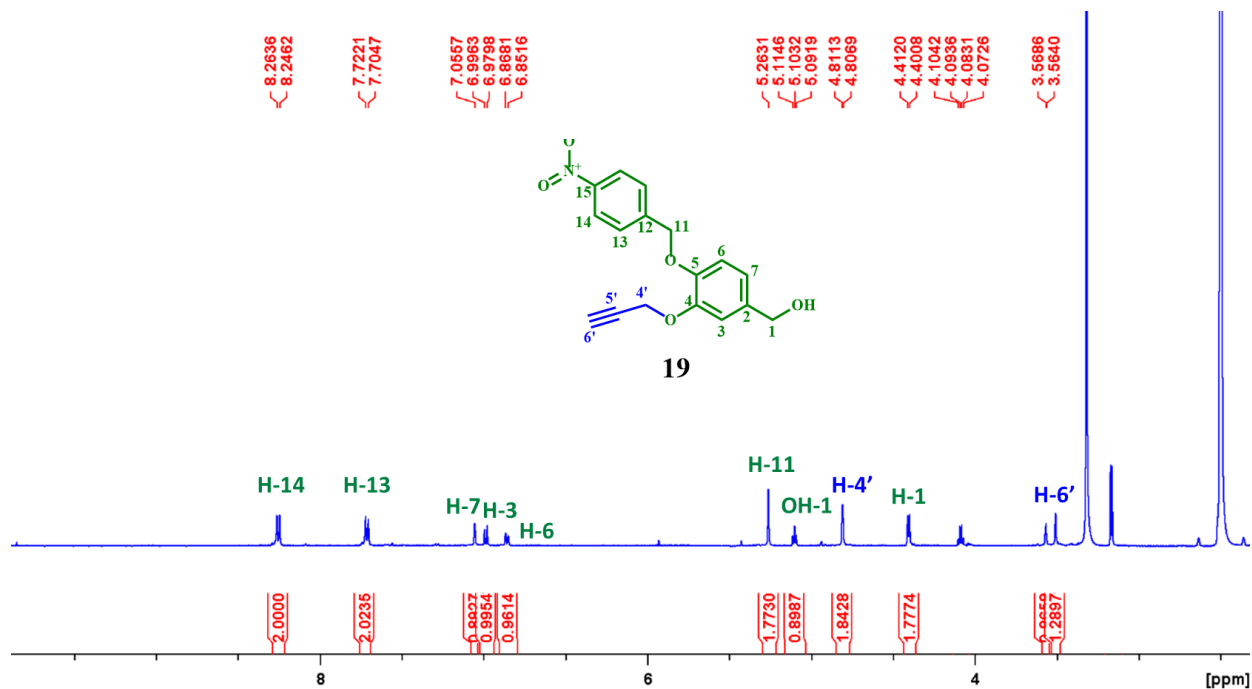
Σχήμα 2.1.21. Μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **18** μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_{\text{N}}2$ .

Η ένωση **18** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.52) που έδειξε την ύπαρξη της αλδεΐδης στα 9.77 ppm ως οξεία κορυφή αλλά την εξαφάνιση της κορυφής που προερχόταν από την φαινολική -OH, υποδεικνύοντας την επιτυχημένη υποκατάσταση. Ακόμη, εμφανίστηκε με νέα απλή κορυφή στα 4.93 ppm με ολοκλήρωση 2 που αντιστοιχεί στη νέα μεθυλενομάδα δίπλα στο αλκύνιο, καθώς και μια νέα τριπλή κορυφή στα 3.61 ppm που αντιστοιχεί το πρωτόνιο του ακραίου αλκυνίου.



Εικόνα 2.1.52. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **18** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

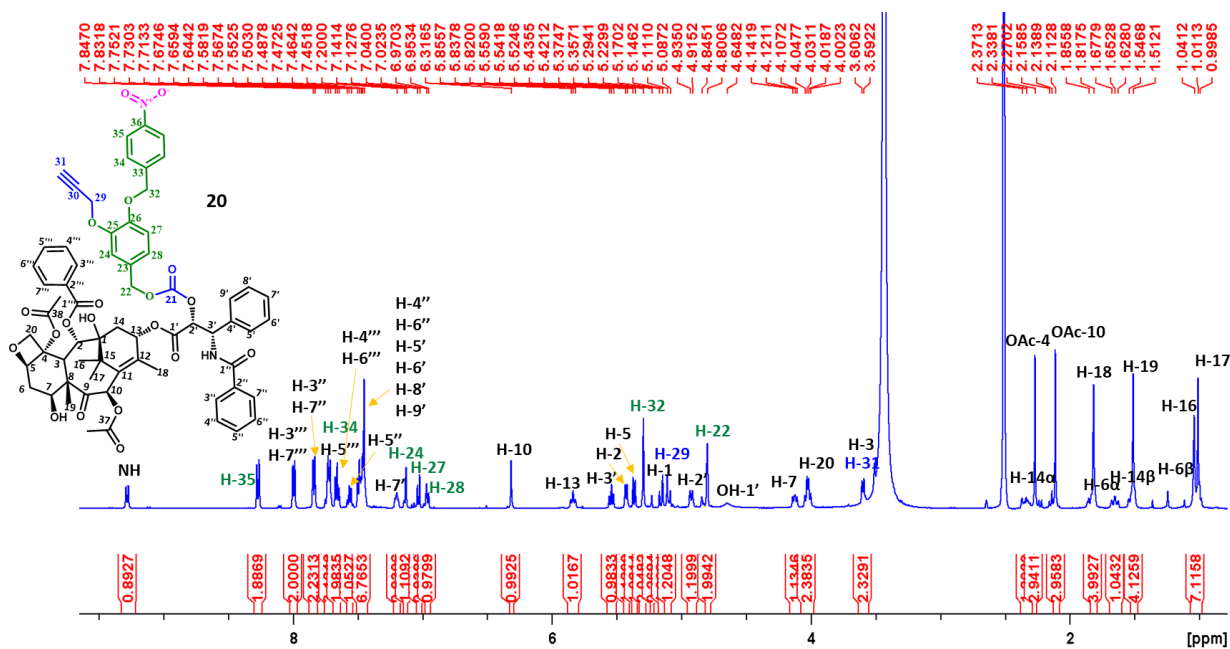
Ύστερα ακολούθησε μια αναγωγή της αλδεΐδης προς την αντίστοιχη πρωτοταγή -OH με χρήση  $\text{NaBH}_4$  σε απόλυτη αιθανόλη, με μηχανισμό ίδιο με αυτούς που παρουσιάστηκαν νωρίτερα, για να προκύψει η ένωση **19**. Η επαλήθευση της επιτυχημένης αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με  $^1\text{H}$ NMR (Εικόνα 2.1.53) που έδειξε την εξαφάνιση της κορυφής που αντιστοιχούσε στην αλδεΐδη και την εμφάνιση μιας νέας τριπλής κορυφής στα 5.10 ppm λόγω της πρωτοταγούς -OH.



**Εικόνα 2.1.53.** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης **19** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Η ένωση **19** συνδέθηκε με το αντικαρκινικό φάρμακο πακλιταξέλη μέσω καρβοξυεστερικού δεσμού μέσω δυο διαδοχικών άκυλο υποκαταστάσεων με χρήση του αντιδραστηρίου BNPC υπό βασικές συνθήκες σε διχλωρομεθάνιο με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της ένωσης **8**.

Η ένωση **20** χαρακτηρίστηκε με φάσμα  $^1\text{H NMR}$  (**Εικόνα 2.1.54**) που έδειξε όλες τις κορυφές της ένωσης **19** με εξαίρεση αυτή που προερχόταν από την πρωτοταγή -OH στα 5.10 ppm, καθώς και όλες τις κορυφές της πακλιταξέλης με χαρακτηριστικές αυτές στην αλειφατική περιοχή προερχόμενες από τις μεθυλομάδες της πακλιταξέλης.

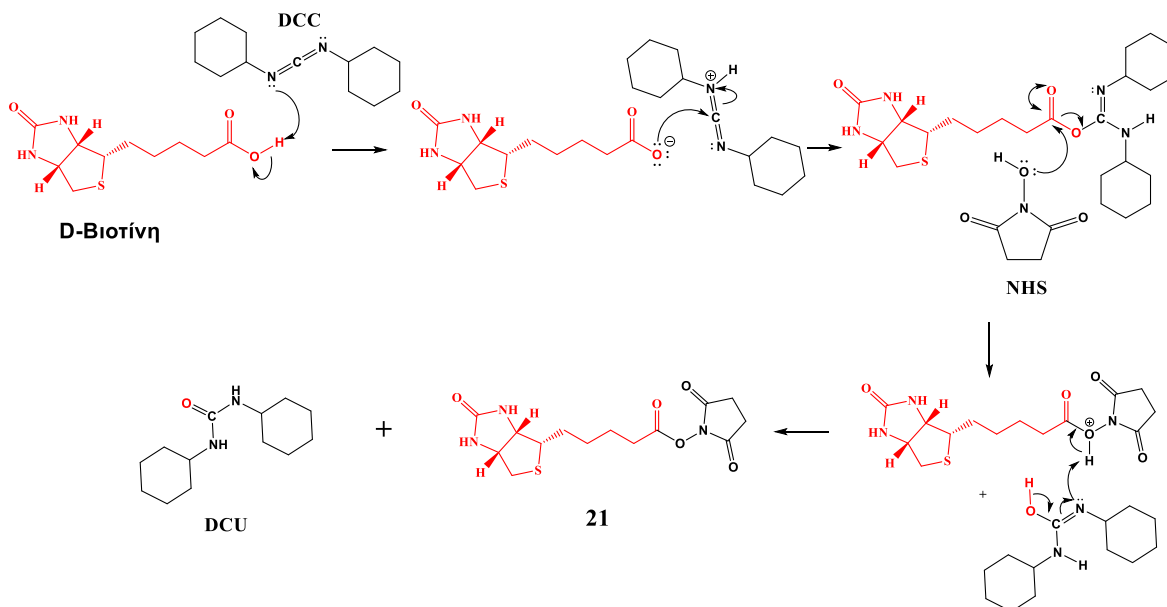


Εικόνα 2.1.54. Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR της ένωσης **20** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Εφόσον ολοκληρώθηκε η σύνθεση της ένωσης **20** που φέρει το φάρμακο, προχωρήσαμε στη σύνθεση μιας τροποποιημένης D-βιοτίνης με ελεύθερο αζίδιο που θα μας επέτρεπε τη προσάρτησή της στην ένωση **20** μέσω κλικ χημείας. Η D-βιοτίνη προσφέρει στόχευση στον όγκο, καθώς, όπως είδαμε και στην εισαγωγή, μπορεί να προσδένεται εκλεκτικά στον αντίστοιχο υποδοχέα της που υπερεκφράζεται στην εξωτερική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Ακολουθεί ενδοκύττωση ολόκληρου του προφαρμάκου με επακόλουθη την απελευθέρωση του φαρμάκου στο λυσόσωμα.

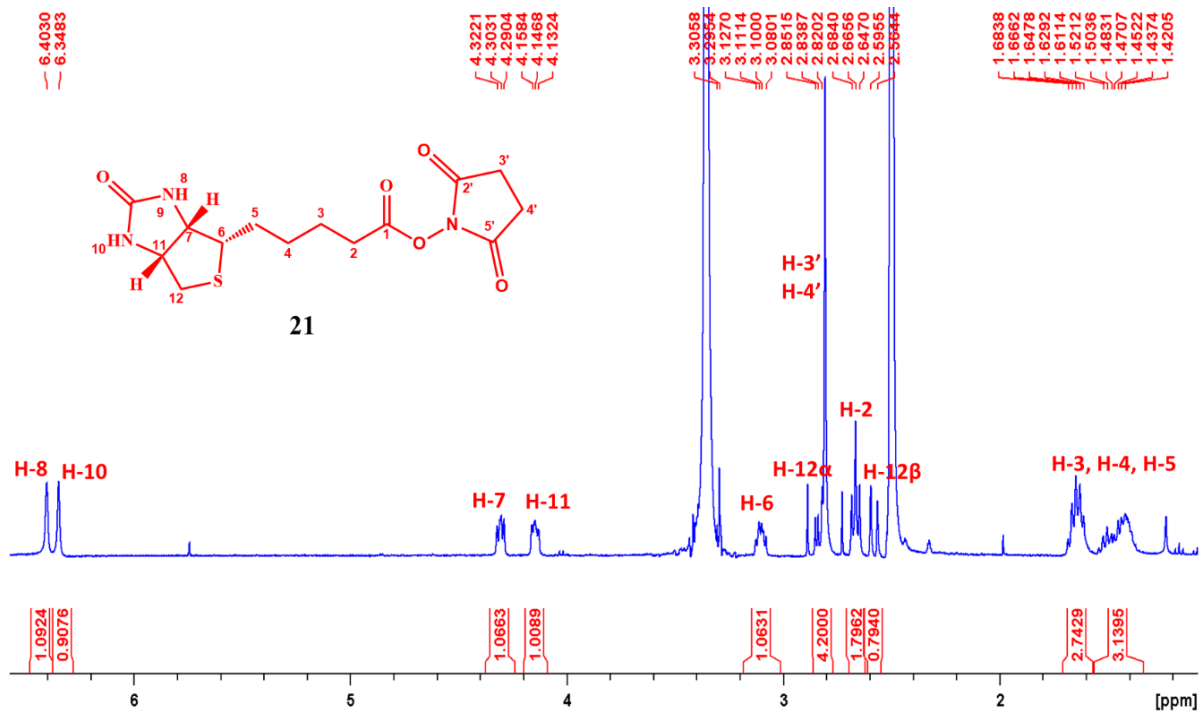
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του ενεργοποιημένου εστέρα της D-βιοτίνης (ένωση **21**) που θα μας επιτρέψει την μετέπειτα σύζευξη. Για τον σκοπό αυτό το ελεύθερο οξύ της βιοτίνης αντέδρασε με DCC (N,N'-δικυκλο-εξυλοκαρβοδιμίδιο) και NHS (N-υδροξυσουκινιμίδιο) σε άνυδρο DMF. Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.22:





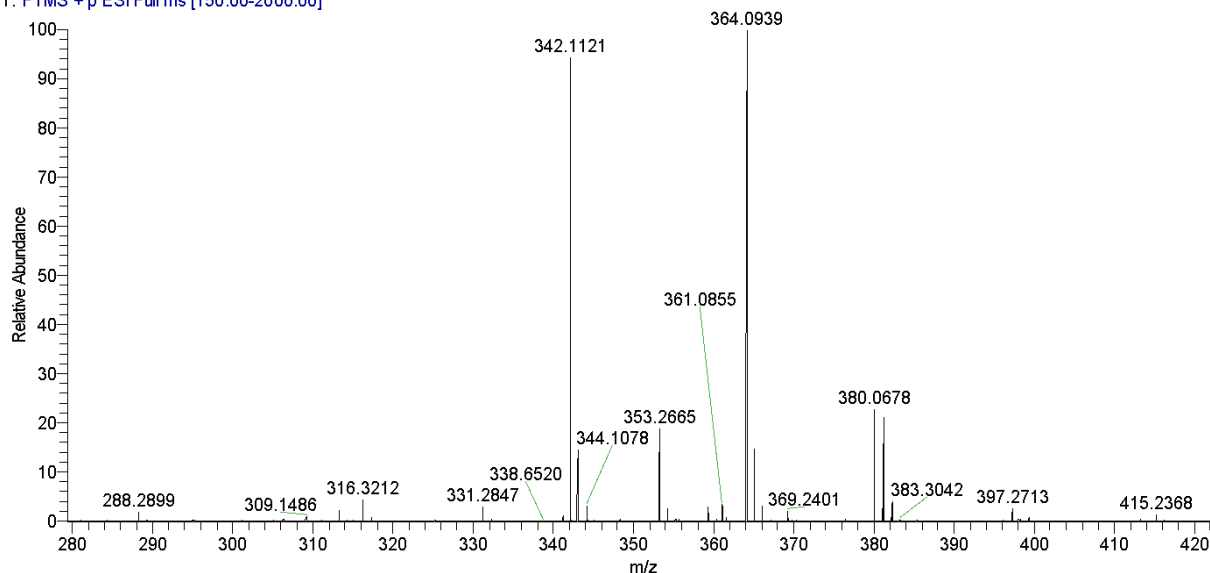
**Σχήμα 2.1.22.** Μηχανισμός σχηματισμού του ενεργοποιημένου εστέρα της βιοτίνης (ένωση **21**) με τη δημιουργία δικυκλοεξουρίας (DCU) ως παραπροϊόν.

Η επιτυχημένη ενεργοποίηση επαληθεύτηκε με χρήση  $^1\text{H NMR}$  (Εικόνα 2.1.55) που έδειξε την έλλειψη του οξέος και την ύπαρξη όλων των υπολοίπων κορυφών με την ταυτόχρονη εμφάνιση μιας κορυφής στα 2.80 ppm με ολοκλήρωση 4 που προέρχεται από τα δυο  $-\text{CH}_2-$  του νεοεισαχθέντος σουκινιμιδίου. Ακόμη, η ένωση **21** χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας που έδειξε την ύπαρξη των ιόντων  $342.1121 [\text{M}+\text{H}]^+$  και  $364.0939 [\text{M}+\text{Na}]^+$  (Εικόνα 2.1.56).



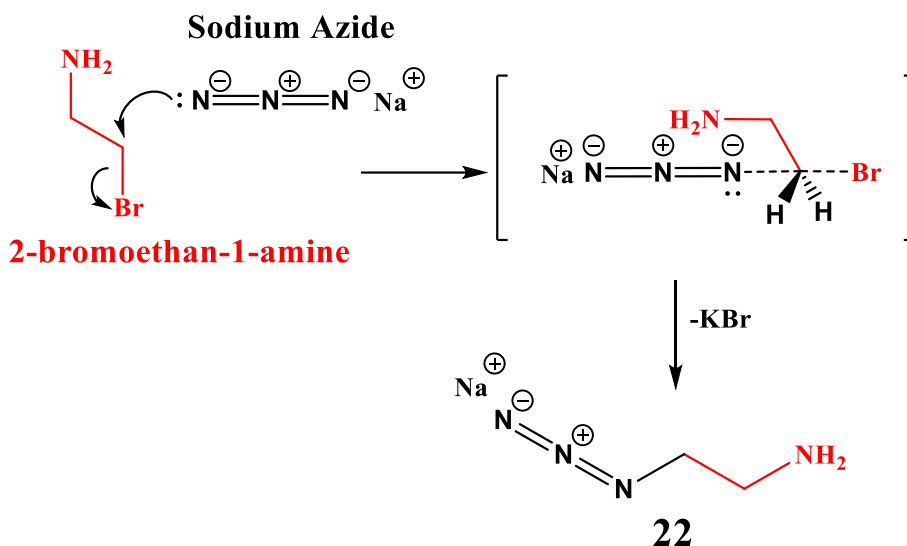
**Εικόνα 2.1.55.** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης **21** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

X29\_191105121954 #5-6 RT: 0.06-0.08 AV: 2 NL: 1.52E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



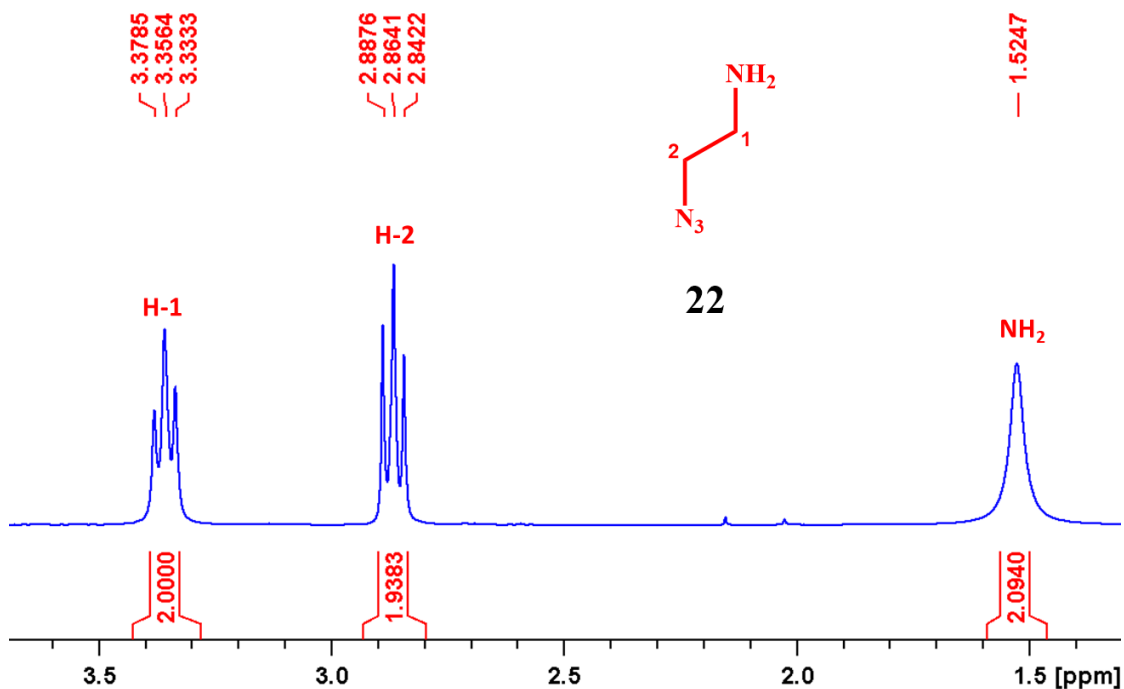
Εικόνα 2.1.56. Φάσμα μάζας της ένωσης 21.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης 22 που φέρει στο ένα άκρο ελεύθερη αμινομάδα που μπορεί να αντιδράσει σαν πυρηνόφιλο στον ενεργοποιημένο εστέρα 21 και στο άλλο άκρο ελεύθερο αζίδιο που θα χρησιμοποιηθεί μεταγενέστερα για κλικ χημεία. Για τον σκοπό αυτό αντέδρασε η 2-βρωμο-1-αιθυλαμίνη με  $\text{NaN}_3$  σε DMF που μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_\text{N}2$  παράχθηκε η ένωση 22 (Σχήμα 2.1.23).



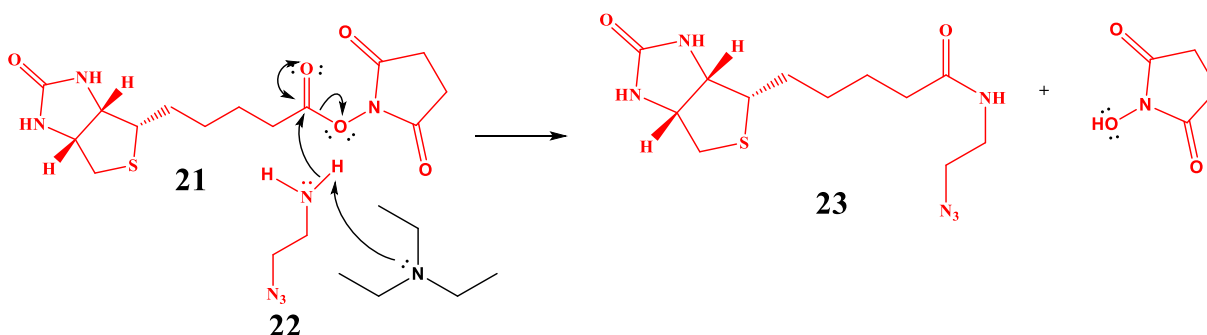
Σχήμα 2.1.23. Μηχανισμός σχηματισμού του της ένωσης 22 μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_\text{N}2$ .

Η ένωση **22** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.57) που έδειξε την ύπαρξη δυο τριπλών κορυφών λόγω των μεθυλενομάδων και μια διευρυμένη απλή κορυφή στα 1.52 ppm λόγω της αμινομάδας. Η κορυφή που αντιστοιχεί στην μεθυλενομάδα δίπλα στο αζίδιο στα 2.86 ppm παρουσιάστηκε μετατοπισμένη σε σχέση με την αρχική ένωση 2-αζιδο-1-αιθυλαμίνη.



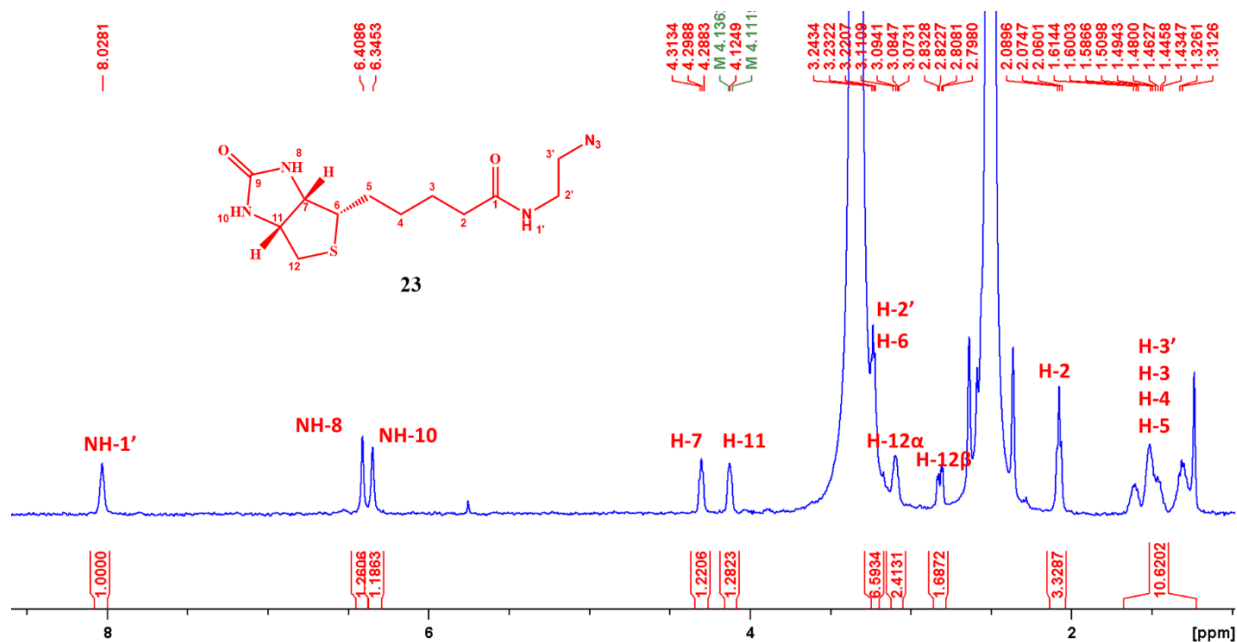
Εικόνα 2.1.57. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **22** σε  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz, 25 °C).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η σύζευξη της ενεργοποιημένης βιοτίνης **21** και της 2-αζιδο-1-αιθυλαμίνης **22** μέσω αμιδικού δεσμού. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μέσω μιας πυρηνόφιλης άκυλο υποκατάστασης υπό βασικές συνθήκες σε DMF που ευνοείται λόγω της καλής αποχωρούσας ομάδας (N-υδροξυσουκινιμίδιο) και παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.24.



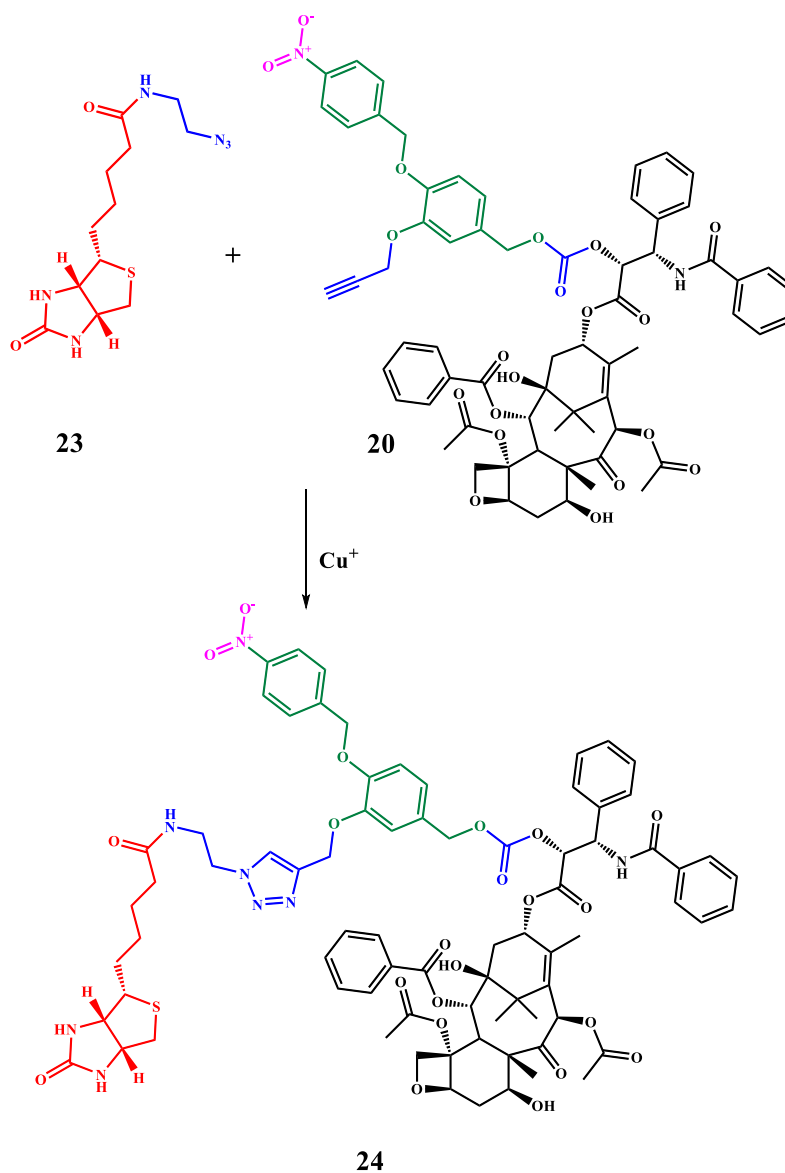
Σχήμα 2.1.24. Μηχανισμός σχηματισμού του της ένωσης **23** μέσω μιας πυρηνόφιλης άκυλο υποκατάστασης.

Το προϊόν **23** χαρακτηρίστηκε με  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.58) που έδειξε την εμφάνιση το πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού στα 8.02 ppm ως τριπλή κορυφή λόγω της ύπαρξης δυο γειτονικών υδρογόνων. Όλα τα υπόλοιπα πρωτόνια της ουρίας και τα αλειφατικά ήταν παρόντα στο φάσμα.



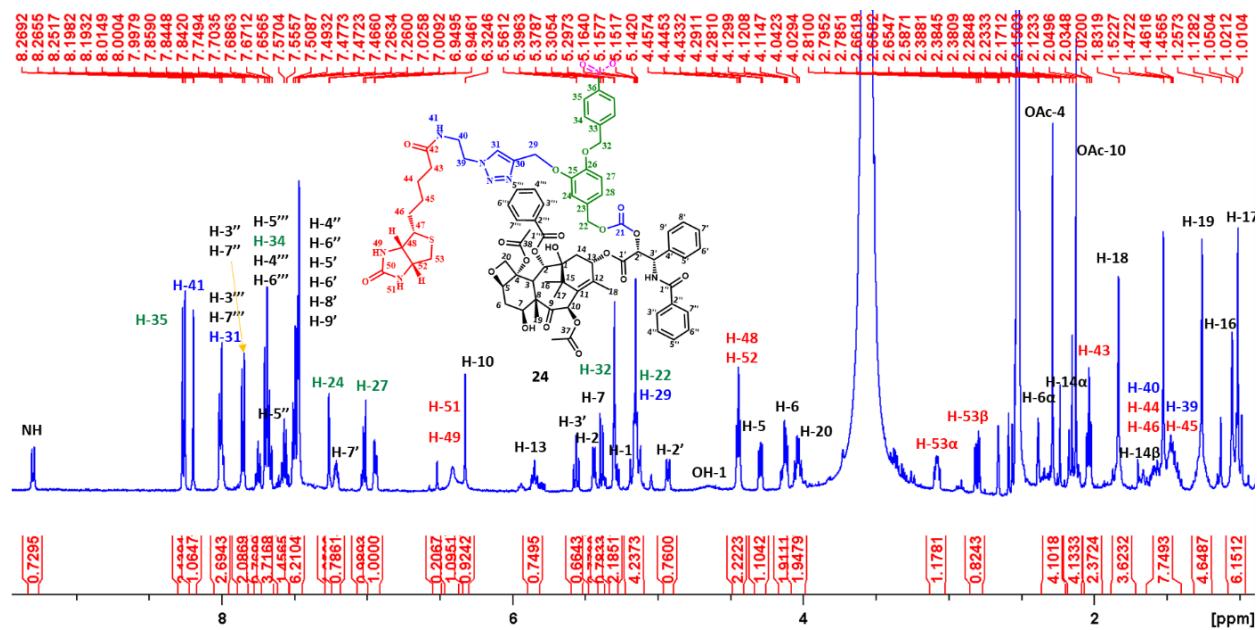
Εικόνα 2.1.58. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **23** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Το τελικό στάδιο περιλάμβανε τη σύζευξη της ένωσης **20**, που περιείχε το φάρμακο, τη «σκανδάλη» και το μόριο κορμό με ελεύθερο αλκύνιο, και της ένωσης **23** που περιείχε το μόριο-στόχευσης με ελεύθερο αζίδιο (Σχήμα 2.1.25). Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε με [3+2] κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκυνίου καταλυόμενη από χαλκό I με μηχανισμό αντίστοιχο με αυτόν που αναλύθηκε στην ενότητα 1.3.5 (Συνδέτες).

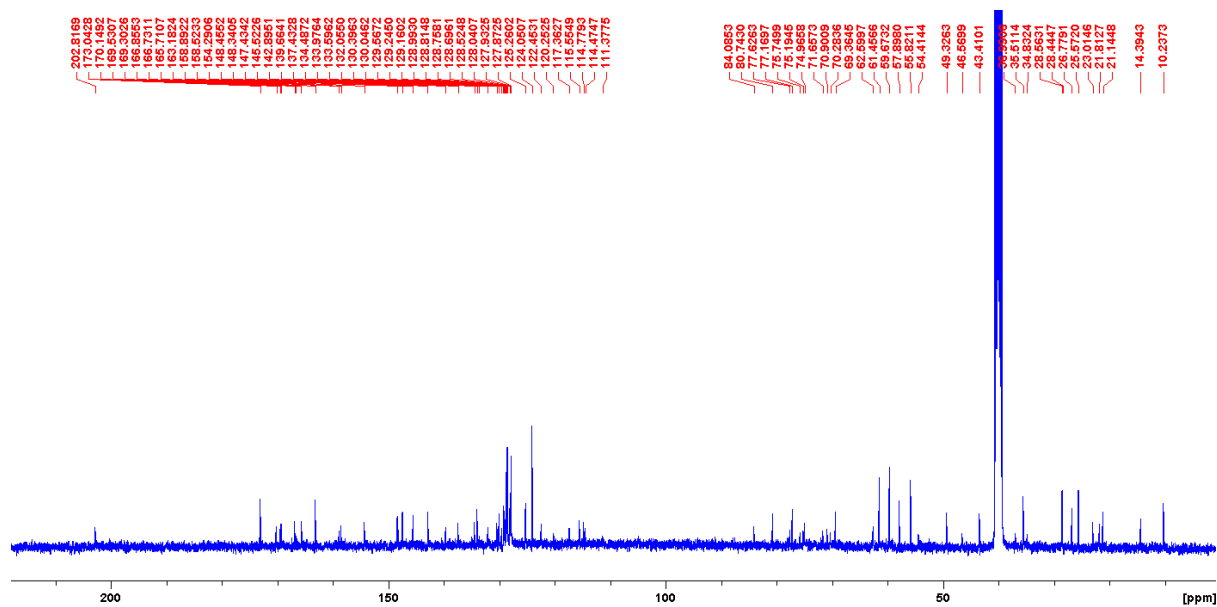


**Σχήμα 2.1.25.** Αντίδραση [3+2] κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκυνίου καταλυόμενη από χαλκό I μεταξύ των ενώσεων **20** και **23** για τον σχηματισμό του 1,4-δihυποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολίου της τελικής ένωσης **24**.

Το τελικό προϊόν **24** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.1.59) και  $^{13}\text{C}$  NMR (Εικόνα 2.1.60), και με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.1.61). Το φάσμα  $^1\text{H}$ NMR επιβεβαίωσε την επιτυχία της αντίδρασης λόγω ύπαρξης κορυφών και των δυο αρχικών με ταυτόχρονη έλλειψη της κορυφής που αντιστοιχούσε στο αλκύνιο και εμφάνιση μιας απλής κορυφής στα 8 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του τριαζολίου. Το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR επιβεβαίωσε την ύπαρξη όλων των αναμενόμενων ανθράκων ενώ το φάσμα μάζας έδειξε ως κύριο ιόν το 1505.5531  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

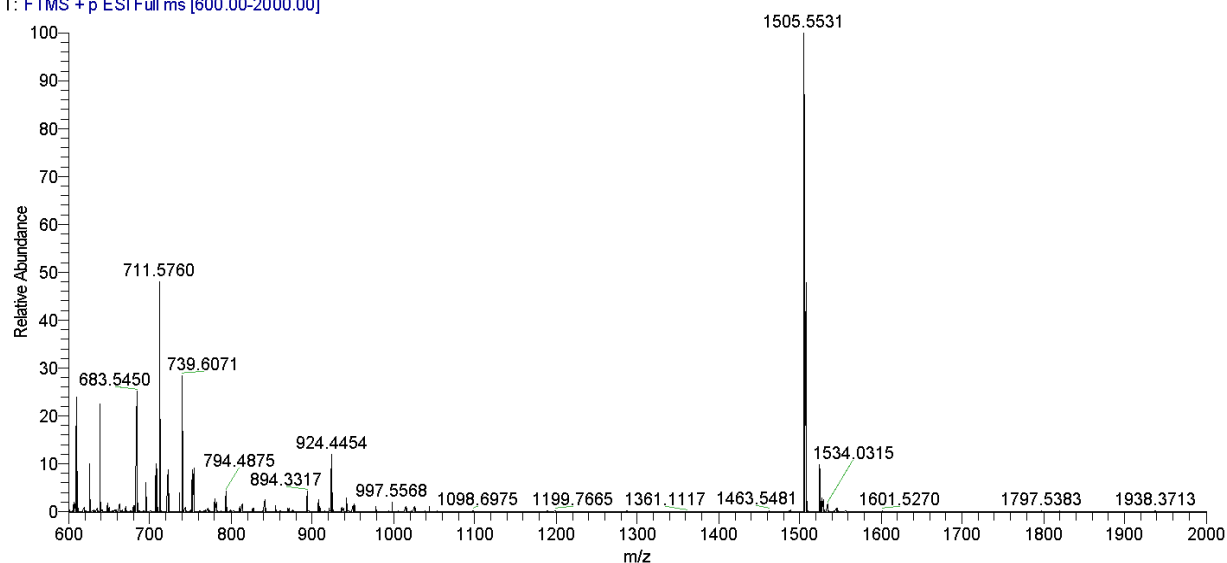


Εικόνα 2.1.59. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **24** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 2.1.60. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **24** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (100 MHz, 25 °C).

X88\_4 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 7.21E6  
T: FTMS +p ESI Full ms [600.00-2000.00]



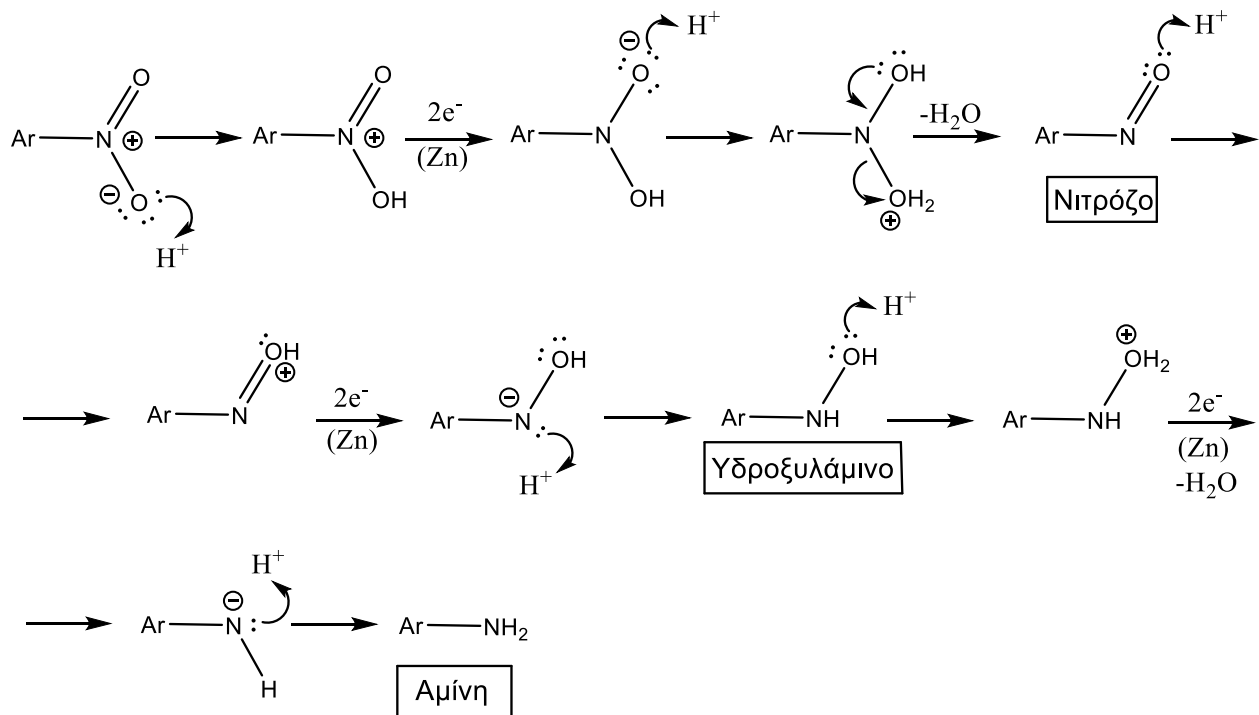
*Εικόνα 2.1.61. Φάσμα μάζας της ένωσης 24.*

### 2.1.6 Βιολογική αξιολόγηση των θεραπευτικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης που ανταποκρίνονται στην υποξία (ενώσεις **13β**, **14β**, **15β**, **16** και **24**)

Τα τρία θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**13β**, **14β**, **15β**) και τα δυο της πακλιταξέλης (**16** και **24**) μελετήθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε 1) η απόκριση τους ως προς την γλουταθειόνη με χρήση  $^1\text{H}$  NMR, 2) η κυτταροτοξικότητά τους σε καρκινικές σειρές HeLa και A549, 3) η σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH και 4) η σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.

#### 2.1.6.1 Χημική αναγωγή της νιτρο ομάδας των προφαρμάκων

Για να είναι επιτυχημένος ο σχεδιασμός των προφαρμάκων, θα πρέπει να ελευθερώνεται το δραστικό φάρμακο αμέσως μετά την αναγωγή της νιτρο ομάδας προς αμινομάδα. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε χημική αναγωγή της νιτρο ομάδας των προφαρμάκων με χρήση ψευδαργύρου και οξικού οξέος σε αιθανόλη. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρήση TLC, σε σύστημα διαλυτών διγλωρομεθάνιο/μεθανόλη (90/10, v/v) και έδειξε την πλήρη κατανάλωση των προφαρμάκων και τον σχηματισμό του αντίστοιχου φαρμάκου (γεμισιταβίνη ή πακλιταξέλη) μέσω του ακόλουθου προτεινόμενου μηχανισμού (**Σχήμα 2.1.26**).



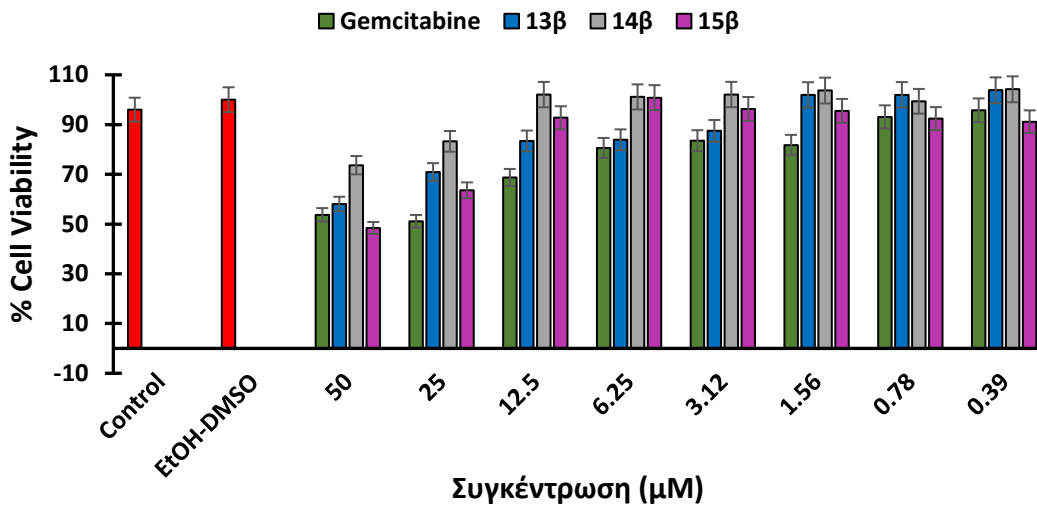
**Σχήμα 2.1.26.** Προτεινόμενος μηχανισμός αναγωγής των αρυλο νιτρο ομάδων προς τις αντίστοιχες αρυλαμίνες με χρήση σκόνης Zn και π. HCl.

Έχοντας πιστοποιήσει τον σωστό σχεδιασμό των προφαρμάκων προχωρήσαμε στη μελέτη της κυτταροτοξικότητας τους σε καρκινικές σειρές HeLa και A549 και στη μελέτη της σταθερότητας σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και σε διάφορες τιμές pH.

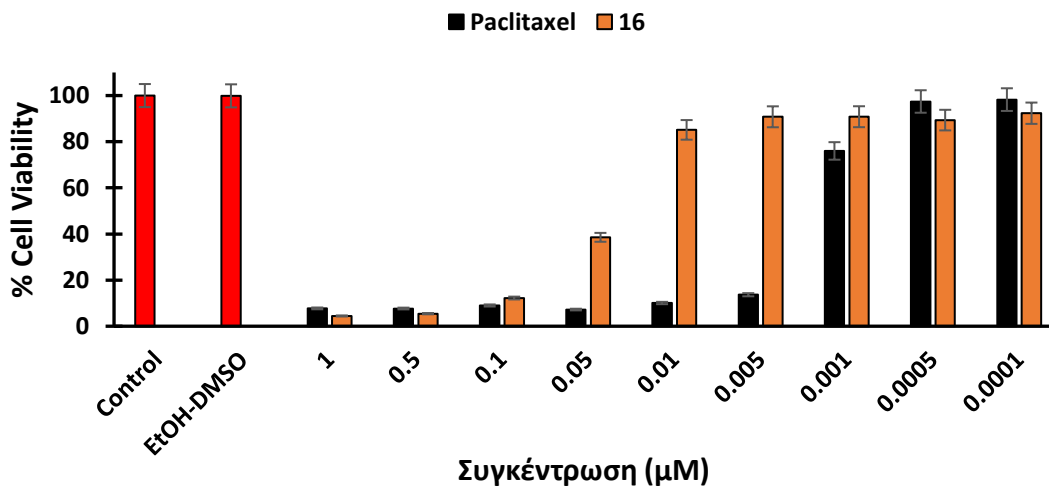
#### 2.1.6.2 Μελέτη της in vitro κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων και των προφαρμάκων **13β**, **14β**, **15β** και **16** σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και A549

Για την μέτρηση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων HeLa και A549 παρουσία γεμισταβίνης, πακλιταξέλης και των 4 αναλόγων τους χρησιμοποιήθηκε η γενική μέθοδος που περιγράφεται στο πειραματικό μέρος. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις συνοψίζονται στα παρακάτω ραβδογράμματα (**Εικόνες 2.1.62**, **2.1.63** και **2.1.64**):

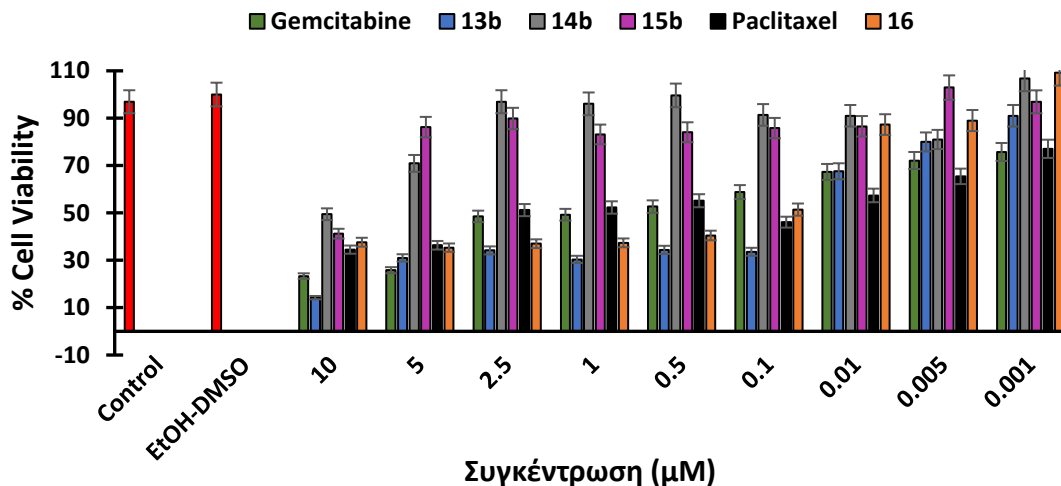




*Εικόνα 2.1.62. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων 13β (μπλε), 14β (γκρι) και 15β και της γεμισαβίνης (πράσινο) κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa.*



*Εικόνα 2.1.63. Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας του αναλόγου 16 (πορτοκαλί) σε σύγκριση με τη πακλιταξέλη (μαύρο) κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa.*



**Εικόνα 2.1.64.** Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων **13β** (μπλε), **14β** (γκρι), **15β** (μωβ) και **16** (πορτοκαλί), και των φαρμάκων γεμισιταβίνη (πράσινο) και πακλιταξέλη (μαύρο) έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549.

Παρατηρείται πως σε γενικές γραμμές τα προφάρμακα διατηρούν την κυτταροτοξικότητα των μητρικών μορίων. Αξίζει να σημειωθεί πως στη κυτταρική σειρά A549 το ανάλογο **13β** δείχνει ισχυρότερη δράση σε σχέση με τη γεμισιταβίνη, ενώ τα άλλα δυο αντίστοιχα ανάλογα **14β** και **15β** ασθενέστερη δράση. Επίσης, στα A549 το ανάλογο **16** δείχνει καλύτερη δράση σε σχέση με τη πακλιταξέλη. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται και στον **Πίνακα 2.3** όπου φαίνονται οι τιμές IC<sub>50</sub>

**Πίνακας 2.3.** Τιμές IC<sub>50</sub> των φαρμάκων και των προφαρμάκων **13β**, **14β**, **15β**, **16** σε HeLa και A549 καρκινικές κυτταρικές σειρές.

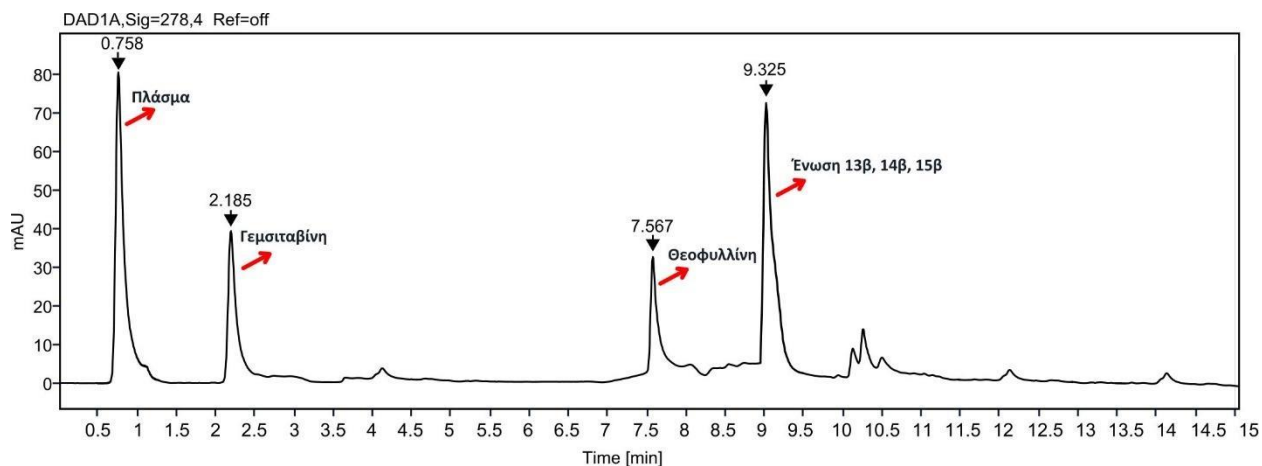
<u>Ένωση</u>	<u>IC<sub>50</sub> (nm)</u>	<u>StDev (nm)</u>	<u>Κυτταρική σειρά</u>
Πακλιταξέλη	2.26	±0.1	HeLa
Προφάρμακο <b>16</b>	30.42	±5.2	HeLa
Πακλιταξέλη	12.95	±4.1	A549
Προφάρμακο <b>16</b>	33.4	±2.8	A549
Γεμισιταβίνη	59.5	±10	A549
Προφάρμακο <b>13β</b>	49.7	±6.5	A549
Προφάρμακο <b>14β</b>	4700	±0.1	A549
Προφάρμακο <b>15β</b>	5800	±0.1	A549

**2.1.6.3** Μελέτη της in vitro σταθερότητας των **13β**, **14β**, **15β**, **16** και **24** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος  
 Πραγματοποιήθηκε η μελέτη της σταθερότητας τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος (σύμφωνα με τη γενική μέθοδο) παρακολουθώντας τον ρυθμό της υδρόλυσής τους και τα επίπεδα του φαρμάκου που παράγεται. Στη περίπτωση της γεμισιταβίνης παρακολουθήθηκε και ο

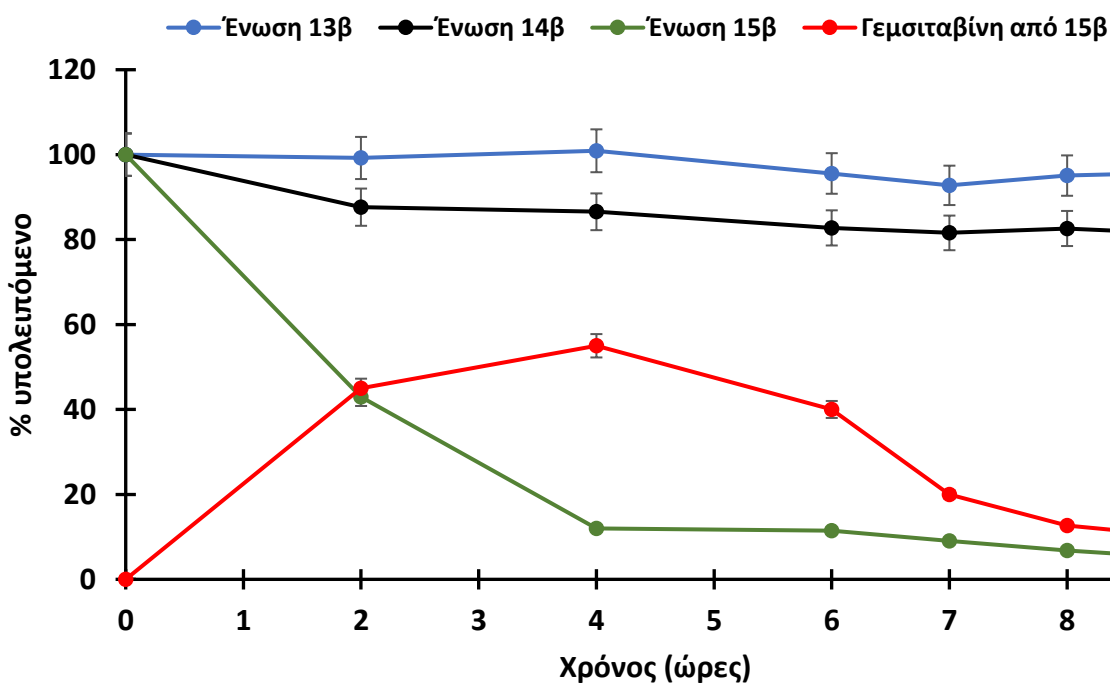
σηματισμός του μεταβολίτη. Η διαφορά με τη γενική μέθοδο έγκειται στην επαναδιαλυτοποίηση που έγινε σε 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ .

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού των φαρμάκων, των μεταβολιτών, του προφαρμάκου, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος.

Όσον αφορά τη γεμισταβίνη: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου,  $\text{pH} = 5$  και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ρυθμιστικό διάλυμα/MeCN ισοκρατικό για 5 λεπτά έως 30/70 ρυθμιστικό διάλυμα/MeCN για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 278 nm. Το πρότυπο χρωματογράφημα φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.1.65**, ενώ τα αποτελέσματα της σταθερότητας συνοψίζονται στην **Εικόνα 2.1.66**. Τα προφάρμακα **13 $\beta$**  και **14 $\beta$**  εμφανίστηκαν εξαιρετικά σταθερά με αποτέλεσμα να μην παρατηρηθεί απελευθέρωση γεμισταβίνης σε 8 ώρες, ενώ το προφάρμακο **15 $\beta$**  εμφάνισε  $t_{1/2}$  περίπου 2 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί πως σε κανένα προφάρμακο δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του ανενεργού μεταβολίτη της γεμισταβίνης, dFdU.

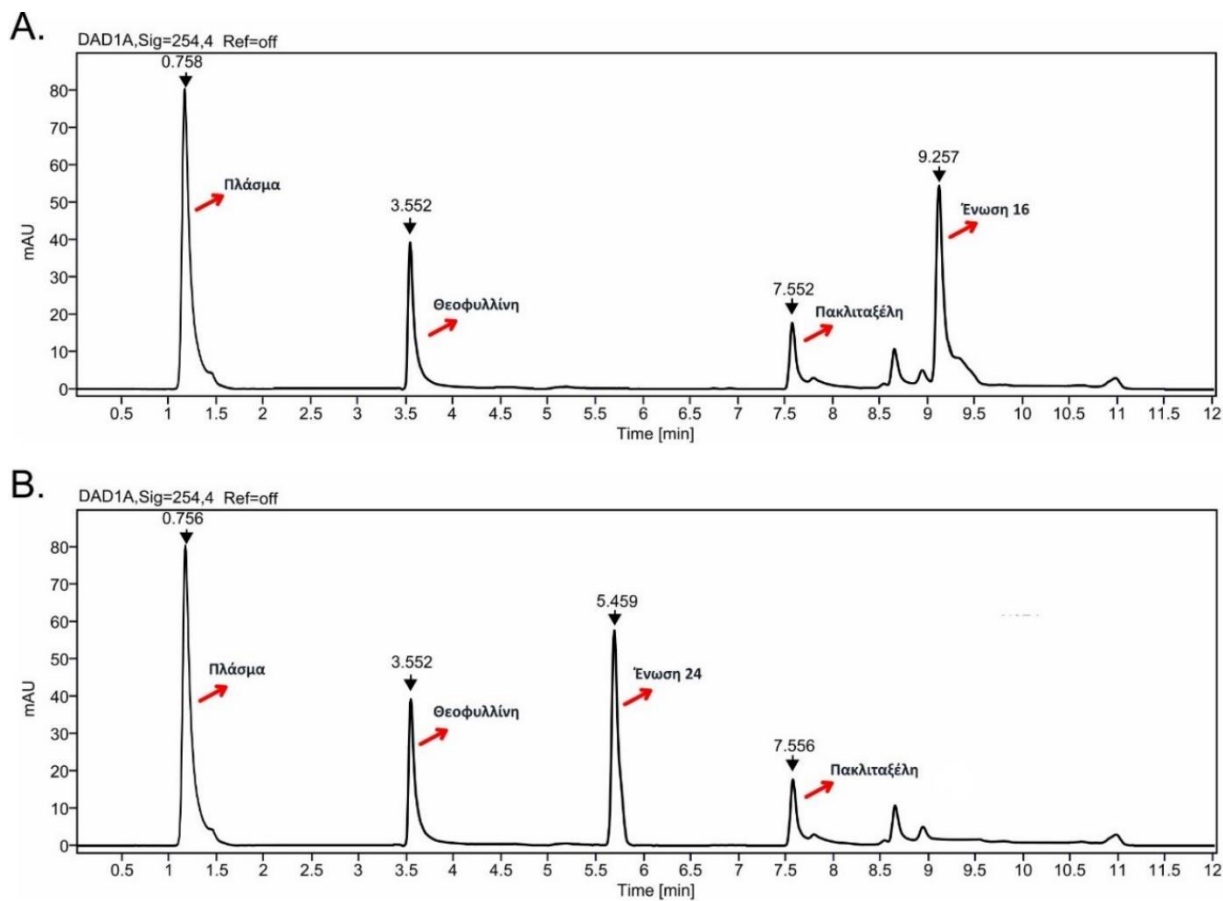


**Εικόνα 2.1.65.** Χρωματογραφία HPLC των προφαρμάκων της γεμισταβίνης (**13 $\beta$** , **14 $\beta$** , **15 $\beta$** ) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.

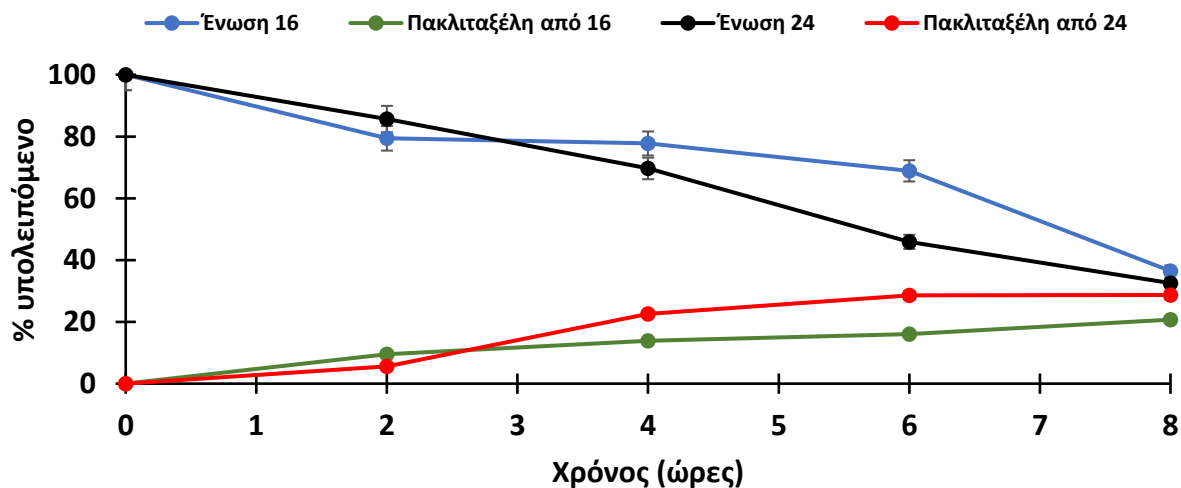


**Εικόνα 2.1.66.** Καμπύλες σταθερότητας των προφαρμάκων **13β** (μπλε χρώμα), **14β** (μαύρο χρώμα) και **15β** (πράσινο χρώμα), και καμπύλες σχηματισμού της γεμισταβίνης από το **15β** (κόκκινο χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο. *dFdU* δεν παρατηρήθηκε σε κανένα προφάρμακο. Στα προφάρμακα **13β** και **14β** λόγω της μεγάλης σταθερότητάς τους δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός γεμισταβίνης.

Όσον αφορά τη πακλιταξέλη: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ρυθμιστικό διάλυμα/MeCN ισοκρατικό για 2 λεπτά, και έπειτα gradient 70/30 ρυθμιστικό διάλυμα/MeCN έως 10/90 ρυθμιστικό διάλυμα/MeCN για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 254 nm. Τα πρότυπα χρωματογραφήματα για τα δυο προφάρμακα φαίνονται παρακάτω στην **Εικόνα 2.1.67**, ενώ τα αποτελέσματα της σταθερότητας συνοψίζονται στην **Εικόνα 2.1.68**. Τα προφάρμακα **16** και **24** εμφάνισαν μια σχετικά σημαντική σταθερότητα στο πλάσμα με  $t_{1/2}$  7 και 6 ώρες, αντίστοιχα. Ωστόσο, τα παρατηρούμενα επίπεδα της πακλιταξέλης δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλά (ελαφρώς υψηλότερα στη περίπτωση του προφαρμάκου **24**) κυρίως λόγω της δομικής της αστάθειας ή της αλληλεπίδρασής της με πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη).



**Εικόνα 2.2.67.** Χρωματογραφία HPLC **A.** Του προφαρμάκου της πακλιταξέλης **16** και **B.** του προφαρμάκου της πακλιταξέλης **24** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.

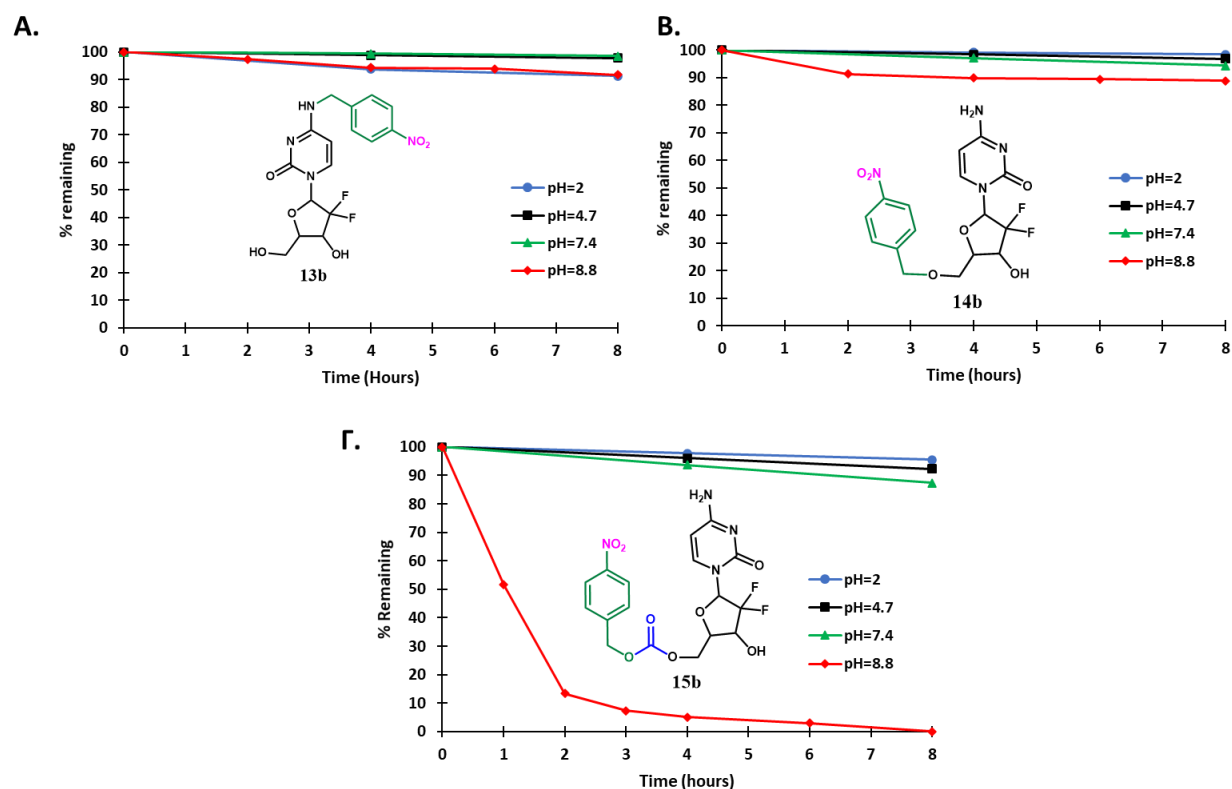


**Εικόνα 2.1.68.** Καμπύλες σταθερότητας των προφαρμάκων **16** (μπλε χρώμα) και **24** (μαύρο χρώμα), και καμπύλες σχηματισμού της πακλιταξέλης από το **16** (πράσινο χρώμα) και **24** (κόκκινο χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

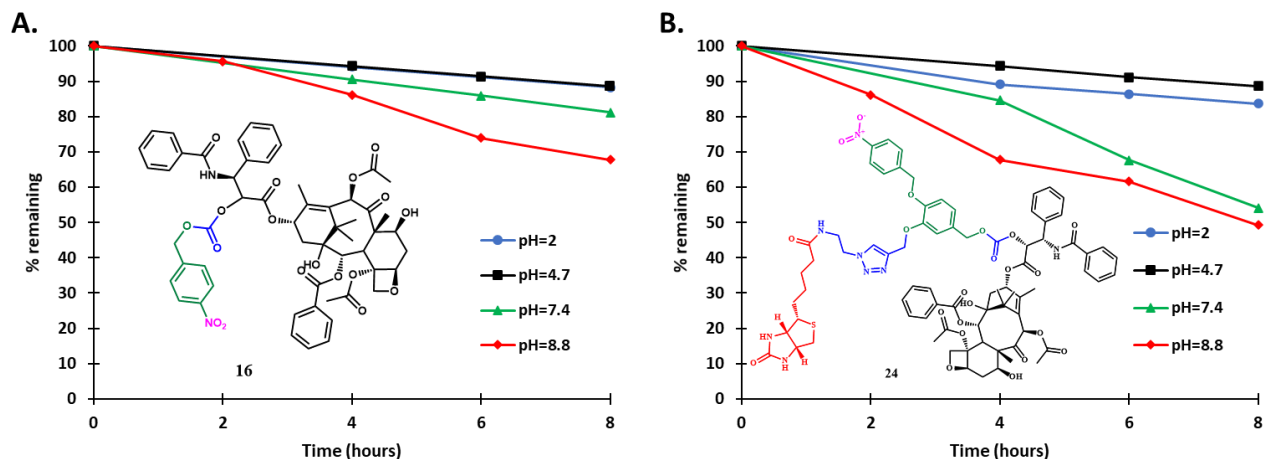
#### 2.1.6.4 Μελέτη της *in vitro* σταθερότητας των **13β**, **14β**, **15β**, **16** και **24** σε εύρος τιμών pH

Η σταθερότητα των 5 προφαρμάκων μελετήθηκε σε 4 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα 20 mM με pH: 2 (ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl), 4.7 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου), 7.4 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) και 8.8 (ρυθμιστικό διάλυμα βορονικού). 50  $\mu$ L των **13β**, **14β**, **15β**, **16** και **24** (1 mM σε DMSO) προστέθηκαν σε 500  $\mu$ L του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος και επώαστηκαν σε έναν θερμοδομητή στους 37 °C. Τριπλότυπα δείγματα των 50  $\mu$ L συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία (t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 και 8 ώρες) και η μελέτη της σταθερότητας των μορίων έγινε με αναλυτική RP-HPLC με τη μέθοδο που περιεγράφηκε προηγουμένως για το πλάσμα ανθρώπινου αίματος για κάθε προφάρμακο.

Η μελέτη σταθερότητας των προφαρμάκων της γεμισιταβίνης συνοψίζεται στην **Εικόνα 2.1.69**, ενώ των προφαρμάκων της πακλιταξέλης στην **Εικόνα 2.1.70**:



**Εικόνα 2.1.69.** Καμπύλη σταθερότητας (A) του **13β**, (B) του **14β** και (Γ) του **15β** σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.



**Εικόνα 2.1.70.** Καμπύλη σταθερότητας (A) του **16** και (B) του **24** σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Παρατηρούμε πως τα ανάλογα **13β** και **14β** είναι σταθερά σε όλα τα διαφορετικά pH λόγω του σταθερού αιθερικού δεσμού. Τα ανάλογα **15β**, **16** και **24** που περιέχουν καρβοξυ εστερικό δεσμό αναμένονταν λιγότερο σταθερά. Παρατηρήθηκε μια σχετική αστάθεια για τα ανάλογα **16** και **24** μόνο στα pH 7.4 και 8.8, ενώ το ανάλογο **15β** της γεμισιταβίνης ήταν εξαιρετικά ασταθές σε pH 8.8 με  $t_{1/2}$  περίπου 1 ώρα.

Συμπερασματικά, το προφάρμακο **13β** της γεμισιταβίνης που περιέχει τη «σκανδάλη» στη 4-NH<sub>2</sub> έδειξε το καλύτερο προφίλ, με σημαντική ενζυμική και χημική σταθερότητα και με ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τη γεμισιταβίνη. Όσον αφορά τα προφάρμακα της πακλιταξέλης, και τα δυο έδειξαν παρόμοια χημική και ενζυμική σταθερότητα ενώ το ανάλογο **16** που ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά του εμφάνισε παρόμοια δράση με της πακλιταξέλης.

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε πέντε θεραπευτικά προφάρμακα που ανταποκρίνονται στα αυξημένα επίπεδα νιτροαναγωγασών με βάση τη γεμισιταβίνη (**13β**, **14β** και **15β**) και τη πακλιταξέλη (**16** και **24**) τα οποία ανταποκρίνονται πλήρως στο εν λόγω ερέθισμα. Τα προφάρμακα **13β**, **14β**, **15β** και **16** ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους κατά δυο καρκινικών σειρών, εμφανίζοντας ελαφρώς ασθενέστερη δράση σε σύγκριση με το μητρικό φάρμακο, το οποίο ήταν πλήρως αναμενόμενο λόγω της στρατηγικής του προφαρμάκου που εφαρμόσαμε. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας της ένωσης **24** βρίσκεται εν εξελίξει. Και τα πέντε προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς την σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH με την πάροδο του χρόνου, οπότε τα προφάρμακα εμφάνισαν διαφοροποιημένες σταθερότητες αναλόγως τον συνδέτη που χρησιμοποιήθηκε στην εκάστοτε περίπτωση.





## 2.2 Θεραγωγικά προφάρμακα

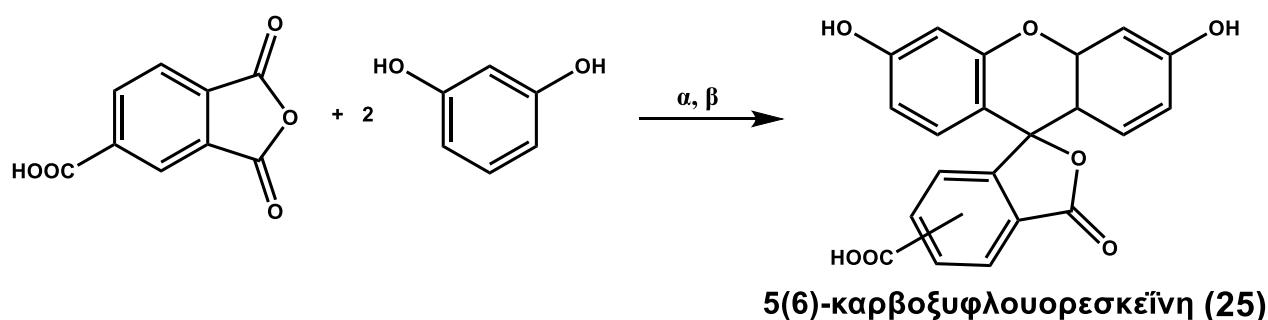
Έχοντας συνθέσει τα προαναφερθέντα εννέα θεραπευτικά προφάρμακα τα οποία στοχεύουν εκλεκτικά το μικροπεριβάλλον του καρκίνου απελευθερώνοντας το ενεργό φάρμακο, προχωρήσαμε στη σύνθεση θεραγωγικών μορίων. Τα μόρια αυτά παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης διάγνωσης και θεραπείας των καρκινικών κυττάρων. Το συμπέρασμα που απορρέει από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα είναι πως τα προφάρμακα που ανταποκρίνονται στην υποξία έδωσαν τα πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα όντας χημικά και ενζυμικά σταθερά, και με εξαιρετικά υψηλή κυτταροτοξικότητα κατά των μελετώμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επομένως, στα επικείμενα θεραγωγικά προφάρμακα επικεντρωθήκαμε στη «σκανδάλη» της νιτρο ομάδας που σε κατάσταση υποξίας προκαλεί την απελευθέρωση του ενεργού μορίου.

### Θεραγωγικά προφάρμακα της γεμισταβίνης

#### 2.2.1 1<sup>ο</sup> Θεραγωγικό προφάρμακο (Γεμισταβίνη-Φλουορεσκεΐνη)

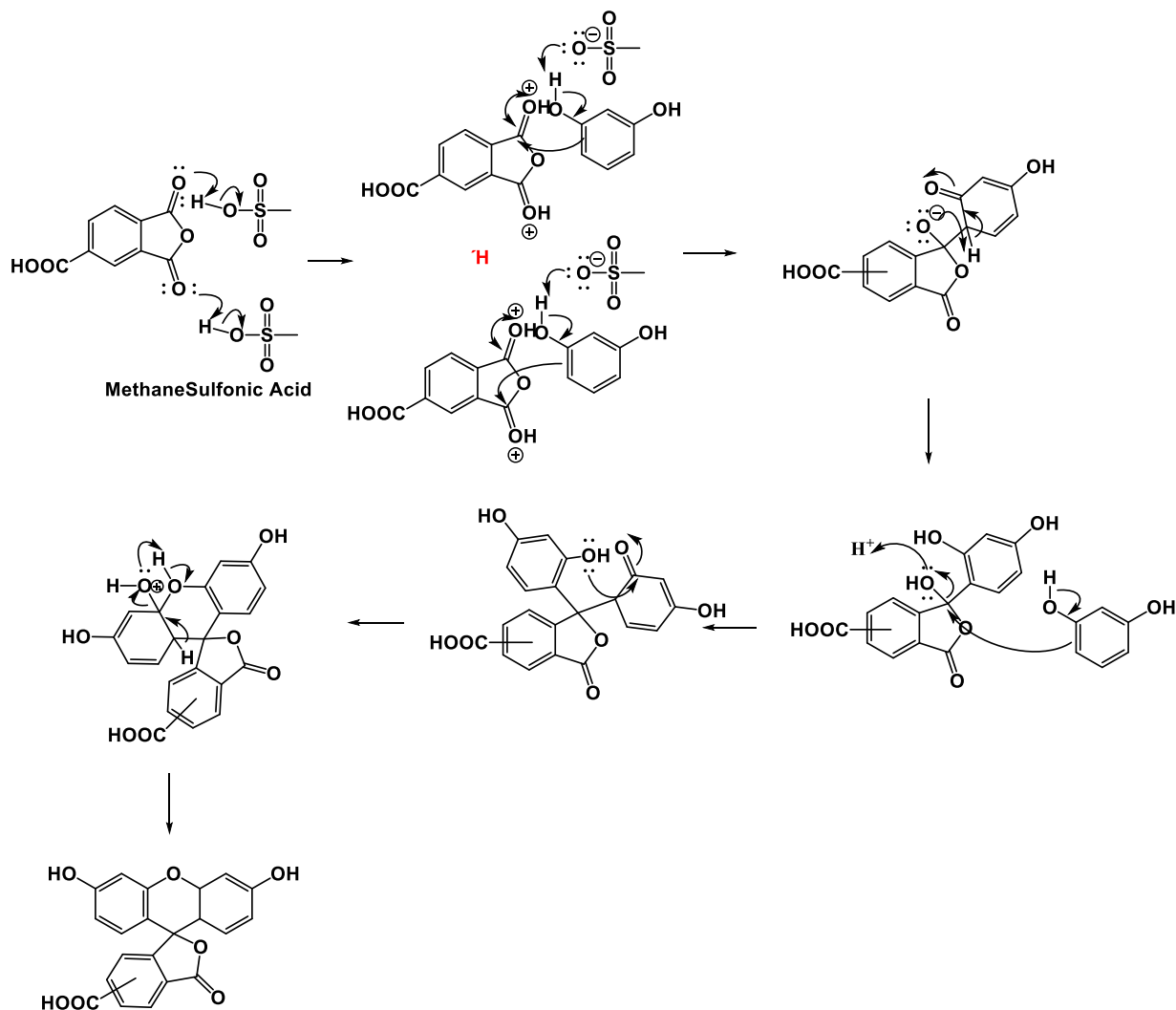
Αρχικά επικεντρωθήκαμε στη σύνθεση θεραγωγικών μορίων που θα περιέχουν τη γεμισταβίνη ως τον κυτταροτοξικό παράγοντα. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκε και συντέθηκε η χρωστική 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη, που αποτελεί ανάλογο της φλουορεσκεΐνης. Η φλουορεσκεΐνη είναι μια οργανική χρωστική που υφίσταται ως σκούρα πορτοκαλί σκόνη ελαφρώς διαλυτή στο νερό. Χρησιμοποιείται ευρέως στη μικροσκοπία λείζερ, στην εγκληματολογία και στην οφθαλμολογία. Η φλουορεσκεΐνη έχει μέγιστη απορρόφηση στα 494 nm και μέγιστη εκπομπή 512 nm (σε νερό). Τα κύρια παράγωγα είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) και η (5)6-καρβοξυφλουορεσκεΐνη που χρησιμοποιήσαμε.

Η σύνθεση της (5)6-καρβοξυφλουορεσκεΐνης, η οποία θα αποτελέσει το φορισμοφόρο τμήμα του τελικού θεραγωγικού μορίου, πραγματοποιήθηκε μέσω 2 σταδίων όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.2.1**.



**Σχήμα 2.2.1.** Η συνθετική πορεία για την παρασκευή της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης (Ένωση 25). Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) Μεθυλοσουλφονικό οξύ (1 M), 85 °C, 24 ώρες, (β) π. HCl.

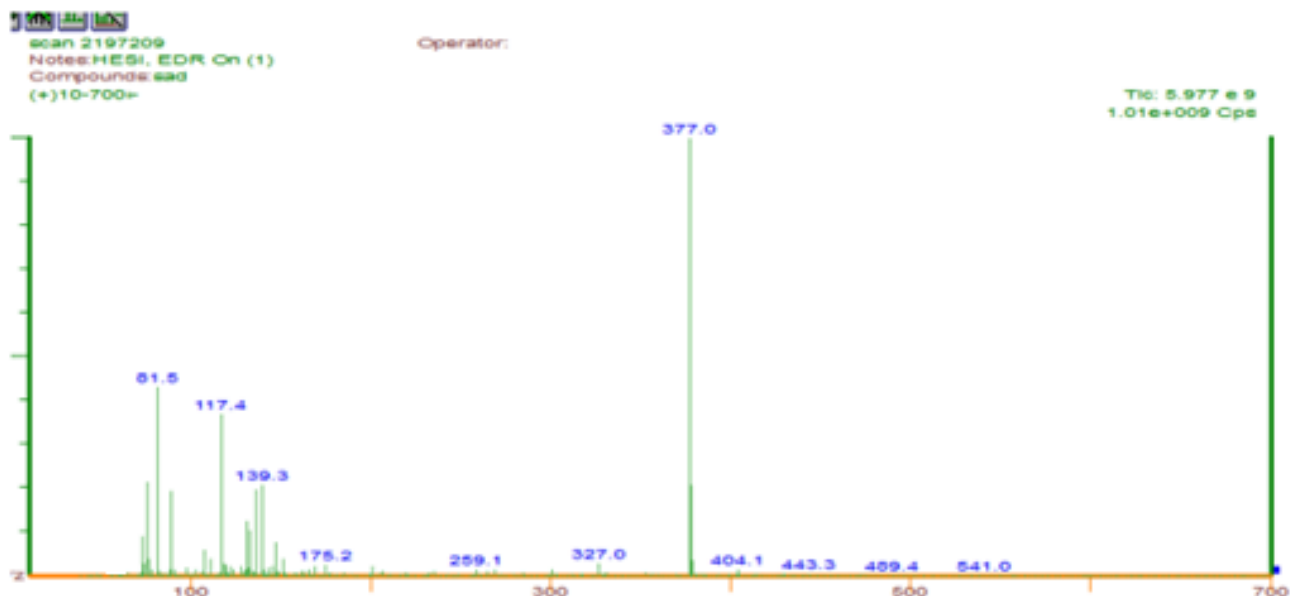
Ο μηχανισμός σχηματισμού της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη (**25**) απεικονίζεται στην **Σχήμα 2.2.2**.



### 5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη

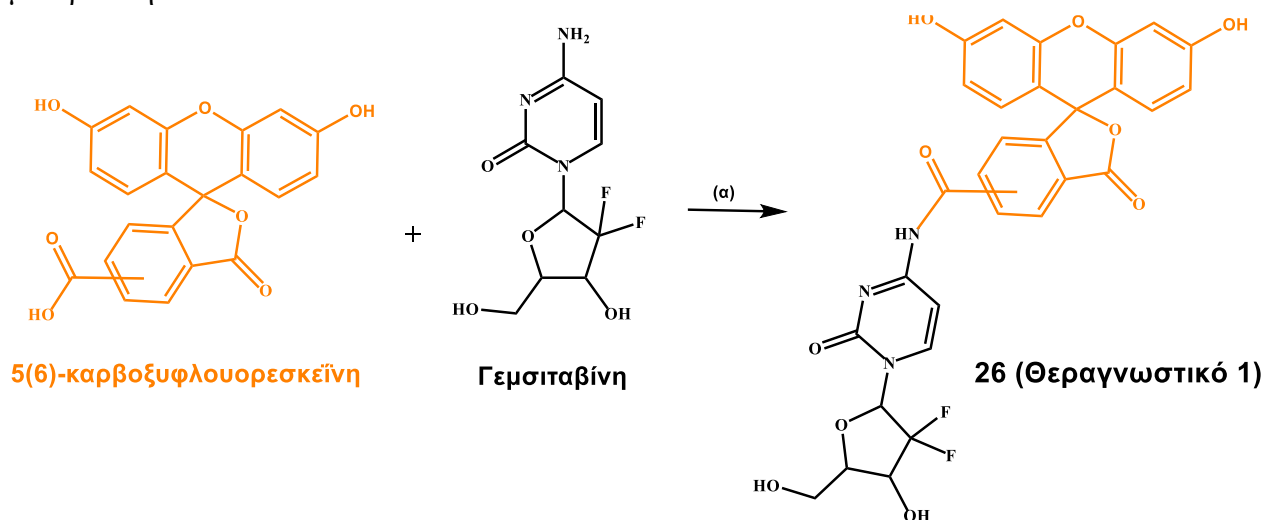
**Σχήμα 2.2.2.** Προτεινόμενος μηχανισμός του σχηματισμού της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη (ένωση **25**).

Η αποτελεσματική σύνθεση της χρωστικής επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας (**Εικόνα 2.2.1**) που έδειξε την ύπαρξη του ιόντος 377.00  $[M+H]^+$ .



Εικόνα 2.2.1. Φάσμα μάζας της 5(6)-καρβοξυφλουροεσκεΐνης (25).

Η χρωστική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απευθείας προσάρτησή της στη γεμισταβίνη για τη σύνθεση του διμοριακού θεραπευτικού μορίου Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουροεσκεΐνη (Θεραγωγικό 1 ή ένωση 26) το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 2.2.3. Ωστόσο, λόγω συζυγίας στο μόριο της γεμισταβίνης, υφίσταται απεντοπισμός των ηλεκτρονίων της αμινομάδας με αποτέλεσμα να την καθιστά ασθενές πυρηνόφιλο. Ύστερα από δοκιμές πληθώρας διαφορετικών συνθηκών, βρέθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες αντίδρασης με χρήση PyBOP και DMAP σε άνυδρο DMF, με απόδοση αντίδρασης 35.3%. Η σύζευξη θέλαμε να γίνει συγκεκριμένα στην αμινομάδα της γεμισταβίνης ώστε να μην υφίσταται άμεση απαμίνωση προς τον ανενεργό μεταβολίτη dFdU.

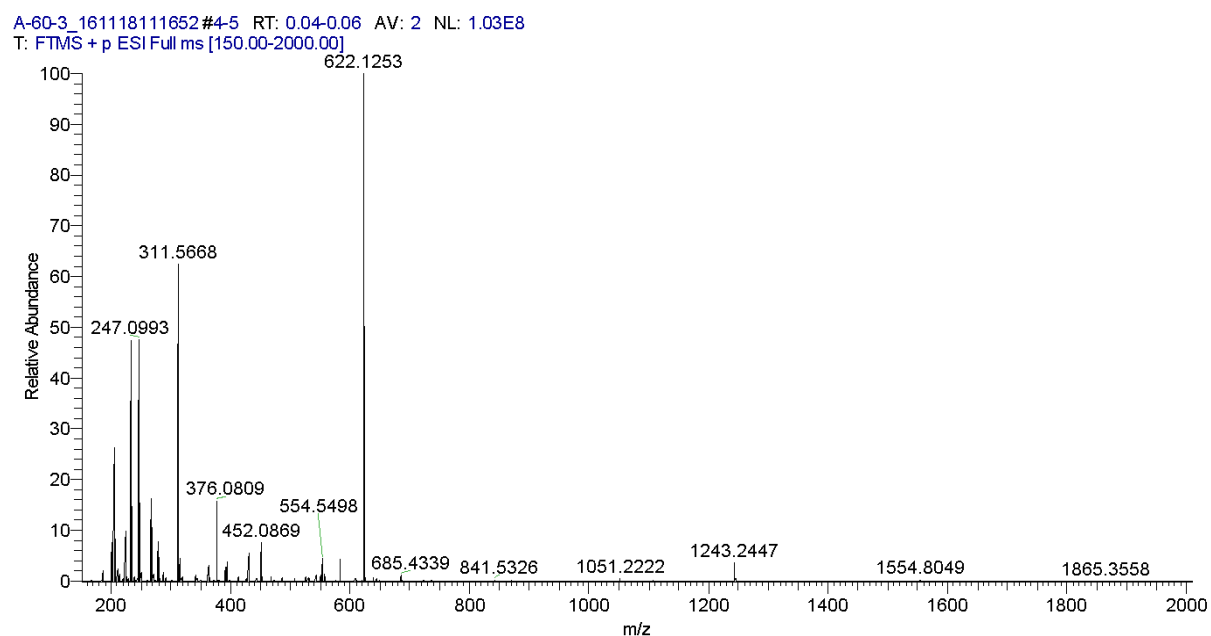


Σχήμα 2.2.3. Η συνθετική πορεία για την παρασκευή του θεραπευτικού μορίου Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουροεσκεΐνη (Θεραγωγικό 1 ή ένωση 26). Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) PyBOP,

DMAP, άνυδρο DMF, rt, 12 ώρες. Η χρωστική φαίνεται με πορτοκαλί χρώμα και η γεμισταβίνη με μαύρο.

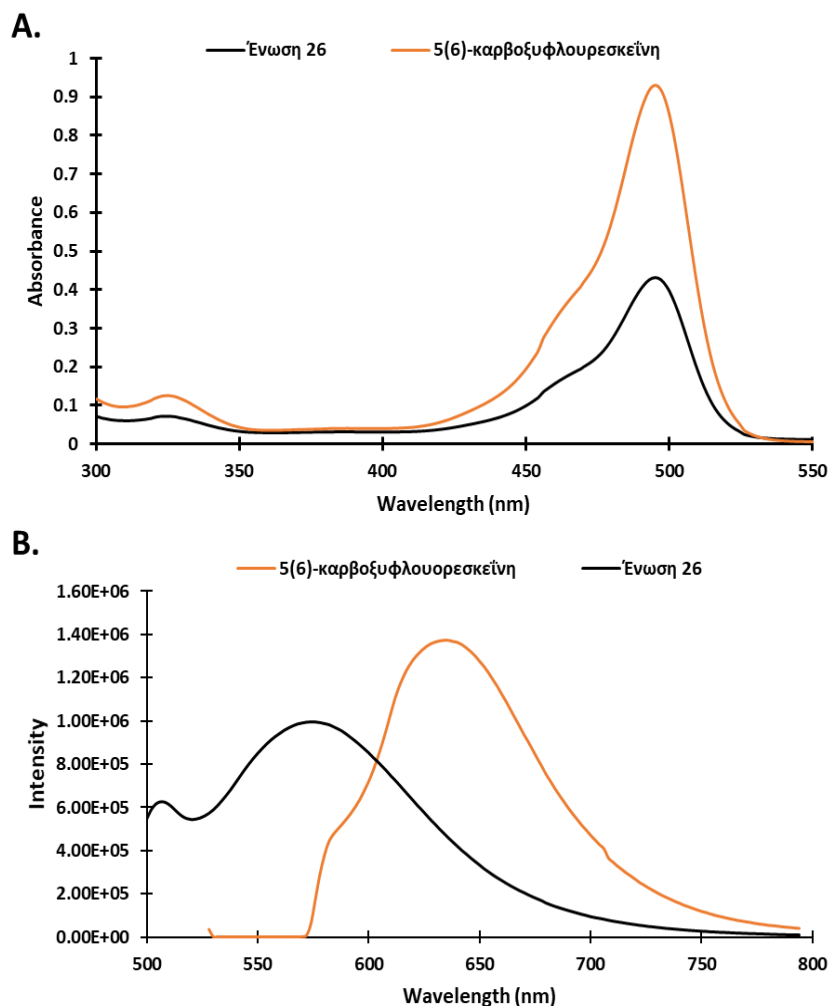
Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει αρχικά την ενεργοποίηση του καρβοξυλικού οξέος με τα αντιδραστήρια PyBOP/DMAP και έπειτα την πυρηνόφιλη άκυλο υποκατάσταση από την αμινομάδα της γεμισταβίνης υπό βασικές συνθήκες για να ληφθεί η τελική ένωση **26**.

Η αποτελεσματική σύνθεση της χρωστικής επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας (**Εικόνα 2.2.2**) που έδειξε την ύπαρξη του ιόντος 322.1253  $[M+H]^+$  και 311.5668  $[M+2H]^{2+}$ . Επίσης, για να επιβεβαιωθεί το σημείο της σύζευξης (η αμινομάδα ή κάποια υδροξυλομάδα) λήφθηκε και το φάσμα  $^1H$  NMR που έδειξε την ύπαρξη κορυφής στα 9.27 ppm που υποδηλώνει την ύπαρξη αμιδικού δεσμού.



**Εικόνα 2.2.2.** Φάσμα μάζας του θεραπευτικού μορίου Γεμισταβίνη-5(6)καρβοξυφλουρεσκεΐνη (**Θεραγωγαστικό 1**).

Αρχικά, το **Θεραγωγαστικό 1** ελέγχθηκε ως προς τις φωτοφυσικές του ιδιότητες λαμβάνοντας τα φάσματα UV-Vis (**Εικόνα 2.2.3A**) και φθορισμού (**Εικόνα 2.2.3B**) και συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα φάσματα της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνης.



**Εικόνα 2.2.3.** (Α) Φάσμα απορρόφησης και (Β) φάσμα εκπομπής (διέγερση στα 480 nm) του **Θεραγωγαστικού 1** (μαύρο χρώμα) και της χρωστικής 5(6)καρβοξυφλουρεσκεΐνη (πορτοκαλί χρώμα) σε PBS 7.4.

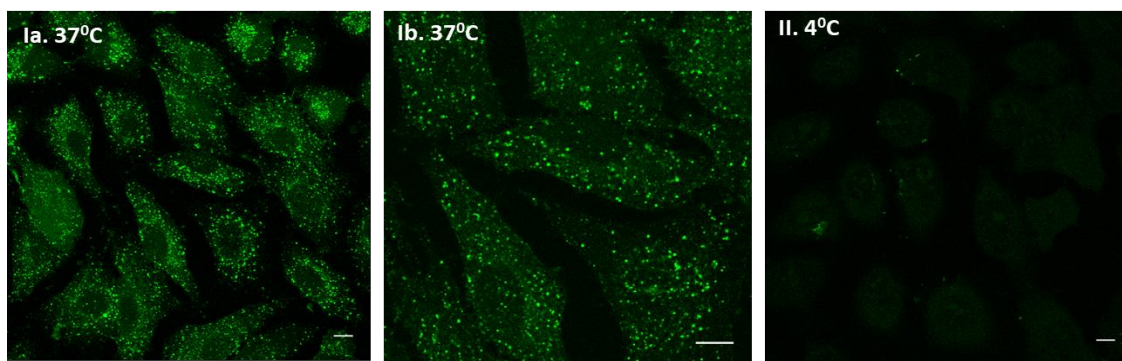
#### 2.2.1.1 Βιολογική αξιολόγηση του **Θεραγωγαστικού 1** της γεμισταβίνης

#### 2.2.1.2 Μελέτη του τρόπου εισόδου του **Θεραγωγαστικού 1** στα κύτταρα με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας

Η φλουρεσκεΐνη εισέρχεται στα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, εκτός από συγκεκριμένες περιπτώσεις που έχουν βρεθεί μεταφορείς που βοηθούν την πρόσληψή της από τα κύτταρα <sup>144</sup>. Για να μελετήσουμε την ενδοκύττωση του θεραπευτικού προφαρμάκου **1**, πραγματοποιήσαμε πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας στους 37 °C, αλλά και στους 4 °C όπου οι μηχανισμοί που χρειάζονται ενέργεια για να πραγματοποιηθούν απενεργοποιούνται (π.χ. ενδοκύττωση μέσω υποδοχέα). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα A549 επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες

σε πλάκες 24 φρεατίων ( $6 \times 10^4$  κύτταρα/φρεάτιο) για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, το μέσο καλλιέργειας ανταλλάχθηκε και τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37 °C ή στους 4 °C για 45 λεπτά, με 50 μM του **Θεραγωγιστικού 1** σε μέσο χωρίς ορό. Μετά την επώαση, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, σταθεροποιήθηκαν με 37% παραφορμαλδεΰδη και τέλος προστέθηκε 50 mM χλωριούχο αμμώνιο. Η κατανομή της ένωσης **26** αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ένα συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Γερμανία) και HCX PL APO CS 63.0x1.4 UV.

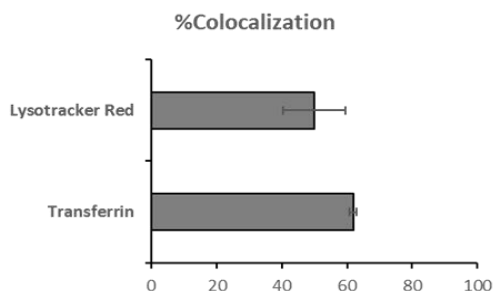
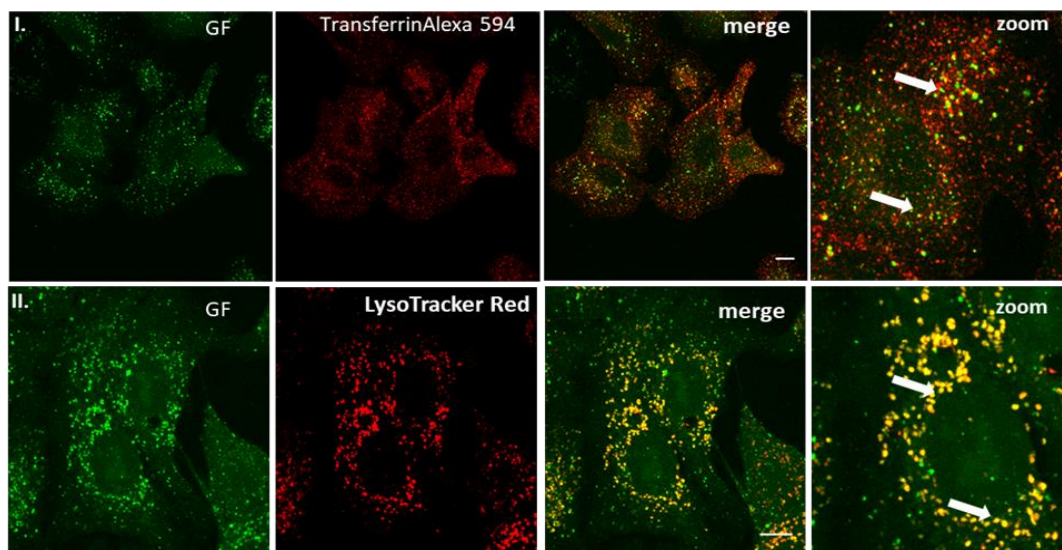
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2.4Ia** και **2.2.4Ib**, όταν καρκινικά κύτταρα A549 επώαστηκαν στους 37 °C με το **Θεραγωγιστικό 1**, παρατηρήθηκε η ενδοκύττωση του. Αντίθετα, όταν το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε στους 4 °C (**Εικόνα 2.2.4II**), δεν παρατηρήθηκε η ενδοκύττωση του μορίου. Αυτό υποδηλώνει πως το μόριο εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί ενέργεια (π.χ. μέσω υποδοχέα) και όχι μέσω παθητικής διάχυσης. Το αποτέλεσμα αυτό μας κίνησε το ενδιαφέρον καθώς παρόμοια μόρια της βιβλιογραφίας με τροποποιήσεις στην 4-NH<sub>2</sub> ομάδα της γεμισιταβίνης εισέρχονται στα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης<sup>145</sup>.



**Εικόνα 2.2.4.** Μελέτη της ενδοκύττωσης του **Θεραγωγιστικού 1** σε καρκινική κυτταρική σειρά A549 (καρκίνος του πνεύμονα). Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν με 50 μM του **Θεραγωγιστικού 1** για 45 λεπτά στους 37 °C (**Ia** και **Ib**) ή στους 4 °C (**II**). Τα δείγματα αναλύθηκαν με LSCM χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο Leica Sp5. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Dr. Carol Murphy στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στα Ιωάννινα.

Έχοντας επιβεβαιώσει την επιτυχή ενδοκύττωση του **Θεραγωγιστικού 1** θελήσαμε να εξακριβώσουμε τον μηχανισμό εισόδου. Αρχικά συγκρίναμε την τοποθέτηση του σε σχέση με το σύζευγμα Transferrin-Alexa 549 με συνεστιακή μικροσκοπία. Για τον λόγο αυτό, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία όπως περιεγράφηκε προηγουμένως με την διαφορά ότι τα κύτταρα επώαστηκαν με 50 μM του **Θεραγωγιστικού 1** και ταυτόχρονα προστέθηκε Transferrin-Alexa Fluor 568 (Invitrogen T23365) στους 25 μg / mL στους 37 °C για 45 λεπτά. Η τρανσφερίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες για την αποσαφήνιση της ενδοκύττωσης μέσω κλαθρίνης, καθώς είναι γνωστό ότι εισέρχεται στο κύτταρο μέσω αυτής της ενδοκυτταρικής οδού. Η

τρανσφερίνη μπορεί να βρεθεί σε στατικά και επίσης δυναμικά πρώιμα ενδοσώματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οπτικοποίηση τόσο των πρώιμων, όσο και των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Όπως παρατηρήσαμε, η οπτικοποίηση του **Θεραγωγιστικού 1** συμπίπτει με αυτή της τρανσφερίνης σε κύτταρα A549 μετά από 45 λεπτά επώασης, υποδηλώνοντας ότι ακολουθεί την ίδια οδό ενδοκύττωσης μέσω κλαθρίνης (**Εικόνα 2.2.5I**). Μετά την ενδοκυτταρική εσωτερίκευση, το **Θεραγωγιστικό 1** αναμενόταν να μετακινηθεί σε άλλα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα με προοδευτικά χαμηλότερο pH και υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμων και τελικά να εισέλθει στα λυσοσώματα και να αποσυνδεθεί. Για τον λόγο αυτό, διερευνήσαμε την ενδοκυτταρική τοποθεσία του χρησιμοποιώντας το LysoTracker Red, έναν λυσοσωμικό δείκτη. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 50  $\mu\text{M}$  του **Θεραγωγιστικού 1** και ταυτόχρονα με 10  $\mu\text{M}$  LysoTracker Red DND99 (Invitrogen, L7528) στους 37 ° C για 45 λεπτά. Παρατηρήσαμε μεγάλη αλληλοεπικάλυψη μετά από 45 λεπτά (**Εικόνα 2.2.5II**), επιβεβαιώνοντας την αρχική μας υπόθεση ότι το **Θεραγωγιστικό 1** μεταφέρεται απευθείας στα λυσοσώματα μετά την ενδοκύττωση.

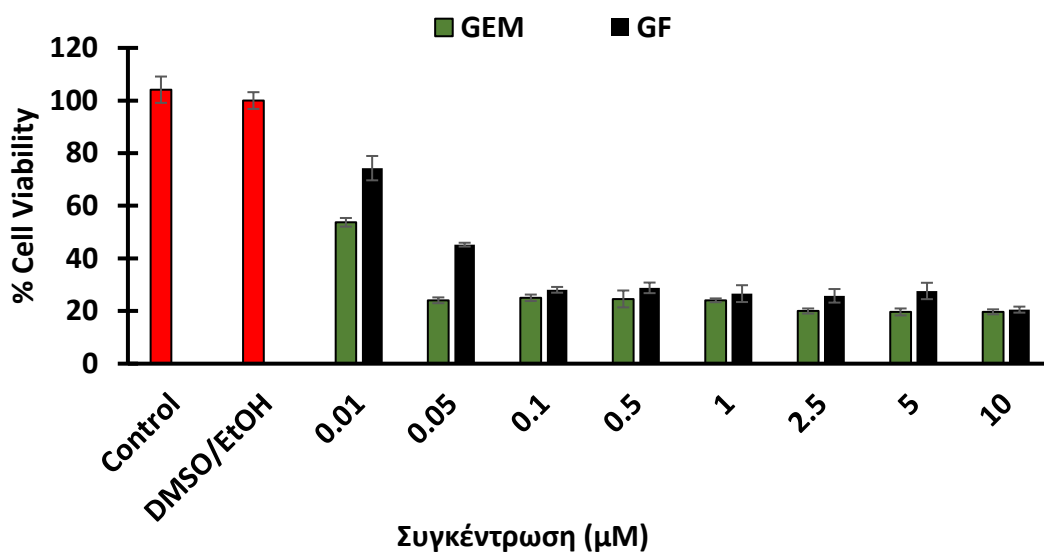


**Εικόνα 2.2.5.** Μελέτη της αλληλοεπικάλυψης του **Θεραγωγιστικού 1** με την *Transferrin-Alexa 594* και με την *LysoTracker Red* σε κύτταρα A549. Τα κύτταρα A549 επώαστηκαν στους 37 °C με 50  $\mu\text{M}$  του **Θεραγωγιστικού 1** και 25  $\mu\text{g/mL}$  *Transferrin-Alexa-594* (I) ή 10  $\mu\text{M}$  *LysoTracker Red* (II) για 45 λεπτά στους 37 °C. Οι γκρι στήλες υποδεικνύουν το ποσοστό του ανοσοφθορισμού του **Θεραγωγιστικού 1** με τον ανοσοφθορισμό της *LysoTracker Red* και της 594 *Transferrin-Alexa*. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος  $\pm$  s.e.m δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, καθένα από τα οποία αξιολογεί

10-15 κύτταρα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Dr. Carol Murphy στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στα Ιωάννινα.

### 2.2.1.3 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του **Θεραγωγαστικού 1** έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549

Έπειτα, προβήκαμε στη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας του **Θεραγωγαστικού 1** και της γεμισιταβίνης σε καρκινική κυτταρική σειρά A549 (**Εικόνα 2.2.6**) σε συγκεντρώσεις 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 και 10  $\mu\text{M}$ . Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ενώσεις στους 37 °C σε μια υγραμένη ατμόσφαιρα (5% CO<sub>2</sub>). Μετά από 72 ώρες επώασης, προστέθηκαν 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος MTT (5 mg/mL σε PBS) σε κάθε φρεάτιο και επώαστηκαν για 4 ώρες. Στη συνέχεια, το μέσο αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  DMSO σε κάθε φρεάτιο. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε μέσω ενός αναγνώστη πλακών Elisa (Awareness Technology Inc). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540 nm ενώ ένα διαφορικό φίλτρο ρυθμίστηκε στα 630 nm. Κάθε συγκέντρωση εφαρμόστηκε εις τριπλούν.



**Εικόνα 2.2.6.** Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του **Θεραγωγαστικού 1** (GF) και της γεμισιταβίνης (GEM) σε κύτταρα A549 (1500 κύτταρα/φρεάτιο) μέσω της μεθόδου MTT μετά από επώαση για 72 ώρες.

Σύμφωνα με τα πειράματα κυτταροτοξικότητας θα μπορούσαμε να αποφανθούμε πως το θεραπευτικό προφάρμακο διατηρεί τη δράση της γεμισιταβίνης, παρουσιάζοντας παρόμοια δράση σε όλο το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων.

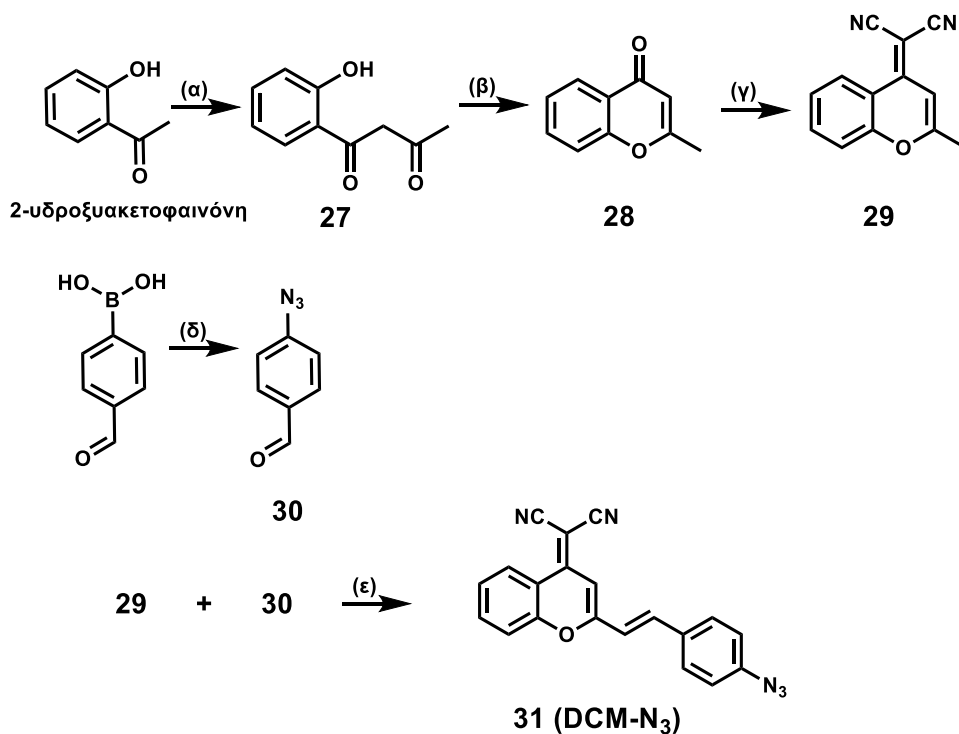
Επιπλέον πειράματα μικροσκοπίας πραγματοποιούνται από συνεργάτες για να βρεθεί ο ακριβής τρόπος εισόδου και δράσης του **Θεραγωγαστικού 1**. Ακόμη, διενεργούνται πειράματα



κυτταροτοξικότητας σε διάφορες κυτταρικές σειρές και πειράματα σταθερότητας σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.

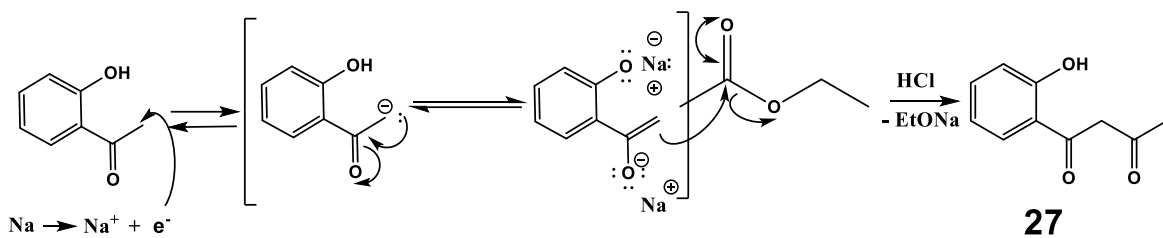
### 2.2.2 2° & 3° Θεραγωγαστικό προφάρμακο (Γεμισιταβίνη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική)

Εν συνεχεία, προχωρήσαμε στη σύνθεση άλλων 2 θεραγωγαστικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης που ανταποκρίνονται σε περιβάλλον υποξίας απελευθερώνοντας το ενεργό φάρμακο. Για τη σύνθεση αυτών των δυο θεραγωγαστικών χρειάστηκε η σύνθεση μιας νέας φθορισμοφόρας ένωσης, η οποία λειτουργεί στο εγγύς υπέρυθρο (NIR), η δομή και η πειραματική πορεία της οποίας φαίνεται στο **Σχήμα 2.2.4**. Ο κορμός της χρωστικής αυτής που αποτελείται από τους 3 δακτυλίους (το βενζοπυράνιο συζευγμένο με έναν επιπλέον βενζολικό δακτύλιο) είναι γνωστή ως DCM, ενώ συνήθως γίνονται τροποποιήσεις στον δεξί βενζολικό δακτύλιο.



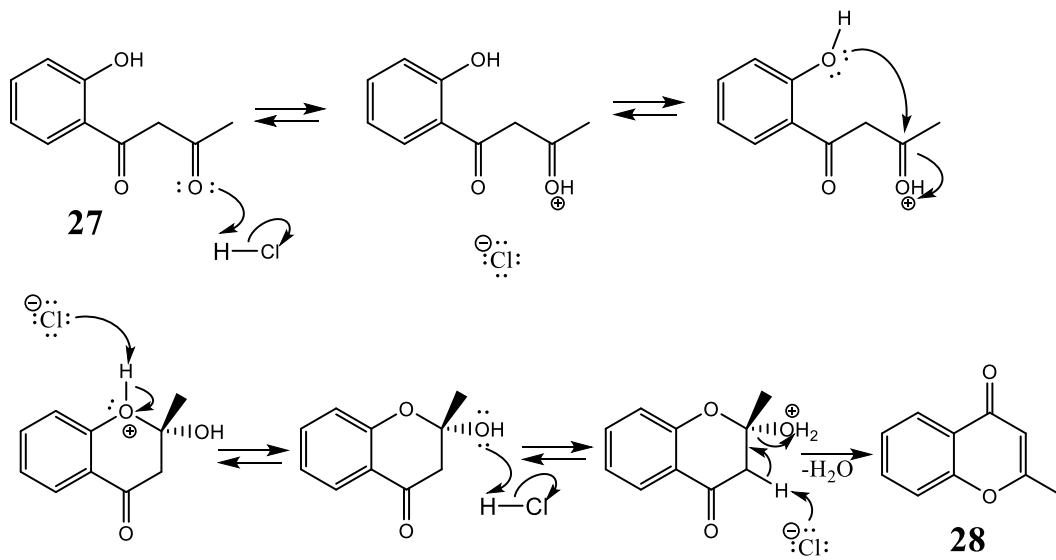
**Σχήμα 2.2.4.** Η συνθετική πορεία για την παρασκευή της χρωστικής DCM-N<sub>3</sub> που εκπέμπει στο NIR φάσμα και χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των θεραγωγαστικών μορίων της γεμισιταβίνης. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) Μεταλλικό Na, άνυδρος EtOAc, rt, 4 ώρες, (β) HCl, MeOH, rt, 4 ώρες, (γ) μαλονονιτρίλιο, οξικός ανυδρίτης, reflux, 6 ώρες, (δ) NaN<sub>3</sub>, CuAc, MeOH, reflux, 6 ώρες, (ε) άνυδρο MeCN, κατ. πιπεριδίνη, reflux, 6 ώρες.

Ξεκινώντας από την 2-υδροξυακετοφαινόνη και μέσω μιας αλδολικής συμπύκνωσης, και συγκεκριμένα συμπύκνωσης Claisen, με χρήση μεταλλικού νατρίου σε άνυδρο οξικό αιθυλεστέρα προέκυψε η ενδιάμεση ένωση 27 (**Σχήμα 2.2.5**).



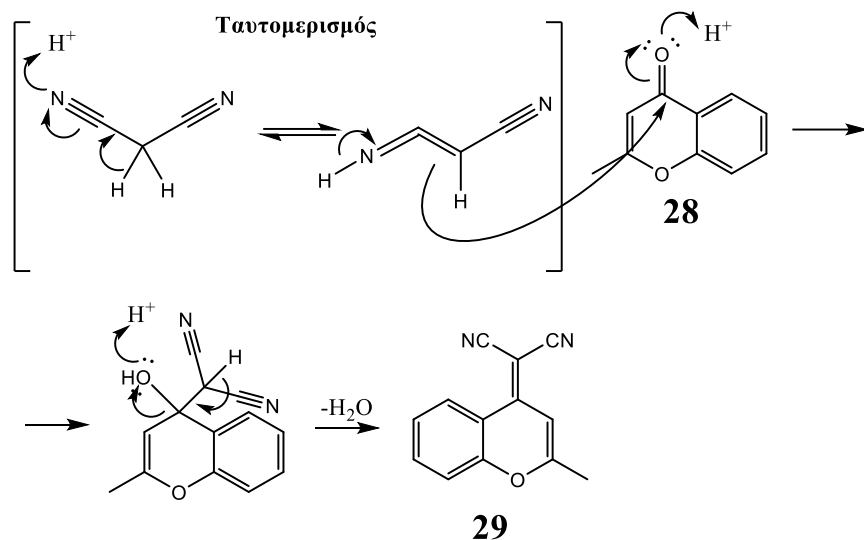
**Σχήμα 2.2.5.** Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **27** μέσω μιας συμπύκνωσης Claisen.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την ενδομοριακή κυκλοποίηση της ένωσης **27** με χρήση HCl και μεθανόλης για να προκύψει η ένωση **28** (Σχήμα 2.2.6). Εφόσον πραγματοποιηθεί η πυρηνόφιλη προσθήκη της φαινολικής υδροξυλομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα, έπειτα συμβαίνει απόσπαση ενός μορίου νερού (αφυδάτωση) για δημιουργηθεί ο ολεφινικός δεσμός.



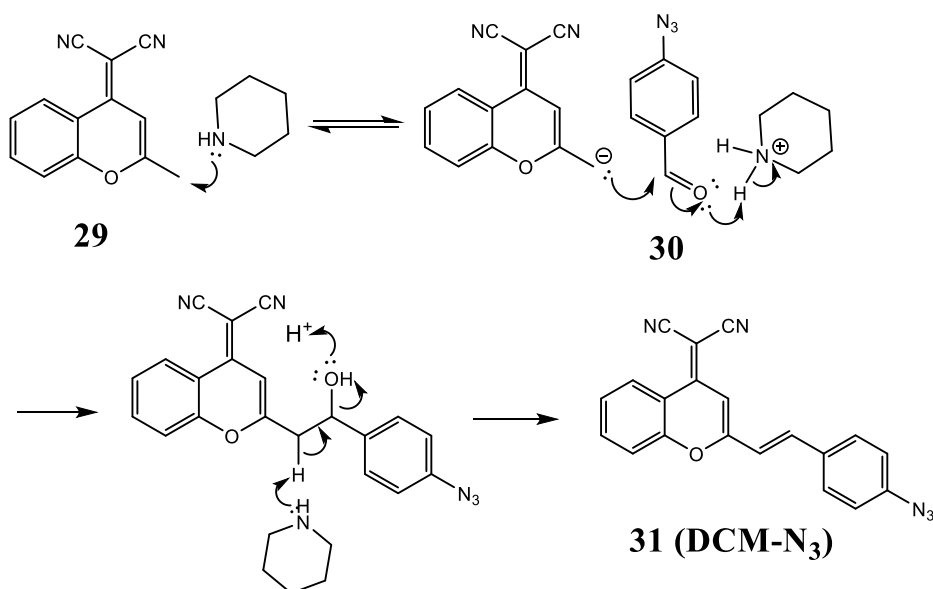
**Σχήμα 2.2.6.** Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **28** μέσω μιας ενδομοριακής κυκλοποίησης με απόσπαση ενός μορίου νερού.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει μια τυπική συμπύκνωση Knoevenagel σε οξικό ανυδρίτη (Σχήμα 2.2.7) <sup>146</sup>. Το μαλονονιτρίλιο προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα της ένωσης **28** που αποτελεί ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο κέντρο λόγω πόλωσης δ<sup>+</sup> από την πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου. Μετά από αφυδάτωση προκύπτει η ένωση **29**.



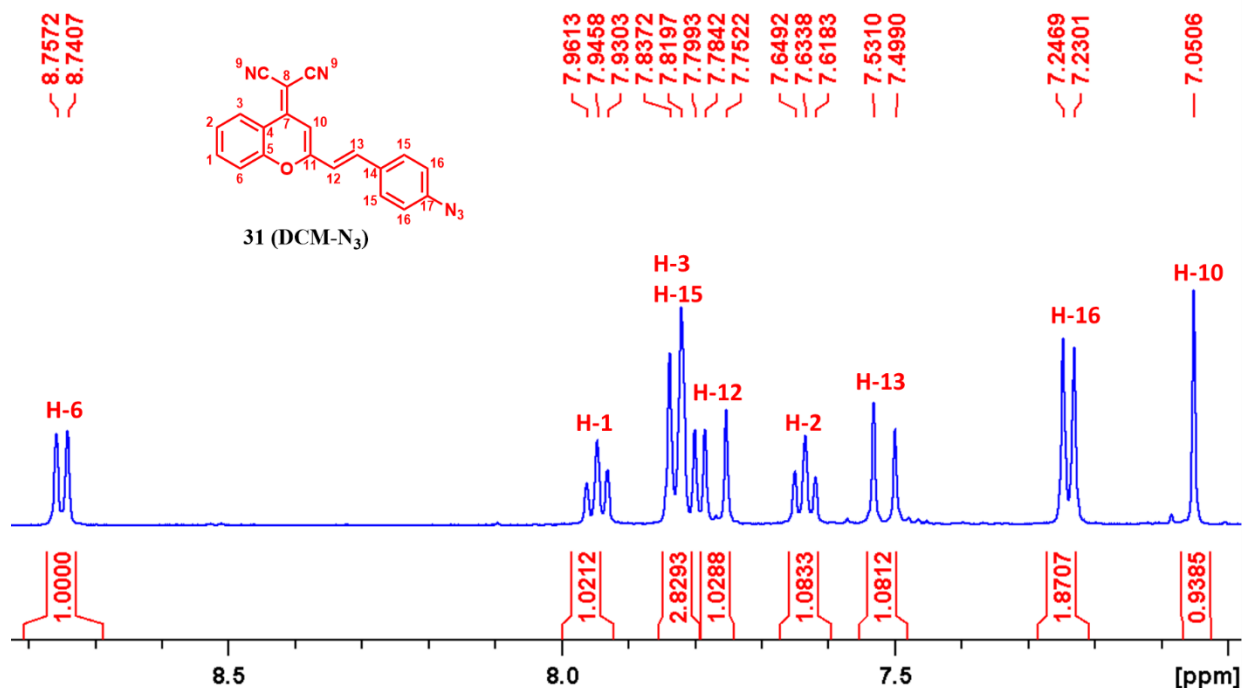
**Σχήμα 2.2.7.** Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **29** μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel.

Η ένωση **29** αντιδρά με την ένωση **30**, η οποία συντίθεται από το 4-φορμυλφαινυλβορονικό οξύ,  $\text{NaN}_3$  και  $\text{CuAc}$  (καταλύτης) μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης Chan-Lam, για τη σύνθεση της ένωσης **31** μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel σε ακετονιτρίλιο με καταλυτική ποσότητα πιπεριδίνης για την απόσπαση του όξινου πρωτονίου της ένωσης **29**<sup>146</sup>. Ο μηχανισμός παρουσιάζεται στην **Σχήμα 2.2.8**.



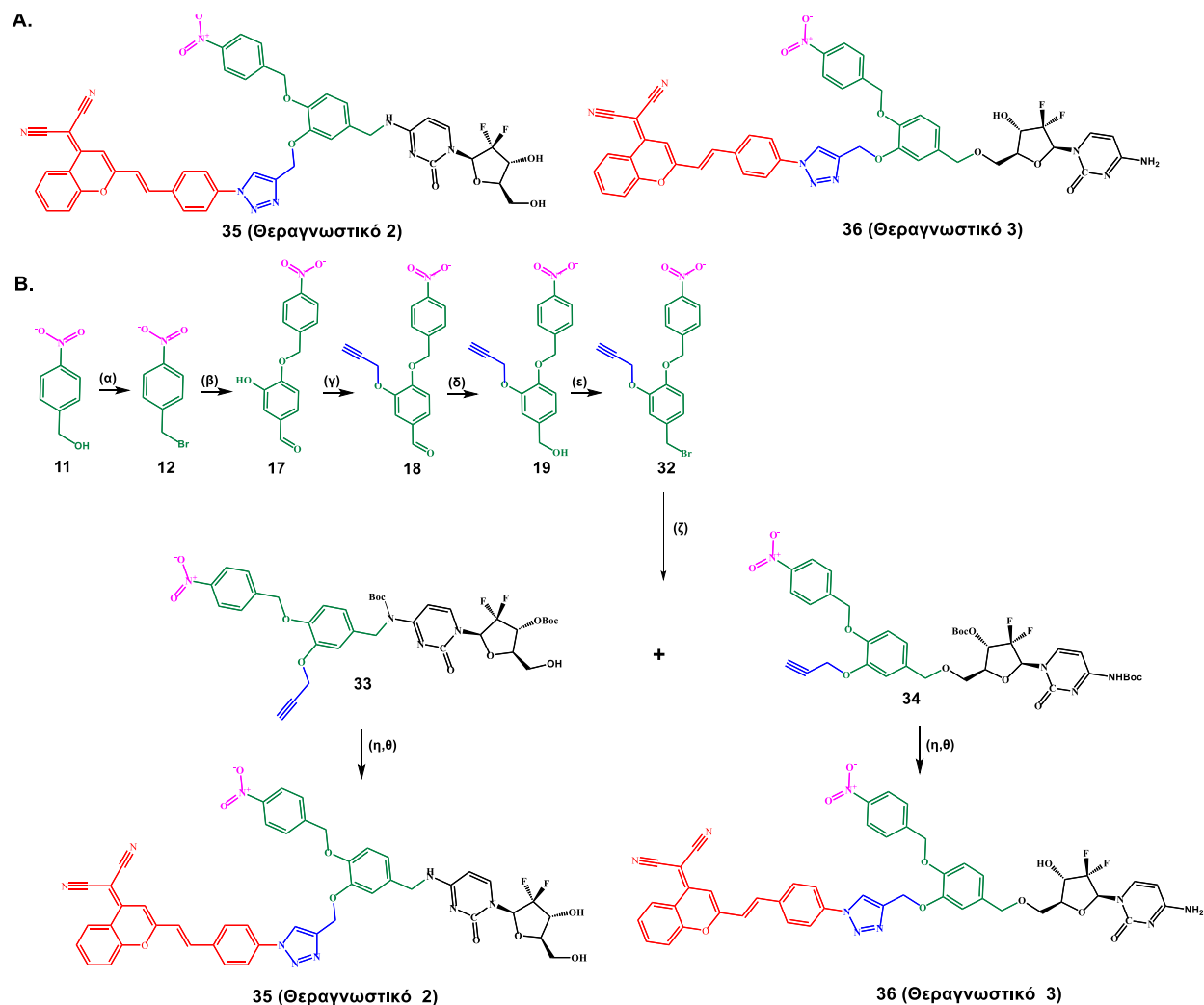
**Σχήμα 2.2.8.** Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **31 (DCM-N<sub>3</sub>)** μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel.

Η τελική χρωστική **DCM-N<sub>3</sub>** που φέρει ελεύθερο αζίδιο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR (**Εικόνα 2.2.7**) που έδειξε όλες τις αναμενόμενες κορυφές, με χαρακτηριστικές τις δυο διπλές στα 7.76 ppm και 7.51 ppm με ολοκλήρωση 1 και με <sup>3</sup>J = 16 Hz, που προέρχονται από τα 2 trans βινυλικά πρωτόνια.



**Εικόνα 2.2.7.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης **31 (DCM-N<sub>3</sub>)** σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).

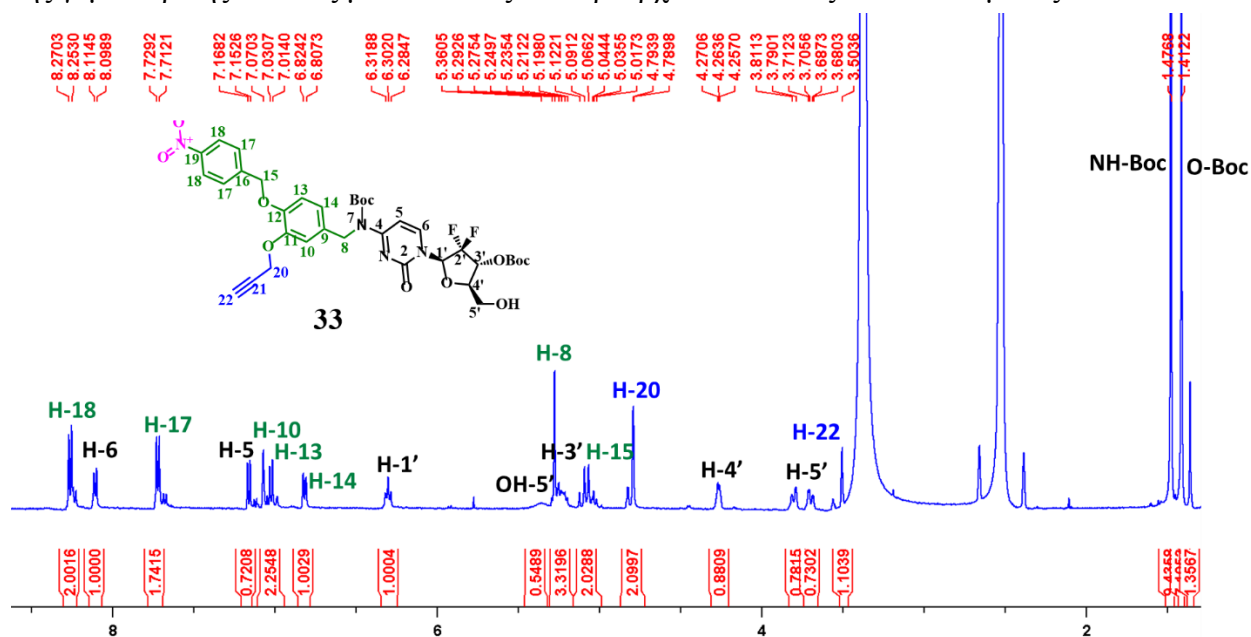
Έχοντας ολοκληρώσει τη σύνθεση της χρωστικής NIR προχωρήσαμε στη σύνθεση του υπόλοιπου δομικού τμήματος των δυο νέων θεραπευτικών μορίων (**Θεραγωγικό 2** και **Θεραγωγικό 3**), οι δομές των οποίων φαίνονται στο **Σχήμα 2.2.9A**. Για τη σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε η ένωση **19** της οποίας η σύνθεση είχε περιγραφεί στην ενότητα 2.1.5. Η ολική συνθετική πορεία για τα 2 θεραπευτικά μόρια απεικονίζεται στο **Σχήμα 2.2.9B**.



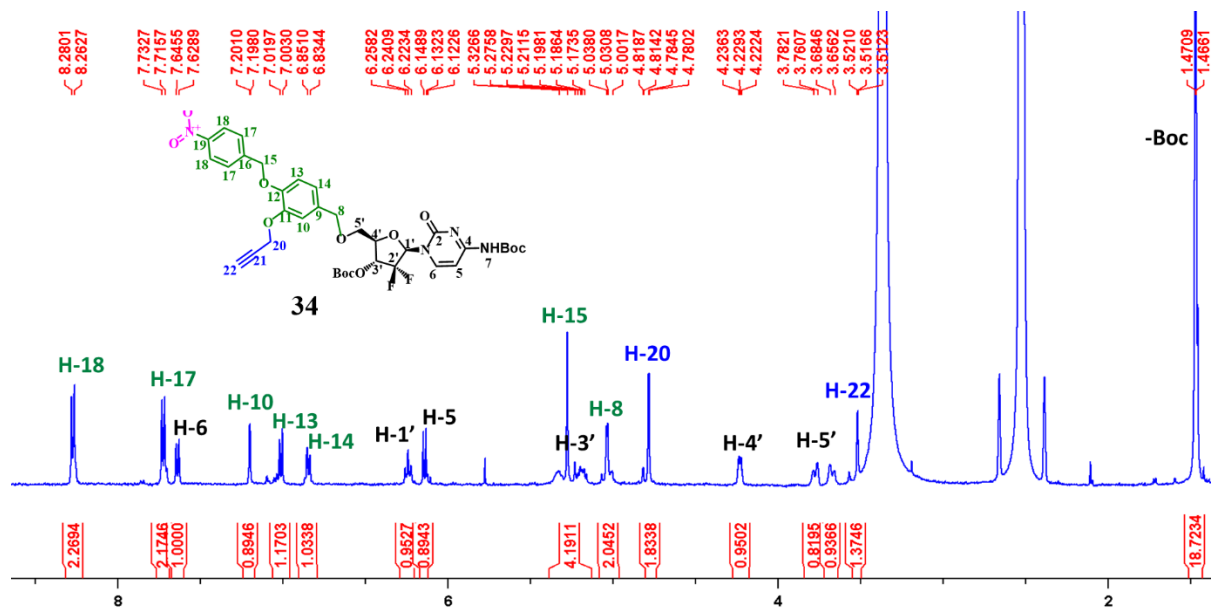
**Σχήμα 2.2.9.** (A) Δομές των δυο θεραγωγαστικών μορίων της γεμισαβίνης: **Θεραγωγαστικό 2** και **Θεραγωγαστικό 3**. (B) Σχηματική απεικόνιση των συνθετικών πορειών για την παρασκευή των δυο θεραγωγαστικών. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α)  $PBr_3$ , άνυδρο  $CH_2Cl_2$ , rt, 2 ώρες, (β) 3,4-διυδροξυβενζαλδεΰδη,  $K_2CO_3$ , ακετόνη, rt, 12 ώρες, (γ) 3-βρωμοπροπύλιο,  $K_2CO_3$ , ακετόνη, 40 °C, 12 ώρες, (δ)  $NaBH_4$ , απόλυτη  $EtOH$ , rt, 3 ώρες, (ε)  $PBr_3$ , άνυδρο  $CH_2Cl_2$ , rt, 2 ώρες, (ζ) Gem2,  $K_2CO_3$ , άνυδρο  $MeCN$ , reflux, 12 ώρες, (η)  $DCM-N_3$ ,  $CuI$ ,  $TEA$ ,  $MeOH/CH_2Cl_2$  (1:2), rt, 12 ώρες, (θ)  $CH_2Cl_2/TFA$  (4:1), rt, 2 ώρες. Οι συνδέτες παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, η χρωστική με κόκκινο, ο αυτο-διασπώμενος συνδέτης με πράσινο, η «σκανδάλη» με μωβ και η γεμισαβίνη με μαύρο.

Η ένωση **19**, της οποίας η σύνθεση έχει περιγραφεί στην ενότητα 2.1.5, μετατράπηκε στο αντίστοιχο βρωμίδιο **32** με χρήση  $PBr_3$  σε απόλυτη αιθανόλη. Η ένωση **32** χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση χωρίς καθαρισμό ή χαρακτηρισμό, παρά μόνο βάσει TLC που έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης και την παραγωγή ενός λιγότερο πολικού προϊόντος.

Έπειτα, η ένωση **32** αντέδρασε με την προστατευμένη γεμισταβίνη Gem2 για να δώσει την ένωση **34** αλλά λάβαμε το μίγμα των προϊόντων **33** και **34** σε αναλογία 3:1. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσία βασικών συνθηκών ( $K_2CO_3$ ) και οι μηχανισμοί για τη λήψη των 2 προϊόντων αποτελούν πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις, παρόμοιες με αυτές που περιεγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Οι δυο ενώσεις διαχωρίστηκαν με RP-HPLC και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία  $^1H$  NMR (Εικόνα 2.2.8 και Εικόνα 2.2.9). Η διαφορά στα φάσματα  $^1H$  NMR έγκειται κυρίως στις μετατοπίσεις των πρωτονίων της κυτοσίνης της γεμισταβίνης και στις μετατοπίσεις που προέρχονται από τις δυο Boc- ομάδες.



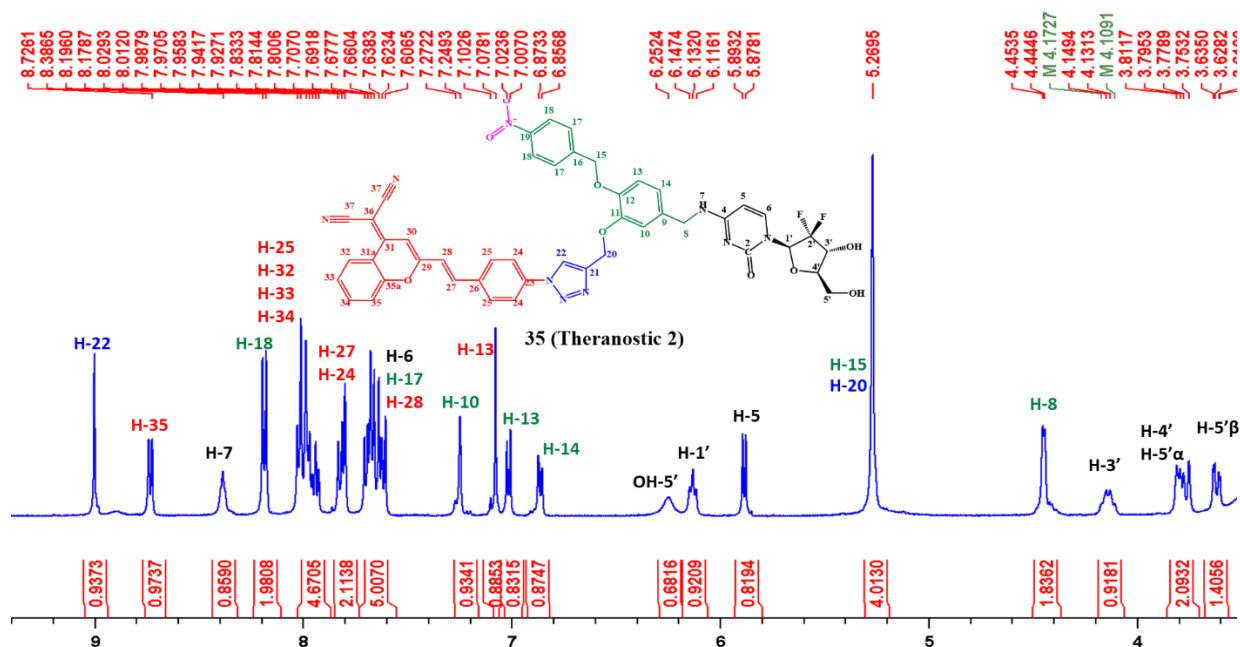
Εικόνα 2.2.8. Φάσμα  $^1H$  NMR της ένωσης **33** σε  $DMSO-d_6$  (400 MHz, 25 °C).



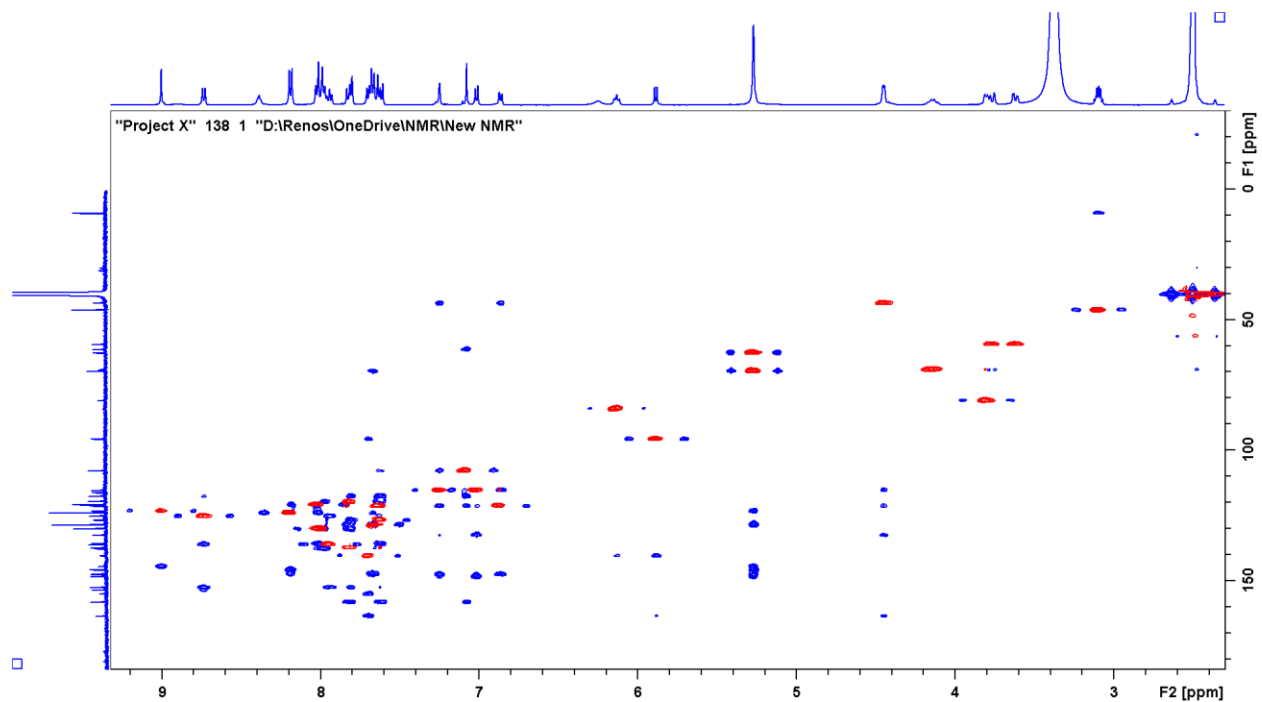
Εικόνα 2.2.9. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **34** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε την προσάρτηση της χρωστικής DCM- $\text{N}_3$  με κλικ χημεία μέσω ενός 1,4-διυποκατεστημένου τριαζολικού δακτυλίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με καταλύτη Cu(I) σε μίγμα μεθανόλης/διχλωρομεθανίου και παρακολούθηθηκε με TLC που έδειξε την κατανάλωση των αρχικών ενώσεων (**33** και **34**) και την εμφάνιση ενός νέου προϊόντος κίτρινου χρώματος. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, προχωρήσαμε στην επόμενη αντίδραση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η επόμενη αντίδραση περιλάμβανε την αποκοπή των Boc- ομάδων με χρήση διαλύματος  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$  (4:1). Τα δυο τελικά προϊόντα (**Θεραγωγαστικό 2** και **Θεραγωγαστικό 3**) καθαρίστηκαν με RP-HPLC και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία 1D/2D NMR και φασματομετρία μάζας.

Το **Θεραγωγαστικό 2** χαρακτηρίστηκε με  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.2.10), με 2D  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSCQ-HMBC (Εικόνα 2.2.11) και με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.2.12). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των 2D  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSCQ-HMBC μας επιβεβαίωσαν το ακριβές προϊόν (αντίδραση στην - $\text{NH}_2$  της γεμισιταβίνης). Το φάσμα μάζας έδειξε το αναμενόμενο ιόν 896.2596  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

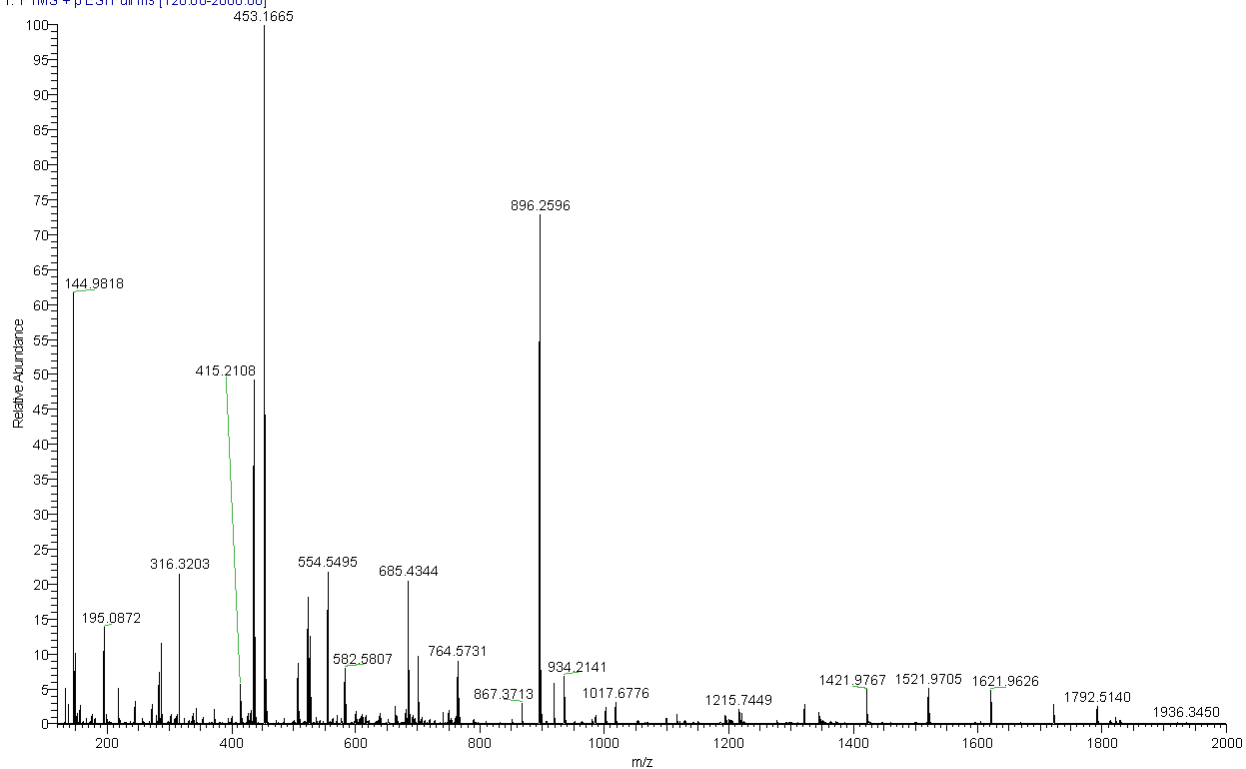


Εικόνα 2.2.10. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του **Θεραγωγαστικού 2** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.2.11.** Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) του Θεραγωγικού 2 σε  $\text{DMSO-d}_6$  (500 MHz, 25 °C).

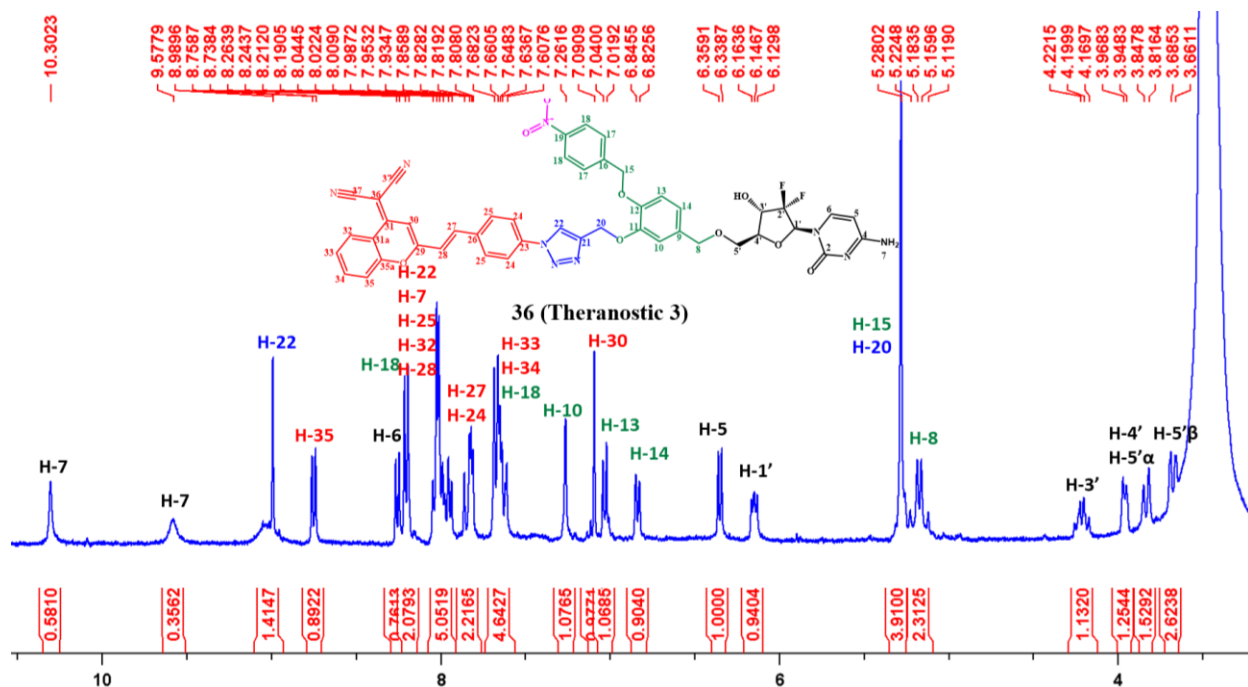
X-114\_210211104729 #31 RT: 0.45 AV: 1 NL: 6.82E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-2000.00]



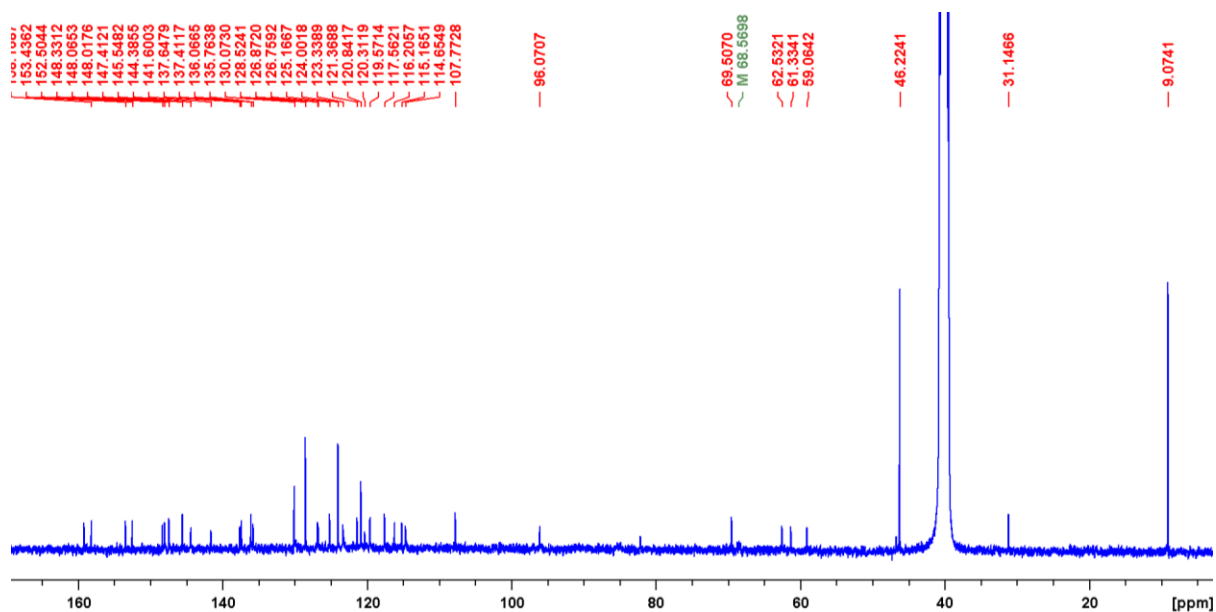
**Εικόνα 2.2.12.** Φάσμα μάζας του Θεραγωγικού 2.



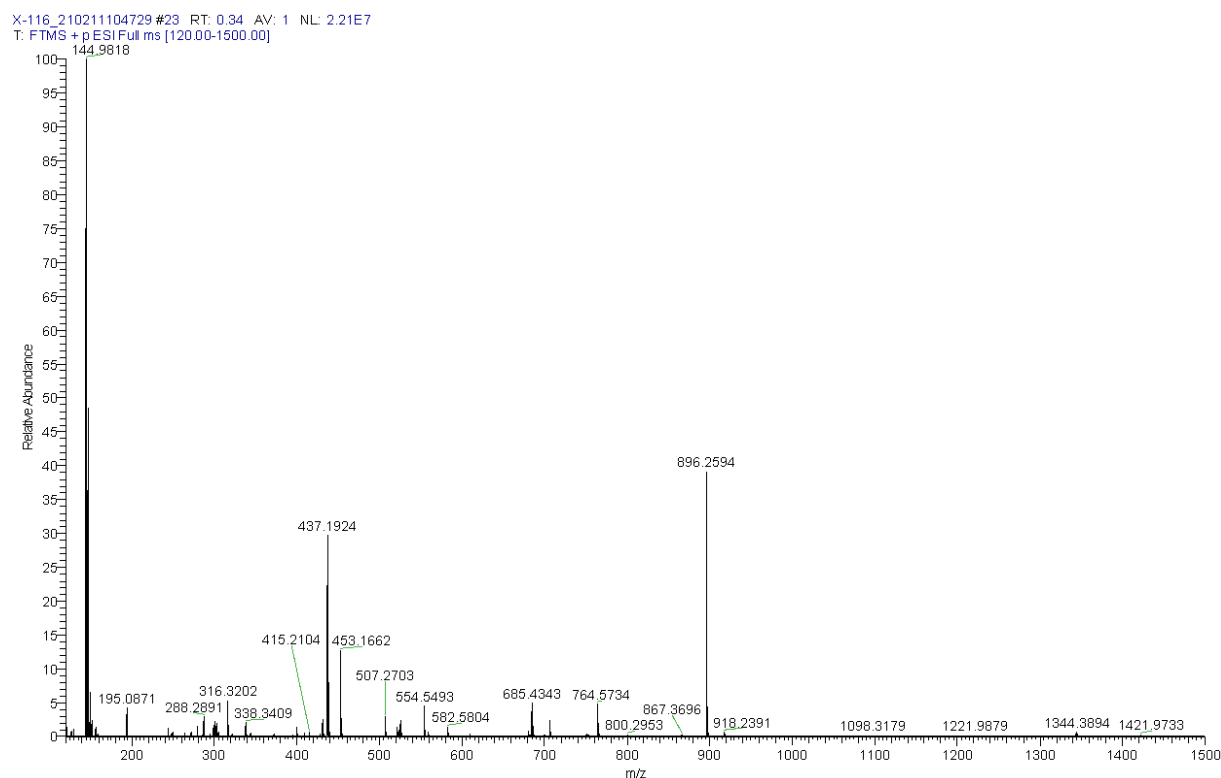
Το **Θεραγωγαστικό 3** χαρακτηρίστηκε με  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.2.13), με  $^{13}\text{C}$  NMR (Εικόνα 2.2.14) και με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.2.15). Το φάσμα μάζας έδειξε το αναμενόμενο ιόν  $896.2494$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



Εικόνα 2.2.13. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του **Θεραγωγαστικού 3** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 2.2.14. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR του **Θεραγωγαστικού 3** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (100 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.2.15.** Φάσμα μάζας του **Θεραγωγιστικού 3**.

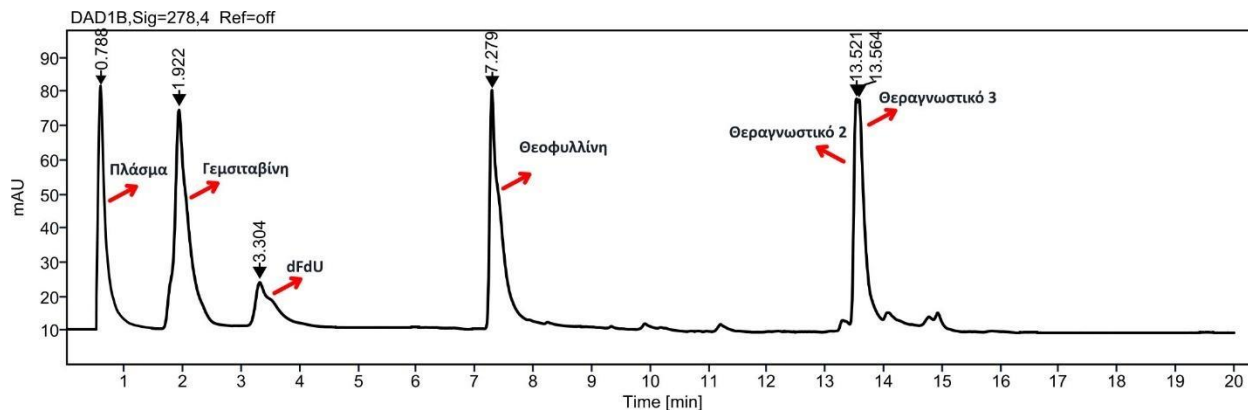
### 2.2.2.1 Βιολογική αξιολόγηση των **Θεραγωγιστικών 2** και **3** (προφάρμακα της γεμισιταβίνης)

Τα δυο θεραγωγιστικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**Θεραγωγιστικό 2** και **Θεραγωγιστικό 3**) μελετήθηκαν ως προς 1) τη σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH, 2) τη σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, 3) τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες (απορρόφηση και εκπομπή) και 4) τη δράση τους έναντι δυο καρκινικών σειρών παρουσία και απουσία υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>).

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των θεραγωγιστικών προφαρμάκων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, ακολουθώντας τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος.

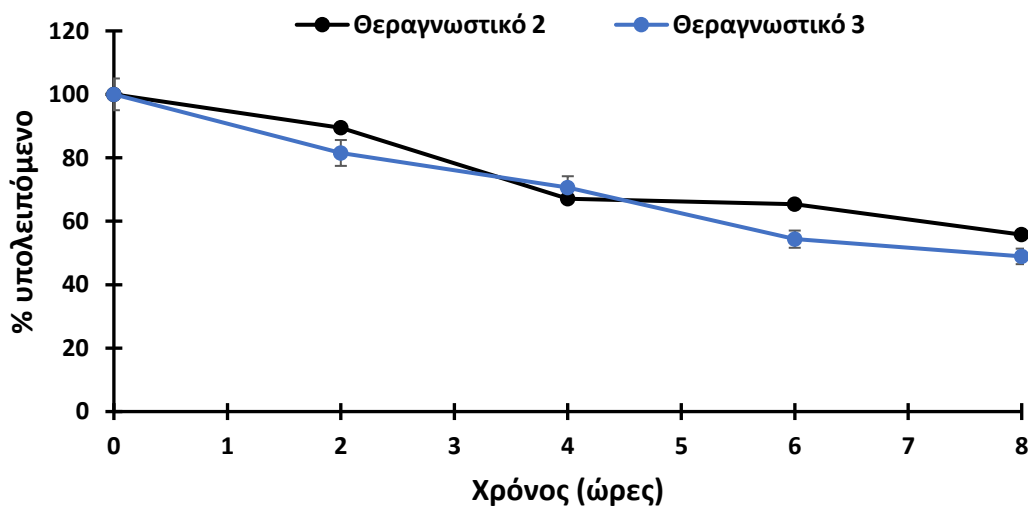
Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού της γεμισιταβίνης, του μεταβολίτη dFdU, του θεραγωγιστικού, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος. Το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5.5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 5 λεπτά και έπειτα βαθμιδωτό έως 0/100 για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 278 nm. Τα πρότυπα χρωματογραφήματα και για τα δυο θεραγωγιστικά

προφάρμακα φαίνονται παρακάτω στην **Εικόνα 2.2.16**. Η διαφορά έγκειται στον χρόνο έκλουσης των δυο θεραγνωστικών, όπου το **Θεραγνωστικό 2** εμφανίζεται στα 13.521 λεπτά και το **Θεραγνωστικό 3** εμφανίζεται στα 13.564 λεπτά.



**Εικόνα 2.2.16.** Χρωματογράφημα HPLC των **Θεραγνωστικών 2 και 3** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία γεμισταβίνης, dFdU και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

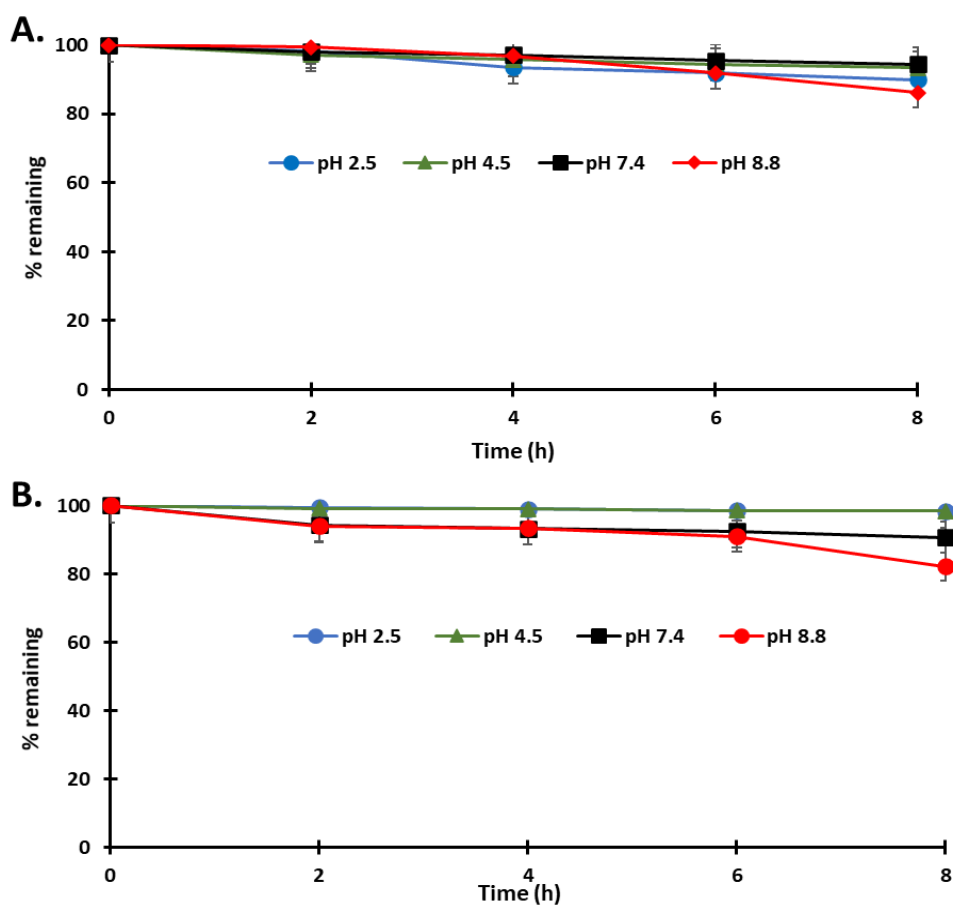
2.2.2.2 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των **Θεραγνωστικών 2 και 3** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος  
Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας των δυο θεραγνωστικών προφαρμάκων (**Εικόνα 2.2.17**) όπου παρατηρούμε πως και τα δυο είναι αρκετά σταθερά με χρόνο ημιζωής ~8 ώρες.



**Εικόνα 2.2.17.** Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγνωστικού 2** (μαύρο χρώμα) και του **Θεραγνωστικού 3** (μπλε χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

### 2.2.2.3 Έλεγχος της in vitro σταθερότητας των Θεραγωγιστικών 2 και 3 σε διάφορες τιμές pH

Η σταθερότητα των 2 θεραγωγιστικών μελετήθηκε σε εύρος τιμών pH σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Η μελέτη της σταθερότητας των δυο προφαρμάκων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το σύστημα που παρουσιάστηκε στην **Εικόνα 2.2.16**. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.2.18**.

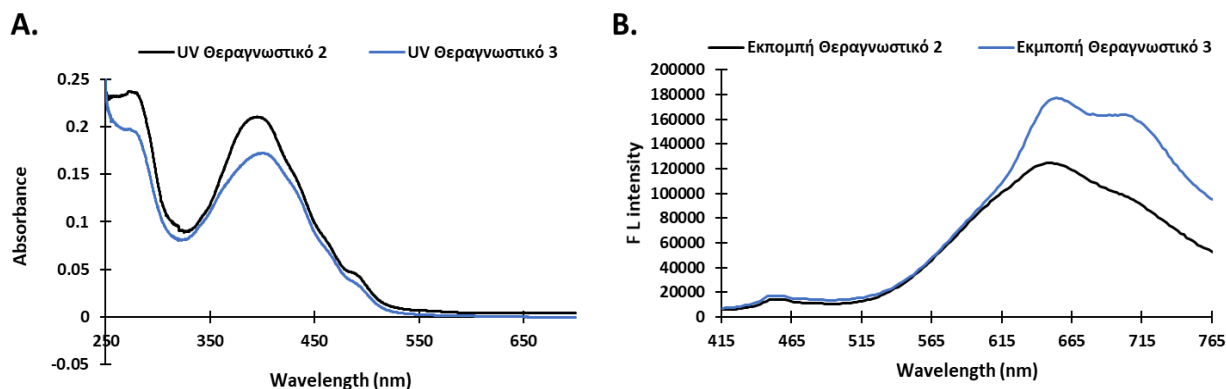


**Εικόνα 2.2.18.** Καμπύλη σταθερότητας (A) του Θεραγωγιστικού 2 και (B) του Θεραγωγιστικού 3 σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Παρατηρούμε πως και τα 2 θεραγωγιστικά προφάρμακα είναι εξαιρετικά σταθερά σε όλο το εύρος τιμών pH (2 έως 8.8) το οποίο είναι σημαντικό καθώς μπορεί να αποφευχθεί μια πρόιμη απελευθέρωση του φαρμάκου.

#### 2.2.2.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες των Θεραγωγιστικών 2 και 3

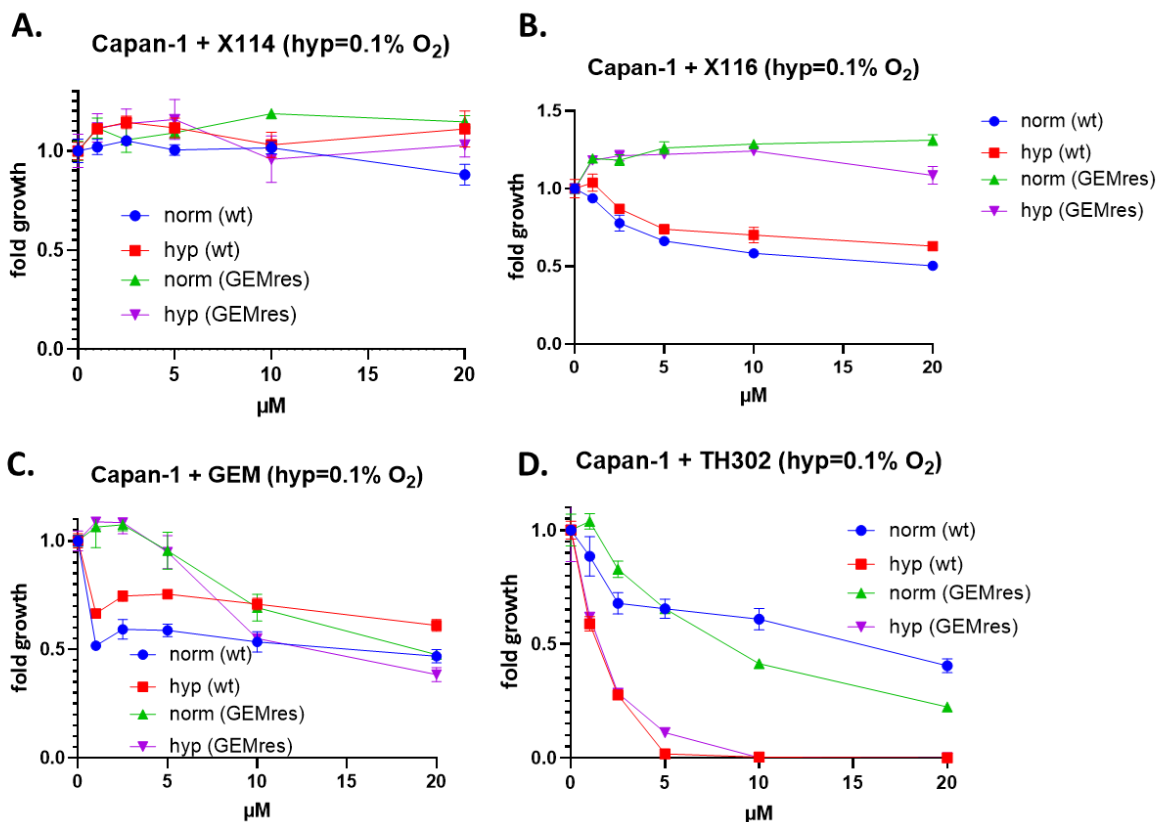
Τα δυο θεραγωγιστικά μόρια χαρακτηρίστηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες με χρήση φασματοσκοπίας UV και φθορισμομετρίας (Εικόνα 2.2.19A και 2.2.19B, αντίστοιχα). Και τα δυο θεραγωγιστικά μόρια έδειξαν παρόμοιο προφίλ, με τη διαφορά πως το Θεραγωγιστικό 3 έδειξε πιο υψηλή ένταση στο φάσμα φθορισμού. Αυτό πιθανώς να οφείλετε στη διευθέτηση στον χώρο, φέρνοντας σε πιο κοντινή απόσταση το νιτροβενζόλιο με τη χρωστική NIR εμφανίζοντας πιο έντονο φαινόμενο απόσβεσης του φθορισμού μέσω του φαινομένου FRET (Förster Resonance Energy Transfer).



**Εικόνα 2.2.19.** (A) Φάσμα UV του Θεραγωγιστικού 2 (μαύρο χρώμα) και του Θεραγωγιστικού 3 (μπλε χρώμα) και (B) Φάσμα φθορισμού του Θεραγωγιστικού 2 (μαύρο χρώμα) και του Θεραγωγιστικού 3 (μπλε χρώμα). Οι ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).

#### 2.2.2.5 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των Θεραγωγιστικών 2 και 3 σε κατάσταση υποξίας

Τα Θεραγωγιστικά 2 και 3 της γεμισιταβίνης ελέγχθηκαν ως προς τη δράση τους σε κατάσταση υποξίας έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς CAPAN-1 (ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος) και της αντίστοιχης καρκινικής σειράς που έχει καταστεί ανθεκτική στη γεμισιταβίνη (Εικόνα 2.2.20A και 2.2.20B) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετά από 72 ώρες. Τα δυο θεραγωγιστικά συγκρίθηκαν με τη σκέτη γεμισιταβίνη (Εικόνα 2.2.20C) και με το πρότυπο προφάρμακο TH302 (Εικόνα 2.2.20D) παρουσία ή όχι υποξίας.



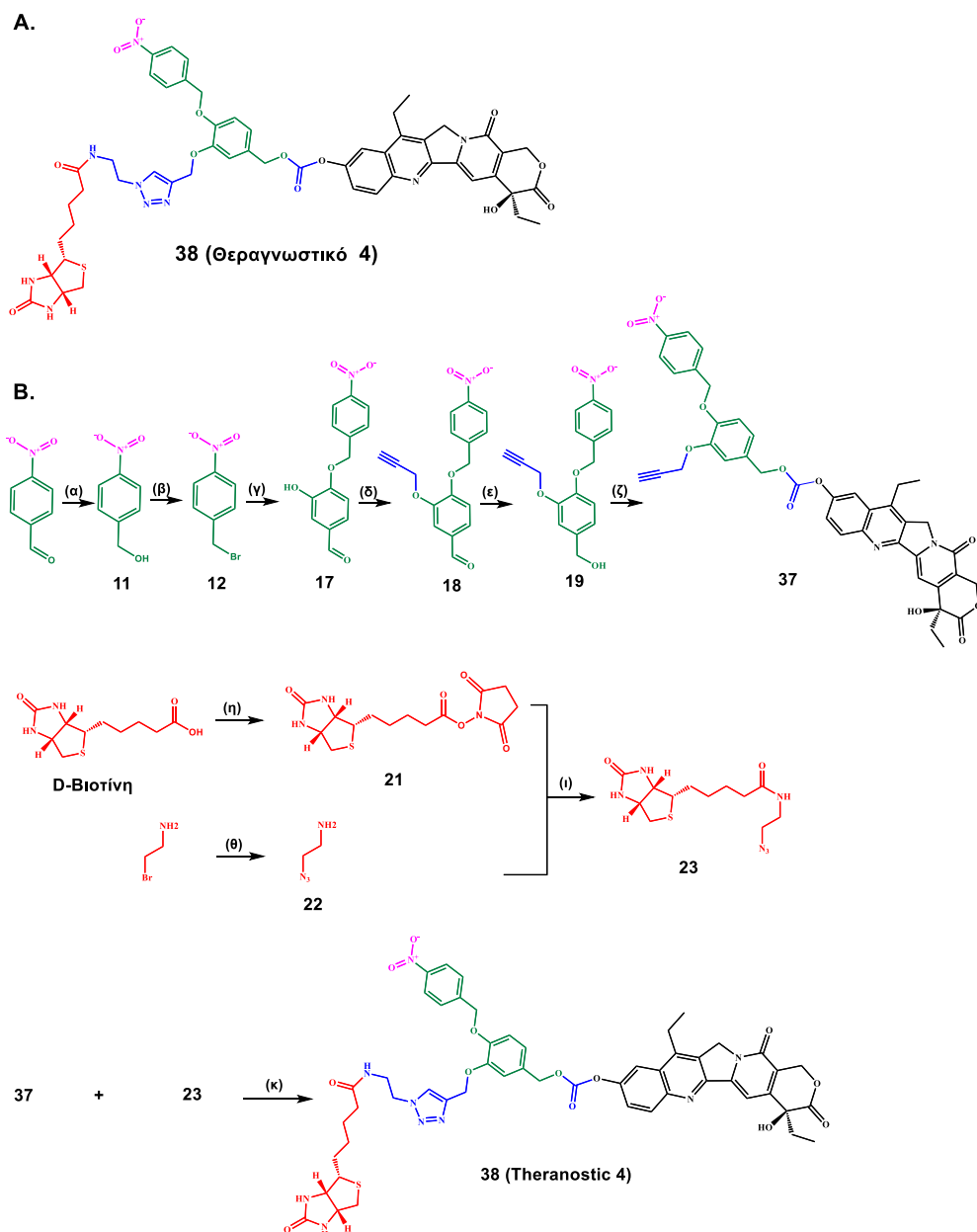
**Εικόνα 2.2.20.** Απόκριση των κυτταρικών σειρών CAPAN-1 (ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος) και CAPAN-1-resistant **A.** Στο **Θεραγωγιστικό 2**, **B.** Στο **Θεραγωγιστικό 3**, **C.** Στη γεμισιταβίνη και **D.** στο πρότυπο φάρμακο TH302, απουσία (μπλε και πράσινο χρώμα) και παρουσία (κόκκινο και μωβ χρώμα) υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Dr. Petra Heffeter στην Αυστρία.

Παρατηρήθηκε πως το **Θεραγωγιστικό 2** δεν είχε δράση έναντι των δυο κυτταρικών σειρών, ενώ το **Θεραγωγιστικό 3** είχε δράση μόνο στη σειρά CAPAN-1 και παρουσία αλλά και απουσία υποξίας. Η γεμισιταβίνη ήταν δραστική και στις δυο σειρές αλλά και παρουσία και απουσία υποξίας. Τα θεραγωγιστικά μόρια θα ελεγχθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και με διαφορετικούς χρόνους επώασης, καθώς στις συγκεκριμένες συνθήκες δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (ανασταλτική δράση εκλεκτικά σε κατάσταση υποξίας όπως το πρότυπο φάρμακο TH302).

## Θεραγωγαστικό προφάρμακο του SN-38

### 2.2.3 4<sup>ο</sup> Θεραγωγαστικό προφάρμακο (SN-38-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-D-Βιοτίνη)

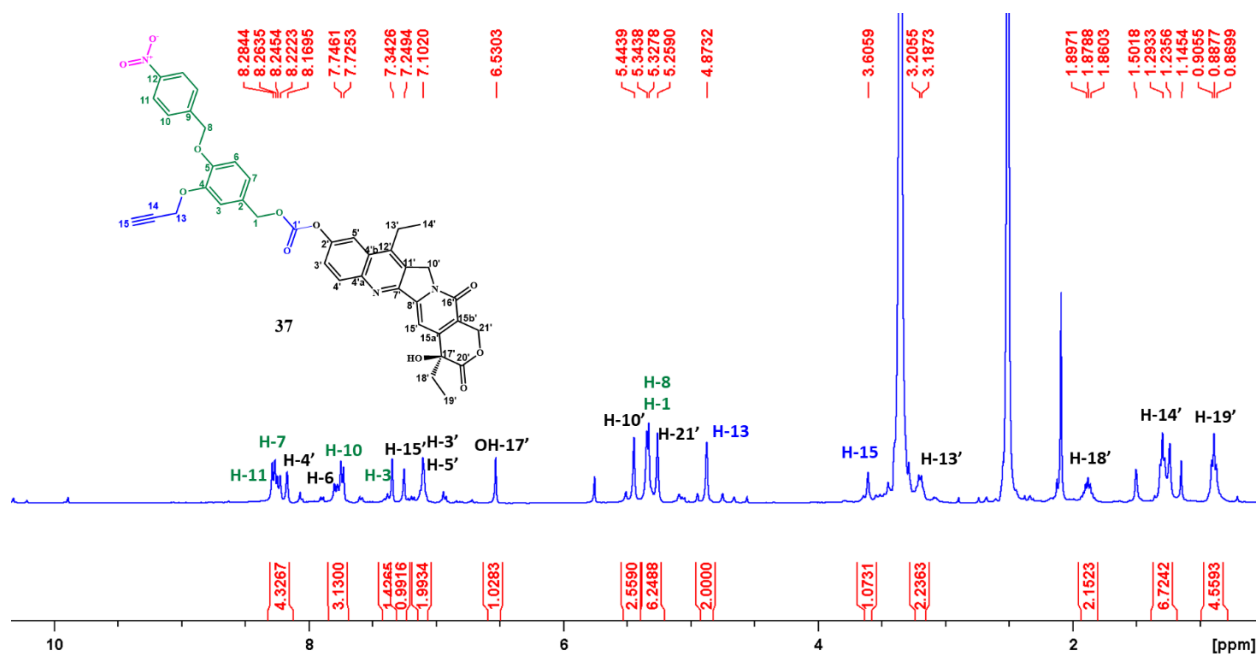
Μετά τη σύνθεση των θεραγωγαστικών μορίων με τη γεμισταβίνη ως τον κυτταροτοξικό παράγοντα, προχωρήσαμε στη σύνθεση ενός θεραγωγαστικού μορίου βασισμένο στο αντικαρκινικό φάρμακο SN-38, το **Θεραγωγαστικό 4**. Για τη σύνθεση του **Θεραγωγαστικού 4** χρησιμοποιήθηκε το μόριο-κορμός **19**, το οποίο φέρει μια νιτρο ομάδα που ανταποκρίνεται στην υποξεία, ένα αλκύνιο για κλικ χημεία και μια -OH. Το SN-38 διαθέτει έντονο φθορισμό λόγω της εκτεταμένης συζυγίας του, οπότε δεν χρησιμοποιήθηκε επιπλέον χρωστική. Η δομή του **Θεραγωγαστικού 4** και η συνθετική πορεία φαίνονται στο κάτωθι σχήμα (**Σχήμα 2.2.10**):



**Σχήμα 2.2.10.** (A) Δομή της ένωσης **38** (**Θεραγωγαστικό 4**) και (B) Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας για την παρασκευή του **Θεραγωγαστικού 4**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α)

$\text{NaBH}_4$ , απόλυτη  $\text{EtOH}$ ,  $rt$ , 2 ώρες, (β)  $\text{PBr}_3$ , άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 2 ώρες, (γ) 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ακετόνη,  $rt$ , 12 ώρες, (δ) 3-βρωμοπροπύλιο,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ακετόνη,  $40^\circ\text{C}$ , 12 ώρες, (ε)  $\text{NaBH}_4$ , απόλυτη  $\text{EtOH}$ ,  $rt$ , 3 ώρες, (ζ) (i)  $\text{BNPC}$ ,  $\text{DMAP}$ , άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 12 ώρες; (ii)  $\text{SN-38}$ , άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $rt$ , 12 ώρες; (η)  $\text{NHS}$ ,  $\text{DCC}$ , άνυδρο  $\text{DMF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 12 ώρες (θ)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $85^\circ\text{C}$ , 12 ώρες, (ι)  $\text{TEA}$ , άνυδρο  $\text{DMF}$ ,  $rt$ , 12 ώρες, (κ)  $\text{CuI}$ ,  $\text{TEA}$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:2),  $rt$ , 12 ώρες. Η ομάδα στόχευσης του καρκίνου παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα, οι συνδέτες με μπλε, ο αυτο-διασπώμενος συνδέτης με πράσινο, η «σκανδάλη» με μωβ και το  $\text{SN-38}$  με μαύρο.

Η σύνθεση της ένωσης **19** περιεγράφηκε στην ενότητα 2.2.2 και της ένωσης **23** στην ενότητα 2.1.5, και επομένως δεν θα αναπτυχθεί εκ νέου. Η ένωση **19** συζεύχθηκε με το αντικαρκινικό φάρμακο  $\text{SN-38}$  μέσω ενός καρβοξυ εστερικού δεσμού με χρήση του αντιδραστήριου  $\text{BNPC}$  σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο δίνοντας την ένωση **37** η οποία χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H NMR}$  (Εικόνα 2.2.21). Παρατηρήθηκε πως η ένωση **37** είναι ασταθής και αποσυντίθεται με το πέρασμα του χρόνου και την επίδραση του φωτός και του ατμοσφαιρικού αέρα. Το  $^1\text{H NMR}$  παρόλο που εμφάνισε μικρές προσμίξεις, έδειξε το επιθυμητό προϊόν με όλες τις αναμενόμενες κορυφές του φαρμάκου και του μορίου-κορμού **19**, ενώ η κορυφή που αντιστοιχούσε στην φαινολική  $-\text{OH}$  του φαρμάκου στα 10.3 ppm απουσίαζε.

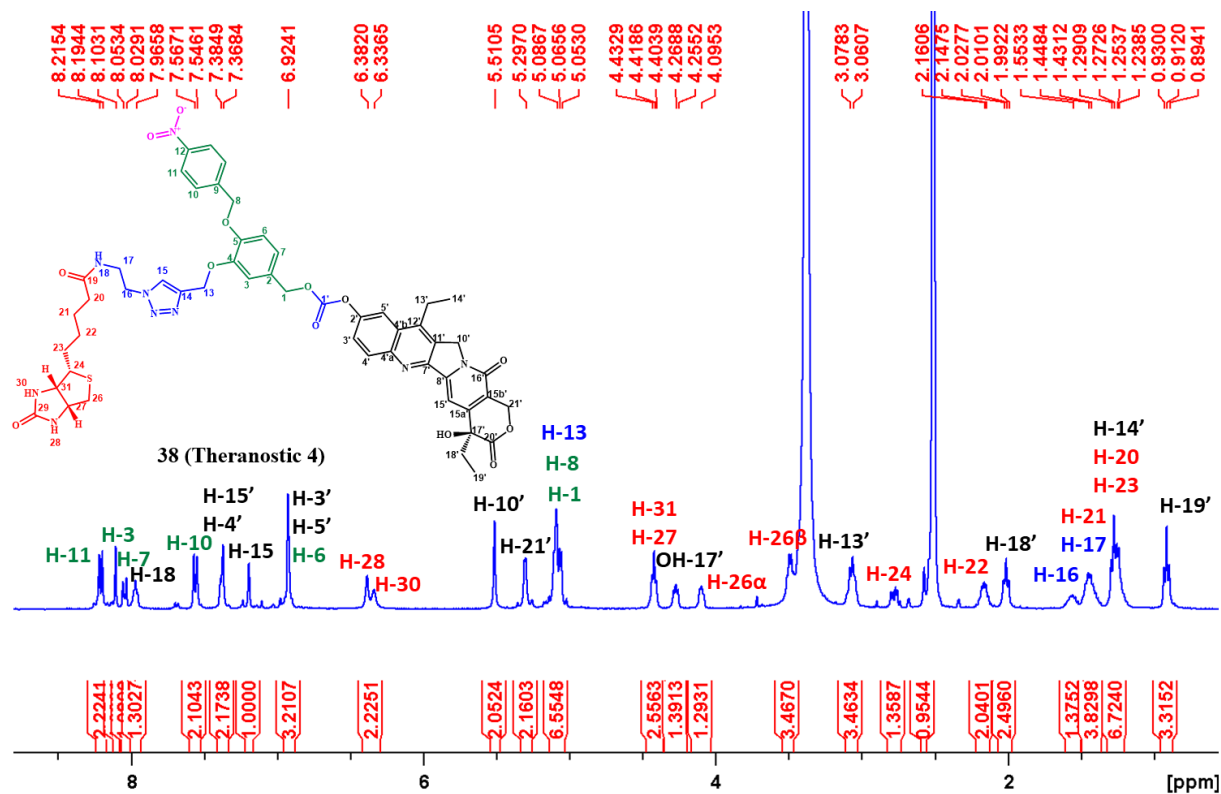


Εικόνα 2.2.21. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης **37** σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz,  $25^\circ\text{C}$ ).

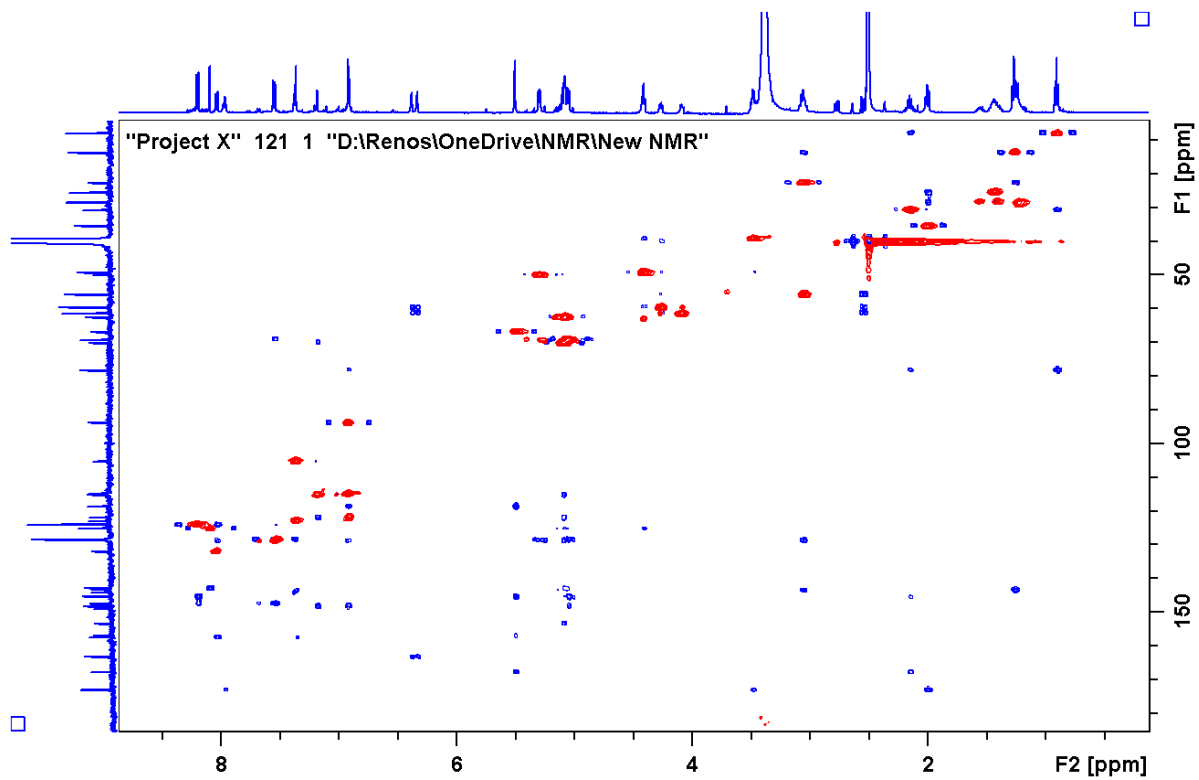
Το τελικό βήμα περιλάμβανε την αντίδραση της ένωσης **37** με την άζιδο-τροποποιημένη  $\text{D}$ -βιοτίνη (**23**) μέσω μιας [3+2] κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκυνίου καταλυόμενη από  $\text{Cu(I)}$  για να δώσει την τελική ένωση **38** (Θεραγωγαστικό **4**). Η τελική ένωση χαρακτηρίστηκε με



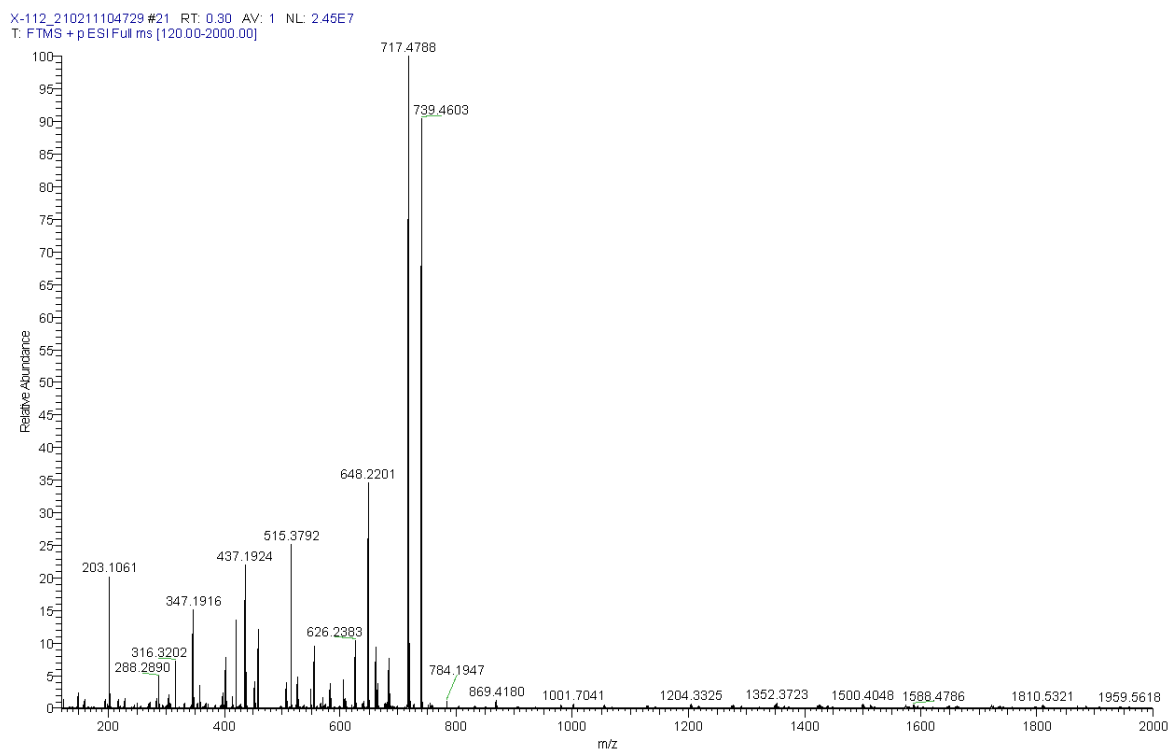
φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα 2.2.22), 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR (Εικόνα 2.2.23) και φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.2.24).



Εικόνα 2.2.22. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του Θεραγωγικού 4 σε DMSO- $d_6$  (400 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.2.23.** Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) του **Θεραγωγστικού 4** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz, 25 °C).



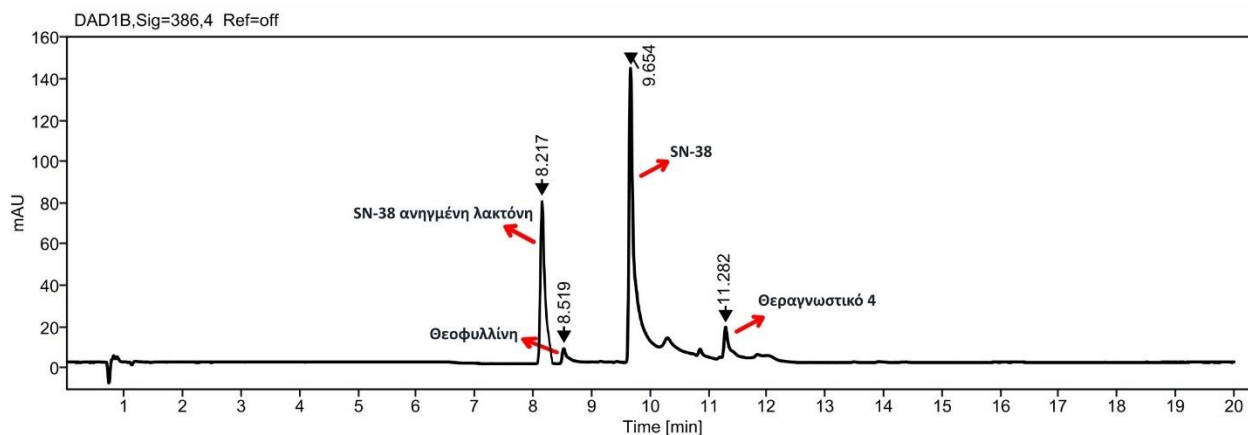
**Εικόνα 2.2.24.** Φάσμα μάζας του **Θεραγωγστικού 4**.

### 2.2.3.1 Βιολογική αξιολόγηση του **Θεραγωγαστικού 4** (προφάρμακο του SN-38)

Το θεραγωγαστικό προφάρμακο του SN-38 (**Θεραγωγαστικό 4**) μελετήθηκε ως προς 1) τη σταθερότητά του σε ένα εύρος τιμών pH, 2) τη σταθερότητά του σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, 3) τις φωτοφυσικές του ιδιότητες (απορρόφηση και εκπομπή) και 4) τη δράση του έναντι δυο καρκινικών σειρών παρουσία και απουσία υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>).

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική του σταθερότητα, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού του θεραγωγαστικού μορίου, του μητρικού φαρμάκου SN-38, του μητρικού φαρμάκου με ανοιγμένη λακτόνη (υφίσταται στα υψηλά pH), του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος. Το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5.5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 5 λεπτά και έπειτα βαθμιδωτό έως 0/100 για άλλα 10 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 386.4 nm. Το πρότυπο χρωματογράφημα φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 2.2.25**. Η κύρια κορυφή του πλάσματος εμφανίζεται στα 0.785 λεπτά αλλά δεν φαίνεται στο χρωματογράφημα διότι δεν έχει απορρόφηση στα 386 nm.

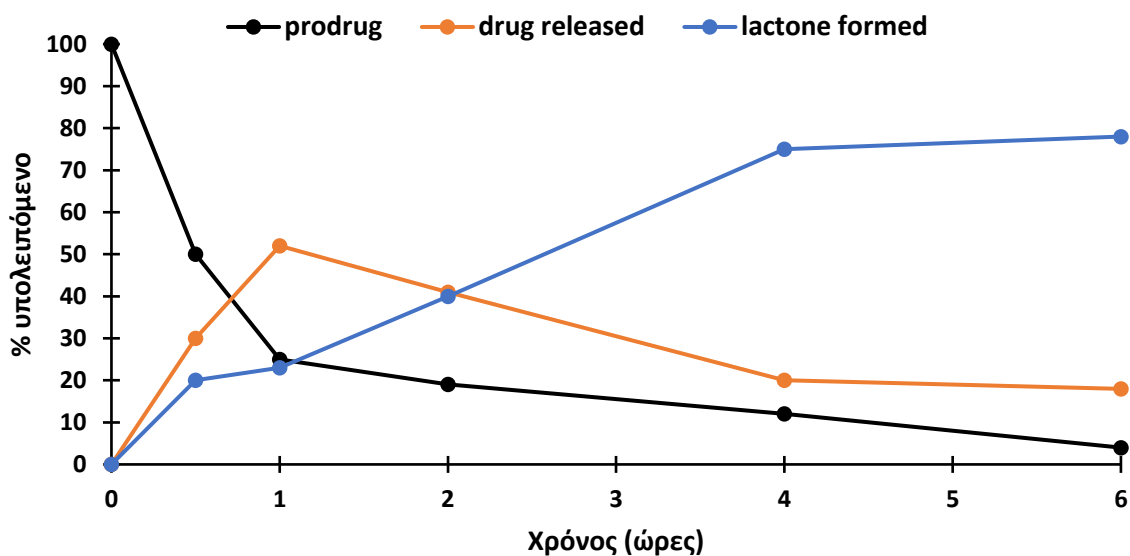


**Εικόνα 2.2.25.** Χρωματογράφημα HPLC του **Θεραγωγαστικού 4** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία SN-38, SN-38 με ανοιγμένη λακτόνη και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

### 2.2.3.2 Έλεγχος της in vitro σταθερότητας του **Θεραγωγαστικού 4** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος

Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας (**Εικόνα 2.2.26**) όπου παρατηρούμε πως το **Θεραγωγαστικό 4** είναι σχετικά ασταθές με χρόνο ημιζωής 30 λεπτά. Η δομική αστάθεια αυτή αποδίδεται κυρίως στον καρβοξυ εστερικό δεσμό που

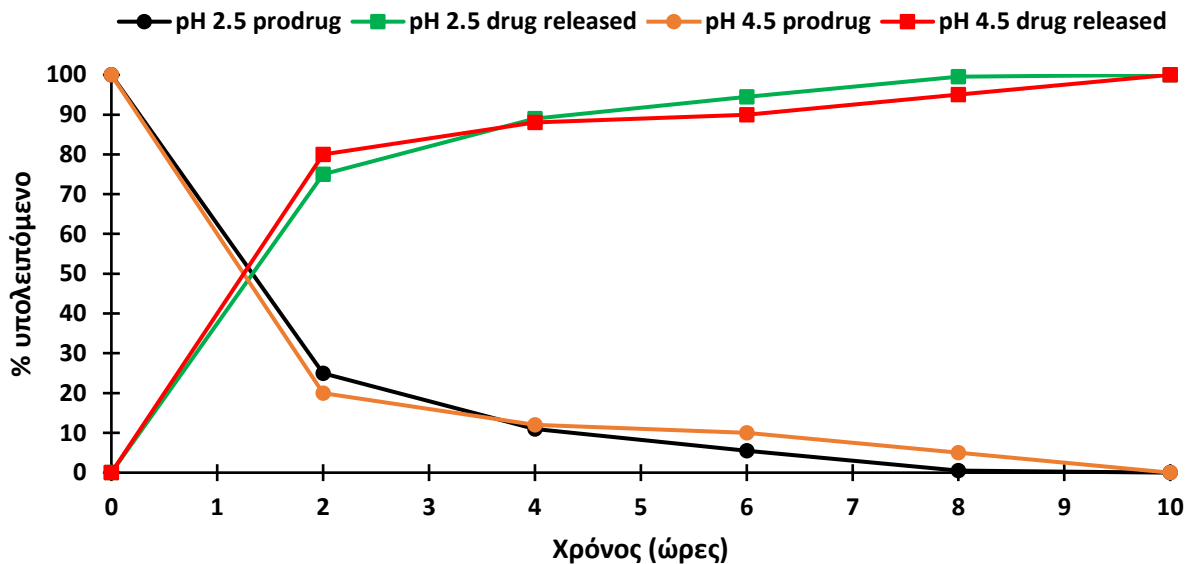
συνδέει το φάρμακο με το υπόλοιπο μόριο και στη λακτόνη του φαρμάκου, καθώς είναι και τα δυο ευαίσθητα σε υδρόλυση παρουσία βασικού pH.



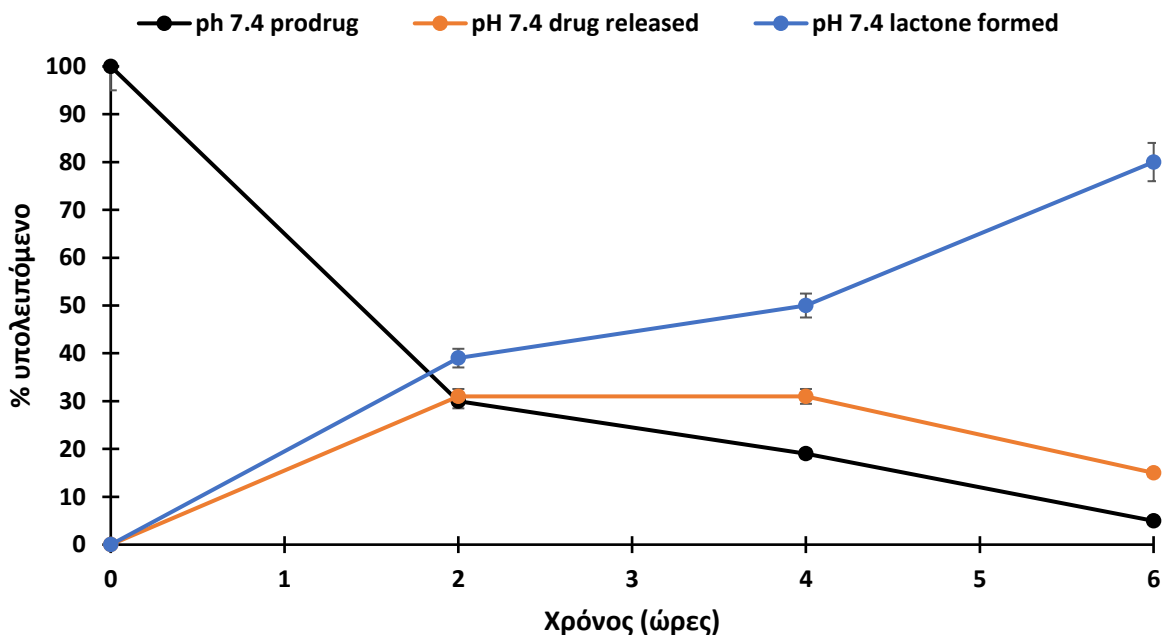
**Εικόνα 2.2.26.** Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγαστικού 4** (μαύρο χρώμα), σχηματισμού του μητρικού φαρμάκου SN-38 (πορτοκαλί χρώμα) και του μητρικού φαρμάκου SN-38 με υδρολυμένη λακτόνη (μπλέ χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο.

### 2.2.3.3 Έλεγχος της in vitro σταθερότητας του **Θεραγωγαστικού 4** σε διάφορες τιμές pH

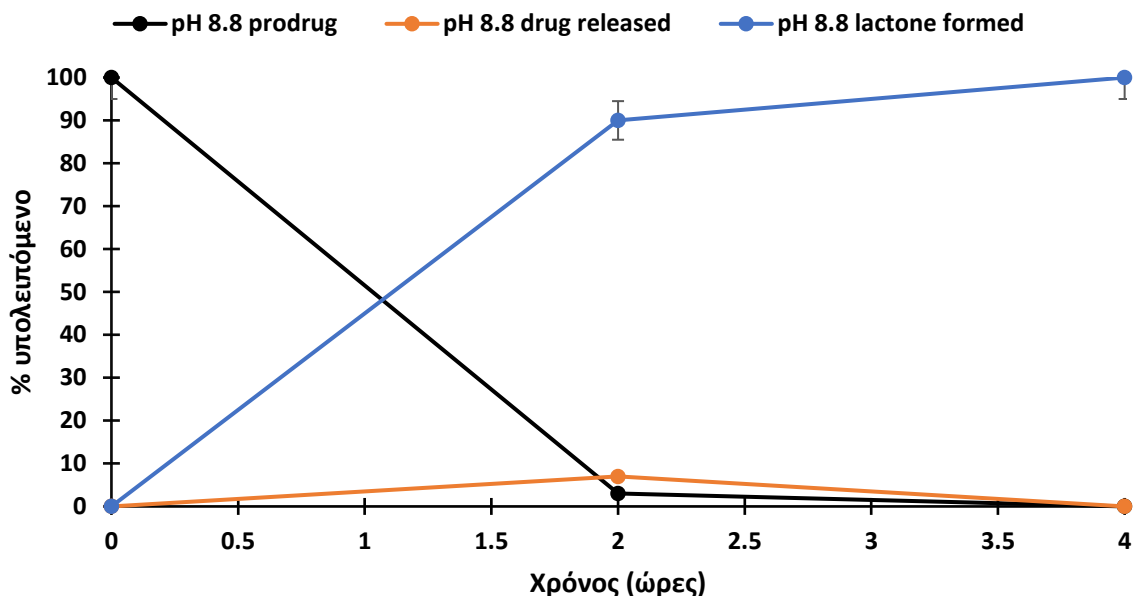
Η χημική του σταθερότητα μελετήθηκε σε 4 ρυθμιστικά διαλύματα σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το σύστημα που παρουσιάστηκε στην **Εικόνα 2.2.25**. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας σε διάφορες τιμές pH παρουσιάζονται στις **Εικόνες 2.2.27, 2.2.28 και 2.2.29**.



*Εικόνα 2.2.27. Καμπύλες σταθερότητας του Θεραγωγιστικού 4 σε pH 2.5 (μαύρο χρώμα) και 4.5 (πορτοκαλί χρώμα), και καμπύλες σχηματισμού του μητρικού φαρμάκου στα αντίστοιχα pH (πράσινο χρώμα για το pH 2.5 και κόκκινο χρώμα για το pH 4.5) σε συνάρτηση με τον χρόνο.*



*Εικόνα 2.2.28. Καμπύλη σταθερότητας του Θεραγωγιστικού 4 (μαύρο χρώμα), σχηματισμού του μητρικού φαρμάκου SN-38 (πορτοκαλί χρώμα) και του μητρικού φαρμάκου SN-38 με υδρολυμένη λακτόνη (μπλέ χρώμα) σε pH 8.8 σε συνάρτηση με τον χρόνο.*

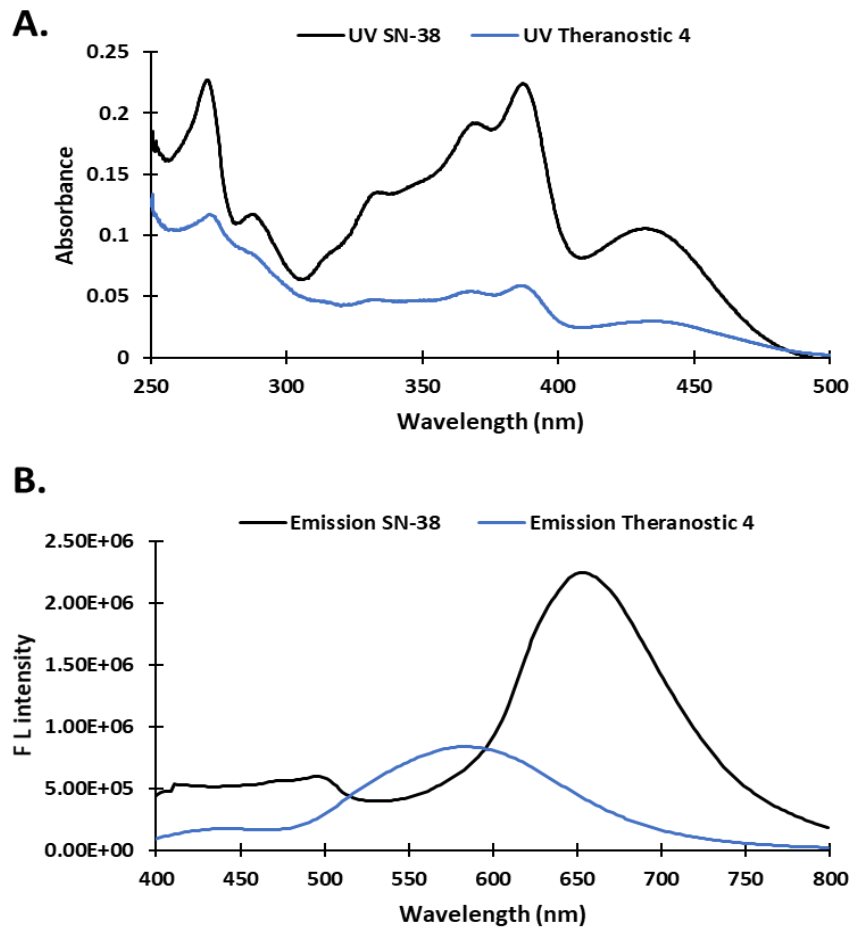


*Εικόνα 2.2.29. Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγαστικού 4** (μαύρο χρώμα), σχηματισμού του μητρικού φαρμάκου SN-38 (πορτοκαλί χρώμα) και του μητρικού φαρμάκου SN-38 με υδρολυμένη λακτόνη (μπλέ χρώμα) σε pH 8.8 σε συνάρτηση με τον χρόνο.*

Παρατηρούμε πως το **Θεραγωγαστικό 4** είναι αρκετά ασταθές σε όλες τις τιμές pH. Στο pH 2.5 και 4.5 απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα του μητρικού φαρμάκου SN-38, ενώ στο pH 7.4 και 8.8 το φάρμακο που ελευθερώνεται μετατρέπεται σε μεγάλο βαθμό στον αντίστοιχο ανενεργό μεταβολίτη με την υδρολυμένη λακτόνη.

#### 2.2.3.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες του **Θεραγωγαστικού 4**

Το **Θεραγωγαστικό 4** μελετήθηκε ως προς τις φωτοφυσικές του ιδιότητες με χρήση φασματοσκοπίας UV και φθορισμομετρίας (**Εικόνα 2.2.30A** και **2.2.30B**, αντίστοιχα).



**Εικόνα 2.2.30.** (A) Φάσμα UV του μητρικού φαρμάκου SN-38 (μαύρο χρώμα) και του **Θεραγωγιστικού 4** (μπλε χρώμα) και (B) Φάσμα φθορισμού του μητρικού φαρμάκου SN-38 (μαύρο χρώμα) και του **Θεραγωγιστικού 4** (μπλε χρώμα). Οι ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).

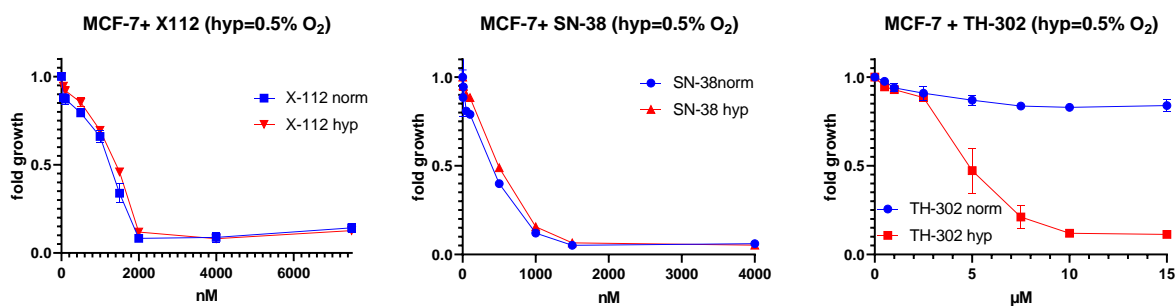
Ως προς τα φάσματα UV παρατηρούμε πως είναι παρόμοια, με το **Θεραγωγιστικό 4** να έχει χαμηλότερη απορρόφηση. Όσον αφορά τα φάσματα φθορισμού, το **Θεραγωγιστικό 4** παρατηρούμε πως βρίσκεται σε απόσβεση (χαμηλότερη ένταση του φθορισμού) και με μια μικρή μετατόπιση προς τα αριστερά (blue shift). Συγκεκριμένα, το μέγιστο του φάσματος εκπομπής του μητρικού φαρμάκου SN-38 βρέθηκε στα 653 nm, ενώ του **Θεραγωγιστικού 4** στα 583 nm. Η αναμενομένη απόσβεση και η μετατόπιση υφίστανται διότι έχει πραγματοποιηθεί αντίδραση στη φαινολική υδροξυλομάδα του μητρικού φαρμάκου που δρα ως δότης ηλεκτρονίων ενισχύοντας τον φθορισμό του.

Έπειτα από την αλληλεπίδραση του **Θεραγωγιστικού 4** με τη νιτροαναγωγή σε κατάσταση υποξίας, θα γίνει αναγωγή της νίτρο ομάδας που θα οδηγήσει σε άμεση απελευθέρωση του μητρικού φαρμάκου SN-38. Επομένως, θα αυξηθεί το σήμα του φθορισμού υποδεικνύοντας

την επιτυχή απελευθέρωση του φαρμάκου αλλά και τη θέση της απελευθέρωσης (καρκινικά κύτταρα).

#### 2.2.3.5 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης του **Θεραγωγαστικού 4** σε κατάσταση υποξίας

Το **Θεραγωγαστικό 4** ελέγχθηκε ως προς τη δράση του σε κατάσταση υποξίας σε διάφορες συγκεντρώσεις μετά από 72 ώρες έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 (καρκίνος του μαστού) η οποία διαθέτει επαρκή έκφραση του υποδοχέα της βιοτίνης (**Εικόνα 2.2.31A**). Ομοίως ελέγχθηκε η δράση του σκέτου φαρμάκου SN-38 (**Εικόνα 2.2.31B**) και του πρότυπου προφαρμάκου TH302 (**Εικόνα 2.2.31Γ**) παρουσία ή όχι υποξίας.



**Εικόνα 2.2.31.** Απόκριση της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 (καρκίνος του μαστού) **A.** Στο **Θεραγωγαστικό 4**, **B.** Στο μητρικό φάρμακο SN-38, **Γ.** στο πρότυπο φάρμακο TH302, απουσία (μπλε χρώμα) και παρουσία (κόκκινο χρώμα) υποξίας (0.5% O<sub>2</sub>). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Dr. Petra Heffeter στην Αυστρία.

Παρατηρήθηκε πως το **Θεραγωγαστικό 4** είχε υψηλή δράση και παρουσία αλλά και απουσία υποξίας, ομοίως με το μητρικό φάρμακο SN-38. Αυτό αποδόθηκε στη δομική αστάθεια του μορίου που παρατηρήθηκε στα πειράματα *in vitro* σταθερότητας που παρατέθηκαν στην ενότητα 2.2.3.2 και 2.2.3.3. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες, αλλά θα επαναληφθεί για 3 ώρες. Ταυτόχρονα, θα πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση του φθορισμού για να επαληθευτεί η επιτυχής απελευθέρωση του φαρμάκου (αύξηση της έντασης του φθορισμού και μετατόπιση του σήματος προς στα δεξιά).

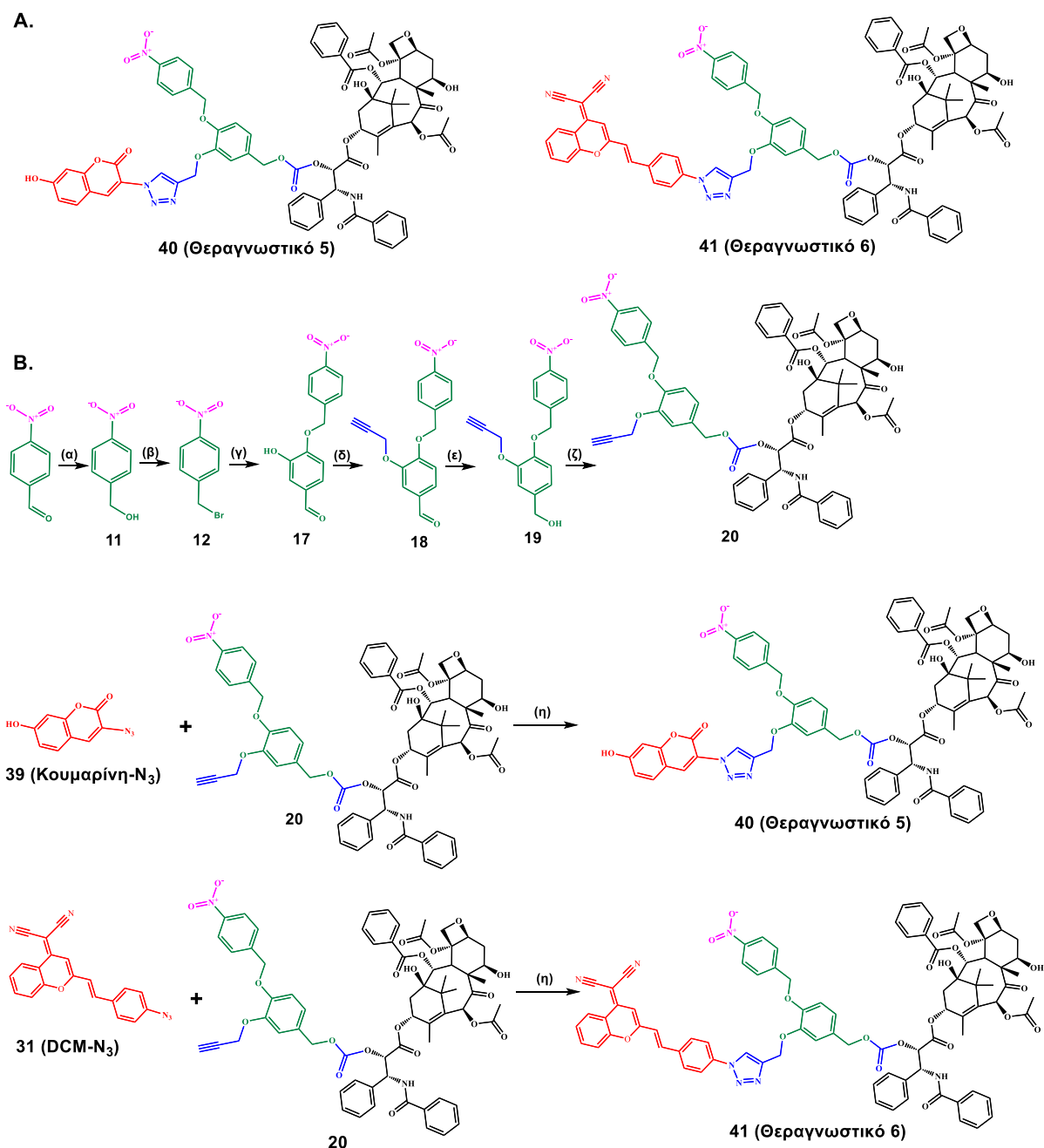


Μετά τη σύνθεση των θεραγωγικών μορίων με τη γεμισταβίνη και το SN-38 ως κυτταροτοξικό παράγοντα, προχωρήσαμε στη σύνθεση πέντε θεραγωγικών μορίων βασισμένα στη πακλιταξέλη (**Θεραγωγικά 5, 6, 7, 8, 9**). Το αντικαρκινικό φάρμακο πακλιταξέλη όπως είδαμε και στην εισαγωγή αποτελεί ένα εξαιρετικά δραστικό φάρμακο ενάντια μιας πληθώρας στερεών όγκων και αποτελεί το πιο κερδοφόρο φάρμακο χημειοθεραπείας στην ιστορία. Ωστόσο, υφίστανται σημαντικά προβλήματα στη χρήση του όπως η υψηλή μη-εκλεκτική τοξικότητα και η δομική αστάθεια.

### 2.2.4 5<sup>ο</sup> & 6<sup>ο</sup> Θεραγωγικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-Χρωστική)

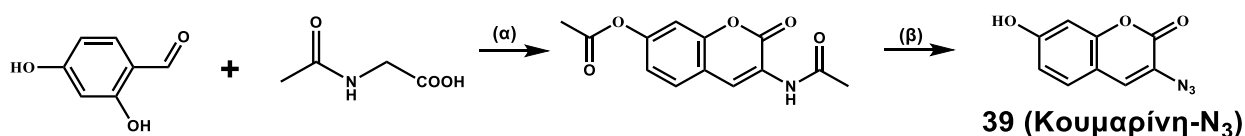
Για τη σύνθεση των **Θεραγωγικών 5** και **6** της πακλιταξέλης χρησιμοποιήθηκε το μόριο-κορμός **19**, το οποίο φέρει μια νιτρο ομάδα που ανταποκρίνεται στην υποξία, ένα αλκύνιο για να πραγματοποιηθεί κλικ χημεία και μια ελεύθερη -OH όπου προσαρτήθηκε η πακλιταξέλη. Στο αλκύνιο προσαρτήθηκαν δυο διαφορετικές χρωστικές μέσω κλικ χημείας αζιδίου-αλκυνίου. Στο **Θεραγωγικό 5** έγινε η προσάρτηση της χρωστικής 3-αζιδο-7-υδροξυ κουμαρίνης (ένωση **39**) ενώ στο **Θεραγωγικό 6** της χρωστικής DCM-N<sub>3</sub> (ένωση **31**) της οποίας η σύνθεση αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.2.

Οι δομές των **Θεραγωγικών 5** και **6**, καθώς και οι συνθετικές πορείες φαίνονται στο κάτωθι σχήμα (**Σχήμα 2.2.11**):



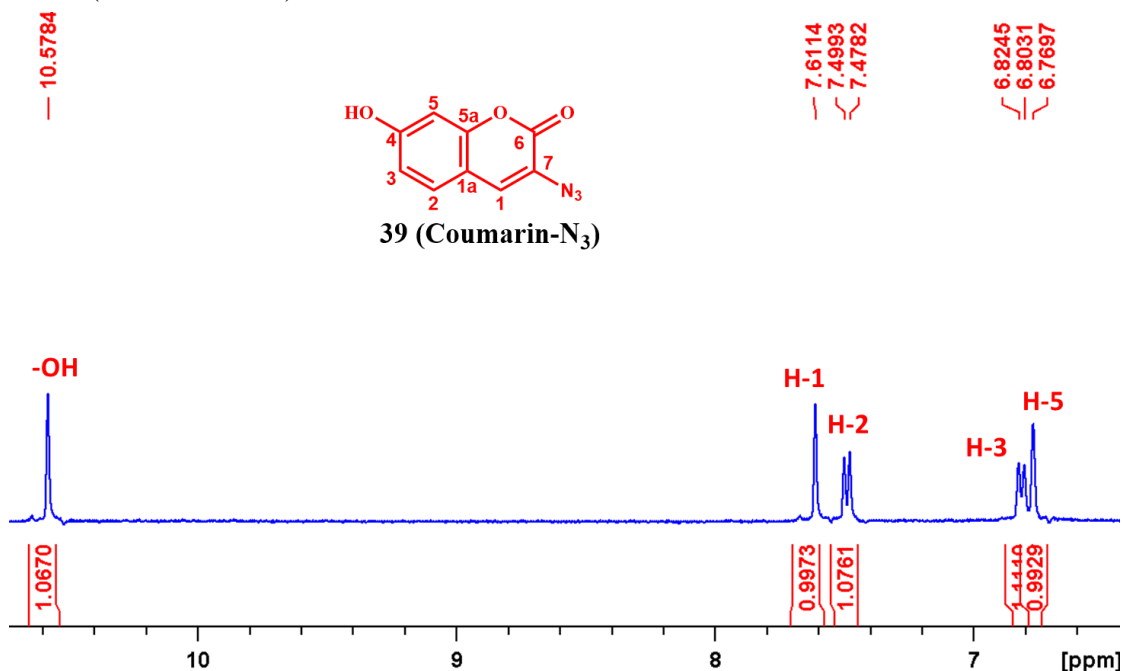
**Σχήμα 2.2.11.** (A) Δομή της ένωσης **40 (Θεραγωγαστικό 5)** και της ένωσης **41 (Θεραγωγαστικό 6)**  
 (B) Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας για την παρασκευή των **Θεραγωγαστικών 5** και **6**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) NaBH<sub>4</sub>, απόλυτη EtOH, rt, 2 ώρες, (β) PBr<sub>3</sub>, άνυδρο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2 ώρες, (γ) 3,4-διυδροξυβενζαλδεϋδη, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ακετόνη, rt, 12 ώρες, (δ) 3-βρωμοπροπύλιο, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ακετόνη, 40 °C, 12 ώρες, (ε) NaBH<sub>4</sub>, απόλυτη EtOH, rt, 3 ώρες, (ζ) (i) BNPC, DMAP, άνυδρο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 12 ώρες, (ii) πακλιταξέλη, άνυδρο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40 °C, 12 ώρες, (η) CuI, TEA, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2), rt, 12 ώρες. Οι συνδέτες παρουσιάζονται με μπλε, η χρωστική με κόκκινο, ο αυτο-διασπώμενος συνδέτης με πράσινο, η «σκανδάλη» με μωβ και η πακλιταξέλη με μαύρο χρώμα.

Η σύνθεση της ένωσης **20** που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των **Θεραγωγιστικών 5** και **6** αναλύθηκε εκτενώς στην ενότητα 2.1.5, ενώ η σύνθεση της χρωστικής NIR που φέρει ελεύθερο αζίδιο (DCM-N<sub>3</sub>) και χρησιμοποιήθηκε για το **Θεραγωγιστικό 6** αναλύθηκε στην ενότητα 2.2.2. Όσον αφορά τη χρωστική 3-αζιδο-7-υδροξυ κουμαρίνη (Κουμαρίνη-N<sub>3</sub>), αυτή συντέθηκε από 2,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη βάσει της βιβλιογραφίας<sup>147</sup>, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.2.12**. Αρχικά γίνεται συμπύκνωση της 2,4-διυδροξυβενζαλδεΐδης και της N-ακετυλο γλυκίνης με χρήση οξικού νατρίου και οξικού ανυδρίτη ως διαλύτη, ενώ έπειτα ακολουθεί υδρόλυση των ακετυλο ομάδων με υδροχλωρικό οξύ και αιθανόλη. Ακολουθεί η μετατροπή της αμινομάδας προς το αντίστοιχο διαζονιακό άλας με χρήση NaNO<sub>2</sub> (πυρηνόφιλη προσθήκη της αμινομάδας στο νιτρόξο ανιόν και απόσπαση νερού), το οποίο εν τέλει μετατρέπεται σε αζίδιο με χρήση NaN<sub>3</sub> μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης S<sub>N</sub>Ar.



**Σχήμα 2.2.12.** Η συνθετική πορεία για την παρασκευή της χρωστικής **Κουμαρίνη-N<sub>3</sub>** (ένωση **39**) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του **Θεραγωγιστικού 5**. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) NaOAc, Ac<sub>2</sub>O, reflux, 4 ώρες, (β) HCl:EtOH (2:1), reflux, 1 ώρα, NaNO<sub>2</sub>, NaN<sub>3</sub>, 0 °C.

Η ένωση **39** (3-αζιδο-7-υδροξυ κουμαρίνη) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR που έδειξε την ύπαρξη της φαινολικής -OH στα 10.57 ppm και την ύπαρξη 4 αρωματικών πρωτονίων (**Εικόνα 2.2.32**).



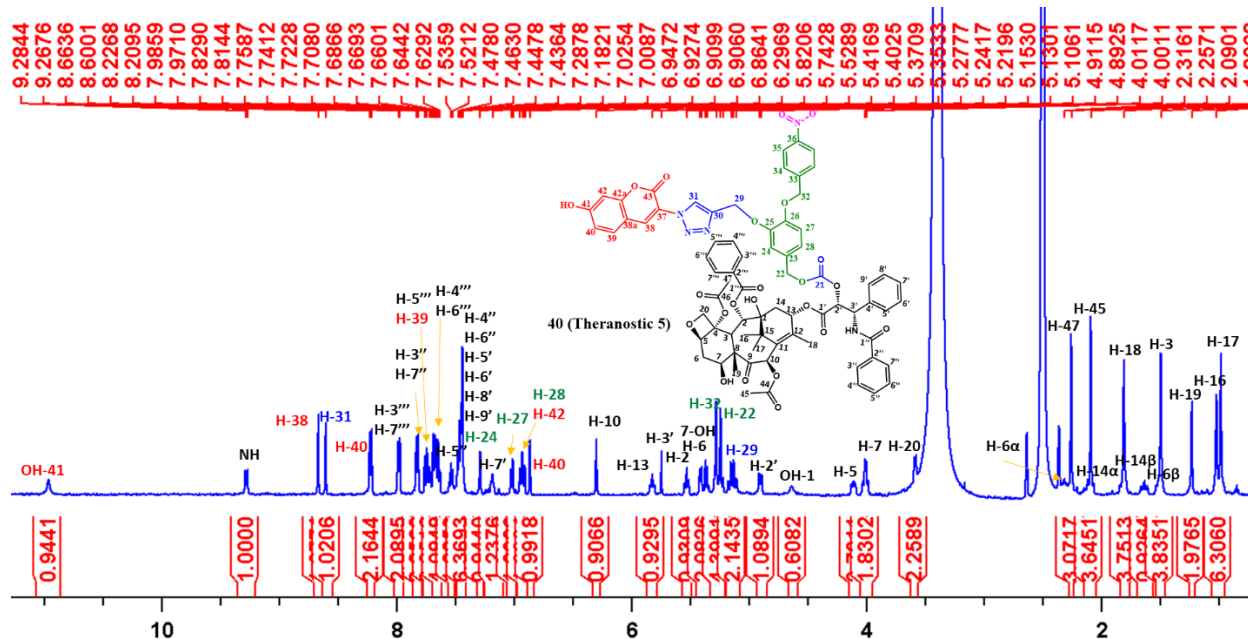
**Εικόνα 2.2.32.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης **39** (**Κουμαρίνη-N<sub>3</sub>**) σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).

Το τελικό στάδιο για τη σύνθεση του **Θεραγωγιστικού 5** περιλάμβανε την προσάρτηση της χρωστικής Κουμαρίνης-N<sub>3</sub> στην ένωση **20** με κλικ χημεία μέσω ενός 1,4-διυποκατεστημένου τριαζολικού δακτυλίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με καταλύτη Cu(I) σε μίγμα μεθανόλης/διχλωρομεθανίου και παρακολούθηθηκε με TLC που έδειξε την κατανάλωση των αρχικών ενώσεων και την εμφάνιση ενός νέου προϊόντος με απορρόφηση στα 366 nm.

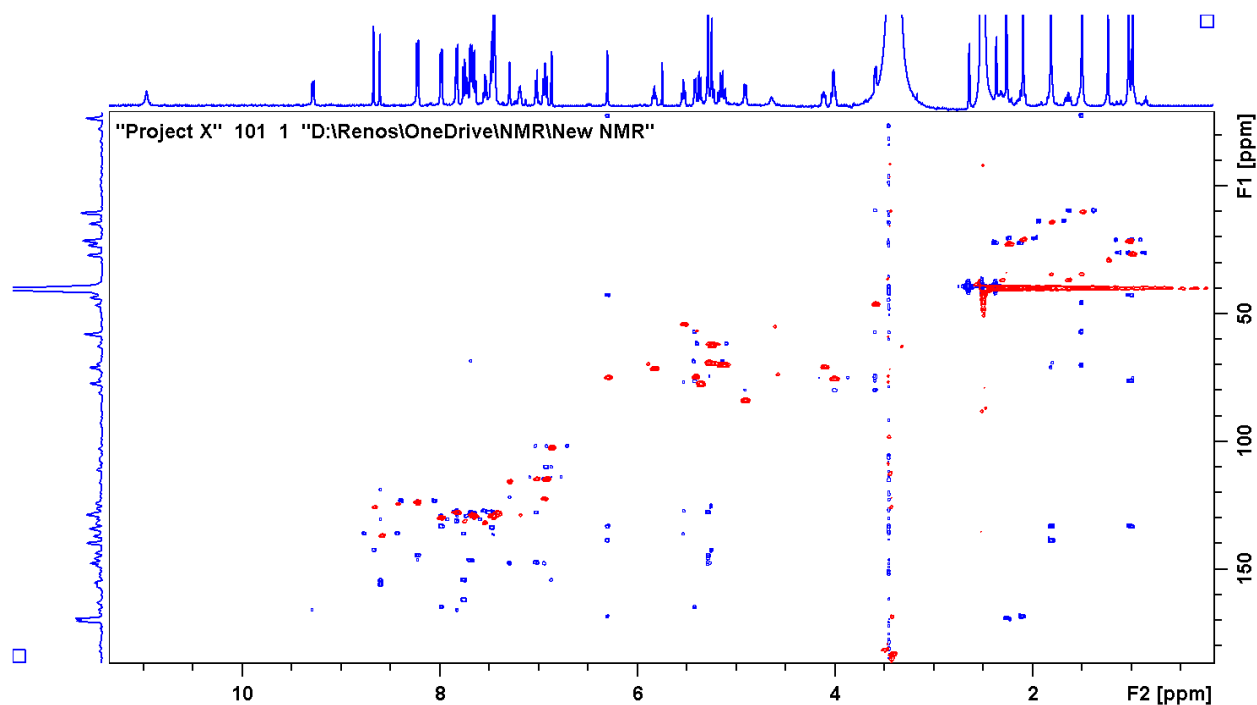
Το τελικό στάδιο για τη σύνθεση του **Θεραγωγιστικού 6** περιλάμβανε την προσάρτηση της χρωστικής DCM-N<sub>3</sub> στην ένωση **20** με κλικ χημεία μέσω ενός 1,4-διυποκατεστημένου τριαζολικού δακτυλίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με καταλύτη Cu(I) σε μίγμα μεθανόλης/διχλωρομεθανίου και παρακολούθηθηκε με TLC που έδειξε την κατανάλωση των αρχικών ενώσεων και την εμφάνιση ενός νέου προϊόντος κίτρινου χρώματος που φαίνεται με γυμνό μάτι.

Τα δυο τελικά προϊόντα (**Θεραγωγιστικό 5** και **Θεραγωγιστικό 6**) καθαρίστηκαν με RP-HPLC και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζας.

Το **Θεραγωγιστικό 5** χαρακτηρίστηκε με <sup>1</sup>H NMR (Εικόνα 2.2.33), με 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSCQ-HMBC (Εικόνα 2.2.34) και με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 2.2.35). Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR έδειξε όλες τις αναμενόμενες κορυφές της ένωσης **20** και της χρωστικής Coumarin-N<sub>3</sub> με χαρακτηριστική την απλή κορυφή στα 10.96 ppm προερχόμενη από την φαινολική -OH. Επίσης, εμφανίστηκε μια κορυφή στα 8.66 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο του τριαζολικού δακτυλίου, επιβεβαιώνοντας την επιτυχημένη κλικ χημεία. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSCQ-HMBC μας επιβεβαίωσαν το προϊόν, και το φάσμα μάζας έδειξε το αναμενόμενο ιόν 1396.4480 [M+H]<sup>+</sup>.

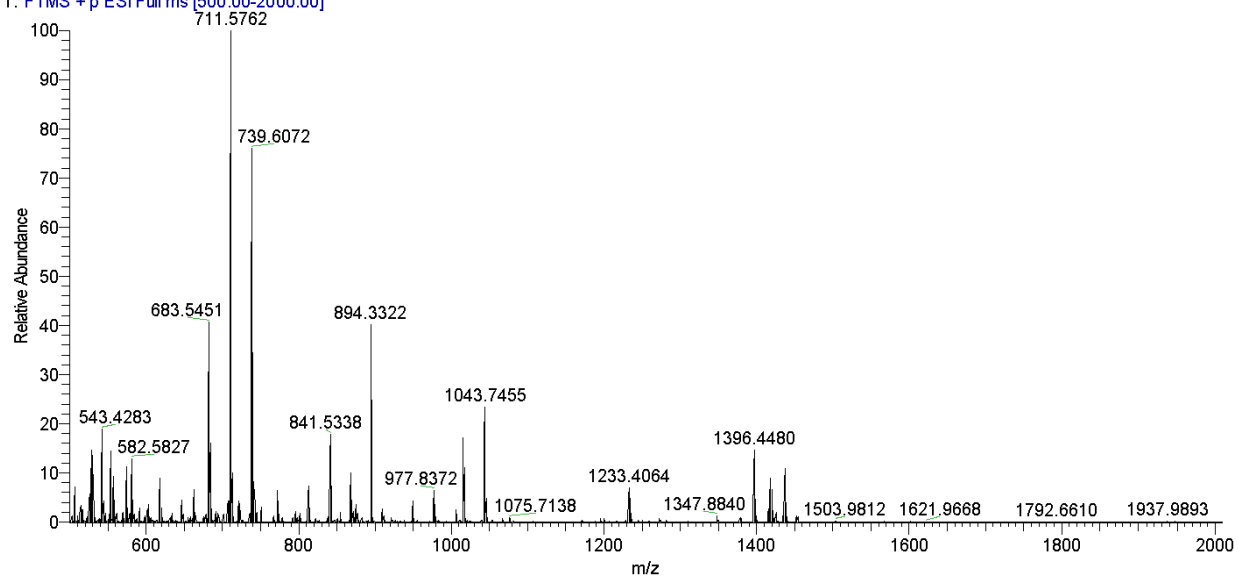


Εικόνα 2.2.33. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του **Θεραγωγιστικού 5** σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.2.34.** Υπέρθηση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) του **Θεραγωγικού 5** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (500 MHz, 25 °C).

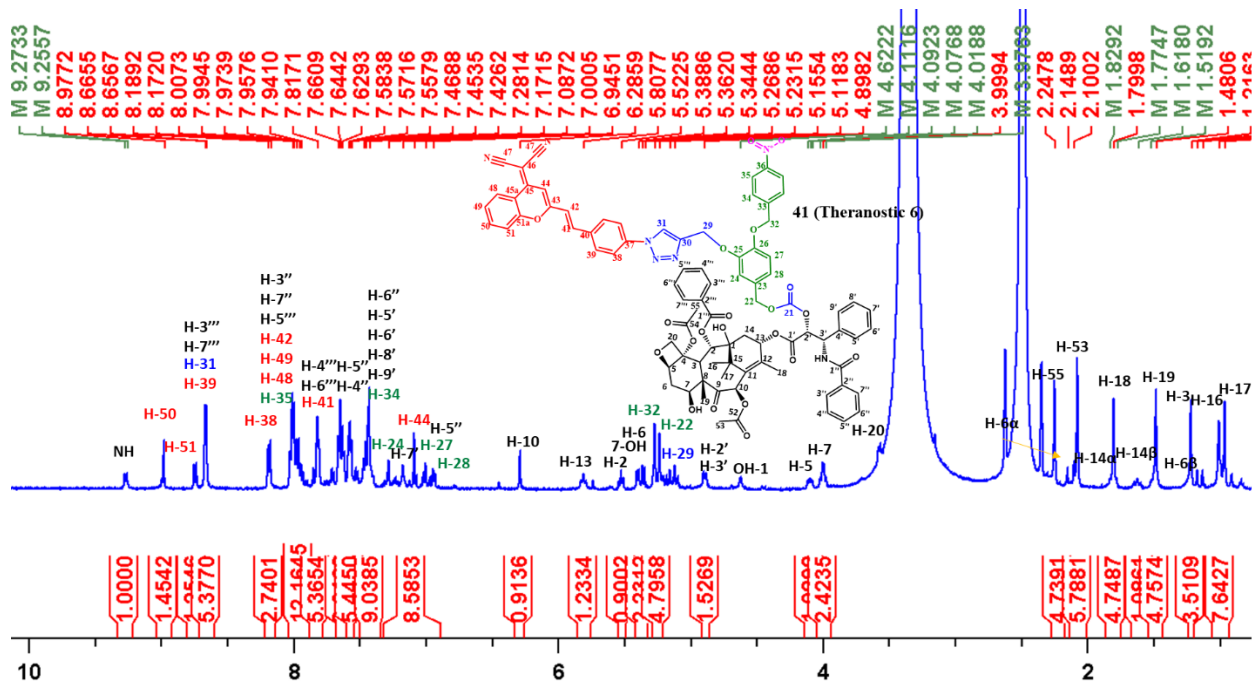
X56\_3\_191105121954 #19-24 RT: 0.28-0.35 AV: 6 NL: 4.88E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [500.00-2000.00]



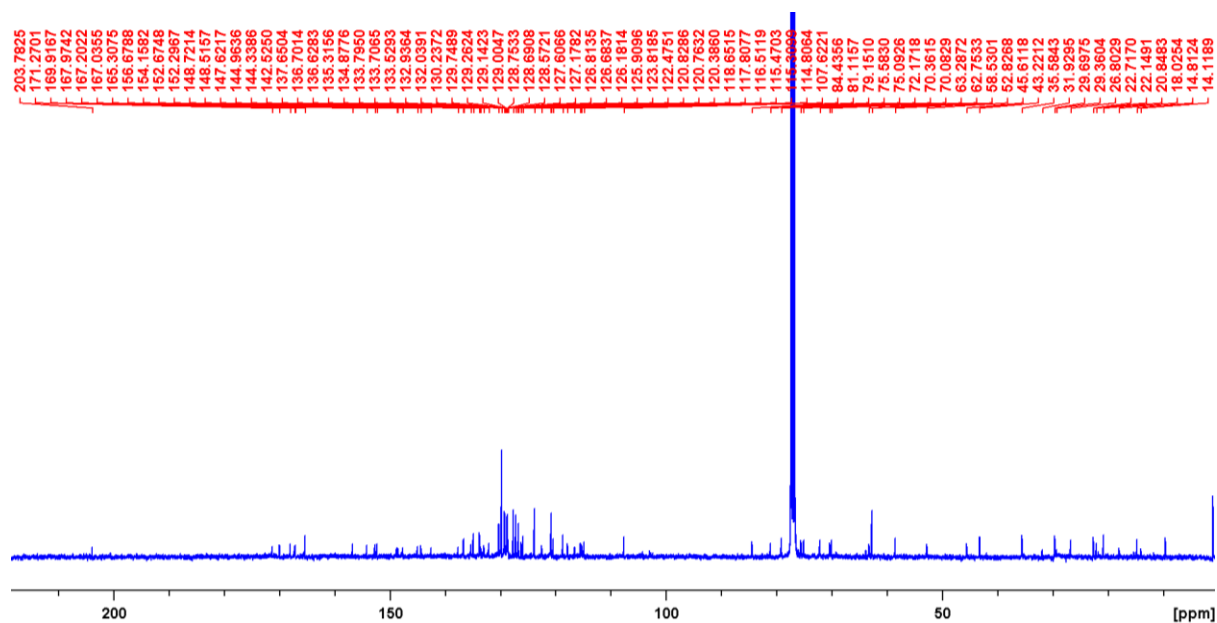
**Εικόνα 2.2.35.** Φάσμα μάζας του **Θεραγωγικού 5**.

Αντίστοιχα, το **Θεραγωγικό 6** χαρακτηρίστηκε με  $^1\text{H}$  NMR (**Εικόνα 2.2.36**, με  $^{13}\text{C}$  NMR (**Εικόνα 2.2.37**) και με φασματομετρία μάζας (**Εικόνα 2.2.38**). Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR έδειξε όλες τις αναμενόμενες κορυφές της ένωσης **20** και της χρωστικής DCM- $\text{N}_3$  με χαρακτηριστική

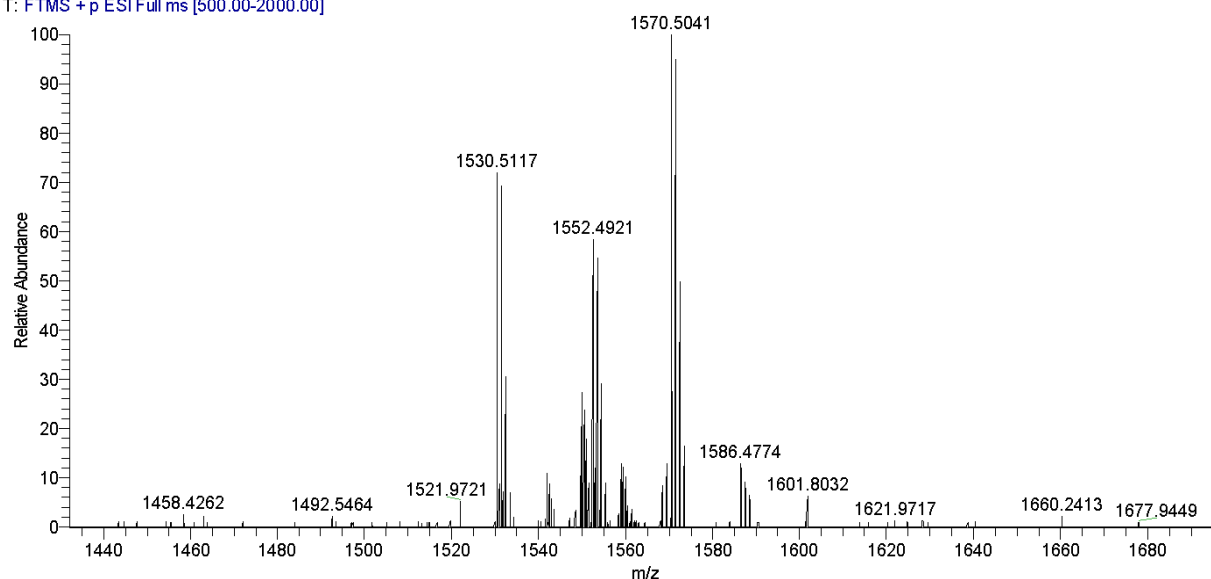
την απλή κορυφή στα 8.97 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο του τριαζολικού δακτυλίου, επιβεβαιώνοντας την επιτυχημένη κλικ χημεία. Το φάσμα μάζας έδειξε το αναμενόμενο ιόν 1530.5117 [M+H]<sup>+</sup>, καθώς και τα ιόντα 1552.4921 [M+Na]<sup>+</sup>, 1570.5041 [M+K]<sup>+</sup>.



Εικόνα 2.2.36. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του Θεραγωγικού 6 σε DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 2.2.37. Φάσμα <sup>13</sup>C NMR του Θεραγωγικού 6 σε DMSO-d<sub>6</sub> (100 MHz, 25 °C).



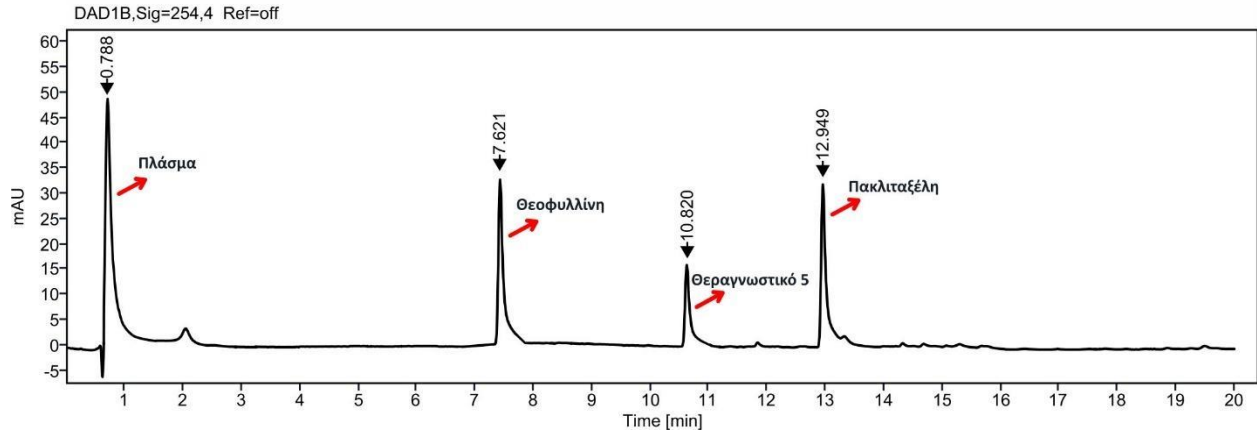
**Εικόνα 2.2.38.** Φάσμα μάζας του **Θεραγωγιστικού 6**.

#### 2.2.4.1 Βιολογική αξιολόγηση των **Θεραγωγιστικών 5** και **6** (προφάρμακα της πακλιταξέλης)

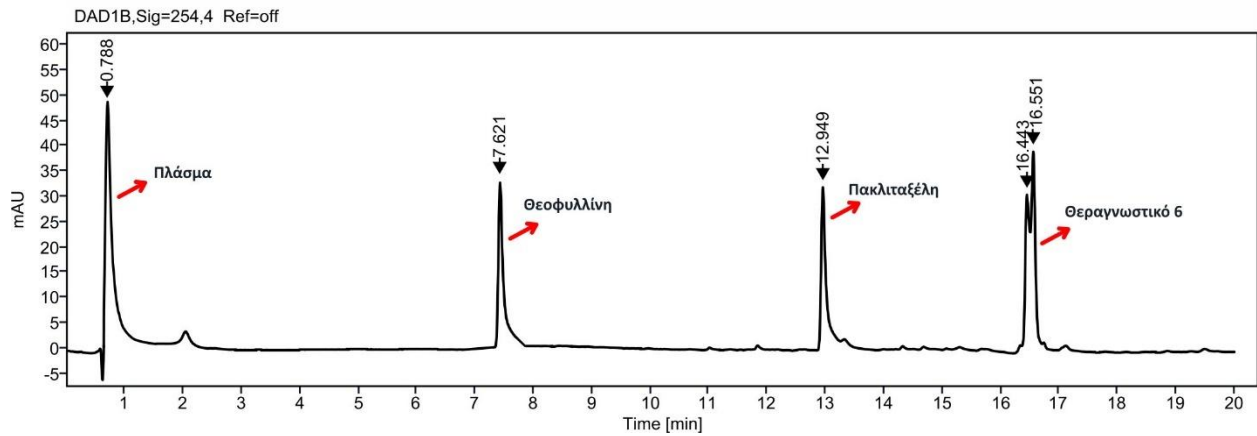
Τα δυο θεραγωγιστικά προφάρμακα της πακλιταξέλης (**Θεραγωγιστικό 5** και **Θεραγωγιστικό 6**) μελετήθηκαν ως προς 1) τη σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, 2), τη σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH και 3) τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες (απορρόφηση και εκπομπή).

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των θεραγωγιστικών προφαρμάκων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού της πακλιταξέλης, του εκάστοτε θεραγωγιστικού, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος. Το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής και για τα δυο θεραγωγιστικά: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5.5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυναδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 5 λεπτά, έπειτα βαθμιδωτό έως 20/80 για άλλα 10 λεπτά και τέλος 0/100 ισοκρατικό για άλλα 5 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 254 nm. Τα πρότυπα χρωματογραφήματα φαίνονται παρακάτω στην **Εικόνα 2.2.39** και **Εικόνα 2.2.40**.



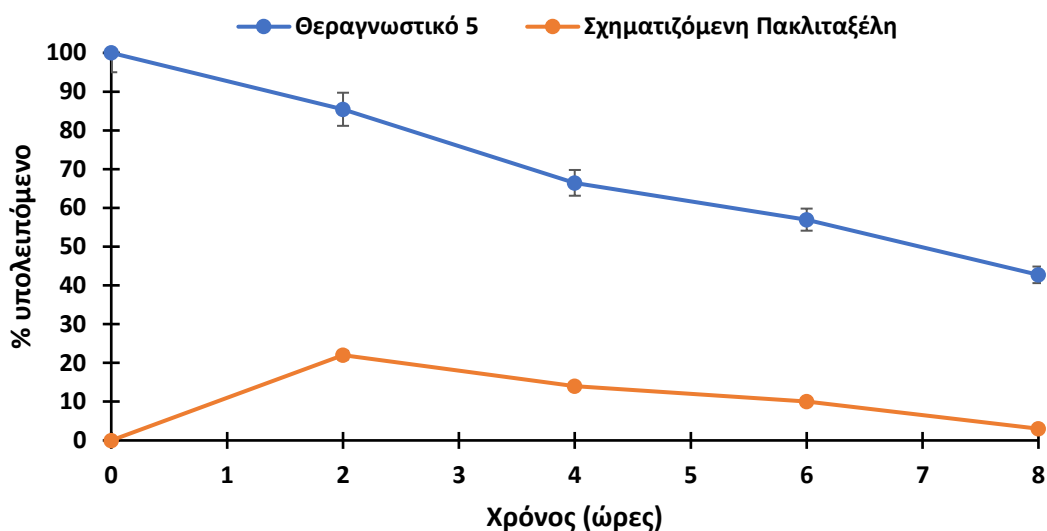
**Εικόνα 2.2.39.** Χρωματογράφημα HPLC του **Θεραγωγικού 5** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία πακλιταξέλης, και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.



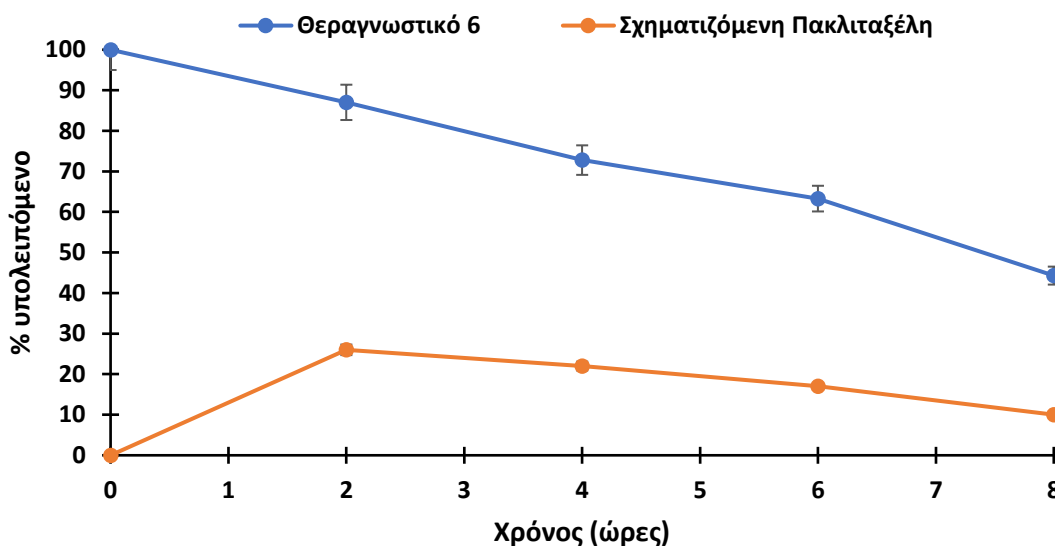
**Εικόνα 2.2.40.** Χρωματογράφημα HPLC του **Θεραγωγικού 6** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία πακλιταξέλης, και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.



1.1.1.1 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των **Θεραγωγιστικών 5 και 6** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος  
Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας των  
δύο θεραγωγιστικών προφαρμάκων σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο:



*Εικόνα 2.2.41.* Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγιστικού 5** (μπλε χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και καμπύλη σχηματισμού της πακλιταξέλης (πορτοκαλί χρώμα) συναρτήσει του χρόνου.

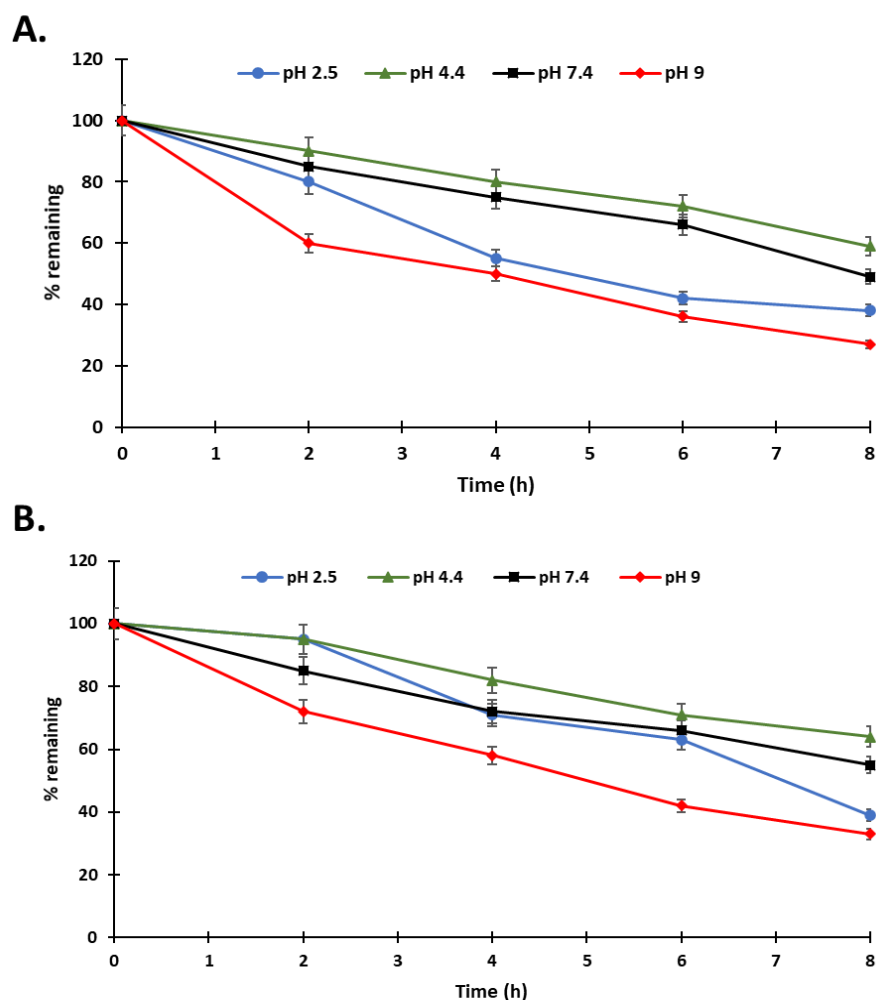


*Εικόνα 2.2.42.* Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγιστικού 6** (μπλε χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και καμπύλη σχηματισμού της πακλιταξέλης (πορτοκαλί χρώμα) συναρτήσει του χρόνου.

Παρατηρούμε πως και τα δυο είναι σχετικά σταθερά με χρόνο ημιζωής στις 8 ώρες, ενώ κατά την διάσπαση των αρχικών μορίων φαίνεται να ελευθερώνεται σημαντική ποσότητα του φαρμάκου πακλιταξέλη.

#### 1.1.1.2 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των Θεραγωγιστικών 5 και 6 σε διάφορες τιμές pH

Η σταθερότητα των 2 θεραπωστικών μελετήθηκε σε 4 ρυθμιστικά διαλύματα σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Η μελέτη της σταθερότητας των δυο προφαρμάκων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το σύστημα που παρουσιάστηκε στις **Εικόνες 2.2.39** και **2.2.40**. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.2.43**.



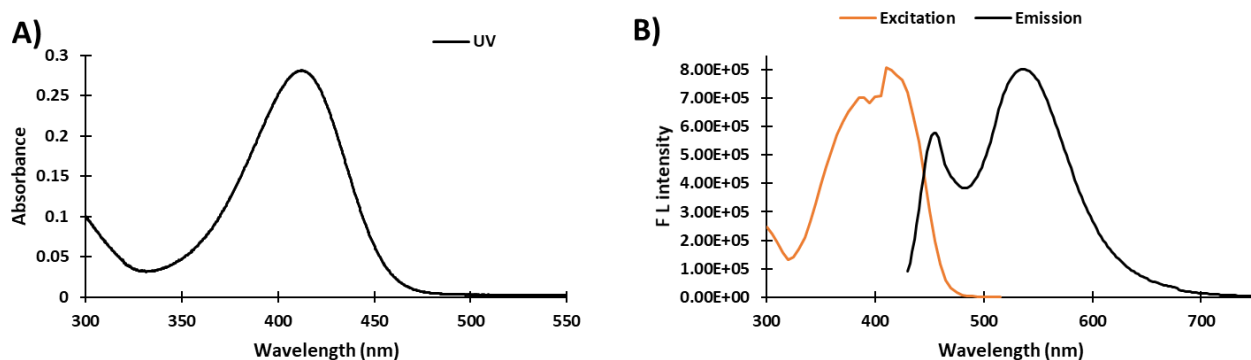
**Εικόνα 2.2.43.** Καμπύλη σταθερότητας (A) του Θεραγωγιστικού 5 και (B) του Θεραγωγιστικού 6 σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Παρατηρούμε πως και τα 2 θεραπωστικά προφαρμάκα είναι σχετικά σταθερά σε pH 7.4 με χρόνο ημιζωής πάνω από 8 ώρες το οποίο είναι σημαντικό καθώς μπορεί να αποφευχθεί μια

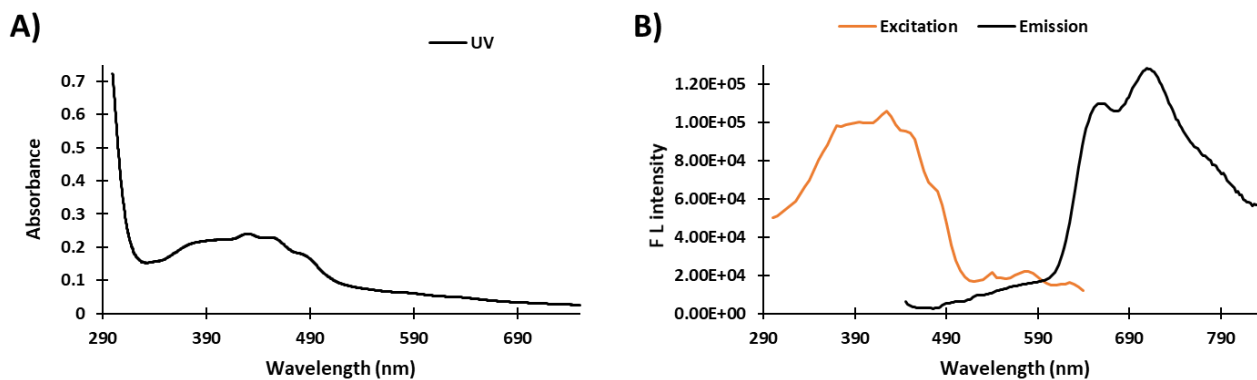
πρώιμη απελευθέρωση του φαρμάκου στη κυκλοφορία του αίματος. Ομοίως, εμφανίζουν παρόμοια σταθερότητα στο pH 4.4 με χρόνο ημιζωής πάνω από 8 ώρες, ενώ στο όξινο pH 2.5 και σε βασικό 9 εμφανίζουν ελαττωμένη σταθερότητα, πιθανότατα λόγω του καρβοξυ εστερικού δεσμού που περιέχουν. Σε γενικές γραμμές, το **Θεραγωγιστικό 6** εμφανίζεται ελαφρώς πιο σταθερό σε σχέση με το **Θεραγωγιστικό 5** σε όλες τις τιμές pH.

### 1.1.1.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες των Θεραγωγιστικών 5 και 6

Τα δυο θεραγωγιστικά μόρια μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες με χρήση φασματοσκοπίας UV και φθορισμομετρίας (**Εικόνα 2.2.44** και **2.2.45**). Το **Θεραγωγιστικό 5** που περιέχει την κουμαρίνη ως χρωστική, έδειξε μέγιστο εκπομπής στα 540 nm. Το **Θεραγωγιστικό 6** που περιέχει την DCM ως χρωστική, έδειξε μέγιστο εκπομπής στα 713 nm.



**Εικόνα 2.2.44.** (A) Φάσμα UV του **Θεραγωγιστικού 5** και (B) Φάσμα διέγερσης (πορτοκαλί χρώμα) και φθορισμού (μαύρο χρώμα) του **Θεραγωγιστικού 5**. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  και σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).



**Εικόνα 2.2.45.** (A) Φάσμα UV του **Θεραγωγιστικού 6** και (B) Φάσμα διέγερσης (πορτοκαλί χρώμα) και φθορισμού (μαύρο χρώμα) του **Θεραγωγιστικού 6**. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  και σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).

#### 1.1.1.4 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των **Θεραγωγιστικών 5 και 6**

Πραγματοποιήθηκε μια πρώτη προσπάθεια μελέτης της δράσης των δυο θεραγωγιστικών μορίων σε περιβάλλον υποξίας αλλά παρατηρήθηκε δομική αστάθεια με αποτέλεσμα τη λήψη μη αναμενόμενων αποτελεσμάτων. Για την αντιμετώπιση της δομικής αστάθειας, προχωρήσαμε στην ενσωμάτωση των μορίων σε πολυμερικά συστήματα τα οποία έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν τις ενσωματωμένες ουσίες σχηματίζοντας νανοσωματίδια σε υδατικό περιβάλλον, και να τις απελευθερώνουν εκλεκτικά σε pH 6.5 (καρκινικό μικροπεριβάλλον). Τα πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη σε συνεργασία με τον Καθηγητή κ. Ερμή Ιατρού και τον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο στο ΕΚΠΑ.

#### 1.1.2 7<sup>ο</sup> & 8<sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική-Βιοτίνη/TPP<sup>+</sup>)

Έχοντας συνθέσει έξι νέα θεραγωγιστικά μόρια με σκοπό τη ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου, προχωρήσαμε στη σύνθεση δυο ακόμα με βάση τη πακλιταξέλη. Θελήσαμε όμως να διαφοροποιηθούμε από τα προηγούμενα μόρια, δημιουργώντας έτσι δυο πιο εξεζητημένες δομές.

Για τον σκοπό αυτό, συνθέσαμε μια καινοτόμα χρωστική-κορμό που με κατάλληλη τροποποίηση εκτέμνει στο εγγύς υπέρυθρο και επάνω της μπορούν να προσαρτηθούν διαφορετικά φάρμακα, μόρια στόχευσης και σκανδάλες. Η νέα χρωστική-κορμός ομοιάζει με τη χρωστική-κορμό που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως για τη σύνθεση της DCM-N<sub>3</sub>, αλλά φέρει επιπλέον θέσεις για συμπυκνώσεις σε αντίθεση με την προηγούμενη στην οποία μπορούσε να γίνει μια μόνο συμπύκνωση.

Έχοντας βρει τη χρωστική-κορμό, θελήσαμε να ενσωματώσουμε μια «σκανδάλη» που θα αλληλεπιδρά σε περιβάλλον υποξίας (-NO<sub>2</sub>) και θα απελευθερώνει το φάρμακο, και ένα μόριο στόχευσης.

Για τον σκοπό αυτό, προχωρήσαμε σε διαφορετικές συμπυκνώσεις δημιουργώντας μια νέα χρωστική της οποίας ο φθορισμός βρίσκεται σε απόσβεση. Η χρωστική φέρει έναν ειδικό μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου που θα προσαρτηθεί στο επόμενο στάδιο. Το τελικό στάδιο περιλάμβανε τη προσάρτηση ομάδων που προσφέρουν στόχευση (D-Βιοτίνη, TPP<sup>+</sup>, πεπτίδιο). Όταν τα νέα αυτά θεραγωγιστικά μόρια βρεθούν σε περιβάλλον υποξίας, απελευθερώνεται το τοξικό φάρμακο και ταυτόχρονα ο φθορισμός αυξάνεται σημαντικά.

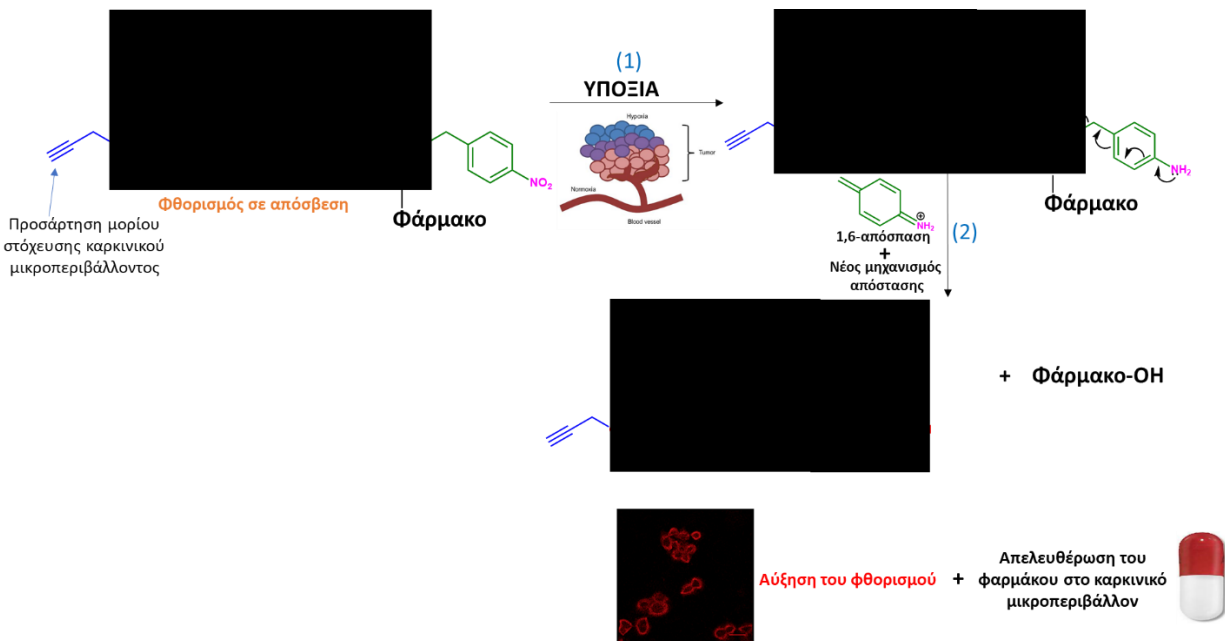
Για το συγκεκριμένο μόριο – μεθοδολογία, θα γίνει περαιτέρω εκτεταμένος έλεγχος και θα διερευνηθεί η πιθανότητα κατοχύρωσης διπλώματος ευρεσιτεχνίας (τη στιγμή που γίνεται η συγγραφή της διατριβής δεν έχει αναφερθεί κάτι παρόμοιο), οπότε και δεν αποκαλύπτεται η δομή των θεραγωγιστικών μορίων **7**, **8** και **9**, αλλά θα παρουσιάζονται καλυμμένες όπως στην **Εικόνα 2.2.46**. Ομοίως, οι πειραματικές πορείες δεν θα παρουσιαστούν στο πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής.



**Εικόνα 2.2.46.** Δομή της νέας χρωστικής που φέρει ομάδα αλληλεπίδρασης με τη νιτροαναγωγή (μωβ χρώμα) και ένα ελεύθερο αλκύνιο που ενδείκνυται για κλικ χημεία.

Συγκεκριμένα, στη πρώτη συμπύκνωση (δεξιά), εισήχθη ένας νέος δακτύλιος-κορμός που φέρει 1) έναν παρα-νιτροβενζύλο υποκαταστάτη (πράσινο χρώμα) που περιέχει την ομάδα αλληλεπίδρασης με τη νιτροαναγωγή (μωβ χρώμα) και σε κοντινή θέση φέρει έναν πρωτότυπο αυτό-διασπώμενο συνδέτη. Στη δεύτερη συμπύκνωση (αριστερά), εισήχθη ένα μόριο που φέρει ελεύθερο αλκύνιο, που ενδείκνυται για κλικ χημεία όπως αλκυνίου-αζιδίου και thiolyne.

Ο γενικευμένος τρόπος δράσης των **Θεραγωγιστικών 7 και 8** παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.2.47**.

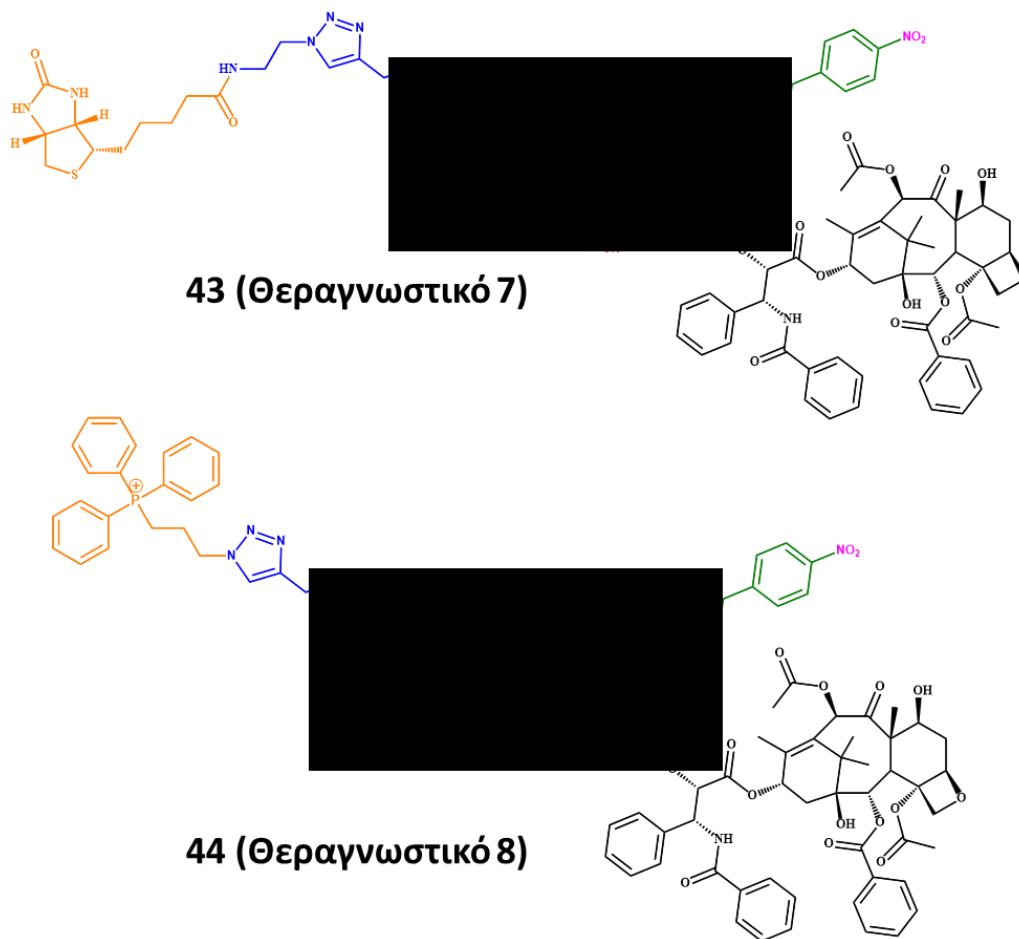


**Εικόνα 2.2.47.** Μηχανισμός δράσης της νέας χρωστικής που φέρει έναν παρα-νιτροβενζύλο υποκαταστάτη (πράσινο χρώμα) που περιέχει την ομάδα αλληλεπίδρασης με τη νιτροαναγωγή (μωβ χρώμα) και σε κοντινή θέση φέρει έναν πρωτότυπο αυτό-διασπώμενο συνδέτη για την

*απελευθέρωση του φαρμάκου σε κατάσταση υποξίας. Επίσης, η νέα χρωστική φέρει ένα ελεύθερο αλκύνιο για χημεία κλικ.*

Συνοπτικά, ο φθορισμός του γενικευμένου θεραγνωστικού προφαρμάκου που φαίνεται στη παραπάνω εικόνα βρίσκεται σε απόσβεση (χαμηλή ένταση φθορισμού) λόγω παρεμπόδισης του φαινομένου ICT (Intramolecular Charge Transfer). Αρχικά, το μόριο στόχευσης θα κατευθύνει εκλεκτικά το θεραγνωστικό μόριο στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Οι στερεοί όγκοι χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία) που συνδυάζονται με την υπερέκφραση νιτροαναγωγασών, οι οποίες μπορούν να αναγάγουν την νίτρο ομάδα της χρωστικής (1). Μόλις η νίτρο ομάδα μετατραπεί στην αντίστοιχη υδροξυλαμίνη ή αμίνη, το μόριο υφίσταται μια ταχεία 1,6-απόσπαση απελευθερώνοντας τον αυτό-διασπώμενο π-νίτρο βενζυλο συνδέτη και ταυτόχρονα μέσω ενός νέου πρωτοποριακού μηχανισμού απελευθερώνεται το τοξικό φάρμακο με ταυτόχρονη αύξηση του φθορισμού (2). Το σημαντικό στοιχείο της μεθοδολογίας αυτής έγκειται στην σημαντική ενίσχυση του φθορισμού όταν θα αποχωριστούν η χρωστική και το φάρμακο λόγω ενεργοποίησης του φαινομένου ICT. **Επομένως, μόλις εμφανιστεί έντονη αύξηση του φθορισμού θα μπορούμε να εντοπίσουμε το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων και ταυτόχρονα θα επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του κυτταροτοξικού φαρμάκου.**

Βασιζόμενοι στον προαναφερθέντα σχεδιασμό, προχωρήσαμε στη σύνθεση δυο θεραγνωστικών μορίων που φέρουν τη πακλιταξέλη ως κυτταροτοξικό παράγοντα αλλά διαφέρουν στο μόριο-στόχευση. Το ένα από αυτά φέρει την D-βιοτίνη ως μόριο στόχευσης (στόχευση υπερεκφραζόμενων υποδοχέων βιοτίνης στη μεμβράνη των κυτταρικών κυττάρων) ενώ το άλλο φέρει την τριφαινυλοφωσφίνη (στόχευση μιτοχονδρίων). Οι δομές των δυο θεραγνωστικών μορίων φαίνονται στη παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 2.2.48**).



**Εικόνα 2.2.48.** Δομές των δυο θεραγωγιστικών που περιέχουν πακλιταξέλη (αντικαρκινικό φάρμακο) και ως μόριο στόχευσης είτε *D*-βιοτίνη (**Θεραγωγιστικό 7**, επάνω), είτε  $TPP^+$  (**Θεραγωγιστικό 8**, κάτω). Τα μόρια στόχευσης φαίνονται με πορτοκαλί χρώμα, οι συνδέτες με μπλε, η πακλιταξέλη με μαύρο, ο αυτο-διασπώμενος συνδέτης με πράσινο και η ομάδα αλληλεπίδρασης με τη νιτροαναγωγή με μωβ χρώμα.

Όσον αφορά το **Θεραγωγιστικό 7**, η *D*-βιοτίνη (ή βιταμίνη Η) προσδένεται εκλεκτικά στους υποδοχείς βιοτίνης οι οποίοι υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, καθώς οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για την επιβίωση και ανάπτυξή τους. Επομένως, το **Θεραγωγιστικό 7** μπορεί και συσσωρεύεται στο εσωτερικό των κυττάρων πολλών διαφορετικών μορφών καρκίνου. Έτσι, επιτυγχάνεται η εκλεκτική απελευθέρωση της πακλιταξέλης στα καρκινικά κύτταρα.

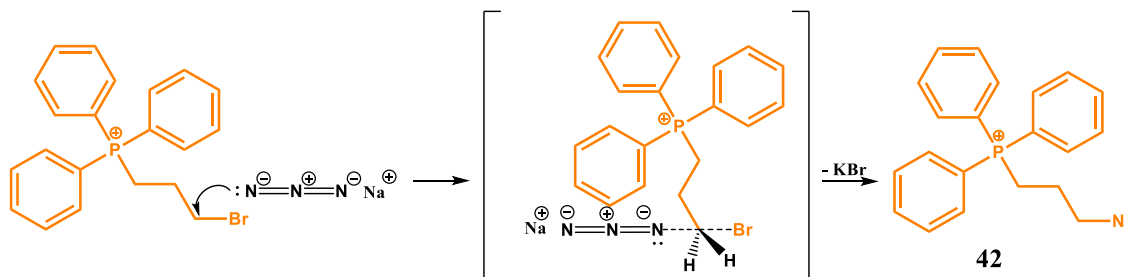
Όσον αφορά το **Θεραγωγιστικό 8**, το  $TPP^+$  διαθέτει μια μεγάλη, υδρόφοβη επιφάνεια που του επιτρέπει να περνά εύκολα δια μέσω των φωσφολιπιδικών διπλών στρώσεων των κυτταρικών μεμβρανών. Το  $TPP^+$  μπορεί να περνά μέσω της μεμβράνης του πλάσματος και να συσσωρεύεται στο κυτοσόλιο που οδηγείται από το δυναμικό της μεμβράνης πλάσματος. Αυτή η στρατηγική χρησιμοποιεί περαιτέρω το μεγάλο αρνητικό εσωτερικό δυναμικό των μιτοχονδρίων για να οδηγήσει τη συσσώρευση βιοδραστικών ενώσεων της  $TPP^+$  μέσα στα μιτοχόνδρια για αρκετές

εκατοντάδες φορές. Αυτό το υψηλό αρνητικό δυναμικό μεμβράνης που υπάρχει στα μιτοχόνδρια δεν βρίσκεται σε κανένα άλλο κυτταρικό διαμέρισμα, το οποίο προσφέρει μια πολύ επιλεκτική μεταφορά μορίων σε αυτά τα οργανίδια <sup>148</sup>. Έτσι, επιτυγχάνεται η εκλεκτική απελευθέρωση της πακλιταξέλης στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων που εμπλέκονται στη παραγωγή ενέργειας αυτών.

Για τη παραλαβή των δυο θεραπευτικών απαιτήθηκε συγκλίνουσα συνθετική προσέγγιση. Χάριν ευκολίας, η δομή των θεραπευτικών μορίων θα μπορούσε να χωριστεί σε 5 επιμέρους συνθέσεις.

- 1) Σύνθεση του κεντρικού δικύανο κορμού που φέρει τις 2 μεθυλομάδες για συμπύκνωση.
- 2) Σύνθεση και μετέπειτα συμπύκνωση του δακτυλίου που φέρει το ακραίο αλκύνιο στο οποίο θα προσαρτηθεί το μόριο στόχευσης.
- 3) Σύνθεση και μετέπειτα συμπύκνωση του δακτυλίου που φέρει την «σκανδάλη» για την υποξία και τον επιπρόσθετο μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου.
- 4) Προσάρτηση του φαρμάκου (πακλιταξέλη).
- 5) Σύνθεση και μετέπειτα προσάρτηση του μορίου στόχευσης μέσω κλικ χημείας.

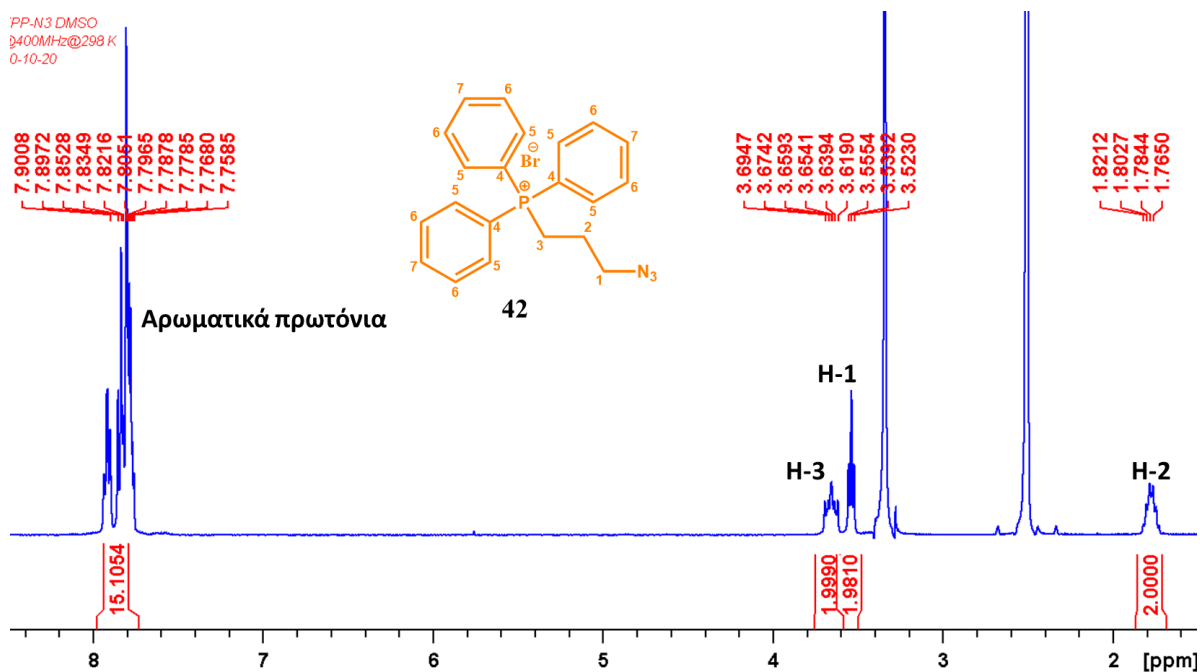
Η τροποποίηση της D-Βιοτίνης για να φέρει ακραίο αλκύνιο παρουσιάστηκε στην ενότητα 2.1.5, ενώ η τροποποίηση του TPP<sup>+</sup> αποτελείται από ένα βήμα μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης S<sub>N</sub>2 που φαίνεται παρακάτω στο **Σχήμα 2.2.13**:



**Σχήμα 2.2.13.** Μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **42** μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης S<sub>N</sub>2.

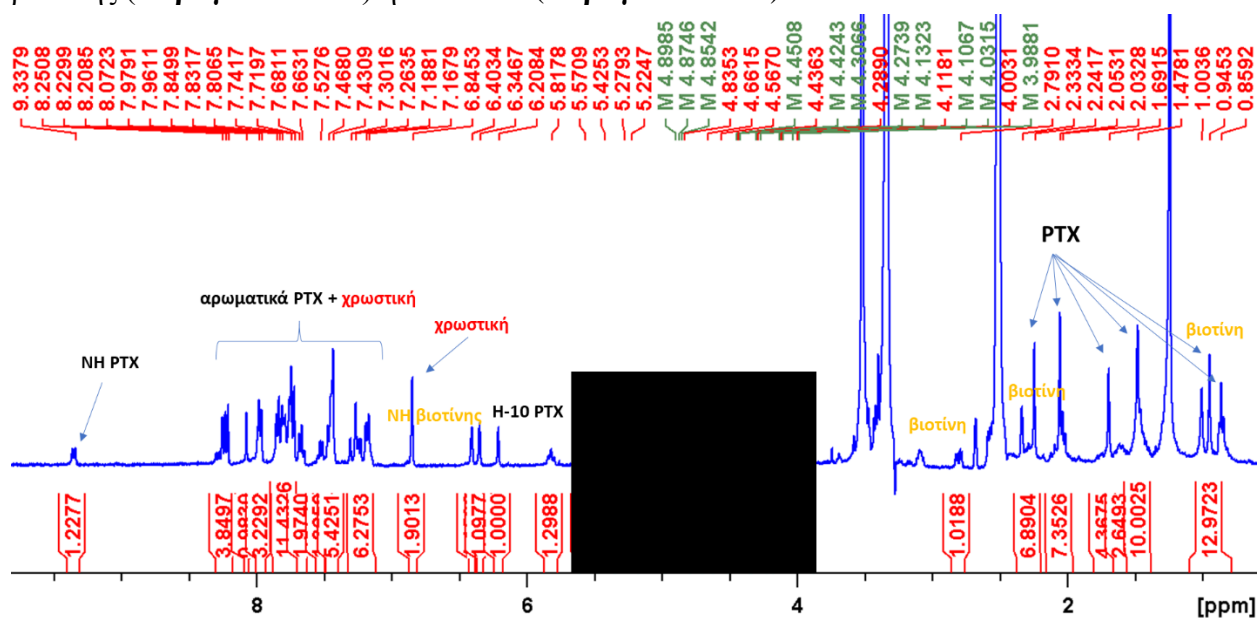
Η ένωση **50** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR (**Εικόνα 2.2.49**) που έδειξε όλες τις αρχικές κορυφές του βρωμιδίου με μετατόπιση των μεθυλενομάδων (ειδικά αυτής που γειτνιάζει με το εισαχθέν αζίδιο).



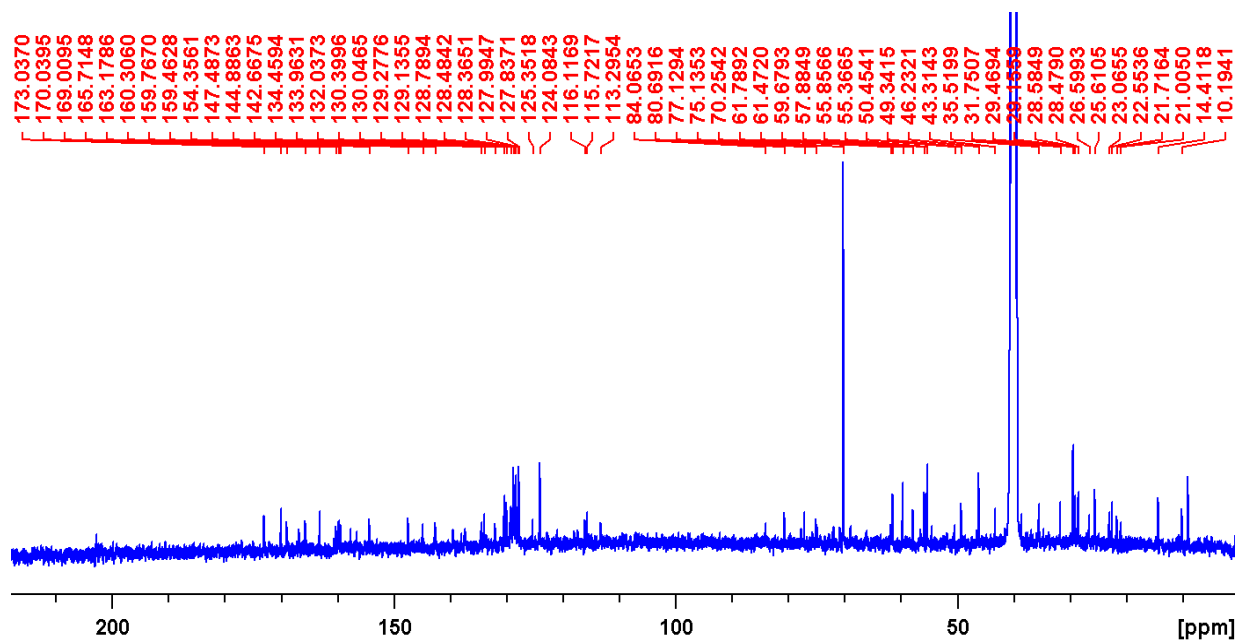


Εικόνα 2.2.49. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **42** σε  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz, 25 °C).

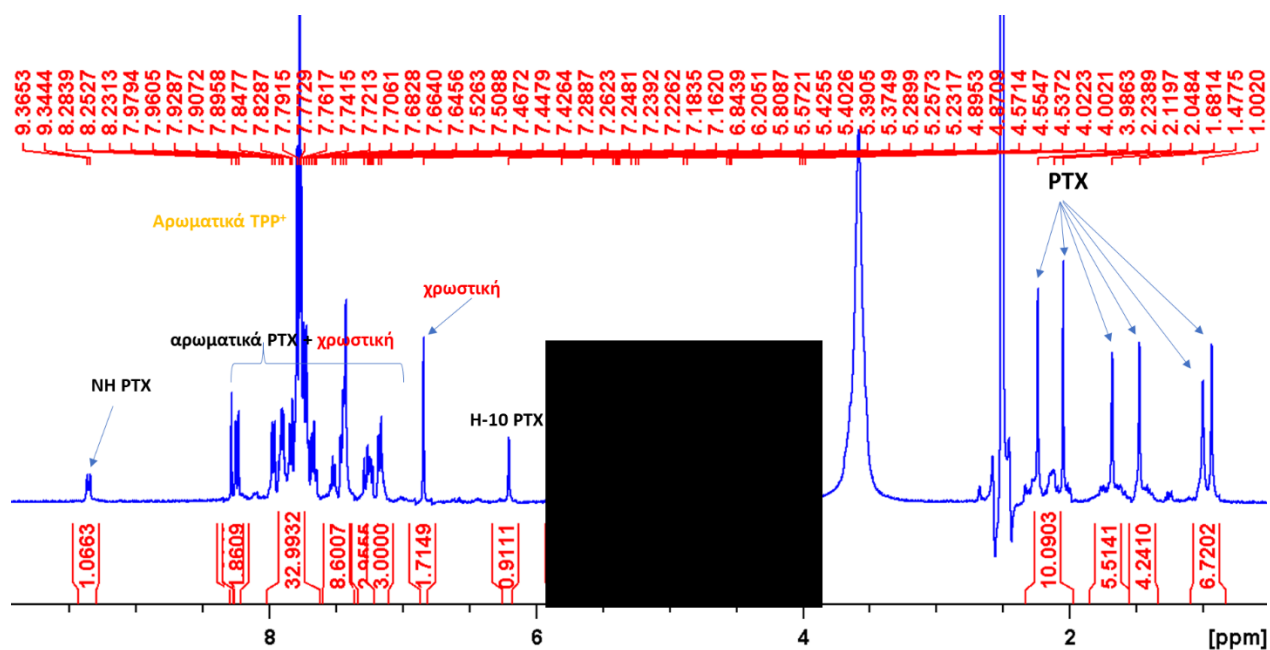
Τα τελικά **Θεραγωγαστικά 7** και **8** χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR και  $^{13}\text{C}$  NMR όπως φαίνονται παρακάτω. Στα φάσματα παρόλο που δεν παρουσιάζονται οι δομές, μπορούν να διακριθούν οι αναμενόμενες κορυφές της χρωστικής, της πακλιταξέλης και της βιοτίνης (**Θεραγωγαστικό 7**) ή του  $\text{TPP}^+$  (**Θεραγωγαστικό 8**).



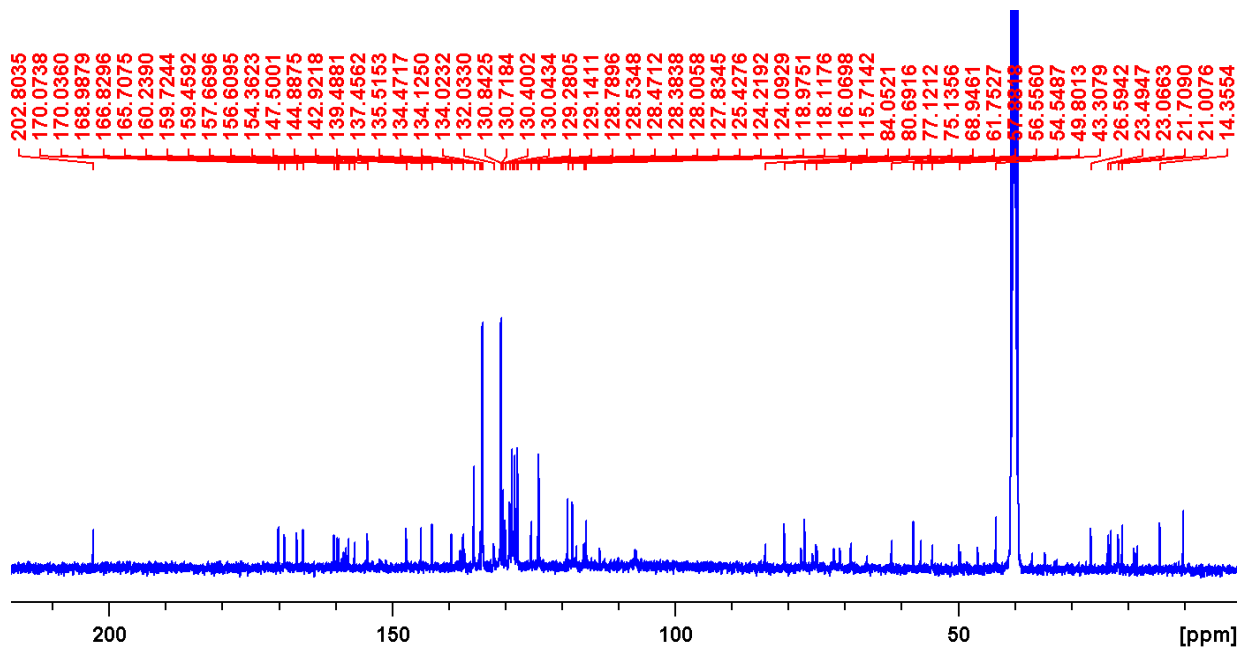
Εικόνα 2.2.50. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **43** (**Θεραγωγαστικό 7**) σε  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 2.2.51. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 43 (Θεραγωγικό 7) σε  $\text{DMSO}-d_6$  (100 MHz, 25 °C).

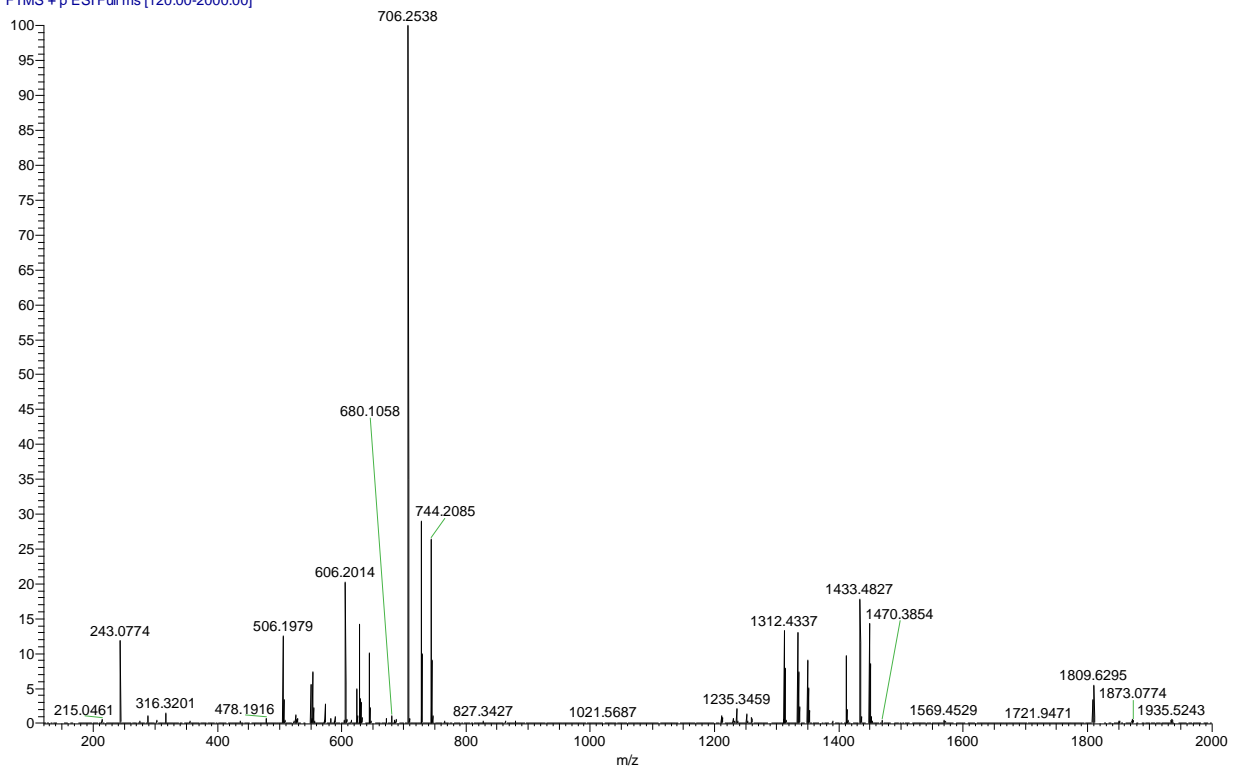


Εικόνα 2.2.52. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 44 (Θεραγωγικό 8) σε  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 2.2.53.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **44** (Θεραγωγικό **8**) σε  $\text{DMSO}-d_6$  (100 MHz, 25 °C).

q-46\_210211104729 #35 RT: 0.50 AV: 1 NL: 5.64E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-2000.00]



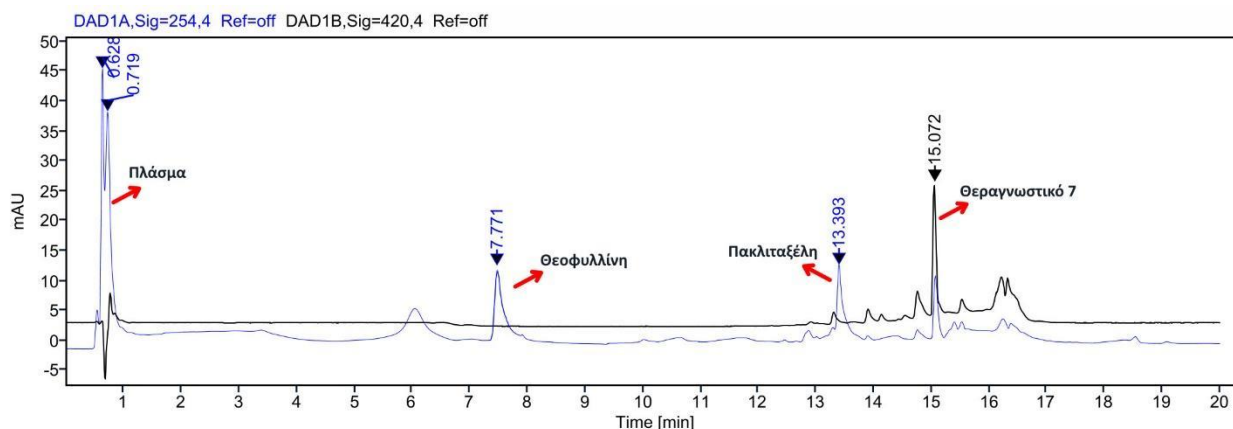
**Εικόνα 2.2.54.** Φάσμα μάζας της ένωσης **44** (Θεραγωγικό **8**).

### 1.1.2.1 Βιολογική αξιολόγηση των **Θεραγωγιστικών 7 και 8** (προφάρμακα της πακλιταξέλης)

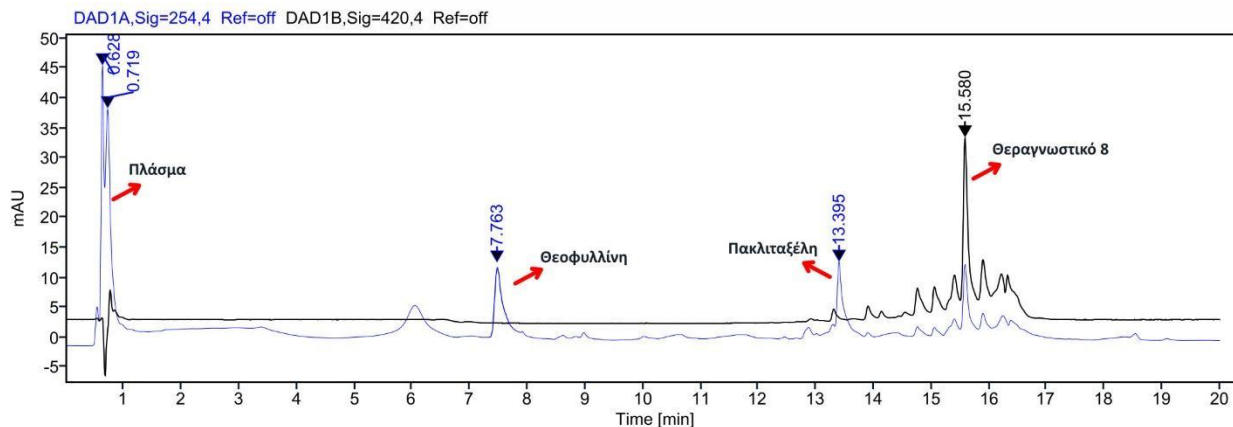
Τα δυο θεραγωγιστικά προφάρμακα της πακλιταξέλης (**Θεραγωγιστικό 7** και **Θεραγωγιστικό 8**) μελετήθηκαν ως προς 1) τη σταθερότητά τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, 2), τη σταθερότητά τους σε ένα εύρος τιμών pH, 3) τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες (απορρόφηση και εκπομπή) και ως προς τη δράση τους έναντι καρκινικής σειράς του παγκρέατος παρουσία και απουσία υποξίας.

Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των θεραγωγιστικών προφαρμάκων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. π

Για τον έλεγχο της σταθερότητας με RP-HPLC, έπρεπε να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού της πακλιταξέλης, του εκάστοτε θεραγωγιστικού, του εσωτερικού προτύπου και των κορυφών του πλάσματος του αίματος. Το κατάλληλο σύστημα βρέθηκε να είναι το εξής και για τα δυο θεραγωγιστικά: Η κινητή φάση αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου, pH = 5.5 και ακετονιτρίλιο, ενώ χρησιμοποιήθηκε δυαδικό σύστημα διαλυτών: 98/2 ισοκρατικό για 5 λεπτά, έπειτα βαθμιδωτό έως 20/80 για άλλα 10 λεπτά και τέλος 0/100 ισοκρατικό για άλλα 5 λεπτά, με ροή 1.2 mL/min και έλεγχο του χρωματογραφήματος στα 254 nm και στα 420 nm. Τα πρότυπα χρωματογραφήματα φαίνονται παρακάτω στην **Εικόνα 2.2.55** και **Εικόνα 2.2.56**.

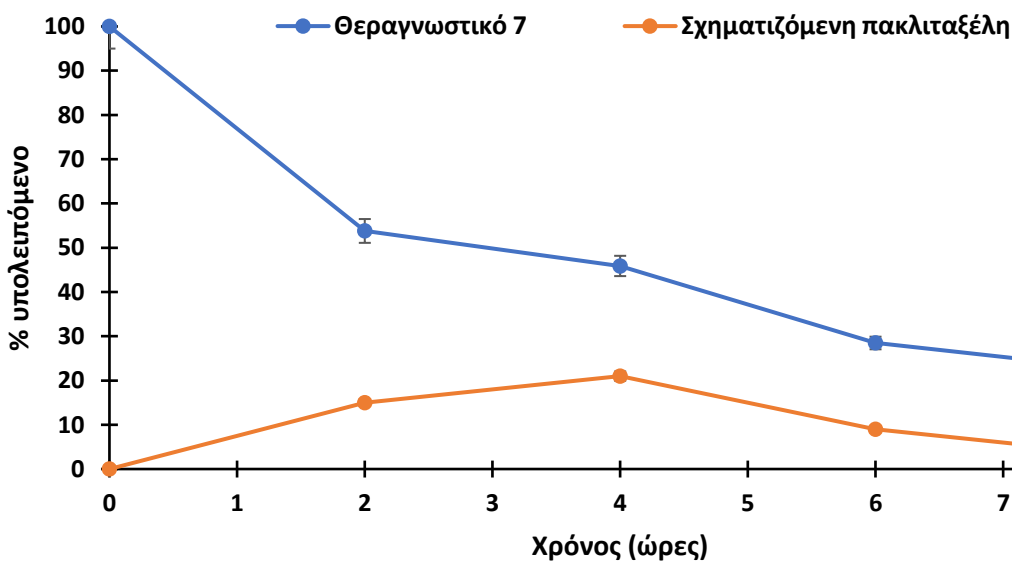


**Εικόνα 2.2.55.** Χρωματογράφημα HPLC του **Θεραγωγιστικού 7** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία πακλιταξέλης, και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

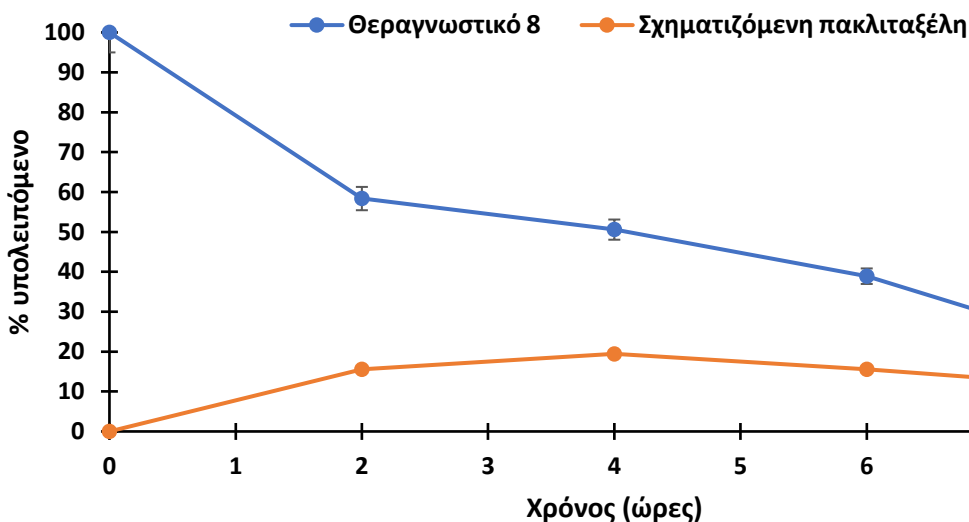


**Εικόνα 2.2.56.** Χρωματογράφημα HPLC του **Θεραγωγικού 8** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, παρουσία πακλιταξέλης, και θεοφυλλίνης ως εσωτερικό πρότυπο.

1.1.2.2 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των **Θεραγωγικών 7** και **8** σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος  
Εφόσον βρέθηκε το κατάλληλο σύστημα, προβήκαμε στη μελέτη της σταθερότητας των δυο θεραπευτικών προφαρμάκων σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος σε συνάρτηση με τον χρόνο (Εικόνες 2.2.57 και 2.2.58).



**Εικόνα 2.2.57.** Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγικού 7** (μπλε χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και καμπύλη σχηματισμού της πακλιταξέλης (πορτοκαλί χρώμα) συναρτήσει του χρόνου.

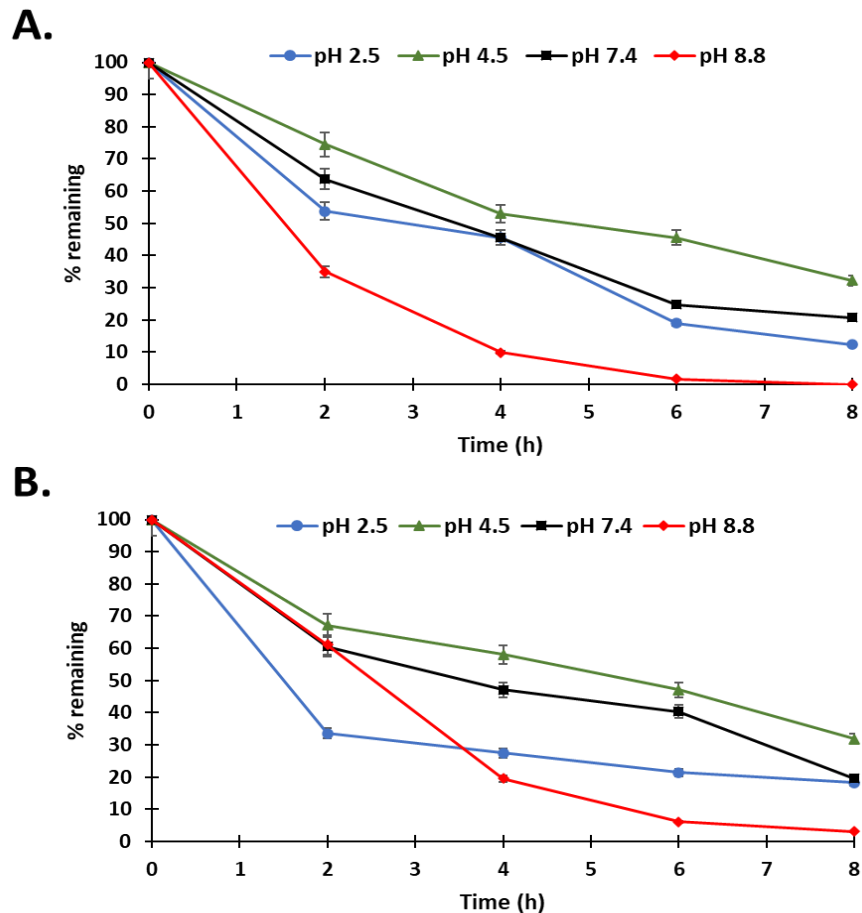


**Εικόνα 2.2.58.** Καμπύλη σταθερότητας του **Θεραγωγικού 8** (μπλε χρώμα) σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος και καμπύλη σχηματισμού της πακλιταξέλης (πορτοκαλί χρώμα) συναρτήσει του χρόνου.

Παρατηρούμε πως και τα δυο **Θεραγωγικά 7** και **8** έχουν έχει χρόνο ημιζωής περίπου 4 ώρες, ενώ μετά από 8 ώρες επώαση παραμένει αναλλοίωτο περίπου το 20% της αρχικής τους ποσότητας. Ωστόσο, και τα δυο θεραγωγικά φαίνεται να μην απελευθερώνουν σημαντική ποσότητα πακλιταξέλης το οποίο μπορεί να οφείλεται είτε στην αστάθεια της πακλιταξέλης είτε στη μικρή σχετικά ευαισθησία της HPLC σε σχέση με κάποια άλλη μέθοδο όπως το LC-MS.

#### 1.1.2.3 Έλεγχος της *in vitro* σταθερότητας των **Θεραγωγικών 7** και **8** σε διάφορες τιμές pH

Η σταθερότητα των 2 θεραγωγικών μελετήθηκε σε 4 ρυθμιστικά διαλύματα σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που παρουσιάζεται στο πειραματικό μέρος. Η μελέτη της σταθερότητας των δυο προφαρμάκων πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το σύστημα που παρουσιάστηκε στις **Εικόνες 2.2.55** και **2.2.56**. Τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.2.59**.



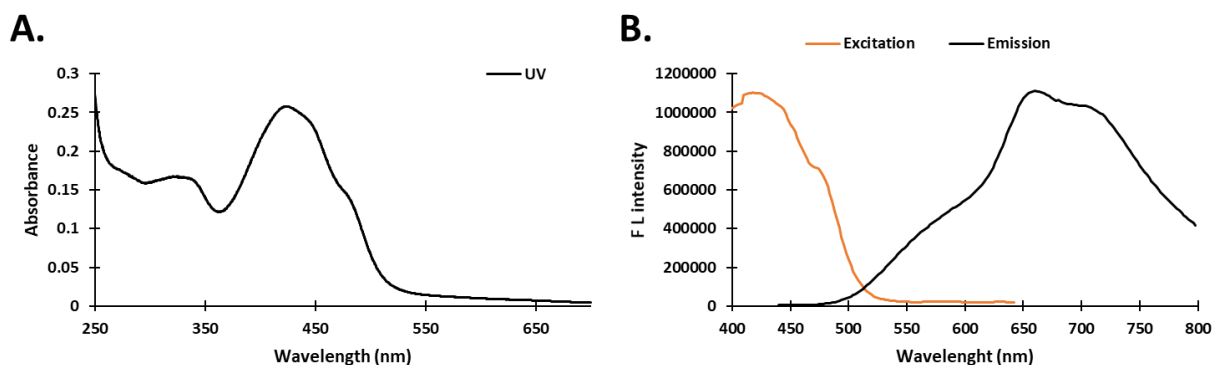
*Εικόνα 2.2.59. Καμπύλη σταθερότητας (A) του Θεραγωγαστικού 7 και (B) του Θεραγωγαστικού 8 σε εύρος τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο.*

Παρατηρούμε πως και τα 2 θεραγωγαστικά προφάρμακα έδειξαν παρόμοιο προφίλ χημικής σταθερότητας, με αυξημένη αστάθεια σε υψηλό pH (pH 8.8) που υδρολύθηκαν πλήρως σε 6 ώρες. Τη μεγαλύτερη σταθερότητα επέδειξαν στο pH 4.5 με χρόνο ημιζωής περίπου 6 ώρες. Στο φυσιολογικό pH εμφάνισαν χρόνο ημιζωής περίπου 4 ώρες, ενώ στο pH 2.5 είχαν μια μέτρια σταθερότητα. Σε γενικές γραμμές, το Θεραγωγαστικό 7 και το Θεραγωγαστικό 8 εμφάνισαν παρόμοια σταθερότητα, η οποία πιθανώς δεν οφείλεται στην ομάδα στόχευσης αλλά στο υπόλοιπο μόριο και κυρίως στη πακλιταξέλη.

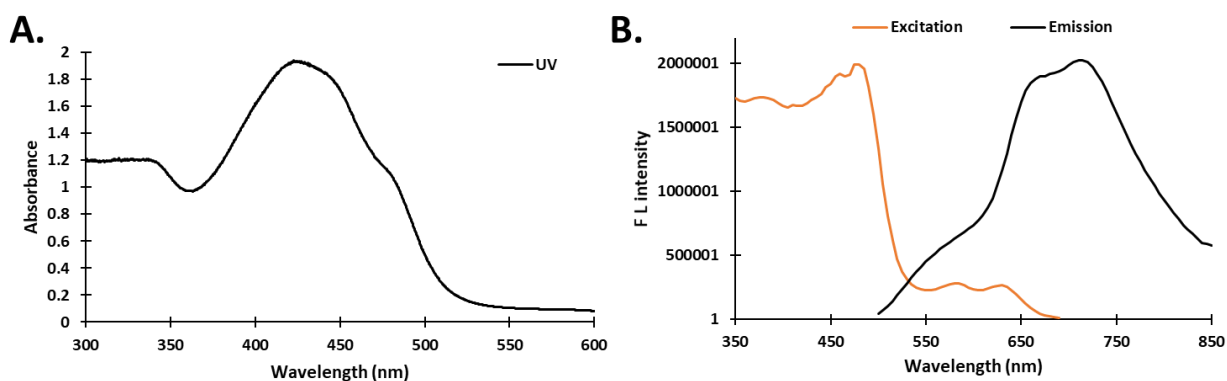
#### 1.1.2.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες των Θεραγωγαστικών 7 και 8

Τα δυο θεραγωγαστικά μόρια χαρακτηρίστηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες με χρήση φασματοσκοπίας UV και φθορισμομετρίας (Εικόνα 2.2.60 και 2.2.61). Το Θεραγωγαστικό 7 έδειξε μέγιστο εκπομπής στα 664 nm, ενώ εμφάνισε έναν μικρότερο ώμο στα 708 nm. Το

**Θεραγωγικό 8** έδειξε μέγιστο εκπομπής στα 715, ενώ εμφάνισε έναν μικρότερο ώμο στα 675 nm.



**Εικόνα 2.2.60.** (A) Φάσμα UV του **Θεραγωγικού 7** και (B) Φάσμα διέγερσης (πορτοκαλί χρώμα) και φθορισμού (μαύρο χρώμα) του **Θεραγωγικού 7**. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  και σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).



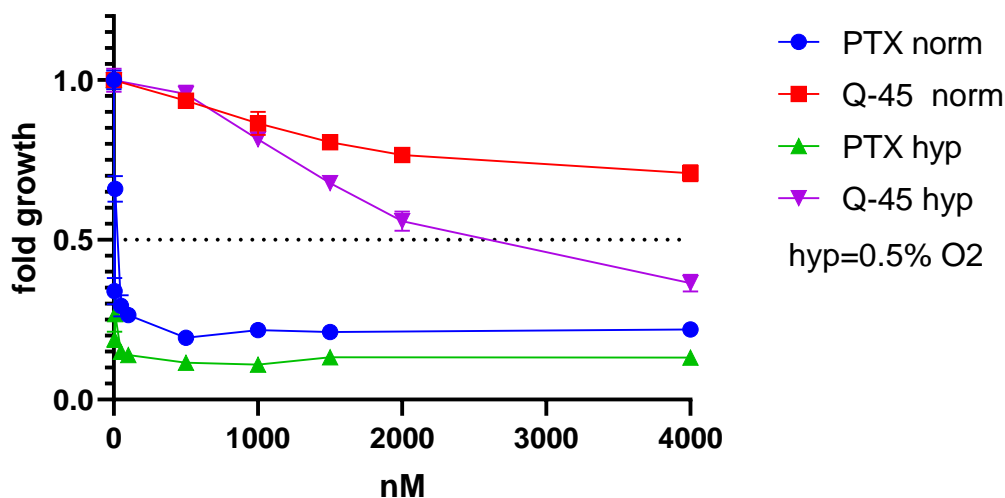
**Εικόνα 2.2.61.** (A) Φάσμα UV του **Θεραγωγικού 8** και (B) Φάσμα διέγερσης (πορτοκαλί χρώμα) και φθορισμού (μαύρο χρώμα) του **Θεραγωγικού 8**. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  και σε διαλύτη DMSO-PBS (1:1).

#### 1.1.2.5 Μελέτη της ανασταλτικής δράσης του **Θεραγωγικού 7** σε κατάσταση υποξίας

Το **Θεραγωγικό 7** ελέγχθηκε ως προς τη δράση του σε κατάσταση υποξίας σε διάφορες συγκεντρώσεις μετά από 72 ώρες έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 (καρκίνος του μαστού) η οποία διαθέτει επαρκή έκφραση του υποδοχέα της βιοτίνης (**Εικόνα 2.2.62**).



### MCF-7+ Q-45, PTX



*Εικόνα 2.2.62. Απόκριση της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 (καρκίνος του μαστού) στο Θεραγωγαστικό 7 και στο μητρικό φάρμακο πακλιταξέλη απουσία και παρουσία υποξίας (0.5% O<sub>2</sub>). Κόκκινο και μπλε χρώμα αντιπροσωπεύουν τη δράση του Θεραγωγαστικού 7 και της πακλιταξέλης σε φυσιολογικές τιμές οξυγόνου, αντίστοιχα. Μωβ και πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τη δράση του Θεραγωγαστικού 7 και της πακλιταξέλης σε κατάσταση υποξίας, αντίστοιχα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα της Dr. Petra Heffeter στην Αυστρία.*

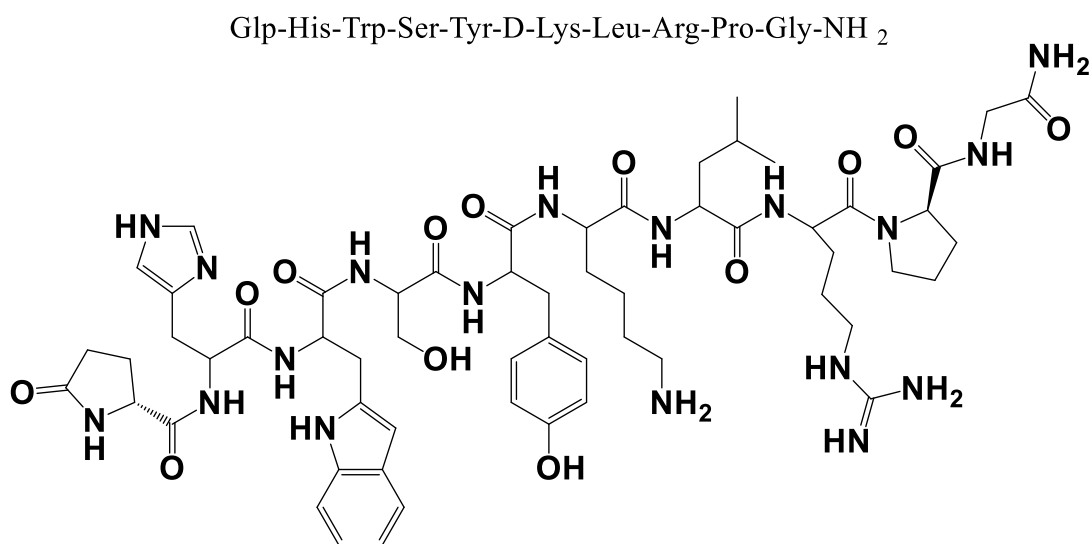
Παρατηρήθηκε πως το **Θεραγωγαστικό 7** είχε εκλεκτική δράση σε κατάσταση υποξίας έναντι της καρκινικής σειράς του μαστού. Σε αντίθεση με τη σκέτη πακλιταξέλη που έδειξε ανασταλτική δράση και παρουσία και απουσία υποξίας. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε πως το **Θεραγωγαστικό 7** εμφανίζει μια σημαντική εκλεκτικότητα προς το μικροπεριβάλλον του καρκίνου, αναστέλλοντας εκλεκτικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων MCF-7. Το αποτέλεσμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς είναι το πρώτο θεραπευτικό προφάρμακο της πακλιταξέλης που αναστέλλει τόσο εκλεκτικά την ανάπτυξη του καρκίνου σε κατάσταση υποξίας.

Το **Θεραγωγαστικό 8** πρόκειται να ελεγχθεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο σε πανομοιότυπες συνθήκες οξυγόνου.

#### 1.1.3 9<sup>ο</sup> Θεραγωγαστικό προφάρμακο (Πακλιταξέλη-Αυτοδιασπώμενος συνδέτης-NIR χρωστική-GnRH πεπτιδίο)

Για το **Θεραγωγαστικό 9**, δοκιμάστηκε η προσάρτηση ενός πεπτιδίου ως εναλλακτικό τρόπο στόχευσης αντί για τη χρήση της D-Βιοτίνης ή του TPP<sup>+</sup>. Για τον σκοπό αυτό

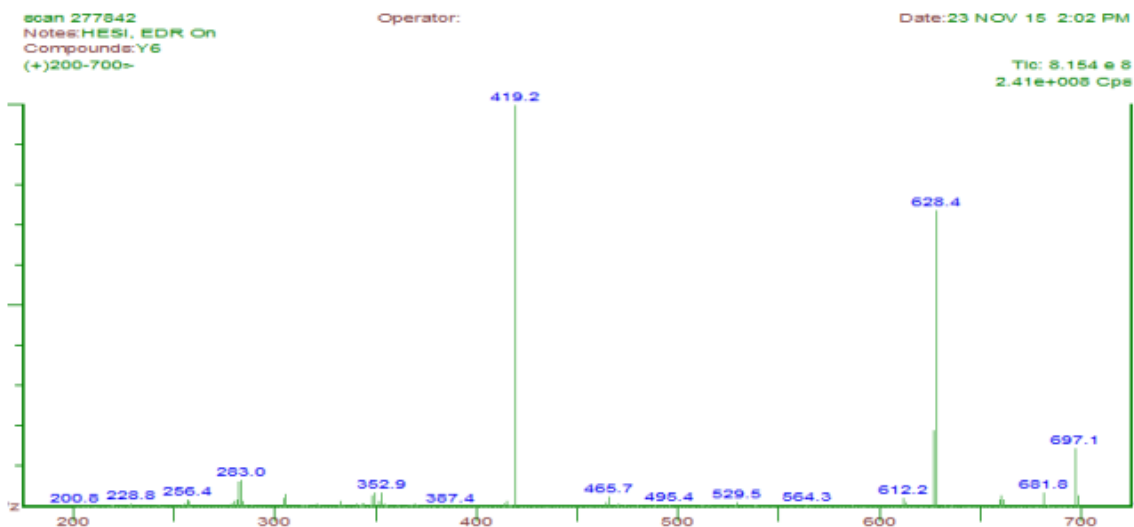
πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πεπτιδίου D-Lys<sup>6</sup>-GnRH το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί παλαιότερα στο εργαστήριο σε συζεύγματα πεπτιδίου-φαρμάκου και έχει δείξει σημαντική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου <sup>118</sup>. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) αποτελεί ένα ανάλογο της φυσικής εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών GnRH-II (Εικόνα 2.2.63) και προσδένεται εκλεκτικά στον υποδοχέα GnRH-R που υπερεκφράζεται στο εξωτερικό της μεμβράνης καρκινικών κυττάρων διαφόρων τύπων καρκίνου.



Molecular Weight: 1253.43

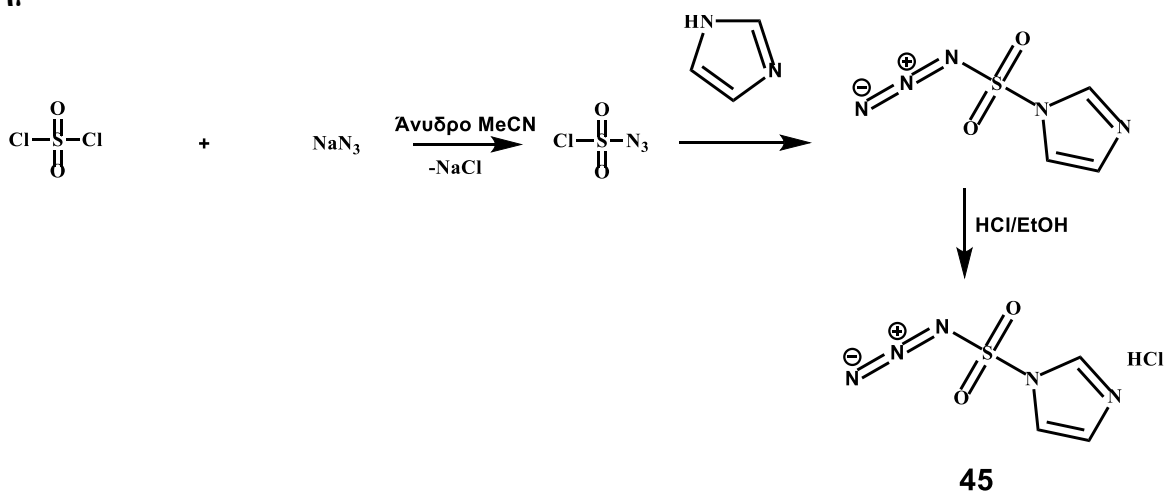
**Εικόνα 2.2.63.** Η διδιάστατη δομή του πεπτιδίου D-Lys<sup>6</sup>-GnRH.

Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε στερεά φάση επί της ρητίνης Rink Amide χρησιμοποιώντας την κλασική Fmoc/tBu μεθοδολογία. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, αυτό αποκόπηκε από τη ρητίνη με χρήση TFA/H<sub>2</sub>O/TIS, καθαρίστηκε με RP-HPLC και ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας που έδειξε τα αναμενόμενα θράυσματα 628.4 [M+2H]<sup>2+</sup> και 419.2 [M+3H]<sup>3+</sup> και (Εικόνα 2.2.64).



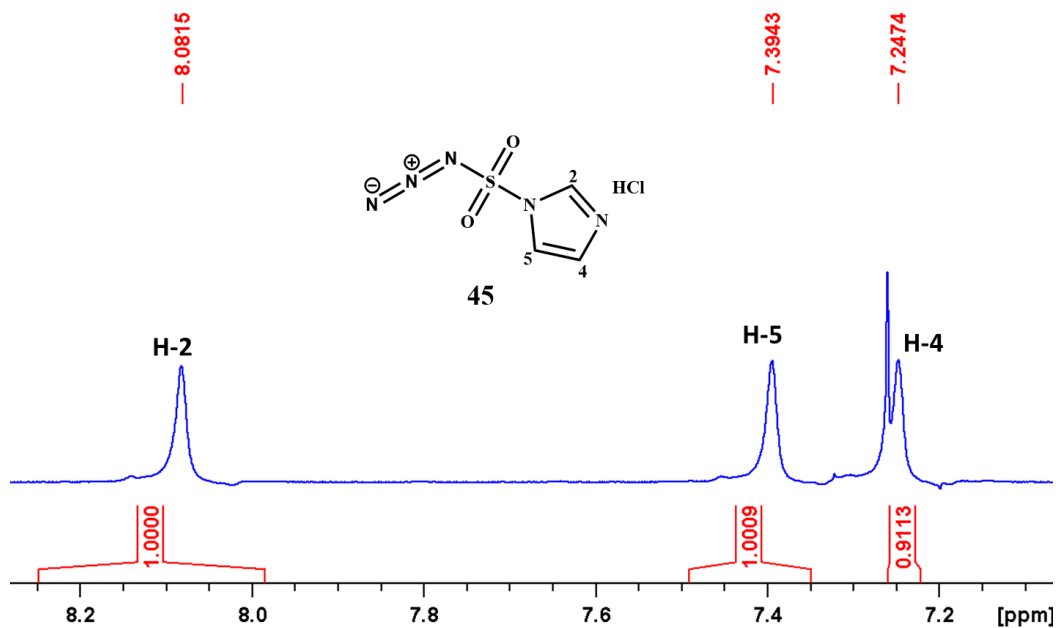
**Εικόνα 2.2.64.** Φάσμα μάζας του πεπτιδίου *D*-Lys<sup>6</sup>-GnRH.

Τέλος, έπρεπε να πραγματοποιηθεί η εκλεκτική μετατροπή της αμινομάδας της Λυσίνης του πεπτιδίου προς αζίδιο ώστε το πεπτίδιο να μπορέσει να συζευχθεί μέσω κλικ χημείας αζιδίου-αλκυνίου. Αξίζει να σημειωθεί πως η Λυσίνη δεν ανήκει στα αμινοξέα του πεπτιδίου που είναι υπεύθυνα για τη πρόσδεση του στον υποδοχέα GnRH, οπότε η τροποποίησή της Λυσίνης δεν θα οδηγούσε σε απουσία της δράσης του πεπτιδίου. Για τον σκοπό αυτό, συντέθηκε μια ουσία (ένωση **45**, diazotransfer reagent) που μπορεί να πραγματοποιεί τη συγκεκριμένη μετατροπή από αμινομάδα σε αζίδιο σε υψηλές αποδόσεις και σε ήπιες συνθήκες. Ωστόσο, χρήζει προσοχής διότι είναι εν δυνάμει εκρηκτική ένωση. Η συνθετική πορεία και η δομή της ένωσης **53** φαίνονται στο **Σχήμα 2.2.14**.



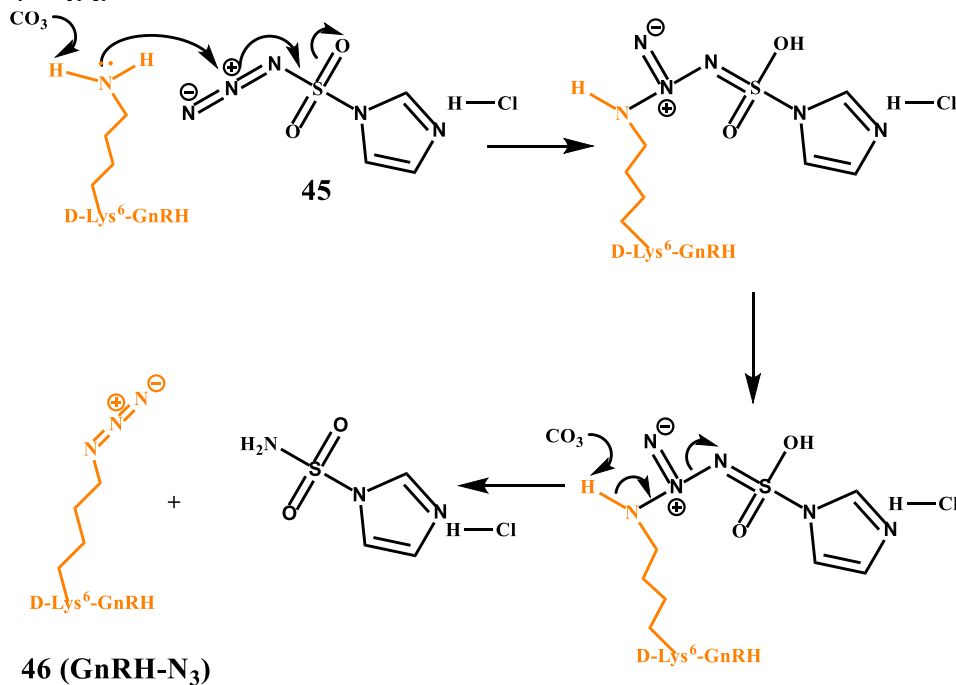
**Σχήμα 2.2.14.** Η συνθετική πορεία για τη παραλαβή της ένωσης **45** (diazotransfer reagent).

Η ένωση **45** (diazotransfer reagent) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR (**Εικόνα 2.2.65**) που έδειξε την ύπαρξη των τριών πρωτονίων του ιμιδαζολικού δακτυλίου ελαφρώς μετατοπισμένων και την εξαφάνιση του -NH του αρχικού ιμιδαζολίου.



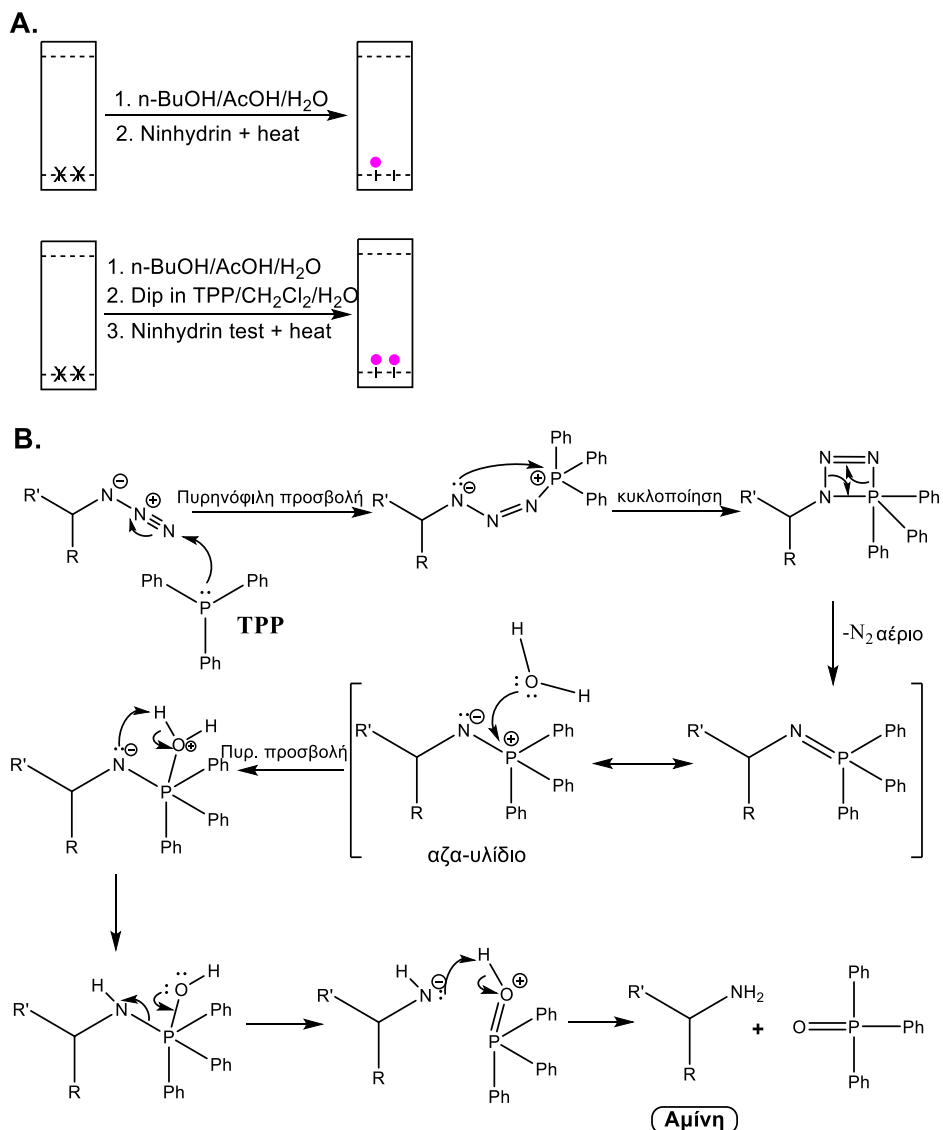
Εικόνα 2.2.65. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **45** (diazotransfer reagent) σε  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz,  $25^\circ\text{C}$ ).

Η ένωση **45** χρησιμοποιήθηκε για να μετατρέψει την ελεύθερη Λυσίνη του πεπτιδίου σε αζίδιο σε υγρή φάση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τον μηχανισμό που φαίνεται στην **Σχήμα 2.2.15**:



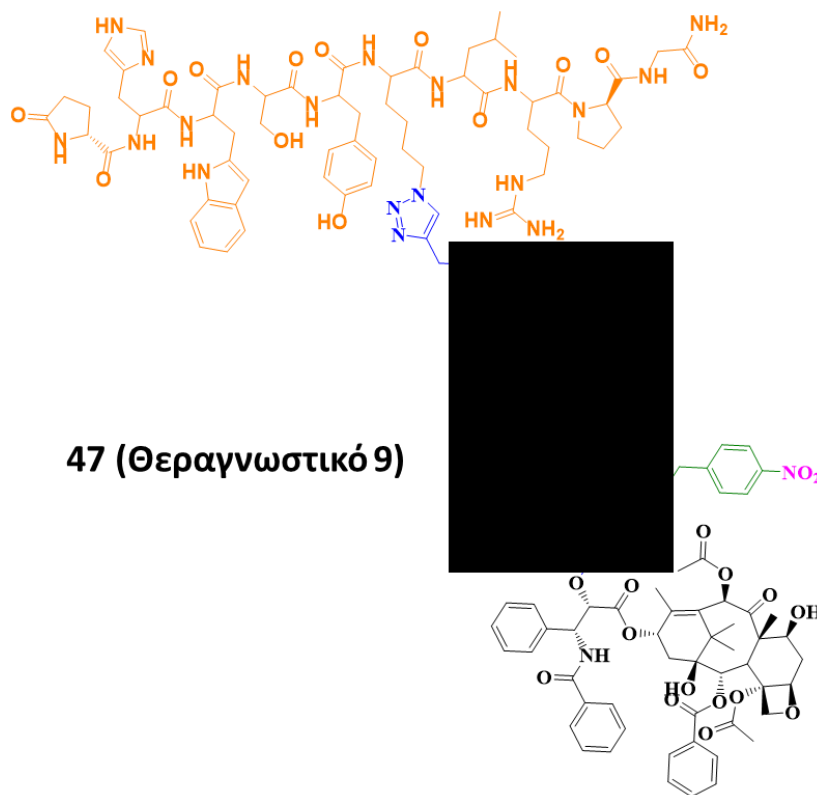
Σχήμα 2.2.15. Η συνθετική πορεία για τη παραλαβή του αζιδο-τροποποιημένου πεπτιδίου **46** ( $\text{GnRH-N}_3$ ).

Η αντίδραση παρακολούθηθηκε με TLC. Αρχικά, η πλάκα TLC αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (60/20/20, v/v) και εμφανίστηκε σε νινυδρίνη, όπου ύστερα από ελαφριά θέρμανση δεν έδειξε ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας σε αντίθεση με το σκέτο πεπτίδιο που εμφάνισε μωβ χρώμα. Έπειτα, για την επαλήθευση της επιτυχημένης μετατροπής σε αζίδιο, μια καινούρια πλάκα αρχικά αναπτύχθηκε στο ίδιο σύστημα διαλυτών, και έπειτα βυθίστηκε σε διάλυμα 10% τριφαινυλοφωσφίνης σε διχλωρομεθάνιο + 2 σταγόνες νερό, και τέλος εμφανίστηκε σε νινυδρίνη, εμφανίζοντας μωβ χρώμα. Η τριφαινυλοφωσφίνη μετέτρεψε το αζίδιο προς την αντίστοιχη αμινομάδα μέσω της αντίδρασης Staudinger οδηγώντας στον χρωματισμό της κηλίδας στη TLC επιβεβαιώνοντας την επιτυχημένη αντίδραση. Η μεθοδολογία TLC που ακολουθήθηκε και ο μηχανισμός της αντίδρασης Staudinger φαίνονται στο **Σχήμα 2.2.16A** και **2.2.16B**:



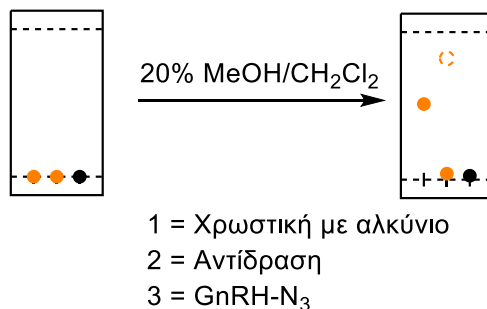
**Σχήμα 2.2.16.** A. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας επαλήθευσης της επιτυχίας της αντίδρασης μέσω TLC και B. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Staudinger που μετατρέπει το αλειφατικό αζίδιο στην αντίστοιχη αμινομάδα.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσπάθεια κλικ χημείας με το αζιδο-τροποποιημένο πεπτίδιο για τη παραλαβή του **Θεραγωγαστικού 9**, η δομή της οποίας φαίνεται στην **Εικόνα 2.2.66**.



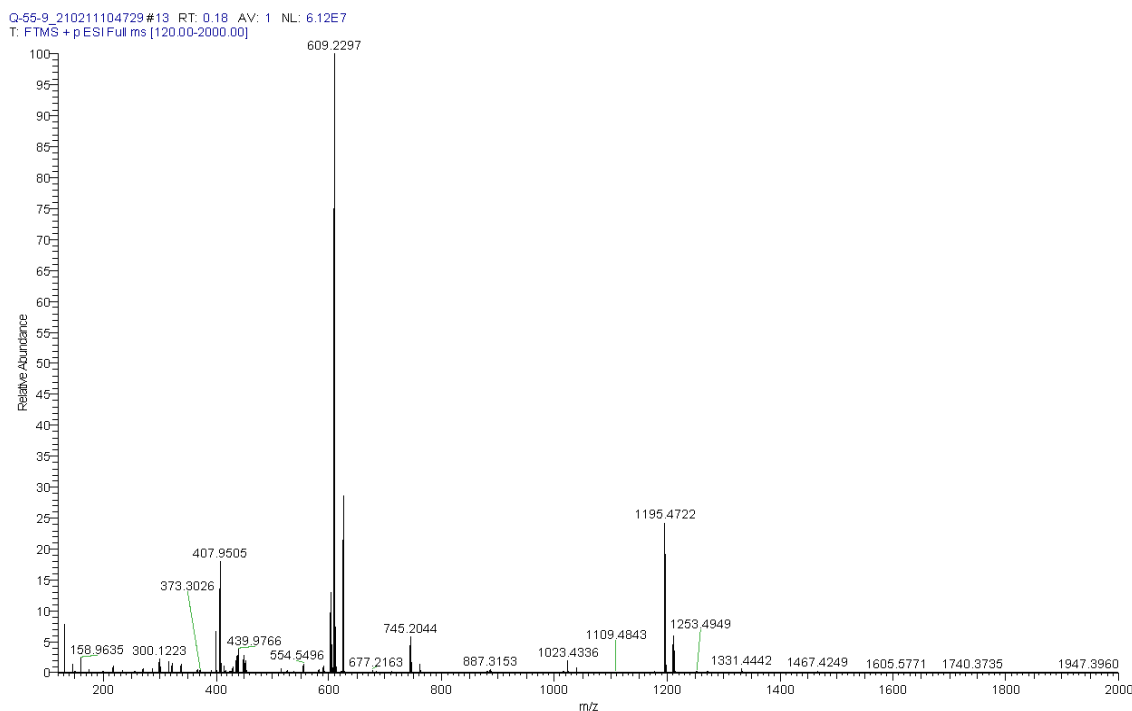
**Εικόνα 2.2.66.** Δομή του **Θεραγωγαστικού 9**. Το πεπτίδιο *D*-Lys<sup>6</sup>-GnRH φαίνεται με πορτοκαλί, οι συνδέτες με μπλε, ο αυτο-διασπώμενος συνδέτης με πράσινο, η «σκανδάλη» με μωβ και η πακλιταξέλη με μαύρο.

Η TLC έδειξε την εμφάνιση μιας νέας κηλίδας πορτοκαλί-κίτρινου χρώματος (**Σχήμα 2.2.17**) η οποία απομονώθηκε μέσω καθαρισμού με RP-HPLC.



**Σχήμα 2.2.17.** Πλάκα TLC πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την ανάπτυξή της σε σύστημα διαλυτών 20% μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο. Οι κηλίδες αφορούν 1 = Τη χρωστική με το ελεύθερο αλκύνιο, 2 = το μίγμα της αντίδρασης και 3 = το αζιδο-τροποποιημένο πεπτίδιο.

Ωστόσο, παρόλο που βάσει TLC η αντίδραση προχώρησε όπως αναμενόταν, η λήψη φάσματος μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας δεν μας βοήθησε να ταυτοποιήσουμε το αναμενόμενο προϊόν το οποίο έχει μοριακό βάρος 2742.9440 (**Εικόνα 2.2.67**). Οι προσπάθειες συνεχίζονται για τη παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος.



**Εικόνα 2.2.67.** Φάσμα μάζας στη προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης **47** (**Θεραγωγιστικό 9**).

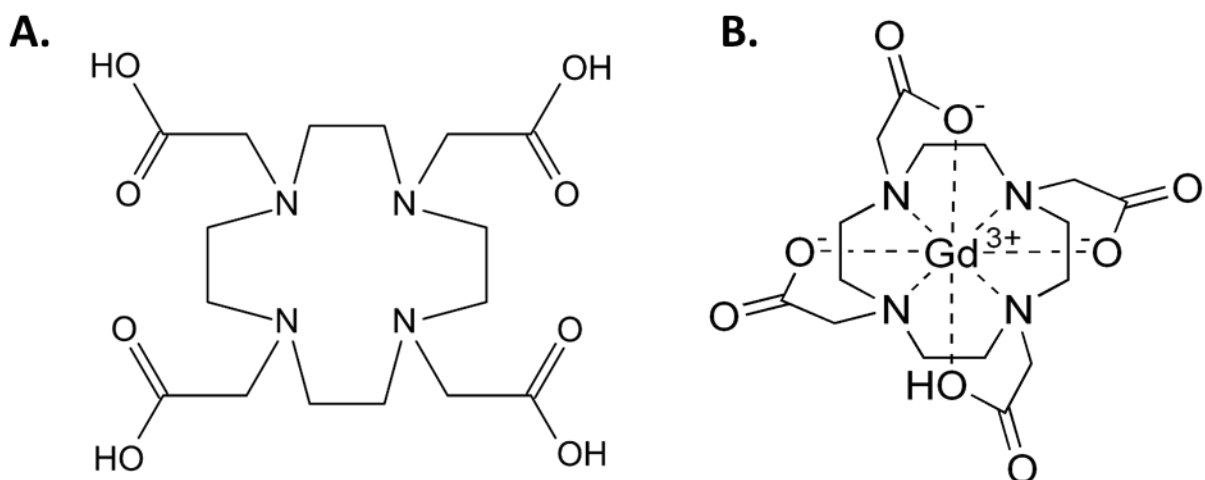
## Θεραγωγιστικά προφάρμακα του DOTA

### 1.1.4 10<sup>ο</sup> Θεραγωγιστικό προφάρμακο (DOTA-αυτοδιασπώμενος συνδέτης-EGFR πεπτίδιο)

Το τελευταίο θεραγωγιστικό μόριο, **Θεραγωγιστικό 10**, αφορά τη χρήση της ένωσης DOTA (1,4,7,10 τετρααζακυκλοδωδεκάνη N,N',N'',N''' τετραζικό οξύ)γνωστή και ως τετραζετάνη. Η ένωση αυτή αποτελεί έναν χηλικό υποκαταστάτη που περιέχει έναν δωδεκαμελή δακτύλιο με τέσσερα άζωτα (**Εικόνα 2.2.68A**). Το DOTA χρησιμοποιείται συνήθως ως παράγοντας συμπλοκοποίησης για κατιόντα διαφόρων μετάλλων και λανθανιδίων, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως είτε ως χρωστικές, είτε ως θεραπευτικοί παράγοντες είτε ως θεραγωγιστικά μόρια αναλόγως το ιόν που θα χρησιμοποιηθεί. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο του DOTA με Gd<sup>3+</sup> χρησιμοποιείται για απεικόνιση στη μαγνητική τομογραφία με το όνομα γαδοτερικό οξύ (**Εικόνα**

**2.2.68B).** Επειδή το γαδολίνιο έχει μαγνητικές ιδιότητες, το γαδοτερικό οξύ αναπτύσσει μαγνητική ροπή όταν τοποθετείται κάτω από ένα μαγνητικό πεδίο, το οποίο αυξάνει την ένταση σήματος (φωτεινότητα) των ιστών κατά τη διάρκεια απεικόνισης της μαγνητικής τομογραφίας.

Μια κλασική περίπτωση που χρησιμοποιείται με βάση το DOTA αφορά τη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου με τη χρήση ενός ταιριαστού ζεύγους ραδιονουκλιδίων π.χ.  $^{99m}\text{Tc}$  (διαγνωστικά) και  $^{188}\text{Re}$  (θεραπευτικά) με τον ίδιο βιολογικό φορέα που χρησιμοποιεί την ίδια συμπλοκοποίηση για τα δύο ραδιοϊσότοπα <sup>149</sup>. Μια άλλη περίπτωση πιο εύκολη είναι η χρήση ενός μόνο ραδιονουκλιδίου το οποίο εκπέμπει απεικονιζόμενα γάμμα φωτόνια για τη διάγνωση και τη δοσιμετρία, και ταυτόχρονα διαθέτει την ικανότητα εκπομπής σωματιδίων ( $\beta^-$  ή  $\alpha$  ή Auger ηλεκτρόνιο) για την πραγματοποίηση θεραπείας. Τέτοιοι παράγοντες που βασίζονται διπλό ρόλο ενός μόνο ραδιονουκλιδίου είναι πιο ελκυστικοί ως το ραδιοφαρμακευτικό προϊόν καθώς η διάγνωση και η θεραπεία παραμένει πανομοιότυπη σε όλους, διασφαλίζοντας έτσι σχεδόν ταυτόσημη βιολογική κατανομή, φαρμακοκινητική και διευκολύνοντας τον ακριβή σχεδιασμό της δοσιμετρίας. Το  $^{177}\text{Lu}$  ανήκει σε αυτή τη κατηγορία, αφού αποσυντίθεται με εκπομπή  $\beta^-$  σωματιδίων προς το σταθερό  $^{177}\text{Hf}$  με ανώτατη  $\beta^-$  ενέργεια 497 keV, η οποία είναι κατάλληλη για ραδιοθεραπευτικές εφαρμογές. Αυτό το ραδιοϊσότοπο επίσης εκπέμπει πολλά ακόμη γάμμα φωτόνια, με 208 keV (11%) και 113 keV (6,4%) γάμμα φωτόνια που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικό σκοπό <sup>149</sup>. Έτσι, ένα ραδιοφαρμακευτικό προϊόν που περιέχει  $^{177}\text{Lu}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάγνωση και για θεραπεία με τις κατάλληλες θεραπευτικές δόσεις.



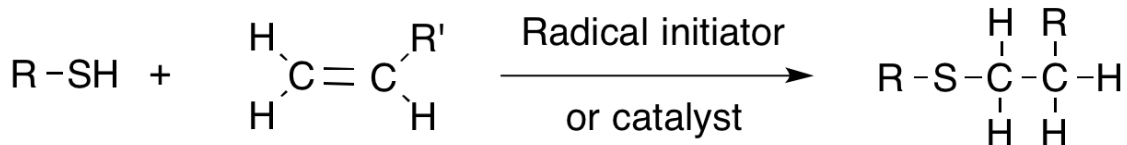
**Εικόνα 2.2.68.** *A.* Δομή του χηλικού υποκαταστάτη DOTA και *B.* Δομή του συμπλόκου του DOTA με  $\text{Gd}^{3+}$  (γαδοτερικό οξύ).

Το DOTA μπορεί επίσης να συνδεθεί με μόρια που έχουν συγγένεια για διάφορες δομές, προσδίδοντάς του έτσι στόχευση. Για παράδειγμα, μπορεί να συνδεθεί με πεπτιδία που προσδένονται εκλεκτικά στους υποδοχείς της σωματοστατίνης, οι οποίοι βρίσκονται σε νευροενδοκρινικούς όγκους δίνοντας τις ενώσεις που πωλούνται με τις ονομασίες DOTATOC και DOTA-TATE. Ακόμη, μπορεί να συνδεθεί με μονοκλωνικά αντισώματα.



Βασιζόμενοι σε αυτό, θελήσαμε να συνθέσουμε ένα θεραπευτικό ανάλογο του DOTA το οποίο θα φέρει ένα πεπτίδιο ως παράγοντα στόχευσης του καρκίνου και το  $^{177}\text{Lu}$  ως το θεραπευτικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, θελήσαμε να στοχεύσουμε τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (Triple Negative Breast Cancer – TNBC) και βάσει της βιβλιογραφίας καταλήξαμε στη χρήση ενός πεπτιδίου το οποίο εμφανίζει μεγάλη συνάφεια ως προς τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR/HER1) που υπερεκφράζεται σε τέτοιου τύπου καρκίνους <sup>150</sup>. Ωστόσο, θελήσαμε να προσπαθήσουμε να χρησιμοποιήσουμε το κυκλοποιημένο ανάλογο αυτού, με σκοπό τη σταθεροποίησή του ως προς τα πρωτεολυτικά ένζυμα και την αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης στον υποδοχέα HER1.

Επειδή το συγκεκριμένο πεπτίδιο φέρει δυο κυστεΐνες, σκεφτήκαμε να τις εκμεταλλευτούμε με χρήση μια ιδιαίτερης κλικ χημείας, που ονομάζεται thiolene κλικ χημεία, και αποτελεί μια οργανική αντίδραση μεταξύ θειόλης και αλκενίου για σχηματισμό ενός θειοαιθέρα. Αυτή η αντίδραση αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1905 αλλά έγινε γνωστή στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και στις αρχές της δεκαετίας του 2000 λόγω του ευρέος φάσματος των εφαρμογών της. Αυτή η αντίδραση θεωρείται ως αντίδραση κλικ χημείας δεδομένης της υψηλής απόδοσης των αντιδράσεων, της στερεοεκλεκτικότητας, του υψηλού ρυθμού και της θερμοδυναμικής κινητήριας δύναμης. Η γενική αντίδραση που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.2.18** πραγματοποιείται είτε μέσω ελεύθερων ριζών με τη βοήθεια φωτός, θέρμανσης και εκκινητές είτε μέσω μιας πυρηνόφιλης προσθήκης τύπου Michael με χρήση καταλυτών όπως βάσεις.



**Σχήμα 2.2.18.** Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης thiolene που πραγματοποιείται είτε μέσω ελεύθερων ριζών με χρήση εκκινητή είτε μέσω προσθήκης Michael με χρήση καταλύτη .

Θελήσαμε να πραγματοποιήσουμε την thiolene αντίδραση μέσω ελεύθερων ριζών με χρήση φωτός και ενός εκκινητή λόγω της μεγαλύτερης ευκολίας και του μικρότερου χρόνου αντίδρασης. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV 366 nm και ο εκκινητής 2,2-διμεθοξυ-2-φαινυλακετοφαινόνη, και βρέθηκε ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε 20 λεπτά σε απόδοση 99% <sup>151</sup>.

Ωστόσο, λόγω της καινοτομίας του συγκεκριμένου μορίου, δεν θα παρουσιαστούν δομές ή αποτελέσματα.

### 3 Πειραματικό μέρος

---

#### Υλικά

---

Οι ουσίες και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από τις εταιρίες Carbosynth Ltd (Ηνωμένο Βασίλειο), GL Biochem (Κίνα) και Sigma Aldrich (Γερμανία) και ήταν της υψηλότερης δυνατής καθαρότητας. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις ήταν αναλυτικής καθαρότητας, απεσταγμένοι στο εργαστήριο και αποθηκευμένοι υπό άζωτο και μοριακά κόσκινα 4Å πριν τη χρήση τους. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Οι δευτερωμένοι διαλύτες για τα πειράματα 1D/2D NMR αγοράστηκαν από την εταιρεία Deutero (Deutero GmbH, Kastellaun, Γερμανία). Οι χημικές μεταπίσεις αναφέρονται ως δ στη κλίμακα ppm. Οι πολλαπλότητες στα φάσματα παρουσιάζονται ως: s (απλή); d (διπλή); t (τριπλή); bs (ευρεία απλή); m (πολλαπλή). Οι σταθερές σύζευξης παρουσιάζονται ως τιμές J σε Hz. Το ακετονιτρίλιο και το νερό που χρησιμοποιήθηκαν για τις HPLC ήταν καθαρότητας HPLC, ενώ οι αντίστοιχοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις μάζες ήταν καθαρότητας LC-MS. Οι πεπτιδικές συνθέσεις πραγματοποιήθηκαν χειροκίνητα με την κλασσική σύνθεση σε στερεά φάση με τη μέθοδο Fmoc-/tBu. Η πορεία της κάθε αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε πλάκες F<sub>254</sub> που ήταν καλυμμένες με silica gel 60. Οι πλάκες TLC παρατηρήθηκαν σε μια λάμπα UV 254 nm/366 nm. Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε με χρήση SiO<sub>2</sub> και των κατάλληλων διαλυτών που αναφέρονται στην εκάστοτε πειραματική πορεία.

#### Οργανολογία

---

Οι ημι-παρασκευαστικοί και παρασκευαστικοί καθαρισμοί RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Έγινε χρήση είτε της στήλης Jupiter 4 μm Proteo 90Å C18 (250 × 10 mm) με ροή 5 mL/min (ημι-παρασκευαστικοί καθαρισμοί) είτε της στήλης Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 × 21.2 mm) με ροή 20 mL/min (παρασκευαστικοί καθαρισμοί). Ο ανιχνευτής μήκους κύματος ήταν ρυθμισμένος στα 254 nm σε όλους τους καθαρισμούς, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Ο συνολικός χρόνος κάθε καθαρισμού ήταν 30 λεπτά.

Οι αναλυτικές RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Agilent εξοπλισμένο με αντλία και ανιχνευτή μήκους κύματος Agilent 1260 Infinity II. Έγινε χρήση της στήλης Poroshell 120EC-C18 4 μm (4.6 × 100 mm) για όλες τις αναλύσεις.

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV400 και AV500. Η λήψη φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε στο κέντρο μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε σύστημα ThermoFischer Scientific LTQ Orbitrap XL και η λήψη φασμάτων μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας σε σύστημα EVOQ™ Elite ER LC-TQ (Bruker, Γερμανία).

---

## Μέθοδοι

---

**Για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων** παρουσία του εκάστοτε φαρμάκου και προφαρμάκου, αρχικά καλλιεργήθηκαν 3000 κύτταρα/φρεάτιο σε τρυβλία των 96 φρεατίων. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε η προσθήκη των μορίων στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και σε τριπλέτες. Τα μόρια διαλύθηκαν αρχικά σε DMSO και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό. Σε κάθε περίπτωση το ποσοστό του DMSO στα κύτταρα δεν ξεπερνούσε το 0.25%. Η επώαση διήρκησε 72 ώρες και τερματίστηκε με την προσθήκη του MTT (5 mg/mL σε διάλυμα φωσφορικών, PBS) για 4 ώρες. Τέλος, μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου, οι σχηματισμένοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκαν με την προσθήκη 100  $\mu$ L DMSO ανά φρεάτιο. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φωτόμετρο τύπου ELISA (Tecan, Infinite F50) χρησιμοποιώντας φίλτρο απορρόφησης στα 545 nm. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα φρεάτια που επώαστηκαν μόνο με DMSO.

**Για να εκτιμήσουμε την ενζυμική σταθερότητα των προφαρμάκων**, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος με χρήση αναλυτικής HPLC. Για τον σκοπό αυτό, 10  $\mu$ L του εκάστοτε προφαρμάκου, από διαλύματα 1 mM σε DMSO, επώαστηκαν σε 50  $\mu$ L ανθρώπινου πλάσματος σε ένα θερμοδομητή στους 37 °C. Δείγματα 60  $\mu$ L (τριπλότυπα) συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία ( $t = 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8$  και 9 ώρες) στα οποία προστέθηκε θεοφυλλίνη ως εσωτερικό πρότυπο. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 300  $\mu$ L παγωμένου ακετονιτριλίου και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -80 °C για την ολοκληρωτική καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ύστερα από φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο λυοφιλοποιήθηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100  $\mu$ L 1:1 νερό-ακετονιτρίλιο πριν τη μελέτη της σταθερότητας τους με αναλυτική RP-HPLC (αντίστροφης φάσης).

**Για να εκτιμήσουμε τη χημική σταθερότητα των προφαρμάκων**, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη τους σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH με χρήση αναλυτικής HPLC. Η σταθερότητα των προφαρμάκων μελετήθηκε σε 4 ρυθμιστικά διαλύματα συγκέντρωσης 20 mM με pH: 2 (ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl), 4.7 (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου), 7.4 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) και 8.8 (ρυθμιστικό διάλυμα βορονικού). Πιο συγκεκριμένα, 50  $\mu$ L των προφαρμάκων από διαλύματα 1 mM σε DMSO, προστέθηκαν σε 500  $\mu$ L του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος (pH= 2, 4.7, 7.4 και 8.8) και επώαστηκαν σε θερμοδομητή στους 37 °C. Τριπλότυπα δείγματα των 50  $\mu$ L συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία ( $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5,$

6, 7 και 8 ώρες) και η μελέτη της σταθερότητας των δυο πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC, με βάση το κατάλληλο σύστημα που βρέθηκε στην κάθε περίπτωση.

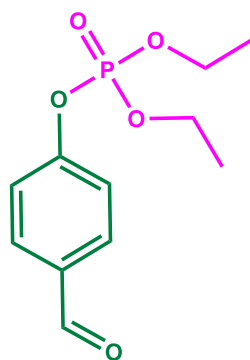
---

### Συνθετικό μέρος

---

**Γενική μέθοδος αναγωγής πρωτοταγών υδροξυλομάδων από τις αντίστοιχες αλδεΐδες με χρήση  $\text{NaBH}_4$ :** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της πρωτοταγούς υδροξυλομάδας (1 eq.) σε απόλυτη αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε προσθήκη του αναγωγικού μέσου  $\text{NaBH}_4$  (1.1 eq.) στους  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  και το εναιώρημα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 2-4 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρήση TLC που έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε ακετόνη για την εξουδετέρωση της περίσσειας του  $\text{NaBH}_4$  <sup>152</sup>.

**Γενική μέθοδος μετατροπής πρωτοταγών υδροξυλομάδων προς τα αντίστοιχα βρωμίδια με χρήση  $\text{PBr}_3$ :** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της πρωτοταγούς υδροξυλομάδας (1 eq.) σε άνυδρο διγλωρομεθάνιο, προστέθηκε  $\text{PBr}_3$  (1.1 eq.) στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 2-4 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρήση TLC που έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Ακολούθησε η προσθήκη νερού και η εκχύλιση του προϊόντος. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να δώσει το αναμενόμενο βρωμίδιο.

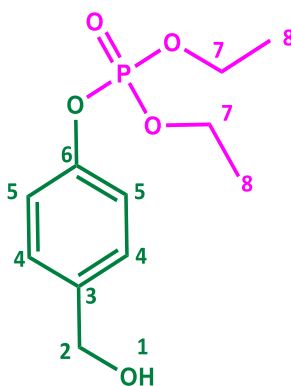


**1**

**Σύνθεση της ένωσης 1:** Σε διάλυμα της 4-υδροξυβενζαλδεΐδης (1 g, 8.19 mmol, 1 eq.) σε 10 mL άνυδρου THF, προστέθηκαν γλωρίδιο του διαιθυλοφωσφορικού εστέρα (1.42 mL, 9.83 mmol 1.2 eq.) και DIPEA (2.14 mL, 12.24 mmol, 1.5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε

θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 3 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αλδεΐδης και τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας. Ο διαλύτης εξατμίστηκε και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα (50 mL) και εκπλύθηκε με νερό τρεις φορές. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και ύστερα από διήθηση ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να λάβουμε την ένωση **1** (1400 mg, 66.2%) ως κίτρινο λάδι, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

$R_f=0.15$  (20% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)



**2**

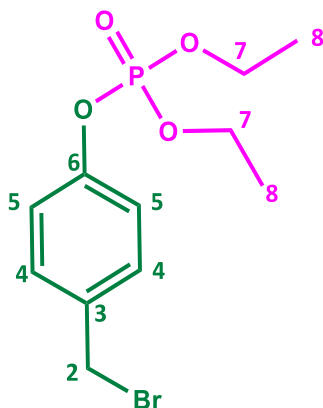
**Σύνθεση της ένωσης 2:** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η ένωση **1** (815 mg, 3.16 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με  $\text{NaBH}_4$  (131.35 mg, 3.47 mmol, 1.1 eq.) σε 18 mL απόλυτης αιθανόλης για 2 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 20% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **2** (705 mg, 86%) ως κιτρινωπό λάδι.

$R_f=0.17$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

**$^1\text{H NMR}$  της ένωσης 2** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 7.33 (d,  $J = 8.32$  Hz, 2 H, H-5), 7.21 (d,  $J = 8.32$  Hz, 2 H, H-4), 4.66 (s, 2 H, H-2), 4.27-4.16 (m, 4 H, H-7), 1.35 (t,  $J = 7.08$ , 6 H, H-8).

**$^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης 2** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 150.26 (C-6), 137.85 (C-3), 128.47 (C-4), 120.15 (C-5), 64.78 (C-2), 64.71 (C-7), 16.21 (C-8).

**Μάζα της ένωσης 2:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{P}$  υπολογίστηκε: 261.0814, βρέθηκε: 261.0881  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 299.0437  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 521.1690  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .



### 3

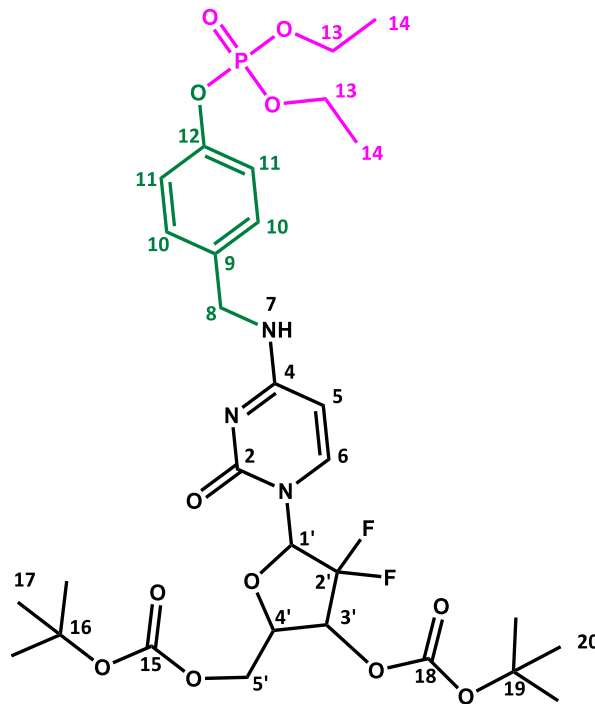
**Σύνθεση της ένωσης 3:** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η ένωση **2** (500 mg, 1.92 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με  $\text{PBr}_3$  (200.8  $\mu\text{L}$ , 2.11 mmol, 1.1 eq.) σε 15 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου για 4 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη νερού και η εκχύλιση του προϊόντος. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να δώσει την ένωση **3** ως κιτρινωπό λάδι (489 mg, 79%).

$R_f=0.32$  (100% διχλωρομεθάνιο)

**$^1\text{H NMR}$  της ένωσης 3** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 7.36 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2 H, H-5), 7.18 (d,  $J = 8.28$  Hz, 2 H, H-4), 4.46 (s, 2 H, H-2), 4.23-4.19 (m, 4 H, H-7), 1.35 (t,  $J = 6.88$  Hz, 6 H, H-8).

**$^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης 3** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 150.97 (C-6), 134.8 (C-3), 130.83 (C-4), 120.64 (C-5), 65.06 (C-7), 32.96 (C-2), 16.45 (C-8).

**Μάζα της ένωσης 3:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{BrO}_4\text{P}$  υπολογίστηκε: 323.1223, βρέθηκε: 323.0044  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 362.9574  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 668.9813  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .



**4a**

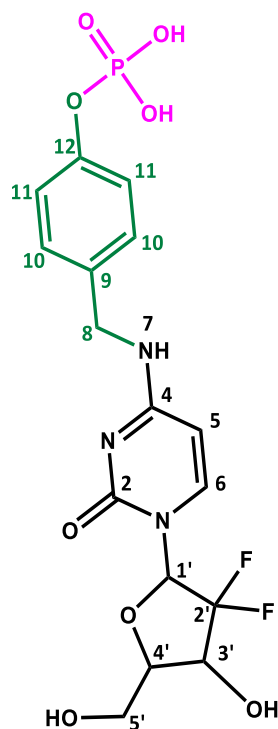
**Σύνθεση της ένωσης 4a:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **3** (209.2 mg, 0.65 mmol, 1.2 eq.) σε 25 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν **Gem1** (250 mg, 0.54 mmol, 1 eq.) και  $K_2CO_3$  (745.6 mg, 5.4 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η TLC έδειξε τη σχεδόν πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων σε 12 ώρες. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης για απομάκρυνση του  $K_2CO_3$ , ενώ το διήθημα εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα μετά την εξατμίστη καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 10/90%  $H_2O+0.1\%TFA/MeCN+0.1\%TFA$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 19 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να λάβουμε την ένωση **4a** (235 mg, 61.7%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.15$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 4a** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 8.07 (d,  $J = 7.77$  Hz, 1 H, H-6), 7.24 (d,  $J = 8.78$  Hz, 2 H, H-10), 7.12 (d,  $J = 8.36$  Hz, 3 H, H-11 + H-5), 6.25 (t,  $J = 8.75$  Hz, 1 H, H-1'), 5.19-5.14 (m, 1 H, H-3'), 5.07 (d,  $J = 6.01$  Hz, 2 H, H-8), 4.22-4.19 (m, 1 H, H-4'), 4.11-4.05 (m, 4 H, H-13), 3.76-3.73 (m, 1 H, H-5'α), 3.65-3.62 (m, 1 H, H-5'β), 1.41 (s, 9 H, H-20), 1.32 (s, 9 H, H-17), 1.19 (t,  $J = 7.15$  Hz, 6 H, H-14).

**$^{13}C$  NMR της ένωσης 4a** (125 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 164.9 (C-4), 154.1 (C-2), 151.4 (C-15, C-18), 149.7 (C-12), 144.3 (C-6), 135.4 (C-9), 129 (C-10), 124 (C-2'), 120.3 (C-11), 98.8 (C-5), 84.7 (C-1'), 84.3 (C-16, C-19), 79.5 (C-4'), 72.8 (C-3'), 64.7 (C-13), 59.5 (C-5') 48.1 (C-8), 27.6 (C-20), 27.4 (C-17), 16.3 (C-14).

**Μάζα της ένωσης 4a:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{30}H_{42}F_2N_3O_{12}P$  υπολογίστηκε: 706.2474, βρέθηκε: 706.2534  $[M+H]^+$ , 744.2076  $[M+Na]^+$ , 1211.3938  $[2M+H-2Boc]^+$ , 1311.4489  $[2M+H-Boc]^+$ , 1411.5012  $[2M+H]^+$ , 1449.4534  $[2M+Na]^+$ .



**4b**

**Σύνθεση της ένωσης 4β:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **4a** (235 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 5 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **4a**. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στην υδραντλία του απαγωγού και το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 mL ακετονιτριλίου. Στο διάλυμα αυτό έγινε προσθήκη TMSBr (85.7 μL, 0.67 mmol, 2 eq.) στους 0 °C και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μικροκυμάτων σε 10 λεπτά με χρήση 60 Watt στους 80 °C. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον απαγωγό υπό κενό στην υδραντλία και 3 mL νερού προστέθηκαν στο υπόλειμμα. Μετά από 2 ώρες ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης λυοφιλοποιήθηκε. Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 50/50% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **4β** (144 mg, 96%) ως λευκό στερεό.

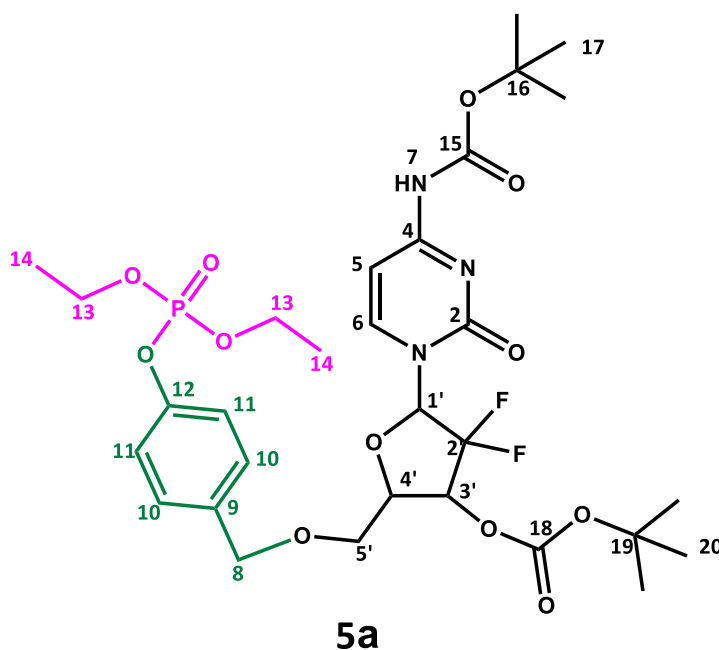
R<sub>f</sub>=0.22 (5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 4β** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 8.59 (s, 1 H, H-7), 7.72 (d, J = 7.68 Hz, 1 H, H-6), 7.29 (d, J = 8.31 Hz, 2 H, H-10), 7.13 (d, J = 8.31 Hz, 2 H, H-11), 6.67 (s, 1 H, OH-3'), 6.12 (t, J = 8.07 Hz, 1 H, H-1'), 5.91 (d, J = 7.64 Hz, 1 H, H-5), 4.48 (d, J = 5.54 Hz, 2 H, H-8), 4.17-4.11 (m, 1 H, H-3'), 3.82-3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (m, 1 H, H-5'b), 3.63-3.60 (m, 1 H, H-5'a).



$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **4β** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 162.9 (C-4), 154.4 (C-2), 151.3 (C-12), 140.6 (C-6), 134.3 (C-9), 129.4 (C-10), 125 (C-2'), 120.6 (C-11), 95.8 (C-5), 84.2 (C-1'), 81 (C-4'), 69.2 (C-3'), 59.5 (C-5'), 43.6 (C-8).

**Μάζα της ένωσης 4β:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$  υπολογίστηκε: 450.0800, βρέθηκε: 450.0873  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 472.0691  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



**Σύνθεση της ένωσης 5a:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **3** (209.2 mg, 0.65 mmol, 1.2 eq.) σε 25 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν η **Gem2** (250 mg, 0.54 mmol, 1 eq.) και  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (745.6 mg, 5.4 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η TLC έδειξε τη σχεδόν πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων σε 12 ώρες. Ακολούθησε διήθηση της αντίδρασης για την απομάκρυνση του ανθρακικού καλίου και το διήθημα εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 10/90%  $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}/\text{MeCN}+0.1\%\text{TFA}$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 21 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **5a** (210 mg, 55%) ως λευκό στερεό.

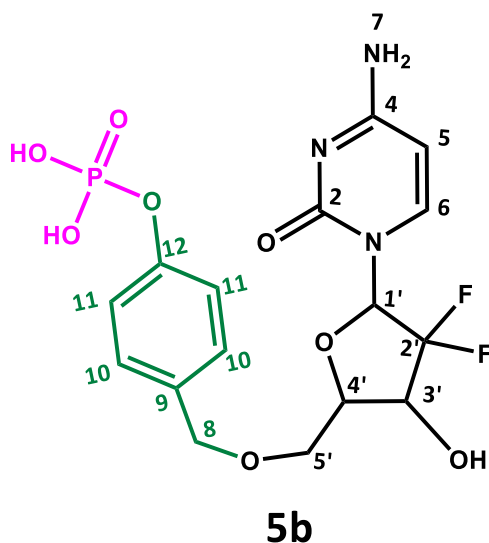
$R_f=0.20$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

$^1\text{H}$  NMR της ένωσης **5a** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 7.60 (d,  $J = 8.23$  Hz, 1 H, H-6), 7.25 (d,  $J = 8.66$  Hz, 2 H, H-11), 7.11 (d,  $J = 8.15$  Hz, 3 H, H-10), 6.18 (t,  $J = 8.75$  Hz, 1 H, H-1'), 6.07 (d,  $J = 8.29$  Hz, 1 H, H-5) 5.15-5.10 (m, 1 H, H-3'), 5.02 (s, 2 H, H-8), 4.19-4.16 (m, 1 H, H-4'), 4.12-4.06 (m, 4 H, H-13), 3.73-3.70 (m, 1 H, H-5'b), 3.63-3.59 (m, 1 H, H-5'a), 1.40 (d,  $J = 5.30$  Hz, 18 H, H-20 + H-17), 1.21 (t,  $J = 7.02$  Hz, 6 H, H-14).

$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **5a** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 157.3 (C-15, C-18), 154.2 (C4), 150 (C-12), 149.7 (C-2), 137 (C-6), 133.5 (C-9), 129.4 (C-10), 125 (C-2'), 120.3 (C-20), 97.3 (C-5), 84.4

(C-1'), 81 (C-19), 80.75 (C-16), 79.2 (C-4'), 72.6 (C-3'), 64.8 (C-13), 59.6 (C-5'), 45 (C-8), 27.8 (C-17, C-20), 16.5 (C-14).

**Μάζα της ένωσης 5a:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{30}H_{42}F_2N_3O_{12}P$  υπολογίστηκε: 706.2474, βρέθηκε: 706.2540  $[M+H]^+$ , 744.2084  $[M+Na]^+$ , 1312.4323  $[2M+H-Boc]^+$ , 1411.5012  $[2M+H]^+$ , 1449.4529  $[2M+Na]^+$ .

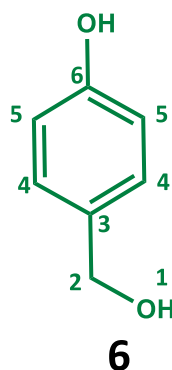


**Σύνθεση της ένωσης 5β:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **5a** (210 mg, 0.298 mmol, 1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 5 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **5a**. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στην υδραντλία του απαγωγού και το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 mL ακετονιτριλίου. Στο διάλυμα αυτό έγινε προσθήκη του TMSBr (78.6  $\mu$ L, 0.596 mmol, 2 eq.) στους 0 °C και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μικροκυμάτων σε 10 λεπτά με 60 Watt στους 80 °C. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον απαγωγό υπό κενό στην υδραντλία και 3 mL νερού προστέθηκαν στο υπόλειμμα. Μετά από 2 ώρες ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ο καθαρισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 50/50%  $H_2O$ +0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **5β** (126 mg, 94%) ως λευκό στερεό.  $R_f=0.10$  (5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 5β** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 8.11 (d,  $J = 7.02$  Hz, 1 H, H-6), 7.19 (d,  $J = 8.28$  Hz, 2 H, H-11), 7.08 (d,  $J = 7.64$  Hz, 2 H, H-10), 6.32 (d,  $J = 7.67$  Hz, 1 H, H-5), 6.11 (t,  $J = 6.20$  Hz, 1 H, H-1'), 5.16 (s, 2 H, H-8), 4.25-4.18 (m, 1 H, H-3'), 3.90 (d,  $J = 7.92$  Hz, 1 H, H-4'), 3.79 (m, 1 H, H-5'b), 3.65 (m, 1 H, H-5'a).

$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **5β** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 158.7 (C-4), 153.2 (C-12), 148.5 (C-2), 148.3 (C-9), 139.9 (C-6), 128.6 (C-10), 123.4 (C-2'), 120.6 (C-11), 97.1 (C-5), 85.1 (C-1'), 82 (C-4'), 68.5 (C-3'), 59 (C-5'), 46 (C-8).

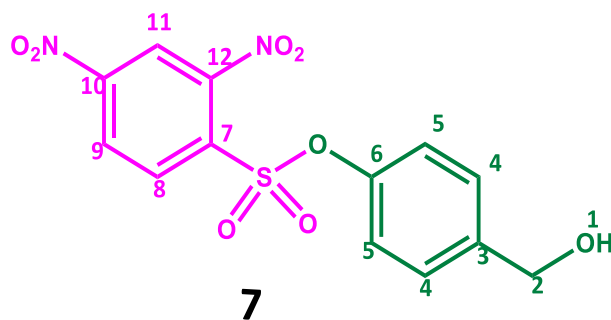
**Μάζα της ένωσης 5β**: MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$  υπολογίστηκε: 450.08, βρέθηκε: 450.0872  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 899.1683  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .



**Σύνθεση της ένωσης 6 (4-υδροξυβενζυλική αλκοόλη)**: Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η 4-υδροξυβενζαλδεΐδη (1000 mg, 8.189 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με  $\text{NaBH}_4$  (340.76 mg, 9.008 mmol, 1.1 eq.) σε 20 mL απόλυτης αιθανόλης για 2 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **6** (955 mg, 94%) ως κιτρινωπό στερεό.

$R_f=0.30$  (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

$^1\text{H}$  NMR της ένωσης **6** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm): 9.21 (s, 1 H, OH-6), 7.10 (d,  $J = 7.99$  Hz, 2 H, H-4), 6.70 (d,  $J = 8.14$  Hz, 2 H, H-5), 4.92 (t,  $J = 5.50$  Hz, 1 H, OH-1), 4.35 (d,  $J = 5.54$  Hz, 2 H, H-2).



**Σύνθεση της ένωσης 7**: Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **6** (500 mg, 4.028 mmol, 1 eq.) σε 20 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, έγινε προσθήκη του αντιδραστήριου 2,4-

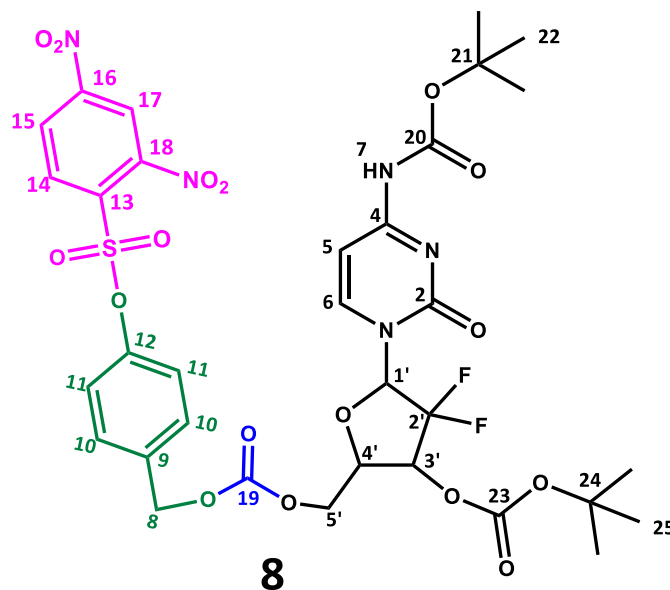
δινιτροβενζοσουλφονυλο χλωρίδιο - DNBS (1073.87 mg, 4.028 mmol, 1 eq.) και K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2786.15 mg, 20.139 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον και υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση και των δυο αρχικών αντιδραστηρίων. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο και εκπλύθηκε με νερό. Η οργανική φάση συλλέχθηκε, ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και τέλος, ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολούθησε καθαρισμός της ένωσης με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 15 λεπτά λυοφιλιοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **7** (950 mg, 66.6%) ως κίτρινο στερεό.

R<sub>f</sub>=0.40 (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

<sup>1</sup>H NMR της ένωσης **7** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 9.10 (s, 1 H, H-11), 8.60 (d, J = 8.23 Hz, 1 H, H-9), 8.21 (d, J = 8.57 Hz, 1 H, H-8), 7.37 (d, J = 8.33 Hz, 2 H, H-5), 7.14 (d, J = 8.37 Hz, 2 H, H-4), 5.43 (s, 1 H, OH-1), 4.49 (s, 2 H, H-2).

<sup>13</sup>C NMR της ένωσης **7** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 150.92 (C-10), 149 (C-6), 148 (C-12), 141.06 (C-7), 133.91 (C-3), 133.63 (C-9), 128.51 (C-4), 126.36 (C-8), 122.01 (C-5), 120.02 (C-11), 64.15 (C-2).

**Μάζα της ένωσης 7:** MS (ESI+) *m/z*: [M-H]<sup>-</sup> για C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S υπολογίστηκε: 354.0158, βρέθηκε: 353.2649 [M-H]<sup>-</sup>.



**Σύνθεση της ένωσης 8:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **7** (76.45 mg, 0.216, 1 eq.) σε 15 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν διαδοχικά BNPC (65.64 mg, 0.216 mmol, 1 eq.) και DMAP (31.64 mg, 0.259 mmol, 1.2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας (R<sub>f</sub>=0.75). Ακολούθησε *in situ*

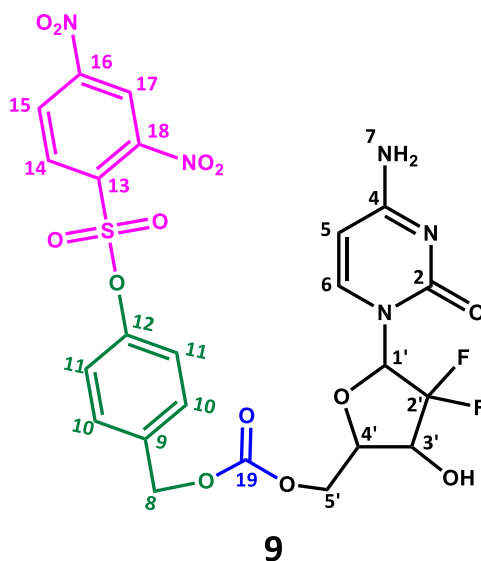
προσθήκη της ένωσης **Gem2** (100 mg, 0.216 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενδιαμέσου. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (80/20% έως 0/100% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17.5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **8** (96 mg, 53%) ως λευκό στερεό.

R<sub>f</sub>=0.37 (40% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

<sup>1</sup>H NMR της ένωσης **8** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 10.56 (s, 1 H, H-7), 9.08 (s, 1 H, H-17), 8.59 (d, J = 8.86 Hz, 1 H, H-15), 8.23 (d, J = 8.71 Hz, 1 H, H-14), 7.96 (d, J = 7.45 Hz, 1 H, H-6), 7.46 (d, J = 8.19 Hz, 2 H, H-11), 7.21 (d, J = 8.19 Hz, 2 H, H-10), 7.06 (d, J = 7.45 Hz, 1 H, H-5), 6.27 (t, J = 7.45 Hz, 1 H, H-1'), 5.32-5.27 (m, 1 H, H-3'), 5.16 (s, 2 H, H-8), 4.52-4.44 (m, 3 H, H-4' + H-5'a + H-5'b), 1.45 (s, 9 H, H-25), 1.42 (s, 9 H, H-22).

<sup>13</sup>C NMR της ένωσης **8** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 164.4 (C-4), 154.6 (C-19), 154.4 (C-23), 152.5 (C-20), 152.2 (C-16), 151.7 (C-2), 148.9 (C-12), 148.7 (C-18), 145.9 (C-6), 136.2 (C-9), 134.1 (C-14), 131.4 (C-13), 130.8 (C-11), 128.1 (C-15), 122.8 (C-2'), 122.7 (C-10), 121.7 (C-17), 95.9 (C-5), 84.6 (C-1'), 82.1 (C-4'), 76.4 (C-3'), 73.8 (C-24), 73.5 (C-21), 68.8 (C-8), 66.8 (C-5'), 28.3 (C-25), 27.7 (C-22).

**Μάζα της ένωσης 8:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>17</sub>S υπολογίστηκε: 844.1717, βρέθηκε: 844.1774 [M+H]<sup>+</sup>, 1687.3481 [2M+H]<sup>+</sup>.



**Σύνθεση της ένωσης 9:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της **8** (50 mg, 0.059 mmol, 1 eq.) σε 3.2 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 0.8 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **8**. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στον απαγωγό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή

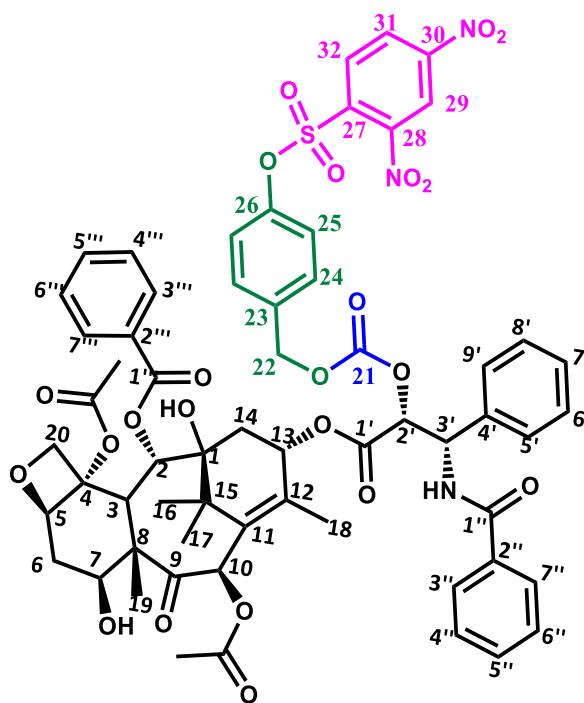
που συλλέχθηκε από την HPLC στα 13 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **9** (35 mg, 92.2%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.15$  (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

$^1\text{H NMR}$  της ένωσης **9** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 9.11 (d,  $J = 2.31$  Hz, 1 H, H-17), 8.89 (s, 1 H, 7-H), 8.60 (dd,  $J_1 = 2.23$  Hz,  $J_2 = 6.37$  Hz, 1 H, H-15), 8.31 (s, 1 H, H-7), 8.26 (d,  $J = 8.60$  Hz, 1 H, H-14), 7.76 (d,  $J = 7.56$  Hz, 1 H, H-6), 7.48 (d,  $J = 8.79$  Hz, 2 H, H-11), 7.23 (d,  $J = 8.69$  Hz, 2 H, H-10), 6.53 (s, 1 H, OH-3'), 6.15 (t,  $J = 8.37$  Hz, 1 H, H-1'), 6.00 (d,  $J = 7.62$  Hz, 1 H, H-5), 5.18 (s, 2 H, H-8), 4.48-4.45 (dd,  $J_1 = 2.72$  Hz,  $J_2 = 9.47$  Hz, 1 H, H-3'), 4.43-4.39 (m, 1 H, H-4'), 4.25-4.18 (m, 1 H, H-5' $\alpha$ ), 4.12-4.09 (m, 1 H, H-5' $\beta$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης **9** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 162 (C-4), 154.6 (C-19), 152.2 (C-16), 150.4 (C-2), 149 (C-12), 148.6 (C-18), 143.5 (C-6), 136.2 (C-9), 133.6 (C-14), 131.3 (C-13) 130.8 (C-11), 128 (C-15), 122.8 (C-2'), 122.6 (C-10), 121.7 (C-17), 95.6 (C-5), 84.7 (C-1'), 78.2 (C-4'), 70.4 (C-3'), 68.7 (C-8), 67.2 (C-5').

**Μάζα της ένωσης 9:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}\text{S}$  υπολογίστηκε: 644.0668, βρέθηκε: 644.0708  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1287.1354  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .



**10**

**Σύνθεση της ένωσης 10:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της πακλιταξέλης (70 mg, 0.082 mmol, 1 eq.) σε 15 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν διαδοχικά δις-4-νιτροφαινυλο καρβοξυ εστέρας - BNPC (24.94 mg, 0.082 mmol, 1 eq.) και DMAP (12.02 mg, 0.098 mmol, 1.2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 40 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC,

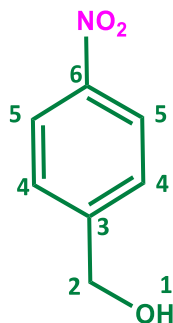
έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου ( $R_f=0.45$ ). Ακολούθησε *in situ* προσθήκη της ένωσης **7** (29.05 mg, 0.082 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενδιάμεσου. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100%  $H_2O+0.1\%TFA/MeCN+0.1\%TFA$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17.5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την τελική ένωση **10** (60 mg, 60%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.15$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης **10**** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 9.27 (d,  $J = 8.01$  Hz, 1 H, -NH), 9.11 (s, 1 H, H-29), 8.59 (d,  $J = 8.01$  Hz, 1 H, H-31), 8.23 (d,  $J = 8.34$  Hz, 1 H, H-32), 7.98 (d,  $J = 7.67$  Hz, 2 H, H-3''' + H-7'''), 7.83 (d,  $J = 7.01$  Hz, 2 H, H-3'', H-7''), 7.74-7.71 (t,  $J = 6.55$  Hz, 1 H, H-5'''), 7.64 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, H-4''' + H-6'''), 7.55 (t,  $J = 6.88$  Hz, 1 H, H-5''), 7.5-7.44 (m, 8 H, H-4'' + H-6'' + H-25 + H-5' + H-6' + H-8' + H-9'), 7.22 (d,  $J = 7.67$  Hz, 3 H, H-24 + H-7'), 6.29 (s, 1 H, H-10), 5.82 (t,  $J = 8.35$  Hz, 1 H, H-13), 5.53 (t,  $J = 8.42$  Hz, 1 H, H-3'), 5.42-5.35 (m, 2 H, H-2', H-5), 5.21 (s, 2 H, H-22), 4.91 (d,  $J = 9.59$  Hz, 1 H, H-2), 4.63 (s, 1 H, OH-1), 4.12-4.08 (m, 1 H, H-7), 4.03-3.98 (m, 2 H, H-20), 3.57 (d, 1 H,  $J = 7.28$  Hz, H-3), 2.25 (s, 3 H, OAc-4), 2.10 (s, 3 H, OAc-10), 2.13-2.09 (m, 1 H, H-14 $\alpha$ ), 1.78 (s, 3 H, H-18), 1.84-1.78 (m, 1 H, H-6 $\alpha$ ), 1.67-1.61 (m, 1 H, H-14 $\beta$ ), 1.49 (s, 3 H, H-19), 1.54-1.49 (m, 1 H, H-6 $\beta$ ), 1.02 (s, 3 H, H-16), 0.99 (s, 3 H, H-17).

**$^{13}C$  NMR της ένωσης **10**** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : ~200 (C-9), 170.2 (C-33), 169.3 (C-34), 166.9 (C-1'''), 166.8 (C-1'), 165.7 (C-1'''), 154.2 (C-21), 152 (C-30), 148.9 (C-26), 148.4 (C-28), 147.4 (C-27), 139.6 (C-12), 137.4 (C-4'), 135.7 (C-23), 134.2 (C-11), 133.7 (C-32), 133.6 (C-5'''), 132.3 (C-2''), 131.9 (C-5''), 131.1 (C-4'',6''), 130.5 (C-2'''), 130.1 (C-3''',7'''), 129.3 (C-4''',6'''), 129.2 (C-5',6',7',8',9'), 128.1 (C-25), 128 (C-3'',7''), 127.9 (C-31), 122.6 (C-24), 121.7 (C-29), 84.1 (C-2), 80.8 (C-1), 77.8 (C-2'), 76.8 (C-4), 75.9 (C-20), 75.2 (C-10) 74.8 (C-5), 71.8 (C-13), 71.1 (C-7), 69.4 (C-22), 57.9 (C-8), 54.5 (C-3'), 46.8 (C-3), 43.7 (C-15), 37.1 (C-14), 34.8 (C-6), 26.9 (C-17), 23.1 (C-4-OAc), 21.8 (C-16), 21.2 (C-10-OAc), 14.5 (C-18), 10.2 (C-19).

**Μάζα της ένωσης **10****: MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{61}H_{59}N_3O_{23}S$  υπολογίστηκε: 1234.3260, βρέθηκε: 1256.3136  $[M+Na]^+$ , 1274.3230  $[M+K]^+$ , 1277.3305  $[M+ACN+H]^2+$ .

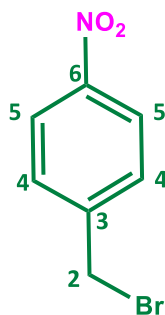


## 11

**Σύνθεση της ένωσης 11 (4-νιτροβενζυλική αλκοόλη):** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η 4-νιτροβενζαλδεΰδη (1000 mg, 6.62 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με NaBH<sub>4</sub> (275.4 mg, 7.28 mmol, 1.1 eq.) σε 18 mL απόλυτης αιθανόλης για 2 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο και εκπλύθηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίστηκε για να δώσει την ένωση **11** ως πορτοκαλί στερεό (950 mg, 94%).

R<sub>f</sub>=0.30 (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 11** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 8.20 (d, J = 7.59 Hz, 2 H, H-5), 7.59 (d, J = 7.90 Hz, 2 H, H-4), 5.54-5.52 (t, J = 5.68 Hz, 1 H, H-1), 4.64 (d, J = 5.62 Hz, 2 H, H-2).



## 12

**Σύνθεση της ένωσης 12 (4-νιτροβενζυλο βρωμίδιο):** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η ένωση **11** (500 mg, 3.27 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με PBr<sub>3</sub> (341.13 μL, 3.59 mmol, 1.1 eq.) σε 20 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου για 4 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη νερού (10 mL) και η εκχύλιση του προϊόντος. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να δώσει την ένωση **12** ως πορτοκαλί στερεό (560 mg, 79.4%).

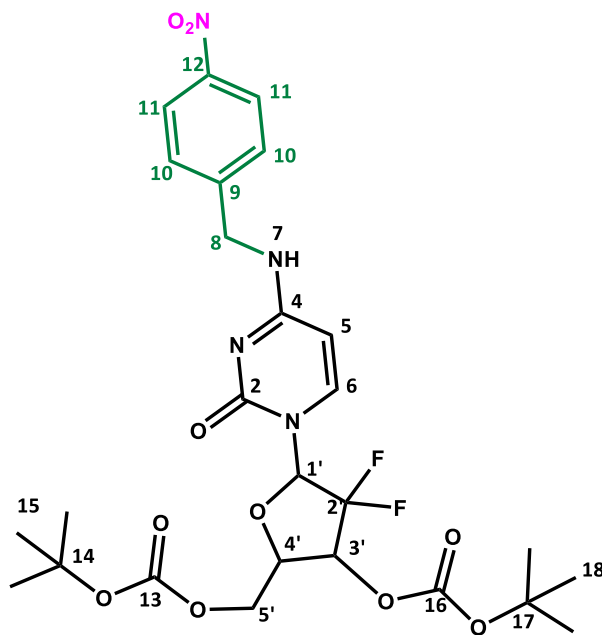
R<sub>f</sub>=0.75 (100% διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 12** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 8.22 (d, J = 8.64 Hz, 2 H, H-5), 7.73 (d, J = 8.57 Hz, 2 H, H-4), 4.82 (s, 2 H, H-2).



$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **12** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 147.71 (C-6), 144.77 (C-3), 129.93 (C-4), 124.06 (C-5), 30.91 (C-2).

**Μάζα της ένωσης 12:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_7\text{H}_6\text{BrNO}_2$  υπολογίστηκε: 214.9582, βρέθηκε: 214.0891  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



**13a**

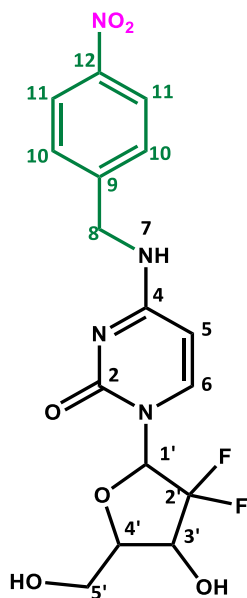
**Σύνθεση της ένωσης 13a:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **12** (100 mg, 0.46 mmol, 1.2 eq.) σε 25 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν διαδοχικά Gem1 (178.77 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) και  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (533.11 mg, 3.86 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την σχεδόν πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό νέων κηλίδων. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης για την απομάκρυνση του  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100%  $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}/\text{MeCN}+0.1\%\text{TFA}$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17 λεπτά λυοφιλιοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **13a** (35 mg, 58.5%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.15$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

$^1\text{H}$  NMR της ένωσης **13a** (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 8.21 (d,  $J = 8.11$  Hz, 2 H, H-11), 8.15 (d,  $J = 7.58$  Hz, 1 H, H-6), 7.50 (d,  $J = 7.99$  Hz, 2 H, H-10), 7.24 (d,  $J = 7.58$  Hz, 1 H, H-5), 6.30-6.25 (t,  $J = 8.12$  Hz, 1 H, H-1'), 5.30-5.17 (m,  $J_1 = 7.14$  Hz,  $J_2 = 5.58$  Hz, 1 H, H-3'), 5.25 (s, 2 H, H-8), 4.25 (s, 1 H, H-4'), 3.79 (d,  $J = 12.13$  Hz, 1 H, H-5'b), 3.70-3.66 (dd,  $J_1 = 2.51$  Hz,  $J_2 = 10.53$  Hz, 1 H, H-5'a), 1.45 (s, 9 H, H-15), 1.36 (s, 9 H, H-18).

$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **13a** (100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 164.72 (C-4), 153.95 (C-2), 152.61 (C-13), 151.71 (C-16), 146.96 (C-12), 146.68 (C-9), 144.41 (C-6), 128.11 (C-10), 124.01 (C-11), 121.95 (C-2'), 98.59 (C-5), 84.37 (C-17), 84.30 (C-14), 79.59 (C-1'), 72.93 (C-4'), 72.47 (C-3'), 59.61 (C-5'), 49.07 (C-8), 27.84 (C-15), 27.58 (C-18).

**Μάζα της ένωσης 13a:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{10}$  υπολογίστηκε: 599.2086, βρέθηκε: 599.2161  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 637.1715  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 1097.3737  $[2\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ , 1197.4265  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 1235.3807  $[2\text{M}+\text{K}]^+$ .



**13b**

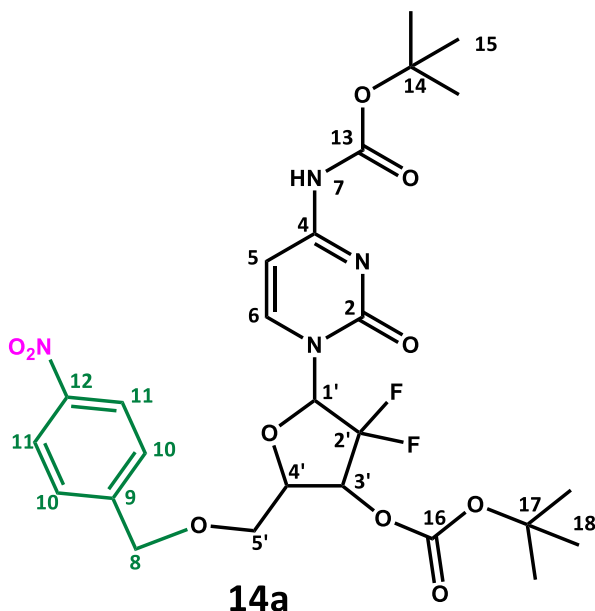
**Σύνθεση της ένωσης 13b:** Στο διάλυμα της ένωσης **13a** (40 mg, 0.067 mmol, 1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 5 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **13a** και τον σχηματισμό νέων κηλίδων. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στον απαγωγό με χρήση υδραντλίας και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 10/90%  $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}/\text{MeCN}+0.1\%\text{TFA}$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 8.5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **13b** (40 mg, 89%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.10$  (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

$^1\text{H}$  NMR της ένωσης **13b** (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 8.69-8.66 (t,  $J = 5.92$  Hz, 2 H, H-7), 8.22 (d,  $J = 8.12$  Hz, 1 H, H-11), 7.75 (d,  $J = 7.38$  Hz, 1 H, H-6), 7.56 (d,  $J = 8.12$  Hz, 2 H, H-10), 6.13-6.10 (t,  $J = 7.82$ , 1 H, H-1'), 5.95 (d,  $J = 7.53$  Hz, 1 H, H-5), 4.66 (d,  $J = 5.49$  Hz, 2 H, H-8), 4.18-4.10 (m, 1 H, H-3'), 3.82-3.75 (m, 2 H, H-4', H-5'b), 3.64-3.60 (dd,  $J_1 = 3.06$  Hz,  $J_2 = 9.59$  Hz, 1 H, H-5'a).

$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **13b** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 163.5 (C-4), 154.4 (C-2), 147.23 (C-12), 146.24 (C-9), 141 (C-6), 129 (C-10), 124.2 (C-11), 121.4 (C-2'), 95.64 (C-5), 84.13 (C-1'), 81.05 (C-4'), 69.14 (C-3'), 59.49 (C-5'), 43.52 (C-8).

**Μάζα της ένωσης 13β:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{16}H_{16}F_2N_4O_6$  υπολογίστηκε: 399.1038, βρέθηκε: 399.1098  $[M+H]^+$ , 437.0654  $[M+K]^+$ , 797.2137  $[2M+H]^+$ , 835.1689  $[2M+K]^+$ .



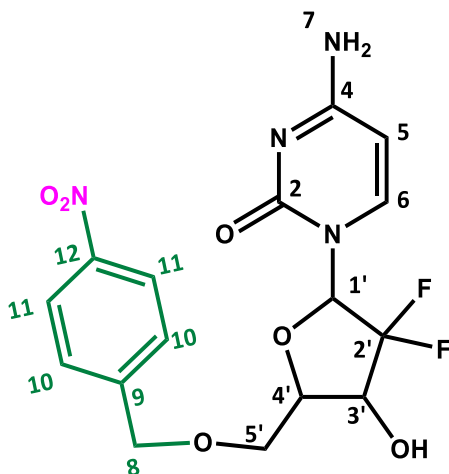
**Σύνθεση της ένωσης 14a:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **12** (100 mg, 0.46 mmol, 1.2 eq.) σε 25 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν διαδοχικά Gem2 (178.77 mg, 0.39 mmol, 1 eq.) και  $K_2CO_3$  (533.11 mg, 3.58 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την σχεδόν πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό νέων κηλίδων. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης για την απομάκρυνση του ανθρακικού καλίου, ο διαλύτης εξατμίστηκε και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100%  $H_2O+0.1\%TFA/MeCN+0.1\%TFA$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 19 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **14a** (115 mg, 49.8%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.15$  (50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 14a** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 8.20 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2 H, H-11), 7.68 (d,  $J = 8.24$  Hz, 1 H, H-6), 7.50 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2 H, H-10), 6.24-6.20 (t,  $J = 8.40$  Hz, 1 H, H-1'), 6.15 (d,  $J = 8.24$  Hz, 1 H, H-5), 5.21 (s, 2 H, H-8), 5.19-5.14 (m, 1 H, H-3'), 4.23-4.22 (t,  $J = 3.05$  Hz, 1 H, H-4'), 3.76 (d,  $J = 12.01$  Hz, 1 H, H-5'a), 3.66 (dd,  $J = 10.47$  Hz, 1 H, H-5'b), 1.45 (s, 9 H, H-15), 1.43 (s, 9 H, H-18).

**$^{13}C$  NMR της ένωσης 14a** (100 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 160.22 (C-4), 154.35 (C-2), 151.69 (C-16), 149.88 (C-13), 147.17 (C-12), 144.61 (C-9), 137.07 (C-6), 128.50 (C-10), 124.11 (C-11), 121.93 (C-2'), 97.24 (C-5), 84.3 (C-1'), 80.71 (C-17), 79.32 (C-14), 72.71 (C-4'), 72.41 (C-3'), 59.56 (C-5'), 45.37 (C-8), 28.17 (C-18), 27.58 (C-15).

**Μάζα της ένωσης 14a:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{26}H_{32}F_2N_4O_{10}$  υπολογίστηκε: 599.2086, βρέθηκε: 599.2159  $[M+H]^+$ , 637.1710  $[M+K]^+$ , 1097.3718  $[2M+H-BOC]^+$ , 1219.4066  $[2M+Na]^+$ .



**14b**

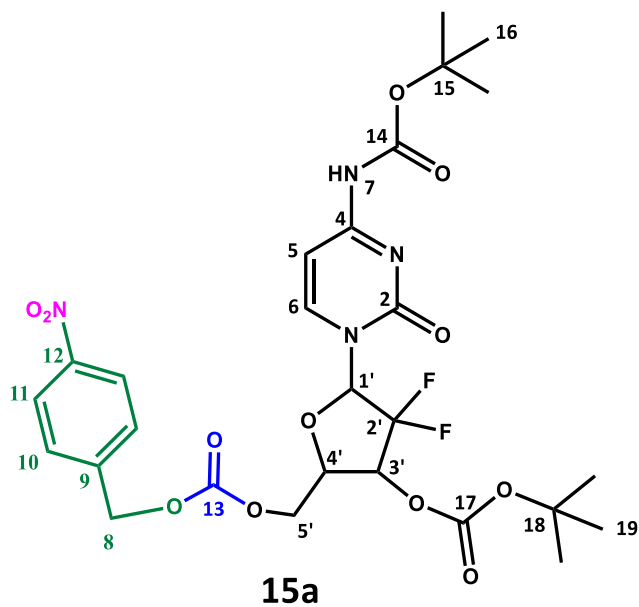
**Σύνθεση της ένωσης 14β:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της **14α** (30 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 5 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **14α**. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στον απαγωγό με χρήση της υδραντλίας και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 8 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **14β** (15 mg, 75%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.10$  (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 14β** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 10.19 (s, 1 H, H-7), 9.54 (s, 1 H, H-7), 8.08 (d, J = 7.88 Hz, 1 H, H-6), 8.06 (d, J = 8.70 Hz, 2 H, H-11), 7.41 (d, J = 8.73 Hz, 2 H, H-10), 6.19 (d, J = 7.89 Hz, 1 H, H-5), 5.95 (t, J = 6.60 Hz, 1 H, H-1'), 5.25-5.09 (d, J = 17.35 Hz, 2 H, H-8), 4.07-4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.78 (d, J = 8.20 Hz, 1 H, H-4'), 3.65 (d, J = 12.49 Hz, 1 H, H-5'a), 3.51-3.48 (dd, J<sub>1</sub> = 3.13 Hz, J<sub>2</sub> = 9.65 Hz, 1 H, H-5'b).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 14β** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 158.8 (C-4), 147.6 (C-2), 147.1 (C-12), 141.8 (C-6), 140.8 (C-9), 128.55 (C-10), 124.23 (C-11), 122.5 (C-2'), 96.3 (C-5), 85.4 (C-1'), 82.2 (C-4'), 68.7 (C-3'), 59.2 (C-5'), 47.2 (C-8).

**Μάζα της ένωσης 14β:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> υπολογίστηκε: 399.1038, βρέθηκε: 399.1100 [M+H]<sup>+</sup>.



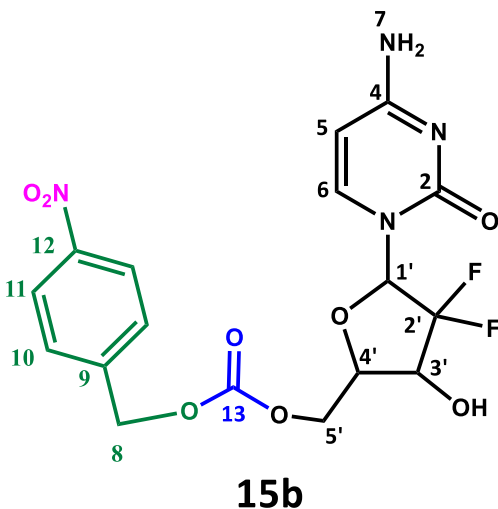
**Σύνθεση της ένωσης 15a:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **11** (16.52 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) σε 15 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν διαδοχικά BNPC (32.82 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) και DMAP (15.82 mg, 0.13 mmol, 1.2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου προϊόντος ( $R_f=0.75$ ). Ακολούθησε *in situ* προσθήκη της Gem2 (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου. Ο διαλύτης εξατμίστηκε και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100%  $H_2O+0.1\%TFA/MeCN+0.1\%TFA$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 14 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **15a** (50 mg, 72%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.45$  (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 15a** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 10.51 (s, 1 H, H-7), 8.25 (d,  $J = 8.13$  Hz, 2 H, H-11), 7.96 (d,  $J = 7.64$  Hz, 1 H, H-6), 7.67 (d,  $J = 8.38$  Hz, 2 H, H-10), 7.05 (d,  $J = 7.04$  Hz, 1 H, H-5), 6.32-6.28 (t,  $J = 8.15$  Hz, 1 H, H-1'), 5.35 (s, 3 H, H-8 + H-3'), 4.58-4.50 (m, 3 H, H-5'a, H-5'b + H-4'), 1.46 (s, 9 H, H-19), 1.45 (s, 9 H, H-16).

**$^{13}C$  NMR της ένωσης 15a** (100 MHz,  $DMSO-d_6$ , ppm)  $\delta$ : 164.35 (C-4), 154.56 (C-13), 154.39 (C-17), 152.53 (C-2), 151.70 (C-14), 147.91 (C-12), 145.72 (C-9), 143.60 (C-6), 129.23 (C-10), 124.23 (C-11), 121.85 (C-2'), 95.89 (C-5), 84.57 (C-18), 82.06 (C-15), 76.46 (C-1'), 73.68 (C-4'), 73.2 (C-3'), 68.53 (C-8), 66.81 (C-5'), 28.33 (C-16), 27.72 (C-19).

**Μάζα της ένωσης 15a:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{27}H_{32}F_2N_4O_{12}$  υπολογίστηκε: 643.2018, βρέθηκε: 665.1860  $[M+Na]^+$ , 1285.4031  $[2M+H]^+$ .



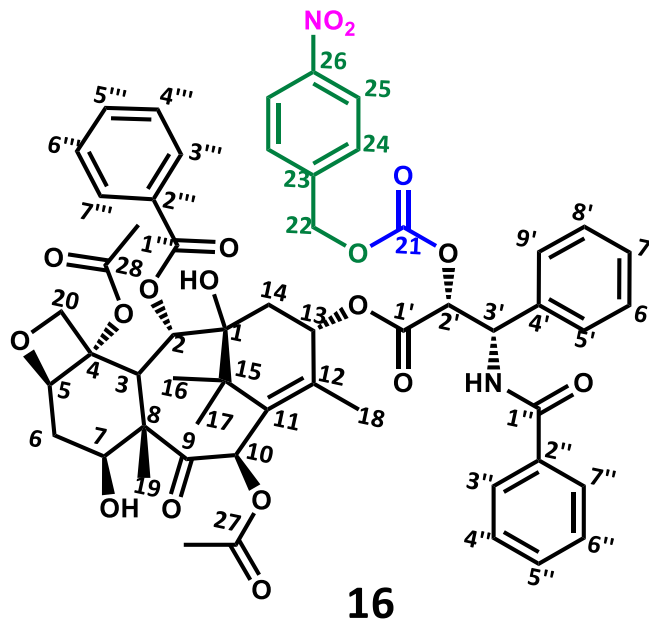
**Σύνθεση της ένωσης 15β:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **15α** (30 mg, 0.047 mmol, 1 eq.) σε 4 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν 1 mL TFA και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **15α**. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στον απαγωγό με χρήση της υδραντλίας και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 9.5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **15β** (16.3 mg, 78.4%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.60$  (50% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 15β** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 8.80 (s, 1 H, H-7), 8.25 (d, J = 8.60 Hz, 2 H, H-11), 8.20 (s, 1 H, H-7), 7.73 (d, J = 7.94 Hz, 1 H, H-6), 7.66 (d, J = 8.93 Hz, 2 H, H-10), 5.97 (d, J = 7.79 Hz, 1 H, H-5), 6.17-6.14 (t, J = 8.25 Hz, 1 H, H-1'), 5.32 (s, 2 H, H-8), 4.51-4.48 (dd, J<sub>1</sub> = 2.60 Hz, J<sub>2</sub> = 9.59 Hz, 1 H, H-5'a), 4.45-4.41 (dd, J<sub>1</sub> = 5.61 Hz, J<sub>2</sub> = 6.67 Hz, 1 H, H-5'b), 4.26-4.19 (m, 1 H, H-3'), 4.14-4.10 (m, 1 H, H-4').

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 15β** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 162.33 (C-4), 154.54 (C-13), 150.8 (C-2), 147.7 (C-12), 143.44 (C-9), 143.22 (C-6), 129.43 (C-10), 124.28 (C-11), 122.94 (C-2'), 95.6 (C-5), 84.7 (C-1'), 78.3 (C-4'), 70.6 (C-3'), 68.5 (C-8), 67.3 (C-5').

**Μάζα της ένωσης 15β:** MS (ESI+)  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> υπολογίστηκε: 443.0973, βρέθηκε: 443.0994 [M+H]<sup>+</sup>, 885.1921 [2M+H]<sup>+</sup>.



**Σύνθεση της ένωσης 16:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **11** (8.97 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) σε 10 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν διαδοχικά BNPC (17.81 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) και DMAP (8.58 mg, 0.07 mmol, 1.2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και την εμφάνιση μιας νέας κηλίδας. Ακολούθησε *in situ* προσθήκη της πακλιταξέλης (50 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 40 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 16 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **16** (40 mg, 66%) ως λευκό στερεό.

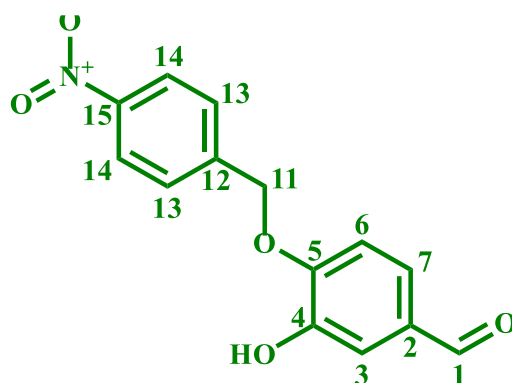
R<sub>f</sub>=0.40 (5% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 16** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 9.29 (d, J = 8.63 Hz, 1 H, -NH), 8.21 (d, J = 8.51 Hz, 2 H, H-25), 7.98 (d, J = 7.55 Hz, 2 H, H-3''', H-7'''), 7.84 (d, J = 7.55 Hz, 2 H, H-3'', H-7''), 7.73-7.70 (t, J = 7.45 Hz, 1 H, H-5'''), 7.65-7.61 (m, 4 H, H-24 + H-4''' + H-6'''), 7.58-7.55 (t, J = 7.46 Hz, 1 H, H-5''), 7.51-7.45 (m, 6 H, H-4'' + H-6'' + H-5' + H-6' + H-8' + H-9'), 7.22-7.19 (m, 1 H, H-7'), 6.28 (s, 1 H, H-10), 5.84-5.81 (t, J = 8.75 Hz, 1 H, H-13), 5.58-5.55 (t, J = 8.68 Hz, 1 H, H-3'), 5.42-5.39 (m, 2 H, H-2, H-5), 5.37 (d, J = 5.98 Hz, 2 H, H-22), 4.90 (d, J = 9.28 Hz, 1 H, H-2'), 4.64 (s, 1 H, OH-1), 4.11-4.07 (m, 1 H, H-7), 4.03-3.98 (q, J<sub>1</sub> = 6.34 Hz, J<sub>2</sub> = 8.28 Hz, 2 H, H-20), 3.57 (d, J = 7.10 Hz, 1 H, H-3), 2.33-2.29 (m, 1 H, H-6α), 2.25 (s, 3 H, OAc-4), 2.11 (s, 3 H, OAc-10), 1.84-1.79 (m, 1 H, H-14α), 1.74 (s, 3 H, H-18), 1.66-1.61 (t, J = 12.72 Hz, 1 H, H-6β), 1.55-1.52 (t, J = 7.85 Hz, 1 H, H-14β), 1.49 (s, 3 H, H-19), 1.02 (s, 3 H, H-16), 0.99 (s, 3 H, H-17).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 16** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: >200 (C-9), 169.6 (C-28), 168.7 (C-27), 166.5 (C-1'), 166.4 (C-1''), 165.2 (C-1'''), 153.7 (C-21), 147.4 (C-26), 142.6 (C-23), 139.1 (C-

12), 136.7 (C-4'), 133.6 (C-11), 133.5 (C-2'''), 132.9 (C-5'''), 131.6 (C-2''), 131.3 (C-5''), 129.5 (C-3''' + C-7'''), 128.8 (C-4''' + C-6'''), 128.7 (C-24), 128.5 (C-6'' + C-4''), 128.3 (C-7'), 127.9 (C-6', C-8'), 127.5 (C-5' + C-9'), 127.4 (C-3'' + C-7''), 123.5 (C-25), 83.3 (C-2), 80.3 (C-4), 77.2 (C-2'), 76.7 (C-1), 75.2 (C-20), 74.4 (C-10), 74.2 (C-5), 71.1 (C-13), 70.2 (C-7), 68.3 (C-22), 57.3 (C-8), 53.9 (C-3'), 46.1 (C-3), 43.3 (C-15), 36.3 (C-6), 34.1 (C-14), 26.3 (C-17), 22.3 (C-28-OAc), 21.3 (C-16), 20.5 (C-27-OAc), 13.5 (C-18), 9.5 (C-19).

**Μάζα της ένωσης 16:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{55}H_{56}N_2O_{18}$  υπολογίστηκε: 1033.3562, βρέθηκε: 1033.3596  $[M+H]^+$ , 1056.3444  $[M+Na]^+$ .



## 17

**Σύνθεση της ένωσης 17:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της 3,4-διυδροξυβενζαλδεΰδης (32 mg, 0.231 mmol, 1 eq.) και  $K_2CO_3$  (32 mg, 0.231 mmol, 1 eq.) σε 5 mL ακετόνης προστέθηκε σε δόσεις σε διάστημα 45 λεπτών η ένωσης **12** (50 mg, 0.231 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την σχεδόν πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και την εμφάνιση δυο νέων κηλίδων που αντιστοιχούσαν στο μόνο-υποκατεστημένο και στο δι-υποκατεστημένο προϊόν. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος για την απομάκρυνση του  $K_2CO_3$  και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 10% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **17** (40 mg, 63.3%) ως υποκίτρινο στερεό.

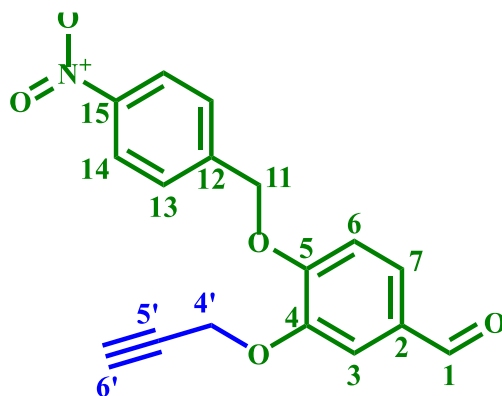
$R_f=0.65$  (30% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 17** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 9.77 (s, 1 H, H-1), 9.75 (s, 1 H, 4-OH), 8.27 (d,  $J$  = 8.62 Hz, 2 H, H-14), 7.76 (d,  $J$  = 8.53 Hz, 2 H, H-13), 7.38 (dd,  $J$  = 8.25 Hz, 1 H, H-7), 7.30 (d,  $J$  = 1.70 Hz, 1 H, H-3), 7.18 (d,  $J$  = 8.26 Hz, 1 H, H-6), 5.40 (s, 2 H, H-11).

**$^{13}C$  NMR της ένωσης 17** (100 MHz,  $CDCl_3$ , 25 °C):  $\delta$  = 191.97 (C-1), 152.26 (C-5), 147.83 (C-4), 147.55 (C-15), 144.99 (C-12), 130.84 (C-2), 128.73 (C-13), 124.49 (C-7), 124.07 (C-14), 114.60 (C-3), 113.83 (C-6), 69.12 (C-11).



**Μάζα της ένωσης 17:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{14}H_{11}NO_5$  υπολογίστηκε: 274.0671, βρέθηκε: 274.0705  $[M+H]^+$ .



## 18

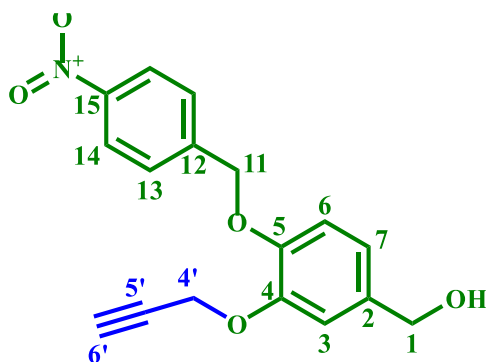
**Σύνθεση της ένωσης 18:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **17** (5 mg, 0.018 mmol, 1 eq.) και  $K_2CO_3$  (8 mg, 0.054 mmol, 3 eq.) σε 3 mL ακετόνης προστέθηκε 3-βρωμοπροπάνιο (1.4  $\mu$ L, 0.018 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 50 °C για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την σχεδόν πλήρη κατανάλωση της ένωσης **17** και την εμφάνιση μιας νέας κηλίδας. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος για την απομάκρυνση του  $K_2CO_3$  και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και μετά από ξήρανση της οργανικής φάσης με  $Na_2SO_4$ , διήθηση και εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα λήφθηκε η ένωση **18** (5 mg, 89%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.90$  (30% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1H$  NMR της ένωσης 18** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 9.84 (s, 1 H, H-1), 8.27 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H, H-14), 7.73 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2 H, H-13), 7.59 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H, H-7), 7.55 (d,  $J$  = 1.15 Hz, 1 H, H-3), 7.28 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H, H-6), 5.42 (s, 2 H, H-11), 4.93 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2 H, H-4'), 3.61 (t, 1 H, H-6').

**$^{13}C$  NMR της ένωσης 18** (100 MHz,  $CDCl_3$ , 25 °C):  $\delta$  = 147.79 (C-4), 147.72 (C-5), 147.60 (C-15), 144.57 (C-12), 135.06 (C-2), 127.59 (C-13), 123.81 (C-14), 120.75 (C-7), 114.99 (C-3), 114.05 (C-6), 78.45 (C-5'), 75.94 (C-6'), 70.20 (C-11), 65.00 (C-1), 56.93 (C-4).

**Μάζα της ένωσης 18:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $C_{17}H_{13}NO_5$  υπολογίστηκε: 312.0827, βρέθηκε: 312.0608  $[M+H]^+$ .



## 19

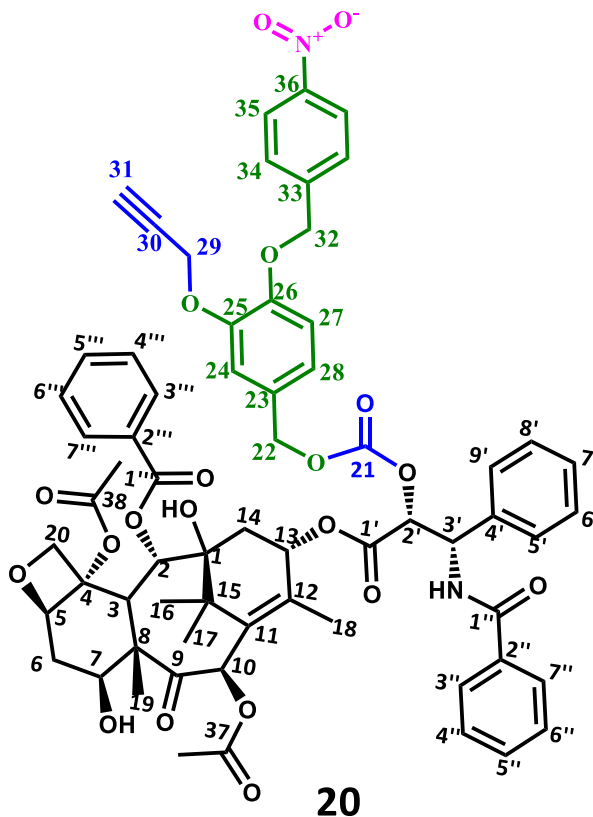
**Σύνθεση της ένωσης 19:** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η ένωση **18** (3.2 mg, 0.0102 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με NaBH<sub>4</sub> (0.43 mg, 0.0113 mmol, 1.1 eq.) σε 1 mL απόλυτης αιθανόλης για 3 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο και εκπλύθηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και εξατμίστηκε για να ληφθεί η ένωση **19** (5 mg, 89%) ως λευκό στερεό.

R<sub>f</sub>=0.55 (100% διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 19** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 8.25 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-14), 7.71 (d, J = 8.51 Hz, 2 H, H-13), 7.05 (d, J = 1.5 Hz, 1 H, H-3), 6.98 (d, J = 8.41 Hz, 1 H, H-6), 6.85 (dd, J = 8.15 Hz, 1 H, H-7), 5.26 (s, 2 H, H-11), 5.10 (t, 1 H, OH-1), 4.81 (d, J = 2.24 Hz, 2 H, H-4'), 4.41 (d, J = 5.71 Hz, 2 H, H-1), 3.56 (t, 1 H, H-6').

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 19** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 147.79 (C-4), 147.72 (C-5), 147.60 (C-15), 144.57 (C-12), 135.06 (C-2), 127.59 (C-13), 123.81 (C-14), 120.75 (C-7), 114.99 (C-3), 114.05 (C-6), 78.45 (C-5'), 75.94 (C-6'), 70.20 (C-11), 65.00 (C-1), 56.93 (C-4').

**Μάζα της ένωσης 19:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub> υπολογίστηκε: 314.0984, βρέθηκε: 313.2728 [M+H]<sup>+</sup>, 353.2652 [M+K]<sup>+</sup>.



**Σύνθεση της ένωσης 20:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **19** (10 mg, 0.031 mmol, 1 eq.) σε 4 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν διαδοχικά δις-4-νιτροφαινυλο καρβοξυ εστέρας -BNPC (9.71 mg, 0.031 mmol, 1 eq.) και DMAP (4.67 mg, 0.038 mmol, 1.2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών αντιδραστηρίων και τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου. Ακολούθησε *in situ* προσθήκη της πακλιταξέλης (27.20 mg, 0.031 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 40 °C για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 15 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την τελική ένωση **20** (19.3 mg, 52.2%) ως λευκό στερεό.

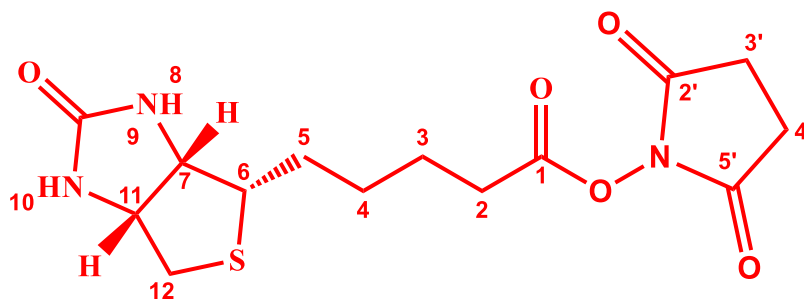
R<sub>f</sub>=0.35 (5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 20** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ = 9.28 (d, J = 8.44 Hz, 1 H, -NH), 8.27 (d, J = 8.54 Hz, 2 H, H-35), 7.99 (d, J = 7.79 Hz, 2 H, H-3''' + H-7'''), 7.83 (d, J = 7.60 Hz, 2 H, H-3'' + H-7''), 7.73-7.70 (t, J = 7.45 Hz, 1 H, H-5'''), 7.72 (d, J = 8.50 Hz, 2 H, H-34), 7.66 (t, J = 15.40 Hz, 2 H, H-4''' + H-6'''), 7.58-7.55 (m, 1 H, H-5''), 7.51-7.45 (m, 6 H, H-4'' + H-6'' + H-5' + H-6' + H-8' + H-9'), 7.22-7.19 (m, 1 H, H-7'), 7.12 (s, 1 H, H-24), 7.03 (d, J = 8.45 Hz, 1 H, H-27), 6.96 (d, J = 8.45 Hz, 1 H, H-28), 6.31 (s, 1 H, H-10), 5.83 (t, J = 9.75 Hz, 1 H, H-13), 5.54 (t, J = 8.14 Hz, 1 H, H-3'), 5.42 (d, J = 7.21 Hz, 1 H, H-2), 5.37 (d, J = 8.80 Hz, 1 H, H-5),

5.29 (s, 2 H, H-32), 5.17-5.08 (m, 2 H, H-1), 4.92 (d,  $J = 9.89$  Hz, 1 H, H-2'), 4.80 (s, 2 H, H-22), 4.64 (s, 1 H, OH-1), 4.14-4.10 (m, 1 H, H-7), 4.03-3.98 (m, 2 H, H-20), 3.57 (d,  $J = 7.10$ , 1 H, H-3), 3.51 (t,  $J = 4.45$  Hz, 1 H, H-31), 2.33-2.29 (m, 1 H, H-6 $\alpha$ ), 2.27 (s, 3 H, OAc-4), 2.11 (s, 3 H, OAc-10), 1.84-1.79 (m, H-14 $\alpha$ ), 1.81 (s, 3 H, H-18), 1.65 (t,  $J = 25.67$  Hz, 1 H, H-6 $\beta$ ), 1.55-1.52 (t,  $J = 7.85$  Hz, 1 H, H-14 $\beta$ ), 1.51 (s, 3 H, H-19), 1.04 (s, 3 H, H-16), 1.01 (s, 3 H, H-17).

$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης **20** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 203.73 (C-9), 171.35 (C-38), 169.91 (C-37), 167.93 (C-1'), 167.85 (C-1''), 167.03 (C-1'''), 154.09 (C-21), 148.77 (C-25), 147.65 (C-26), 144.19 (C-36), 142.53 (C-33), 140.71 (C-12), 136.43 (C-4'), 133.75 (C-11), 133.65 (C-2'''), 133.21 (C-5'''), 132.98 (C-2''), 132.30 (C-5''), 130.20 (C-3''' + C-7'''), 129.17 (C-34), 128.80 (C-4'''), 128.75 (C-6'''), 128.65 (C-6'' + C-4''), 128.11 (C-7'), 127.57 (C-6' + C-8'), 127.44 (C-23), 127.15 (C-5' + C-9'), 126.87 (C-3''), 126.57 (C-7''), 123.86 (C-35), 122.78 (C-28), 115.50 (C-24), 114.56 (C-27), 84.51 (C-2'), 81.11 (C-4), 79.09 (C-2), 78.19 (C-30), 76.21 (C-31), 75.60 (C-1), 75.06 (C-20), 72.18 (C-22), 70.55 (C-10), 69.96 (C-5), 58.51 (C-29), 57.01 (C-8), 52.88 (C-3'), 45.60 (C-3), 43.23 (C-15), 35.58 (C-6), 35.50 (C-14), 22.68 (C-38-OAc), 22.12 (C-17), 21.94 (C-16), 20.83 (C-37-OAc), 14.80 (C-18), 9.62 (C-19).

**Μάζα της ένωσης 20:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{65}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_{20}$  υπολογίστηκε: 1192.4086, βρέθηκε: 1192.4119  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



## 21

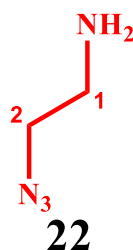
**Σύνθεση της ένωσης 21:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της D-βιοτίνης (200 mg, 0.81 mmol, 1 eq.) σε 10 mL άνυδρου DMF προστέθηκε NHS (141.32 mg, 1.22 mmol, 1.5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 50 °C μέχρι να διαλυτοποιηθούν πλήρως τα στερεά. Έπειτα, στην ίδια θερμοκρασία προστέθηκε στάγδην διάλυμα DCC (253.36 mg, 1.22 mmol, 1.5 eq.) σε 5 mL άνυδρου DMF<sup>153</sup>. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η πραγματοποίηση της αντίδρασης επαληθεύτηκε λόγω καταβύθισης του παραπροϊόντος της ουρίας (DCU) ως λευκό ίζημα, ενώ η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της βιοτίνης. Ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του παραπροϊόντος DCU και εξάτμιση του διαλύτη υπό υψηλό κενό. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίστηκε μέσω ανακρυστάλλωσης από 2-προπανόλη για να παραληφθεί η τελική ένωση **21** (255 mg, 92.2%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.20$  (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1\text{H}$  NMR της ένωσης 21** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 6.40 (s, 1 H, H-8), 6.34 (s, 1 H, H-10), 4.30 (t,  $J$  = 8.21 Hz, 1 H, H-7), 4.14 (t,  $J$  = 8.21 Hz, 1 H, H-11), 3.13-3.07 (m, 1 H, H-6), 2.88-2.81 (m, 1 H, H-12a), 2.80 (s, 2 H, H-3' + 4'), 2.66 (t,  $J$  = 9.25 Hz, 2 H, H-2), 2.57 (d,  $J$  = 12 Hz, H 1, H-12b), 1.69-1.34 (m, 6 H, H-5 + H-3 + H-4).

**$^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 21** (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 174.4 (C-2' + C-5'), 169.0 (C-1), 162.8 (C-9), 61.0 (-7), 59.1 (C-11), 55.3 (C-6), 39.9 (C-12), 30.0 (C-2), 27.9 (C-4), 27.6 (C-5), 25.5 (C-2' + C-4'), 24.3 (C-3).

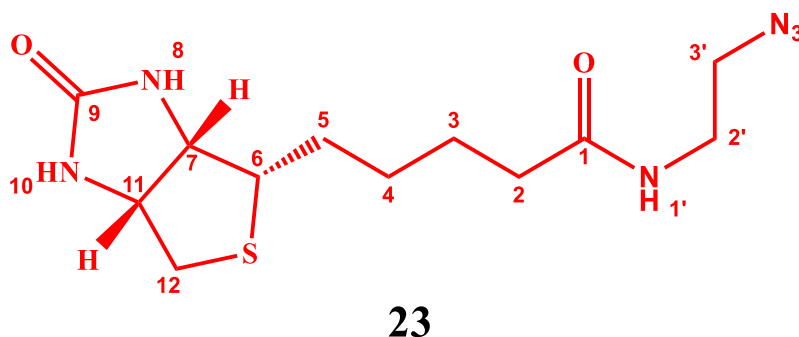
**Μάζα της ένωσης 21:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  υπολογίστηκε: 342.1079, βρέθηκε: 342.1121  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 364.0939  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



**Σύνθεση της ένωσης 22 (2-αζιδοαιθυλ-1-αμίνη):** Το υπό ανάδευση διάλυμα των 2-βρωμαιοιθυλαμίνης.HBr (500 mg, 2.44 mmol, 1 eq.) και NaN<sub>3</sub> (476 mg, 7.23 mmol, 3 eq.) σε 5 mL H<sub>2</sub>O αναδεύτηκε στους 85 °C για 12 ώρες<sup>154</sup>. Η TLC εμφανίστηκε σε διάλυμα νινυδρίνης και έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αρχικού βρωμιδίου και τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας. Εφόσον το μίγμα της αντίδρασης επήλθε σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη NaOH (98 mg, 2.44 mmol, 1 eq.) και ακολούθησε εκχύλιση του προϊόντος με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να ληφθεί η ένωση **22** (151.1 mg, 72%) ως ένα κιτρινωπό λάδι.

$R_f$ =0.15 (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1\text{H}$  NMR της ένωσης 22** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 3.35 (t,  $J$  = 11.30 Hz, 2 H, H-1), 2.86 (t,  $J$  = 11.35 Hz, 2 H, H-2), 1.52 (br, 2 H, -NH<sub>2</sub>).



**Σύνθεση της ένωσης 23:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **21** (20 mg, 0.058 mmol, 1 eq.) και της ένωσης **22** (10 mg, 0.117 mmol, 2 eq.) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αζώτου,

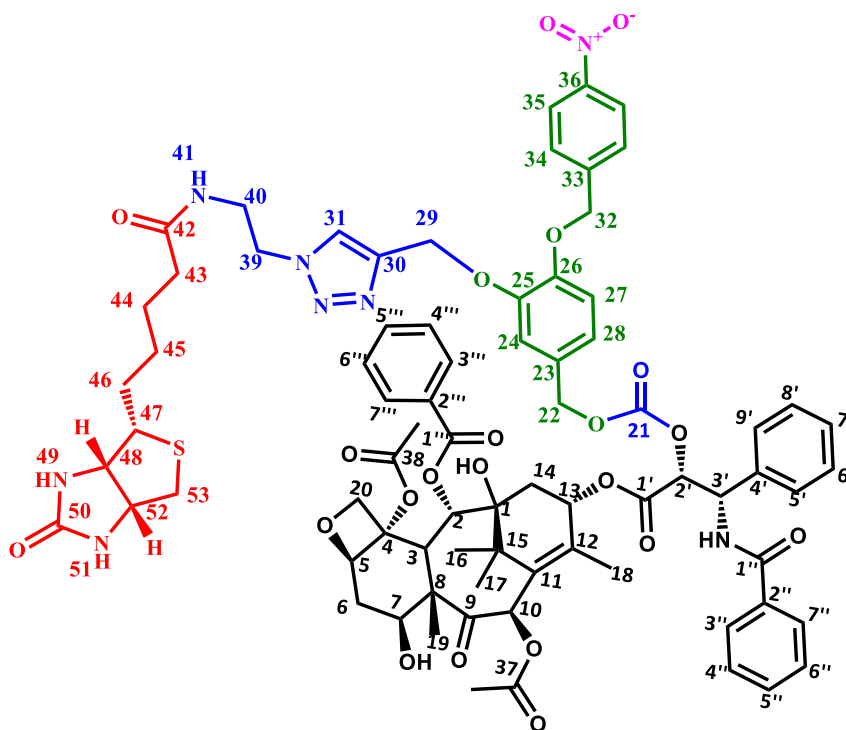
προστέθηκε η TEA (82  $\mu$ L, 0.58 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η TLC εμφανίστηκε σε διάλυμα νινυδρίνης και έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης **21**. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (98/2% έως 30/70% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA, στα 214 nm). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 11 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **23** (15.0 mg, 82.8%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.44$  (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 23** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 8.02 (t, 1 H,  $J$  = 3.95 Hz, 1'-NH), 6.40 (s, 1 H, 8-NH), 6.34 (s, 1 H, 10-NH), 4.29 (t,  $J$  = 7.16 Hz, 1 H, H-7), 4.12 (t,  $J$  = 5.93 Hz, 1 H, H-11), 3.25-3.20 (m, 3 H, H-2' + H-6), 3.08 (m, 1 H, H-12 $\alpha$ ), 2.81 (m, 1 H, H-12 $\beta$ ), 2.07 (t,  $J$  = 7.58 Hz, 2 H, H-2), 1.65-1.25 (m, 8 H, H-3' + H-5 + H-3 + H-4).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 23** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 172.88 (C-1), 163.16 (C-9), 61.49 (C-7), 59.66 (C-11), 55.87 (C-6), 50.46 (C-3'), 40.67 (C-2'), 38.61 (C-12), 35.60 (C-2), 28.65 (C-4), 28.51 (C-3), 25.61 (C-5).

**Μάζα της ένωσης 23:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S υπολογίστηκε: 313.1402, βρέθηκε: 335.1262  $[M+Na]^+$ , 647.2630  $[2M+Na]^+$ .



## 24

**Σύνθεση της ένωσης 24:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **23** (3.92 mg, 0.0125 mmol, 1 eq.), της ένωσης **20** (15 mg, 0.0125 mmol, 1 eq.) και του καταλύτη CuI (1.5 mg, 0.0062 mmol,

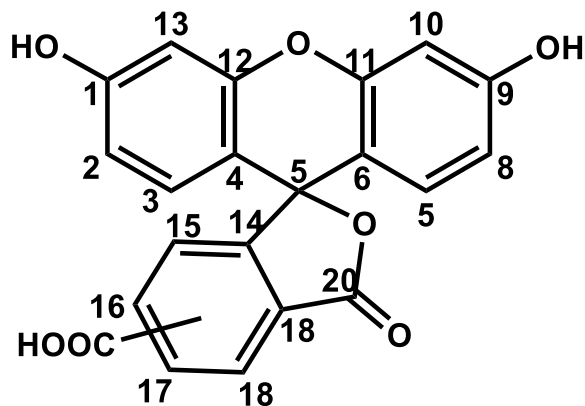
0.5 eq.) σε 2 mL μίγματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης (1:2), προστέθηκε η TEA (9  $\mu$ L, 0.062 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών ενώσεων. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (80/20% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **24** (10.2 mg, 54.2%) ως λευκό στερεό.

R<sub>f</sub>=0.33 (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 24** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 9.29 (d, J = 8.39 Hz, 1 H, -NH), 8.26 (d, J = 8.75 Hz, 2 H, H-35), 8.19 (s, 1 H, H-41), 8.00-7.98 (m, 3 H, H-3''' + H-7''' + H-31), 7.85 (d, J = 8.50 Hz, 2 H, H-3'' + H-7''), 7.74-7.70 (m, 1 H, H-5'''), 7.71-7.65 (m, 4 H, H-34 + H-4''' + H-6'''), 7.59-7.54 (m, 1 H, H-5''), 7.51-7.45 (m, 6 H, H-4'' + H-6'' + H-5' + H-6' + H-8' + H-9'), 7.26 (s, 1 H, H-24), 7.23-7.19 (m, 1 H, H-7'), 7.01 (d, J = 8.30 Hz, H-27), 6.96-6.92 (m, 1 H, H-28), 6.51 (s, 1 H, H-10), 6.41 (bs, 1 H, H-49), 6.32 (s, 1 H, H-51), 5.84 (t, J = 9.11 Hz, 1 H, H-13), 5.60 (t, J = 8.62 Hz, 1 H, H-3'), 5.43 (d, J = 7.22 Hz, H-2), 5.38 (d, J = 8.80 Hz, 1 H, H-7), 5.19-5.11 (m, 6 H, H-32 + H-1 + H-22 + H-29), 4.92 (d, J = 10.45 Hz, 1 H, H-2'), 4.66 (bs, 1 H, OH-1), 4.44 (t, J = 6.05 Hz, 2 H, H-48 + H-52), 4.31-4.27 (m, 1 H, H-5), 4.15-4.10 (m, 2 H, H-6), 4.05-4.01 (m, 2 H, H-20), 3.09-3.05 (m, 1 H, H-53a), 2.80 (dd, J<sub>1</sub> = 12.45 Hz, J<sub>2</sub> = 5.06 Hz, 1 H, H-53b), 2.35-2.29 (m, 1 H, H-6 $\alpha$ ), 2.28 (s, 3 H, OAc-4), 2.17-2.13 (m, 1 H, H-14 $\alpha$ ), 2.12 (s, 3 H, OAc-10), 2.03 (t, J = 7.40 Hz, 2 H, H-43), 1.86-1.84 (m, 1 H, H-14b), 1.83 (s, 3 H, H-18), 1.63-1.40 (m, 6 H, H-44 + H-46 + H-40), 1.52 (s, 3 H, H-19), 1.31-1.25 (m, 4 H, H-45 + H-39), 1.05 (s, 3 H, H-16), 1.01 (s, 3 H, H-17).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 24** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): 202.81, 173.04, 170.14, 169.53, 169.30, 166.85, 166.73, 165.71, 163.18, 158.89, 158.52, 154.29, 148.45, 148.34, 147.43, 145.52, 142.89, 139.66, 137.43, 134.48, 133.97, 133.59, 132.05, 130.04, 129.56, 129.24, 129.16, 128.99, 128.81, 128.75, 128.69, 128.52, 128.04, 127.93, 127.87, 125.26, 124.05, 122.45, 117.36, 115.55, 114.77, 114.47, 84.08, 80.74, 77.62, 77.16, 75.74, 75.19, 74.96, 71.65, 70.90, 70.28, 69.36, 62.59, 61.45, 59.67, 57.89, 55.82, 54.41, 49.32, 46.56, 43.41, 36.99, 35.51, 34.84, 28.56, 28.44, 26.77, 25.57, 23.01, 21.81, 21.14, 14.39, 10.23.

**Μάζα της ένωσης 24:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>77</sub>H<sub>84</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub>S υπολογίστηκε: 1505.5454 και βρέθηκε: 1505.5531 [M+H]<sup>+</sup>.



## 25

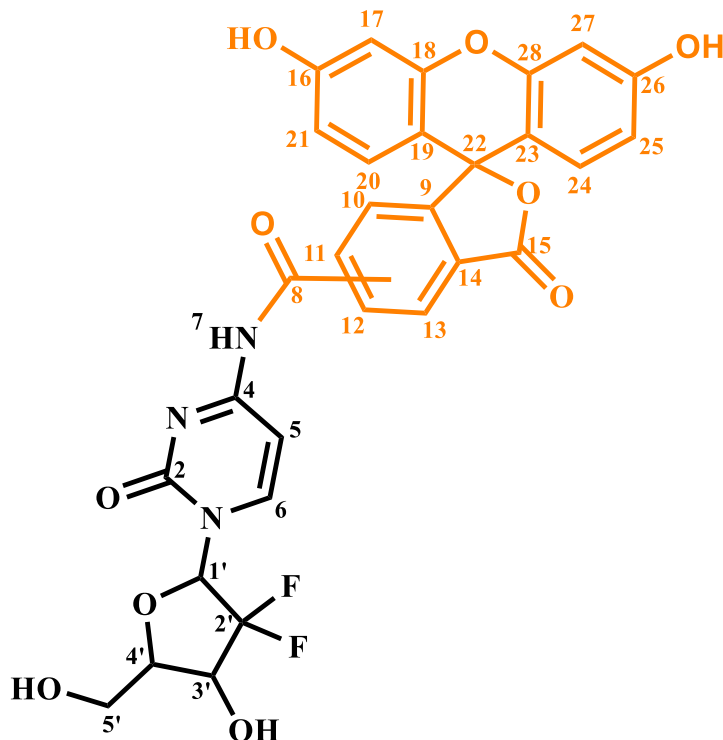
**Σύνθεση της ένωσης 25 (5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη):** Στο υπό ανάδευση διάλυμα του 1,3-διυδροξυβενζολίου (28.6 g, 0.26 mol, 2 eq.) σε 100 mL μεθανοσουλφονικό οξύ (1 M) προστέθηκε ο 1,2,4-βενζολοτρικαρβοξυλικός ανυδρίτης (25.0 g, 0.13 mol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 85 °C για 24 ώρες. Μετά τη ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιήθηκε η απόχυσή του σε παγόνερο και σχηματίστηκε ένα πορτοκαλί-κίτρινο ίζημα το οποίο συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση και ξηράνθηκε. Αυτό το στερεό υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε από μεθανόλη/εξάνιο για να δώσει το ενδιάμεσο προϊόν το οποίο διαλύθηκε σε 4 M NaOH και ακολούθησε η στάγδην προσθήκη πυκνού HCl (aq.) σε διάλυμα του ενδιάμεσου προϊόντος σε για να ληφθεί η τελική ένωση **25** ως πορτοκαλί στερεό σε σχεδόν ποσοτική απόδοση.

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 25** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 13.61 (s, 2 H, -COOH), 10.19 (s, 4 H, -OH 5/6-ισομερές), 8.42 (s, 1 H, H-15 5-ισομερές), 8.33 (dd, J<sub>1</sub> = 8.05 Hz, J<sub>2</sub> = 1.52 Hz, 1 H, H-8 5-ισομερές), 8.26 (dd, J<sub>1</sub> = 8.04 Hz, J<sub>2</sub> = 1.29 Hz, 1 H, H-8 6-ισομερές), 8.14 (d, J = 7.63 Hz, 1 H, H-3 6-ισομερές), 7.68 (s, 1 H, H-15 6-ισομερές), 7.43 (d, J = 8.00 Hz, 1 H, H-3 5-ισομερές), 6.72 (d, J = 1.83 Hz, 4 H, H-5 + H-10 5/6-ισομερές), 6.67-6.55 (m, 8 H, H-2 + H-17 + H-18 + H-13 5/6-ισομερές).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 25** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ 172.9, 167.85, 167.80, 165.9, 159.6, 151.87, 151.80, 137.3, 136.1, 132.45, 131.2, 129.3, 129.1, 126.7, 125.4, 125.2, 124.6, 124.4, 112.7, 109.0, 108.9, 102.3, 82.9.

**Μάζα της ένωσης 25:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub> υπολογίστηκε: 377.05 και βρέθηκε: 377.00 [M+H]<sup>+</sup>.





## 26 (Theranostic 1)

**Σύνθεση της ένωσης 26 (Θεραγωγαστικό 1):** Το διάλυμα της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης (10 mg, 0.027 mmol, 3 eq.), του PyBOP (14 mg, 0.027 mmol, 3 eq.) και του DMAP (8 mg, 0.045 mmol, 5 eq.) σε άνυδρο DMF (0.6 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά από 20 λεπτά, διάλυμα της γεμισιταβίνης (2.4 mg, 0.0091 mmol, 1 eq.) σε άνυδρο DMF (0.4 mL) προστέθηκε στάγδην και το προκύπτον μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε τον σχηματισμό νέων κηλίδων κίτρινου χρώματος. Ο διαλύτης εξατμίστηκε με απόσταξη υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC (90/10% έως 10/90% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA / MeCN+0.1%TFA, στα 214 nm) και η κορυφή που συλλέχθηκε στα 15 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **26** (2 mg, 35.3%) ως πορτοκαλί στερεό.

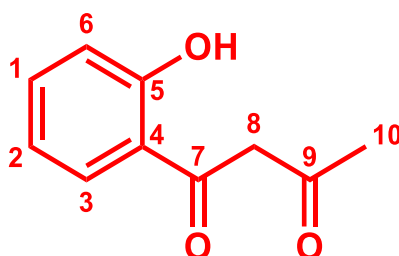
$R_f=0.15$  (20% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 26** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 10.19 (s, 16-OH + 26-OH, 5/6-ισομερές), 9.23 (t,  $J$  = 10.86 Hz, 7-NH, 5/6-ισομερές), 8.60 (s, H-13, 5-ισομερές), 8.46 (s, H-13, 6-ισομερές), 8.44-8.27 (m, H-12, 5/6-ισομερές), 8.21 (d,  $J$  = 8.02 Hz, H-11, 5-ισομερές), 8.17 (d,  $J$  = 8.05 Hz, H-11, 6-ισομερές), 8.04 (d,  $J$  = 7.72 Hz, H-24, 6-ισομερές), 7.96 (d,  $J$  = 7.88 Hz, H-24, 5-ισομερές), 7.92 (d,  $J$  = 7.84 Hz, H-6, 5-ισομερές), 7.83 (s, H-10, 5-ισομερές), 7.80 (d,  $J$  = 7.79 Hz, H-6, 6-ισομερές), 7.70 (s, H-10, 6-ισομερές), 7.50 (d,  $J$  = 8.05 Hz, H-20, 5-ισομερές), 7.45 (d,  $J$  = 8.05 Hz, H-20, 6-ισομερές), 6.70 (m, H-17 + H-27, 5/6-ισομερές), 6.67-6.54 (m, H-21 + H-25, 5/6-ισομερές), 6.42 (t,  $J$  = 8.90 Hz, H-1', 5-ισομερές), 6.32 (t,  $J$  = 8.72 Hz, 5'-OH, 5-ισομερές), 6.22 (t,  $J$  = 8.72 Hz, 5'-OH, 6-ισομερές), 6.16-6.07 (m, H-5 5-ισομερές, H-1' 6-

ισομερές, OH-5' 5/6-ισομερές), 5.96 (d, J = 7.86 Hz, H-5, 6-ισομερές), 5.70-5.62 (m, H-3', 5-ισομερές), 5.57-5.50 (m, H-3', 6-ισομερές), 4.70-4.20 (m, H-5'a + H-5'b + H-4', 5/6-ισομερές).

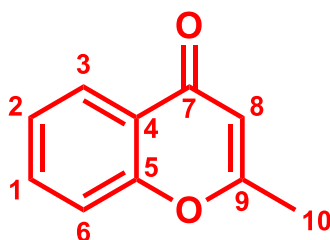
<sup>13</sup>C NMR της ένωσης **26** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 168.35, 168.01, 163.92, 161.23, 160.20, 153.01, 152.37, 152.27, 149.42, 143.96, 136.89, 136.05, 134.85, 131.91, 131.25, 130.48, 129.79, 129.70, 127.57, 126.77, 126.17, 125.55, 125.33, 121.87, 115.01, 113.20, 109.28, 109.13, 102.79, 95.52, 84.61, 79.78, 79.48, 59.76 ppm.

**Μάζα της ένωσης 26:** MS (ESI+) *m/z* για C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: υπολογίστηκε: 622.1176, βρέθηκε: 622.1253 [M+H]<sup>+</sup> και 311.5668 [M+2H]<sup>2+</sup>.



**27**

**Σύνθεση της ένωσης 27:** 2-υδροξυακετοφαινόνη (0.5 g, 3.7 mmol) και μεταλλικό νάτριο (0.6 g, 26.1 mmol) προστέθηκαν σε μια σφαιρική που περιείχε 10 mL άνυδρο οξικό αιθυλεστέρα <sup>141</sup>. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης και τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας. Έπειτα, το μίγμα αποχύθηκε σε 50 mL παγωμένου νερού και το pH ρυθμίστηκε στο 7 με αραιό διάλυμα HCl. Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να δώσει την ένωση **27** η οποία χρησιμοποιήθηκε στην επόμενη αντίδραση δίχως περαιτέρω καθαρισμό. R<sub>f</sub>=0.44 (30% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

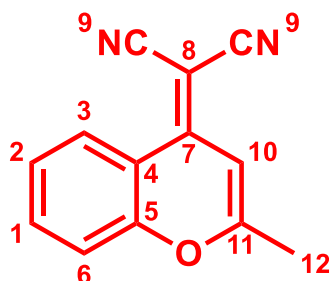


**28**

**Σύνθεση της ένωσης 28:** Η ένωση **27** διαλύθηκε σε 20 mL μεθανόλης και προστέθηκαν 5 σταγόνες π. HCl <sup>141</sup>. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Έπειτα, η μεθανόλη της αντίδρασης

εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο και εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και εξατμίστηκε. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 20% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **28** (0.3 g, 50%) ως κίτρινο στερεό.

R<sub>f</sub>=0.39 (30% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

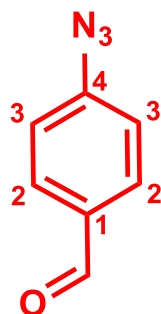


## 29

**Σύνθεση της ένωσης 29:** Η ένωση **28** (0.4 g, 2.5 mmol) και μαλονονιτρίλιο (0.22 g, 3 mmol) προστέθηκαν σε 25 mL άνυδρου οξικού ανυδρίτη με συνεχή ανάδευση <sup>141</sup>. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε reflux υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης και μιας νέας κηλίδας κίτρινου χρώματος. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό, προστέθηκε νερό (50 mL) στο υπόλειμμα και το νέο μίγμα αναδεύτηκε σε reflux για 3 λεπτά. Έπειτα, το προϊόν εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και εξατμίστηκε. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 100% διχλωρομεθάνιο. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **29** (0.16 g, 30%) ως πορτοκαλί στερεό.

R<sub>f</sub>=0.77 (100% διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 29** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 8.91 (d, J = 8.60 Hz, 1 H, H-6), 7.70 (t, J = 7.71 Hz, 1 H, H-1), 7.42 (t, J = 7.12 Hz, 2 H, H-2 + H-3), 6.70 (s, 1 H, H-10), 2.44 (s, 3 H, H-12).

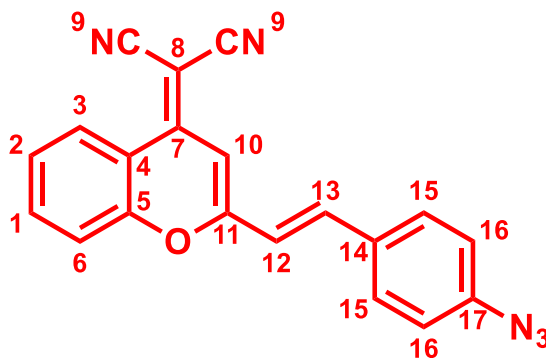


**30**

Σύνθεση της ένωσης **30** (4-αζιδοβενζαλδεΰδη): Μίγμα του (4-φορμυλφαινυλ)βορονικού οξέος (500 mg, 3.39 mmol, 1 eq.), NaN<sub>3</sub> (468 mg, 7.2 mmol, 2.1 eq.) και CuAc (72 mg, 0.36 mmol, 0.1 eq.) σε 10 mL μεθανόλης αναδεύτηκαν σε reflux για 6 ώρες <sup>155</sup>. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αρχικού βορονικού οξέος. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 2% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **30** (0.3 g, 60.2%) ως υποκίτρινο λάδι.

R<sub>f</sub>=0.66 (10% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο)

<sup>1</sup>H NMR της ένωσης **30** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 10.01 (s, J = 8.61 Hz, 1 H, -CHO), 7.92 (dt, J<sub>1</sub> = 8.30 Hz, J<sub>2</sub> = 2.00 Hz, 2 H, H-2), 7.61 (dt, J<sub>1</sub> = 8.24 Hz, J<sub>2</sub> = 2.0 Hz, 2 H, H-3).



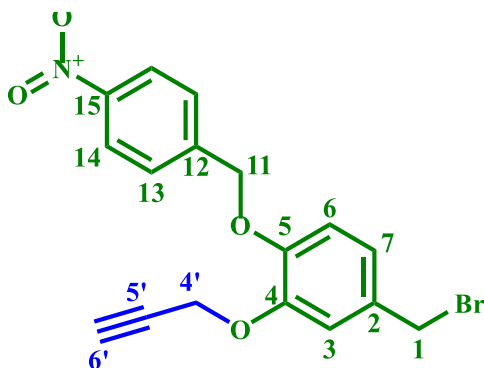
**31 (DCM-N<sub>3</sub>)**

Σύνθεση της ένωσης **31** (DCM-N<sub>3</sub>): Στο διάλυμα της ένωσης **30** (10 mg, 0.067 mmol, 1eq) και της ένωσης **29** (14.15 mg, 0.067 mmol, 1 eq.) σε 3 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκε 1 σταγόνα πιπεριδίνης και το προκύπτον μίγμα αναδεύτηκε σε reflux υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 6 ώρες <sup>156</sup>. Η TLC έδειξε τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας κίτρινου χρώματος. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε σε 100% διχλωρομεθάνιο. Ο

διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **31** (10.0 mg, 44.2%) ως κίτρινο στερεό.

$R_f=0.80$  (100% διχλωρομεθάνιο)

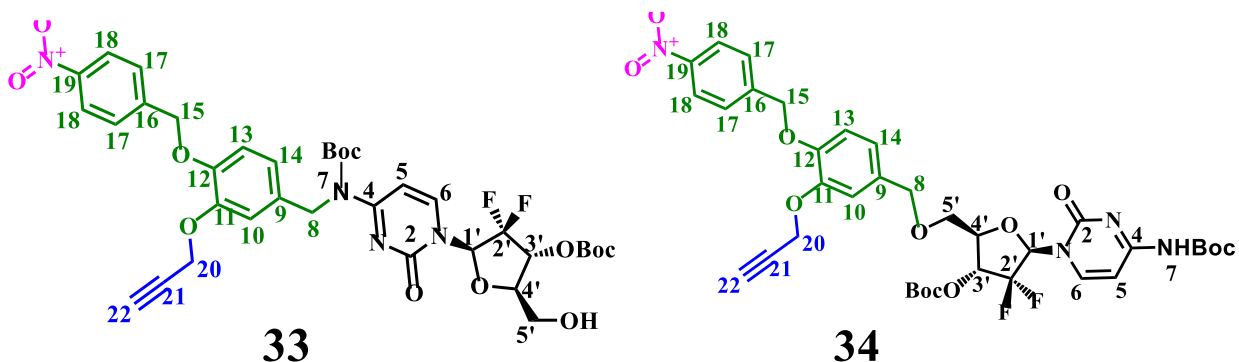
$^1\text{H NMR}$  της ένωσης **31** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 8.74 (d,  $J$  = 8.26 Hz, 1 H, H-6), 7.94 (t,  $J_1$  = 8.86 Hz, 1 H, H-1), 7.83-7.79 (m, 3 H, H-3 + H-15), 7.76 (d,  $J$  = 15.96 Hz, 1 H, H-12), 7.63 (t,  $J$  = 7.76 Hz, 1 H, H-2), 7.51 (d,  $J$  = 16.00 Hz, 1 H, H-13), 7.23 (d,  $J$  = 8.42 Hz, 2 H, H-16), 7.05 (s, 1 H, H-10).



**32**

**Σύνθεση της ένωσης 32:** Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, η ένωση **19** (200 mg, 0.63 mmol, 1 eq.) αντέδρασε με  $\text{PBr}_3$  (67  $\mu\text{L}$ , 0.70 mmol, 1.1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου για 2 ώρες. Ακολούθησε η προσθήκη νερού (5 mL) και η εκχύλιση του προϊόντος. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα για να δώσει την ένωση **32** ως πορτοκαλί στερεό (176 mg, 73.3%). Η ένωση **32** χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση χωρίς καθαρισμό ή χαρακτηρισμό, παρά μόνο βάσει TLC.

$R_f=0.86$  (100% διχλωρομεθάνιο)



**33**

**34**

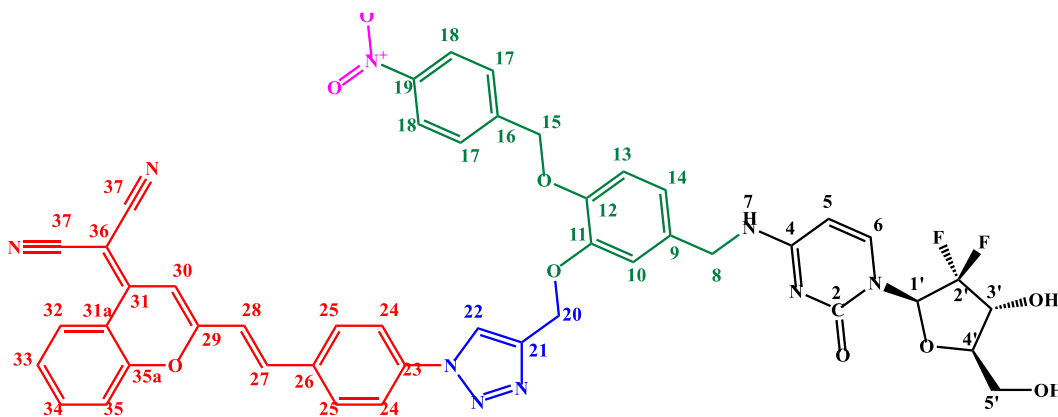
**Σύνθεση των ενώσεων 33 και 34:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **32** (6.0 mg, 0.015 mmol, 1.2 eq.) σε 1 mL άνυδρου ακετονιτριλίου, προστέθηκαν διαδοχικά Gem2 (6.2 mg, 0.13

mmol, 1 eq.) και  $K_2CO_3$  (18.4 mg, 0.13 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε τη σχεδόν πλήρη κατανάλωση της ένωσης **32** και τον σχηματισμό δυο νέων κηλίδων. Ακολούθησε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης για την απομάκρυνση του ανθρακικού καλίου, ο διαλύτης εξατμίστηκε και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100%  $H_2O+0.1\%TFA/MeCN+0.1\%TFA$ ). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **33** (5 mg, 41.9%) ως λευκό στερεό. Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 17.8 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **34** (3.5 mg, 29.0%) ως λευκό στερεό.

$R_f=0.50$  (ένωση **34**) και  $0.55$  (ένωση **33**) (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

$^1H$  NMR της ένωσης **33** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ , 25 °C):  $\delta = 8.26$  (d,  $J = 8.62$  Hz, 2 H, H-18), 8.10 (d,  $J = 7.80$  Hz, 1 H, H-6), 7.72 (d,  $J = 8.58$  Hz, 2 H, H-17), 7.16 (d,  $J = 7.80$  Hz, 1 H, H-5), 7.07 (s, 1 H, H-10), 7.01 (d,  $J = 8.35$  Hz, 1 H, H-13), 6.81 (d,  $J = 8.45$  Hz, 1 H, H-14), 6.30 (t,  $J = 8.52$  Hz, 1 H, H-1'), 5.36 (bs, 1 H, 5'-OH), 5.29-5.19 (m, 3 H, H-8 + H-3'), 5.12-5.01 (m, 2 H, H-15), 4.78 (d,  $J = 1.96$  Hz, 2 H, H-20), 4.28-4.25 (m, 1 H, H-5'a), 3.81-3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.71-3.67 (m, 1 H, H-5'b), 3.50 (t,  $J = 2.26$  Hz, 1 H, H-22), 1.47 (s, 9 H, H-7Boc), 1.41 (s, 9 H, 3'-OBoc).

$^1H$  NMR της ένωσης **34** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ , 25 °C):  $\delta = 8.27$  (d,  $J = 8.62$  Hz, 2 H, H-18), 7.72 (d,  $J = 8.58$  Hz, 2 H, H-17), 7.64 (d,  $J = 7.80$  Hz, 1 H, H-6), 7.20 (d,  $J = 1.59$  Hz, 1 H, H-10), 7.01 (d,  $J = 8.35$  Hz, 1 H, H-13), 6.84 (d,  $J = 8.29$  Hz, 1 H, H-14), 6.24 (t,  $J = 8.69$  Hz, 1 H, H-1'), 6.14 (d,  $J = 8.28$  Hz, 1 H, H-5), 5.28 (s, 2 H, H-8), 5.22-5.17 (m, 1 H, H-3'), 5.03 (d, 3.69, 2 H, H-15), 4.78 (d, 2 H, H-20), 4.24-4.21 (m, 1 H, H-5'a), 3.79-3.75 (m, 1 H, H-4'), 3.70-3.64 (m, 1 H, H-5'b), 3.51 (t,  $J = 2.26$  Hz, 1 H, H-22), 1.47 (s, 9 H, H-7Boc), 1.46 (s, 9 H, 3'-OBoc).



### 35 (Theranostic 2)

Σύνθεση της ένωσης **35** (Θεραγωγιστικό 2): Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **33** (50 mg, 0.065 mmol, 1 eq.), της  $DCM-N_3$  (22.2 mg, 0.065 mmol, 1 eq.) και  $CuI$  (6.27 mg, 0.032 mmol, 0.5 eq.) σε 10 mL μεθανόλης/διχλωρομεθανίου (1:2, v/v), προστέθηκε η τριαιθυλαμίνη (46  $\mu L$ ,

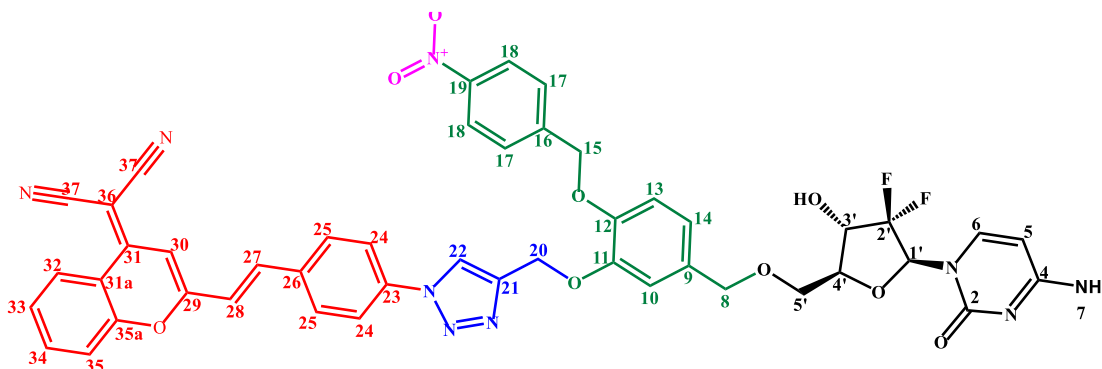
0.32 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες <sup>157</sup>. Η TLC έδειξε τη σχεδόν πλήρη κατανάλωση των δυο αρχικών ενώσεων και τον σχηματισμό μιας νέας κίτρινης κηλίδας ( $R_f=0.35$ ). Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στο υπόλειμμα της αντίδρασης προστέθηκε διάλυμα αποκοπής των Boc- ομάδων (10 mL) αποτελούμενο από  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$  (4:1, v/v). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες έως ότου η TLC έδειξε τη πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε με χρήση υδραντλίας στον απαγωγό και το προκύπτον υπόλειμμα εκπλύθηκε διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο (2 φορές) και με αιθέρα (4 φορές). Το στερεό μετά τις εκπλύσεις ξηράνθηκε υπό υψηλό για να δώσει το **Θεραγωγιστικό 2** (20 mg, 34.4%) ως καφέ στερεό.

$R_f=0.10$  (10% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR του Θεραγωγιστικού 2** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C):  $\delta = 9.00$  (s, 1 H, H-22), 8.73 (d, 1 H,  $J = 8.26$  Hz, H-35), 8.38 (t,  $J = 8.81$  Hz, 1 H, H-7), 8.18 (d,  $J = 8.54$  Hz, 2 H, H-18), 8.04-7.92 (m, 5 H, H-25 + H-32 + H-33 + H-34), 7.84-7.78 (m, 2 H, H-27 + H-24), 7.72-7.75 (m, 5 H, H-6 + H-17 + H-28), 7.24 (d,  $J = 0.98$  Hz, 1 H, H-10), 7.07 (s, 1 H, H-30), 7.01 (d,  $J = 8.38$  Hz, 1 H, H-13), 6.86 (dd,  $J = 8.38$  Hz, 1 H, H-14), 6.24 (br, 1 H, 5'-OH), 6.13 (t,  $J = 8.52$  Hz, 1 H, H-1'), 5.88 (d,  $J = 7.56$  Hz, 1 H, H-5), 5.26 (s, 2 H, H-20 + H-15), 4.44 (d,  $J = 4.72$  Hz, 2 H, H-8), 4.18-4.09 (m, 1 H, H-3'), 3.83-3.73 (m, 2 H, H-4' + H-5'a), 3.61 (m, 1 H, H-5'b).

**<sup>13</sup>C NMR του Θεραγωγιστικού 2** (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C):  $\delta = 176.87$  (C-31), 163.50 (C-4), 158.18 (C-29), 154.96 (C-2), 153.41 (35a), 152.50 (C-34), 148.35 (C-11), 147.50 (C-12), 147.36 (C-19), 145.75 (C-16), 144.50 (C-21), 140.36 (C-6), 137.67 (C-23), 137.42 (C-26), 136.04 (C-2'), 135.70 (C-32), 132.49 (C-9), 130.05 (C-24), 128.50 (C-17), 126.73 (C-27), 125.15 (C-33), 123.96 (C-18), 123.30 (C-22), 121.33 (C-35), 121.26 (C-14), 120.83 (C-25), 119.57 (C-28), 117.55 (C-31a), 117.52 (C-35), 116.20 (C-37), 115.36 (C-10), 115.31 (C-13), 107.76 (C-30), 95.69 (C-5), 84.05 (C-1'), 80.94 (C-4'), 69.65 (C-15), 69.15 (C-3'), 62.58 (C-20), 61.30 (C-36), 59.44 (C-5'), 43.58 (C-8).

**Μάζα του Θεραγωγιστικού 2:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{46}\text{H}_{35}\text{F}_2\text{N}_9\text{O}_9$ : υπολογίστηκε: 896.2559, βρέθηκε: 896.2596  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



### 36 (Theranostic 3)

**Σύνθεση της ένωσης 36 (Θεραγωγιστικό 3):** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **34** (50 mg, 0.065 mmol, 1 eq.), της DCM-N3 (22.2 mg, 0.065 mmol, 1 eq.) και CuI (6.27 mg, 0.032 mmol,

0.5 eq.) σε 10 mL μεθανόλης/διχλωρομεθανίου (1:2, v/v), προστέθηκε η τριαιθυλαμίνη (46  $\mu$ L, 0.32 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες<sup>157</sup>. Η TLC έδειξε τη σχεδόν πλήρη κατανάλωση των δυο αρχικών ενώσεων και τον σχηματισμό μιας νέας κίτρινης κηλίδας ( $R_f=0.39$ ). Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στο υπόλειμμα της αντίδρασης προστέθηκε διάλυμα αποκοπής των Boc- ομάδων (10 mL) αποτελούμενο από  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$  (4:1, v/v). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες έως ότου η TLC έδειξε τη πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε με χρήση υδραντλίας στον απαγωγό και το προκύπτον υπόλειμμα εκπλύθηκε διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο (2 φορές) και με αιθέρα (4 φορές). Το στερεό μετά τις εκπλύσεις ξηράνθηκε υπό υψηλό για να δώσει το **Θεραγωγαστικό 3** (21 mg, 36.0%) ως καφέ στερεό.

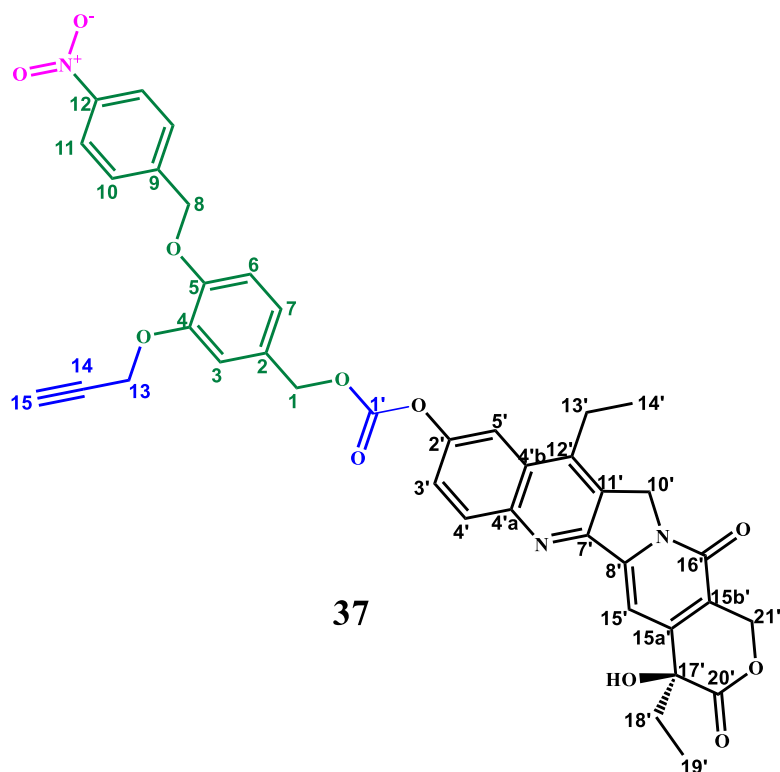
$R_f=0.10$  (10% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**$^1\text{H}$  NMR του Θεραγωγαστικού 3** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 10.27 (bs, 1 H, H-7), 9.56 (s, 1 H, H-7), 8.98 (s, 1 H, H-22), 8.76 (d,  $J$  = 8.20 Hz, 1 H, H-35), 8.25 (d,  $J$  = 7.96 Hz, 1 H, H-6), 8.20 (d,  $J$  = 8.48 Hz, 2 H, H- H-18), 8.06-7.93 (m, 5 H, H-22 + H-7 + H-25 + H-32 + H-28), 7.86-7.80 (m, 2 H, H-27 + H-24), 7.71-7.61 (m, 4 H, H-33 + H-34 + H-18), 7.26 (s, 1 H, H-10), 7.10 (s, 1 H, H-30), 7.03 (d,  $J$  = 8.33 Hz, 1 H, H-13), 6.84 (d,  $J$  = 8.68 Hz, 1 H, H-14), 6.34 (d,  $J$  = 7.82 Hz, 1 H, H-5), 6.15 (t,  $J$  = 8.52 Hz, 1 H, H-1'), 5.28 (s, 4 H, H- 20 + H-15), 5.17 (m, 2 H, H-8), 4.21 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 1 H, H-5'a), 3.83 (m, 2 H, H-4' + H-5'b).

**$^{13}\text{C}$  NMR του Θεραγωγαστικού 3** (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 176.0 (C-31), 159.17 (C-4), 158.16 (C-29), 153.43 (C-2), 152.50 (C-34), 148.33 (C-11), 148.06 (35a), 148.01 (C-12), 147.41 (C-19), 145.54 (C-16), 144.38 (C-21), 141.60 (C-6), 137.64 (C-23), 137.41 (C-26), 137.35 (C-9), 136.06 (C-2'), 135.76 (C-32), 130.07 (C-24), 128.52 (C-17), 126.87 (C-27), 125.16 (C-33), 124.00 (C-18), 123.33 (C-31a), 123.23 (C-14), 121.36 (C-35), 120.84 (C-25), 120.31 (C-28), 119.57 (C-22), 117.56 (C-31a), 117.52 (C-35), 116.20 (C-37), 115.16 (C-10), 114.65 (C-13), 107.77 (C-30), 96.07 (C-5), 82.18 (C-1'), 82.05 (C-4'), 69.50 (C-15), 68.56 (C-3'), 62.53 (C-20), 61.33 (C-36), 59.06 (C-5'), 46.22 (C-8).

**Μάζα του Θεραγωγαστικού 3:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{46}\text{H}_{35}\text{F}_2\text{N}_9\text{O}_9$ : υπολογίστηκε: 896.2559 βρέθηκε: 896.2594  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .





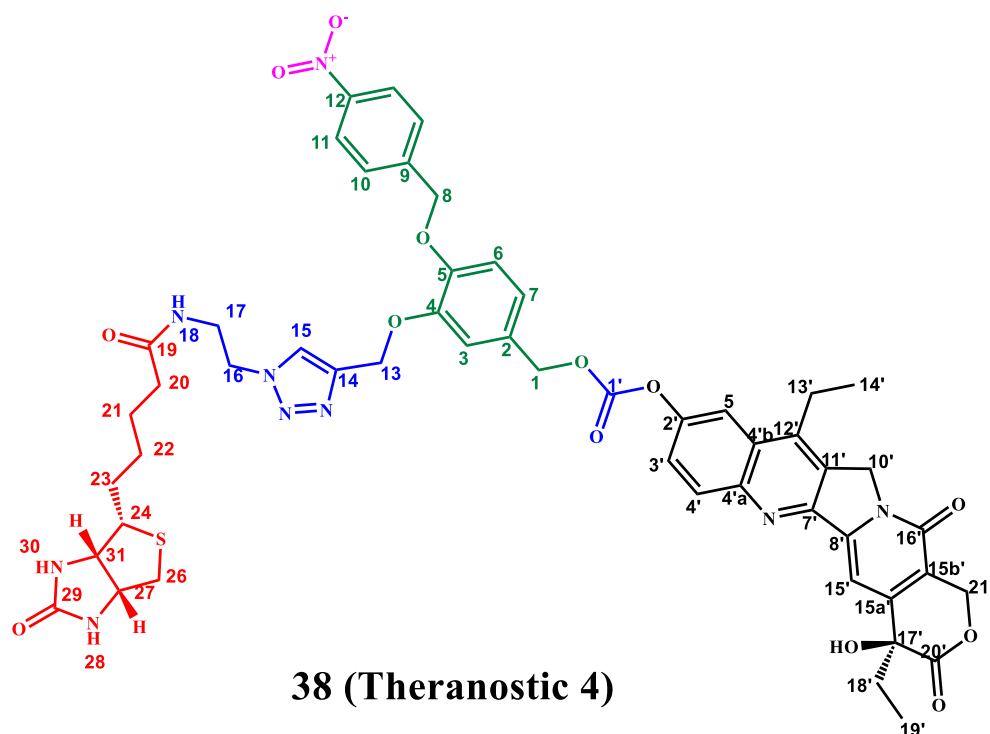
**Σύνθεση της ένωσης 36:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **19** (39.9 mg, 0.127 mmol, 1 eq.) σε 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκαν διαδοχικά BNPC (38.7 mg, 0.127 mmol, 1 eq.) και DMAP (12.7 mg, 0.152 mmol, 1.2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση της ένωσης **19** και τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου ( $R_f=0.66$ ). Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στο υπόλειμμα της αντίδρασης προστέθηκαν 5 mL άνυδρου DMF και έπειτα το φάρμακο SN-38 (50 mg, 0.127 mmol, 1 eq.). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για άλλες 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου και τον σχηματισμό μιας νέας κηλίδας που φθόριζε στα 366 nm. Ακολούθησε προσθήκη νερού (10 mL) και το προκύπτον ίζημα διηθήθηκε και εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα. Το ίζημα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και το αναμενόμενο προϊόν που συλλέχθηκε στο 12% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **37** (60.0 mg, 64.5%) ως κίτρινο στερεό.

$R_f=0.22$  (100% διχλωρομεθάνιο)

**$^1\text{H NMR}$  της ένωσης 37** (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 8.27 (d,  $J$  = 8.62 Hz, 2 H, H-11), 8.23 (d,  $J$  = 9.24 Hz, 1 H, H-7), 8.16 (d,  $J$  = 2.41 Hz, 1 H, H-4'), 7.78 (dd,  $J_1$  = 9.24 Hz,  $J_2$  = 2.35 Hz, H-6), 7.73 (d,  $J$  = 8.29 Hz, 2 H, H-10), 7.34 (s, 1 H, H-3), 7.24 (s, 1 H, H-15'), 7.10 (s, 2 H, H-3' + H-5'), 6.53 (s, 1 H, 17'-OH), 5.44 (s, 2 H, H-10'), 5.34 (s, 2 H, H-8), 5.32 (s, 2 H, H-1), 5.25 (s, 2 H, H-21'), 4.87 (s, 2 H, H-13), 3.60 (t,  $J$  = 2.20 Hz, 1 H, H-15), 3.25-3.16 (m, 2 H, H-13'), 1.93-1.82 (m, 2 H, H-18'), 1.29 (t,  $J$  = 7.55 Hz, 3 H, H-14'), 0.88 (t,  $J$  = 7.31 Hz, 3 H, H-19').

**$^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης 37** (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 172.93 (C-20'), 157.28 (C-16'), 153.32 (C-1'), 152.67 (C-2'), 150.49 (C-7'), 149.79 (C-15'a), 148.71 (C-8'), 147.52 (C-4), 147.32

(C-5), 147.06 (C-12), 146.30 (C-4'a), 146.03 (C-12'), 145.40 (C-9), 132.16 (C-2), 131.96 (C-4'), 129.17 (C-11'), 128.69 (C-4'b), 128.32 (C-15'b), 127.51 (C-10), 125.44 (C-7), 124.09 (C-6), 123.09 (C-11), 119.56 (C-3), 115.91 (C-3'), 114.57 (C-5'), 97.19 (C-15'), 79.70 (C-14), 78.97 (C-15), 72.84 (C-17'), 70.54 (C-8), 69.30 (C-1), 65.73 (C-13), 56.88 (C-21'), 50.03 (C-10'), 30.99 (C-18'), 22.72 (C-13'), 14.31 (C-14'), 8.22 (C-19').



**Σύνθεση της ένωσης 38 (Θεραγωγικό 4):** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **37** (10 mg, 0.013 mmol, 1 eq.), της ένωσης **23 (Βιοτίνη-N<sub>3</sub>)** (4.26 mg, 0.013 mmol, 1 eq.) και του καταλύτη CuI (1.3 mg, 0.006 mmol, 0.5 eq.) σε 1 mL μίγματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης (1:2), προστέθηκε η TEA (7 μL, 0.068 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες<sup>157</sup>. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών ενώσεων. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 10 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει το **Θεραγωγικό 4** (10.2 mg, 75.1%) ως καφέ στερεό.

R<sub>f</sub>=0.10 (30% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR του Θεραγωγικού 4** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 8.19 (d, J = 8.70 Hz, 2 H, H-11), 8.09 (s, 1 H, H-3), 8.03 (d, J = 9.84 Hz, 1 H, H-7), 7.39 (t, J = 5.64 Hz, 1 H, H-18), 7.54 (d, J = 7.54 Hz, 2 H, H-10), 7.38-7.35 (m, 2 H, H-4' + H-15'), 7.22 (s, 1 H, H-15), 6.92-6.89 (m, 3 H, H-3' + H-5' + H-6), 6.37 (s, 1 H, H-28), 6.33 (s, 1 H, H-30), 5.51 (s, 2 H, H-10'), 5.29 (d, J = 5.95 Hz, 2 H, H-21'), 5.12-5.01 (m, 6 H, H-8 + H-1 + H-13), 4.40 (t, J = 6.01 Hz, 2 H, H-31 + H-27),

4.27-4.24 (m, 1 H, OH-17'), 4.09-4.06 (m, 1 H, H-26α), 3.51-3.45 (m, 1 H, H-26β), 3.08-3.02 (m, 2 H, H-13'), 2.76 (dd,  $J_1 = 12.44$  Hz,  $J_2 = 5.08$  Hz, 1 H, H-24), 2.19-2.10 (m, 2 H, H-22), 2.01-1.98 (m, 2 H, H-18'), 1.55-1.52 (m, 2 H, H-16), 1.48-1.38 (m, 3 H, H-21 + H-17), 1.27-1.21 (m, 7 H, H-14' + H-20 + H-23), 0.90 (t,  $J = 7.42$  Hz, 3 H, H-19').

$^{13}\text{C}$  NMR του Θεραγωγαστικού 4 (125 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta = 173.03$  (C-20'), 167.71 (C-19), 163.17 (C-29), 157.32 (C-16'), 157.00 (C-1'), 153.35 (C-2'), 148.92 (C-7'), 148.32 (C-15'a), 147.65 (C-8'), 147.38 (C-4), 145.40 (C-5), 145.34 (C-12), 144.08 (C-4'a), 143.37 (C-12'), 142.88 (C-9), 132.02 (C-2), 128.76 (C-4'), 128.68 (C-11'), 128.49 (C-4'b), 128.39 (C-15'b), 125.13 (C-10), 123.97 (C-7), 122.96 (C-25), 121.91 (C-6), 118.59 (C-11), 115.14 (C-3), 114.78 (C-3'), 105.26 (C-5'), 93.82 (C-15'), 78.34 (C-15), 70.18 (C-8), 69.26 (C-1), 66.92 (C-13), 62.59 (C-21'), 61.44 (C-31), 59.65 (C-27), 55.81 (C-24), 50.04 (C-17), 49.31 (C-16), 35.49 (C-26), 30.76 (C-20), 28.54 (C-22), 28.44 (C-21), 25.56 (C-23), 22.75 (C-13'), 13.79 (C-14'), 7.99 (C-19').

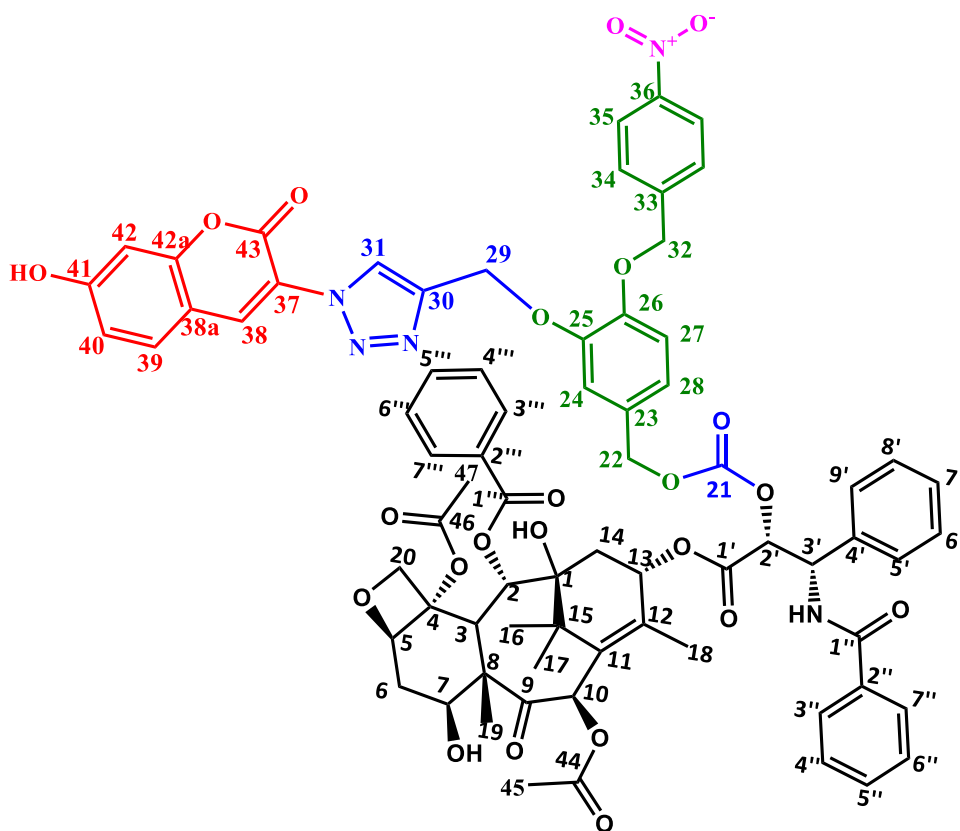
**Μάζα του Θεραγωγαστικού 4:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για  $\text{C}_{52}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{S}$ : υπολογίστηκε: 1044.3517, βρέθηκε: 515.3792  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , 347.1924  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,



### 39 (Coumarin- $\text{N}_3$ )

**Σύνθεση της ένωσης 39 (Κουμαρίνη- $\text{N}_3$ ):** Μίγμα 2,4-διυδροξυβενζαλδεϋδης (2.76 g, 20 mmol, 1 eq.), N-ακετυλογλυκίνης (2.34 g, 20 mmol, 1 eq.) και άνυδρου NaOAc (60 mmol, 3 eq.) σε οξικό ανυδρίτη (100 mL) αναδεύτηκε σε reflux για 4 ώρες <sup>147</sup>. Το μίγμα της αντίδρασης αποχύθηκε σε παγόνερο για να δώσει ένα κίτρινο ίζημα, το οποίο διηθήθηκε και εκπλύθηκε με παγωμένο νερό. Έπειτα, το στερεό διαλύθηκε σε 30 mL π. HCl και αιθανόλη (2:1, v/v) και αναδεύτηκε σε reflux για 1 ώρα. Προστέθηκε παγόνερο (40 mL) και στο προκύπτον διάλυμα προστέθηκε  $\text{NaNO}_2$  (40 mmol, 2 eq.) στους 0 °C και μετά από 10 λεπτά προστέθηκε σταδιακά  $\text{NaN}_3$  (60 mmol, 3 eq.). Το ίζημα που σχηματίστηκε διηθήθηκε, εκπλύθηκε πολλές φορές με νερό και ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση 39 (1 g) ως καφέ στερεό.

$^1\text{H}$  NMR της ένωσης 39 (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta = 10.53$  (s, 1 H, 4-OH), 7.61 (s, 1 H, H-1), 7.49 (d,  $J = 8.50$  Hz, 1 H, H-2), 6.82 (dd,  $J = 8.42$  Hz, 1 H, H-3), 6.77 (d,  $J = 2.21$  Hz, 1 H, H-5).



## 40 (Theranostic 5)

**Σύνθεση της ένωσης 40 (Θεραγωγαστικό 5):** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **20** (20 mg, 0.016 mmol, 1 eq.), της ένωσης **39** (Κουμαρίνη-N<sub>3</sub>) (3.4 mg, 0.016 mmol, 1 eq.) και του καταλύτη CuI (1.6 mg, 0.008 mmol, 0.5 eq.) σε 3 mL μίγματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης (1:2), προστέθηκε η TEA (7  $\mu$ L, 0.05 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες <sup>157</sup>. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών ενώσεων. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 16.5 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει το **Θεραγωγαστικό 5** (15.0 mg, 67.2%) ως κίτρινο στερεό.

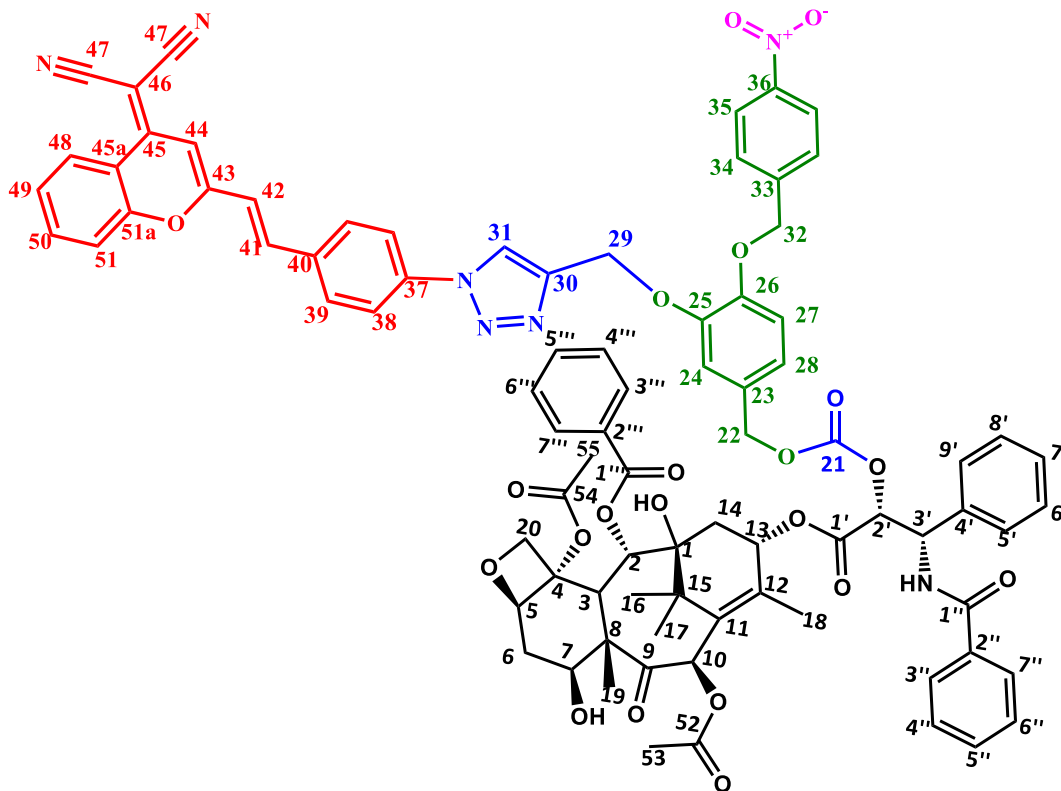
R<sub>f</sub>=0.43 (10% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR του Θεραγωγαστικού 5** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 10.96 (s, 1 H, 41-OH), 9.27 (d, J = 8.39 Hz, 1 H, -NH), 8.66 (s, 1 H, H-38), 8.60 (s, 1 H, H-31), 8.21 (d, J = 8.63 Hz, 2 H, H-40), 7.92 (d, J = 7.45 Hz, 2 H, H-3''' + H-7'''), 7.82 (d, J = 7.28 Hz, 2 H, H-3'' + H-7''), 7.75 (d, J = 8.71 Hz, 1 H, H-5'''), 7.71 (d, J = 7.40 Hz, 1 H, H-39), 7.69-7.62 (m, 4 H, H-4''' + H-6'''), 7.53 (t, J = 7.40 Hz, 1 H, H-5''), 7.48-7.42 (m, 6 H, H-4'' + H-6'' + H-5' + H-6' + H-8' + H-9'), 7.28 (s, 1 H, H-24), 7.20-7.16 (m, 1 H, H-7'), 7.01 (d, J = 8.36 Hz, 1 H, H-27), 6.92 (m, 2 H, H-28 + H-42), 6.86 (d, J = 1.67 Hz, 1 H, H-40), 6.29 (s, 1 H, H-10), 5.82 (t, J = 9.41 Hz, H-13), 5.74 (s, 1 H, H-3'), 5.52 (t, J = 8.57 Hz, 1 H, H-2), 5.41 (d, J = 7.18 Hz, 1 H, 7-OH), 5.36 (d, J = 8.80 Hz, 1 H, H-6), 5.27 (s, 2 H, H-32), 5.24 (s, 2 H, H-22), 5.14 (q, J = 11.57 Hz, 2 H, H-29), 4.90 (d,

$J = 9.50$  Hz, 1 H, H-2'), 4.63 (bs, 1 H, 1-OH), 4.13-4.08 (m, 1 H, H-5), 4.04-3.97 (m, 2 H, H-7), 3.58 (d,  $J = 6.66$  Hz, 2 H, H-20), 2.27-2.25 (m, 1 H, H-6a), 2.25 (s, 3 H, H-47), 2.12-2.06 (m, 2 H, H-14a), 2.09 (s, 3 H, H-45), 1.85-1.77 (m, 1 H, H-14b), 1.80 (s, 3 H, H-18), 1.63 (t,  $J = 13.30$  Hz, 1 H, H-6b), 1.54-1.46 (m, 1 H, H-3), 1.49 (s, 3 H, H-19), 1.02 (s, 3 H, H-16), 0.98 (s, 3 H, H-17).

$^{13}\text{C}$  NMR του Θεραγωγαστικού **5** (125 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta = 203.81$  (C-9), 170.74 (C-38), 169.95 (C-37), 169.63 (C-1'), 169.30 (C-1''), 166.90 (C-1'''), 165.91 (C-43), 163.08 (C-41), 156.3 (C-42a), 155.1 (C-21), 153.00 (C-25), 151.62 (C-26), 148.51 (C-36), 147.55 (C-33), 145.81 (C-30), 143.55 (C-12), 139.60 (C-4'), 136.92 (C-2''), 134.86 (C-11), 133.18 (C-5'''), 132.21 (C-2'''), 131.46 (C-23), 130.24 (C-5''), 130.10 (C-39), 129.54 (C-7'''), 129.22 (C-3'''), 128.88 (C-4'''), 128.80 (C-6'''), 128.33 (C-34), 128.00 (C-6'), 127.86 (C-8'), 126.36 (C-4''), 125.82 (C-6''), 124.59 (C-9'), 114.50 (C-7'), 123.99 (C-3''), 123.98 (C-5'), 123.55 (C-35), 123.44 (C-7''), 116.50 (C-31), 116.22 (C-37), 115.28 (C-28), 114.41 (C-38), 113.76 (C-24), 107.22 (C-27), 102.76 (C-38a), 102.55 (C-40), 102.33 (C-42), 84.28 (C-2'), 77.66 (C-5), 75.60 (C-4), 75.10 (C-1), 74.82 (C-7), 71.51 (C-20), 70.90 (C-2), 70.33 (C-10), 69.51 (C-13), 66.98 (C-29), 62.67 (C-22), 62.40 (C-32), 57.71 (C-8), 54.42 (C-3'), 46.75 (C-3), 43.51 (C-15), 29.50 (C-14), 27.1 (C-6), 24.16 (C-17), 23.22 (C-16), 22.00 (C-47), 21.44 (C-45), 14.49 (C-18), 10.53 (C-19).

**Μάζα του Θεραγωγαστικού 5:** MS (ESI+)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  για  $\text{C}_{74}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{23}$ : υπολογίστηκε: 1396.4417  $[M+H]^+$ , βρέθηκε: 1396.4480  $[M+H]^+$ .



## 41 (Theranostic 6)

Σύνθεση της ένωσης **41** (Θεραγωγαστικό **6**): Στο υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **20** (5.00 mg, 0.004 mmol, 1 eq.), της ένωσης **31** (DCM- $\text{N}_3$ ) (1.41 mg, 0.004 mmol, 1 eq.) και του καταλύτη

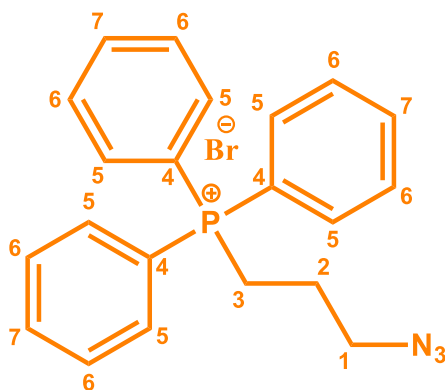
CuI (0.40 mg, 0.002 mmol, 0.5 eq.) σε 1 mL μίγματος διχλωρομεθανίου/μεθανόλης (1:2), προστέθηκε η TEA (3 μL, 0.02 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά για 12 ώρες<sup>157</sup>. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση των αρχικών ενώσεων. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με παρασκευαστική RP-HPLC (70/30% έως 0/100% H<sub>2</sub>O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC στα 19 λεπτά λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει το **Θεραγωγαστικό 6** (5.1 mg, 81.3%) ως κίτρινο στερεό.

R<sub>f</sub>=0.22 (5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR του Θεραγωγαστικού 6** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 9.26 (d, J = 8.77 Hz, 1 H, -NH), 8.97 (s, 1 H, H-50), 8.74 (d, J = 8.35 Hz, 1 H, H-51), 8.66 (d, J = 4.41 Hz, 12 H, H-39 + H-31 + H-3'''' + H-7'''' + H-42 + H-49 + H-48 + H-35), 8.18 (d, J = 8.60 Hz, 2 H, H-38), 8.04-7.92 (m, 5 H, H-3'''' + H-7'''' + H-42 + H-49 + H-48), 7.85-7.80 (m, 3 H, H-3'' + H-7'' + H-5'''), 7.66-7.61 (m, 4 H, H-4'''' + H-6'''' + H-41), 7.57 (t, J = 6.10 Hz, 1 H, H-5''), 7.51 (d, J = 7.53 Hz, 1 H, H-4''), 7.47-7.40 (m, 7 H, H-6'' + H-5' + H-6' + H-8' + H-9' + H-34), 7.28 (s, 1 H, H-24), 7.17 (s, 1 H, H-7'), 7.08 (s, 1 H, H-44), 7.01 (d, J = 8.62 Hz, 1 H, H-27), 6.93 (d, J = 8.03 Hz, 1 H, H-28), 6.28 (s, 1 H, H-10), 5.80 (t, J = 8.50 Hz, 1 H, H-13), 5.52 (t, J = 9.13 Hz, 1 H, H-2), 5.39 (d, J = 7.17 Hz, 1 H, 7-OH), 5.35 (d, J = 8.65 Hz, 1 H, H-6), 5.26 (s, 2 H, H-32), 5.23 (s, 2 H, H-22), 5.21-5.08 (m, 2 H, H-29), 4.89 (d, J = 9.43 Hz, 2 H, H-2' + H-3'), 4.62 (bs, 1 H, 1-OH), 4.12-4.07 (m, 1 H, H-5), 4.02-3.97 (m, 1 H, H-7), 3.57 (d, J = 6.68 Hz, 2 H, H-20), 2.27-2.25 (m, 1 H, H-6a), 2.24 (s, 3 H, H-55), 2.12-2.06 (m, 2 H, H-14a), 2.09 (s, 3 H, H-53), 1.85-1.77 (m, 1 H, H-14b), 1.81 (s, 3 H, H-18), 1.63 (t, J = 13.30 Hz, 1 H, H-6b), 1.54-1.46 (m, 1 H, H-3), 1.49 (s, 3 H, H-19), 1.00 (s, 3 H, H-16), 0.96 (s, 3 H, H-17).

**<sup>13</sup>C NMR του Θεραγωγαστικού 6** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 203.78 (C-9), 171.27 (C-45), 169.91 (C-37), 167.97 (C-38), 167.20 (C-1'), 167.03 (C-1''), 165.30 (C-1'''), 156.67 (C-21), 154.15 (C-51a), 152.67 (C-25), 152.29 (C-43), 148.72 (C-26), 148.51 (C-36), 147.62 (C-30), 144.96 (C-33), 144.33 (C-41), 142.52 (C-12), 137.65 (C-37), 136.70 (C-11), 136.65 (C-40), 135.31 (C-5'''), 134.87 (C-23), 133.79 (C-4'), 133.70 (C-2''), 133.52 (C-5''), 132.93 (C-2'''), 132.03 (C-7'''), 130.32 (C-48), 129.81 (C-3'''), 129.74 (C-34), 129.26 (C-4'''), 129.14 (C-6'''), 129.00 (C-6'), 128.75 (C-8'), 128.69 (C-4''), 128.57 (C-6''), 127.60 (C-50), 127.17 (C-39), 127.13 (C-7''), 126.81 (C-3'''), 126.68 (C-7'), 126.18 (C-5'), 125.90 (C-9'), 123.81 (C-35), 122.47 (C-49), 120.82 (C-45a), 120.76 (C-38), 120.38 (C-28), 118.65 (C-31), 117.80 (C-42), 116.51 (C-24), 115.47 (C-27), 115.30 (C-51), 114.80 (C-44), 107.62 (C-47), 84.43 (C-2'), 81.11 (C-5), 79.15 (C-4), 75.58 (C-1), 75.09 (C-20), 72.17 (C-7), 72.12 (C-29), 70.36 (C-22), 70.08 (C-32), 63.81 (C-2), 63.28 (C-10), 62.75 (C-13), 58.53 (C-46), 52.82 (C-3'), 45.61 (C-8), 43.22 (C-3), 35.58 (C-15), 29.69 (C-14), 29.68 (C-6), 26.80 (C-55), 22.71 (C-17), 22.14 (C-16), 20.84 (C-53), 14.81 (C-18), 9.62. (C-19).

**Μάζα του Θεραγωγαστικού 6:** MS (ESI+) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> για: C<sub>85</sub>H<sub>75</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub>: υπολογίστηκε: 1530.5050, βρέθηκε: 1530.5117 [M+H]<sup>+</sup>, 1552.4921 [M+Na]<sup>+</sup>, 1570.5041 [M+K]<sup>+</sup>.

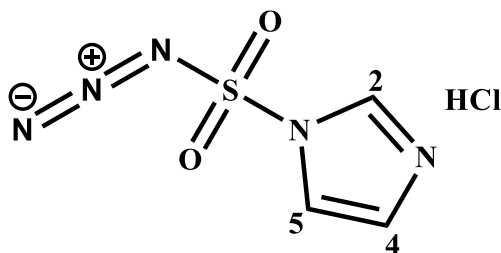


**42**

**Σύνθεση της ένωσης 42:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα της (3-αζιδοπροπυλ)τριφαινυλοφωσφονιακού άλατος (2000 mg, 4.29 mmol, 1 eq.) σε 50 mL νερού/αιθανόλης (1:1, v/v) προστέθηκε διάλυμα του NaN<sub>3</sub> (279 mg, 4.29 mmol, 1 eq.) σε 5 mL νερό και το προκύπτον μίγμα αναδεύτηκε σε reflux για 12 ώρες. Η TLC έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αρχικού βρωμιδίου. Ο διαλύτης της αντίδρασης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο για να ληφθεί η ένωση **42** (1737.1 mg, 94.5%) ως ένα λευκό στερεό. R<sub>f</sub>=0.55 (10% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο)

**<sup>1</sup>H NMR της ένωσης 42** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 7.93-7.76 (m, 15 H, αρωματικά), 3.70-3.61 (m, 2 H, H-3), 3.53 (t, J = 6.48 Hz, 2 H, H-1), 1.82-1.73 (m, 2 H, H-1).

**<sup>13</sup>C NMR της ένωσης 42** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 135.48 (d, J = 2.72 Hz, C-7), 134.10 (d, J = 11.43 Hz, C-5), 130.43 (d, J = 12.29 Hz, C-6), 118.71 (d, J = 86.20 Hz, C-4), 50.97 (d, J = 18.94 Hz, C-1), 22.35 (d, J = 3.16 Hz, C-3), 18.70 (d, J = 52.53 Hz, C-2).



**45**

**Σύνθεση της ένωσης 45:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (206.57 mg, 1.53 mmol, 0.99 eq.) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (2 mL), προστέθηκε το NaN<sub>3</sub> (100.5 mg, 1.54 mmol, 1 eq.) σε δόσεις στους 0 °C και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Έπειτα προστέθηκε το ιμιδαζόλιο (200.00 mg, 2.93 mmol, 1.9 eq.) στους 0 °C και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για άλλες 3 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης

παρακολουθήθηκε με χρήση TLC σε διγλωρομεθάνιο/μεθανόλη (90/10, v/v) που έδειξε τον σχηματισμό ενός νέου προϊόντος ( $R_f=0.39$ ). Ακολούθησε προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα (2 mL) και νερού (2 mL) και εκχύλιση του προϊόντος. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 2.5 mL) και έπειτα ξηράνθηκε με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ο διαλύτης της οργανικής φάσης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 700  $\mu\text{L}$  άνυδρης αιθανόλης. Ακολούθησε προσθήκη υδροχλωρικής αιθανόλης 4M στους 0 °C που οδήγησε στη καταβύθιση ενός λευκού στερεού το οποίο ύστερα από ξήρανση οδήγησε στην καθαρή ένωση **45** (150.0 mg, 46.5%) ως λευκό στερεό.

$^1\text{H NMR}$  της ένωσης **45** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C):  $\delta = 9.53$  (d,  $J = 1.6$  Hz, 1 H, H-2), 8.09 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H, H-5), 7.68 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης **45** (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C):  $\delta = 138.3$  (C-2), 123.4 (C-5), 120.8 (C-4).



### **46 (GnRH-N<sub>3</sub>)**

**Σύνθεση της ένωσης 46:** Στο υπό ανάδευση διάλυμα του πεπτιδίου D-Lys<sup>6</sup>-GnRH (1.0 mg, 0.0007 mmol, 1 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.22 mg, 0.0015 mmol, 2 eq.) και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.019 mg, 0.00007 mmol, 0.1 eq.) σε 0.5 mL μεθανόλης, προστέθηκε η ένωση **43** (100.5 mg, 1.54 mmol, 1 eq. και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες <sup>158</sup>. Η πλάκα TLC (n-BuOH/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  60/20/20, v/v) εμφανίστηκε σε νινυδρίνη και δεν εμφάνισε χρώμα, υποδεικνύοντας την επιτυχή μετατροπή της ελεύθερης αμινομάδας του πεπτιδίου σε αζίδιο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για απομάκρυνση των  $\text{K}_2\text{CO}_3$  και  $\text{CuSO}_4$ , και το υγρό χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση (κλικ για τη σύνθεση της ένωσης **47**) ως έχειν.



## 4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν διαφορετικές 'βιοδραστικές πλατφόρμες' που δύνανται να χρησιμοποιηθούν ποικιλοτρόπως είτε για τη θεραπεία είτε για την ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου.

Αρχικά αναπτύχθηκαν κατάλληλες χαρακτηριστικές ομάδες («σκανδάλες») οι οποίες σχεδιάστηκαν ώστε να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα ερεθίσματα που υπερεκφράζονται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (π.χ. ένζυμα). Αυτές ενσωματώθηκαν σε κατάλληλα μόρια-κορμούς, λαμβάνοντας έτσι συγκεκριμένους αυτο-διασπώμενους συνδέτες, οι οποίοι μπορούν να προσαρτηθούν σε διαφορετικά φάρμακα οδηγώντας στις προαναφερόμενες πλατφόρμες-προφάρμακα. Οι εν λόγω αυτο-διασπώμενοι συνδέτες έχουν την ικανότητα να προκαλούν την ταχεία απελευθέρωση του δραστικού φαρμάκου όταν βρεθούν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, συμβάλλοντας έτσι στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις που κρίθηκε αναγκαίο προσαρτήθηκαν επιπλέον μόρια που προσδίδουν στόχευση, όπως η D-βιοτίνη, το TPP<sup>+</sup> και το πεπτίδιο D-Lys<sup>6</sup>-GnRH.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Τα αντικαρκινικά φάρμακα γεμισταβίνη, πακλιταξέλη και SN-38
- 2) Αυτο-διασπώμενοι συνδέτες που ανταποκρίνονται σε αλκαλική φωσφατάση, γλουταθειόνη και νιτροαναγωγή
- 3) Τα μόρια στόχευσης D-βιοτίνη, TPP<sup>+</sup> και το πεπτίδιο D-Lys<sup>6</sup>-GnRH.

Οι συγκεκριμένες βιοδραστικές πλατφόρμες που περιεγράφηκαν στην παρούσα διατριβή, μπορούν να τροποποιηθούν κατάλληλα και να επαναστοχευθούν ώστε να αντιμετωπίσουν εξατομικευμένα και εξειδικευμένα διαφορετικές μορφές καρκίνου, αλλάζοντας κάθε φορά το φάρμακο / συνδέτη / «σκανδάλη» / μόριο στόχευσης / χρωστική για την συναρμολόγηση ενός νέου θεραπευτικού ή θεραγνωστικού προφαρμάκου. Αναλόγως τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε τύπου καρκίνου (π.χ. υπερέκφραση συγκεκριμένου ενζύμου), μπορεί να αναπτυχθεί και διαφορετικό προφάρμακο για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του.

Για να αποδειχθεί ο επιτυχής σχεδιασμός των εν λόγω βιοδραστικών πλατφορμών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικιλοτρόπως, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν, καθарίστηκαν, ταυτοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν βιολογικά διαφορετικά θεραπευτικά και θεραγνωστικά (θεραπεία + διάγνωση) προφάρμακα τα οποία στοχεύουν εκλεκτικά το καρκινικό μικροπεριβάλλον. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν συνολικά 9 θεραπευτικά και 8 θεραγνωστικά προφάρμακα τα οποία ανταποκρίνονται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, απελευθερώνοντας τα τοξικά τους φορτία. Όλες οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις (95 συνολικά) καθарίστηκαν με κατάλληλες τεχνικές όπως χρωματογραφία στήλης και RP-HPLC, ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία 1D/2D NMR και φασματομετρία μάζας, και μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες, για τις περιπτώσεις που υπήρχε φθορισμός (τελικά θεραγνωστικά

μόρια). Επιπλέον, όλα τα τελικά μόρια μελετήθηκαν χρονικά ως προς τη σταθερότητά τους σε ένα μεγάλο εύρος pH καθώς και σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος με τη χρήση εξατομικευμένης μεθοδολογίας HPLC που αναπτύχθηκε ξεχωριστά για κάθε προφάρμακο. Τέλος, όλα τα προφάρμακα ελέγχθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ, και συγκεκριμένα: α) τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, β) τον έλεγχο της απόκρισης τους υπό την επίδραση του κατάλληλου ερεθίσματος (π.χ. υποξία) που εντοπίζεται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον που στοχεύεται κάθε φορά, και γ) την εξερεύνηση του ακριβή τρόπου ενδοκύττωσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας.

Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης και της πακλιταξέλης τα οποία ανταποκρίνονται στην αλκαλική φωσφατάση, τη γλουταθειόνη και την υποξία, απελευθερώνοντας το εκάστοτε μητρικό τοξικό φάρμακο. Συντέθηκαν 8 θεραπευτικά προφάρμακα που να ανταποκρίνονται σε αυτά τα ερεθίσματα, ενώ έπειτα αναπτύχθηκε ένα επιπλέον (συνολικά 9) που περιλάμβανε την προσάρτηση της βιταμίνης D-βιοτίνη που προσέδωσε επιπλέον στόχευση προς το καρκινικό μικροπεριβάλλον. Σε όλες τις περιπτώσεις κατορθώσαμε να αντιμετωπίσουμε την ανεξέλεγκτη τοξικότητα των μητρικών φαρμάκων, εισάγοντας μια κατάλληλη «σκανδάλη» η οποία προκαλεί την απελευθέρωση του φαρμάκου μόνο στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Όλα τα προφάρμακα ανταποκρίθηκαν πλήρως στο κατάλληλο ερέθισμα απελευθερώνοντας το τοξικό φάρμακο. Ταυτόχρονα, κατορθώσαμε να αντιμετωπίσουμε και άλλα μειονεκτήματα των δυο φαρμάκων, όπως τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα (χρήση της φωσφορικής ομάδας στη περίπτωση της γεμισιταβίνης και της D-βιοτίνης στη περίπτωση της πακλιταξέλης) και τη χημική/ενζυμική απενεργοποίηση τους. Αναλόγως το συνδέτη και τη «σκανδάλη» που χρησιμοποιήσαμε στην εκάστοτε περίπτωση, παραλάβαμε προφάρμακα διαφορετικής σταθερότητας σε εύρος τιμών pH και σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος (μελετήθηκαν με χρήση HPLC).

Έπειτα, προχωρήσαμε στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραγνωστικών προφαρμάκων της γεμισιταβίνης, της πακλιταξέλης και του SN-38 (ανάλογο της καμπτοθεκίνης). Σε όλες τις περιπτώσεις, έπειτα από ορθό σχεδιασμό πέτυχαμε την ταυτόχρονη απελευθέρωση του φαρμάκου και αύξηση του φθορισμού λόγω της εκάστοτε χρωστικής (ταυτόχρονη θεραπεία και διάγνωση). Όλα τα θεραγνωστικά μόρια μελετήθηκαν χρονικά ως προς τη σταθερότητά τους σε ένα μεγάλο εύρος pH καθώς και σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος με τη χρήση εξατομικευμένης μεθοδολογίας HPLC που αναπτύχθηκε ξεχωριστά για κάθε προφάρμακο.

- **Γεμισιταβίνη:** Στην περίπτωση της γεμισιταβίνης, αναπτύχθηκε ένα θεραγνωστικό προφάρμακο που στοχεύει τα λυσοσώματα απελευθερώνοντας το μητρικό τοξικό φάρμακο (**Θεραγνωστικό 1**). Το προφάρμακο αυτό μελετήθηκε ως προς τις φωτοφυσικές του ιδιότητες, καθώς και ως προς τον τρόπο εισόδου στα κύτταρα. Αποκαλύψαμε ότι εισέρχεται στα κύτταρα μέσω κλαθρινών και καταλήγει στο λυσόσωμα όπου λόγω χαμηλού pH αυξημένων επιπέδων αμιδασών, προκαλείται απελευθέρωση του φαρμάκου και της χρωστικής (φλουορεσκεΐνη). Το εν λόγω μόριο αποτελεί βιβλιογραφικά το πρώτο μικρό μόριο της γεμισιταβίνης που εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί

ενέργεια και όχι μέσω διάχυσης (χωρίς χρήση μορίου στόχευσης). Έπειτα, αναπτύχθηκαν άλλα δυο θεραπευτικά προφάρμακα της γεμισιταβίνης (**Θεραγωγαστικό 2** και **Θεραγωγαστικό 3**) τα οποία στοχεύουν την υποξία. Για τον σκοπό αυτό συντέθηκε μια χρωστική που εκπέμπει στο εγγύς υπέρυθρο -NIR- (DCM-N<sub>3</sub>). Σε κατάσταση υποξίας, πραγματοποιείται η απελευθέρωση της γεμισιταβίνης και η ταυτόχρονη αύξηση του φθορισμού στο εγγύς υπέρυθρο, ο οποίος προηγουμένως βρισκόταν σε απόσβεση. Το **Θεραγωγαστικό 2** δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά καρκινικών κυττάρων σε κατάσταση υποξίας και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ενώ τα πειράματα συνεχίζονται με χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης και μεγαλύτερου χρόνου επώασης. Το **Θεραγωγαστικό 3** εμφάνισε δράση παρόμοια με αυτή της γεμισιταβίνης και θα πραγματοποιηθούν νέες μελέτες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης.

- **SN-38:** Αναπτύχθηκε ένα θεραπευτικό προφάρμακο με χρήση του φαρμάκου SN-38 (**Θεραγωγαστικό 4**), που αποτελεί ένα δραστικό ανάλογο της καμπτοθεκίνης. Το SN-38 εμφανίζει φθορισμό, οπότε χρησιμοποιείται μόνο του για θεραπεία και διάγνωση, χωρίς τη χρήση επιπλέον χρωστικής όπως στις προηγούμενες περιπτώσεις. Στο θεραπευτικό αυτό προσαρτήθηκε η D-βιοτίνη για επιπλέον στόχευση προς τα καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αντίστοιχο υποδοχέα στην επιφάνειά τους. Το **Θεραγωγαστικό 4** παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση κατά καρκινικών κυττάρων, χωρίς όμως να παρατηρηθεί διαφοροποίηση μεταξύ υποξίας και φυσιολογικών επιπέδων οξυγόνου. Τα πειράματα συνεχίζονται με μείωση του χρόνου επώασης και της χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών.
- **Πακλιταξέλη:** Αναπτύχθηκαν 4 θεραπευτικά προφάρμακα με βάση το αντικαρκινικό φάρμακο πακλιταξέλη. Στα **Θεραγωγαστικά 5** και **6** έγινε η χρήση της κουμαρίνης-N<sub>3</sub> και της NIR χρωστικής DCM-N<sub>3</sub> αντίστοιχα, και τα προφάρμακα αυτά εγκλωβίστηκαν σε νανοσωματίδια (πολυμερικό σύστημα αποτελούμενο από πολυ-ιστιδίνη στο εσωτερικό και πολυαιθυλενοξειδία στο εξωτερικό) για την αύξηση της σταθερότητάς τους και την εκλεκτική τους απελευθέρωση στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (τα εν λόγω νανοσωματίδια αποσυντίθενται σε ελαφρώς όξινο pH απελευθερώνοντας το φάρμακο). Οι μελέτες βιοδραστικότητας βρίσκονται εν εξελίξει. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη 2 νέων θεραπευτικών προφαρμάκων της πακλιταξέλης (**Θεραγωγαστικά 7** και **8**) στα οποία ενσωματώθηκε ένας καινοτόμος αυτοδιασπώμενος συνδέτης που επιτρέπει την ταυτόχρονη απελευθέρωση του φαρμάκου και την αύξηση του φθορισμού στην περιοχή NIR. Και τα δυο εμπεριέχουν διαφορετικά μόρια στόχευσης (D-βιοτίνη και TPP<sup>+</sup>, αντίστοιχα), καθώς και μια καινοτόμα NIR χρωστική. Το **Θεραγωγαστικό 7** παρουσίασε ανασταλτική δράση καρκινικών κυττάρων εκλεκτικά σε κατάσταση υποξίας. Το **Θεραγωγαστικό 8** μελετάται αυτή τη στιγμή ως προς την ανασταλτική του δράση σε παρόμοιες συνθήκες. Ομοίως, το **Θεραγωγαστικό 9**, αποτελείται από τα ίδια επιμέρους στοιχεία, με χρήση πεπτιδίου όμως ως μόριο στόχευσης. Οι δομές των τριών αυτών προφαρμάκων δεν παρουσιάζονται πλήρως στο κείμενο. Ομοίως για το **Θεραγωγαστικό 10**, το οποίο βρίσκεται στα τελικά στάδια σύνθεσης, δεν παρουσιάζεται η δομή του.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκαν επιτυχώς ‘βιοδραστικές πλατφόρμες’ που επιτρέπουν τη συναρμολόγηση διαφορετικών προφαρμάκων, που μπορούν να επαναστοχευθούν εκλεκτικά στο καρκινικό μικροπεριβάλλον και να αποδεσμεύουν το τοξικό αντικαρκινικό φάρμακο. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή θέσαμε τις βασικές αρχές του επιτυχή σχεδιασμού ‘βιοδραστικών πλατφορμών’ οι οποίες μπορούν να προσαρμοστούν εύκολα και γρήγορα για την αντιμετώπιση διαφορετικών τύπων καρκίνων. Με βάση αυτές τις ‘βιοδραστικές πλατφόρμες’, συντέθηκαν συνολικά 9 θεραπευτικά και 8 θεραγωγικά προφάρμακα τα οποία ανταποκρίνονται πλήρως στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, ενώ για κάθε ένα από αυτά: 1) αναλύθηκαν πλήρως τα βήματα που απαιτούνται για το σχεδιασμό του ώστε να στοχεύει εκλεκτικά το καρκινικό μικροπεριβάλλον, 2) παρατέθηκαν τα ακριβή πειραματικά βήματα κατά τη σύνθεση, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση του, 3) παρουσιάστηκαν οι μελέτες σταθερότητάς του σε εύρος τιμών pH και σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, και 3) επαληθεύτηκε η αποτελεσματικότητα του αρχικού σχεδιασμού μέσω της κατάλληλης βιολογικής αξιολόγησης.

## 5 Βιβλιογραφία

1. C. Fitzmaurice, D. Dicker, A. Pain, H. Hamavid, M. Moradi-Lakeh, M. F. MacIntyre, C. Allen, G. Hansen, R. Woodbrook, C. Wolfe, R. R. Hamadeh, A. Moore, A. Werdecker, B. D. Gessner, B. Te Ao, B. McMahon, C. Karimkhani, C. Yu, G. S. Cooke, D. C. Schwebel, D. O. Carpenter, D. M. Pereira, D. Nash, D. S. Kazi, D. De Leo, D. Plass, K. N. Ukwaja, G. D. Thurston, K. Yun Jin, E. P. Simard, E. Mills, E. K. Park, F. Catalá-López, G. deVeber, C. Gotay, G. Khan, H. D. Hosgood, 3rd, I. S. Santos, J. L. Leasher, J. Singh, J. Leigh, J. B. Jonas, J. Sanabria, J. Beardsley, K. H. Jacobsen, K. Takahashi, R. C. Franklin, L. Ronfani, M. Montico, L. Naldi, M. Tonelli, J. Geleijnse, M. Petzold, M. G. Shrimel, M. Younis, N. Yonemoto, N. Breitborde, P. Yip, F. Pourmalek, P. A. Lotufo, A. Esteghamati, G. J. Hankey, R. Ali, R. Lunevicius, R. Malekzadeh, R. Dellavalle, R. Weintraub, R. Lucas, R. Hay, D. Rojas-Rueda, R. Westerman, S. G. Sepanlou, S. Nolte, S. Patten, S. Weichenthal, S. F. Abera, S. M. Fereshtehnejad, I. Shiue, T. Driscoll, T. Vasankari, U. Alsharif, V. Rahimi-Movaghar, V. V. Vlassov, W. S. Marcenes, W. Mekonnen, Y. A. Melaku, Y. Yano, A. Artaman, I. Campos, J. MacLachlan, U. Mueller, D. Kim, M. Trillini, B. Eshrati, H. C. Williams, K. Shibuya, R. Dandona, K. Murthy, B. Cowie, A. T. Amare, C. A. Antonio, C. Castañeda-Orjuela, C. H. van Gool, F. Violante, I. H. Oh, K. Deribe, K. Soreide, L. Knibbs, M. Kereselidze, M. Green, R. Cardenas, N. Roy, T. Tillmann, Y. Li, H. Krueger, L. Monasta, S. Dey, S. Sheikhbahaei, N. Hafezi-Nejad, G. A. Kumar, C. T. Sreeramareddy, L. Dandona, H. Wang, S. E. Vollset, A. Mokdad, J. A. Salomon, R. Lozano, T. Vos, M. Forouzanfar, A. Lopez, C. Murray and M. Naghavi, *JAMA oncology*, 2015, **1**, 505-527.
2. H. R. Max Roser, <https://ourworldindata.org/cancer#citation>, 2019.
3. *International Agency for Research on Cancer*.
4. G. G. Meadows and H. Zhang, *Alcohol research : current reviews*, 2015, **37**, 311-322.

5. J. E. Klaunig, in *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*, eds. C. N. Pope and J. Liu, Academic Press, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813602-7.00008-9>, pp. 97-110.
6. H. F. Lodish, A. Berk, C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. L. Ploegh and P. T. Matsudaira, *Molecular cell biology*, W.H. Freeman, New York, 2008.
7. D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, 2000, **100**, 57-70.
8. D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646-674.
9. S. Uthaman, K. M. Huh and I.-K. Park, *Biomaterials Research*, 2018, **22**, 22.
10. M. V. Liberti and J. W. Locasale, *Trends in biochemical sciences*, 2016, **41**, 211-218.
11. L. Q. Chen and M. D. Pagel, *Advances in radiology*, 2015, **2015**.
12. E. I. Vrettos, G. Mező and A. G. Tzakos, *Beilstein J Org Chem*, 2018, **14**, 930-954.
13. P. Vaupel, F. Kallinowski and P. Okunieff, *Cancer research*, 1989, **49**, 6449-6465.
14. W. Al Tameemi, T. P. Dale, R. M. K. Al-Jumaily and N. R. Forsyth, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, **7**.
15. M. A. Cavadas, L. K. Nguyen and A. Cheong, *Cell communication and signaling : CCS*, 2013, **11**, 42.
16. W. G. Kaelin, Jr., P. J. Ratcliffe and G. L. Semenza, *Jama*, 2016, **316**, 1252-1253.
17. A. Zimna and M. Kurpisz, *BioMed research international*, 2015, **2015**, 549412.
18. N. Goda and M. Kanai, *International journal of hematology*, 2012, **95**, 457-463.
19. C. V. Dang, J. W. Kim, P. Gao and J. Yustein, *Nature reviews. Cancer*, 2008, **8**, 51-56.
20. R. B. Robey and N. Hay, *Seminars in Cancer Biology*, 2009, **19**, 25-31.
21. A. M. Weljie and F. R. Jirik, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2011, **43**, 981-989.
22. Y. Singh, M. Palombo and P. J. Sinko, *Current medicinal chemistry*, 2008, **15**, 1802-1826.
23. V. Aggarwal, H. S. Tuli, A. Varol, F. Thakral, M. B. Yerer, K. Sak, M. Varol, A. Jain, M. A. Khan and G. Sethi, *Biomolecules*, 2019, **9**.
24. G. Y. Liou and P. Storz, *Free radical research*, 2010, **44**, 479-496.
25. X. Peng and V. Gandhi, *Therapeutic delivery*, 2012, **3**, 823-833.
26. M. Wei, P. Yin, Y. Shen, L. Zhang, J. Deng, S. Xue, H. Li, B. Guo, Y. Zhang and S. Yao, *Chemical Communications*, 2013, **49**, 4640-4642.
27. S. Majumdar and T. J. Siahhaan, *Medicinal Research Reviews*, 2012, **32**, 637-658.
28. A.-F. Miller, J. T. Park, K. L. Ferguson, W. Pitsawong and A. S. Bommarius, *Molecules*, 2018, **23**, 211.
29. E. M. Williams, R. F. Little, A. M. Mowday, M. H. Rich, J. V. Chan-Hyams, J. N. Copp, J. B. Smaill, A. V. Patterson and D. F. Ackerley, *The Biochemical journal*, 2015, **471**, 131-153.
30. K. M. Holtz and E. R. Kantrowitz, *FEBS letters*, 1999, **462**, 7-11.
31. G. N. Bowers, Jr. and R. B. McComb, *Clinical chemistry*, 1966, **12**, 70-89.
32. C. Ruan, W. Wang and B. Gu, *Anal Chem*, 2006, **78**, 3379-3384.
33. L. Wang, K. Ye, J. Pan, H. Song and X. Niu, *Analytical Methods*, 2019, **11**, 2374-2377.
34. R. Ralhan and J. Kaur, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2007, **17**, 1061-1075.
35. E. Scholar, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, eds. S. J. Enna and D. B. Bylund, Elsevier, New York, 2007, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61036-0>, pp. 1-4.

36. C. Avendaño and J. C. Menéndez, in *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, eds. C. Avendaño and J. C. Menéndez, Elsevier, Amsterdam, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52824-7.00002-0>, pp. 9-52.
37. I. Buss and U. Jaehde, in *Encyclopedia of Cancer*, ed. M. Schwab, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, DOI: 10.1007/978-3-642-16483-5\_4616, pp. 2911-2916.
38. J. A. Hadfield, S. Ducki, N. Hirst and A. T. McGown, *Progress in cell cycle research*, 2003, **5**, 309-325.
39. M. A. Jordan and L. Wilson, *Nature reviews. Cancer*, 2004, **4**, 253-265.
40. D. G. Kingston, *Journal of natural products*, 2009, **72**, 507-515.
41. E. B. Garon and S. M. Dubinett, *Journal of Thoracic Oncology*, 2011, **6**, S1791-S1792.
42. Y. H. Seo, *J Cancer Prev*, 2015, **20**, 5-11.
43. J. J. Champoux and R. Aronoff, *Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**, 1010-1015.
44. J. E. Dewese and N. Osheroff, *Nucleic acids research*, 2009, **37**, 738-748.
45. Y. Gao, Q. Shang, W. Li, W. Guo, A. Stojadinovic, C. Mannion, Y.-g. Man and T. Chen, *Journal of Cancer*, 2020, **11**, 5135-5149.
46. B. Bhattacharya and S. Mukherjee, *Journal of Cancer Therapy*, 2015, **Vol.06No.10**, 10.
47. J. W. Yarbro, *Semin Oncol*, 1992, **19**, 1-10.
48. R. A. Egler, S. P. Ahuja and Y. Matloub, *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2016, **7**, 62-71.
49. Z.-y. Wang, *Gan To Kagaku Ryoho*, 2002, **29 Suppl 1**, 214-218.
50. J. O. S. Barbara L. Hoffman, Karen D. Bradshaw, Lisa M. Halvorson, Joseph I. Schaffer, Marlene M. Corton, *Williams Gynecology*.
51. H. Hayashi, T. Kurata and K. Nakagawa, *Clin Med Insights Oncol*, 2011, **5**, 177-184.
52. J. A. Belt, N. M. Marina, D. A. Phelps and C. R. Crawford, *Advances in Enzyme Regulation*, 1993, **33**, 235-252.
53. D. A. Griffith and S. M. Jarvis, *Biochimica et biophysica acta*, 1996, **1286**, 153-181.
54. J. R. Mackey, R. S. Mani, M. Selner, D. Mowles, J. D. Young, J. A. Belt, C. R. Crawford and C. E. Cass, *Cancer research*, 1998, **58**, 4349-4357.
55. M. W. Ritzel, A. M. Ng, S. Y. Yao, K. Graham, S. K. Loewen, K. M. Smith, R. G. Ritzel, D. A. Mowles, P. Carpenter, X. Z. Chen, E. Karpinski, R. J. Hyde, S. A. Baldwin, C. E. Cass and J. D. Young, *The Journal of biological chemistry*, 2001, **276**, 2914-2927.
56. M. P. Lostao, J. F. Mata, I. M. Larrayoz, S. M. Inzillo, F. J. Casado and M. Pastor-Anglada, *FEBS letters*, 2000, **481**, 137-140.
57. J. García-Manteiga, M. Molina-Arcas, F. J. Casado, A. Mazo and M. Pastor-Anglada, *Clin Cancer Res*, 2003, **9**, 5000-5008.
58. J. R. Mackey, S. Y. M. Yao, K. M. Smith, E. Karpinski, S. A. Baldwin, C. E. Cass and J. D. Young, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1999, **91**, 1876-1881.
59. R. J. Paproski, S. Y. M. Yao, N. Favis, D. Evans, J. D. Young, C. E. Cass and R. J. Zemp, *PLOS ONE*, 2013, **8**, e56423.
60. D. M. Bender, J. Bao, A. H. Dantzig, W. D. Diserod, K. L. Law, N. A. Magnus, J. A. Peterson, E. J. Perkins, Y. J. Pu, S. M. Reutzel-Edens, D. M. Remick, J. J. Starling, G. A. Stephenson, R. K. Vaid, D. Zhang and J. R. McCarthy, *J Med Chem*, 2009, **52**, 6958-6961.

61. V. Heinemann, L. W. Hertel, G. B. Grindey and W. Plunkett, *Cancer research*, 1988, **48**, 4024-4031.
62. D. Y. Bouffard, J. Laliberté and R. L. Momparler, *Biochemical pharmacology*, 1993, **45**, 1857-1861.
63. P. Hatzis, A. S. Al-Madhoon, M. Jüllig, T. G. Petrakis, S. Eriksson and I. Talianidis, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**, 30239-30243.
64. A. R. Van Rompay, M. Johansson and A. Karlsson, *Molecular Pharmacology*, 1999, **56**, 562.
65. R. Hu, W. Lam, C.-H. Hsu and Y.-C. Cheng, *PloS one*, 2011, **6**, e19490-e19490.
66. A. Wong, R. A. Soo, W. P. Yong and F. Innocenti, *Drug metabolism reviews*, 2009, **41**, 77-88.
67. V. W. T. Ruiz van Haperen, G. Veerman, J. B. Vermorken, H. M. Pinedo and G. J. Peters, *Biochemical pharmacology*, 1996, **51**, 911-918.
68. S. Ohhashi, K. Ohuchida, K. Mizumoto, H. Fujita, T. Egami, J. Yu, H. Toma, S. Sadatomi, E. Nagai and M. Tanaka, *Anticancer research*, 2008, **28**, 2205-2212.
69. D. Rudin, L. Li, N. Niu, K. R. Kalari, J. A. Gilbert, M. M. Ames and L. Wang, *J Drug Metab Toxicol*, 2011, **2**, 1-10.
70. L. S. Hodge, M. E. Taub and T. S. Tracy, *Drug Metab Dispos*, 2011, **39**, 2013-2016.
71. E. J. B. Derissen, A. D. R. Huitema, H. Rosing, J. H. M. Schellens and J. H. Beijnen, *British journal of clinical pharmacology*, 2018, **84**, 1279-1289.
72. A. M. Bergman, G. Giaccone, C. J. A. van Moorsel, R. Mauritz, P. Noordhuis, H. M. Pinedo and G. J. Peters, *European Journal of Cancer*, 2000, **36**, 1974-1983.
73. S. A. Hunsucker, B. S. Mitchell and J. Spsychala, *Pharmacology & therapeutics*, 2005, **107**, 1-30.
74. S. A. Hunsucker, J. Spsychala and B. S. Mitchell, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 10498-10504.
75. P. Aksoy, M. J. Zhu, K. R. Kalari, I. Moon, L. L. Pelleymounter, B. W. Eckloff, E. D. Wieben, V. C. Yee, R. M. Weinshilboum and L. Wang, *Pharmacogenetics and genomics*, 2009, **19**, 567-576.
76. P. Huang, S. Chubb, L. W. Hertel, G. B. Grindey and W. Plunkett, *Cancer research*, 1991, **51**, 6110-6117.
77. V. Gandhi, J. Legha, F. Chen, L. W. Hertel and W. Plunkett, *Cancer research*, 1996, **56**, 4453-4459.
78. V. Heinemann, Y. Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L. W. Hertel, G. B. Grindey and W. Plunkett, *Cancer research*, 1992, **52**, 533-539.
79. V. Heinemann, Y. Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L. W. Hertel, G. B. Grindey and W. Plunkett, *Mol Pharmacol*, 1990, **38**, 567-572.
80. H. Xu, C. Faber, T. Uchiki, J. Racca and C. Dealwis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**, 4028.
81. J. C. Sarup, M. A. Johnson, V. Verhoef and A. Fridland, *Biochemical pharmacology*, 1989, **38**, 2601-2607.
82. C. G. Ferreira, S. W. Span, G. J. Peters, F. A. Kruyt and G. Giaccone, *Cancer research*, 2000, **60**, 7133-7141.
83. A. Habiro, S. Tanno, K. Koizumi, T. Izawa, Y. Nakano, M. Osanai, Y. Mizukami, T. Okumura and Y. Kohgo, *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, **316**, 71-77.

84. N. M. Chandler, J. J. Canete and M. P. Callery, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2004, **8**, 1072-1078.
85. J. L. Kummer, P. K. Rao and K. A. Heidenreich, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 20490-20494.
86. F. Köpper, C. Bierwirth, M. Schön, M. Kunze, I. Elvers, D. Kranz, P. Saini, M. B. Menon, D. Walter, C. S. Sørensen, M. Gaestel, T. Helleday, M. P. Schön and M. Dobbelstein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**, 16856.
87. M. Nakashima, S. Adachi, I. Yasuda, T. Yamauchi, J. Kawaguchi, M. Itani, T. Yoshioka, R. Matsushima-Nishiwaki, Y. Hirose, O. Kozawa and H. Moriwaki, *Cancer Letters*, 2011, **313**, 218-225.
88. Y. Kuramitsu, Y. Wang, K. Taba, S. Suenaga, S. Ryozaawa, S. Kaino, I. Sakaida and K. Nakamura, *Anticancer research*, 2012, **32**, 2295.
89. M. W. Saif, Y. Lee and R. Kim, *Therapeutic advances in medical oncology*, 2012, **4**, 341-346.
90. L. de Sousa Cavalcante and G. Monteiro, *European journal of pharmacology*, 2014, **741**, 8-16.
91. Y. Jia and J. Xie, *Genes & diseases*, 2015, **2**, 299-306.
92. S. E. Pratt, S. Durland-Busbice, R. L. Shepard, G. P. Donoho, J. J. Starling, E. R. Wickremsinhe, E. J. Perkins and A. H. Dantzig, *Molecular cancer therapeutics*, 2013, **12**, 481-490.
93. J. T. Weiss, J. C. Dawson, C. Fraser, W. Rybski, C. Torres-Sánchez, M. Bradley, E. E. Patton, N. O. Carragher and A. Unciti-Broceta, *J Med Chem*, 2014, **57**, 5395-5404.
94. C. Zhao, X. Xue, G. Li, C. Sun, C. Sun, X. Qu and W. Li, *Chemical Biology & Drug Design*, 2012, **80**, 479-488.
95. T. Karampelas, O. Argyros, N. Sayyad, K. Spyridaki, C. Pappas, K. Morgan, G. Kolios, R. P. Millar, G. Liapakis, A. G. Tzakos, D. Fokas and C. Tamvakopoulos, *Bioconjugate chemistry*, 2014, **25**, 813-823.
96. K. D. Tew, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, eds. S. J. Enna and D. B. Bylund, Elsevier, New York, 2007, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62356-6>, pp. 1-5.
97. V. Walsh and J. Goodman, *Medical Anthropology*, 2002, **21**, 307-336.
98. B. A. Weaver, *Mol Biol Cell*, 2014, **25**, 2677-2681.
99. R. S. Tuma, *Oncology Times*, 2003, **25**.
100. R. A. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith and S. Kim, *Journal of the American Chemical Society*, 1994, **116**, 1597-1598.
101. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen, *Nature*, 1994, **367**, 630-634.
102. S. J. Danishefsky, J. J. Masters, W. B. Young, J. T. Link, L. B. Snyder, T. V. Magee, D. K. Jung, R. C. A. Isaacs, W. G. Bornmann, C. A. Alaimo, C. A. Coburn and M. J. Di Grandi, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 2843-2859.
103. P. A. Wender, N. F. Badham, S. P. Conway, P. E. Floreancig, T. E. Glass, J. B. Houze, N. E. Krauss, D. Lee, D. G. Marquess, P. L. McGrane, W. Meng, M. G. Natchus, A. J. Shuker, J. C. Sutton and R. E. Taylor, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119**, 2757-2758.



104. K. Morihira, R. Hara, S. Kawahara, T. Nishimori, N. Nakamura, H. Kusama and I. Kuwajima, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**, 12980-12981.
105. T. Mukaiyama, I. Shiina, H. Iwadare, M. Saitoh, T. Nishimura, N. Ohkawa, H. Sakoh, K. Nishimura, Y.-i. Tani, M. Hasegawa, K. Yamada and K. Saitoh, *Chemistry – A European Journal*, 1999, **5**, 121-161.
106. T. Doi, S. Fuse, S. Miyamoto, K. Nakai, D. Sasuga and T. Takahashi, *Chemistry, an Asian journal*, 2006, **1**, 370-383.
107. K. Fukaya, Y. Tanaka, A. C. Sato, K. Kodama, H. Yamazaki, T. Ishimoto, Y. Nozaki, Y. M. Iwaki, Y. Yuki, K. Umei, T. Sugai, Y. Yamaguchi, A. Watanabe, T. Oishi, T. Sato and N. Chida, *Organic Letters*, 2015, **17**, 2570-2573.
108. S. Hirai, M. Utsugi, M. Iwamoto and M. Nakada, *Chemistry – A European Journal*, 2015, **21**, 355-359.
109. Y. Kanda, H. Nakamura, S. Umemiya, R. K. Puthukanoori, V. R. Murthy Appala, G. K. Gaddamanugu, B. R. Paraselli and P. S. Baran, *Journal of the American Chemical Society*, 2020, **142**, 10526-10533.
110. K. Varsha, A. Sharma, A. Kaur, J. Madan, R. S. Pandey, U. K. Jain and R. Chandra, in *Nanostructures for Cancer Therapy*, eds. A. Fikai and A. M. Grumezescu, Elsevier, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00028-3>, pp. 775-809.
111. M. V. Blagosklonny, P. Giannakakou, W. S. el-Deiry, D. G. Kingston, P. I. Higgs, L. Neckers and T. Fojo, *Cancer research*, 1997, **57**, 130-135.
112. P. Giannakakou, R. Robey, T. Fojo and M. V. Blagosklonny, *Oncogene*, 2001, **20**, 3806-3813.
113. T. M. Abu Samaan, M. Samec, A. Liskova, P. Kubatka and D. Büsselberg, *Biomolecules*, 2019, **9**, 789.
114. M. Izdebska, M. Hałas-Wiśniewska, I. Adamczyk, I. Lewandowska, I. Kwiatkowska, M. Gagat and A. Grzanka, *Adv Clin Exp Med*, 2018, **27**, 367-378.
115. I. Larionova, N. Cherdyntseva, T. Liu, M. Patysheva, M. Rakina and J. Kzhyshkowska, *Oncolmmunology*, 2019, **8**, e1596004.
116. B. Monsarrat, E. Mariel, S. Cros, M. Garès, D. Guénard, F. Guéritte-Voegelein and M. Wright, *Drug Metabolism and Disposition*, 1990, **18**, 895.
117. B. Monsarrat, P. Alvinerie, M. Wright, J. Dubois, F. Guéritte-Voegelein, D. Guénard, R. C. Donehower and E. K. Rowinsky, *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 1993, 39-46.
118. B. Mittal, S. Tulsyan, S. Kumar, R. D. Mittal and G. Agarwal, *Advances in clinical chemistry*, 2015, **71**, 77-139.
119. A. M. Barbuti and Z.-S. Chen, *Cancers (Basel)*, 2015, **7**, 2360-2371.
120. J. Żwawiak and L. Zaprutko, *Journal of Medical Science*, 2014, **83**, 47-52.
121. G. G. Chabot, D. Abigeres, G. Catimel, S. Culine, M. de Forni, J. M. Extra, M. Mahjoubi, P. Hérait, J. P. Armand, R. Bugat, M. Clavel and M. E. Marty, *Annals of Oncology*, 1995, **6**, 141-151.
122. G. J. Peters, in *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies*, eds. C. H. Cho and T. Hu, Academic Press, 2020, vol. 8, pp. 1-33.
123. M. Ramesh, P. Ahlawat and N. R. Srinivas, *Biomedical chromatography : BMC*, 2010, **24**, 104-123.

124. V. J. Stella, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, **109**, 3514-3523.
125. K. M. Huttunen, H. Raunio and J. Rautio, *Pharmacological reviews*, 2011, **63**, 750-771.
126. P. W. Hsieh, C. F. Hung and J. Y. Fang, *Current pharmaceutical design*, 2009, **15**, 2236-2250.
127. V. J. Stella and K. W. Nti-Addae, *Advanced drug delivery reviews*, 2007, **59**, 677-694.
128. K. K. Yap and S. J. Neuhaus, *Surgical Oncology*, 2016, **25**, 30-36.
129. J. Drews, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, **3**, 797-801.
130. J. V. Frangioni, *Current opinion in chemical biology*, 2003, **7**, 626-634.
131. S. Zhu, R. Tian, A. L. Antaris, X. Chen and H. Dai, *Advanced Materials*, 2019, **31**, 1900321.
132. E. I. Vrettos, T. Karampelas, N. Sayyad, A. Kougioumtzi, N. Syed, T. Crook, C. Murphy, C. Tamvakopoulos and A. G. Tzakos, *European journal of medicinal chemistry*, 2021, **211**, 113018.
133. Y. Zhou, L. Zhang, X. Zhang and Z.-J. Zhu, *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, **7**, 809-814.
134. D. A. Diamantis, A. Agalou, M. V. Chatziathanasiadou, G. S. Markopoulos, S. Bellou, Z. Kanaki, T. Crook, N. Syed, T. Rampias, A. Klinakis, E. Kolettas, D. Beis and A. G. Tzakos, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, **337**, 129807.
135. R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya and J. S. Kim, *Chemical Society Reviews*, 2015, **44**, 6670-6683.
136. G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner, *The Journal of Nutrition*, 2004, **134**, 489-492.
137. S. C. Jeffrey, M. T. Nguyen, R. F. Moser, D. L. Meyer, J. B. Miyamoto and P. D. Senter.
138. H. Ben El Ayouchia, L. Bahsis, H. Anane, L. R. Domingo and S.-E. Stiriba, *RSC Advances*, 2018, **8**, 7670-7678.
139. Z. W. Guo Zw and J. M. Gallo, *The Journal of organic chemistry*, 1999, **64**, 8319-8322.
140. A. Capes-Davis, G. Theodosopoulos, I. Atkin, H. G. Drexler, A. Kohara, R. A. MacLeod, J. R. Masters, Y. Nakamura, Y. A. Reid, R. R. Reddel and R. I. Freshney, *International journal of cancer*, 2010, **127**, 1-8.
141. Z. Lu, J. Wu, W. Liu, G. Zhang and P. Wang, *RSC Advances*, 2016, **6**, 32046-32051.
142. K. Paál, J. Müller and L. Hegedûs, *European journal of biochemistry*, 2001, **268**, 2187-2191.
143. R. B. P. Elmes, *Chemical Communications*, 2016, **52**, 8935-8956.
144. K. Kuwayama, S. Miyauchi, R. Tateoka, H. Abe and N. Kamo, *Biochemical pharmacology*, 2002, **63**, 81-88.
145. P. Wonganan, D. S. P. Lansakara-P, S. Zhu, M. Holzer, M. A. Sandoval, M. Warthaka and Z. Cui, *J Control Release*, 2013, **169**, 17-27.
146. E. Zarins, A. Vembris, V. Kokars and I. Muzikante, 2012.
147. K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill and Q. Wang, *Organic Letters*, 2004, **6**, 4603-4606.
148. N. Apostolova and V. M. Victor, *Antioxidants & redox signaling*, 2015, **22**, 686-729.
149. D. Tapas and B. Sharmila, *Current Radiopharmaceuticals*, 2016, **9**, 94-101.
150. H. Hossein-Nejad-Ariani, E. Althagafi and K. Kaur, *Scientific Reports*, 2019, **9**, 2723.
151. Y. Wang and D. H.-C. Chou, *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, **54**, 10931-10934.

152. F. Peng and S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 18860-18867.
153. J. Buller, A. Laschewsky, J.-F. Lutz and E. Wischerhoff, *Polymer Chemistry*, 2011, **2**, 1486-1489.
154. S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart and J. I. Zink, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 2222-2226.
155. K. D. Grimes, A. Gupte and C. C. Aldrich, *Synthesis (Stuttg)*, 2010, **2010**, 1441-1448.
156. Y. Zheng, M. Zhao, Q. Qiao, H. Liu, H. Lang and Z. Xu, *Dyes and Pigments*, 2013, **98**, 367-371.
157. V. D. Bock, H. Hiemstra and J. H. van Maarseveen, *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, **2006**, 51-68.
158. E. D. Goddard-Borger and R. V. Stick, *Organic Letters*, 2007, **9**, 3797-3800.