

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



МАЧУЛКИН Алексей Эдуардович

**СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ПРЕПАРАТОВ С ПРОИЗВОДНЫМИ МОЧЕВИН**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители

Мажуга Александр Георгиевич
доктор химических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты:

Кочетков Константин Александрович
доктор химических наук, профессор
Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
отдел элементоорганических соединений,
заведующий лабораторией 128
гомолитических реакций
элементоорганических соединений.

Милаева Елена Рудольфовна
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский
государственный университет имени
М.В. Ломоносова», заведующий кафедрой
медицинской химии и тонкого
органического синтеза Химического
факультета.

Зубков Федор Иванович
кандидат химических наук, доцент
кафедры органической химии факультета
физико-математических и естественных
наук федерального государственного
автономного учреждения высшего
образования "Российский университет
дружбы народов"

Защита состоится «29» мая 2019 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

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

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени

М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/190780182/>

Автореферат разослан «23» апреля 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор

 Т.В. Магдесиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Рак предстательной железы – одна из самых распространенных причин смертности среди мужчин в Российской Федерации и во всем Мире. В США он занимает второе место по частоте летальных исходов среди онкологических заболеваний.* В настоящее время диагностика рака простаты осуществляется методами ректальной диагностики, анализа уровня простатического специфического антигена (ПСА) в крови, биопсии простаты. Однако, эти методы обладают существенными недостатками: ректальная диагностика позволяет обнаружить заболевание только на поздних стадиях, биопсия является дорогим и болезненным методом, а анализ ПСА зачастую дает ложноположительные результаты. В качестве методов терапии рака предстательной железы применяются хирургическое вмешательство, радио-терапия, гормональная терапия, а также химиотерапия. Несмотря на разнообразие имеющихся способов воздействия на опухоль, ни один из приведенных методов не позволяют проводить эффективное лечение опухолей, имеющих метастазы. Также все приведенные методы обладают широким спектром побочных эффектов, которые негативно сказываются на состоянии пациентов.

В связи с имеющимися недостатками в терапии рака предстательной железы необходимы методы, имеющие существенно меньший спектр побочных эффектов. Таким методом может выступать адресная доставка диагностических и терапевтических агентов, направленных на биологические мишени, характеризующиеся высокой экспрессией в опухолевых тканях. Простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) в настоящее время является наиболее привлекательной мишенью для решения таких задач. Повышенная экспрессия ПСМА в раковых клетках коррелирует со степенью развития опухоли, а также, позволяет диагностировать метастатические новообразования. При этом ПСМА практически не наблюдается в здоровых тканях.† Актуальной задачей является дизайн, разработка синтетических подходов, а также получение и биологическое исследование таких конъюгатов.

Общая структура конъюгатов представляет собой ПСМА-вектор, соединенный с лекарственным/диагностическим средством, с помощью линкера гидрофобной природы. Для реализации подхода с использованием ПСМА-вектора были выбраны пути получения конъюгатов, основанные на создании различных функциональных групп, в том числе

* Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, 68 (6), 394–424.

† Чехонин, В. П.; Григорьев, М. Э.; Жирков, Ю. А.; Лебеде, Д. В. Простатический специфический мембранный антиген и его роль в диагностике рака предстательной железы. *вопросы медицинской химии.* 2002, 48, 31–43.

получение гидразонов, либо 1,2,3-триазолов, с применением реакции азид-алкинового циклоприсоединения, как наиболее удобного и универсального синтетического метода получения сложных биологически-активных молекул.

Цель работы заключалась в дизайне и синтезе новых лигандов простатического специфического мембранного антигена, а также способов создания конъюгатов с противоопухолевыми препаратами на их основе.

Задачи работы состояли в а) разработке синтетических подходов к получению конъюгатов доксорубицина, содержащих гидролитически лабильный линкер б) разработки методики получения конъюгатов паклитаксела с использованием реакции 3+2 азид-алкинового циклоприсоединения в) получение конъюгатов лигандов ПСМА с агентами для фотодинамической терапии г) дизайн и синтез серии новых лигандов ПСМА, содержащих три ароматических фрагмента в структуре линкера, а также оценка их аффинности к белковой мишени д) *in vitro* и *in vivo* исследовании биологических свойств полученных конъюгатов.

Научная новизна. Оптимизированы методики синтеза лигандов ПСМА, содержащих фрагмент гидразида. Это открыло возможность последующего их соединения с терапевтическими с помощью реакции образования чувствительных конъюгатов гидразонов. На основе полученных лигандов были впервые синтезированы конъюгаты - гидразоны доксорубицина и исследована их цитотоксичность. Разработан универсальный метод синтеза азид-содержащих лигандов ПСМА, что открыло возможность создания конъюгатов с терапевтическими агентами с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения. В результате выделено и охарактеризовано набором физико-химических методов анализа 12 новых лигандов ПСМА, на их основе было получено 12 ранее не описанных конъюгатов с паклитакселом. Для полученных соединений впервые проведены *in vitro* и *in vivo* исследования их противоопухолевого эффекта. В работе был разработан подход к получению конъюгатов лиганда ПСМА и фотосенсибилизатора хлорина е6, замещенного в положения 13¹ и 15² макроциклической системы, а также исследована его фототоксичность. Проведен дизайн, а также разработка синтетических методик получения 21 новый лиганд ПСМА, содержащий в линкерной группировке три ароматических структурных фрагмента и продемонстрирована их высокая аффинность к ПСМА. На основе полученных лигандов получены ранее не описанные конъюгаты доцетаксела, также впервые предложен подход к применению низкомолекулярных конъюгатов противоопухолевого препарата монOMETИЛ ауриСТАТИНА E, проведено их *in vitro* и *in vivo* исследование.

Практическая значимость. Разработаны синтетические схемы и осуществлен синтез новых высокоэффективных лигандов простатического специфического мембранного антигена на основе производных мочевины глутаминовой кислоты и лизина. Разработаны синтетические подходы к синтезу и получено 3 кислотно-чувствительных конъюгата-гидразона доксорубицина, показавших высокую цитотоксическую активность на клеточной линии LNCaP, обладающей высокой экспрессией ПСМА.

Проведена оптимизация структуры лигандов ПСМА и разработаны синтетические методики получения конъюгатов на их основе с применением реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Методом исследования ингибирования ферментативной активности ПСМА, проведено исследование аффинности новых лигандов ПСМА, показано, что введение трех ароматических фрагментов структуру лигандов ПСМА положительно сказывается на их аффинности к белковой мишени. На основе данных лигандов получены конъюгаты доцетаксела, а также впервые предложен подход к созданию низкомолекулярных конъюгатов монометил ауристатина E и проведено их *in vitro* и *in vivo* исследование.

Положения, выносимые на защиту 1) Синтез гидразонов доксорубицина, с лигандами ПСМА на основе мочевины глутаминовой кислоты и лизина, содержащих фрагмент гидразида в составе линкера, проявляющих высокую цитотоксическую активность; 2) разработка подходов к синтезу конъюгатов паклитаксела с использованием реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения; 3) модификация фотосенсибилизатора хлорина еб с использованием лиганда ПСМА и *in vitro* тестирование его фототоксичности; 4) дизайн и синтез новых высокоаффинных лигандов ПСМА, содержащих три ароматических фрагмента в структуре линкера; 6) разработка синтетических подходов к получению низкомолекулярных конъюгатов доцетаксела и монометил ауристатина E; 7) исследование цитотоксической активности противоопухолевых конъюгатов, а также их эффективности на ксенографтных моделях рака предстательной железы.

Публикации. По материалам работы опубликована 15 печатных работ: 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, 1 патент, и 11 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: XXII Международная научная

конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, Россия, 2015); International Baltic Conference On Magnetism 2015 (Светлогорск, Россия, 2015); 2-я Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2016 (Красновидово, Россия, 2016); XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (Москва, Россия, 2016); EFMC-ISMC 2016 XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (Манчестер, Великобритания, 2016); II Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2016); WSOC. Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней (Красновидово, Россия, 2017); XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты», ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия, 2017); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017", МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия, 2017); EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (Любляна, Словения, 2018).

Личный вклад автора. Автор проводил сбор и анализ литературных данных по теме исследования, синтез 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, приложений. Работа изложена на 212 страницах машинописного текста, содержит 39 схем, 27 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 100 наименования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (грант №14-34-00017), гранта Президента РФ (Договор № 075-02-2018-865) и Министерства образования и науки Российской Федерации (02.G25.31.0219, договор № ИФ-МГУ/10-14 от 14 октября 2016 года).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что при получении конъюгатов для адресной доставки на основе лигандов ПСМА большое внимание

необходимо уделять структуре линкера и способу его соединения с векторным и терапевтическим фрагментами. На основании литературных данных о строении рецептора ПСМА в рамках данной работы был осуществлен дизайн потенциальных конъюгатов для адресной доставки таких противоопухолевых препаратов как доксорубин, паклитаксел, доцетаксел, монометил ауристатин E, а также агента для фотодинамической терапии хлорина еб (**Рисунок 1**). Для каждого из препаратов был осуществлен анализ литературных данных и разработаны синтетические методы их модификации с использованием лигандов ПСМА.

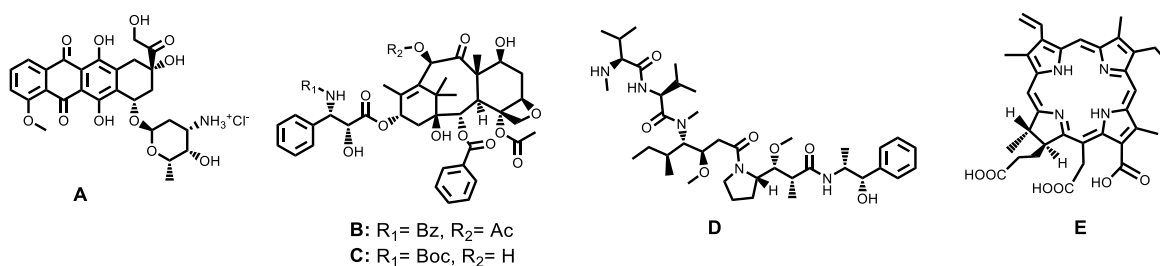


Рисунок 1. Структура противоопухолевых препаратов для создания конъюгатов на их основе: доксорубин (A), паклитаксел (B), доцетаксел (C), монометилауристатин E(D), хлорин еб (E).

Одними из наиболее перспективных, для использования в качестве адресных лигандов молекулами, являются производные мочевины (DUPA и DCL), а наиболее синтетически доступным и удобным с точки зрения его последующей модификации представляется лиганд DCL, получаемый на основе L-глутаминовой кислоты и L-лизина. Наиболее препаративно удобным методом синтеза такого лиганда является трехстадийная последовательность с получением на первом этапе изоцианата из ди-трет-бутилового эфира глутаминовой кислоты, его последующим взаимодействием *in situ* с гидрохлоридом трет-бутилового эфира *N*_ε-Cbz-L-лизина и удалением защитной группы с амина по **схеме 1**.

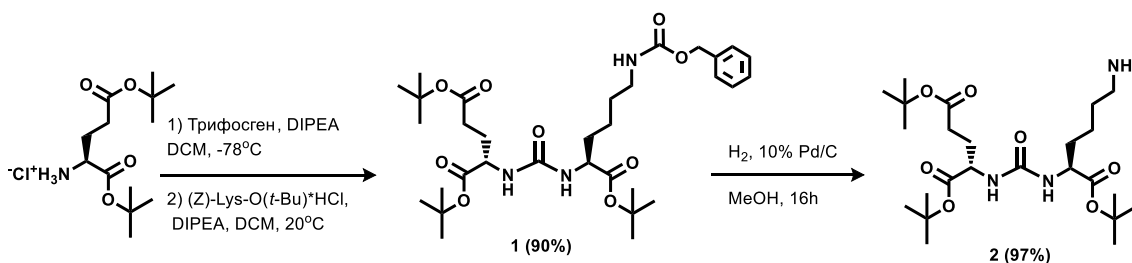


Схема 1

Конъюгаты доксорубина

Конъюгация лиганда ПСМА на основе мочевины **2** с противоопухолевыми или диагностическими агентами может быть осуществлена путем модификации терминальной NH₂-группы фрагмента лизина. На основании данных по молекулярному моделированию

установлено, что оптимальная длина линкера, соединяющего лиганд ПСМА и доставляемую молекулу, должна быть не менее 20 Å, а фрагменты, входящие в состав линкера, должны иметь гидрофобную природу. Для этого нами были выбраны производных аминокислот с различной длиной полиметиленового фрагмента между амино- и карбоксильной группой. В качестве базовых структурных фрагментов использовались 6-аминогексановая и 11-аминундекановая кислоты, на их основе были получены соответствующие линкеры **7** и **8**, которые далее были использованы для модификации *tert*-бутил-защищенного лиганда ПСМА **2** (схема 2).

Согласно имеющимся литературным данным существует два основных подхода к модификации структуры доксорубина: образование амидной связи с использованием амино-группы углеводного фрагмента и образование гидразона с кето-группой. Последний метод является наиболее перспективным, ввиду лабильности получаемых соединений в слабокислых условиях, что может способствовать высвобождению лекарственного препарата во внутриклеточной среде в процессе эндоцитоза. По этой причине в качестве наиболее перспективного, как с точки зрения синтеза, так и с точки зрения последующего биологического применения был выбран метод, основанный на образовании гидразона. Для этого из соединений **9** и **10**, содержащих карбоксиметильную группу, были получены соответствующие гидразиды **11** и **12**. Соединения **11** и **12** были охарактеризованы методами спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Так в ЯМР ^1H спектре соединений **11** и **12** исчезает сигнал протонов метокси-группы при 3.6 м.д., характерный для соединений **9-10** и появляются сигналы протонов -NHNH₂ фрагмента при 8.91 (NH) и 4.1 (NH₂) м.д.

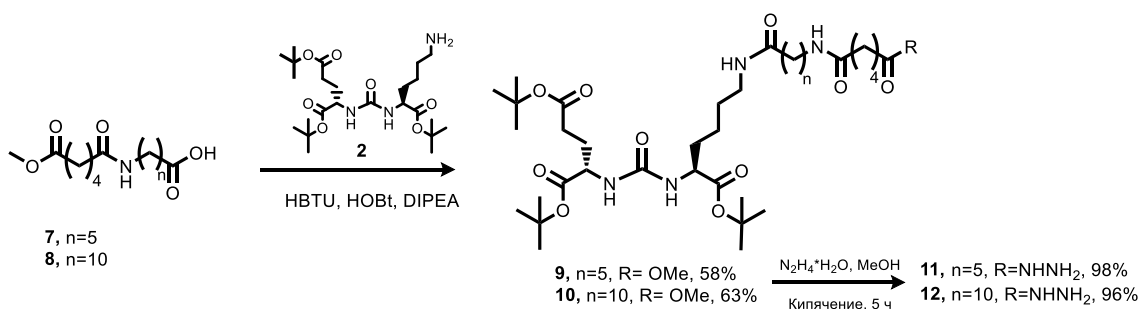


Схема 2

При анализе литературных источников было установлено, что наибольший вклад в увеличение аффинности к ПСМА вносят гидрофобные взаимодействия между линкером и длинным туннелем в структуре данного белка, в конце которого находятся два гидрофобных кармана. По этой причине введение дополнительных гидрофобных фрагментов, в качестве которых могут выступать последовательности ароматических

аминокислот, дипептидная последовательность на основе ароматической аминокислоты фенилаланина L-Phe-L-Phe является оптимальным структурным фрагментом для увеличения гидрофобных взаимодействий: для лиганда ПСМА, содержащего такой структурный фрагмент. По этой причине в структуру лиганда нами было решено ввести фрагмент фениланил-фенилаланина (Phe-Phe).

Для введения такого структурного фрагмента необходимо было провести модификацию соединения **2**. Для этого сначала были получены амиды **15** и **16** реакцией с соответствующими 6-азидогексановой и 11-азидоундекановой кислотами в присутствии реагентов HBTU, HOBT, а также диизопропилэтиламина, последующий гидрогенолиз которых в присутствии 10% Pd/C привел к соответствующим аминам **17** и **18с** выходами, близкими к количественным (Схема 3.).

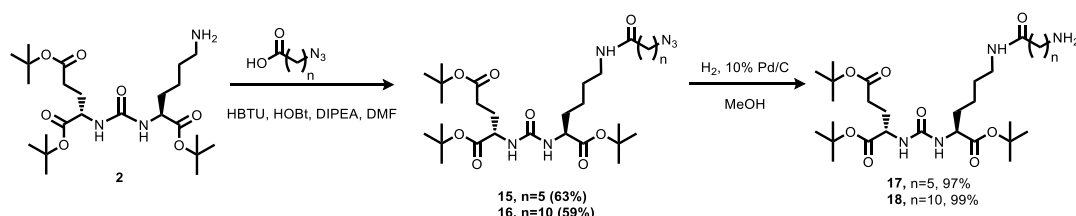


Схема 3

Соединение **17** было далее введено в реакцию с производным дипептида L-Phe-L-Phe-OMe и янтарной кислоты (**14**) в присутствии HBTU, HOBT и диизопропилэтиламина, в результате чего после хроматографического разделения реакционной смеси был выделен продукт **19**. Дальнейшая его реакция с гидразином позволила получить соответствующий гидразид **20** с высоким выходом (Схема 4.).

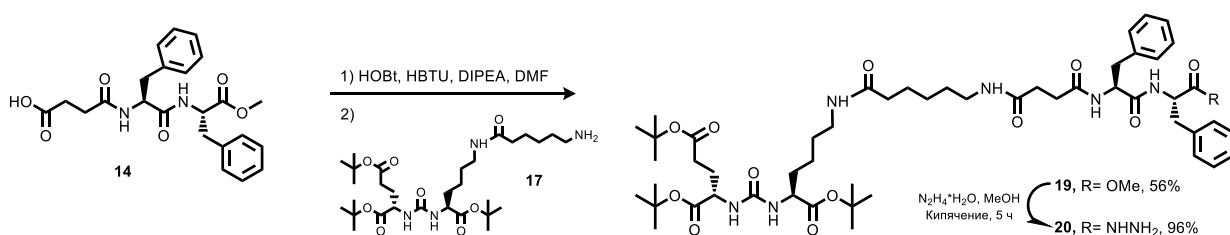


Схема 4

На заключительном этапе синтеза лигандов для получения конъюгатов с доксорубицином в структурах **11**, **12** и **20** были удалены защитные *трет*-бутильные группы в смеси трифторуксусная кислота:дихлорметан (1:9). Очистка лигандов **21-23** после реакции проводилась с помощью многократной промывки диэтиловым эфиром (Схема 5.).

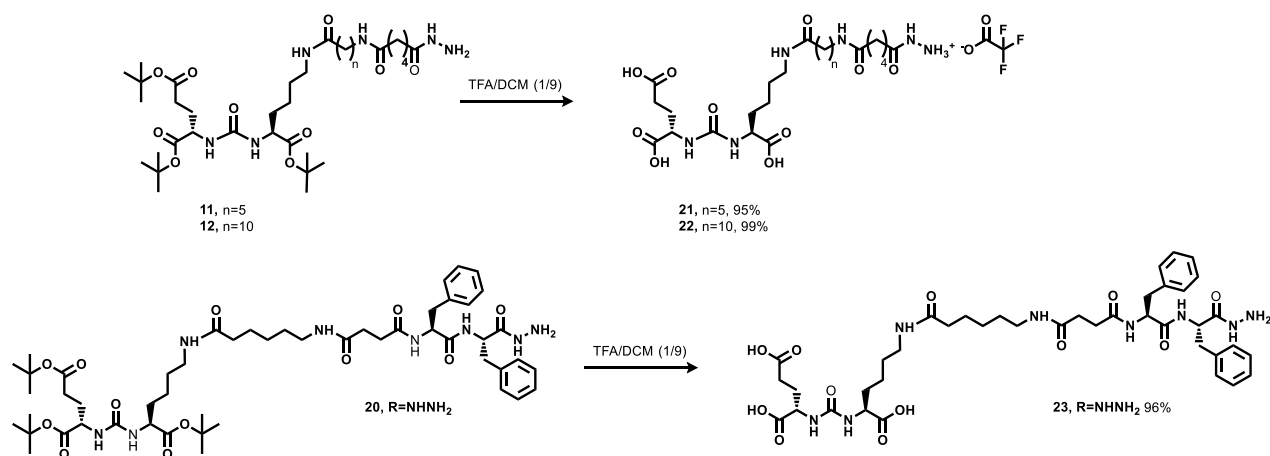


Схема 5

Для синтеза конъюгатов была использована реакция получения гидразонов доксорубина из соответствующих гидразидов **21**, **22** и **23** в присутствии каталитических количеств трифторуксусной кислоты (Схема 6).

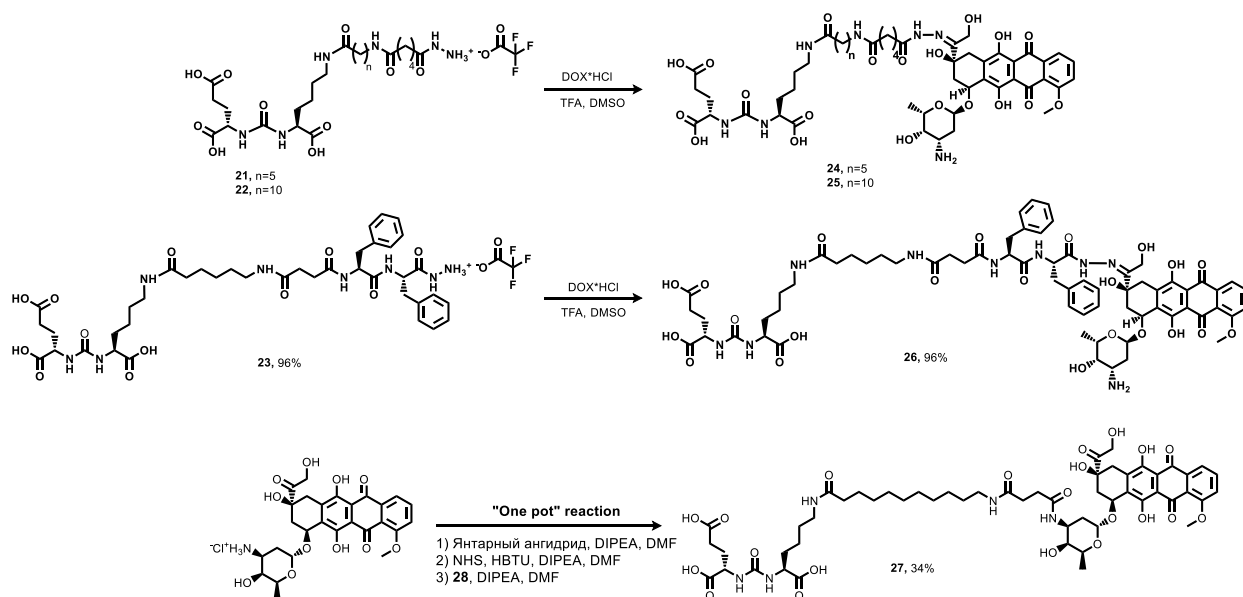


Схема 6

Также для проведения сравнения биологической активности полученных соединений нами был осуществлен синтез конъюгата доксорубина и векторного фрагмента с образованием амидной связи. Данный синтез был осуществлен с использованием “one-pot” стратегии, где на первом этапе была проведена модификация доксорубина с помощью янтарного ангидрида в присутствии DIPEA. Далее карбоксильная группа янтарного ангидрида была активирована за счет образования NHS-эфира, последующая реакция которого с лигандом **28** привела к образованию конъюгата **27**. Очистку полученной реакционной смеси проводили с помощью препаративной

тонкослойной хроматографии, в результате чего конъюгат **27** был выделен с выходом 34% (Схема 6).

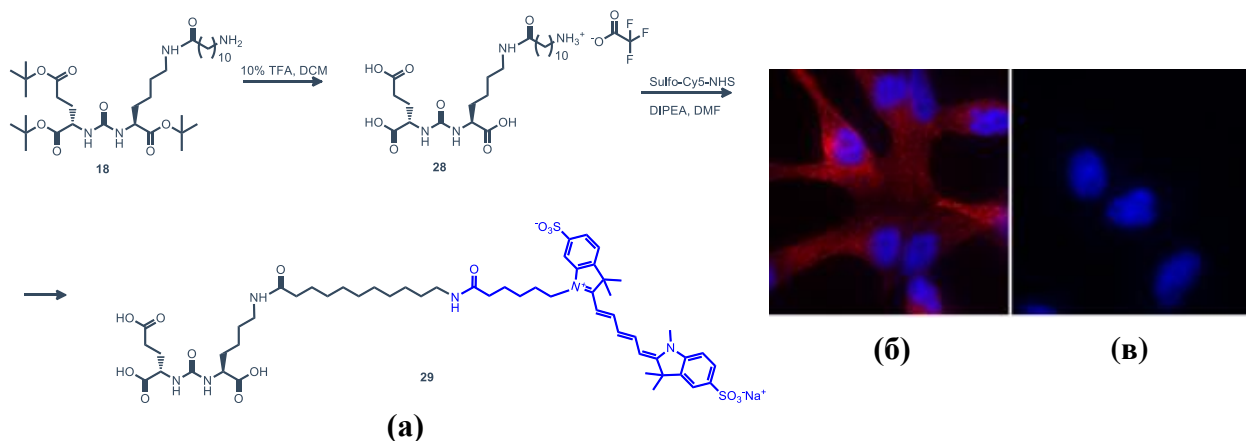


Рисунок 2. Синтез флуоресцентного конъюгата. **(а)**; изображение клеток LNCaP **(б)** и PC-3 **(в)** обработанных конъюгатом **29** ($C=30$ нМ) в течение 120 минут; клеточное ядро (синее) окрашено флуоресцентным красителем (DAPI, 4',6-диамидино-2-фенилиндол).

Таблица 1.

Противоопухолевая активность конъюгатов **24-27** и доксорубина на клеточных линиях LNCaP и PC-3

№	CC ₅₀ , нМ	
	LNCaP	PC-3
24	331±15	2068±323
25	487±35	2791±914
26	95±11	926±76
27	Не активно	Не активно
Dox	93±5	< 500

На первом этапе биологических тестирований полученных конъюгатов нами была поставлена задача визуализации ПСМА методом флуоресцентной микроскопии. Для получения флуоресцентных конъюгатов был выбран NHS-активированный флуоресцентный цианиновый краситель Sulfo-Cy5. В качестве лиганда ПСМА было использовано соединение с терминальной амино-группой **28**, полученное из соединения **18** реакцией с трифторуксусной кислотой. В спектре ¹H ЯМР продукта реакции **28** отсутствовали сигналы протонов *трет*-бутильных групп (1,45-1,49 м.д.) и наблюдались уширенные сигналы протонов в слабом поле при 12 м.д., что свидетельствовало о полноте протекания процесса

(Рисунок 2, а)

Для доказательства специфичности связывания полученных конъюгатов с целевыми клетками, экспрессирующими ПСМА, были использованы две клеточные линии рака предстательной железы: LNCaP, экспрессирующая ПСМА, и PC-3, неэкспрессирующая ПСМА. Тестирование флуоресцентного конъюгата **29** на данных клеточных линиях демонстрирует избирательное связывание конъюгата только с клетками

линии LNCaP (*рисунок 2, б*) в то время как связывание конъюгата с клетками линии PC-3 (*рисунок 2, в*), неэкспрессирующей ПСМА, обнаружено не было[‡].

Для синтезированных конъюгатов **24-27** было проведено исследование их цитотоксичности на ПСМА «+» клеточной линии LNCaP и ПСМА «-» линии PC-3 (*Таблица 1*); в качестве контрольного препарата был взят доксорубицин. Наиболее активное соединение по данным МТТ-теста, показало значение $CC_{50} = 95$ нМ, близкое к токсичности самого доксорубицина ($CC_{50} = 93$ нМ) на клеточной культуре LNCaP.

Конъюгаты **24** ($CC_{50} = 331$ нМ) и **25** ($CC_{50} = 487$ нМ), показали меньшую активность по отношению к опухолевым клеткам. В то же время, значение CC_{50} конъюгата **26** на клеточной линии PC-3 составило 926 нМ, что демонстрирует его большую селективность относительно ПСМА-экспрессирующей клеточной линии по сравнению с доксорубицином. В то же время, конъюгат **37**, полученный с образованием амидной связи, продемонстрировал отсутствие значительного токсического эффекта на двух клеточных линиях.

Конъюгаты паклитаксела

Для получения конъюгатов паклитаксела была использована синтетическая последовательность, с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Для этого в структуру лиганда ПСМА был введен фрагмент, содержащий азидо-группу. В качестве азидосодержащих линкеров были выбраны 6-азидогексановая и 11-азидоундекановая кислоты. Модификация лигандов могла быть проведена двумя синтетическими путями: с образованием амидной связи (*Схема 7, а*) или с образованием фрагмента мочевины (*Схема 7, б*). Разница в типе соединения линкера и структурного фрагмента, отвечающего за связывание лиганда с ПСМА, может влиять на аффинность лиганда, а также на активность получаемых соединений. Поэтому при выполнении в данной части работы были синтезированы оба структурных типа лигандов.

Ранее синтезированные азид-содержащие молекулы **15** и **16** были использованы для синтеза лигандов для конъюгации с паклитакселом. Для этого они были введены в реакцию с трифторуксусной кислотой, в результате чего было получены соответствующие кислоты **30** и **31**.

Синтез лигандов с мочевиным типом сочленения был реализован с использованием 1-азидо-6-изоцианатогексана и 1-азидо-11-изоцианатоундекана, с получением соединений **32** и **33**. Последующее удаление *трет*-бутильных групп дает лиганды **34** и **35**, которые дальше могут быть использованы для проведения реакции азид-

[‡] Автор выражает благодарность к.б.н. Гараниной Анастасии Сергеевне за помощь в проведении *in vitro* исследований и интерпретации полученных данных

алкинового циклоприсоединения.

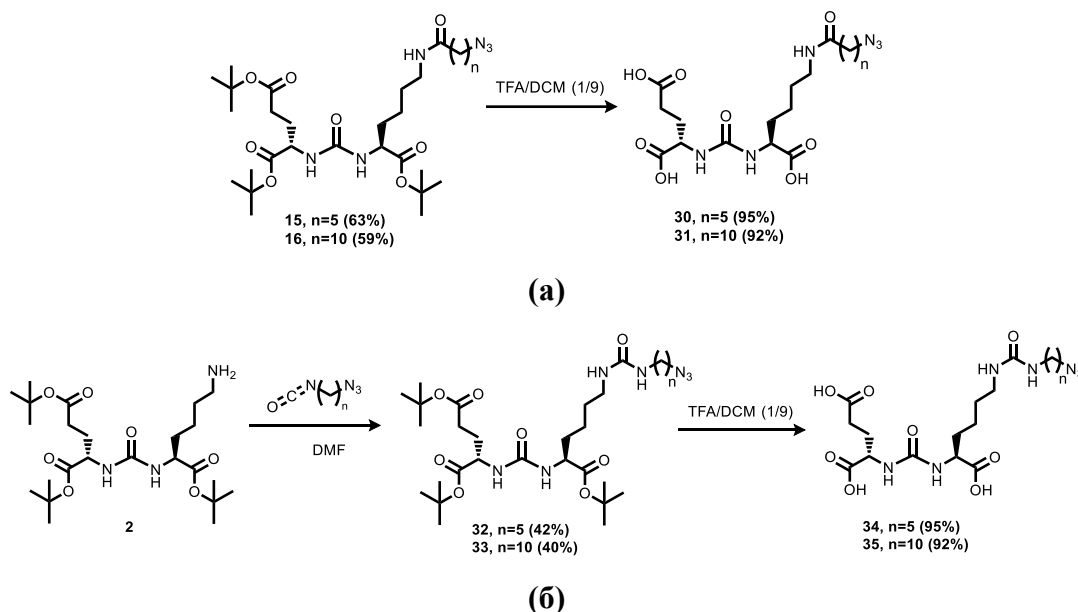


Схема 7

Известно, что дополнительная модификация атома азота амино-группы лизина ароматическим фрагментом, содержащим атом галогена, улучшает способность лиганда к связыванию с ПСМА за счет взаимодействия с гидрофобным карманом, расположенным у сайта связывания. Наилучшие результаты по связыванию были продемонстрированы лигандами, содержащими атом галогена в *para*-положении. В связи с этим, в качестве векторного фрагмента для получения конъюгатов с паклитакселом было решено синтезировать серию ПСМА лигандов – производных мочевины на основе глутаминовой кислоты и лизина, несущих *n*-замещенный бензильный фрагмент при ϵ -атоме азота.

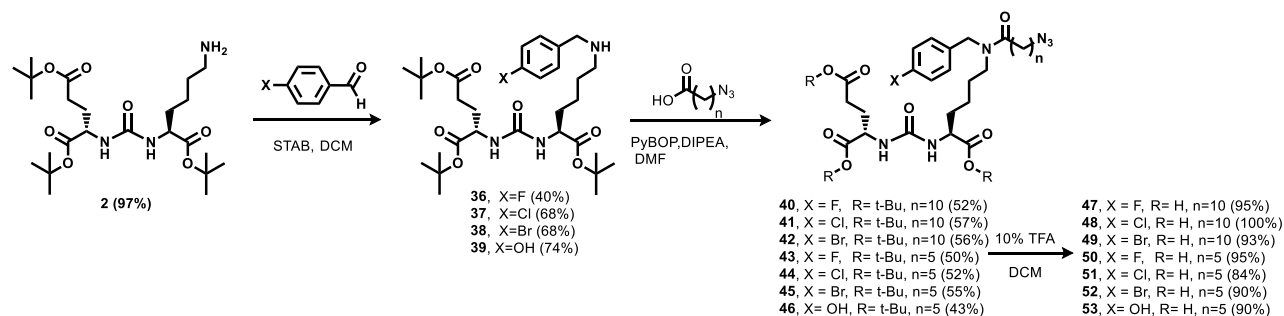


Схема 8

Для синтеза указанных производных **36-39** была использована реакция восстановительного аминирования *para*-замещенных бензальдегидов с соединением **2** в присутствии триацетоксиборогидрида натрия (STAB) в качестве восстановителя (Схема 8).

Для получения конъюгатов с противоопухолевым препаратом также была использована реакция азид-алкинового циклоприсоединения. Для этого была получена

серия азид-содержащих лигандов ПСМА **40-46** с использованием РуВОР в качестве реагента образования амидной связи (**Схема 8**).

Для анализа влияния положения ПСМА-лиганда на активность полученных конъюгатов нами были получены сложные эфиры с 5-гексиновой кислотой как в положении 2', так и в положении 7 (**Схемы 9-10**). В первом случае модифицированное производное паклитаксела получалось реакцией прямого ацилирования паклитаксела в присутствии диизопропилкарбодиимида (DIC) и каталитического количества 4-(N,N-диметиламино)пиридина (DMAP). Полученное соединение **53a** было охарактеризовано данными спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии высокого разрешения.

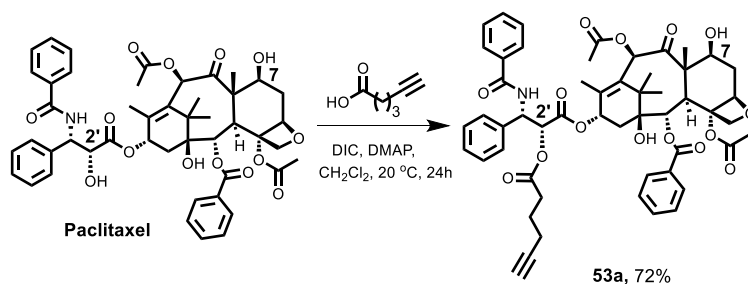


Схема 9

Для модификации положения 7-ОН была разработана синтетическая схема с введением *трет*-бутилдиметилсилильной (TBDMS) защитной группы (**54**), последующей реакцией ацилирования 7-ОН группы в стандартных условиях, в присутствии реагентов DIC и DMAP, с образованием соединения **55**. На заключительном этапе была удалена защитная группа TBDMS под действием *трет*-бутиламмоний фторида, в результате чего было получено соединение **56** (**Схема 10**).

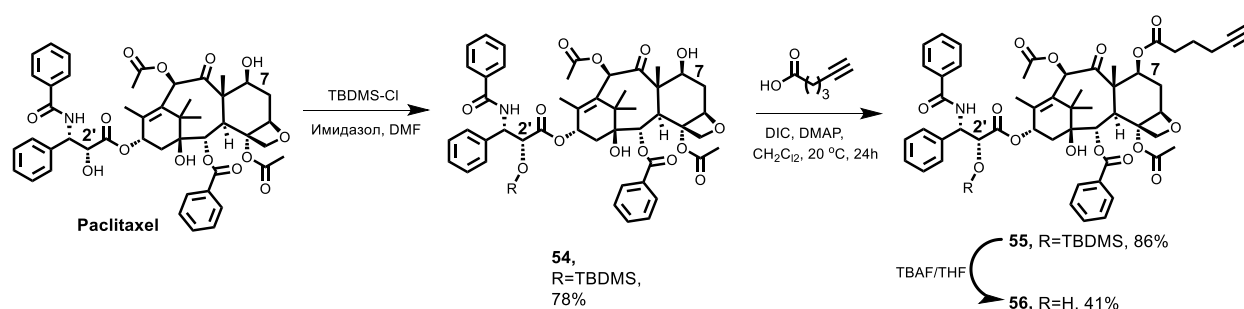


Схема 10

На первом этапе был произведен синтез двух конъюгатов **57** и **59** с использованием лиганда **31**, для установления оптимального для модификации положения паклитаксела. По результатам *in vitro* тестирований (**таблица 2**) было установлено, что конъюгат **57** обладает значительно менее выраженной токсичностью как на ПСМА-положительных, так и на ПСМА-отрицательных клеточных линиях, что свидетельствует о значительном влиянии вводимого структурного фрагмента ПСМА лиганда на активность

противоопухолевого препарата. По этой причине дальнейший синтез конъюгатов паклитаксела был осуществлен на примере 2'-замещенных производных.

В результате было получено 5 конъюгатов, содержащих алифатические линкеры как с амидным (57-59), так и с мочевиным (60-61) типом сочленения (Схема 11).

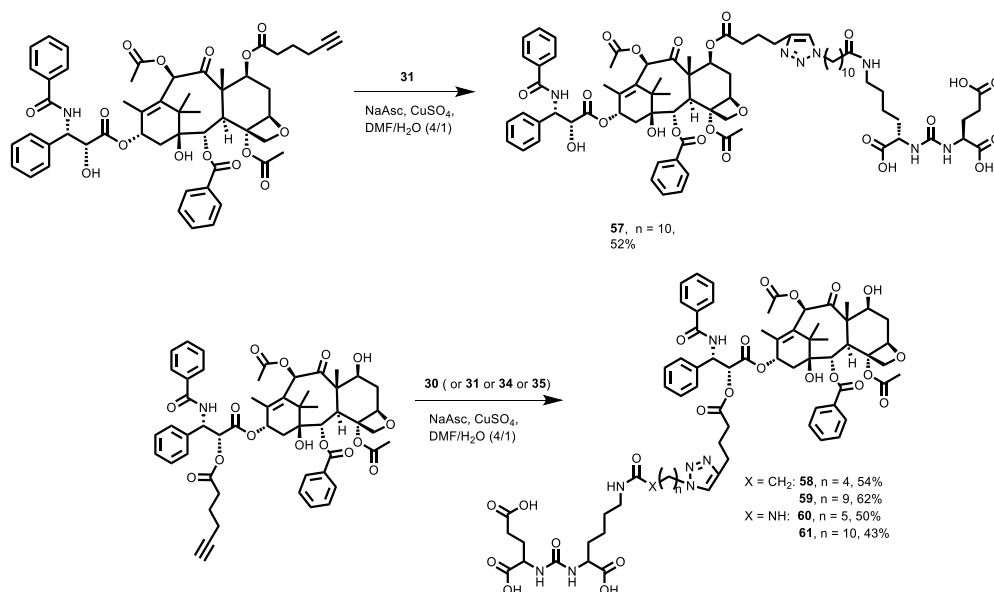


Схема 11

Аналогичный подход с использованием клик-реакции был использован для синтеза конъюгатов, содержащих ароматический фрагмент при ε-амино-группе лизина. По схеме 12 из лигандов 47-53, были получены соответствующие конъюгаты 62-68.

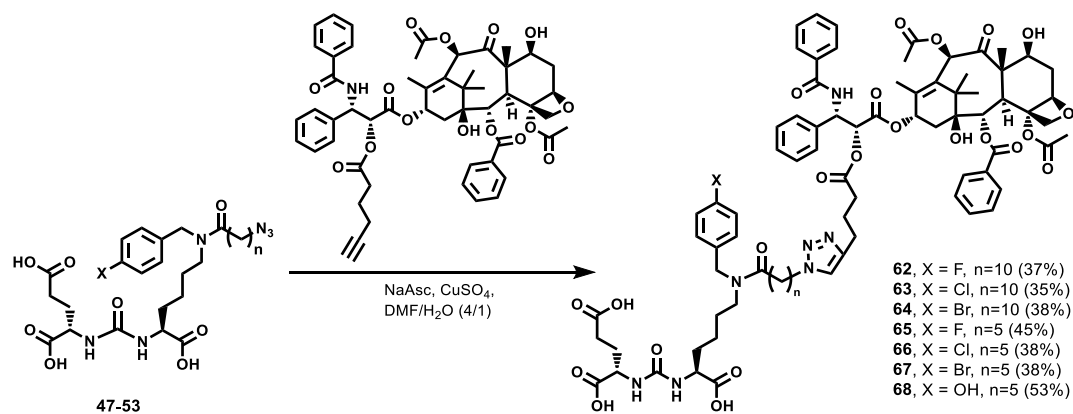


Схема 12

На заключительной стадии нами была исследована цитотоксичность конъюгатов паклитаксела 57-68 на клеточных линиях рака предстательной железы человека LNCaP (экспрессирующие ПСМА), 22Rv1 (экспрессирующие ПСМА) и PC-3 (не экспрессирующие ПСМА), а также легочных фибробластах VA-13 (неопухолевая

клеточная линия). Для оценки цитотоксичности использовали стандартный MTS-тест (таблица 2)[§].

Таблица 2. Результаты определения цитотоксичности CC_{50} для соединений **57-68** на клеточных линиях LNCaP, 22Rv1, PC-3 и VA-13.

№	Цитотоксичность (CC_{50}), нМ			
	LNCaP	22Rv1	PC-3	VA-13
57	980	2623	2874	900
58	53	119	92	43
59	39	96	78	47
60	12	34	25	12
61	58	131	74	71
62	452	1125	474	427
63	43	118	20	32
64	66	52	25	44
65	349	1285	720	361
66	1462	1637	1012	667
67	497	1096	860	288
68	42	60	89	27
Ptxl	1.3	3.9	2.6	2.2

Для дополнительного исследования эффективности конъюгатов паклитаксела, одно из полученных соединений было протестировано *in vivo* на ксенографтной мышинной модели рака предстательной железы 22Rv1. В качестве тестируемого конъюгата было выбрано соединение **58**, обладающее средними среди полученной серии конъюгатов значениями токсичности (CC_{50} (LNCaP)= 58 нМ, CC_{50} (PC-3)= 92 нМ) по данным *in vitro* тестирований.

Поданным *in vivo* тестирований было установлено, что показатель торможения роста опухоли (ТРО) при использовании конъюгата **58** и препарата паклитаксел (вводимых в эквивалентных мольных дозировках) оказался сопоставимым и составил ~30% относительно контрольной группы (Рисунок 3).

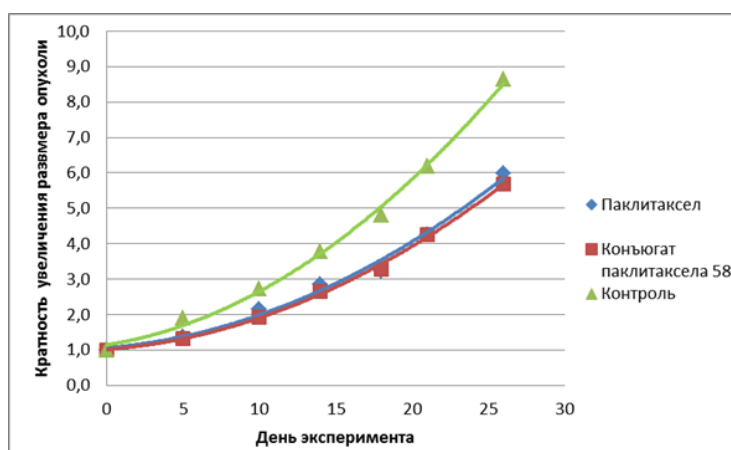


Рисунок 3. Увлечение размера опухоли на ксенографтной модели рака предстательной железы (22Rv1) с использованием паклитаксела 6 мг/кг (7 мкг/кг); конъюгата **58** 10 мг/кг (7 мкг/кг) и контрольной группы при введении 1% этанол в воде.

[§]Автор выражает благодарность к.х.н. Скворцову Дмитрию Александровичу за проведение *in vitro* исследований, а также Плотниковой Екатерине Александровне за проведение *in vivo* исследований

Конъюгаты хлорина еб.

Ранее в литературе были описаны конъюгаты фотосенсибилизаторов с лигандами ПСМА, например с меткой IRDye700dx, а также имелся пример создания конъюгата с хлорином еб, в котором лиганд для направленной доставки был введен только в 17³-положение хлорина. По этой причине для модификации хлорина еб были выбраны положения 15²- и 13¹-. Для синтеза были использованы соответствующие цинковые комплексы производных хлорина, содержащие в указанных положениях фрагмент пропаргиламина, для получения конъюгатов был использован подход на основе реакции медь-катализируемого [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения. (схема 13). В результате были получены конъюгаты **71** и **74**.

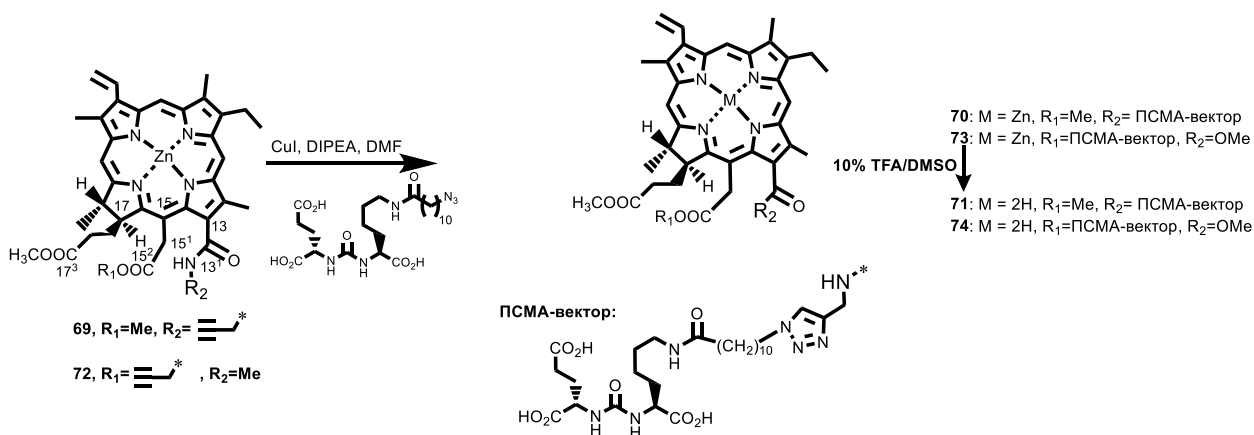


Схема 13

Фототоксичность полученных конъюгатов **71** и **74** была протестирована на двух клеточных линиях рака предстательной железы 22Rv1 и PC-3, после инкубирования в течение 0.5 - 6 часов. В качестве контрольного образца был использован радахлорин. Было показано, что все исследованные вещества обладают противоопухолевой активностью по отношению к клеточным линиям рака предстательной железы. Максимальная фотоактивность конъюгата **71** на ПСМА-положительной клеточной культуре 22Rv1 наблюдалась после инкубации в течении 6 часов и составила $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$, что превосходило его эффект на ПСМА-отрицательной клеточной линии PC-3 в 7 раз. Помимо этого, конъюгат **71** показал большую эффективность на клеточной линии 22Rv1, чем радахлорин ($\text{CC}_{50} = 3.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$). При этом конъюгат **74** в аналогичных тестах не показал значительного улучшения активности: значения CC_{50} оказались сопоставимыми на обеих клеточных линиях.

Конъюгаты производных доцетаксела и монометил ауристатина Е.

В предыдущих разделах настоящей работы были представлены лиганды, содержащие ароматический фрагмент при ϵ -амино-группе лизина, либо содержащие

дипептиды на основе ароматических аминокислот. Логичным продолжением данных исследований является объединение в структуре лиганда данных структурных фрагментов, и введение в его молекулу одновременно трёх ароматических группировок,

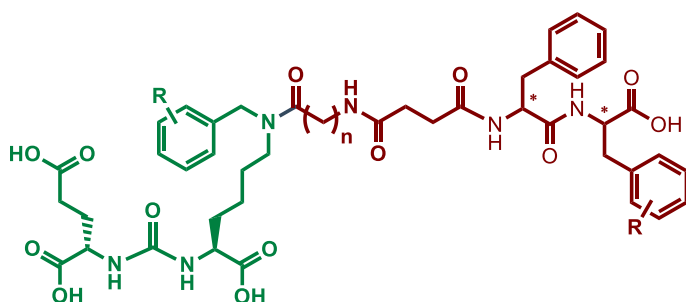


Рисунок 4. Общая структурная формула исследуемых структур.

что может оказать существенное влияние на аффинность получаемых ПСМА-лигандов. Для проверки целесообразности такого подхода было проведено предварительное *in silico* моделирование связывания** таких лигандов с ПСМА. Для этого было сгенерировано ~2,5 миллиона

виртуальных соединений (**рисунок 4**). По результатам докинга было спрогнозировано, что введение в ароматический фрагмент при ϵ -амино-группе лизина Br- и Cl-заместителей, а также OH- и NO₂-групп, может способствовать связыванию. Анализ моделирования на примере дизамещенных ароматических фрагментов показал, что наилучшие значения скорингов показали ароматические фрагменты, замещенные в *para*-/*ortho*- или *para*-/*meta*- положения. По результатам докинга было показано, что наибольшими значениями энергетического скоринга обладают структуры с длиной линкерной последовательности $n=3-6$ метиленовых звеньев. Таким образом, с учетом синтетической доступности соответствующих альдегидов для получения N-бензильных производных реакцией восстановительного аминирования, Cl-, OH-, F- и NO₂-замещенные производные можно отнести к наиболее перспективным.

Синтез лигандов ПСМА с тремя ароматическими фрагментами был осуществлен на базе ранее разработанных синтетических подходов. В качестве заместителей ароматической системы при ϵ -амино-группе лизина использовались как ранее реализованные структурные фрагменты **37** и **38**, содержащие *n*-Cl и *n*-Br заместители, так и новые производные со следующими заместителями: *m*-хлор (**76**), *m*-фтор-*n*-хлор (**77**), *o*-фтор-*n*-хлор (**78**) или с незамещенным ароматическим кольцом (**75**), изображенные на **схеме 14**. Дальнейшую реакцию получения аминов из соответствующих азидов (**44**, **45**, **80-83**) проводили с использованием реакции восстановления по Штаудингеру, что позволило получить серию производных **85-90**, гидрогенолиз соединения **79** проводили в стандартных условиях, с использованием водорода и 10% Pd/C в качестве катализатора.

** Автор выражает благодарность к.б.н. Иваненкову Яну Андреевичу и сотрудникам Лаборатории медицинской химии и биоинформатики МФТИ за проведение *in silico* скрининга

На основе серии полученных соединений **84-90**, а также дипептидных фрагментов на основе дипептидов ароматических аминокислот (L-Phe-L-Phe, D-Phe-D-Phe, L-Phe-L-Tyr, D-Phe-D-Tyr, D-Phe-D-Tyr(Br)), содержащих фрагмент 3-аминопропилазида, был осуществлен синтез трет-бутиловых производных лигандов ПСМА **105-125**. Для связывания полученных лигандов с ПСМА необходимо наличие в них немодифицированных карбоксильных групп. Превращение *трет*-бутиловых эфиров в карбоновые кислоты осуществлялось обработкой соединений **105-125** трифторуксусной кислотой в дихлорметане. В результате был получен ряд лигандов-ингибиторов ПСМА **126-146** (Схема 15). Структура полученных продуктов подтверждена данными ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

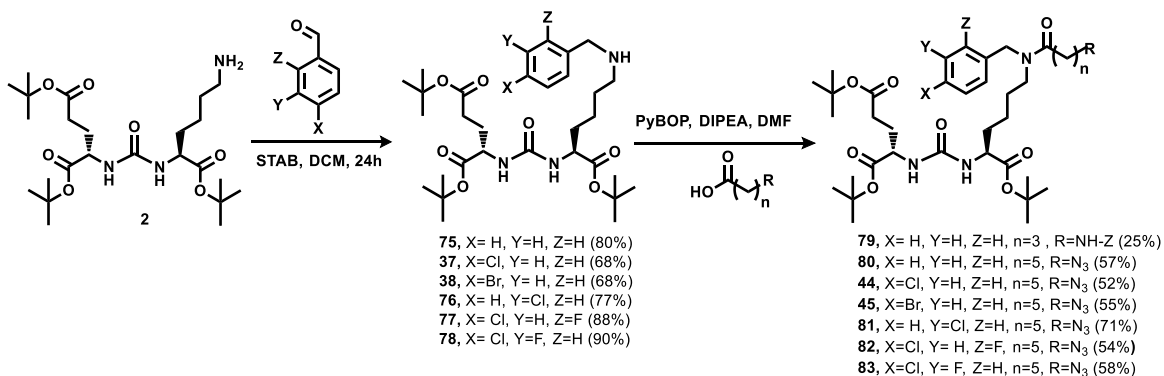


Схема 14

Таблица 3. Цитотоксичность (CC₅₀) на клеточных линиях Hek293T, VA-13, MCF7, A549.

№	CC ₅₀ , мкМ			
	Hek293T	VA13	MCF7	A549
126	>100	>100	>100	>100
127	114±51	>100	>100	>100
128	>100	>100	>100	>100
129	88±40	>100	>100	>100
132	>100	>100	>100	>100
137	>100	>100	>100	>100
142	>100	>100	>100	>100
143	71±18	>100	>100	>100
144	51±11	>100	>100	>100
145	>100	>100	>100	>100
DCL	>100	>100	>100	>100

Для ряда лигандов было показано, что данные молекулы не обладают выраженной токсичностью на клеточных линиях Hek293T (эмбриональные клетки почек человека), VA-13 (фибробласты легких), MCF7 (аденокарцинома груди), A549 (карцинома легких), значения пополу максимальной клеточной токсичности (CC₅₀) на данных клеточных культурах оказывается >50 мкМ (Таблица 3).

Далее было исследовано взаимодействие полученных лигандов **126-146** с ПСМА.

Изучалось ингибирование реакции расщепления N-ацетил-аспартил-глутамата под действием ПСМА. Целью данного исследования было установить аффинность полученных лигандов к ПСМА и выбрать из серии полученных соединений наиболее

перспективные для создания терапевтических конъюгатов на их основе. Наилучшие результаты показали три соединения: **127** (X=H, Y=H, Z=H, L-Phe-L-Phe, n = 5), **132** (X = Br, Y=H, Z=H, n=5, L-Phe-L-Tyr) и **138** (X=H, Y=Cl, Z=H, L-Phe-L-Tyr, n = 5). Значения IC₅₀ составили 47, 10 и 23 нМ соответственно (Таблица 4)^{††}.

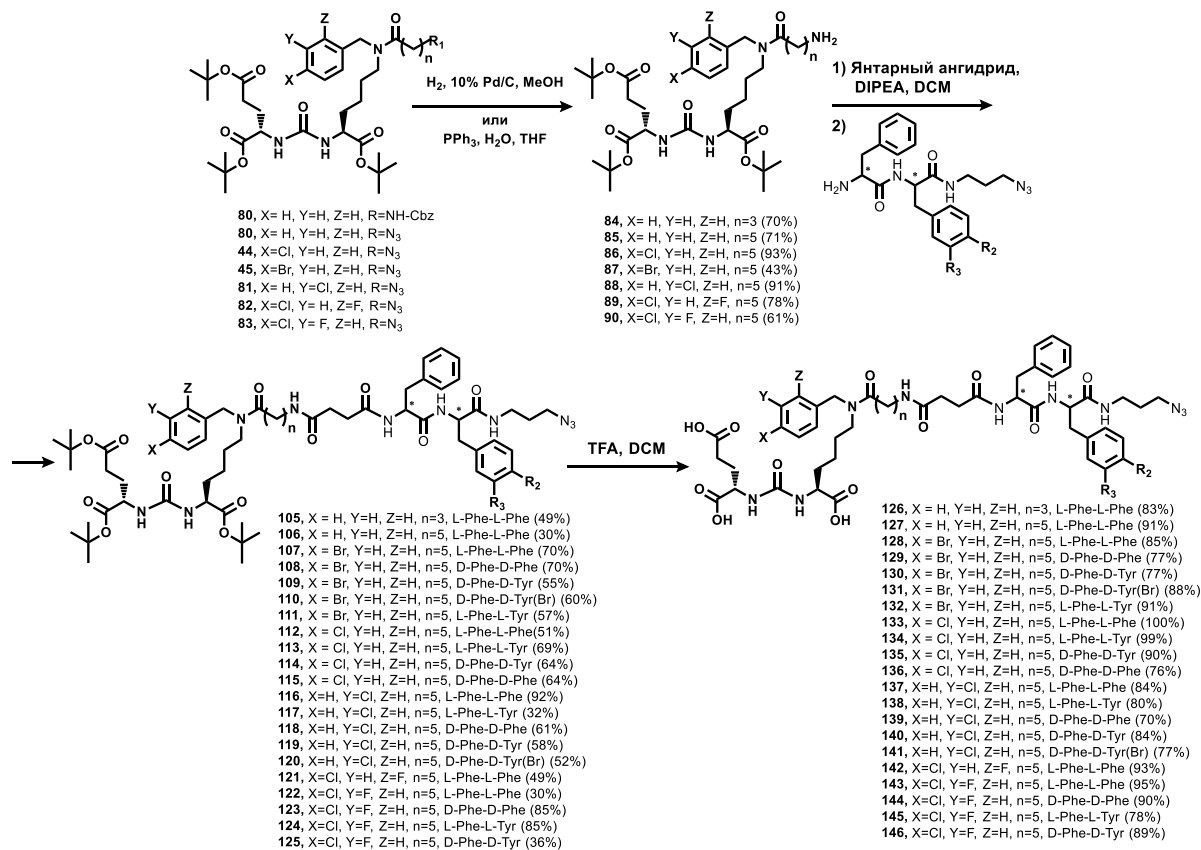


Схема 15

В качестве реакции, позволяющей получить конъюгат из азидного (вектор с линкером) и алкинового (терапевтический) фрагментов была выбрана 1,3-диполярного циклоприсоединения, катализируемая солями меди(I). Для получения конъюгатов доцетаксела были использованы лиганды ПСМА **127**, **140** и **138**, содержащие азидо-группу, и модифицированные лекарственные препараты: доцетаксел **147** и монометил ауристатин Е **151** (Схема 16).

На заключительной стадии работы была исследована цитотоксичность терапевтических конъюгатов **152-155** на клеточных линиях рака предстательной железы человека 22Rv1 (экспрессирующие ПСМА) и PC-3 (не экспрессирующие ПСМА). Для оценки цитотоксичности использовали стандартный MTS-тест⁷⁹. Результаты представлены в таблице 5.

^{††} Автор выражает благодарность к.х.н. Скворцову Дмитрию Александровичу за проведение *in vitro* исследований

Таблица 4. Концентрации полуингибирования (IC₅₀, нМ) реакции расщепления NAAG под действием ПСМА (ГСРП)

Соединение	IC ₅₀ , нМ
126	91 ± 43
127	47 ± 14
128	81 ± 11
129	400 ± 54
130	333 ± 128
131	8029 ± 6824
132	9,7 ± 2,8
133	91 ± 27
134	146 ± 58
135	66 ± 18
136	384 ± 153
137	86 ± 24
138	22 ± 6
139	58 ± 16
140	820 ± 448
141	267 ± 152
142	124 ± 33
143	50 ± 15
144	234 ± 48
145	75 ± 14
146	130 ± 39
DCL	2149±223

Таблица 5. Результаты определения параметра токсичности CC₅₀ для соединений 152-155 на клеточных линиях 22Rv1 и РС-3.

Соединение	CC ₅₀ , нМ	
	22Rv1 (ПСМА«+»)	РС-3 (ПСМА«-»)
Доцетаксел	1,0± 0,5	1,0± 0,3
152	123±18	63±13
153	28±4	51±23
153	2,7±2,1	2,8±0,7
ММАЕ	14± 1	19± 1
155	13±3	20±3

В результате проведенных исследований установлено, что среди полученных конъюгатов соединение **154**, содержащее *мета*-хлорбензильный фрагмент и дипептидный линкер L-Phe-L-Tyr, обладает наибольшей цитотоксичностью (2,7 нМ для 22Rv1 ПСМА

«+» и 2,8 нМ для РС-3 ПСМА «-»). Наибольшая селективность наблюдается для соединения **153**, содержащее *пара*-хлор-*мета*-фторбензильный фрагмент и дипептидный линкер D-Phe-D-Tyr (28 нМ для 22Rv1 ПСМА «+» и 51 нМ для РС-3 ПСМА «-»). В этом случае конъюгат показывает хорошую селективность по

сравнению с немодифицированным доцетакселом (1 нМ для 22Rv1 ПСМА «+» и 1 нМ для РС-3 ПСМА «-»). Соединение **152**, содержащее незамещенный бензильный фрагмент и дипептидный линкер L-Phe-L-Tyr, не показало ни высокой токсичности, ни хорошей селективности (123 нМ для 22Rv1 ПСМА «+» и 63 нМ для РС-3 ПСМА «-»).

Также было показано, что впервые полученный низкомолекулярный конъюгат на основе монометилауристатина E **155**, содержащий *мета*-хлорбензильный фрагмент и дипептидный линкер L-Phe-L-Tyr, обладает высокой цитотоксичностью (13 нМ для 22Rv1 ПСМА «+» и 20 нМ для РС-3 ПСМА «-»), сопоставимой с немодифицированным препаратом, что доказывает перспективность создания подобных конъюгатов.

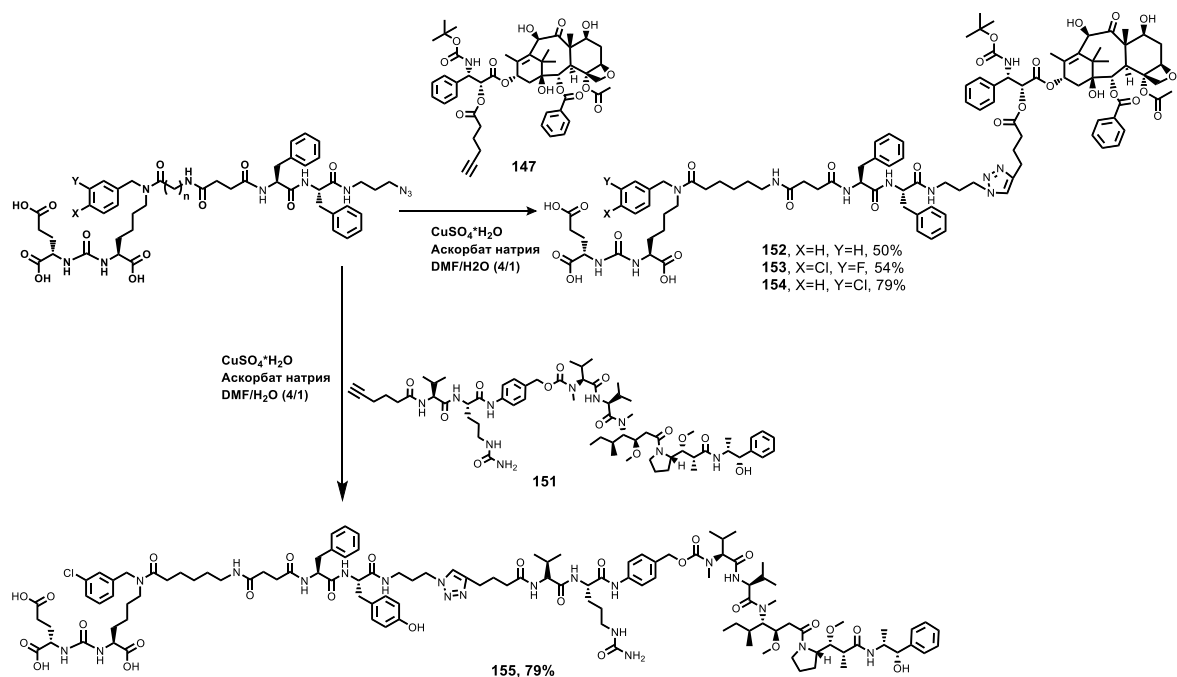


Схема 16

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны и впервые синтезированы новые высокоселективные лиганды простатического специфического мембранного антигена, а также разработаны способы получения низкомолекулярных конъюгатов с противоопухолевыми препаратами на их основе.
2. Предложен синтетический подход к конъюгатам доксорубина с лигандами ПСМА на основе гидролитически лабильных гидразон содержащих линкеров. Продемонстрирована их высокая цитотоксичность, благодаря высвобождению свободного доксорубина.
3. Разработан метод синтеза азидсодержащих лигандов ПСМА для создания конъюгатов с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Получено 12 новых лигандов ПСМА, а также 12 конъюгатов паклитаксела на их основе.
4. На примере одного из полученных конъюгатов паклитаксела показано, что введение адресного фрагмента на основе лиганда ПСМА не влечет за собой снижения противоопухолевой активности *in vivo*.
5. Впервые получены конъюгаты лиганда ПСМА и фотосенсибилизатора хлорина еб, замещенного в положения 13¹ и 15² макроциклической системы. Продемонстрировано увеличение токсического эффекта конъюгата, замещенного в положение 13¹, по сравнению с контрольным препаратом Радахлорином, а также увеличение селективности его действия к ПСМА-экспрессирующей клеточной линии.

6. Получен 21 новый лиганд ПСМА, содержащий в линкере три ароматических структурных фрагмента. Проведено исследование их аффинности к ПСМА, продемонстрировано повышенное связывание с белковой мишенью по сравнению со стандартным лигандом на основе производного глутаминовой кислоты и лизина (DCL).
7. На основе отобранных, по данным исследования аффинности, лигандов-лидеров впервые получен их низкомолекулярный конъюгат на основе монометил ауристатина Е, а также 3 конъюгата с доцетакселом. Для лучшего по результатам *in vitro* тестирования конъюгата доцетаксела показана его высокая эффективность в терапии ксенорафтной опухоли предстательной железы. По результатам доклинических исследований данного конъюгата показано снижение среднесмертельной дозы конъюгата по сравнению с доцетакселом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Machulkin A.E.**, Ivanenkov Y.A., Aladinskaya A.V., Veselov M.S., Aladinskiy V.A., Beloglazkina E.K., Koteliansky V.E., Shakhbazyan A.G., Sandulenko Y.B., Majouga A.G. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. *Journal of Drug Targeting*, 2016; 24(8):679-93. Impact Factor = 3.408.
2. Suvorov N.V., **Machulkin A.E.**, Ivanova A.V., Popkov A.M., Bondareva E.A., Plotnikova E.A., Yakubovskaya R.I., Majouga A.G., Mironov A.F., Grin M.A. Synthesis of PSMA-targeted ¹³ - and ¹⁵ -substituted chlorin e6 derivatives and their biological properties. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2018; 22(11). Impact Factor = 1.217 .
3. Ivanenkov Y.A., **Machulkin A.E.**, Garanina A.S., Skvortsov D.A., Uspenskaya A.A., Deyneka E.V., Trofimenko A.V., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Koteliansky V.E., Bezrukov D.S., Aladinskaya A.V., Vorobyev N.S., Puchinina M.M., Riabykh G.K., Sofronova A.A., Malyshev A.S., Majouga A.G. Synthesis and biological evaluation of Doxorubicin-containing conjugate targeting PSMA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2019; 29(10):1246-1255. Impact Factor = 2.442.
4. Грин М.А., Суворов Н.В., **Мачулкин А.Э.**, Плотникова Е.А., Якубовская Р.И., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Филоненко Е.В. Фотосенсибилизатор для лечения рака предстательной железы и способ его получения. Патент № 2670087, 2018.
5. Успенская А.А., **Мачулкин А.Э.** Синтез конъюгатов на основе лигандов ПСМА с антимитотическими препаратами. XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2018". *Сборник тезисов докладов*. Москва, Россия, 9 – 13 апреля 2018.
6. **Machulkin A.E.**, Ber A.P., Skvotvortsov D.A., Plotnikova E.A., Yakubovskaya R.I., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Koteliansky V.E., Majouga A.G. Synthesis and biological evaluation of novel small-molecule psma-targeted paclitaxel conjugates. EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. *Book of abstracts*. Ljubljana, Slovenia, September 2-6, 2018. – P. 322.
7. **Мачулкин А.Э.** Синтез конъюгатов-ингибиторов ПСМА для терапии рака предстательной железы и их биологическое тестирование. XXIV Международная научная

конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017". *Сборник тезисов докладов*. Москва, Россия, 10 – 14 апреля 2017.

8. **Мачулкин А.Э.**, Гаранина А.С., Киреев И.И., Алиева И.Б., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Синтез конъюгатов лигандов простатического специфического мембранного антигена с доксорубицином для терапии рака предстательной железы и их биологическое тестирование. XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». *Сборник тезисов докладов*. Москва, Россия, 16-17 марта 2017. 2017. Т. 16. № Спецвыпуск. – С. 51–51.

9. Мачулкин А.Э., Гаранина А.С., Киреев И.И., Алиева И.Б., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Синтез конъюгатов – ингибиторов простатического специфического мембранного антигена с доксорубицином для терапии рака предстательной железы. XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». *Сборник тезисов докладов*. Москва, Россия, 17-18 марта 2016. 2016. Т. 15. № 1. – С. 64–64.

10. **Мачулкин А.Э.**, Бер А.П., Воробьева Н.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Синтез конъюгатов-ингибиторов ПСМА для терапии рака предстательной железы. WSOC. Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней. *Сборник тезисов докладов*. Красновидово, Россия, 13-18 января 2017. – С. 172.

11. **Machulkin A.E.**, Garanina A., Alieva I., Kireev I., Koteliansky V., Kucherov F., Beloglazkina E., Majouga A., Zyk N. Synthesis and biological evaluation of novel small-molecule PSMA-targeted conjugates for prostate cancer treatment. EFMC-ISMIC 2016 XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. *Book of abstracts*. Манчестер, Великобритания, 28 августа - 1 сентября 2016. – С. 145.

12. **Мачулкин А.Э.**, Гаранина А.С., Киреев И.И., Алиева И.Б., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Котелянский В.Э., Мажуга А.Г. Создание конъюгатов-ингибиторов ПСМА для терапии рака предстательной железы. 2-я Зимняя конференция молодых ученых по органической химии WSOC-2016. *Сборник тезисов докладов*. Красновидово, Россия, 16-21 января 2016. – С.168

13. **Мачулкин А.Э.**, Воробьева Н.С., Ковалев С.В., Мажуга А.Г., Бер А.П., Белоглазкина Е.К., Котелянский В.Э. Синтез и биологические испытания конъюгатов паклитаксела для терапии рака предстательной железы. II Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, Москва, Россия, 6-8 декабря 2016. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016. Т. 3. № 4. – С. 75–75.

14. Machulkin A.E., Gerasimov V.M., Abakumov M.A., Savchenko A.G., Majouga A.G. Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of magnetite-gold dumbbell nanoparticles for prostate cancer MRI imaging. International Baltic conference on magnetism 2015. *Сборник тезисов докладов*. Светлогорск, Россия, 30 августа - 3 сентября 2015. – С.68

15. **Мачулкин А.Э.** Создание конъюгатов-ингибиторов PSMA для терапии рака предстательной железы. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2015". *Сборник тезисов докладов*. Москва, Россия, 13 – 17 апреля 2015.