

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический Факультет



Кафедра органической химии
Лаборатория биологически активных органических соединений

Петров Ростислав Александрович

**Дизайн и синтез конъюгатов лигандов асиалоггликопротеинового рецептора с
противоопухолевыми препаратами для направленной доставки в клетки печени**

02.00.03 – Органическая химия
диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
профессор, д.х.н. Белоглазкина Е.К.

Москва 2018

Оглавление

1. Введение.....	3
2. Литературный обзор.....	5
2.1. Адресная доставка.....	5
2.2. Низкомолекулярные системы адресной доставки лекарственных средств: основные элементы.....	6
2.2.1. Терапевтический агент.....	6
2.2.2. Линкер.....	11
2.2.3. Лиганд.....	19
2.3. Адресная доставка лекарственных средств в клетки печени.....	19
2.3.1. Асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R).....	21
2.3.2. Лиганды ASGP-R.....	23
2.3.3. Примеры адресной доставки лекарственных средств в клетки печени.....	39
3. Обсуждение результатов.....	42
3.1. Выбор фрагмента, отвечающего за связывание.....	43
3.2. Выбор терапевтических агентов.....	45
3.3. Синтез производных N-ацетилгалактозамина.....	46
3.4. Синтез фрагментов, отвечающих за связывание.....	50
3.5. Синтез модельных триантеннарных лигандов ASGP-R.....	52
3.6. Синтез целевых триантеннарных лигандов ASGP-R.....	56
3.7. Синтез упрощенных конъюгатов моно- и дивалентных лигандов ASGP-R с лекарственным средством в качестве точки ветвления.....	58
3.7.1. Синтез производных рибавирина.....	58
3.7.2. Синтез производных метотрексата.....	62
3.7.3. Синтез производных доксорубицина.....	65
3.7.4. Синтез производных паклитаксела.....	66
3.8. Биологические исследования конъюгатов терапевтических агентов с лигандами ASGP-R.....	68
3.8.1. Исследование цитотоксичности конъюгатов рибавирина.....	69
3.8.2. Исследование цитотоксичности конъюгатов метотрексата.....	69
3.8.3. Исследование цитотоксичности конъюгатов доксорубицина.....	69
3.8.4. Исследование цитотоксичности конъюгатов паклитаксела.....	72
4. Экспериментальная часть.....	74
4.1. Общие сведения.....	74
4.2. Выделение исходных соединений.....	75
4.3. Синтез промежуточных и конечных соединений.....	76
5. Выводы.....	114
6. Список литературных источников.....	115

1. Введение

Онкологические заболевания являются второй по распространенности причиной смертности во всем мире — так, в 2015 году зарегистрировано 8.8 миллиона случаев смерти, связанных с раком. Таким образом, раком вызвана почти каждая шестая смерть, причем число смертей от разных типов онкологических заболеваний следующее [1]:

- рак легких (1.69 млн случаев смерти);
- рак печени (788 000 случаев смерти);
- рак толстой и прямой кишки (774 000 случаев смерти);
- рак желудка (754 000 случаев смерти);
- рак молочной железы (571 000 случаев смерти)

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, таких как вирусы гепатита С, цирроз печени и употребление гепатоканцерогенов [1].

Современные методы химиотерапии гепатоцеллюлярной карциномы несовершенны и обладают серьезными недостатками, такими как общая токсичность, неселективность и недостаточная эффективность. Адресная доставка лекарственных средств в пораженные ткани призвана исправить существующие недостатки и повысить эффективность терапии. 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 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 [3,4]. Главными преимуществами процесса рецептор-опосредованного эндоцитоза являются возможность освобождения от молекулы-доставщика при помощи ферментативного или

кислотного гидролиза внутри эндосомы, а также возвращение способности рецептора к связыванию новой молекулы на поверхность клетки в течение часа [5,6]. В совокупности все это делает ASGP-R перспективнейшей мишенью для адресной терапии заболеваний печени, особенно гепатоцеллюлярной карциномы и вирусного гепатита С. В целом, среди исследований адресной доставки лекарственных препаратов к печени стратегия создания специфичных к ASGP-рецептору веществ играет ведущую роль.

В литературе описаны примеры наноразмерных систем, использующих ASGP-R в качестве мишени для направленного транспорта противоопухолевых препаратов (наночастицы, липосомы и мицеллы), в то время как низкомолекулярные ковалентные конъюгаты с лигандами-векторами практически не представлены. В настоящее время фармацевтические компании активно ведут разработки низкомолекулярных гликоконъюгатов олигонуклеотидов и моносахаридов в области генной терапии заболеваний печени, которые находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Целью настоящей работы явился синтез систем адресной доставки, представляющих собой конъюгаты лекарственных препаратов с новыми лигандами асиалогликопротеинового рецептора на основе замещенных N-ацетилгалактозаминов.

2. Литературный обзор «Средства адресной доставки лекарственных препаратов в клетки печени»

2.1. Адресная доставка.

Доставка лекарственных средств, иначе адресная доставка лекарственных веществ (англ. targeted drug delivery, drug targeting) — направленный транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, органа или клетки. Преимуществами такого подхода является уменьшение побочных эффектов и вводимой дозы для улучшения качества терапии заболеваний.

Контролируемые системы доставки лекарственных препаратов успешно развивались в течение последних 60 лет [7]. На сегодняшний день в клинической практике используются сотни препаратов с контролируемым высвобождением [8]. Успехи в этой области были ограничены рядом факторов, и поэтому на данный момент существует всего несколько типов препаратов адресной доставки, в частности, оральные и трансдермальные системы. Существует много систем доставки, в том числе доставка плохо растворимых лекарственных форм, белковых систем, саморегулируемые устройства доставки инсулина и целевые системы доставки лекарственных средств. Из них, в последнее время, особое внимание получили средства направленной доставки к опухолевым тканям. Появление нанотехнологий привело к разработке многочисленных средств доставки на основе наночастиц. Термин "наночастицы" включает в себя лекарственные полимерные конъюгаты, лекарственные белковые конъюгаты, липосомы, полимерные мицеллы, дендримеры и нанокристаллы препаратов, большая часть которых известна с 1960-х годов[9]. Конечной целью адресной доставки лекарств является локализация большей части вводимого лекарства в мишени, в то время, как накопление препарата в любых тканях, не являющихся мишенями, сводится к минимуму; в связи с этим наблюдаются минимальные побочные эффекты, связанных с применением препаратов [10]. Первое десятилетие 2000-х годов было посвящено разработке различных наночастиц для адресной доставки лекарств к опухолям, и результаты, в целом, внушают оптимизм. Однако подобные высокомолекулярные системы доставки имеют ограниченную применимость за счет некоторых своих недостатков: затрудненной проницаемости мембран клеток и стенок сосудов, иммунного ответа, неустойчивости в плазме крови, проблем с растворимостью, высокой цены и сложности получения [11,12,13,14,15,16].

2.2. Низкомолекулярные системы адресной доставки лекарственных средств: основные элементы.

Другое направление развития адресной доставки – это низкомолекулярные средства доставки. Низкомолекулярные средства адресной доставки обычно содержат три структурных фрагмента: собственно терапевтический агент, лиганд – фрагмент, обеспечивающий взаимодействие с мишенью, а также соединяющий два вышеуказанных фрагмента линкер. К каждому из элементов существует ряд требований. Применение низкомолекулярных средств адресной доставки терапевтических агентов позволяет решить проблемы, характерные для высокомолекулярных систем (устойчивость в физиологических условиях, иммунный ответ, недостаточная проницаемость через стенки сосудов и клеточную мембрану). В последующих разделах рассмотрены их составные элементы.

2.2.1. Терапевтический агент.

Для образования связи терапевтического агента с линкером принято использовать два основных подхода: непосредственно ковалентное связывание между ними или координационное связывание терапевтических агентов в клатраты и комплексы с молекулой-доставщиком.

Для создания ковалентной связи между лекарственным агентом и линкером используют достаточно ограниченный набор функциональных групп: сложноэфирную, амидную, гидразоновую, ацетальную и дисульфидную [16]. Выбор этой функциональной группы зависит от строения терапевтического агента.

Можно выделить лекарственные препараты, которые содержат пространственно доступные гидроксильные или карбоксильные группы, способные образовывать сложноэфирные связи, например, метотрексат, гемцитабин и паклитаксел (Рис. 1) [16].

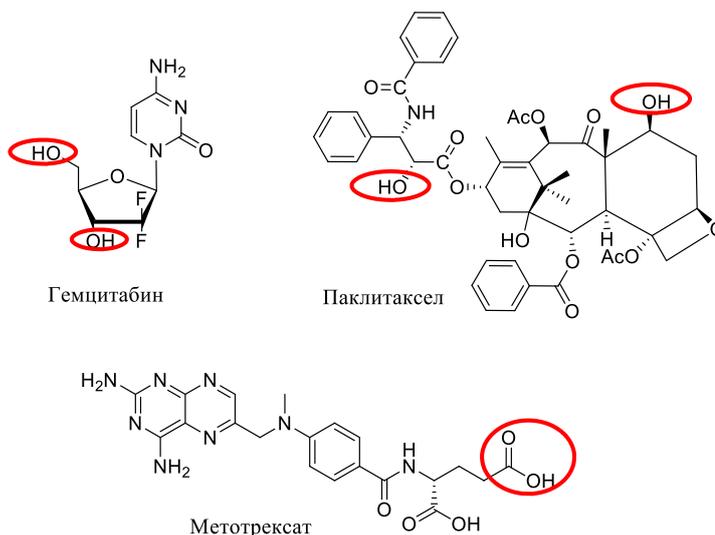


Рисунок 1. Примеры антинеопластических терапевтических агентов, содержащих гидроксильные или карбоксильные группы, способные образовывать сложноэфирную связь.

Для создания сложноэфирной связи принято использовать два основных, наиболее эффективных метода: карбодиимидный синтез и реакции с хлорангидами.

Присутствие свободных карбоксильных и аминогрупп в молекуле терапевтического агента дает возможность образования амидной связи с линкером. По этому признаку среди известных широко используемых противоопухолевых препаратов можно выделить гемцитабин, метотрексат, доксорубин, минтомицин [16] (Рисунок 2):

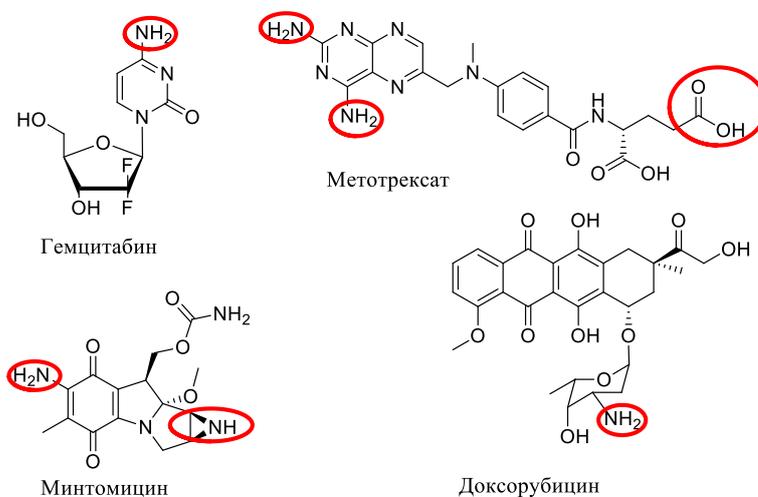


Рисунок 2. Примеры антинеопластических терапевтических агентов, содержащих амино- и/или карбоксильные группы, способные образовывать амидную связь.

Образование амидной связи чаще всего проводят при помощи метода карбодимидного синтеза или метода активированных эфиров.

Терапевтические агенты, содержащие свободную карбонильную группу, могут вступать в реакцию с различными производными гидразина с получением гидразонов [17]. Примером такого соединения является доксорубин (Рисунок 3):

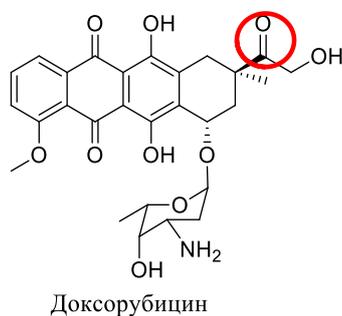


Рисунок 3. Карбонильная группа доксорубина, способная образовывать гидразонную связь.

Реакция между карбонильной группой и производным гидразина протекает без дополнительной активации реагентов. [17] (Рис. 4).

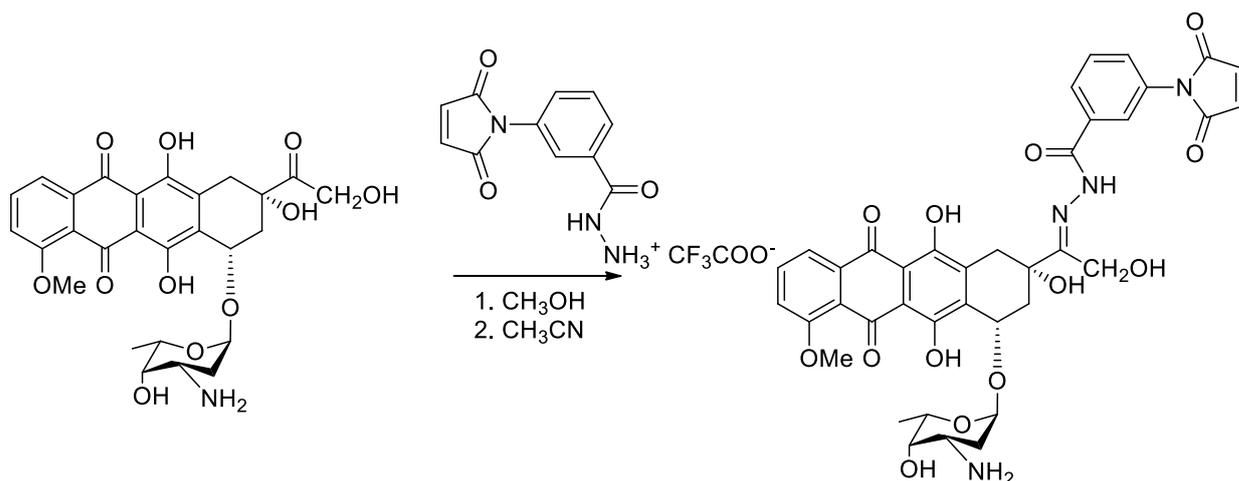


Рисунок 4. Образование гидразонной связи [17].

Перспективным направлением конъюгации лекарственных агентов может являться образование ацеталей или кеталей для соединений, содержащих карбонильные или гидроксильные группы (Рис.5) [18].

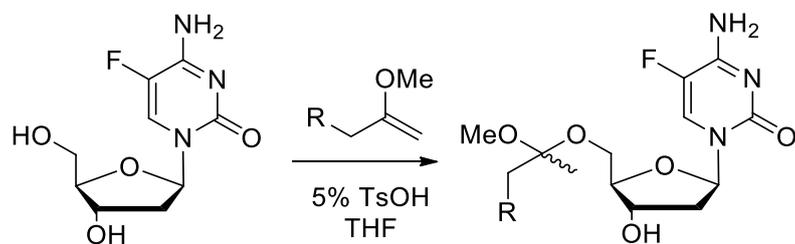


Рисунок 5. Получение ацеталей, описанное в работе [18].

Основным преимуществом представленных ковалентных связей лекарственного агента с линкером является устойчивость в физиологических условиях и способность разрушаться внутриклеточно.

Для нековалентного связывания терапевтического агента с молекулой-доставщиком чаще всего используют образование клатратов, таким образом, формируя систему «хозяин (доставщик) – гость (терапевтический агент)».

Хотя строение «хозяина» может быть различным, наиболее часто используются циклические структуры. Так, примером циклических «хозяев» можно считать циклодекстрины, схематичное изображение которых представлено на Рис.6 [19].

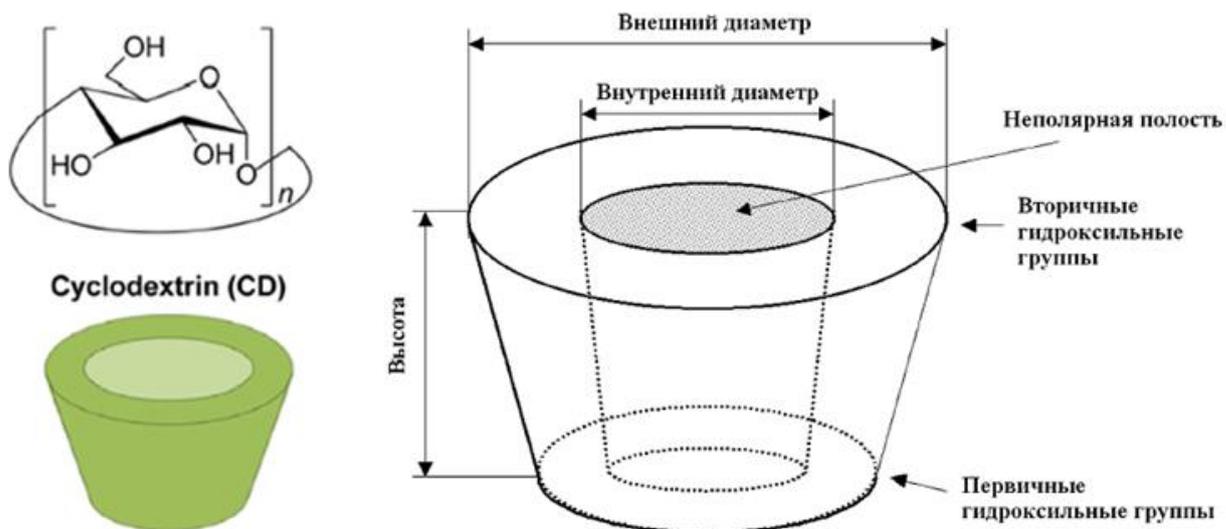


Рисунок 6. Циклодекстрины

Механизм высвобождения и доставки молекул лекарственных средств имеет равновесный характер и описывается следующей схемой (Рисунок 7) [20]:

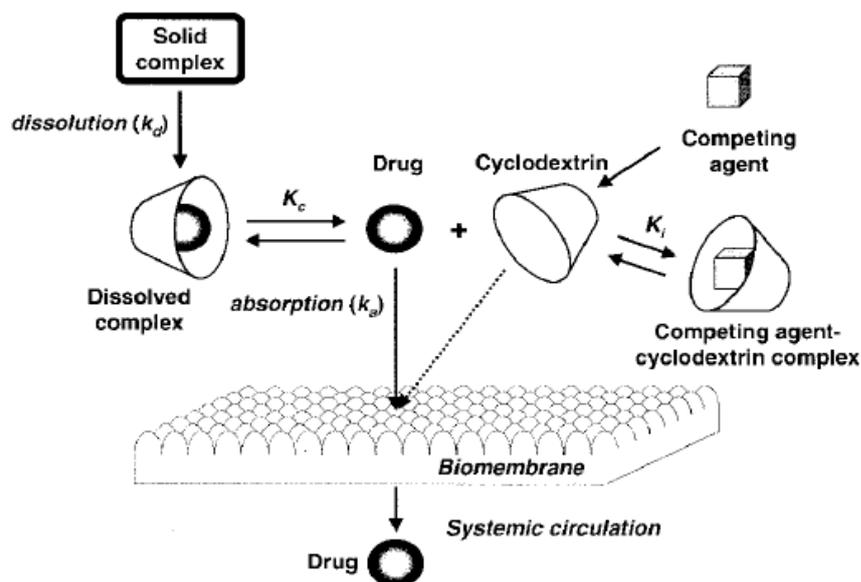


Рисунок 7. Процессы, происходящие в системе «гость-хозяин».

Наиболее важной стадией этого процесса является равновесие между комплексом и свободным лекарственным препаратом. Поскольку только свободный терапевтический агент может проникнуть сквозь биологическую мембрану, важно, чтобы диссоциация комплекса проходила около целевых клеток организма. Для достижения этого проводят модификацию циклодекстринов для изменения времени удерживания препарата, смещения равновесия, чувствительности к разным средам в разных тканях [21].

Таким образом, основным требованием, предъявляемым к лекарственной молекуле при построении системы адресной доставки, является наличие функциональной группы, обеспечивающей возможность связывания с линкером. Образующаяся связь должна быть устойчива в ходе доставки молекулы к целевым тканям организма, но лабильна в около- или внутриклеточном пространстве.

2.2.2 Линкер

Линкер как структурный фрагмент необходим для пространственного разделения лекарственного препарата и адресного фрагмента, поскольку при их непосредственной связи возможно взаимное влияние этих структурных фрагментов друг на друга, которое выражается в снижении эффективности действия лекарственного препарата, конформационных изменениях и снижении стерической доступности адресного фрагмента. Для устранения этого взаимного влияния, а также облегчения высвобождения лекарственного препарата, в целевую молекулу вводят линкер [22].

Нередко как линкерные фрагменты используют производные гликолей или олигоамиды. Оптимальная длина и строение линкера может быть определена при анализе взаимодействия лиганда с молекулой-мишенью [23].

Можно увеличить функционал линкерного фрагмента, вводя в него различные дополнительные реакционноспособные группы. Так, например, можно ввести фрагмент, отвечающий за деструкцию линкера (рН-зависимый, ферментоактивируемый), или позволяющий увеличить нагрузку низкомолекулярной системы доставки дополнительной лекарственной молекулой или диагностическим агентом, с помощью которого можно отслеживать распределение терапевтического агента в организме. [23].

Диалкил- и диарилсиланы, ортоэфиры, ацетали, кетали, гидразоны, β -тиопропионаты, фосфоамиды, имины и виниловые эфиры обычно используют как фрагменты, отвечающие за деструкцию линкера [24].

Кислотность среды в различных тканях организма сильно отличается, помимо этого она не одинакова для здоровых и раковых клеток (значения рН ниже у последних) и даже для различных внутриклеточных органоидов. Подобные различия в кислотности можно использовать в дизайне рН-деградируемых линкеров (Рис.8) [25].

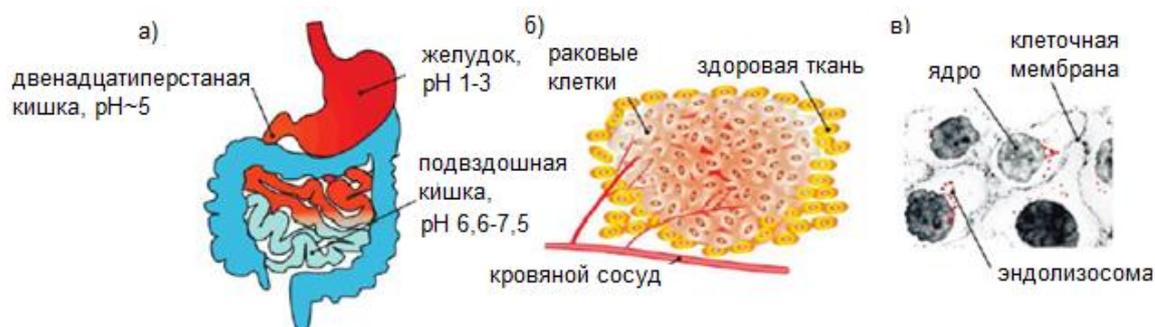
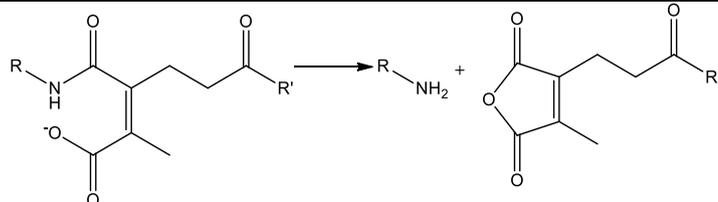
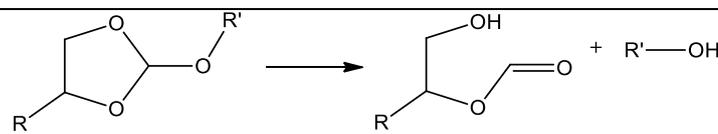


Рисунок 8. Различие в кислотности различных органов, тканей и клеточных органелл: а) рН в органах человеческого организма колеблется в широком диапазоне; б) опухолевые ткани обладают большей кислотностью, чем здоровые; в) рН в эндолизосомах ниже, нежели в цитоплазме.

Учитывая это, при дизайне средств адресной доставки нередко используют линкеры с рН-чувствительными фрагментами. Некоторые примеры таких групп представлены в таблице 1 [25]:

Таблица 1. Примеры рН-чувствительных фрагментов, используемых в линкерах [25].

Название	Структура
Сложный эфир	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}' \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH} + \text{HO}-\text{R}'$
Гидразон	$\text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{\text{R}'}{\text{C}}}=\text{N}-\text{NH}-\text{R}'' \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}' + \text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{R}''$
Производные карбоксималонового эфира	
Ортоэфиры	
Имины	$\text{R}-\text{N}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\text{R}' \longrightarrow \text{R}-\text{OH} + \text{O}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\text{R}'$
Виниловые эфиры	$\text{R}-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}'' \longrightarrow \text{R}-\text{OH} + \text{O}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\text{CH}=\text{R}''$
Фосфоамидаты	$\text{R}-\text{N}-\overset{\text{O}^-}{\parallel}{\text{P}}(\text{O})-\text{O}-\text{R}' \longrightarrow \text{R}-\text{OH} + \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{R}'-\text{OH}$

Гидразоновую связь часто включают в системы адресной доставки из-за ее высокой чувствительности к кислотности среды. В работе [26] описан конъюгат, полученный из олигопептида, содержащего гидразидный фрагмент, и молекулы доксорубина, устойчивый в нейтральной (рН=7.4) и слабокислой (рН=6.0) средах. Кинетика гидролиза полученного в работе конъюгата представлена на Рис. 10:

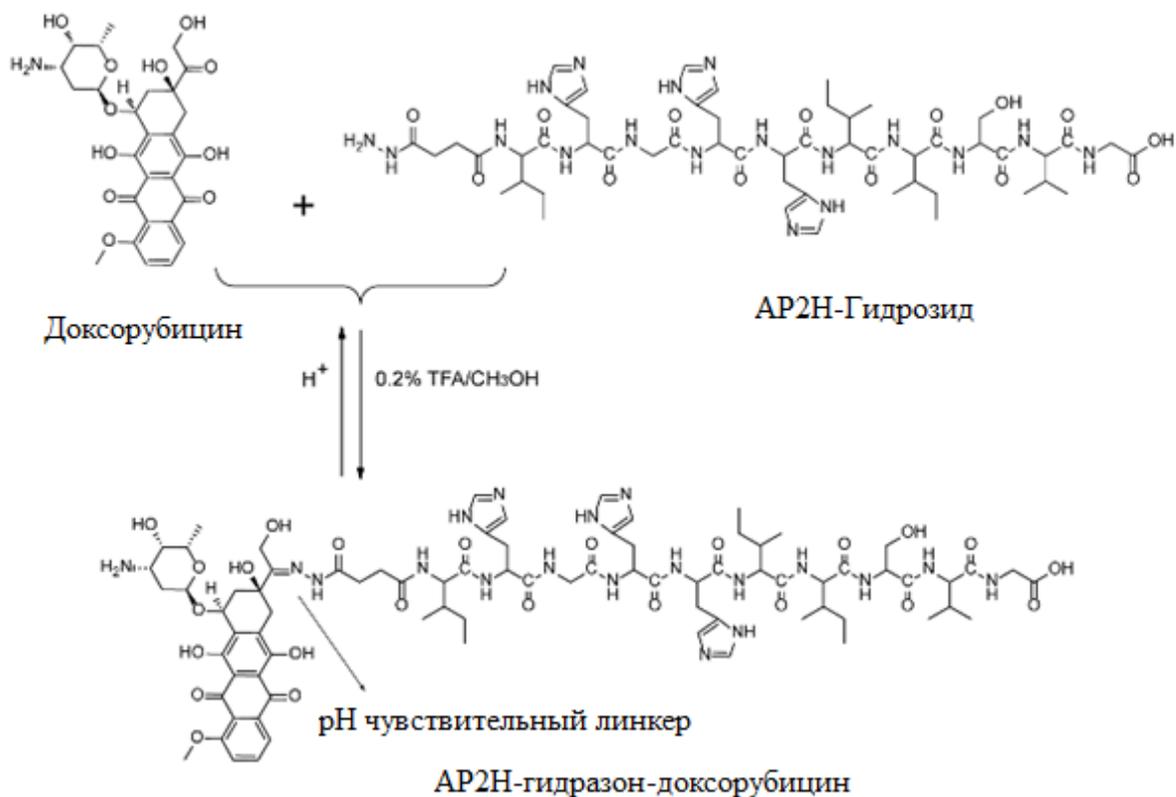


Рисунок 9. Получение pH-чувствительного конъюгата в работе [26]

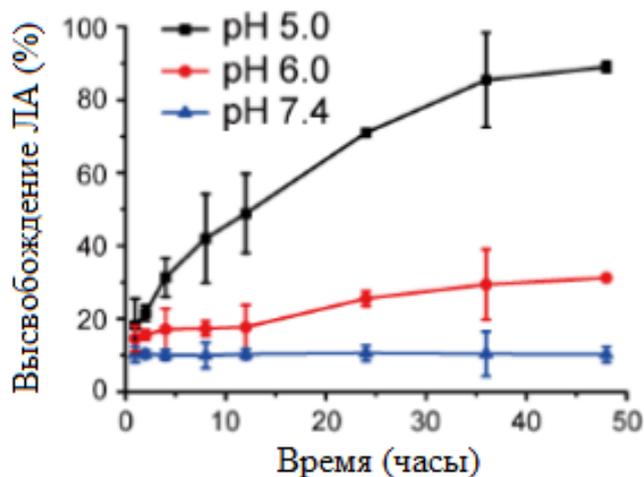


Рисунок 10. Кинетика гидролиза полученного конъюгата [26].

Исследования, описанные в работах [27] и [28], касались стабильности полимерных систем адресной доставки, включающих в структуру линкерного фрагмента один и два гидразидных фрагмента. На представленных графиках (Рис.11) показано, что появление в структуре второй pH-зависимой группы вызывает существенное увеличение степени

высвобождения терапевтического агента при pH=6.5. Однако помимо этого было замечено повышенное высвобождение препарата при условиях, характерных для плазмы крови (от 10% до 40%).

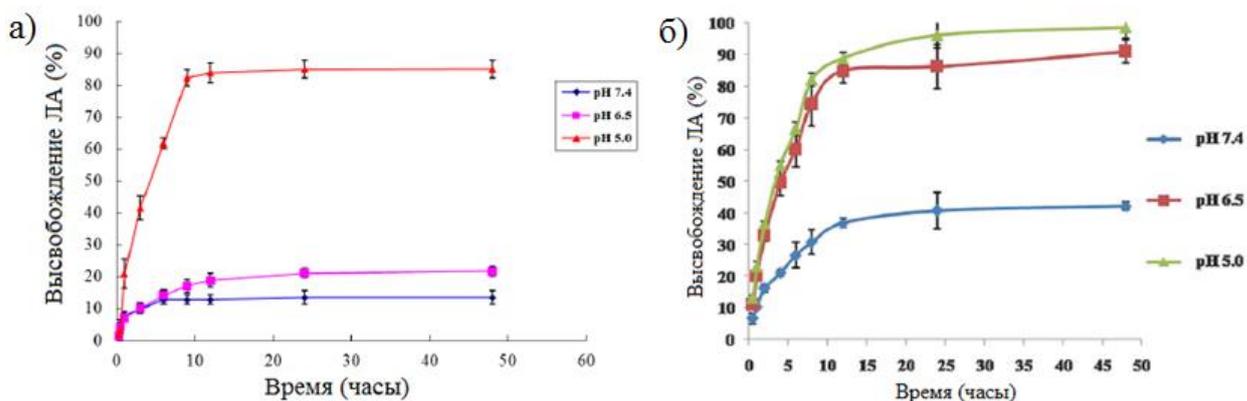


Рисунок 11. Кинетика гидролиза конъюгатов, описанных в работах а) [27] и б) [28].

В ранее рассмотренном нами исследовании [18] были изучены конъюгаты с ацетальной связью между лекарственным препаратом и линкером. Была показана лабильность ацетальной группы в кислых условиях (Рис.12).

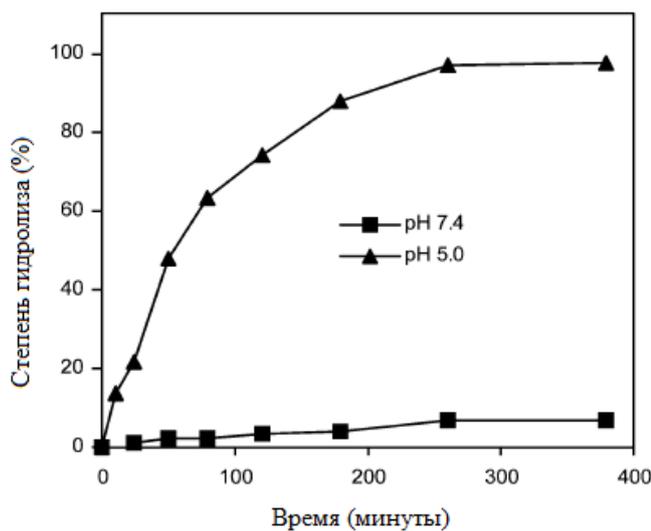


Рисунок 8. Кинетические кривые гидролиза ацетальных групп в конъюгатах в работе [18].

Внутриклеточные пептидазы селективно распознают и расщепляют небольшие олигопептидные участки. Следовательно, можно использовать данные фрагменты для создания расщепляемых ферментами линкеров, как это показано в работе [29] при создании средств адресной доставки доксорубина. Последовательности пептидов (Phe-

Lys и Val-Cit), взаимодействуя с пептидазой, запускают процесс разрыва амидной связи с промежуточным *para*-аминобензилоксикарбонильным фрагментом (Рисунок 9). Далее этот промежуточный фрагмент отделяется в ходе кислотного гидролиза, высвобождая молекулу доксорубина. Также было показано, что подобные конъюгаты демонстрируют высокую стабильность в плазме крови.

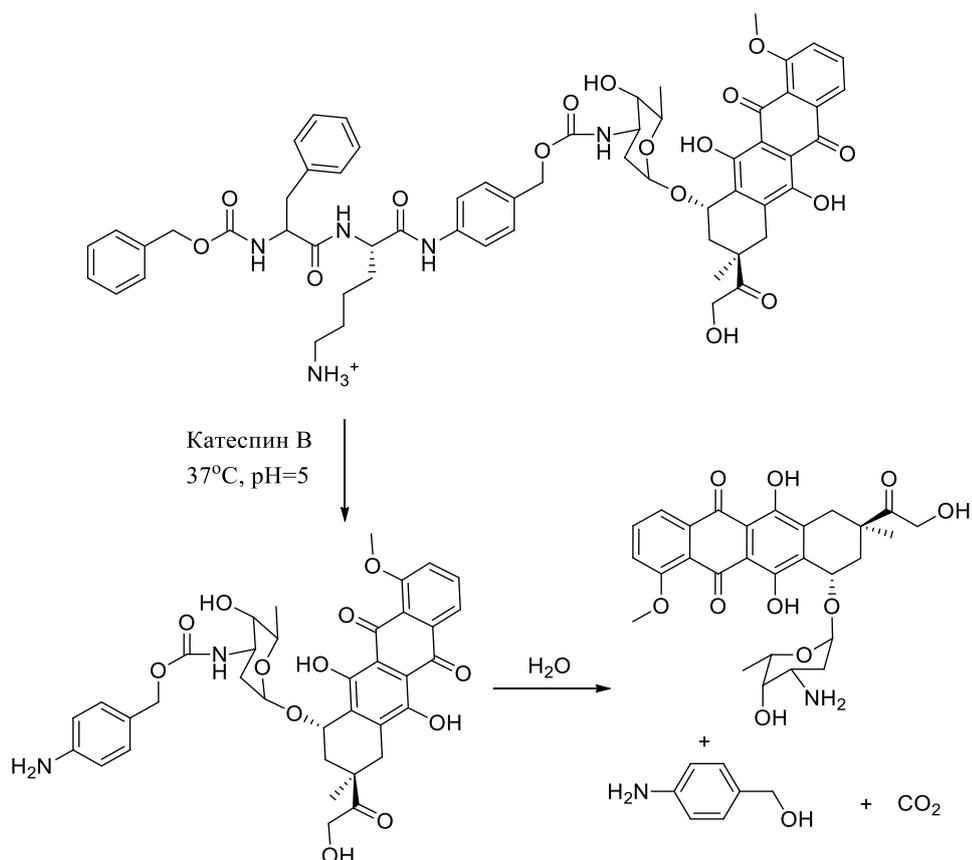
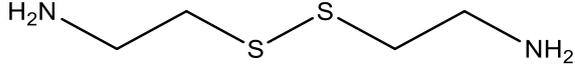
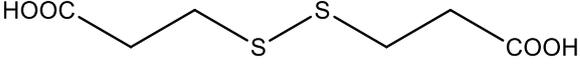
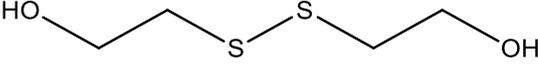
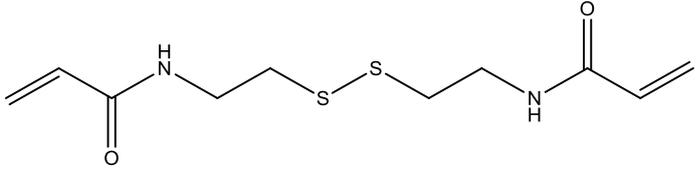
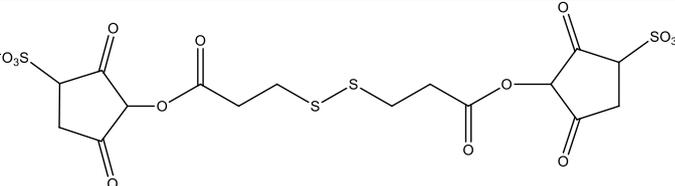
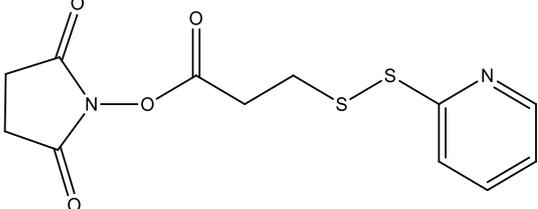


Рисунок 9. Селективный гидролиз дипептидного линкера под действием катепсина В [29].

Часто в качестве расщепляемого фрагмента в линкерах используют дисульфидную связь. Глутатион - трипептид γ -глутамилцистеинилглицин вызывает восстановительное разрушение S-S связей в организме. Данный белок преимущественно расположен в цитоплазме. Поэтому конъюгаты, содержащие в своей структуре линкеры с дисульфидными мостиками, получили широкое распространение в качестве средств для адресной доставки [30]. В обзоре [31] перечислены наиболее известные линкерные фрагменты, используемые для создания систем направленного транспорта (

Таблица 2).

Таблица 2. Распространенные структурные фрагменты, участвующие в образовании линкера с дисульфидной связью [31].

Название фрагмента	Химическая структура
Цистамин	
3,3'-дитиодипропионовая кислота	
2,2'-дитиоэтанол	
Цистеин бисакриламид	
3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидил пропионат)	
N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат	

Большое количество доступных производных позволяет использовать линкер с дисульфидной связью для широкого диапазона терапевтических агентов

Для полученного в работе [32] соединения, имеющего в своей структуре дисульфидную связь, были исследованы биологические свойства. Разрушение S-S связи вызывает появление в системе нуклеофила –SH, атакующего карбаматную группу с высвобождением лекарственного препарата. При этом также смещался максимум поглощения в электронном спектре для адресного фрагмента. По изменению спектра поглощения можно судить об успешности доставки полученного конъюгата.

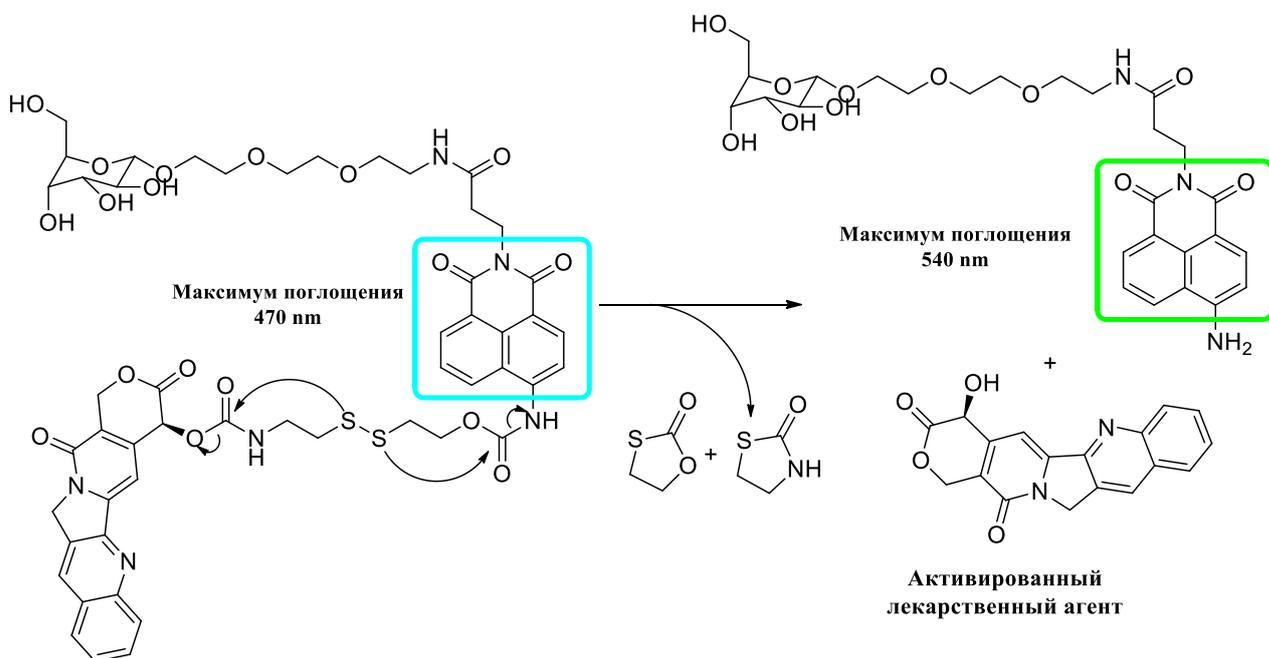


Рисунок 10. Механизм высвобождения терапевтического агента в работе [32]

Исследование [6] посвящено изучению устойчивости различных функциональных групп, используемых в линкерах. Авторы выбрали для изучения амидную, дисульфидную, сложноэфирную группы и короткие олигопептидные последовательности. Для разных функциональных групп приведены условия, в которых они подвергаются деструкции. Так, например, сложноэфирная группа разрушается под воздействием кислой среды и эстераз, дисульфидная связь чувствительна к действию восстановителей и глутатиона, а амидная – к протеазам.

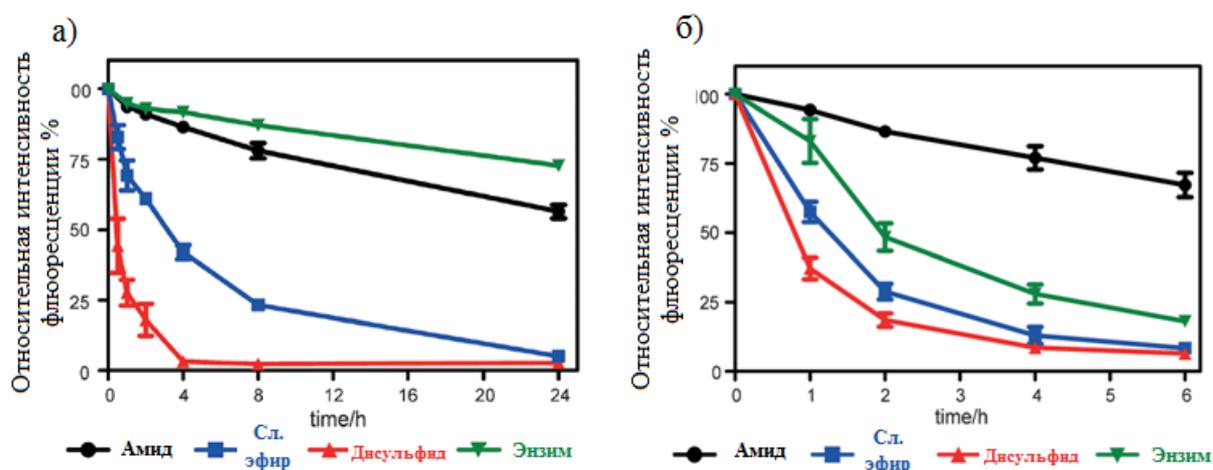


Рисунок 11. Изменение концентрации конъюгатов со временем а) в плазме крови б) в тестируемых клетках

Авторы отмечают, что дисульфидная и сложноэфирная связь легче всего разрушаются как внутри клетки, так и в плазме крови, поскольку они подвергаются действию эстераз и кислотному гидролизу в случае сложноэфирной связи и действию глутатиона и других восстановителей в случае дисульфида (Рис. 11).

В то же время олигопептиды стабильны в плазме крови, поскольку почти не подвергаются гидролизу. Однако внутриклеточные пептидазы легко разрушают данный тип линкера в цитоплазме.

Подводя итог раздела о линкерах, можно сказать, что на данный момент описаны различные варианты расщепляемых линкерных фрагментов, которые отвечают разнообразным требованиям по функциональности, синтезу, контролю эффективности доставки, устойчивости в физиологических условиях и лабильности в клеточном пространстве.

2.2.3. Лиганд

Адресным фрагментом могут служить соединения различных классов. На выбор фрагмента, отвечающего за направленный транспорт, влияет множество факторов, таких как целевой орган или ткань организма, структура мишени, способ доставки, тип проникновения через клеточную мембрану.

Исходя из задач данной диссертационной работы, нами будет уделено внимание лигандам, используемым для адресной доставки лекарственных средств в клетки гепатоцеллюлярной карциномы посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием асиалогликопротеинового рецептора.

2.3. Адресная доставка лекарственных средств в клетки печени

В качестве ключевых клеток при разработке систем адресной доставки в печень выделяют: гепатоциты, клетки гепатоцеллюлярной карциномы, клетки Купфера и клетки Ито [33,34].

Клетки Ито обладают следующим набором рецепторов:

- RBP – селективно поглощает витамин А, группу ретиноидов;
- Рецептор тромбоцитарного фактора роста, для него известны несколько семейств лигандов белкового происхождения;

- PAR 1/3/4 – рецептор селективно реагирующий на тромбин, один из белков отвечающих за свертываемость крови.

Как видно из данного списка основных рецепторов клеток Ито, адресная доставка в них может осуществляться, например, низкомолекулярными конъюгатами на основе витамина А.

Основными рецепторами для клеток Купфера являются:

- Фукоза-специфичный рецептор (фукоза)
- Галактоза-специфичный рецептор (галактоза и N-ацетилгалактоза)
- Манноза-специфичный рецептор (манноза)
- Fc-рецепторы и рецепторы иммуноглобулина (лиганды иммуноглобулин E и G)

Адресную доставку в клетки Купфера можно осуществить, используя конъюгаты, включающие в себя остатки моносахаридов в качестве лигандов.

Гепатоцеллюлярная карцинома представляет собой результат злокачественного перерождения гепатоцитов; в силу этого, здоровые и раковые клетки обладают очень близким набором рецепторов и соответствующими лигандами для адресной доставки.

В обоих типах клеток присутствуют:

- ASGP-рецептор, селективен к галактозе, N-ацетилгалактозамину, пуллуану, ксилоглюкану;
- GAR и GLR – рецепторы, селективно захватывающие глицериттиновую и глицирризиновую кислоты соответственно;
- GLP-1R – рецептор, направленный на захват глюкагоноподобного пептида-1, представляющего собой цепь из 30 остатков аминокислот;
- STR 2/3/5 рецептор захвата пептидного гормона соматостатина;
- FR – отвечает за захват фолиевой кислоты.

Для селективной доставки в здоровые клетки гепатоцитов можно выбрать в качестве мишени HDLR (high density lipoprotein receptor), селективно поглощающий липопротеины высокой плотности. Для доставки в клетки карциномы можно использовать антитела CA9/CAIX, вырабатываемые организмом для борьбы с раком. К сожалению, ни липопротеины, ни конъюгаты с антителами не удовлетворяют условиям по молекулярной массе низкомолекулярных средств адресной доставки [35].

При дифференцированных формах ГЦК гепатоцитами гиперэкспрессируется асиалогликопротеиновый рецептор, и к настоящему времени разработан ряд систем доставки лекарственных средств при помощи этого рецептора, основанных на производных лактозамина или галактозамина; данные системы рассмотрены в недавнем обзоре [8]. Помимо проблем, связанных с использованием высокомолекулярных средств доставки, главным недостатком этого подхода является отсутствие специфичности к раковым гепатоцитам в сравнении с нормальными гепатоцитами, так как оба типа клеток экспрессируют ASGP-рецепторы. Дедифференцировка опухолевых клеток приводит к потере экспрессии ASGP-рецептора и, следовательно, на поздних стадиях заболевания отсутствует специфичность для злокачественных клеток [36]. Отсутствие специфичности к ГЦК было четко продемонстрировано для пациентов, которым вводили радиоактивно-меченый сополимер, связанный с галактозамином; при этом основное количество конъюгата накапливалось в нормальной ткани печени, а не в опухолевой ткани [37].

Однако согласно данным исследований Колинза и коллег [38] уровень экспрессии ASGP-R в клетке зависит от количества биотина в среде, а также повышенной концентрации ионов кальция, что важно для проникновения конъюгатов с N-ацетилгалактозамином в экспериментах на клеточной линии Huh7, что может способствовать большей выработке ASGP-R в раковых клетках.

2.3.1. Асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R).

ASGP-R (асиалогликопротеиновый рецептор) был первым клеточным лектиновым поверхностным рецептором, обнаруженным у млекопитающих [39]. ASGP-R распознает десилилированные гликопротеины с D-галактозой (Gal) или N-ацетилгалактозамином (GalNAc) в качестве концевых групп (Рис. 16).

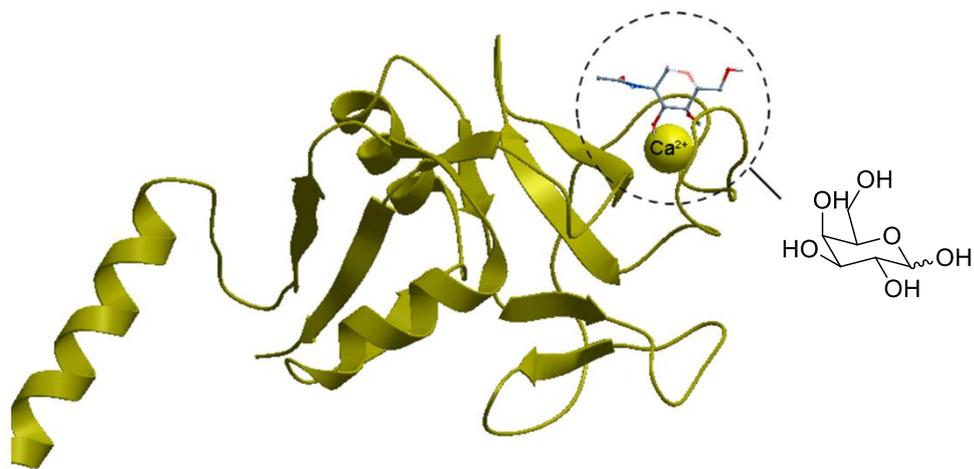


Рисунок 16. Активный сайт связывания ASGP-R

ASGP-R экспрессируется в базолатеральных гепатоцитах. Экспрессия ASGP-R также была обнаружена в других клетках, а именно в макрофагах крысы и человека, сперме человека, эпителиальных клетках кишечника человека и моноцитах периферической крови. Колоректальная карцинома, образующая метастазы в печени, также, как сообщается, экспрессирует ASGP-R [40]. Тем не менее, экспрессия ASGP-R в гепатоцитах намного превышает экспрессию в других клетках тела. Высокая экспрессия (500 000 ASGP-R на гепатоцит) и минимальная экспрессия в других клетках позволяют использовать ASGP-R для минимально токсичной целевой доставки лекарственных средств. Этанол, четыреххлористый углерод, липополисахариды и анти-Fas-антитела ухудшают экспрессию ASGP-R в гепатоцитах. Диабет и частичное удаление печени также являются причиной нарушения экспрессии ASGP-R.[41] *In vitro* ASGP-R экспрессируется в различных клеточных линиях. В клетках HepG2 (рак печени человека) обнаружена плотность гепатоцитов 76 000 рецепторов на клетку, в то время как HepAD38 экспрессирует 17 000 ASGPR на гепатоцит. HuH-7, HuH-6, тогда как и другие производные клеток ГЦК субклональных линий BNLCL2 и Huh-5-2 проявляют более низкую плотность ~ 3000 ASGP-R на гепатоцит[42].

В организме человека ASGP-R состоит из двух различных полипептидных субъединиц массой 46kDa и 50kDa, которые обладают высоким подобием на уровне аминокислотной последовательности. Каждая субъединица состоит из 4 доменов: N-концевого цитоплазматического домена, трансмембранного домена, внеклеточного домена и углевод-распознающего домена (УРД), содержащего Ca^{2+} . Ca^{2+} необходим для взаимодействия ASGP-R с лигандами. УРД в ASGP-R имеет три сайта связывания с Ca^{2+} , один из которых обладает низкой аффинностью (Рис. 17).[43] Длины координационных

связей между рецептором Ca^{2+} и лигандом, содержащим атом кислорода, составляют 2.8-3.0Å [44].

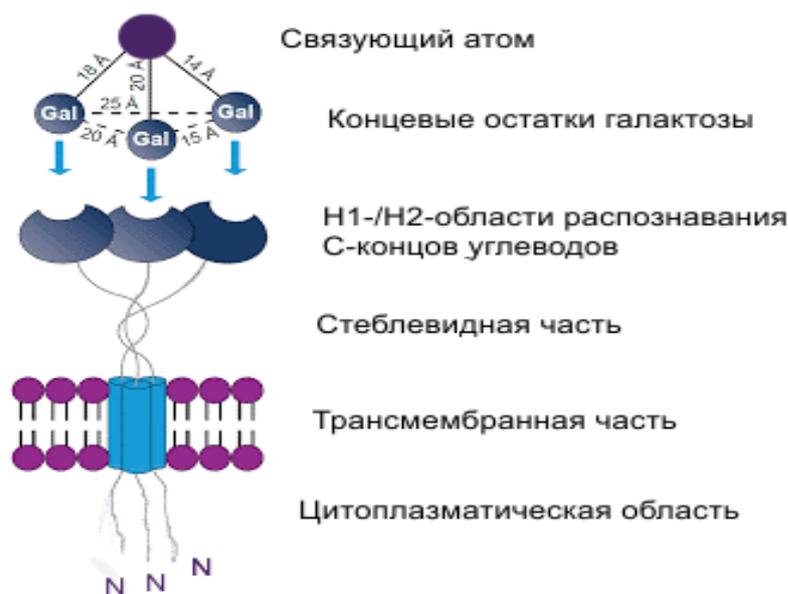


Рисунок 17. Структура ASGP-R и его тривалентного лиганда.

ASGP-R располагается в липидном бислое гепатоцита и запускает процесс поглощения клеткой лиганда с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза.

2.3.2. Лиганды ASGP-R

Первые работы по созданию лигандов ASGP-R были выполнены в 80-х годах 20-го века [45,46,47,48]. Изначально лиганды представляли из себя природные и синтетические олигосахариды. В работе Баенцигера [46] и др. было показано, что рецептор обладает специфичностью к терминальным остаткам галактозы (Gal) и N-ацетилгалактозамина (GalNAc), причем сродство к последнему примерно в 50 раз выше. Триантенарные лиганды проявляли более высокое сродство, чем их моно- и диантенарные аналоги. Кроме того, исследования привели к выводу, что для специфического распознавания необходимы только концевые остатки и что процесс связывания протекает через одновременное взаимодействие 2-3 сахарных остатков с 2-3 сайтами связывания гетероолигомерного рецептора.

Исследования Ли и др. на гепатоцитах кроликов [45,48] с использованием синтетических олигосахаридов еще больше укрепили иерархию связывания поливалентных лигандов: тетраантенарный > триантенарный >> диантенарный >> моноантенарный. Было обнаружено, что значения IC_{50} для моно-, ди-, три- и

тетраантеннарных олигосахаридов составляют приблизительно $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-9}$ и 10^{-9} М соответственно. Поскольку четвертый галактозный фрагмент, присутствующий в тетраантеннарном лиганде, не столь заметно усиливал сродство, предполагалось, что требования к связыванию рецептора клеточной поверхности в значительной степени удовлетворяются триантеннарной структурой.

Дальнейшие исследования развивались по двум направлениям: поиск оптимальной пространственной структуры лиганда [49,50,51,52,23,53] (поскольку синтез олигосахаридов достаточно трудоемок, предполагалось упростить и оптимизировать синтез подобных соединений), и модификация терминального моносахарида [54, 23, 55] для увеличения связывания с рецептором.

Биессен с соавторами [53] для создания подобных олигосахаридам структур использовал сочетание трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS) в качестве фрагмента ветвления и полиэтиленгликольных цепочек для оптимального расположения моносахаридов к сайтам связывания рецептора (Рис. 18). Варьированием длины полиэтиленгликольного фрагмента ими было установлено, что наибольшее сродство к ASGP-R показывают лиганды с расстоянием от моносахарида до точки ветвления $\sim 20 \text{ \AA}$.

Таблица 3. Константы ингибирования лигандов в работе [53]

Вещество	K_i , мкМ	$pK_i \pm SE$
TG (4 \AA)	>390	3.41 \pm 0.08
TG (9 \AA)	19	4.72 \pm 0.12
TG (10 \AA)	1.2	5.91 \pm 0.09
TG (13 \AA)	11	4.95 \pm 0.26
TG (20 \AA)	0.2	6.68 \pm 0.14
GalNAc	870	3.06 \pm 0.14

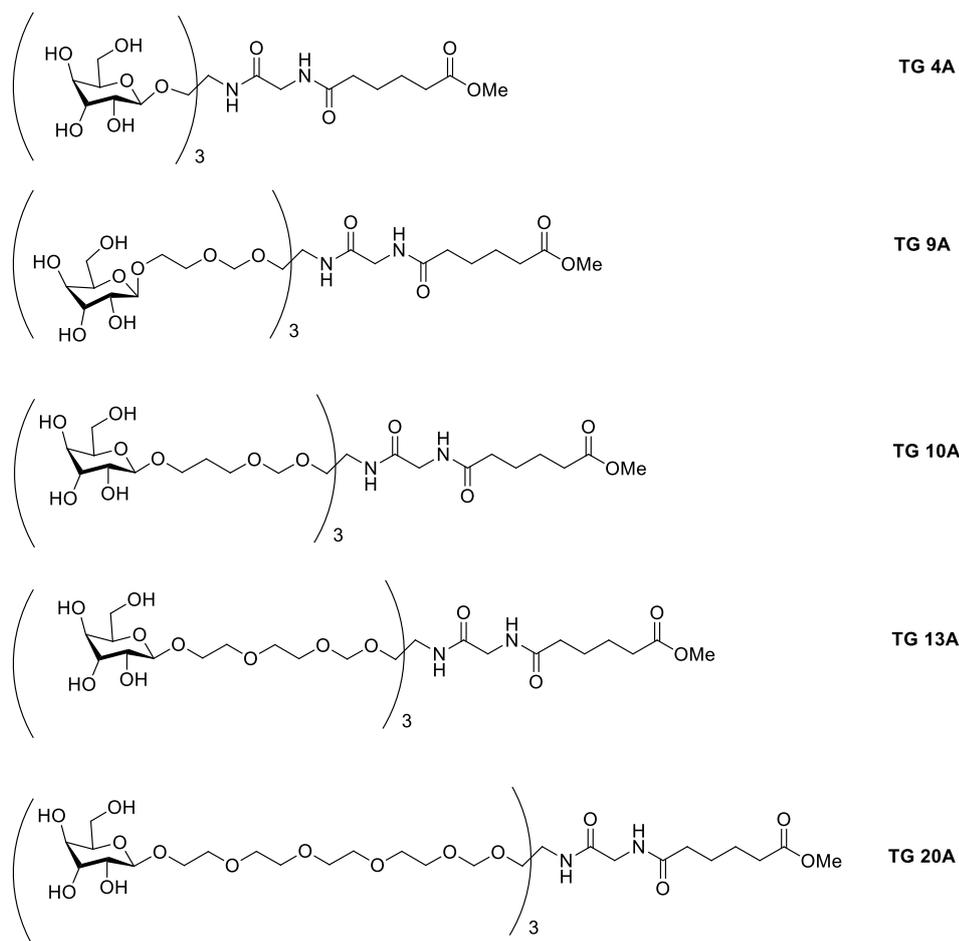


Рисунок 18. Лиганды ASGP-R на основе TRIS с полиэтиленгликольными фрагментами.

Валентайн с соавторами [50] в своих исследованиях предложил использовать в качестве фрагмента ветвления лизин для синтеза лигандов следующей структуры (Рис.19).

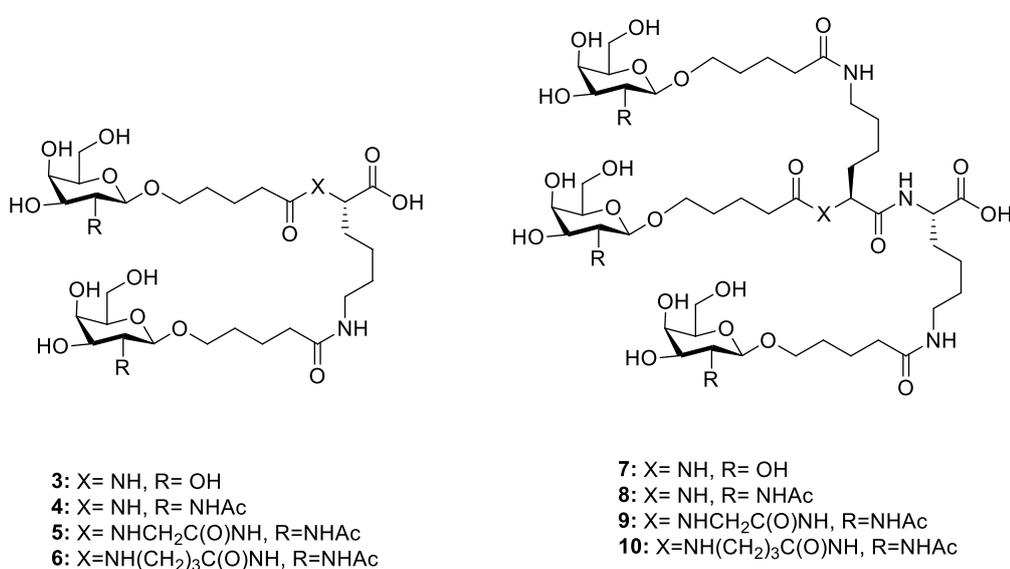


Рисунок 19. Лиганды ASGP-R на основе лизина

Сборку лигандов осуществляли на полимерной подложке с использованием Аллос- и Фмос- защит по схеме приведенной ниже (Рис. 20).

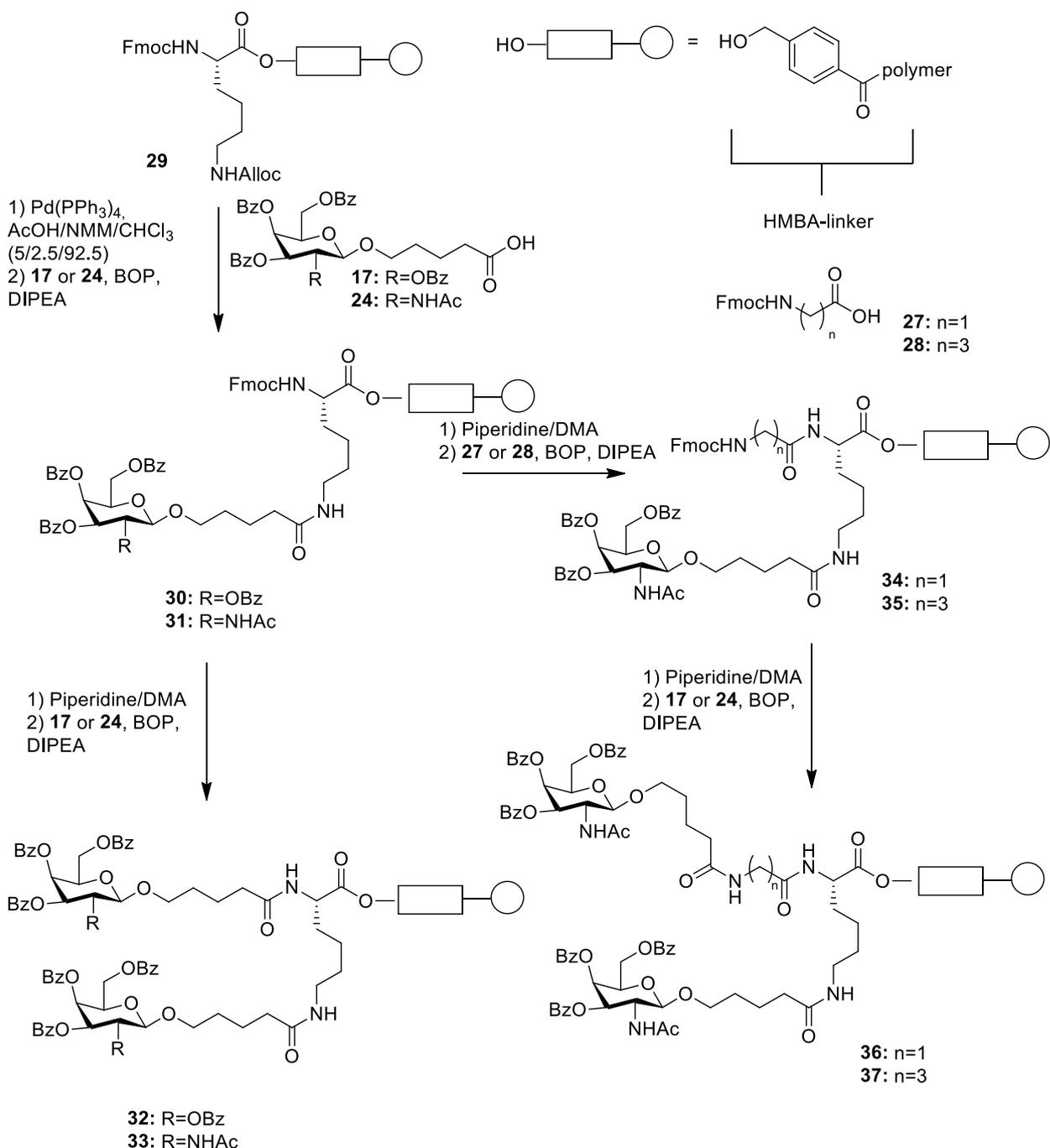


Рисунок 20. Схема синтеза лигандов ASGP-R на основе лизина.

Защищенный Аллос- и Фмос- по аминогруппам лизин прикрепляли на полимерную подложку. После чего удаляли одну из защитных групп и вводили адресный фрагмент на основе галактозы, синтезированный согласно схеме, приведенной на Рис. 21. Затем после

удаления второй защитной группы с молекулы лизина либо вводили еще один адресный фрагмент, либо удлиняли расстояние между фрагментом ветвления и углеводным фрагментом (спейсер) при помощи фрагментов глицина или γ -аминомасляной кислоты и только после этого вводили второй адресный фрагмент. Далее открепленные от подложки диантеннарные лиганды вводили в реакцию с фрагментом лизина, содержащим еще один адресный фрагмент. Диантеннарные и триантеннарные лиганды получали откреплением от подложки и удалением защитных OBz-групп в щелочной среде.

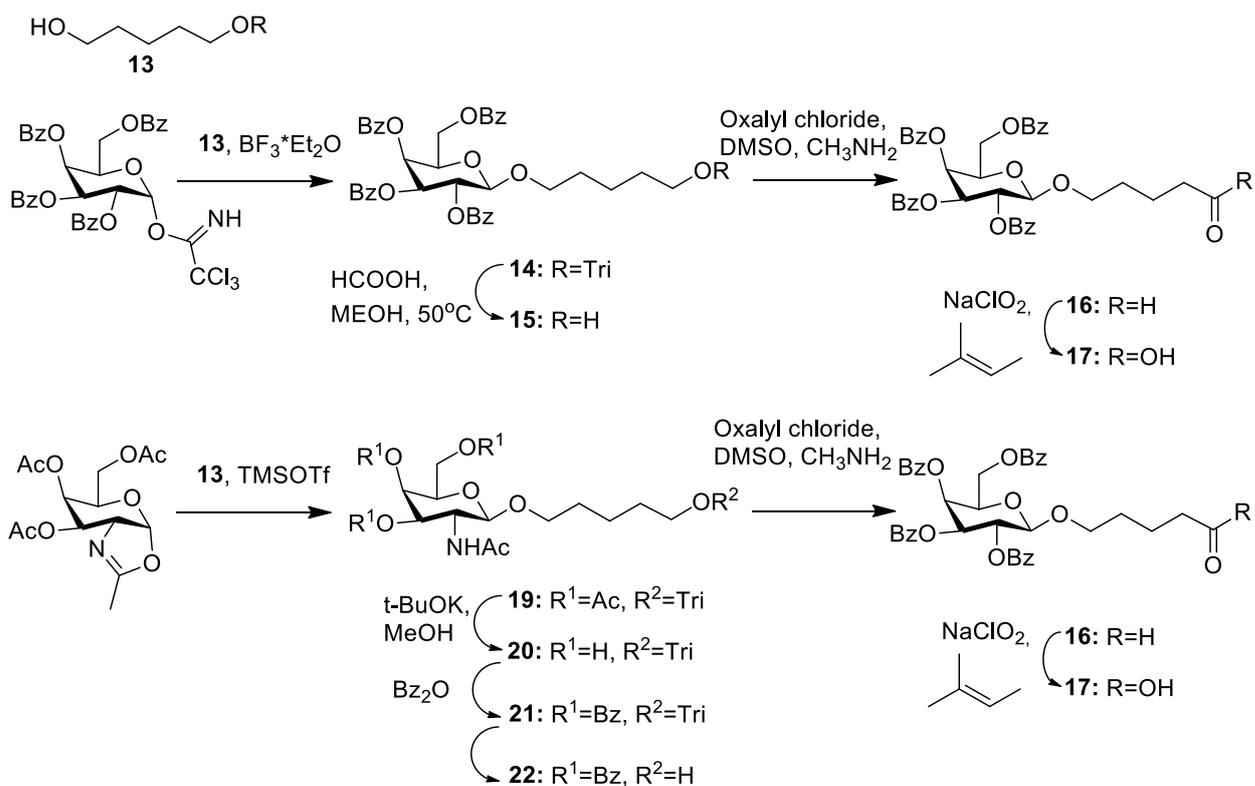


Рисунок 21. Синтез углеводсодержащего адресного фрагмента для лигандов ASGP-R на основе лизина.

Полученные соединения показали достаточно интересную зависимость аффинности к рецептору от структуры (Рис.22).

Вещество	R	m	X	Ki, (нМ)
3	ОН	0	NH	95 000
4	NHAc	0	NH	30
5	NHAc	0	NHCH ₂ C(O)NH	470
6	NHAc	0	NH(CH ₂) ₃ C(O)NH	27
7	ОН	1	NH	650
8	NHAc	1	NH	4
9	NHAc	1	NHCH ₂ C(O)NH	10
10	NHAc	1	NH(CH ₂) ₃ C(O)NH	3

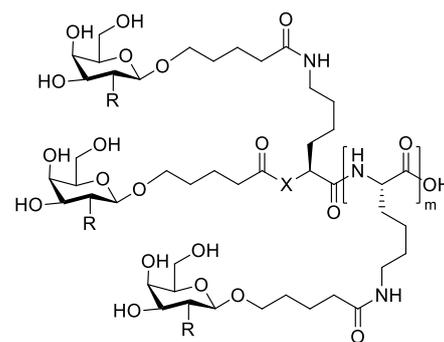


Рисунок 22. Зависимость аффинности к ASGP-R от структуры полученных лигандов.

Можно видеть, что N-ацетилгалактозаминсодержащие лиганды, как и ожидалось авторами статьи, являются более эффективными лигандами, чем соответствующие галактозосодержащие производные (**3** и **7** против **4** и **8**). Также очевидно, что триантеннарные лиганды **7-10** имеют более высокое сродство к ASGP-R, чем соответствующие диантеннарные соединения. **3-6**. Включение фрагмента глицина в лиганды (как, например, в соединении **5**) в диантеннарной серии привело к неожиданному уменьшению сродства к рецептору. Аналогичное явление, хотя и менее выраженное, наблюдалось для соединения **9** в триантеннарной серии. Последнее наблюдение может быть приписано ограниченной конформационной гибкости глицин-лизиновой части в лигандах **5** и **9** по сравнению с исходными соединениями **4** и **8**. Присутствие конформационно менее ограниченного фрагмента γ -аминомасляной кислоты в соединениях **6** и **10** мало влияло на сродство. Наконец, можно сделать вывод, что аффинность этих лигандов на основе лизина незначительно зависит от длины спейсера.

Еще одна модификация лигандов трехвалентного строения была представлена в работе Слайдрегга с соавторами [51]. Схема синтеза лиганда представлена на Рис.23.

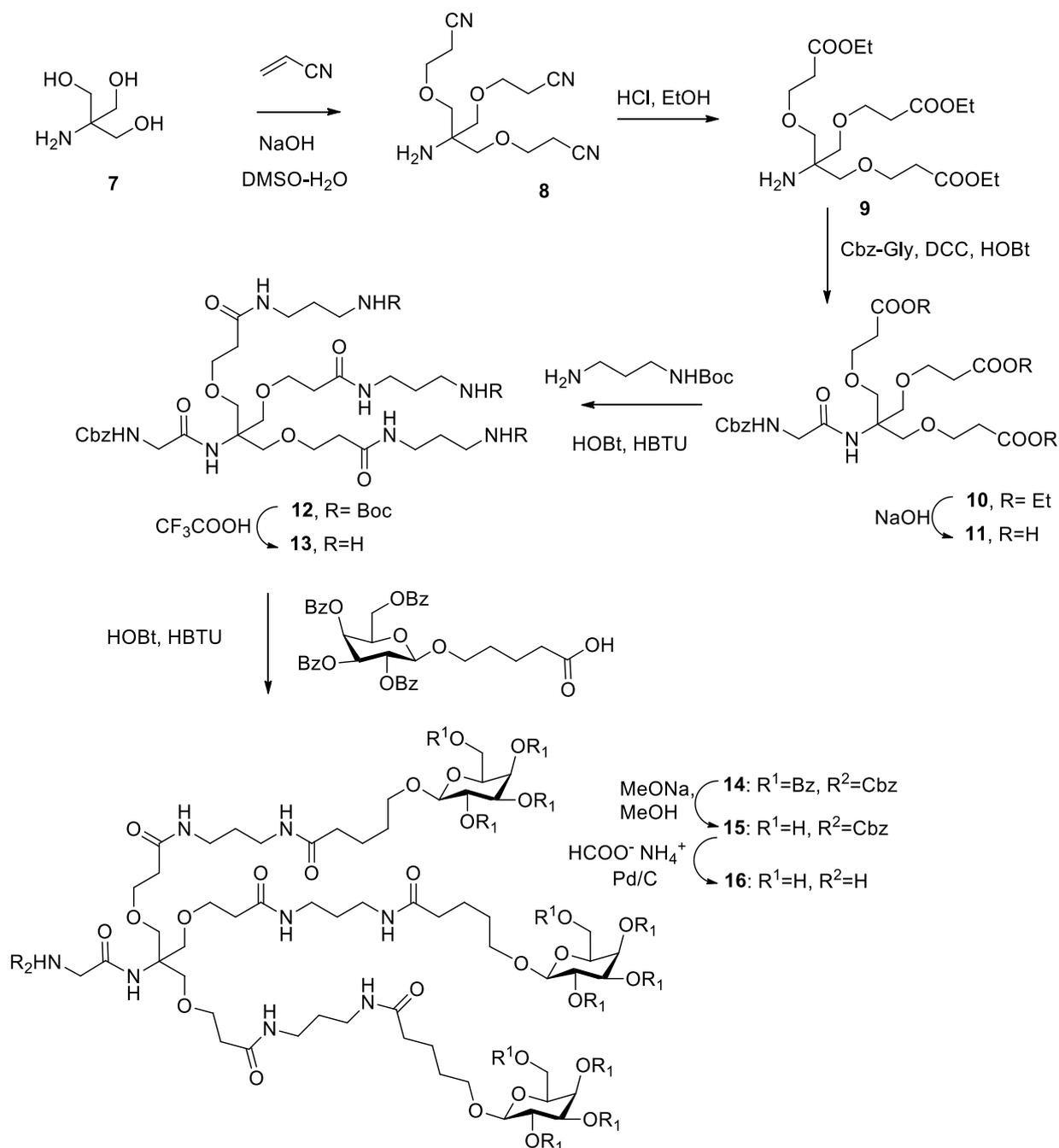


Рисунок 23. Схема синтеза лиганда ASGP-R на основе TRIS

Для его создания в качестве фрагмента ветвления авторами был выбран TRIS, к которому последовательно присоединяли фрагменты акрилонитрила при помощи реакции Михаэля, затем подвергали алкоголизу циано-группу, защищали амино-группу Cbz-защитой и гидролизовали полученный эфир. После чего сочетали полученный фрагмент при помощи реакции карбодиимидного синтеза с моно-N-Вос-диаминопропаном, снимали Вос-защиту и вводили реакцией карбодиимидного синтеза адресный углеводсодержащий фрагмент. Далее авторы статьи проводили удаление защитных групп. Аффинность

полученного соединения к рецептору оказалась выше, чем у соединения TG 20Å, описанного в работе Биессена [53] ($K_i=93$ нМ против $K_i=0.2$ мкМ). Также аналогичным образом при помощи карбодиимидного синтеза Слайдергом с соавторами был синтезирован лиганд на основе TRIS, содержащий глициновый фрагмент и имеющий ту же длину спейсера 20Å (Рис. 24), величина константы ингибирования (K_i) для которого составила те же 93 нМ. Таким образом, авторами было доказано, что аффинность лиганда определяется природой спейсера гораздо в меньшей степени, чем его длиной, при условии сохранения максимальной гибкости фрагмента между точкой ветвления и углеводным остатком.

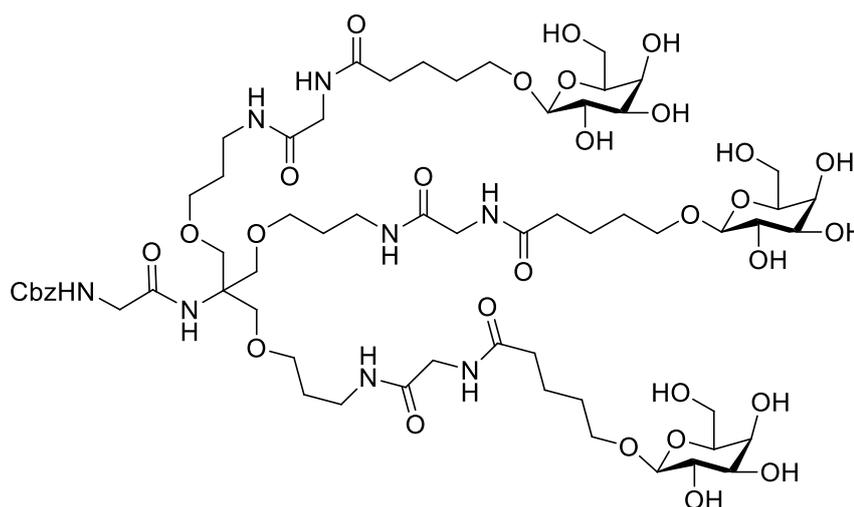


Рисунок 24. Лиганд ASGP-R на основе TRIS с фрагментом глицина

Еще одной вехой в развитии представлений о создании лигандов ASGP-R стала работа Раджива с соавторами [52]. В ней авторы попытались отойти от триантенарной структуры лигандов и перейти к тривалентной структуре с отдельно синтезируемыми блоками, т.е. пространственное расположение галактозных остатков было задано не дендритным образом, а последовательным соединением моновалентных лигандов (Рис.25).

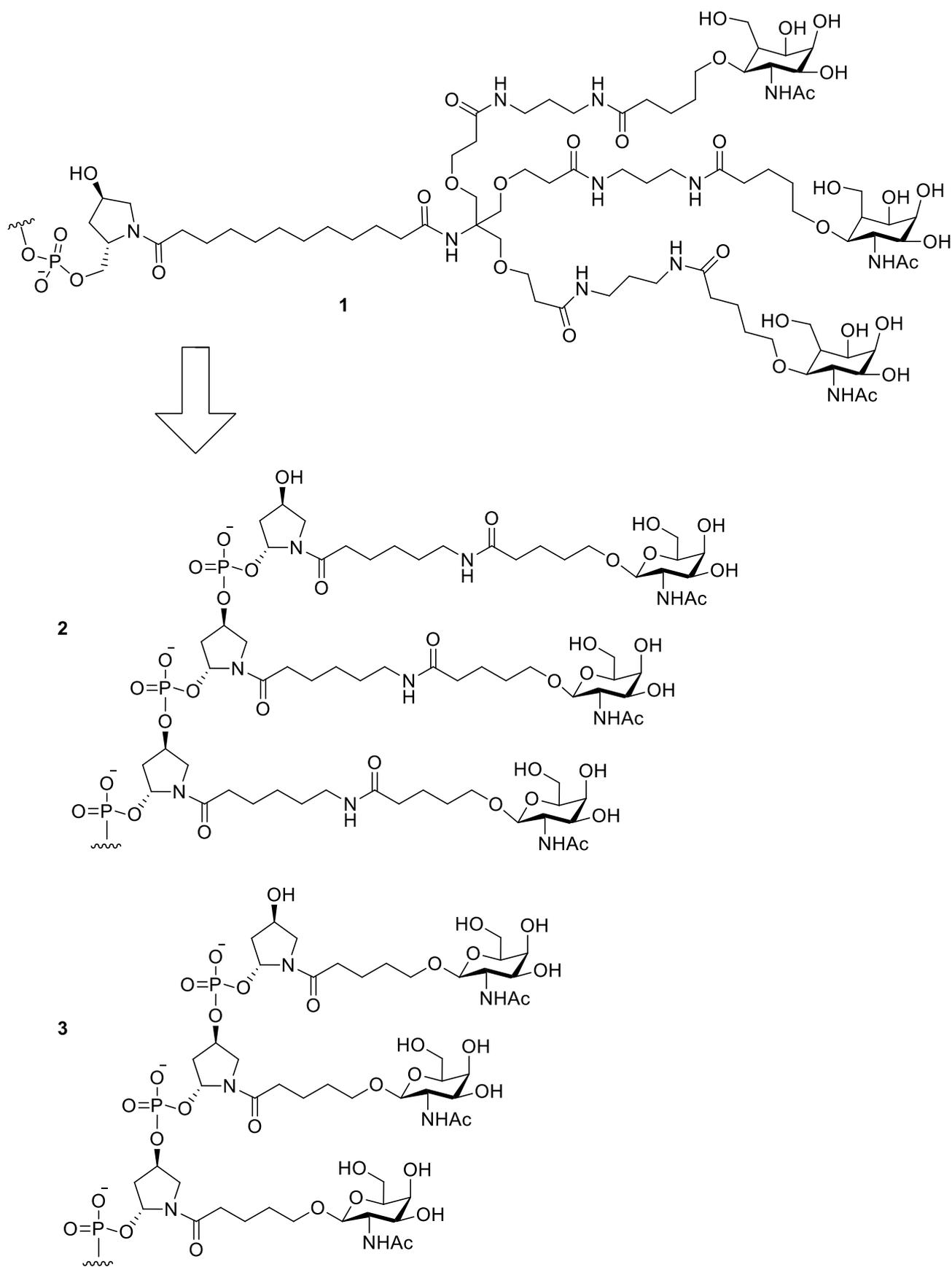


Рисунок 25. Структура тривалентных лигандов ASGP-R, синтезированных в работе [52]

Ключевой стадией в синтезе мономеров было получение показанных на Рис. 26 амидов, которые затем последовательно соединялись при помощи образования эфиров с ортофосфорной кислотой.

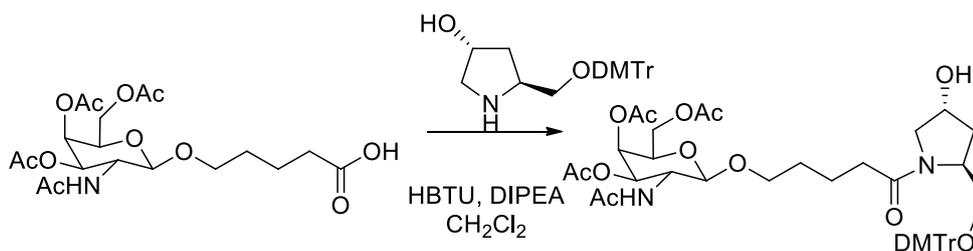


Рисунок 26. Получение мономеров в работе [52].

Аффинность к рецептору у полученных тривалентных структур оказалась в 1.5-2 раза ниже, чем у триантеннарных, однако синтез значительно упростился.

Еще один вариант пространственной структуры лиганда ASGP-R (Рис.27) был предложен в работе [23]. Однако никакого обсуждения того, насколько природа спейсера влияет на связывание с ASGP-R, помимо уже известного нам нелинейного увеличения связывания с рецептором в зависимости от количества углеводных остатков, не было представлено. По всей видимости, такая структура выбрана на основании удобства синтеза и условия сохранения максимальной гибкости спейсера.

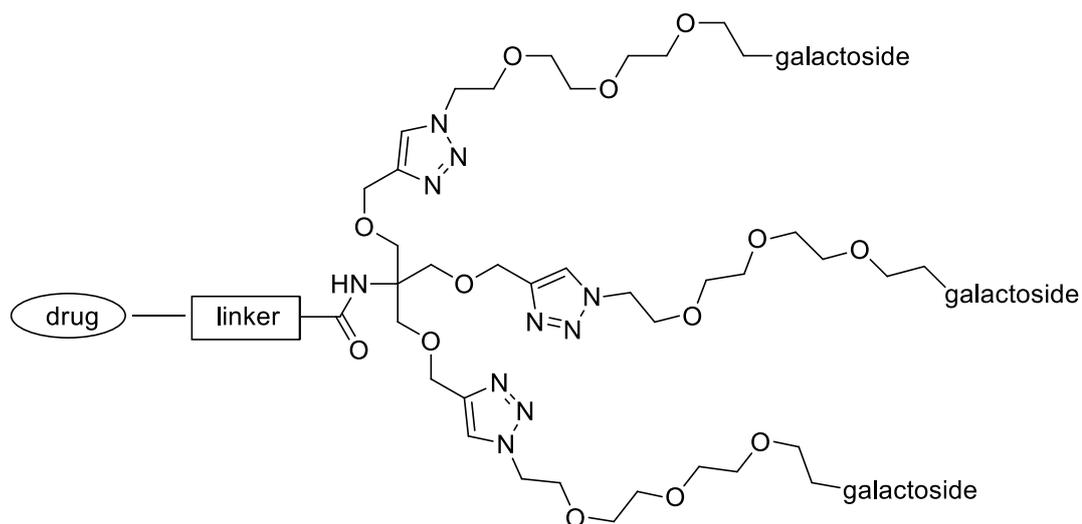


Рисунок 27. Структура лигандов ASGP-R, представленных в работе [23].

Параллельно с исследованием влияния структуры и природы спейсера лигандов на связывание с ASGP-R изучалось влияние структуры углеводного фрагмента на аффинность к рецептору.

Первым очевидным выбором для модификации стала аминогруппа N-ацетиламиногалактозы, поскольку в работе Баенцигера [46] и др. было показано, что сродство к рецептору увеличивается примерно в 50 раз при переходе от галактозного фрагмента к N-ацетилгалактозному.

В работе Иобст и Дрикамер [54] изучили аффинность к ASGP-R ряда производных 2-амино-2-дезоксаминогалактозы, ацилированных по второму положению (Табл. 4), и определили связующий карман рецептора. Было показано, что небольшое увеличение длины алкильной цепи положительно влияет на связывание.

Таблица 4. Изменение константы ингибирования в зависимости от длины алкильного радикала во втором положении

Производное галактозы	$K_i/K_i(\text{GalNAc})$
N-формилгалактозамин	13±1
N-ацетилгалактозамин	1
N-пропионилгалактозамин	0.13±0.04
N-н-бутаноилгалактозамин	0.29±0.06
N-изо-бутаноилгалактозамин	0.82±0.06

В работе Д'Соуза [44] было подробно исследовано связывание природных моно- и олигосахаридов (в том, числе и галактозы) с активным сайтом рецептора (Рис. 28). Было установлено, что связывания с лигандом отвечают несколько аминокислотных остатков, принадлежащих первой субъединице рецептора: аспарагиновая кислота-241, аспарагиновая кислота-265, аспарагин-264, глутаминовая кислота-252, глутамин-239 и триптофан-243. Между атомом кальция и атомами кислорода лиганда образуются координационные связи, в то время как между амидной и карбоксильными группами рецептора и группами в 3 и 4 положениях галактозы образуются водородные связи. Эти водородные связи играют ключевую роль для связывания производного с рецептором. Кроме того, галактоза стабилизируется в активном сайте благодаря гидрофобным взаимодействиям с атомами C³, C⁴, C⁵ и C⁶ триптофана 243.

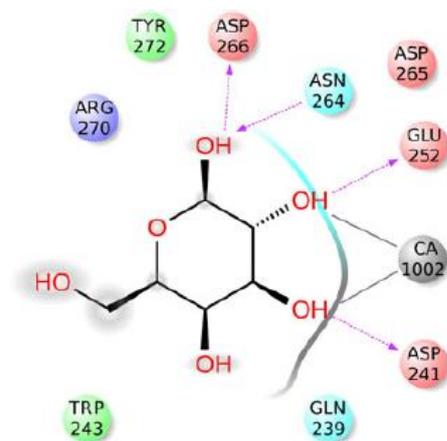
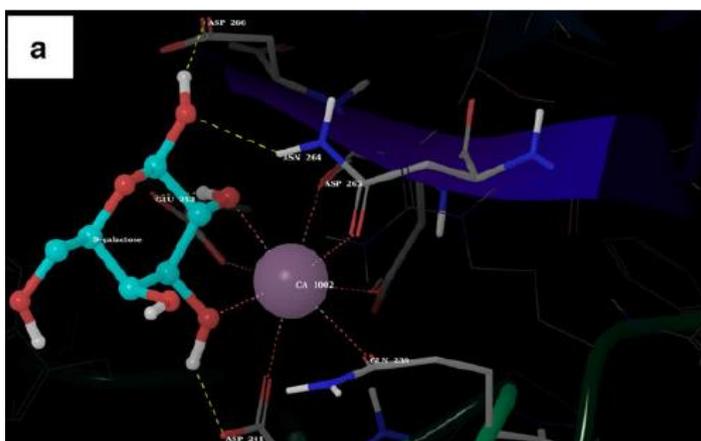


Рисунок 28. Структура активного сайта ASGP-R

На основании этих исследований Мамидьяла [55] синтезировал и исследовал на аффинность к ASGP-R несколько классов производных галактозы с различными заместителями в аномерных, C2-, C5- и C6-положениях (Рис.29 а,б). Было показано, что модификация с обеих сторон от ключевого C3, C4-диольного фрагмента не вызывает критическую потерю сродства к рецептору.

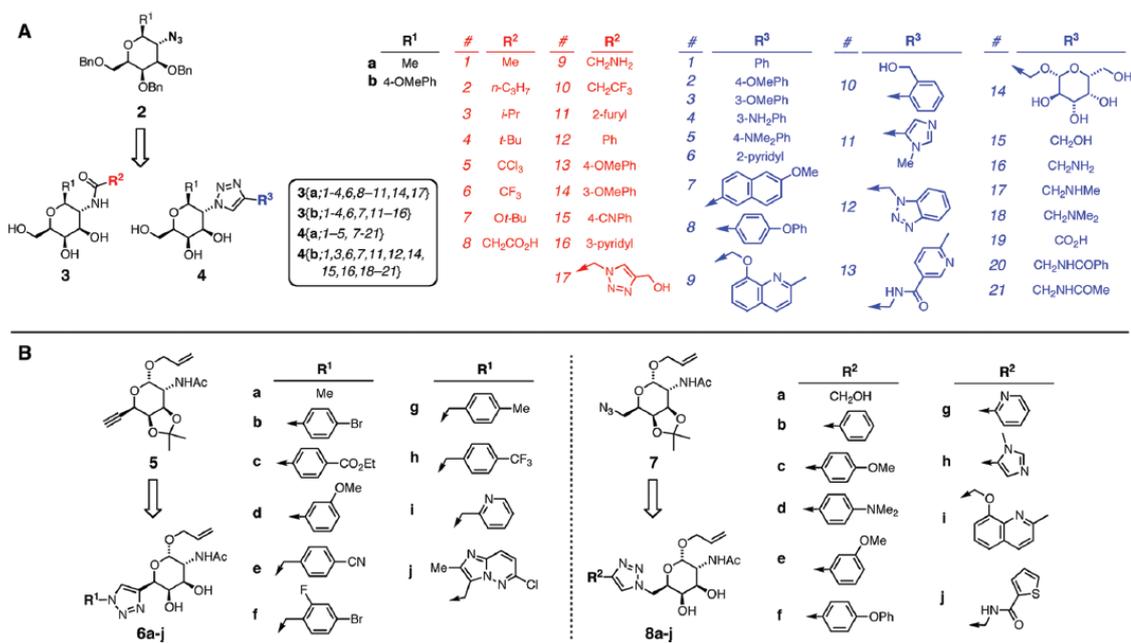


Рисунок 29(а). Производные галактозы с различными модификациями в 1,2,5 и 6 положениях.

Замена ацетамидной группы во втором положении триазольной привела к получению нескольких соединений с умеренной аффинностью, причем β -4-метоксифенильный ряд соединений (**4b**), как правило, превосходил β -метильный (**4a**).

Исследование производных C5/6 (триазольные аддукты **6** и **8**) началось с исходных аллилгликозидов (**9**, алкина **10** и азида **11**). Алкин **9** не проявил улучшения сродства к ASGP-R по сравнению с GalNAc, в отличие от двух других соединений. Ряд арильных и бензиловых триазолов, полученных из C5-алкина **5** (**6b-h**) были исследованы на сродство к ASGP-R, наиболее эффективные примеры показаны на Рис. 29.

Триазольные (C6) производные оказались в целом наиболее эффективным семейством GalNAc-миметиков, в соответствии с лучшей аффинностью их общего предшественника азида. Сравнительно большая серия соединений проявляла низкое микромолярное связывание (3,2-19 мкМ) для множества заместителей разных размеров и характеристик.

В работе [23] был рассмотрен компактный и стабильный бициклический мостиковый кеталь (Рис.30). Он был разработан как лиганд для ASGP-R и синтезирован двумя различными способами, включая ферментативный (Рис.31). Это соединение показало отличную эффективность в качестве лиганда, сравнимую с аллилокси производными, рассмотренными в работе [55].

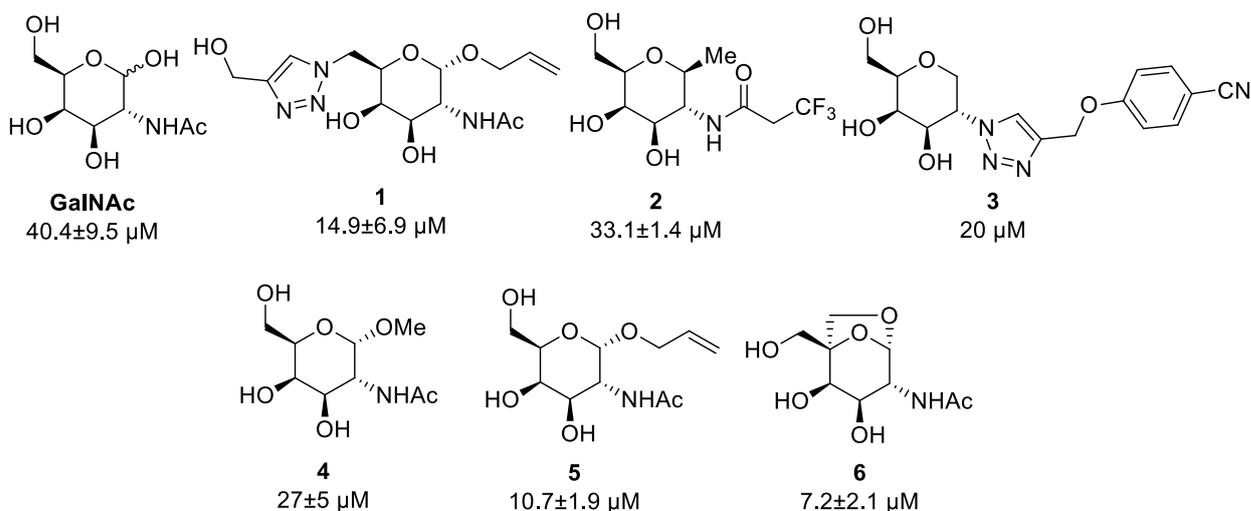


Рисунок 30. Лиганды ASGP-R, рассмотренные в статье [23]

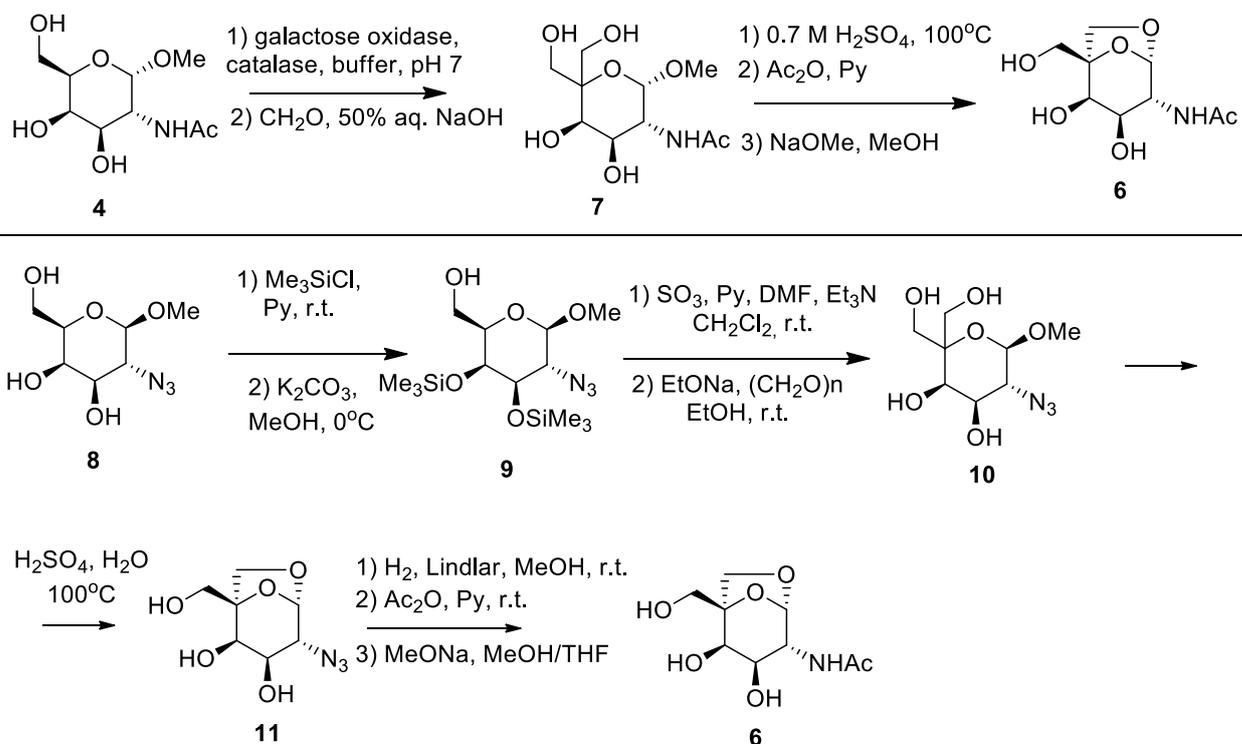


Рисунок 31. Схема синтеза бициклического кетала

Этот аналог использовался для создания высокоэффективных ди- и триантеннарных разветвленных лигандов ASGP-R (Рис.32).

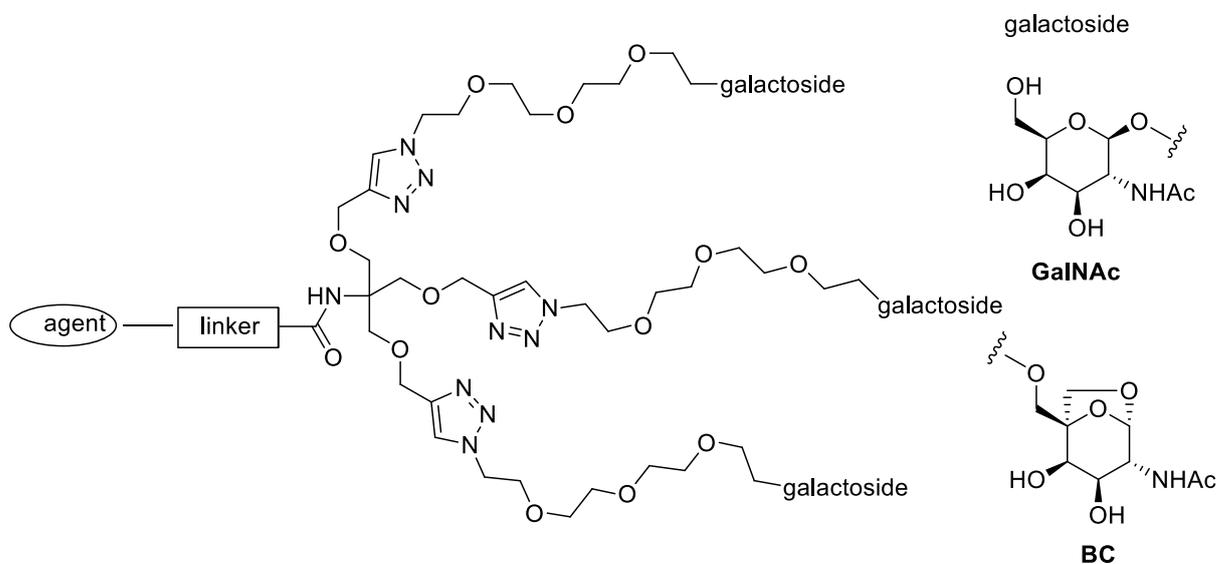


Рисунок 32. Триантеннарные лиганды и конъюгаты, обсуждаемые в работе [23].

Обширное исследование функций этих соединений показало быстрое ASGP-R-зависимое клеточное поглощение *in vitro* и высокий уровень избирательности печень/плазма *in vivo* (Рис.33 и Табл.5). Оценка биораспределения у грызунов прототипического маркера Alexa, соединенного с триантеннарным конъюгатом на основе этих лигандов, показала селективную доставку в гепатоциты без определяемого накопления в непаренхимных клетках. Эта молекула также в большем количестве захватывалась гепатоцитами и дольше удерживалась ASGP-R по сравнению с аналогичным триантеннарным конъюгатом, полученным на основе GalNAc.

Таблица 5. Распределение *in vivo* конъюгатов лигандов ASGP-R на основе бициклического кетала (A) и GalNAc (B).

	Моно-BC	Ди-BC	Три-BC	Ди-GalNAc	Три-GalNAc
Отношение количества конъюгата печень/плазма	0.39	9	144	0.87	8.7

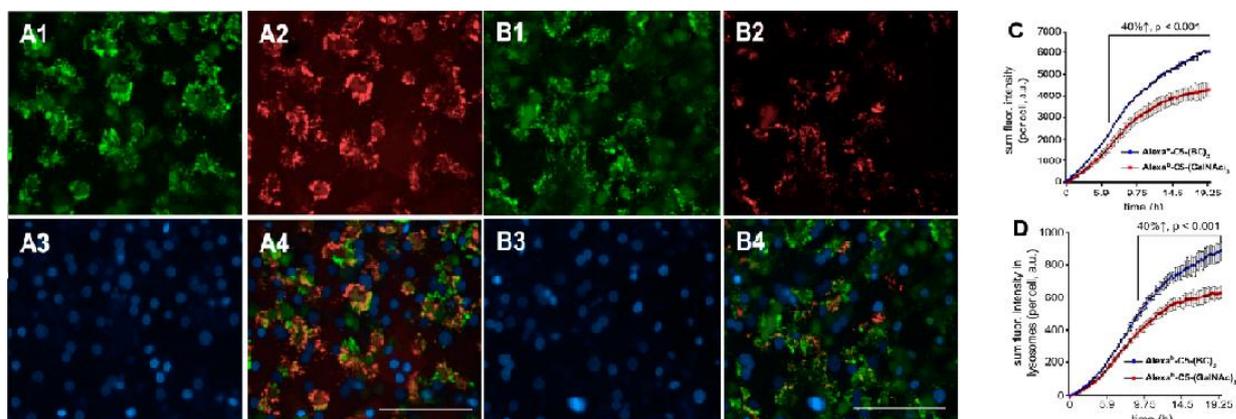


Рисунок 33. Поглощение первичными человеческими гепатоцитами конъюгатов красителя Alexa и триантеннарных лигандов ASGP-R на основе бициклического кетала (A) и GalNAc (B). Человеческие первичные гепатоциты обрабатывали (A) Alexa^b-C5-(BC)₃ или (B) Alexa^b-C5-(GalNAc)₃ в течение 20 ч при концентрации 1 мкМ. Окрашивание: 1 = эндолизосомальный (pHrodo декстран); 2 = AlexaFluor647 (ASGP-R направленные соединения); 3 = ядерный (DAPI); 4 = наложенные друг на друга изображения. Шкала= 100 мкм. Количественное внутриклеточное (C) и лизосомальное накопления (D). В каждом случае наблюдалось статистически значимое увеличение (~40%) для трехвалентного BC лиганда относительно аналогичного GalNAc лиганда.

Таким образом, описанная в [23] многокомпонентная конструкция представляет собой высокоэффективный носитель для адресной доставки в гепатоциты.

Резюмируя раздел о лигандах ASGP-R, можно сделать следующие выводы: 1) лиганды ASGP-R обладают кумулятивным эффектом (нелинейное увеличение сродства к рецептору при увеличении количества фрагментов, отвечающих за связывание); 2) оптимальное количество галактозных остатков в лиганде равняется трем; 3) сродство к рецептору зависит от длины спейсера между точкой ветвления и углеводным остатком (оптимальная 20Å), но не зависит от природы спейсера при условии сохранения его гибкости; 4) ключевую роль в связывании с рецептором играют гидроксильные группы в С3 и С4 положении галактозы; 5) модификация С1,С2,С5,С6 положений в галактозе не запрещена и может привести как к увеличению сродства к ASGP-R, так и к уменьшению; 6) увеличение сродства к рецептору приводит к большему поглощению препаратов как *in vitro*, так и *in vivo*.

2.3.3. Примеры адресной доставки лекарственных средств в клетки печени

На данный момент широко описано использование асиалогликопротеинового рецептора в качестве целевого рецептора для доставки лекарственных средств в гепатоциты [8,56]. Однако в большинстве своем это примеры адресной доставки высокомолекулярными средствами (липосомами [57,58,59,60,61,62], мицеллами [63,64,65], полимерными комплексами [66,67], наночастицами [68,69,70,71,72,73,74] и липидными наночастицами [75,76,77]), чьи недостатки были отмечены выше. ASGP-R был использован для доставки в гепатоциты практически всех типов терапевтических соединений, начиная от белков и противовирусных средств [71,72,78,79] до противоопухолевых препаратов [80,63,64,68,69]. В частности, ASGP-R-ориентированные липосомы применяются для доставки лекарств, генов и олигонуклеотидов в этот тип клеток. Заметим, что доставка липосом и белков в гепатоциты с использованием ASGP-R в качестве мишени была одним из первых примеров клеточно-специфической доставки в клетки печени [81], и до сегодняшнего дня проводится большое количество исследований по липосомному типу доставки в гепатоциты [56], хотя это и не привело к введению какого-либо препарата в клиническую практику. Лиганды ASGP-рецепторов также были применены для доставки в гепатоциты миРНК [82,83], что может представлять собой новую и важную фармацевтическую стратегию, потому что молекулы миРНК являются очень перспективными терапевтическими препаратами, но обычно они недостаточно

устойчивы в физиологических условиях и для достижения целевых клеток нуждаются в адресной доставке. Тем не менее, обоснованность такого подхода предстоит установить в экспериментах *in vivo* и клинических испытаниях.

В противоположность этому, число примеров низкомолекулярных препаратов для адресной доставки при помощи ASGP-R ограничено. В данном разделе не приводится полный обзор данных по низкомолекулярным средствам адресной доставки, однако среди рассмотренных работ удалось найти всего два примера доставки противоопухолевых средств [84, 23].

В работе Санхуэза [23], рассмотренной нами ранее, в качестве лекарственных препаратов был выбран нестероидный глюкокортикоидный модулятор и стероидный глюкокортикоидный антагонист, обладающие противоопухолевой активностью (Рис.34).

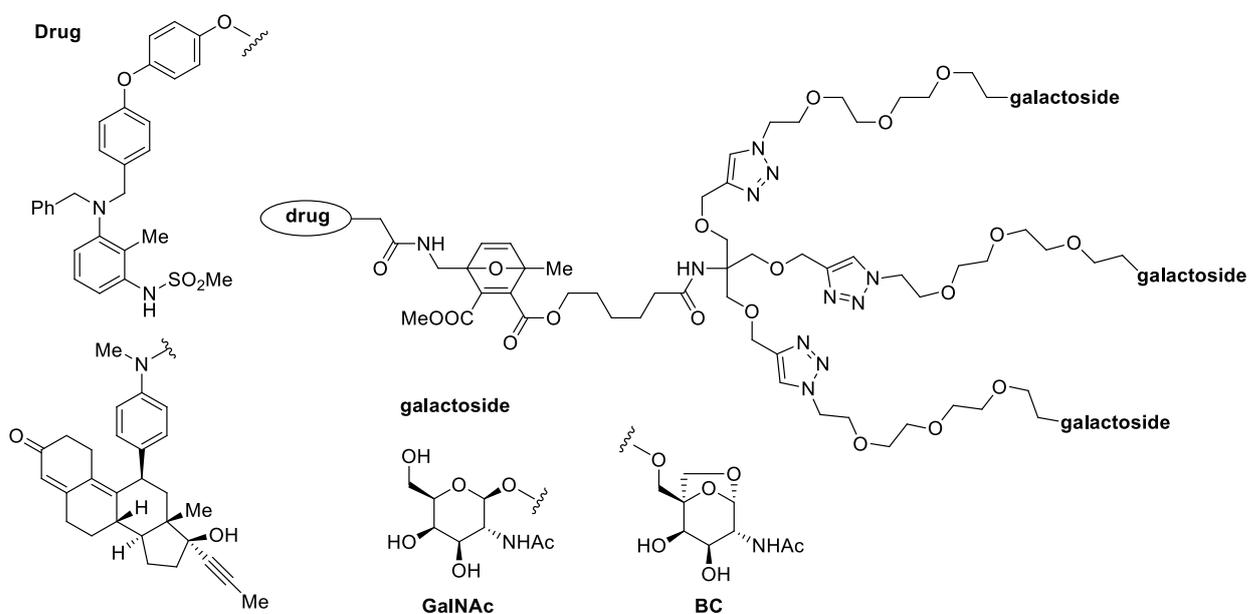


Рисунок 34. Структура конъюгатов лекарственных средств в работе [23].

Селективное высвобождение в печени низкомолекулярных препаратов было достигнуто путем обратной реакции Дильса-Альдера, предположительно после взаимодействия с внутриклеточным тиолом. Таким образом, описанная в [23] многокомпонентная конструкция представляет собой высокоэффективный носитель для адресной доставки в гепатоциты.

3. Обсуждение результатов

Основываясь на данных исследований, рассмотренных в обзоре литературы (в особенности [6,23,55,83]), 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.36). 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.

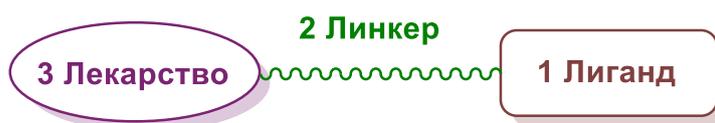


Рисунок 36. Общая структура синтезируемых конъюгатов.

Первой задачей диссертационного исследования было создание новых высокоэффективных лигандов ASGP-R. Для этого была выбрана оптимальная модель, представляющая собой триантеннарный лиганд, поскольку он: 1) содержит три углеводных остатка, 2) производные галактозы находятся на расстоянии $\sim 20\text{\AA}$ от точки ветвления, 3) спейсеры сохраняют гибкость (см. раздел 2.3.2), и произведена модификация фрагмента, отвечающего за связывание (Рис.37), для увеличения аффинности к ASGP-R, поскольку это напрямую влияет на количество поглощенного препарата [23]. Впоследствии полученные высокоэффективные лиганды ASGP-R планируется конъюгировать с лекарственными препаратами (Рис. 37).

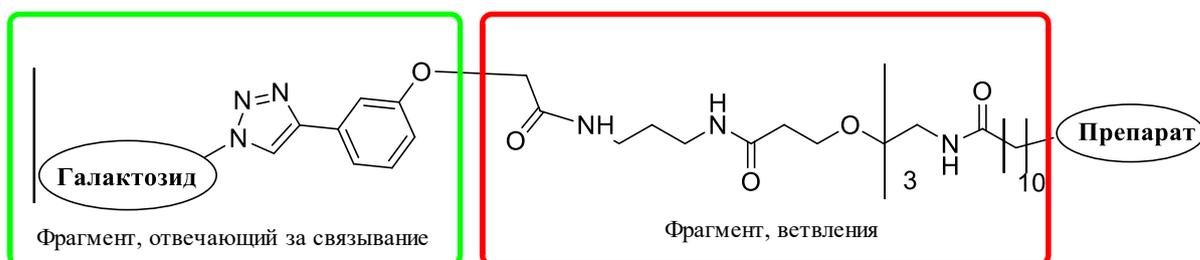
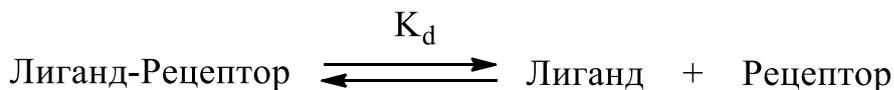


Рисунок 37. Общая схема строения конъюгатов с лигандами триантеннарного строения для направленной доставки в гепатоциты с обозначенными функциональными фрагментами

3.1. Выбор фрагмента, отвечающего за связывание.

Для количественного определения сродства лиганда к рецептору чаще всего используют равновесную константу диссоциации (K_d) для следующей обратимой реакции



Из чего следует, что $K_d = \frac{[\text{Лиганд}] \times [\text{Рецептор}]}{[\text{Лиганд-Рецептор}]}$, [моль].

Согласно данной формуле, большему сродству лиганда к рецептору соответствует наименьшее численное значение константы K_d .

Ранее используя метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР), были установлены константы диссоциации (K_d) комплекса «лиганд-рецептор» для следующих моносахаридов [23,55]:

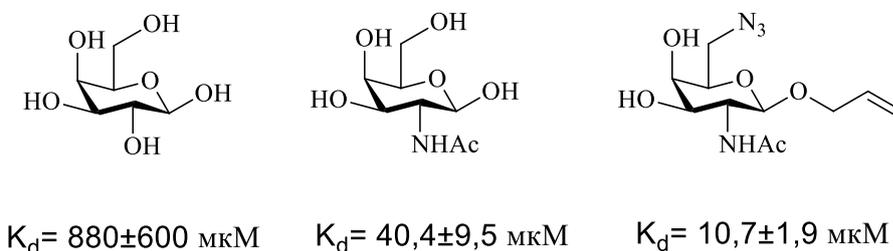


Рисунок 38. Константы диссоциации моносахаридов, представленных в работе [23]

Можно отметить улучшение связывания при переходе от галактозы к N-ацетилгалактозамину. Модификация аллильным фрагментом по первому положению N-ацетилгалактозамина также приводит к значительному увеличению сродства, которое проявляется в уменьшении константы диссоциации в 4 раза.

Первоначально наиболее перспективным нам представлялся триантенарный лиганд следующего строения (Рис.39), исходя из данных работы Мамидьяла [55], где 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 ($K_D = 8.2 \pm 0.7 \text{ мкМ}$), и работы Санхуеза [23], где было показано, что аффинность углеводного фрагмента напрямую влияет на поглощение конъюгатов *in vitro* и *in vivo*. Также в качестве модельных

соединений были исследованы N-ацетилгалактозаминные производные (**13**) и (**14**) (Рис.40). Производные (**13**) и (**14**) были выбраны для изучения влияния расстояния между углеводным и триазольным циклами и положения триазольного фрагмента по отношению к пиранозному на средство к сайту связывания. К возможным преимуществам лигандов (**13**) и (**14**) можно отнести то, что синтез галактозаминных производных для их получения требует меньшего количества стадий. [85,86].

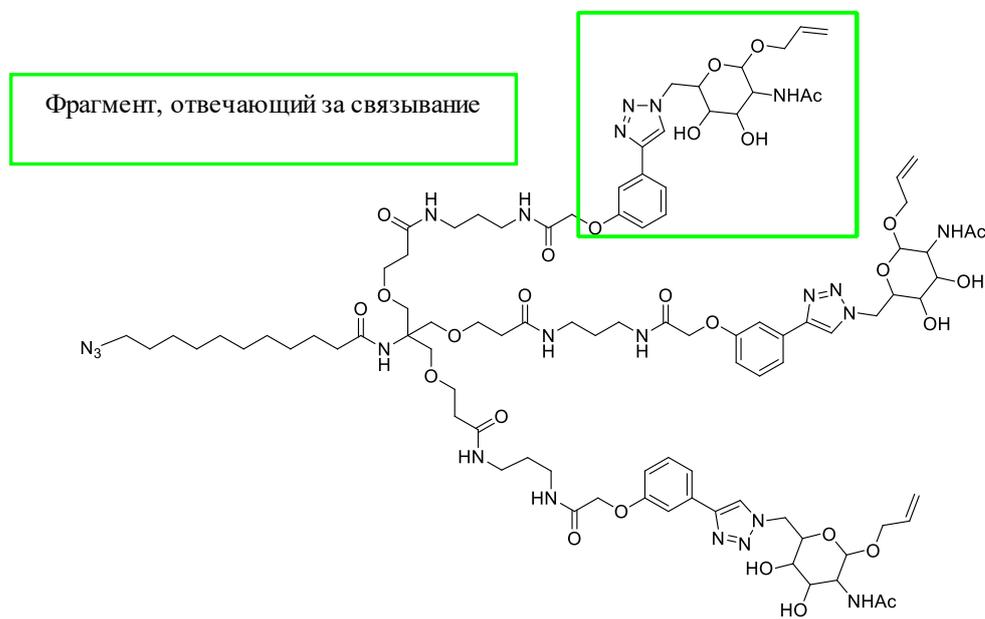


Рисунок 39. Целевой лиганд ASGP-R триантенарного строения, содержащий аллильное производное галактозы.

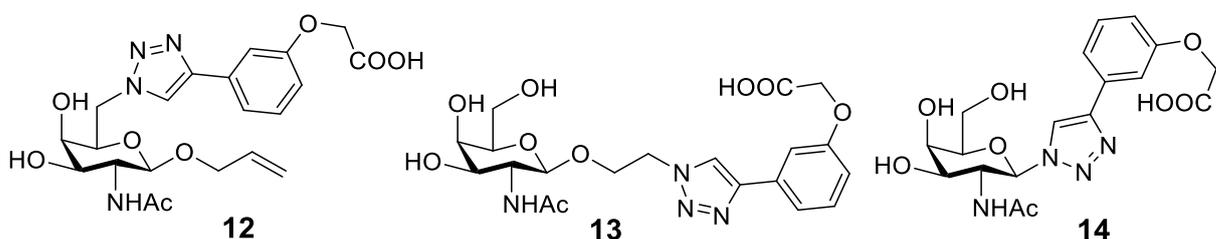


Рисунок 40. Производные N-ацетилгалактозамина, выбранные в качестве фрагментов, отвечающих за связывание (**12**),(**13**),(**14**)

3.2. Выбор терапевтических агентов

В качестве модельных доставляемых агентов для последующего конъюгирования были выбраны широко известные и применяемые в клинической практике низкомолекулярные противоопухолевые (паклитаксел, доксорубин и метотрексат) и противовирусный (рибавирин) препараты:

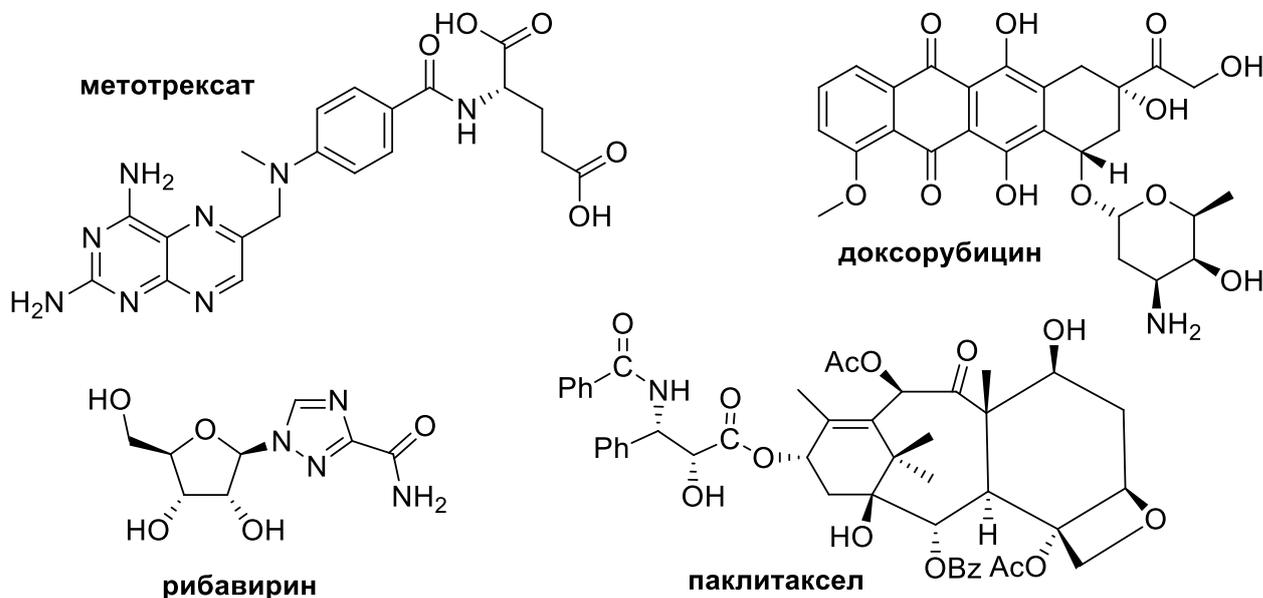


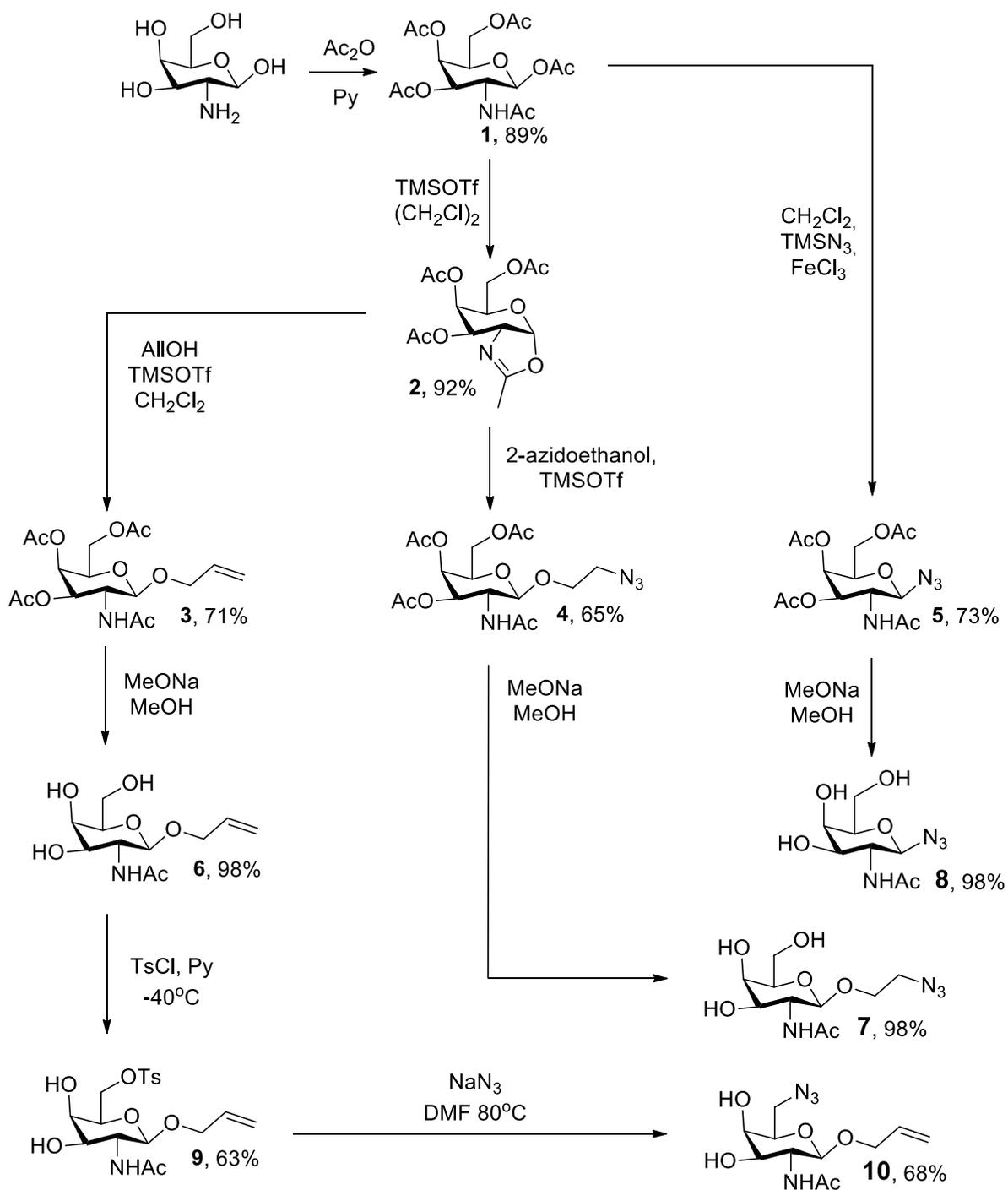
Рисунок 41. Препараты, выбранные в качестве терапевтических агентов для конъюгирования с лигандами ASGP-R

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.

3.3. Синтез производных N-ацетилгалактозамина¹

Галактозные производные (7),(8),(10), выступающие в качестве соединений предшествующих, фрагментам, отвечающим за связывание (12),(13),(14), были синтезированы согласно следующей схеме:

¹ 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)



На первом этапе нами был проацелирован 2-амино-2-дезоксi-β-D-галактопираноза при помощи уксусного ангидрида в пиридине. В ходе данной реакции идет активация карбоксильной группы путем образования ацилпиридиния по методу Айнхорна, что позволяет проводить реакцию в мягких условиях с высокими выходами [87].

Основным показателем того, что реакция протекает полностью, является наличие пяти синглетных сигналов в области 1.7-2.0 м.д. в спектре ПМР соединения (1)

Затем из пентаацелированного производного N-ацетигалактозамина (1) реакцией с триметилсилилтрифлатом (TMSOTf) получили соединение (2), содержащее в своей структуре оксазолиновый цикл. Образование только α -изомера продукта объясняется стереоселективностью протекающей реакции. В литературных источниках фигурируют два возможных пути образования соединения (2).

В первом случае (протекает для α и β изомеров, Рис.42), реакция идет по S_N1 механизму. Стабилизация промежуточного карбокатиона осуществляется неподеленной электронной парой кислорода пиранозного цикла. После чего катионный центр атакует нуклеофил – атом кислорода ацильной группы во втором положении галактозы. Получившийся циклический катион депротонируется с образованием оксазолина. [88].

Во втором варианте (протекает только для β -изомера, (Рис.43), реакция идет по S_N2 механизму: происходит внутримолекулярная нуклеофильная атака атомом кислорода ацильной группы во втором положении галактозы по гликозидному атому углерода, что приводит к обращению конфигурации гликозидного атома углерода, давая α -продукт. Получившийся циклический катион также после депротонирования образует оксазолин [88].

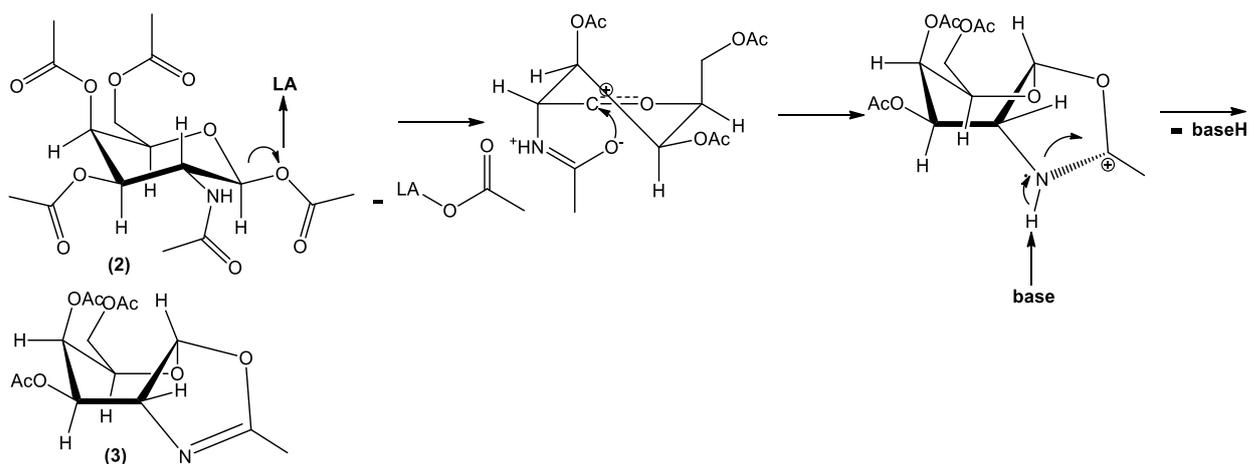


Рисунок 42. Механизм образования оксазолина путем реакции S_N1 .

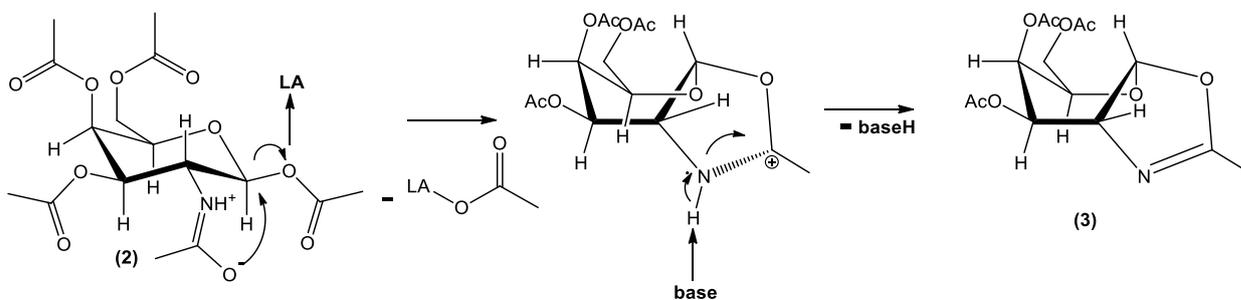


Рисунок 43. Механизм образования оксазолина через реакции S_N2 .

Об образовании исключительно α -изомера соединения (2) можно судить по данным спектра ПМР, а именно по величине вицинальной константы спин-спинового взаимодействия сигнала протона при гликозидном атоме углерода ($J=6.7$ Гц) и исчезновении одного из сигналов, характерных для ацильных групп, это также согласуется с результатами работы [89].

Нуклеофильное раскрытие оксазолина (2) азидоэтанолом и аллиловым спиртом в присутствии кислоты Льюиса приводит к получению производных (3) и (4) и идет по S_N2 механизму [88,90].

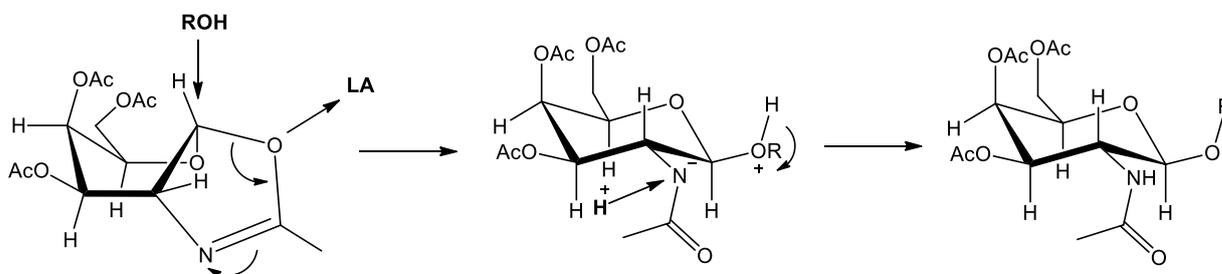


Рисунок 44. Нуклеофильное раскрытие оксазолинового цикла.

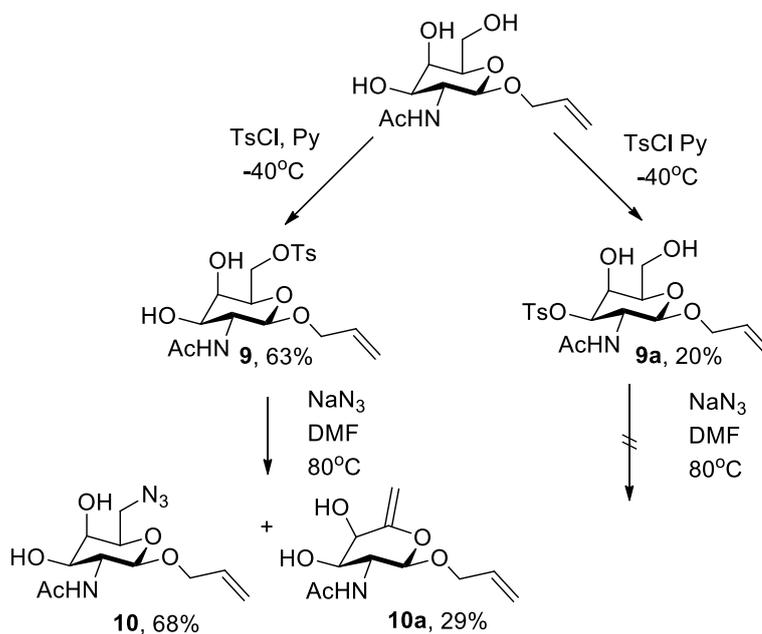
Реакция получения соединения (5) также идет через стадии образования и раскрытия оксазолинового цикла по механизму S_N2 , однако с небольшими отличиями: в качестве нуклеофила выступает азид-анион, и реакцию проводят без промежуточного выделения оксазолина (2) [91,86]. В каждом из описанных случаев раскрытия оксазолинового цикла образуется лишь β -продукт, что можно подтвердить, исходя из величин вицинальных констант спин-спинового взаимодействия сигнала протона при гликозидном атоме углерода в спектре ПМР представленных соединений ($J = 8.3$ Гц (3), $J = 8.3$ Гц (4), $J = 9.3$ Гц (5); что соответствует *транс*-положению заместителей при C2 и C1).

Далее реакцией алкоголиза в основной среде (MeONa в MeOH) удалили защитные ацильные группы с гидроксильных групп соединений (3), (4), (5), при этом не были затронуты ацетамидные группы данных соединений, поскольку продолжительность реакции была строго ограничена. Наличие только одного синглетного сигнала ацетамидной группы в области 1.7-2.1 м.д. спектров ПМР полученных соединений (6), (7), (8) говорит о полноте протекания реакции.

Азиды (7) и (8) далее использовали для синтеза фрагментов, отвечающих за связывание и конъюгатов лигандов ASGP-R с лекарственными агентами, а в аллильное производное (6) последовательными реакциями тозилрования и нуклеофильного замещения вводили азидогруппу в шестое положение. Первая стадия заключалась в тозилровании соединения (6) тозилхлоридом в пиридине. После колоночной хроматографии реакционной смеси были выделены два изомерных продукта тозилрования (9, 9a) по шестому и третьему положению галактопиразного цикла соответственно. Различие положения характерного сигнала протона при C3 (дублет дублетов $J = 2.8$ Гц и 10.9 Гц) в спектрах ПМР полученных соединений стало определяющим в установлении структуры изомеров. Для побочного продукта (9a) сигнал протона при C3 смещается в область слабого поля, в то время как для целевого продукта (9) смещается сигнал протона при C6.

Условия реакции тозилрования были оптимизированы для увеличения доли целевого продукта. Для протекания реакции как кинетически контролируемой была уменьшена концентрация раствора TsCl, а также температура проведения реакции (с 0°C до -40°C). В результате соединение (9) удалось получить с препаративным выходом 63%.

Еще одним доказательством структуры соединений (9) и (9a) являются результаты реакций нуклеофильного замещения тозильной группы на азидогруппу, которые проводили в условиях нагревания до 80°C в ДМФА с азидом натрия для соединений (9) и (9a), соответственно. Из реакционной смеси для тозилата по C6-положению (9) были выделены целевой азид (10) и побочный продукт E2-элиминирования (10a), в то время как для тозилата по C3-положению (9a) ни нуклеофильное замещение, ни элиминирование не протекало.



Объяснение подобных результатов заключается пространственной структуре тозилата (**9a**). Его наиболее стабильная конформация – та, в которой тозильная группа располагается в экваториальном положении. Тогда для реакция S_N2 -замещения возникают значительные стерические затруднения, а реакция элиминирования не может протекать ввиду отсутствия достаточно сильных оснований (E_2) и неустойчивости карбокатионов (E_1).

3.4 Синтез фрагментов, отвечающих за связывание.

Финальной стадией синтеза фрагментов, отвечающих за связывание (Рис.40), являлась реакция медь-катализируемого [3+2] азид-алкиновое циклоприсоединения между полученными азидами (**7**), (**8**), (**10**) и (*мета*-этинилфенокси)уксусной кислотой (**11**).

Фрагмент, содержащий терминальную тройную связь, (**11**) синтезировали из этил-2-бромацетата и *мета*-этинилфенола. Увеличение нуклеофильности фенольной группы происходило за счет ее депротонирования в основной среде, полученный таким образом нуклеофильный агент вступал в реакцию S_N2 замещения с этил-2-бромацетатом и в дальнейшем подвергался гидролизу по сложноэфирной связи. Сигналы, характерные гидроксильной группе фенола и этильному заместителю сложного эфира, не были обнаружены на спектре ПМР соединения (**11**).

Реакцию [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения проводили для азидов (**7**), (**8**), (**10**) и алкина (**11**) в присутствии сульфата меди и аскорбата натрия. При восстановлении

Cu^{2+} аскорбатом натрия образуется одновалентная медь (Cu^+), которая и катализирует данную реакцию (Рис. 45):

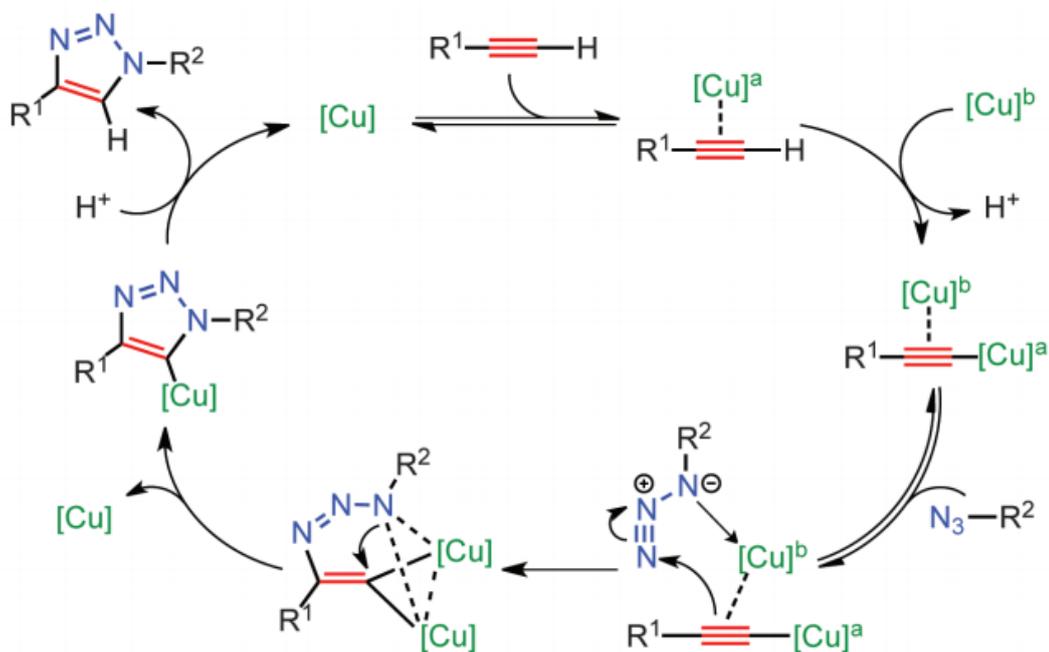
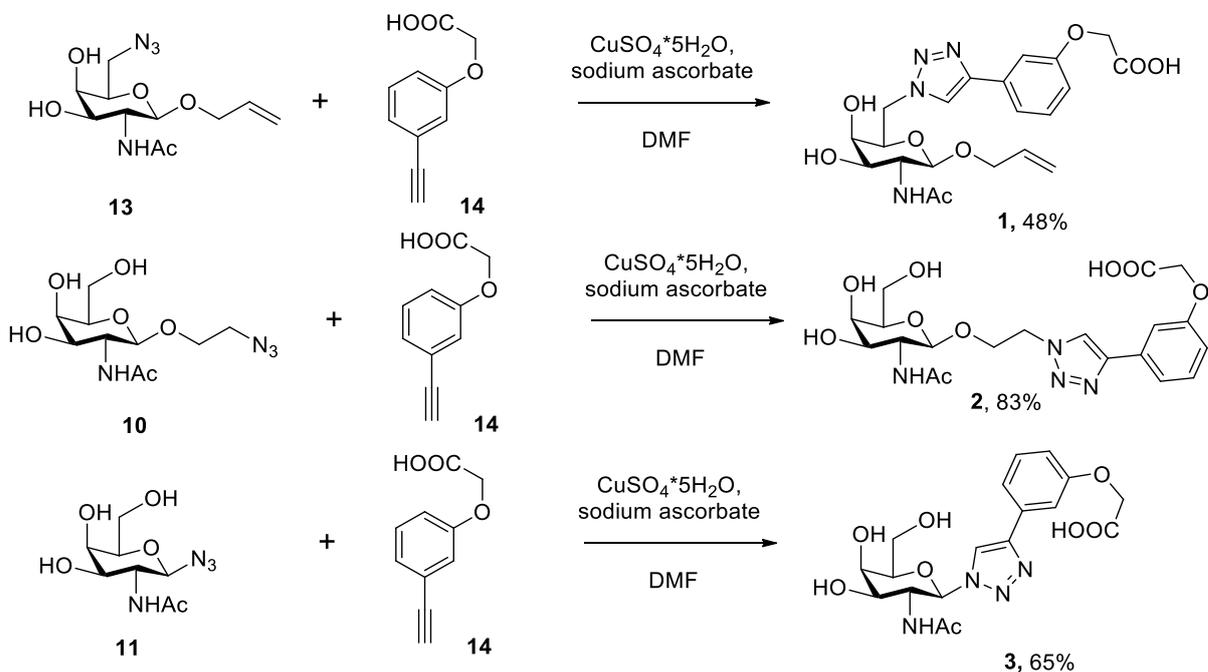


Рисунок 45. Каталитический цикл реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения

О получении целевого продукта реакции указывает наличие синглетного сигнала протона триазольного цикла в спектрах ПМР полученных соединений в области слабого поля (8.53 м.д. (**12**), 8.15 м.д. (**13**), 8.60 м.д. (**14**)).



3.5. Синтез модельных триантеннарных лигандов ASGP-R

Следующим этапом работы был синтез модельных триантеннарных лигандов (Рис. 46) и исследование их связывания с ASGP рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса.

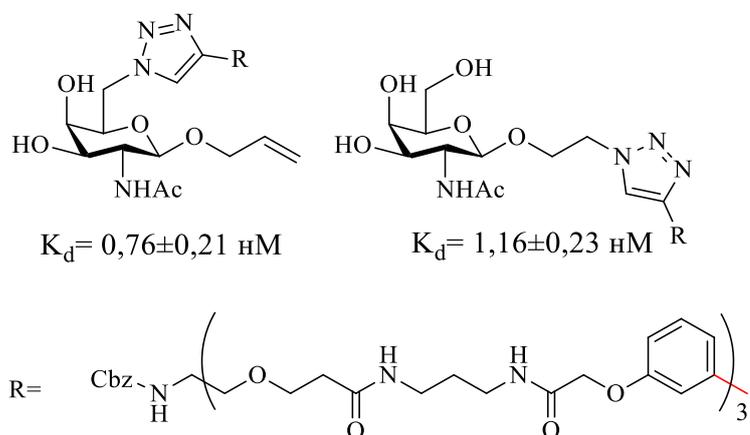
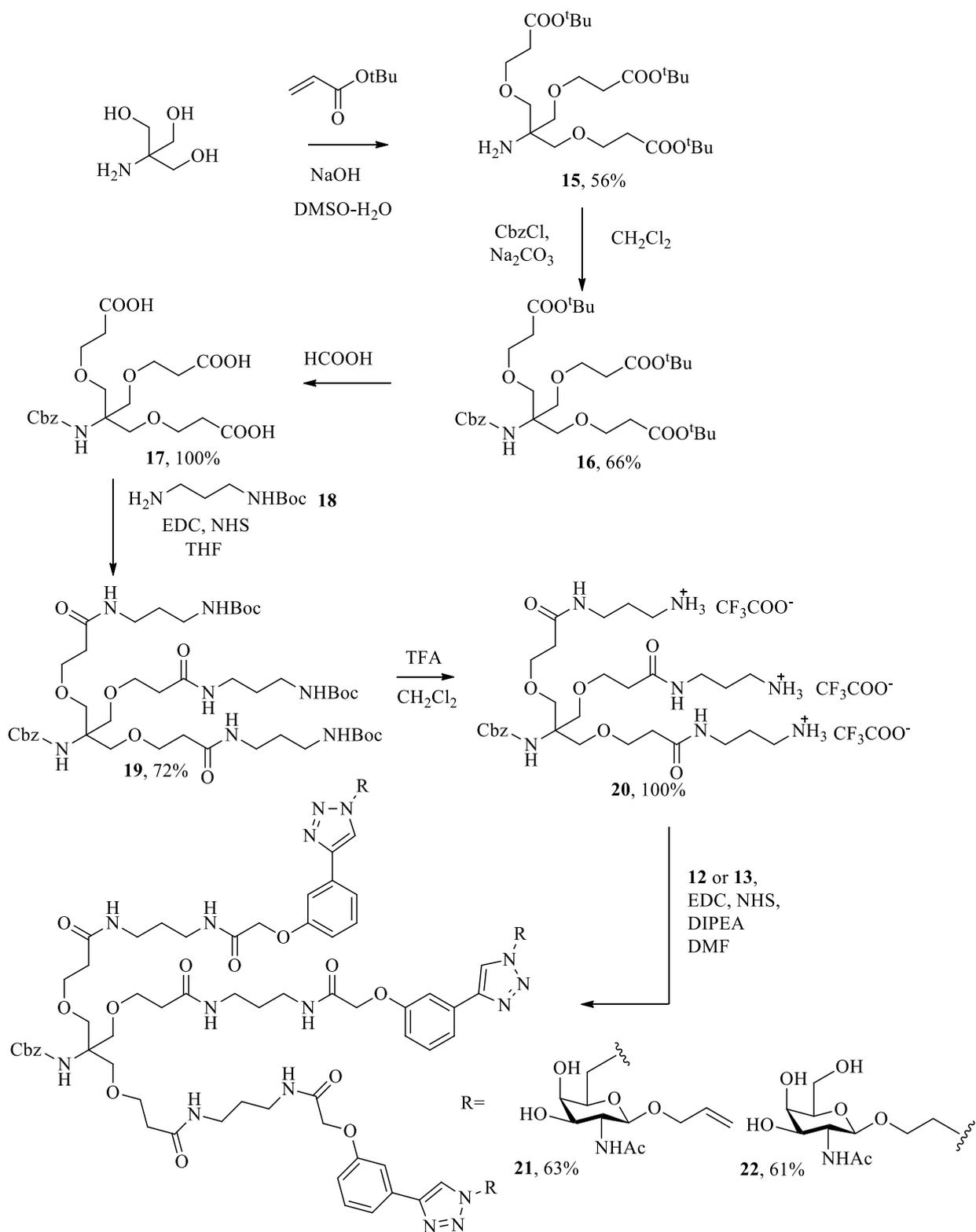


Рисунок 46. Модельные триантеннарные лиганды ASGP-R и их константы диссоциации, измеренные методом ППР.

Синтез модельных лигандов проводился в соответствии с представленной ниже схемой. На первой стадии было проведена реакция 1,4-присоединения по Михаэлю трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS) к *трет*-бутилакрилату. Авторы методики [51], согласно которой проводился синтез, оптимизировали условия реакции таким образом, чтобы увеличить нуклеофильность гидроксильных групп по сравнению с аминогруппой путем их депротонирования в основной среде. После разделения нами реакционной смеси методом колоночной хроматографии не было обнаружено продуктов присоединения аминогруппы к α,β -ненасыщенному эфиру, однако были выделены побочные продукты моно- и диалкилирования TRIS по гидроксильным группам.



Сопряженное присоединение нуклеофильного агента в β -положение енона приводит к енолят-иону в качестве интермедиата, который после протонирования по α -углеродному атому образует насыщенный продукт присоединения. Конечный результат

соответствует, таким образом, формальному присоединению по двойной углерод-углеродной связи без затрагивания карбонильной группы [87].

О получении целевого продукта свидетельствует отсутствие характерных сигналов протонов при двойной связи *трет*-бутилакрилата в спектре ПМР в области 4.5-6.0 м.д., а также наличие триплетных сигналов протонов 3.60 и 2.41 м.д. для -O-CH₂- и -CH₂-COO- соответственно.

На следующей стадии осуществили постановку защитной Cbz-группы на аминогруппу. Для ацилирования аминогруппы использовали хлорангидрид (Cbz-Cl). Выделяющийся в ходе реакции HCl нейтрализовали при помощи Na₂CO₃. О прохождении реакции судили по исчезновению сигнала аминогруппы и появлению сигналов амидной группы при 5.31 м.д., а также сигналов характерных для Cbz-группировки: ароматических в районе 7.26-7.40 м.д и O-CH₂-Ph при 5.03 м.д.

Отщепление *трет*-бутильных групп с получением трикислоты (**17**) проводили обработкой продукта (**16**) 100% муравьиной кислотой. Преимуществами данной реакции являются: количественный выход, легкое и быстрое удаление муравьиной кислоты при пониженном давлении. В спектре ПМР продукта реакции отсутствовали сигналы характерные для *трет*-бутильных групп, в районе (1.40-1.50 м.д.).

Параллельно синтезировали моно-Вос производное 1,3-диаминопропана (**18**). Чтобы получить моно-продукт, использовали эффект разбавления. Раствор одного эквивалента Вос₂O аккуратно прикапывали к 1,3-диаминопропану в щелочной среде. Образование целевого продукта реакции подтверждали с помощью спектров ПМР (по наличию сигналов *трет*-бутильной группы (1.43 м.д.) и аминогруппы с соответствующим относительным интегралом).

Затем соединения (**17**) и (**18**) вводили в реакцию карбодиимидного синтеза, используя систему EDC/NHS. В спектре ПМР продукта реакции (**19**) присутствуют сигналы *трет*-бутильных групп (1.5-1.7 м.д.) и отсутствуют сигналы карбоксильных групп (10-12 м.д.), что свидетельствует о прохождении реакции.

Для удаления защитных Вос-групп использовали трифторуксусную кислоту. Сигналы *трет*-бутильных групп в спектре ПМР (1.40-1.50 м.д) продукта (**20**) отсутствуют, однако присутствует сигнал аммонийной группы (-NH₃⁺) (7.78 м.д.), что подтверждает прохождение реакции.

Конечная стадия синтеза модельного триантеннарного лиганда заключалась в образовании амидных связей между полученными галактозными производными (**12**, **13**) и фрагментом ветвления (**20**) согласно схеме на с. 52. Амид получали в присутствии EDC/NHS. Помимо этого для активации аминогруппы добавляли третичный амин (DIPEA). Продукты реакции выделялись с помощью колоночной хроматографии. Наличие целевого продукта подтверждалось при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР ¹H. Исчезновение в спектрах ЯМР ¹H характерного сигнала амонийных групп (~7.8 м.д.) свидетельствует об образовании целевого продукта.

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

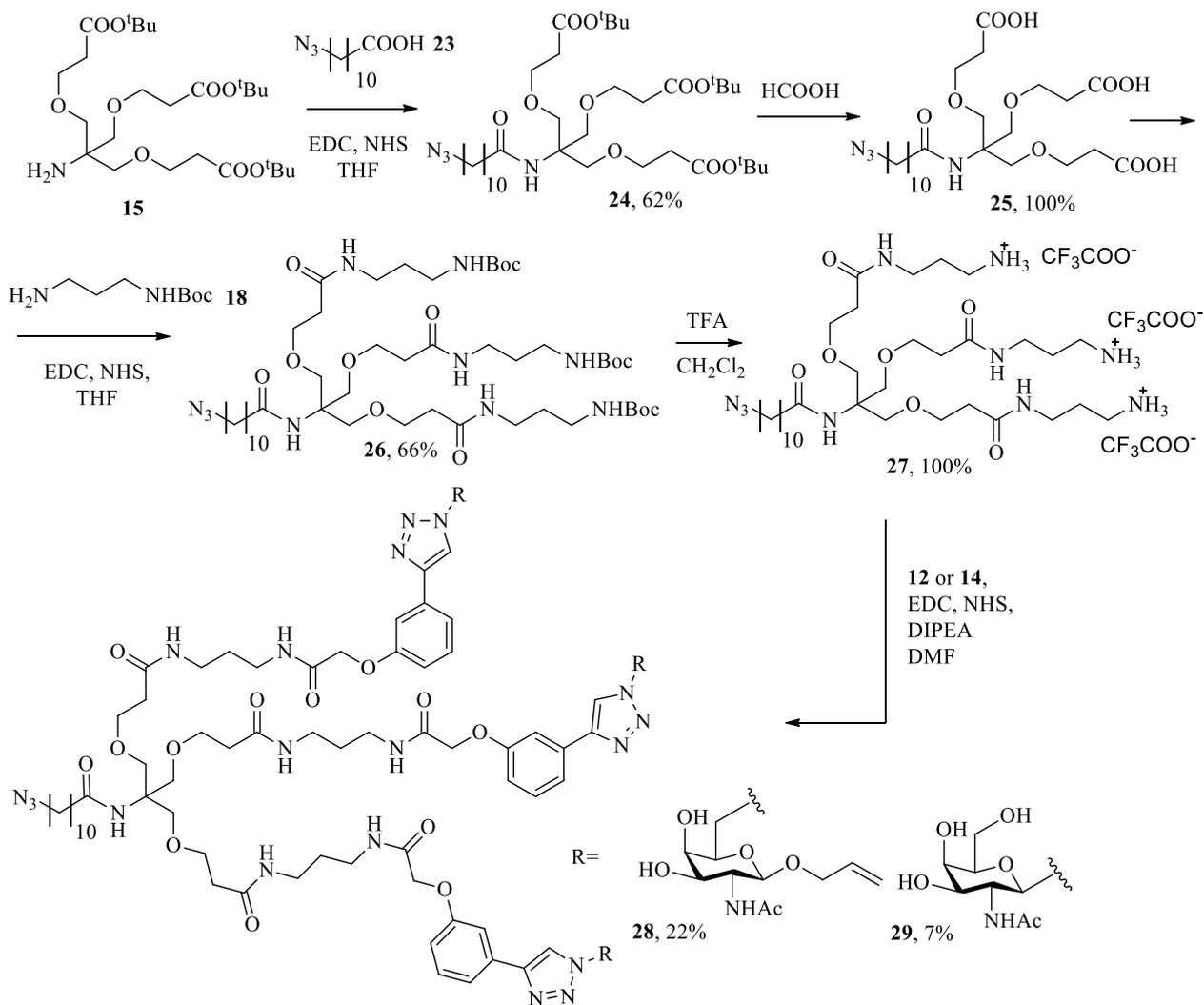
Полученные лиганды были протестированы методом поверхностного плазмонного резонанса². В процессе проведения анализа устанавливается связь между изменением аналитического сигнала и изменением массы иммобилизованного на подложке рецептора в ходе обратимого образования лиганд-рецепторного комплекса в контролируемом проточном режиме. Данный метод позволяет изучать межмолекулярное взаимодействие без необходимости метить реагенты какими-либо метками, и его применимость не зависит от спектральных характеристик исследуемых соединений; чувствительность метода позволяет работать с малыми количествами веществ.

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 полученных нами соединений. Важно также отметить, что полученные триантеннарные лиганды ASGP-R показали весьма близкие значения констант диссоциации, существенно не зависящие от расстояния между углеводным и триазольным циклами и места присоединения триазольного цикла к пиранозному, то есть данные параметры не оказывают заметного влияния на сродство к сайту связывания. Это наблюдение позволяет использовать более простые синтетические методы для получения галактозаминных лигандов, сократить количество стадий синтеза лиганда и увеличить конечные выходы.

² Данная часть работы выполнена совместно с сотрудником кафедры химической энзимологии м.н.с. Лопуховым А.В.

3.6. Синтез целевых триантеннарных лигандов ASGP-R

В качестве следующей стадии синтеза первоначально представлялось логичным удалить с модельных лигандов защитные Cbz-группы и ввести линкер для связывания препарата с лекарственным агентом. Однако при удалении Cbz-группы как в кислотных, так и в восстановительных (H_2 на Pd/C) условиях происходило разрушение углеводного фрагмента. Поэтому схема синтеза целевых лигандов была модифицирована следующим образом;



Главным отличием этой схемы от предыдущей (см. с. 52) является введение линкера на начальной стадии синтеза. Для стадии наращивания линкера необходима 11-азидоундекановая кислота (**23**), которая позволяет создать необходимое расстояние между лигандом и лекарственным препаратом, позволяющее нивелировать возможные негативные пространственные эффекты, а также содержит азидо-группу, благодаря

которой возможно соединить лиганд и лекарственный препарат реакцией [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения, не затрагивая другие функциональные группы. Синтез кислоты (**23**) предполагал реакцию нуклеофильного замещения атома брома в 11-бромундекановой кислоте на азидогруппу. Данную реакцию проводили в соответствии с S_N2 механизмом в полярном апротонном растворителе. Прохождение реакции подтверждает смещение мультиплетов H_2C^{11} и H_2C^{10} в область слабого поля в спектре ПМР продукта реакции.

Соединения (**24**) синтезировали при помощи метода карбодимидного синтеза. В качестве систем для активации карбоксильной группы в реакции образования амидной связи применялись 3-[бис(диметиламино)метил]-3Н-бензотриазол-1-оксид гексафторфосфат (HBTU) и 3-(этилиминометиленамино)-N,N-диметилпропан-1-амин (EDC), при использовании последнего выходы реакции были выше. О прохождении реакции свидетельствует отсутствие характерных сигналов в области 10 – 11.5 м.д. (уширенный синглет -COOH) и в области 1-3 м.д. (синглет $-NH_2$), а также наличие характерного сигнала амидной группы 6-7.5 м.д.

Остальные стадии синтеза были выполнены в соответствии с предыдущей схемой (см. раздел 3.5). 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 ($K_D(\mathbf{28}) = 0.76 \pm 0.25$ нМ, $K_D(\mathbf{29}) = 1.1 \pm 0.3$ нМ), что говорит о том, что введение линкера не сказывается на связывании с рецептором.

Таким образом, была выполнена первая задача диссертационной работы, предполагавшая синтез новых высокоэффективных лигандов ASGP-R. Данные лиганды (**28**) и (**29**) действительно продемонстрировали аффинность к рецептору, на несколько порядков превышающую аффинность нативного лиганда. В дальнейшем с соединениями (**28**) и (**29**) планируется осуществить конъюгацию с лекарственными препаратами и для полученных конъюгатов провести биологические тесты на цитотоксичность. Однако синтез лигандов (**28**) и (**29**) представлял значительную сложность и с трудом подвергался масштабированию, поэтому было решено апробировать методики синтеза конъюгатов с лекарственными препаратами на более простых модельных лигандах и вместе с тем

реализовать стратегию, заключающуюся в использовании лекарственного препарата в качестве точки ветвления.

3.7. Синтез упрощенных конъюгатов моно- и дивалентных лигандов 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.47). При этом исходный препарат должен содержать несколько однотипных функциональных групп, которые можно было бы подвергнуть модификации адресным фрагментом без потери фармакологической активности. В случае успеха подобный подход может позволить существенно упростить синтез соединений для направленной доставки.

Для получения подобных упрощенных конъюгатов препараты, предложенные в разделе 3.2, 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.

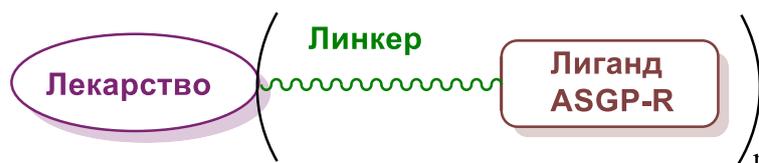
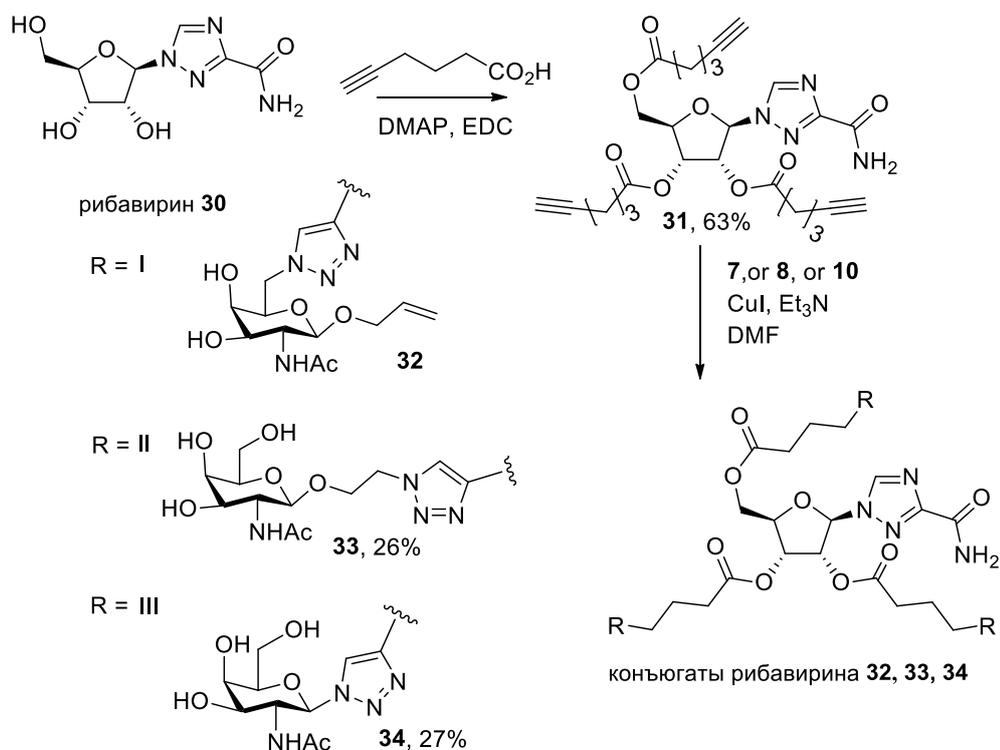


Рисунок 47. Общая структура синтезируемых конъюгатов.

3.7.1. 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**) с выходом 63%. Реакцию проводили в CH₂Cl₂ в присутствии EDC и DMAP, по методике, описанной для ацилирования пент-4-иновой кислотой паклитаксела [92]. Такой метод этерификации, протекающей в исключительно мягких условиях, был выбран, поскольку модифицируемый лекарственный препарат содержит несколько разных функциональных групп различной реакционной способности.

На первом этапе реакции происходит взаимодействие карбодиимида с кислотой с образованием O-ацильного промежуточного соединения. Если этерификация происходит медленно, протекает побочная реакция, уменьшающая конечный выход и осложняющая очистку продукта, и представляющая собой 1,3-перегруппировку O-ацильного промежуточного соединения в N-ацилмочевину, которая неспособна далее реагировать со спиртом. DMAP подавляет эту побочную реакцию, действуя как переносчик ацильной группы [93].

Следует отметить, что исходный рибавирин плохо растворим в выбранном растворителе, а продукт ацилирования растворим хорошо; таким образом можно легко отделить непрореагировавшее исходное вещества и другие побочные продукты. Окончательная очистка полученного соединения проводилась методом колоночной

хроматографии в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$. Полученный продукт был охарактеризован данными ЯМР ^1H и МСВР (масс-спектрометрии высокого разрешения).

В дальнейшем производное **(31)** конъюгировали с полученными лигандами посредством реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого солями Cu(I) (CuAAC; copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition). В результате были получены конъюгаты лигандов и рибавирина, соединенные через 1,2,3-триазольные фрагменты, в которых заместители находятся в 1 или 4 положениях лигандов. CuAAC является региоселективным процессом и даёт 1,4-дизамещенные 1,2,3-триазолы в качестве единственных продуктов[94].

При осуществлении этой реакции в условиях, которые были испробованы нами ранее, мы столкнулись с проблемой гидролиза сложноэфирной связи. В литературе описано много вариантов проведения азид-алкинового присоединения, катализируемого Cu(I) , различающихся растворителями, катализаторами и их количеством, условиями проведения [95,96,97,98,99]. В ходе подбора условий реакции нами были опробованы следующие варианты (Табл. 6): 1) аскорбат Na, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{DMFA}-\text{H}_2\text{O}$; в результате выделен продукт гидролиза сложноэфирной связи с образованием рибавирина и продукта клик-реакции между гекс-5-иновой кислотой и лигандом; 2) аскорбат Na, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$; результат аналогичен 1 варианту; 3) CuI/MeOH , в результате получили продукт перэтерификации сложноэфирной связи с образованием рибавирина и продукта клик-реакции между гекс-5-иновой кислотой и метиловым эфиром лиганда; 4) CuI/DMFA , в результате получился целевой конъюгат с выходом 9%; 5) CuI , $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMFA}$, кол-во CuI , Et_3N 0,3 экв на каждый образующийся триазольный фрагмент, при высоком разбавлении, в результате получился продукт конъюгирования с выходом 27% .

Таблица 6. Подбор условий реакции [3+2] - азид-алкинового циклоприсоединения.

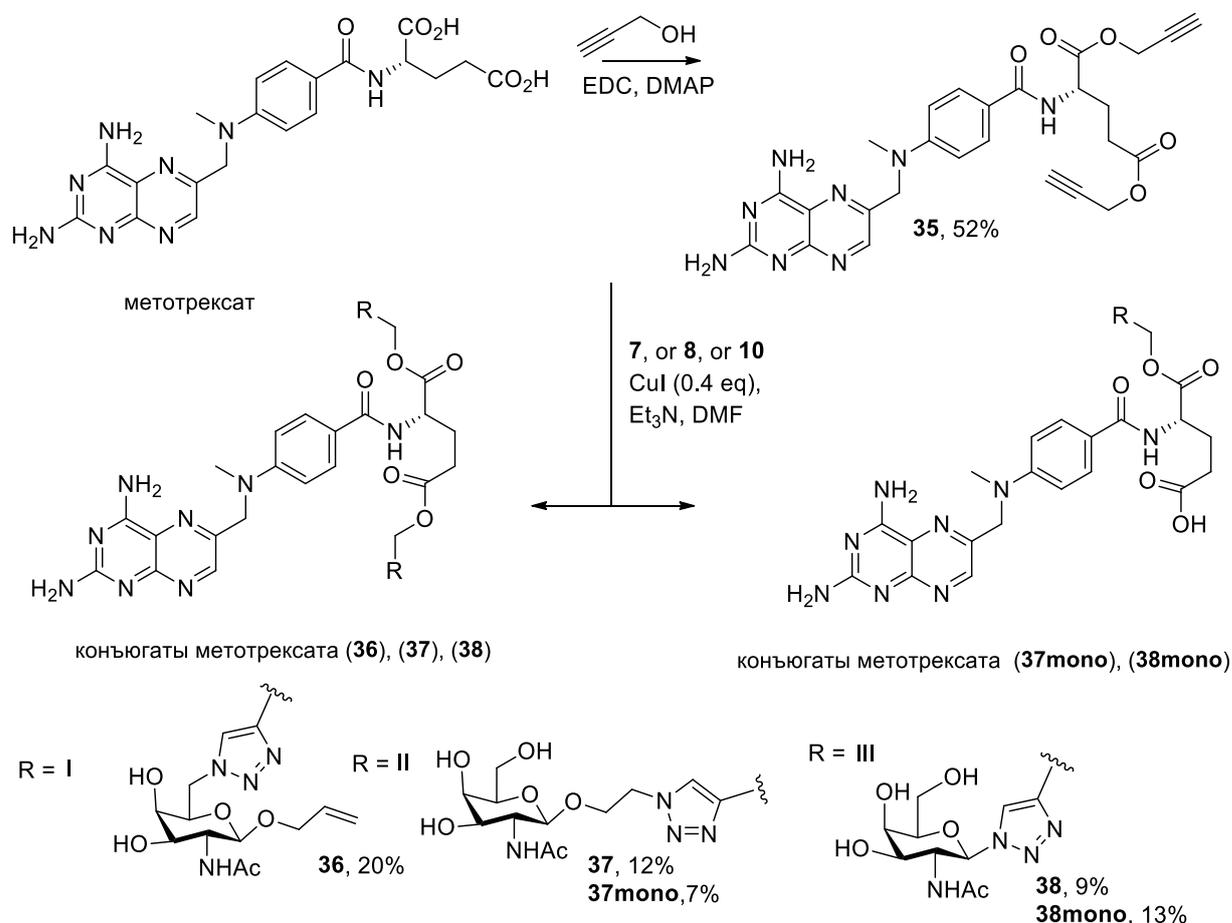
Растворитель	Катализатор	Результат реакции
DMFA- H ₂ O	аскорбат Na (3 экв.), CuSO ₄ *5H ₂ O (3 экв.)	Гидролиз сложноэфирной связи
MeOH	аскорбат Na (3 экв.), CuSO ₄ *5H ₂ O (3 экв.)	Гидролиз сложноэфирной связи
MeOH	CuI (9 экв.)	Переэтерификация сложноэфирной группы
DMFA	CuI (0.9 экв.)	9% продукта конъюгирования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

Выделение продуктов **(33)**, **(34)** осуществлялось путем двукратного хроматографирования: вначале методом колоночной хроматографии в системе CH₂Cl₂:MeOH, затем методом ВЭЖХ в обращенно-фазовой системе H₂O–MeCN. Конъюгат **(32)** был очищен методом колоночной хроматографии в системе CH₂Cl₂: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.

О получении продуктов реакции **(33)**, **(34)** можно судить по появлению в области слабого поля в спектрах ЯМР ¹H характеристичных пиков при 7.7-7.8 м.д. с суммарной интенсивностью равной трем, отвечающих протонам при C5-положении в 1,4 – замещенном 1,2,3-триазольном кольце.

3.7.2. Синтез производных метотрексата.

Производные метотрексата (**36**), (**37**), (**38**) были получены 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**), выделенный методом препаративного хроматографического разделения. Альтернативно продукт (**35**) также выделяли методом колоночной хроматографии в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ с последующей ВЭЖХ в обращено-фазовой системе ($\text{H}_2\text{O}-\text{MeCN}$). Строение продукта подтверждали методами ЯМР ^1H и МСВР.

Конъюгирование было осуществлено в условиях реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения, оптимизированных на примере реакции с рибавирином (раздел 3.7.1), но с использованием 0,4 экв. CuI и Et_3N , с получением ранее не описанных продуктов (**36**), (**37**), (**38**). Продукты выделяли путем последовательных

хроматографических разделений, а затем методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O–MeCN). Структура продуктов подтверждали методами ЯМР ¹H и МСВР.

О получении продуктов реакции (36), (37), (38) свидетельствует появление в спектрах ЯМР ¹H в области слабого поля новых характеристичных пиков с суммарной интенсивностью равной двум, отвечающих протонам при C5 в 1,4–замещенном 1,2,3–триазольном кольце.

В случае реакции (35) с (8) в качестве продуктов образуется смесь соединений (38) и (38mono) – целевого конъюгата и продукта его гидролиза по одной из сложноэфирных групп. Соединения (38) и (38mono) были разделены методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O–AcCN). Структура продукта (38mono) (Рис. 48) была определена с использованием метода двумерной ¹H - ¹³C ЯМР спектроскопии gHMBC. Полученный спектр соединения (38mono) показан на Рис. 49.

В случае реакции (35) с (7) в качестве продуктов также образуется смесь соединений (37) и (37mono) – целевого конъюгата и продукта его гидролиза по одной из сложноэфирных групп. Соединения (37) и (37mono) были разделены методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O–MeCN). По аналогии с побочным продуктом (38mono) реакции получения конъюгата (38) нами была предложена структура (37mono), представленная на Рис. 48.

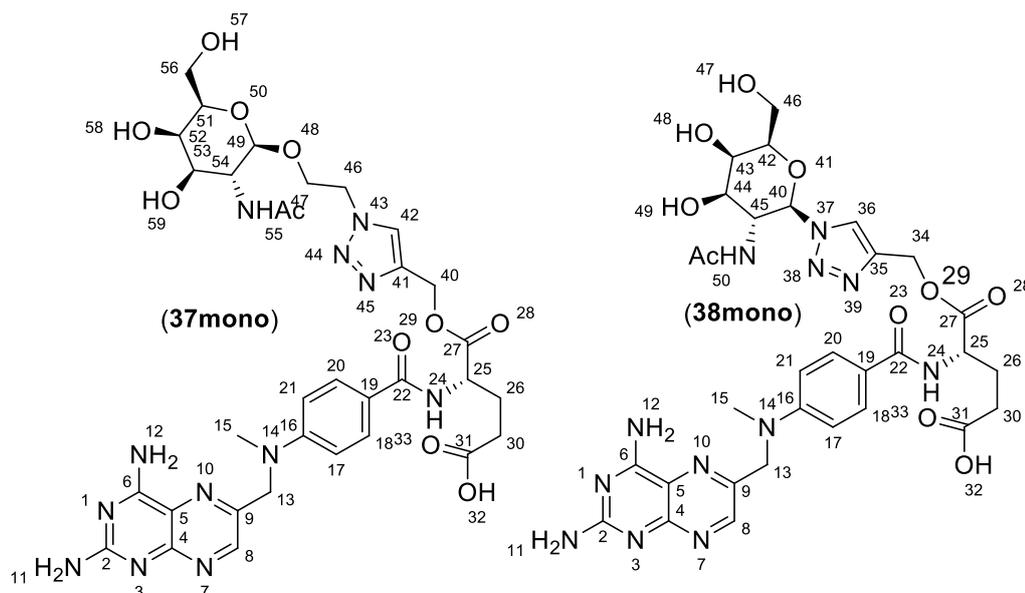


Рисунок 48. Структура продукта (37mono) и продукта (38mono).

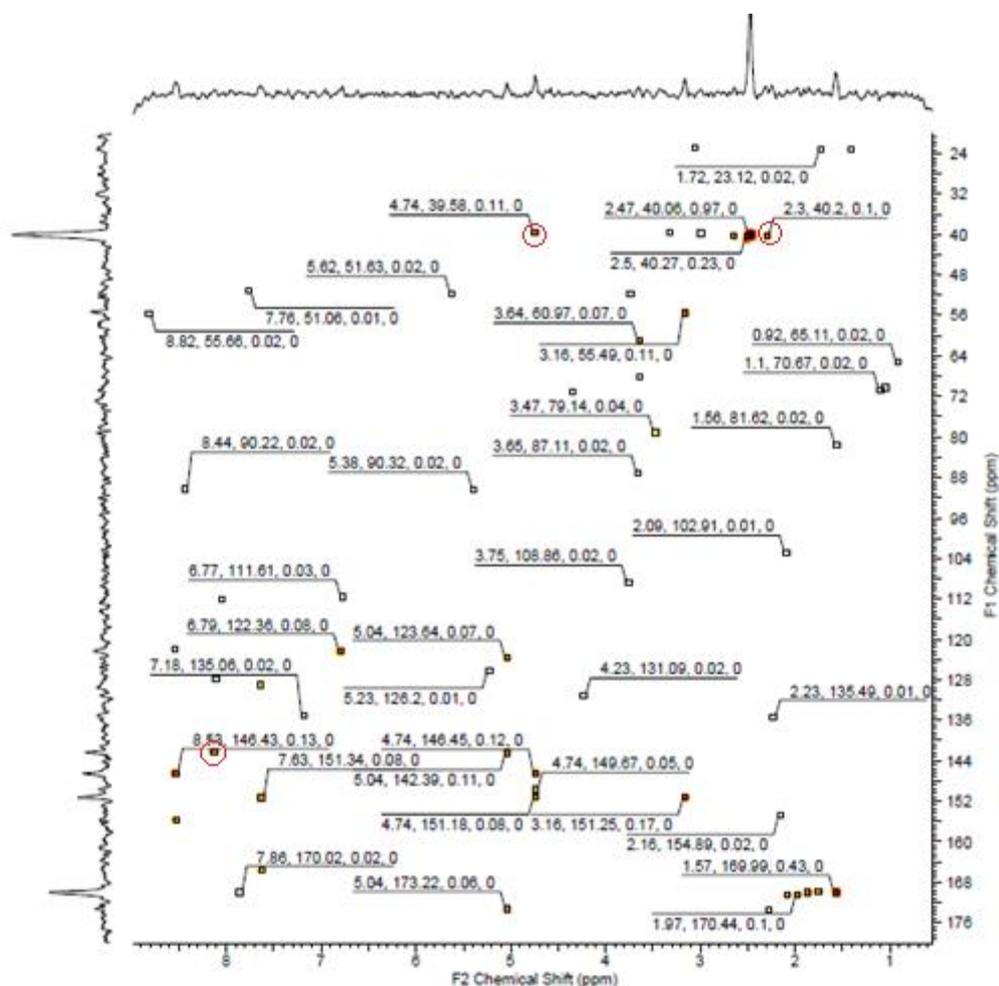


Рисунок 49. Двумерный ^1H - ^{13}C ЯМР спектр gНМВС соединения (**38mono**) в ДМСО- d_6 .

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 [100] 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.). Соответствующие кросс - пики отмечены на Рис. 49. 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).

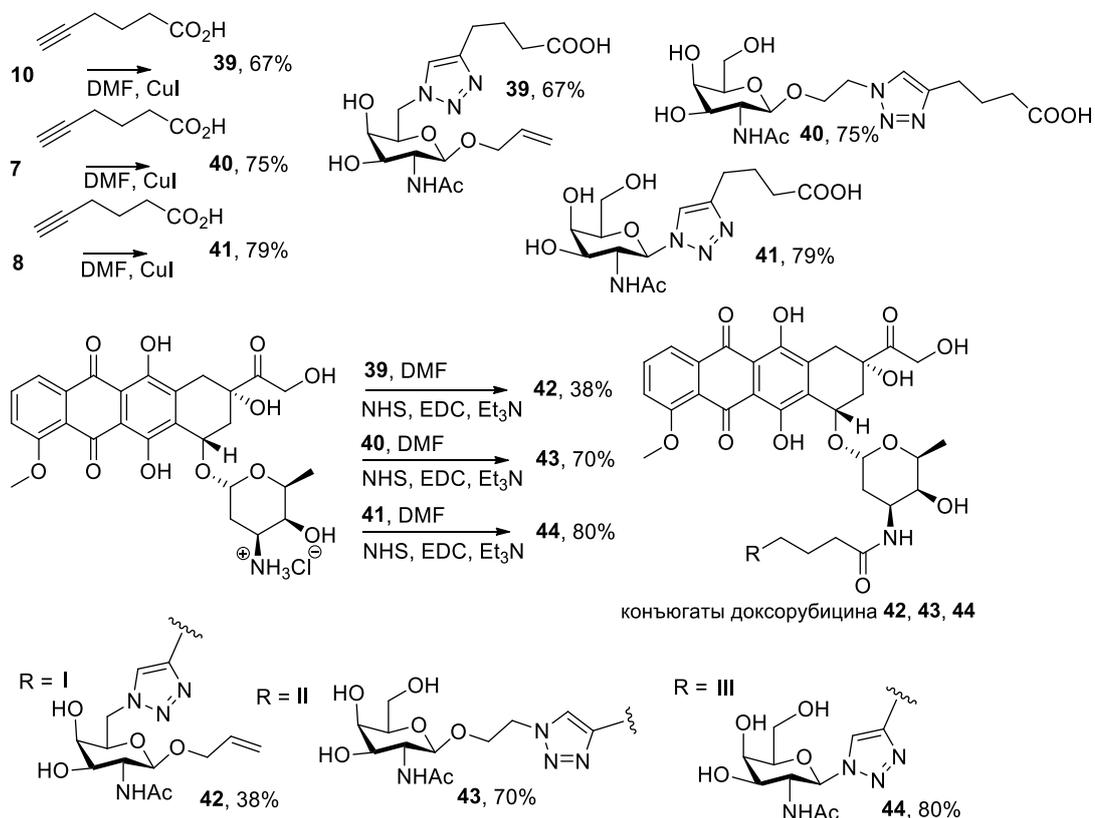
Протекание гидролиза по группе $\text{C}^{31}(\text{O})$ согласуется с большей кислотностью соответствующей карбоксильной группы (для RC^{31}OON $\text{pK}_{a1}=2,89$, для RC^{27}OON

$pK_{a2}=4,41$ [101]), а также большей пространственной доступностью группы $RC^{31}OON$ для гидролиза.

3.7.3. Синтез производных доксорубина.

Производные доксорубина (**42**), (**43**), (**44**) синтезированы по схеме, приведенной ниже.

Схема получения конъюгатов доксорубина отличается от получения ранее описанных производных тем, что присоединение лиганда с линкером осуществлялось на заключительной стадии синтеза, после [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения гекс-5-иновой кислоты к лигандам. В результате были получены не описанные в литературе производные доксорубина (**42**), (**43**), (**44**), соединенные с лигандами через амидную связь.



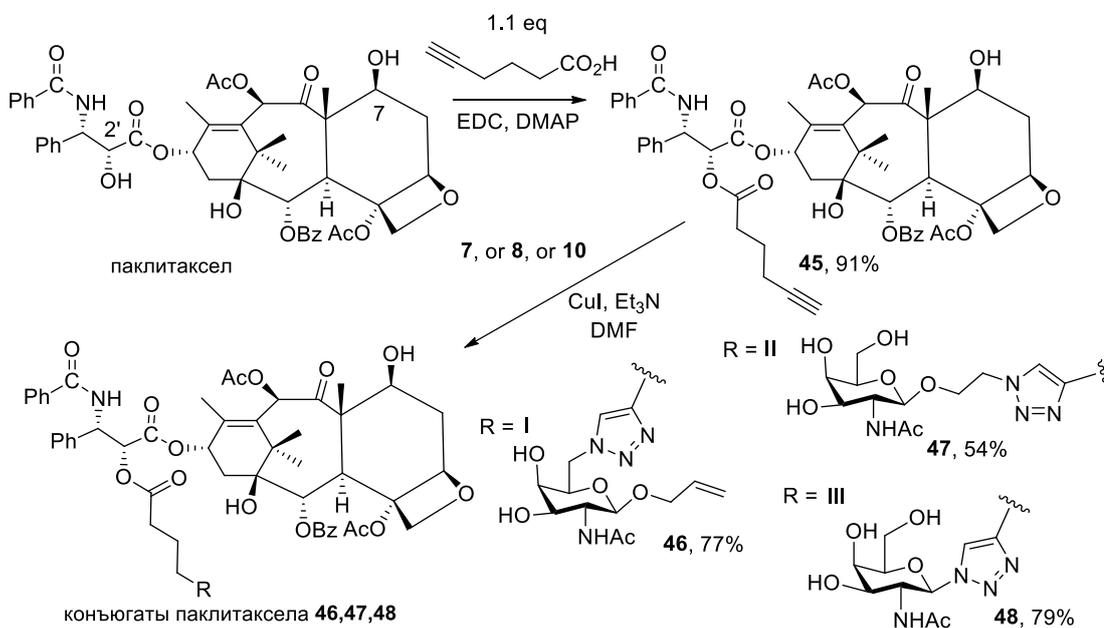
Клик-реакции в данном случае протекают с высокими выходами во всех вариантах, рассмотренных для конъюгирования рибавирина. Об образовании целевых продуктов можно судить по характеристичным пикам триазольных протонов в спектрах ЯМР 1H при 7.79-8.03 м.д. а также МСВР.

Далее соединения (39), (40), (41) вводили в реакции с гидроклоридом доксорубина по методике карбодимидного синтеза [102]. Использование NHS подавляет побочную реакцию 1,3-перегруппировки O-ацильного интермедиата, приводящую к N-ацилмочевине, действуя как ацил-транспортирующий-реагент. [103]

Выделение продуктов осуществлялось вначале методом колоночной хроматографии в системе CH₂Cl₂:MeOH, а затем методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O–MeCN). Следует отметить, что в литературе не описано получение и выделение подобных производных. Полученные конъюгаты (42), (43), (44), были охарактеризованы методами ЯМР ¹H и МСВР.

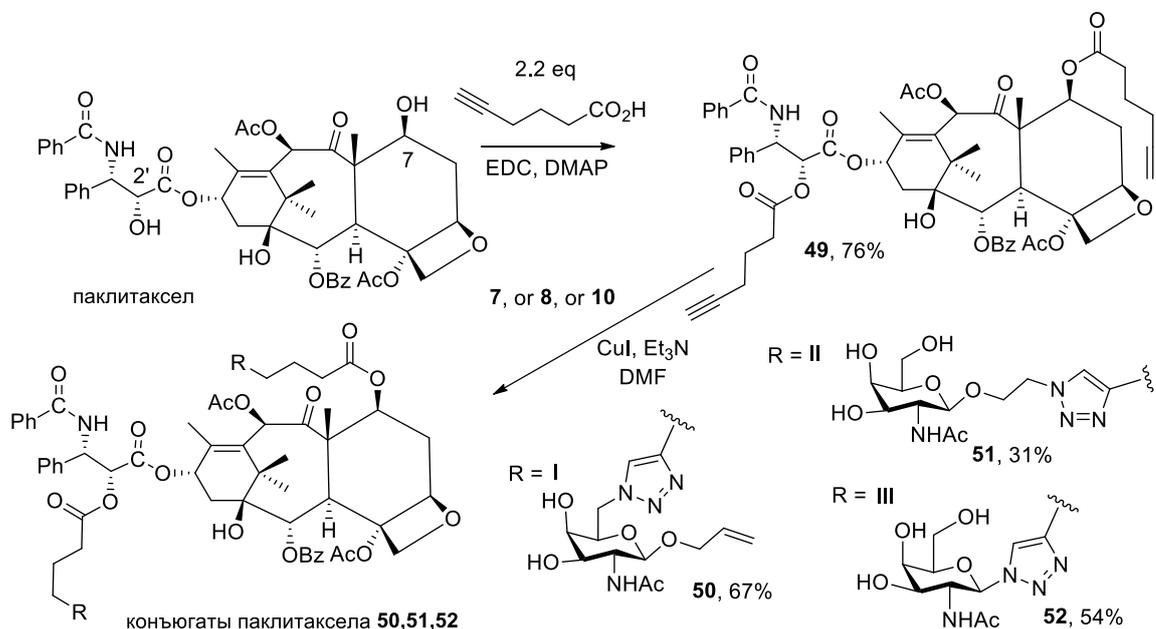
3.7.4. Синтез производных паклитаксела.

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



Молекулу паклитаксела (РТХ) мы модифицировали по гидроксильным группам в С2' и С7 положениях, наиболее удобным для введения различных заместителей. Следует отметить, что для РТХ наиболее реакционноспособной является гидроксильная группа при углероде С2' в боковой цепи, меньшей реакционной способностью обладает гидроксильная группа при атоме С7. Это дает возможность селективно проводить модификацию группы HO-С^{2'}, не затрагивая С7 положение, или же модифицировать С2' и С7 положения одновременно. Нами было получено 6 конъюгатов данного препарата. Первоначальное ацилирование РТХ гекс-5-иновой кислотой проводили в CH₂Cl₂ в

присутствии EDC и DMAP, по методике.[92] Для получения моновалентных конъюгатов паклитаксела в реакцию вводили 1 экв. кислоты, в случае дивалентных конъюгатов - 2 экв. Полученные производные (45) и (49) были выделены на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 и охарактеризованы данными ЯМР ^1H спектроскопии. Экспериментально полученные спектры ЯМР ^1H полностью согласуются с литературными данными.[92]



Следующей стадией синтеза было конъюгирование соединений (45) и (49) с соединениями (7), (9), (11) по реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения по оптимизированной методике, с использованием CuI и Et₃N в количестве 0,2 и 0,4 экв. соответственно, с получением ранее не описанные в литературе производных (46), (47), (48) и (50), (51), (52). Продукты реакции очищали методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O-MeCN). Полученные соединения охарактеризованы данными ЯМР ^1H и МСВР.

О получении продуктов реакции (46), (47), (48) свидетельствует появлении в области слабого поля в спектрах ЯМР ^1H нового характеристичного пика с интенсивностью равной единице, соответствующего протону при C5 в 1,4-замещенном 1,2,3-триазольном кольце. Аналогично, об образовании соединений (50), (51), (52) можно судить по появлению в области слабого поля новых пиков с суммарной интенсивностью равной двум, отвечающих протону при C5 в 1,4-замещенном 1,2,3-триазольном кольце.

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

На заключительном этапе нами была исследована цитотоксичность полученных конъюгатов на культуре клеток ГЦК человека HepG2³. Известно, что, после выделения гепатоцитов из печени происходит уменьшение количества ASGP-R на поверхности [104]. В связи с этим нами была выбрана устойчивая, пролиферирующая клеточная линия HepG2, содержащая 76000 рецепторов на клетку [42]. Клеточная линия HepG2 является универсальным объектом для тестирования средств адресной доставки лигандов ASGP-R с противоопухолевыми препаратами [105]. Для оценки цитотоксического действия конъюгатов использовали стандартный MTS тест. MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий) является водорастворимым аналогом реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид). MTS тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток, также он может быть использован для измерения цитотоксичности или цитостатической активности (сдвиг от пролиферации к состоянию покоя) потенциальных лекарственных агентов и токсичных веществ. НАДФ-Н-зависимые клеточные оксидоредуктазные ферменты могут, при определенных условиях, отражать количество жизнеспособных клеток. Эти ферменты способны восстанавливать тетразолиевый краситель MTS в присутствии PMS (феназин метосульфат) в формазановый продукт с максимумом поглощения при 490—500 нм в фосфатном буферном солевом растворе (Рис.50) [106].

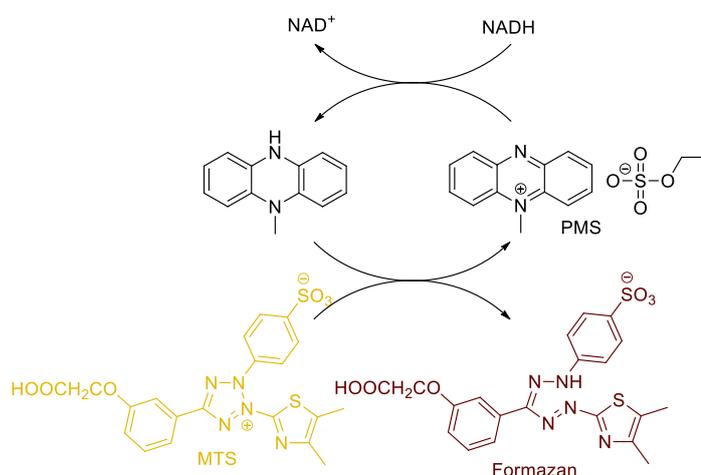


Рисунок 50. Схема MTS теста.

³ Данная часть работы выполнена совместно с н.с., к.м.н., Салтыковой И.В. (межкафедральная лаборатория тканеспецифичных лигандов химического факультета МГУ).

Для определения цитотоксичности клетки инкубировали с различными концентрациями конъюгатов в течение 48 часов. Далее в культуральную среду добавляли MTS и спектрофотометрически определяли поглощение красителя. По поглощению красителя оценивали жизнеспособность клеточной культуры.

3.8.1. Исследование цитотоксичности конъюгатов рибавирина.

Рибавирин - препарат, обладающий противовирусным действием, основным механизмом действия которого является встраивание в цепь ДНК и прекращения ее репликации. Однако сам по себе препарат рибавирин не обладает существенным цитотоксическим потенциалом. Так, для культуры HepG2 в концентрации до 150 мкМ при инкубации 48 ч не достигается 50% гибели клеток [107]. Аналогичные результаты были получены для конъюгатов (33) и (34) в наших исследованиях.

3.8.2. Исследование цитотоксичности конъюгатов метотрексата.

МТХ действует как химиотерапевтический противоопухолевый агент, с высокой аффинностью ингибируя дигидрофолатредуктазу (DHFR), что приводит к истощению тетрагидрофолатов, которые необходимы для синтеза пуринов и тимидилата. Вследствие этого синтез ДНК и РНК, а также другие метаболические реакции прекращаются [108].

На первом этапе нами была оценена цитотоксичность препарата метотрексата на клеточных линиях HepG2. Экспериментальное значение CC_{50} для свободного метотрексата представлены в публикации Де Вриеса и коллег. [109], которое составило величину порядка 9.3 ± 16.0 мкМ. В нашем исследовании для метотрексата получены аналогичные значения, для всех конъюгатов (36), (37), (38) значения CC_{50} не были достигнуты. Для конъюгатов (36), (37), (38) диапазон выживаемости составил от 100% до порядка 60% при разных концентрациях конъюгатов.

3.8.3. Исследование цитотоксичности конъюгатов доксорубина.

Доксорубин - противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, оказывающий антимиотическое и антипролиферативное действие. Механизм действия заключается во взаимодействии с ДНК, образовании свободных радикалов последующим подавлением синтеза нуклеиновых кислот [110].

Однако известно, что конъюгат является трудно расщепляемым в физиологических условиях, что приводит к изменению цитотоксического действия. На первом этапе нами

была оценена цитотоксичность препарата доксорубицина на клеточных линиях HepG2 и A549, значения CC_{50} составили соответственно $0,4 \pm 0,1$ мкМ и $1,54 \pm 0,14$ мкМ. Данные значения хорошо согласуются с литературными данными. [111,112]

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.

Для объяснения факта отсутствия существенной цитотоксичности конъюгатов использовался метод флуоресцентной микроскопии. Известно, что препарат доксорубицин обладает собственной флуоресценцией при возбуждении в 480-490 нм, что позволяет детектировать его накопление в культуре клеток HepG2. Были получены результаты, свидетельствующие о накоплении свободного доксорубицина в клеточном ядре, что обуславливает цитотоксическое действие препарата. В случае конъюгатов доксорубицина наблюдается накопление в цитоплазме, что косвенно объясняет отсутствие цитотоксичности конъюгатов (Рис. 51). 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.

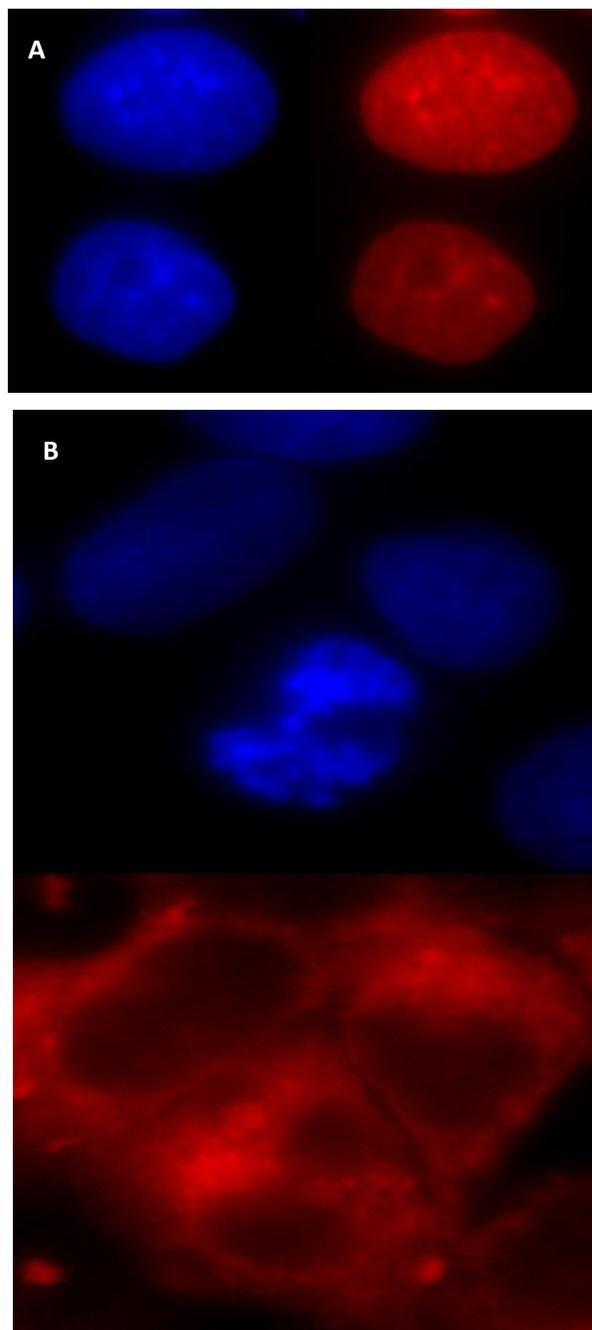


Рисунок 51. Снимки, сделанные при помощи микроскопа, доксорубицина – А (синим подсвечено ядро при помощи 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI), красным показано распределение доксорубицина) и характеристического распределения конъюгата (42) – В (синим подсвечено ядро при помощи DAPI, красным показано распределение конъюгата (42)). Время инкубирования - 24 часа.

3.8.4. Исследование цитотоксичности конъюгатов паклитаксела.

В рамках диссертационной работы были синтезированы две серии конъюгатов паклитаксела: моновалентные, модифицированные по С2' положению (46), (47), (48) и двухвалентные, модифицированные по С2' и С7 положениям (50), (51), (52), которые в дальнейшем исследовали на цитотоксичность на клеточной линии HepG2. Результаты исследования представлены в таблице 7. Экспериментальные данные цитотоксичности самого паклитаксела на клеточной линии HepG2 представлены в работе Луо и соавторов, а так же получены в настоящей работе. [113]

Таблица 7. Значения CC_{50} (мкМ) для конъюгатов паклитаксела.

№	(46)	(47)	(48)	(50)	(51)	(52)	PTX	PTX [113]
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). Наличие двух остатков N-ацетилгалактозы в структуре конъюгатов (50), (51), (52) предположительно, оказывает эффект на захват препарата внутрь клетки в случае наличия большего количества ASGP – R на поверхности. Конъюгаты (46), (47), (48) имеют меньший размер, чем (50), (51), (52) и большую липофильность, что, по-видимому, обуславливает иной механизм транспорта конъюгатов в клетку - рецептор независимый.

Известно, что конъюгаты противоопухолевых препаратов с адресными фрагментами обладают меньшей цитотоксичностью, чем исходные терапевтические агенты. Наличие остатка N-ацетилгалактозы в структуре конъюгатов в любом случае влияет на возможность препарата осуществлять свое биологическое действие. Даже присутствие расщепляемых фрагментов в структуре конъюгата, во времени *in vitro* эксперимента, не обеспечивает равноценный биологический эффект. Полученные данные,

в особенности, для конъюгатов (46), (47), (48), показывают, что указанные соединения имеют сравнимые значения CC_{50} с препаратом - паклитакселом. Следует ожидать, что рецептор зависимый транспорт конъюгатов (50), (51), (52) в экспериментах *in vivo*, будет приводить к снижению общей системной токсичности при эффективном противоопухолевом действии по сравнению с исходным препаратом.

Таким образом, 1) предложенная нами впервые стратегия использования лекарственного препарата в качестве фрагмента ветвления очень перспективна, однако требует доработки, ввиду, по всей видимости, недостаточного высвобождения лекарственных средств внутри клетки. Поэтому в ходе дальнейших исследований необходимо а) подтвердить механизм проникновения в клетку конъюгатов лекарственных препаратов с малыми лигандами ASGP-R путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, б) учесть специфику высвобождения лекарственных средств в клетке и испытать конъюгаты с более лабильной связью «терапевтический агент-линкер» (например, дисульфидной или гидразонной).

2) Введение фрагментов с терминальной тройной связью в структуру лекарственного препарата для последующей конъюгации с фрагментом, отвечающим за связывание, реакцией [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения более предпочтительно, нежели непосредственное введение лиганда ASGP-R, так как в первом случае снижается вероятность затронуть какую-либо функциональную группу лекарственного агента или лиганда, и тем самым расширяется спектр возможных лекарственных агентов, а также данная последовательность стадий более удобна в синтетическом плане, несмотря на то, что суммарные выходы конъюгатов получаются немного ниже.

3) 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, недостаточно высвобождаясь 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*.

4. Экспериментальная часть

4.1. Общие сведения.

Исходные 2-амино-2-дезоксид-β-D-галактопираноза, доксорубин гидрохлорид, паклитаксел представляли собой коммерчески доступные реагенты.

Использованные растворители были очищены и абсолютированы по методикам, приведенным в руководстве [114].

Контроль за ходом реакций осуществлялся методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля (Merck).

Спектры ЯМР ^1H были зарегистрированы на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 400 МГц. В качестве растворителей использовали: CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_3OD , D_2O , CD_3CN , ацетон-d₆. Химические сдвиги приведены в миллионных долях по шкале δ относительно гексаметилдисилоксана как внутреннего стандарта. Спектры ЯМР ^{13}C и были зарегистрированы на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 100 МГц.

Двумерные спектры были получены методом гетероядерной многосвязной корреляционной спектроскопии (gHMBC) на ядрах ^1H и ^{13}C на приборе Agilent 400 с рабочими частотами 400 МГц (^1H) и 100 МГц (^{13}C).

Масс-спектры с лазерной ионизацией регистрировали на приборе Autoflex II компании Bruker (разрешение FWHM 18000), оборудованном азотным лазером с рабочей длиной волны 337 нм и времяпролетным масс-анализатором, работающим в рефлекторном режиме. Ускоряющее напряжение 20 кВ. Образцы наносили на золотую подложку. Запись спектров производили в режиме положительных ионов. Результирующий спектр представлял собой сумму 300 спектров, полученных в разных точках образца.

Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре высокого разрешения Orbitrap Elite. Растворы образцов в ацетонитриле с 1% муравьиной кислоты вводили в источник ионизации методом электрораспыления.

ВЭЖХ: для очистки и анализа образцов использовали систему Shimadzu Prominence LC-20 с конвекционной колонкой и коллектором фракций, соединенным с одиночным квадрупольным масс-спектрометром Shimadzu LCMS-2020 с двойным

источником ионизации DUIS-ESI-APCI. Аналитической и препаративной колонкой была Phenomenex Luna 3u C18 100A.

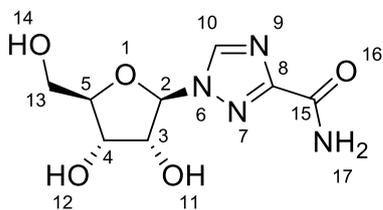
Препаративное хроматографическое разделение веществ проводили при помощи хроматографа INTERCHIM puriFlash 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012.

Исследование цитотоксичности веществ осуществляли при помощи устройства для считывания микропланшетов Thermo Fisher Varioskan Lux.

Исследование методом флуоресцентной микроскопии проводили с использованием системы для визуализации флуоресценции EVOS FL Cell Imaging System. С 40 – кратным увеличением.

4.2. Выделение исходных соединений.

Рибавирин (30)



10 Таблеток продажного препарата рибавирина с содержанием исходного вещества 0.2 г, с примесями вспомогательных веществ (лактоза, крахмал, метилцеллюлоза, стеарат магния), растолкли в ступке до порошкообразного состояния и выделили рибавирин одним

из двух представленных способов.

Вариант А. Порошок растворили в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ и выделили целевое вещество методом колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (20:1) \rightarrow MeOH).

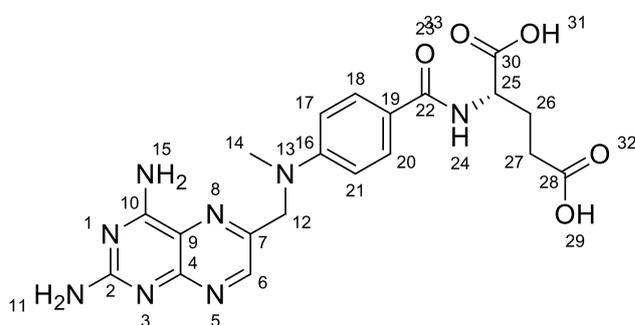
Вариант Б. К порошку добавили 50 мл EtOAc и перемешали в течение 10 минут. Затем отфильтровали осадок, просушили на воздухе, после поместили его в 50 мл EtOH, нагрели до кипения и перемешали в течение 10 минут. После чего отфильтровали осадок и удалили растворитель при пониженном давлении. Получили рибавирин в виде белого порошка. Выход 1.1 г (55%).

^1H ЯМР (DMSO- d_6 , δ , м.д., 400 МГц): 8.85 (с, 1H, H-10), 7.81–7.60 (д, 2H, $-\text{NH}_2$), 5.80 (д, 1H, $J=3.9$ Гц, H-2), 5.57 (д, 1H, $J=4.9$ Гц, H-3), 5.19 (д, 1H, $J=4.9$ Гц H-4); 4.90 (т, 1H, $J=5.4$

Гц, Н-5); 4.10-4.16 (м, 1Н, Н-13а) 3.90-3.97 (м, 1Н, Н-13b), 3.60 (уш. с, 1Н, ОН), 3.47 (уш. с, 1Н, ОН).[115]

МСВР (m/z): для $C_8H_{12}N_4O_5$ $[M+H]^+$ 245,0878 (найдено), 245,0880 (рассч.); $[M+Na]^+$ 267,0699 (найдено), 267,0699 (рассч.).

Метотрексат



Метотрексат выделили из препарата, представляющего собой натриевую соль в растворе воды в ампулах по 500 мг. Выделение проводили подкислением раствора лекарственной формы раствором 0.1 М НСl до рН =3 ($pK_{a1}=2.89$ и $pK_{a2}=4.41$ [101]), в результате чего выпал осадок,

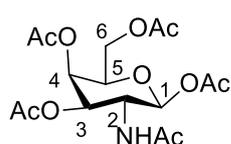
который центрифугировали, а затем промыли водой до нейтрального рН. Получили метотрексат в виде желтого порошка. Выход 432 мг (86%).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д.): 12.50 (уш. с, 1Н, Н-29, 31); 8.56 (с, 1Н, Н-6); 8.18 (д, 1Н, 7.6 Гц, Н-24); 7.71 (д, 2Н, 8.8 Гц, Н-18,20); 7.47 (уш. с, 2Н, Н-11 или 15); 6.81 (д, 2Н, 8.9 Гц, Н-17,21); 6.66 (уш. с, 2Н, Н-11 или 15); 4.77 (с, 2Н, Н-12); 4.29-4.36 (м, 1Н, Н-25); 3.19 (с, 3Н, Н-14); 2.30 (т, 2Н, $J=7.4$ Гц, Н-27); 2.01-2.06 (м, 1Н, Н-26); 1.87-1.93 (м, 1Н, Н-26).[100]

МСВР (m/z): для $C_{20}H_{22}N_8O_5$ $[M+H]^+$ 455,1785 (найдено), 455,1786 (рассч.); $[M+Na]^+$ 477,1609 (найдено), 477,1605 (рассч.).

4.3. Синтез промежуточных и конечных соединений

Синтез 2-ацетамидо-2-дезоксигалактопиранозы (1).[116]

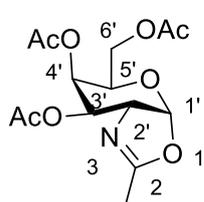


К раствору 5 г (23.19 ммоль) гидрохлорида 2-амино-2-дезоксигалактопиранозы в 30 мл Ру добавили 47.35 г (465.8 ммоль, 20 экв) Ac_2O и перемешивали в течение 8 часов при комнатной температуре.

Затем в реакционную смесь добавили H_2O , в результате выпал белый осадок, который промыли H_2O на стеклянном пористом фильтре до удаления остатков Ру и далее сушили на воздухе. В результате получили соединение (1) в виде белого порошка (8.04 г, 89%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д.): 7.90 (д, 1H, J=9.2 Гц, -NH); 5.62 (д, 1H, J=8.8 Гц, H-1); 5.25 (д, 1H, J=3.1 Гц, H-4); 5.04 (дд, 1H, J₁=3.4 Гц, J₂=11.3 Гц, H-3); 4.21 (м, 1H, H-2); 3.94-4.13 (м, 3H, H-5,6); 2.10 (с, 3H, -OAc); 2.02 (с, 3H, -OAc); 1.98 (с, 3H, -OAc); 1.89 (с, 3H, -OAc); 1.76 (с, 3H, -NHAc).

Синтез -2-метил-4,5-(2'-Дезокси -3',4',6'-три-О-ацетил- α -D-галактопирано)- Δ^2 -оксазолина (2).[116]

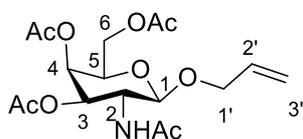


К раствору 6 г (15.41 ммоль) соединения (1) в 75 мл сухого $\text{Cl}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$ добавили 3.77 г (16.95 ммоль, 1,1 экв.) TMSOTf. Полученную смесь перемешивали при 50 °С в течение 12 часов. Далее охладили до комнатной температуры и добавили 1.71 г (16.95 ммоль, 1.1 экв.) Et_3N

после перемешивания в течение 10 мин. Раствор удалили при пониженном давлении и далее провели разделение реакционной смеси при помощи препаративной колоночной хроматографии в системе метанол/дихлорметан (1:50). Конечное вещество — желтая вязкая жидкость (4.66 г, 0.0141 моль). Выход: 92%

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 5.97 (д, 1H, J=6.7 Гц, H-1'); 5.44 (т, 1H, J=2.9 Гц, H-4'); 4.88 (дд, 1H, J₁=3.4 Гц, J₂=7.4 Гц, H-3'); 4.14-4.28 (м, 2H, H-2',5'); 4.08 (дд, 1H, J=5.8 и 11.1 Гц, H-6'); 3.99 (дд, 1H, J₁=J₂=7.2 Гц, H-6'); 2.10 (с, 3H, -OAc); 2.05 (с, 6H, -OAc); 2.03 (с, 3H, -Me(2)).

Синтез 1-О-Аллил-2-ацетида-2-дезокси-3,4,6-три-О-ацетил- β -D-галактопиранозы (3)[117].



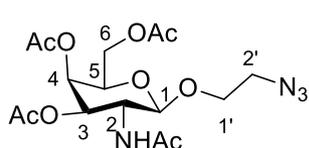
Соединение (2) (2 г, 0.006 моль) растворили в 25 мл 1,2-дихлорэтана, смесь перемешивали в течение 30 минут в инертной атмосфере в присутствии молекулярных сит (4Å) для удаления

остатков воды. Затем добавили триметилсилилтрифлат (0.405 г, 0.0018 моль, 0.3 экв.) и аллиловой спирт (1.86 мл, 1.5808 г, 0.0273 моль 4.5 экв.), и реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре. После в раствор добавили триэтиламин (0.25 мл, 0.1818 г, 0.0018 моль, 0.3 экв.), перемешивали в течение 10 минут и отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре от молекулярных сит. Фильтрат удалили при пониженном давлении. Полученную смесь очищали методом препаративной колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан

(1:50) → метанол/дихлорметан (1:20). В результате получили продукт в виде светло-желтого аморфного вещества (1.67 г, 0.0043 моль). Выход: 71%.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃Cl, δ, м.д.): 5.76-5.93 (м, 2H, H-2', NH); 5.32 (м, 1H, H-4); 5.23-5.29 (м, 2H, H-3,3'); 5.15 (дд, 1H, J=1.4, 10.4 Гц, H-3'); 4.73 (д, 1H, J=8.3 Гц, H-1); 4.34 (ддт, J=1.4, 5.0, 13.5 Гц, H-5); 4.02-4.17 (м, 3H, H-1',2); 3.85-4.01 (м, 2H, H-6); 2.10 (с, 3H, -OAc); 2.01 (с, 3H, -OAc); 1.96 (с, 3H, -OAc); 1.92 (с, 3H, -NHAc).

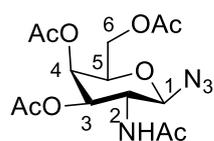
Синтез 1-О-(2'-Азидоэтил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-галактопиранозы (4)[85].



Соединение (2) (2.55 г, 0.0077 моль) было растворено в 25 мл 1,2-дихлорэтана, смесь перемешивали 30 минут в инертной атмосфере в присутствии молекулярных сит (4Å) для удаления остатков воды. Затем добавили триметилсилилтрифлат (0.516 г, 0.0023 моль, 0.3 экв.) и азидоэтанол (2.37 мл, 2.023 г, 0.0348 моль 4.5 экв.), и реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре. Раствор отфильтровали от молекулярных сит, а после добавили триэтиламин (0.323 мл, 0.2345 г, 0.00232 моль, 0.3 экв.). Растворитель удалили при пониженном давлении. Полученную смесь очистили методом препаративной колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:50) → метанол/дихлорметан (1:5). В результате получили продукт в виде темного аморфного вещества (2.095 г, 0.005 моль). Выход: 65%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 5.65 (уш. с, 1H, -NHAc); 5.36-5.45 (м, 2H, H-2'); 4.90 (д, 1H, J=8,4 Гц, H-1); 4.05-4.22 (м, 4H, H-1', 3, 4); 3.88-4.01 (м, 2H, H-2,5); 3.68-3.79 (м, 1H, H-6); 3.49-3.61 (м, 1H, H-6); 2.17 (с, 3H, -OAc); 2.07 (с, 3H, -OAc), 2.03 (с, 3H, -OAc), 1.99 (с, 3H, -NHAc).

Синтез 1-Азидо-2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-ацетил-β-D-галактопиранозы (5)[86].

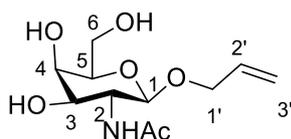


Пентаацетил-2-аминогалактозу (1) (1 г, 0.00257 моль) растворили в 10 мл хлористого метилена, и к раствору добавили FeCl₃ (0.0835 г, 0.000514 моль, 0.2 экв.) Полученную смесь перемешивали 10 мин. при комнатной температуре в инертной атмосфере, после чего добавили триметилсилилазид (0.2505 г, 0.003855 моль, 1.5 экв.). Перемешивание продолжили при комнатной температуре в течение 24 часов в инертной атмосфере, затем добавили 50 мл CH₂Cl₂,

реакционную смесь промыли водой, далее растворитель удалили при пониженном давлении. Полученное соединение представляет собой светло-желтый порошок (0.698 г, 0.00188 моль). Выход 73%..

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.30 (д, 1H, $J=8.9$ Гц, -NHAc); 5.20 (д, 1H, $J=2.7$ Гц, H-4); 5.00 (дд, 1H, $J=3.2, 11.1$ Гц, H-3); 4.59 (д, 1H, $J=9.3$ Гц, H-1); 3.95-4.06 (м, 3H, H-2,5,6); 3.86 (дд, 1H, $J_1=J_2=6.5$ Гц, H-6), 2.00 (с, 3H, -OAc); 1.90 (с, 3H, -OAc); 1.82 (с, 3H, -OAc); 1.80 (с, 3H, -NHAc).

Синтез 1-О-Аллил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозы (6)[117].

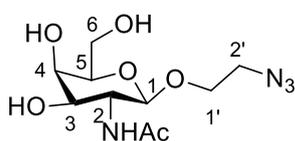


Соединение (3) (1.67 г, 0.00431 моль) растворили в 10 мл раствора метилата натрия (3 экв.) в метаноле. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем

добавили ионнообменную смолу Dowex 50W до нейтрального pH, дополнительно смесь перемешивали 10 мин., после чего ионнообменную смолу отфильтровали. Растворитель удалили при пониженном давлении. Получили соединение (6) в виде светло-желтого порошка (1.1 г, 0.00422 моль). Выход: 98%.

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 5.89 (ддт, 1H, $J=5.4, 11.0$ и 16.8 Гц, H-2'); 5.27 (дд, 1H, $J=1.8, 17.3$ Гц, H-3'); 5.13 (дд, 1H, $J=1.3, 10.5$ Гц, H-3'); 4.41 (д, 1H, $J=8.4$ Гц, H-1); 4.34 (ддт, 1H, $J=1.4, 5.0, 13.5$ Гц, H-5), 4.08 (дд, 1H, $J=5.7, 13.3$ Гц, H-1'); 3.95 (дд, 1H, $J=8.5, 10.6$ Гц, H-1'); 3.84 (д, 1H, $J=3.1$ Гц, H-4), 3.70-3.81 (м, 2H, H-2, 3), 3.59 (дд, 1H, $J=3.2, 10.7$ Гц, H-6), 3.48 (дд, 1H, $J_1=J_2=5.6$ Гц, H-6), 1.98 (с, 3H, NHAc).

Синтез 1-О-(2'-Азидоэтил)-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозы (7)[85].



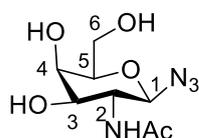
Соединение (4) (2.1 г, 0.00503 моль) растворили в 10 мл раствора метилата натрия (3 экв.) в метаноле. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем

добавили ионнообменную смолу Dowex 50W до нейтрального pH, дополнительно смесь перемешивали 10 мин., после чего ионнообменную смолу отфильтровали. Растворитель удалили при пониженном давлении. Получили соединение (7) в виде светло-желтого порошка (1,43 г, 0,00493 моль). Выход: 98%.

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 4.46 (д, 1H, $J=8.4$ Гц, H-1); 4.04 (ддд, 1H, $J=2.6, 5.3, 8.2$ Гц, H-1'); 3.96 (дд, 1H, $J=8.6$ и 10.5 Гц, H-1'); 3.84 (д, 1H, $J=2.9$ Гц, H-4); 3.64-3.80 (м, 3H,

H-2', H-5); 3.60 (дд, 1H, J=3.2, 10.7, H-3); 3.51 (дд, 1H, J₁=J₂=6.0 Гц, H-6); 3.43 (дд, 1H, J=3.2, 7.9 Гц, H-6); 3.31 (м, 1H, H-2); 1.98 (с, 3H, -NHAc).

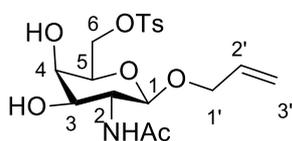
Синтез 1-Азидо-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозы (8).[118]



Соединение (5) (0.7 г, 0.00188 моль) растворили в 10 мл раствора метилата натрия (3 экв.) в метаноле. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем добавили ионнообменную смолу Dowex 50W до нейтрального pH, дополнительно смесь перемешивали 10 мин., после чего ионнообменную смолу отфильтровывали. Растворитель удалили при пониженном давлении. Получили соединение (8) в виде светло-желтого порошка (0.4536г, 0.00184моль). Выход: 98%.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 4.51 (д, 1H, J=9.2 Гц, H-1); 3.82 (д, 1H, J=3.1 Гц, H-4); 3.75-3.81 (м, 1H, H-5); 3.58-3.69 (м, 4H, H-2,3,6); 1.91 (с, 3H, -NHAc).

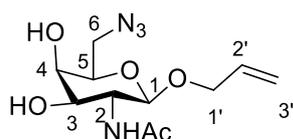
Синтез 1-О-Аллил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-6-О-тозил-β-D-галактопиранозы (9) [119]



Соединение (6) (1,1 г, 0,00422 моль) растворили в 20 мл Ру (сух.) и охладили до -40 °С. После по каплям добавили раствор тозилхлорида (0.8843 г, 0.004642 моль, 1,1 экв.) в 40 мл Ру (сух.) в течение двух часов. После чего убрали охлаждение и реакционную смесь перемешивали 12 часов в инертной атмосфере. Затем добавили избыток воды и отделили органический слой. Растворитель удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:20) → метанол/дихлорметан (1:10). Получили соединение (9) в виде белого кристаллического вещества (1.215 г, 0.00292 моль). Выход: 63%.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 7.67 (д, 2H, J=8.2 Гц, -OTs); 7.25 (д, 2H, J=7.8 Гц, -OTs); 5.73 (м, 1H, H-2'); 5.13 (дд, 1H, J=1.6, 17.2 Гц, H-3'); 5.05 (дд, 1H, J=1.4, 10.4 Гц, H-3'); 4.30 (д, 1H, J=8.2 Гц, H-1); 4.04-4.20 (м, 3H, H-5, H-1', H-2); 3.95 (дд, 1H, J=6.2, 13.0 Гц, H-1'); 3.69 (д, 1H, J=2.7 Гц, H-4); 3.61 (дд, 1H, J₁=J₂=5.9 Гц, H-6); 3.52 (дд, 1H, J=2.7, 10.6 Гц, H-6); 2.34 (с, 1H, CH₃(OTs)); 1.88 (с, 3H, -NHAc).

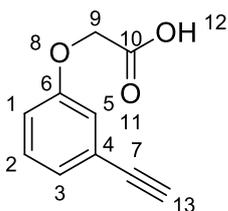
Синтез 1-О- Аллил -2-ацетиамидо-2-дезоксидезокси-6-азидо-6-дезоксидезокси-β-D-галактопиранозы (10) [119].



Соединение (9) (1.1 г, 0.00266 моль) растворили в диметилформамиде (сух.) и добавили азид натрия (1.47 г, 0.0266 моль, 10 экв.) Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 3 часов, после чего охладили до комнатной температуры, растворитель удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:50) → метанол/дихлорметан (1:10). Получили соединение (10) в виде белого порошка (0.518 г, 0.0018 моль). Выход: 68%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 5.83-6.02 (м, 2H, H-2',-NHAc); 5.33 (дд, 1H, J=1.0, 17.1 Гц, H-3'); 5.27 (дд, 1H, J=0.9, 10.4 Hz, H-3'); 4.90 (м, 1H, H-5); 4.22-4.33 (м, 2H, H-1',1); 4.03 (дд, 1H, J=6.4, 12.7 Гц, H-1'); 3.90 (дд, 1H, J=3.7, 8.6 Гц, H-2); 3.85 (д, 1H, J=2.7 Гц, H-4); 3.81 (дд, 1H, J=3.2, 10.3 Гц, H-3); 3.70 (дд, 1H, J=8.6, 13.0 Гц, H-6); 3.34 (дд, 1H, J=4.2, 13.0 Гц, H-6); 2.07 (с, 3H, -NHAc).

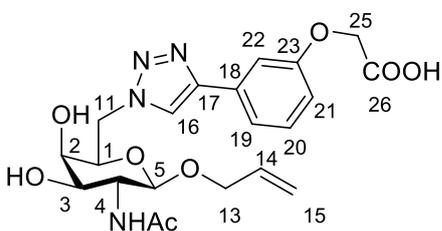
(3-этинилфенокси)уксусная кислота (11) [120].



Смесь 3-этинилфенола (1.02 г, 0.01 моль), этил 2-бромацетата (1.67 г, 0.01 моль) и K₂CO₃ (3.036 г, 0.022 моль, 2,2 экв.) в 12.5 мл ДМФА перемешивали при температуре 60°C в течение 8 часов. Затем смесь разбавили водой, и перемешивали ещё 16 часов при 60°C. О полноте протекания реакции следили при помощи метода тонкослойной хроматографии. После полного протекания реакции смесь охладили до комнатной температуры и в реакционную смесь осторожно добавили воду (50 мл), экстрагировали диэтиловым эфиром (2×50мл), органическую фазу осушили над безводным MgSO₄, после чего растворитель удалили при пониженном давлении. Полученную смесь очистили методом колоночной хроматографии в системе гексан/этилацетат (4:1). Далее выделенный промежуточный продукт добавили в 50 мл раствор 1 М NaOH в смеси ТГФ/Н₂O (1:1). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем добавили ионнообменную смолу Dowex 50W до нейтрального pH, дополнительно смесь перемешивали 10 минут, после чего ионнообменную смолу отфильтровывали. Растворитель удалили на роторном испарителе. Конечный продукт представляет собой темно-коричневое кристаллическое вещество (1.34 г, 0.0076 моль). Выход: 76%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.15 (т, 1H, $J=7.9$ Гц, H-2)); 7.03 (д, 1H, $J=7.6$ Гц, H-1)); 6.94 (с, 1H, H-5); 6.86 (д, 1H, $J=8.3$ Гц, H-3); 4.51 (с, 2H, O- CH_2 - (9)); 3.01 (с, 1H, $\equiv\text{C-H}$ (13)).

Соединение (12)



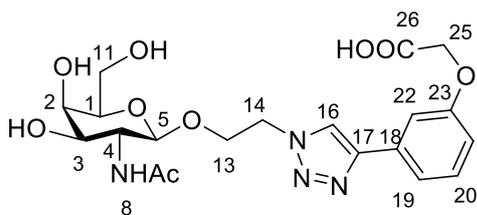
Соединения (10) (0.155 г, 0.00054 моль) и (11) (0.0955 г, 0.00054 моль) растворили в 10 мл смеси тетрагидрофуран-вода. В инертной атмосфере добавили пентагидрат сульфата меди (0.135 г, 0.00054 моль) и аскорбат натрия (0.107 г, 0,00054 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение суток. После прохождения реакции растворители удалили при пониженном давлении, смесь растворили в метаноле и отфильтровали через тонкий слой целита. Из фильтрата удалили избыток растворителя на роторном испарителе и полученную смесь очищали методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:20) \rightarrow метанол/дихлорметан (1:2). Продукт представляет собой темно-коричневое твердое вещество (0.120 г, 0.00026 моль). Выход: 48%.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8.53 (с, 1H, -N- $\text{CH}=\text{C}$ (16)); 7.79 (д, 1H, 8.2 Гц, - $\text{CH}=\text{C}$ (21)); 7.31 (с, 2H, - $\text{CH}=\text{C}$ (19), - $\text{CH}=\text{C}$ (22)); 7.26 (т, 1H, 8.0 Гц, - $\text{CH}=\text{C}$ (20)); 6.77 (д, 1H, 8.0 Гц, -NHAc); 5.55-5.68 (м, 1H, - $\text{CH}=\text{CH}_2$ (14)); 5.06 (дд, 1H, 1.8, 17.4 Гц, - $\text{CH}=\text{CH}_2$ (15)); 4.98 (дд, 1H, 1.8, 10.5 Гц, - $\text{CH}=\text{CH}_2$ (15)); 4.65 (д, 1H, 3.4, -O- CH_2 -O- (5)); 4.54 (д, 2H, 6.5 Гц, O- CH_2 - $\text{CH}=\text{C}$ (13)); 4.25 (с, 2H, -O- CH_2 -COOH (25)); 4.03-4.12 (м, 2H, - $\text{CH}(\text{OH})$ - (2), - $\text{CH}(\text{NHAc})$ - (4)); 3.54-3.72 (м, 4H, - $\text{CH}(\text{CH}_2)$ - (1), - $\text{CH}(\text{CH}_2)$ - (11), - $\text{CH}(\text{OH})$ - (3)); 1.80 (с, 3H, -NHAc).

ЯМР ^{13}C (CD_3OD , δ , м.д., 400 МГц): 193.9 (-COOH); 133.9 (- $\text{CH}=\text{C}$); 131.7 (- $\text{CH}=\text{C}$); 129.8 (- $\text{CH}=\text{C}$); 118.1 (- $\text{CH}=\text{C}$); 115.9 (- $\text{CH}=\text{C}$); 100.6 (- $\text{CH}=\text{C}$); 73.35; 69.5; 52.5; 51.0; 47.9; 38.3; 29.4; 21.7.

МСВР (m/z) для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.1832 (найдено), 463.1829 (расчет); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 485.16492 (найдено), 485.1648 (расчет).

Соединение (13)



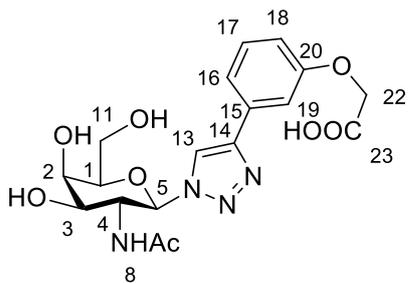
Соединение (7) (0.412 г, 0.00142 моль) и (11) (0.250 г, 0.00142 моль) растворили в 10 мл смеси тетрагидрофуран-вода. В инертной атмосфере добавили пентагидрат сульфата меди (0.355 г, 0.00142 моль) и аскорбат натрия (0.283 г, 0.00142 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение суток. После прохождения реакции растворители удалили при пониженном давлении, смесь растворяли в метаноле и отфильтровывали через целит. Фильтрат упаривали и полученную смесь очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:20) → метанол/дихлорметан (1:2). Продукт представляет собой темно-коричневое твердое вещество (0,550 г, 0,001179 моль). Выход: 83%.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д.): 8.30 (с, 1H, -N-CH=C (16)); 7.43 (м, 2H, -CH= (21, 22)); 7.33 (т, 1H, J=8.0 Гц, -CH= (20)); 6.95 (д, 1H, 8.0 Гц, -CH=(19)); 4.64 (м, 2H, -CH₂-N (14)); 4.47 (с, 2H, -O-CH₂-COOH (25)); 4.40 (д, 1H, 8.2, -O-CH-O- (5)); 4.28 (м, 1H, -CH(OH)- (2)); 3.70-4.01 (м, 4H, -CH(CH₂)- (1), -CH(OH)- (3), -CH(NHAc)- (4), -O-CH₂- (13)); 3.54 (м, 2H, -CH(CH₂)- (11)); 1.76 (с, 3H, -NHAc).

ЯМР ^{13}C (CD₃OD, δ , м.д., 400 МГц): 172.8 (-COOH (26)); 159.2 (-NHCOCH₃ (8)); 147.1 (-N-CH=C (16), -N-C=CH- (17)); 131.5 (-CH=); 129.6 (-CH=); 122.2 (-CH=); 117.8(-CH=); 114.5 (-CH=); 111.7 (-CH=); 101.5(-CH=); 75.4; 71.5; 68.3; 67.0; 61.2; 52.5; 50.2; 29.3; 21.7.

МСВР (m/z) для C₂₀H₂₆N₄O₉: [M+H]⁺ 467.1773 (найдено), 467.1773 (расчет); [M+Na]⁺ 485.1592 (найдено), 489.1592 (расчет).

Соединение (14)



Соединение (8) (0.420 г, 0.0017 моль) и (11) (0.299 г, 0.0017 моль) растворили в 10 мл смеси тетрагидрофуран-вода. В инертной атмосфере добавили пентагидрат сульфата меди (0.425 г, 0.0017 моль) и аскорбат натрия (0.333 г, 0.0017 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение суток. После прохождения реакции растворители удалили при пониженном давлении, смесь растворили в метаноле и отфильтровывали через тонкий слой целита. Фильтрат удалили при пониженном давлении и полученную смесь очистили

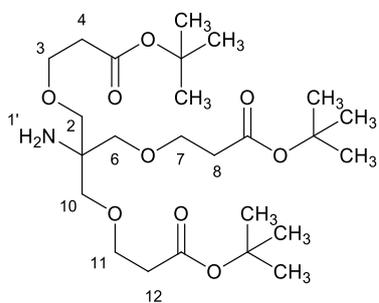
методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций метанол/дихлорметан (1:20) → метанол/дихлорметан (1:2). Продукт представляет собой темно-коричневое твердое вещество (0.4684 г, 0.0011 моль). Выход: 65%.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д.): 8.60 (с, 1H, -N-CH=C (13)); 7.85 (д, 1H, 9.1 Гц, -CH= (18)); 7.35 (м, 3H, -CH= (16, 17, 19)); 6.83 (д, 1H, 8.1 Гц, -NHAc); 5.66 (д, 1H, 9.9, -O-CH-N- (5)); 4.52 (с, 2H, -O-CH₂-COOH (22)); 4.42 (кв, 1H, 9.7, 10.0 Гц, -CH(OH)- (2)); 3.46-3.82 (м, 4H, -CH(CH₂-) (1), -CH(CH₂-) (11), -CH(OH)- (3), -CH(NHAc)- (4)); 1.60 (с, 3H, -NHAc).

ЯМР ^{13}C (CD₃OD, δ , м.д., 400 МГц): 172.4 (-COOH (23)); 158.8 (-NHС(O)CH₃ (8)); 147.2 (-N-CH=C (13), -N-C=CH- (14)); 111.4-131.5 (-CH= (15-20)); 87.3; 78.7; 71.3; 68.3; 61.1; 52.1; 29.3; 21.2.

МСВР (m/z) для C₁₈H₂₃N₄O₈: [M+H]⁺ 423.1510 (найдено), 423.1510 (расчет); [M+Na]⁺ 445.1330 (найдено), 445.1330 (расчет).

Трис((2-(*tert*-бутоксикарбонил)этокси)метил)метиламин (15) [121].

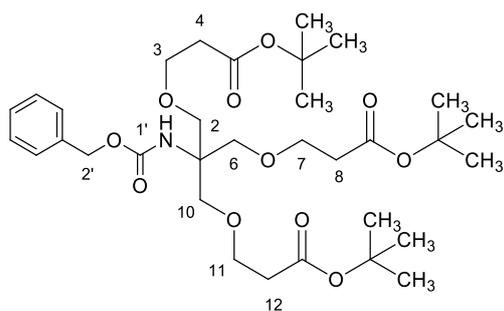


Трисгидроксиметиламинометан (2,4 г, 0,0198 моль), растворили в (10 мл) 1М растворе NaOH в диметилсульфоксиде. Смесь охладили до температуры ~17-18 °С, после чего по каплям в течение часа добавили третибутилакрилат (8 мл), после прикапывания охлаждение прекратили. Реакционную смесь перемешивали сутки. Смесь

разбавили водой (75 мл), провели экстракцию с этилацетатом (2× 75мл) и промыли органическую фазу насыщенным раствором NaCl (75 мл). Растворители и остатки третибутилакрилата удалили при пониженном давлении. Дальнейшую очистку провели методом препаративной колоночной хроматографии в системе этилацетат/гексан (1:2 → 2:1). Вещество представляет собой вязкую прозрачную маслянистую жидкость (5.516 г, 0.0111 моль). Выход: 56%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ , м.д.): 3.60 (т, 6H, 6.4 Гц, -O-CH₂- (3, 7, 11)); 3.28 (с, 6H, -C(CH₂O)₃ (2, 6, 10)); 2.41 (т, 6H, 6.4 Гц, -CH₂-COO- (4, 8, 12)); 1.99 (с, 2H, -NH₂ (1')); 1.40 (с, 27H, -C(CH₃)₃).

Бензил N-трис((2-(*tert*-бутоксисарбонил)этокси)метил)метилкарбомат (16) [121]

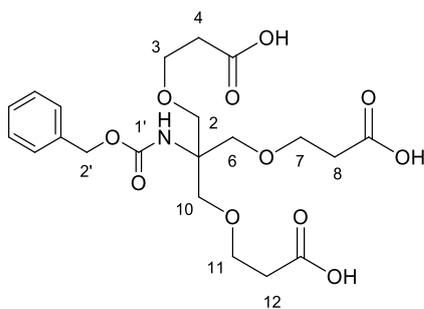


1.5 г (3 ммоль) трис((2-(трет-бутоксисарбонил)этокси)метил)метиламина (15) было растворено в 20 мл CH_2Cl_2 и 10 мл 25% водного раствора Na_2CO_3 . Затем 1.3 мл (9 ммоль) бензилхлорформиата добавили к реакционной смеси по каплям и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Продукт

экстрагировали в CH_2Cl_2 и сушили над MgSO_4 , после чего растворитель удалили при пониженном давлении. Получившуюся смесь разделили методом колоночной хроматографии в системе гексан-этилацетат 2:1. Масса полученного продукта составила 1.26 г (66%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.26-7.40 (м, 5H, Ar), 5.31 (уш. с, 1H, -NH- (1')), 5.03 (с, 2H, Ph- CH_2 (2')), 3.60-3.69 (м, 12H, - OCH_2 - (2,3,6,7,10,11)), 2.44 (т, 6H, $\text{J}=6.3$ Гц, - CH_2 -C(O)- (4,8,12)), 1.43 (с, 27H, - CH_3)

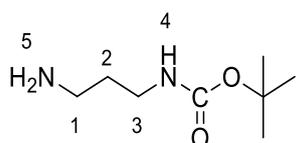
Бензил N-трис((2-карбоксиэтокси)метил)метилкарбомат (17) [121].



1.26 г (2 ммоль) бензил N-трис((2-(трет-бутоксисарбонил)этокси)метил)метилкарбомата (16) перемешивали в 20 мл HCOOH (96%) в течение 18 часов. Затем растворитель удалили при пониженном давлении. Масса полученного продукта составила 0.937 г (100%).

^1H ЯМР (400 МГц, ацетон- d_6 , δ , м.д.): 7.21-7.43 (м, 5H, Ar), 5.79 (уш. с, 1H, -NH- (1')), 5.04 (с, 2H, Ph- CH_2 - (2')), 3.62-3.72 (м, 12H, - OCH_2 - (2,3,6,7,10,11)), 2.55 (т, 6H, $\text{J}=6.2$ Гц, - CH_2 -C(O)- (4,8,12)).

1-(*tert*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминопропан (18) [122]

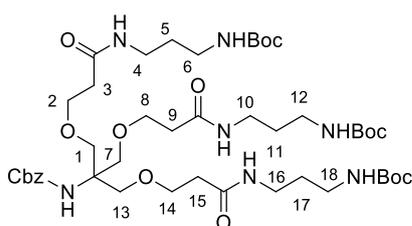


1,3-диаминопропан (1.02 г, 0.0137 моль) растворили в сухом диоксане (20мл) и смесь охладили до 0°C . Ди-трет-бутилдикарбонат (2.98 г, 0.0137 моль), растворенный в 30 мл диоксана, добавили по каплям в течение 2 часов. Затем реакционную смесь оставили перемешиваться ночь при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Реакционную смесь разбавили водой,

ди-Вос-производное, выпавшее в осадок, отделили фильтрованием на стеклянном фильтре.Mono-Вос-производное экстрагировали из водной фазы хлороформом (5×50мл). Остатки воды из органической фазы удалили при помощи Na₂SO₄, после чего растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт представляет собой прозрачную маслянистую жидкость (1.43 г, 0.0082 моль). Выход: 60%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 5.00 (с, 1H, -CONH- (4)); 3.21 (м, 2H, -CH₂-NH₂, (1)); 2.79 (т, 2H, 6.5 Гц, -CH₂-NHCO (3)); 2.59 (с, 2H, -NH₂); 1.65 (квин, 2H, J=6.6 Гц, -CH₂- (2)); 1.43 (с, 9H, -C(CH₃)₃).

Соединение (19) [51].

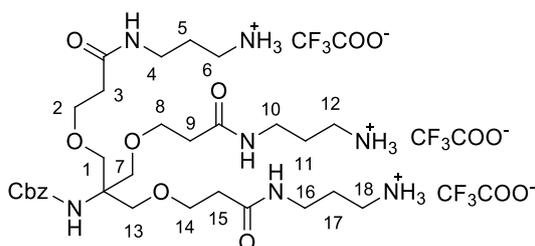


К раствору 0.825 г (1.76 ммоль) бензил N-трис((2-карбоксиэтокси)метил)метилкарбамата (17) в 10 мл ТГФ добавили 0.85 мл (6.15 ммоль) Et₃N, 1.17 г (6.15 ммоль) EDCI, 0.178 г (1.72 ммоль) NHS и 1.10 г (6.33 ммоль) моно-Вос-диаминопропана (18) в 10 мл ТГФ.

Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов в инертной атмосфере. После удаления растворителя при пониженном давлении реакционная смесь растворили в этилацетате и промыли 0.5 М раствором HCl. После чего органическую фракцию сушили над MgSO₄. Растворитель удалили при пониженном давлении и продукт массой 1.32 г (72%) выделили методом колоночной хроматографии в системе EtOAc-EtOH (8:1)

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.25-7.40 (м, 5H, Ar (Cbz)), 6.89 (уш. с, 3H, -NH-CH₂), 5.56 (уш. с, 1H, -NH-Cbz), 5.20 (уш. с, 3H, -NH- Вос), 5.04 (с, 2H, Ph-CH₂ (Cbz)), 3.60-3.72 (м, 12H, -OCH₂-(2,3,7,8,13,14)), 3.05-3.35 (м, 12H, -NHCH₂(4,6,10,12,16,18)), 2.55 (т, 6H, J=6.2 Гц, -CH₂-C(O)-(3,9,15)), 1.55-1.70 (м, 6H, CH₂-CH₂-CH₂(5,11,17)), 1.43 (с, 27H, Вос).

Соединение (20) [51].

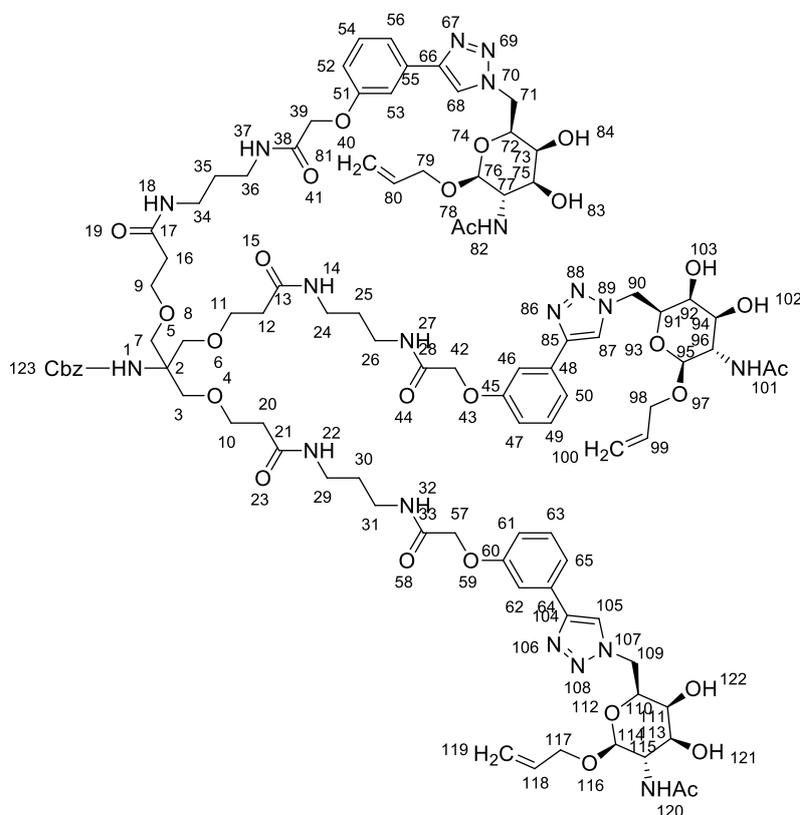


кислоты массой 0.45 г (100%).

К раствору соединения (20) 0.366 г в 10 мл CHCl₃ добавили 2 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали в течение 3 часов. После чего из реакционной смеси удалили растворитель, выделили продукт в виде соли трифторуксусной

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.06 (уш. с, 3H, $-\text{NH}-\text{CH}_2$), 7.78 (уш. с, 9H, $-\text{NH}_3^+$ -), 7.25-7.40 (м, 5H, Ar(Cbz)), 6.57 (уш. с, 1H, $-\text{NH}-\text{Cbz}$), 4.99 (с, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2(\text{Cbz})$), 3.56 (т, 6H, $J=6.3$ Гц, $-\text{OCH}_2-$ (2,8,14)), 3.48 (с, 6H, $-\text{OCH}_2-$ (1,7,13)), 3.11 (т, 6H, $J=6.4$ Гц, $-\text{NHCH}_2$ (6,12,18)), 2.70-2.83 (м, 6H, $-\text{NHCH}_2$ (4,10,16)) 2.31 (т, 6H, $J=6.3$ Гц $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ (3,9,15)), 1.59-1.71 (м, 6H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ (5,11,17)).

Соединение (21)



Соединение (12) (0.065 г, 0.00014 моль 3.3 экв) растворили в 10 мл диметилформамида, добавили NHS (16 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.) и EDCI (22 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего добавили раствор соединения (20) (0.048 г, 0.000043 моль) с DIPEA (25 мкл, 3.3 экв) в 5 мл ДМФА. Оставили перемешиваться ночь, после чего растворитель удалили при пониженном

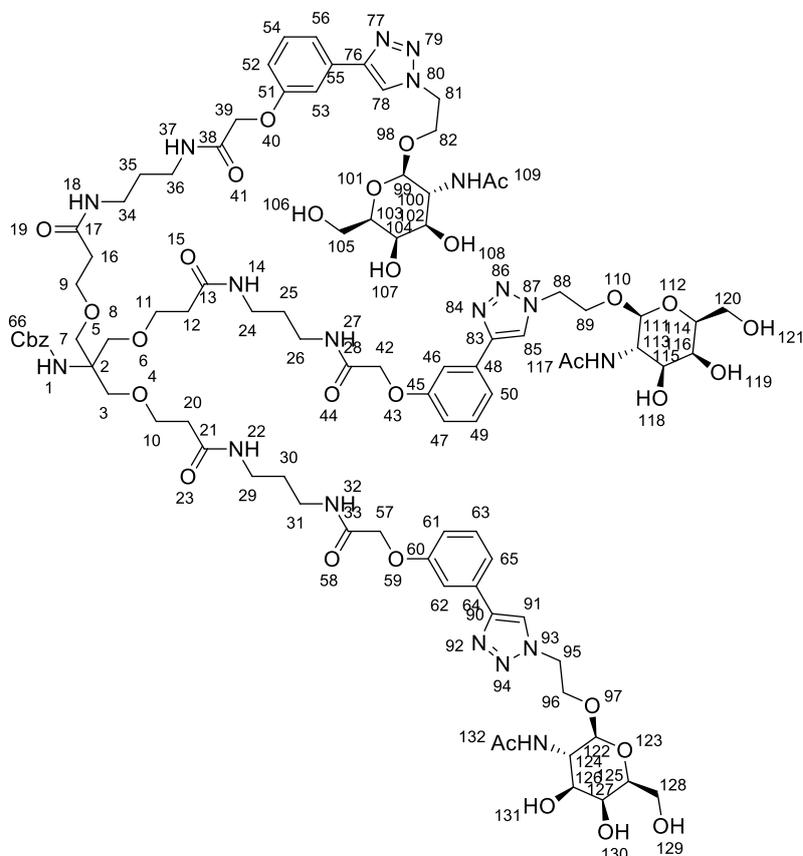
давлении, а реакционную смесь разделили методом колоночной хроматографии в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (5:1). Индивидуальность вещества подтвердили ВЭЖХ-МС анализом. Вещество получили с выходом 63% (0.0534 г, 0.0000271 моль).

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3(1:6)$, δ , м.д.): 8.20 (с, 3H, H-триазола (68,87,105)), 7.64 (с, 1H, $-\text{NH}-$ (1)), 7.40-7.47 (м, 6H, H-Ar), 7.30-7.37 (м, 3H, H-Ar), 7.16-7.28 (м, 5H, H-Ar (Cbz)), 6.88-6.97 (м, 3H, H-Ar), 5.57-5.70 (м, 3H, $-\text{CH}$ (80,99,118)), 4.93-5.07 (м, 8H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ (Cbz) + CH_2- (81,100,119)), 4.82 (д, 3H, $J=3.0$ Гц, $\text{O}-\text{CH}-\text{O}$ (76,95,114)), 4.65 (м, 6H, $\text{O}-\text{CH}_2$ (79,98,117)), 4.50 (с, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ (39, 42, 57)), 4.31 (дд, 3H, $J=3.3$ и 14.0 Hz, H-Gal (75,94,113)), 4.23 (т, 3H, $J=5.5$ Гц, H-Gal(77,96,115)), 3.93 (с, 3H, H-Gal (73,92,111)), 3.81 (д, 3H, $J=2.8$ и 13.2 Гц, H-Gal(72,91,111)), 3.70 (м, 6H, CH_2 -Gal (71,90,109)), 3.65-3.60 (м, 12H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ (3,5,7,9,10,11)), 3.29 (т, 6H, $J=6.5$ Гц, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ (26,31,36)), 3.18 (т, 6H, $J=6.5$

Гц, $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ (24,29,34)), 2.39 (т, 6H, $J=6.3$ Гц, $-\text{CH}_2\text{-C(O)-}$ (12,16,20)), 1.98 (с, 9H, NHAc-Gal (82,101,120)), 1.67 (м, 6H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ (25,30,35)).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{93}\text{H}_{125}\text{N}_{19}\text{O}_{29}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1972.8833 (найдено), 1972.8963 (расчет); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1994.8666 (найдено), 1994.8783 (расчет).

Соединение (22)



Соединение (13) (0.065 г, 0.00014 моль 3.3 экв) растворили в 10 мл диметилформамида, добавили NHS (16 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.) и EDCI (22 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего добавили раствор соединения (20) (0.048 г, 0.000043 моль) с DIPEA (25 мкл, 3.3 экв) в 5 мл ДМФА. Оставили перемешиваться ночь, после чего растворитель удалили под пониженным давлением, а реакционную

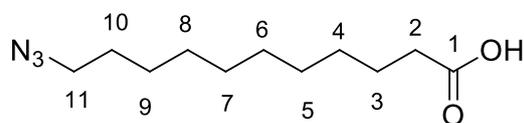
смесь разделили методом колоночной хроматографии в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (5:1). Индивидуальность вещества подтвердили ВЭЖХ-МС анализом. Вещество получили с выходом 61% (0.052 г, 0.0000262 моль).

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ (1:6), δ , м.д.): 8.30 (с, 3H, H-триазол (78,85,91)), 7.45-7.53 (м, 6H, H-Ar), 7.33-7.41 (м, 3H, H-Ar), 7.22-7.32 (м, 5H, H-Ar (Cbz)), 6.93-7.01 (м, 3H, H-Ar), 4.95-5.03 (м, 3H, $-\text{O-CH-}$ (Cbz) +NH), 4.60-4.70 (м, 6H, O-CH_2 (82,89,96)), 4.53-4.59 (м, 6H, O-CH_2 (39,42,57)), 4.37 (д, 3H, H-Gal (99,111,122)), 4.25-4.33 (м,3H, H-Gal (102,115,126)), 3.95-4.03 (м, 3H, H-Gal (104,116,126)), 3.87-3.96 (м, 6H, $\text{O-CH}_2\text{-}$ (9,10,11)), 3.81-3.86 (м, 3H, (100,113,124)), 3.68-3.80 (м, 9H, (3,5,7, 103,114,125)); 3.59-3.68 (м, 18H, O-CH_2 и NH-CH_2 (105,120,128,24,26,29,31,34,36)), 3.49-3.55 (м, 6H, $\text{CH}_2\text{-}$ триазол

(81,88,95)), 3.14-3.22 (м, 6H, -CH₂-C(O)-(12,16,20)), 2.54 (с, 9H, NHAc); 2.34-2.43 (м, 6H, CH₂-CH₂-CH₂ (25,30,35)).

МСВР (*m/z*) для C₉₀H₁₂₅N₁₉O₃₂: [M+H]⁺ 1984.8710 (найдено), 1984.8811 (расчет).

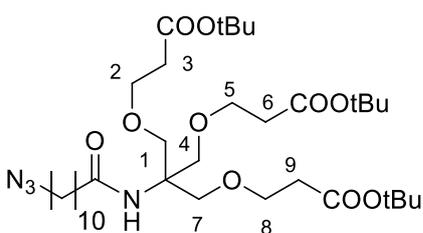
11-азидоундекановая кислота (**23**) [123]



11-бромундекановую кислоту (3 г, 0.0113 моль) и азид натрия (3.68 г, 0.0566 моль) растворили в диметилформамиде. Реакционную смесь перемешивали при температуре 50°C в течение 3 часов. Растворитель удалили при пониженном давлении. Оставшуюся реакционную смесь растворили в СНCl₃, промыли насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄, затем удалили растворитель при пониженном давлении. Полученное вещество представляет собой прозрачную жидкость (2.1615 г, 0.0095 моль). Выход: 84%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 3.25 (т, 2H, J=7.0 Гц, -CH₂-N₃ (11)); 2.35 (т, 2H, 7.6 Гц, -CH₂-COOH (2)); 1.61 (м, 4H, -CH₂- (3, 10)); 1.29 (м, 12H, -CH₂- (4-9)).

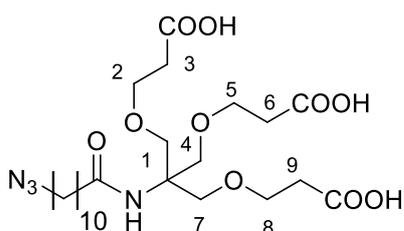
N-трис((2-(*tert*-бутоксикарбонил)этокси)метил)метиламид 11-азидоундекановой кислоты (**24**) [2]



11-Азидоундекановую кислоту (0.4945 г, 0.00218 моль) растворили в дихлорметане (25 мл), к раствору добавили N-гидроксисукцинимид (0.276 г, 0.0024 моль, 1.1 экв.) и 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (0.373 г, 0.0024 моль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали 15 минут, после чего было добавили амин (**15**) (1.1 г, 0.00218 моль), перемешивание продолжали сутки. Растворитель отделили на роторном испарителе, реакционную смесь разделили методом препаративной колоночной хроматографии в системе хлористый метилен/метанол (50:1). Вещество — прозрачная маслянистая жидкость (0.960 г, 0.00134 моль). Выход: 62%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6.22 (уш. с, 1H, -CONH-) 3.70 (с, 6H, O-CH₂-(1, 4, 7)); 3.64 (т, 6H, 6.4 Гц, -O-CH₂- (2, 5, 8)); 3.25 (т, 2H, 7.0 Гц, -CH₂-N₃ (11')); 2.44 (т, 6H, J=6.2 Гц, -CH₂-COO- (3,5,9)); 2.19 (т, 2H, 7.7 Гц, -CH₂-CONH- (2')); 1.59 (м, 4H, 6.9 Гц, -CH₂- (10', 3')); 1.44 (с, 27H, -C(CH₃)₃); 1.27 (м, 12H, -CH₂- (4' - 9')).

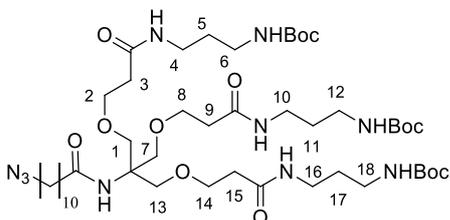
N-трис((2-карбокиэтокси)метил)метиламид 11-азидоундекановой кислоты (25) [2]



Соединение (24) (0.960 г, 0.00134 моль) растворили в 100% муравьиной кислоте (20 мл) и перемешивали ночь. Муравьиная кислота удалили на роторном испарителе. Вещество представляет собой прозрачную жидкость (0.732г, 0.00134 моль). Выход: 100%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6.04 (с, 1H, $-\text{CONH}-$); 3.67-3.78 (м, 12H, $\text{O}-\text{CH}_2-$ (1,2,4,5,7,8)); 3.26 (т, 2H, 6.9 Гц, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ (11')); 2.59 (т, 6H, 5.8 Гц, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ (3, 6, 9)); 2.17 (т, 2H, $J=7.3$ Гц, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ (2')); 1.59 (м, 4H, $-\text{CH}_2-$ (10', 3')); 1.27 (с, 12H, $-\text{CH}_2-$ (4' - 9')).

Соединение (26) [2]

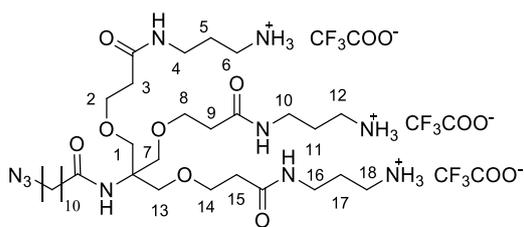


Соединение (25) (0.350г, 0.00064 моль) растворили в хлористом метиле, добавили N-гидроксисукцинимид (0.243 г, 0.002112 моль, 3.3 экв.) и 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (0.329 г, 0.002112 моль, 3.3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в

течение 15 минут, после чего добавили соединение (18) (0.368 г, 0.002112 моль, 3.3 экв.). Оставили перемешиваться ночь, после чего растворитель удалили при пониженном давлении, а реакционную смесь разделили методом препаративной колоночной хроматографии в системе метанол/хлористый метилен (1:50→1:20→1:10). Вещество представляет собой вязкую прозрачную жидкость (0.4286 г, 0.000423 моль). Выход: 66%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.19 (уш.с, 3H, $-\text{CONH}-$); 6.47 (с, 1H, $-\text{CONH}-$ (1')); 5.29 (с, 3H, $-\text{CONH}-$ (Boc)); 3.61-3.74 (м, 12H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ (1, 7, 13, 2, 8, 14)); 3.21-3.33 (м, 8H, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ (11'), $-\text{CH}_2-\text{NH}$ (4, 10, 16)); 3.14 (т, 6H, $J=5.4$ Гц, $-\text{CH}_2-\text{NH Boc}$ (6, 12, 18)); 2.44 (т, 6H, $J=5.4$ Гц, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ (3, 9, 15)); 2.18 (т, 2H, 7.6 Гц, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ (2')); 1.50-1.70 (м, 10H, $-\text{CH}_2-$ (3', 10', 5, 11, 17)); 1.42 (с, 27H, $-\text{Boc}$); 1.26 (м, 12H, $-\text{CH}_2-$ (4'-9')).

Соединение (27) [2]

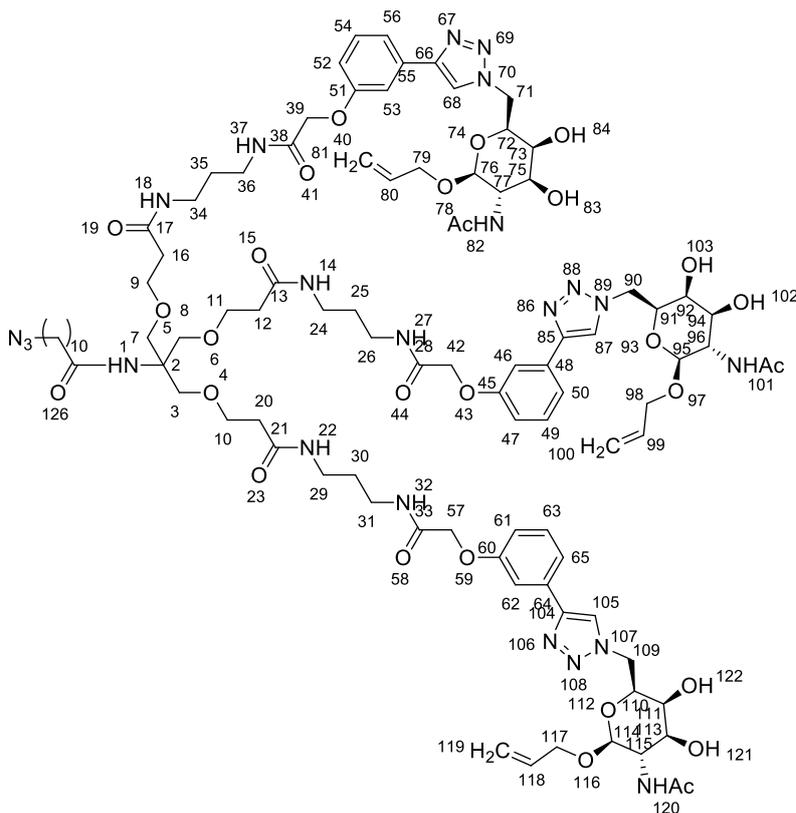


Соединение (26) (0.4286 г, 0.000423 моль) растворили в смеси трифторуксусная кислота/хлористый метилен (1:4) (60 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов, после чего растворители удалили при

пониженном давлении. Вещество в дальнейших реакциях использовали без дополнительной отчистки. Соединение (27) представляет собой белое кристаллическое вещество (0.4469 г, 0.000423 моль). Выход: 100%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.04 (м, 3H, J=5.4 Гц, -CONH-); 7.76 (с, 9H, -NH₃⁺); 7.01 с, 1H, -CONH- (1'')); 3.46-3.60 (м, 12H, O-CH₂- (1,7,13,2,8,14)); 3.28 (т, 2H, J=6.9 Гц, -CH₂-N₃ (11'')); 3.09 (кв, 6H, J=6.4 Гц, -CH₂-NH₃⁺ (6, 12, 18)); 2.75 (м, 6H, -CONH-CH₂- (4, 10, 16)); 2.29 (т, 6H, J=6.2 Гц, -CH₂-COO- (3, 9, 15)); 2.05 (т, 2H, J=6.2 Гц, -CH₂-CONH- (2'')); 1.65 (м, 6H, -CH₂- (5, 11, 17)); 1.50 (т, 2H, J=6.9 Гц, -CH₂- (10'')); 1.41 (т, 2H, J=5.3 Гц, -CH₂- (3'')); 1.21 (м, 12H, -CH₂- (4'-9')).

Соединение (28)



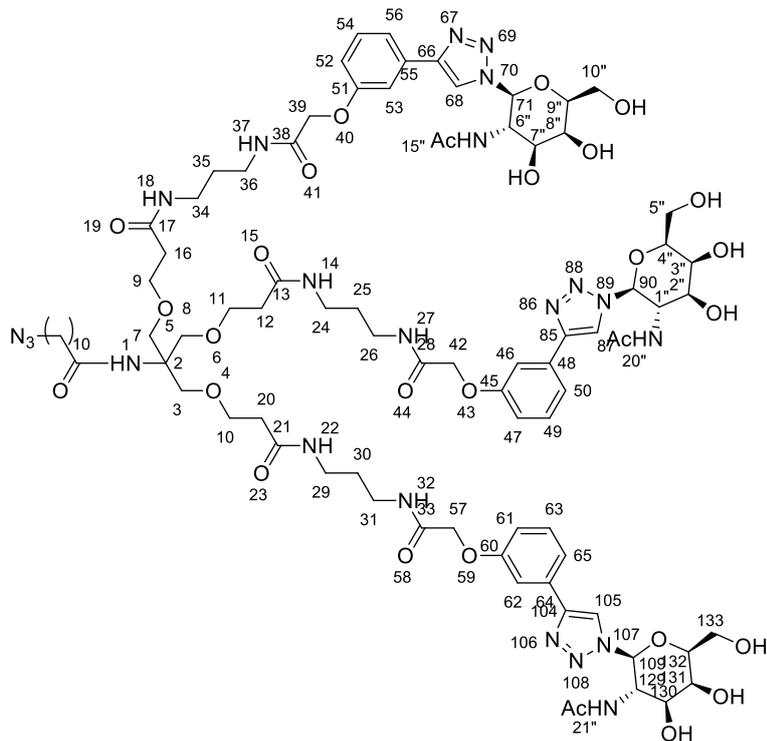
Соединение (12) (0.065 г, 0.00014 моль 3.3 экв) растворили в 10 мл ДМФА, добавили NHS (16 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.) и EDCI (22 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего добавили раствор соединения (27) (0.050 г, 43 мкмоль) 25 мкл DIPEA (3.3 экв.) в 5 мл ДМФА. Оставили перемешиваться ночь, после чего растворитель удалили при пониженном давлении, а

реакционную смесь разделили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в системе вода/ацетонитрил. Выход 22% (0.025 г, 9.5 мкмоль).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 8.35 (с, 3H, Н-триазол (68, 87, 105)); 7.43-7.50 (м, 6H, Н-Ar); 7.37 (т, 3H, $J=8.1$ Гц, Н-Ar (47, 54, 63)); 7.19 (с, 1H, CO-NH- (1)); 6.98 (д, 3H, $J=8.1$ Гц, Н-Ar (50, 56, 65)); 5.59-5.72 (м, 3H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (80, 99, 118)); 5.04 (дд, 3H, $J=1.5, 17.2$ Гц, $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (81, 100, 119)); 4.99 (дд, 3H, 1.7, 10.3 Гц, $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (81, 100, 119)); 4.69 (м, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=(79, 98, 117)$); 4.56 (с, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ (39, 42, 57)); 4.32 (дд, 3H, $J=3.7, 11.1$ Гц, $-\text{CH}-$ триазол (71, 90, 109)); 4.26 (дд, 3H, $J=4.2, 8.7$ Гц, $-\text{H}-\text{Gal}$ (73, 92, 111)) 3.84 (дд, 3H, 3.3, 11.1 Гц, $-\text{CH}-$ триазол (71, 90, 109)); 3.62-3.75 (м, 17H, Н-Gal (72,75,77,91,92,96,110,113,115), $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ (11'), $-\text{C}(\text{CH}_2\text{O})_3$ (3,5,7)); 3.21 (т, 6H, $J=6.7$ Гц, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$ (26, 31, 36)); 2.41 (т, 6H, $J=6.1$ Гц, $\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ (12, 16, 20)); 2.14 (т, 2H, 6.5 Гц, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ (2')); 1.98 (с, 9H, $-\text{NHAc}$ (82, 101, 120)); 1.71 (м, 6H, $J=6.4$ Гц, $-\text{CH}_2-$ (25, 30, 35)); 1.52 (м, 4H, $-\text{CH}_2-$ (3', 10')); 1.26 (м, 12H, $-\text{CH}_2-$ (4'-9')).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{96}\text{H}_{138}\text{N}_{22}\text{O}_{28}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2048.0059 (найдено), 2048.0129 (расчет); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 2069.9876 (найдено), 2069.9949 (расчет).

Соединение (29)



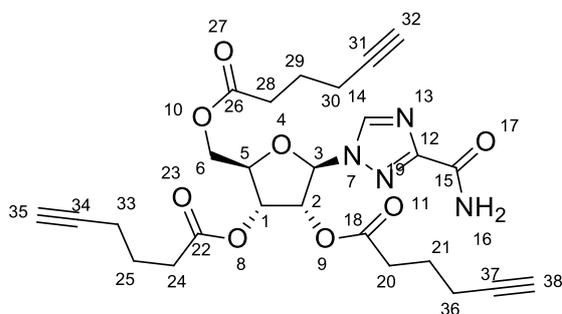
Соединение (14) (0.0591 г, 0.00014 моль 3.3 экв) растворили в 10 мл ДМФА, добавили NHS (16 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.) и EDCI (22 мг, 0.00014 моль, 3.3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего добавили раствор соединения (27) (0.050 г, 43 мкмоль) 25 мкл DIPEA (3.3 экв.) в 5 мл ДМФА. Оставили перемешиваться ночь, после чего растворитель удалили при пониженном давлении, а реакционную смесь разделили

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в системе вода/ацетонитрил. Выход 7% (0.008 г, 0.000003 моль).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 8.42 (с, 3H, H-триазол (68, 87, 105)); 8.04 (с, 3H, H-Ar (46,53,62)); 7.29 (т, 3H, $J=8.0$ Гц, H-Ar (49, 54, 63)); 6.86 (д, 3H, $J=8.0$ Гц, H-Ar (50, 56, 65)); 5.75 (д, 3H, $J=8.8$ Гц, -O-CH-N (71,90,109)); 4.40-4.61 (м, 12H, -O-CH₂-COO (39, 42, 57), H-Gal (1'',6'',129, 3'',8'', 131)); 3.75-3.89 (м, 9H, -O-CH₂- (3, 5, 7), H-Gal (4'', 9'', 132)); 3.55-3.68 (м, 11H, -CH₂-O (9,10,11), -CH₂-N₃ (11'), H-Gal (5'',10'',133)); 3.41 (т, 3H, $J=5.3$ Гц, H-Gal (2'', 7'', 130)); 3.30 (м, 6H, -CH₂-NH-CO (26, 31, 36)); 3.18 (т, 6H, $J=7.1$ Гц, -CH₂-NH-CO (24, 29, 34)); 2.38 (м, 6H, -CH₂-CONH- (12, 16, 20)); 2.12 (т, 2H, $J=7.3$ Гц, -CH₂-CONH- (2'')); 1.77 (с, 9H, NHAc (15'', 20'', 21'')); 1.67 (т, 6H, $J=6.4$ Гц, -CH₂- (25, 30, 35)); 1.51 (м, 4H, -CH₂- (3', 10')); 1.21 (м, 12H, -CH₂- (4'-9')).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{87}\text{H}_{126}\text{N}_{22}\text{O}_{28}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1927.9127 (найдено), 1927.9190 (расчет); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1949.8998 (найдено), 1949.9010 (расчет).

Синтез триацилированного гекс-5-иновой кислотой рибавирина (31).



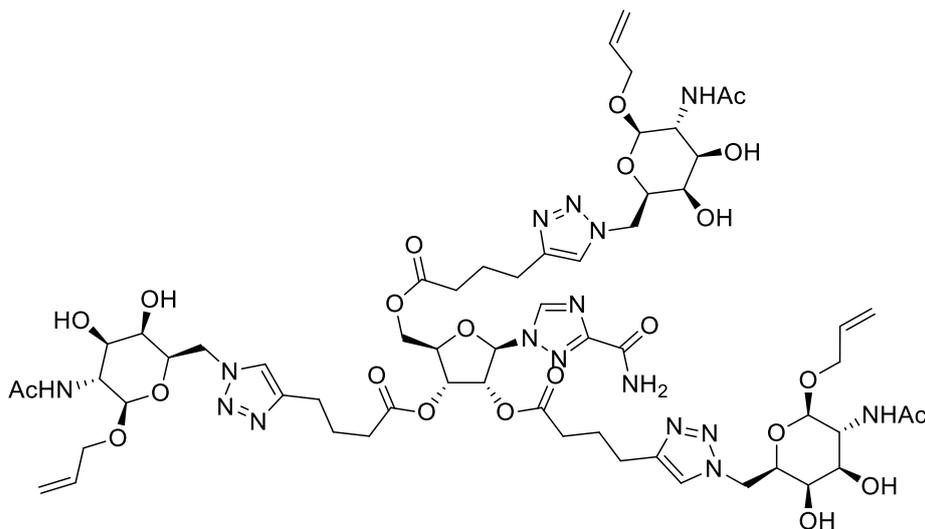
К раствору 152 мг (0.622 ммоль) рибавирина в 20 мл сухого CH_2Cl_2 добавили 230 мг (2.054 ммоль, 3.3 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 394 мг (2.053 ммоль, 3.3 экв.) EDC, а также каталитическое количество DMAP.

Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего CH_2Cl_2 удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (20:1) \rightarrow MeOH. В результате получили соединение (31) в виде светло-желтого аморфного вещества (206 мг, 63%).

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{CD}_3\text{Cl} + 10\% \text{CD}_3\text{OD}$, δ , м.д.): 8.37 (с, 1H, H-14); 5.99 (д, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-3); 5.67 (дд, 1H, $J=2.3, 4.5$ Гц, H-2); 5.51 (т, 1H, 5.7 Гц, H-1); 4.36-4.41 (м, 1H, H-5), 4.33 (дд, 1H, $J=3.1, 12.2$ Гц, H-6); 4.18 (дд, 1H, $J=4.8, 12.2$ Гц, H-6); 2.30-2.48 (м, 6H, H-30,33,36); 2.10-2.22 (м, 6H, H-20,24,28); 1.88-1.97 (м,3H, H-32,35,38); 1.66-1.80 (м,6H, H-21,25,29).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 527.2155 (найдено), 527.2136 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 549.1978 (найдено), 549.1956 (рассч.); $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 1053.4244 (найдено), 1053.4200 (рассч.)

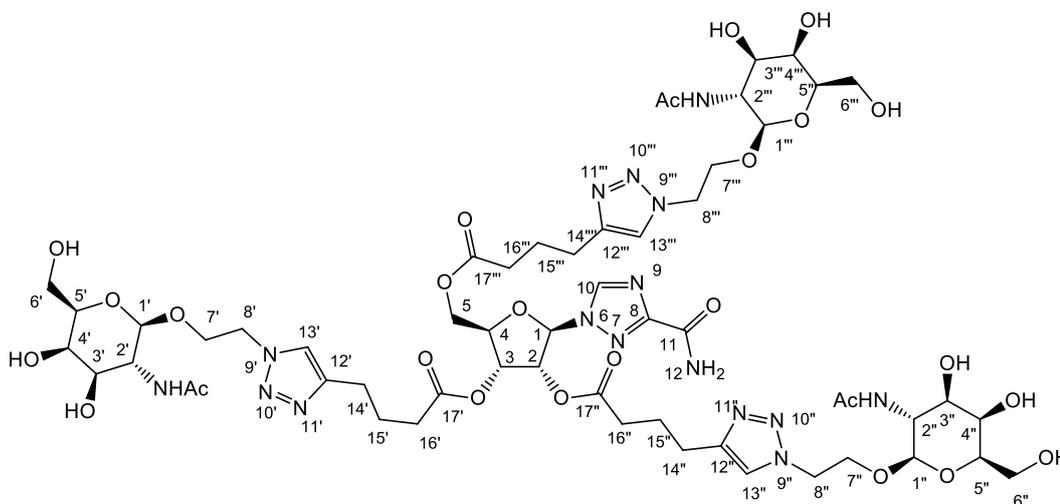
Синтез конъюгата рибавирина (32).



К раствору 28.4 мг (0.0541 ммоль) соединения (31) в 12 мл сухого ДМФА добавили 46.5 мг (0.1622 ммоль, 3 экв.) соединения (10) в присутствии 9.3 мг (0.0486 ммоль, 0.9 экв.) CuI и 4.9 мг

(0.0486 ммоль, 0.9 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов. Затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование CH₂Cl₂:MeOH (20:1) → MeOH. В результате получили конъюгат (32). По данным ЯМР ¹H и МСВР полученный продукт присутствует в смеси, но не индивидуален и требует дальнейшего выделения методом ВЭЖХ.

Синтез конъюгата рибавирина (33).



К раствору 99 мг (0,188 ммоль) соединения (31) в 50 мл сухого ДМФА добавили 163.7 мг (0.564 ммоль, 3 экв.) соединения (7) в присутствии 32.2 мг (0.169 ммоль, 0.9 экв.) CuI и 17.1 мг (0.169 ммоль, 0.9 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь

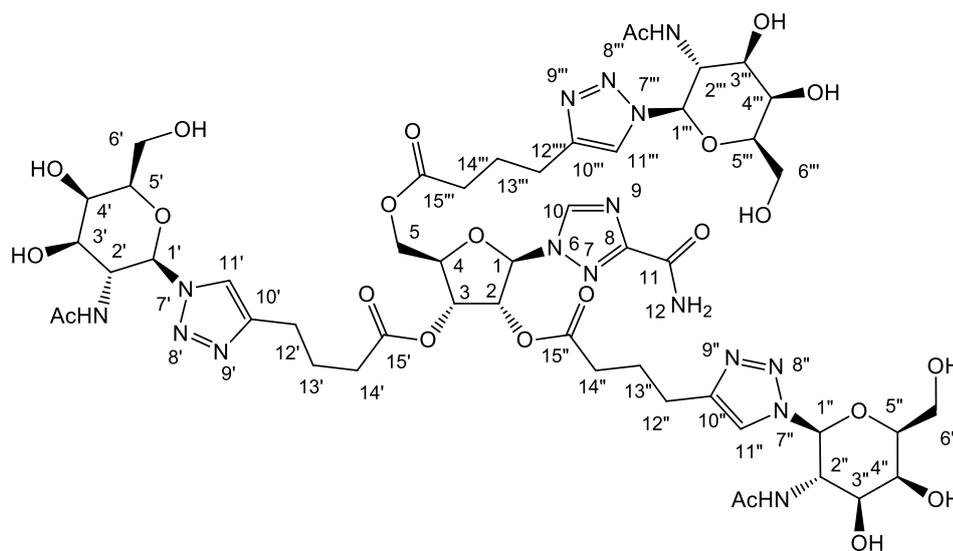
перемешивали в течение 24 часов. Затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) колоночная хроматография на силикагеле (градиентное элюирование $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (20:1) \rightarrow MeOH), 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе ($\text{H}_2\text{O} - \text{AcCN}$). В результате получили конъюгат (**33**) в виде бесцветного аморфного вещества (68 мг, 26%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 7.77 (м, 4H, H-10, 13',13'',13'''); 4.52-4.60 (м, 6H, H-4',4'',4''',5',5'',5'''); 4.42-4.52 (м, 2H, H-2,3); 4.38 (д, 3H, $J=8.1$ Гц, H-1',1'',1'''); 4.17-4.32 (м, 4H, H-4, H-3',3'',3'''); 3.87-4.04 (м, 7H, H-5,7',7'',7'''); 3.82-3.87 (м, 3H, H-2',2'',2'''); 3.69-3.82 (м, 7H, H-5,8',8'',8'''); 3.65 (м, 1H, H-1); 3.60 (дд, 3H, $J=2.4, 10.4$ Гц, H-6',6'',6'''); 3.52 (т, 3H, $J=5.6$ Гц, H-6',6'',6'''); 2.73 (т, 6H, H-7.5 Гц, H-14',14'',14'''); 2.35-2.54 (м, 4H, H-16',16''); 2.22 (т, 2H, $J=7.3$ Гц, H-16''); 1.87-2.07 (м, 15H, NH-Ac, H-15',15'',15''').

ЯМР ^{13}C (CD_3OD , δ , м.д., 400 МГц): 180.6 (C(O)NH); 172.7 (C(O)OR); 147.3 (C-5(Tr,TrR)); 146.6 (C-4(Tr,TrR)); 123.1; 122.8; 101.5; 75.4; 71.5; 68.3; 67.1; 61.1; 52.2; 50.0; 36.8; 32.7; 26.0; 24.9; 24.3; 21.9; 21.8.

MALDI TOF(m/z) для $\text{C}_{56}\text{H}_{84}\text{N}_{16}\text{O}_{26}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1397.5818 (найдено), 1397.5815 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1419.5636$ (найдено), 1419.5635 (рассч.).

Синтез конъюгата рибавирина (**34**)



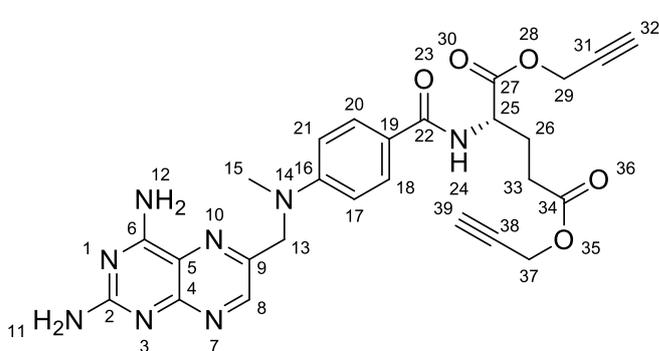
К раствору 25 мг (0.0475 ммоль) соединения (**31**) в 8 мл сухого ДМФА добавили 35.07 мг (0.1424 ммоль, 3 экв.) соединения (**8**) в присутствии 8.12 мг (0.0427 ммоль, 0.9 экв.) CuI и 4.32 мг (0.0427 ммоль, 0.9 экв.) Et_3N в инертной атмосфере. Полученную смесь

перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) колоночная хроматография на силикагеле (градиентное элюирование $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (20:1) \rightarrow MeOH), 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе ($\text{H}_2\text{O} - \text{AcCN}$). В результате получили конъюгат (**34**) в виде бесцветного аморфного вещества (16 мг, 27%).

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{D}_2\text{O}:\text{MeCN-d}_3$ (6:1), δ , м.д.): 7.94 (м, 4H, H-11',11'',11''',10); 6.15 (д, 1H, $J=2.0$ Гц, H-1); 5.62-5.70 (м, 1H, H-2); 5.48-5.60 (м, 5H, H-3, 4, 1',1'',1'''); 4.37-4.46 (м, 1H, H-5); 4.18-4.30 (м, 4H, H-5, 5',5'',5'''); 3.88-3.95 (м, 3H, H-4',4'',4'''); 3.73-3.84 (м, 6H, H-2',2'',2''',3',3'',3'''); 3.57-3.70 (м, 6H, H-6',6'',6'''); 2.42-2.66 (м, 6H, H-12',12'',12'''); 2.07-2.32 (м, 6H, H-14',14'',14'''); 1.52-1.87 (м, 15H, $-\text{NHAc}$, H-13',13'',13''').

МСВР (m/z) для $\text{C}_{50}\text{H}_{72}\text{N}_{16}\text{O}_{23}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1265.4996 (найдено), 1265.5029 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1287.4827 (найдено), 1287.4848 (рассч.).

Синтез сложного эфира пропаргилового спирта и метотрексата (**35**)



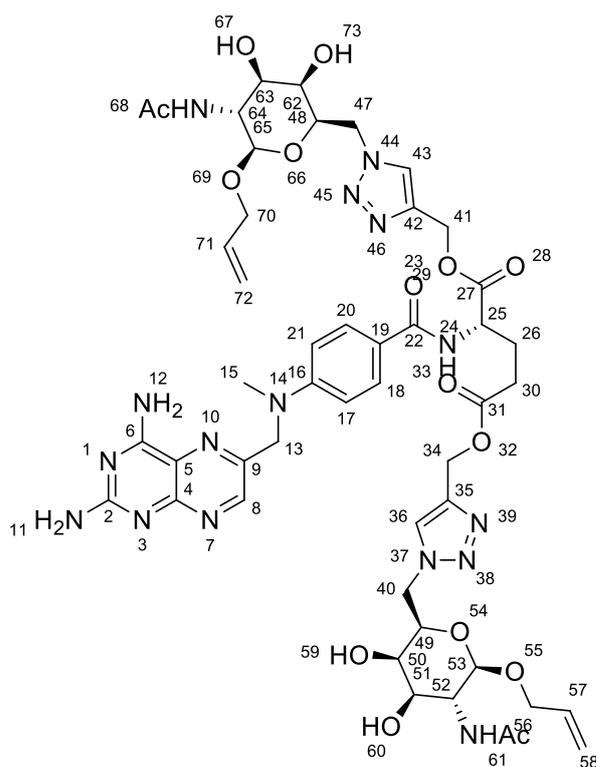
К раствору 182 мг (0.4 ммоль) метотрексата в 20 мл сухого ДМФА добавили 50 мг (0.88 ммоль, 2.2 экв.) пропаргилового спирта в присутствии 169 мг (0.88 ммоль, 2.2 экв.) EDC и каталитическое количество DMAP в инертной атмосфере. Полученную смесь

перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом обращенно-фазовой колоночной хроматографии на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом концентраций $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (1:0) \rightarrow $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (0:1). В результате получили соединение (**35**) в виде желтого аморфного вещества (111 мг, 52%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 8.54 (с, 1H, H-8); 7.64 (д, 2H, $J=8.6$ Гц, H-18,20); 6.70 (д, 2H, $J=8.4$ Гц, H-17,21); 4.65-4.85 (м, 4H, H-29,37); 4.58 (с, 2H, H-13); 3.70 (м, 1H, H-25); 3.14 (с, 3H, H-15); 2.37-2.59 (м, 4H, H-32,33,39); 2.17-2.33 (м, 1H, H-26); 2.08 (м, 1H, H-26).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_5$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 531.2101 (найдено), 531.2099 (рассч.).

Синтез конъюгата метотрексата (36)



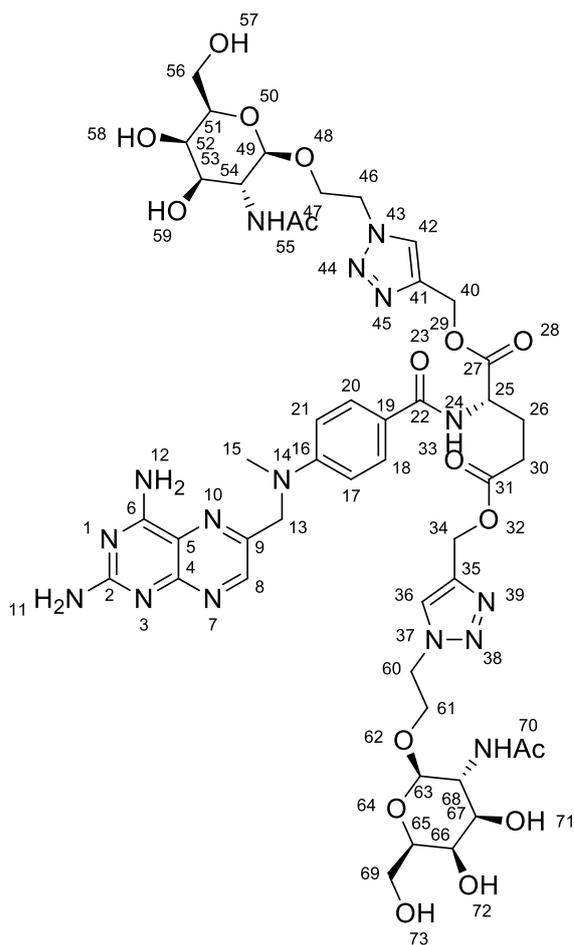
К раствору 20.4 мг (0.0384 ммоль) соединения (35) в 8 мл сухого ДМФА добавили 22 мг (0.0768 ммоль, 2 экв.) соединения (10) в присутствии 2.9 мг (0.015 ммоль, 0.4 экв.) CuI и 1.5 мг (0.015 ммоль, 0.4 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом

концентраций H₂O:MeCN (1:0) → H₂O:MeCN (0:1). 2) ВЭЖХ в обращенно-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (36) в виде желтого аморфного вещества (8 мг, 20%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O:MeCN-d₃ (6:1), δ, м.д.): 8.63 (с, 1H, H-8); 8.33 (уш.с, 2H, H-11,12); 8.02 (с, 1H, H-43 или 36); 7.89 (с, 1H, H-43 или 36); 7.58 (д, 2H, J=8.2 Гц, H-18,20); 6.80 (д, 2H, J=8.2 Гц, H-17,21); 5.46-5.64 (м, 2H, H-57,71); 5.25 (с, 2H, H-34 или 41); 5.07 (с, 2H, H-34 или 41); 4.83-5.01 (м, 5H, H-13,58,72); 4.47-4.60 (м, 2H, H-53,65); 4.16-4.25 (м, 2H, H-48,49); 3.59-3.98 (м, 15H, H-25,40,47,50,51,56,52,62,63,64,70); 3.21 (с, 3H, H-15); 2.37-2.47 (м, 2H, H-30), 2.13-2.23 (м, 2H, H-26); 1.95 (м, 6H, H-55 и 70 (Ac)).

МСВР (*m/z*) для C₄₈H₆₂N₁₆O₁₅: [M+H]⁺ 1103.4652 (найдено), 1103.4653 (рассч.); [M+Na]⁺ 1125.4453(найдено), 1125.4472 (рассч.).

Синтез конъюгата метотрексата (37).

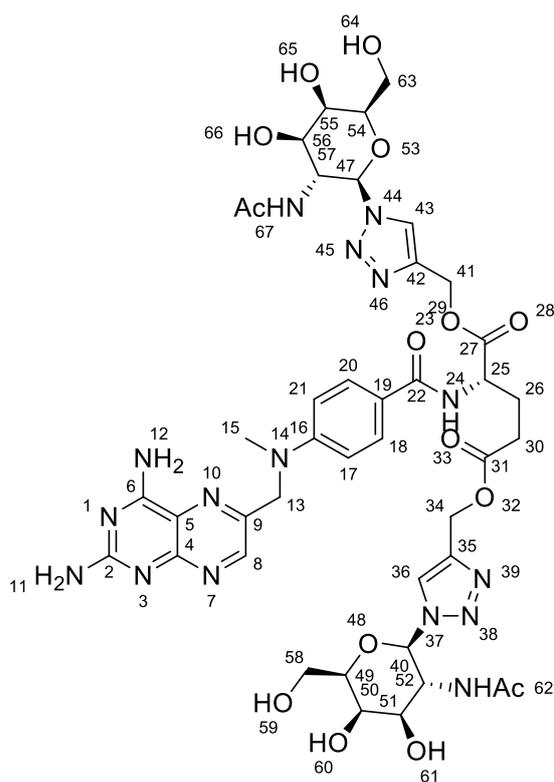


К раствору 20 мг (0.0377 ммоль) соединения (35) в 8 мл сухого ДМФА добавили 21,9 мг (0.0754 ммоль, 2 экв.) соединения (7) в присутствии 2.9 мг (0.015 ммоль, 0.4 экв.) CuI и 1.5 мг (0.015 ммоль, 0.4 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом концентраций H₂O:MeCN (1:0) → H₂O:MeCN (0:1). 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (37) в виде желтого аморфного вещества (5 мг, 12%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O:MeCN-d₃ (6:1), δ, м.д.): 8.65 (с, 1H, H-8); 8.37 (уш.с, 7H, H-11,12,36,42,-NHAc); 7.95 (д, 1H, J=6.2 Гц, -NHAc); 7.82 (д, 1H, J=13.2 Гц, H-24); 7.59 (д, 2H, J=9.0 Гц, H-18,20); 6.81 (д, 2H, J=9.0Гц, H-17,21); 5.25 (с, 2H, H-34 или 40); 5.07 (с, 2H, H-34 или 40); 4.89 (с, 2H, H-13); 4.44-4.60 (м, 4H, H-49,63,51,65); 4.18-4.34 (м, 4H, H-47,61); 3.79-3.97 (м, 3H, H-25,52,66); 3.63-3.79 (м, 8H, H-53,54,56,67,68,69); 3.50-3.61 (м, 4H, H-46,60); 3.22 (с, 3H, H-15); 2.43-2.56 (м, 2H, H-30), 2.05-2.29 (м, 2H, H-26); 1.77 (м, 6H, H-55 и 70 (Ac)).

МСВР (*m/z*) для C₄₆H₆₂N₁₆O₁₇: [M+H]⁺ 1111.4493 (найдено), 1111.4551 (рассч.); [M+Na]⁺ 1133.4313(найдено), 1133.4371 (рассч.).

Синтез конъюгата метотрексата (38).



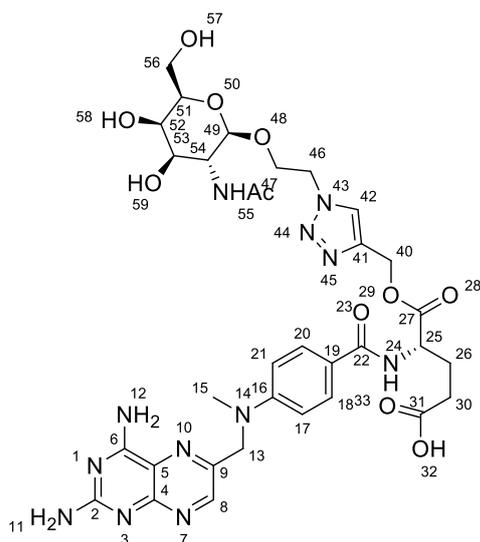
К раствору 24 мг (0.045 ммоль) соединения (35) в 8 мл сухого ДМФА добавили 22.3 мг (0.09 ммоль, 2 экв.) соединения (8) в присутствии 3.5 мг (0.018 ммоль, 0,4 экв.) CuI и 1.8 мг (0.018 ммоль, 0.4 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом концентраций H₂O:MeCN (1:0) → H₂O:MeCN (0:1). 2) ВЭЖХ в обращенно-фазовой системе (H₂O – AcCN). В

результате получили конъюгат (38) в виде желтого аморфного вещества (4 мг, 9%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O:MeCN-d₃ (6:1), δ, м.д.): 8.55 (с, 1H, H-8); 8.34 (уш.с, 7H, H-11,12,36 или 43,-NHAc); 8.18 (с, 1H, H-36 или 43); 8.04 (д, 1H, J=12.2 Гц, H-24); 7.53 (д, 2H, J=6.7 Гц, H-18,20); 6.71-6.79 (м, 2H, H-17,21); 5.64 (д, 1H, J=7.6 Гц, H-62 или 67 (NH)); 5.59 (д, 1H, J=9.8 Гц, H-62 или 67 (NH)); 5.19 (м, 2H, H-34, 41); 4.79-4.92 (м, 2H, H-13); 4.45-4.55 (м, 2H, H-40,47); 4.18-4.34 (м, 2H, H-49,54); 3.94-4.03 (м, 2H, H-50,55); 3.81-3.92 (м, 3H, H-25,51,56); 3.64-3.76 (м, 6H, H-52,57,58,63); 3.13 (с, 3H, H-15); 2.28-2.50 (м, 2H, H-30), 2.06-2.23 (м, 2H, H-26); 1.62 (м, 6H, H-62 и 67 (Ac)).

МСВР (*m/z*) для C₄₂H₅₄N₁₆O₁₅: [M+H]⁺ 1023.4008 (найдено), 1023.4027 (рассч.); [M+Na]⁺ 1045.3793 (найдено), 1045.3846 (рассч.).

Конъюгат метотрексата (**37моно**).

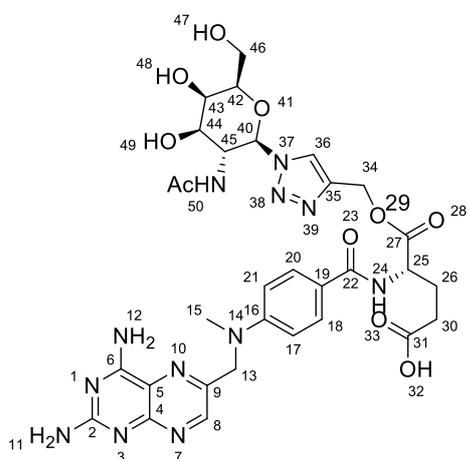


В случае реакции (**35**) с (**7**) в качестве продуктов образуется смесь соединений (**37**) и (**37моно**). Соединения (**37**) и (**37моно**) разделили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе H₂O/AcCN. В результате получили конъюгат (**37моно**) в виде желтого аморфного вещества (3 мг, 7%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O:MeCN-d₃ (6:1), δ, м.д.): 8.52 (с, 1H, H-8); 8.34 (уш.с, 5H, H-11,12,42); 7.51 (д, 2H, J=7.2 Гц, H-18,20); 6.72 (д, 2H, J=7.2 Гц, H-17,21); 4.81-4.86 (м, 2H, H-13); 4.26-4.35 (м, 3H, H-40,49); 4.06-4.22 (м, 2H, H-47); 3.72-3.81 (м, 3H, H-25,51,52); 3.57-3.70 (м, 4H, H-53,54,56); 3.47-3.55 (м, 2H, H-46); 3.11 (с, 3H, H-15); 2.31-2.46 (м, 2H, H-30), 2.12-2.28 (м, 2H, H-26); 1.92 (с, 3H, H-55 (Ac)).

МСВР (*m/z*) для C₃₃H₄₂N₁₂O₁₁: [M+H]⁺ 783.3203(найдено), 783.3169 (рассч.); [M+Na]⁺ 805.2980 (найдено), 805.2988 (рассч.).

Конъюгат метотрексата (**38моно**).



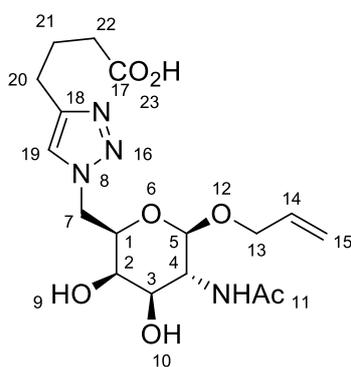
В случае реакции (**35**) с (**8**) в качестве продуктов образуется смесь соединений (**38**) и (**38моно**). Соединения (**38**) и (**38моно**) разделили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе H₂O/AcCN. В результате получили конъюгат (**38моно**) в виде желтого аморфного вещества (6 мг, 13%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O:MeCN-d₃ (6:1), δ, м.д.): 8.48 (с, 1H, H-8); 8.31 (уш.с, 5H, H-11,12,36); 8.04 (д, 1H, J=12.2 Гц, H-24); 7.47 (м, 2H, H-18,20); 6.61 (м, 2H, H-17,21); 5.60 (д, 1H, J=9.8 Гц, H-50 (NH)); 4.79-4.92 (м, 2H, H-13); 4.19-4.35 (м, 3H, H-40,34); 3.99 (м, 1H, H-43); 3.81-3.92 (м, 2H, H-25,45); 3.65-3.79 (м, 2H, H-46); 3.07 (с, 3H, H-15); 2.28-2.43 (м, 2H, H-30), 2.06-2.23 (м, 2H, H-26); 1.93 (с, 3H, H-50 (Ac)).

^{13}C ЯМР (400 МГц, $\text{D}_2\text{O}:\text{MeCN-d}_3$ (6:1), δ , м.д.): 177.5 (C-36); 176.5 (C-27); 165.7 (C-31); 164.7 (C-22); 154.2 (C-8); 152.0 (C-50 (C=O)); 133.6 (C-2); 131.4 (C-18,20); 126.5 (C-6); 123.0 (C-4); 114.5 (C-17,21); 89.4 (C-40); 80.9 (C-34); 73.2 (C-44); 70.2 (C-43); 63.4 (C-42); 59.9 (C-46); 57.5 (C-46); 54.6 (C-15); 41.6 (C-13); 33.2 (C-25); 29.7 (C-30); 24.3 (C-50 (CH_3)); 22.7 (C-26).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_{10}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 739.2923(найдено), 739.2907 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 761.2711 (найдено), 761.2726 (рассч.).

Синтез 4-(1-((5-ацетамидо-6-(аллилокси)-3,4-дигидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)бутановой кислоты (39).



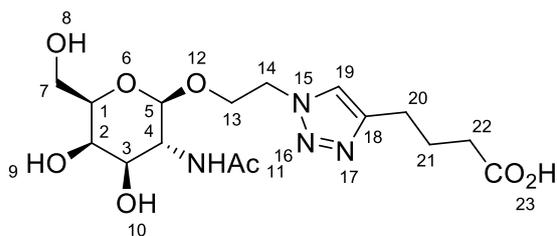
К раствору 30 мг (0.105 ммоль) соединения (**10**) в 15 мл сухого ДМФА добавили 14,1 мг (0.125 ммоль, 1.2 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 5 мг (0.026 ммоль, 0.25 экв.) CuI. Полученную смесь перемешивали в течение 48 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (10:1) \rightarrow MeOH. В результате получили соединение (**39**) в виде светло-желтого аморфного

вещества (28 мг, 67%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD , δ , м.д.): 7.99 (с, 1H, H-19); 5.65-5.78 (м, 1H, H-14); 5.04-5.19 (м, 2H, H-15); 4.81 (д, 1H, $J=3.6$ Гц, H-2); 4.63-4.71 (м, 2H, H-1,5); 4.30 (дд, 1H, $J=3.5$ и 11.0 Гц, H-3); 4.19-4.24 (м, 1H, H-4), 3.95 (д, 1H, $J=2.6$ Гц, H-7), 3.84 (дд, 1H, $J=3.1$ и 11.0 Гц, H-7), 3.63-3.75 (м, 2H, H-13), 2.74-2.86 (м, 2H, H-20), 2.32-2.42 (м, 2H, H-22), 1.91-2.05 (м, 5H, H-21, -NHAc).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_7$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 399.1876(найдено), 399.1874 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 421.1692 (найдено), 421.1694 (рассч.).

Синтез 4-(1-(2-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиетил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)этил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)бутановой кислоты (40).



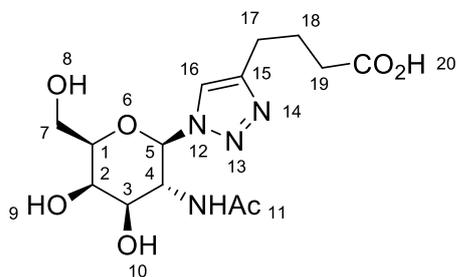
К раствору 30 мг (0.103 ммоль) соединения (7) в 15 мл сухого ДМФА добавили 13,9 мг (0.124 ммоль, 1,2 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 4,9 мг (0.026 ммоль, 0.25 экв.) CuI. Полученную смесь перемешивали в течение 48 часов, затем ДМФА

удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций CH₂Cl₂:MeOH (10:1) → MeOH. В результате получили соединение (40) в виде светло-желтого аморфного вещества 31 мг (75%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.21 (с, 1H, H-19); 4.67-4.77 (м, 2H, H-1,2); 4.40 (д, 1H, J=8.4 Гц, H-5); 4.21-4.30 (м, 1H, H-3); 3.90-4.03 (м, 2H, H-4, 13); 3.80-3.90 (м, 1H, H-13); 3.48-3.80 (м, 4H, H-7,14); 2.86 (т, 2H, J=7.4 Гц, H-20); 2.45 (т, 2H, J=7.4 Гц, H-22); 1.92-2.08 (м, 5H, H-21, -NHAc).

МСВР (*m/z*) для C₁₆H₂₆N₄O₈: [M+H]⁺ 403.1819(найдено), 403.1823 (рассч.).

Синтез 4-(1-(3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиетил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)бутановой кислоты (41).



К раствору 108 мг (0.44 ммоль) соединения (8) в 15 мл сухого ДМФА добавили 60 мг (0.528 ммоль, 1.2 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 21 мг (0.11 ммоль, 0.25 экв.) CuI. Полученную смесь перемешивали в течение 48 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом

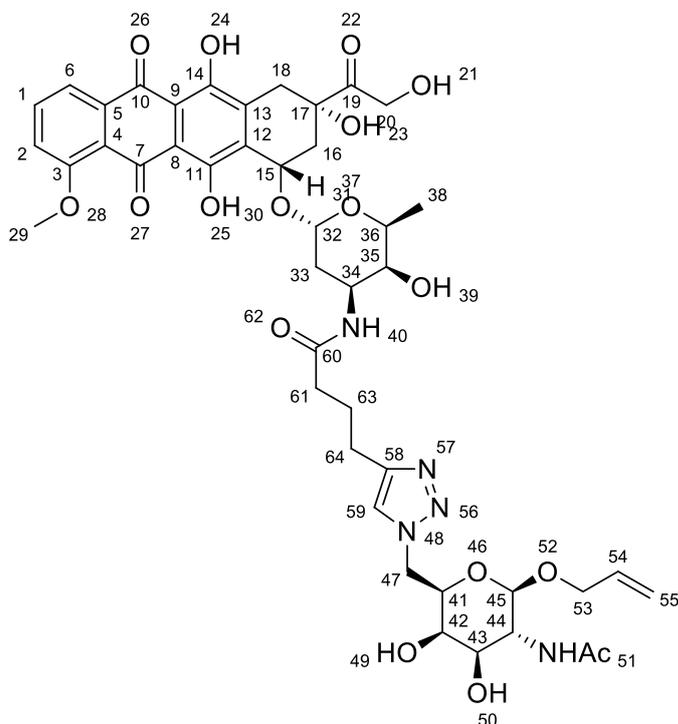
колоночной хроматографии в системе с градиентом концентраций CH₂Cl₂:MeOH (10:1) → MeOH. В результате получили соединение (41) в виде светло-желтого аморфного вещества 125 мг (79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.03 (с, 1H, H-16); 5.75 (д, 1H, J=9.8 Гц, H-5); 4.51-4.63 (м, 1H, H-1); 4.06 (д, 1H, J=3.1 Гц, H-2); 4.21-4.30 (м, 1H, H-3); 3.73-3.97 (м, 4H, H-3,4,7);

2.68-2.80 (м, 2H, H-17); 2.20-2.32 (м, 2H, H-19); 1.88-2.01 (м, 2H, H-18); 1.79 (с, 1H, -NHAc).

МСВР (m/z) для $C_{14}H_{22}N_4O_7$: $[M+H]^+$ 359.1561 (найдено), 359.1562 (рассч.); $[M+Na]^+$ 381.1381 (найдено), 381.1381 (рассч.).

Синтез конъюгата доксорубина (42).



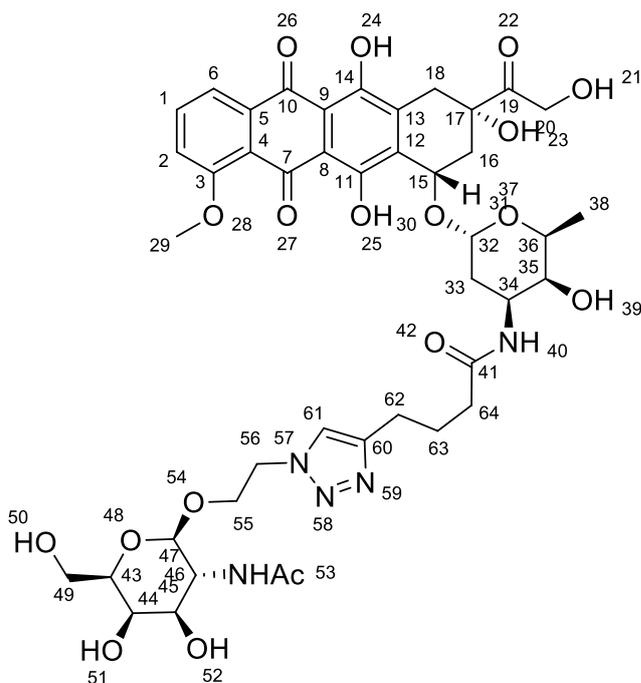
К раствору 10 мг (0.017 ммоль) Дох*HCl в 10 мл сухого ДМФА добавили 6.87 мг (0.017 ммоль, 1 экв.) соединения (39) в присутствии 1.92 мг (0,019 ммоль, 1.1 экв.) Et₃N, 2.18 мг (0.019 ммоль, 1.1 экв.) NHS, 3.64 мг (0.019 ммоль, 1.1 экв.) EDC в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1)

колоночная хроматография на силикагеле (градиентное элюирование CH₂Cl₂:MeOH (20:1) → MeOH), 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (42) в виде темно-красного порошка (6 мг, 38%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 7.94 (д, 1H, J=7.5 Гц, H-6); 7.83 (т, J=7.5 Гц, H-1); 7.73 (с, 1H, H-59); 7.56 (д, 1H, J=7.5 Гц, H-2); 5.56-5.72 (м, 1H, H-54); 5.42 (м, 1H, OH); 4.96-5.23 (м, 3H, H-32,55); 4.75 (м, 2H, H-53); 4.48-4.56 (м, 2H, H-20); 4.20-4.33 (м, 2H, H-41,45); 4.08-4.19 (м, 1H, H-42,43); 4.02 (с, 3H, H-29); 3.88 (с, 1H, OH); 3.74-3.84 (м, 1H, H-44) 3.46-3.70 (м, 5H, H-31,34,35,36,47); 2.95-3.18 (м, 2H, H-64); 2.11-2.42 (м, 4H, H-16, 61); 1.81-2.07 (м, 5H, -NHAc, H-63); 1.54-1.76 (м, 2H, H-33).

МСВР (m/z) для $C_{44}H_{53}N_5O_{17}$: $[M+H]^+$ 924.3509 (найдено), 924.3543 (рассч.); $[M+Na]^+$ 946.3340 (найдено), 946.3329 (рассч.).

Синтез конъюгата доксорубина (43).



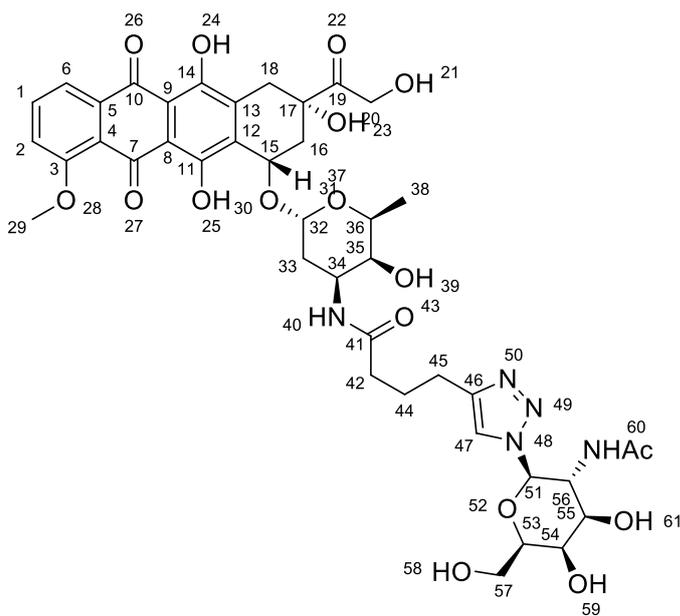
К раствору 6 мг (0.01 ммоль) Dox*HCl в 6 мл сухого ДМФА добавили 4.16 мг (0.01 ммоль, 1 экв.) соединения (40) в присутствии 1.15 мг (0.011 ммоль, 1.1 экв.) Et₃N, 1.31 мг (0.011 ммоль, 1.1 экв.) NHS, 2.11 мг (0,011 ммоль, 1.1 экв.) EDC в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя последовательными хроматографированиями: 1) колоночная хроматография на силикагеле (градиентное элюирование CH₂Cl₂:MeOH

(20:1) → MeOH), 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (43) в виде темно-красного порошка (6.7 мг, 70%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.00 (д, 1H, J=7.5 Гц, H-6); 7.85 (т, J=7.5 Гц, H-1); 7.74 (с, 1H, H-61); 7.58 (д, 1H, J=7.5 Гц, H-2); 5.43 (м, 1H, OH); 5.19 (м, 1H, H-32); 4.74 (м, 2H, H-55); 4.61 (с, 2H, H-20); 4.51 (т, 2H, J=6.2 Гц, H-56); 4.33 (д, 1H, J=8.4 Гц, H-47); 4.28 (д, 1H, J=6.6 Гц, H-43); 4.08-4.22 (м, 2H, H-44,45); 4.04 (с, 3H, H-29); 3.66-3.96 (м, 6H, H-31,34,35,36,46, OH); 3.62 (уш.с, 1H, OH); 3.51-3.57 (м, 1H, H-49); 3.44-3.50 (м, 1H, H-49); 3.00-3.18 (м, 2H, H-62); 2.37 (м, 2H, H-16); 2.23 (т, 2H, J=7.8 Гц, H-64); 1.85-2.05 (м, 7H, -NHAc, H-33,63); 1.24-1.34 (м, 5H, H-18,38).

МСВР (*m/z*) для C₄₃H₅₃N₅O₁₈: [M+H]⁺ 928,3458 (найдено), 928,3456 (рассч.); [M+Na]⁺ 950,3277 (найдено), 950,3270 (рассч.).

Синтез конъюгата доксорубина (44).



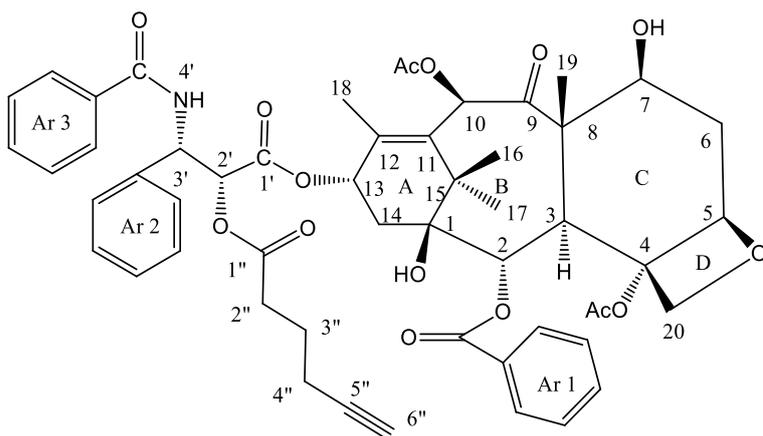
К раствору 6 мг (0.01 ммоль) доксорубина гидрохлорида в 6 мл сухого ДМФА добавили 3.95 мг (0.01 ммоль, 1 экв.) соединения (41) в присутствии 1.15 мг (0.011 ммоль) Et₃N, 1.31 мг (0.011 ммоль, 1.1 экв.) NHS, 2.11 мг (0.011 ммоль, 1.1 экв.) EDC в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили двумя

последовательными хроматографированиями: 1) колоночная хроматография на силикагеле (градиентное элюирование CH₂Cl₂:MeOH (20:1) → MeOH), 2) ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (44) в виде темно-красного порошка (7.3 мг, 80%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 7.72-8.04 (м, 3H, H-1,6, 61); 7.56 (д, 1H, J=7.6 Гц, H-2); 5.61 (д, 2H, J=9.2 Гц, H-51); 5.09-5.22 (м, 1H, H-32); 4.65 (с, 2H, H-20); 4.46 (т, 1H, J=10.0 Гц, H-53); 4.09-4.33 (м, 3H, H-54,55,56); 4.04 (с, 5H, H-29,57); 3.69-3.87 (м, 5H, H-31,34,35,36, OH); 3.62 (уш.с, 1H, OH); 2.91-3.18 (м, 2H, H-45); 2.27-2.44 (м, 2H, H-16); 2.06-2.22 (м, 2H, H-42); 1.84-2.03 (м, 4H, H-44,33); 1.77 (с, 3H, -NHAc); 1.20-1.34 (м, 5H, H-18,38).

МСВР (*m/z*) для C₄₁H₄₉N₅O₁₇ : [M+H]⁺ 884.3196 (найдено), 884.3196 (рассч.); [M+Na]⁺ 906.3025 (найдено), 906.3016 (рассч.).

Синтез моноацилированного гекс-5-иновой кислоты паклитаксела (45)[92].

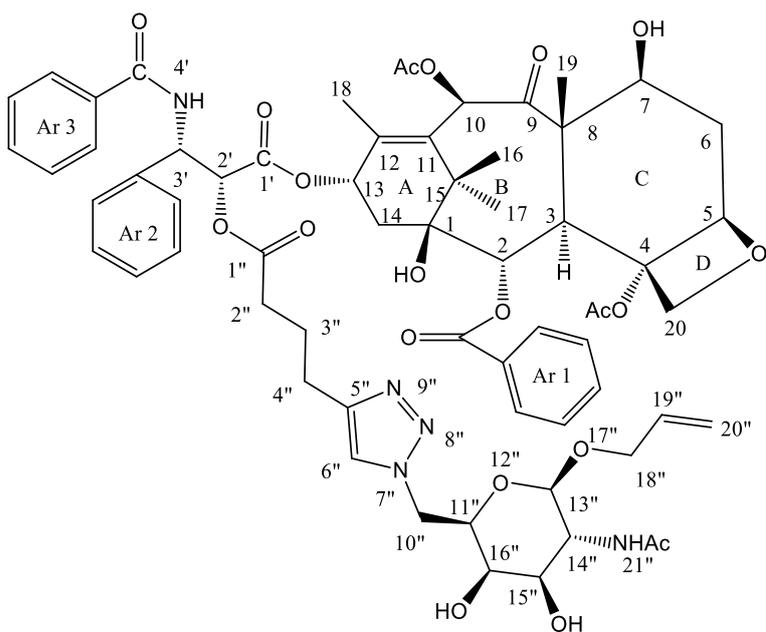


К раствору 40.9 мг (47.87 мкмоль) паклитаксела в 20 мл сухого CH_2Cl_2 добавили 5.9 мг (52.66 мкмоль, 1.1 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 8.2 мг (52.66 мкмоль, 1.1 экв.) EDC, а также каталитическое количество DMAP в инертной атмосфере. Полученную смесь

перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, затем CH_2Cl_2 удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом обращенно-фазовой колоночной хроматографии на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом концентраций $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (1:0) \rightarrow $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (0:1). В результате получили соединение (45) в виде белого порошка (41.3 мг, 91%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.15 (д, 2H, $J=7.2$ Гц, H-орто- (Ar1)); 7.75 (д, 2H, $J=7.3$ Гц, H-орто- (Ar3)); 7.62 (т, 1H, $J=7.4$ Гц, H-пара-(Ar1)); 7.57-7.48 (м, 3H, Ароматика); 7.47-7.32 (м, 7H, Ароматика); 6.90 (д, 1H, $J=9.2$ Гц, NH); 6.23-6.32 (м, 2H, H-10, 13); 5.97 (дд, 1H, $J=2.9$ и 9.2 Гц, H-3'); 5.69 (д, 1H, $J=7.1$ Гц, H-2); 5.51 (д, 1H, $J=3.1$ Гц, H-2'); 4.98 (дд, 1H, $J=1.8$ и 9.5 Гц, H-5); 4.45 (дд, 1H, $J=6.7$ и 10.8 Гц, H-7); 4.33 (д, 1H, $J=8.4$ Гц, H-20); 4.21 (д, 1H, $J=8.6$ Гц, H-20); 3.82 (д, 1H, $J=7.1$ Гц, H-3); 2.48-2.70 (м, 3H, H-6, 4''); 2.47 (с, 3H, 4-OAc); 2.13-2.44 (м, 8H, H-14, 6'', 10-OAc, H-2''); 2.00-1.78 (м, 6H, H-6, 18, 3''); 1.69 (с, 3H, H-19); 1.24 (с, 3H, H-17); 1.14 (с, 3H, H-16).

Синтез конъюгата паклитаксела (46).



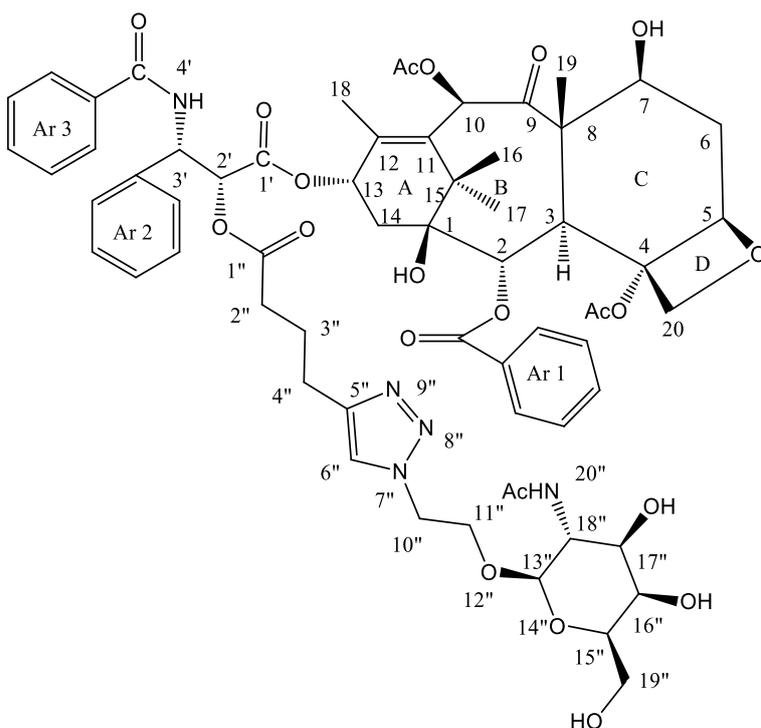
К раствору 6.5 мг (6.85 мкмоль) соединения (45) в 7 мл сухого ДМФА добавили 2,2 мг (6.85 мкмоль, 1 экв.) соединения (10) в присутствии 0.3 мг (1.58 мкмоль, 0.2 экв.) CuI и 0.2 мг (1.58 мкмоль, 0.2 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении.

Полученное вещество очистили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (46) в виде белого порошка (6.5 мг, 77 %).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.11 (д, 2H, J=7.2 Гц, H-орто- (Ar1)); 7.80 (д, 2H, J=7.2 Гц, H-орто- (Ar3)); 7.77 (с, 1H, H-6''); 7.62-7.70 (м, 2H, -NH-, H-пара-(Ar1)); 7.38-7.60 (м, 9H, Ароматика); 7.27 (т, 1H, J=7.1 Гц, H-пара-(Ar2)); 6.43 (с, 1H, H-10); 6.08 (т, 1H, J=9.1 Гц, H-13); 5.84 (д, 1H, J=6.1 Гц, H-3'); 5.70-5.81 (м, 1H, H-19''); 5.65 (д, 1H, J=7.2 Гц, H-2); 5.46 (д, 1H, J=6.0 Гц, H-2'); 4.95-5.15 (м, 3H, H-5,20''); 4.59-4.66 (м, 1H, H-11''); 4.17-4.39 (м, 4H, H-7, 13'',20); 4.09 (дд, 1H, J=4.7, 13.3 Гц, H-14''); 3.76-4.00 (м, 5H, H-3, 15'',16'',18''); 3.60 (дд, 1H, J=3.0, 10.7 Гц, H-10''); 3.42-3.50 (м, 1H, H-10''); 2.68-2.79 (м, 2H, H-4''); 2.44-2.54 (м, 3H, H-2'',6); 2.40 (с, 3H, 4-OAc); 2.11-2.23 (м, 5H, H-14, 10-OAc); 1.76-2.06 (м, 7H, H-6,3'', 18, -NHAc); 1.66 (с, 3H, H-19); 1.14 (с, 6H, H-16, 17).

МСВР (*m/z*) для C₆₄H₇₅N₅O₂₀ : [M+H]⁺ 1234.5084 (найдено), 1234.5078 (рассч.); [M+Na]⁺ 1256.4896(найдено), 1256.4898 (рассч.).

Синтез конъюгата паклитаксела (47).



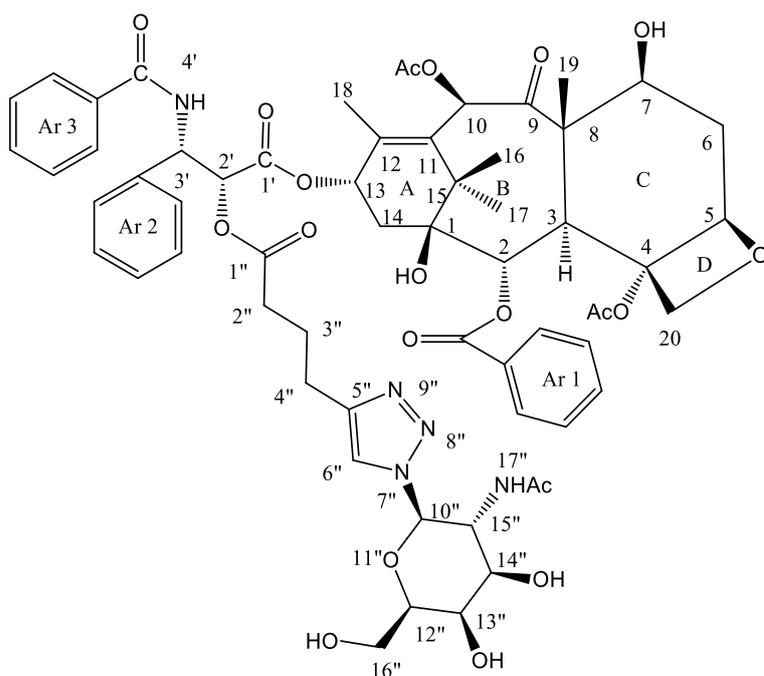
К раствору 10 мг (10.54 мкмоль) соединения (45) в 7 мл сухого ДМФА добавили 3.1 мг (10.54 мкмоль, 1 экв.) соединения (7) в присутствии 0,4 мг (2.11 мкмоль, 0.2 экв.) CuI и 0.2 мг (2.11 мкмоль, 0.2 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом ВЭЖХ в обращено-

фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (47) в виде белого порошка (7 мг, 54%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.07 (д, 2H, J=7.5 Гц, H-орто- (Ar1)); 8.00 (м, 2H, -NH-, H-6''); 7.71 (д, 2H, J=7.0 Гц, H-орто- (Ar3)); 7.30-7.60 (м, 12H, Ароматика, -NH-); 6.27 (с, 1H, H-10); 6.09 (т, 1H, J=8.7 Гц, H-13); 5.87 (д, 1H, J=4.4 Гц, H-3'); 5.63 (д, 1H, J=7.0 Гц, H-2); 5.33-5.42 (м, 1H, H-2'); 4.93 (д, 1H, J=9.3 Гц, H-5); 4.08-4.56 (м, 9H, H-7,20, 11'', 13'',15'',16'',+OH); 3.67-3.98 (м, 7H, H-3, 10'', 17'',18'', 19''); 2.62-2.77 (м, 3H, H-6,4''); 2.31-2.52 (м, 5H, 4-Ас, 2''); 2.09-2.26 (м, 5H, H-14, 10-Ас); 1.76-1.99 (м, 9H, H-6,18,3'',NHAc); 1.62 (с, 1H, H-19); 1.19 (с, 3H, H-17); 1.14 (с, 3H, H-16).

МСВР (*m/z*) для C₆₃H₇₅N₅O₂₁ : [M+H]⁺ 1238.5035 (найдено), 1238.5027 (рассч.); [M+Na]⁺ 1260.4848(найдено), 1260.4847 (рассч.).

Синтез конъюгата паклитаксела (48).



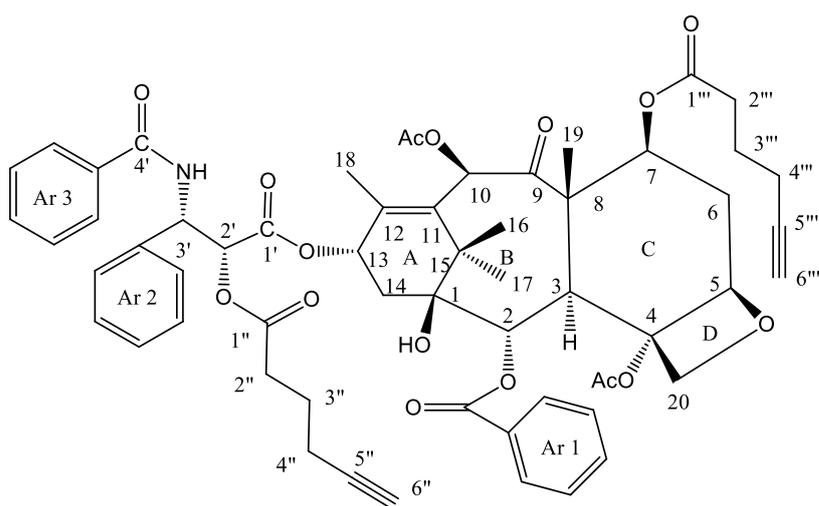
К раствору 10 мг (10.54 мкмоль) соединения (45) в 7 мл сухого ДМФА добавили 2.6 мг (10.54 мкмоль, 1 экв.) соединения (8) в присутствии 0.4 мг (2.11 мкмоль, 0.2 экв.) CuI и 0.2 мг (2.11 мкмоль, 0.2 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили

методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (48) в виде белого порошка (10 мг, 79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.04 (д, 2H, J=7.8 Гц, H-орто- (Ar1)); 7.99 (м, 1H, -NH-); 7.82 (с, 1H, H-6''); 7.69 (д, 2H, J=6.5 Гц, H-орто- (Ar3)); 7.29-7.57 (м, 11H, Ароматика); 6.26 (с, 1H, H-10); 6.08 (т, 1H, J=8.7 Гц, H-13); 5.84-5.91 (м, 1H, H-3'); 5.60-5.68 (м, 2H, H-2, H-10''); 5.34-5.42 (м, 1H, H-2'); 4.91 (д, 1H, J=9.8 Гц, H-5); 4.12-4.42 (м, 4H, H-7,20, 12''); 3.93-4.00 (м, 1H, H-13''); 2.53-2.73 (м, 3H, H-6,4''); 2.30-2.50 (м, 5H, 4-Ac, 2''); 2.10-2.27 (м, 5H, H-14, 10-Ac); 1.75-2.06 (м, 6H, H-6,3'', -NHAc); 1.65 (с, 3H, H-18); 1.60 (с, 3H, H-19); 1.11 (с, 3H, H-17); 1.07 (с, 3H, H-16).

МСВР (*m/z*) для C₆₁H₇₁N₅O₂₀: [M+H]⁺ 1194.4771 (найдено), 1194.4765 (рассч.); [M+Na]⁺ 1216.4585 (найдено), 1216.4585 (рассч.).

Синтез диацилированного гекс-5-иновой кислотой паклитаксела (49).



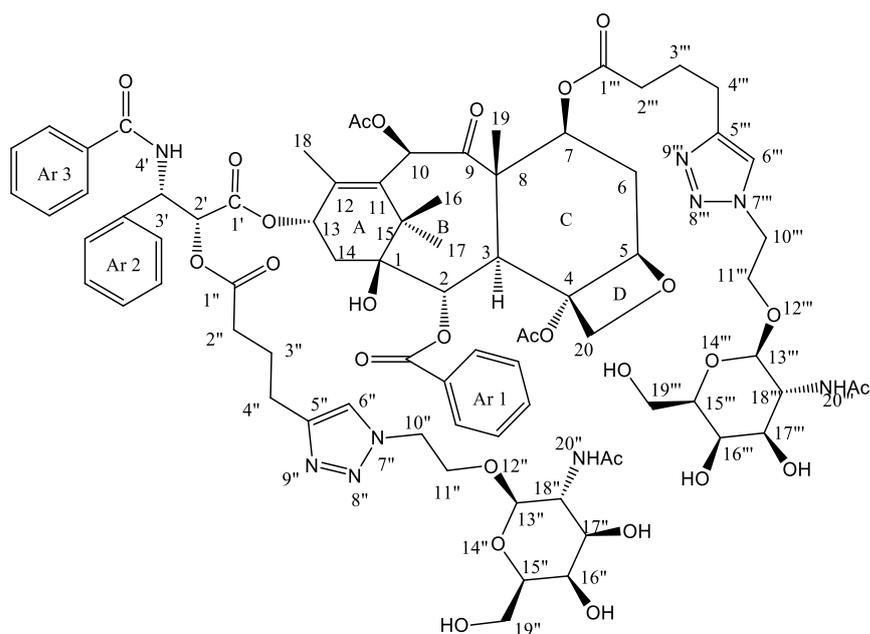
К раствору 39 мг (45.67 мкмоль) паклитаксела в 20 мл сухого CH_2Cl_2 добавили 11.3 мг (100.5 мкмоль, 2.2 экв.) гекс-5-иновой кислоты и 15.6 мг (100.48 мкмоль, 2.2 экв.) EDC, а также каталитическое количество DMAP в инертной атмосфере. Полученную

смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, затем CH_2Cl_2 удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом обращенно-фазовой колоночной хроматографии на приборе INTERCHIM PURIFLASH 430 на обращенно-фазовой колонке PURIFLASH C18-HP 15UM F0012 в системе с градиентом концентраций $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (1:0) \rightarrow $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (0:1). В результате получили соединение (49) в виде белого порошка (36.2 мг, 76%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.13 (д, 2H, $J=7.3$ Гц, H-орто- (Ar1)); 7.76 (д, 2H, $J=7.3$ Гц, H-орто- (Ar3)); 7.62 (т, 1H, $J=7.4$ Гц, H-пара-(Ar1)); 7.47-7.57 (м, 3H, Ароматика); 7.31-7.47 (м, 7H, Ароматика); 6.92 (д, 1H, $J=9.2$ Гц, NH); 6.28 (с, 1H, H-10); 6.23 (т, 1H, $J=9.0$ Гц, H-13); 5.96 (дд, 1H, $J=3.0$ и 9.1 Гц, H-3'); 5.69 (д, 1H, $J=6.8$ Гц, H-2); 5.61 (дд, 1H, $J=7.1$ и 10.5 Гц, H-7); 5.54 (д, 1H, $J=3.1$ Гц, H-2'); 4.97 (д, 1H, $J=8.7$ Гц, H-5); 4.34 (д, 1H, $J=8.4$ Гц, H-20); 4.19 (д, 1H, $J=8.4$ Гц, H-20); 3.96 (д, 1H, $J=6.8$ Гц, H-3); 2.10-2.68 (м, 18H, H-6, 6'', 6''', 4-OAc, 14, 4'', 4''', 10-OAc, H-2'', 2'''); 1.93-2.04 (м, 4H, 3'', 3'''); 1.77-1.90 (м, 4H, H-6, 18); 1.70 (с, 3H, H-19) 1.26(с, 3H, H-17, OH); 1.14 (с, 3H, H-16).

МСВР (m/z) для $\text{C}_{59}\text{H}_{63}\text{NO}_{16}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1042.4227 (найдено), 1042.4220 (рассч.); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1064.4045 (найдено), 1064.4039 (рассч.).

Синтез конъюгата паклитаксела (51).



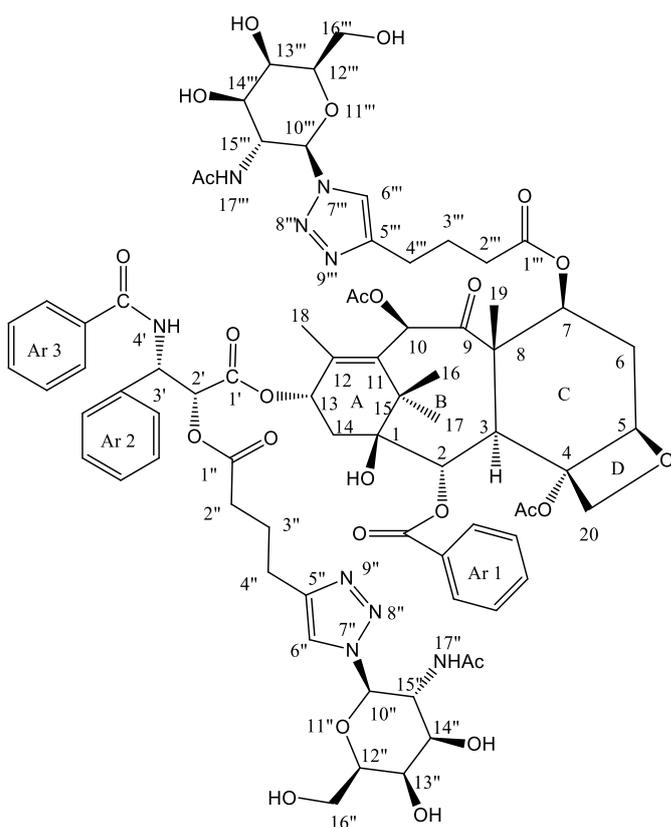
К раствору 9 мг (8.64 мкмоль) соединения (49) в 7 мл сухого ДМФА добавили 5 мг (17.28 мкмоль, 2 экв.) соединения (7) в присутствии 0,7 мг (3.46 мкмоль, 0.4 экв.) CuI и 0.4 мг (3.46 мкмоль, 0.4 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем

ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (51) в виде белого порошка (4.3 мг, 31%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.12 (д, 2H, J=7.3 Гц, H-орто- (Ar1)); 7.75-7.85 (м, 3H, H-орто- (Ar3), 6''); 7.65-7.74 (м, 2H, H-6'', H-пара-(Ar1)); 7.41-7.63 (м, 9H, Ароматика); 7.28 (т, 1H, J=6.3 Гц, H-пара-(Ar2)); 6.25 (с, 1H, H-10); 6.07 (т, 1H, J=8.7 Гц, H-13); 5.84 (д, 1H, J=6.0 Гц, H-3'); 5.56-5.66 (м, 2H, H-2,7); 5.48 (д, 1H, J=6.4 Гц, H-2'); 5.01 (д, 1H, J=9.3 Гц, H-5); 4.48-4.66 (м, 6H, H-11'',11''',15'',15'''); 4.33-4.41 (м, 2H, H-13'',13'''); 4.14-4.27 (м, 4H, H-20, 16'', 16'''); 3.67-4.00 (м, 11H, H-3, 10'',10''',18'', 18''', 17'',17'''+OH); 3.45-3.60 (м, 4H, 19'',19'''); 2.69-2.77 (м, 4H, H-4'',4'''); 2.62-2.70 (м, 1H, H-6); 2.49-2.57 (м, 3H, 2'', 2'''); 2.30-2.44 (м, 5H, H-2''',4-OAc, 14); 2.09-2.22 (м, 4H, H-14, 10-Ac); 1.87-2.05 (м, 14H, H-6,18,3'',3''',NHAc); 1.78 (с, 3H, H-19); 1.07-1.16 (м, 6H, H-17,16).

МСВР (*m/z*) для C₇₉H₉₉N₉O₂₈: [M+H]⁺ 1622.6668 (найдено), 1622.6672 (рассч.); [M+Na]⁺ 1644.6524 (найдено), 1644.6492 (рассч.).

Синтез конъюгата паклитаксела (52).



К раствору 9 мг (8.64 мкмоль) соединения (49) в 7 мл сухого ДМФА добавили 4.3 мг (17,28 мкмоль, 2 экв.) соединения (8) в присутствии 0.7 мг (3.46 мкмоль, 0.4 экв.) CuI и 0.4 мг (3.46 мкмоль, 0.4 экв.) Et₃N в инертной атмосфере. Полученную смесь перемешивали в течение 24 часов, затем ДМФА удалили при пониженном давлении. Полученное вещество очистили методом ВЭЖХ в обращено-фазовой системе (H₂O – AcCN). В результате получили конъюгат (52) в виде белого порошка (7.1 мг, 54%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, δ, м.д.): 8.13

(д, 2H, J=7.1 Гц, H-орто- (Ar1)); 8.03 (с, 1H, H-6''); 7.98 (с, 1H, H-6''); 7.83 (д, 2H, J=7.0 Гц, H-орто- (Ar3)); 7.40-7.71 (м, 10H, Ароматика); 7.29 (т, 1H, H-пара-(Ar2)); 6.26 (с, 1H, H-10); 6.09 (т, 1H, J=9.0 Гц, H-13); 5.87 (д, 1H, J=5.7 Гц, H-3'); 5.57-5.73 (м, 4H, H-2,7, 10'',10'''); 5.51 (д, 1H, J=6.0 Гц, H-2'); 5.01 (д, 1H, J=9.3 Гц, H-5); 4.44-4.53 (м, 2H, H-12'', 12'''); 4.15-4.25 (м, 2H, H-20); 3.96-4.03 (м, 1H, H-13'',13'''); 3.88-3.94 (м, 1H, H-3); 3.70-3.87 (м, 8H, H-14'',15'',16'', 14''',15''',16'''); 2.73 (т, 4H, J=6.8 Гц, H-4'',4'''); 2.51-2.60 (м, 1H, H-6); 2.39-2.51 (м, 5H, 4-Ac, 2'',2'''); 2.09-2.37 (м, 7H, H-14, 10-Ac, 2'',2'''); 1.84-2.04 (м, 8H, H-6,3'', 3''', -NHAc); 1.69-1.83 (м, 9H, H-18,19,-NHAc); 1.06-1.17 (м, 6H, H-17,16).

МСВР (*m/z*) для C₇₅H₉₁N₉O₂₆: [M+H]⁺ 1534.6129 (найдено), 1534.6148 (рассч.); [M+Na]⁺ 1556.5962 (найдено), 1556.5967 (рассч.).

5. Выводы

1. Разработаны и впервые синтезированы новые структурные типы низкомолекулярных лигандов асиалогликопротеинового 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 асиалогликопротеиновым 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 асиалогликопротеинового 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.

6. Список цитируемой литературы

- 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 Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors // Biochemistry. 1990. V. 29. №. 43. P. 10009-10018.
- ⁴ Stockert R. J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression // Physiol. Rev. 1995. V. 75. №. 3. P. 591-609.
- ⁵ Bareford L. M., Swaan P. W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. V. 59. №. 8. P. 748-758.
- ⁶ Böhme D., Beck-Sickinger A. G. Controlling Toxicity of Peptide–Drug Conjugates by Different Chemical Linker Structures //ChemMedChem. 2015. V. 10. №. 5. P. 804-814.
- ⁷ Hoffman A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems // J. Control. Release. 2008. V. 132. №. 3. P. 153-163.
- ⁸ Иваненков Я. А. и др. Экспериментальные направления в разработке средств направленной доставки лекарственных препаратов в клетки печени //Успехи химии. – 2017. Т. 86. №. 8. С. 750-776.
- ⁹ Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery // J. Control. Release. 2007. V. 120. №. 1-2. P. 1-3.
- ¹⁰ Cukierman E., Khan D. R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy // Biochem. Pharmacol. 2010. V. 80. №. 5. P. 762-770.
- ¹¹ Brennan F. R. et al. Preclinical safety testing of biotechnology-derived pharmaceuticals //Molecular biotechnology. 2004. V. 27. №. 1. P. 59-74.
- ¹² Kang B. K. et al. Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo //International journal of pharmaceutics. 2004. V. 286. №. 1-2. P. 147-156.
- ¹³ Sinha R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery //Molecular cancer therapeutics, 2006, V. 5, №. 8, P. 1909-1917.
- ¹⁴ Stern S. T., McNeil S. E. Nanotechnology safety concerns revisited //Toxicological sciences. – 2007. V. 101. №. 1. P. 4-21.
- ¹⁵ Akbarzadeh A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications // Nanoscale Research Letters. 2013. Vol. 8. P. 102.
- ¹⁶ Bildstein L., Dubernet C., Couvreur P. Prodrug-based intracellular delivery of anticancer agents //Advanced drug delivery reviews. 2011. V. 63. №. 1-2. P. 3-23.
- ¹⁷ Kruger M. et al. Synthesis and stability of four maleimide derivatives of the anticancer drug doxorubicin for the preparation of chemoimmunoconjugates //Chemical and pharmaceutical bulletin. 1997. V. 45. №. 2. V. 399-401.
- ¹⁸ Gillies E. R., Fréchet J. M. J. A new approach towards acid sensitive copolymer micelles for drug delivery //Chemical Communications. 2003. №. 14. P. 1640-1641.
- ¹⁹ Ma X., Zhao Y. Biomedical applications of supramolecular systems based on host–guest interactions //Chemical reviews. 2014. V. 115. №. 15. P. 7794-7839.
- ²⁰ Uekama K., Hirayama F., Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems //Chemical reviews. – 1998. V. 98. №. 5. P. 2045-2076.
- ²¹ Uekama K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2004. V. 52. №. 8. P. 900-915.

-
- ²² Rajendran L., Knölker H. J., Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery // *Nature reviews Drug discovery*. 2010. V. 9. №. 1. P. 29.
- ²³ 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.
- ²⁴ Leriche G., Chisholm L., Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology // *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012. V. 20. №. 2. P. 571-582.
- ²⁵ Gao W., Chan J. M., Farokhzad O. C. pH-responsive nanoparticles for drug delivery // *Molecular pharmaceutics*. 2010. V. 7. №. 6. P. 1913-1920.
- ²⁶ Jin Y. et al. A peptide-based pH-sensitive drug delivery system for targeted ablation of cancer cells // *Chemical Communications*. 2015. V. 51. №. 77. P. 14454-14457.
- ²⁷ Liang Y. et al. Preparation of pH sensitive Pluronic-docetaxel conjugate micelles to balance the stability and controlled release issues // *Materials*. 2015. V. 8. №. 2. P. 379-391.
- ²⁸ Su Z. et al. Polymeric complex micelles based on the double-hydrazone linkage and dual drug-loading strategy for pH-sensitive docetaxel delivery // *Journal of Materials Chemistry B*. 2016. V. 4. №. 6. P. 1122-1133.
- ²⁹ Dubowchik G. M. 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 // *Bioconjugate chemistry*. 2002. V. 13. №. 4. P. 855-869.
- ³⁰ Zheng N. et al. Redox-responsive, reversibly-crosslinked thiolated cationic helical polypeptides for efficient siRNA encapsulation and delivery // *Journal of Controlled Release*. – 2015. V. 205. P. 231-239.
- ³¹ Ramasamy T. et al. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: a comprehensive review // *Journal of Controlled Release*. 2017. V. 258. P. 226-253.
- ³² MiáJeon H. et al. Camptothecin delivery into hepatoma cell line by galactose-appended fluorescent drug delivery system // *RSC Advances*. 2014. V. 4. №. 36. P. 18744-18748.
- ³³ Grisham J. W. Cell types in long-term propagable cultures of rat liver // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1980. V. 349. №. 1. P. 128-137.
- ³⁴ Poelstra K., Prakash J., Beljaars L. Drug targeting to the diseased liver // *Journal of controlled release*. 2012. V. 161. №. 2. P. 188-197.
- ³⁵ Chou L. Y. T., Ming K., Chan W. C. W. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles // *Chemical Society Reviews*. 2011. V. 40. №. 1. P. 233-245.
- ³⁶ Hyodo I. et al. Distribution of asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinoma // *Liver Int*. 1993. V. 13. №. 2. P. 80-85.
- ³⁷ Julyan P. J. et al. Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine // *J. Control. Release*. 1999. V. 57. №. 3. P. 281-290.
- ³⁸ Collins J. C. et al. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 // *J. Biol. Chem*. 1988. V. 263. №. 23. P. 11280-11283.
- ³⁹ Grewal P. K. Chapter Thirteen-The Ashwell–Morell Receptor // *Methods Enzymol*. 2010. V. 479. P. 223-241.
- ⁴⁰ Harris R. L., Van den Berg C. W., Bowen D. J. ASGR1 and ASGR2, the genes that encode the asialoglycoprotein receptor (Ashwell receptor), are expressed in peripheral blood monocytes and show interindividual differences in transcript profile // *Mol. Biol. Int*. 2012. V. 2012. P. 1-10.
- ⁴¹ Dodeur M. et al. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus on the Binding and Uptake of Asialoorosomucoïd by Isolated Hepatocytes from Rats // *Eur. J. Biochem*. 1982. V. 123. №. 2. P. 383-387.

-
- ⁴² Li Y. et al. Targeted delivery of macromolecular drugs: asialoglycoprotein receptor (ASGPR) expression by selected hepatoma cell lines used in antiviral drug development // *Curr. Drug. Deliv.* 2008. V. 5. №. 4. P. 299-302.
- ⁴³ Onizuka T. et al. NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes // *FEBS J.* 2012. V. 279. №. 15. P. 2645-2656.
- ⁴⁴ D'Souza A. A. et al. Comparative in silico–in vivo evaluation of ASGP-R ligands for hepatic targeting of curcumin Gantrez nanoparticles // *AAPS J.* 2013. V. 15. №. 3. P. 696-706.
- ⁴⁵ Lee Y. C. et al. Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features // *Journal of Biological Chemistry.* 1983. V. 258. №. 1. P. 199-202.
- ⁴⁶ Baenziger J. U., Maynard Y. Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity // *Journal of Biological Chemistry.* 1980. V. 255. №. 10. P. 4607-4613.
- ⁴⁷ Baenziger J. U., Fiete D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes // *Cell.* 1980. V. 22. №. 2. P. 611-620.
- ⁴⁸ Connolly D. T. et al. Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. Evidence for a short-circuit pathway that does not lead to degradation // *Journal of Biological Chemistry.* 1982. V. 257. №. 2. P. 939-945.
- ⁴⁹ Khorev O. et al. Trivalent, Gal/GalNAc-containing ligands designed for the asialoglycoprotein receptor // *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2008. V. 16. №. 9. P. 5216-5231.
- ⁵⁰ Valentijn A. R. P. M. et al. Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the asialoglycoprotein receptor // *Tetrahedron.* 1997. V. 53. №. 2. P. 759-770.
- ⁵¹ Sliedregt L. A. J. M. et al. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor // *Journal of medicinal chemistry.* 1999. V. 42. №. 4. P. 609-618.
- ⁵² Rajeev K. G. et al. Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo // *Chembiochem.* 2015. V. 16. №. 6. P. 903-908.
- ⁵³ Biessen E. A. L. et al. Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor // *Journal of medicinal chemistry.* 1995. V. 38. №. 9. P. 1538-1546.
- ⁵⁴ Iobst S. T., Drickamer K. Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors // *Journal of Biological Chemistry.* – 1996. V. 271. №. 12. P. 6686-6693.
- ⁵⁵ Mamidyala S. K. et al. Glycomimetic ligands for the human asialoglycoprotein receptor // *Journal of the American Chemical Society.* 2012. V. 134. №. 4. P. 1978-1981.
- ⁵⁶ Wu J., Nantz M. H., Zern M. A. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications // *Front. Biosci.* 2002. V. 7. P. 717-725.
- ⁵⁷ Wei M. et al. Lactoferrin-modified PEGylated liposomes loaded with doxorubicin for targeting delivery to hepatocellular carcinoma // *International journal of nanomedicine.* 2015. V. 10. P. 5123.
- ⁵⁸ Liu X. et al. Asialoglycoprotein receptor-targeted liposomes loaded with a norcantharimide derivative for hepatocyte-selective targeting // *International journal of pharmaceutics.* 2017. V. 520. №. 1-2. P. 98-110.
- ⁵⁹ Zhang X. et al. Dual-functional liposome for tumor targeting and overcoming multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells // *Biomaterials.* 2012. P. 33. №. 29. P. 7103-7114.
- ⁶⁰ Zhang Y. et al. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect // *Journal of controlled release.* 2007. V. 117. №. 2. P. 281-290.

- ⁶¹ Cho H. A. et al. Suppression of hepatitis B virus-derived human hepatocellular carcinoma by NF- κ B-inducing kinase-specific siRNA using liver-targeting liposomes //Archives of pharmacal research. 2009. V. 32. №. 7. P. 1077-1086.
- ⁶² Singh M., Ariatti M. Targeted gene delivery into HepG2 cells using complexes containing DNA, cationized asialoorosomucoid and activated cationic liposomes // J. Control. Release. 2003. V. 92. №. 3. P. 383-394.
- ⁶³ Suo A. et al. Galactosylated poly (ethylene glycol)-b-poly (l-lactide-co- β -malic acid) block copolymer micelles for targeted drug delivery: preparation and in vitro characterization //International journal of nanomedicine. 2010. V. 5. P. 1029.
- ⁶⁴ Wang Z. et al. Amphiphilic diblock terpolymer PMAgala-b-P (MAA-co-MACHol) s with attached galactose and cholesterol grafts and their intracellular pH-responsive doxorubicin delivery //Biomacromolecules. 2015. V. 17. №. 1. P. 98-110.
- ⁶⁵ Wu D. Q. et al. Galactosylated fluorescent labeled micelles as a liver targeting drug carrier //Biomaterials. 2009. V. 30. №. 7. P. 1363-1371.
- ⁶⁶ Cavallaro G. et al. Galactosylated polyaspartamide copolymers for siRNA targeted delivery to hepatocellular carcinoma cells //International journal of pharmaceutics. 2017. V. 525. №. 2. P. 397-406.
- ⁶⁷ Peng D. J. et al. Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor //Cancer gene therapy. 2007. V. 14. №. 1. P. 66.
- ⁶⁸ Li H. et al. High drug loading pH-sensitive pullulan-DOX conjugate nanoparticles for hepatic targeting //Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2014. V. 102. №. 1. P. 150-159.
- ⁶⁹ Lee C. et al. Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017. V. 152. P. 183-191.
- ⁷⁰ Wang Y. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded nanoparticle incorporated with galactose-carrying polymer for hepatocyte targeted delivery //Drug development and industrial pharmacy. 2012. V. 38. №. 9. P. 1039-1046.
- ⁷¹ Li X. et al. Preparation, characterization and controlled release of liver-targeting nanoparticles from the amphiphilic random copolymer //Polymer. 2008. P. 49. №. 22. P. 4769-4775.
- ⁷² Jain N. et al. Lactosaminated-N-succinyl chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of acyclovir //Journal of nanoparticle research. 2014. V. 16. №. 1. P. 2136.
- ⁷³ Huang G. et al. Asialoglycoprotein receptor-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles //International journal of pharmaceutics. 2008. V. 360. №. 1-2. P. 197-203.
- ⁷⁴ Zhang X. Q. et al. Galactosylated ternary DNA/polyphosphoramidate nanoparticles mediate high gene transfection efficiency in hepatocytes // J. Control. Release. 2005. V. 102. №. 3. P. 749-763.
- ⁷⁵ Xu Z. et al. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma //Biomaterials. – 2009. – T. 30. – №. 2. – C. 226-232.
- ⁷⁶ Lu W. et al. The use of solid lipid nanoparticles to target a lipophilic molecule to the liver after intravenous administration to mice //International journal of biological macromolecules. 2008. V. 43. №. 3. P. 320-324.
- ⁷⁷ Chen S. et al. Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration //Journal of Controlled Release. 2014. V. 196. P. 106-112.
- ⁷⁸ Wu Y. T. et al. A new N-acetylgalactosamine containing peptide as a targeting vehicle for mammalian hepatocytes via asialoglycoprotein receptor endocytosis // Curr. Drug. Deliv. 2004. V. 1. №. 2. P. 119-127.

- ⁷⁹. Di Stefano G. et al. Ribavirin conjugated with lactosaminated poly-L-lysine: selective delivery to the liver and increased antiviral activity in mice with viral hepatitis // *Biochem. Pharmacol.* 1997. V. 54. №. 3. P. 357-363.
- ⁸⁰. Duncan R. Development of HPMA copolymer–anticancer conjugates: clinical experience and lessons learnt // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. №. 13. P. 1131-1148.
- ⁸¹. Meijer D. K. F., Molema G. Targeting of drugs to the liver // *Semin. Liver Dis.* V. 15. №. 3. P. 202-256.
- ⁸². Zhu L., Mahato R. I. Targeted delivery of siRNA to hepatocytes and hepatic stellate cells by bioconjugation // *Bioconjugate Chem.* 2010. V. 21. №. 11. P. 2119-2127.
- ⁸³ Prakash T. P. et al. Comprehensive Structure–Activity Relationship of Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugated Antisense Oligonucleotides for Targeted Delivery to Hepatocytes // *Journal of medicinal chemistry.* 2016. V. 59. №. 6. P. 2718-2733.
- ⁸⁴ Rico L. et al. Studies directed toward the asialoglycoprotein receptor mediated delivery of 5-fluoro-2'-deoxyuridine for hepatocellular carcinoma // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2018.
- ⁸⁵ Hasegawa A. et al. Studies on the thioglycosides of N-acetylneuraminic acid 10: Synthesis of S-(α -sialosyl)-(2 \rightarrow 6)-O-2-acetamido-2-deoxy- β -d-hexopyranosyl ceramide and its related compounds // *J. Carbohydr. Chem.* 1992. V. 11. №. 3. P. 319-331.
- ⁸⁶ SeshuáBabu N. et al. Iron (III) chloride as an efficient catalyst for stereoselective synthesis of glycosyl azides and a cocatalyst with Cu (0) for the subsequent click chemistry // *Chem. Commun.* 2011. V. 47. №. 37. P. 10440-10442.
- ⁸⁷ Реутов О.А., Курц А.Л., Бутин К.П. *Органическая химия учебник для студентов химических специальностей и аспирантов* М: 2015 Бином. Лаборатория знаний 1336 с.
- ⁸⁸ *Carbohydrate Chemistry* (Ed. by Davis B. G., Fairbanks A. J.). Oxford: Oxford University Press. 2002. P. 96.
- ⁸⁹ Nakabayashi S., Warren C. D., Jeanloz R. W. The preparation of a partially protected heptasaccharide-asparagine intermediate for glycopeptide synthesis // *Carbohydrate research.* – 1988. V. 174. 3. 279-289.
- ⁹⁰ Kamst E. et al. Chemical synthesis of N-acetylglucosamine derivatives and their use as glycosyl acceptors by the Mesorhizobium loti chitin oligosaccharide synthase NodC // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 321. №. 3. P. 176-189.
- ⁹¹ Aly M. R. E. S., El Sayed H. Recent Advances Toward Robust N-Protecting Groups for Glucosamine as Required for Glycosylation Strategies // *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry.* – Academic Press, 2016. V. 73. P. 117-224.
- ⁹² Pilkington-Miksa M. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel cRGD–Paclitaxel Conjugates for Integrin-Assisted Drug Delivery // *Bioconjugate Chem.* 2012. V. 23. №. 8. P. 1610-1622.
- ⁹³. Gilles V. et al. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long-Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil // *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. V. 26. №. 1. P. 74-83.
- ⁹⁴. Singh M. S., Chowdhury S., Koley S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade // *Tetrahedron.* 2016. V. 72. №. 35. P. 5257-5283.
- ⁹⁵. Riva R. et al. Synthesis of new substituted lactones by "click" chemistry // *Arkivoc.* 2007. V. 10. P. 292-306.
- ⁹⁶. Gu Z. Y. et al. Effective enlargement of fluorescence resonance energy transfer of porphyrin mediated by β -cyclodextrin dimers // *J. Org. Chem.* 2010. V. 75. №. 11. P. 3600-3607.
- ⁹⁷. Nguyen D. M., Miles D. H. Copper (I)-catalyzed cycloaddition of methyl O-propargylpodocarbate and azides at room temperature // *Synth. Commun.* 2011. V. 41. №. 12. P. 1759-1771.

- ⁹⁸. Zhang X., Yang X., Zhang S. Synthesis of triazole-linked glycoconjugates by copper (I)-catalyzed regioselective cycloaddition of alkynes and azides // *Synth. Commun.* 2009. V. 39. №. 5. P. 830-844.
- ⁹⁹. Fazio F. et al. Synthesis of sugar arrays in microtiter plate // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. №. 48. P. 14397-14402.
- ¹⁰⁰. Gaggelli E. et al. ¹H and ¹³C NMR relaxation investigation of methotrexate in [2H₆] dimethyl sulphoxide solution // *Magn. Reson. Chem.* 1993. V. 31. №. 5. P. 431-434.
- ¹⁰¹. 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.
- ¹⁰². Sun C. Z. et al. Characterization of the doxorubicin-Pluronic F68 conjugate micelles and their effect on doxorubicin resistant human erythroleukemic cancer cells // *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2011. V. 2. P. 114.
- ¹⁰³. López-Alonso J. P. et al. Carbodiimide EDC induces cross-links that stabilize RNase A C-dimer against dissociation: EDC adducts can affect protein net charge, conformation, and activity // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. №. 8. P. 1459-1473.
- ¹⁰⁴. Schwartz A. L., Ashwell G. The hepatic asialoglycoprotein receptor // *Crit. Rev. Biochem.* 1984. V. 16. №. 3. P. 207-233.
- ¹⁰⁵. Zhang X. et al. Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: current and future // *Nanomedicine.* 2016. V. 12. №. 4. P. 853-869.
- ¹⁰⁶. Cory A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture // *Cancer Commun.* 1991. V. 3. №. 7. P. 207-212.
- ¹⁰⁷. Kökény S. et al. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation // *Anticancer Res.* 2009. V. 29. №. 6. P. 1971-1980.
- ¹⁰⁸. Abolmaali S. S., Tamaddon A. M., Dinarvand R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013. V. 71. №. 5. P. 1115-1130.
- ¹⁰⁹. 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.
- ¹¹⁰. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems // *J. Pharm. Pharmacol.* 2013. V. 65. №. 2. P. 157-170.
- ¹¹¹. Chan J. Y. W., Chu A. C. Y., Fung K. P. Inhibition of P-glycoprotein expression and reversal of drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense RNA // *Life Sci.* 2000. V. 67. №. 17. P. 2117-2124.
- ¹¹². Tian G. et al. In vitro Anticancer Activity of Doxorubicin-Loading Pectin Nanoparticles // *J Pharm Biomed Sci.* 2016. V. 6. №. 5. P. 338-342
- ¹¹³. 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.
- ¹¹⁴. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. М: МГУ. 1964. 704 с.
- ¹¹⁵. Witkowski J. T. et al. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-, beta.-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides // *J. Med. Chem.* 1972. V. 15. №. 11. P. 1150-1154.
- ¹¹⁶. Wipf P. et al. Synthesis of anti-inflammatory α - and β -linked acetamidopyranosides as inhibitors of toll-like receptor 4 (TLR4) // *Tetrahedron Lett.* 2015. V. 56. №. 23. P. 3097-3100.
- ¹¹⁷. Balcerzak A. K. et al. Structurally diverse disaccharide analogs of antifreeze glycoproteins and their ability to inhibit ice recrystallization // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. V. 22. №. 4. P. 1719-1721.
- ¹¹⁸. Lee D. J. et al. A one-pot approach to neoglycopeptides using orthogonal native chemical ligation and click chemistry // *Org. Lett.* 2009. V. 11. №. 22. P. 5270-5273.

-
- ¹¹⁹ Wong C. H. et al. A library approach to the discovery of small molecules that recognize RNA: use of a 1, 3-hydroxyamine motif as core // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. №. 33. P. 8319-8327.
- ¹²⁰ Tae H. S. et al. Identification of hydrophobic tags for the degradation of stabilized proteins // *ChemBioChem*. 2012, Vol. 13, P. 538-541.
- ¹²¹ Cardona C. M., Gawley R. E. An improved synthesis of a trifurcated newkome-type monomer and orthogonally protected two-generation dendrons // *The Journal of organic chemistry*. 2002. V. 67. №. 4. P. 1411-1413.
- ¹²² Chadwick J. et al. Design, synthesis and antimalarial/anticancer evaluation of spermidine linked artemisinin conjugates designed to exploit polyamine transporters in *Plasmodium falciparum* and HL-60 cancer cell lines // *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2010. V. 18. №. 7. P. 2586-2597.
- ¹²³ Chen Y. et al. Functionalization of MgZnO nanorod films and characterization by FTIR microscopic imaging // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2017. V. 409. №. 27. P. 6379-6386.