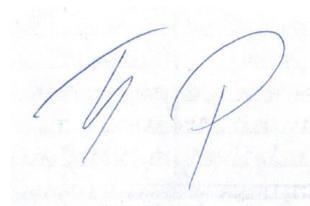


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



ПЕТРОВ РОСТИСЛАВ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ДИЗАЙН И СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ЛИГАНДОВ АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИНОВОГО
РЕЦЕПТОРА С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ
ДОСТАВКИ В КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель

Белоглазкина Елена Кимовна
профессор, доктор химических наук

Официальные оппоненты

Злотин Сергей Григорьевич
профессор, доктор химических наук, заведующий
лабораторией тонкого органического синтеза имени И.Н.
Назарова Института Органической Химии РАН

Грачев Михаил Константинович
профессор, доктор химических наук, заведующий
кафедрой органической химии Института биологии и
химии Московского педагогического государственного
университета.

Щекотихин Андрей Егорович, профессор, доктор
химических наук, директор Научно-Исследовательского
Института по изысканию новых антибиотиков имени
Г.Ф. Гаузе.

Защита состоится 14 ноября 2018 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного
совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по
адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет.

E-mail: tvn@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени
М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:
<https://istina.msu.ru/dissertations/148863288>

Автореферат разослан _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

Доктор химических наук

Магдесиева Т.В

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Онкологические заболевания являются второй по распространенности причиной смертности во всем мире — так, в 2015 году зарегистрировано 8.8 миллиона случаев смерти, связанных с раком. Среди всех онкологических заболеваний рак печени занимает второе место по смертности (788 000 случаев), а самым распространенным видом рака печени является гепатоцеллюлярная карцинома — результат злокачественного перерождения гепатоцитов под действием различных факторов. [1]

Современные методы химиотерапии гепатоцеллюлярной карциномы несовершенны и обладают серьезными недостатками, такими как общая токсичность, неселективность и недостаточная эффективность. Адресная доставка — перспективная стратегия модификации лекарственных агентов, позволяющая улучшить фармакологический профиль, локализовать терапевтические агенты в целевой ткани, органе или клетке, повысить терапевтический индекс и эффективность лекарственных препаратов за счет увеличения его действенной концентрации и снижения общего содержания в организме [2].

Удобной мишенью для адресной доставки в гепатоциты является асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R) по ряду причин: 1) высокая селективность рецептора по отношению к производным галактозы, 2) расположение преимущественно на поверхности гепатоцитов, 3) высокая концентрация (более 500 000 рецепторов на гепатоците), 4) запуск процесса рецептор-опосредованного эндоцитоза при связывании с производным галактозы. В совокупности все это делает ASGP-R перспективнейшей мишенью для адресной терапии заболеваний печени, особенно гепатоцеллюлярной карциномы и вирусного гепатита С.

Цель работы состояла в разработке, синтезе и исследовании биологической активности новых структурных типов низкомолекулярных систем адресной доставки, представляющих собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с новыми лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Дизайн и разработка методов синтеза новых высокоэффективных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина.
2. Изучение закономерностей связывания полученных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса.

¹ World Health Organization: Cancer. Fact sheet. <http://who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

² Маклакова С. Ю. и др. Новый подход к синтезу лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленной доставки олигонуклеотидов в гепатоциты // Известия Академии наук. Серия химическая. 2015. №. 7. С. 1655-1655.

3. Разработка низкомолекулярных средств адресной доставки, представляющих собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина.
4. Исследование цитотоксичности и внутриклеточного накопления полученных новых низкомолекулярных систем адресной доставки.

Научная новизна. Разработаны и впервые синтезированы новые структурные типы высокоэффективных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина. Методом поверхностного плазмонного резонанса установлены величины констант диссоциации для новых триантеннарных лигандов ASGP-R и зависимости, обуславливающих связывание лигандов с асиалогликопротеиновым рецептором.

Впервые предложена и осуществлена на практике стратегия использования терапевтического агента в качестве точки ветвления для лигандов асиалогликопротеинового рецептора. Разработаны и впервые синтезированы новые низкомолекулярные средства адресной доставки, представляющие собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина, в том числе в рамках стратегии «лекарственный препарат как точка ветвления лигандов ASGP-R».

Исследована биологическая активность *in vitro* (цитотоксичность и внутриклеточное накопление) новых низкомолекулярных средств адресной доставки, представляющих собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина, установлены величины CC_{50} и показано внутриклеточное распределение представленных конъюгатов.

Практическая значимость. Разработаны синтетические схемы и осуществлен синтез новых высокоэффективных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина.

Оптимизирована методика селективного тозилрования производных N-ацетилгалактозамина по шестому положению, включающая кинетический контроль реакции.

Методом поверхностного плазмонного резонанса показано, что полученные триантеннарные лиганды обладают намного большей аффинностью к ASGP-R, чем нативный лиганд - N-ацетилгалактозамин-2 (константы диссоциации триантеннарных лигандов на пять порядков ниже), а также продемонстрировано, что введение линкера в структуру триантеннарного лиганда практически не влияет на значения констант диссоциации.

В рамках стратегии «лекарственный препарат как точка ветвления лигандов ASGP-R» разработаны синтетические схемы и впервые синтезированы новые низкомолекулярные средства адресной доставки, представляющие собой ковалентные конъюгаты лекарственных

препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина.

Оптимизированы методики получения ковалентных конъюгатов лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина, включающие реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Показано эффективное внутриклеточное накопление для низкомолекулярных ковалентных конъюгатов паклитаксела с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина и внутриклеточное распределение, отвечающее недостаточному высвобождению терапевтического агента.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработка методов получения новых высокоэффективных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина.
2. Изучение аффинности полученных триантеннарных лигандов асиалогликопротеинового рецептора к ASGP-R методом поверхностного плазмонного резонанса.
3. Синтез новых низкомолекулярных средств адресной доставки, представляющих собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина.
4. Исследования цитотоксической активности и внутриклеточного накопления новых низкомолекулярных средств адресной доставки, представляющих собой ковалентные конъюгаты лекарственных препаратов с лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных производных N-ацетилгалактозамина.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международном симпозиуме «29th International Carbohydrate Symposium» (Лиссабон, Португалия, 14-19 июля 2018), молодёжной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Шерегеш, Кемеровская обл, Россия, 9-16 марта 2018), международной конференции «10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry» (Дубровник, Хорватия, 25-28 июня 2017), международной конференции «Зимняя школа по органической химии-2017» (Красновидово, Московская область, Россия, 13-18 января 2017), международной конференции «Зимняя школа по органической химии-2018» (Красновидово, Московская область, Россия, 19-23 января 2018), международном конгрессе "Kost-2015" (Москва, Россия, 18-23 октября 2015), международной конференции «XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry» (Мец, Франция, 7-11 июня 2015), 3-ей Российской конференции по медицинской химии (Казань, Россия, 28 сентября - 3 ноября 2017), XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 17-18

марта 2016), XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 16-17 марта 2017)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в российских и зарубежных журналах, индексируемых международных базах данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных Диссертационным советом МГУ, и 10 тезисов докладов.

Личный вклад автора состоял в общей постановке задач, систематизации литературных данных, подготовке и проведении экспериментальных этапов исследования, обработке, интерпретации и оформлении полученных экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации и представлении полученных результатов на конференциях

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы на тему «Средства адресной доставки лекарственных препаратов в клетки печени», главы обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, изложена на 121 странице машинописного текста и включает 51 рисунок, 7 таблиц и список цитируемой литературы из 123 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-74-30012 и гранта фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд содействия инновациям) «УМНИК» №8879ГУ/2015.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В рамках данного диссертационного исследования была поставлена задача разработки низкомолекулярных систем адресной доставки лекарственных средств в гепатоциты, представляющих собой ковалентные конъюгаты терапевтических агентов с лигандами ASGP-R (Рис.1). Новизна работы заключается в создании и применении в качестве средств доставки более эффективных по сравнению с известными лигандами ASGP-R, а также в формировании принципиально новой стратегии построения средств адресной доставки, подразумевающей использование лекарственного препарата в качестве точки ветвления.

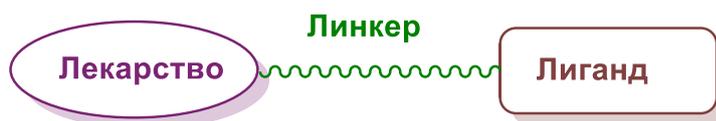


Рисунок 1. Общая структура синтезируемых конъюгатов.

1. Синтез триантеннарных лигандов ASGP-R

Первой задачей диссертационного исследования было создание новых высокоэффективных лигандов ASGP-R. Для этого на основании литературных данных в качестве целевых молекул были выбраны триантеннарные лиганды, которые: 1) содержат три галактозных фрагмента, 2) фрагменты галактозы находятся на расстоянии $\sim 20\text{\AA}$ от точки ветвления, 3) содержат гибкие спейсеры. В рамках работы произведена модификация

фрагмента, отвечающего за связывание, для увеличения аффинности к ASGP-R, поскольку это напрямую влияет на количество поглощенного препарата [3]. Впоследствии полученные высокоэффективные лиганды ASGP-R планируется конъюгировать с лекарственными препаратами (Рис. 2).

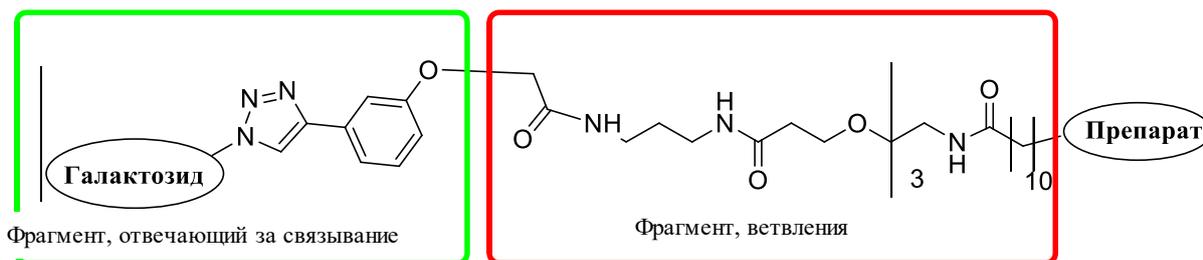
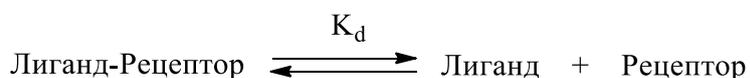


Рисунок 2. Общая схема строения конъюгатов с лигандами триантеннарного строения для направленной доставки в гепатоциты с обозначенными функциональными фрагментами

1.1. Выбор фрагмента, отвечающего за связывание

Основным количественным критерием для оценки связывания углеводных остатков с целевым рецептором является равновесная константа диссоциации (K_d) для реакции:



Ранее методом поверхностного плазмонного резонанса были установлены константы диссоциации комплексов «лиганд-рецептор» для следующих моносахаридов (Рис. 3):

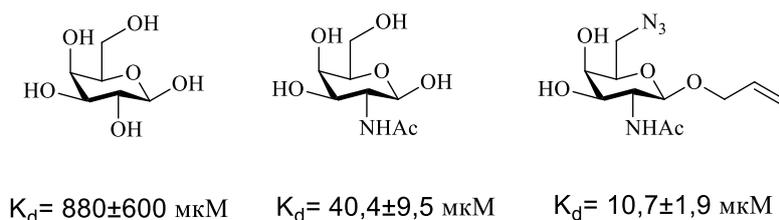


Рисунок 3. Константы диссоциации моносахаридов

Поскольку для производного N-ацетилгалактозамина, содержащего аллилокси-заместитель в С1-положении и триазол с ароматическим заместителем в С4- или в С6-положении, было выявлено одно из самых высоких значений аффинности ($K_D = 8.2 \pm 0.7$ мкМ), и из литературных данных известно, что аффинность углеводного фрагмента напрямую влияет на поглощение конъюгатов *in vitro* и *in vivo*, в рамках работы была исследована возможность получения триантеннарного лиганда, представленного на Рис. 4. Также в качестве модельных соединений были исследованы N-ацетилгалактозаминные производные (2) и (3) (Рис.5). К возможным преимуществам лигандов (2) и (3) можно отнести то, что синтез галактозаминных производных для их получения требует меньшего количества стадий.

³ Sanhueza C. A. et al. Efficient liver targeting by polyvalent display of a compact Ligand for the asialoglycoprotein receptor // Journal of the American Chemical Society. 2017. V. 139. №. 9. P. 3528-3536.

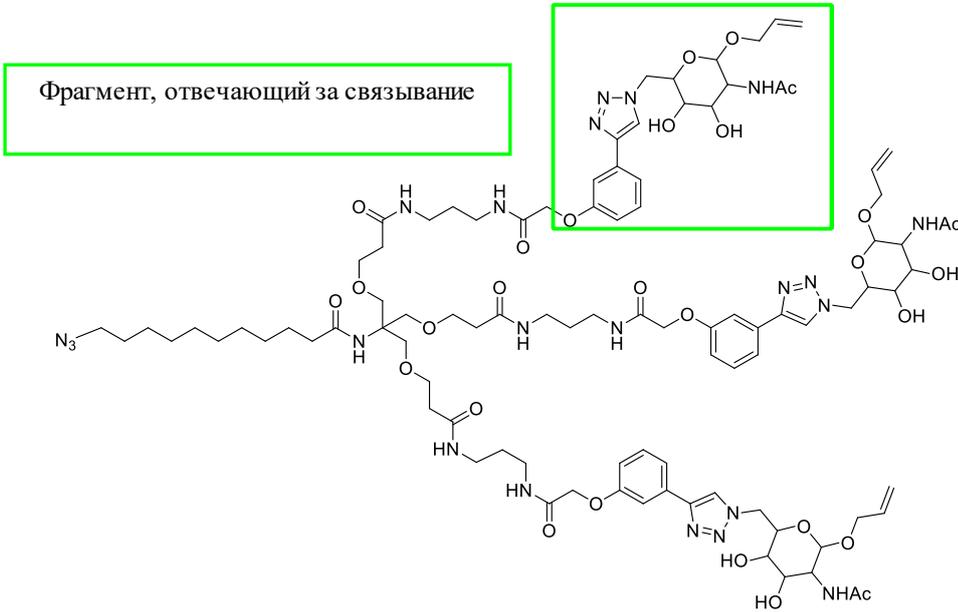


Рисунок 4. Целевой лиганд ASGP-R триантенарного строения, содержащий аллильное производное галактозы.

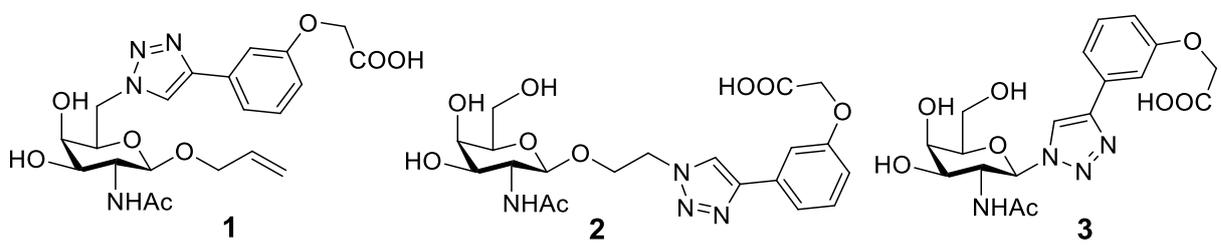


Рисунок 5. Производные N-ацетилгалактозамина, выбранные в качестве фрагментов, отвечающих за связывание (1),(2),(3)

1.2. Выбор терапевтических агентов

В качестве модельных доставляемых агентов для последующего конъюгирования были выбраны низкомолекулярные противоопухолевые (паклитаксел, доксорубин и метотрексат) и противовирусный (рибавирин) препараты:

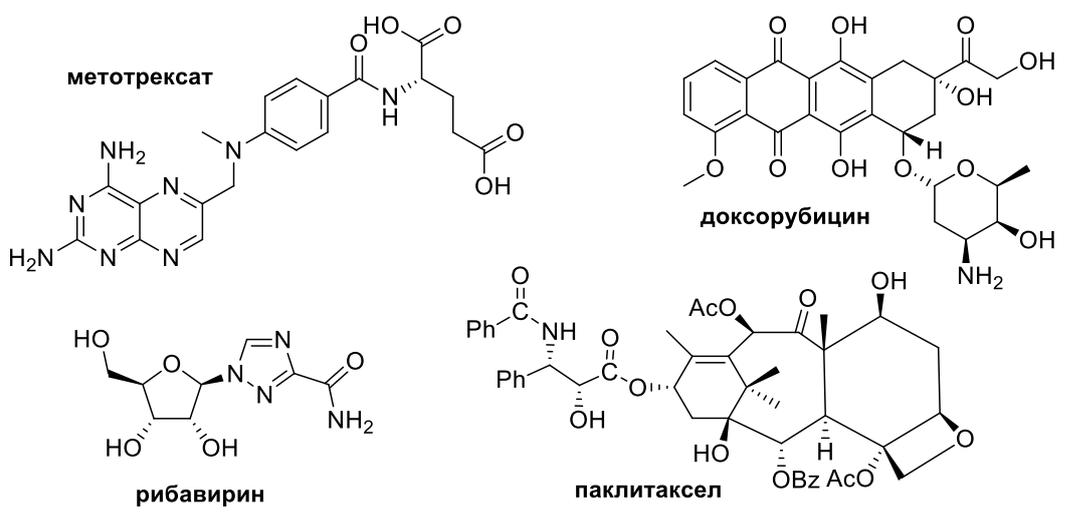
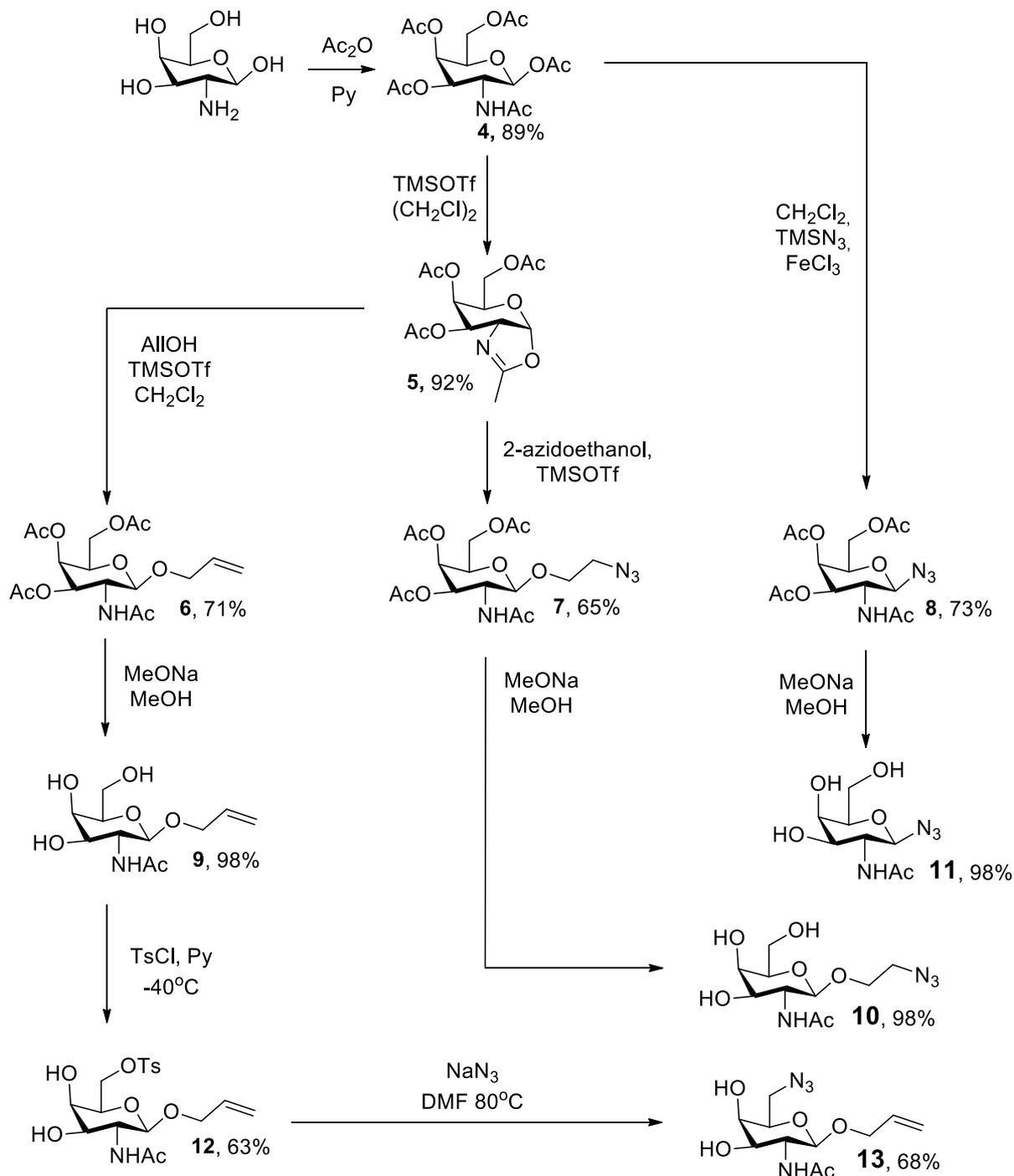


Рисунок 6. Препараты, выбранные в качестве терапевтических агентов для конъюгирования с лигандами ASGP-R

Каждая из молекул данных препаратов обладает несколькими функциональными группами с различной реакционной способностью. Это позволяет избирательно получать конъюгаты с различным количеством лигандов ASGP-R, вводя терминальные ацетиленовые связи.

1.3. Синтез производных N-ацетилгалактозамина⁴

Галактозные производные (10),(11),(13) синтезировали согласно следующей схеме:



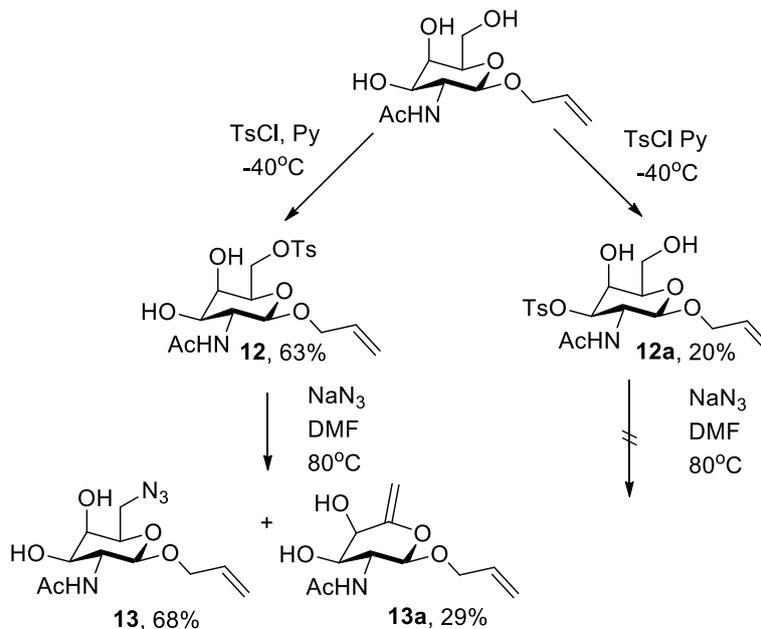
На первой стадии синтеза 2-амино-2-дезоксид-β-D-галактопиранозу ацилировали уксусным ангидридом в присутствии пиридина; из полученной 2-ацетиламино-2-дезоксид-1,3,4,6-

⁴ Часть исследований, представленных в разделах 3.3-3.6, выполнены совместно с И. Кисляковым в рамках его дипломной работы (руководители Р.А. Петров, Е.К. Белоглазкина)

тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозы (4) реакцией с триметилсилилтрифлатом синтезировали 2-метил-4,5-(2'-дезоксигалактопирано)-Δ²-оксазолин (2). Дальнейшая реакция с получением производных (6) и (7) протекает с раскрытием оксазолинового цикла в (5) по S_N2 механизму, где в качестве нуклеофила выступает молекула спирта. Соединение (8) получается по сходному механизму, за исключением того, что реакцию проводили без выделения промежуточного оксазолина. Для производных (6), (7), (8) далее проводили деацилирование с получением соединений (9), (10), (11).

В случае соединений (10) и (11) полученные продукты представляли собой конечные галактозные производные, вещество (9) подвергали дальнейшим превращениям. Для этого 1-О-аллил-2-ацетиламино-2-дезоксигалактопиранозу (9) тозиллировали тозилхлоридом в пиридине. В результате получили два изомерных продукта моно-тозиллирования по атомам С6 и С3 (12, 12a), разделённые методом колоночной хроматографии. Для увеличения соотношения изомеров в пользу целевого продукта (12) методика была оптимизирована; в результате соединение (12) удалось получить с препаративным выходом 63%.

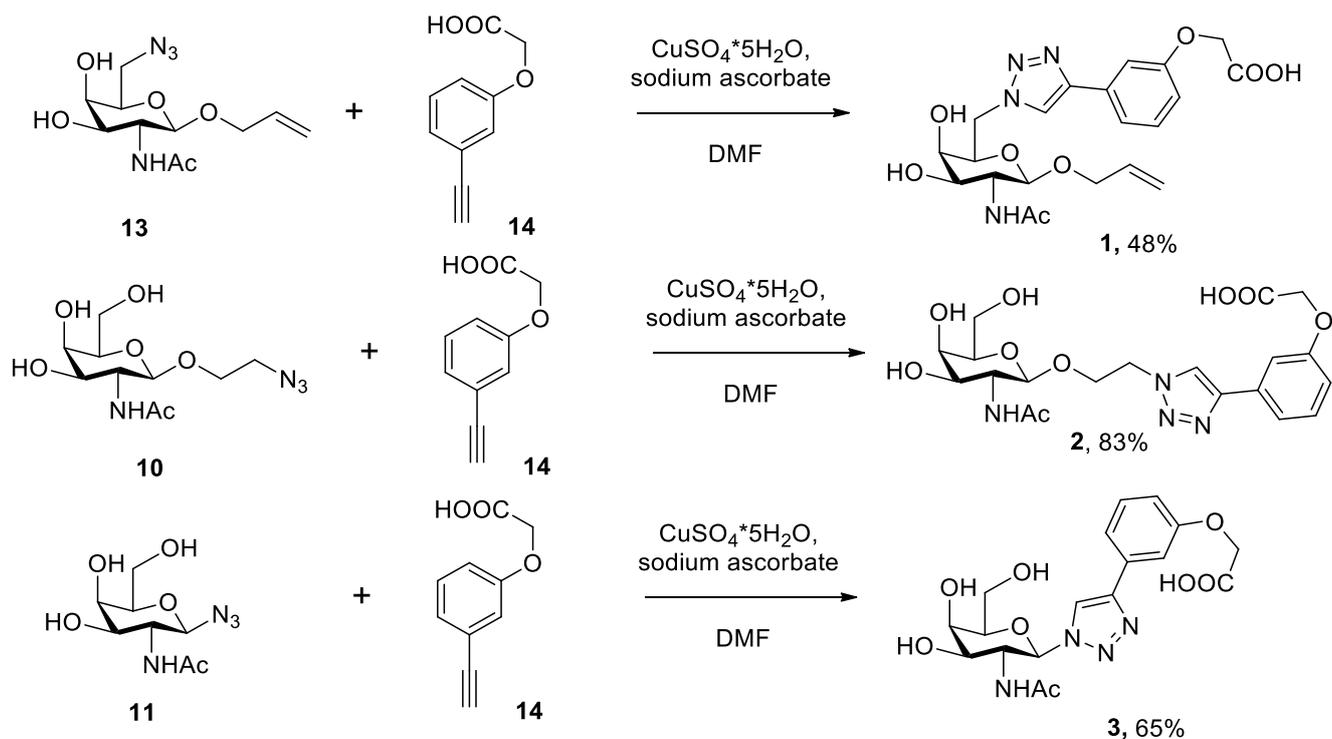
Структура изомерных продуктов (12) и (12a) подтверждается данными ¹H ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии, а также результатом S_N2 реакций замещения группы на N₃ нагреванием в DMF с азидом натрия для двух этих изомеров: для С6-ОТs изомера (12) в результате образуются продукт замещения на азидо-группу (13), а также продукт E2-элиминирования (13a); для изомера (12a) ни замещение, ни элиминирование не протекают:



1.4. Синтез фрагментов, отвечающих за связывание

Финальной стадией синтеза производных (1),(2),(3), отвечающих за связывание (Рис.5), являлось медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение между полученными азид-галактозными производными и (*мета*-этинилфенокси)уксусной кислотой (14). Алкинильную составляющую (14) синтезировали реакцией S_N2 замещения из этил-2-бромацетата и *мета*-

этинилфенола. Азид-алкиновое циклоприсоединение проводили для соединений **(10)**, **(11)**, **(13)** с алкином **(14)** в присутствии сульфата меди и аскорбата натрия:

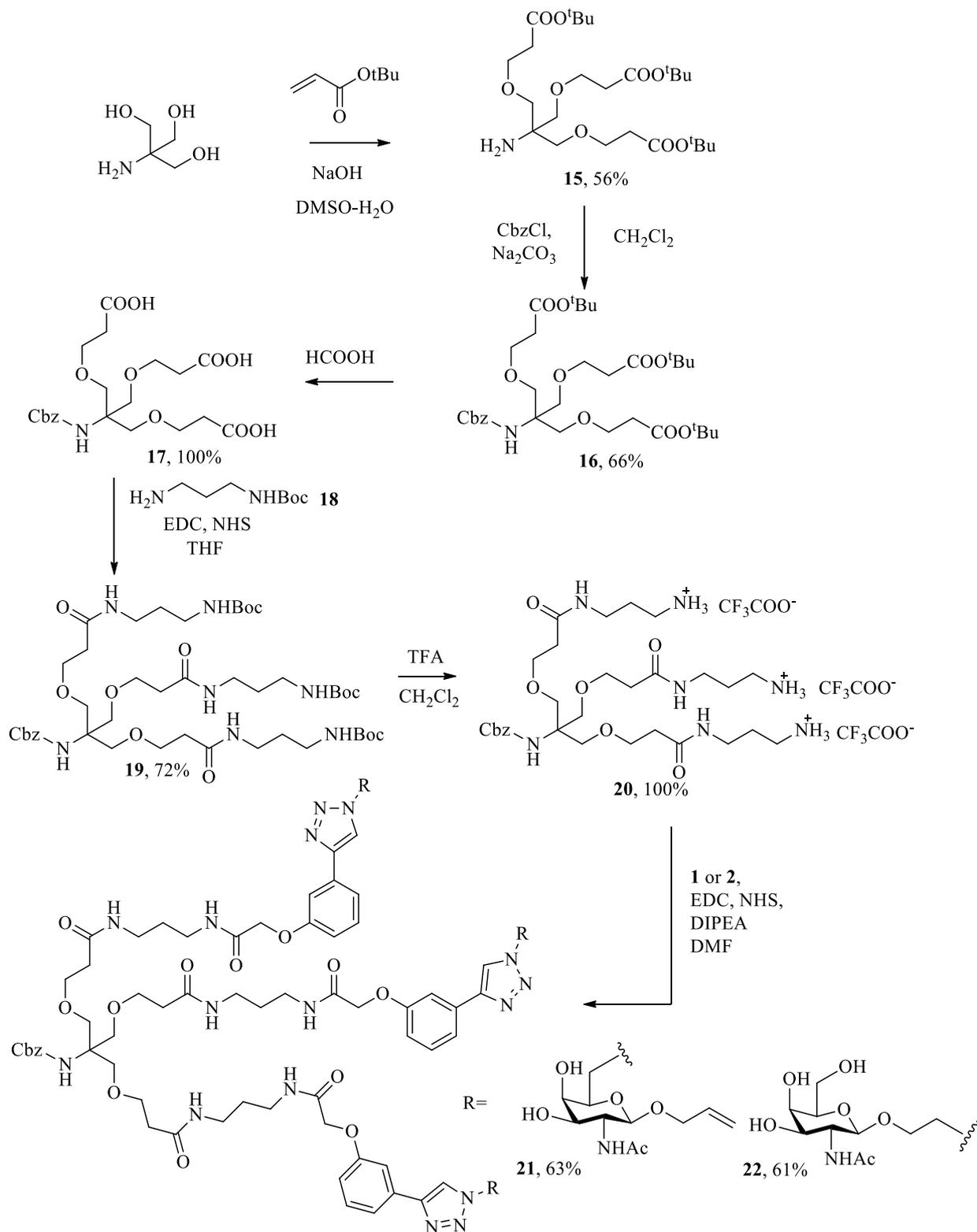


1.5. Синтез модельных триантеннарных лигандов ASGP-R

Следующим этапом работы был синтез модельных триантеннарных лигандов и исследование их связывания с ASGP рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Синтез модельных лигандов проводили в соответствии с представленной ниже схемой. Начальной реакцией является 1,4-присоединение по Михаэлю трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS) к *трет*-бутилакрилату. Далее к аминогруппе вводили Cbz-защиту, удаляли *трет*-бутильные группы 100% муравьиной кислотой с получением трикислоты **(17)**, которую вводили в реакцию с моно-Вос производным 1,3-диаминопропана **(18)**, после чего Вос-защитные группы удалили трифторуксусной кислотой. Финальная стадия синтеза трехвалентного лиганда заключалась в образовании амидных связей между полученными галактозными производными **(1, 2)** и фрагментом ветвления **(20)** с получением целевых соединений **(21, 22)**. Продукты реакции выделили с помощью колоночной хроматографии. Образование целевого продукта подтверждали при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР ^1H .

Таким образом, в рамках работы были синтезированы модельные триантеннарные лиганды **(21)** и **(22)** с галактозамидными фрагментами.



Полученные лиганды протестировали на аффинность к ASGP-R методом поверхностного плазмонного резонанса⁵. В проведенных тестах полученные производные продемонстрировали константу диссоциации на шесть порядков меньшую (0.76 ± 0.21 нМ для **(21)** и 1.16 ± 0.23 нМ для **(22)**), чем у нативного лиганда (448 мкМ (N-ацетилгалактозамин)), что свидетельствует о существенном улучшении параметров связывания при использовании

⁵ Данная часть работы выполнена совместно с сотрудником кафедры химической энзимологии м.н.с. Лопуховым А.В.

карбоксильной группы в реакции образования амидной связи применялись 3-[бис(диметиламино)метил]-3Н-бензотриазол-1-оксид гексафторофосфат (HBTU) и 3-(этилиминометиленамино)-N,N-диметилпропан-1-амин (EDC), при использовании последнего выходы реакции были выше. Остальные стадии синтеза были выполнены в соответствии с предыдущей схемой (см. раздел 1.5). Таким образом, были синтезированы ранее не описанные целевые триантеннарные лиганды (28) и (29).

Данные по связыванию лигандов (28) и (29) с ASGP-R, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, не показали существенных отличий с модельными лигандами ($K_D(28) = 0.76 \pm 0.25$ нМ, $K_D(29) = 1.1 \pm 0.3$ нМ), что говорит о том, что введение линкера не сказывается на связывании с рецептором.

В дальнейшем с соединениями (28) и (29) планируется осуществить конъюгацию с лекарственными препаратами и для полученных конъюгатов провести биологические тесты на цитотоксичность.

2. Синтез упрощенных конъюгатов моно- и дивалентных конъюгатов ASGP-R с лекарственным средством в качестве точки ветвления

В качестве второй задачи данного исследования, в работе впервые была исследована возможность использования новой стратегии создания конъюгатов лекарственных препаратов с лигандами ASGP-R, в которых точкой ветвления являлся бы сам лекарственный препарат (Рис.7). При этом исходный препарат должен содержать несколько однотипных функциональных групп, которые можно было бы подвергнуть модификации адресным фрагментом без потери фармакологической активности. Данный подход позволит существенно упростить синтез соединений для направленной доставки.

Для получения упрощенных конъюгатов препараты, предложенные ранее как терапевтические агенты (раздел 1.2), вводились в реакцию с молекулами, содержащим терминальную тройную связь, для последующей конъюгации с углеводными фрагментами, отвечающими за связывание, или уже модифицированными (содержащими карбоксильную группу) лигандами ASGP-R.

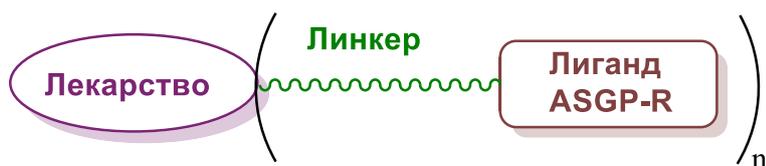
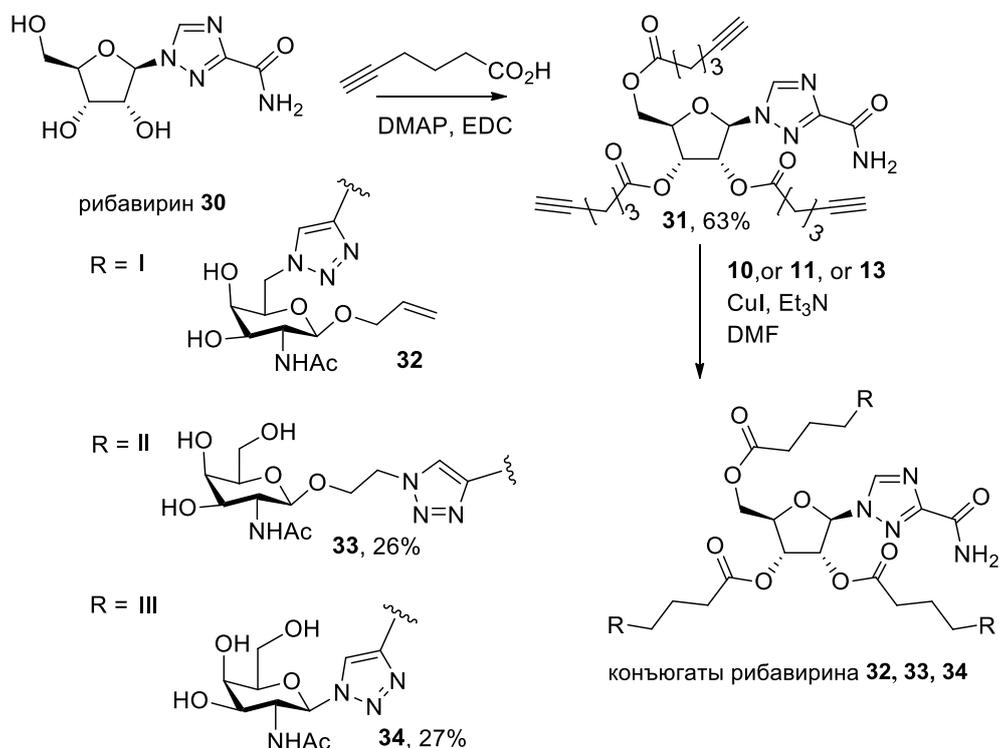


Рисунок 7. Общая структура синтезируемых упрощенных конъюгатов.

2.1. Синтез производных рибавирина

Конъюгаты рибавирина (32), (33), (34) были получены по схеме, представленной ниже



На первом этапе было проведено ацилирование рибавирина 3-мя эквивалентами гекс-5-иновой кислоты, в результате было получено ранее не описанное производное (**31**), которое далее вводили в реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого солями Cu(I) (CuAAC), с лигандами (**10, 11, 13**). В результате были получены конъюгаты лигандов и рибавирина, соединенные через 1,2,3-триазольные фрагменты (**32-34**).

При осуществлении этой реакции мы столкнулись с проблемой гидролиза сложноэфирной связи; таким образом, стандартные условия проведения реакции CuAAC требовали оптимизации. Результаты оптимизации условий реакции на примере получения соединения (**34**) приведены в Табл. 1: Проведением реакции при высоком разбавлении в присутствии CuI, Et₃N/DMФА, продукт конъюгирования был получен с выходом 27% .

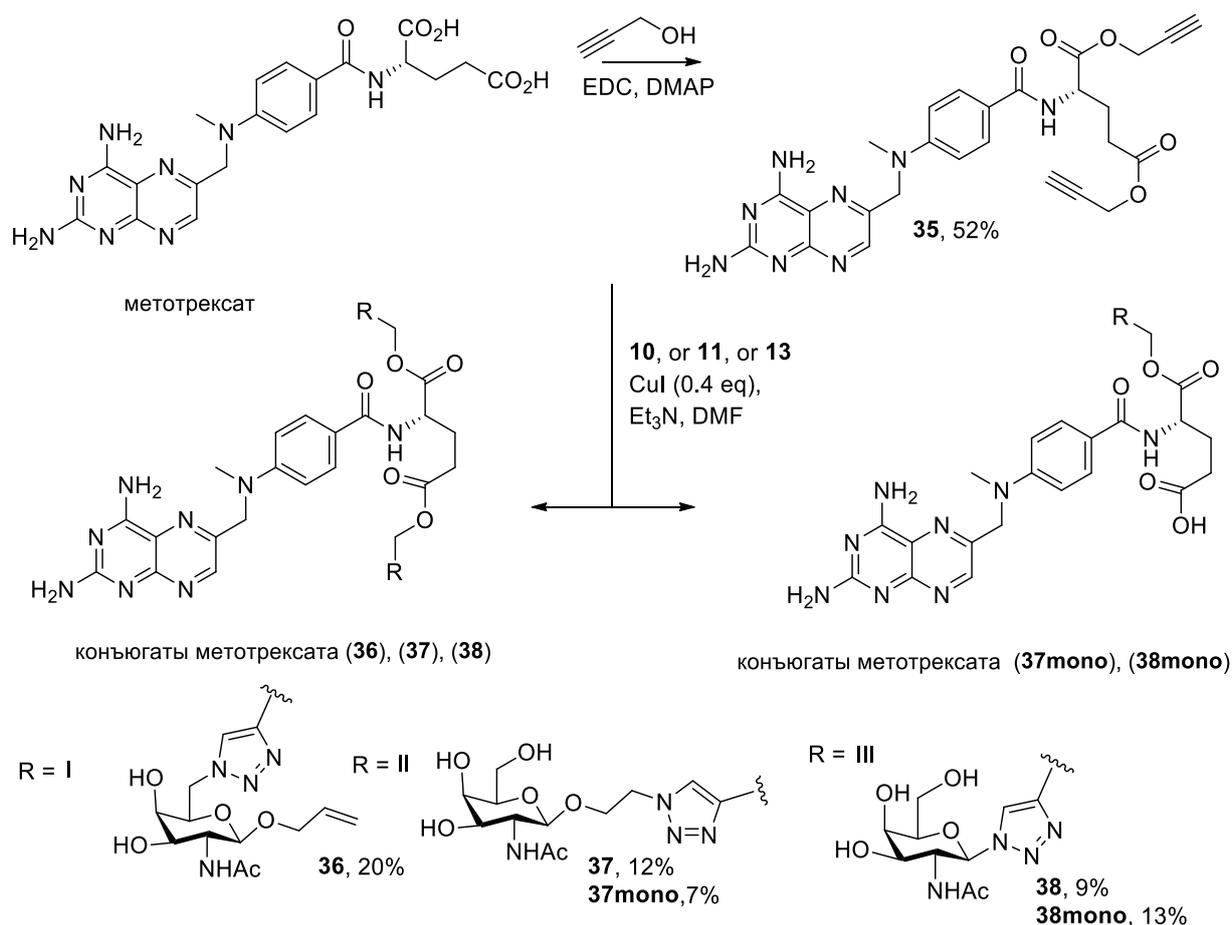
Таблица 1. Подбор условий реакции [3+2] - азид-алкинового циклоприсоединения на примере получения соединения (**34**)

Растворитель	Катализатор	Результат реакции
DMФА- H ₂ O	аскорбат Na (3 экв.), CuSO ₄ *5H ₂ O (3 экв.)	Гидролиз сложноэфирной связи
MeOH	аскорбат Na (3 экв.), CuSO ₄ *5H ₂ O (3 экв.)	Гидролиз сложноэфирной связи
MeOH	CuI (9 экв.)	Переэтерификация сложноэфирной группы
DMФА	CuI (0.9 экв.)	9% продукта конъюгирования
DMФА	CuI (9 экв.)	9% продукта конъюгирования
DMФА	CuI (0.9 экв.), Et ₃ N (0.9 экв.)	27% продукта конъюгирования

Выделение продуктов **(33)**, **(34)** осуществляли путем двукратного хроматографирования: вначале методом колоночной хроматографии в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, затем методом ВЭЖХ в обращенно-фазовой системе $\text{H}_2\text{O}-\text{MeCN}$. Конъюгат **(32)** был очищен методом колоночной хроматографии в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$. Но последующий этап очистки не был осуществлен. По данным ЯМР ^1H и МСВР полученный продукт присутствует в смеси, но не индивидуален и требует дальнейшего выделения. Следует отметить, что в литературе не описано получение и выделение подобных производных. Полученные конъюгаты **(33)**, **(34)** были охарактеризованы методами ЯМР ^1H и МСВР, в случае соединения **(33)** – методом MALDI.

2.2. Синтез производных метотрексата

Производные метотрексата **(36)**, **(37)**, **(38)** получили согласно следующей схеме:



Метотрексат вводили в реакцию с 2 экв. пропаргилового спирта по методике, сходной с методикой ацилирования рибавирина и паклитаксела (отличие состояло в том, что реакцию проводили в ДМФА по причине низкой растворимости продукта и реагента в CH_2Cl_2). В результате с выходом 52% получили продукт **(35)**, который затем вводили в реакцию CuAAC с получением конъюгатов **(36-38)**

В случае реакции соединений **(35)** и **(11)** в качестве продуктов образуется смесь соединений **(38)** и **(38mono)** – целевого конъюгата и продукта его гидролиза по одной из сложноэфирных групп. Соединения **(38)** и **(38mono)** разделили методом ВЭЖХ в обращено-

фазовой системе ($\text{H}_2\text{O}-\text{AcCN}$). Структуру продукта (**38mono**) (Рис. 8) определили с использованием метода двумерной $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ЯМР спектроскопии gHMBC.

В случае реакции (**35**) с (**10**) в качестве продуктов также образуется смесь соединений (**37**) и (**37mono**) (Рис. 8) – целевого конъюгата и продукта его гидролиза по одной из сложноэфирных групп. Соединения (**37**) и (**37mono**) разделили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе ($\text{H}_2\text{O}-\text{MeCN}$).

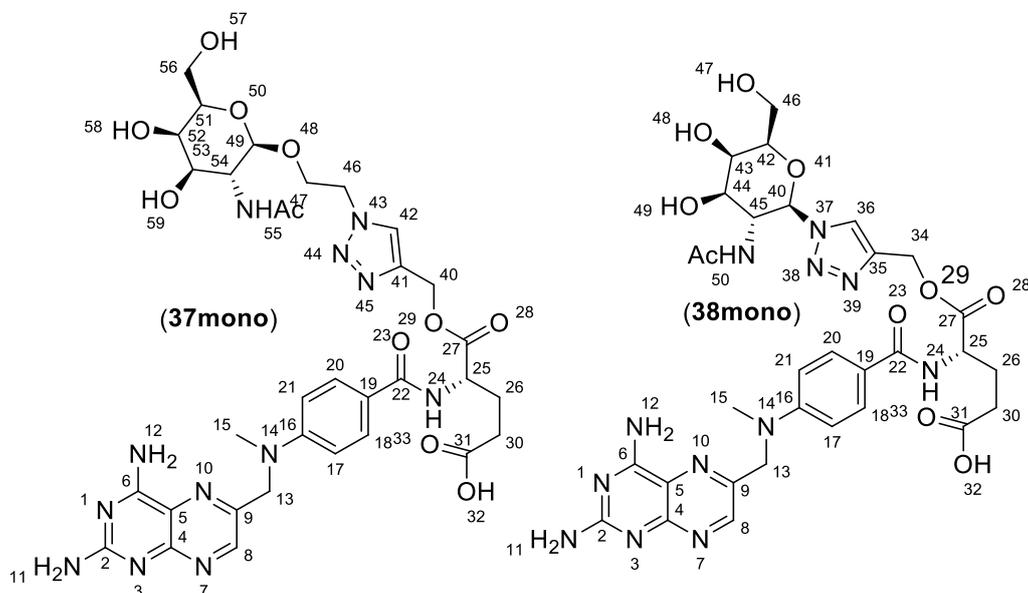


Рисунок 8. Структура продукта (**37mono**) и продукта (**38mono**).

Поскольку в состав вещества (**38**) входят две различных сложноэфирных группы, при образовании соединения (**38mono**) может протекать гидролиз по сложноэфирной группе при атоме C^{27} или при атоме C^{31} . Сравнение спектра полученного продукта (**21mono**) с литературными данными для исходного метотрексата в ДМСО показывает, что наиболее сильное изменение претерпевают химические сдвиги протонов HN^{24} (8.18 и 8.13 м.д. соответственно для метотрексата [6] и соединения (**38mono**)) и HC^{25} (4.33 и 4.74 м.д.), а не протона HC^{30} (2.31 и 2.3 м.д.). Таким образом при атоме C^{31} по-видимому находится тот же заместитель, что и в метотрексате (- OH), а заместитель при атоме C^{27} отличен от исходного соединения (- OR).

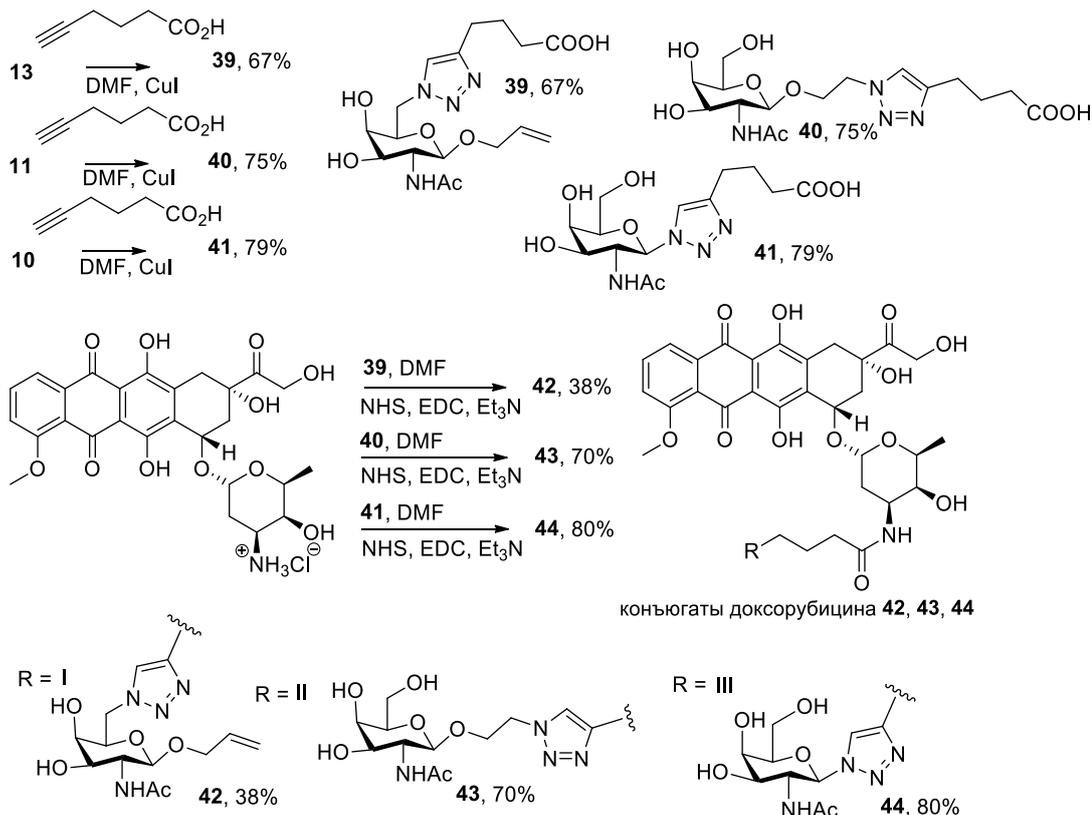
Протекание гидролиза по группе $\text{C}^{31}(\text{O})$ согласуется с большей кислотностью соответствующей карбоксильной группы (для RC^{31}OON $\text{pK}_{\text{a}1}=2,89$, для RC^{27}OON $\text{pK}_{\text{a}2}=4,41$ [7]), а также большей пространственной доступностью группы RC^{31}OON для гидролиза.

⁶ Gaggioli E. et al. ^1H and ^{13}C NMR relaxation investigation of methotrexate in [2H₆] dimethyl sulphoxide solution // Magn. Reson. Chem. 1993. V. 31. №. 5. P. 431-434.

⁷ Meloun M., Ferenčíková Z., Vrána A. The thermodynamic dissociation constants of methotrexate by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data // Open Chem. 2010. V. 8. №. 3. P. 494-507.

2.3. Синтез производных доксорубина

Производные доксорубина (**42**), (**43**), (**44**) синтезировали по схеме, приведенной ниже:



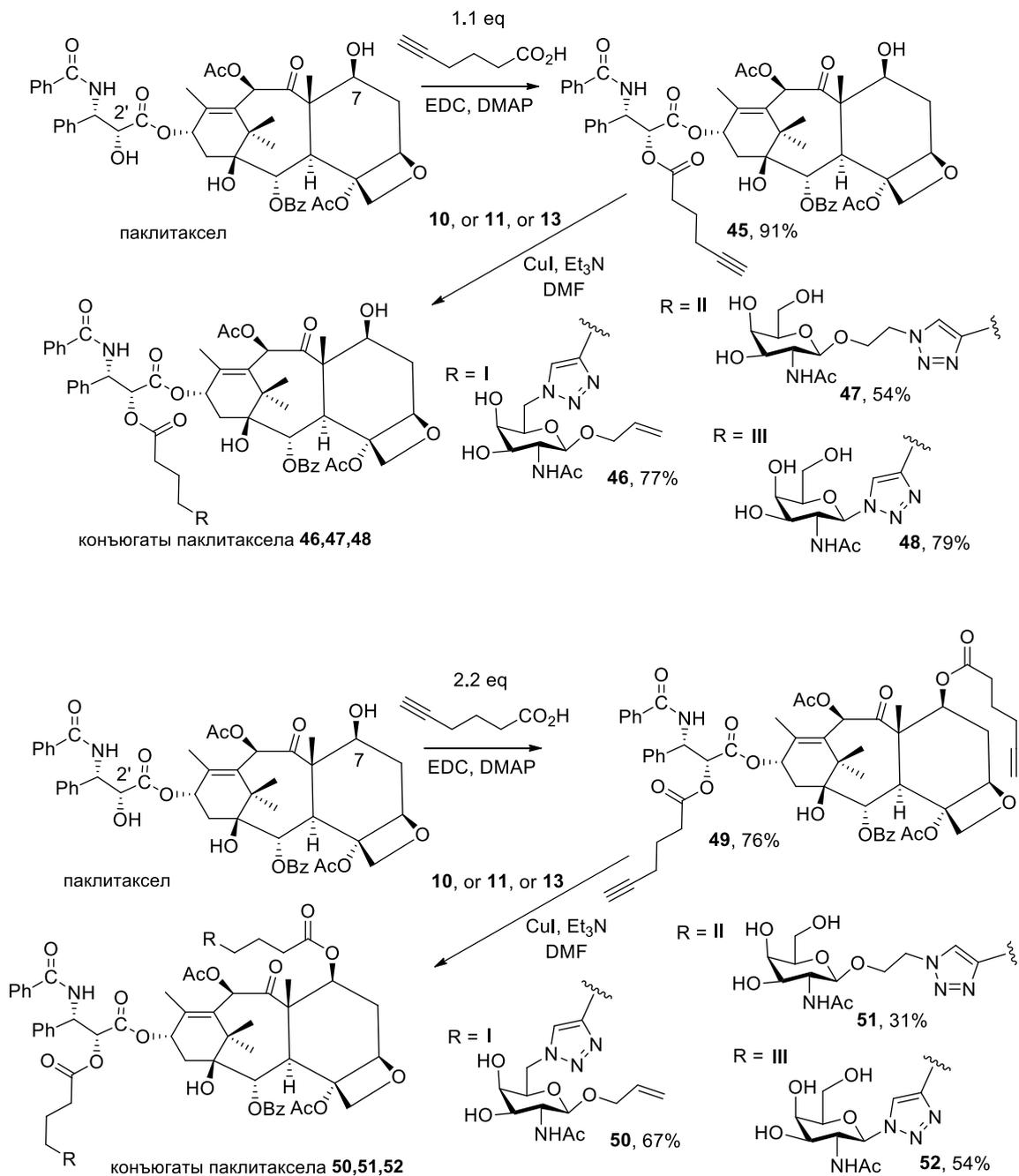
Получение конъюгатов доксорубина отличается от схем, представленных в разделах 2.1, 2.2 тем, что присоединение лиганда к линкеру осуществили на заключительной стадии синтеза, после [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения гекс-5-иновой кислоты к лигандам. Вначале реакцией CuAAC синтезировали лиганды (**39**), (**40**), (**41**); далее соединения (**39**), (**40**), (**41**) вводили в реакции с гидрохлоридом доксорубина по методике карбодимидного синтеза. Выделение продуктов осуществили вначале методом колоночной хроматографии в системе CH₂Cl₂:MeOH, а затем методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O–MeCN). В результате были получены производные доксорубина (**42**), (**43**), (**44**).

2.4. Синтез производных паклитаксела

Производные паклитаксела (**46**), (**47**), (**48**) и (**50**), (**51**), (**52**) синтезировали согласно схемам приведенным ниже.

Молекулу паклитаксела (PTX) модифицировали по гидроксильным группам в C2' и C7 положениях, наиболее удобным для введения различных заместителей. Следует отметить, что для PTX наиболее реакционноспособной является гидроксильная группа при углероде C2' в боковой цепи, меньшей реакционной способностью обладает гидроксильная группа при атоме C7. Это дает возможность селективно проводить модификацию группы HO-C2', не затрагивая C7 положение, или же модифицировать C2' и C7 положения одновременно. Первоначальное ацилирование PTX гекс-5-иновой кислотой проводили в CH₂Cl₂ в присутствии EDC и DMAP.

Для получения моновалентных конъюгатов паклитаксела в реакцию вводили 1 экв. кислоты, в случае дивалентных конъюгатов - 2 экв. Следующей стадией синтеза было конъюгирование соединений (45) и (49) с соединениями (10), (11), (13) по реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения по оптимизированной методике, с получением ранее не описанных в литературе производных (46), (47), (48) и (50), (51), (52).



2.5. Биологические исследования конъюгатов терапевтических агентов с лигандами ASGP-R

На заключительном этапе нами была исследована цитотоксичность полученных конъюгатов на культуре клеток ГЦК человека НерG2⁸. в стандартном MTS тест.

⁸ Данная часть работы выполнена совместно с н.с., к.м.н., Салтыковой И.В. (межкафедральная лаборатория тканеспецифичных лигандов химического факультета МГУ).

2.5.1. Исследование цитотоксичности конъюгатов метотрексата

Цитотоксичность производных метотрексата определяли на клеточной линии HepG2. Экспериментальное значение CC_{50} для свободного метотрексата [⁹] составляет 9.3 ± 16.0 мкМ. В нашем исследовании для метотрексата получены аналогичные значения; для полученных конъюгатов (36), (37), (38) значения CC_{50} не были достигнуты. Для соединений (36), (37), (38) диапазон выживаемости клеток составил от 100% до 60% при разных концентрациях конъюгатов.

2.5.2. Исследование цитотоксичности конъюгатов доксорубина

На первом этапе нами была оценена цитотоксичность свободного доксорубина на клеточных линиях HepG2 и A549; полученные значения CC_{50} составили соответственно $0,4 \pm 0,1$ мкМ и $1,54 \pm 0,14$ мкМ. Известно, что конъюгаты терапевтических агентов со средствами адресной доставки, особенно в случае использования нерасщепляемых линкеров менее цитотоксичны, чем свободные лекарственные препараты. Нами была исследована цитотоксичность конъюгатов (42), (43), (44) на клеточной линии HepG2. Следует отметить, что во всех случаях не достигается значение CC_{50} . Для большинства конъюгатов в максимальной применяемой дозе 100 мкМ достигается всего лишь 20-30% гибель клеток.

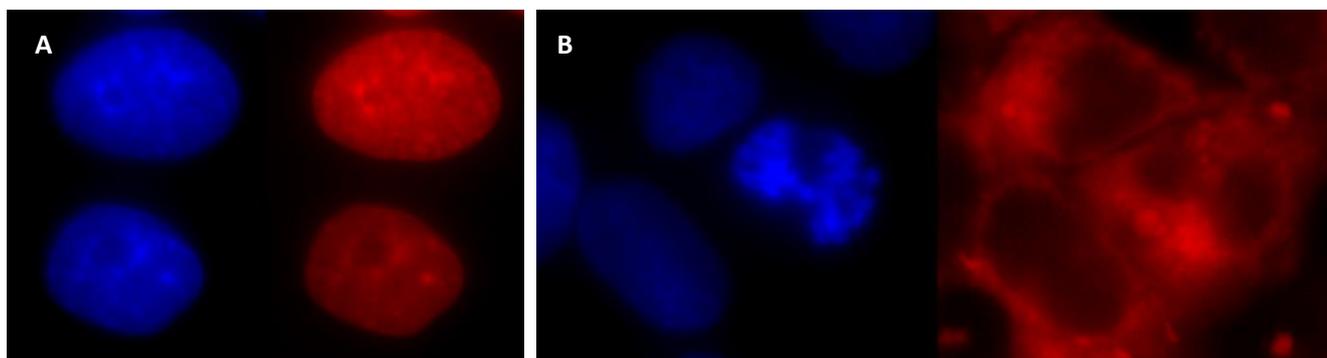


Рисунок 9. Микрофотографии распределения препаратов в клетке, сделанные с использованием флуоресцентной микроскопии. доксорубина – А (синим подсвечено ядро при помощи 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI), красным показано распределение доксорубина) и характеристического распределения конъюгата (42) – В (синим подсвечено ядро при помощи DAPI, красным показано распределение конъюгата (42)). Время инкубирования - 24 часа.

Для объяснения факта отсутствия существенной цитотоксичности конъюгатов мы провели исследования проникновения препаратов в клетку методом флуоресцентной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют о накоплении свободного

⁹ de Vries H. S. et al. Infliximab exerts no direct hepatotoxic effect on HepG2 cells in vitro // Dig. Dis. Sci. 2012. V. 57. №. 6. P. 1604-1608.

доксорубицина в клеточном ядре, что обуславливает цитотоксическое действие препарата. В случае же конъюгатов доксорубицина наблюдается их накопление в цитоплазме, что косвенно объясняет отсутствие цитотоксичности конъюгатов (Рис. 9). Для этих результатов можно предложить два возможных объяснения: либо амидная связь не является достаточно лабильной в эндосомальных условиях (что более вероятно), либо поглощение в клетку за счет малых размеров и липофильности конъюгатов не идет путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

2.5.3. Исследование цитотоксичности конъюгатов паклитаксела

В данной работе были синтезированы две серии конъюгатов паклитаксела (РТХ): моновалентные, модифицированные по С2' положению (46), (47), (48) и двухвалентные, модифицированные по С2' и С7 положениям (50), (51), (52), результаты исследования которых цитотоксичность на клеточной линии HepG2 представлены в таблице 2. Экспериментальные данные цитотоксичности самого паклитаксела на клеточной линии HepG2 представлены в работе Луо и соавторов^[10], а так же получены в настоящей работе

Таблица 2. Значения CC_{50} (мкМ) для конъюгатов паклитаксела.

№	(46)	(47)	(48)	(50)	(51)	(52)	РТХ	РТХ
CC_{50} HepG2	3.25±0.10	0.82±0.27	0.092±0.016	NA	NA	22.9±0.1	0,12±0,01	0,21 ± 0,03

*NA – не достигнуты значения CC_{50} .

Следует отметить, что в случае моно- и двухвалентных конъюгатов цитотоксичность соединений, содержащих триазольный цикл при С1 фрагмента N-ацетилгалактозамина, оказалась выше ((48) и (52) соответственно). Полученные данные, в особенности, для конъюгатов (46), (47), (48), показывают, что указанные соединения имеют сравнимые значения CC_{50} с препаратом - паклитакселом.

Таким образом, хотя полученные конъюгаты противоопухолевых препаратов с лигандами ASGP-R не проявили высокой цитотоксической активности (за исключением моновалентных конъюгатов паклитаксела), было установлено, что они проникают в опухолевую клетку, но, по-видимому, недостаточно быстро высвобождаются внутри нее. Ожидается, что этот эффект приведет к снижению общей системной токсичности при эффективном противоопухолевом действии (с условием дальнейшей модификации связи «лекарственный препарат-линкер») в последующих тестах *in vitro* и *in vivo*.

¹⁰. Luo D. et al. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line // Biochem. Cell Biol. 2000. V. 78. №. 2. P. 119-126.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и впервые синтезированы новые структурные типы низкомолекулярных лигандов асиалоггликопротеинового рецептора на основе производных N-ацетилгалактозамина триантеннарного строения для доставки лекарственных средств в клетки печени.
2. Для полученных лигандов методом поверхностного плазмонного резонанса впервые изучены закономерности связывания с асиалоггликопротеиновым рецептором. Измеренные значения констант диссоциации комплекса «лиганд-рецептор» составили 0.76 нМ и 1.16 нМ, что на пять порядков ниже значения константы диссоциации для нативного лиганда - N-ацетилгалактозамина. Показано, что последующее введение линкера не приводит к существенным изменениям аффинности триантеннарных лигандов к рецептору, что позволяет рассчитывать на близкие значения аффинности к ASGP-R низкомолекулярных систем адресной доставки терапевтических агентов с данными лигандами.
3. Предложена новая стратегия использования лекарственных средств как точки ветвления для лигандов асиалоггликопротеинового рецептора. В соответствии с данной стратегией разработаны и впервые получены лиганды ASGP-R и системы адресной доставки на их основе, представляющие собой низкомолекулярные конъюгаты с ковалентной связью «лиганд ASGP-R - терапевтический агент».
4. Для полученных низкомолекулярных конъюгатов терапевтических агентов с лигандами ASGP-R проведены биологические исследования *in vitro* на клетках гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), включающие тесты на цитотоксичность и внутриклеточное накопление. Исследованные конъюгаты не проявили высокой цитотоксичности, за исключением некоторых производных паклитаксела, однако было показано их существенное накопление во внутриклеточном пространстве, что может свидетельствовать либо о недостаточно лабильной связи «терапевтический агент-лиганд ASGP-R», либо о механизме проникновения полученных конъюгатов в клетку, не связанном с рецептор-опосредованным эндоцитозом.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. **Petrov R.A.** et al. Synthesis and biological evaluation of novel mono-and bivalent ASGP-R-targeted drug-conjugates/ **Petrov R.A.**, Maklakova S.Yu., Ivanenkov Ya.A., Petrov S.A., Sergeeva O.V., Yamansarov E.Yu, Saltykova I.V., Kireev I.I., Alieva I.B., Deyneka E.V., Sofronova A.A., Aladinskaia A.V., Trofimenko A.V., Yamidanov R.S., Kovalev S.V., Kotelianski V.E., Zatsepin T. S., Beloglazkina E. K., Majouga A.G.//Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2018. – V. 28. – №. 3. – P. 382-387. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.032 (Impact Factor: 2.442)

2. Ivanenkov Y. A. et al. Synthesis and biological evaluation of novel doxorubicin-containing ASGP-R-targeted drug-conjugates/ Ivanenkov Ya.A., Majouga A.G., **Petrov R.A.**, Petrov S.A., Kovalev S.V., Maklakova S.Yu., Yamansarov E.Yu., Saltykova I.V., Deyneka E.V., Filkov G.I., Kotelianski V.E., Zatsepin T.S., Beloglazkina E. K. //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2018. – V. 28. – №. 3. – P. 503-508. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.004 (Impact Factor: 2.442)

3. Маклакова С. Ю. и др. Новый подход к синтезу лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленной доставки олигонуклеотидов в гепатоциты / Маклакова С.Ю., Кучеров Ф.А., **Петров Р.А.**, Гопко В.В., Шипулин Г.А., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. //Известия Академии наук. Серия химическая. - 2015. - №. 7. - С. 1655-1655. doi: 10.1007/s11172-015-1056-6 (Impact Factor: 0.809)

4. **Petrov R.A.** New means of targeted drug delivery of antitumor drugs for HCC therapy based on N-acethylgalactosamine derivatives / **Petrov R.A.**, Maklakova S.Yu., Yamansarov E.Yu., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. // 29th International Carbohydrate Symposium. - Лиссабон, Португалия, 14-19 июля 2018. – С.597

5. **Петров Р.А.** Синтез и исследование биологической активности новых средств адресной доставки противоопухолевых препаратов для терапии ГЦК / **Петров Р.А.**, Кисляков И.В., Ондар Е.Э., Салтыкова И.В., Ямансаров Э.Ю., Белоглазкина Е.К., Мажуга А.Г.// Тезисы докладов Молодёжной научной школы-конференции "Актуальные проблемы органической химии". - Шерегеш, Кемеровская обл, Россия, 9-16 марта 2018. – С.153

6. **Petrov R.A.** Novel conjugates of doxorubicin with ASGP-receptor ligands for targeted delivery/ **Petrov R.A.**, Petrov S.A., Ondar E.E., Maklakova S.Yu, Saltykova I.V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Koteliansky V.E. // 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry - Дубровник, Хорватия, 25-28 июня 2017.- С.197

7. **Petrov R.A.** Design and synthesis of ASGP-receptors ligands based on N-acetyl-galactose / **Petrov R.A.**, Majouga A.G., Beloglazkina E.K., Kislyakov I.V. // XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry. - Мец, Франция, 7-11 июня 2015. – С. 94

8. **Петров Р.А.** Дизайн и синтез лигандов ASGP-рецептора на основе производных N-ацетилгалактозы/ **Петров Р.А.**, Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Котелянский В.Э., Зык Н.В. // Тезисы докладов международного конгресса "Kost-2015" - Москва, Россия, 18-23 октября 2015. – С.495.

9. **Петров Р.А.** Новые системы адресной доставки противоопухолевых агентов для терапии ГЦК: синтез и исследование биологической активности / **Петров Р.А.**, Кисляков И.В., Ондар Е.Э., Салтыкова И.В., Ямансаров Э.Ю., Белоглазкина Е.К., Мажуга Е.К. // Тезисы докладов международной конференции «Зимняя школа по органической химии-2018». - Красновиново, Московская область, Россия, 19-23 января 2018.

10. **Петров Р.А.** Новые конъюгаты ASGP-рецептора на основе производных N-ацетилгалактозы для доставки лекарственных средств в клетки печени / **Петров Р.А.**, Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Петров С.А., Кисляков И.В., Ондар Е.Э., Зык Н.В. // Тезисы докладов международной конференции «Зимняя школа по органической химии-2017». - Красновидово, Московская область, Россия, 13-18 января 2017.

11. **Петров Р.А.** Дизайн и синтез лигандов ASGP -рецептора на основе производных N-ацетил-галактозы / **Петров Р.А.**, Мажуга А. Г., Белоглазкина Е. К. // Тезисы докладов XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Москва, 17-18 марта 2016— С. 86.

12. **Петров Р.А.** Новые конъюгаты лигандов ASGP-рецептора с противоопухолевыми препаратами: синтез и биологические исследования / **Петров Р.А.**, Петров С.А., Ямансаров Э.Ю.// Тезисы докладов XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». — Москва, 16-17 марта 2017.— С. 62.

13. Ямансаров Э.Ю. Синтез новых гликоконъюгатов бетулина и N-ацетилгалактозамина. / **Петров Р.А.**, Метелкина О.Н., Белоглазкина Е.К., Мажуга А.Г., Ямансаров Э.Ю. // Тезисы докладов 3-ей Российской конференции по медицинской химии. - Казань, Россия, 28 сентября - 3 ноября 2017. – С.172

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю проф. д.х.н. Белоглазкиной Е.К., а также проф. д.х.н. Мажуге А.Г., проф. д.х.н. Зыку Н.В., к.м.н. Салтыковой И.В., к.х.н. Ковалеву С.В., к.х.н. Ямансарову Э.Ю., Маклаковой С.Ю., Лопухову А.В., Петрову С.А., Кислякову И.В. и Ондар Е.Э. за помощь в работе и обсуждении результатов. Автор благодарит сотрудников лаборатории физико-химических методов анализа строения вещества д.х.н. Гришину Ю.К., к.х.н. Торочешникова В.Н. за помощь в получении и интерпретации данных ЯМР-спектроскопии.