



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

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ
ΠΟΛΥΤΡΟΠΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΜΕ ΒΑΣΗ ΕΝΑ ΔΟΜΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΔΙΒΡΩΜΟΠΥΡΙΔΑΖΙΝΟΔΙΟΝΗΣ

ΤΣΩΤΣΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2023



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

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ
ΠΟΛΥΤΡΟΠΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΜΕ ΒΑΣΗ ΕΝΑ ΔΟΜΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΔΙΒΡΩΜΟΠΥΡΙΔΑΖΙΝΟΔΙΟΝΗΣ

ΤΣΩΤΣΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

ΣΥΜΕΩΝ ΑΓΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΕΥ, ΠΑΝ/ΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ **(ΜΕΛΟΣ)**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2023



UNIVERSITY OF IOANNINA
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INTERDEPARTMENTAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
MEDICINAL CHEMISTRY

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR THE ORTHOGONAL
DESIGN OF TARGETED MULTIMODAL CONJUGATES OF
ANTICANCER AGENTS BASED ON A DIBROMOPYRIDAZINODIONE
SCAFFOLD

TSOTSOU EVANGELIA

MASTER THESIS

MEMBERS OF THE EXAMINING COMMITTEE

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

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

SIMEON AGATHOPOULOS, PROFESSOR, DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE
AND ENGINEERING, UNIVERSITY OF IOANNINA (MEMBER)

IOANNINA, JULY 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την περίοδο 2021-2022 στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Ιατρική Χημεία, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτοπόρο θέμα, αλλά κυρίως για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η εμπιστοσύνη και οι συμβουλές που μου παρείχε, αποτέλεσαν σπουδαίο παράγοντα για την επιτυχή ολοκλήρωση του θέματός μου και βοήθησαν στο να εντρυφήσω και να αγαπήσω το κομμάτι της οργανικής σύνθεσης ακόμα περισσότερο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στους κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, και κ. Συμεών Αγαθόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης τον Ερευνητή του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο για την ευγενική χορηγία της ντοσεταξέλης, όπως επίσης και τον μεταδιδάκτορα Υψηλάντη Κωνσταντίνο στο Τμήμα Χημείας, για την άριστη συνεργασία και βοήθειά του σε αυτή την ερευνητική δουλειά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το κέντρο NMR και το κέντρο φασματομετρίας μάζας.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στα μέλη του εργαστηρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Πολυμερών και ειδικότερα στους Γεώργιο Παπαδόπουλο, Σπυρίδωνα Τσίρκα και Κωνσταντίνο Αρτοποιάδη, για τη συνεχή βοήθεια και συνεργασία σε οτιδήποτε κι αν προέκυπτε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τ. Μ. Ε. Υ. για την αρμονική συνεργασία και το πάντα ευχάριστο κλίμα που υπήρχε. Ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια του ΔΠΜΣ Ιατρικής Χημείας, Χαριτίνη Δημαρέλια, για τη βοήθεια ένταξης στο εργαστήριο κατά την έναρξη της διπλωματικής μου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και το κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για τη συμπαράσταση, την υπομονή και την αγάπη τους για όλο το χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
Λίστα συντομογραφιών.....	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1. Καρκίνος.....	14
2. Στοχευμένη χημειοθεραπεία με θεραπευτικά συζεύγματα	21
2.1. Χημειοθεραπεία μέσω στοχευτικού προσδέτη (Ligand-Targeted Drug Therapy)	21
2.2. Επαγόμενη ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα (Receptor-Mediated Endocytosis, RME)	25
2.3. Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates).....	27
3. Στρατηγική σύνθεσης συζευγμάτων με πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο	30
3.1. Ικρίωμα Διβρωμοπυριδαζινοδιόνης	30
3.2. Πολυτροπικά συζεύγματα με βάση την διβρωμοπυριδαζινοδιόνη	32
3.3. Σχεδιασμός πολυτροπικών συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης	34
3.4. Στρατηγική σύνθεσης του ικριώματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης.....	36
3.5. Επιλογή φαρμάκων για τη σύζευξη.....	37
3.5.1. Ντοσεταξέλη (Docetaxel, DTX)	39
3.5.2. Γεμισιταβίνη (Gemcitabine, Gem).....	40
3.5.3. Σουνιτινίμπη (Sunitinib)	41
3.5.4. Ανάλογο σουνιτινίμπης (SAP).....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
Σύνθεση ενός πρότυπου ικριώματος diBrPD και μελέτες ορθογωνικής σύζευξης	44
Μελέτες σύζευξης.....	45
Σύνθεση του ενεργοποιημένου εστέρα του ικριώματος diBrPD.....	46
Βελτιστοποίηση σύνθεσης της διπεπτιδικής γέφυρας Val-Cit.....	48
Μελέτη σύζευξης της ντοσεταξέλης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val- Cit (Docetaxel-Linker)	51
Βελτιστοποίηση σύνθεσης της συζευγμένης γεμισιταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (Gemcitabine-Linker)	53
Βελτιστοποίηση σύνθεσης του συζευγμένου με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit αναλόγου σουνιτινίμπης (SAP-Linker).....	56

Σύζευξη του γεφυρωμένου SAP με το ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (SAP Conjugate)	57
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
1. Σύνθεση μορίων	60
1.1. Όργανα, υλικά και μέθοδοι	60
1.2. Σύνθεση των ενώσεων 1-23	61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	96
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	97
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	98
1. Καθαρισμός/Διαχωρισμός Ενώσεων.....	98
1.1. Χρωματογραφία.....	98
1.1.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) 98	
1.1.2. Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography)	100
2. Ταυτοποίηση Ενώσεων.....	103
2.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	103
2.1.1. Χαρακτηριστικά στοιχεία φασμάτων NMR.....	105
2.1.2. Εφαρμογές φασματοσκοπίας NMR	108
2.2. Φασματομετρία Μαζών (MS).....	109
2.2.1. Χαρακτηριστικά στοιχεία MS.....	110
2.2.2. Εφαρμογές Φασματομετρίας Μαζών.....	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι δυνατό να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του σώματος, ύστερα από απορρύθμιση των μηχανισμών που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Η κλασική μέθοδος που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινική θεραπεία είναι η χημειοθεραπεία, όπου και χορηγούνται στον ασθενή ισχυρά κυτταροτοξικά φάρμακα, τα οποία όμως προκαλούν σοβαρές παρενέργειες λόγω της μειωμένης ειδικότητας και στόχευσης που παρουσιάζουν και της μεγάλης τοξικότητας έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής είναι αρκετά μειωμένη και εναλλακτικές προσεγγίσεις οι οποίες φαίνονται πολλά υποσχόμενες αναπτύσσονται και επικεντρώνονται στη σύνδεση κυτταροτοξικών φαρμάκων με έναν στοχευτικό προσδέτη, ο οποίος αναγνωρίζει το κύτταρο-στόχο, μέσω μιας βιοδιασπώμενης γέφυρας. Τα στοχευτικά προσδέματα που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο είναι αντισώματα και πεπτίδια και στοχεύουν σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη στοχευμένη θεραπεία. Αν και τέτοιου είδους συζεύγματα βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές και εμφανίζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, παρόλα αυτά υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες στην αντιμετώπιση ετερογενών όγκων. Τα συζεύγματα που υπάρχουν όμως φέρουν μόνο έναν αντικαρκινικό παράγοντα και μία στοχευτική ομάδα, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητά τους καθώς οι όγκοι μπορούν να εμφανίσουν ανθεκτικότητα και δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα στο φάρμακο. Για την αντιμετώπιση αυτών των εμποδίων, η ερευνητική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην στοχευμένη θεραπεία με συνδυασμό φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, που μπορεί να επιφέρει σημαντικές βελτιώσεις λόγω της συνεργιστικής δράσης των διαφορετικών κυτταροτοξικών μορίων.

Ελλείψει στοχευτικών συζευγμάτων πολλαπλών φαρμάκων σαν αυτά που περιγράφηκαν πιο πάνω, η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επικεντρώθηκε σε αυτό το σκοπό, την ανάπτυξη δηλαδή μια γενικής μεθοδολογίας που θα επιτρέπει την ορθογωνική σύνθεση διαφόρων στοχευτικών συζευγμάτων δύο ή

περισσότερων αντικαρκινικών φαρμάκων (γεμισιταβίνη, ντοσεταξέλη, σουνιτινίμπη κτλ). Η στρατηγική που ακολουθήθηκε βασίστηκε στη σύνθεση ενός ικρίωματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης, όπου μέσω των ατόμων αζώτου αυτού μπορεί να επιτευχθεί η σύζευξη των φαρμακευτικών μορίων, μέσω μιας βιοδιασπώμενης διπεπτιδικής γέφυρας (Val-Cit) και ενός αυτοκαταστροφικού συνδέτη, ώστε να επιτραπεί η χημική/ενζυμική απελευθέρωση των φαρμάκων στο ενδόσωμα, μετά την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος. Τα άτομα βρωμίου του διπλού δεσμού του ικρίωματος της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για αντιδράσεις σύζευξης με μεγάλο αριθμό στοχευτικών προσδετών, οι οποίοι φέρουν ελεύθερες θειόλες, όπως για παράδειγμα πεπτίδια με κατάλοιπα κυστεΐνης, σχηματίζοντας σταθερούς σουλφιδικούς δεσμούς.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επιτεύχθηκαν αρχικά η σύνθεση ενός πρότυπου ικρίωματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης και του αντίστοιχου ενεργοποιημένου εστέρα και στη συνέχεια η παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα. Με βάση τις συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν στο παρελθόν στα πλαίσια των διατριβών των προηγούμενων ερευνητών του εργαστηρίου, έγινε η σύνθεση της βιοδιασπώμενης διπεπτιδικής γέφυρας Val-Cit σε μεγαλύτερες ποσότητες και η σύνδεση αυτής με τη γεμισιταβίνη και το SAP και βελτιστοποιήθηκε η διαδικασία παραλαβής του τελικού προϊόντος. Εκκρεμεί όμως η σύνδεση της γέφυρας με την ντοσεταξέλη που βρίσκεται σε στάδιο ολοκλήρωσης. Τέλος, επιτεύχθηκε η σύνδεση του γεφυρωμένου SAP στο ικρίωμα της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης, γεγονός που θέτει τη βάση για την εισαγωγή του δεύτερου φαρμάκου (π.χ. γεμισιταβίνη), και στη συνέχεια των στοχευτικών προσδετών που θα προσδώσουν τη στοχευτική ικανότητα στο σύζευγμα.

Επιστημονική περιοχή: Οργανική Χημεία, Οργανική Σύνθεση, Ιατρική Χημεία.

Λέξεις κλειδιά: διβρωμοπυριδαζινοδιόνη, γεμισιταβίνη, σουνιτινίμπη, SAP, ντοσεταξέλη, διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit, στόχευση, αντικαρκινικά φάρμακα, συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων.

ABSTRACT

Cancer is one of the most serious diseases worldwide and it is possible to appear in any organ or tissue of the body, after deregulation of the mechanisms that control the behavior of normal cells. The classic method used as an anti-cancer treatment is chemotherapy, where strong cytotoxic drugs are administered to the patient. However, these drugs cause serious side effects due to their reduced specificity and targeting and the high toxicity against non-diseased cells. For this reason the effectiveness of this method is quite reduced and alternative approaches, which seem promising, are being developed and focus on the conjugation of cytotoxic drugs with a targeting ligand, which recognizes the target cell, through a biodegradable linker. The targeting ligands primarily used are antibodies and peptides which target receptors overexpressed on the surface of cancer cells, resulting in targeted therapy. Although such conjugates are already in clinical trials and show encouraging results, there are still significant difficulties in treating heterogeneous tumors. The conjugates that do exist, however, carry only one anticancer agent and one targeting group, which reduces their effectiveness, as tumors can show resistance and dose-dependent toxicity to the drug. To address these obstacles, the research community has switched their focus to targeted therapy by combining drugs with different mechanisms of action, which can yield significant improvements due to the synergistic action of different cytotoxic molecules.

In the absence of targeting multidrug conjugates like those described above, this master's thesis is focused on this purpose, i.e. the development of a general methodology that will allow the orthogonal synthesis of various targeted conjugates of two or more anticancer drugs (gemcitabine, docetaxel, sunitinib, etc.). The strategy which was followed is based on the synthesis of a dibromopyridazinodione scaffold which employs its nitrogen atoms for the conjugation of the drug molecules through a biodegradable dipeptide bridge (Val-Cit) and a self-destructive linker, which will allow the chemical/enzymatic release of the drugs into the endosome following the endocytosis of the conjugate. The bromine atoms of the double bond of the dibromopyridazinodione scaffold are particularly useful for conjugation

reactions with a large number of targeting ligands, which bear free thiols, such as peptides with cysteine residues, forming stable sulfide bonds.

In the context of the present thesis, the synthesis of a model dibromopyridazinodione scaffold and its corresponding activated ester was initially achieved, followed by their large-scale production.

Based on the synthetic routes followed in the past by previous researchers in our laboratory, the synthesis of the biodegradable Val-Cit dipeptide linker in larger quantities and its conjugation with gemcitabine and SAP was carried out. Also, an optimized process for the isolation of the final conjugated product was achieved. However, the conjugation of the dipeptide linker with docetaxel is currently under investigation and remains to be completed. Finally, the attachment of the conjugated SAP to the dibromopyridazinodione scaffold was achieved, which sets the groundwork for the attachment of the second drug (e.g. gemcitabine) and the introduction of the targeting ligands which will endow the targeting capability to the conjugate.

Scientific area: Organic chemistry, Organic Synthesis, Medicinal Chemistry.

Key words: dibromopyridazinodione, gemcitabine, sunitinib, SAP, docetaxel, Val-Cit dipeptide linker, ligand, targeting, anticancer agents, multi-drug conjugates.

Λίστα συντομογραφιών

ADC	Antibody Drug Conjugate
ADDC	Antibody Dual-Drug Conjugate
AcOH	Acetic acid
BOC	tert-butyloxycarbonyl
BPDDC	Bicycle-Peptide Dual-Drug Conjugate
CDCl ₃	Chloroform-d
Cit	Citrulline
DBDC	Di-tert-butyl dicarbonate
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
diBrPD	Dibromopyridazinodione
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DME	Dimethoxyethane
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EEDQ	N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline
eq.	equivalent
ESI	Electrospray Ionization
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethyl ether
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride
h	Hours
HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
Hex	Hexane
HOBt	Hydroxybenzotriazole
i-PrOH	Isopropyl alcohol
LDC	Ligand-Drug Conjugate
LTDDC	Ligand-Targeted Drug-Drug Conjugate
MeCN	Acetonitrile
MeOH	Methanol
Min	Minutes
MS	Mass Spectrometry
MsCl	Mesyl Chloride
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
Na ₂ SO ₄	Sodium Sulfate Anhydrous
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
PABOH	p-aminobenzyl alcohol
PEA	2-phenethylamine
PDC	Peptide-Drug Conjugate
PDDC	Peptide Dual-Drug Conjugate
PLDDC	Polymer Dual-Drug conjugate
PMA	Phosphomolybdic acid

PNP	p-nitrophenol
RT	Room Temperature
TBDMSCl	tert-Butyldimethylsilyl chloride
TEA	Triethylamine
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
Val	Valine

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος

Μία από τις σημαντικότερες και βασικές ιδιότητες για τη δημιουργία και τη διατήρηση της ζωής των διαφόρων οργανισμών είναι η κυτταρική διαίρεση. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η αρχή γίνεται μέσω ενός μόνο κυττάρου το οποίο πολλαπλασιάζεται, διαιρείται και διαφοροποιείται μέσω του κυτταρικού κύκλου, δημιουργώντας έτσι ένα νέο ζωντανό σύστημα που αναπτύσσεται και μεταβάλλεται συνεχώς. Η σωστή λειτουργία των διαφόρων διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε έναν οργανισμό, εξασφαλίζεται μέσω ενός πολύπλοκου και καλά οργανωμένου συστήματος το οποίο ελέγχει αυστηρά τον κυτταρικό κύκλο και τη διαίρεση ώστε να ανταποκρίνονται στις εκάστοτε απαιτήσεις. Αποκλίσεις και διατάραξη των λειτουργιών αυτών, έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν σε απορρύθμιση του συστήματος και αυτόνομη κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό.

Ο καρκίνος είναι μία μεγάλη ομάδα ασθενειών οι οποίες εμφανίζονται λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 γνωστοί, διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τον τύπο του κυττάρου που επηρεάζεται αρχικά. Είναι δυνατό να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του σώματος, εφόσον ισχύει η προαναφερθείσα προϋπόθεση, και έχει τη δυνατότητα μετανάστευσης. Αυτό γίνεται λόγω της δυνατότητας των συγκεκριμένων κυττάρων να εξαπλώνονται και να εισέρχονται σε παρακείμενα σημεία ή όργανα του σώματος.

Είναι μία ασθένεια του γονιδιώματος, η οποία έχει τις απαρχές της σε φθορές που προκαλούνται στο DNA των κυττάρων οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε λανθασμένες γενετικές πληροφορίες και κατ' επέκταση σε ανωμαλίες κατά τη διάρκεια της γονιδιακής έκφρασης.¹

Τα κύτταρα του οργανισμού που ακολουθούν τον φυσιολογικό κύκλο ζωής, πολλαπλασιάζονται, αναπτύσσονται, διαιρούνται και πεθαίνουν μέσω καθορισμένων μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ονομάζεται απόπτωση, και όταν η διαδικασία αυτή

διαταράσσεται, ο καρκίνος αρχίζει να εμφανίζεται. Πιο συγκεκριμένα, αντίθετα από τα κανονικά κύτταρα, τα καρκινικά δεν εμφανίζουν προγραμματισμένο θάνατο με αποτέλεσμα να συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται, δημιουργώντας μια μάζα μη φυσιολογικών κυττάρων, η οποία παύει πλέον να έγκειται υπό τον έλεγχο των μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου. Ο καρκίνος εμφανίζεται τελικά ως το αποτέλεσμα κυττάρων που αναπτύσσονται με πολύ υψηλούς ρυθμούς, χωρίς να πεθαίνουν και προκαλεί βλάβες στον οργανισμό όταν τα πάσχοντα κύτταρα σχηματίζουν όγκους, που είναι μάζες ιστών ή θρόμβοι, ή εμποδίζουν τις διάφορες λειτουργίες του αίματος, όπως συμβαίνει στη λευχαιμία.^{1,2}

Ως συνέπεια των παραπάνω, οι λειτουργίες των γονιδίων που εκφράζονται και υπό φυσιολογικές συνθήκες και ελέγχουν την ανάπτυξη των κυττάρων, την επιβίωση και την εξάπλωσή τους, εντείνονται ενώ σε αντιπαράβολή εκείνες οι οποίες δρουν κατασταλτικά, παύουν να ενεργούν. Οι μεταβολές αυτές οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο γενετικό κώδικα γίνονται κατά κύριο λόγο μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Ωστόσο, γίνεται ολοένα και μεγαλύτερος λόγος ως προς το ρόλο που παίζουν στη δημιουργία καρκίνου και πολλές μη μεταλλαξιогόνες αλλαγές.⁴⁸⁻⁵⁰

Οι καρκινικές μάζες που σχηματίζονται είναι δυνατό να εξαπλωθούν σε πολλά μέρη του οργανισμού, όπως το νευρικό, πεπτικό και κυκλοφορικό σύστημα ή ακόμα να συμβάλλουν στην παραγωγή ορμονών οι οποίες προκαλούν αλλαγές σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος.

Οι όγκοι οι οποίοι μένουν σε ένα σημείο του σώματος και εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης, θεωρούνται και αντιμετωπίζονται γενικά ως καλοήθεις. Τα χαρακτηριστικά αυτού του είδους όγκων είναι ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν μεταναστεύουν σε γειτονικά όργανα και ιστούς ούτε πολλαπλασιάζονται χωρίς έλεγχο και τα κύτταρα μένουν όλα μαζεμένα σε μία μάζα. Η αφαίρεσή τους γίνεται με χειρουργική επέμβαση και δεν εμφανίζονται συνήθως εκ νέου.^{1,2,3}

Οι πιο επικίνδυνοι, ή κακοήθεις, όγκοι σχηματίζονται όταν:

- ένα καρκινικό κύτταρο επιτυγχάνει να μετακινηθεί μέσα στον οργανισμό χρησιμοποιώντας το αίμα ή τα λεμφικά συστήματα, καταστρέφοντας τον υγιή ιστό, σε μια διαδικασία που ονομάζεται εισβολή
- ένα πάσχον κύτταρο καταφέρνει να διαιρεθεί και να αναπτυχθεί, ενώ την ίδια στιγμή δημιουργεί νέα αιμοφόρα αγγεία που το συντηρούν με μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους είναι η ικανότητα επέκτασης που εμφανίζουν, δηλαδή μπορούν να μεταναστεύουν σε γειτονικά όργανα και ιστούς. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος, όπως έχει γίνει αναφορά προηγουμένως, και δημιουργούν νέους όγκους αφού εισχωρήσουν εκεί. Αφαιρούνται χειρουργικά αλλά επανεμφανίζονται.^{1,2,3}

Το στάδιο κατά το οποίο ένας όγκος εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του σώματος και αναπτύσσεται, εισβάλλει και καταστρέφει άλλους υγιείς ιστούς ονομάζεται μετάσταση. Αυτό το στάδιο του καρκίνου έχει ως αποτέλεσμα μια σοβαρή κατάσταση για τον οργανισμό, που είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστεί. Θεωρείται μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Με βάση τα τελευταία δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organisation-WHO), ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά από τις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος και πριν από τα εγκεφαλικά νοσήματα.

Τα πιο συχνά εμφανιζόμενα είδη καρκίνου για τις γυναίκες είναι ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, ενώ για τους άνδρες ο καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη και του παχέος εντέρου.⁴

Όπως γίνεται κατανοητό η συγκεκριμένη ασθένεια αποτελείται από πολλά στάδια και επηρεάζεται από εξίσου πολλούς παράγοντες, οι οποίοι όταν δρουν παράλληλα ή σωρευτικά μπορούν να προκαλέσουν στο μέλλον την δημιουργία καρκίνου.

Οι παράγοντες οι οποίοι είναι πιο πιθανό να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου, μπορεί να είναι κάποιοι από τους:

- Μολυσματικοί, όπως για παράδειγμα οι ιοί (HIV)
- Περιβαλλοντικοί, όπως διάφορες χημικές ουσίες και ακτινοβολίες
- Τρόπος ζωής, όπως κάπνισμα, υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, κακή διατροφή κτλ
- Αλλαγές του γενετικού υλικού, όπως διάφορες μεταλλάξεις.¹

Τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη της έρευνας στη Βιολογία μοριακού επιπέδου στοχεύει κυρίως στη μελέτη των γονιδίων που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα και έχει καταφέρει να τα κατηγοριοποιήσει σε δύο βασικές ομάδες, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία έχουν το δικό τους μοναδικό ρόλο στην καρκινογένεση.

Τα ογκογονίδια ενεργοποιούνται από γενετικές μεταβολές σε κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια που επηρεάζουν ποσοτικά την έκφρασή τους ή τη δομή και λειτουργία τους. Τα πρωτο-ογκογονίδια ελέγχουν τις κυτταρικές διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης υπό κανονικές συνθήκες. Στην περίπτωση που λάβουν χώρα γονιδιακές μεταλλάξεις ή ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων, τότε είναι δυνατό να γίνει μετατροπή των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια, τα οποία θα οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου.

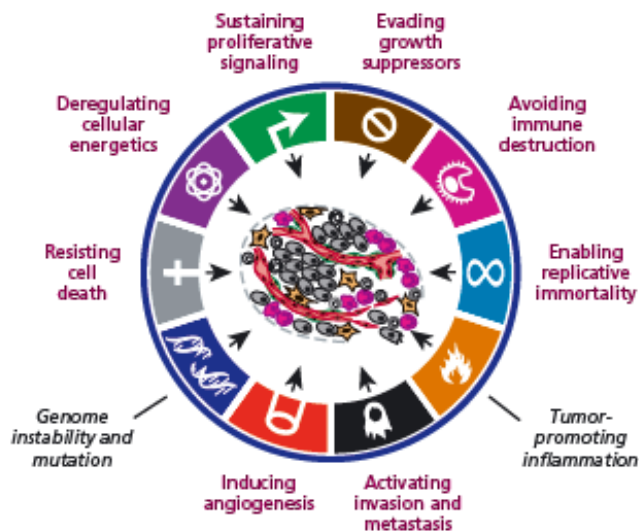
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω πολλών βιοχημικών μηχανισμών και καταστέλλουν την δημιουργία όγκων μέσω ρύθμισης της δράσης των πρωτο-ογκογονιδίων. Η απενεργοποίησή τους και η απώλεια λειτουργικότητας καθενός εκ των βιοχημικών μηχανισμών, αυξάνει την πιθανότητα ένα κύτταρο να υποστεί νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Η απώλεια ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου συμβαίνει πολύ πιο συχνά στην ανάπτυξη ενός όγκου από ότι η ενεργοποίηση ενός πρωτο-ογκογονιδίου.⁴⁸⁻⁵⁰

Σημαντικός παράγοντας στην εμφάνιση καρκίνου, είναι επίσης και η μη λειτουργία γονιδίων τα οποία ελέγχουν την παραγωγή ενζύμων

επιδιόρθωσης. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για ρύθμιση λαθών του γενετικού υλικού τα οποία προκύπτουν είτε λόγω εξωτερικών παραγόντων, όπως είναι τα διάφορα χημικά ή οι ακτινοβολίες, είτε από τυχαία σφάλματα κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA. Με βάση τα παραπάνω, ορίστηκαν ως καρκινογόνοι παράγοντες, οποιοδήποτε αίτιο μετάλλαξης γονιδίων το οποίο έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου δυνητικά.^{2,3}

Μεγάλο βήμα στην κατανόηση της ασθένειας αλλά και στην αντιμετώπισή της, αποτελεί η διατύπωση των χαρακτηριστικών που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα από τους Hanahan και Weinbergg. Τα πάσχοντα κύτταρα λοιπόν, διαθέτουν ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται τόσο με την δημιουργία όσο και με την εξάπλωση του όγκου και μπορούν να καθορίσουν την εικόνα της εκάστοτε νεοπλασίας όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση αλλά και την ανάπτυξη ή την θανάτωσή τους (Εικόνα 1). Γενικά, παρουσιάζονται πολλές διαφορές ανά είδος καρκίνου, ωστόσο ορισμένα γνωρίσματα των πασχόντων κυττάρων τείνουν να είναι πανομοιότυπα στην πλειάδα των διαφόρων μορφών νεοπλασιών. Αυτά συνοψίζονται επιγραμματικά στα παρακάτω:

1. Αντίσταση στους μηχανισμούς της απόπτωσης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
2. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής
3. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
4. Φλεγμονή που επάγει την ανάπτυξη όγκου
5. Ενεργοποίηση της δυνατότητας εισχώρησης και μετάστασης
6. Επαγωγή της αγγειογένεσης
7. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις
8. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
9. Απορρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας και της κυτταρικής ενέργειας
10. Καταστολή αντι-αυξητικών σημάτων



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου (Hallmarks of Cancer. *Cell* 144, 2011).

Για την εξασφάλιση της ανάπτυξης και της εκτέλεσης των διαφόρων λειτουργιών τους, οι όγκοι πρέπει να προσλαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο αλλά και να έχουν τη δυνατότητα να απεκκρίνουν απόβλητα του μεταβολισμού τους και διοξείδιο του άνθρακα, με τον ίδιο σκεπτικό με το οποίο επιβιώνουν και οι φυσιολογικοί ιστοί. Για να διασφαλιστούν τα παραπάνω, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα μηχανισμό αγγειογένεσης, μέσω του οποίου δημιουργούνται νέα αιμοφόρα αγγεία από τα ήδη υπάρχοντα. Με αυτό τον τρόπο, οι νεοπλασίες αναπτύσσονται σε μέγεθος και τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν να εισχωρήσουν στο αίμα και να μεταφερθούν σε απομακρυσμένα σημεία του οργανισμού, κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως μετάσταση.

Η αγγειογένεση είναι μία διαδικασία η οποία συμβαίνει φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη των εμβρύων για το σχηματισμό νέων αγγείων ενώ στους υγιείς ενήλικες λαμβάνει χώρα μόνο όταν είναι απαραίτητο όπως για παράδειγμα κατά την επούλωση τραυμάτων ή κατά τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου στις γυναίκες. Ενώ λοιπόν, υπό κανονικές συνθήκες η κατάσταση αυτή δεν είναι συνεχής, κατά την ανάπτυξη μιας νεοπλασίας εμφανίζει την ακριβώς αντίθετη τάση. Η αγγειογένεση συμβαίνει διαρκώς μέσω της ενεργοποίησης ορισμένων μηχανισμών, οι οποίοι παραμένουν ενεργοί επ' αόριστον, αναγκάζοντας τα φυσιολογικά αγγεία να παράγουν

διαρκώς καινούρια, τα οποία αποτελούν τρόπο επιβίωσης και εξάπλωσης των καρκινικών όγκων. Τα νέα αιμοφόρα αγγεία που δημιουργούνται από τα πάσχοντα κύτταρα, εμφανίζουν αρκετά αποκλίνοντα χαρακτηριστικά σε σχέση με τα φυσιολογικά και αυτό γιατί δέχονται απορρυθμισμένα προαγγειογόνα σήματα που εκτός των άλλων διατηρούν συνεχώς ενεργοποιημένη την αγγειογένεση. Τα αγγεία είναι διαφοροποιημένα, φαίνεται να έχουν παραμορφώσεις και διευρύνσεις, πολλές σε αριθμό και πολυπλοκότητα διακλαδώσεις, πρόωρο τριχοειδή βλαστό, ακανόνιστη ροή αίματος και διαταραχές στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.^{5,48-51}

Για την αντιμετώπιση του καρκίνου, οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται είναι:

1. Η *χειρουργική επέμβαση*, η οποία εφαρμόζεται σε συμπαγείς όγκους, και έχει ως στόχο την αφαίρεση του συσσωματώματος αλλά και των γειτονικών ιστών όπου μπορεί να έχει γίνει εισχώρηση καρκινικών κυττάρων. Στην περίπτωση που ο όγκος είναι εντοπισμένος η τεχνική αυτή συνήθως οδηγεί και στην ίαση του ασθενή.
2. Η *χημειοθεραπεία*, κατά τη διάρκεια της οποίας χορηγούνται στον ασθενή ιδιαίτερα κυτταροτοξικά φάρμακα που φτάνουν σε πολλά μέρη του οργανισμού μέσω του κυκλοφορικού συστήματος και δρουν ενάντια των καρκινικών κυττάρων. Συνήθως, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις διάχυτων καρκινωμάτων και όγκων με ταχεία αναπαραγωγή, όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι εφικτή. Τα φάρμακα που χορηγούνται στοχεύουν σε κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς και για το λόγο αυτό πέραν των πασχόντων κυττάρων σκοτώνουν και φυσιολογικά με αποτέλεσμα την εμφάνιση όλων των γνωστών παρενεργειών όπως απώλεια μαλλιών, ναυτία κτλ.
3. Η *ακτινοθεραπεία*, όπου γίνεται έκθεση του εντοπισμένου καρκινικού όγκου σε ακτινοβολία υψηλής ενέργειας με στόχο την καταστροφή ή τον έλεγχο των πασχόντων κυττάρων, χωρίς να επηρεάζει τους περιβάλλοντες ιστούς.

4. Η ανοσοθεραπεία, κατά τη διάρκεια της οποίας διεγείρεται το ανοσοβιολογικό σύστημα του οργανισμού με σκοπό την δράση του έναντι των καρκινικών κυττάρων. Ο μηχανισμός στον οποίο στηρίζεται αυτή η μέθοδος, κάνει χρήση των λευκών αιμοσφαιρίων (και συγκεκριμένα των κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων), που φυσιολογικά έχουν αμυντικό ρόλο έναντι των λοιμώξεων, και τα ενεργοποιεί ώστε να οδηγήσουν στην καταστροφή των νεοπλασιών.

7-9

2. Στοχευμένη χημειοθεραπεία με θεραπευτικά συζεύγματα

2.1. Χημειοθεραπεία μέσω στοχευτικού προσδέτη (Ligand-Targeted Drug Therapy)

Από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω, αυτή που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη θεραπεία νεοπλασιών είναι η χημειοθεραπεία και επί πολλές δεκαετίες ήταν συνυφασμένη με τον καρκίνο. Κατά τη διάρκεια αυτής, όπως ήδη ειπώθηκε, χορηγούνται στους ασθενείς πολύ ισχυρά κυτταροτοξικά φάρμακα τα οποία στοχεύουν σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό. Αυτό σημαίνει ότι επηρεάζονται όμως και φυσιολογικά κύτταρα του σώματος που εμφανίζουν ταχεία διαίρεση όπως τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα του αίματος και του δέρματος, με συνέπεια αυτού να είναι οι γνωστές παρενέργειες, απώλεια μαλλιών, αναιμία, ναυτία, εμετός, αίσθημα κόπωσης.

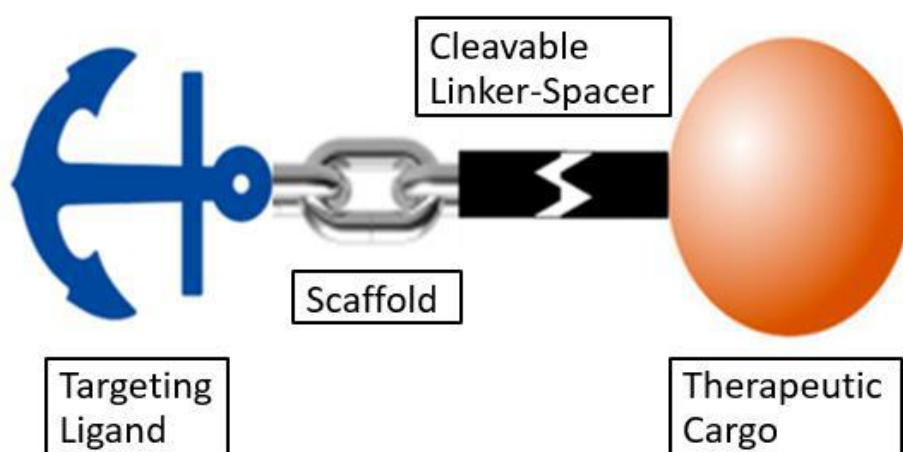
Για την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων αυτών ενεργειών, γίνονται προσπάθειες σχεδιασμού νέων στρατηγικών οι οποίες θα προσφέρουν στοχευμένη δράση και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της εφαρμοζόμενης θεραπείας. Αυτό φαίνεται δυνατό να πραγματοποιηθεί μέσω της χρήσης συζευγμάτων φαρμάκου-προσδέτη (ligand-drug conjugates, LDCs), τα οποία δρουν αποκλειστικά και μόνο στους πάσχοντες ιστούς λόγω της αυξημένης εξειδίκευσης και της μειωμένης τοξικότητάς τους έναντι των φυσιολογικών.

12, 13, 47

Τα συζεύγματα αυτά παρουσιάζουν πολλά θετικά στοιχεία καθώς για αρχή έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς των θεραπευτικών ουσιών με εκλεκτικό

τρόπο στα πάσχοντα κύτταρα, χωρίς να επηρεάζονται τα υγιή από παράπλευρη τοξικότητα λόγω μη εξειδικευμένης στόχευσης. Επίσης, καθιστούν δυνατή τη χρήση ισχυρότερων φαρμάκων στη μεγαλύτερη ανεκτή δόση, τα οποία όταν χορηγούνται στους ασθενείς με μη ειδική πρόσληψη δεν επιφέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τέλος, τα συζεύγματα φαρμάκου-προσδέτη φαντάζουν ως πιθανοί διαγνωστικοί παράγοντες καθώς μπορούν να φανούν χρήσιμα στον εντοπισμό μη φυσιολογικών κυττάρων που εκφράζουν σε υπερβολικό βαθμό τον υποδοχέα-στόχο και επομένως να βοηθήσουν στη διαλογή των ασθενών.

Η δομή των φαρμάκων με στοχευτικό προσδέτη αποτελείται γενικά από τέσσερα τμήματα, τη στοχευτική ομάδα (targeting ligand) η οποία είναι συνδεδεμένη με τη φαρμακευτική ουσία μέσω ενός ικριώματος (scaffold), μιας διασπώμενης γέφυρας/δεσμού (cleavable linker) και ενός διαχωριστή (spacer) (Εικόνα 2). Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στοχευτικών προσδετών που μελετώνται από την επιστημονική κοινότητα με τους επικρατέστερους να είναι τα αντισώματα, τα πολυμερή, τα απταμερή, πεπτίδια αλλά και μικρού μοριακού βάρους μη-πεπτιδικά μόρια και μικρά πρωτεϊνικά μόρια. Τα συζεύγματα φαρμάκων με αντισώματα φαίνεται να είναι τα περισσότερο υποσχόμενα και με καλύτερα αποτελέσματα μέχρι στιγμής, με ορισμένα από αυτά να έχουν φτάσει ήδη σε επίπεδα κλινικών μελετών.^{10,11,46}



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός συζεύγματος φαρμάκου με στοχευτικό προσδέτη (ligand-targeted drug, LTD) (Srinivasarao, M., et al., *Chem. Rev.* **2017**, 117, 12133–12164).

Η αποτελεσματικότητα του συζεύγματος εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το πόσο ισχυρό είναι το φορτίο που φέρει ο προσδέτης, ενώ η ασφάλειά του καθορίζεται από την εξειδίκευση της στοχευτικής ομάδας ανάλογα με το είδος του πάσχοντος κυττάρου, δηλαδή της ικανότητας αναγνώρισης και πρόσδεσης στον υποδοχέα που υπερεκφράζεται στο κύτταρο-στόχο. Έχοντας τα δύο σημαντικότερα χαρακτηριστικά του συζεύγματος, την εκλεκτικότητα και την θεραπευτική δράση, σε διαφορετικά σημεία πάνω στο σκελετό του, δίνεται η δυνατότητα ανεξάρτητων τροποποιήσεων με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων του.^{10,11}

Οι βιοδιασπώμενες γέφυρες οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να εμφανίζουν σταθερότητα όταν βρίσκονται στην συστηματική κυκλοφορία του αίματος, επιτρέποντας όμως ταυτόχρονα την αποτελεσματική απελευθέρωση του φαρμάκου στη θέση-στόχο, ούτως ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη μεταφορά του φαρμάκου στον όγκο. Ωστόσο, η συμφωνία με όλες αυτές τις προϋποθέσεις καθιστά τη σύνθεση των γεφυρών μία ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία, η οποία υπόκειται διαρκώς βελτιστοποιήσεις για την επίτευξη συστημικής σταθερότητας αλλά και αποτελεσματικής απελευθέρωσης.

Οι γέφυρες μπορούν να καταταχθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες έχοντας ως βάση τον μηχανισμό απελευθέρωσης του φαρμάκου, τις διασπώμενες και τις μη διασπώμενες. Με τη σειρά τους οι διασπώμενες διακρίνονται σε χημικά και ενζυμικά διασπώμενες, ανάλογα με το πού έχουν σχεδιαστεί να εμφανίζουν ευαισθησία. Οι φυσιολογικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν τη διάσπασή τους είναι η συγκέντρωση γλουταθειόνης, το pH και η διάσπαση από πρωτεάσες, ένζυμα που εκφράζονται ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα ή/και στο μικροπεριβάλλον του όγκου.²⁵

Τα συζεύγματα πρώτης γενιάς είχαν ως υπόβαθρο δισουλφίδια και υδραζόνες, καθώς οι γέφυρες που δημιουργούνται είναι χημικά διασπώμενες και εμφανίζουν σταθερότητα στο ουδέτερο pH του αίματος. Οι γέφυρες υδραζόνης διασπώνται στο όξινο περιβάλλον των ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων των καρκινικών κυττάρων, ενώ οι δισουλφιδικές γέφυρες

διασπώνται από γλουταθειόνη που έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κύτταρα του όγκου έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Επίσης, οι γέφυρες με βάση τα πεπτίδια αποτελούν ειδικά υποστρώματα για πρωτεάσες (π.χ. καθεψίνη B), που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα καρκινικά κύτταρα.²⁵

Με αύξηση του pH και προσέγγιση της βασικότητας, η ευαισθησία στην καθεψίνη B αυξάνεται και για το λόγο αυτό η ύπαρξη ενός υδρόφιλου αμινοξέος (π.χ. Arg, Cit) κρίνεται απαραίτητη στο σχεδιασμό. Μεταξύ των Arg και Cit, προτιμάται η κιτρουλίνη (Cit), η οποία είναι ισοηλεκτρονική με την αργινίνη (Arg) και παρόλο που εμφανίζει τη μικρότερη βασικότητα, είναι πολύ πιο εύκολο να συντεθεί. Ταυτόχρονα στη γέφυρα θα πρέπει να υπάρχει και ένα υδρόφοβο αμινοξύ (Phe, Val, Ala) το οποίο θα επιτρέπει τη διάσπασή της από την καθεψίνη B, ενώ θα της προσδίδει επιπλέον σταθερότητα στο πλάσμα. Για τη συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήθηκε η διπεπτιδική γέφυρα βαλίνης-κιτρουλίνης (Val-Cit), η οποία διασπάται εκλεκτικά στα λυσοσώματα από την καθεψίνη B (Cathepsin-B), επιτρέποντας την απελευθέρωση των φαρμάκων στο ενδόσωμα μετά την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος.²⁵

Η Cathepsin-B είναι μια κυστεϊνοπρωτεάση με δράση ουβικιτίνης, η οποία υπάρχει σχεδόν αποκλειστικά στα λυσοσώματα και υπερεκφράζεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, όπου μπορεί να παρουσιάζει και εξωκυτταρική δραστηριότητα. Αποτελεί μία από τις βασικές πρωτεάσες που συμμετέχουν στα διάφορα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου, όπως είναι οι κασπάσες και η καλπαΐνη.²⁵

Επίσης, λόγω του στερικού όγκου του θεραπευτικού φορτίου, απαιτείται ένας αυτοκαταστροφικός συνδέτης (self-immolating linker) ανάμεσα στο φάρμακο και την διπεπτιδική γέφυρα, που θα εξασφαλίζει την απελευθέρωση του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιηθεί η p-αμινοβενζυλική αλκοόλη (p-aminobenzyl alcohol, PABOH), που αποσυντίθεται υδρολυτικά έπειτα από αντίδραση απακυλίωσης. Η αυτοκαταστροφική φύση της PABOH απαιτείται για την απελευθέρωση του καθαρού, μη τροποποιημένου φαρμάκου. Η γέφυρα Val-Cit-PABOH εμφανίζει

υψηλή σταθερότητα στο πλάσμα και έχει βρεθεί ότι είναι ανώτερη έναντι των χημικά διασπώμενων γεφυρών.^{25,26}

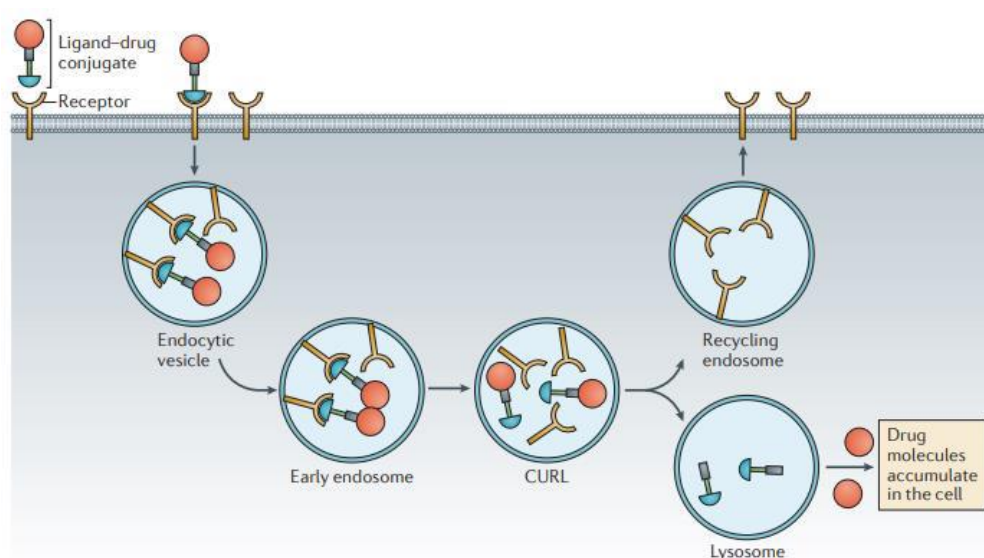
2.2. Επαγόμενη ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα (Receptor-Mediated Endocytosis, RME)

Η ενδοκυττάρωση ή αλλιώς ενδοκύττωση αποτελεί μια διαδικασία μη εκλεκτικής μεταφοράς υλικού από το εξωτερικό στο εσωτερικό ενός κυττάρου, σε περιπτώσεις όπου η είσοδος των εκάστοτε ουσιών δεν καθίσταται δυνατή μέσω παθητικής διάχυσης. Μόρια τα οποία συνήθως αντιμετωπίζουν δυσκολία διάσχισης των μεμβρανών είναι τα μακρομόρια όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες, ενώ στην περίπτωση των συζευγμάτων αυτά με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 500Da δεν καταφέρνουν να διαπεράσουν τις μεμβράνες με διάχυση και γι' αυτό το λόγο μεταφέρονται μέσω ενδοκύττωσης. Για να επιτευχθεί εκλεκτικότητα του συζεύγματος προτιμώνται εξωκυττάριοι υποδοχείς, έναντι των ενδοκυττάρων όπως για παράδειγμα οι στεροειδείς ορμόνες, γιατί στη δεύτερη περίπτωση απαιτείται διαπέραση των μεμβρανών και επομένως χάνεται η δυνατότητα στοχευμένης προσβολής των πασχόντων κυττάρων καθώς πέραν αυτών γίνεται εισβολή και στα φυσιολογικά, προκαλώντας σοβαρές βλάβες.

Με βάση τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι ο υποδοχέας που θα χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση θα πρέπει να ανταποκρίνεται σε ορισμένα κριτήρια. Βασική προϋπόθεση αποτελεί η υπερέκφραση αυτού στα καρκινικά κύτταρα μόνο και όχι στα φυσιολογικά, ώστε να παρουσιάζει στοχευμένη δράση. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να βρίσκεται στο εξωτερικό του κυττάρου και μετά την πρόσδεση του συζεύγματος σε αυτόν, να μεταφέρει το θεραπευτικό φορτίο στο εσωτερικό.

Η στοχευτική ομάδα του συζεύγματος αναγνωρίζει και προσδένεται στον εκάστοτε υποδοχέα, ο οποίος υπερεκφράζεται στα πάσχοντα κύτταρα των οποίων επιθυμείται η θεραπεία. Το σύζευγμα (LDC) ύστερα εισχωρεί ταχέως στο κύτταρο με τη διαδικασία της επαγόμενης ενδοκυττάρωσης μέσω υποδοχέα και εσωτερικεύεται σχηματίζοντας ένα κυστίδιο, το οποίο

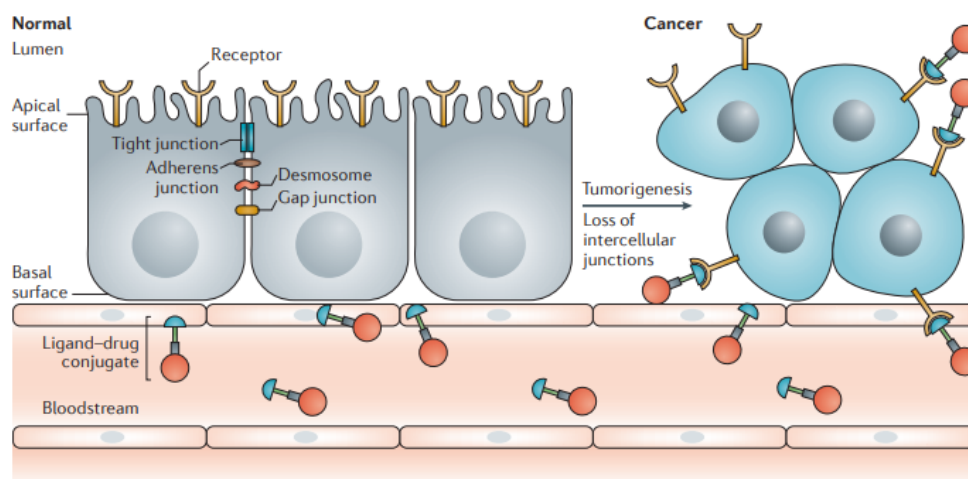
χαρακτηρίζεται με τον όρο «πρώιμο ενδοσώμα». Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε διαμερίσματα στο εσωτερικό του κυττάρου και ειδικότερα στο λεγόμενο CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand) όπου συμβαίνει η αποσύνδεση του προσδέτη από τον υποδοχέα, λόγω μείωσης του pH σε περίπου 5. Επόμενο βήμα της διαδικασίας είναι η παραλαβή του αποσυνδεδεμένου υποδοχέα αλλά και του φορτίου που έφερε, από τα ενδοσώματα (Εικόνα 3). Αυτά επιτρέπουν την ανακύκλωση του υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, δίνοντάς του τη δυνατότητα να λάβει μέρος σε επιπλέον γύρο ενδοκυττάρωσης αλλά επίσης μπορούν να μεταφέρουν αυτόν και το φορτίο του στα λυσοσώματα όπου και γίνεται η αποσύνθεσή τους. Ένας ιδανικός υποδοχέας είναι αυτός που ανακυκλώνεται συχνά ή ανασυντίθεται ταχεία μετά την αποσύνθεσή του.^{11,13}



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας επαγόμενης ενδοκυττάρωσης μέσω υποδοχέα (Srinivasarao, M., et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 203-219).

Ο σχεδιασμός των συζευγμάτων αντικαρκινικών φαρμάκων έχει ως στόχο συγκεκριμένους εξωκυττάριους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, ώστε η προσβολή να είναι εκλεκτική και να μην επηρεάζονται τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι υποδοχείς που συναντώνται στην επιφάνεια ενός υγιούς επιθηλιακού κυττάρου και υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι περιορισμένοι και μη προσβάσιμοι από φάρμακα που χορηγούνται παρεντερικά, παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα καθώς ύστερα από τον κακοήγη μετασχηματισμό οι διακλαδώσεις μεταξύ τους καταστρέφονται με

αποτέλεσμα την κατανομή τους με τυχαίο τρόπο στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου (Εικόνα 4) . Αυτό με τη σειρά του, τα καθιστά εύκολο στόχο για φάρμακα με στοχευτικό προσδέτη και εξαιρετική διέξοδο στη θεραπεία του καρκίνου, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των νεοπλασμάτων προέρχονται από κύτταρα του επιθηλίου.^{11,13}



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων και του αποτελέσματος αυτού στην προσβασιμότητα των επιφανειακών υποδοχέων (Srinivasarao, M., et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 203-219).

2.3. Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates)

Τα συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων είναι μία προσέγγιση στην αντικαρκινική θεραπεία, η οποία έχει ως βασικό στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Ενισχύει την κυτταροτοξικότητα και την στοχευτική δράση, μέσω της σύζευξης με στοχευτικούς προσδέτες (π.χ. πεπτίδια, αντισώματα) οι οποίοι δρουν εκλεκτικά στους υποδοχείς που υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και αυξάνει την εκλεκτικότητα ενώ ταυτόχρονα μειώνει της παρενέργειες και την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα χορηγούμενα φάρμακα. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της ταυτόχρονης χορήγησης διαφορετικών θεραπευτικών ουσιών με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, οι οποίες δρώντας συνεργιστικά εμποδίζουν την εμφάνιση αντίστασης του οργανισμού, ενισχύουν την αποτελεσματικότητα και μειώνουν την εμφάνιση δοσοεξαρτώμενης τοξικότητας. Στοχεύοντας

διαφορετικές βιολογικές οδούς σηματοδότησης και προσβάλλοντας τα καρκινικά κύτταρα σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους, σε σχέση με την μεμονωμένη δράση που έχουν στην κλασική χημειοθεραπεία, επιτυγχάνεται η μείωση της απαιτούμενης δοσολογίας του καθενός από τα φάρμακα και κατά συνέπεια αποφεύγεται η θανάτωση υγιών ιστών μαζί με τους πάσχοντες και άρα οι παρενέργειες που εμφανίζονται στην κλασική θεραπεία όπως απώλεια μαλλιών, ζαλάδες, εμετοί.

Οι υπάρχουσες στρατηγικές για το σχεδιασμό στοχευτικών συζευγμάτων βασίζονται στη σύζευξη ενός μόνο αντικαρκινικού παράγοντα με το στοχευτικό πρόσδεμα και παρόλο που έχουν επιτευχθεί σημαντικά κλινικά οφέλη από αυτές, αποδεικνύονται συνήθως μη αποτελεσματικές για τη θεραπεία ετερογενών όγκων που περιέχουν κυτταρικούς πληθυσμούς με διαφορετικές αποκρίσεις σε φάρμακα. Έτσι, γίνεται ακόμα περισσότερο επιτακτική και κατανοητή η ανάγκη για τη δημιουργία συζευγμάτων με πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο.

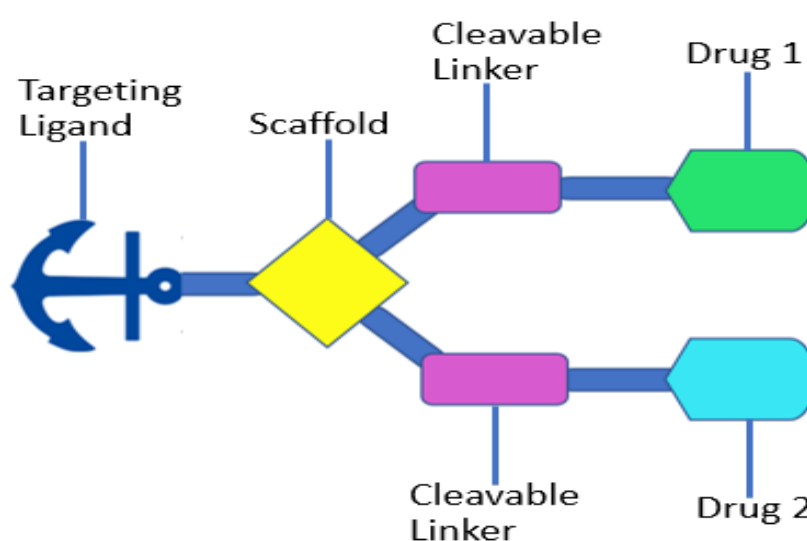
Η συνδυαστική θεραπεία πρέπει, όπως γίνεται εμφανές από τα παραπάνω, να ανταπεξέλθει σε έναν πολύ δύσκολο ρόλο, αυτόν του συνδυασμού της φαρμακοκινητικής και της κυτταρικής πρόσληψης διαφορετικών φαρμακευτικών μορίων.^{18,19}

Ένας από τους πιο διαδεδομένους και προσφιλείς τρόπους σχεδιασμού ενός συζεύγματος σαν αυτό που περιγράφηκε παραπάνω, απαρτίζεται από στάδια τα οποία περιλαμβάνουν αρχικά τη σύνδεση διαφορετικών θεραπευτικών μορίων μέσω χημικών γεφυρών, σε ένα κοινό μέσο (ικρίωμα) και ύστερα την ταυτόχρονη μεταφορά και απελευθέρωσή τους στον τόπο δράσης τους. Υπάρχει μια αρκετά μεγάλη ποικιλία συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, όπως είναι τα λιποσώματα, τα πολυμερή και τα νανοσωματίδια, τα οποία μπορούν να φέρουν συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων. Ωστόσο, κρίνεται ύψιστης σημασίας ο έλεγχος της απόδοσης φόρτωσής τους όπως επίσης και της κινητικής απελευθέρωσης του ωφέλιμου φορτίου τους.

Από τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής στον κλάδο αυτό έχουν καταφέρει να λάβουν έγκριση πέντε συζεύγματα φαρμάκων με αντισώματα

(ADCs) ενώ εκατοντάδες είναι αυτά στα οποία γίνεται διερεύνηση σε διάφορα στάδια κλινικής ανάπτυξης. Τα συζεύγματα φαρμάκων με πολυμερή είναι ένα εξίσου πολλά υποσχόμενα όπως επίσης και αυτά με στοχευτικά πεπτίδια (Peptide-Drug Conjugates, PDCs), τα οποία φαίνεται να μπορούν να δώσουν πολύ καλά αποτελέσματα και ευελιξία στο σχεδιασμό. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν τα PDCs είναι η μεγαλύτερη ευχέρεια διείσδυσης στους ιστούς, η αυξημένη δυνατότητα φόρτωσης και η αναπαραγωγικότητά τους καθώς επίσης και το χαμηλό κόστος παραγωγής σε σχέση με τις υπόλοιπες στοχευτικές θεραπείες. Επιπλέον, προσδίδουν αυξημένη ισχύ στο παραγόμενο σκεύασμα και υψηλή αντικαρκινική δράση λόγω της μεγάλης ειδικότητας και στόχευσης που προσφέρουν.¹⁹⁻²¹

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των διαφορετικών αυτών προσεγγίσεων, αυτές βασίζονται μέχρι στιγμής στη σύζευξη ενός μόνο αντικαρκινικού παράγοντα με μια στοχευτική ομάδα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο φάρμακο, αυξημένη δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα και μειωμένη αποτελεσματικότητα. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου έχει στραφεί στη στοχευτική θεραπεία με σύζευξη δύο ή και περισσότερων φαρμάκων, η οποία φαίνεται ικανή να αντιμετωπίσει τα προβλήματα που προκύπτουν από τη χορήγηση ενός μόνο χημειοθεραπευτικού φαρμάκου.¹⁹⁻²¹



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση συζεύγματος με στοχευτικό προσδέτη και διπλό θεραπευτικό φορτίο.

Το βασικό πρωτόκολλο για τη σύνθεση συζευγμάτων φαρμάκων με στοχευτικό προσδέτη (Σχήμα 1) αποτελείται από πέντε βασικά στάδια:

- Σύνθεση του ικρίωματος για την πρόσδεση των φαρμάκων και των στοχευτικών προσδετών.
- Σύνθεση της γέφυρας (Linker) που επιτρέπει τη χημική/ενζυμική απελευθέρωση του φαρμάκου.
- Σύζευξη των φαρμάκων με τη γέφυρα (Drug-Linker).
- Σύζευξη των συνδεδεμένων με τα φάρμακα γεφυρών με το ικρίωμα (Multi-Drug Conjugate, MDC).
- Σύζευξη του MDC με τον στοχευτικό προσδέτη (Ligand-Targeted-Multi-Drug Conjugate, LTMD).^{22,46,47}

3. Στρατηγική σύνθεσης συζευγμάτων με πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο

3.1. Ικρίωμα Διβρωμοπυριδαζινοδιόνης

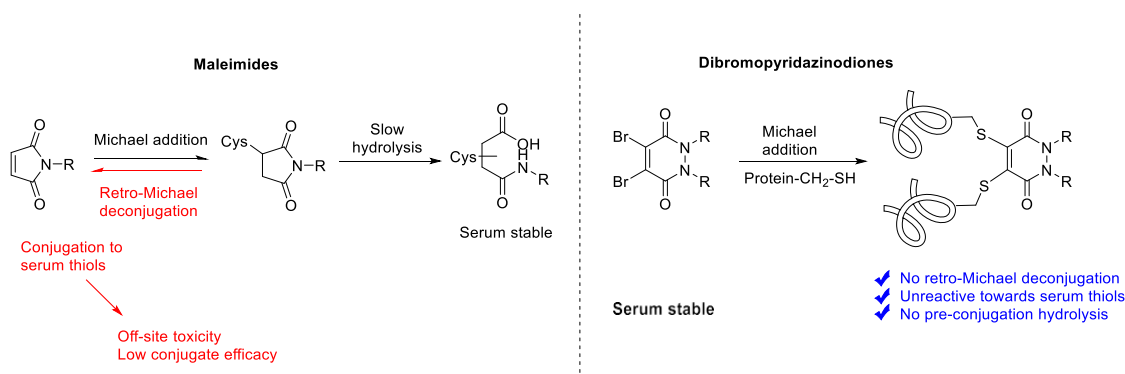
Για τη σύζευξη των πρωτεϊνών (protein bio-conjugation), η επιστήμη τις τελευταίες δεκαετίες έχει επικεντρωθεί στη χρήση της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (di-BrPD). Το μόριο αυτό επιτρέπει το συνδυασμό δύο επιστημών, της οργανικής χημείας με τη μοριακή βιολογία, καθώς έχει δώσει τη δυνατότητα δημιουργίας μιας σειράς πρωτεϊνών και πεπτιδίων ως ανιχνευτών, γεγονός που έχει επιφέρει σημαντικές διευκολύνσεις και στους δύο κλάδους.

Τα μαλεϊμίδια έχουν βρει πολλές φορές εφαρμογή στην δημιουργία στοχευτικών συζευγμάτων αντισώματος-φαρμάκου (ADCs) και πεπτιδίου-φαρμάκου (PDCs). Αυτό συμβαίνει λόγω των πλεονεκτικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν εξαιτίας της θειόλης της κυστεΐνης η οποία συμμετέχει στη βιοσύζευξη. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

- i. υψηλή πυρηνοφιλία της πλευρικής αλυσίδας θειόλης σε ουδέτερο pH ($pK_a \approx 8$)
- ii. χαμηλή φυσική διαθεσιμότητα (<2%)

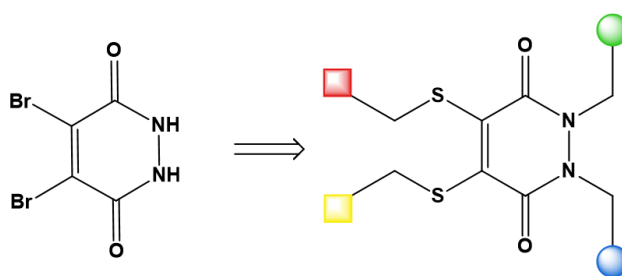
iii. ευκολία ενσωμάτωσης μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης.

Ωστόσο ταυτόχρονα παρουσιάζουν και ορισμένα μη ευνοϊκά γνωρίσματα, όπως η μη αντιστρεπτή αντίδραση με τις θειόλες του αίματος, η οποία παρόλο που γίνεται ταχύτατα και εκλεκτικά, οδηγεί σε παράπλευρη τοξικότητα και μειωμένη αποτελεσματικότητα έναντι του καρκίνου. Επίσης, δίνουν συχνά retro-Michael αντιδράσεις αποσύζευξης (retro-Michael deconjugation reactions), με αποτέλεσμα την αποσύζευξη γέφυρας-φαρμάκου από το σύζευγμα, οδηγώντας σε μειωμένη αντικαρκινική δράση και αυξημένη περιφερειακή τοξικότητα, λόγω της μη στοχευμένης απελευθέρωσης του φαρμάκου (Εικόνα 5). Επιπλέον, στον ορό του αίματος λαμβάνει χώρα υδρόλυση του συζεύγματος μιας και αυτό δεν είναι σταθερό, επομένως χάνεται ποσότητα του φαρμάκου.^{23, 24}



Εικόνα 5. Διαφορές στη δράση μεταξύ μαλεϊμιδίων και διβρωμοπυριδαζινοδίων.

Η χρήση διβρωμοπυριδαζινοδίων (diBrPDs) σε εφαρμογές βιοσυζεύξεων και ειδικότερα στη σύνθεση στοχευτικών συζευγμάτων, όπως τα ADCs, αναδεικνύουν τα σημαντικά πλεονεκτήματά τους έναντι των μαλεϊμιδίων. Μερικά από αυτά είναι η μεγαλύτερη σταθερότητά τους και η αποφυγή υδρόλυσης στο αίμα, η μη πραγματοποίηση retro-Michael αποσύζευξης καθώς επίσης και το γεγονός ότι δεν πραγματοποιούν αντιδράσεις με τις θειόλες του αίματος. Επιπλέον, εμφανίζουν συμβατότητα με κοινά ήπια αναγωγικά μέσα και το ακόρεστο κυκλικό ικρίωμα είναι σταθερό σε υδατικές συνθήκες.^{23, 24}



Εικόνα 6. Ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης (di-BrPD) συνδεδεμένο με τέσσερις διαφορετικές λειτουργικές ομάδες.

Οι diBrPDs αποτελούν ιδανικά μόρια για αντιδράσεις σύζευξης-προσθήκης με στοχευτικές ομάδες που φέρουν ελεύθερες θειόλες, όπως στοχευτικά πεπτίδια και αντισώματα, μιας και έχουν τέσσερα σημεία πρόσδεσης. Αυτά είναι τα δύο άτομα αζώτου και τα άλλα δύο άτομα βρωμίου του διπλού δεσμού του δακτυλίου. Μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους τροποποίησης πρωτεϊνών παραμένει η εκλεκτική τροποποίηση της κυστεΐνης, λόγω της χαμηλής φυσικής διαθεσιμότητας και της αυξημένης πυρηνοφιλίας της σουλφυδρύλο ομάδας της, καθώς επίσης και της απλής εισαγωγής της στις επιθυμητές θέσεις των πρωτεϊνών με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων μοριακής βιολογίας. Με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, η σύνθεση συζευγμάτων τα οποία θα έχουν ως ικρίωμα τη διβρωμοπυριδαζινοδιόνη, έχουν τη δυνατότητα να φέρουν ταυτόχρονα τόσο πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο όσο και στοχευτικό φορτίο, με το οποίο θα επιτυγχάνεται στόχευση και αύξηση της εξειδίκευσης του χορηγούμενου θεραπευτικού μορίου και άρα της αποτελεσματικότητάς του (Εικόνα 6).^{23, 24}

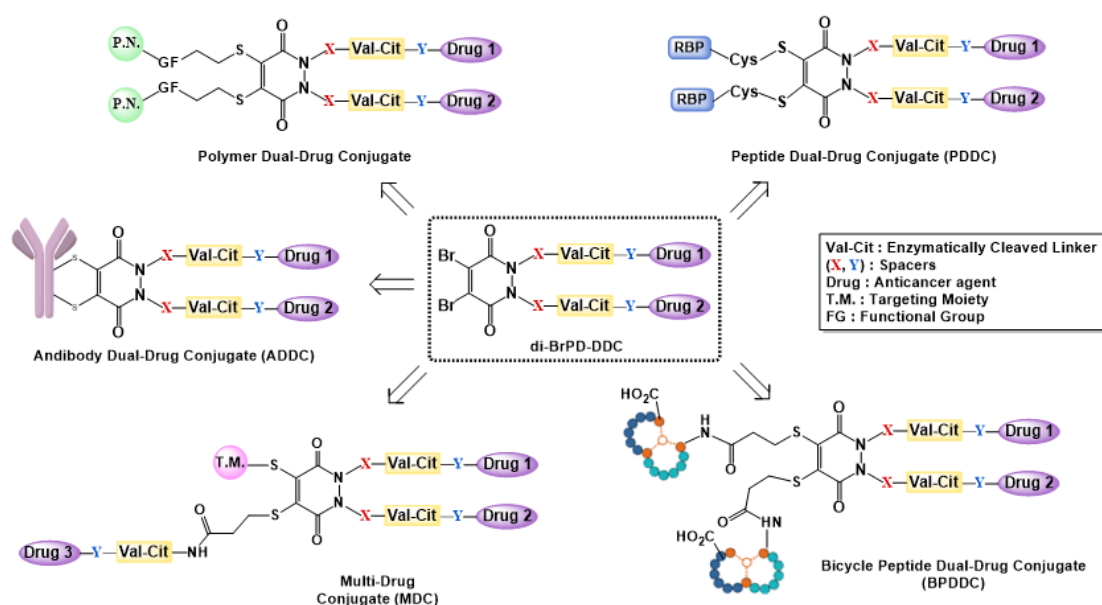
3.2. Πολυτροπικά συζεύγματα με βάση την διβρωμοπυριδαζινοδιόνη

Από την επιτυχημένη δημιουργία του ικρίωματος της diBrPD θα μπορούσε ύστερα να συντεθεί ένα μεγάλο πλήθος στοχευτικών συζευγμάτων, μέσω ορθογωνικής σύζευξης όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2. Παραδείγματα συζευγμάτων που θα μπορούσαν να δημιουργηθούν είναι:

- i. Συζεύγματα με πεπτίδια (Peptide Dual-Drug Conjugates (PDDC)), μέσω σύζευξης του diBrPD-DDC με στοχευτικά πεπτίδια που αναγνωρίζουν

και προσδένονται σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα (Receptor binding peptides, RBPs).

- ii. Συζεύγματα με πεπτίδια τύπου *bicycle* (Bicycle-Peptide Dual-Drug Conjugates (BPDDC)), μέσω σύζευξης του diBrPD-DDC με πεπτίδια τύπου *bicycle* (BPs). Αυτά είναι μικρά συνθετικά πεπτίδια τα οποία εμφανίζουν τις φαρμακολογικές ιδιότητες βιολογικού μορίου και τα φαρμακοκινητικά πλεονεκτήματα ενός μικρού μορίου, χωρίς ενδείξεις ανοσογονικότητας.
- iii. Συζεύγματα με αντισώματα (Antibody Dual-Drug Conjugates (ADDC)), μέσω σύζευξης του diBrPD-DDC με τις ελεύθερες κυστεΐνες ενός μονοκλωνικού αντισώματος, μέσω ανηγμένων δισουλφιδικών γεφυρών.
- iv. Συζεύγματα με πολυμερικά νανοσωματίδια (Polymer Dual-Drug conjugates (PLDDC)), μέσω σύζευξης του diBrPD-DDC με πολυμερικά νανοσωματίδια (PN). Η χρήση των πολυμερικών νανοσωματιδίων τα οποία διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια, θα έδινε τη δυνατότητα αύξησης του μεταβολικού προφίλ των συζευγμάτων, συμβάλλοντας στην αποφυγή της πρόωρης αποικοδόμησής τους και αυξάνοντας το χρόνο ημιζώης τους.

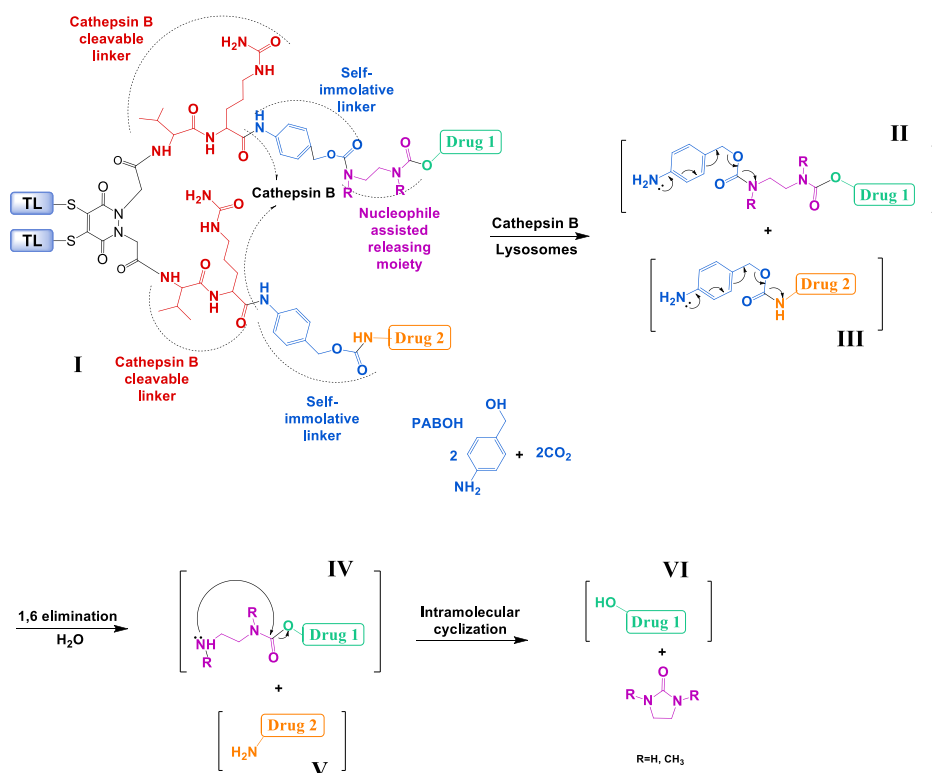


Σχήμα 2. Παραδείγματα στοχευτικών συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης.

Με παρόμοιο τρόπο όπως σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, θα ήταν εφικτή και η δημιουργία συζευγμάτων τα οποία θα φέρουν περισσότερα από δύο διαφορετικά φάρμακα στο μόριό τους (Multi-Drug Conjugates), δηλαδή τρεις θεραπευτικούς παράγοντες και μία στοχευτική ομάδα, η οποία θα μπορούσε να είναι κάτι εκ των παραπάνω αναφερθέντων όπως πεπτίδιο ή πολυμερικό νανοσωματίδιο. Επίσης, αντίστοιχα θα μπορούσε εκτός από διπλό ή πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο να φέρει και διπλό στοχευτικό φορτίο, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την ειδικότητα και στοχευτική ικανότητα του συζεύγματος.^{23, 24}

3.3. Σχεδιασμός πολυτροπικών συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης

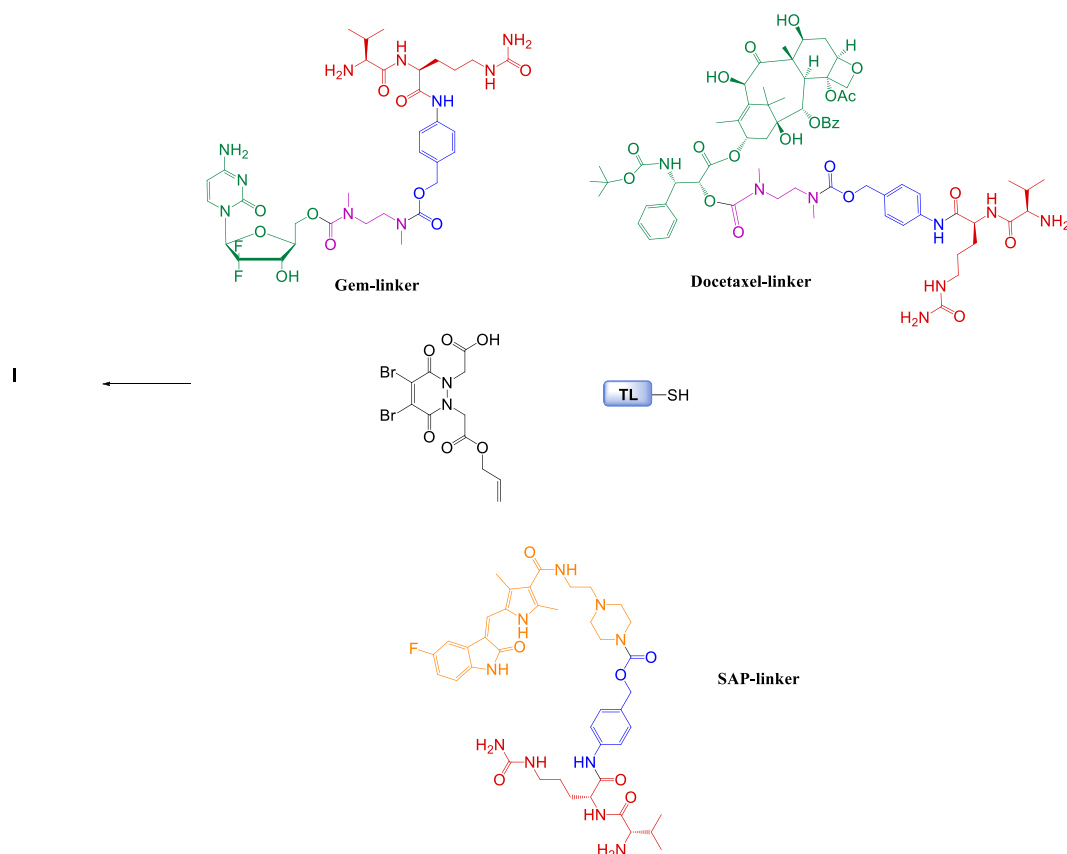
Ο σχεδιασμός όσον αφορά τη σύνθεση συζευγμάτων που μεταφέρουν δύο ή περισσότερα φάρμακα (multi-drug conjugates) με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, θα έχει ως βάση του ένα ικρίωμα diBrPD, όπου η σύνδεση των δύο φαρμακευτικών μορίων με το ικρίωμα θα γίνει μέσω βιοδιασπώμενων γεφυρών (Εικόνα 3).



Σχήμα 3. Προτεινόμενος σχεδιασμός συζευγμάτων με βάση το μηχανισμό απελευθέρωσης των φαρμάκων (TL: Στοχευτικός Προσδέκτης).

Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός δράσης του συζεύγματος **I** αφού λάβει χώρα η ενδοκυττάρωση, ακολουθεί την πορεία που περιγράφεται στη συνέχεια. Η Cathepsin-B θα δράσει στον αμιδικό δεσμό ανάμεσα στην καρβονυλομάδα της κιτροουλίνης και την αμινομάδα της PABOH και θα τον διασπάσει, δίνοντας τα ενδιάμεσα **II** και **III**. Στη συνέχεια, η PABOH υφίσταται αυθόρμητη 1,6-διάσπαση και αποσυντίθεται υδρολυτικά έπειτα από αντίδραση απακυλίωσης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φαρμάκου (**drug 2**). Στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι, τα φάρμακα που συνδέονται μέσω αμινομάδας (π.χ. SAP), όπως το **drug 2**, συνδέονται άμεσα με τη γέφυρα Val-Cit-PABOH, ενώ στην περίπτωση των φαρμάκων που συνδέονται μέσω υδροξυλομάδας (π.χ. γεμισιταβίνη, ντοσεταξέλη), όπως το **drug 1**, για να διευκολυνθεί η σύζευξη, προτείνεται η εισαγωγή ενός διαχωριστή (spacer) ανάμεσα στην γέφυρα και το φάρμακο. Στην πειραματική πορεία που ακολούθησε το συγκεκριμένο εργαστήριο, ως διαχωριστής επιλέχθηκε η αιθυλενοδιαμίνη, καθώς έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τη δημιουργία καρβαμιδικού δεσμού, τόσο με τη γέφυρα όσο και με το φάρμακο, λόγω των ιδιαίτερα πυρηνόφιλων αζώτων της, χωρίς να επάγεται η εμφάνιση τοποϊσομέρειας λόγω της συμμετρίας του μορίου. Η αιθυλενοδιαμίνη, έπειτα από μία ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης του ενδιαμέσου **IV**, που είναι το προϊόν απακυλίωσης του ενδιαμέσου **III**, αναμένεται να απελευθερώσει το φάρμακο (**drug 1**) και μια συμμετρική-κυκλική ουρία.^{25,26}

Η σύνθεση των πολυτροπικών συζευγμάτων στα οποία επικεντρώνεται το ενδιαφέρον της έρευνας και των προσπαθειών του παρόντος εργαστηρίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, περιλαμβάνει τη σύνθεση των γεφυρών των αντικαρκινικών φαρμάκων γεμισιταβίνη, ντοσεταξέλη και SAP, τη σύζευξη αυτών στο ικρίωμα της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης και την εισαγωγή στη συνέχεια των στοχευτικών προσδετών που φέρουν ελεύθερες θειόλες, στις θέσεις των ομάδων Br μέσω αντιδράσεων αντικατάστασης.

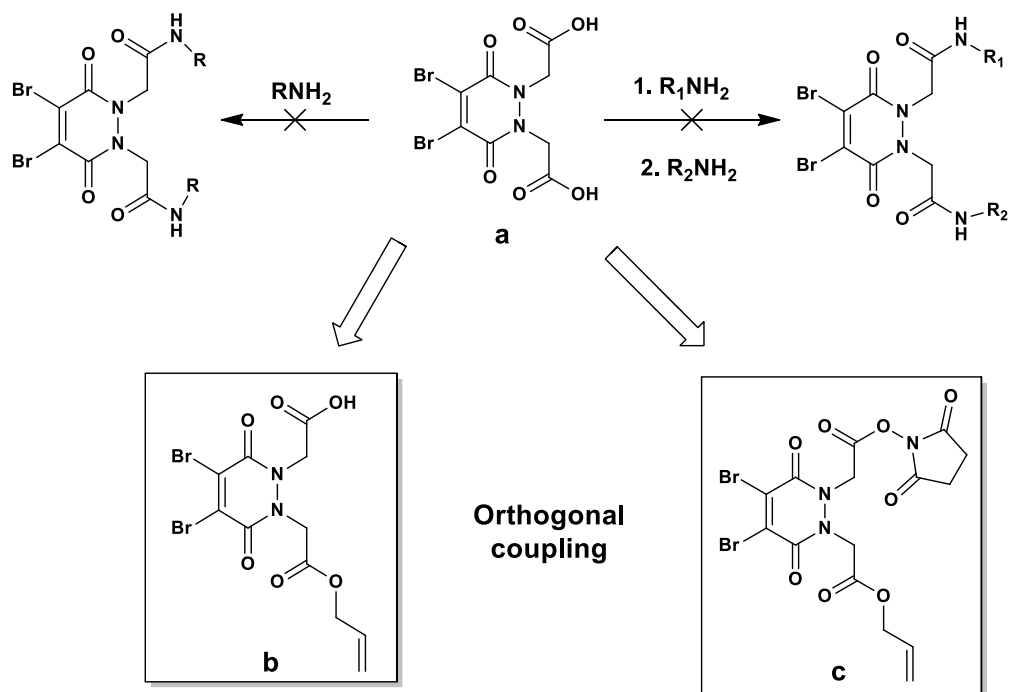


Σχήμα 4. Ρετροσυνθετική πορεία σχεδιασμού συζευγμάτων με δομικό υπόβαθρο τη διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (TL: Στοχευτικός Προσδέτης).

3.4. Στρατηγική σύνθεσης του ικρίωματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης

Η αρχική στρατηγική (Σχήμα 5) βασίστηκε στη σύνθεση ενός ικρίωματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης με δύο ελεύθερες καρβοξυλομάδες, που περιείχε ένα άτομο άνθρακα μεταξύ της καρβοξυλομάδας σύνδεσης και της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (ικρίωμα **a**). Ωστόσο, το εγχείρημα αυτό δεν στέφθηκε με επιτυχία τόσο στις δοκιμές που έγιναν με μία όσο και με δύο διαφορετικές αμίνες. Το συμπέρασμα το οποίο σχηματίστηκε, ήταν ότι η πραγματοποίηση της αντίδρασης δεν ήταν εφικτή λόγω της ύπαρξης των όξινων $\alpha\text{-CH}_2$ του δικαρβοξυλικού οξέος, που οδηγούσαν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό, το ερευνητικό επίκεντρο του εργαστηρίου μετατοπίστηκε στην ανάπτυξη μίας νέας στρατηγικής σύνθεσης, η οποία περιλάμβανε τη δημιουργία ικριωμάτων τα οποία θα φέρουν στο μόριό τους δύο διαφορετικές τερματικές λειτουργικές ομάδες για τη διευκόλυνση της ορθογωνικής σύζευξης των φαρμάκων. Το ικρίωμα **b** με τα $\alpha\text{-CH}_2$ θα

αποτελέσει το πρότυπο και στη συνέχεια θα τροποποιηθεί το ένα του άκρο με την δημιουργία του αντίστοιχου εστέρα (ικρίωμα **c**), ώστε να επιτευχθεί ενεργοποίηση του καρβοξυλικού άκρου.^{23, 24}



Σχήμα 5. Στρατηγική σύνθεσης του ικρίωματος για την ορθογωνική σύζευξη των φαρμάκων.

Για την βελτιωμένη στρατηγική σύνθεσης των ικριωμάτων με σκοπό την ορθογωνική σύζευξη των φαρμάκων, δύο διαφορετικές λειτουργικές ομάδες προσαρμόστηκαν στη διβρωμοπυριδαζινοδιόνη ώστε να επιτευχθεί εκλεκτική σύζευξη των φαρμάκων σε αυτές. Το ικρίωμα **b** στο ένα N-άκρο του φέρει μια καρβοξυλομάδα, η οποία έπειτα από ενεργοποίηση, θα μπορούσε να συζευχθεί με την αμινομάδα της βαλίνης του πρώτου φαρμάκου συνδεδεμένου με την διπεπτιδική γέφυρα. Στο άλλο N-άκρο του ικρίωματος **b** υπάρχει ένας άλλου εστέρας που μπορεί να μετατραπεί στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ, το οποίο αφού ενεργοποιηθεί κι αυτό θα μπορούσε να συζευχθεί με την αμινομάδα της βαλίνης του δεύτερου γεφυρωμένου φαρμάκου. Έτσι, θα προκύψει τελικά το επιθυμητό σύζευγμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης με διπλό φαρμακευτικό φορτίο (diBrPD-DDC).^{23, 24}

3.5. Επιλογή φαρμάκων για τη σύζευξη

Τα οφέλη της συγχορήγησης φαρμάκων τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης, στοχεύοντας ξεχωριστούς τύπους κυττάρων και οδούς

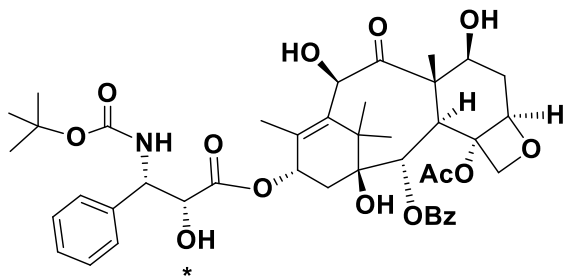
σηματοδότησης, φαίνεται να είναι πολλά καθώς λόγω της συνεργιστικής δράσης των φαρμακευτικών μορίων μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και πιο στοχευμένη αντιμετώπιση της ανάπτυξης των όγκων αλλά και της μεταστατικής τους ικανότητας. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η σημαντική μείωση της αποτελεσματικής δόσης που απαιτείται για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά, μειώνοντας έτσι τις σχετικές παρενέργειες. Για την επίτευξη της δημιουργίας τέτοιων συζευγμάτων προτείνεται η σύζευξη μέσω διασπώμενων γεφυρών καθώς με τη βοήθειά τους επιτυγχάνονται τα επιθυμητά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, η θεραπευτική αποτελεσματικότητα που επιζητείται και η ισορροπία λιποφιλικότητας-υδροφιλικότητας των φαρμάκων. Ωστόσο, η έρευνα αυτή βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο και χρειάζεται να γίνουν μελέτες οι οποίες θα επικεντρώνονται στην αξιολόγηση των διαφόρων ειδών γεφυρών που έχουν αναπτυχθεί και θα προτείνουν τρόπους βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας και του σκελετού των μορίων, για την δημιουργία δραστικών συζευγμάτων με πολλαπλό θεραπευτικό και στοχευτικό φορτίο.

31,35

Μεταξύ των φαρμακευτικών σκευασμάτων τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου, η γεμισιταβίνη (gemcitabine, GEM) σε συνδυασμό με τη σουνιτινίμπη (sunitinib) παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα στη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω της ικανότητας των ουσιών αυτών να επηρεάζουν την αγγειογένεση, να καλύπτουν μεγάλο εύρος δραστηριότητας και να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του όγκου αλλά και την μεταστατική του πορεία. Επίσης, άλλος ένας αποδεδειγμένα αποτελεσματικός συνδυασμός είναι αυτός της ντοσεταξέλης (docetaxel, DTX) και της γεμισιταβίνης που δρουν θεραπευτικά έναντι πολλών ειδών καρκίνου, όπως ο προχωρημένος μεταστατικός καρκίνος του πνεύμονα, του παγκρέατος, του οισοφάγου, του μαστού και του λειομυοσαρκόματος της μήτρας. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές οι οποίες να κάνουν λόγο για την ικανότητα παράδοσης των φαρμάκων και τα φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά, όπως επίσης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους τα οποία αποτελούν ακόμα πεδίο

μελέτης και τροχοπέδη για την περαιτέρω ανάπτυξη της συνδυαστικής θεραπείας.^{31, 35}

3.5.1. Ντοσεταξέλη (Docetaxel, DTX)



Η ντοσεταξέλη είναι ένα ημι-συνθετικό ανάλογο της ταξόλης, η οποία είναι ένα διτερπενοειδές παράγωγο της ταξάνης. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1971 από το φυτό *Taxus*

brevifolia ή αλλιώς έλατο του Ειρηνικού και είναι πλέον από τα πιο αναγνωρισμένα παγκοσμίως χημειοθεραπευτικά μόρια. Πωλείται κυρίως με την εμπορική ονομασία Taxotere, χορηγείται ενδοφλεβίως και είναι από τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία των καρκίνων των ωοθηκών, του μαστού και των πνευμόνων. Η σύζευξη της ντοσεταξέλης με τη γέφυρα θα γίνει μέσω της λειτουργικής υδροξυλομάδας 2'-OH, η οποία επισημαίνεται με αστερίσκο στο σχήμα.^{29, 53}

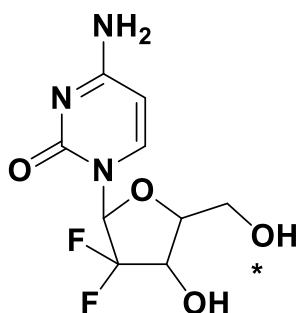
Η ταξόλη και το Docetaxel είναι αντινεοπλασματικοί παράγοντες που δρουν προωθώντας τη συσσώρευση της τουμπουλίνης σε σταθερούς μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού αναστέλλοντας έτσι την αποσυναρμολόγηση τους και προκαλώντας σημαντική ελάττωση της ελεύθερης τουμπουλίνης. Η αναστολή αυτών των δομών και η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων οδηγεί τελικά σε αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, με αποτέλεσμα το θάνατο των κυττάρων.

Το φαρμακευτικό αυτό μόριο είναι ένα αντι-μιτωτικό χημειοθεραπευτικό αδιάλυτο στο νερό και για το λόγο αυτό η μεταφορά του μέσα στο κύτταρο πραγματοποιείται με τη βοήθεια πρωτεϊνών του πλάσματος όπως λιποπρωτεΐνες και αλβουμίνη. Λόγω όμως της χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς του, το docetaxel για κλινική χρήση υφίσταται με τη μορφή αιθανολικού διαλύματος με γαλακτωματοποιητή προκαλώντας σοβαρές παρενέργειες. Επίσης, εμφανίζει τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς, όπως αλλεργικές αντιδράσεις, νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα και καρδιαγγειακή

τοξικότητα. Τέλος, μπορεί να εμφανιστεί αντίσταση στη ντοσεταξέλη, είτε εγγενής ή επίκτητη.^{29, 33}

Για να αντιμετωπιστούν οι παρενέργειες που προκύπτουν από τη χορήγηση του φαρμάκου, η έρευνα στρέφεται στην εύρεση εναλλακτικών διαμορφώσεων που θα αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα του φαρμάκου. Οι αμιδικοί και οι εστερικοί δεσμοί προκαλούν αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της ντοσεταξέλης και μπορούν να υδρολυθούν από ένζυμα του οργανισμού, απελευθερώνοντάς την. Έτσι, φάρμακα που περιέχουν οξέα ή αμινοξέα φαίνεται να προσελκύνουν ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον, με μοναδικό πρόβλημα την έλλειψη στον όγκο. Η σύζευξη αντικαρκινικών φαρμάκων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως η ντοσεταξέλη, με οργανικά οξέα, ολιγοπεπτίδια, αντισώματα, λιποσώματα, πρωτεΐνες ορού ή πολυμερή μέσω μιας διασπώμενης γέφυρας είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη βελτίωση του θεραπευτικού προφίλ.^{29, 53}

3.5.2. Γεμισιταβίνη (Gemsitabine, Gem)



Η Gemcitabine (2'-δεοξυ-2',2'-διφλουοροκυτιδίνη), είναι ένας ισχυρός αντιμεταβολίτης, όπως η πλειονότητα των υπόλοιπων αντικαρκινικών φαρμάκων, και έχει εγκριθεί για χρήση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος και του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο, που μαζί με κάποια άλλα είδη αντιμεταβολιτών όπως είναι τα παράγωγα πυριμιδινικών και πουρινικών νουκλεοσιδίων, εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων όγκων. Η σύζευξη της γεμισιταβίνης με τη γέφυρα θα πραγματοποιηθεί μέσω της 5'-OH υδροξυλομάδας, η οποία έχει σημειωθεί με αστερίσκο στην δομή της γεμισιταβίνης.²⁸

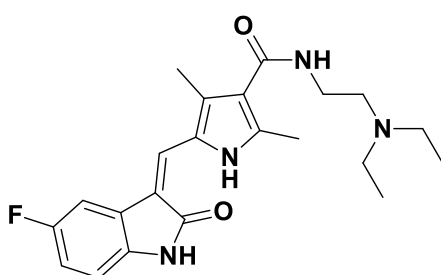
Η χορήγηση της γεμισιταβίνης γίνεται ενδοφλεβίως και η είσοδός της στα κύτταρα γίνεται εφικτή με τη βοήθεια νουκλεοσιδικών μεταφορέων. Εκεί αφού υποστεί φωσφορυλίωση από τις κινάσες, μετατρέπεται αρχικά στη μονοφωσφορική (dFdCMP), ύστερα στη διφωσφορική (dFdCDP) και τελικά

στην τριφωσφορική (dFdCTP) μορφή της, η οποία αποτελεί και το κλειδί της δράσης του φαρμάκου. Η τριφωσφορική γεμισιταβίνη ενσωματώνεται στον κλώνο του DNA κατά την αντιγραφή του, παρεμποδίζοντας τη σύνθεσή του και οδηγώντας με αυτό τον τρόπο το κύτταρο σε απόπτωση. Η dFdCDP επίσης, εμφανίζει έμμεση κυτταροτοξική δράση καθώς δρα ανασταλτικά στη λειτουργία ενός ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της διφωσφορικής κυτιδίνης (CDP), στη διφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCDP), μια διαδικασία απαραίτητη για τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA.^{26, 52}

Παρά το πολύ ενδιαφέρον προφίλ που παρουσιάζει η γεμισιταβίνη, ταυτόχρονα εμφανίζει ορισμένα μη ευνοϊκά χαρακτηριστικά. Αρχικά, ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% αυτής υφίσταται απαμίνωση και μετατρέπεται στο ανενεργό μεταβολίτη με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται ταχύτατα στο μεταβολισμό. Επιπλέον, ύστερα από συνεχή χρήση της τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αντοχή και τέλος είναι ιδιαίτερα τοξική όχι μόνο στα πάσχοντα αλλά και στα υγιή κύτταρα, οδηγώντας στην εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών και επιπτώσεων στους ασθενείς.^{26, 27}

Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα, η επιστημονική κοινότητα έχει προσανατολιστεί σε νέες τεχνολογίες στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων και συνδυαστικών θεραπειών, οι οποίες περιλαμβάνουν συζεύγματα και νανοπλατφόρμες, νανοσωματίδια, λιποσώματα, δενδριμερή, μικκύλια, με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο εσωτερικό των πασχόντων κυττάρων. Πέραν αυτών, γίνονται και δοκιμές χημικής τροποποίησης του μορίου της γεμισιταβίνης, για τη βελτίωση του φαρμακοκινητικού της προφίλ, τη μείωση της επαγόμενης αντίστασης και γενικότερα την ενίσχυση της θεραπευτικής της αποτελεσματικότητας.²⁵⁻²⁷

3.5.3. Σουνιτινίμπη (Sunitinib)



Το sunitinib είναι ένας πολυστοχευτικός αναστολέας τυροσινικών κινασών, με ισχυρά αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματα και άμεσες αντικαρκινικές δράσεις. Οι αναστολείς κινασών αποτελούν ένα νέο

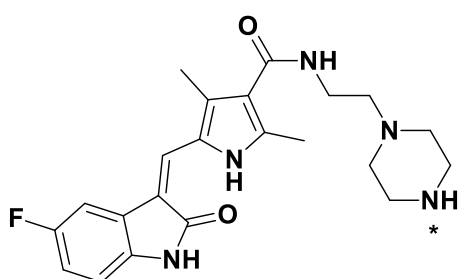
πεδίο στην αντικαρκινική θεραπεία. Είναι μία πολύ αποτελεσματική θεραπεία έναντι προχωρημένου καρκινώματος νεφρικών κυττάρων (RCC) και γαστρεντερικών στρωματικών όγκων (GIST).

Σε υγιείς ενήλικες, η αγγειογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλαπλών σταδίων, που ελέγχεται αυστηρά από μια ισορροπία μεταξύ ενδογενών προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Οι αυξητικοί παράγοντες (VEGFs, PDGFs), είναι σημαντικοί προ-αγγειογενετικοί παράγοντες και η δράση τους προκαλείται με σύνδεση σε συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (υποδοχείς κινάσες τυροσίνης). Κατά τη δέσμευση συνδέτη-υποδοχέα, ενεργοποιείται η κινάση τυροσίνης της ενδοκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα και ενεργοποιεί έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος τελικά οδηγεί στο κυτταρικό αποτέλεσμα. Υπερεκφρασμένοι ή μεταλλαγμένοι αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς κινάσες τυροσίνης έχουν εμπλακεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και διαταράσσουν την κανονική αγγειογενετική ισορροπία για να ευνοήσουν τον αυξημένο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Η αγγειογένεση που σχετίζεται με τον όγκο, είναι ένα χαρακτηριστικό που πιθανώς έχουν κοινό όλοι οι συμπαγείς όγκοι και είναι ένας πιθανός και ευνοϊκός στόχος θεραπείας του καρκίνου, στοχεύοντας στις κινάσες τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης.

Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να έχουν καλύτερο προφίλ τοξικότητας από τα παραδοσιακά κυτταροτοξικά μόρια της χημειοθεραπείας, που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με το κυτταρικό DNA και την τουμπουλίνη, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα παράπλευρη και παροδική βλάβη σε υγιείς ιστούς.

Τα τελικά αντικαρκινικά αποτελέσματα του Sunitinib περιλαμβάνουν: άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα με επαγωγή κυτταρικού θανάτου, αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματα που οδηγούν σε καθυστέρηση της ανάπτυξης και/ή οπισθοχώρηση του όγκου με αναστολή του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων και αγγειακή διαταραχή με αναστολή των υπαρχόντων εξαρτώμενων από VEGF/VEGFR καρκινικών αιμοφόρων αγγείων, που οδηγούν σε νέκρωση των κυττάρων του κεντρικού όγκου.⁴⁰

3.5.4. Ανάλογο σουνιτινίμπης (SAP)



Η σουνιτινίμπη είναι μια πολλά υποσχόμενη ένωση, αλλά λόγω της αδυναμίας της να συζευχθεί με άλλες δραστικές ομάδες για στοχευμένη θεραπεία, είναι λιγότερο αποτελεσματική στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων

και στην ελαχιστοποίηση της κυτταροτοξικότητας σε υγιείς ιστούς. Το SAP, ένα νέο ανάλογο της σουνιτινίμπης βασισμένο στην πιπεραζίνη, σχεδιάστηκε ορθολογικά διατηρώντας τη δραστηριότητα της σουνιτινίμπης, αλλά με το πλεονέκτημα της στοχευμένης θεραπείας, καθώς επιτρέπει τη σύζευξη του φαρμάκου με στοχευτικούς προσδέτες μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Επίσης, το SAP χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο συντελεστή κατανομής (clogP), μεγαλύτερη πολική επιφάνεια και βελτιωμένη διαλυτότητα.

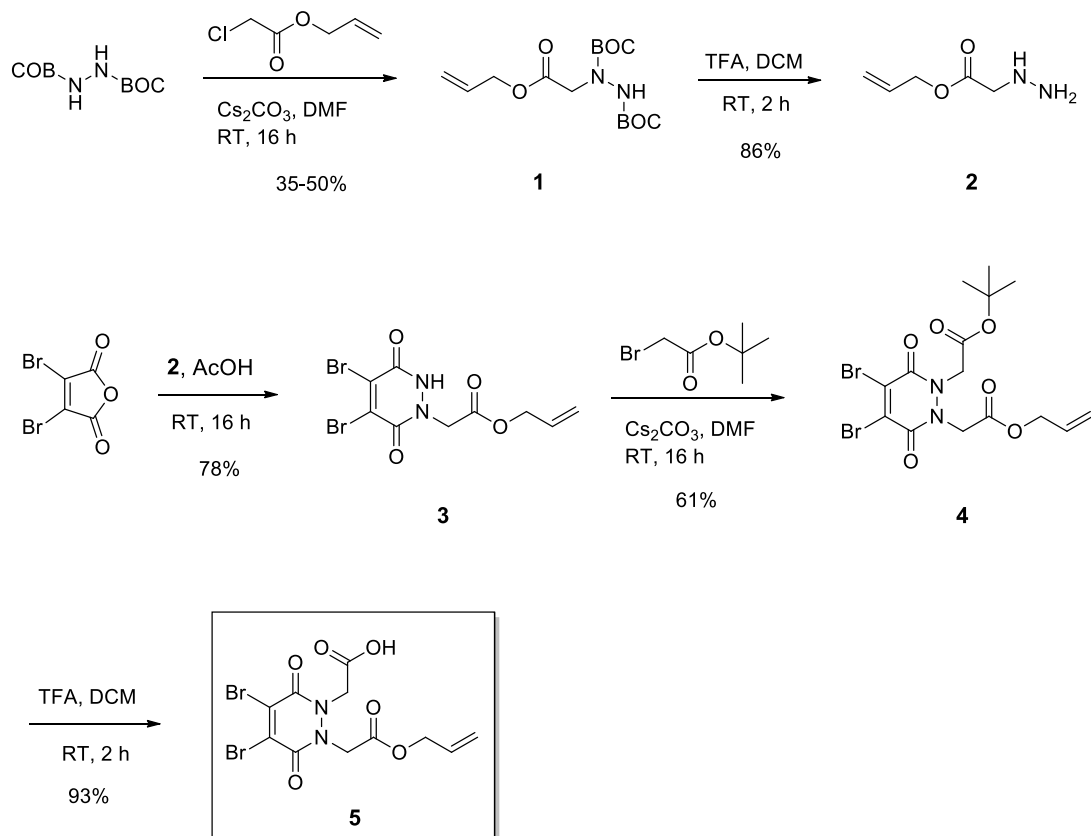
Το SAP διατήρησε τη δομή της ινδολιν-2-ονης της σουνιτινίμπης, ενώ η λιποφιλικότητά του βρέθηκε να είναι χαμηλότερη από της σουνιτινίμπης (clogP=1.5 έναντι 2.9 του sunitinib). Το καλό ποσοστό απορρόφησης και ο μικρός βαθμός διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθιστούν το φαρμακολογικό προφίλ του SAP αντίστοιχο άλλων αγγειογενετικών αναστολέων.⁴¹

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύνθεση ενός πρότυπου ικριώματος diBrPD και μελέτες ορθογωνικής σύζευξης

Η στρατηγική σύνθεσης του ικριώματος περιλάμβανε τη δημιουργία του σε ξεχωριστά στάδια, μέσω εισαγωγής δύο διαφορετικών λειτουργικών ομάδων οι οποίες θα επέτρεπαν την εκλεκτική σύζευξη των φαρμάκων. Συγκεκριμένα, το ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης περιλάμβανε μια καρβοξυλομάδα στο ένα N-άκρο και έναν άλλυλο εστέρα στο άλλο N-άκρο του, που θα μετατρεπόταν, με τη βοήθεια καταλύτη, στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ.

Επομένως, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, στο αρχικό στάδιο αυτής της συνθετικής πορείας, πραγματοποιήθηκε μονοαλκυλίωση της N,N'-δι-BOC-υδραζίνης με χλωροξικό αλλυλεστέρα, παρουσία Cs₂CO₃ σε DMF, που απέδωσε την επιθυμητή ένωση **2** σε σχετικά επαρκή απόδοση (35%) με σημαντική όμως ποσότητα του διαλκυλιωμένου προϊόντος. Το μονοαλκυλιωμένο προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης. Ακολούθησε αποπροστασία των δύο BOC-ομάδων της ένωσης **2**, με τη χρήση περίσσειας TFA σε διάλυμα DCM και απευθείας αντίδραση της παραγόμενης ένωσης **3** με τον δι-βρωμομαλεϊκό ανυδρίτη σε AcOH, που απέδωσε την ένωση **4** σε πολύ καλή απόδοση (78%), μετά από χρωματογραφία στήλης. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι η αντίδραση κυκλοποίησης ολοκληρώθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς την εφαρμογή θέρμανσης όπως είχε δοκιμασθεί στο παρελθόν ⁴²⁻⁴⁴, για να αποφευχθεί οποιαδήποτε παράπλευρη αντίδραση που θα μπορούσε να οδηγήσει στον σχηματισμό παραπροϊόντων και φάνηκε να αποδίδει καλά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση της ένωσης **3** με βρωμοξικό t-βουτυλεστέρα, παρουσία Cs₂CO₃ σε DMF, που απέδωσε την επιθυμητή ένωση **4** σε καλή απόδοση (61%). Στο τελευταίο στάδιο αυτής της πορείας, πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της BOC-ομάδας της ένωσης **4**, με τη χρήση περίσσειας TFA σε διάλυμα DCM, καταλήγοντας στην επιθυμητή ένωση **5** σε εξαιρετική απόδοση (93%). ^{23, 24}



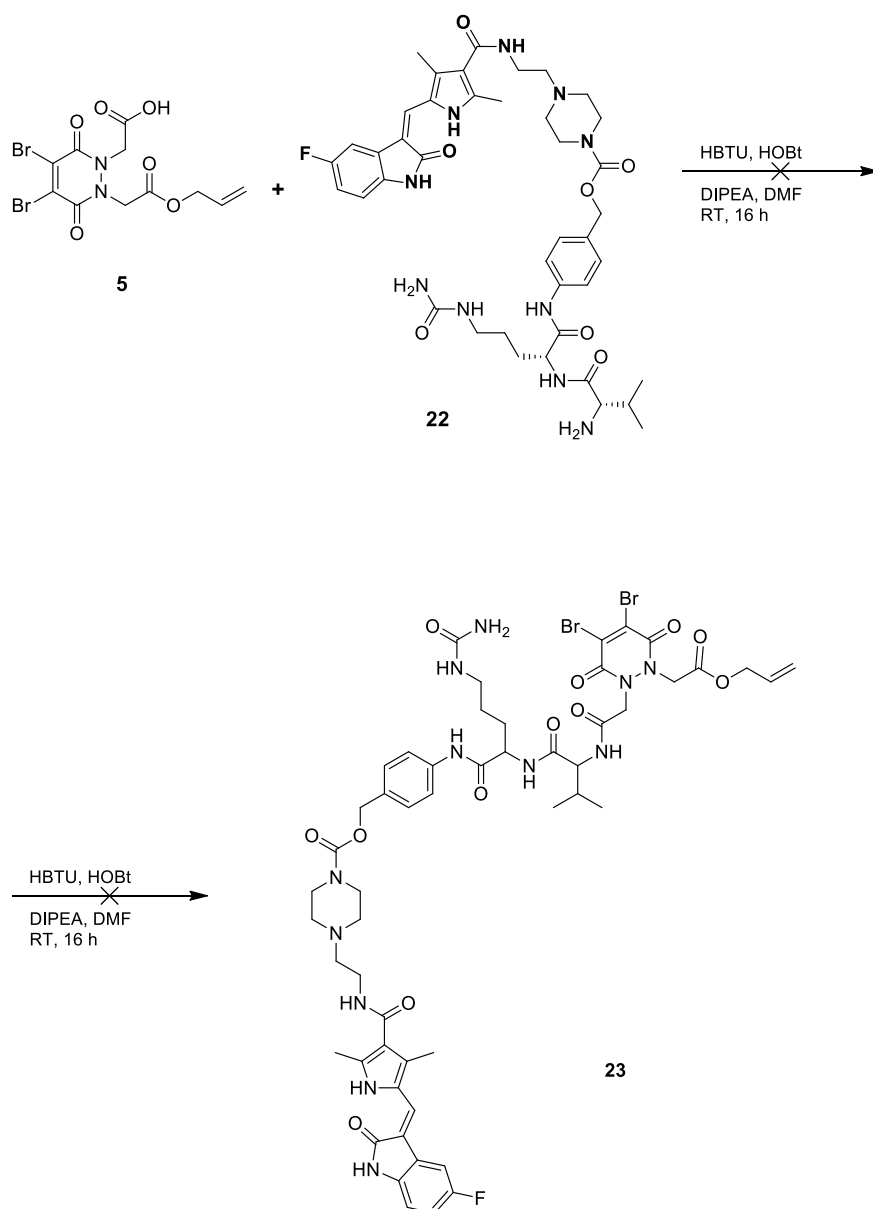
Σχήμα 6. Συνθετική πορεία σχηματισμού του ικρίωματος 5.

Επίσης στο σημείο αυτό, να επισημανθεί ότι στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία το ικρίωμα συντέθηκε με βάση την πορεία που περιγράφηκε παραπάνω σε μεγάλη ποσότητα, θέτοντας τη βάση για παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα (scale up).

Μελέτες σύζευξης

Για να επιβεβαιωθεί ότι το πλάνο που σχεδιάστηκε με στόχο τη δημιουργία μιας γενικής και προπάντων εύκολης συνθετικής πορείας προς το επιθυμητό σύζευγμα με πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο, έγιναν ορισμένες προσπάθειες σύζευξης της γέφυρας SAP, που είχε συντεθεί στο εργαστήριο σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, με το ικρίωμα του οξέος και χρήση HBTU/HOBt σε διαλύτη DMF (Σχήμα 7). Η πορεία της αντίδρασης, κατά τη διάρκεια της σύζευξης, ελέγχθηκε με TLC και επίσης, παρατηρώντας τη χαρακτηριστική μετατόπιση των πρωτονίων στο φάσμα ^1H NMR.

Αρχικά, έλαβε χώρα η ενεργοποίηση του οξέος με HBTU/HOBt παρουσία DIPEA και ύστερα έγινε προσπάθεια για τη σύζευξη του μονοκαρβοξυλικού οξέος με την γέφυρα του SAP, **22**.



Σχήμα 7. Μελέτες σύζευξης του ικρίωματος με τη γέφυρα SAP.

Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι η αντίδραση λαμβάνει χώρα και δημιουργείται το επιθυμητό σύζευγμα, ωστόσο δεν είναι δυνατή η απομόνωση του προϊόντος με απλές τεχνικές καθαρισμού. Για το λόγο αυτό εγκαταλείφθηκε η απευθείας σύνδεση της πρότυπης γέφυρας του SAP με το ικρίωμα του οξέος και προσανατολίστηκε στη δημιουργία του ενεργοποιημένου εστέρα αυτού.

Σύνθεση του ενεργοποιημένου εστέρα του ικρίωματος diBrPD

Το ικρίωμα της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης που συντέθηκε σε προηγούμενο στάδιο περιέχει δύο καρβοξυλομάδες, εκ των οποίων η μία είναι προστατευμένη με μία άλλυλο ομάδα, που επιτρέπει τον ορθογωνικό σχεδιασμό και επιτυγχάνεται η εκλεκτική σύζευξη των φαρμάκων στο κάθε άκρο. Με βάση το

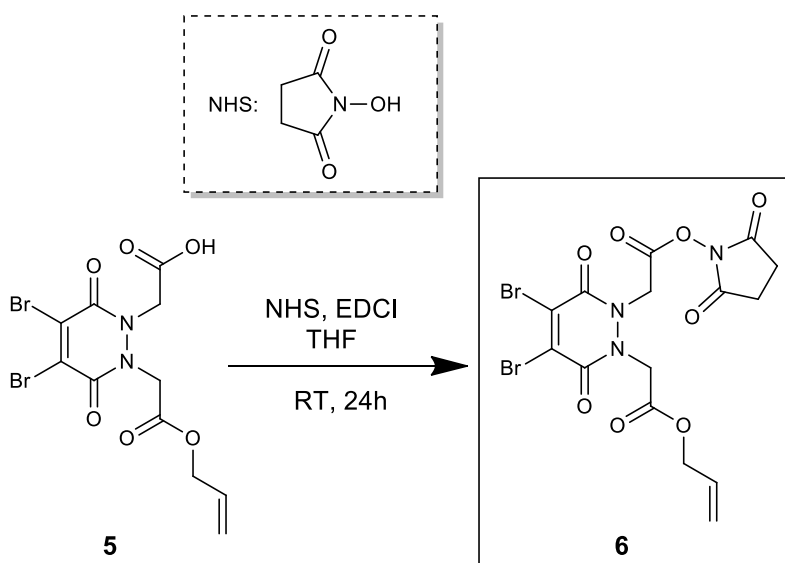
ικρίωμα αυτό έγιναν προσπάθειες σύζευξης των γεφυρών των φαρμάκων με HBTU/HOBt σε διαλύτη DMF και Hunig's base, αλλά παρατηρήθηκε ότι η ουσία χανόταν στην υδατική φάση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και επομένως υπήρχε πρόβλημα στην απομόνωση της. Για το λόγο αυτό, έγινε τροποποίηση της δομής του υποβάθρου προς σχηματισμό του αντίστοιχου σουκινικού εστέρα, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία παραπροϊόντων καθώς σε αυτή την περίπτωση θα υπήρχε μόνο το NHS ως παραπροϊόν και επομένως τα προϊόντα θα μπορούσαν να απομονωθούν ευκολότερα και πιο καθαρά.

Το HBTU είναι ένας τυπικός συζευκτικός παράγοντας, που χρησιμοποιείται συνήθως για την ενεργοποίηση των καρβοξυλικών οξέων, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης πεπτιδίων στερεάς φάσης ή σε διάλυμα. Το HBTU αποτελείται από καρβοδιμίδιο και HOBt και χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο ενεργοποίησης με ή χωρίς επιπλέον ισοδύναμο HOBt. Ωστόσο, η 1-υδροξυβενζοτρίαζόλη (HOBt) παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της ρακεμοποίησης κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται τακτικά ως πρόσθετο της σύζευξης.

Έτσι, για την ελεύθερη καρβοξυλομάδα προτάθηκε αντίδραση ενεργοποίησης προς σχηματισμό του εστέρα, καθώς το τροποποιημένο ικρίωμα στη συνέχεια θα μπορεί να αντιδρά πιο αποτελεσματικά με αμίνες και να σχηματίζει τα αντίστοιχα αμίδια, πράγμα που σε αντίθετη περίπτωση θα ευνοούσε το σχηματισμό αλάτων και παραπροϊόντων όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Έτσι, η συνθετική πορεία η οποία ακολουθήθηκε επικεντρώθηκε στη δημιουργία του σουκινικού εστέρα του οξέος. Για να επιτευχθεί αυτό, η ένωση **5** αντέδρασε με N-υδρόξυ σουκινιμίδιο (NHS) σε άνυδρο THF, παρουσία EDCI ως συζευκτικού παράγοντα, καταλήγοντας μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης στην επιθυμητή ένωση **6** σε εξαιρετική απόδοση (99%).

Το EDCI είναι ένα καρβοδιμίδιο που δρα ως συζευκτικό αντιδραστήριο και χρησιμοποιείται ως παράγοντας ενεργοποίησης καρβοξυλομάδων για την κατόπιν σύζευξη με αμίνες και τη δημιουργία αμιδικών δεσμών. Έτσι, προκύπτει ένα πολύ δραστικό ενδιάμεσο ενεργοποιημένο οξύ με το οποίο στη συνέχεια

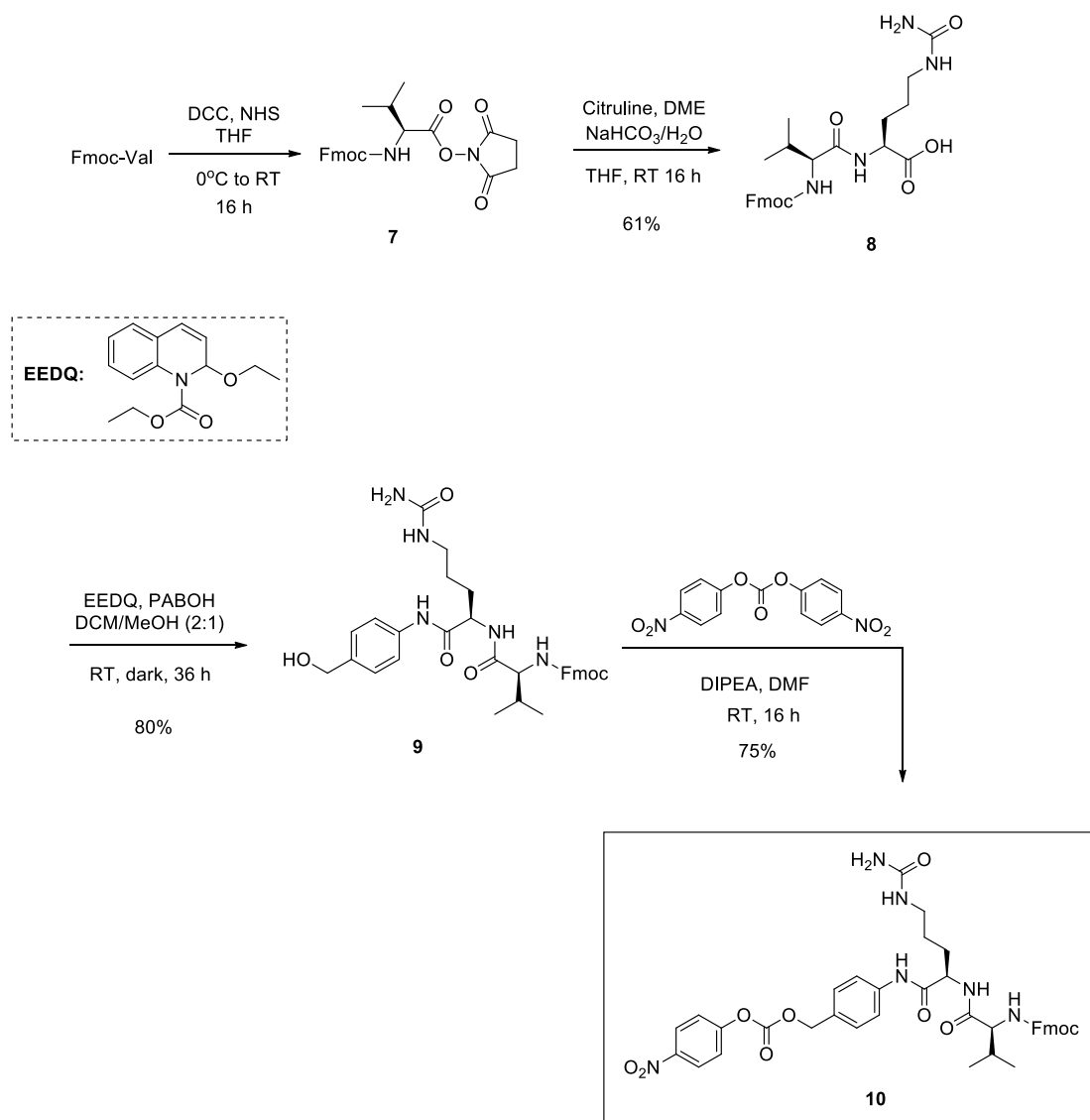
αντιδρά το NHS και σχηματίζεται το τελικό και περισσότερο σταθερό ενεργοποιημένο προϊόν.



Σχήμα 8. Σύνθεση του ενεργοποιημένου εστέρα του ικρίωματος **6**.

Βελτιστοποίηση σύνθεσης της διπεπτιδικής γέφυρας Val-Cit

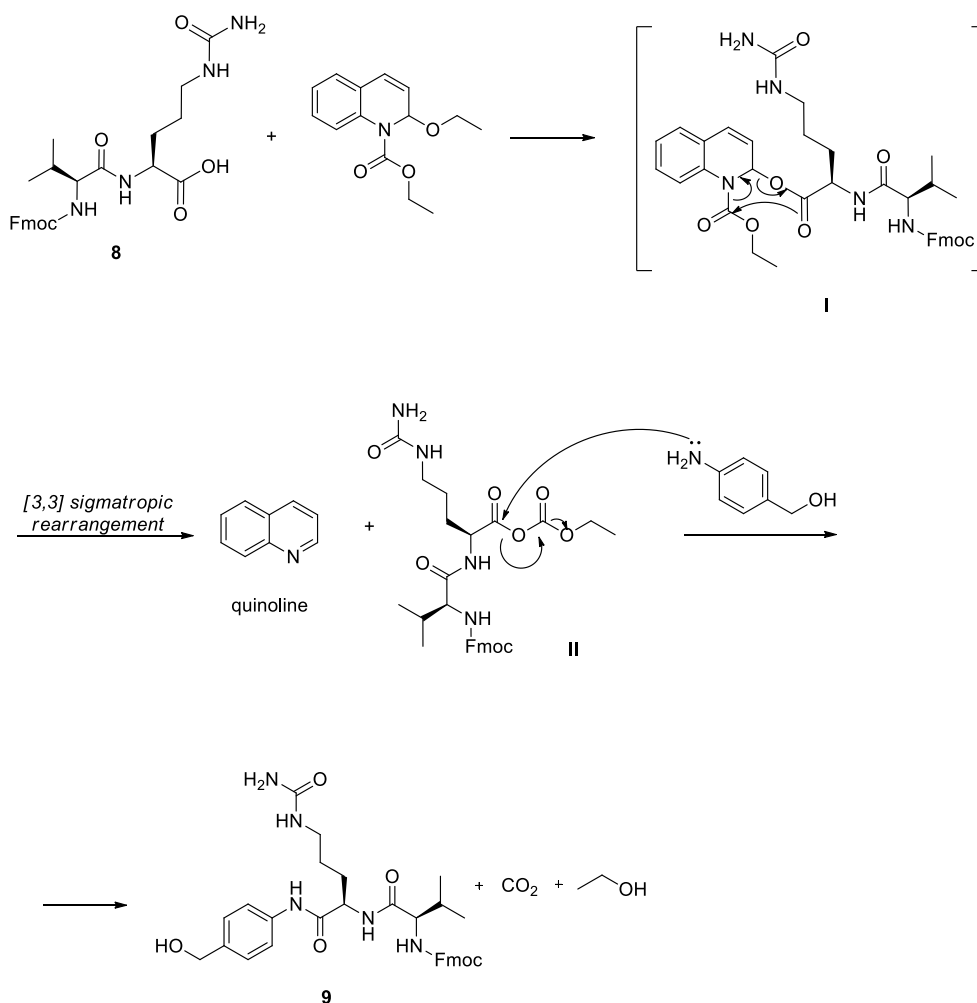
Η σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας, η οποία υδρολύεται εκλεκτικά από την καθεψίνη-B στα λυσοσώματα, ξεκίνησε από την Fmoc-Valine, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9 που ακολουθεί. Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας της βαλίνης με N-υδρόξυ σουκινιμίδιο (NHS) παρουσία DCC απέδωσε, μετά από διήθηση του παραπροϊόντος της DCU-ουρίας, τον ενεργοποιημένο NHS-εστέρα **7** του αμινοξέος, ως υαλώδες στερεό. Ο ενεργοποιημένος εστέρας **7** υποβλήθηκε, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, σε αντίδραση ακυλίωσης Schotten-Baumann με την κιτρουλίνη, δίνοντας το διπεπτίδιο **8**, σε καλή απόδοση (61%). Στη συνέχεια, αντίδραση του διπεπτιδίου με p-αμινοβενζυλική αλκοόλη (PABOH), παρουσία του συζευκτικού αντιδραστήριου EEDQ, απέδωσε την ένωση **9**, σε εξαιρετική απόδοση της τάξεως του 80%. Στο τελευταίο στάδιο αυτής της συνθετικής πορείας, πραγματοποιήθηκε ακυλίωση της βενζυλικής υδροξυλομάδας της ένωσης **9** με το δι-ανθρακικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης (bis-PNP carbonate) παρουσία DIPEA, αποδίδοντας τον ανθρακικό εστέρα **10** μετά από καταβύθιση και απομόνωση με κατεργασία με Et₂O και EtOAc, ως υποκίτρινο στερεό, σε πολύ καλή απόδοση (75%).^{30, 31}



Σχήμα 9. Σύνθεση της διπεπτιδικής γέφυρας Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP **10**.

Το EEDQ είναι ένα συζευκτικό αντιδραστήριο το οποίο σε σχέση με άλλα αντιδραστήρια αυτού του τύπου, προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως το γεγονός ότι επιτρέπει τη σύζευξη αμινοξέων με εστέρες αμινοξέων σε ένα στάδιο, με λίγη ή καθόλου ρακεμοποίηση. Ο μηχανισμός με τον οποίο αντιδρά, φαίνεται στο Σχήμα 10 και περιλαμβάνει το σχηματισμό, μέσω ενός βραδέως σταδίου, ενός ενδιάμεσου μικτού ανθρακικού ανυδρίτη που έχει την ικανότητα να αντιδρά ταχέα με αμίνες. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο το EEDQ εμφανίζει μικρή ή και καθόλου ρακεμοποίηση, μιας και ο συνδυασμός αργού σχηματισμού του ανυδρίτη και γρήγορης κατανάλωσής του στη συνέχεια, μειώνουν σε πολύ σημαντικό βαθμό την πιθανότητα δημιουργίας ρακεμικού μίγματος. Συγκεκριμένα, για την αντίδραση σχηματισμού της ένωσης Fmoc-Val-

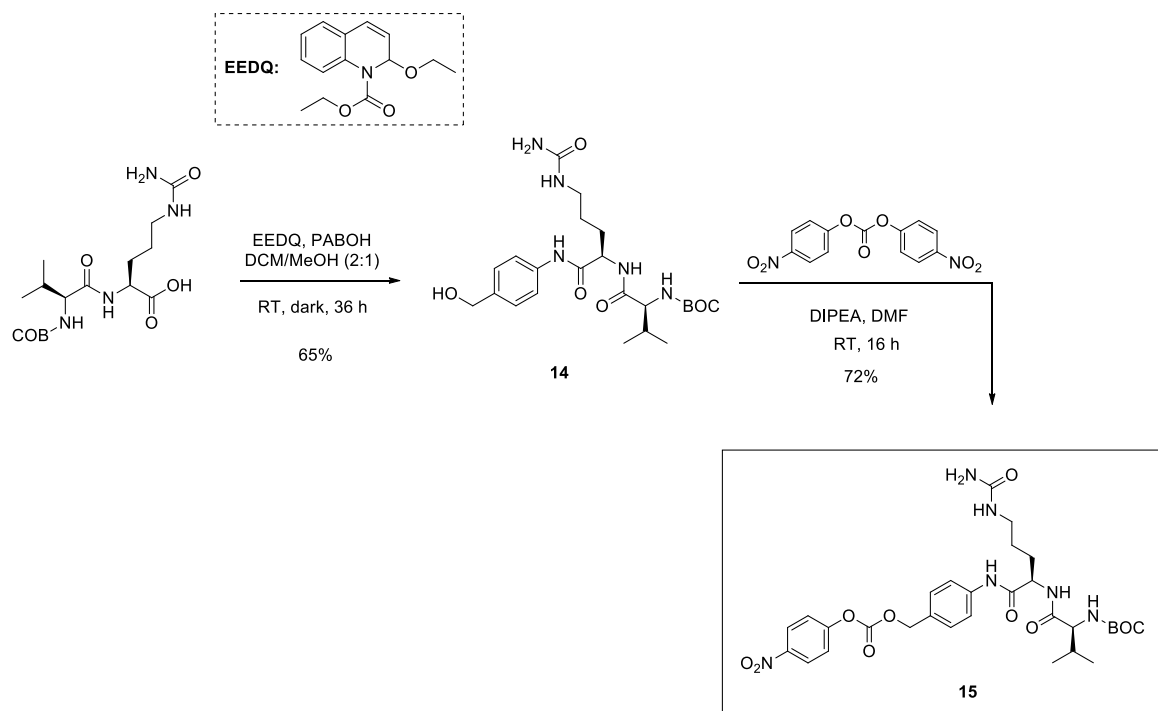
Cit-PABOH, **9**, το οξύ του διπεπτιδίου **8** αντιδρά με το EEDQ και οδηγεί σε απελευθέρωση EtOH και στον σχηματισμό του ενδιάμεσου **I**. Αυτό ύστερα από σιγματροπική μετάθεση και απελευθέρωση κινολίνης, παράγει τον μικτό ανυδρίτη του οξέος **II**. Η αντίδραση του παραγόμενου ανυδρίτη με την αμίνη της PABOH, οδηγεί στη δημιουργία του τελικού προϊόντος, ένωση **9**, ενώ παράγονται επίσης CO₂ και EtOH.³⁷⁻³⁹



Σχήμα 10. Μηχανισμός σύζευξης της κινουλίνης με την PABOH παρουσία EEDQ.

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και η σύνθεση της N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP γέφυρας με τη μόνη διαφορά ότι εδώ το αρχικό αντιδραστήριο είναι η N-BOC-Val. Στη συγκεκριμένη εργασία, η δημιουργία της γέφυρας ξεκίνησε από το δεύτερο στάδιο, δηλαδή από την N-BOC-Val-Cit καθώς είχε ήδη προηγηθεί η σύνθεσή της σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες και υπήρχε αρκετά μεγάλη ποσότητα της N-BOC-Val-Cit ήδη έτοιμη σε απόθεμα.^{30, 31, 45} Τόσο η N-BOC-Val-Cit-PABOH, ένωση **14**, όσο και η N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP, ένωση **15**, επεξεργάστηκαν μετά

το πέρας της αντίδρασης με Et₂O και ανακρυσταλλώθηκαν στους 50°C σε EtOAc/MeOH (5:1) αποδίδοντας τις επιθυμητές ενώσεις σε πάρα πολύ καλές αποδόσεις, 65% και 72% αντίστοιχα, και σε υψηλή καθαρότητα σε σχέση με τις προηγούμενες απόπειρες σύνθεσής τους.



Σχήμα 11 . Σύνθεση της διπεπτιδικής γέφυρας N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP **15**.

Μελέτη σύζευξης της ντοσεταξέλης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val- Cit (Docetaxel-Linker)

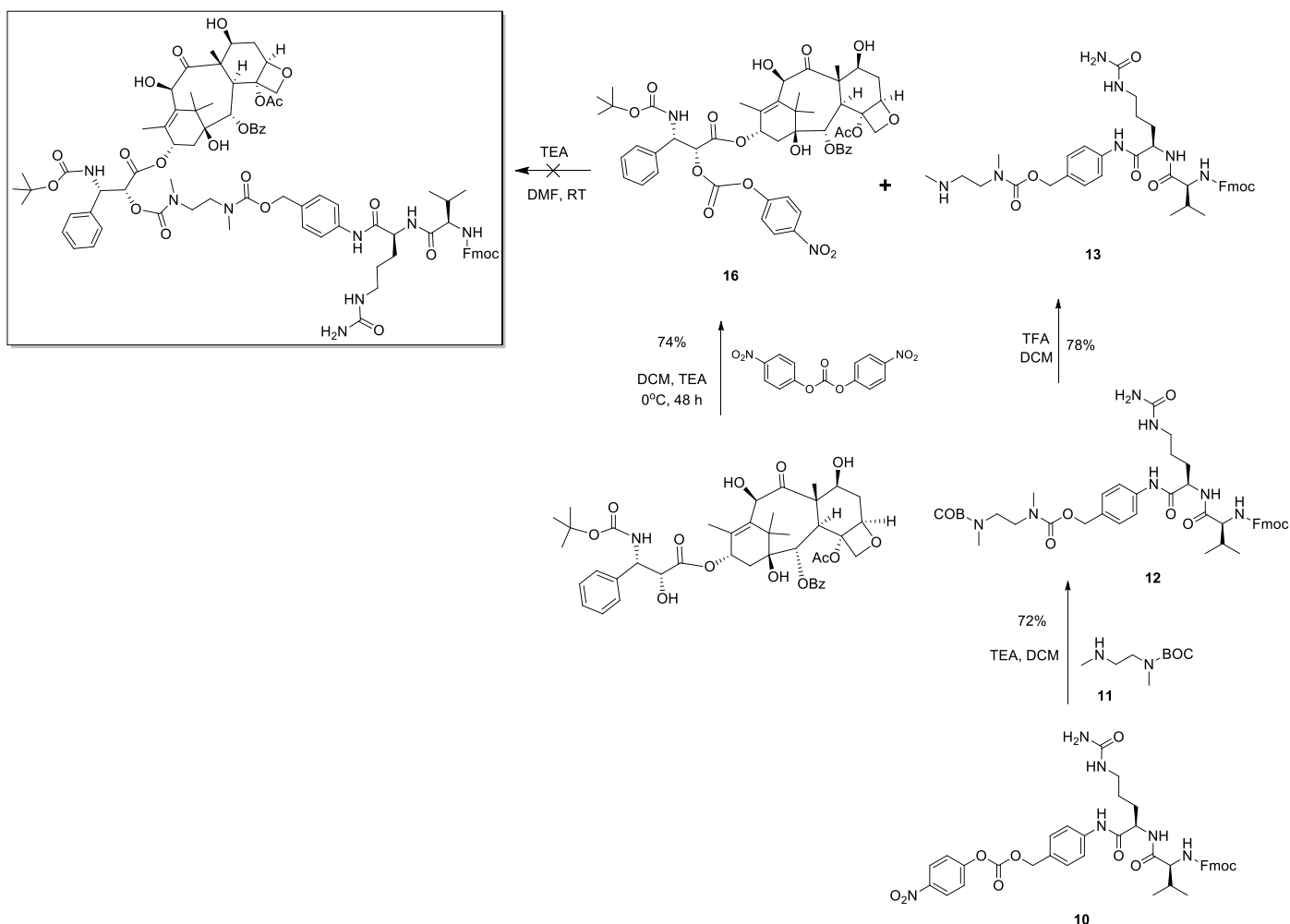
Για τη σύνθεση της γεφυρωμένης ντοσεταξέλης, η σύζευξη της γέφυρας με το φάρμακο θα πραγματοποιηθεί στην 2'- OH θέση, καθώς είναι η πιο δραστική. Η ντοσεταξέλη όμως περιέχει στη δομή της μια BOC-ομάδα, επομένως στην περίπτωση αυτή η σύζευξη με την N-BOC-προστατευμένη διπεπτιδική γέφυρα δε θα ήταν συμβατή, μιας και στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης γίνεται αποπροστασία της BOC-ομάδας της βαλίνης, η οποία θα οδηγούσε και στη διάσπαση της BOC-ομάδας του φαρμάκου. Για το λόγο αυτό συντέθηκε η βιοδιασπώμενη διπεπτιδική γέφυρα χρησιμοποιώντας στο πρώτο στάδιο την Fmoc-Valine. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο Σχήμα 12.

Για να επιτευχθεί η σύζευξη της ντοσεταξέλης με τη γέφυρα, έπρεπε να γίνει πρώτα τροποποίηση της θέσης 2'-OH, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα

σχετικών πειραμάτων που είχαν προηγηθεί.⁴²⁻⁴³ Έτσι, ως πρώτο βήμα αυτής της σειράς αντιδράσεων σύνθεσης, έλαβε χώρα ακυλίωση της 2'-OH με δι-ανθρακικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης, αποδίδοντας τον 2'-O-PNP ανθρακικό εστέρα **16** σε καλή απόδοση (74%), έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Δύο βασικές παρατηρήσεις που αξίζει να γίνουν για την αντίδραση αυτή, είναι αρχικά η χαμηλή θερμοκρασία στην οποία εξελίχθηκε το πείραμα, η οποία ρυθμίστηκε στους 0°C, μιας και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες το προϊόν διασπάται όπως έγινε αντιληπτό, και επίσης η χρήση TEA έναντι της DIPEA ως βάση, μιας και η δεύτερη θεωρείται ότι συμβάλλει στη διάσπαση του ανθρακικού εστέρα που δημιουργείται.^{33, 34}

Αρχικά γίνεται αντίδραση ακυλο-υποκατάστασης της ένωσης **10** (Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP) με την BOC προστατευμένη N,N'-διμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη **11**, που δρα ως πυρηνόφιλος διαχωριστής ανάμεσα στο φάρμακο και τη γέφυρα μιας και η υδροξυλομάδα εμφανίζει μειωμένη πυρηνοφιλία, δίνοντας την ένωση **12**, σε πάρα πολύ καλή απόδοση (72%). Έστερα, ακολουθεί αποπροστασία της παραχθείσας ένωσης **12** υπό όξινες συνθήκες με TFA και DCM, δίνοντας την ένωση **13** σε πάρα πολύ καλή απόδοση (78%). Στη συνέχεια, ο 2'-O-PNP ανθρακικός εστέρας **16** αντιδρά με την γέφυρα **13**, παρουσία TEA και DMF. Η προσθήκη της **13** στον 2'-O-PNP ανθρακικό εστέρα **16**, έγινε στάγδην με σκοπό να αποφευχθεί ο διμερισμός της και η θερμοκρασία συνέχισε να διατηρείται στους 0°C, για να αποφευχθεί η διάσπαση του προϊόντος.

Δυστυχώς και η προσπάθεια αυτή δημιουργίας της γέφυρας του Docetaxel αποδείχθηκε άκαρπη όπως και οι προηγούμενες που είχαν διεξαχθεί σε παλαιότερες έρευνες του εργαστηρίου⁴², στις οποίες αρχικά γινόταν σύνδεση της αιθυλενοδιαμίνης με τη ντοσεταξέλη, **16**, ακολουθούμενη από την προσθήκη της γέφυρας, **10**.^{33, 34}



Σχήμα 12. Στρατηγική σύζευξης της ντοσεταξέλης με τη βιοδιασπώμενη γέφυρα.

Βελτιστοποίηση σύνθεσης της συζευγμένης γεμισιταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (Gemcitabine-Linker)

Για τη δημιουργία της γέφυρας της γεμισιταβίνης, η σύζευξη θα λάβει χώρα στην 5'-OH θέση του φαρμάκου. Η επιλεκτική προστασία των άλλων δύο δραστικών θέσεων του φαρμάκου, της 4-NH₂ και 3'-OH, είναι απαραίτητη ούτως ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του φαρμακευτικού μορίου με τη διπεπτιδική γέφυρα. Η προστασία των δύο αυτών δραστικών άκρων του μορίου, είχε ήδη επιτευχθεί στο εργαστήριο ακολουθώντας την προτεινόμενη συνθετική πορεία των Guo et al.³²

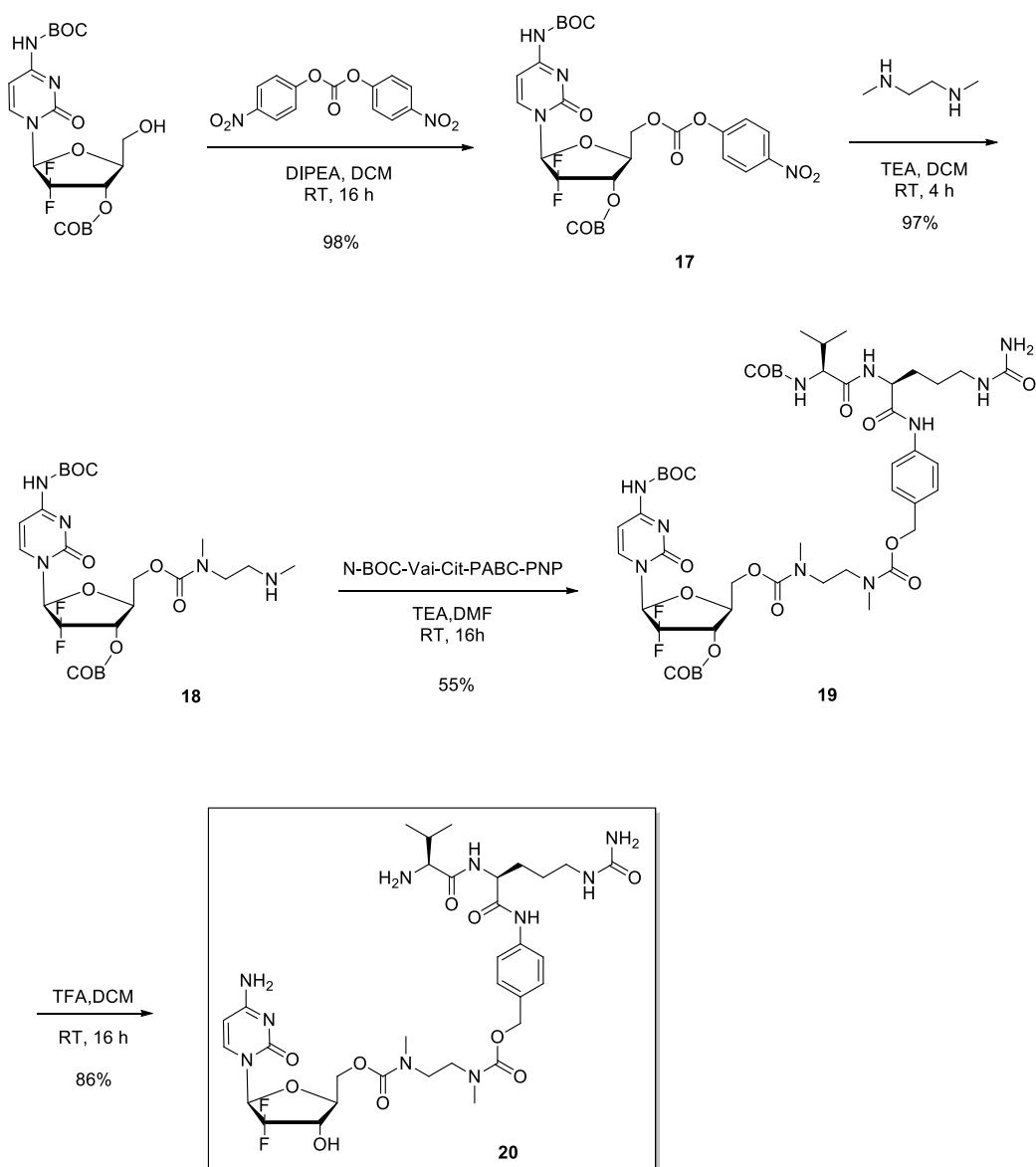
Η σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP πραγματοποιήθηκε με επιτυχία όπως περιγράφηκε παραπάνω, οπότε έγινε προσπάθεια σύζευξης αυτής με την δι-προστατευμένη γεμισιταβίνη. Σε προηγούμενες αποτυχημένες απόπειρες σύζευξης που έγιναν στο εργαστήριο,

έγινε εμφανές ότι η απευθείας σύνδεση της N-BOC-γέφυρας με την ελεύθερη υδροξυλομάδα του φαρμάκου δεν μπορούσε να επιτευχθεί, λόγω του μικρότερου βαθμού πυρηνοφιλίας της 5'-OH σε σχέση με τις άλλες δύο δραστικές θέσεις.^{42,43} Για το λόγο αυτό η τακτική που δοκιμάστηκε ήταν η τροποποίηση του πυρηνόφιλου που θα λάμβανε χώρα στην αντίδραση, με σκοπό τη διευκόλυνση της σύζευξης.³²

Στη συγκεκριμένη περίπτωση λοιπόν ως πυρηνόφιλος διαχωριστής, επιλέχθηκε η N,N'-διμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη, η οποία θα συνδεόταν ανάμεσα στο φάρμακο και τη γέφυρα για την πραγματοποίηση της σύζευξης. Η N,N'-διμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη παρουσιάζει δύο πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα τα οποία την καθιστούν ιδανικό διαχωριστή, αυξημένη πυρηνοφιλία και απελευθέρωση του φαρμάκου σε ελεύθερη μορφή. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της μεγάλης πυρηνοφιλίας που εμφανίζουν τα άζωτά της, το ένα της άκρο έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί με αρκετά μεγάλη ευχέρεια με τον ενεργοποιημένο ανθρακικό εστέρα του φαρμάκου, μέσω καρβαμιδικού δεσμού, ο οποίος μπορεί να σχηματιστεί αφού προηγουμένως έχει λάβει χώρα αντίδραση ακυλίωσης της δι-προστατευμένης γεμισταβίνης με δι-ανθρακικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης, ενώ το άλλο της άκρο θα ήταν δυνατό να συνδεθεί με τον ενεργοποιημένο εστέρα της γέφυρας. Επιπλέον, αφού διασπαστεί η διπεπτιδική γέφυρα και αποσπαστεί η PABOH, μπορεί να συμβεί μια ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης όπου και απελευθερώνεται το ελεύθερο φάρμακο από την N,N'-διμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη καθώς επίσης και μια συμμετρική-κυκλική ουρία (Σχήμα 3).³²

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 13, η ακυλίωση της δι-προστατευμένης γεμισταβίνης με δι-ανθρακικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης απέδωσε επιτυχώς την ένωση **17** σε εξαιρετική απόδοση (98%). Στη συνέχεια, η αντίδραση της **17** με N,N'-διμεθυλαιθυλενοδιαμίνη απέδωσε την ένωση **18** σε εξαιρετική απόδοση (97%) επίσης. Εδώ, αξίζει να τονισθεί πως η προσθήκη της **17** στην N,N'-διμεθυλαιθυλενοδιαμίνη έγινε στάγδην με σκοπό να αποφευχθεί ο διμερισμός της. Σε επόμενο στάδιο, η προσθήκη του ανθρακικού διπεπτιδικού εστέρα της γέφυρας απέδωσε την ένωση **19** ως υποκίτρινο στερεό έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε αρκετά καλή απόδοση (55%). Και σε αυτή την

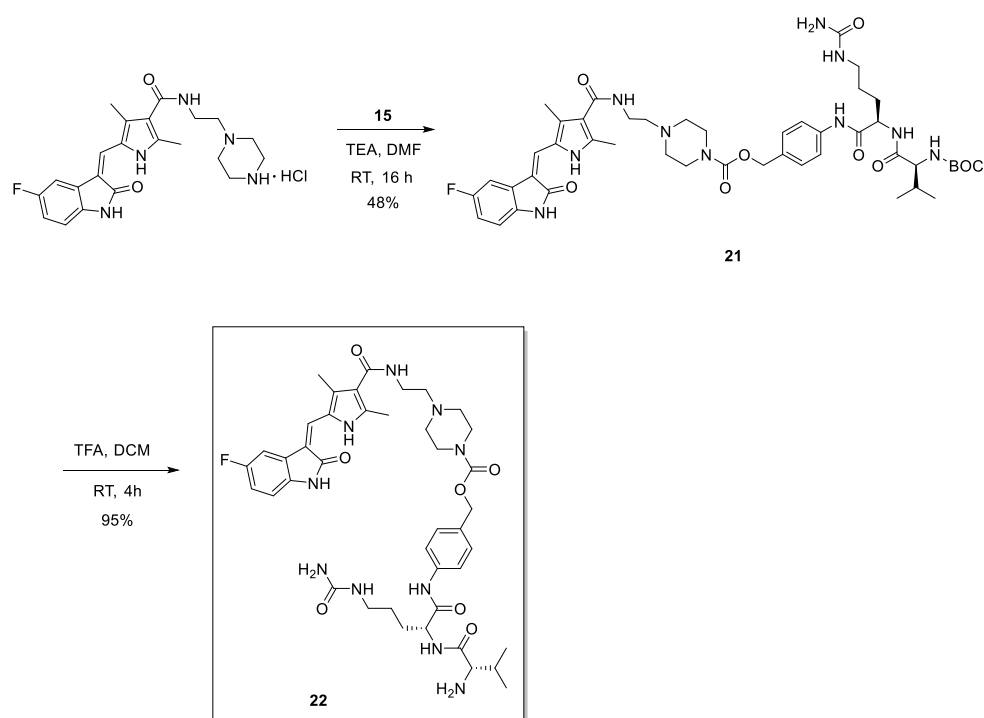
περίπτωση, η σειρά με την οποία προστέθηκαν τα αντιδραστήρια ήταν συγκεκριμένη και έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της αντίδρασης, με τη γέφυρα να προστίθεται στάγδην στην ένωση **18**, ενώ η προσθήκη βάσης ακολούθησε. Στο τελικό στάδιο αυτής της πορείας, πραγματοποιήθηκε αποπροστασία των τριών BOC-ομάδων της ένωσης **19**, με τη χρήση περίσσειας TFA σε διάλυμα DCM και κατεργασία στη συνέχεια με Et₂O και DCM, καταλήγοντας στην επιθυμητή ένωση **20**, με εξαιρετική απόδοση (86%) και υψηλή καθαρότητα.³²



Σχήμα 13. Σύνθεση της συζευγμένης με τη διπεπτιδική γέφυρα γεμισταβίνης **20**.

Βελτιστοποίηση σύνθεσης του συζευγμένου με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit αναλόγου σουνιτινίμπης (SAP-Linker)

Όσον αφορά το σχηματισμό της γέφυρας με το SAP (Σχήμα 14) το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας που ακολουθήθηκε ήταν η αντίδραση του υδροχλωρικού άλατος του SAP με την γέφυρα N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP, ένωση **15**, σε βασικό περιβάλλον με την παρουσία TEA, η οποία είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της ένωσης **21**, σε καλή απόδοση (48%). Το υδροχλωρικό άλας του SAP υπήρχε σε απόθεμα στο εργαστήριο καθώς είχε παρασκευαστεί σε πολύ καλή απόδοση σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες ^{44, 45}, με βάση την προτεινόμενη συνθετική πορεία των Argyros et al. ⁴¹. Έστερα, ακολούθησε αποπροστασία της BOC ομάδας υπό όξινες συνθήκες, με χρήση TFA και DCM έναντι του HCl που χρησιμοποιούνταν σε παλιότερες πειραματικές πορείες με τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου να είναι συγκριτικά καλύτερα, αποφεύγοντας παράπλευρες αντιδράσεις και σχηματισμό παραπροϊόντων και λαμβάνοντας μεγαλύτερη ποσότητα καθαρού προϊόντος. Τέλος, πλύση με Et₂O με χρήση υπερήχων και ανακρυστάλλωση σε EtOAc/MeOH (5:1), οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού συζεύγματος, ένωση **22**, σε εξαιρετική απόδοση της τάξεως του 95%.



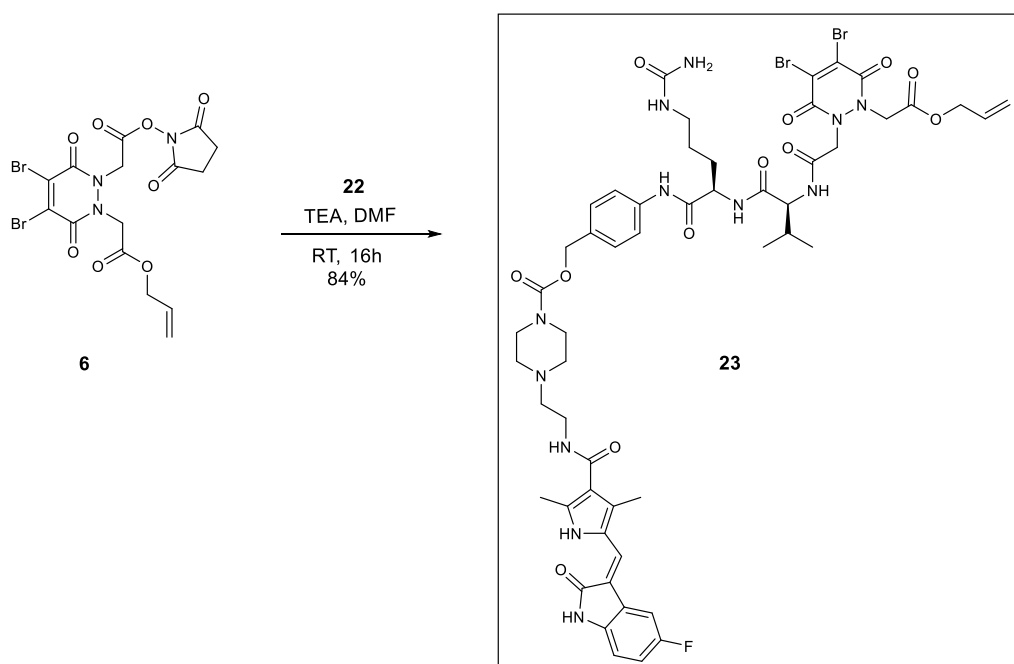
Σχήμα 14. Σύζευξη του SAP με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit.

Σύζευξη του γεφυρωμένου SAP με το ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (SAP Conjugate)

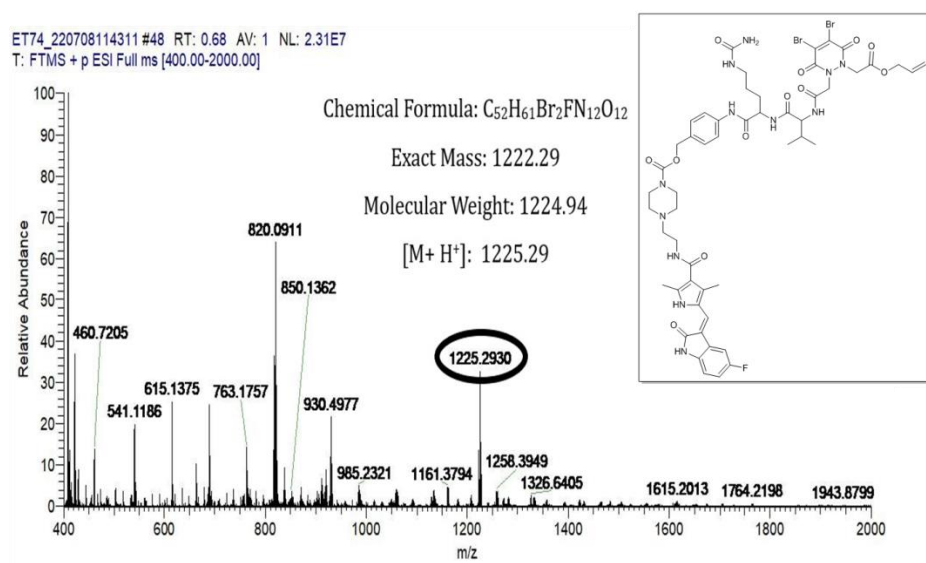
Έχοντας καταφέρει να παραχθούν τόσο ο ενεργοποιημένος εστέρας του οξέος του ικριώματος, ένωση **6**, όσο και η γέφυρα του SAP, ένωση **22**, σε πολύ καλές αποδόσεις και σε αρκετά καθαρή μορφή, επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια σύζευξης του γεφυρωμένου φαρμάκου με το ικρίωμα της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης. Η σύζευξη θα πραγματοποιηθεί μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας της Val της γέφυρας και του ενεργοποιημένου καρβοξυλικού άκρου του ικριώματος, δημιουργώντας τον αμιδικό δεσμό που θα οδηγήσει στο επιθυμητό σύζευγμα.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την επίτευξη αυτού του στόχου, Σχήμα 15, ήταν η προσθήκη διαλύματος της ένωσης **22** σε DMF σε διάλυμα του ενεργοποιημένου εστέρα, ένωση **6**, στον ίδιο διαλύτη και η προσθήκη στη συνέχεια TEA για τη διατήρηση βασικού περιβάλλοντος. Το προϊόν υπέστη κατεργασία με Et₂O, DCM και χρήση υπερήχων, με αποτέλεσμα την παραλαβή της ένωσης **23**, σε εξαιρετική απόδοση (84%). Η επιτυχία της σύζευξης επιβεβαιώθηκε μέσω φασμάτων ¹H NMR και ESI MS (Εικόνα 7).

Η κατεργασία με Et₂O και DCM έγινε με αρχικό στόχο τον καθαρισμό της ένωσης για την απομάκρυνση των αντιδρώντων και παραπροϊόντων που είναι διαλυτά σε Et₂O και DCM, ώστε στη συνέχεια να αναπτυχθεί μία μεθοδολογία κρυστάλλωσής της, η οποία θα συμβάλλει στην ευκολότερη απομόνωση της ουσίας, χωρίς τη χρήση περισσότερο επίπονων και δαπανηρών διαδικασιών όπως χρωματογραφία στήλης ή υγρή χρωματογραφία, HPLC.



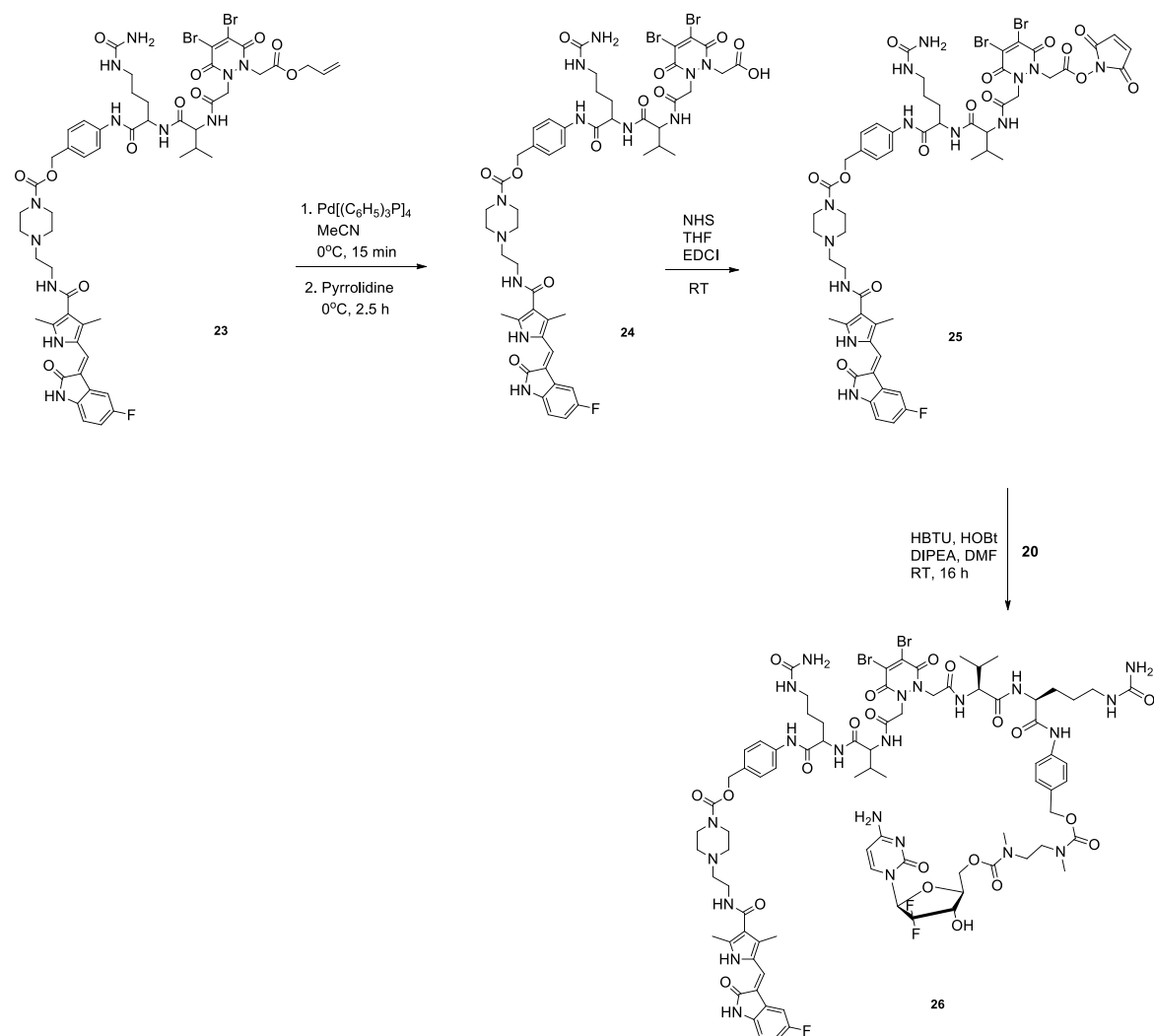
Σχήμα 15. Σύζευξη του γεφυρωμένου SAP με το ικρίωμα της diBrPD.



Εικόνα 7. Φάσμα ESI MS του συζεύγματος SAP με το ικρίωμα της diBrPD.

Το επόμενο βήμα της συνθετικής αυτής πορείας θα είναι η δοκιμή για την σύζευξη της γέφυρας της γεμισταβίνης πάνω στο σύζευγμα ικριώματος-SAP. Για να καταστεί εφικτό αυτό, αρχικά θα πρέπει αποπροστατευτεί η δεύτερη καρβοξυλομάδα του ικριώματος στην ένωση **23** με τη διάσπαση του αλλυλοεστέρα προς σχηματισμό του οξέος **24**. Αυτό θα επιτευχθεί με την κατεργασία της ένωσης **23** με καταλύτη $Pd(PPh_3)_4$, παρουσία πυρρολιδίνης, παράγοντας το

οξύ **24** που, μετά την ενεργοποίησή του στον αντίστοιχο σουκινικό εστέρα **25** και σύζευξη με την γεμισταβίνη **20**, θα οδηγήσει στο σχηματισμό του επιθυμητού συζεύγματος **26** (Σχήμα 16).



Σχήμα 16. Πορεία για τη τελική σύνθεση του συζεύγματος diBrPD με διπλό θεραπευτικό φορτίο SAP και γεμισταβίνης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σύνθεση μορίων

1.1. Όργανα, υλικά και μέθοδοι

Στη συγκεκριμένη ενότητα, αναφέρονται τα όργανα, τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων σύνθεσης και για το χαρακτηρισμό και την εξακρίβωση της καθαρότητας των προϊόντων.

Τα αντιδραστήρια προμηθεύθηκαν από τις εταιρίες Fluorochem , Sigma-Aldrich και Alfa. Όλες οι εμπορικά διαθέσιμες χημικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες THF, DCM, CH₃CN, Et₂O, DMSO και DMF αγοράστηκαν σε άνυδρη μορφή και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα ευαίσθητα σε αέρα και υγρασία υγρά μεταφέρθηκαν με σύριγγα. Διεξήχθη χρωματογραφία στήλης flash με Silica gel 60 (230-400 mesh) όπως περιγράφεται από τους Still et al.³⁶. Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων και κατ' επέκταση της καθαρότητας των προϊόντων σε σχέση με τα αντιδρώντα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC , Thin layer Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου 60 F254, με επίστρωση Silica gel 60 της εταιρείας Merck και το χρησιμοποιούμενο έκλουσμα αναφέρθηκε σε παρένθεση. Οι πλάκες TLC απεικονίστηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV) και χρώση με υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO₄) ή με φωσφομολυβδικό οξύ (PMA), όπου κρίνεται απαραίτητο.

Για την εξάτμιση των διαλυτών και κατά συνέπεια τη συμπύκνωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (IKA Rotavapor).

Ο χαρακτηρισμός των νέων παραγώγων και η εξέταση της καθαρότητας τους έγινε με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπίας μάζας (MS).

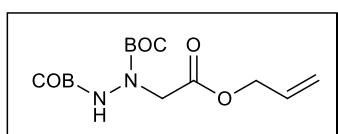
Τα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance FT-NMR 400 MHz του Χημικού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃), το δευτεριωμένο διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO-d₆) και η δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD). Όσον αφορά τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων, αυτές δίνονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα πρωτονίου χαρακτηρίζεται όπως ακολουθεί: s (singlet, απλή), d (doublet, διπλή), t (triplet, τριπλή), q (quartet, τετραπλή), m (multiplet, πολλαπλή), br (broad, ευρεία), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), tt (triplet of triplets, τριπλή τριπλών) και td (triplet of doublets, τριπλή διπλών).

Τα φάσματα μάζας ESI (ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού) καταγράφηκαν σε όργανο LC/MSD της σειράς Agilent 1100 Series. Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης ελήφθησαν υπό συνθήκες ιονισμού ηλεκτροψεκασμού με φασματομέτρο μάζας Thermo Scientific LC-MS /(LTQ)- Orbitrap.

Τα σημεία τήξης μετρήθηκαν σε όργανο Melting point meter KSP1N της εταιρείας Kruss.

1.2. Σύνθεση των ενώσεων 1-23

Ένωση 1

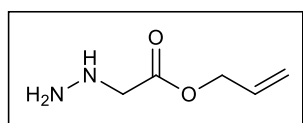


Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε η di-BOC υδραζίνη (1.000 g, 4.305 mmol, 1 eq.) και Cs_2CO_3 (2.805 g, 8.61 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (15 mL). Στη συνέχεια, προστέθηκε το allyl-chloroacetate (500 μL , 3.013 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με EtOAc/ H_2O και η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hexane/EtOAc (10:1 έως 5:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **1** ως ένα κίτρινο λάδι (500 mg, 35%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.66 (s, 0.66 H), 6.38 (br, 0.14 H), 5.89 (m, 1H), 5.28 (d, 1H, $J = 24$ Hz), 5.24 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4.62 (s, 2H), 4.24 (d, 2H, $J = 42$ Hz), 1.44 (s, 18 H).

HRMS (ESI) for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$: m/z calcd., 330.18; found, 353.17 [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Ένωση 2

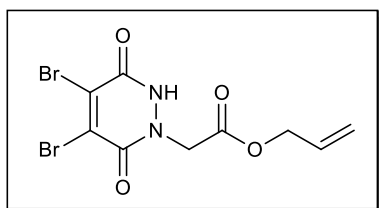


Σε διάλυμα της ένωσης **1** (500 mg, 1.51 mmol, 1 eq.) σε DCM (5 mL) προστέθηκε TFA (5 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **1**, μετά από διάστημα 3 h, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **2** ως ένα κίτρινο λάδι, που χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (170 mg, 86%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.84 (brs, 3H), 5.91-5.84 (m, 1H), 5.35-5.34 (d, 1H, $J = 17.1$ Hz), 5.28-5.26 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 4.65-4.63 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz), 3.92-3.88 (d, 2H, $J = 17.1$ Hz).

HRMS (ESI) for $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$: m/z calcd., 130.07; found, 131.08 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Ένωση 3

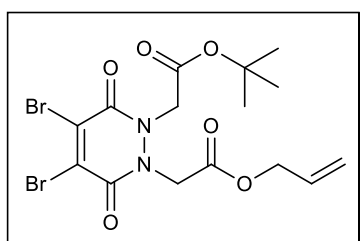


Σε μια σφαιρική φιάλη, δι-βρωμομαλεϊκός ανυδρίτης (334.2 mg, 1.306 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε AcOH (2 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη της ένωσης **2** (170 mg, 1.306 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hexane/EtOAc (3:1 έως 1:1) ως κινητή φάση, δίνοντας την ένωση **3** ως ένα κίτρινο λάδι (375.3 mg, 78%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 5.94- 5.85 (m, 1H), 5.35-5.30 (d, 1H, J = 16 Hz), 5.28-5.25 (d, 1H, J = 12 Hz), 4.77 (s, 2H), 4.68-4.67 (d, 2H, J = 4.7 Hz), 2.05 (s, 1H).

HRMS (ESI) for C₉H₈Br₂N₂O₄: m/z calcd., 367.98; found, 368.89 [M+H⁺].

Ένωση 4

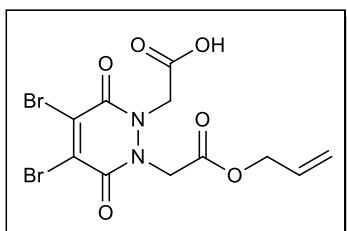


Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **3** (600.9 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) και Cs₂CO₃ (1.06 g, 3.27 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε DMF (6 mL). Στη συνέχεια, προστέθηκε βρωμοξικός t-βουτυλεστέρας (0.483 mL, 3.27 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O και η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hexane/EtOAc (10:1 έως 1:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **4** ως ένα σκούρο πορτοκαλί λάδι (482.7 mg, 61%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 5.93-5.87 (m, 1H), 5.35-5.30 (d, 1H, J = 20 Hz), 5.28-5.25 (d, 1H, J = 12 Hz), 4.75 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 1.46 (s, 9H).

HRMS (ESI) for C₁₅H₁₈Br₂N₂O₆: m/z calcd., 481.95; found, 482.95 [M+H⁺].

Ένωση 5



Σε διάλυμα της ένωσης **4** (482.7 mg, 1.001 mmol, 1 eq.) σε DCM (4 mL) προστέθηκε TFA (3 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η

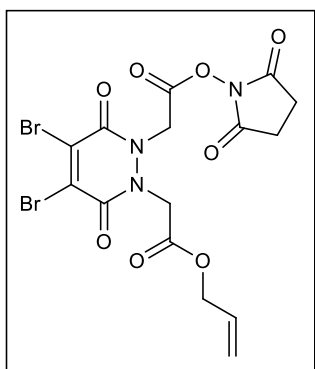
πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **4**, μετά από διάστημα 3 h, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **5** ως ένα πορτοκαλί ελαιώδες προϊόν (398.3 mg, 93%).

Σημείο Τήξης: 136-140 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 5.93-5.85 (m, 1H), 5.35-5.31 (d, 1H, J = 16 Hz), 5.29-5.26 (d, 1H, J = 12 Hz), 4.83 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.67-4.66 (d, 2H, J = 4.7 Hz).

HRMS (ESI) for C₁₁H₁₀Br₂N₂O₆: m/z calcd., 426.02; found, 426.89 [M+H⁺].

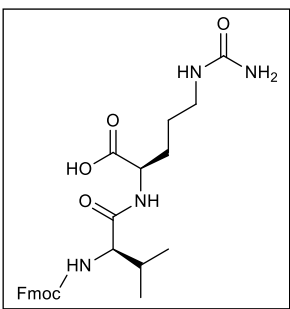
Ένωση 6



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **5** (40.0 mg, 0.094 mmol, 1 eq.) και NHS (21.6 mg, 0.188 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε THF (2 mL). Στη συνέχεια, προστέθηκε EDCI (36.0 mg, 0.188 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 24 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών EtOAc/Hex (1:1 έως 3:1) ως κινητή φάση, δίνοντας την ένωση **6** ως ένα πορτοκαλί ελαιώδες προϊόν (47.7 mg, 99%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 5.99-5.89 (m, 1H), 5.38-5.34 (d, 1H, J= 16 Hz), 5.30-5.27 (d, 1H, J= 12 Hz), 5.07 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.71-4.70 (d, 2H, J= 4.7 Hz), 2.84 (s, 4H).

Ένωση 8



Σε μια σφαιρική φιάλη Fmoc-Val (1.36 g, 4.01 mmol, 1 eq.) και NHS (0.51 g, 4.01 mmol, 1 eq.) διαλύθηκαν σε άνυδρο THF (10 mL) στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη DCC (0.87 g, 4.01 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, η DCU-ουρία διηθήθηκε και εκπλύθηκε με THF. Ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος και το προκύπτον υαλώδες στερεό (Fmoc-Val-OSu, **7**) χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

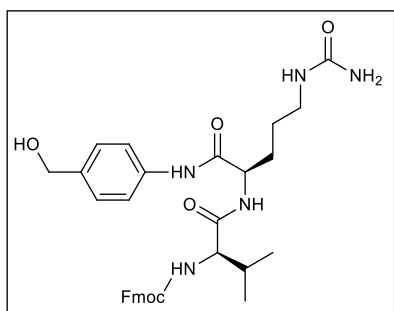
Ο ενεργοποιημένος εστέρας **7** (1.75 g, 4.00 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε DME (20 mL), και προστέθηκε σε διάλυμα κιτρουλίνης (0.74 g, 4.21 mmol, 1.05 eq.) και NaHCO₃ (0.35 g, 4.21 mmol, 1.05 eq.) σε H₂O (15 mL). Ακολούθησε

προσθήκη THF (15 mL) για να διευκολυνθεί η διαλυτότητα, και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Στη συνέχεια προστέθηκε υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος (15%, 35 mL) και το μίγμα εκχυλίστηκε με 10% i-PrOH/EtOAc (2 x 100 mL). Το στερεό προϊόν ξεκίνησε να καθιζάνει στην οργανική φάση, η οποία στη συνέχεια εκπλύθηκε με H₂O (2 x 100 mL). Στη συνέχεια, η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και το ληφθέν εναιώρημα συμπυκνώθηκε δίνοντας ένα κίτρινο λάδι το οποίο στερεοποιήθηκε μετά από προσθήκη Et₂O (20 mL) και σύντομη κατεργασία με υπερήχους. Διήθηση υπό κενό έδωσε την επιθυμητή ένωση **8** ως ένα υπόλευκο στερεό (1.22 g, 61%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆): δ(ppm) 12.52 (br s, 1H), 8.17-8.15 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.91-7.89 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 7.77-7.74 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 7.44-7.40 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 7.39-7.36 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.35-7.31 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 5.94-5.92 (t, 1H, J = 5.9 Hz), 5.36 (s, 2H), 4.30-4.25 (dd, 1H, J = 4.3 Hz), 4.24-4.22 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 4.18-4.13 (q, 1H, J = 4.2 Hz), 3.95-3.91 (t, 1H, J = 4.0 Hz), 2.97-2.93 (q, 2H, J = 6.0 Hz), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.71-1.56 (m, 2H), 1.41-1.36 (m, 1H), 0.90-0.85 (q, 6H, J = 7.5 Hz).

HRMS (ESI) for C₂₆H₃₂N₄O₆: m/z calcd., 496.23; found, 519.22 [M+Na⁺].

Ένωση 9



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε Fmoc-Val-Cit **8** (1.22 g, 2.46 mmol, 1 eq.) και PABOH (0.61 g, 4.92 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε DCM/MeOH (45 mL, 2:1). Ακολούθησε προσθήκη EEDQ (1.22 g, 4.92 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT στο σκοτάδι για 36 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίστηκαν και

στο κίτρινο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O (75 mL). Ακολούθησε κατεργασία του εναιωρήματος με υπερήχους για 5 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 15 min. Το στερεό παραλήφθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με Et₂O και ξηράνθηκε υπό κενό, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **9** ως υποκίτρινο στερεό (1.18 g, 80%).

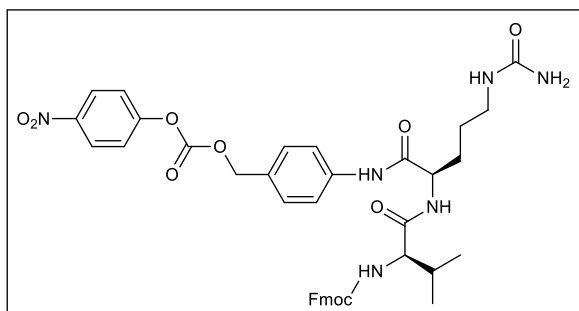
Σημείο Τήξης: 208-211 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 9.97 (s, 1H), 8.10-8.08 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.91-7.89 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 7.77-7.73 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.55-7.53 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.44-7.42 (d, 2H, J = 7.4 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.35-7.31 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 7.25-7.22 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 5.98-5.95 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 5.40 (s, 2H), 5.11-5.08 (t, 1H, J = 5.1 Hz), 4.44-4.43 (d, 2H, J = 4.5 Hz), 4.32-4.29 (m, 1H),

4.27-4.24 (m, 2H), 3.95-3.91 (m, 1H), 3.04-2.93 (m, 2H), 2.01-1.99 (m, 1H), 1.70-1.58 (m, 2H), 1.45-1.38 (m, 1H), 0.89-0.85 (q, 6H, $J = 6.0$ Hz).

HRMS (ESI) for $C_{33}H_{39}N_5O_6$: m/z calcd., 601.29; found, 602.30 $[M+H]^+$.

Ένωση 10



Σε διάλυμα δι-καρβονικού εστέρα της p-νιτροφαινόλης (809 mg, 2.66 mmol, 4 eq.) και DIPEA (232 μ L, 1.33 mmol, 2 eq.) σε άνυδρο DMF (4 mL) σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε σταγόδην διάλυμα της ένωσης **9**

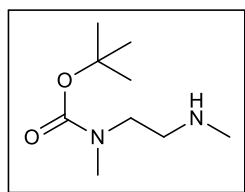
(400 mg, 0.665 mmol, 1 eq) ως διάλυμα σε άνυδρο DMF (6 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε Et_2O (10 mL). Ακολούθησε κατεργασία του υπολείμματος με υπερήχους για 15 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό διηθήθηκε, εκπλύθηκε με Et_2O , επεξεργάστηκε με $Et_2O/EtOAc$ (30 mL, 2:1), αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h στους 0 °C και παραλήφθηκε με διήθηση, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **10** ως υποκίτρινο στερεό (380 g, 75%).

Σημείο Τήξης: 176-180 °C

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 10.14 (s, 1H), 8.33-8.31 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 8.15-8.13 (m, 1H), 7.90-7.88 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.77-7.73 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.66-7.64 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.59-7.56 (d, 2H, $J = 12$ Hz), 7.41 (m, 4H), 7.35-7.31 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.99-5.97 (t, 1H, $J = 4.0$ Hz), 5.41 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.46-4.41 (q, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.31-4.29 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.25-4.23 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 3.96-3.92 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 3.05-2.89 (m, 2H), 2.02-1.98 (q, 1H, $J = 6.0$ Hz), 1.71-1.59 (m, 2H), 1.47-1.35 (m, 2H), 0.90-0.85 (q, 6H, $J = 6.7$ Hz).

HRMS (ESI) for $C_{40}H_{42}N_6O_{10}$: m/z calcd., 766.30; found, 767.30 $[M+H]^+$.

Ένωση 11

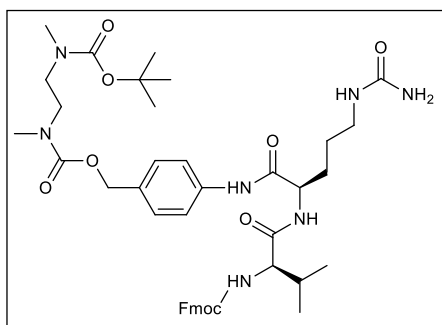


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκε N,N'-δι-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (0.61 mL, 5.67 mmoles, 2 eq), διαλύθηκε σε THF (10 mL) και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε σταγόδην διάλυμα BOC-ανυδρίτη (618 mg, 2.84 mmoles, 1 eq) σε THF (5 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 0°C υπό ατμόσφαιρα αργού για 6 h. Το μίγμα

παίρνει λευκό γαλακτώδες χρώμα και όψη. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O και στη συνέχεια, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CHCl₃/MeOH (20:1 έως 1:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **11** ως ένα υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν (289.1 mg, 48%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 3.33 (s, 1H), 2.86 (s, 3H), 2.73 (s, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.76 (s, 2H), 1.44 (s, 9H).

Ένωση 12



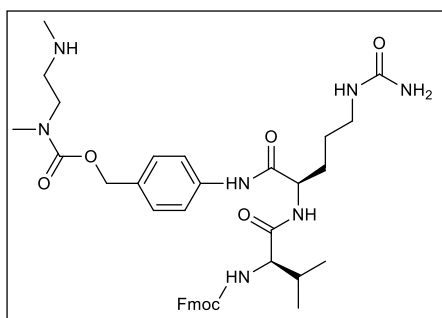
Σε διάλυμα της ένωσης **10** (19.2 mg, 0.025 mmol, 1 eq.) σε DMF (1.5 mL) προστέθηκε σταγόδην διάλυμα της ένωσης **11** (5.4 mg, 0.030 mmoles, 1.2 eq.) σε DCM (100 μL). Στη συνέχεια, στο μίγμα προστέθηκε TEA (8 μL, 0.050 mmoles, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 24 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης

ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το πορτοκαλί φιλμ καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM:MeOH (15:1 έως 10:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **12** ως υποκίτρινο λάδι (15.0 mg, 72%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ(ppm) 7.79-7.78 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 7.67-7.63 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 7.57 (s, 1H), 7.39-7.28 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.84 (s, 3H), 4.56-4.50 (m, 1H), 4.39-4.36 (m, 2H), 4.23-4.20 (t, 1H, J = 4.2 Hz), 3.96-3.94 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 3.41-3.32 (m, 6H), 3.20-3.06 (m, 3H), 2.93-2.89 (d, 3H, J = 3.0 Hz), 2.84 (s, 1H), 2.73 (s, 1H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.91-1.73 (m, 2H), 1.57-1.56 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 0.97-0.94 (t, 6H, J = 4.0 Hz).

HRMS (ESI) for C₄₃H₅₇N₇O₁₀: m/z calcd., 815.95; found, 838.41 [M+Na⁺].

Ένωση 13

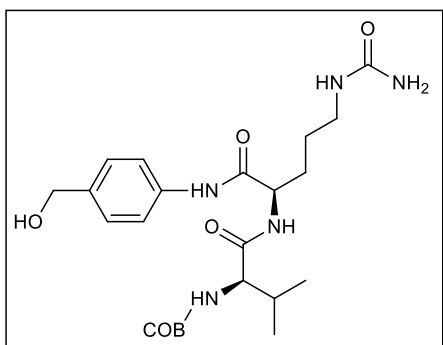


Σε διάλυμα της ένωσης **12** (15 mg, 0.018 mmol, 1 eq.) σε DCM (1 mL) προστέθηκε TFA (1 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **12**, μετά από διάστημα 4 h, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, δίνοντας την

ένωση **13** ως ένα υποκίτρινο λάδι (10.0 mg, 78%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₆): δ(ppm) 7.81-7.79 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 7.68-7.63 (q, 2H, J = 7.7 Hz), 7.56-7.54 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.40-7.29 (m, 5H), 5.35 (s, 2H), 4.87 (s, 3H), 4.55-4.52 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 4.41-4.37 (t, 2H, J = 4.5 Hz), 4.27-4.23 (t, 1H, J = 4.3 Hz), 3.98-3.95 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 3.65 (s, 6H), 3.23-3.10 (m, 3H), 2.80 (s, 5H), 2.08-2.05 (m, 1H), 1.92-1.74 (m, 2H), 1.60-1.56 (m, 2H), 1.29 (s, 1H), 0.98-0.90 (m, 6H).

Ένωση 14



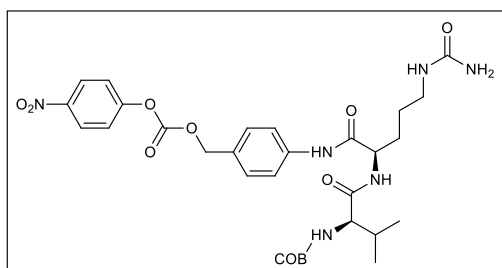
Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε NBOC-Val-Cit (300 mg, 0.801 mmol, 1 eq.) και PABOH (197 mg, 1.60 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε DCM/MeOH (15 mL, 2:1). Ακολούθησε προσθήκη EEDQ (396 mg, 1.60 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT στο σκοτάδι για 36 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίστηκαν και

στο κίτρινο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O (50 mL). Ακολούθησε κατεργασία του εναιωρήματος με υπερήχους για 5 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με Et₂O και ξηράνθηκε υπό κενό. Ύστερα, ακολούθησε ανακρυστάλλωσή του σε EtOAc/MeOH (5:1) στους 50 °C και με διήθηση του προκύπτοντος μίγματος, συλλέχθηκε η επιθυμητή ένωση **14** ως υποκίτρινο στερεό (250 mg, 65%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 9.96 (s, 1H), 7.97-7.95 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.54-7.52 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.24-7.22 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 6.75-6.73 (d, 1H, J = 6.7 Hz), 5.97-5.95 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 5.39 (s, 2H), 5.10-5.08 (t, 1H, J = 5.1 Hz), 4.43-4.41 (d, 4H, J = 4.5 Hz), 4.05-4.00 (m, 1H), 3.84-3.80 (t, 1H, J = 4.0 Hz), 3.03-2.92 (m, 2H), 1.98 (br s, 2H), 1.71-1.54 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.86-0.84 (d, 3H, J = 4.5 Hz), 0.82-0.80 (d, 3H, J = 4.5 Hz).

HRMS (ESI) for C₂₃H₃₇N₅O₆: m/z calcd., 479.27; found, 502.26 [M+Na⁺].

Ένωση 15



Σε διάλυμα δι-ανθρακικού εστέρα της p-νιτροφαινόλης (634 mg, 2.08 mmol, 4 eq.) και DIPEA (181 μL, 1.04 mmol, 2 eq.) σε άνυδρο DMF (4 mL) σε δίλαιο σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε στάγδην διάλυμα της ένωσης **14** (250

mg, 0.521 mmol, 1 eq) ως διάλυμα σε άνυδρο DMF (3 mL) και το μίγμα της

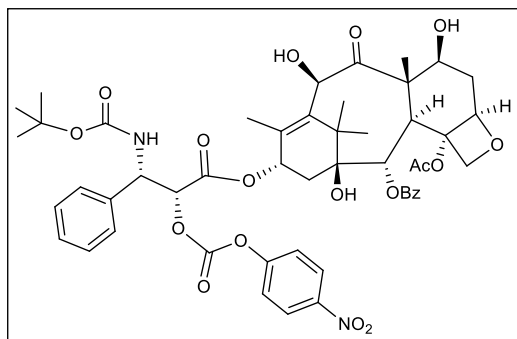
αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O (20 mL). Ακολούθησε κατεργασία του υπολείμματος με υπερήχους για 15 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό διηθήθηκε, εκπλύθηκε με Et₂O, επεξεργάστηκε με Et₂O/EtOAc (30 mL, 2:1), αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h στους 0 °C και παραλήφθηκε με διήθηση. Ύστερα, ακολούθησε ανακρυστάλλωσή του σε EtOAc/MeOH (5:1) στους 50 °C και με διήθηση του προκύπτοντος μίγματος, συλλέχθηκε η επιθυμητή ένωση **15** ως υποκίτρινο στερεό (242 mg, 72%).

Σημείο Τήξης: 170-175 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 10.14 (s, 1H), 8.33-8.31 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 8.02-8.00 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.66-7.64 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.59-7.57 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.43-7.41 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.75-6.73 (d, 1H, J = 6.7 Hz), 5.99-5.96 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.46-4.44 (d, 1H, J = 4.5 Hz), 3.86-3.83 (t, 1H, J = 4.0 Hz), 3.03-2.96 (dd, 2H, J = 4.0 Hz), 1.97-1.96 (d, 2H, J = 4.0 Hz), 1.70-1.59 (dd, 2H, J = 8.0 Hz), 1.39 (s, 9H), 0.88-0.86 (d, 3H, J = 8.0 Hz), 0.84-0.82 (d, 3H, J = 8.0 Hz).

HRMS (ESI) for C₃₀H₄₀N₆O₁₀: m/z calcd., 644.28; found, 667.27 [M+Na⁺].

Ένωση 16



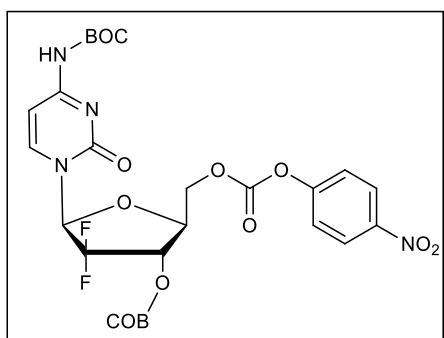
Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε ντοσεταξέλη (40 mg, 0.05 mmol, 1 eq.) και δι-ανθρακικός εστέρας της p- νιτροφαινόλης (18 mg, 0.06 mmol, 1.2 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DCM (3 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη TEA (7 μL, 0.05 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της

αντίδρασης αναδεύτηκε στους 0 °C για 48 h. Με το πέρας της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του DCM υπό κενό και το κίτρινο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hex:EtOAc (3:1 έως 1:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **16** ως κίτρινο λάδι (35.7 mg, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 8.26 (d, 2H, J = 9.4 Hz), 8.13 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.60 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 7.52-7.40 (m, 5H), 7.38-7.31 (m, 5H), 6.33 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 5.71 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 5.42-5.38 (m, 2H), 5.20 (s, 1H), 4.97 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 4.34 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 4.26-4.19 (m, 2H), 3.98 (q, 1H, J = 2.3 Hz), 3.95 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 2.62-2.60 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.33 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.14 (s, 3H).

HRMS (ESI) for $C_{50}H_{56}N_2O_{18}$: m/z calcd., 972.35; found, 973.36 $[M+H]^+$.

Ένωση 17

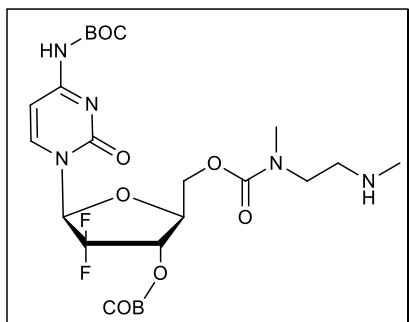


Σε διάλυμα δι-ανθρακικού εστέρα της p-νιτροφαινόλης (131.2 mg, 0.431 mmol, 2 eq.) σε άνυδρο DCM (2 mL) σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε στάγδην διάλυμα της δι-BOC προστατευμένης γεμισταβίνης (100 mg, 0.216 mmol, 1 eq.) σε άνυδρο DCM (3 mL). Στη συνέχεια προστέθηκε DIPEA (75 μ L, 0.431 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίστηκε με DCM/ H_2O , η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, πλύθηκε αρχικά με Et_2O και παραλήφθηκε στερεό κιτρινωπού χρώματος με μηχανική απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια, έγινε κατεργασία του στερεού με Hex σε υπερήχους και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 μέρα. Ακολούθησε μηχανική απόχυση του διαλύτη, εξάτμιση και ξήρανση υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **17** ως υποκίτρινο φιλμ (133.1 mg, 98%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.30 (d, 2H, J = 9.1 Hz), 7.72 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.40 (d, 2H, J = 9.1 Hz), 7.29 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 6.44 (t, 1H, J = 9.1 Hz), 5.24-5.18 (m, 1H), 4.65 (d, 2H, J = 3.8 Hz), 4.46-4.43 (m, 1H), 1.51 (s, 18H).

HRMS (ESI) for $C_{26}H_{30}F_2N_4O_{12}$: m/z calcd., 628.18; found, 629.19 $[M+H]^+$.

Ένωση 18



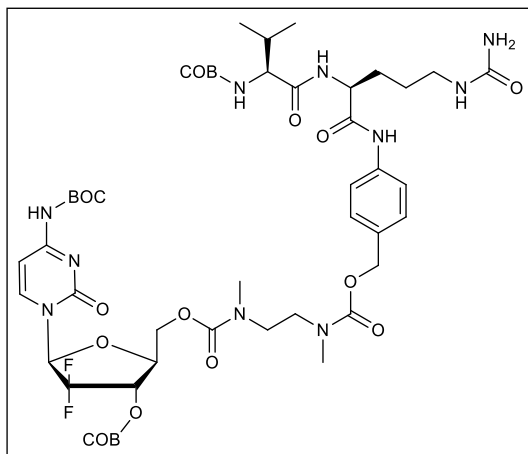
Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη, προστέθηκε N,N'-διμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (91.3 μ L, 0.848 mmol, 4 eq.) και TEA (118 μ L, 0.848 mmol, 4 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DCM (5 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη διαλύματος της ένωσης **17** (133.1 mg, 0.212 mmol, 1 eq.) σε άνυδρο DCM (5 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού, για 72 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε εκχύλιση με DCM/ H_2O και το μίγμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O/NH_4Cl και $H_2O/NaHCO_3$. Στη συνέχεια, η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **18** ως ένα υποκίτρινο στερεό, που

χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (118.8 mg, 97%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ(ppm) 8.01 (m, 1H), 7.13-7.11 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 6.29 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.40-4.39 (d, 2H, J = 4.4 Hz), 3.48 (s, 2H), 2.99-2.96 (m, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.47 (s, 9H).

HRMS (ESI) for C₂₄H₃₈F₂N₅O₉: m/z calcd., 577.58; found, 578.26 [M+H⁺].

Ένωση 19



Σε μια δίλαιμη σφαιρική φιάλη η ένωση **18** (118.8 mg, 0.206 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (2 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην διάλυμα της διπεπτιδικής γέφυρας **15** (132.6 mg, 0.206 mmol, 1 eq.), σε άνυδρο DMF (1 mL). Ακολούθησε η προσθήκη TEA (0.143 mL, 1.03 mmol, 5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε

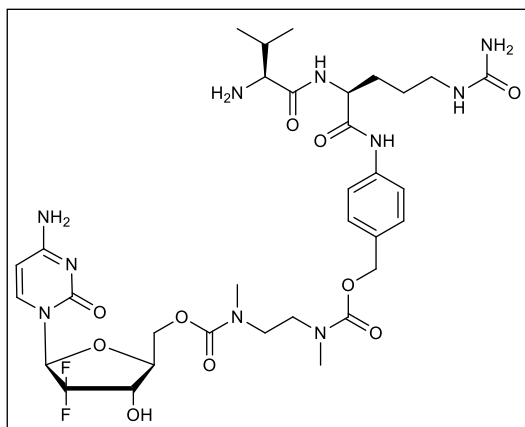
σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το DMF εξατμίστηκε υπό κενό και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με DCM/H₂O και εκπλύθηκε με H₂O/NH₄Cl. Στη συνέχεια, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH (20:1 έως 5:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **19** ως ένα υποκίτρινο στερεό (123 mg, 55%).

Σημείο Τήξης: 148 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 10.58 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.99-7.97 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.58-7.56 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.28-7.26 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.12 (s, 1H), 6.75-6.72 (d, 1H, J = 6.7 Hz), 6.30 (s, 1H), 5.98-5.96 (t, 1H, J = 4.0 Hz), 5.41 (s, 2H), 5.25 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.44-4.43 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 4.37 (s, 2H), 3.86-3.82 (t, 1H, J = 3.8 Hz), 3.42 (m, 4H), 3.04-2.93 (m, 2H), 2.84-2.76 (m, 6H), 1.95 (m, 1H), 1.70-1.57 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 0.87-0.81 (dd, 6H, J = 8.0 Hz).

HRMS (ESI) for C₄₈H₇₂F₂N₁₀O₁₆: m/z calcd., 1082.51; found, 1105.50 [M+Na⁺].

Ένωση 20



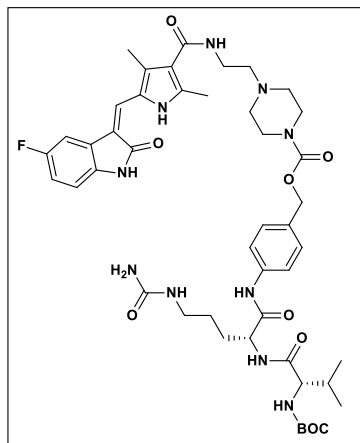
Σε διάλυμα της ένωσης **19** (10 mg, 0.009 mmol, 1 eq.) σε DCM (1.5 mL) προστέθηκε TFA (55 μ L, 0.736 mmol, 80 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **19**, μετά από διάστημα 3 h, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό δίνοντας ένα κίτρινο λάδι. Το υπόλειμμα στη

συνέχεια εκπλύθηκε διαδοχικά με Et₂O και DCM και ξηράνθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **20** ως ένα λευκό στερεό (6.2 mg, 86%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.11 (s, 1H), 8.68-8.66 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 8.10 (s, 3H), 7.78-7.74 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.78-7.74 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.55-7.53 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 7.26 (s, 1H), 7.24 (d, 2H), 6.15-6.13 (m, 1H), 6.09 (m, 1H), 6.03-6.01 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 5.38 (s, 1H), 4.54-4.49 (q, 1H, J = 4.5 Hz), 4.44 (s, 2H), 4.36-4.34 (d, 1H, J = 4.4 Hz), 4.31-4.26 (dd, 2H, J = 4.3 Hz), 4.10 (s, 2H), 3.67-3.51 (m, 4H), 3.08 (s, 1H), 3.03-2.97 (m, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.11-2.06 (m, 1H), 1.78-1.58 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 2H), 0.96-0.94 (dd, 6H, J = 2.4 Hz).

HRMS (ESI) for C₃₃H₄₈F₂N₁₀O₁₀: m/z calcd., 782.35; found, 783.35 [M+H⁺], 392.18 [(M+2)/2].

Ένωση 21



Σε σφαιρική φιάλη η ένωση **15** (114.2 mg, 0.178 mmol, 1.2 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DMF (3mL). Στη συνέχεια, προστέθηκε το υδροχλωρικό άλας του SAP (60.9 mg, 0.148 mmol, 1 eq.) και ακολούθως TEA (33 μ L, 0.444 mmol, 3 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το DMF εξατμίστηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O (40 mL). Ακολούθησε κατεργασία του υπολείμματος με υπερήχους για 15 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για

30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με μηχανική απόχυση του διαλύτη, εκπλύθηκε με Et₂O, επεξεργάστηκε με Et₂O/EtOAc (30 mL, 2:1) και αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h στους 0 °C. Το στερεό που παραλήφθηκε ύστερα από μηχανική απόχυση των διαλυτών και ξήρανση υπό κενό, ανακρυσταλλώθηκε

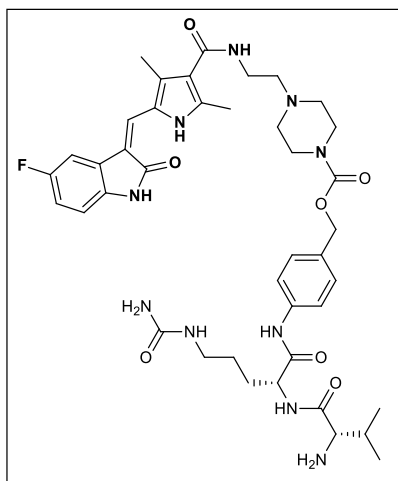
σε EtOAc/MeOH (5:1) στους 50 °C και με διήθηση, συλλέχθηκε η επιθυμητή ένωση **21** ως πορτοκαλί κρυσταλλικό στερεό (65 mg, 48%).

Σημείο Τήξης: 187-193 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 13.70 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.01-8.00 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 7.78-7.73 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 7.62-7.60 (d, 3H, J = 8.0 Hz), 7.43-7.41 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.33-7.32 (d, 2H, J = 4.0 Hz), 7.03-6.73 (m, 2H), 6.02 (brs, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.07-5.03 (d, 2H, J = 16.0 Hz), 4.45-4.44 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 3.86-3.82 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 3.08-2.95 (m, 8H), 2.47-2.45 (d, 5H, J = 8.0 Hz), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.71-1.59 (dd, 3H, J = 8.0 Hz), 1.39 (s, 10H), 1.21-1.18 (m, 6H), 0.87-0.82 (dd, 6H, J = 8.0 Hz).

HRMS (ESI) for C₄₆H₆₁FN₁₀O₉: m/z calcd., 916.46; found, 917.46 [M+H⁺].

Ένωση 22



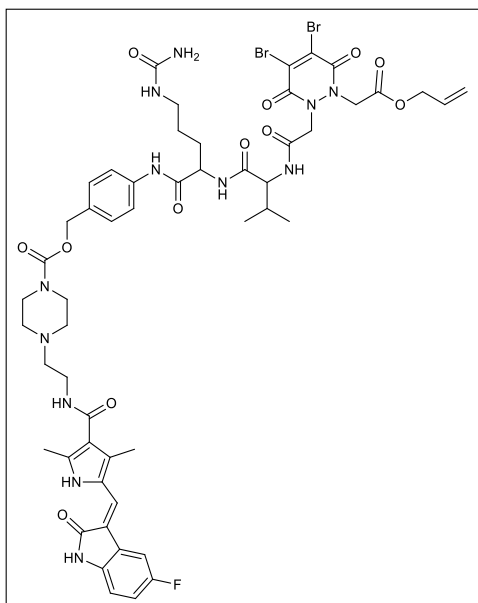
Σε σφαιρική φιάλη με την ένωση **21** (50 mg, 0.055 mmol, 1 eq.) σε DCM (2 mL) προστέθηκε TFA (2 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **21**, μετά από διάστημα 4 h, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό δίνοντας ένα πορτοκαλί φιλμ. Το υπόλειμμα στη συνέχεια εκπλύθηκε με Et₂O και ξηράνθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **22** ως ένα πορτοκαλί κρυσταλλικό στερεό (43 mg, 95%).

Σημείο Τήξης: 190 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) 13.76-13.72 (d, 1H, J = 16.0 Hz), 10.93-10.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 10.30-10.23 (m, 1H), 8.71-8.69 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.73 (m, 2H), 7.62-7.60 (m, 3H), 7.41-7.36 (m, 3H), 6.94-6.84 (m, 2H), 6.09 (brs, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.06 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.52-4.51 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 3.67-3.65 (s, 1H), 3.20-3.09 (m, 8H), 2.48-2.44 (m, 6H), 2.23 (s, 1H), 2.09-2.08 (d, 2H, J = 4.0 Hz), 1.72-1.64 (dd, 3H, J = 8.0 Hz), 1.50-1.44 (m, 3H), 1.20-1.18 (m, 3H), 0.96-0.94 (d, 6H, J = 8.0 Hz).

HRMS (ESI) for C₄₁H₅₃FN₁₀O₇: m/z calcd., 816.41; found, 409.21 [(M+2)/2], 817.41 [M+H⁺].

Ένωση 23



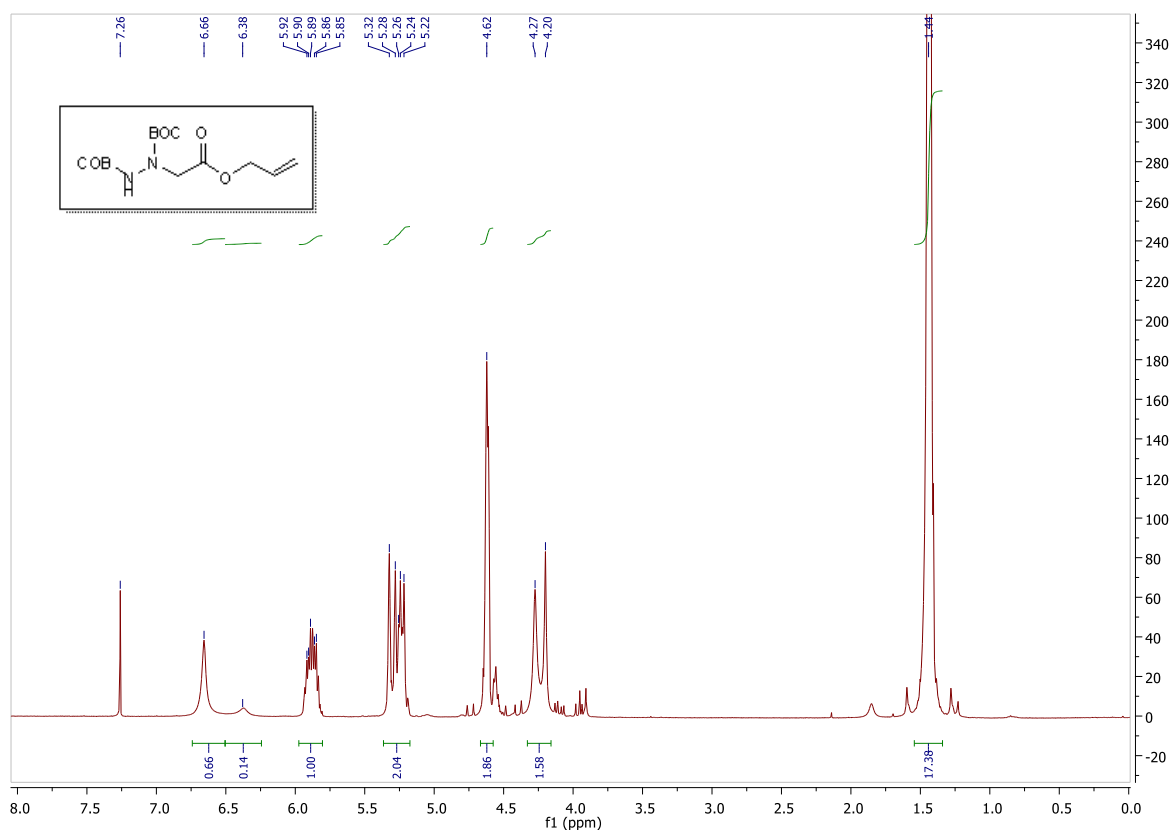
Σε σφαιρική φιάλη με την ένωση **6** (15.6 mg, 0.031 mmol, 1 eq.) σε DMF (2 mL) προστίθεται στάγδην διάλυμα της ένωσης **22** (30.2 mg, 0.037 mmol, 1.2 eq.) σε DMF (3 mL). Στη συνέχεια, προστίθεται TEA (15 μ L, 0.102 mmol, 3.3 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε RT για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το DMF εξατμίστηκε υπό κενό και το πορτοκαλί φιλμ που προέκυψε εκπλύθηκε διαδοχικά με Et₂O και DCM. Ακολούθησε κατεργασία του υπολείμματος με υπερήχους για 15 min και στη συνέχεια αφέρθηκε σε ηρεμία για

30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με μηχανική απόχυση του διαλύτη και ξηράνθηκε υπό κενό, δίνοντας την επιθυμητή ένωση **23** ως κίτρινο στερεό (32 mg, 84%).

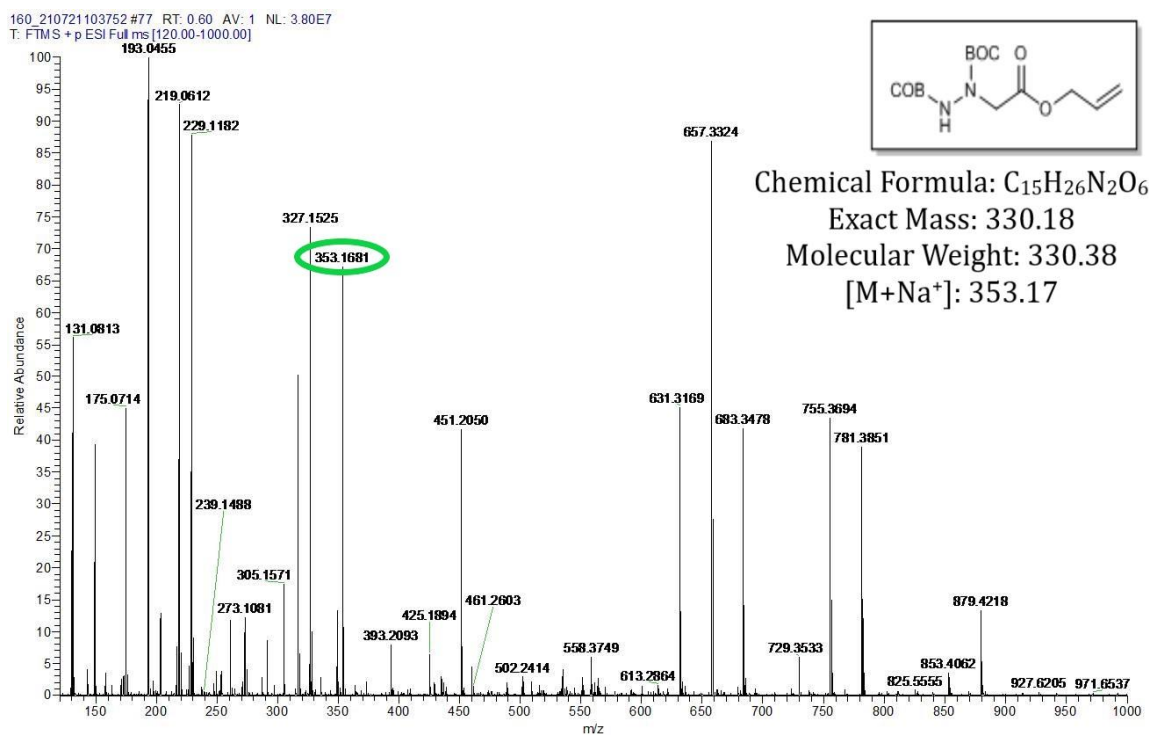
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 13.74 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.78-7.74 (m, 2H), 7.61-7.53 (dd, 3H, J = 7.6 Hz), 7.35-7.22 (m, 3H), 6.97-6.85 (m, 2H), 6.07-5.99 (m, 1H), 5.92-5.89 (m, 1H), 5.48-5.42 (dd, 2H, J = 5.5 Hz), 5.05 (brs, 3H), 4.82-4.76 (m, 2H), 4.64 (brs, 2H), 4.43-4.41 (m, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.12-3.00 (m, 8H), 2.46 (s, 6H), 2.23 (s, 1H), 2.09 (s, 1H), 1.74-1.61 (dd, 3H, J = 8.0 Hz), 1.47-1.43 (m, 3H), 1.31-1.28 (t, 2H, J = 4.0 Hz), 1.20-1.17 (m, 3H), 0.96-0.95 (d, 3H, J = 4.0 Hz), 0.88-0.84 (m, 3H).

HRMS (ESI) for C₅₂H₆₁Br₂FN₁₂O₁₂: m/z calcd., 1224.94; found, 1225.29 [M +H⁺].

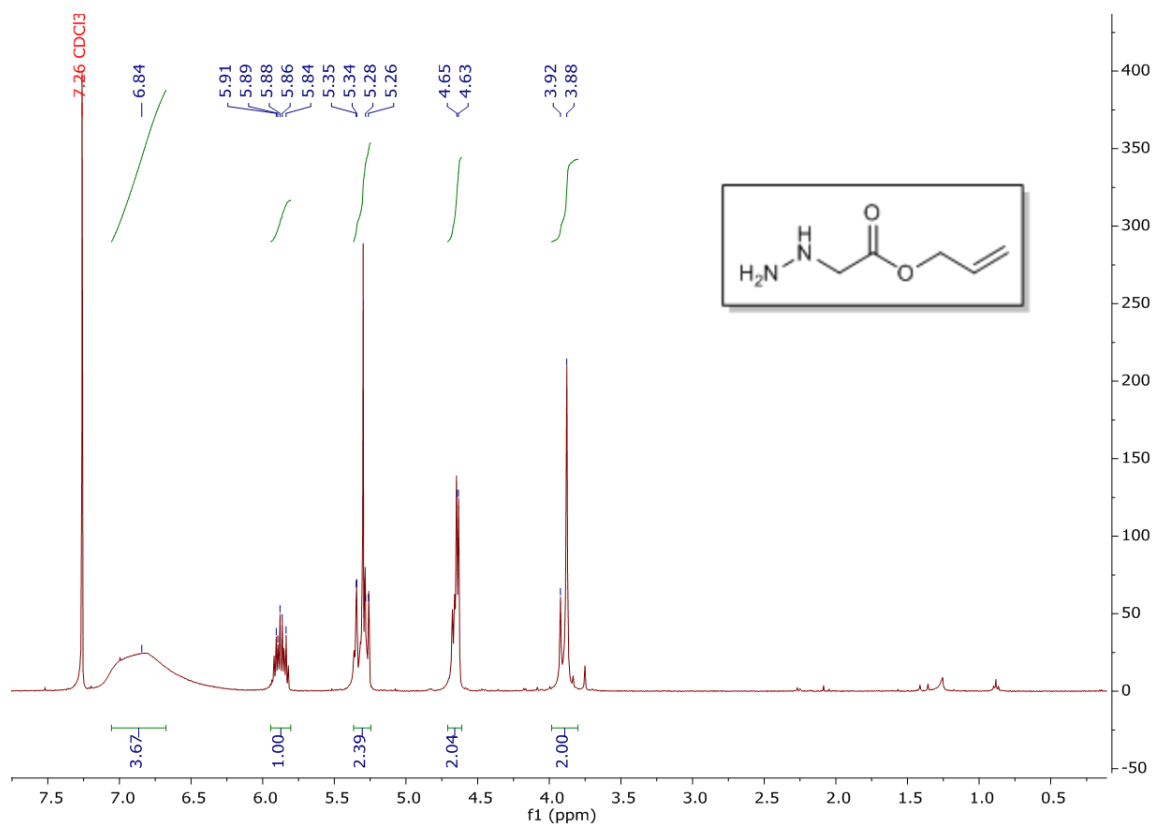
Φασματοσκοπικά δεδομένα ενώσεων



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

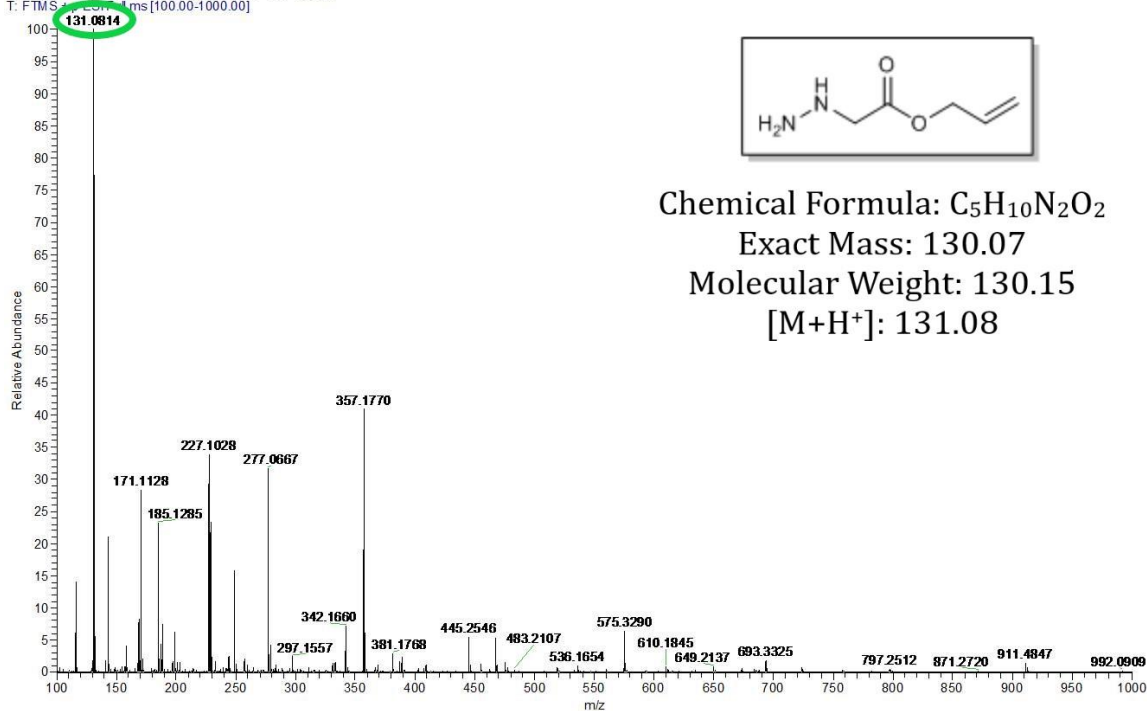


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **1**.

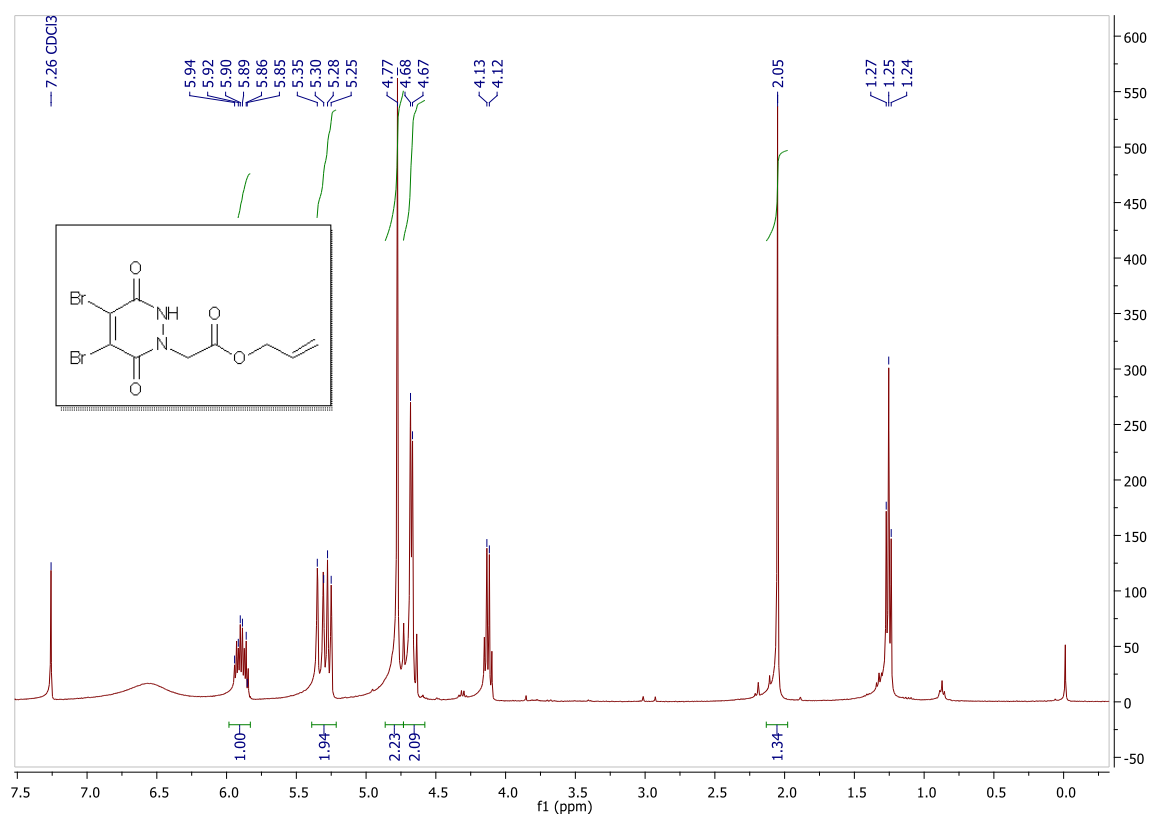


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) φάσμα της ένωσης **2**.

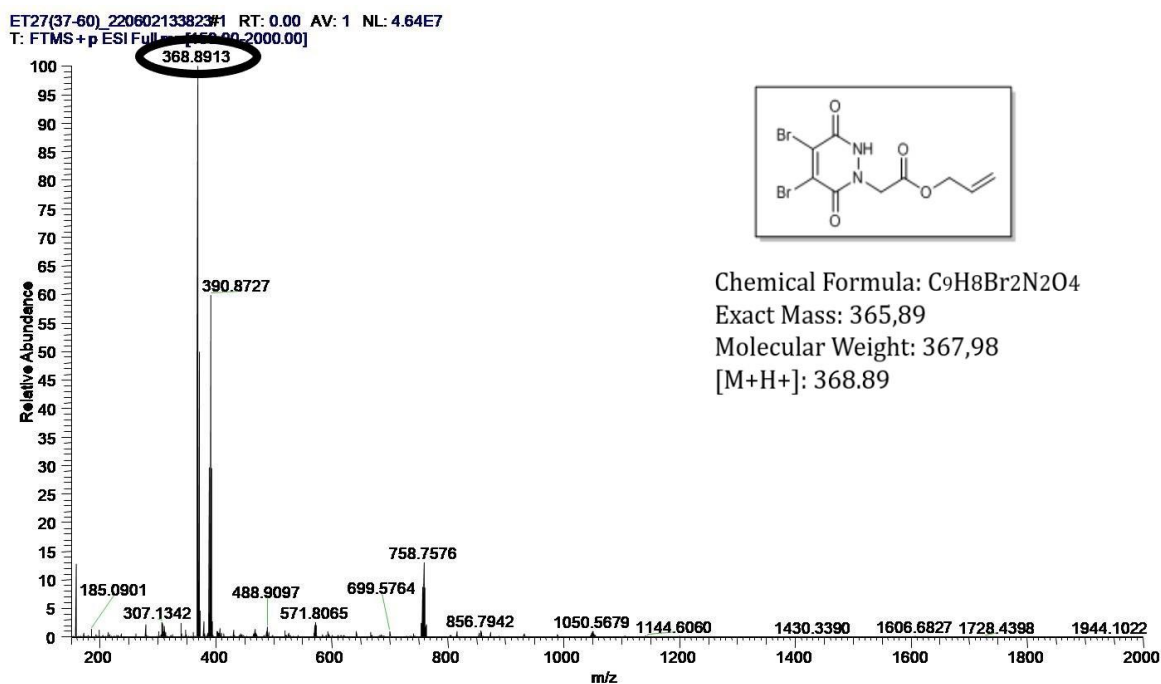
1-162_210720134705#9 RT: 0.06 AV: 1 NL: 7.32E7
T: FIMS [100.00-1000.00]



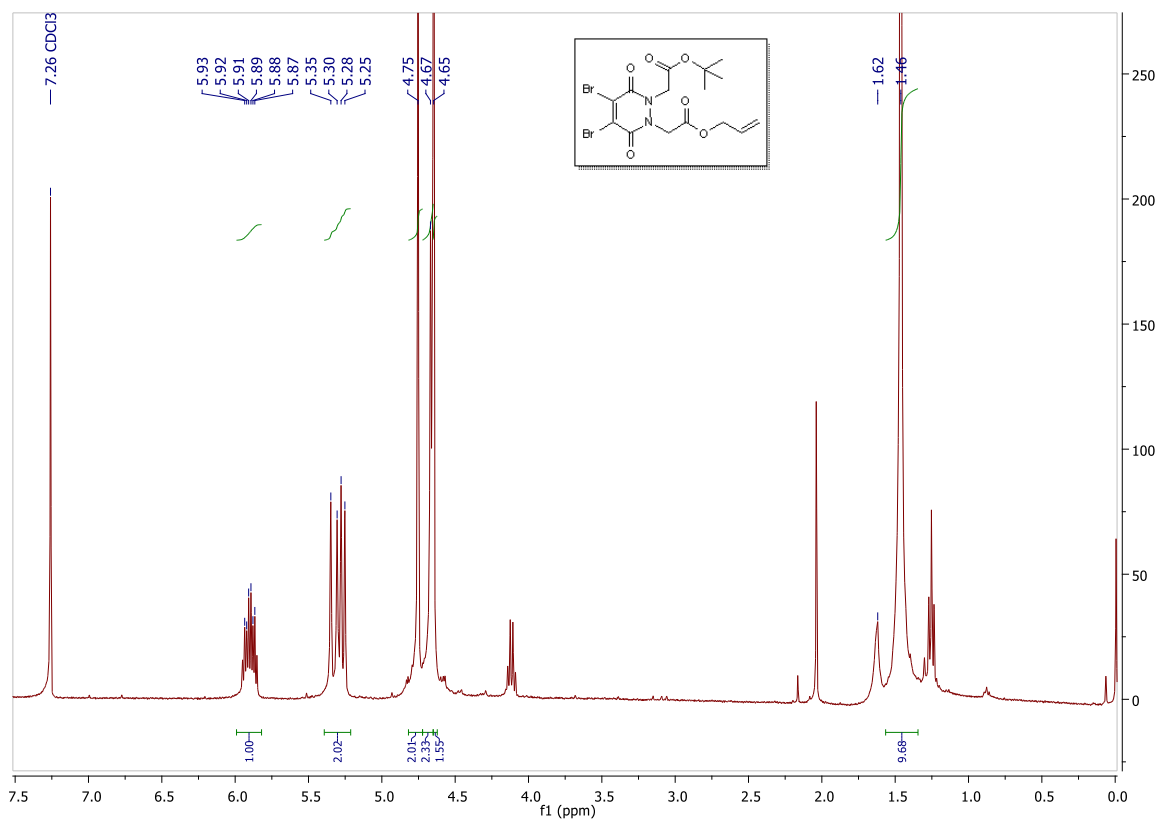
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 2.



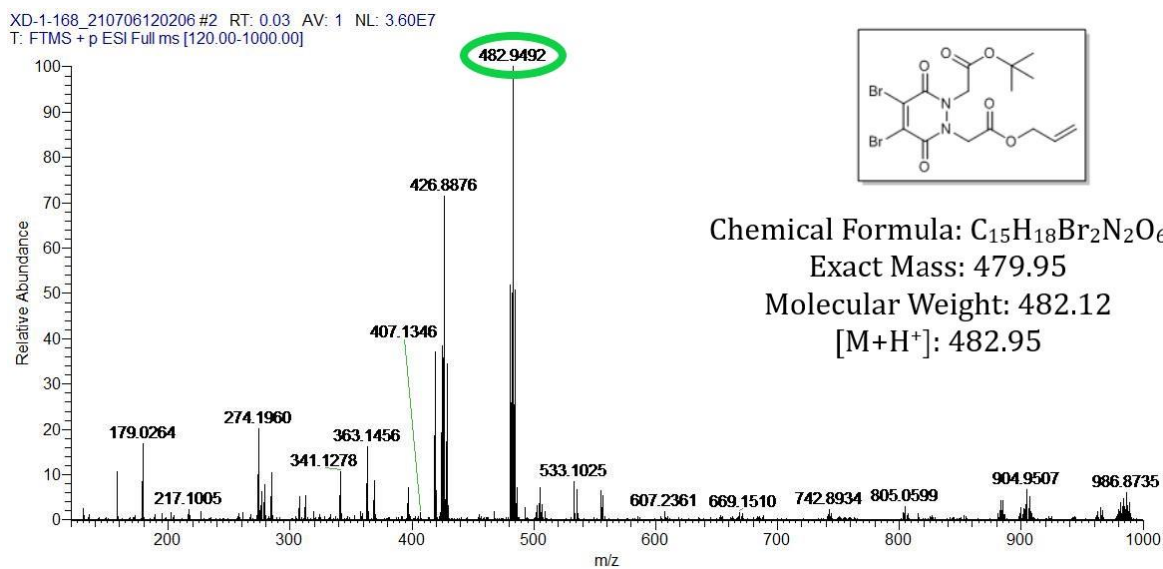
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) φάσμα της ένωσης 3.



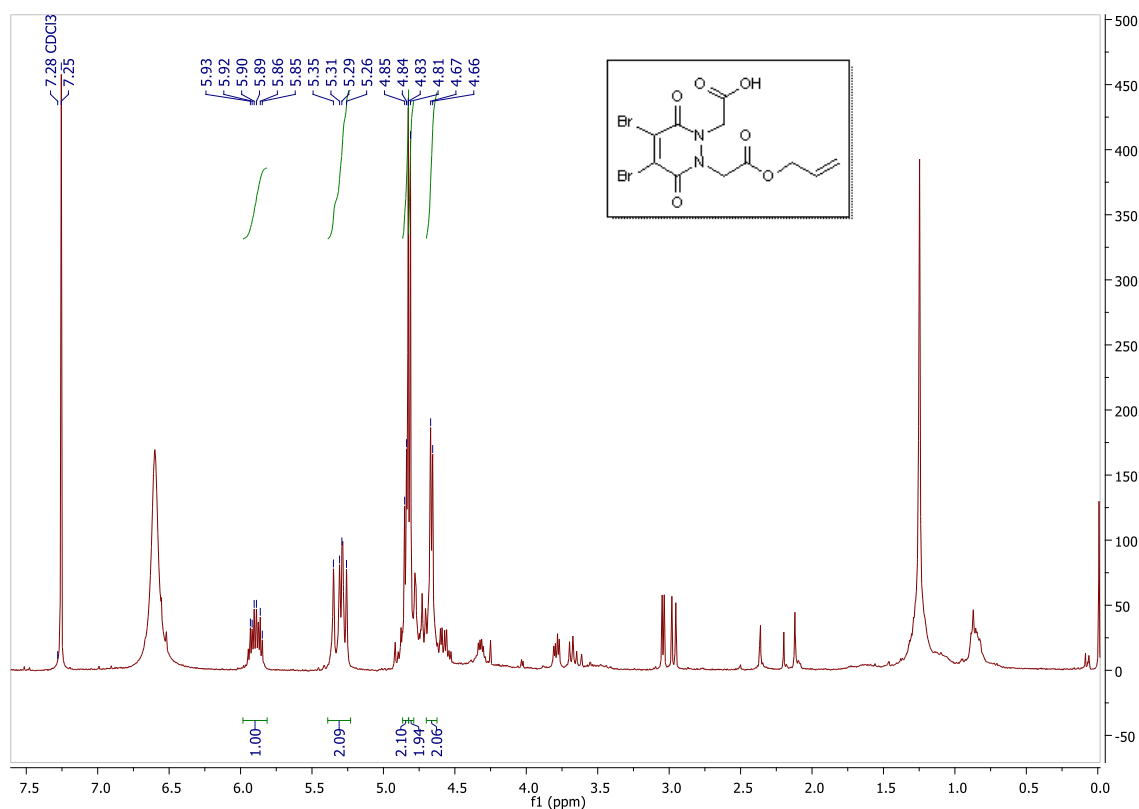
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 3.



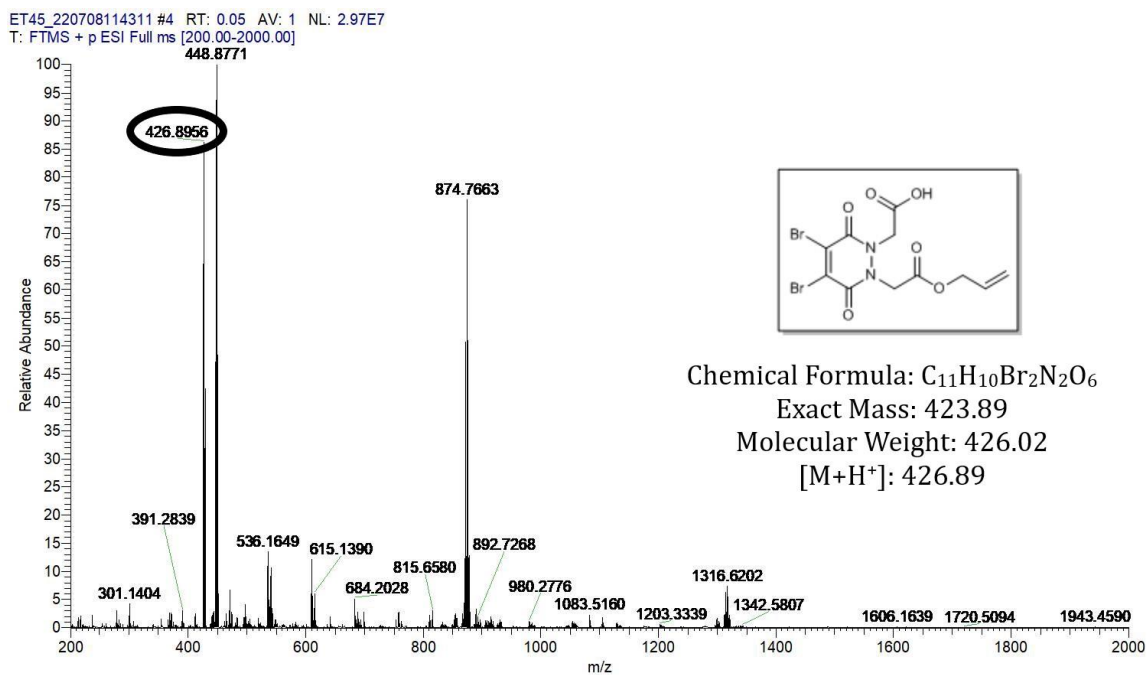
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) φάσμα της ένωσης 4.



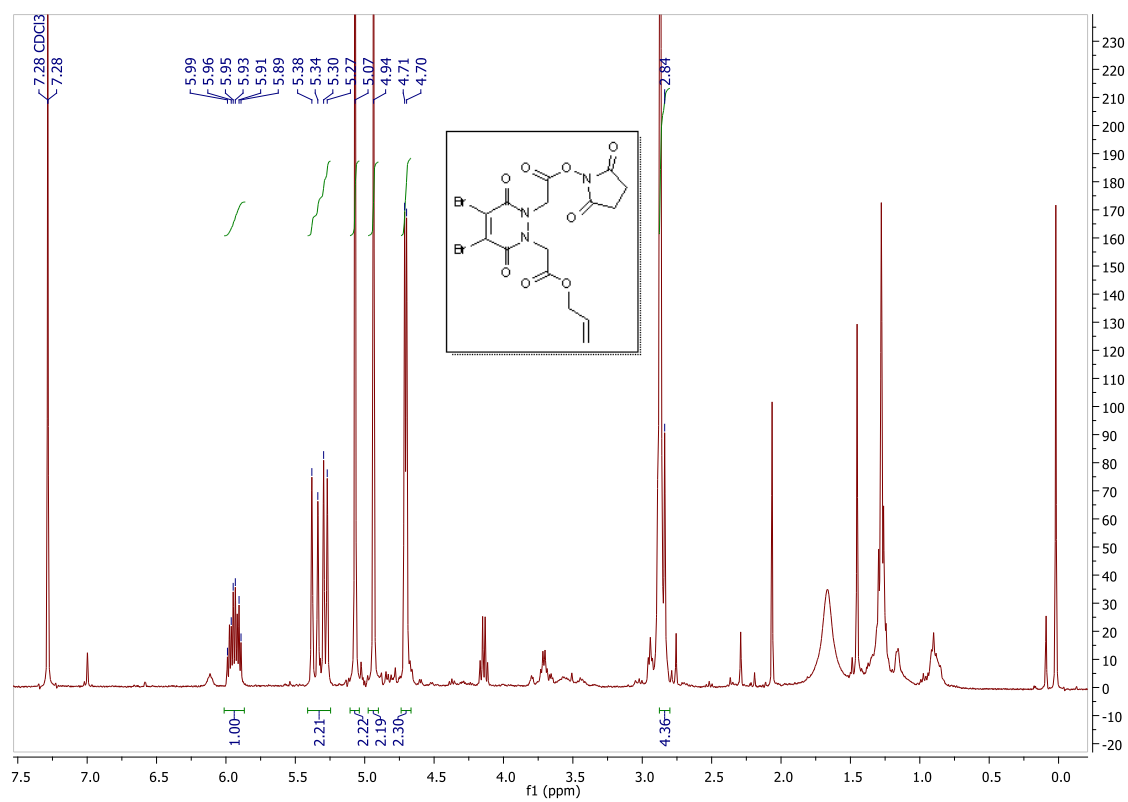
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 4.



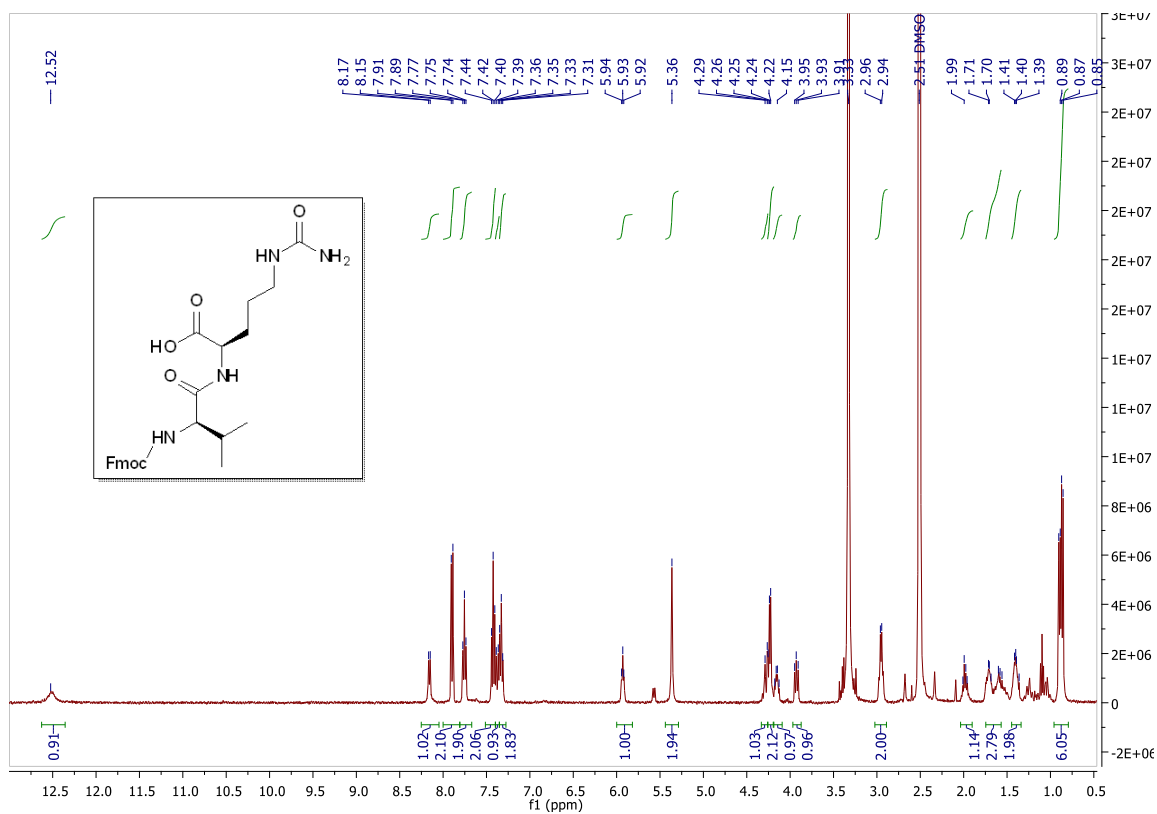
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) φάσμα της ένωσης **5**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **5**.

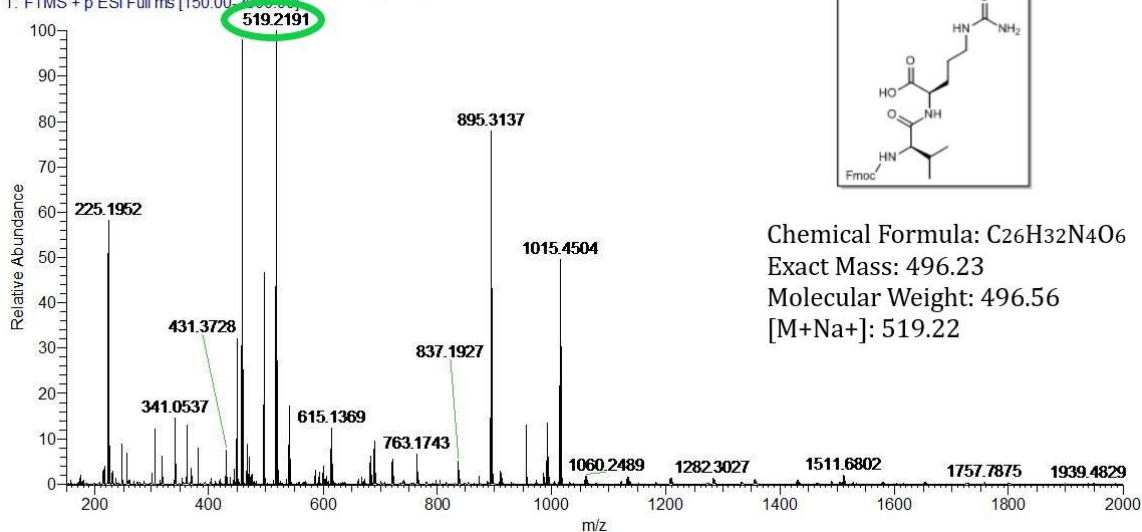


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **6**.

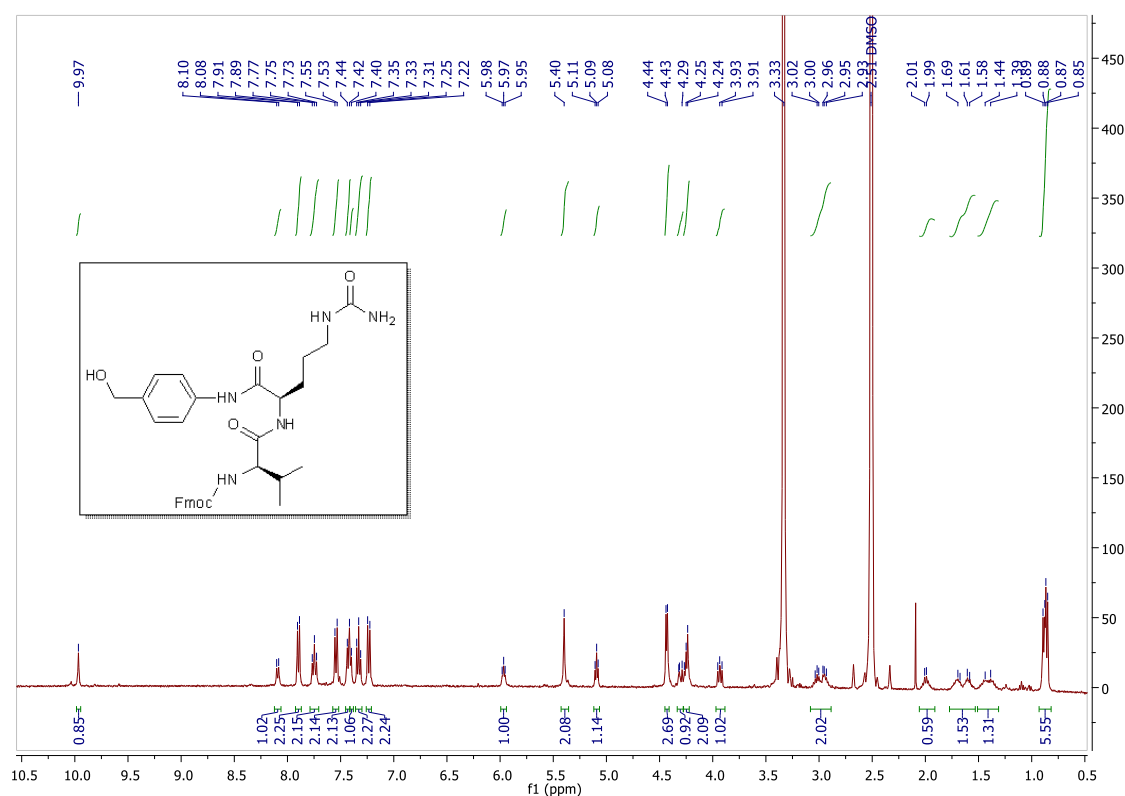


^1H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης **8**.

BX1_100_200711135727 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.47E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

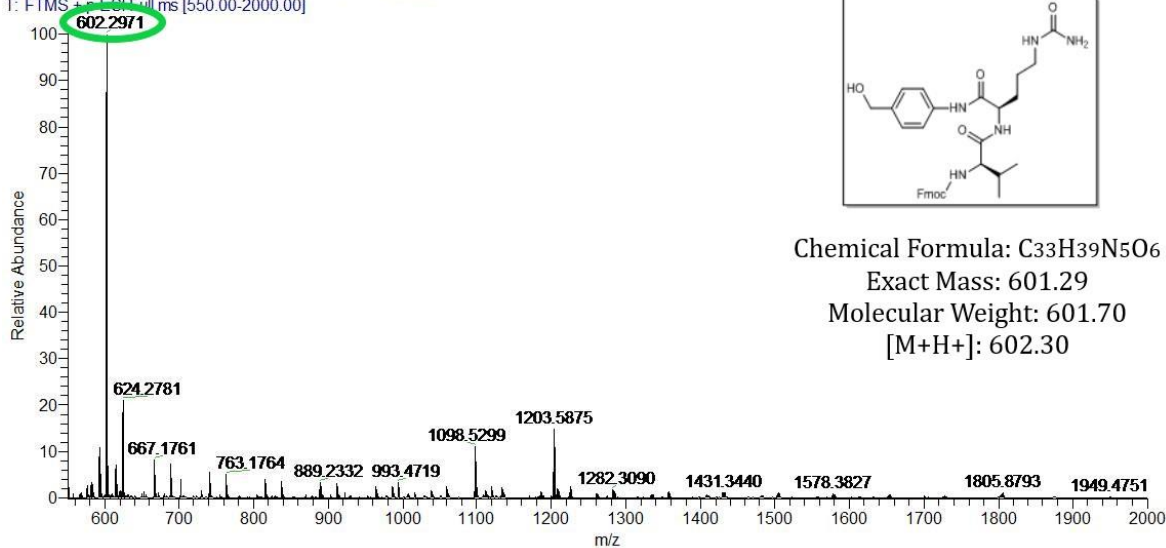


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **8**.

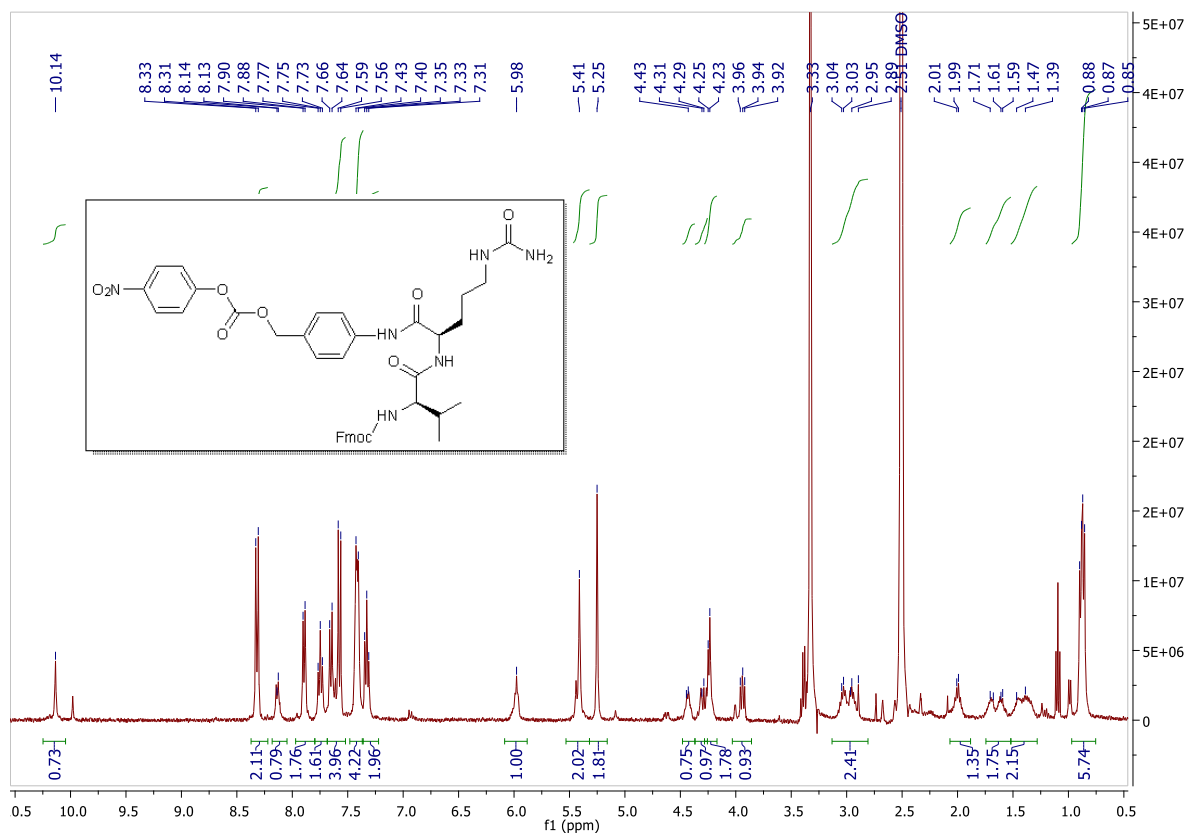


¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης 9.

BX1_105_200711135727#3 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.50E7
T: FTMS + ESI Fullms [550.00-2000.00]

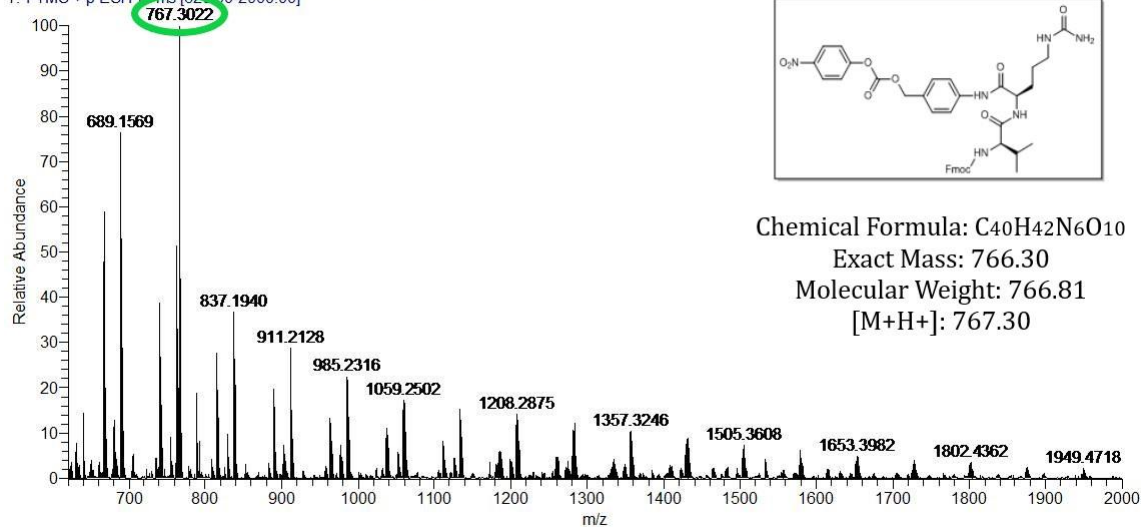


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 9.

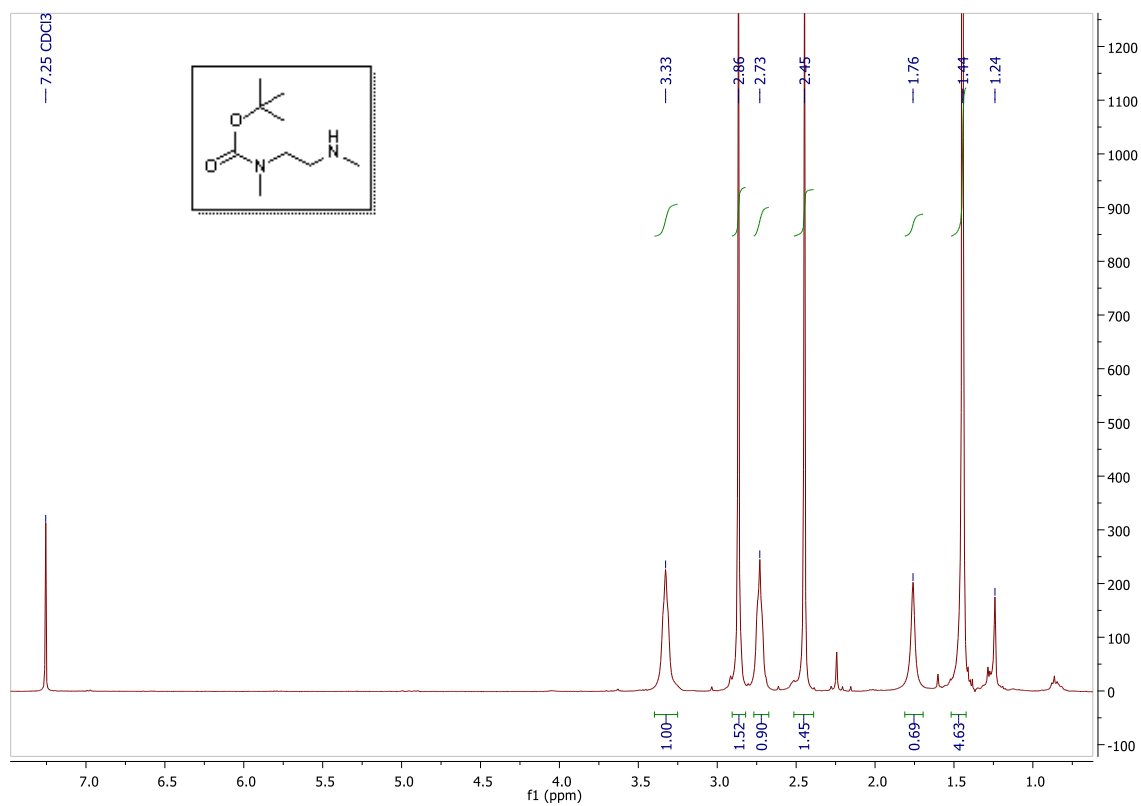


¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης **10**.

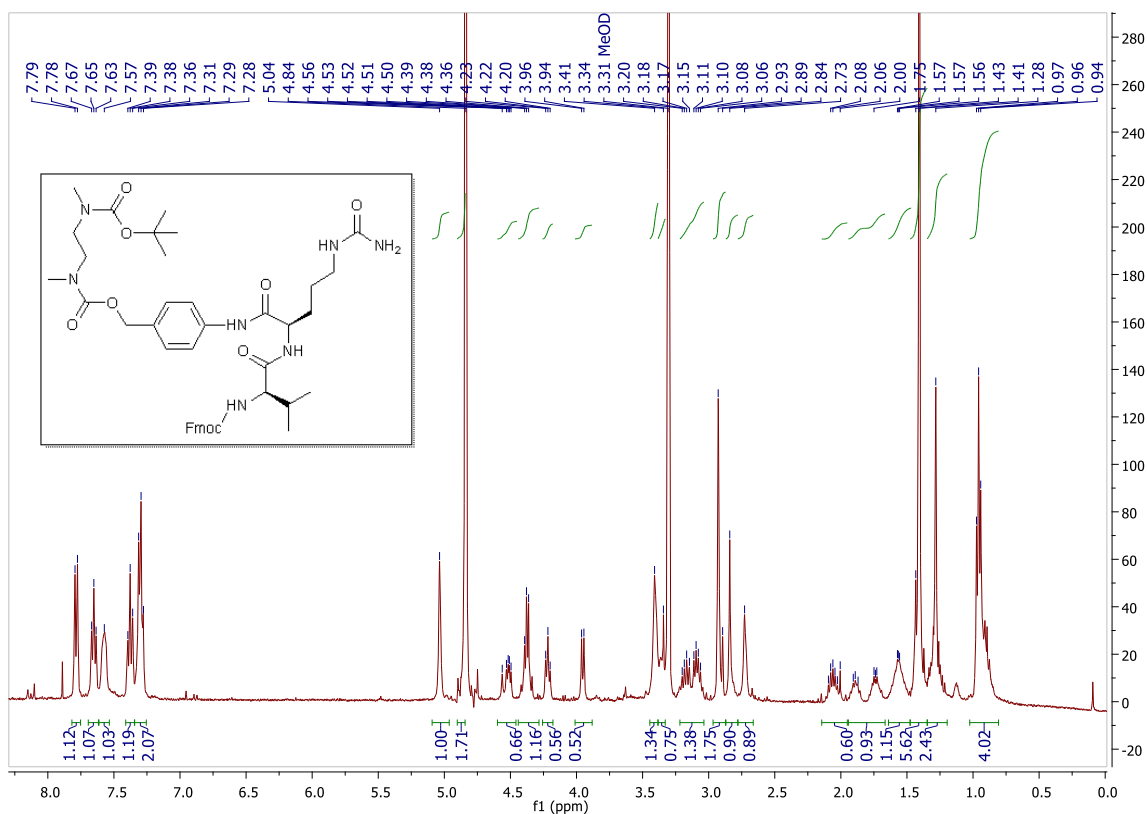
BX1_116_200711135727 #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.21E6
T: FTMS + p ESI Full MS (600.00-2000.00)



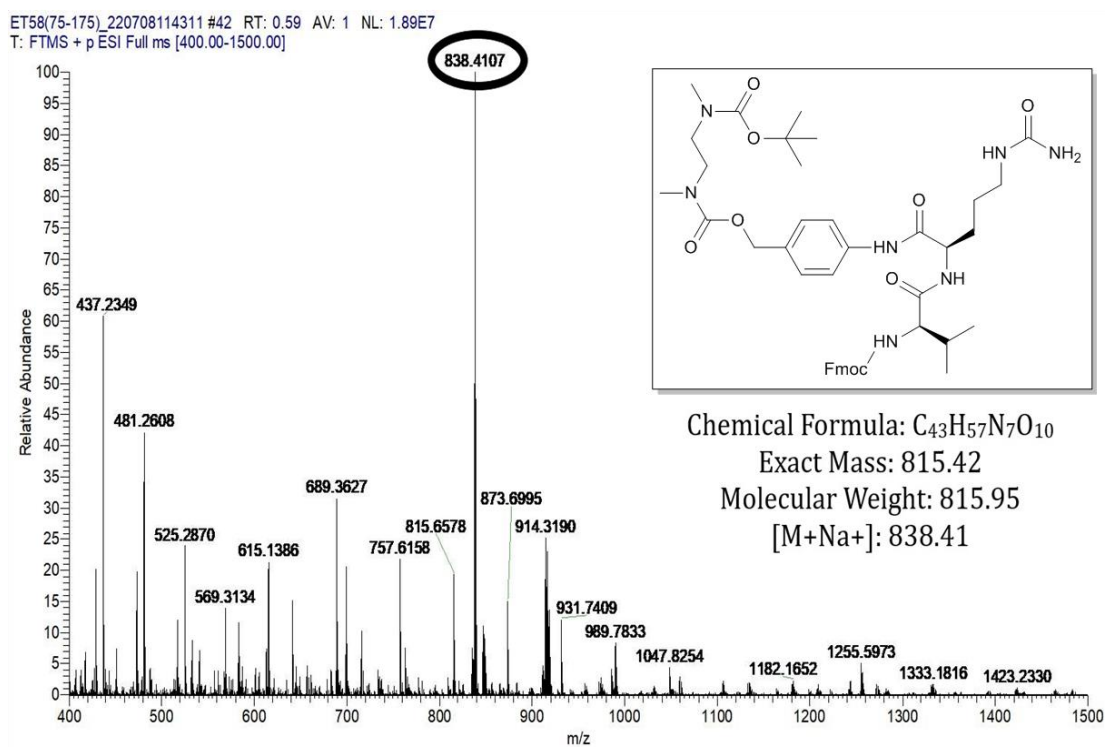
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **10**.



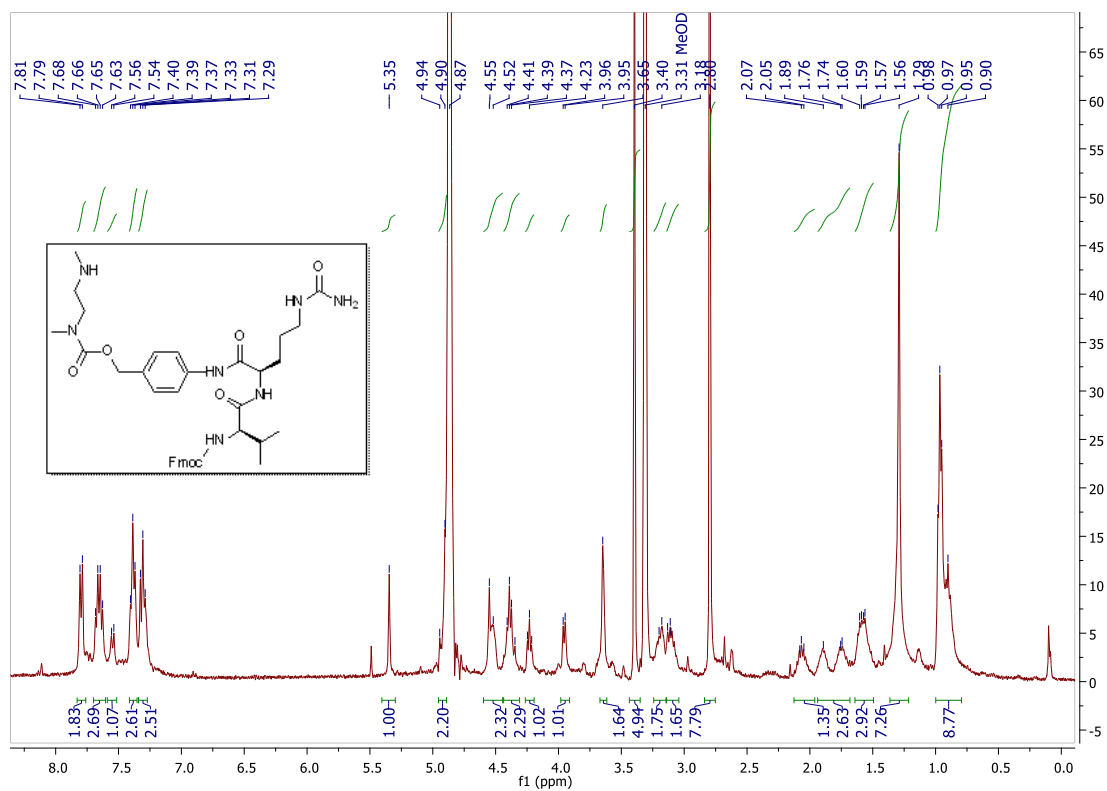
¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης **11**.



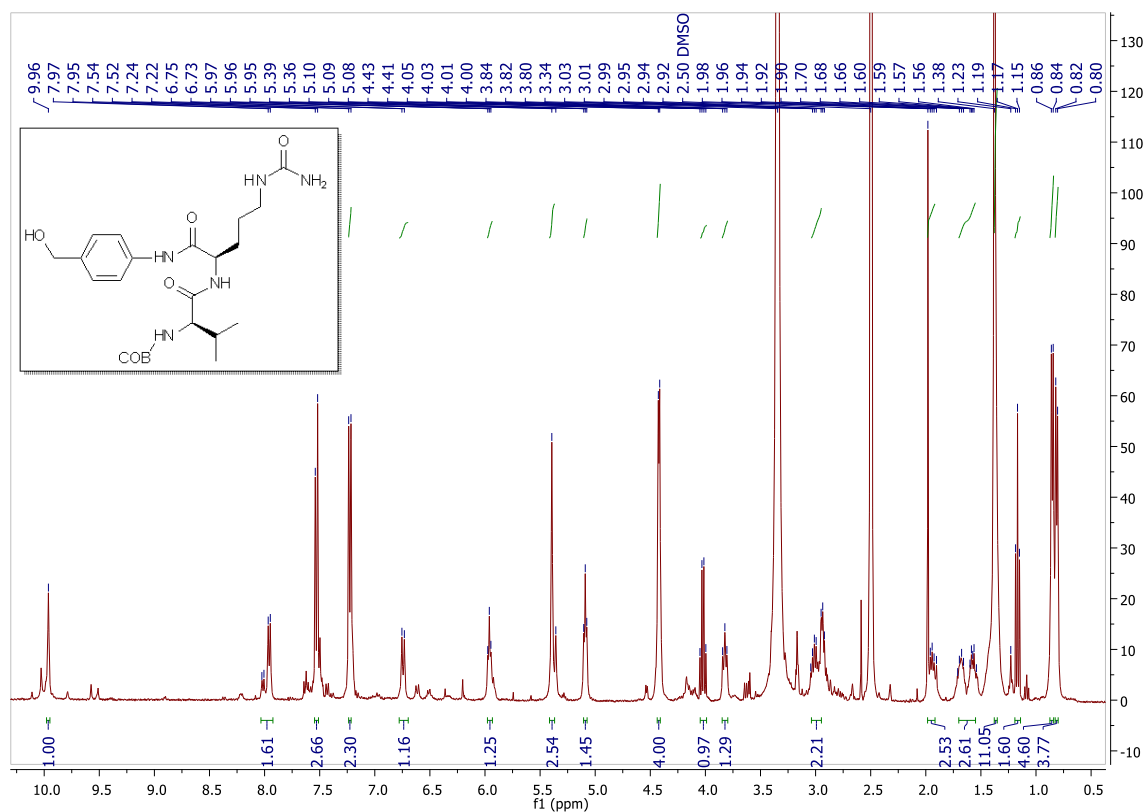
¹H NMR (400 MHz, MeOD) φάσμα της ένωσης **12**.



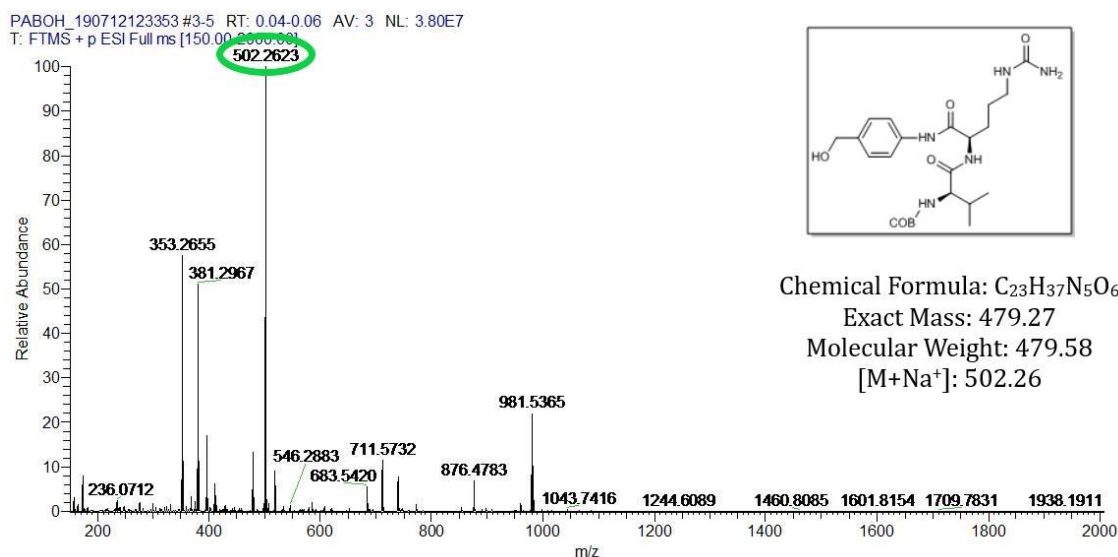
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **12**.



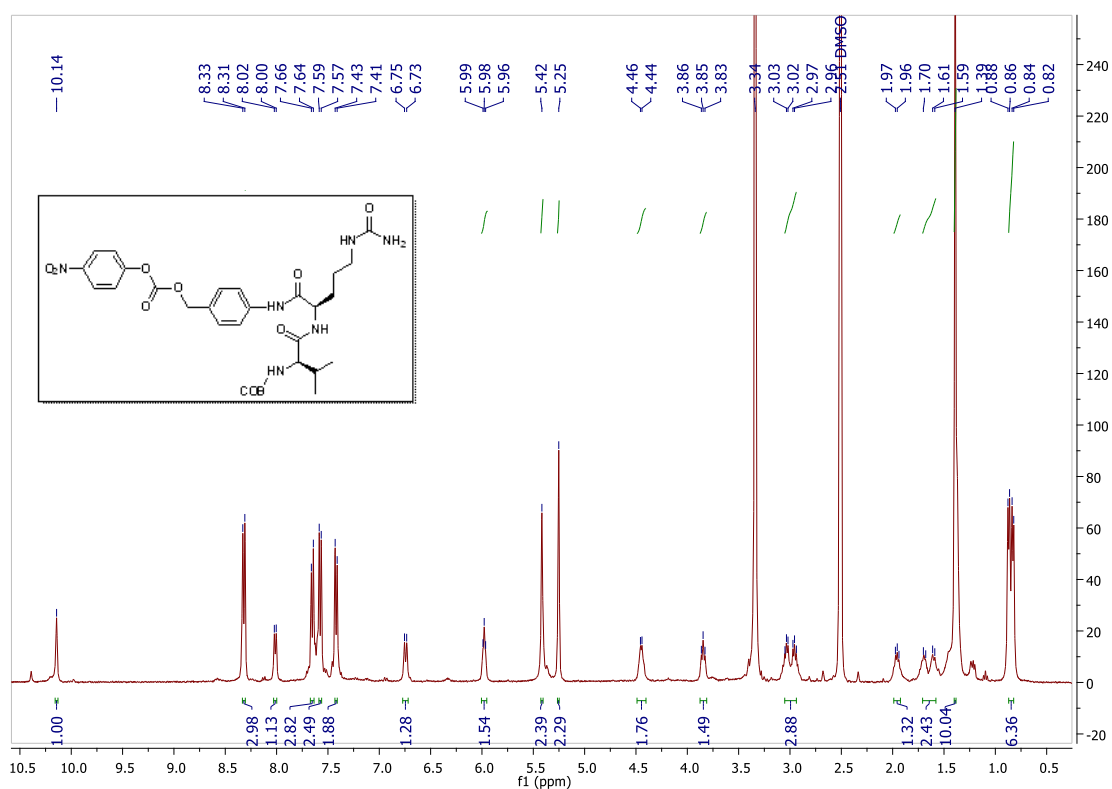
¹H NMR (400 MHz, MeOD) φάσμα της ένωσης 13.



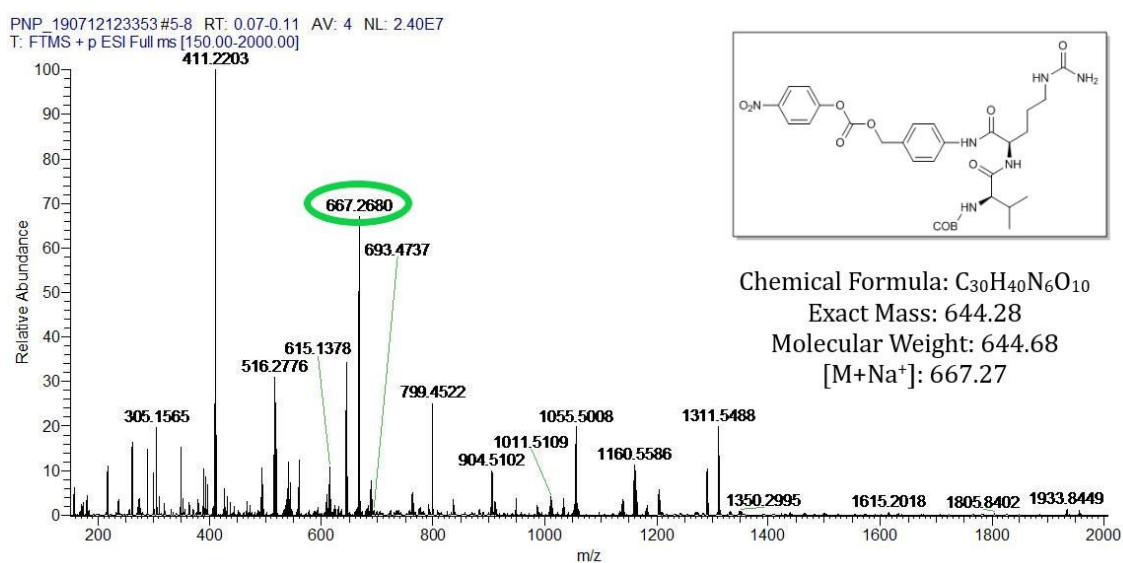
^1H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης **14**.



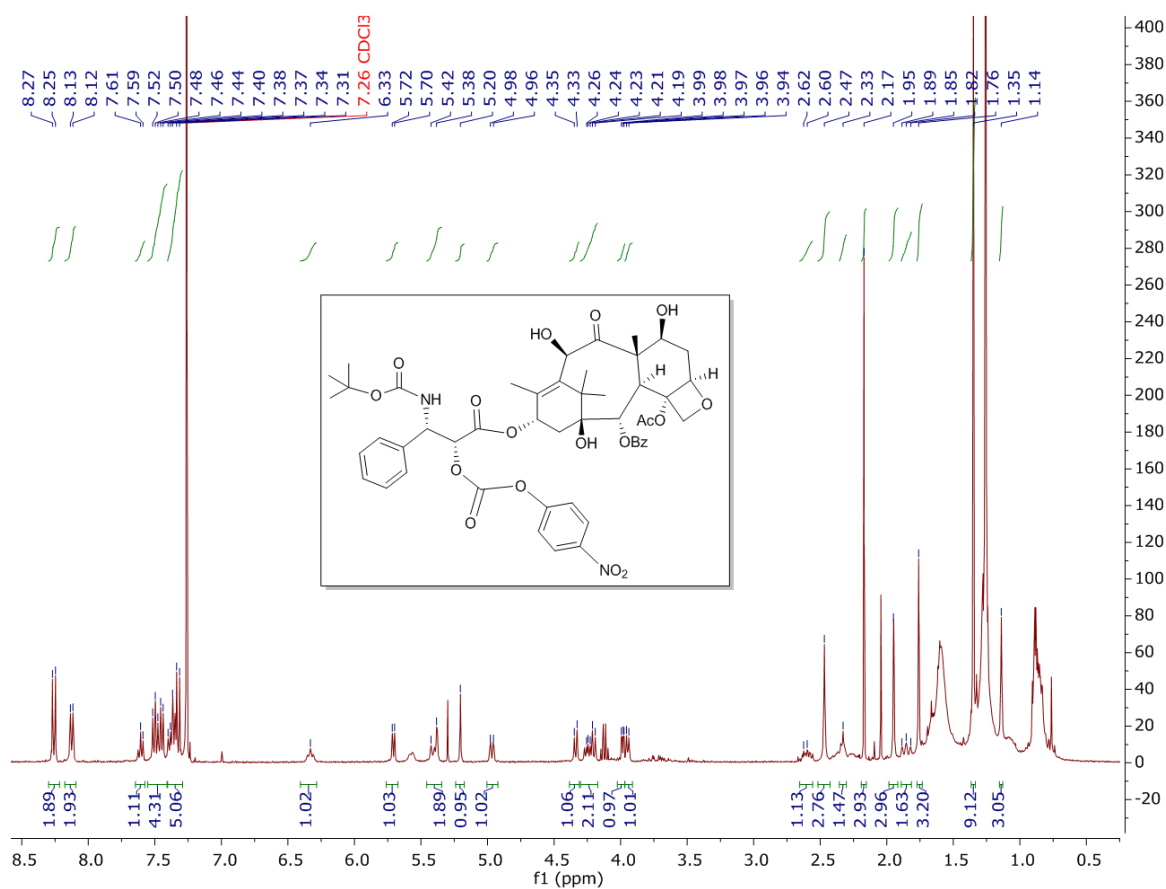
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **14**.



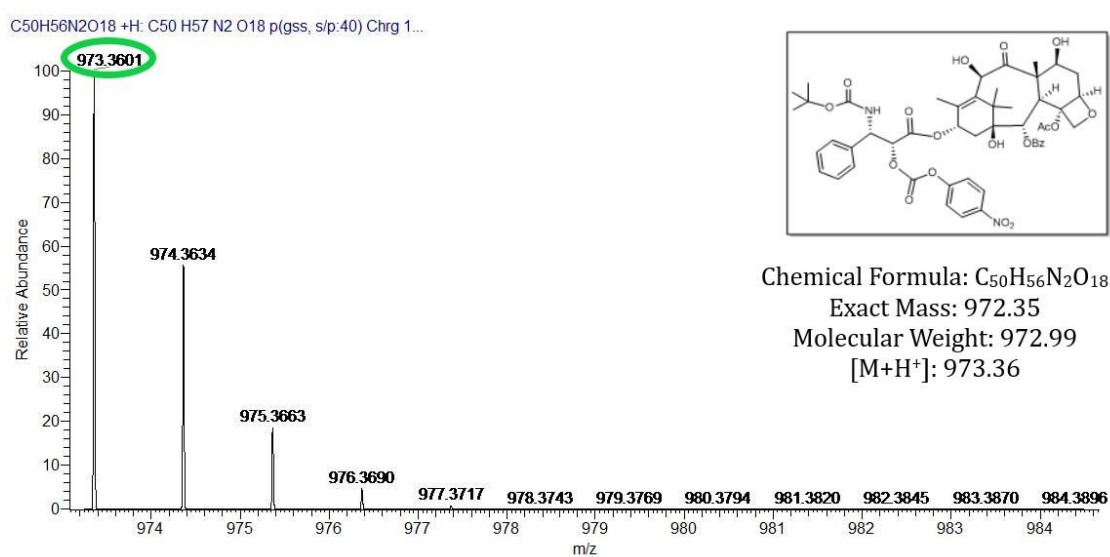
¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης **15**.



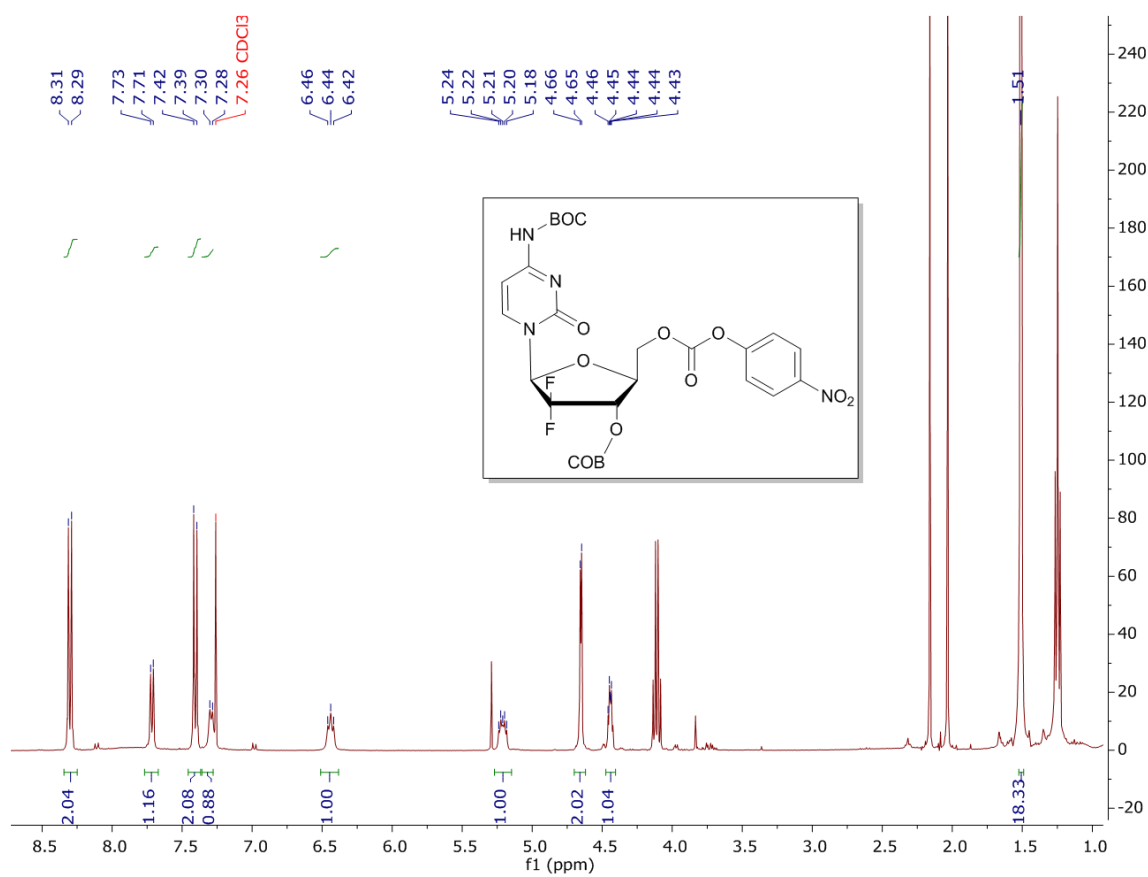
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **15**.



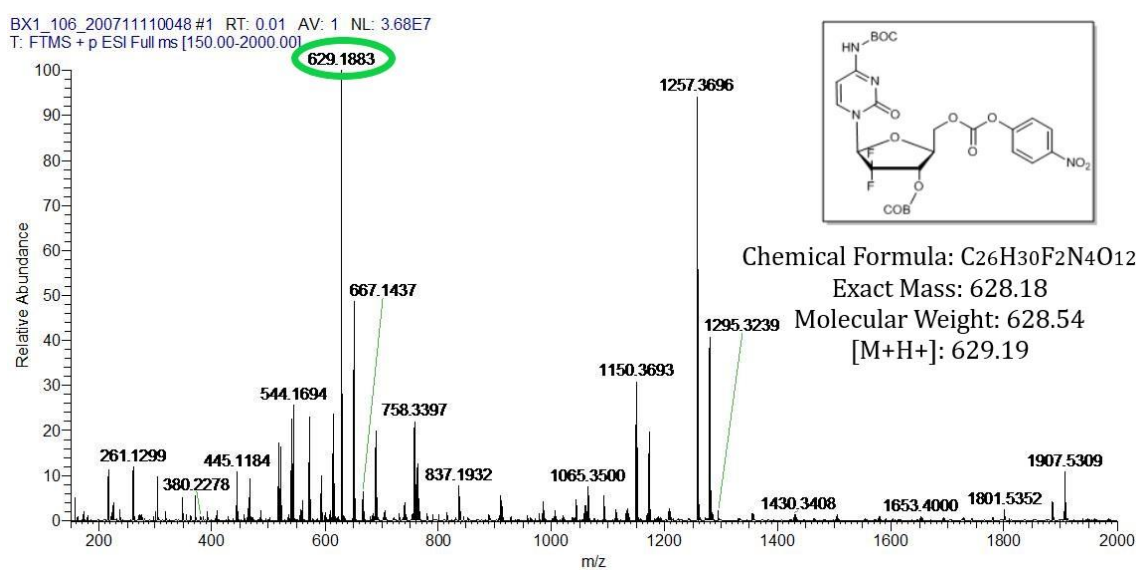
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **16**.



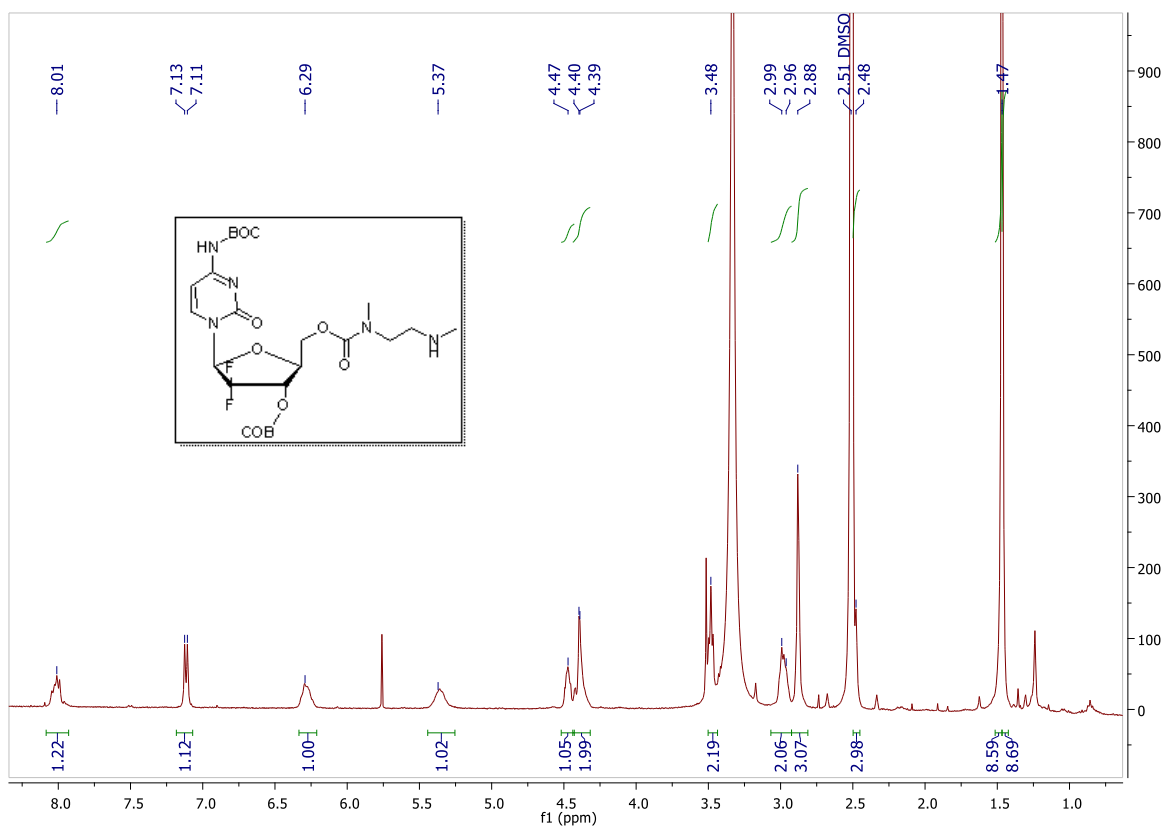
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **16**.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **17**.

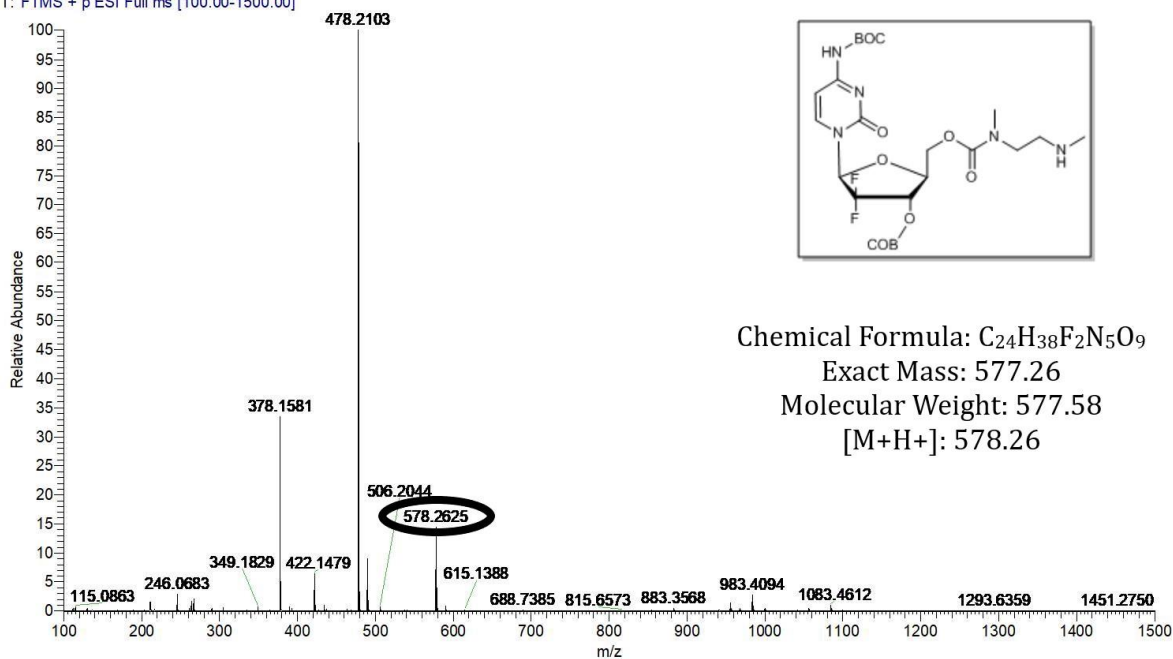


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **17**.

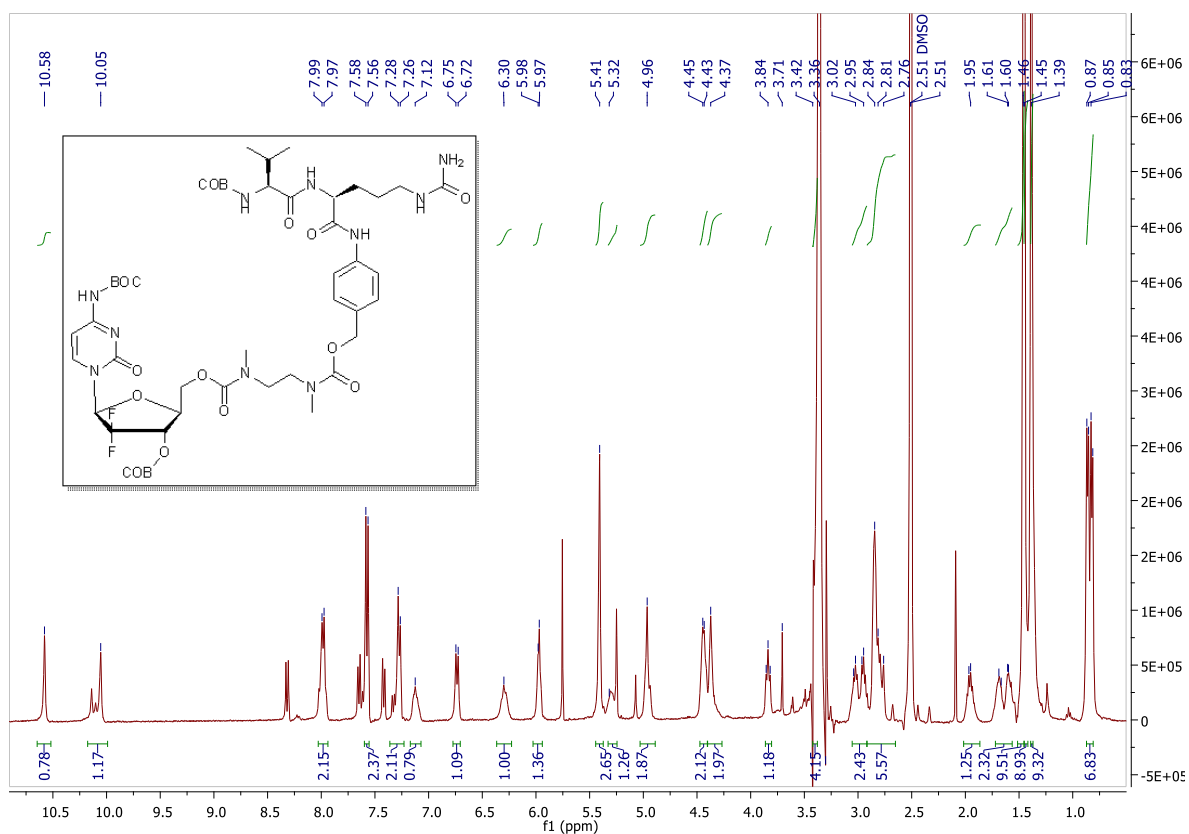


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **18**.

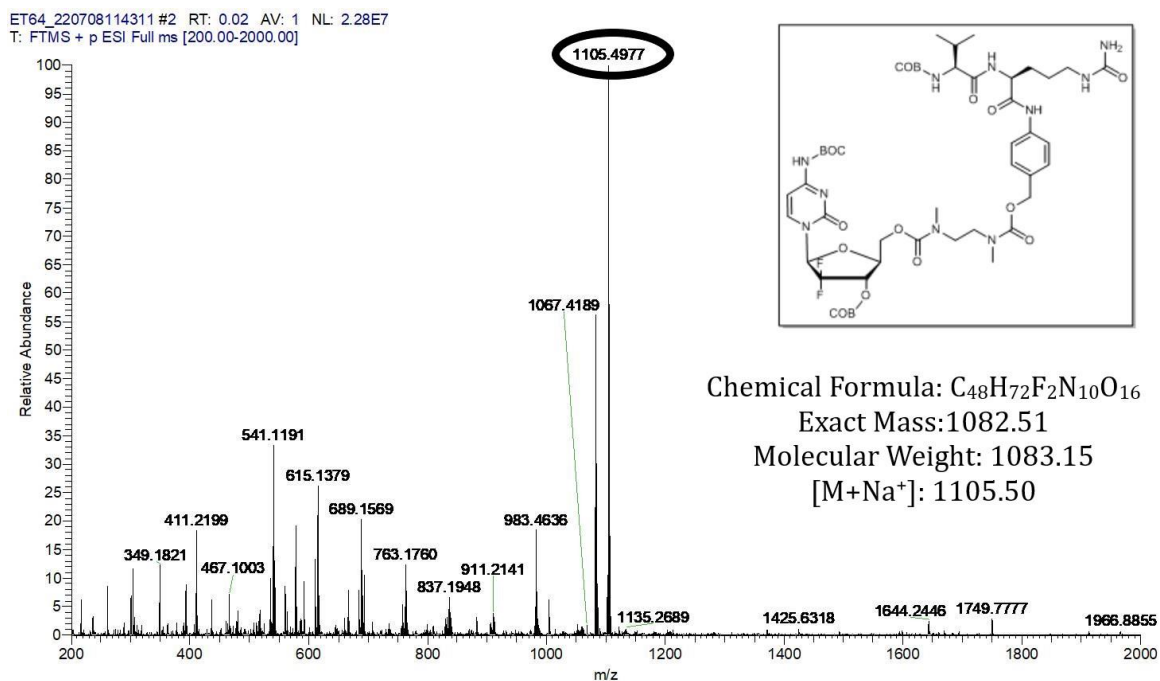
ET59_220708114311 #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 4.62E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]



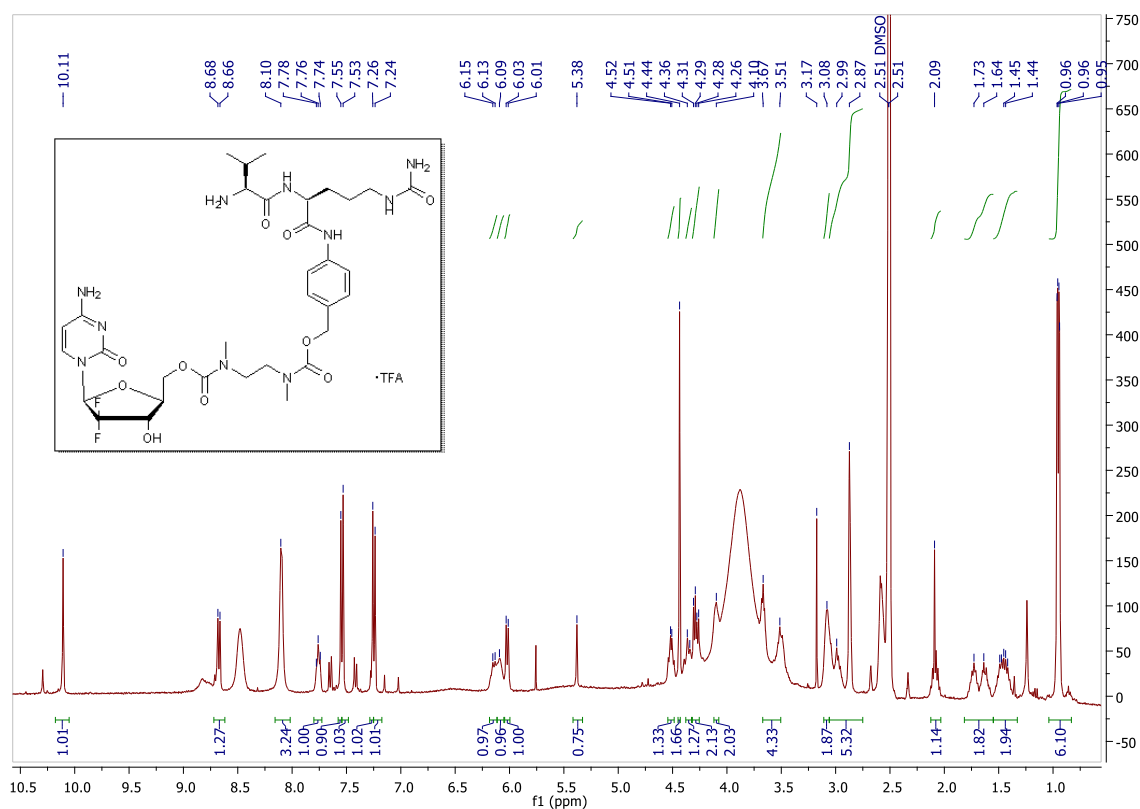
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **18**.



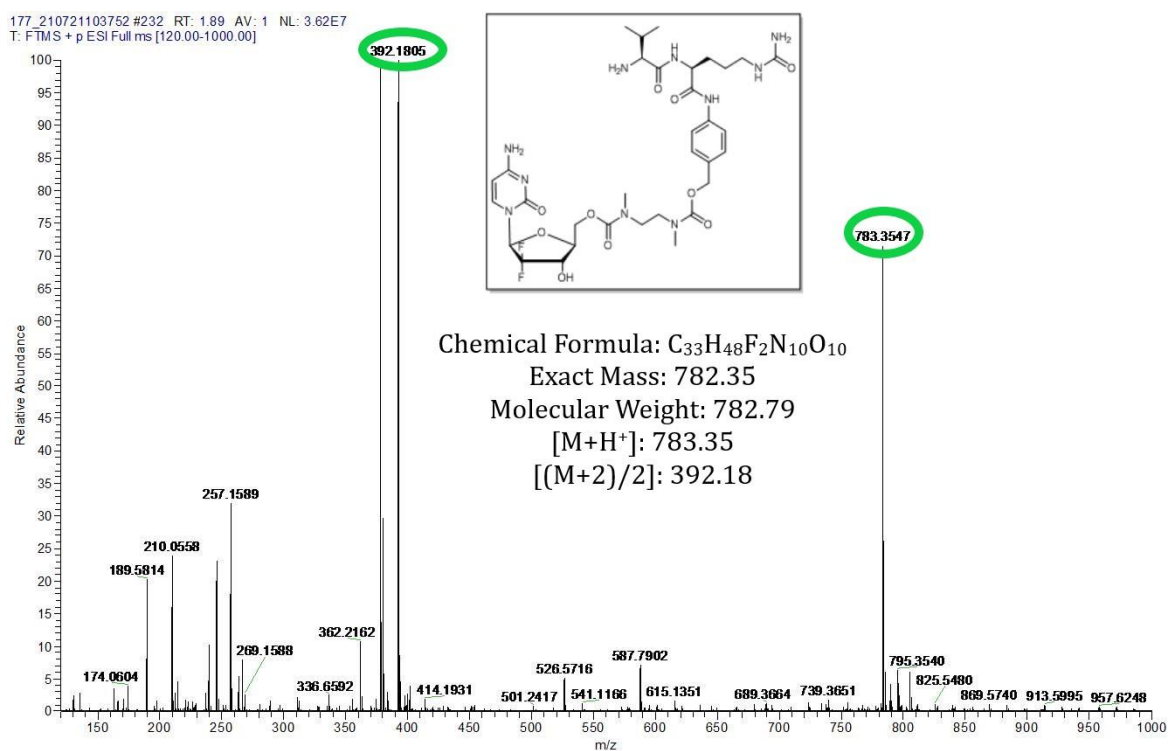
¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης 19.



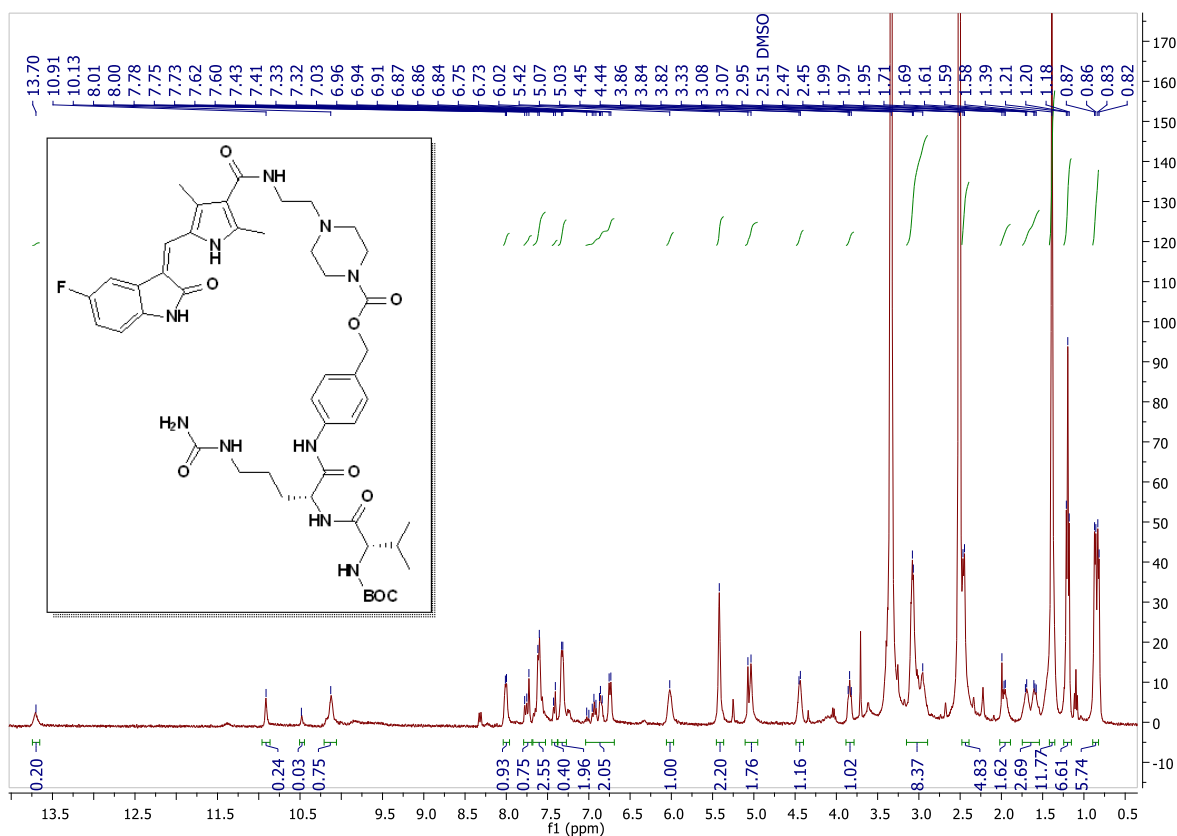
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 19.



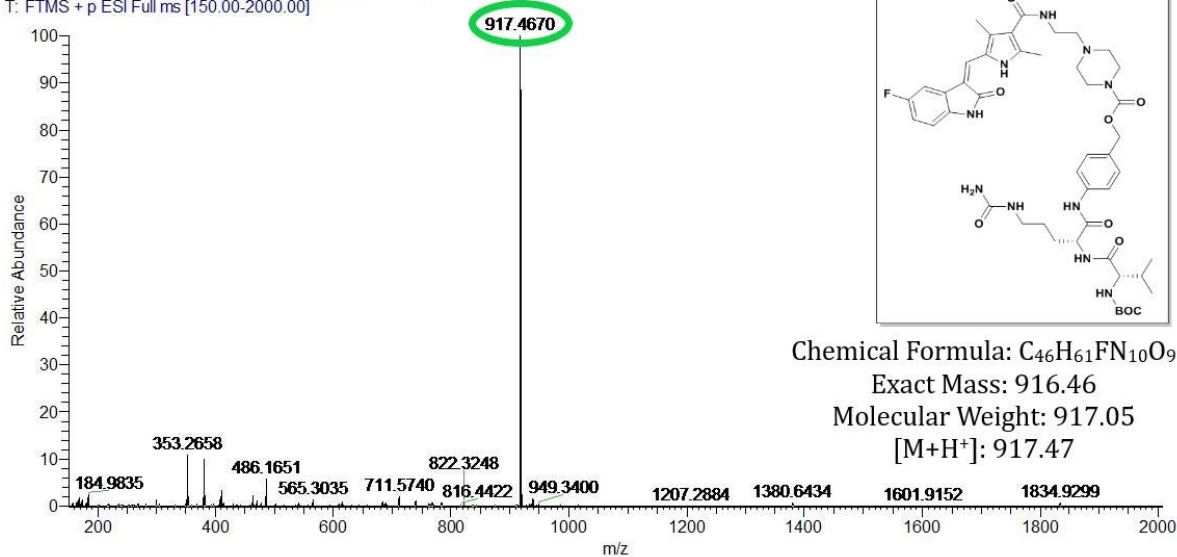
¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης 20.



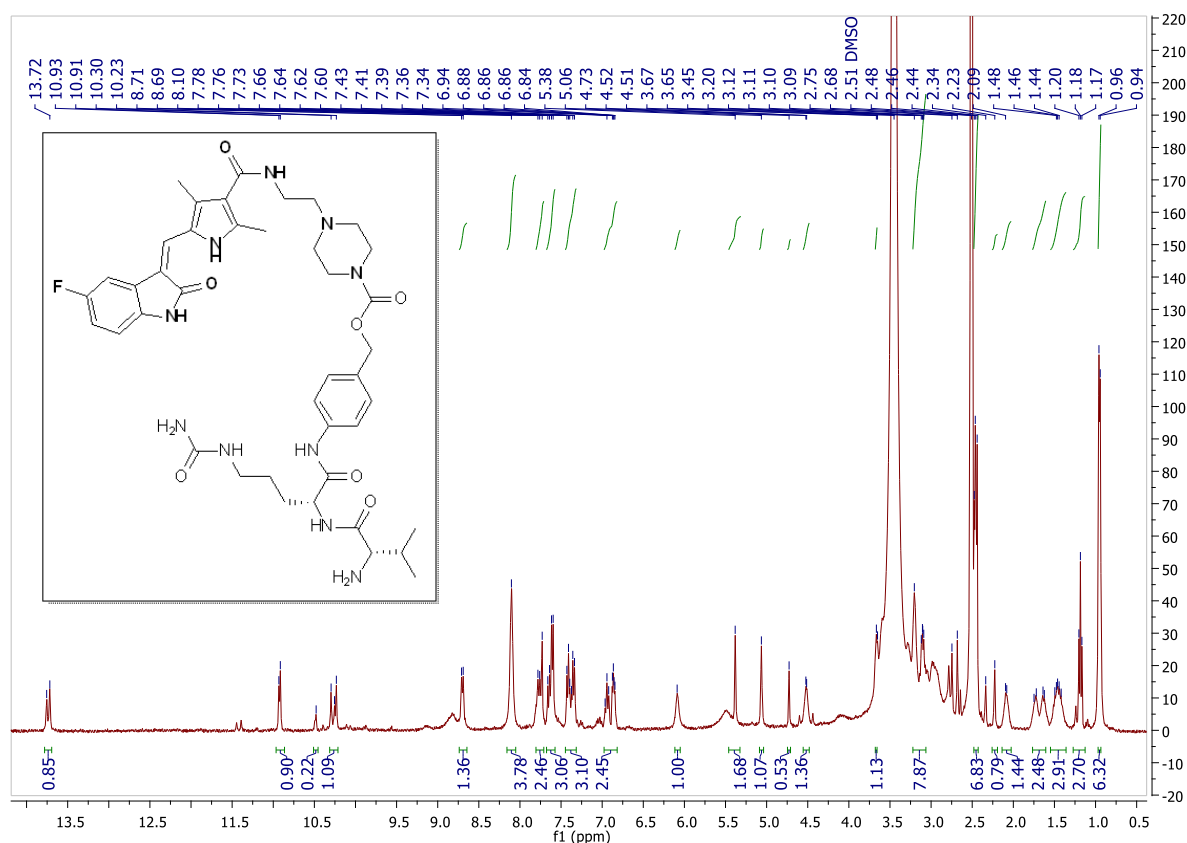
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 20.



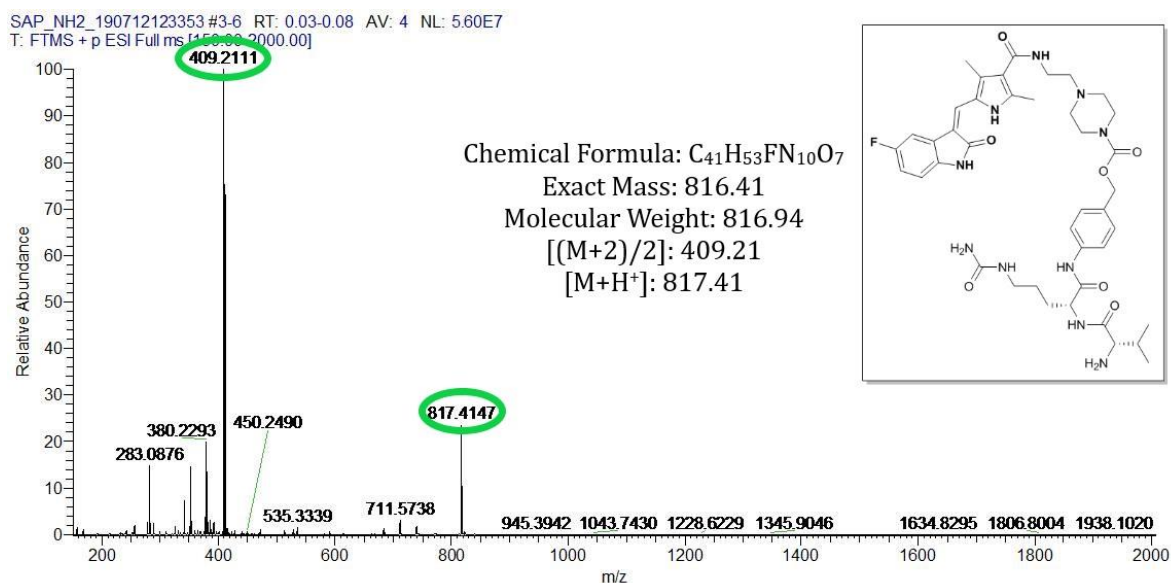
SAP_NBOC_190712123353 #5-8 RT: 0.07-0.11 AV: 4 NL: 7.03E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



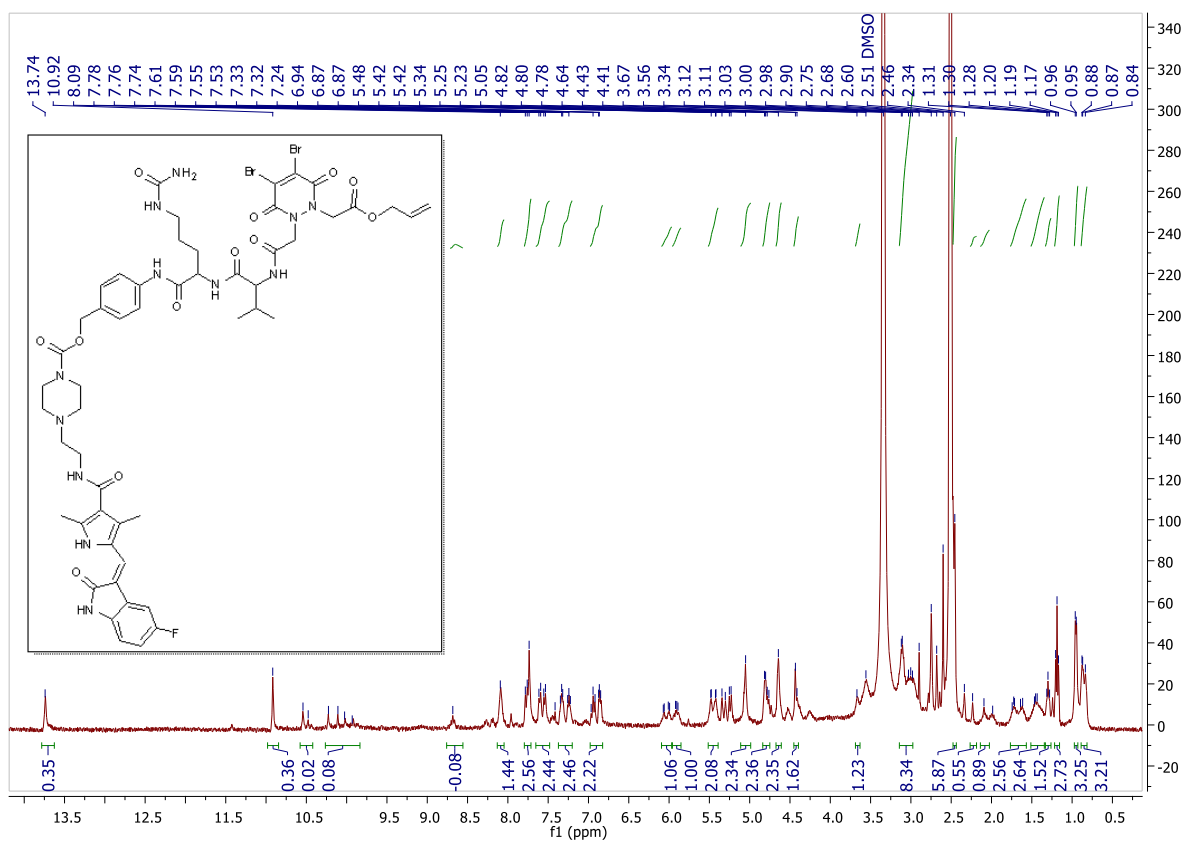
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **21**.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης 22.

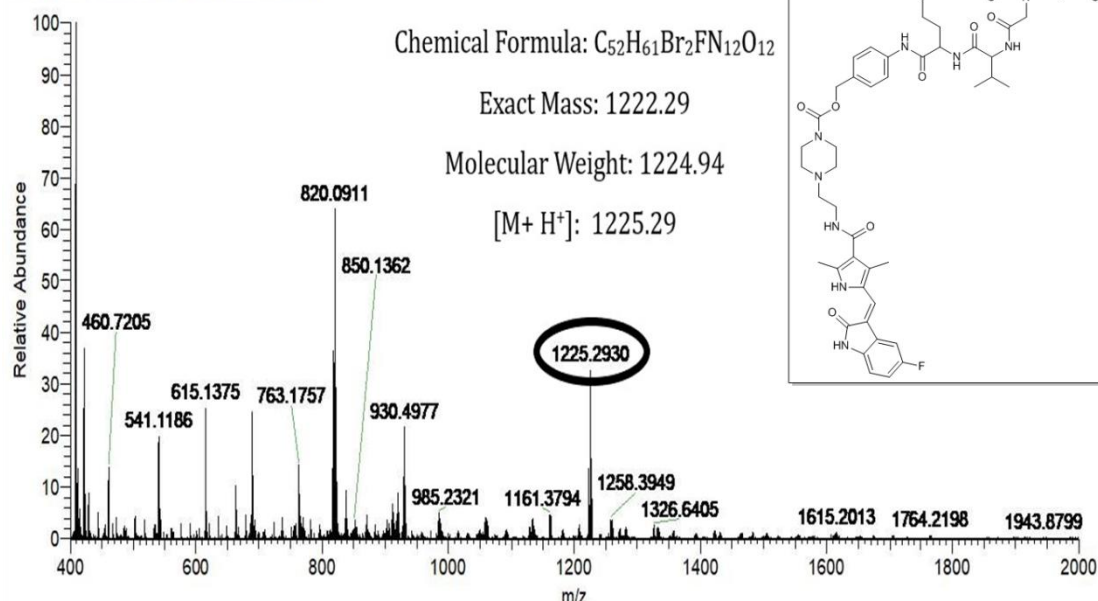


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 22.



^1H NMR (400 MHz, DMSO) φάσμα της ένωσης 23.

ET74_220708114311 #48 RT: 0.68 AV: 1 NL: 2.31E7
T: FTMS + p ESI Full ms [400.00-2000.00]



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 23.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μιας μεθοδολογίας σύνθεσης στοχευτικών συζευγμάτων αντικαρκινικών φαρμάκων με πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο (targeted multi-drug conjugates) με βάση ένα ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης.

Στο πρώτο και πολύ σημαντικό κομμάτι αυτής της ερευνητικής δουλειάς, έγινε η σύνθεση του πρότυπου ικρίωματος το οποίο θα δίνει τη δυνατότητα ορθογωνικής σύζευξης των φαρμακευτικών μορίων, που είναι συνδεδεμένα με τη βιοδιασπώμενη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit μέσω αμιδικών δεσμών. Έτσι, με επιτυχία συντέθηκε ένα ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης, που έφερε μια ελεύθερη καρβοξυλομάδα στο ένα άκρο και μια προστατευμένη καρβοξυλομάδα ως άλλυλο εστέρας στο άλλο άκρο του και αφού επιτεύχθηκε αυτό ακολούθησε η παραγωγή του σε μεγάλη ποσότητα (scale up). Με τροποποίηση του ελεύθερου καρβοξυλικού άκρου του ικρίωματος προέκυψε ο ενεργοποιημένος σουκινικός εστέρας του οξέος, ο οποίος απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη σύζευξη με τις γέφυρες των φαρμάκων.

Το επόμενο κομμάτι της εργασίας επικεντρώθηκε στη βελτιστοποίηση της σύνθεσης των διπεπτιδικών γεφυρών Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP και NBOC-Val-Cit-PABC-PNP και τη σύνδεση των φαρμάκων (γεμισιταβίνη, SAP, ντοσεταξέλη) σε αυτές. Η σύνθεση των γεφυρών ήταν επιτυχής όπως και η σύζευξή τους με τη γεμισιταβίνη και το SAP και η απομόνωσή τους σε καθαρή μορφή. Η σύνδεση της γέφυρας με τη ντοσεταξέλη δυστυχώς δεν κατέστη δυνατή, παρόλο που φάνηκε ότι η προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετά κοντά στο να δώσει θετικό αποτέλεσμα, ωστόσο η μελέτη αυτή θα συνεχιστεί και δε θα εγκαταλειφθεί.

Το τελευταίο μέρος της ερευνητικής αυτής δουλειάς αφοσιώθηκε στην σύζευξη των γεφυρωμένων φαρμάκων με το πρότυπο ικρίωμα της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης, με επιτυχές αποτέλεσμα όσον αφορά το SAP. Η σύζευξη της γεφυρωμένης γεμισιταβίνης, στο χρονικό πλαίσιο που εκπονήθηκε αυτή η μελέτη, δεν ολοκληρώθηκε ωστόσο δοκιμές για τη σύνδεσή της ξεκίνησαν και παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Οι ενώσεις οι οποίες συντέθηκαν, σε αρκετά υψηλές αποδόσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 40-95%, ταυτοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H NMR και Φασματοσκοπίας Μαζών (MS) ενώ σε ορισμένες από αυτές έγινε και μέτρηση του σημείου τήξης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι αρκετά ενθαρρυντικά και προχωρούν ένα βήμα ακόμα πιο μπροστά την προσπάθεια που γίνεται στο εργαστήριο.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Πρωταρχικό στόχο για την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτελεί η ολοκλήρωση της σύνθεσης της συζευγμένης με τη γέφυρα ντοσεταξέλης και η σύνδεση κατόπιν δύο εκ των παραπάνω φαρμάκων, μέσω των βιοδιασπώμενων γεφυρών, με το ικρίωμα.

Επιπλέον, επικείμενο στόχο αποτελεί η μελέτη των ιδιοτήτων και η βιολογική αξιολόγηση του συζεύγματος με το διπλό/πολλαπλό θεραπευτικό φορτίο, ώστε να επιβεβαιωθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός απελευθέρωσης των φαρμάκων.

Τέλος, μελλοντικό στόχο αποτελεί η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας για την ορθογωνική σύνθεση πληθώρας πολυτροπικών συζευγμάτων δύο ή περισσότερων φαρμάκων με στοχευτικούς προσδέτες όπως πεπτίδια (Peptide Dual-Drug Conjugates, PDDCs), μονοκλωνικά αντισώματα (Antibody Dual-Drug Conjugates, ADDCs), πολυμερικά νανοσωματίδια (Polymer Dual-Drug Conjugates, PNDDCs), κ.α., μέσω συνεργασίας με εργαστήρια που εξειδικεύονται στο εκάστοτε αντικείμενο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Καθαρισμός/Διαχωρισμός Ενώσεων

1.1. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης. Ανάλογα με τη φύση της κινούμενης και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέριος ή υγρή. Ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν κατανομής, προσρόφησης, ιονανταλλαγής ή πηκτής. Τέλος ανάλογα με την τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης, έχουμε χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία.

1.1.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography- TLC)

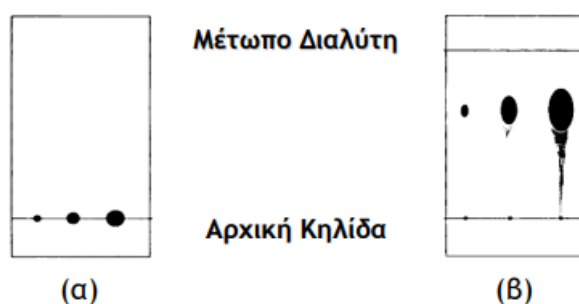
Σ' αυτή την τεχνική συνήθως χρησιμοποιούνται πλάκες από γυαλί, αλουμίνιο ή πλαστικό οι οποίες είναι επιστρωμένες με τη στερεή στατική φάση. Ως υλικό επίστρωσης συνήθως χρησιμοποιείται διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (alumina) και κυτταρίνη (cellulose), πολλά από τα οποία περιέχουν μία ουσία φθορισμού, προκειμένου να διευκολυνθεί η ανίχνευση των συστατικών του αναλυμένου μίγματος κάτω από το υπεριώδες φως. Άλλα υλικά κατάλληλα για ειδικές εφαρμογές είναι πολυαμίδια, κατεργασμένες κυτταρίνες με ιονανταλλακτικές ιδιότητες και ειδικές μορφές οργανικής πηκτής με ιδιότητες μοριακού κόσκινου (π.χ. Sephadex, Biogel P). Οι υάλινες πλάκες πριν επιστρωθούν, πρέπει να καθαρισθούν καλά και να ξηραθούν.

Η τοποθέτηση πάνω στην πλάκα, του προς ανάλυση δείγματος, γίνεται με κατάλληλους τριχοειδείς σωλήνες, ανάλογα με το αν πρόκειται για αναλυτικούς ή παρασκευαστικούς σκοπούς. Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος γίνεται μέσα σε ειδικούς θαλάμους, οι οποίοι περιέχουν το κατάλληλο μίγμα διαλυτών που αποτελεί την υγρή κινητή φάση.

Στον θάλαμο ανάπτυξης τοποθετείται μικρή ποσότητα διαλύτη μέχρι ύψους 1-2cm. Στον θάλαμο τοποθετείται και διηθητικό χαρτί το οποίο είναι εμποτισμένο από τον διαλύτη έτσι ώστε η συγκέντρωση των ατμών του διαλύτη να είναι η παντού η ίδια. Κατά τη διάρκεια λήψης του χρωματογραφήματος, δεν μετακινείται ο θάλαμος ανάπτυξης για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη ανάπτυξη.

Ως R_f (Εικόνα 7) αναφέρεται μια χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ουσία, που ορίζεται ως εξής:

$$R_f = \frac{\text{απόσταση διανυθείσα από την ουσία}}{\text{απόσταση διανυθείσα από το σύστημα διαλύτη ανάπτυξης}}$$



Εικόνα 7. Χρωματογράφημα πριν (α) και μετά (β) την ανάπτυξη.

Το R_f εξαρτάται από την ικανότητα προσρόφησης της ουσίας επί του προσροφητικού ή την ικανότητα διάλυσής της σε μία ακίνητη υγρή φάση συγκρατούμενη επί ενός αδρανούς στερεού φορέα.

Η ανίχνευση των κηλίδων των συστατικών του μίγματος, μετά το τέλος του χρωματογραφήματος και την εξάτμιση του διαλύτη ανάπτυξης, για μεν τις έγχρωμες ουσίες γίνεται από το ίδιο τους το χρώμα, για δε τις άχρωμες, με κατάλληλο ψεκασμό ή εμβάπτιση σε κάποιον δείκτη έτσι ώστε να δώσουν μια χαρακτηριστική έγχρωμη αντίδραση. Για την περίπτωση ενώσεων που φθορίζουν, ο εντοπισμός των κηλίδων μπορεί να γίνει πολύ εύκολα με μία

λάμπα υπεριώδους, κάτι το οποίο συνίσταται να γίνεται ούτως ή άλλως πριν από οποιονδήποτε ψεκασμό ή εμφάνιση.

Οι τιμές R_f επηρεάζονται και από τους εξής παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται πάντα υπ' όψη, ώστε οι τιμές να είναι επαναλήψιμες:

- Το μέγεθος των τεμαχιδίων διαφορετικών παρτίδων προσροφητικού υλικού
- Η σύνθεση του διαλύτη ανάπτυξης και ο βαθμός κορεσμού του θαλάμου με τους ατμούς του διαλύτη
- Οι συνθήκες ενεργοποίησης και αποθήκευσης των πλακών
- Το πάχος της προσροφητικής στιβάδας

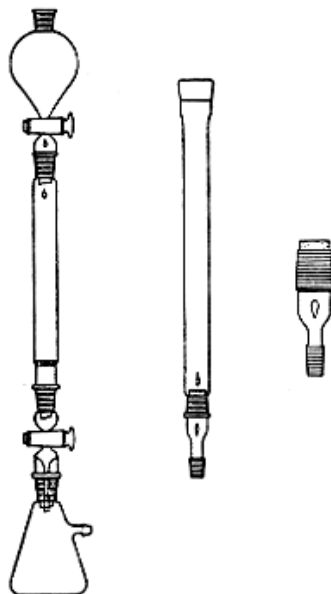
Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα, έναντι των άλλων τεχνικών υγρής χρωματογραφίας:

1. Έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα
2. Είναι περισσότερο ευέλικτη γιατί σ' αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία στατικών φάσεων και διάφοροι μηχανισμοί διαχωρισμού
3. Είναι ταχύτερη. Μπορούν να επιτευχθούν χρόνοι ανάπτυξης μέχρι και 5 λεπτών
4. Χρησιμοποιείται εύκολα στο διαχωρισμό υδρόφοβων ουσιών
5. Είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος και απαιτεί μικρότερες ποσότητες προσροφητικού μέσου και δείγματος (από μερικά μg ως 1mg)
6. Επιτρέπει την εύκολη παραλαβή των ουσιών, που έχουν διαχωριστεί, με απόξυση κάθε κηλίδας μαζί με το επίστρωμα και εκχύλισή του με κατάλληλο διαλύτη
7. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ποσοτική ανάλυση ⁵⁴

1.1.2.Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography)

Διαχωρισμοί, σε παρασκευαστική κλίμακα, με αυτή την τεχνική επιτυγχάνονται με τοποθέτηση της ουσίας σε μία κυλινδρική στήλη, η οποία πληρώνεται με στερεή στατική φάση, δια μέσου της οποίας περνά η κινητή

υγρή φάση είτε λόγω βαρύτητας είτε με μικρή πίεση (Flash chromatography) που εφαρμόζεται στη δεξαμενή των διαλυτών (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Διάταξη Χρωματογραφίας στήλης.

Η εκλογή του κατάλληλου υλικού που χρησιμοποιείται για την πλήρωση της στήλης εξαρτάται από το είδος της χρωματογραφικής μεθόδου που θα εφαρμοστεί για το συγκεκριμένο διαχωρισμό, π.χ. χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία ιονανταλλαγής ή χρωματογραφία πηκτής. Η χρωματογραφία προσρόφησης εφαρμόζεται αρκετά στην παρασκευαστική Οργανική Χημεία, όπου γίνεται συνήθως καθαρισμός των αρχικών ουσιών και των προϊόντων της αντίδρασης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με ιονανταλλακτικές ρητίνες είναι μια χρήσιμη αναλυτική και παρασκευαστική τεχνική για τον διαχωρισμό μιγμάτων οξέων και βάσεων (π.χ. αμινοξέων, αμινοφαινολών κ.λ.π.) και για την απομόνωση ουδέτερων οργανικών υλικών από υδατικά διαλύματα που περιέχουν κατιονικές ή ανιοντικές ουσίες. Η χρωματογραφία πηκτής είναι μια σημαντική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων φυσικών προϊόντων μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες, πεπτίδια, ένζυμα, ορμόνες κ.λ.π.)

Στη χρωματογραφία προσρόφησης ένα από τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), όταν δεν περιέχει περισσότερο από ορισμένο ποσό νερού, πέρα από το οποίο ο διαχωρισμός θα στηρίζεται

πλέον στην κατανομή και λιγότερο στην προσρόφηση. Η προσροφητική ισχύς εξαρτάται από το προσροφητικό υλικό, αλλά και από την προσροφούμενη ουσία.

Η ευκολία έκλουσης συνεπώς των παρακάτω κατηγοριών οργανικών ουσιών μικραίνει με την εξής σειρά:

Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες > αλκένια, αλκίνια, αρωματικοί υδρογονάνθρακες > εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες > αμίνες, αλκοόλες, θειόλες > φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα

Η φύση της κινούμενης φάσης (διαλυτών) είναι μεγάλης σπουδαιότητας για κάθε χρωματογραφικό πείραμα. Ο διαλύτης μπορεί επίσης να προσροφηθεί πάνω στο στερεό υλικό με συνέπεια, να παρατηρείται ένας ανταγωνισμός μεταξύ διαλυτών και συστατικών του προς ανάλυση μίγματος ως προς την προσροφητικότητά τους στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στην έκλουση είναι περισσότερο πολικός και προσροφάται ισχυρότερα από τα συστατικά του μίγματος, τα συστατικά θα παραμένουν, σχεδόν πλήρως, στην κινούμενη φάση και δεν θα γίνει ο διαχωρισμός. Για να γίνει ένας αποτελεσματικός διαχωρισμός, ο διαλύτης έκλουσης πρέπει να είναι λιγότερο πολικός από τα συστατικά του μίγματος. Επί πλέον τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος πρέπει να είναι αρκετά διαλυτά στο διαλύτη έκλουσης, γιατί σε αντίθετη περίπτωση θα παραμείνουν μόνιμα προσροφημένα στη στατική φάση της στήλης.

Όσο περισσότερο πολικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται, τόσο γρηγορότερα εκκλούνται τα συστατικά ενός μίγματος. Οι μη πολικές ουσίες δεν διαχωρίζονται με έναν πολικό διαλύτη, όπως επίσης πολικές ουσίες δεν διαχωρίζονται με έναν μη πολικό διαλύτη. Για να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα και να διαχωριστούν τόσο οι πολικές όσο και οι μη πολικές ουσίες σε ένα μίγμα, μπορούμε να αυξάνουμε σταδιακά την αναλογία του πιο πολικού διαλύτη σε ένα μίγμα δύο διαλυτών.⁵⁵

2. Ταυτοποίηση Ενώσεων

2.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Πολλοί πυρήνες ατόμων παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται με την περιστροφή των θεμελιωδών πυρηνικών σωματιδίων. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι ατομικές πυρηνικές ροπές που εμφανίζονται μέσα σε οποιοδήποτε υλικό είναι προσανατολισμένες τυχαία, έτσι ώστε το σύστημα δεν εμφανίζει μαγνητική ροπή. Ωστόσο, εάν το υλικό ή η ουσία που μελετάται, τοποθετηθεί μεταξύ των πόλων ενός ισχυρού μαγνήτη, οι ροπές τείνουν να ευθυγραμμιστούν με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται. Μικρά ποσά ενέργειας απαιτούνται για να περιστρέψουν τα μόρια ώστε να μην είναι ευθυγραμμισμένες οι ροπές με το πεδίο. Τα ποσά ενέργειας αυτά είναι κβαντισμένα. Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)) βασίζεται στις διεγέρσεις αυτές των μαγνητικών πυρήνων, οι οποίοι βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο. Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί αυτές τις διεγέρσεις, βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων.

Πυρήνες οι οποίοι εμφανίζουν άρτιο ατομικό και μαζικό αριθμό, όπως $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$, $^{32}_{16}\text{S}$ δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ($I=0$), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και δε δίνουν φάσματα NMR.

Πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό ή περιττό ατομικό αριθμό ή και τα δύο ταυτόχρονα, παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες. Παραδείγματα τέτοιων μορίων είναι τα $^{13}_6\text{C}$, $^{19}_9\text{F}$, ^1_1H , $^{14}_7\text{N}$.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός των πρωτονίων έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει γίνει ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της δομής των οργανικών ενώσεων.

Υπάρχουν δύο καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ένα πρωτόνιο, στη μία η στροφορμή του είναι ευθυγραμμισμένη σύμφωνα με τη φορά του εφαρμοζόμενου πεδίου ενώ στη δεύτερη τάσσεται αντίθετά του. Ο

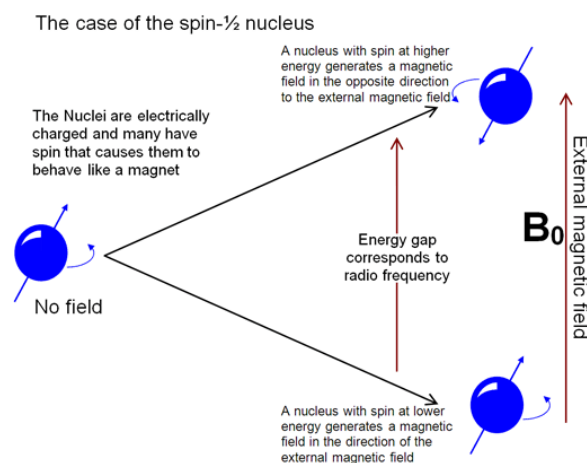
παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί τη βασική κατάσταση χαμηλής ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος τη διεγερμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας. Η πυρηνική στροφορμή ενός πρωτονίου που βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου μπορεί να έχει έναν από τους δύο δυνατούς προσανατολισμούς. Έτσι, οι επιτρεπόμενοι κβαντικοί αριθμοί που μπορεί να πάρει το spin ενός πρωτονίου είναι $\frac{1}{2}$ και $-\frac{1}{2}$, σύμφωνα και με τη θεωρία των κβάντων. Η ενέργεια που απαιτείται για να μεταβεί ένα πρωτόνιο από μία κατάσταση χαμηλότερης σε μία κατάσταση υψηλότερης ενέργειας, εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού πεδίου που εφαρμόζεται. Οι θεμελιώδεις εξισώσεις που περιγράφουν τις παραπάνω συσχετίσεις είναι οι:

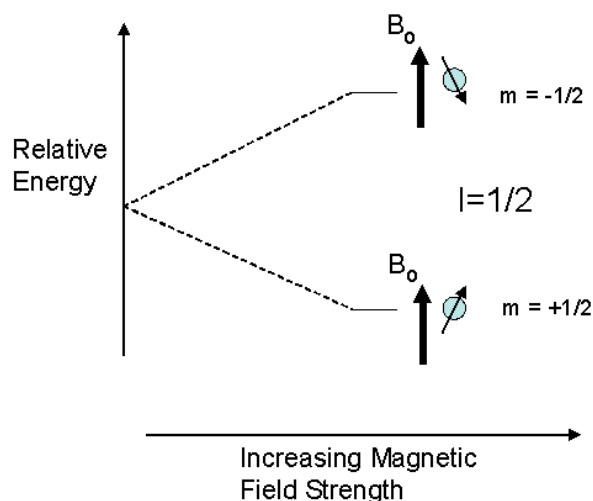
$$\Delta E = \frac{\gamma * h * H}{2 * \pi} \quad (1)$$

όπου ΔE : η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων, γ : ο γυρομαγνητικός ρυθμός, μία σταθερά χαρακτηριστική ενός συγκεκριμένου πυρήνα, h : η σταθερά του Planck, H : η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου.

$$\Delta E = h * \nu \quad (2)$$

όπου ν : η συχνότητα της απορρόφησης του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, η οποία ισούται με $\nu = \frac{\gamma * H}{2 * \pi}$.^{14, 15}





Εικόνα 9. Επίπεδα ενέργειας για έναν πυρήνα -Ενεργειακή Διαφορά ΔE μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (B_0).

Μία συνήθης πειραματική πορεία που ακολουθείται κατά την ανάλυση NMR, είναι να διατηρείται σταθερή η τιμή του σήματος της ραδιοσυχνότητας, ν , και να μεταβάλλεται η ισχύς του εξωτερικού πεδίου, H (Εικόνα 9). Η τεχνική της μέτρησης είναι απλή θεωρητικά αλλά αρκετά περίπλοκη στην εφαρμογή της. Το δείγμα τοποθετείται μεταξύ των πόλων ενός μαγνήτη και περιβάλλεται από ένα πηνίο συνδεδεμένο με έναν ταλαντωτή. Η συχνότητα των παλμών του ταλαντωτή ποικίλει και όταν συμπίσει με τη συχνότητα που χαρακτηρίζει τη μετάβαση μεταξύ των δύο καταστάσεων, ενέργεια απορροφάται από το σύστημα. Μιας και μεταβολή της συχνότητας δεν μπορεί να επιτευχθεί εύκολα, η πιο συνηθισμένη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η διατήρηση σταθερής συχνότητας με εναλλαγή της έντασης του μαγνητικού πεδίου. Η απορρόφηση της ενέργειας μπορεί να παρατηρηθεί μέσω της αλλαγής της ηλεκτρικής εμπίδησης του πηνίου και μεταφράζεται σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο εμφανίζεται ως σήμα ενός ανιχνευτή.^{14, 15}

2.1.1. Χαρακτηριστικά στοιχεία φασμάτων NMR

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των φασμάτων NMR, είναι ότι σε ένα δεδομένο πεδίο, παρατηρούνται μικρές διαφορές στις συχνότητες απορρόφησης των πρωτονίων του ίδιου είδους σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι το ισχυρό εξωτερικό πεδίο

αλληλεπιδρά όχι μόνο με τα πρωτόνια αλλά και με τα ηλεκτρόνια του μορίου. Στην περίπτωση που οι στροφορμές όλων των ηλεκτρονίων ταυτίζονται, το μόριο δεν εμφανίζει μαγνητικές ιδιότητες.

Το ηλεκτρονιακό νέφος ενός μορίου εμφανίζει διαμαγνητική θωράκιση, δημιουργώντας ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης κατευθύνσεως από το εφαρμοζόμενο. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια «προστατεύουν» ή «θωρακίζουν» τον πυρήνα, σε ένα μικρό ποσοστό, έτσι ώστε να μειώνεται ελαφρά η επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου.

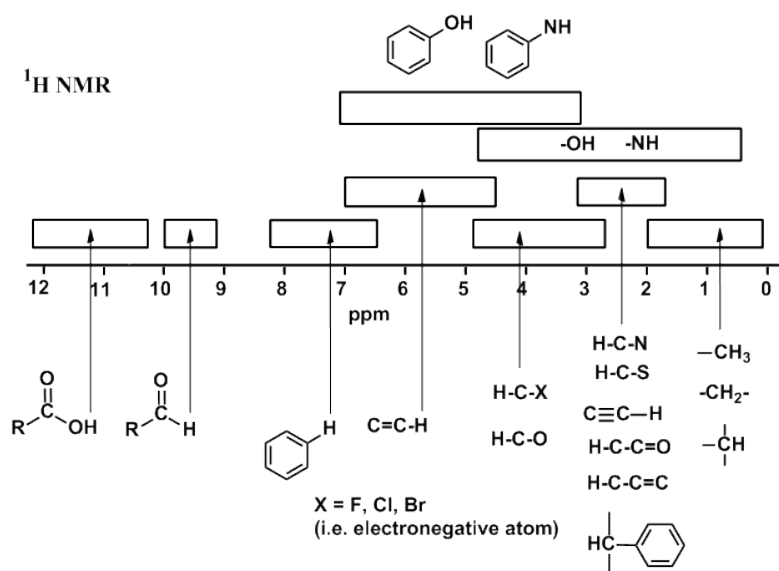
Τα πρωτόνια συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το είδος του δεσμού H-X και την ύπαρξη στο μόριο ομάδων, που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των πρωτονίων.

Σε δεσμούς $H \rightarrow X$, όπου X είναι δέκτης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου είναι ελαττωμένη, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διαμαγνητική προστασία και τη μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μικρότερες τιμές πεδίου. Αντίθετα, σε δεσμούς $H \leftarrow X$, όπου X είναι δότης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονική πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου θα είναι αυξημένη και η συχνότητα συντονισμού μετατοπισμένη σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου.

Μιας και η χημική μετατόπιση εξαρτάται από την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου, τα δεδομένα των χημικών μετατοπίσεων ερμηνεύονται με βάση κάποια πρότυπα. Έτσι, ως χημική μετατόπιση ορίζεται η σχετική διαφορά σε σχέση με τη συχνότητα συντονισμού ενός δείγματος αναφοράς, συνήθως tetramethylsilane (TMS). Το τετραμεθυλοσιλάνιο είναι το πρότυπο, διότι τα πρωτόνια του εμφανίζουν συχνότητες απορρόφησης σε μεγαλύτερα πεδία από αυτά που παρατηρούνται σε οποιαδήποτε άλλη οργανική ένωση. Επίσης, είναι επαρκώς αδρανές και άρα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό δείγμα αναφοράς για πολλά διαλύματα.

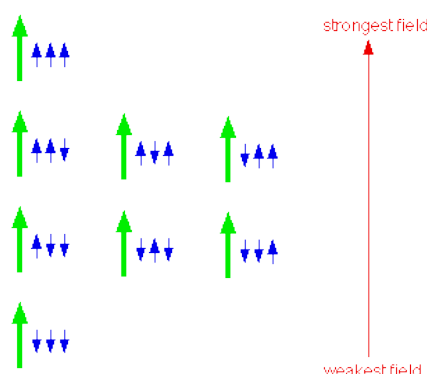
Εάν ν_δ είναι η συχνότητα συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος, ν_σ της ουσίας αναφοράς και ν_0 η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματόμετρου (σε Hz), τότε η χημική

μετατόπιση (Εικόνα 10) εκφράζεται με την κλίμακα δ , όπου $\delta = \frac{\nu_{\delta} - \nu_{\sigma}}{\nu_0} * 10^6$ ppm.^{14, 15, 16}



Εικόνα 10. Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ^1H NMR.

Τα φάσματα NMR βασίζονται επίσης στο φαινόμενο της spin-spin συζεύξεως (spin-spin coupling), δηλαδή του διαχωρισμού μίας κορυφής συντονισμού σε ομάδα πολλαπλών συμμετρικών κορυφών, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin των γειτονικών πυρήνων. Εάν δύο μαγνητικοί πυρήνες είναι αρκετά κοντά και οι γωνιακές σχέσεις μεταξύ των δεσμών που τους συγκρατούν είναι κατάλληλες, τότε οι δύο πυρήνες δεν δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο.^{14, 15}



Εικόνα 11. Προέλευση του φαινομένου της spin spin σύζευξης στο NMR.

Όταν ένα από τα πρωτόνια ομάδων μεθυλίου απορροφά ενέργεια, η συχνότητα της απορρόφησής του αυξάνεται ή μειώνεται ελαφρώς σχετικά

με αυτή της ομάδας μεθυλενίου, πράγμα που εξαρτάται από το spin των πρωτονίων των ομάδων του μεθυλίου. (Εικόνα 11) Η απόσταση σε Hz μεταξύ των επιμέρους κορυφών που δημιουργούνται υπολογίζουν τη σταθερά σύζευξης, J , η οποία φανερώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο ομάδων. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων (ή δύο ομάδων ισότιμων πυρήνων) είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται.

Στα φάσματα πολλών ενώσεων ^1H NMR οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές, κλπ.) λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή καλείται spin spin σύζευξη και διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω δεσμών του μορίου.

Όταν μία ομάδα μαγνητικώς ισότιμων ^1H , δηλαδή πρωτονίων με ίδιο J , έχει n ισότιμα γειτονικά ^1H , τα ^1H της ομάδας δίνουν μία σύνθετη κορυφή στο φάσμα NMR με πολλαπλότητα $(n+1)$.^{14, 15, 16}

2.1.2. Εφαρμογές φασματοσκοπίας NMR

1. Προσδιορισμός του ρυθμού διαφόρων αντιδράσεων: Η φασματοσκοπία NMR δίνει τη δυνατότητα μελέτης και καταγραφής του ρυθμού πολλών αντιδράσεων, οι οποίες εξελίσσονται πολύ γρήγορα και δεν μπορούν να μετρηθούν με άλλες τεχνικές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι αντιδράσεις γρήγορης ανταλλαγής πρωτονίων.

2. Προσδιορισμός της δομής μίας ένωσης: Από όλα τα είδη φασμάτων, τα φάσματα NMR δίνουν τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δομή μίας ένωσης. Για το σκοπό αυτό γίνεται συνήθως συσχετισμός και με δεδομένα που λαμβάνονται από άλλες τεχνικές όπως είναι η φασματομετρία μάζας.

3. Ποιοτική ανάλυση: Παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης των ειδών των χαρακτηριστικών ομάδων του μορίου και ανίχνευσης πιθανών προσμίξεων μέσω παρατήρησης των μηκών κύματος στα οποία εμφανίζονται οι διάφορες κορυφές.

4. Ποσοτική ανάλυση: Χρησιμοποιείται κυρίως για τον υπολογισμό της καθαρότητας της ένωσης.^{14, 15, 16}

2.2. Φασματομετρία Μαζών (MS)

Η φασματομετρία μαζών είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους κυρίως άγνωστων ενώσεων και για το διαχωρισμό ιόντων. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων σε αέρια μορφή του επιθυμητού κάθε φορά δείγματος και στη διάκρισή τους με τη βοήθεια του λόγου της μάζας προς το φορτίο (m/z). Το φάσμα μαζών είναι στην ουσία το διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει την ένταση του σήματος που καταγράφει ο ανιχνευτής συναρτήσει του λόγου m/z , που αναφέρθηκε πιο πριν. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα ποσοτικής και ποιοτικής ταυτοποίησης των ενώσεων και άρα εύρεσης του «δακτυλικού αποτυπώματος» αυτών.

Η φασματομετρία μαζών συνήθως χρησιμοποιείται συνδυαστικά με κάποια χρωματογραφική τεχνική, στις λεγόμενες συζευγμένες μεθόδους ανάλυσης, όπως είναι οι LC/MS και GS/MS. Στην περίπτωση αυτή, το διάγραμμα που προκύπτει αφορά το χρόνο, είναι δηλαδή η ένταση του ληφθέντος σήματος συναρτήσει του χρόνου και ονομάζεται χρωματογράφημα μαζών. Ο συνδυασμός αυτός τεχνικών υψηλής διακριτικότητας εκτός του ότι είναι αρκετά σύγχρονος, χαρίζει στην τεχνική ανάλυσης αυξημένη ευαισθησία αλλά και εκλεκτικότητα.

Οι συζευγμένες αυτές μέθοδοι έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογών σε πλειάδα επιστημονικών κλάδων, όπως είναι η φαρμακευτική, η βιολογία, η αρχαιολογία και η αεροδιαστημική. Στη φαρμακευτική γίνεται χρήση τους για να προσδιοριστούν ποσοτικά φάρμακα αλλά και διάφοροι μεταβολίτες αυτών που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά καθώς επίσης και για την διαπίστωση ύπαρξης προσμίξεων και του είδους αυτών κατά τη διάρκεια του ποιοτικού ελέγχου. Χρησιμοποιούνται στη βιολογία για τη μελέτη του DNA και των πρωτεϊνών που παράγονται μέσω των διάφορων μεταβολικών μονοπατιών ενώ αποτελούν σπουδαίο εργαλείο για τη διάγνωση μεγάλου αριθμού παθήσεων. Στην αρχαιολογία, οι συζευγμένες τεχνικές βρίσκουν εφαρμογή στην εξέταση ευρημάτων και στην απόκτηση χρήσιμων ιστορικών

και χρονολογικών πληροφοριών για αυτά. Στην αεροδιαστημική, βοηθούν στην εξερεύνηση του διαστήματος και στην μελέτη πετρωμάτων, εδαφολογικών δειγμάτων και ατμοσφαιρικών συνθηκών.¹⁷

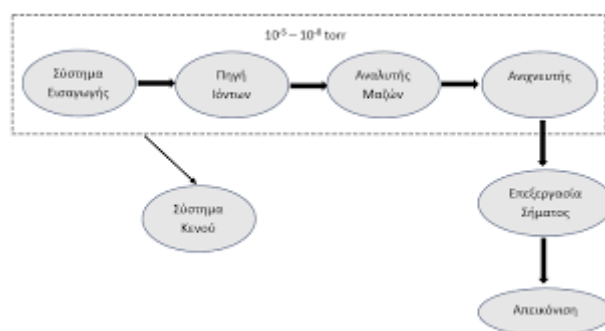
2.2.1. Χαρακτηριστικά στοιχεία MS

Τα βασικά οργανολογικά τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών είναι:

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
- Η πηγή ιοντισμού
- Ο αναλυτής μαζών
- Ο ανιχνευτής

Πέρα από αυτά, εντοπίζονται και κάποια άλλα λειτουργικά κομμάτια όπως είναι οι αντλίες που εξασφαλίζουν υψηλό κενό στο σύστημα, οι γεννήτριες αζώτου (αέριο νεφελοποίησης και αποδιαλύτωσης) καθώς επίσης και καταγραφικά μέρη τα οποία πλέον είναι οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές. Δίνεται έτσι η δυνατότητα χρήσης ειδικών λογισμικών για την σωστή λειτουργία του συστήματος καθώς επίσης και για την καταγραφή, συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση των προκύπτοντων φασματομετρικών δεδομένων.

17



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός φασματομέτρου μαζών.

Τα δείγματα προς ανάλυση με τη βοήθεια ενός κατάλληλου συστήματος εισαγωγής, καταλήγουν στην πηγή ιοντισμού όπου υφίστανται την αλλαγή τους σε φορτισμένα ιόντα, είτε θετικού είτε αρνητικού φορτίου. (Εικόνα 12) Τα μόρια του δείγματος κινούνται λόγω της διαφοράς πίεσης κατά μήκος της εισόδου διαρροής, που είναι συνήθως περί τα 10^{-2} - 10^{-5} Torr. Τα ιόντα που δημιουργούνται, καταλήγουν ευθυγραμμισμένα σε μία λεπτή δέσμη όπου και

επιταχύνονται λόγω του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, φτάνοντας στον αναλυτή μαζών. Στο σημείο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το λόγο της μάζας ως προς το φορτίο τους, m/z . Το σύστημα αντιλαμβάνεται το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται από τα δημιουργούμενα ιόντα μέσω του ανιχνευτή και το σήμα που προκύπτει καταλήγει στο τελικό τμήμα, όπου γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Με αύξηση της ενέργειας των ηλεκτρονίων προκύπτουν περισσότερο διεγερμένα ιόντα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη θραυσματοποίηση. Στην περίπτωση που η ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι σταθερή, τα θραύσματα που προκύπτουν αποτελούν χαρακτηριστικό "αποτύπωμα" για την κάθε ουσία.¹⁷

2.2.2. Εφαρμογές Φασματομετρίας Μαζών

1. Μελέτη και επαλήθευση της δομής νέων μορίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους.
2. Διαπίστωση της δομικής σύστασης νέων ενώσεων φυσικών προϊόντων.
3. Ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα μείγματα.
4. Ποσοτικοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα μείγματα.
5. Ακριβές μοριακό βάρος

Εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας, όπως: στη βιοτεχνολογία, στη φαρμακοβιομηχανία, στην κλινική πράξη, στο περιβάλλον, τα τρόφιμα, την τοξικολογία και την Ιατροδικαστική έρευνα.¹⁷

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. The Genetics of Cancer. *National Cancer Institute* **2017**
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. B. Alberts. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science **2002**, 17, 145.
3. J. Boyle. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, 36, 317–318.
4. R. Nall. What to know about cancer. *Medical News Today* **2020**
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648>
5. H. Sung et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: Cancer J. Clin.* **2021**, 71, 209-249.
6. D. Hanahan, R. A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Leading Edge Review. *Cell* **2011**, 144, 646-674.
7. M.K. Boss, R. Bristow, M.W. Dewhirst. Linking the history of radiation biology to the hallmarks of cancer. *Radiat. Res.* **2014**, 181, 561-77.
8. Types of Cancer Treatment. *National Cancer Institute*.
www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types.
9. R. Airley. *Cancer chemotherapy*. Wiley-Blackwell **2009**, 55-67.
10. M. Srinivasarao, C. V. Galliford, P. S. Low. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 203–219.
11. M. Srinivasarao, P.S. Low. Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 12133-12164.
12. P. Hoppenz, S. Els-Heindl, A.G. Beck-Sickinger. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies. *Front. Chem.* **2020**, 8, 571.
13. G. Trapani et al. Recent advances in ligand targeted therapy. *J. Drug Target.* **2012**, 20, 1-22.
14. S. A. Richards, J. C. Hollerton. *Essential Practical NMR for Organic Chemistry*. John Wiley & Sons. 2010, 1-10.
15. D. L. Pavia, G. M. Lampman et al. *Introduction to Spectroscopy*. Gengage Learning. **2015**, 5, 215-576.
16. N. E. Jacobsen. *NMR Spectroscopy Explained-Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. Wiley Interscience. **2007**, 1-20.
17. Ε. Παντερή, Μ. Παρίση-Πούλου. Προχωρημένη Φαρμακευτική Ανάλυση **2015**.
18. M. Hasan et al. Drug conjugates-an emerging approach to treat breast cancer. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2018**, 6.
19. S. Aryal, C.M. Hu, L. Zhang. Combinatorial drug conjugation enables nanoparticle dual-drug delivery. *Small*. **2010**, 6, 1442-1448.

20. C.H. Chau, P.S. Steeg, W.D. Figg. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet*. **2019**, 394, 793-804.
21. R. He et al. Peptide Conjugates with Small Molecules Designed to Enhance Efficacy and Safety. *Molecules* **2019**, 24.
22. M.A. Krishnan, S. Sengupta, V. Chelvam. Preparation of Ligand-Targeted Drug Conjugates for Cancer Therapy and Their Evaluation In Vitro. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2018**, 10.
23. R.P. Lyon et al. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 1059-1062.
24. C. Bahou et al. Use of pyridazinediones as extracellular cleavable linkers through reversible cysteine conjugation. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 14829-14832.
25. C. Wei et al. Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 4979-4986.
26. G.M. Dubowchik et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13, 855-869.
27. D. Mondal, J. Ford, K.G. Pinney. Improved Methodology for the Synthesis of a Cathepsin B Cleavable Dipeptide Linker, Widely Used in Antibody-Drug Conjugate Research. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59, 3594-3599.
28. J.D. Bargh et al. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 4361-4374.
29. S. Mura et al. In vitro investigation of multidrug nanoparticles for combined therapy with gemcitabine and a tyrosine kinase inhibitor: Together is not better. *Biochimie* **2016**, 130, 4-13.
30. T. Karampelas et al. GnRH-Gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25, 813-23.
31. S. Dyawanapelly, A. Kumar, M.K. Chourasia. Lessons Learned from Gemcitabine: Impact of Therapeutic Carrier Systems and Gemcitabine's Drug Conjugates on Cancer Therapy. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2017**, 34, 63-96.
32. R.D. Dubey et al. Recent advances in drug delivery strategies for improved therapeutic efficacy of gemcitabine. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, 93, 147-162.
33. H. Ma et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Novel Water-soluble Prodrug of Docetaxel with Amino Acid as a Linker. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, 88, 363-369.
34. A. Ganju et al. Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer. *Drug Resist. Updat.* **2014**, 17, 13-23.

35. J. Gao et al. Preparation, characterization and in vitro activity of a docetaxel-albumin conjugate. *Bioorg. Chem.* **2019**, 83, 154-160.
36. W. Clark, M.K. Still, A. Mitra. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 43.
37. D. W. Knight. N-Hydroxysuccinimide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.* **2001**.
38. G.W. Anderson, J.F. Zimmerman, F.M. Callahan. N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3039.
39. M. Tsakos, E.S. Schaffert, L.L. Clement, N.L. Villadsen, T.B. Poulsen. Ester coupling reactions—an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Natural Product Reports.* **2015**, 32, 605–632.
40. S. Faivre et al. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 734-745.
41. O. Argyros et al. Targeting of the breast cancer microenvironment with a potent and linkable oxindole based antiangiogenic small molecule. *Oncotarget.* **2017**, 8, 37250-37262.
42. Χ. Δ. Δημαρέλια. Σύνθεση Ικριωμάτων Διβρωμοπυριδαζινοδιόνης για τον Σχεδιασμό Στοχευτικών Πολυτροπικών Συζευγμάτων Αντικαρκινικών Φαρμάκων. *Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.* **2021**.
43. Α. Π. Βαλάκα. Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τη Σύνθεση Συζευγμάτων (Drug-Drug Conjugates) Αντικαρκινικών Φαρμάκων με τη χρήση Ικριώματος Διβρωμοπυριδαζινοδιόνης. *Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.* **2020**.
44. Χ. Μητρογιάννης. Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τη Σύνθεση Στοχευτικών Αντικαρκινικών Συζευγμάτων με Διπλό Θεραπευτικό Φορτίο μέσω Ικριώματος Διβρωμοπυριδαζινοδιόνης. *Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.* **2020**.
45. Π. Αναγνωστάκης. Σχεδιασμός και σύνθεση συζευγμάτων αντικαρκινικών φαρμάκων με πεπτίδια του υποδοχέα EGFR για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. *Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.* **2018**.
46. Y. Gilad et al. Dual-drug RGD conjugates provide enhanced cytotoxicity to melanoma and non-small lung cancer cells. *Biopolymers.* **2016**, 106, 160-171.
47. K.W. Swiderska et al. FGF2 Dual Warhead Conjugate with Monomethyl Auristatin E and α -Amanitin Displays a Cytotoxic Effect towards Cancer Cells Overproducing FGF Receptor 1. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 2098.
48. M.S.S. Murthy. Cancer Genes: The Molecular Militants. *Resonance* **2000**, 5, 45–59.
49. K.J. Harrington. Biology of Cancer. *Medicine* **2008**, 36, 1–4.
50. How Cancers Grow. *Cancer Research UK.* **2014**
<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancers-grow>

51. F. Spill et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, 40, 41–48.
52. M.W. Saif et al. Harnessing gemcitabine metabolism: a step towards personalized medicine for pancreatic cancer, *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **2012**, 4, 341–346.
53. K.A. Lyseng-Williamson et al. Docetaxel, *Drugs* **2005**, 65, 2513–2531.
54. D. of C. and B. University of Colorado at Boulder, Thin Layer Chromatography (TLC), Aug. 31, **2015**.
<http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html>
(accessed Oct. 08, 2022)
55. V. P. Pakhomov, Chromatography in Pharmaceutical Chemistry (100 Years of the Discovery of Chromatography, *Pharm. Chem. J.* **2003** 37, 8, 451–452