

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Зык Николай Юрьевич

**Синтез двойных конъюгатов терапевтических препаратов с
лигандами простатического специфического мембранного
антигена**

1.4.3. Органическая химия

1.4.16. Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре органической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: **Мачулкин Алексей Эдуардович**

кандидат химических наук

Белоглазкина Елена Кимовна

доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Кочетков Константин Александрович**

доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), отдел элементоорганических соединений, лаборатория гомолитических реакций элементоорганических соединений (ЛПРЭОС) № 128, заведующий лабораторией

Бутов Геннадий Михайлович

доктор химических наук, профессор, Волжский политехнический институт, филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический университет», заместитель директора по научно-исследовательской работе, заведующий кафедрой «Химия, технология и оборудование химических производств»

Зефирова Ольга Николаевна

доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», химический факультет, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, лаборатория медицинской химии, профессор

Защита диссертации состоится «29» октября 2025 г. в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.1 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: maloshitskaya@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д.27 и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3534>

Автореферат разослан «__» ____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.014.1

кандидат химических наук

Малошицкая О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым онкологическим заболеванием среди мужчин по количеству диагностируемых случаев. Существующие на данный момент методы терапии этого заболевания обладают целым рядом серьёзных побочных эффектов, таких как: ухудшение функций мочеиспускательной и кишечной систем, возможность развития эректильной дисфункции, потеря волос, аллергические реакции, повышение риска инфекционных заболеваний, кровотечения, диабета, переломов и сердечно-сосудистых заболеваний. Потенциальным решением данной проблемы может служить создание препаратов, направленно доставляющих терапевтические агенты непосредственно в опухолевую ткань. В случае РПЖ одной из наиболее перспективных мишеней является простатический специфический мембранный антиген (ПСМА). Использование направленных на ПСМА терапевтических конъюгатов может позволить значительно снизить побочные эффекты химиотерапии за счёт снижения дозировки действующего препарата. Механизм действия подобных направленных соединений основан на селективном взаимодействии синтетического лиганда с рецептором, гиперэкспрессируемым на поверхности клеток рака предстательной железы и его метастазов (мРПЖ), и последующем высвобождении терапевтического агента. Ещё одним перспективным подходом в современных методах терапии и диагностики онкологических заболеваний является использование комбинации различных препаратов для достижения синергетического эффекта между агентами различной природы. Таким образом, разработка эффективных методов получения направленных на ПСМА конъюгатов, имеющих в составе комбинации двух различных терапевтических агентов, является актуальным направлением научных исследований.

Степень разработанности темы. На данный момент в литературе представлен ряд лигандов, способных селективно связываться с простатическим специфическим мембранным антигеном, среди которых самыми перспективными считаются производные мочевины (DUPA и DCL). Лиганд DCL (((S)-5-амино-1-карбоксипентил)карбамоил)-L-глутаминовая кислота) получил наибольшее распространение в качестве основы для более сложных лигандов ПСМА, и на его базе разработано несколько конъюгатов, одобренных для использования в клинической практике. Общая структура подобных конъюгатов включает мочевины DCL в качестве ПСМА-вектора, соединённую с терапевтическим или диагностическим фрагментом с помощью линкера, который дополнительно увеличивает аффинность к мишени. На данный момент наиболее полно рассмотрено влияние на аффинность к мишени бензильных фрагментов в составе лиганда, содержащих атом

галогена в ароматическом кольце, в то время как влияние заместителей другой природы систематически не исследовано.

В литературе описаны отдельные примеры направленных на ПСМА низкомолекулярных конъюгатов для совместной доставки двух различных функциональных фрагментов, однако это почти исключительно тераностические и диагностические конъюгаты. Системы совместной доставки комбинации терапевтических агентов представлены высокомолекулярными платформами, которые в сравнении с низкомолекулярными конъюгатами обладают рядом недостатков: низкой воспроизводимостью синтеза и более высокой вероятностью возникновения иммунного ответа.

Цель работы состояла в разработке методов синтеза и тестировании ингибирующей и противоопухолевой активности новых лигандов простатического специфического мембранного антигена и бимодальных терапевтических конъюгатов на их основе.

Задачи работы состояли в 1) разработке подходов к получению новых лигандов простатического специфического мембранного антигена на основе мочевины DCL с различными заместителями при ϵ -аминогруппе лизина и последующем *in vitro* исследовании ингибирующей активности полученных соединений; 2) создании новых альтернативных подходов к синтезу соединений-предшественников лигандов ПСМА с концевой аминогруппой как точкой последующего конъюгирования; 3) разработке методов получения лигандов ПСМА, пригодных к созданию на их основе бимодальных конъюгатов и исследовании их ингибирующей активности *in vitro*; 4) разработке, оптимизации и реализации синтеза бимодальных конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами, обладающими различными механизмами действия (монометил ауристатин Е, доцетаксел, абиратерон, энзалутамид и испинесиб); 5) исследовании цитотоксической активности синтезированных бимодальных конъюгатов *in vitro* на клеточных линиях РПЖ с различным уровнем экспрессии ПСМА; 6) исследовании противоопухолевой активности синтезированных бимодальных конъюгатов *in vivo* на ксенографтных моделях РПЖ.

Объекты и предмет исследования. В качестве объектов исследования были выбраны лиганды простатического специфического мембранного антигена на основе мочевины DCL, а также конъюгаты с терапевтическими агентами на их основе. Предметом исследования являлись методы получения этих соединений и их биологическая активность.

Научная новизна. Впервые осуществлён синтез двенадцати новых лигандов ПСМА с варьируемыми функциональными группами при ϵ -аминогруппе лизина и проведены исследования их ингибирующей активности. Разработан и реализован на практике новый подход к получению защищённых соединений-предшественников лигандов ПСМА с концевой аминогруппой, основанный на иммобилизации остатка 1,3-диаминопропана на твердофазном носителе. Осуществлён синтез четырёх ранее не описанных лигандов ПСМА, пригодных для создания на их основе бимодальных конъюгатов, их ингибирующая активность оценена *in vitro*. Синтезировано десять ранее не описанных бимодальных конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами, обладающими различными механизмами действия. При получении данных соединений впервые осуществлён синтез модифицированных форм ряда терапевтических агентов. Проведены исследования противоопухолевой активности полученных соединений *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе синтезированы лиганды ПСМА на основе мочевины DCL с заместителями различной природы в бензильном фрагменте при ϵ -аминогруппе лизина и выявлен ряд закономерностей в соотношении структура – ингибирующая активность для этих соединений. Разработан новый подход твердофазного синтеза соединений-предшественников лигандов ПСМА с концевой аминогруппой. Разработаны подходы к получению лигандов ПСМА, пригодных к созданию на их основе бимодальных конъюгатов, и оценено влияние дополнительного аминокислотного остатка (лизина) на ингибирующую активность полученных соединений. Предложены способы модификации терапевтических агентов для последующего конъюгирования с лигандами ПСМА. Предложены стратегии синтеза бимодальных терапевтических конъюгатов ПСМА с различными терапевтическими агентами. Исследована цитотоксическая и противоопухолевая активность синтезированных конъюгатов и выявлена зависимость противоопухолевой активности от уровня экспрессии ПСМА.

Методология диссертационного исследования включала предварительный анализ литературы, планирование и проведение экспериментов, оптимизацию условий разработанных реакций, изучение применимости оптимизированных условий к субстратам и реагентам различного строения, анализ полученных результатов и их обобщение, формулирование выводов. Строение синтезированных соединений определяли с использованием спектromетрии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C , а также масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-HRMS). Чистоту полученных соединений оценивали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим

детектированием (ВЭЖХ-МС). Биологическую активность оценивали в исследованиях эффективности ингибирования ПСМА или цитотоксичности *in vitro*, а также противоопухолевой эффективности *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Лиганды на основе мочевины DCL с различными заместителями в бензильном фрагменте при ϵ -аминогруппе лизина, способные ингибировать активность ПСМА, могут быть получены методом жидкофазного пептидного синтеза;
- 2) Синтез соединений-предшественников лигандов ПСМА может быть осуществлён за счёт иммобилизации 1,3-диаминопропана на 2-хлортритил хлоридной смоле и последующего твердофазного пептидного синтеза;
- 3) Синтез лигандов на основе мочевины DCL, способных ингибировать ПСМА и пригодных к созданию на их основе бимодальных конъюгатов, может быть осуществлён с использованием комбинации твердофазного подхода и синтеза в растворе;
- 4) Бимодальные конъюгаты с двумя терапевтическими агентами могут быть получены последовательным присоединением к лиганду ПСМА соответствующих функциональных фрагментов за счёт реакций [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения и ацилирования;
- 5) Синтезированные конъюгаты лигандов ПСМА с парами препаратов доцетаксел/абиратерон, ММАЕ/абиратерон, ММАЕ/энзалутамид, ММАЕ/испинесиб демонстрируют селективность и цитотоксичность в отношении ПСМА положительных клеточных линий *in vitro*;
- 6) Полученные бимодальные конъюгаты лигандов ПСМА с парами терапевтических агентов ММАЕ/абиратерон и ММАЕ/энзалутамид демонстрируют противоопухолевую активность и селективность *in vivo* на ксенографтных моделях РПЖ.

Степень достоверности полученных результатов определяется высоким уровнем экспериментальных исследований, который подтверждается воспроизводимостью результатов, использованием современных спектроскопических и спектрометрических методов анализа, сопоставлением полученных результатов с данными из литературы, публикацией полученных результатов в ведущих рецензируемых периодических изданиях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ: 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.4.3 – Органическая химия, 1.4.16 – Медицинская химия.

Апробация работы. Основные результаты были представлены в виде 3 устных и 1 стендового докладов на всероссийских и международных научных конференциях: Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2021, 2023, 2024); Всероссийской научной конференции “Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней” (Лоо, Сочи, Россия, 16-21 сентября 2022).

Личный вклад автора заключался в анализе литературных данных по теме исследования, выполнении синтетических экспериментов, анализе данных физико-химических и биологических исследований, представлении полученных результатов в виде докладов на научных конференциях, участии в анализе, обобщении и обсуждении полученных результатов, формулировании положений и выводов, подготовке публикации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 250 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка используемых сокращений, а также списка литературы из 175 наименований. Работа содержит 130 рисунков и 26 таблиц.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (Грант № 20-33-70089\20) и Российского Научного Фонда (Грант № 24-23-00156).

*Автор выражает признательность к.х.н. Скворцову Д.А., к.х.н. Шафикову Р.Р., Колчановой А.Ю., к.б.н. Гараниной А.С., д.м.н. Покровскому В.С. за проведение *in vitro* исследований ингибирующей активности и цитотоксичности, к.б.н. Панкратову А.А., к.б.н. Плотниковой Е.А. за проведение *in vivo* исследований противоопухолевой активности, к.х.н. Вацуро И.М. за помощь в регистрации спектров ЯМР ^{13}C , д.х.н. Польшакову В.И. за проведение ЯМР экспериментов.*

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты диссертационной работы представлены в трёх разделах.¹ В первом разделе рассмотрен синтез и *in vitro* исследования новых ингибиторов ПСМА, содержащих заместители различной природы в бензильном фрагменте при ϵ -аминогруппе лизина. Второй раздел посвящен новому методу создания лигандов ПСМА с аминогруппой как точкой последующей модификации терапевтическим или диагностическим агентом. В третьем разделе рассмотрены подходы к синтезу направленных на ПСМА систем совместной доставки. В нём описаны разработка подходов к синтезу лигандов ПСМА, пригодных для создания бимодальных конъюгатов;

¹Нумерация соединений в тексте автореферата совпадает с нумерацией соединений в тексте диссертации.

синтез и *in vitro* исследования бимодального конъюгата с монометил ауристатином Е и испинесибом; синтез серии бимодальных конъюгатов с ингибиторами тубулина и абиратероном/энзалутамидом и исследования их биологической активности.

Синтез и *in vitro* исследования новых ингибиторов ПСМА

Лиганд DCL – мочевиное производное глутаминовой кислоты и лизина – способен селективно связываться с активным сайтом ПСМА и был выбран в качестве основы для синтезированных в рамках работы соединений. Полученные лиганды (Рисунок 1) содержат замещённый бензильный фрагмент при ε -аминогруппе лизина мочевины, линкер, состоящий из алифатического и дипептидного участков, и концевую азидогруппу, как точку последующей модификации диагностическим или терапевтическим агентом (то есть, отвечающую за последующее конъюгирование).

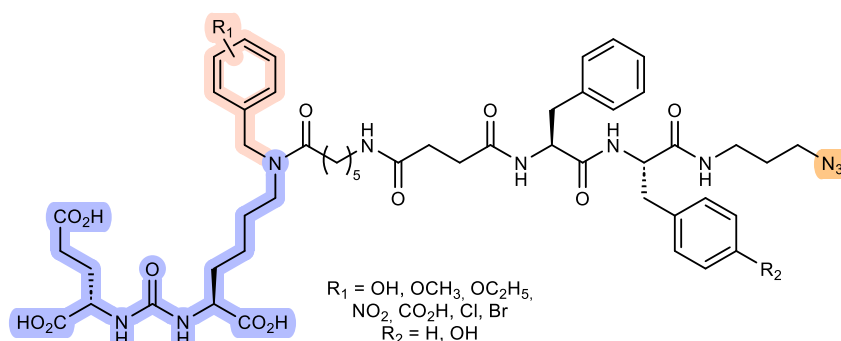


Рисунок 1. Общая структура синтезируемых лигандов ПСМА. Цветом выделены: вектор-фрагмент мочевины DCL (отвечает за направленность доставки) – фиолетовый; замещённый бензильный фрагмент – розовый; азидогруппа – оранжевый.

На первом этапе работы варьировались заместители в бензильном фрагменте при ε -аминогруппе лизина мочевины DCL.

Для получения целевых лигандов первоначально соединяли векторный фрагмент мочевины DCL с алифатическим участком линкера, отвечающим за необходимое удаление терапевтической или диагностической нагрузки от сайта связывания. После этого вводили полученные производные в реакции с дипептидным фрагментом линкера, синтезируемым отдельно. Дипептидный фрагмент, содержащий остатки фенилаланина или тирозина, позволяет добиться дополнительного увеличения ингибирующей активности синтезируемых лигандов за счёт взаимодействий с гидрофобными карманами в структуре белка.

Для введения бензильного фрагмента к концевой аминогруппе три-*трет*-бутил защищённой мочевины DCL **3** использовали реакцию восстановительного аминирования соответствующего бензальдегида (Рисунок 2). Полученные вторичные амины **4a-m** далее ацилировали 6-азидогексановой кислотой в присутствии РувОР и ДИПЭА с получением азидов **5a-m**.

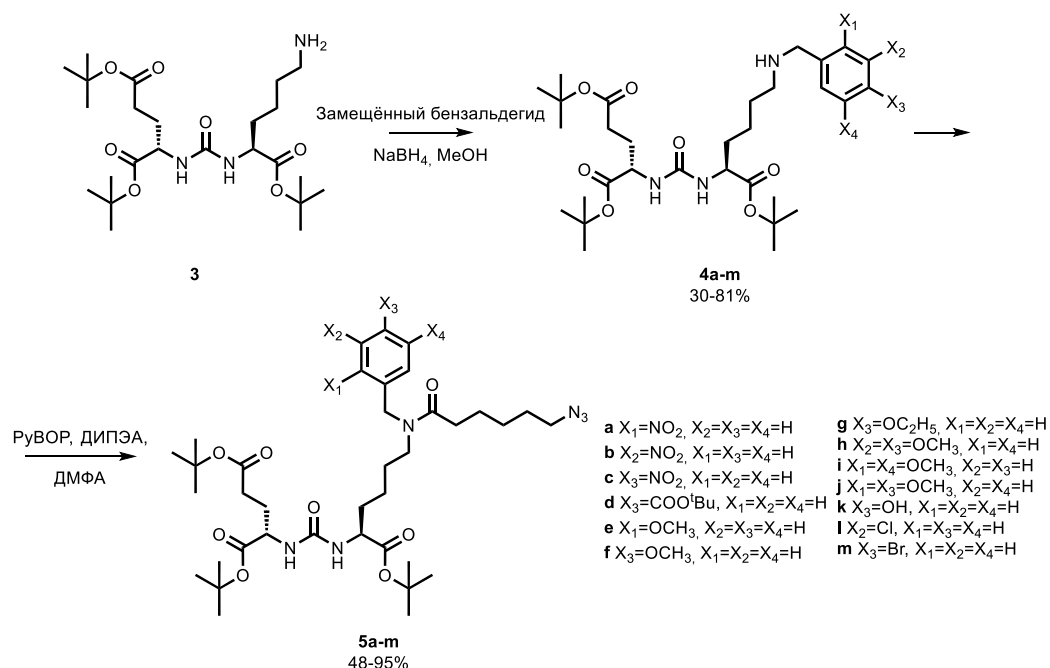


Рисунок 2. Схема синтеза азидов **5a-m**.

Терминальную азидогруппу соединений **5** далее восстанавливали по Штаудингеру с использованием трифенилфосфина (Рисунок 3). Полученные амины **6a-m** ацилировали янтарным ангидридом с получением кислот **7a-m**.

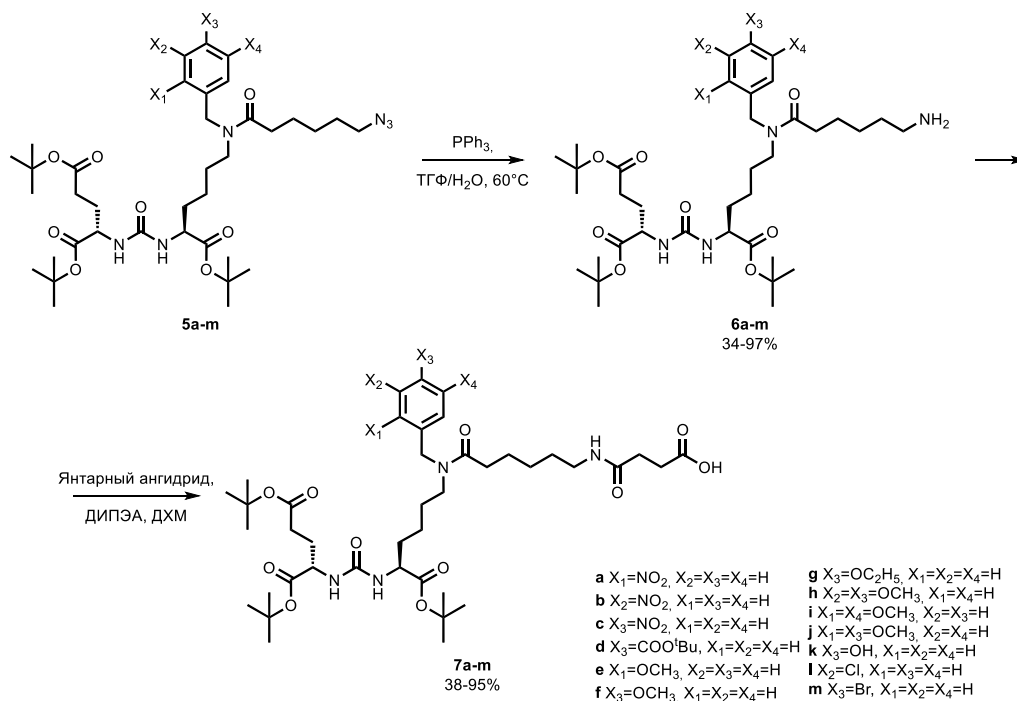


Рисунок 3. Схема получения производных янтарного ангидрида **7a-m**.

В качестве дипептидного фрагмента линкеров целевых лигандов ПСМА (Рисунок 1) использовались последовательности *L*-Phe-*L*-Phe и *L*-Phe-*L*-Tyr. Для сборки дипептидного участка линкера был выбран классический подход синтеза в растворе с

использованием Вос-стратегии; структуры полученных в результате соединений **11a-b** представлены на Рисунке 4.

На заключительной стадии синтеза лигандов ПСМА модифицированные пептиды **11a-b** вводили в реакции ацилирования кислотами **7a-m** с образованием защищённых лигандов **12a-k**, содержащих два фрагмента фенилаланина в линкере и **13a-b**, содержащих остаток тирозина (Рисунок 4). После этого соединения **12** и **13** подверглись удалению кислотно-лабильных защитных групп с получением целевых лигандов **14a-k** и **15a-b**. Следует отметить, что выделить лиганд **14j**, содержащий метокси-группы в *орто*- и *пара*-положениях бензильного фрагмента, не удалось.

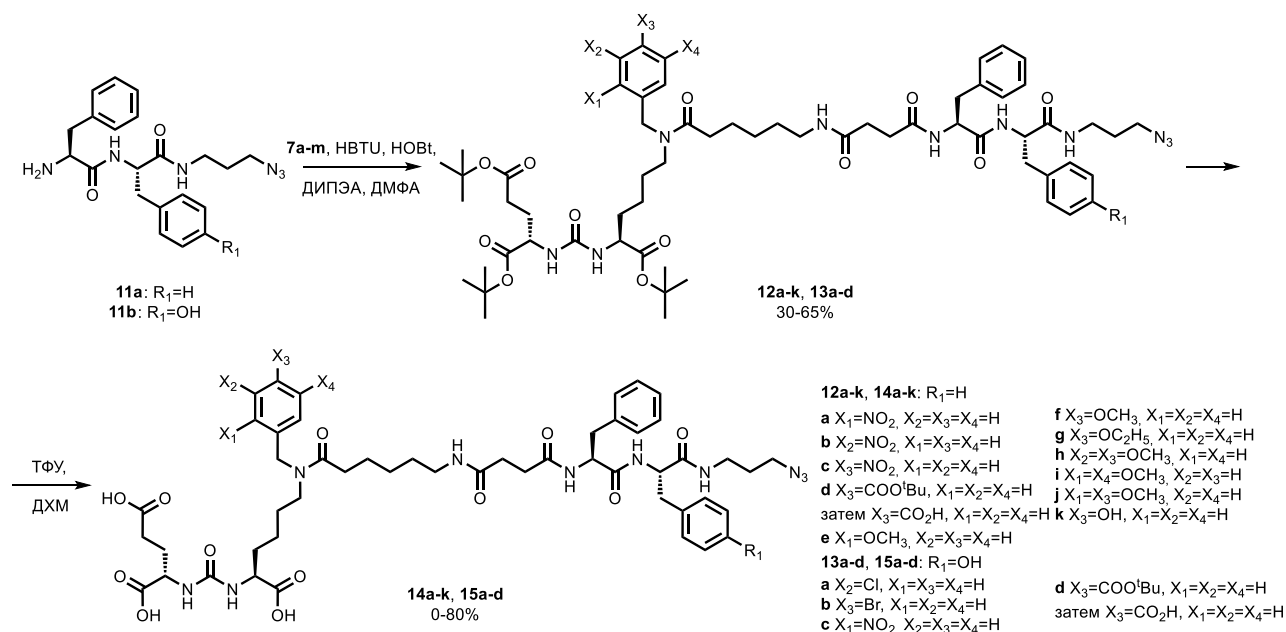


Рисунок 4. Схема синтеза лигандов ПСМА **14a-k** и **15a-d**.

Ингибирующая активность по отношению к ПСМА полученных десяти лигандов **14a-k**, содержащих в своей структуре два остатка фенилаланина, а также двух лигандов сравнения **15a-b**, была оценена *in vitro* при помощи исследования ингибирования реакции расщепления *N*-ацетиласпартилглутамата (NAAG) под действием ПСМА. Кроме лигандов **15a-b**, в качестве соединений сравнения использовались известные лиганды ПСМА ZJ-43 и 2-ПМРА (Рисунок 5). Полученные значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) приведены в Таблице 1.

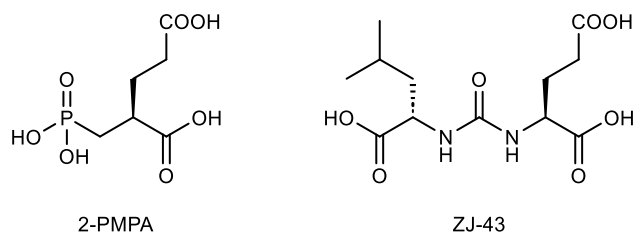


Рисунок 5. Структура лигандов сравнения 2-ПМРА и ZJ-43.

Как видно из представленных в Таблице 1 данных, наименьшую эффективность ингибирования показали лиганды с алкоксильными группами в *para*-положении **14f** и **14g**, при этом значение IC₅₀, полученное для соединения с гидроксильной функцией в *para*-положении (**14j**) говорит о значительно более высокой аффинности данного лиганда, в сравнении с метокси- и этокси- замещёнными по четвёртому положению аналогами. Другие метокси-замещённые лиганды, хоть и превосходят в значениях IC₅₀ соединения **14f** и **14g**, но уступают другим полученным лигандам, а именно **14ai** и **14d**.

Таблица 1. Значения IC₅₀ полученные для соединений **14a-k** и **15a-d**.

Соединение	Заместитель		IC ₅₀ ±SD, нМ
	ε-NH-бензил	R ₁	
14a	X ₁ =NO ₂	H	16±3
14b	X ₂ =NO ₂	H	23±9
14c	X ₃ =NO ₂	H	35±12
14d	X ₃ =COOH	H	7±2
14e	X ₁ =OCH ₃	H	38±8
14f	X ₃ =OCH ₃	H	112±38
14g	X ₃ =OC ₂ H ₅	H	51±9
14h	X ₂ =X ₃ =OCH ₃	H	88±30
14i	X ₁ =X ₄ =OCH ₃	H	23±4
14k	X ₃ =OH	H	24±6
15a	X ₂ =Cl	ОН	9±3
15b	X ₃ =Br	ОН	18±6
15c	X ₁ =NO ₂	ОН	101±75
15d	X ₃ =COOH	ОН	19±5
ZJ-43	—	—	11 ±3
2-PMPA	—	—	80±24

Наилучшую эффективность связывания с мишенью показал лиганд **14d** с карбоксильной функцией в *para*-положении. Данные, полученные для серии нитро-замещённых лигандов **14a-c**, указывают на снижение аффинности в ряду *орто*->*мета*->*пара*-. При этом лиганд **14a** с нитрогруппой в *орто*-положении показал наиболее высокую аффинность в сравнении с другими лигандами, содержащими заместители аналогичной природы. Таким образом, наличие в молекуле полярных функциональных заместителей, таких как NO₂, ОН и COOH, может вносить существенный вклад в увеличение сродства лигандов к ПСМА.

На основе лигандов **14d** и **14a**, как показавших наилучшую аффинность, согласно Рисунку 4 были получены лиганды **15c-d** с остатком *L*-тирозина вместо одного из остатков фенилаланина в пептидном фрагменте линкера, так как ранее было показано, что подобная замена может приводить к увеличению эффективности связывания с мишенью. Однако полученные лиганды **15c-d** уступали в аффинности аналогам **14a** и **14d** с двумя остатками фенилаланина в структуре линкера. При этом, если падение аффинности в случае лиганда **15d** относительно невелико, то замена остатка фенилаланина на тирозин для *орто*-нитро замещённого лиганда приводит к существенному уменьшению ингибирующей

активности. Таким образом, из двух полученных тирозинсодержащих лигандов, только соединение **15d** представляется перспективным для последующих исследований.

Для ряда полученных лигандов **14** и **15** была проведена оценка их водорастворимости. Наибольшую водорастворимость (189 ± 14 μM) ожидаемо демонстрирует лиганд **15d**, содержащий карбоксильную группу в бензильном фрагменте и остаток тирозина в линкерной части.

Таким образом, в данном разделе работы было получено 12 ранее не описанных лигандов ПСМА с различными заместителями при ε -аминогруппе лизина мочевинового фрагмента (соединения **14a-k** и **15c-d**), оценена их ингибирующая активность и водорастворимость. *In vitro* исследования эффективности ингибирования реакции расщепления NAAG под действием ПСМА показали, что лиганды **14a**, **14d** и **15d** обладают наиболее высокой аффинностью к мишени.

Альтернативные подходы к твердофазному синтезу лигандов ПСМА с аминогруппой как точкой последующего конъюгирования

При дизайне рассмотренных выше лигандов **14a-k** и **15a-d** в качестве функциональной группы для последующего конъюгирования была выбрана азидогруппа. Ещё одной группой, способной выполнять эту роль, является аминогруппа. Существующие методы получения соединений, содержащих аминогруппу в качестве точки конъюгирования, довольно трудозатратны. Ввиду этого в настоящей работе был предложен альтернативный подход к получению защищённых форм лигандов ПСМА, содержащих аминогруппу (соединения **18a-j**, Рисунок 6) для последующей функционализации, оценены границы применимости предложенного метода и проведено сравнение его с альтернативным подходом.

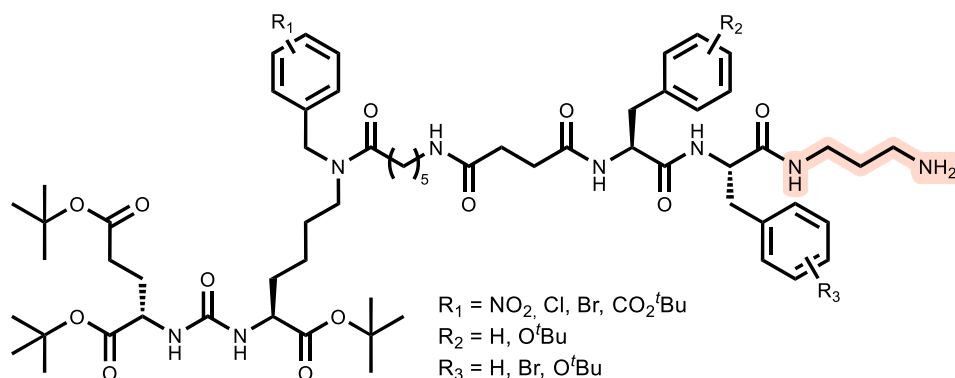


Рисунок 6. Общая структура получаемых защищённых лигандов **18a-j** с остатком 1,3-диаминопропана (выделен цветом).

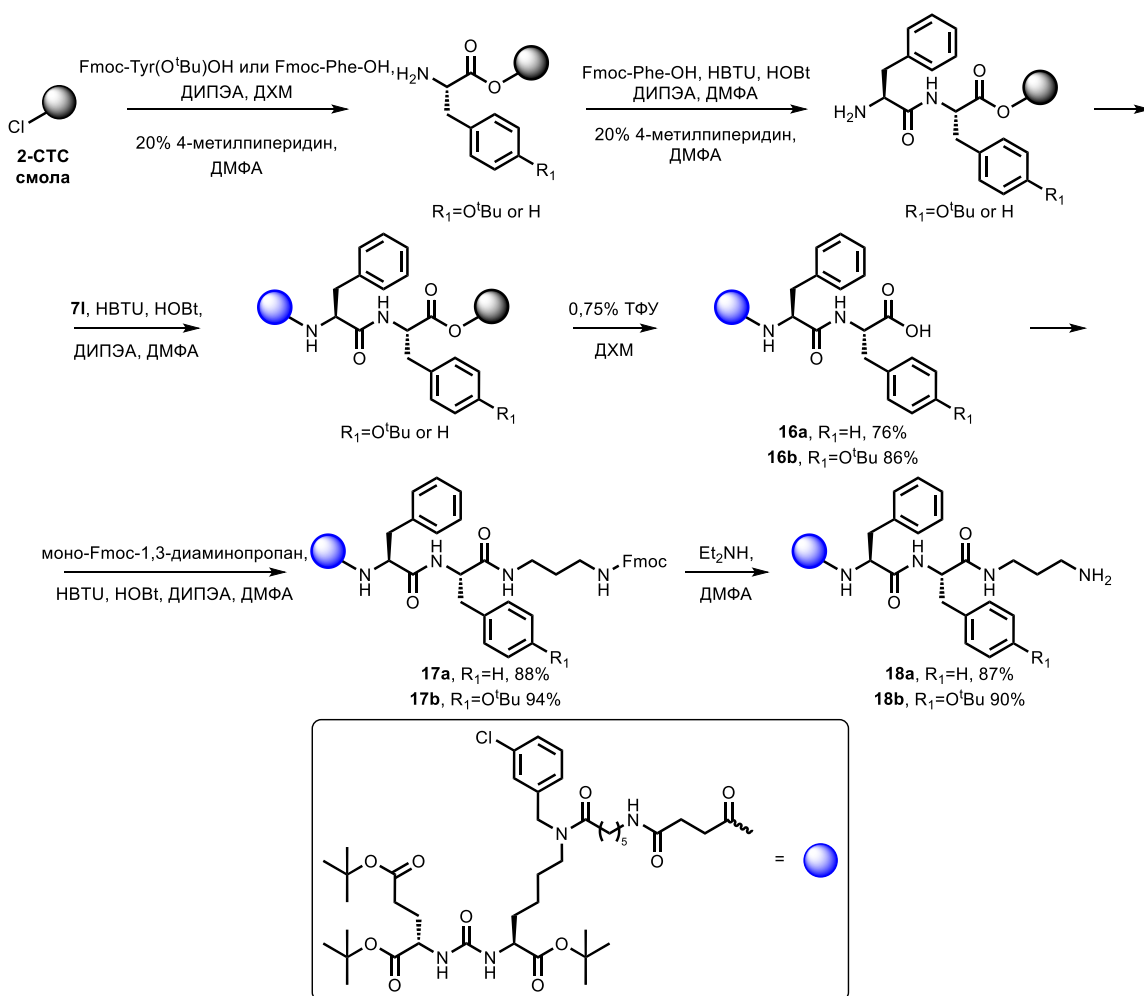


Рисунок 7. Схема получения защищённых лигандов **18a-b** с использованием комбинации твердофазного и жидкофазного синтеза.

Синтез целевых соединений был осуществлён с применением двух различных методов. Первый метод основан на использовании комбинации твердофазного пептидного синтеза и классического синтеза в растворе (Рисунок 7). На первой стадии иммобилизовали Fmoc-защищённую аминокислоту (Fmoc-Phe-OH или Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH) на 2-хлортритил хлоридной (2-СТС) смоле. На следующей стадии удаляли Fmoc-защитную группу действием пиперидина. После этого ацилировали α-аминогруппу иммобилизованной аминокислоты Fmoc-защищённым фенилаланином в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА, и далее вновь удаляли Fmoc-защитные группы. Затем проводилось введение защищённого вектор-фрагмента **7I**, после чего действием разбавленного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) соединения **16a-b** удаляли с твердофазной подложки. Затем вводили в структуру лиганда спейсера за счёт модификации свободной карбоксильной группы соединений **16**: для этого вначале ацилировали моно-Fmoc-1,3-диаминопропан с образованием соединений **17a-b** и далее удаляли Fmoc-защитную группу действием диэтиламина с получением защищённых лигандов **18a-b**.

В качестве альтернативы нами впервые предложен подход к синтезу соединений **18** с предварительной иммобилизацией 1,3-диаминопропана на 2-СТС смоле. На первой стадии синтеза смолу активировали, после чего иммобилизовывали на ней 1,3-диаминопропан. Полученная таким образом смола с привитым фрагментом диаминопропана использовалась в последующих реакциях твердофазного пептидного синтеза (Рисунок 8).

Первоначально данный синтетический подход был протестирован на примере соединений **18a-b,e** и **19**, и далее для более полной оценки синтетического потенциала был проведён синтез ещё ряда лигандов (**18c, d, f-j**) на основе вектор-молекул **7a,d,l-m**. Было обнаружено, что удаление целевых соединений **18** и **19** со смолы в стандартных условиях (две последовательные промывки 0,75% раствором ТФУ длительностью 15 минут каждая) протекает с низкими выходами. При изменении условий реакции (увеличение концентрации CF_3COOH до 1% и количества последовательных промывок) для соединений **18e** и **19**, содержащих остаток тирозина, протекал побочный процесс частичного удаления *трет*-бутильных защитных групп при атоме кислорода тирозина. Достигнуть выхода, сопоставимого с суммарными выходами синтетической схемой на Рисунке 7, удалось лишь в случае лигандов **18a** (выходы 43% и 48% соответственно), **18e** и **18i**; для пептидной последовательности, содержащей два остатка защищённого *L*-тирозина относительно высоких выходов удалось достичь только в случае лиганда **18j** (36% относительно векторного фрагмента). Также не удалось достичь высоких выходов для соединений **18c** и **18g**, содержащих пептидный фрагмент с остатками фенилаланина и бромзамещённого фенилаланина.

В дальнейшем мы провели оценку применимости показанной на Рисунке 8 синтетической стратегии для получения лиганда-предшественника бимодальных конъюгатов, содержащего трипептидный фрагмент с двумя фрагментами фенилаланина и фрагментом Вос-защищённого по ϵ -аминогруппе лизина (Рисунок 8). Однако полученный защищённый лиганд **20**, согласно данным ВЭЖХ-МС, содержал значительное количество побочного продукта без Вос-защитных групп.

Рисунок 8. Схема синтеза защищённых лигандов **18a-j** и **20** с использованием твердофазного подхода.

Таким образом, для синтеза соединений-предшественников лигандов ПСМА для последующего получения конъюгатов путём создания амидной связи оптимальным может быть:

1) использование комбинации твердофазного и жидкофазного пептидного синтеза с первоначальным прикреплением реагента к смоле за счет карбоксильной группы – если задачей является получение существенных количеств целевых соединений с максимальным выходом или синтез соединений, пригодных для создания бимодальных конъюгатов;

2) использование твердофазного пептидного синтеза с первоначальным прикреплением реагента к смоле за счет аминогруппы – если задачей является быстрая наработка библиотеки соединений.

Синтез направленных на ПСМА систем совместной доставки

Для создания ингибиторов ПСМА, пригодных к конъюгированию с двумя терапевтическими агентами, были выбраны соединения с функциональными группами, которые можно модифицировать независимо друг от друга (ортогональными), в качестве которых использовались аминогруппа лизина и азидогруппа фрагмента 3-азидопропиламина. Реакцию с одной из этих функциональных групп можно осуществить, не затрагивая вторую. Для синтеза использовали соединения **7d**, **7l-m**, содержащие *мета*-хлор-, *пара*-бром- и *пара*-карбоксильные заместители в бензильном фрагменте при ϵ -аминогруппе лизина. В качестве пептидного линкера были выбраны последовательности *L*-Phe-*L*-Tyr-*L*-Lys (соединения **24a-c**) и *L*-Phe-*L*-Phe-*L*-Lys (соединение **24d**). Соответствующие трипептидные фрагменты **21a-b** (Рисунок 9) были получены с использованием стандартных протоколов твердофазного синтеза на 2-СТС смоле с использованием Fmoc-стратегии.

Полученные трипептиды **21a-b** ацилировали соединениями **7d,l-m** в присутствии HBTU, HOBT и основания (Рисунок 9). Продукты **22a-d** были удалены со смолы с помощью 0,75% раствора трифторуксусной кислоты в ДХМ и введены в реакцию ацилирования с 3-азидопропиламином в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА. Таким образом были получены защищённые соединения **23a-d** с терминальной азидогруппой. На последнем этапе было проведено удаление защитных групп с образованием лигандов **24a-d**.

Для четырёх новых полученных лигандов **24a-d** была проведена *in vitro* оценка их ингибирующей активности. Полученные значения IC₅₀ представлены в Таблице 2. Данные *in vitro* исследований показывают, что введение в пептидный фрагмент линкера остатка лизина не приводит к значительным изменениям ингибирующей активности лигандов.

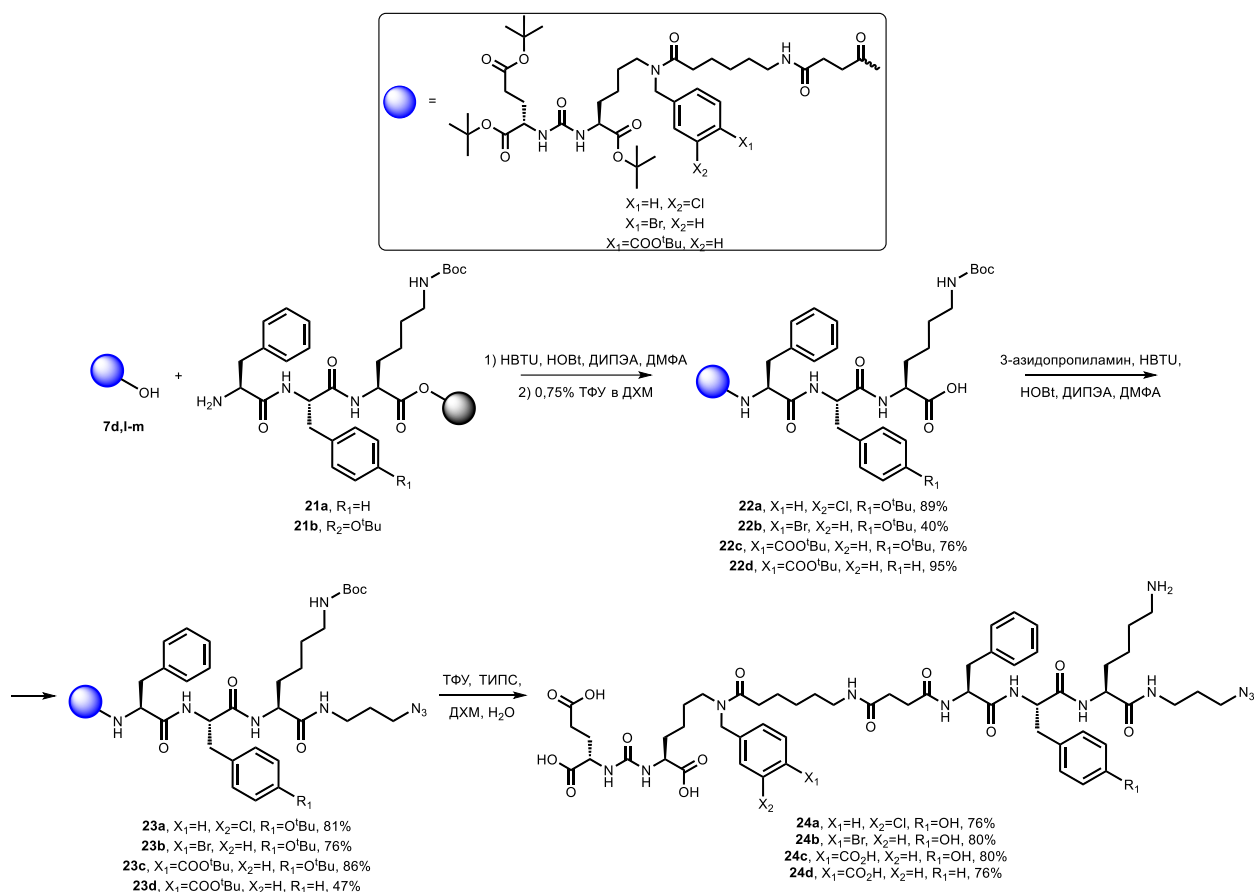


Рисунок 9. Схема синтеза лигандов ПСМА, пригодных для создания бимодальных конъюгатов.

Таблица 2. Результаты *in vitro* исследований ингибирования реакции расщепления NAAG соединениями **24a-d**

Соединение	Заместители			$\text{IC}_{50 \pm \text{SD}}, \text{нМ}$
	X_1	X_2	R_1	
24a	H	Cl	OH	13 ± 3
24b	Br	H	OH	11 ± 2
24c	COOH	H	OH	10 ± 3
24d	COOH	H	H	6 ± 2

Таким образом, в данном разделе работы была получена серия из четырёх ранее не описанных лигандов простатического специфического мембранного антигена **24a-d**, пригодных для создания на их основе бимодальных конъюгатов.

Для последующего сравнения с активностью целевых бимодальных конъюгатов, содержащих терапевтические агенты, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, был синтезирован модельный мономодальный конъюгат **25**, содержащий терапевтический агент монометил ауристатин Е (Рисунок 10). В качестве лиганда было использовано соединение **15a**, а монометил ауристатин Е (ММАЕ) был предварительно дополнительно модифицирован линкером, содержащим терминальную тройную связь и фрагмент, способный селективно

расщепляться под действием катепсина Б. Соединение **25** было получено реакцией [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения между модифицированным MMAE **29** и лигандом **15a**.

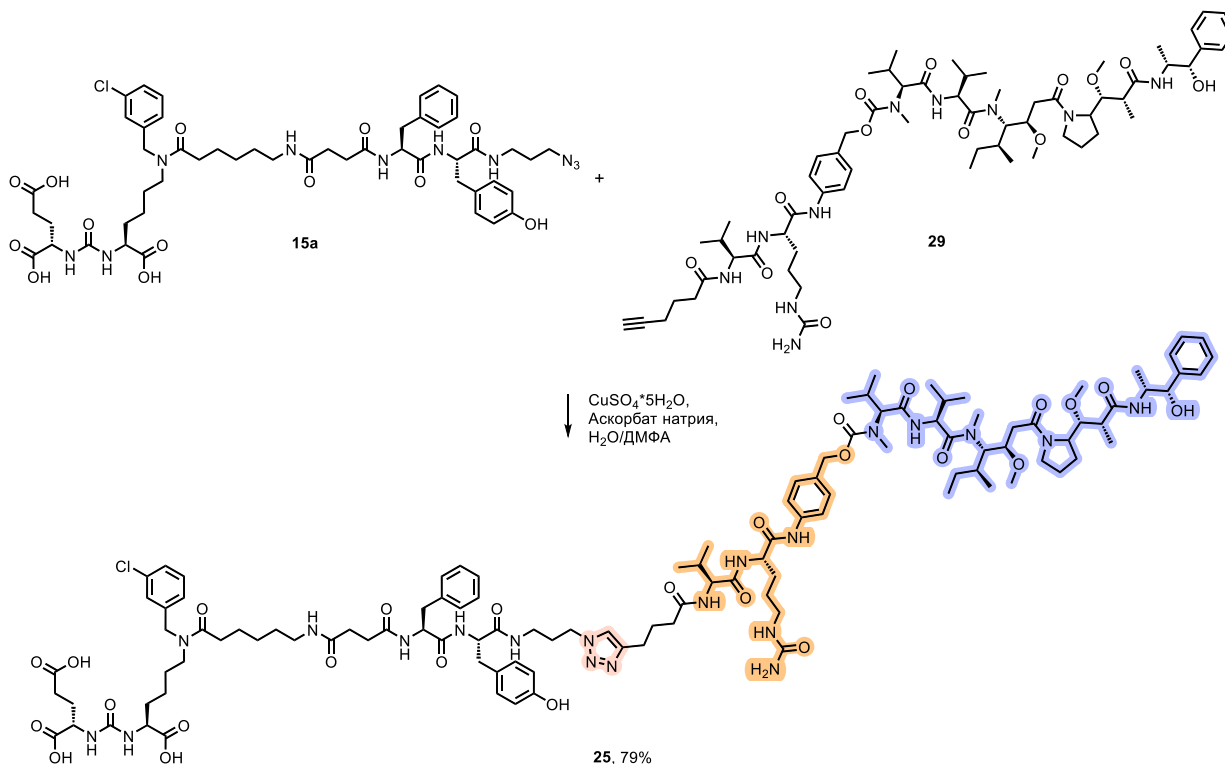


Рисунок 10. Схема синтеза мономодального конъюгата **25**. Цветом выделены следующие фрагменты: оранжевым – фрагмент катепсин-расщепляемого линкера; фиолетовым – фрагмент MMAE; розовым – образующийся триазольный цикл.

Для подтверждения структуры конъюгата **25** были проведены его исследования методом спектроскопии ЯМР с использованием корреляционных спектров 2D ^1H - ^1H DQF-COSY, 2D ^1H - ^1H TOCSY, 2D ^1H - ^1H NOESY, 2D ^1H - ^1H ROESY, 2D ^{13}C - ^1H HSQC, 2D ^{13}C - ^1H HMBC и 2D ^{15}N - ^1H HSQC. Анализ указанных 1D и 2D спектров позволил получить полное отнесение сигналов ^1H , ^{13}C и ^{15}N . Кроме полного соотнесения сигналов, полученные данные показали, что вещество в растворе существует в виде четырех конформеров (*Z,E* изомеров) вследствие заторможенного вращения амидных связей.

В качестве первой пары терапевтических агентов для конъюгирования с соединениями **24** были выбраны препараты монометил ауристатин Е (MMAE) и испинесиб (Isp). Первоначально был проведён *in vitro* эксперимент, в котором оценивалась цитотоксичность свободных препаратов MMAE и испинесиба, а также их эквимольной смеси. Полученные данные показали, что при эквимольном соотношении вводимых препаратов не наблюдается их антагонизма.

Для возможности конъюгирования с векторным фрагментом терапевтические агенты были предварительно модифицированы с получением соединений **31** и **29**. На

первом этапе получения целевого бимодального конъюгата проводилась реакция [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения между лигандом **24a** и модифицированным MMAE **29** (Рисунок 11). Полученный таким образом моноконъюгат **32** далее был введен в реакцию ацилирования с модифицированным испинесибом **31** с получением целевого бимодального конъюгата **33**.

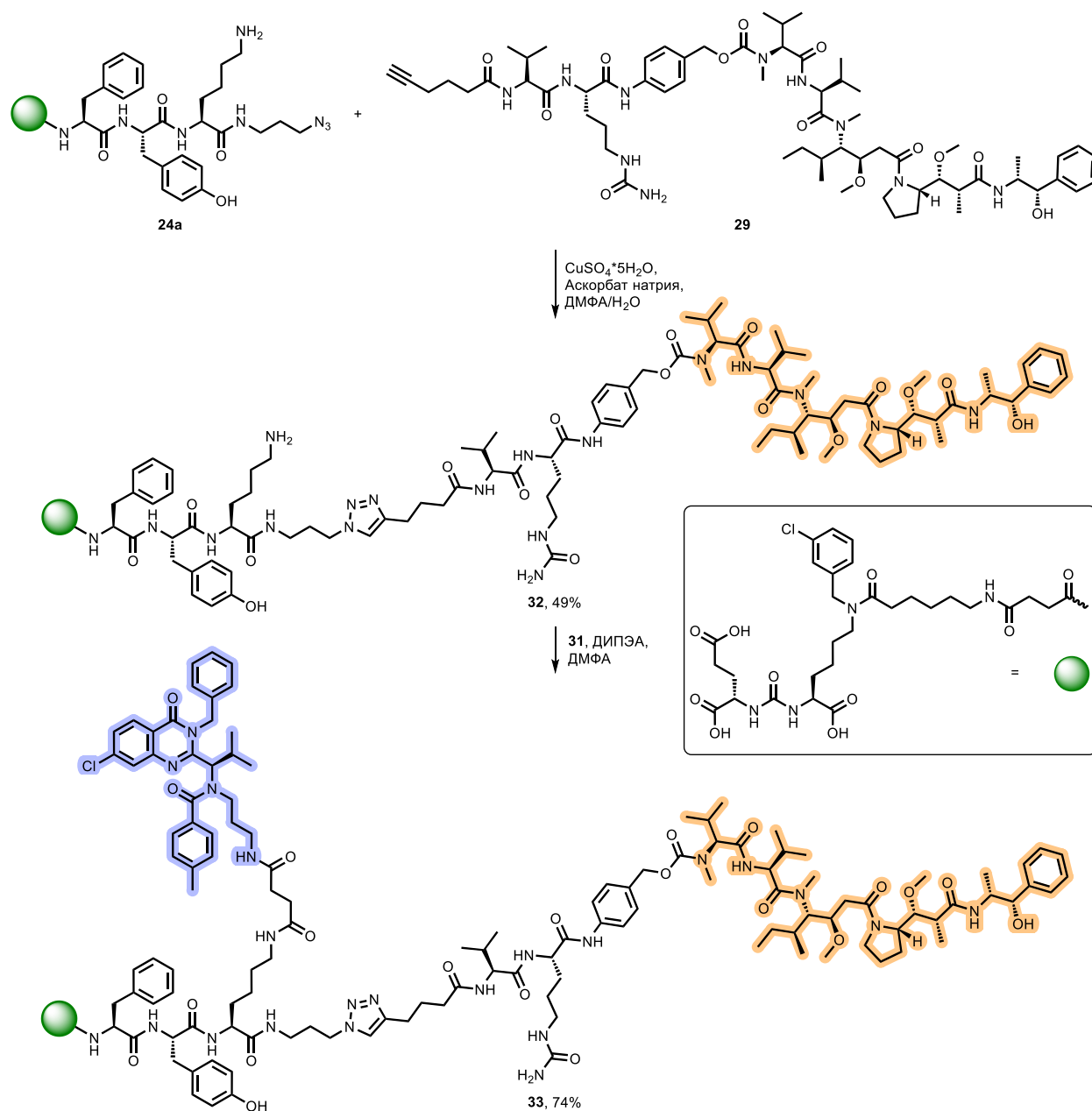


Рисунок 11. Схема синтеза бимодального конъюгата с испинесибом и MMAE. Цветом выделены следующие фрагменты: фиолетовым – испинесиб; оранжевым – MMAE.

In vitro исследования цитотоксичности полученного бимодального конъюгата на клеточных моделях РПЖ показали, что соединение **33** демонстрирует умеренную селективность в отношении ПСМА-экспрессирующих опухолевых моделей. При этом конъюгат **33** значительно уступает в токсичности как свободным препаратам, так и мономодальному конъюгату лиганда ПСМА с MMAE.

Следующим этапом работы стал синтез серии бимодальных конъюгатов, содержащих в качестве одного из препаратов ингибитор тубулина, а в качестве второго абиратерон или энзалутамид.

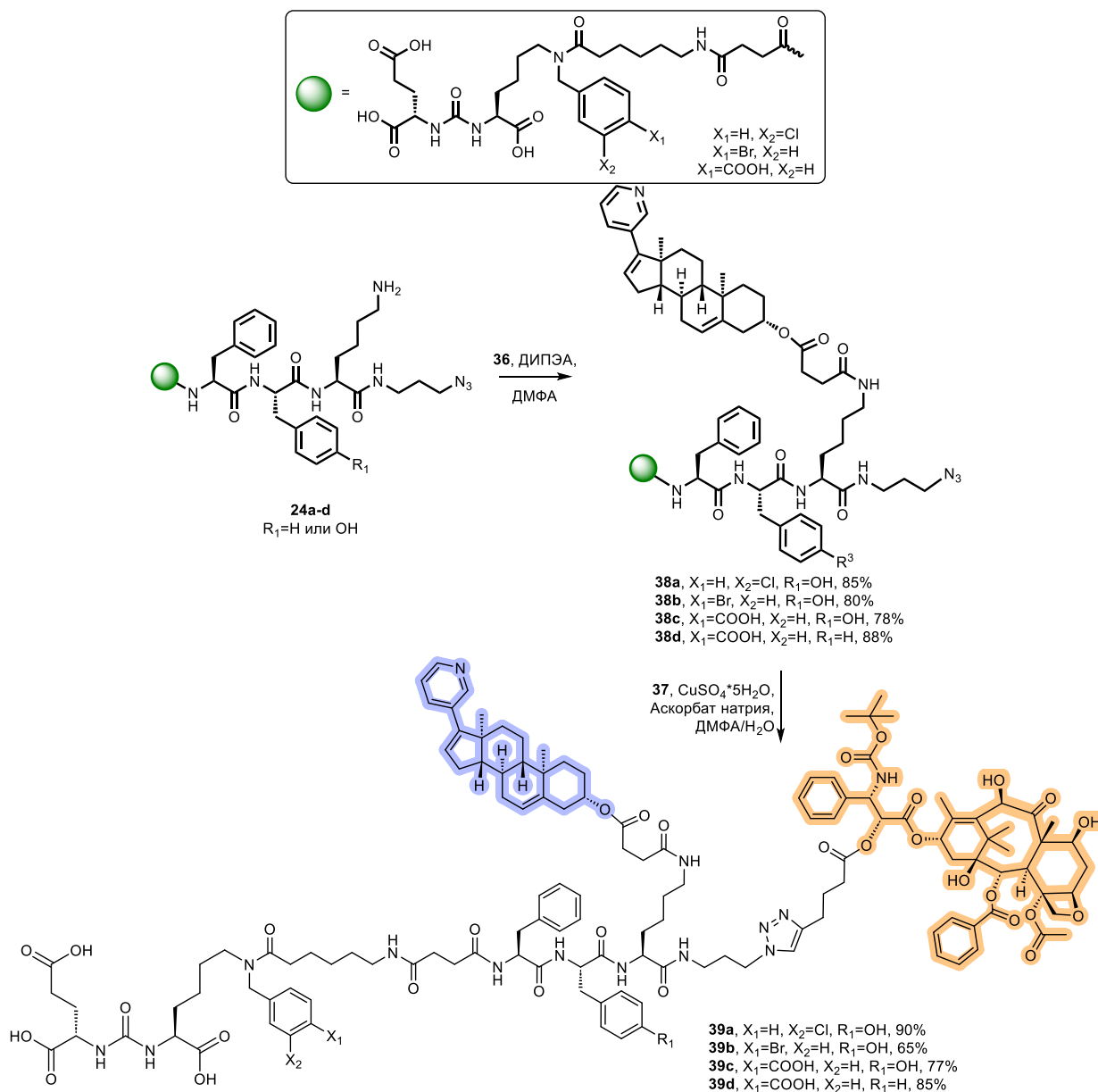


Рисунок 12. Схема синтеза бимодальных конъюгатов с парой доцетаксел/абиратерон.

Цветом выделены: оранжевым – фрагмент доцетаксела, фиолетовым – фрагмент абиратерона.

Бимодальные конъюгаты **39a-d**, содержащие стабилизирующий ингибитор тубулина доцетаксел и ингибитор CYP17A1 абиратерон (Рисунок 12), получали реакцией лигандов **24a-d** с модифицированными формами соответствующих препаратов **36** и **37**. Вначале проводили реакции лигандов **24** с модифицированным препаратом **36** присутствии ненуклеофильного основания (Рисунок 12). При этом были выделены соединения **38a-d**, которые далее вводили в азид-алкиновое циклоприсоединение, катализируемого медью, с модифицированным доцетакселем **37**. Бимодальные конъюгаты

39a-d были выделены в индивидуальном виде при помощи препаративной обращённо-фазовой колоночной хроматографии. Структура соединений **39a-d** подтверждена методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии высокого разрешения, а чистота - методом ВЭЖХ-МС.

Бимодальные конъюгаты **39a-d** были протестированы *in vitro* на трёх различных клеточных культурах РПЖ: ПСМА-экспрессирующих клеточных линиях 22Rv1 и LNCaP, а также ПСМА-неэкспрессирующей клеточной линии PC-3 (Рисунок 13). На всех трёх клеточных линиях полученные соединения уступали в токсичности доцетакселу, что в случае ПСМА-неэкспрессирующей линии PC-3 может быть связано с низкой неспецифичной токсичностью синтезированных конъюгатов. Исходя из данных цитотоксичности на ПСМА-экспрессирующих клеточных линиях LNCaP и 22Rv1, цитотоксичность полученных конъюгатов **39a-d** находится в прямой зависимости от уровня экспрессии ПСМА в клетках РПЖ и возрастает при повышении экспрессии ПСМА.

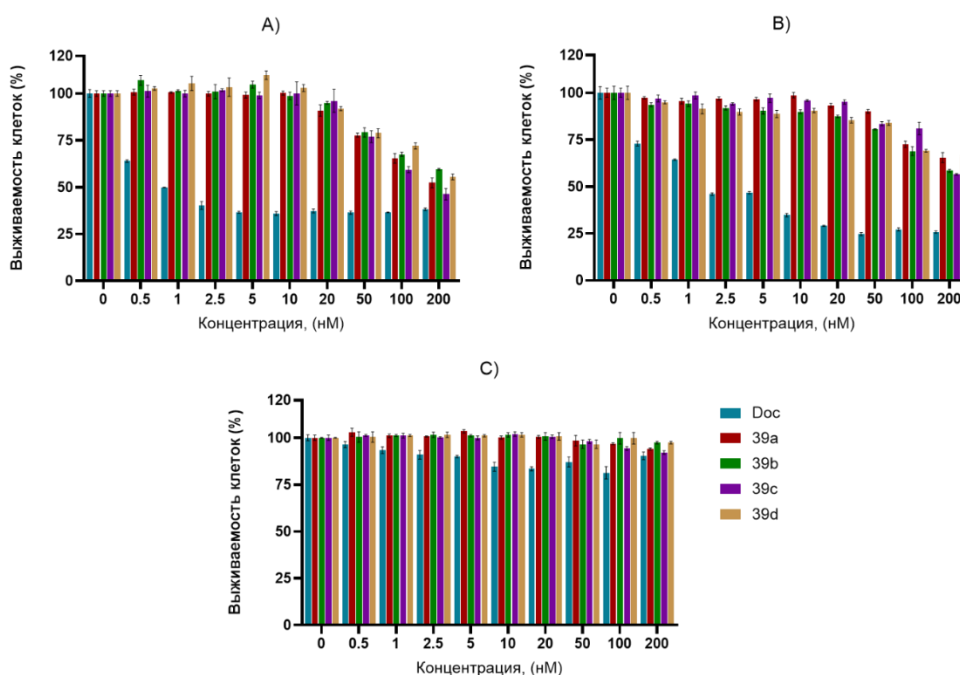


Рисунок 13. Графическое представление результатов *in vitro* эксперимента на клеточных линиях рака предстательной железы: А) LNCaP; В) 22Rv1; С) PC-3.

Учитывая невысокую токсичность полученной серии соединений, в структуру последующих конъюгатов **40a-d** и **43** вместо доцетаксела вводили другой терапевтический агент – монометил ауристатин Е.

Для синтеза бимодальных конъюгатов **40a-d** (Рисунок 14) вначале проводили реакцию лигандов **24a-d** с соединением **29** и далее полученные моноконъюгаты **32a-d**

реагировали с модифицированным абиратероном **36**. Аналогично, исходя из соединения **32a** был получен конъюгат **43**, содержащий вместо абиратерона энзалутамид.

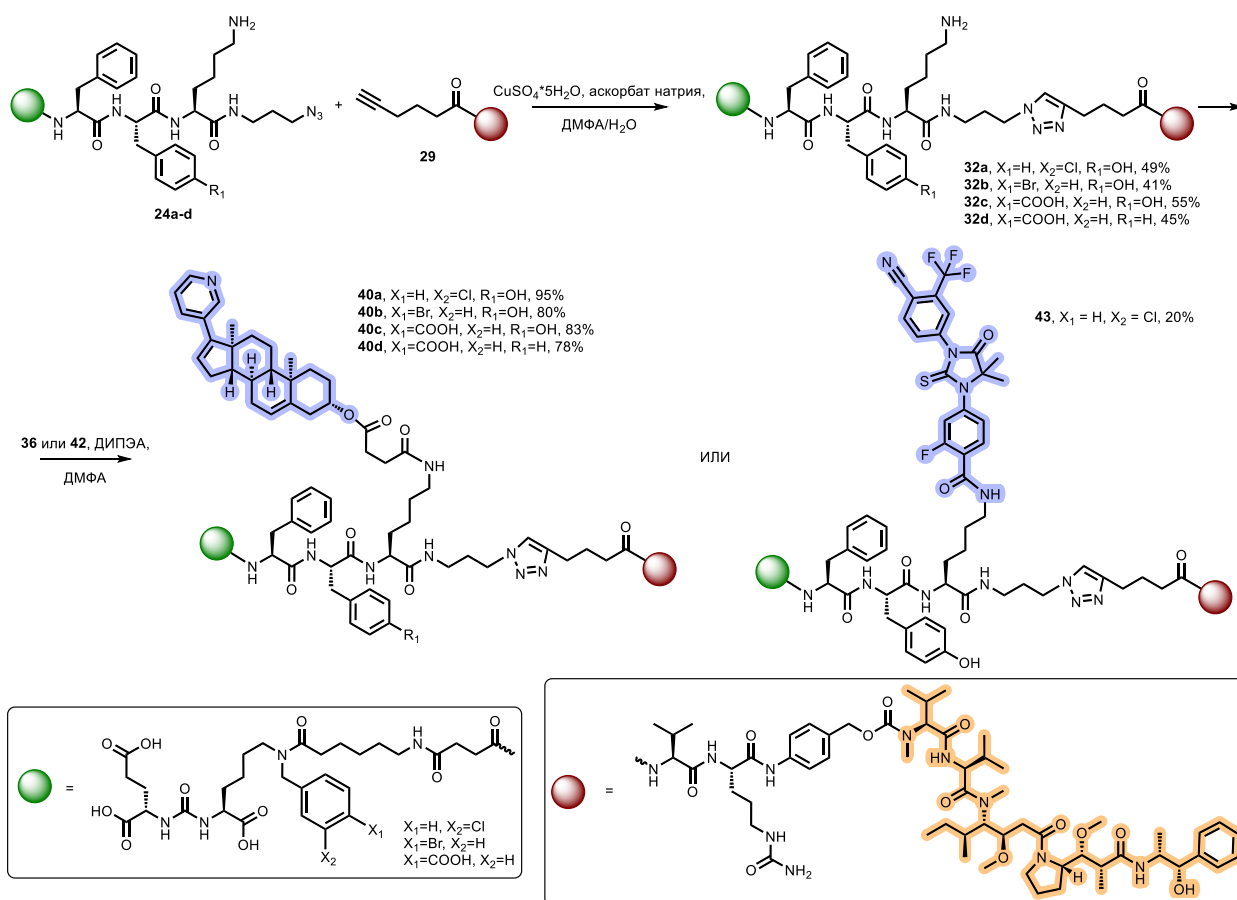


Рисунок 14. Синтез бимодальных конъюгатов **40a-d** и **43** содержащих комбинацию препаратов ММАЕ/абиратерон и ММАЕ/энзалутамид. Цветом выделены: оранжевым – фрагмент ММАЕ, фиолетовым – фрагмент абиратерона или энзалутамида.

В рамках *in vitro* исследований соединений, содержащих ММАЕ, была определена цитотоксичность как бимодальных конъюгатов **40a-d** и **43**, так и их мономодальных предшественников **32a-d**. Для соединений **40a-d** значения концентрации полумаксимальной выживаемости (CC₅₀) находились в диапазоне от 130 до 213 нМ на клеточной линии LNCaP и от 129 до 192 нМ на линии 22Rv1. На клеточной линии PC-3 достичь значения CC₅₀ не удалось. Соединение **43** показало сопоставимую активность: CC₅₀(LNCaP) = 139±19 нМ; CC₅₀(22Rv1) = 170±15 нМ; CC₅₀> 800нМ. Бимодальные конъюгаты **40a** и **43** также были исследованы *in vivo* на мышах с привитыми ксенографтами 22Rv1 и PC-3. При воздействии конъюгатов **40a**, **43** и **25** на опухоль 22Rv1 достигался высокий противоопухолевый эффект: торможение роста опухоли (ТРО) при лечении конъюгатом **40a** на весь срок наблюдения составило 60,6–80,6%, конъюгатом **43** – 53,9-71,3%, конъюгатом **25** – 59,1-84,5%, свободным ММАЕ – 43,0 – 64,7% (Рисунок 15). При воздействии на опухоль PC-3 эффект был значительно слабее: ТРО при лечении конъюгатом **40a** не превышало 44,9%, **43** – 51,7%, **25** – 37,7%, ММАЕ – 38,4%.

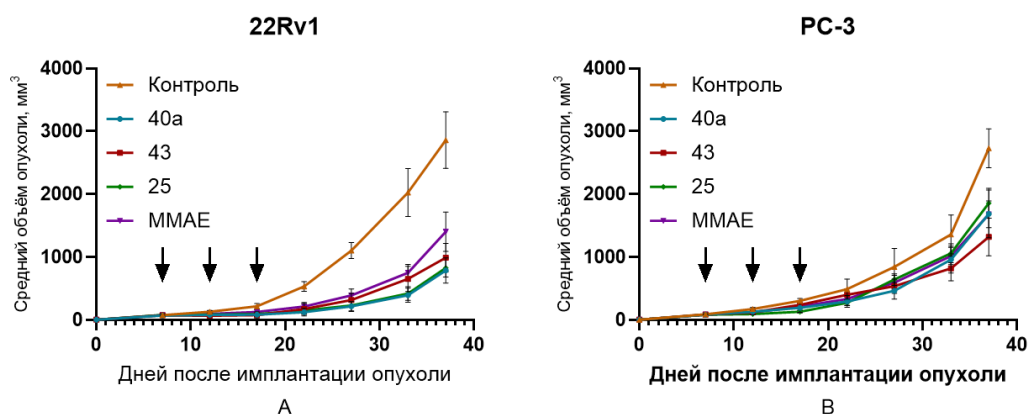


Рисунок 15. Графики динамики роста опухолей 22Rv1 (А) и РС-3 (В) у мышей при внутривенном трёхкратном введении **40a**, **43**, **25** и MMAE (разовая доза 0,3 мг/кг). Стрелками обозначены дни инъекций.

Таким образом, в работе было получено девять новых бимодальных терапевтических конъюгатов с векторными фрагментами к ПСМА различной структуры. *In vitro* и *in vivo* исследования цитотоксичности синтезированных конъюгатов показали наличие зависимости цитотоксической и противоопухолевой активности от уровня экспрессии ПСМА в клетках РПЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы собраны и проанализированы литературные данные, описывающие основные подходы к дизайну и получению низкомолекулярных ингибиторов простатического специфического мембранного антигена и конъюгатов с терапевтическими агентами на их основе. В работе предложены препаративные методы получения лигандов ПСМА с различными заместителями в бензильном фрагменте при ϵ -положении лизина. Синтезирована серия ранее не описанных лигандов ПСМА, исследована их ингибирующая активность *in vitro* и на основе полученных данных выявлено, что для акцепторных заместителей в бензильном фрагменте молекулы лиганда аффинность к ПСМА увеличивается в ряду *орто*->*мета*->*пара*-. Показано, что введение метокси- или этокси-группы вместо гидроксильной в этот фрагмент приводит к снижению аффинности к мишени. Установлено, что для *n*-карбокси- и *o*-нитро-содержащих соединений, в отличие от галоген-содержащих лигандов, замена одного из остатков фенилаланина в линкере на остаток тирозина не приводит к увеличению ингибирующей активности лиганда по отношению к ПСМА. Наибольшую ингибирующую активность продемонстрировали лиганды, содержащие *n*-карбоксильную и *o*-нитрогруппу.

Показано, что за счёт иммобилизации остатка 1,3-диаминопропана на 2-хлортритилхлоридной смоле и последующего твердофазного пептидного синтеза возможно осуществить получение защищённых лигандов ПСМА с концевой

аминогруппой, как точкой последующего конъюгирования. Выявлены границы применимости разработанного метода.

Реализован подход к синтезу лигандов ПСМА, пригодных к созданию бимодальных конъюгатов. Изучение ингибирующей активности этих соединений *in vitro* продемонстрировало, что дополнительный остаток лизина в структуре линкера подобных соединений не оказывает значительного влияния на аффинность к ПСМА. Исходя из полученных лигандов ПСМА синтезирована серия бимодальных конъюгатов со следующими комбинациями терапевтических агентов: доцетаксел/абиратерон, ММАЕ/абиратерон, ММАЕ/энзалутамид, ММАЕ/испинесиб. Проведена оценка цитотоксической активности всех полученных соединений *in vitro* и показано, что её уровень выше на клеточных моделях РПЖ с высокой экспрессией ПСМА и ниже на клеточных моделях с низкой экспрессией этого белка. Изучена противоопухолевая активность *in vivo* двух синтезированных конъюгатов, содержащих комбинации терапевтических агентов ММАЕ/абиратерон и ММАЕ/энзалутамид. Показано, что на ксенографтных моделях с низкой экспрессией ПСМА эффективность торможения роста опухоли ниже, чем на высокоэкспрессирующих моделях. Установлено, что полученные конъюгаты превосходят в эффективности торможения роста опухоли свободный препарат ММАЕ.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработаны и оптимизированы методы получения новых лигандов простатического специфического мембранного антигена с различными замещёнными бензильными фрагментами в ϵ -положении лизина. Для синтезированных соединений проведены *in vitro* исследования ингибирующей активности. Установлено, что для нитро-замещенных производных аффинность к ПСМА уменьшается в ряду *пара*-<*мета*-<*орто*-; гидрокси-содержащие соединения демонстрируют большую ингибирующую активность в сравнении с алкокси-аналогами; введение остатка тирозина вместо фенилаланина в структуру линкера не приводит к увеличению аффинности для лигандов, содержащих *о*-нитро- или *п*-карбокси-группу. Лиганды, содержащие *п*-карбокси- или *о*-нитрогруппу, демонстрируют эффективность ингибирования реакции расщепления N-ацетиласпартилглутамата ПСМА, сопоставимую или превосходящую описанные в литературе аналоги.
2. Впервые предложен способ синтеза соединений-предшественников лигандов ПСМА с концевой аминогруппой как точкой последующего конъюгирования, основанный на иммобилизации остатка 1,3-диаминопропана на твердофазном носителе. Проведён сравнительный анализ с альтернативной стратегией получения подобных соединений,

использующей комбинацию твердофазного подхода и синтеза в растворе. Показано, что предложенный метод удобен для быстрой наработки библиотек лигандов, однако обладает рядом субстратных ограничений.

3. Осуществлён синтез четырёх ранее не описанных лигандов ПСМА, пригодных к созданию на их основе бимодальных конъюгатов. Проведены исследования ингибирующей активности полученных лигандов *in vitro*, показавшие, что введение дополнительного аминокислотного остатка (лизина) в структуру лиганда не приводит к значительному изменению ингибирующей активности по сравнению с аналогами, не содержащими в линкере остаток лизина.
4. Разработаны и оптимизированы методы получения бимодальных конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами, обладающими различным механизмом действия: монометил ауристатин Е, доцетаксел, абиратерон, энзалутамид и испинесиб. С использованием разработанных подходов осуществлён синтез десяти ранее не описанных в литературе бимодальных терапевтических конъюгатов.
5. Впервые проведены *in vitro* исследования цитотоксичности комбинации препаратов монометил ауристатин Е и испинесиб. Показано отсутствие антагонизма между данными терапевтическими агентами. Проведены *in vitro* исследования цитотоксичности полученных в работе бимодальных конъюгатов этих препаратов и их соединений-предшественников на трёх клеточных моделях рака предстательной железы (LNCaP, 22Rv1 и PC-3). Показано наличие зависимости активности синтезированных соединений от уровня экспрессии ПСМА в клетке.
6. Проведены *in vivo* исследования противоопухолевой активности двух полученных бимодальных конъюгатов на ксенографтных моделях РПЖс различным уровнем экспрессии ПСМА (22Rv1 и PC-3). Показана зависимость противоопухолевой активности от экспрессии ПСМА. Анализ эффективности торможения роста опухоли показал преимущество бимодальных конъюгатов над свободным препаратом монометил ауристатин Е.

Перспективы дальнейшего развития: Разработанные в рамках диссертационного исследования подходы к получению ингибиторов ПСМА позволяют значительно расширить существующую библиотеку лигандов. Выявленные закономерности в соотношении структура-активность синтезированных лигандов ПСМА могут быть применены для дополнительной оптимизации структуры и получения более аффинных к мишени соединений. Создание высокоэффективных ингибиторов ПСМА с заместителями различной природы в бензильном фрагменте может позволить осуществлять тонкую настройку фармакокинетического профиля диагностических и терапевтических

препаратов, получаемых на их основе. Предложенные подходы к синтезу модифицированных терапевтических агентов и бимодальных конъюгатов могут быть в дальнейшем применены как для создания препаратов с другими сочетаниями действующих веществ, так и для синтеза различных тераностических и диагностических систем совместной доставки к опухолям предстательной железы.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационных советах МГУ:

1. Machulkin, A.E., Uspenskaya, A.A., **Zyk, N.U.**, Nimenko, E.A., Ber, A.P., Petrov, S.A., Polshakov, V.I., Shafikov, R.R., Skvortsov, D.A., Plotnikova, E.A., Pankratov, A.A., Smirnova, G.B., Borisova, Y.A., Pokrovsky, V.S., Kolmogorov, V.S., Vaneev, A.N., Khudyakov, A.D., Chepikova, O.E., Kovalev, S.V., Zamyatnin, A.A., Erofeev, A.S., Gorelkin, P.V., Beloglazkina, E.K., Zyk, N.V., Khazanova, E.S., and Majouga, A.G. Synthesis, characterization and preclinical evaluation of small-molecule prostate-specific membrane antigen targeted monomethyl auristatin e conjugate // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2021. – Vol. 64. – № 23 – P. 17123-17145. EDN: XLFMLK. Импакт-фактор 6,8 (JIF). Объём 3,043 п.л. Личный вклад автора – 15%.
2. **Zyk, N.Y.**, Ber, A.P., Nimenko, E.A., Shafikov, R.R., Evteev, S.A., Petrov, S.A., Uspenskaya, A.A., Dashkova, N.S., Ivanenkov, Y.A., Skvortsov, D.A., Beloglazkina, E.K., Majouga, A.G., and Machulkin, A.E. Synthesis and initial in vitro evaluation of PSMA-targeting ligands with a modified aromatic moiety at the lysine ϵ -nitrogen atom // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*– 2022. – Vol. 71. – P. 128840. EDN: YWTYFY. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Объём 0,681 п.л. Личный вклад автора – 30%.
3. **Zyk, N.Y.**, Petrov, S.A., Zavertkina, M.V., Uspenskaya, A.A., Krasnikov, P.A., Dashkova, N.S., Beloglazkina, E.K., Majouga, A.G., Zyk, N.V., and Machulkin, A.E. Choice of the optimal synthetic approach for the polypeptide ligands of prostatic specific membrane antigen preparation // *Mendeleev Communications*– 2023. – Vol. 33. – № 4 – P. 472-475. EDN: SOUGJU. Импакт-фактор 1,7 (JIF). Объём 0,374 п.л. Личный вклад автора – 35%.
4. **Zyk, N.Y.**, Garanina, A.S., Plotnikova, E.A., Ber, A.P., Nimenko, E.A., Dashkova, N.S., Uspenskaia, A.A., Shafikov, R.R., Skvortsov, D.A., Petrov, S.A., Pankratov, A.A., Zyk, N.V., Majouga, A.G., Beloglazkina, E.K., and Machulkin, A.E. Synthesis of prostate-specific membrane antigen-targeted bimodal conjugates of cytotoxic agents and antiandrogens and their comparative assessment with monoconjugates // *International Journal of Molecular Sciences*– 2023. – Vol. 24. – № 14 – P.11327. EDN: HYYCDJ. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Объём 2,314 п.л. Личный вклад автора – 40%.
5. **Zyk, N.Y.**, Kolchanova, A.Yu., Volkova, N.S., Uspenskaia, A.A., Skvortsov, D.A., Beloglazkina, E.K., Zyk, N.V., Majouga, A.G., and Machulkin, A.E. A novel molecular platform for co-delivery of monomethyl auristatin E and ispinesib to prostate cancer cells // *Mendeleev Communications* – 2025. – Vol. 35. – № 4 – P.440-443. EDN: ENAWEU. Импакт-фактор 1,7 (JIF). Объём 0,348 п.л. Личный вклад автора – 50%.