МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Маклакова Светлана Юрьевна

Лиганды асиалогликопротеинового рецептора и конъюгаты на их основе с терапевтическими и диагностическими агентами

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

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

Научный руководитель **Мажуга Александр Георгиевич**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты **Терентьев Александр Олегович**
член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией исследования гомолитических реакций (№13) ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»

Воскресенский Леонид Геннадьевич
доктор химических наук, профессор, декан факультета Физико-математических и естественных наук, заведующий кафедрой органической химии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Федорова Ольга Анатольевна
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией фотоактивных супрамолекулярных систем (ЛФСМС) ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук»

Защита состоится «5» декабря 2018 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.
E-mail: tvm@org.chem.msu,ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте ИАС «ИСТИНА» https://istina.msu.ru/dissertations/153707615/

Автореферат разослан «__» ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор Т.В. Магдесиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Направленный транспорт лекарственных препаратов – перспективный подход медицинской химии, который позволяет: 1) обеспечить проникновение активной молекулы в целевой орган, ткань или клетку в эффективной концентрации; 2) защитить действующее вещество от разрушения и дезактивации под влиянием физиологических условий; 3) ограничить взаимодействие лекарства с нецелевыми клетками. В результате открывается возможность снизить необходимую дозу введения препарата, а также побочные эффекты от его приема.

На поверхности паренхимных клеток печени содержится порядка 0.5 – 1 млн асиалогликопротеиновых рецепторов (ASGPR). Способность ASGPR переносить через мембрану гликозилированные белки, быстрый цикл регенерации и преимущественное расположение на поверхности гепатоцитов и клеток ГЦК делают его перспективной мишенью для адресной доставки биологически активных веществ. ASGPR селективно связывается с D-галактозой (Gal) и *N*-ацетил-D-галактозамином (GalNAc), что позволяет осуществлять направленный транспорт лекарственных препаратов и средств диагностики в клетки печени с помощью векторных (адресных) фрагментов на основе этих углеводов. Активное применение нашли липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы, модифицированные Gal или GalNAc, в то время как ковалентные конъюгаты лигандов ASGPR с лекарственными препаратами представлены единичными примерами. В связи с этим вызывает интерес их синтез и исследование.

Медь-катализируемое 1,3-диполярное циклоприсоединение азидов к ацетиленам (CuAAC) – удобный способ синтеза ковалентных конъюгатов сложных природных соединений. Для реализации данного подхода к получению конъюгатов необходимо предложить лиганды ASGPR с азидогруппой или терминальной тройной связью и разработать методики их синтеза. На сегодняшний день известен ряд селективных лигандов ASGPR – производных *N*-ацетилгалактозамина, однако поскольку гликозилированные соединения могут вызывать иммунный ответ, актуальной задачей также является поиск лигандов ASGPR неуглеводной природы. Такие соединения, помимо всего прочего, должны выгодно отличаться простотой синтеза и низкой стоимостью.

Цель работы заключалась в синтезе новых типов лигандов асиалогликопротеинового рецептора и разработке методов получения конъюгатов на их основе с терапевтическими и диагностическими агентами.

Задачи работы состояли в а) разработке синтетического подхода к лигандам ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомерам на основе *N*-ацетилглюкозамина, содержащим азидогруппу; б) поиске новых классов низкомолекулярных органических соединений,

способных связываться с асиалогликопротеиновым рецептором, разработке методов получения предложенных структур; в) синтезе конъюгатов полученных в работе лигандов с противоопухолевым препаратом паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5 при помощи медь-катализируемого циклоприсоединения азидов к ацетиленам; г) *in vitro* и *in vivo* исследовании биологических свойств полученных конъюгатов.

Научная новизна. Оптимизированы методики синтеза селективных лигандов асиалогликопротеинового рецептора с тремя остатками *N*-ацетилгалактозамина и гидрофобным линкером с терминальной азидогруппой, что открыло возможность последующего их соединения с терапевтическими и диагностическими молекулами с помощью CuAAC. Помимо модифицированных лигандов получены изомерные им соединения на основе *N*-ацетилглюкозамина. В результате выделено четыре новых углеводсодержащих соединения, готовых для конъюгирования с лекарственными средствами. На их основе получены конъюгаты с терапевтическими (малые интерферирующие РНК (*ми*РНК) и противоопухолевый препарат паклитаксел) и диагностическими (флуоресцентный краситель *sulfo*-Cy5 алкин) агентами. Для полученных соединений проведены *in vitro* и *in vivo* исследования влияния введения векторного фрагмента на распределение конъюгата в организме и его способность проникать в целевые клетки. Впервые предложено использовать в качестве лигандов ASGPR вещества неуглеводной природы – производные 3-гидроксихинолин-4-карбоновой кислоты.

Практическая значимость. Разработана стратегия синтеза лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и изомерных им соединений – производных *N*-ацетилглюкозамина. Структурные изменения, которые были внесены в эффективные и селективные лиганды ASGPR, открыли возможность конъюгировать их с терапевтическими и диагностическими агентами с помощью удобной в исполнении реакции CuAAC, что позволило использовать предложенные лиганды для модификации биологически активных соединений различного строения. Разработаны методы синтеза ранее неизвестных лигандов ASGPR – 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот.

Положения, выносимые на защиту: 1) синтез лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и изомерных им соединений на основе *N*-ацетилглюкозамина; 2) 3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты как новый класс низкомолекулярных органических соединений, способных связываться с ASGPR; 3) методология синтеза 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)хинолин-4-карбоновых кислот с этинильным заместителем в бензольном кольце хинолинового ядра; 4) получение с помощью CuAAC конъюгатов флуоресцентного красителя *sulfo*-Cy5 и противоопухолевого препарата паклитаксела с предложенными в работе лигандами; 5) распределение конъюгатов в организме, их проникновение в целевые клетки и способность проявлять терапевтический эффект.

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликована 21 печатная работа: 3 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ для публикации результатов диссертационных работ, и 18 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015» (Красновидово, Россия, 2015); Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "KOST-2015" (Москва, Россия, 2015); XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry (Мец, Франция, 2015); 2ая Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2016» (Красновидово, Россия, 2016); XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 2016); I Всероссийская молодёжная школа-конференция “Успехи синтеза и комплексообразования” (Москва, Россия, 2016); International conference «Dombay Organic Conference Cluster» (DOCC-2016) (Домбай, Россия, 2016); Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней (Красновидово, Россия, 2017); XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 2017); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017" (Москва, Россия, 2017); The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing" (Москва, Россия, 2017); VII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, Россия, 2017); 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry (Дубровник, Хорватия, 2017); 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry «Med Chem Russia 2017» (Казань, Россия, 2017); XV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, Россия, 2018); Всероссийская молодежная научная школа-конференция “Актуальные проблемы органической химии” (Шерегеш, Россия, 2018); V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (Владикавказ, Россия, 2018).

Личный вклад автора. Автор проводил сбор и анализ литературных данных по теме исследования, синтез, выделение и очистку целевых и промежуточных соединений, анализ данных, полученных методами ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии, принимал участие в составлении плана исследований, обсуждении полученных результатов, подготовке их к публикации в научных журналах и их представлении на научных конференциях.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из 7 разделов: введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, приложения. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 31 схему, 29 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 139 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант №14-34-00017), РФФИ (проект №18-33-01237\18), Сколковского института науки и технологий (договор № 182-MRA от 01.10.2013 г).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Представляемая диссертационная работа состоит из трех частей. Первая часть посвящена исследованию синтетических подходов к известным лигандам ASGPR с тремя остатками *N*-ацетилгалактозамина, содержащим гидрофобный линкер с азидогруппой. Вторая часть данного исследования посвящена поиску принципиально новых лигандов ASGPR, не содержащих в своем составе остатков галактозы или *N*-ацетилгалактозамина, разработке методов получения предложенных структур. На заключительных этапах работы оценивали потенциал использования полученных лигандов на примере создания ковалентных конъюгатов с *ми*РНК, противоопухолевым препаратом паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5.

Синтез лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомеров на основе *N*-ацетилглюкозамина

По литературным данным, наибольшую аффинность по отношению к асиалогликопротеиновому рецептору демонстрируют соединения, содержащие три или четыре остатка D-галактозы или *N*-ацетилгалактозамина. Поскольку в дальнейшем необходимо соединить векторный фрагмент с молекулой лекарственного препарата, в структуру лиганда необходимо ввести функциональную группу, которая обеспечит возможность такого соединения. Удобной реакцией для синтеза ковалентных конъюгатов сложных природных соединений является медь-катализируемое 1,3-диполярное циклоприсоединение азидов к ацетиленам. Поэтому, в структуру известного и наиболее эффективного на сегодняшний день разветвленного лиганда ASGPR было предложено добавить гидрофобный линкер с концевой азидогруппой (Рисунок 1). Помимо целевого лиганда был осуществлен синтез изомерного ему соединения, содержащего остатки *N*-ацетилглюкозамина. Известно, что производные *N*-ацетилглюкозамина связываются с ASGPR на несколько порядков хуже, чем производные *N*-ацетилгалактозамина, что позволяет использовать их в качестве контрольных соединений при проведении биологических испытаний.

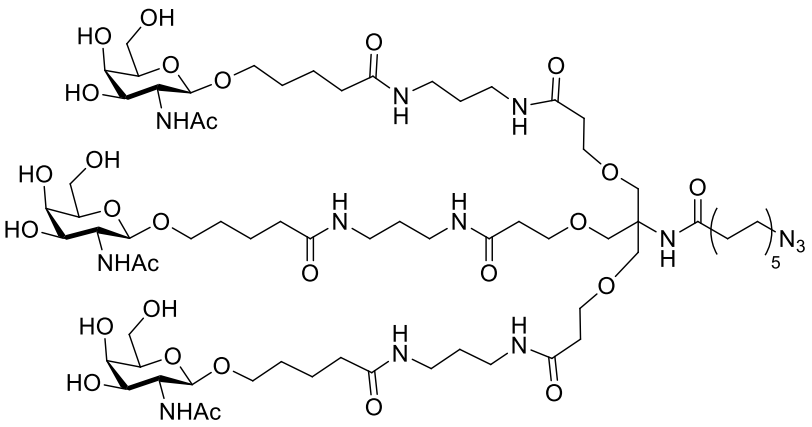


Рисунок 1. Строение селективного лиганда ASGPR с гидрофобным линкером с концевой азидогруппой

Для синтеза целевых соединений был разработан новый конвергентный подход. В отличие от имеющихся в литературе способов, основанных на последовательном добавлении структурных звеньев к 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диолу (TRIS), данный подход позволил сократить число стадий, в ходе которых реакция протекает сразу по трем функциональным группам и может сопровождаться образованием смеси моно- и ди-производных.

На первых этапах синтеза получали трикарбоновую кислоту, необходимую для создания каркаса целевых соединений (Схема 1).

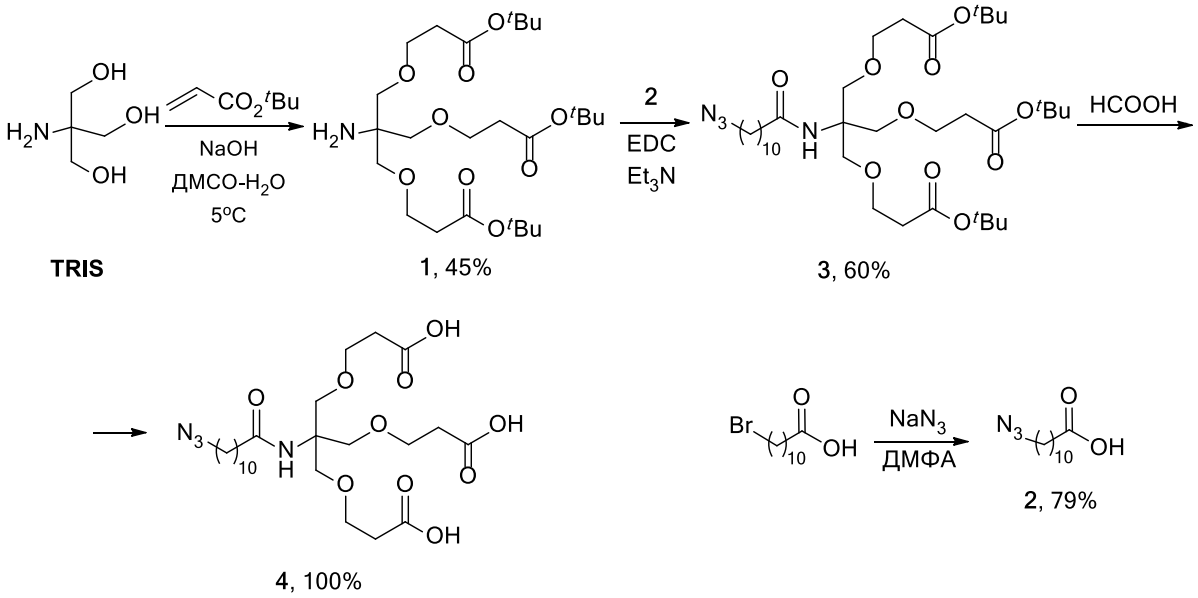


Схема 1

Синтез начинали с присоединения по Михаэлю *трет*-бутилового эфира акриловой кислоты к молекуле TRIS. Полученное производное **1** далее вводили в реакцию с 11-азидоундекановой кислотой (**2**). Таким образом, в разработанном нами подходе линкер с функциональной группой для дальнейшего конъюгирования с препаратом вводили на начальных этапах синтеза, что позволило сократить количество стадий: нет необходимости в

постановке и удалении защитных групп. *трет*-Бутильные группы удаляли действием муравьиной кислоты. Продукт **4** и промежуточное соединение **3** являются неописанными ранее соединениями и были охарактеризованы полным комплексом физико-химических методов анализа.

Синтез второго структурного фрагмента лиганда, содержащего углеводный остаток, начинали с получения агликона (Схема 2). Для этого была использована реакция раскрытия δ-валеролактона *N*-Boc-1,3-диаминопропаном (**5**) в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты. Следующей стадией синтеза стало гликозилирование *трет*-бутил-(3-(5-гидроксипентанамидо)-пропил)-карбамата (**6**) остатками *N*-ацетилгалактозамина (**7a**) и *N*-ацетилглюкозамина (**7b**). В качестве гликозилирующих агентов выступали 1,2-оксазолины, которые получали из пентаацетатов 2-дезокси-2-аминогексапираноз **8a,b** действием триметилсилилтрифторсульфоната (TMSOTf). Оксазолины **9a,b** вводили в реакцию со спиртом **6** без специфической очистки в условиях катализа субэквивалентными количествами TMSOTf.

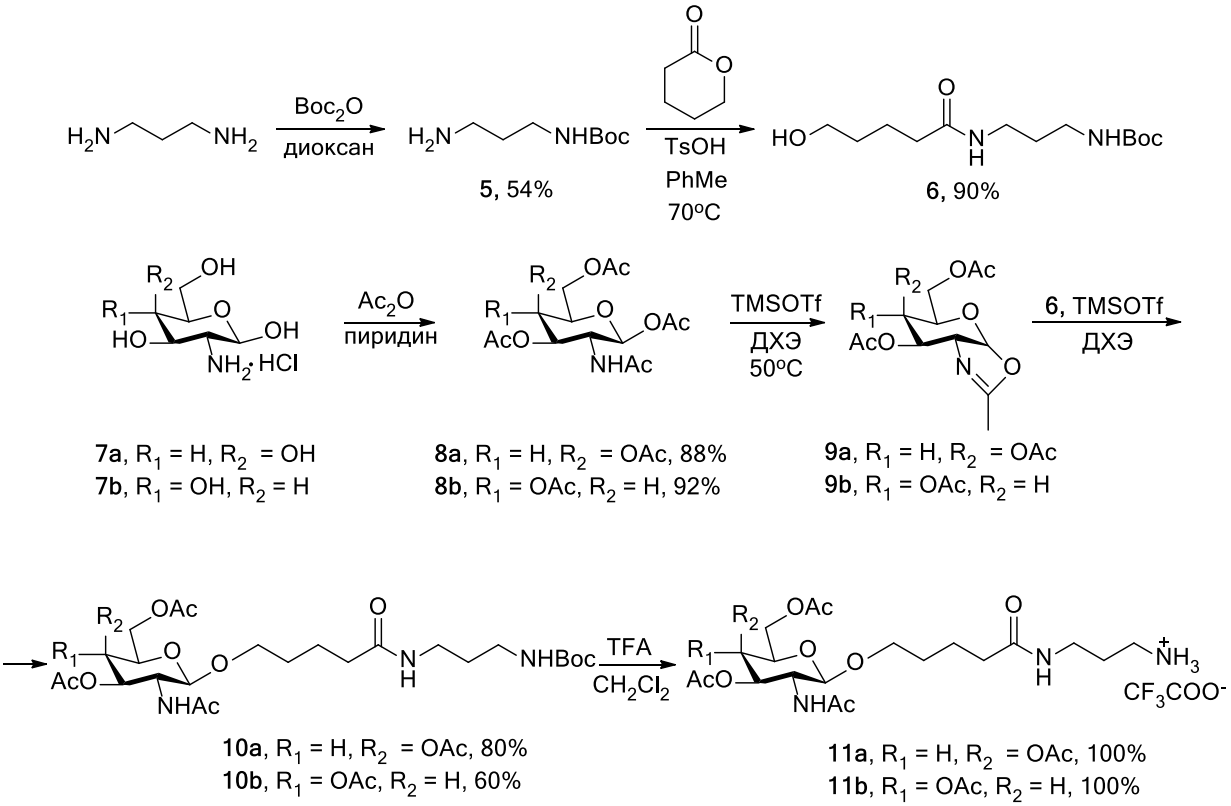


Схема 2

О конфигурации атомов С-1 углеводных остатков гликозидов **10a,b** судили по данным ЯМР ^{1}H спектроскопии. Так, в спектрах обоих гликозидов наблюдали дублеты в области 4.50-4.60 м.д. с константами спин-спинового взаимодействия 8-9 Гц (сигналы атомов водорода в первом положении гексапиранозного цикла). Сопоставление полученных значений КССВ и химических сдвигов с имеющимися в литературе данными указывало на то, что в нашем случае

имеет место *транс*-диаксиальное расположение протонов H-1 и H-2, то есть гликозиды выделяли в виде β-аномеров.

Соединения **10a,b** обрабатывали трифторуксусной кислотой для удаления защитных *трет*-бутоксикарбонильных групп. Соответствующие соли - трифторацетаты **11a,b** получали с количественными выходами.

После синтеза аминогликозидов **11a,b** и трикарбоновой кислоты **4**, было сделано несколько попыток получения целевых соединений **12a,b** в различных условиях. Лучших результатов удалось достичь при использовании ДМФА в качестве растворителя и HBTU с HOBt для активации карбоксильных групп (Схема 3).

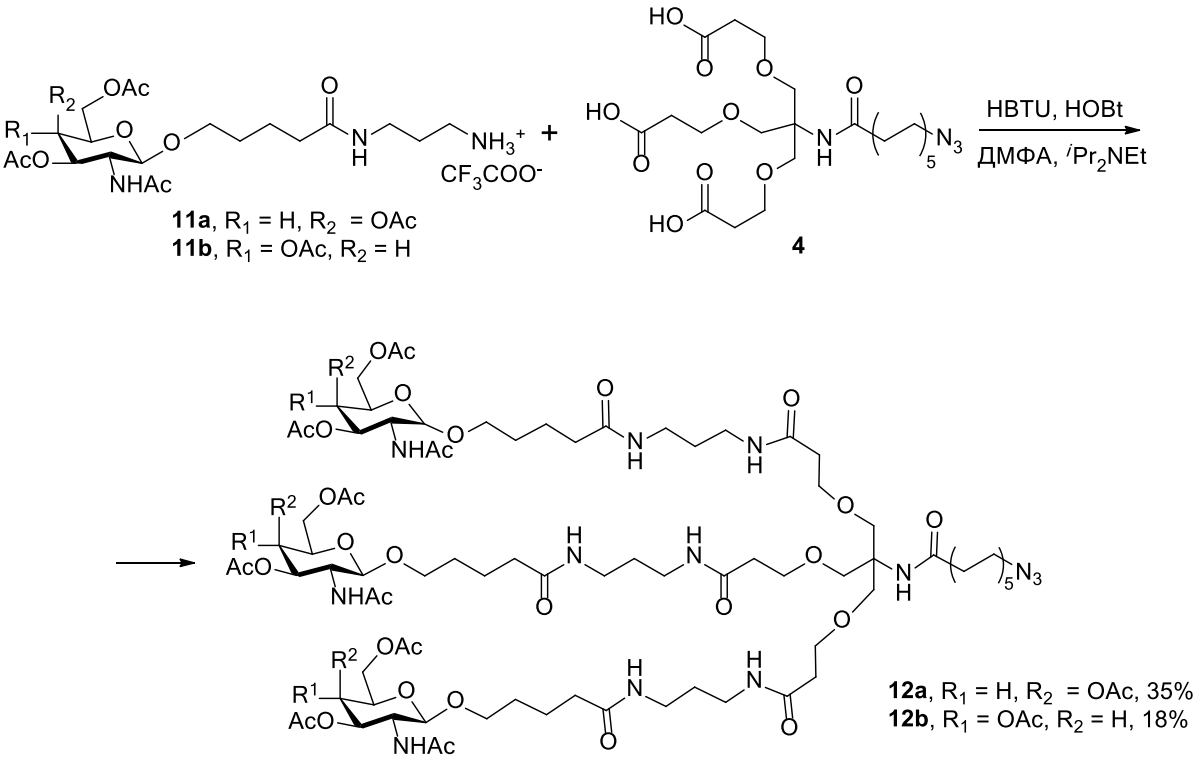


Схема 3

Несмотря на попытки оптимизировать условия протекания данного превращения, выхода в реакции более чем 35% добиться не удалось. Во-первых, при проведении синтеза наблюдается образование продуктов моно- и диприсоединения. Во-вторых, хроматографическое выделение целевого соединения сильно осложнено: вещество трудно элюируется, а поскольку продукты моно-, ди- и триприсоединения обладают близкими значениями фактора удерживания, требуется два-три последовательных хроматографических разделения. Тем не менее, соединения **12a,b** были выделены в индивидуальном виде, охарактеризованы с помощью ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Из-за сложности синтеза использование лигандов **12a,b** представляется нецелесообразным для направленного транспорта низкомолекулярных терапевтических препаратов, однако они могут быть полезны в получении конъюгатов более сложных и дорогостоящих терапевтических молекул. Так, в

работе были получены конъюгаты малых интерферирующих РНК. Защитные ацетильные группы удаляли после соединения с олигонуклеотидами.

Для конъюгирования же с низкомолекулярными соединениями был проведен синтез лиганда ASGPR с несколько упрощенным строением (Рисунок 2).

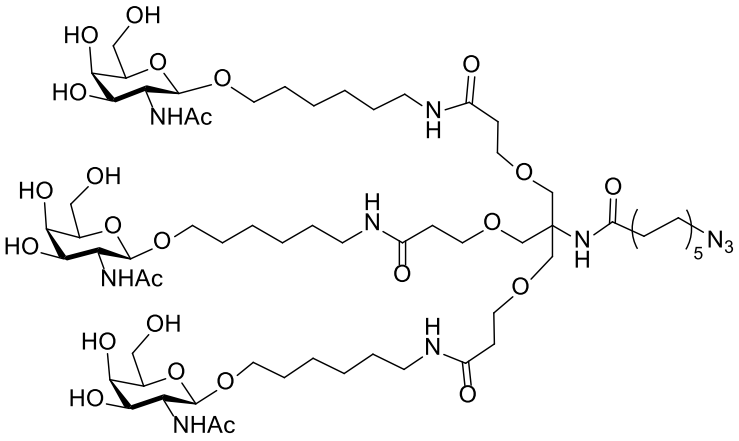
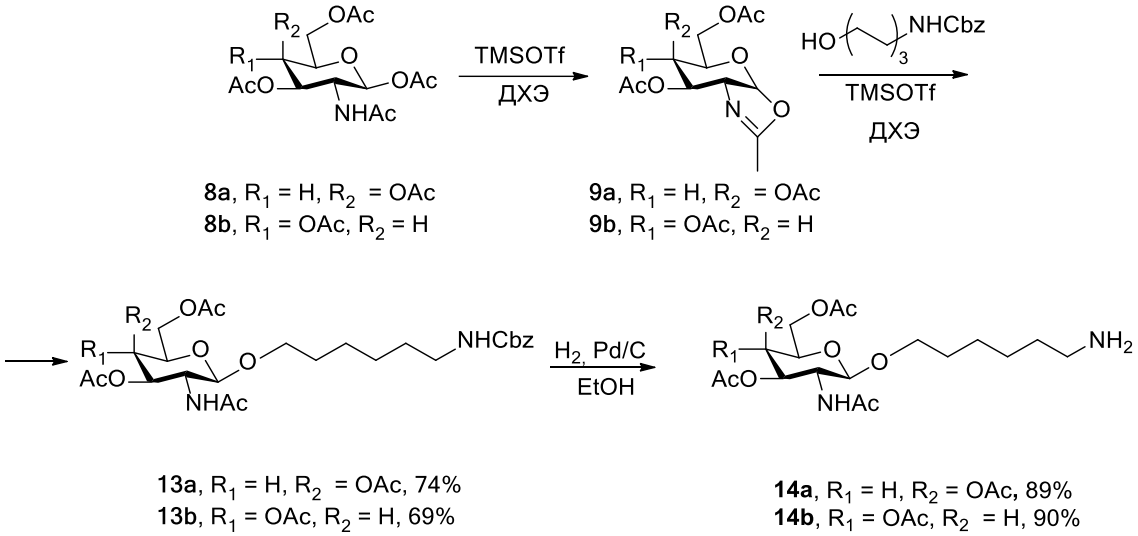


Рисунок 2. Структура лиганда ASGPR упрощенного строения с гидрофильным линкером и концевой азидогруппой

Согласно литературным данным, векторный фрагмент данной структуры демонстрирует схожее сродство к ASGPR, однако обладает меньшей гидрофильностью, чем соединения **12a,b,** в связи с этим его выделение в индивидуальном виде с помощью колоночной хроматографии должно проходить проще. Кроме того, для его синтеза требуется меньшее количество стадий.

Синтез гликозидов **13a,b** был проведен аналогично синтезу соединений **10a,b** (Схема 4). В качестве агликона использовали коммерчески доступный *N*-карбоксибензил-6-аминогексан-1-ол. Свободные амины из соединений **13a,b** получали удалением защитной группы гидрогенолизом.



8a, R_1 = H, R_2 = OAc
8b, R_1 = OAc, R_2 = H

9a, R_1 = H, R_2 = OAc
9b, R_1 = OAc, R_2 = H

13a, R_1 = H, R_2 = OAc, 74%
13b, R_1 = OAc, R_2 = H, 69%

14a, R_1 = H, R_2 = OAc, 89%
14b, R_1 = OAc, R_2 = H, 90%

Схема 4

Перед соединением двух фрагментов молекулы из кислоты **4** получали ее активированное производное – пентафторфениловый эфир **15** (Схема 5). Из эфира **15** производные **16a,b**

получали смешением компонентов реакции в присутствии триэтиламина (Схема 6). Продукты выделяли со значительно большими выходами в сравнении с аналогичным синтезом при получении лигандов **12a,b** предыдущего структурного типа.

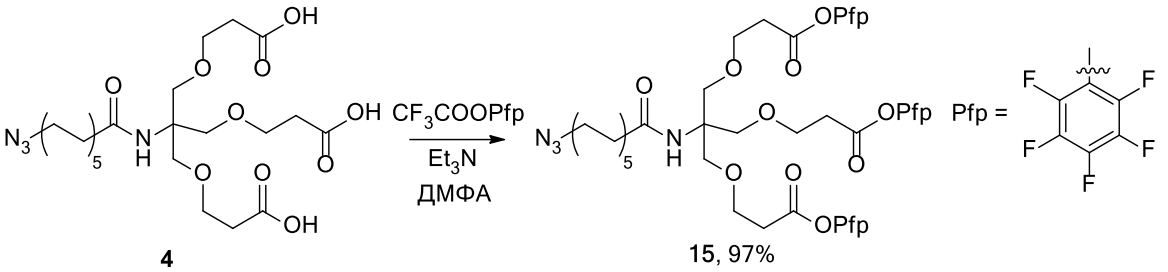


Схема 5

Для удаления защитных ацетильных групп с гидроксилов углеводных остатков был использован алкоголиз сложных эфиров в основной среде. Избыток основания нейтрализовали катионообменной смолой.

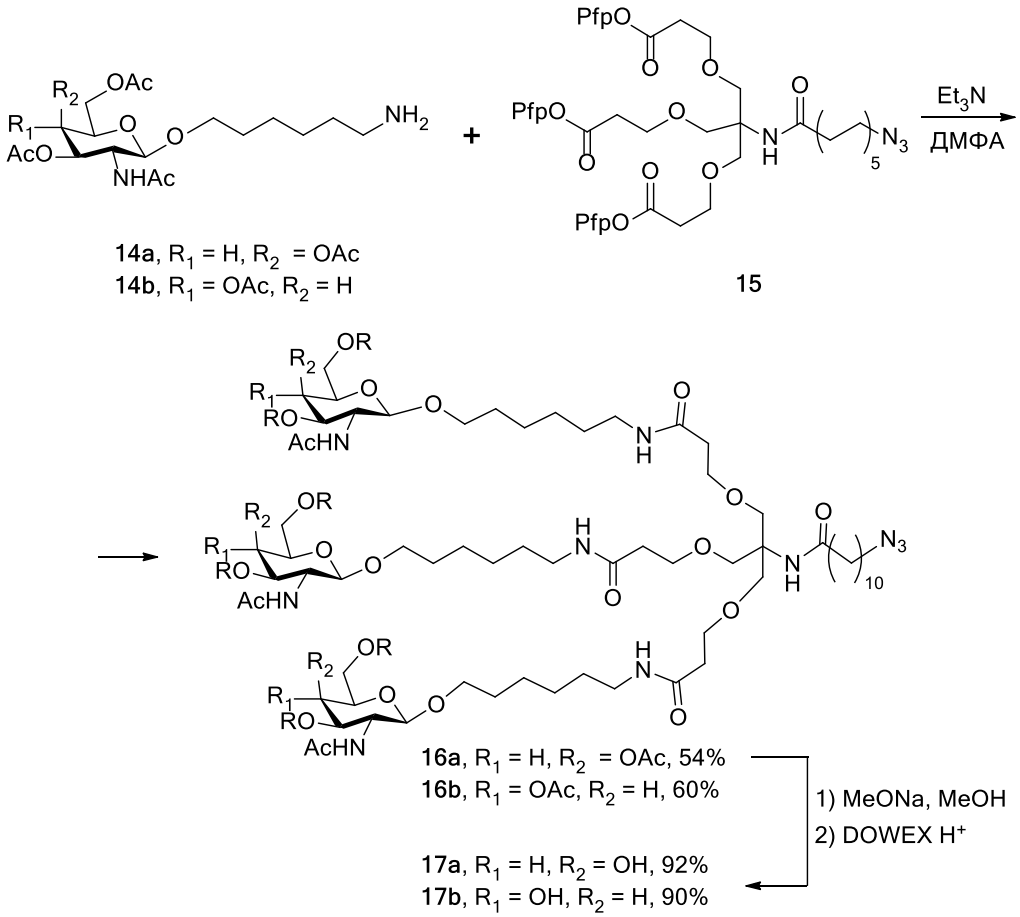


Схема 6

Таким образом, в результате первой части работы была предложена новая стратегия многостадийного синтеза разветвлённых углеводсодержащих соединений – лигандов ASGPR и их аналогов. Полученные производные *N*-ацетилгалактозамина могут служить в качестве векторных фрагментов в синтезе диагностических и терапевтических конъюгатов для

направленного транспорта в клетки печени, а производные *N*-ацетилглюкозамина могут быть использованы как контроль в биологических испытаниях.

Поиск новых лигандов ASGPR

С помощью молекулярного докинга 10 тысяч структур, специально отобранных из библиотеки ChemDiv, и последующего скрининга методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) было выявлено 33 наиболее аффинных по отношению к ASGPR соединения, в том числе хинолин-4-карбоновая кислота (Рисунок 3, второе соединение)*. Ранее хинолин-4-карбоновые кислоты с гидроксильной группой в 3-ем положении, и *n*-хлорбензильным фрагментом во 2-ом были предложены в качестве антагонистов P-селектина, рецептора, который имеет характерное сходство с лектинами типа C (к которым относится ASGPR) благодаря N-концевой последовательности аминокислот и кальций-зависимому связыванию. Исходя из подобия двух белков, 3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты решили исследовать на предмет связывания с ASGPR. В *in vitro* тестировании модельное соединение (8-бром-3-гидроксихинолин-4-карбоновая кислота) показало большую аффинность к ASGPR, чем галактоза и *N*-ацетилгалактозамин (Рисунок 3).

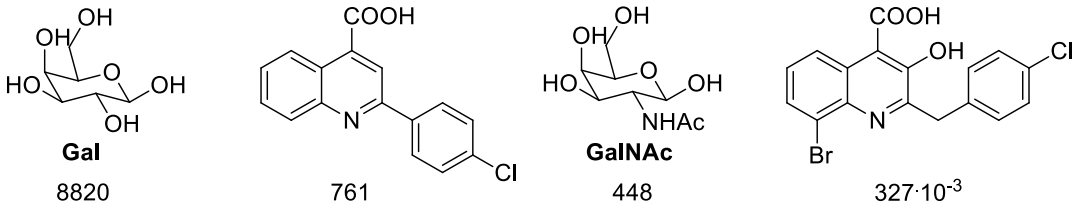


Рисунок 3. Термодинамические константы диссоциации комплекса рецептор-лиганд (K_D, мкМ)

Таким образом, производные хинолина, содержащие в третьем положении гидроксильную, а в четвертом – карбоксильную группы, могут рассматриваться как перспективный класс соединений для использования в качестве лигандов ASGPR.

Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот с терминальной тройной связью

Для возможности последующего конъюгирования с молекулой паклитаксела были получены 3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты с тройной связью в 8-ом или 6-ом положениях.

Основным этапом в синтезе целевых соединений стала реакция Пфитцингера. Это удобный метод, который позволяет получать хинолин-4-карбоновые кислоты из изатинов и карбонильных соединений, содержащих в α-положении хотя бы одну метиленовую группу, при

* *Автор выражает благодарность к.б.н. Иваненкову Яну Андреевичу и сотрудникам Лаборатории медицинской химии и биоинформатики МФТИ за проведение in silico скрининга, а также Лопухову Антону Владимировичу и сотрудникам Кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова за измерение констант диссоциации комплекса рецептор-лиганд*

этом заместители в хинолиновом ядре могут варьироваться в широких пределах. Получать хинолины, содержащие одновременно и карбоксильную, и гидроксильную группы можно, если вводить в реакцию с изатинами α-гидроксикетоны или α-ацилоксикетоны.

В данной работе прекурсорами хинолинов выступали 3-(4-хлорфенил)-2-оксопропил ацетат (**20**) или 1-(4-хлорфенил)-3-гидроксипропан-2-он (**21**), полученные из хлорангидрида *n*-хлорфенилуксусной кислоты **18** (Схема 7).

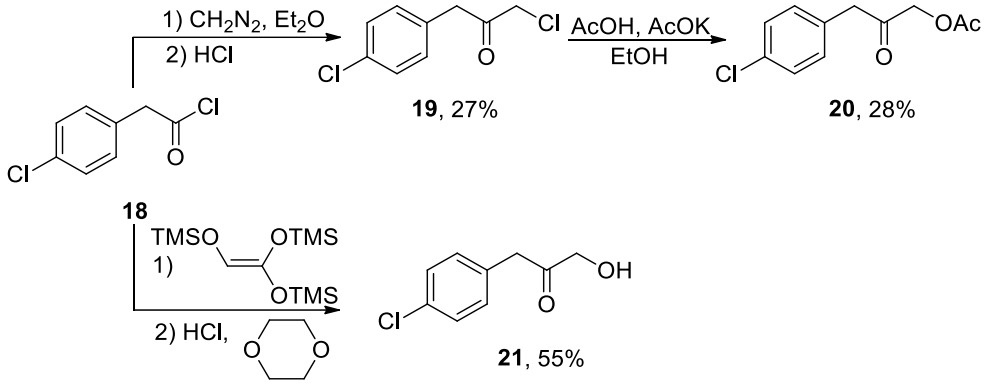
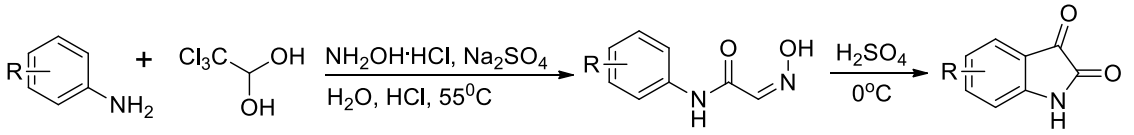


Схема 7

Соединение **20** использовали только на начальных этапах работы для синтеза 2-(4-хлорбензил)-3-гидрокси-8-бромхинолин-4-карбоновой кислоты. Позже от этой стратегии было решено отказаться, так как CH_2N_2 токсичен, неудобен в использовании, реакции с ним не поддаются масштабированию. Выходы соединений **19** и **20** оказывались невысокими. Альтернативным подходом к синтезу карбонильных соединений стало удлинение углеродного скелета *n*-хлорфенилуксусной кислоты при помощи 1,1,2-трис(триметилсилилокси)этилена. В результате был получен 1-(4-хлорфенил)-3-гидроксипропан-2-он (**21**) с гораздо большим выходом.

На следующем этапе по методу Зандмейера с высокими выходами были получены галогензамещенные изатины **22**-**24** (Схема 8).



22, R = 7-Br, 62%
23, R = 7-I, 67%
24, R = 5-I, 66%

Схема 8

При введении в реакцию Пфитцингера изатинов **22**-**24** и кетонов **20**,**21** были выделены галоген-3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты **25**-**27**. Выходы составили 34-42% (Схема 9).

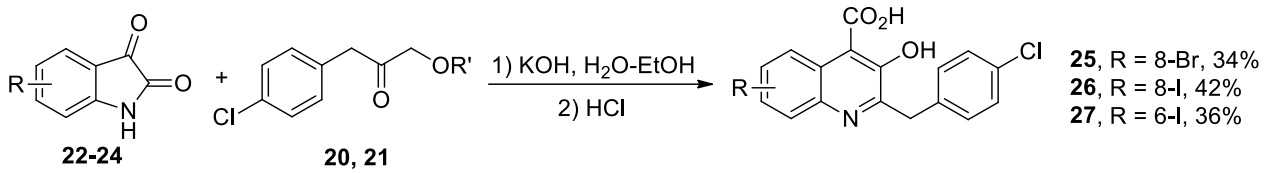


Схема 9

На примере йодхинолин-4-карбоновой кислоты **26** была проведена пробная реакция Соногаширы с триметилсилилацетиленом (Схема 10), однако выделить целевой продукт с удовлетворительным выходом не удалось. Варьирование времени реакции, температуры и замена катализатора на $Pd(Ph_3P)_4$ также не привели к значительным улучшениям.

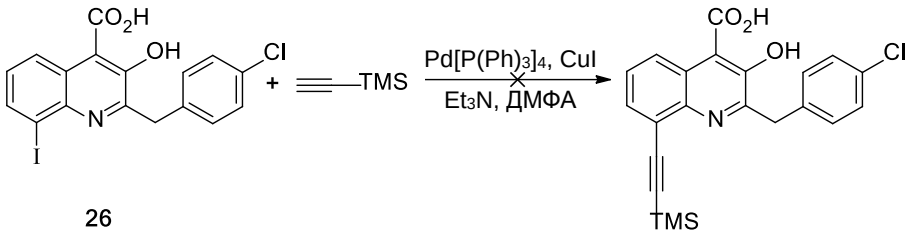


Схема 10

Альтернативным подходом к синтезу целевых соединений стало проведение реакции Соногаширы с изатинами и последующее введение полученных веществ в реакцию Пфитцингера. Отметим, что в литературе синтез соединения **28** упоминается только один раз, при этом авторам удалось выделить продукт с выходом только 5%. Физико-химические свойства соединения описаны не были. В нашем случае выход изатина **28** составил 48% (Схема **11**) и соединения **28**, **29** были охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа.

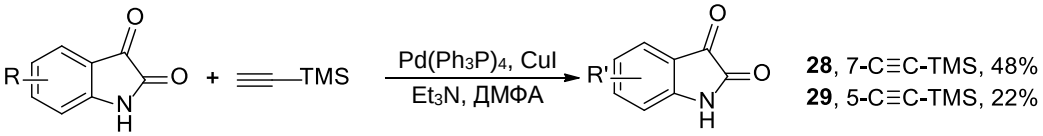


Схема 11

Для получения целевого лиганда α-гидроксикетон **21** вводили в реакцию Пфитцингера с содержащими тройную связь изатинами **28**,**29** (Схема 12). Триметилсилильная группа удалялась в щелочном растворе, поэтому дополнительной стадии получения свободного терминального алкина не потребовалось.

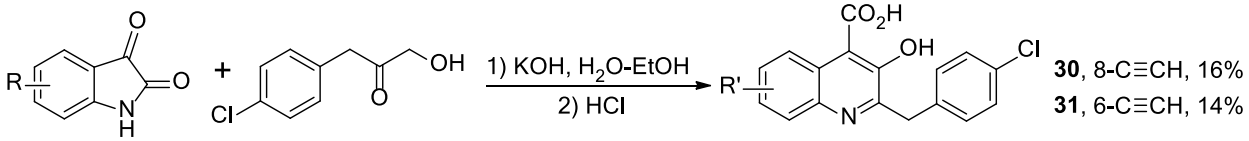


Схема 12

3-Гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты, которые содержат в 6-ом и 8-ом положениях этинильный фрагмент, были получены впервые. Их состав подтверждали методом масс-спектрометрии высокого разрешения, а строение – с помощью ^{1}H и ^{13}C ЯМР и ИК-спектроскопии.

Конъюгаты лигандов ASGPR

Для оценки перспективности использования полученных лигандов для направленного транспорта лекарственных и терапевтических препаратов в клетки печени были получены их конъюгаты с *ми*РНК, противоопухолевым препаратом паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5.

Конъюгаты с *ми*РНК

На примере лиганда **12b** была проведена катализируемая солями Cu(I) реакция азидо-ацетиленового циклоприсоединения с модельным олигонуклеотидом **dT_{20}**, содержащим терминальный алкин на 5'-конце (Схема 13).* Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 12 часов. Деблокирование олигонуклеотида и удаление защитных групп осуществляли действием насыщенного водного аммиака при 55°C. Образование конъюгата **33** подтверждали с помощью ВЭЖХ-МС. Степень превращения составила более 95%.

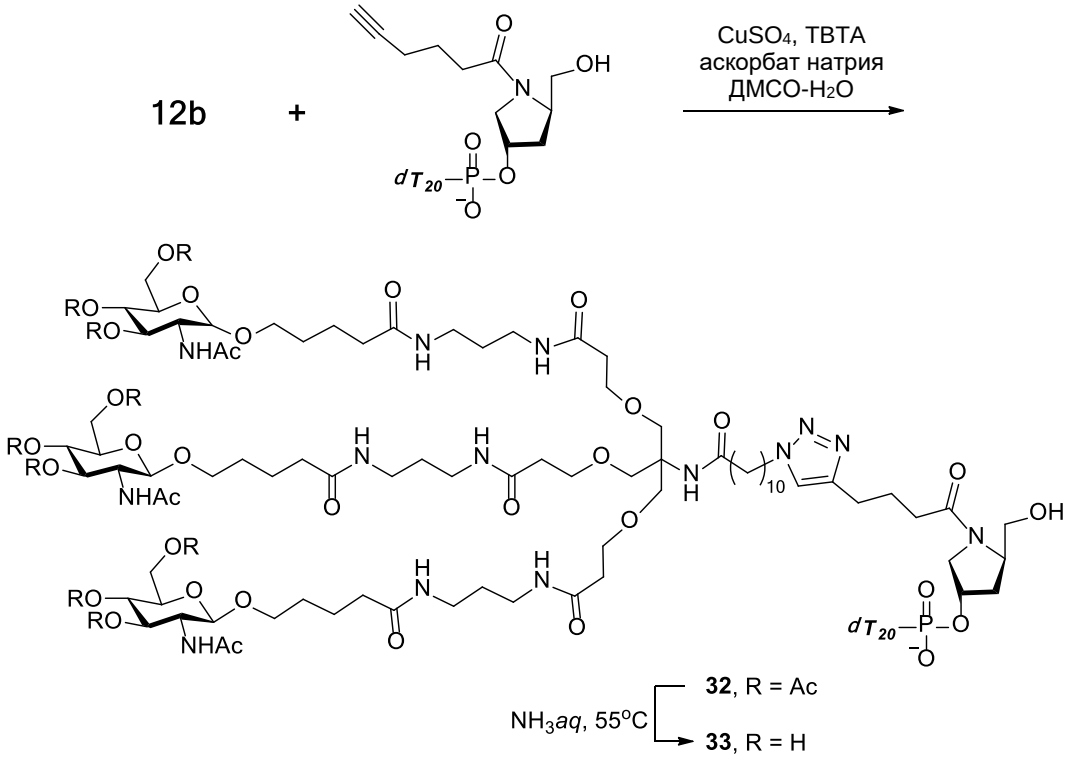


Схема 13

* *Автор выражает благодарность к.х.н. Зацепину Тимофею Сергеевичу и сотрудникам Центра трансляционной медицины Сколковского института наук и технологий за синтез конъюгатов с олигонуклеотидами*

Таким образом, апробирован способ постсинтетического присоединения полученных в работе лигандов к олигонуклеотидам, содержащим терминальный алкин на 5’-конце. Реакция протекает довольно быстро, с количественными выходами, что открывает возможность использовать CuAAC и лиганд **12a** для скрининга новых нуклеотидных последовательностей.

Конъюгаты с флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5

Для исследования специфичности лиганда **17a** по отношению к гепатоцитам и клеткам ГЦК с помощью медь-катализируемого циклоприсоединения азидов к ацетиленам был получен его конъюгат **34a** с водорастворимым коммерчески доступным флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5 алкином. Реакцию проводили в инертной атмосфере в системе вода-ДМФА с использованием сульфата меди и аскорбата натрия (Схема 14).

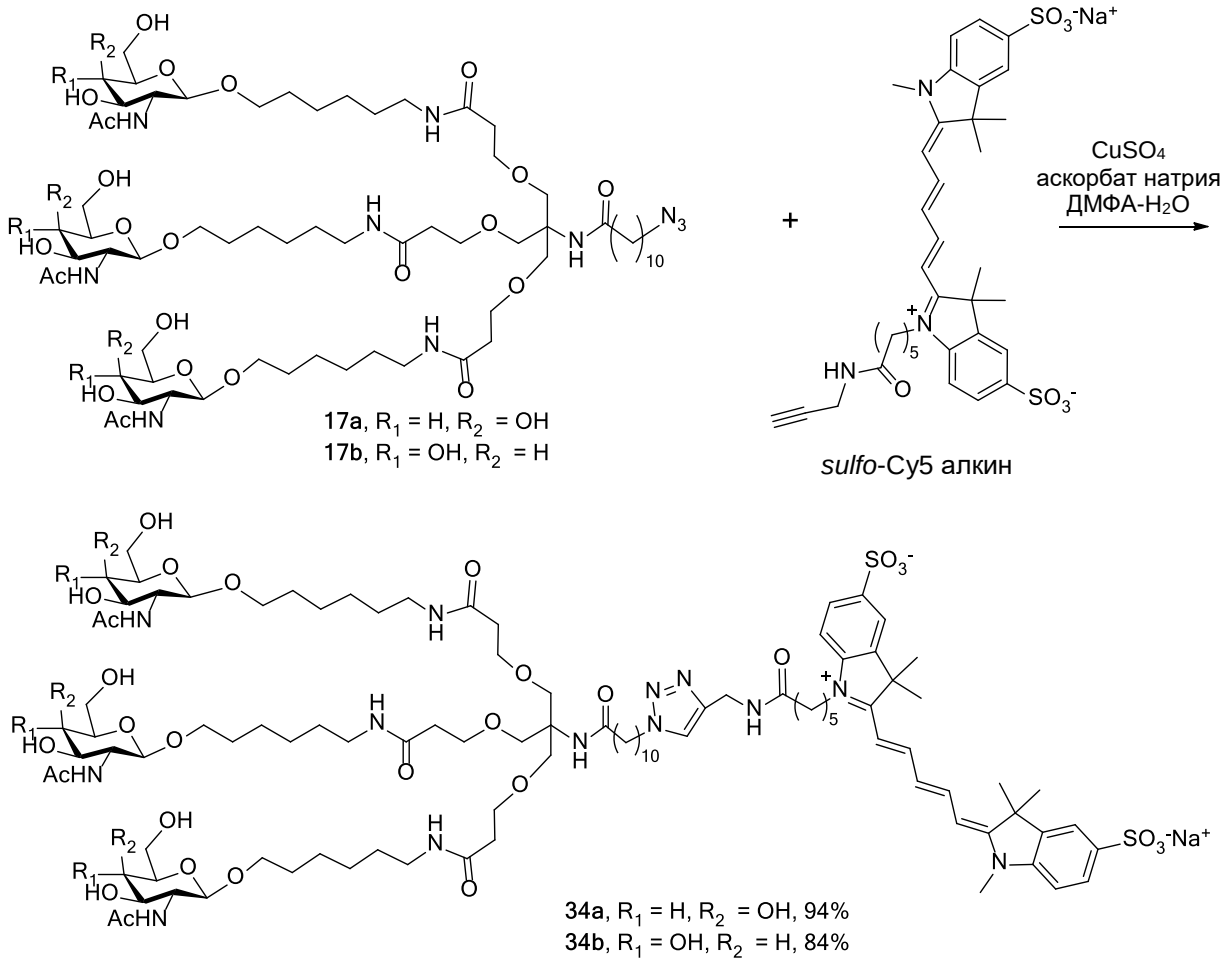


Схема 14

В результате с высоким выходом был получен конъюгат **34a**. По аналогичной методике был синтезирован продукт **34b** на основе *N*-ацетилглюкозамина. Строение соединений подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{1}H и ^{13}C, а состав посредством масс-спектрометрии высокого разрешения. В электронных спектрах поглощения полученных веществ **34a,b** наблюдали максимум поглощения при 646 нм (при той же длине волны, что и для исходного флуорофора).

In vivo исследование динамики распределения конъюгата **34a** по клеткам печени проводили с помощью интравитальной (прижизненной) микроскопии*. Сразу после введения животному конъюгата **34a** наблюдали его циркуляцию в печеночных синусоидах. К 10-й минуте концентрация препарата в сосудах уменьшалась, а в паренхиме органа, напротив, увеличивалась (Рисунок 4). На протяжении всего времени съемки (2 часа) наблюдали устойчивый сигнал флуоресценции с характерной для *sulfo*-Cy5 длиной волны.

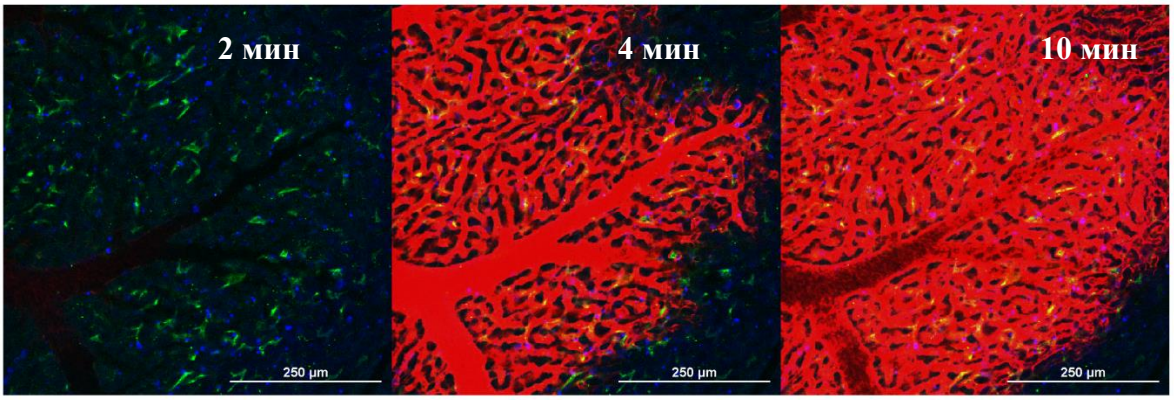


Рисунок 4. Кадры из видеосъемки, полученной при проведении интравитальной микроскопии печени мыши. Зеленым цветом окрашены макрофаги печени, синим – нейтрофилы, красный цвет – сигнал флуоресценции конъюгата **34a**

Чтобы подтвердить специфичность проникновения вещества в гепатоциты, исследовали взаимодействие конъюгата с другими типами клеток – макрофагами и нейтрофилами печени, которые выявляли с помощью флуоресцентных антител (анти-F4/80-Alexa-488 и анти-Ly6G-BV421, соответственно). Съемку проводили в трех каналах (DAPI/FITC/Cy5) (Рисунок 5). Было показано, что конъюгат **34a** не попадает в макрофаги и нейтрофилы, а проникает исключительно в гепатоциты.

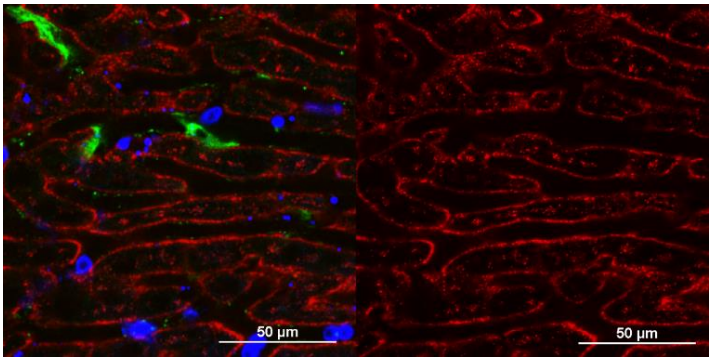


Рисунок 5. Снимки клеток печени с введенным соединением **34a**, зарегистрированные в различных спектральных диапазонах. Зеленый цвет соответствует макрофагам, синий – нейтрофилам, красный цвет – сигнал флуоресценции конъюгата **34a**

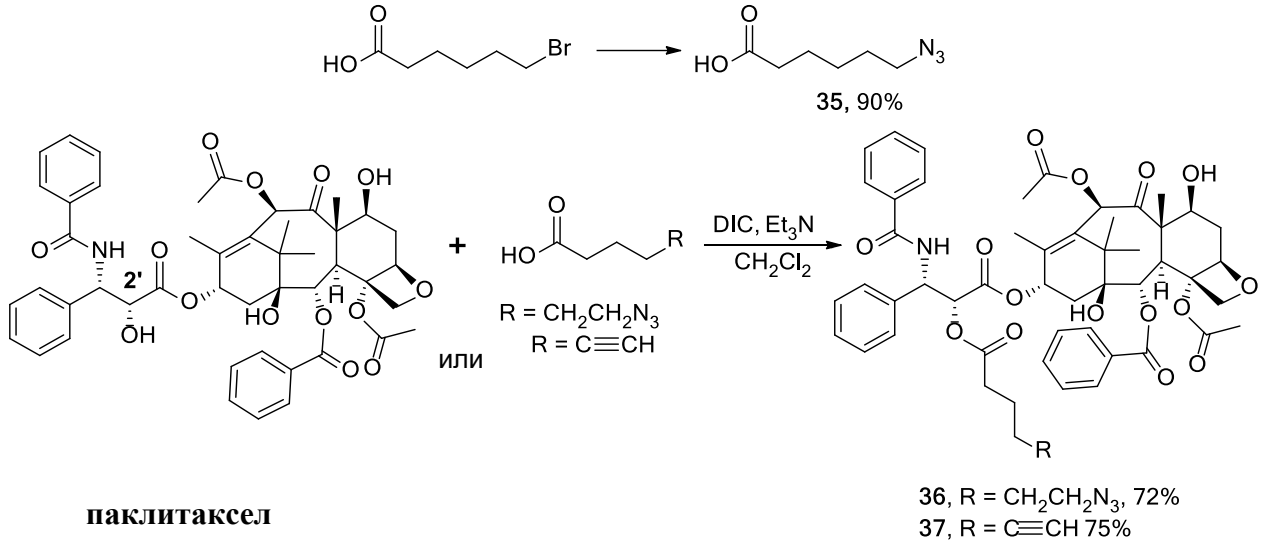
* *Данная часть исследований была выполнена совместно с лабораторией «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ «МИСиС». Автор выражает благодарность к.м.н. Науменко Виктору Алексеевичу за проведение интравитальной микроскопии и помощь в интерпретации полученных результатов*

Конъюгат **34b** на основе *N*-ацетилглюкозамина также был исследован с помощью интравитальной микроскопии. В отличие от GalNAc-содержащего изомера **34a** конъюгат **34b** не продемонстрировал способности проникать в гепатоциты, а накапливался на поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих печеночные синусоиды.

Полученные в биологических экспериментах данные говорят в пользу того, что лиганд **17a** способствует быстрому, специфичному и эффективному проникновению флуорофора в целевые клетки, его накоплению и удержанию. *In vivo* исследование конъюгатов **34a,b** с помощью интравитальной микроскопии проведено впервые и доказывает принципиальную возможность использования лиганда **17a** для доставки лекарственных препаратов и средств диагностики в клетки печени.

Конъюгаты паклитаксела

Паклитаксел был модифицирован по положению 2’-OH (Схема 15). Для этого прежде всего были получены производные **36**, **37** с азидогруппой и терминальной тройной связью.



паклитаксел

Схема 15

На заключительном этапе работы соединения **36, 37** и лиганды ASGPR были введены в реакцию медь-катализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения азидов к ацетиленам. В первом случае модифицированный паклитаксел **37** конъюгировали с углеводным лигандом **17a** (Схема 16). Полученный конъюгат **38** продемонстрировал хорошую стабильность в физиологических условиях: анализ с помощью ВЭЖХ-МС не выявил продуктов его гидролиза в водных средах (pH 5.0 и 7.4) даже через 24 часа. В связи с этим ожидается, что соединение не будет подвержено быстрой деградации в кровотоке при внутривенном введении и успешно достигнет целевых тканей.

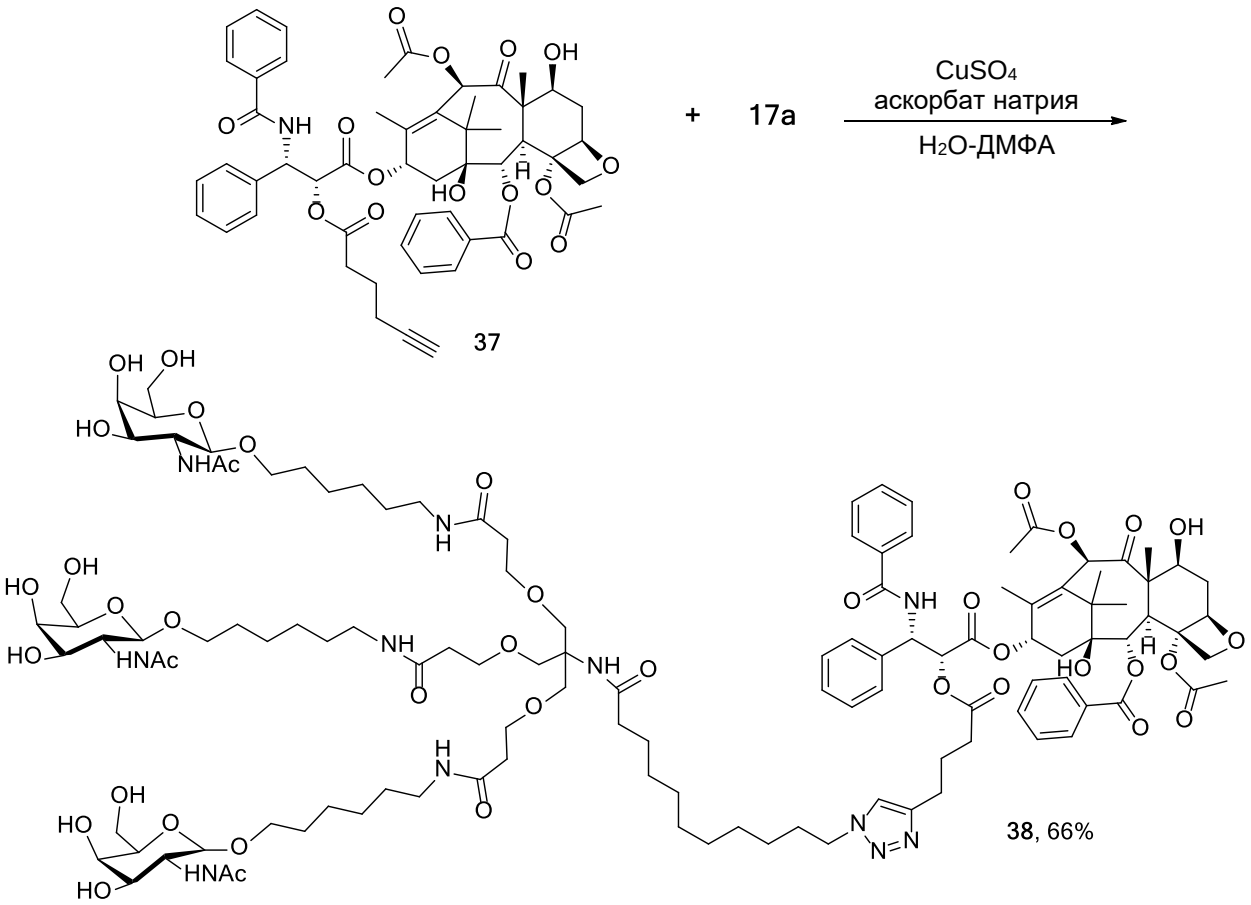


Схема 16

Цитотоксичность конъюгата измеряли с помощью стандартного MTS-теста (Таблица 1). Соединение **38,** как и ожидалось, продемонстрировало цитотоксическую активность на уровне с немодифицированным препаратом. По-видимому, после попадания в клетку сложноэфирная связь разрушается под действием внутриклеточных эстераз и терапевтический агент высвобождается. Таким образом, конъюгирование паклитаксела с лигандом **17a** не приводит к снижению эффективности действия препарата. Важным моментом также стало существенное повышение растворимости лекарственного средства в воде.

Таблица 1. *Цитотоксичность полученного конъюгата **38** в сравнении с немодифицированным паклитакселом, измеренная с помощью MTS-теста*[*]

Соединение	**38**	**паклитаксел**
CC_{50}, мкМ	0.11±0.12	0.12±0.01

Исходя из данных биологических исследований соединения **38** и конъюгата с флуоресцентным красителем **34a**, можно предположить, что введение адресного фрагмента в молекулу паклитаксела приведет к улучшению его фармакокинетических параметров в последующих *in vivo* тестах.

[*] *Автор выражает благодарность к.м.н. Салтыковой Ирине Владимировне за проведение экспериментов, направленных на измерение цитотоксичности конъюгата **38***

Во втором случае производное паклитаксела **36** вводили в реакцию с неуглеводным лигандом **30** (Схема 17). Соединение **39** выделяли хроматографически. Строение и состав конъюгата подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

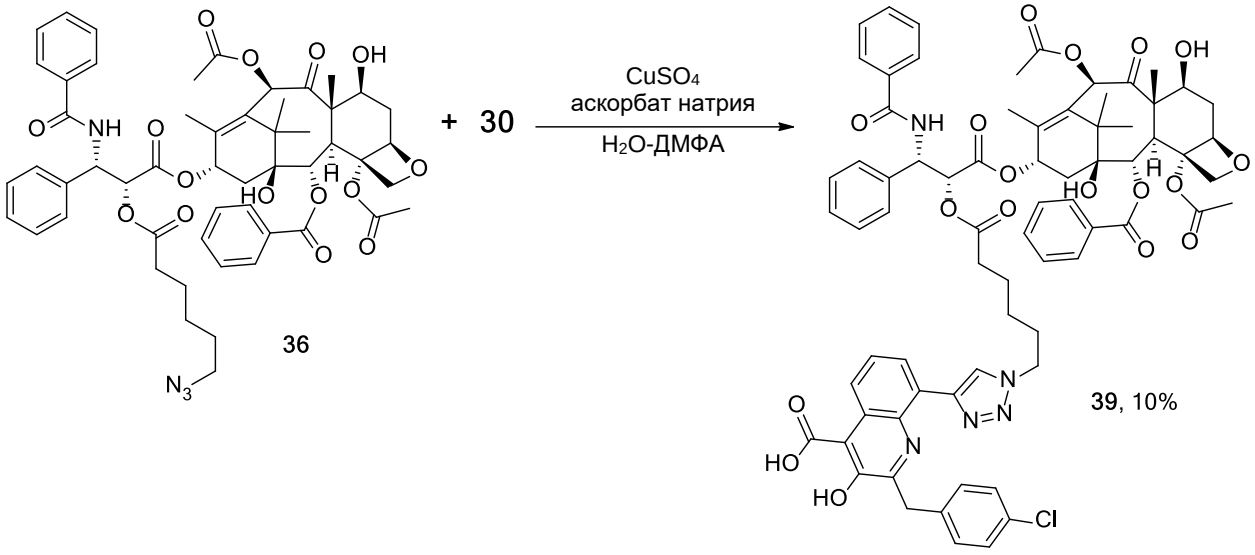


Схема 17

В результате, на примере соединения **30** и производного паклитаксела **36** показано, что предложенные в работе лиганды могут быть использованы для синтеза конъюгатов противоопухолевых препаратов для направленного транспорта в клетки гепатоцеллюлярной карциномы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые предложена конвергентная стратегия синтеза лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомеров на основе *N*-ацетилглюкозамина. Разработанный подход позволил получить 4 новых углеводсодержащих векторных соединения с терминальной азидогруппой.

2. Предложен препаративный метод получения конъюгатов *N*-ацетилгалактозамин- и *N*-ацетилглюкозамин-содержащих лигандов с флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5 алкином и противоопухолевым препаратом паклитакселом на основе катализируемого солями меди азидо-алкинового циклоприсоединения. Впервые проведено исследование распределения полученных соединений в организме животного методом интравитальной микроскопии. Показано, что лиганд на основе *N*-ацетилгалактозамина способствует быстрому проникновению флуорофора из кровотока в гепатоциты, минуя эндотелиальные клетки печени и макрофаги.

3. На примере пролекарства паклитаксела показано, что введение адресного фрагмента на основе *N*-ацетилгалактозамина не влечет за собой снижения биологической активности противоопухолевого препарата при увеличении его водорастворимости.

4. Найден новый класс лигандов ASGPR неуглеводной природы – производные 3-гидроксихинолин-4-карбоновой кислоты. Разработан синтетический подход к 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)хинолин-4-карбоновым кислотам, содержащим в бензольном кольце этинильный заместитель. На примере паклитаксела показано, что предложенные лиганды могут быть использованы для синтеза конъюгатов противоопухолевых препаратов для направленного транспорта в клетки гепатоцеллюлярной карциномы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Majouga A.G., Ivanenkov Ya.A., Veselov M.S., Lopuhov A.V., **Maklakova S.Yu.,** Beloglazkina E.K., Klyachko N.L., Sandulenko Yu.B., Galkina N.Y., Koteliansky V.E. Identification of novel Small-molecule ASGP-R ligands // *Curr. Drug Deliv.* – **2016**. – V. 13. – № 8. – P. 1303–1312 (IF=2.516).

2. Иваненков Я.А., **Маклакова С.Ю.,** Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Назаренко А.Г., Тоневицкий А.Г., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Экспериментальные направления в разработке средств направленной доставки лекарственных препаратов в клетки печени // *Успехи химии*. – **2017**. – Т. 86. – №. 8. – С. 750–776 (IF=3.991).

3. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., **Maklakova S.Yu.,** Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse N-acetylgalactosamine clusters // *Bioconjugate Chemistry*. – **2017**. – V. 28. – №. 10. – P. 2599–2607 (IF=4.485).

4. **Маклакова С.Ю.** Мажуга А.Г., Белоглазкина Е.К., Гопко В.В., Зык Н.В. Дизайн и синтез специфических лигандов асиалогликопротеинового рецептора // *Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015». Сборник тезисов докладов*. Красновидово. 18-21 января **2015**. – С. 71.

5. **Маклакова С.Ю.,** Кучеров Ф.А., Петров Р.А., Гопко В.В., Шипулин Г.А., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Синтез тривалентных лигандов асиалогликопротеинового рецептора, получение с помощью медь-катализируемого азидо-алкинового циклоприсоединения конъюгатов олигонуклеотидов для адресной доставки в клетки печени // *Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "KOST-2015". Сборник тезисов докладов*. Москва. 18-23 октября **2015**. – С. 464.

6. **Maklakova S.,** Kucherov F., Petrov R., Gopko V., Shipulin G., Zatsepin T., Beloglazkina E., Zyk N., Majouga A., Kotelyansky V. Conjugation of triantenerary ligands of the asialglycoprotein

receptor with oligonucleotides by means of copper-catalized azide-alkyne cycloaddition // *XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry. Book of abstracts*. Metz (France) 7-11 June **2015**. – P. 89.

7. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Шипулин Г.А., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Синтез лигандов асиалогликопротеинового рецептора для адресной доставки биологически активных веществ в клетки печени // *2ая Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015». Сборник тезисов докладов*. Красновидово. 16-21 января **2016**. – С. 164.

8. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Шипулин Г.А., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Синтез лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленной доставки биологически активных веществ в клетки печени // *XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал*. – **2016**. – Т. 15. – № 1. – С. 59–59.

9. Пугач А.В., **Маклакова С.Ю**. Хинолиновый гетероцикл как новый лиганд асиалогликопротеинового рецептора // *I Всероссийская молодёжная школа-конференция "Успехи синтеза и комплексообразования". Сборник тезисов докладов*. Москва. 25-28 апреля **2016**. – С. 172.

10. **Maklakova S.Yu.,** Pugach A.V., Gopko V.V., Shubernetskaya O.S., Shipulin G.A., Zatsepin T.S., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G., Koteliansky V.E. Synthesis of ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted delivery to hepatocytes // *International conference «Dombay Organic Conference Cluster» (DOCC-2016). Book of abstracts*. Домбай. 28 мая – 4 июня **2016**. – С. 206.

11. **Maklakova S.Yu.,** Petrov R.A., Gopko V.V., Shubernetskaya O.S., Shipulin G.A., Zatsepin T.S., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G., Koteliansky V.E. Conjugation of ligands of the asialoglycoprotein receptor with anticancer drugs, fluorescent dyes and siRNA // *EFMC-ISMC 2016 XXIV International Symposium on Medicinal Chemistry. Book of abstracts*. Manchester (United Kingdom). 28 August – 1 September **2016**. – P. 148.

12. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Пугач А.В., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Дизайн и синтез лигандов ASGPR для направленного транспорта биологически активных веществ в клетки печени // *Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней. Сборник тезисов докладов.* Красновидово. 13 – 18 января **2017.** С. 164.

13. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Пугач А.В., Шубернецкая О.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Использование низкомолекулярных лигандов ASGPR для создания противоопухолевых препаратов направленного действия // *XIV Всероссийской научно-*

практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал. – **2017**. – Т. 16. – № S1. – С. 49–49.

14. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Пугач А.В. Синтез конъюгатов противоопухолевых препаратов, олигонуклеотидов и флуоресцентных красителей для направленного транспорта в клетки печени // *XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017". Сборник тезисов докладов.* Москва. 10 – 14 апреля **2017**.

15. Hapko V.V., **Maklakova S.Yu.,** Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G., Koteliansky V.E. Synthesis of tissue-specific ligands conjugates for the targeted drug delivery to hepatic cells // *The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing". Book of abstracts.* Москва. 24 – 28 апреля **2017**.

16. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Пугач А.В., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Конъюгаты низкомолекулярных лигандов ASGPR для направленного транспорта биологически активных веществ в клетки печени // *VII Молодежная конференция ИОХ РАН. Сборник тезисов докладов.* Москва. 17 – 18 мая **2017**. С. 27.

17. **Maklakova S.Yu.,** Hapko V.V., Petrov R.A., Zatsepin T.S., Abakumova T.O., Sergeeva O.V., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Koteliansky V.E., Majouga A.G. Synthesis of tissue-specific conjugates for targeted drug delivery into hepatic cells // *10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry. Book of abstracts.* Dubrovnik (Croatia). 25 – 28 June **2017**. P. 73.

18. Hapko V.V., **Maklakova S.Yu.,** Chuprov A.D., Saltykova I.V., Sergeeva O.V., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Koteliansky V.E., Majouga A.G. Synthesis of tissue-specific ligands for the targeted drug delivery to hepatic cells // *3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry «Med Chem Russia 2017». Book of abstracts.* Kazan (Russia). 28 September – 3 October **2017**. C. 16.

19. Чупров А.Д., **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Салтыкова И.В., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г. Синтез и биологические исследования противоопухолевых препаратов направленного действия на основе лигандов ASGPR // *XV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы». Российский биотерапевтический журнал* – **2018**. – Т. 17. – № S1. – С. 83–83.

20. **Маклакова С.Ю.,** Гопко В.В., Чупров А.Д., Салтыкова И.В., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г. Конъюгаты терапевтических и диагностических агентов с тканеспецифическими лигандами для направленного транспорта в клетки печени // *Всероссийская молодежная научная школа-конференция "Актуальные проблемы органической химии". Сборник тезисов докладов.* Шерегеш. 09 – 16 марта **2018**. С. 141.

21. **Маклакова С.Ю.,** Чупров А.Д., Салтыкова И.В., Науменко В.А., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г. 3-Гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты как новые лиганды асиалогликопротеинового рецептора: синтез и биологические тестирования // *V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии. Сборник тезисов докладов.* Владикавказ. 10 – 14 сентября **2018**. С. 199.

Автор считает своим приятным долгом выразить благодарность научному руководителю д.х.н., проф. Мажуге Александру Георгиевичу за интересную тему исследования и помощь в проведении и организации работы; д.х.н., проф. Белоглазкиной Елене Кимовне и д.х.н., проф. Зыку Николаю Васильевичу за всестороннюю помощь в подготовке к представлению результатов исследования; к.х.н. Зацепину Тимофею Сергеевичу, к.б.н. Иваненкову Яну Андреевичу, к.м.н Науменко Виктору Алексеевичу, к.х.н. Ковалеву Сергею Васильевичу, к.м.н. Салтыковой Ирине Владимировне, к.ф.-м.н. Рознятовскому Виталию Александровичу, д.х.н. Гришину Юрию Константиновичу, д.х.н. Черткову Вячеславу Алексеевичу, к.х.н. Финько Александру Валерьевичу, Петрову Ростиславу Александровичу, Лопухову Антону Владимировичу, Комарову Арсению Игоревичу за проведение исследований физико-химических и биологических свойств полученных в работе соединений и помощь в интерпретации результатов; Пугачу Андрею Владиславовичу, Гопко Владиславу Владимировичу и Чупрову Андрею Дмитриевичу за помощь в исследовании; друзьям и близким за поддержку на протяжении всех этапов работы.