

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
кандидат химических наук
Мачулкин Алексей Эдуардович
доктор химических наук, доцент
Белоглазкина Елена Кимовна

Москва – 2025

Оглавление

1. Введение	4
2. Обзор литературы.....	9
2.1 Простатический специфический мембранный антиген как мишень для направленной доставки в опухолевые ткани.....	9
2.2 Лиганды ПСМА.....	13
2.2.1 Лиганды – аналоги переходного состояния.....	14
2.2.2 Лиганды – аналоги субстрата	19
2.2.3 Основные подходы к синтезу лигандов ПСМА на основе мочевины DCL.....	44
2.2.3.1 Подходы к созданию мочевинового фрагмента лигандов ПСМА.....	45
2.2.3.2 Способы введения ароматического фрагмента к ϵ-атому азот лизина.....	47
2.2.3.3 Способы введения линкера в структуру лигандов ПСМА	49
2.2.3.4 Твердофазные стратегии синтеза лигандов ПСМА.....	58
2.3 Комбинационная терапия рака предстательной железы.....	60
2.4 Терапевтические конъюгаты лигандов ПСМА.....	64
2.4.1 Мономодальные терапевтические конъюгаты, направленные на ПСМА	64
2.4.2 ПСМА-направленные бимодальные конъюгаты и подходы к их получению	73
2.5 Заключение	83
3. Обсуждение результатов.....	84
3.1 Синтез и <i>in vitro</i> исследования новых ингибиторов ПСМА	85
3.2 Альтернативные подходы к твердофазному синтезу лигандов ПСМА с аминogруппой как точкой последующего конъюгирования.....	96
3.3 Синтез направленных на ПСМА систем совместной доставки	105
3.3.1 Синтез лигандов ПСМА, пригодных для создания бимодальных конъюгатов и оценка их ингибирующей активности	106
3.3.2 Синтез конъюгата сравнения с терапевтическим агентом монометил ауристатин Е	112
3.3.3 Синтез бимодального конъюгата с монометил ауристатином Е и испинесибом	121

3.3.4 Синтез серии бимодальных конъюгатов с ингибиторами тубулина и абиратероном/энзалутамидом.	126
4. Экспериментальная часть	143
4.1. Общая информация	143
4.2. Синтез соединений	144
4.3. <i>In vitro</i> исследования полученных соединений	223
4.4. <i>In vivo</i> исследования полученных соединений	225
5. Заключение	229
6. Список литературы	232

1. Введение

Актуальность исследования. Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым онкологическим заболеванием среди мужчин по количеству диагностируемых случаев.[1] 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.[2–4] 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).[5] 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.[6,7] 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.[8,9]

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.[10–12] 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.[13–15]

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 спектроскопии 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 [16–20] 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, 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.*

2. Обзор литературы

Данная работа посвящена синтезу и изучению новых лигандов простатического мембранного антигена и исследованию их применения в качестве платформ для совместной доставки терапевтических агентов с разным механизмом действия. В связи с этим, в обзоре литературы рассмотрены строение и особенности функционирования ПСМА, структура, синтез и эффективность связывания лигандов ПСМА, при этом особое внимание уделено лигандам на основе мочевины DCL. Также в обзоре проанализированы подходы к получению мономодальных терапевтических конъюгатов и бимодальных диагностических и тераностических систем доставки, направленных на ПСМА.

2.1 Простатический специфический мембранный антиген как мишень для направленной доставки в опухолевые ткани

Простатический специфический мембранный антиген (ПСМА), также известный как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), фолатгидралаза I, (FOLH1) и N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALDase I) является трансмембранным белком, открытым в 1987 году.[21] На данный момент известно, что он экспрессируется в клетках головного мозга, тонкого кишечника, почек, слюнных желёз и предстательной железы.[22–25] В опухолевых клетках предстательной железы наблюдается сверхэкспрессия ПСМА, уровень которой может превосходить в 1000 раз уровень экспрессии данного белка в здоровых клетках.[26] Экспрессия ПСМА увеличивается с прогрессией РПЖ.[27]

Глутаматкарбоксипептидаза II представляет собой трансмембранный белок, в структуру которого входит 750 аминокислотных остатков.[28] Молекулу можно разделить на три участка: внутриклеточный – 19 аминокислотных остатков; трансмембранный – 24 аминокислотных остатка; внеклеточный – 707 аминокислотных остатков (Рисунок 2.1). Внеклеточный участок содержит в своей структуре активный сайт связывания белка, содержащий два иона цинка. В сайте связывания осуществляется расщепление N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата (NAAG) на L-глутамат и N-ацетил-L-аспартат (NAA). Также данный сайт отвечает за расщепление полиглутамат фолата (от одного до шести остатков глутаминовой кислоты, связанных между собой амидными связями γ -карбоксильных и α -амино групп) на моноглутамат фолат и глутамат.

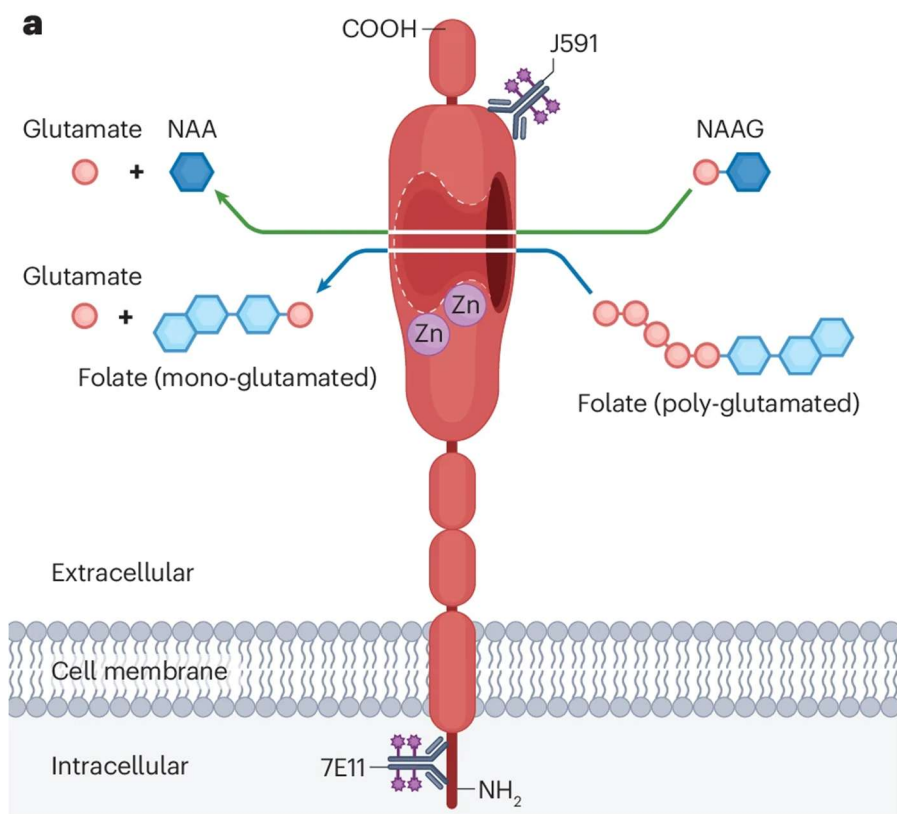


Рисунок 2.1. Схематическое изображение структуры ПСМА и его функций.[29] Синяя стрелка иллюстрирует расщепление полиглутамат фолата и высвобождение глутамата.

Зеленая стрелка иллюстрирует расщепление NAAG.

Рентгеноструктурные исследования внешнечеточного участка показали, что каждый ион цинка активного сайта связывания координирован тремя аминокислотными остатками: гистидином (His-553 или -377), аспартатом (Asp-453) или глутаматом (Glu-425) и мостиковым аспартатом (Asp-387).[30] Также в качестве мостикового лиганда выступает молекула воды (Рисунок 2.2). Замена данных аминокислотных остатков сайт-направленным мутагенезом приводит к значительному снижению ферментативной активности белка.[31]

Также, в рамках рентгеноструктурных исследований ПСМА,[30] было определено, как NAAG связывается с активным сайтом белка и предложен механизм последующего расщепления субстрата (Рисунок 2.2).

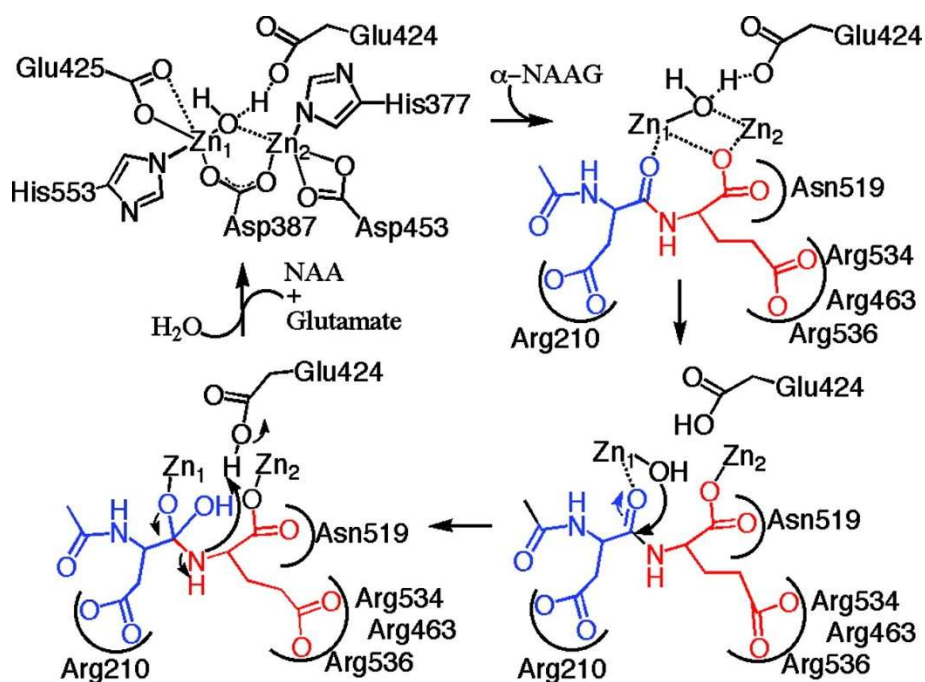


Рисунок 2.2. Схема взаимодействия NAAG с активным сайтом ПСМА и предполагаемый механизм расщепления субстрата на NAA и глутамат.[30]

Согласно предложенному авторами механизму (Рисунок 2.2), первоначальное связывание субстрата осуществляется за счёт четырёх типов взаимодействий: 1) электростатические взаимодействия аргининовой триады (Arg463, Arg534 и Arg536) с γ -карбоксильной группой остатка глутаминовой кислоты; 2) электростатическое взаимодействие остатка аргинина (Arg210) с β -карбоксильной группой фрагмента аспартата; 3) водородная связь аргинина (Asn519) с С-концевой карбоксильной группой субстрата; 4) координация атомов кислорода глутаматного и аспартатного фрагментов ионами цинка. Дальнейшее расщепление субстрата происходит за счёт нуклеофильной атаки молекулы воды, координированной атомами цинка, по атому углерода амидной группы. В результате образуется тетраэдрический интермедиат и далее разрывается пептидная связь. На последней стадии происходит выведение продуктов реакции (N-ацетиласпартата и глутамата) из активного сайта связывания и введение туда новой молекулы воды.

Опираясь на данные рентгеноструктурного анализа, молекулярного докинга и предполагаемый механизм гидролиза NAAG, активный сайт связывания разделяют на два кармана (Рисунок 2.3).[32] Карман S1' является глутамат-чувствительным и отвечает за связывание глутаратного фрагмента остатка глутаминовой кислоты.[33,34] Карман S1 отвечает за связывание NAA фрагмента субстрата и считается не-фармакофорным. В отличие от кармана S1', который имеет примерные размеры $8 \times 8 \times 8 \text{ \AA}$, [35] карман S1 можно описать как воронку с узким основанием ($\sim 8 \text{ \AA}$) в месте расположения ионов цинка

активного сайта, и ободком воронки (приблизительный диаметр 20 Å) на расстоянии 20 Å от основания. Также отдельно выделяют два атома цинка и молекулу воды, координированную с ними, как фрагмент, непосредственно участвующий в гидролизе пептидной связи. Исходя из этого структуру лигандов разделяют на фрагменты P1, P1' и ZBG (цинк-связывающая группа).

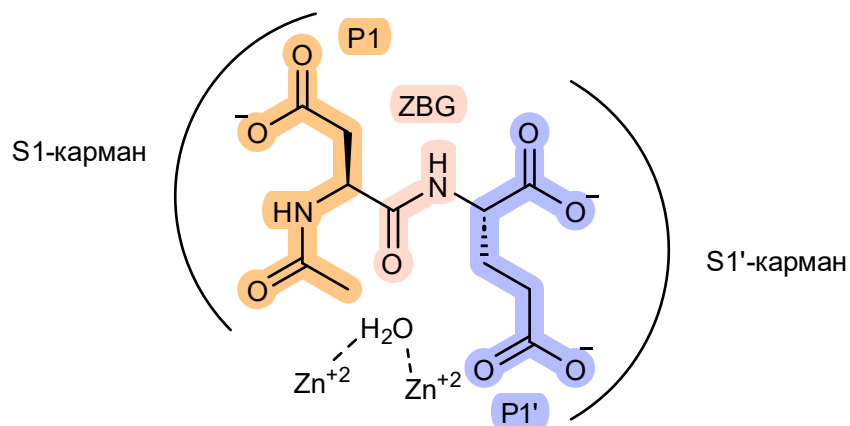


Рисунок 2.3. Схематическое изображение активного сайта связывания ПСМА с обозначением «карманов» и того, с какими фрагментами NAAG они взаимодействуют. P1 – оранжевый; P1' – синий; ZBG – розовый.

Дальнейшие исследования белка, а именно анализ структуры вокруг цинкового сайта и на пути к нему, показали, что рядом с карманом S1, который отвечает за связывание остатка N-ацетиласпартата, имеется крупный гидрофобный карман (Рисунок 2.4).[36]

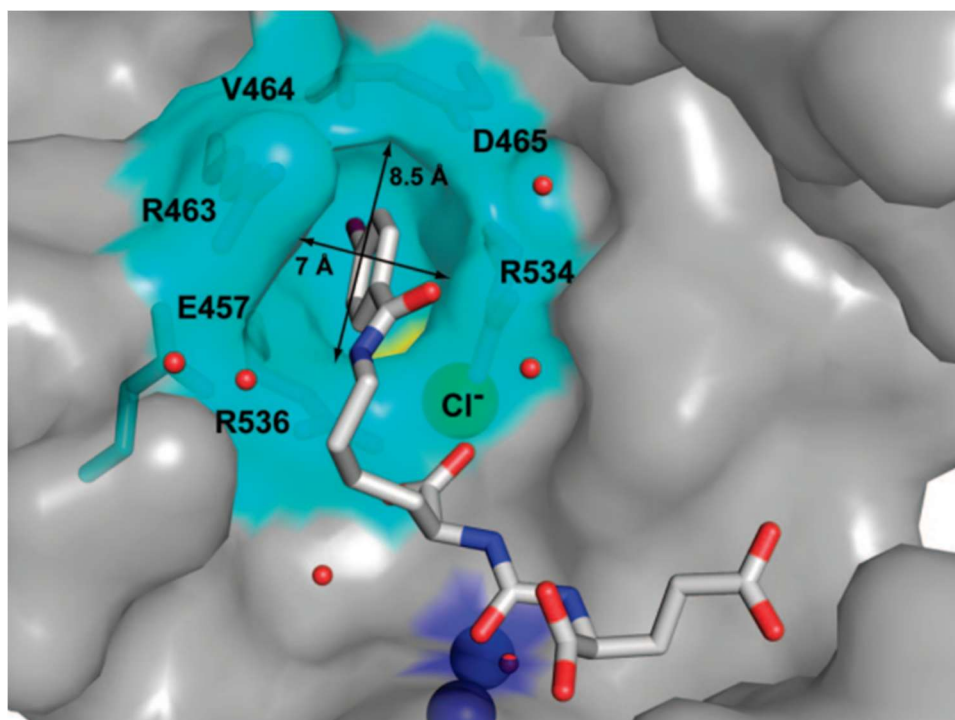


Рисунок 2.4. Схема структуры гидрофобного кармана при кармане S1. В качестве субстрата – лиганд ПСМА DCIBzL. Разрез субстрат-связывающей полости GCPH показан

в виде серой полупрозрачной поверхности. Боковые цепи аминокислот, очерчивающих «вспомогательный гидрофобный карман», показаны в виде палочек и окрашены в голубой цвет. Активный сайт Zn^{2+} и S1-связанный Cl^- окрашены в синий и желтый цвета, соответственно, а молекулы воды представлены красными сферами.

В более поздних работах было продемонстрировано, что имеется ещё два гидрофобных кармана на пути к активному сайту связывания (Рисунок 2.5).[37] Данные карманы (T2 и T3 на Рисунке 2.5) могут дополнительно влиять на эффективность связывания различных субстратов за счёт гидрофобных взаимодействий.

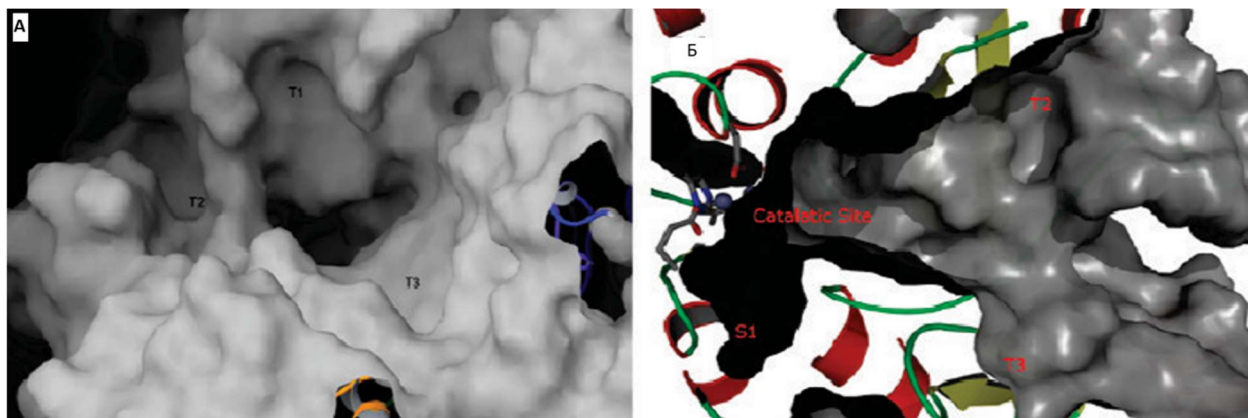


Рисунок 2.5. Изображение постепенно сужающегося туннеля глубиной 20 Å, ведущего от поверхности белка к активному сайту (А – вид сверху и Б – вид сбоку). T1, T2 и T3 обозначают гидрофобные карманы в структуре туннеля.

Таким образом, на данный момент в литературе представлены обширные данные о структуре ПСМА и механизмах взаимодействия этого белка с низкомолекулярными субстратами, что позволяет создавать высокоэффективные ингибиторы данного фермента, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве платформ для направленной доставки терапевтических и диагностических агентов.

2.2 Лиганды ПСМА

На данный момент в литературе описано несколько групп лигандов, специфичных по отношению к ПСМА.[5,34] Все представленные ингибиторы можно разделить на две группы: лиганды-аналоги переходного состояния и лиганды-аналоги субстрата (Рисунок 2.6).

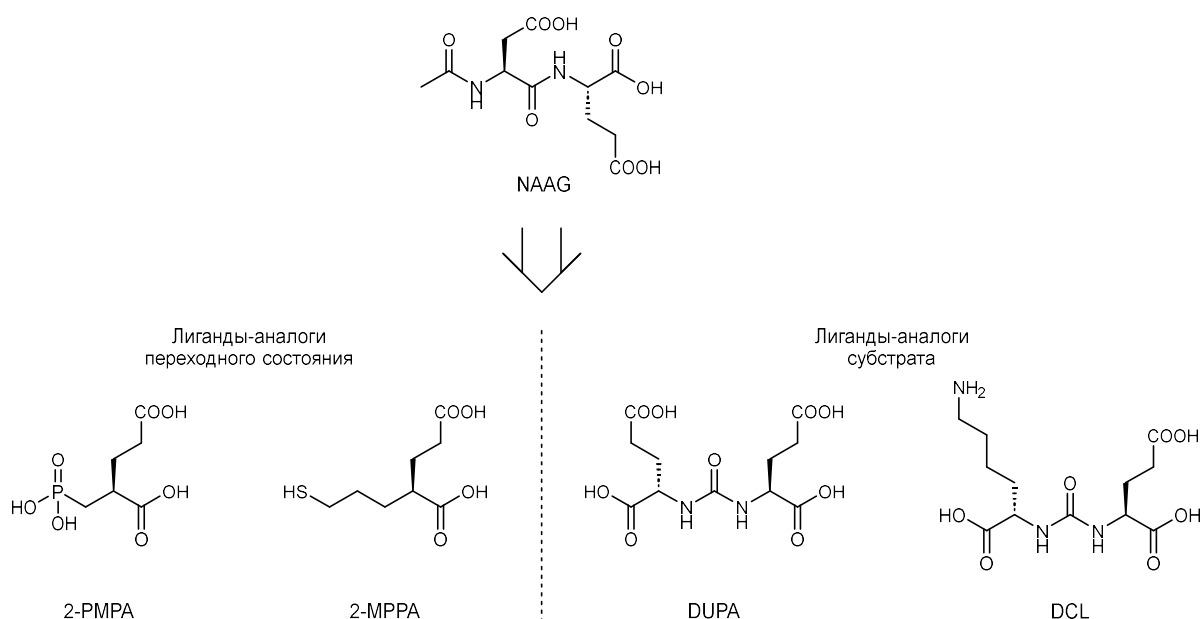


Рисунок 2.6. Основные группы лигандов ПСМА и примеры их представителей.

Лиганды – аналоги переходного состояния созданы на основе структуры интермедиата, образующегося в процессе гидролиза NAAG и исторически являются первыми высокоэффективными ингибиторами ПСМА. Наиболее распространёнными лигандами из данной группы являются соединения на основе фосфиновых и фосфиновых кислот, а также производные тиолов.

Лиганды – аналоги субстрата представляют собой соединения, схожие с NAAG, однако, связь между фрагментом молекулы, связывающимся в кармане S1', и фрагментом, взаимодействующим с карманом S1, не подвергается гидролизу после связывания с активным сайтом за счёт устойчивости в подобных условиях. Наиболее часто встречающимися примерами подобных лигандов являются различные производные мочевины.

2.2.1 Лиганды – аналоги переходного состояния

Первые ингибиторы ПСМА были представлены в литературе с начала 1990-х годов, однако в связи с недостатком данных о структуре белка первые представители лигандов ПСМА обладали довольно низкой ингибирующей активностью и селективностью.[38,39] Однако уже к середине того же десятилетия были описаны первые эффективные ингибиторы ПСМА, а именно производные фосфиновых и фосфиновых кислот (Рисунок 2.7).[40] В рамках публикации были представлены три ингибитора NAALADase, два из которых являются производными фосфиновой кислоты (соединения **1** и **2**), а один – фосфиновой (**3**).

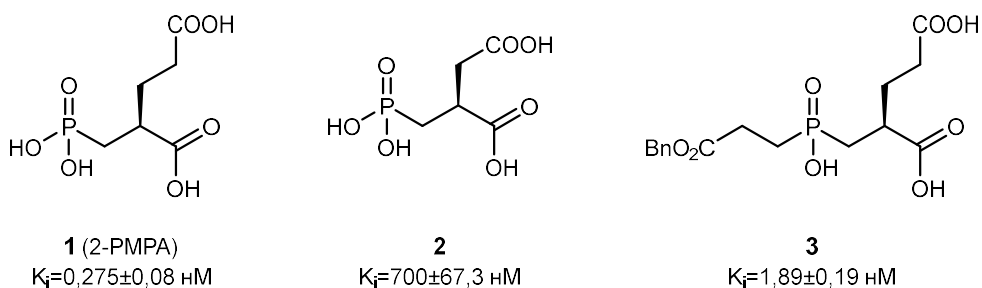


Рисунок 2.7. Структура первых лигандов на основе фосфорорганических кислот.

Наиболее высокую ингибирующую активность ($K_i = 0,28 \pm 0,08 \text{ нМ}$; $IC_{50} = 0,3 \text{ нМ}$) продемонстрировало соединение **1** – 2-(фосфонометил)пентадиовая кислота (2-РМРА). При этом его аналог (**2**), содержащий на один метиленовый фрагмент меньше, показал значительно более низкое значение константы ингибирования ($K_i = 700 \pm 67 \text{ нМ}$). Это позволяет утверждать, что данный глутаратный фрагмент играет ключевую роль во взаимодействии с активным сайтом связывания. Соединение **3**, являющееся производным фосфиновой кислоты, хоть и уступает в эффективности ингибирования 2-РМРА, в тоже время имеет боковую цепь, содержащую сложноэфирную группу, которая может быть подвергнута последующей модификации. Таким образом, на основе соединения **3** потенциально могло осуществляться создание диагностических или терапевтических конъюгатов.

В дальнейшем на основе 2-РМРА был создан обширный набор различных лигандов.[41–43] Однако даже наиболее эффективные из полученных соединений (Рисунок 2.8, соединения **4-6**) не продемонстрировали такой же эффективности ингибирования расщепления NAAG, как соединение **1**.

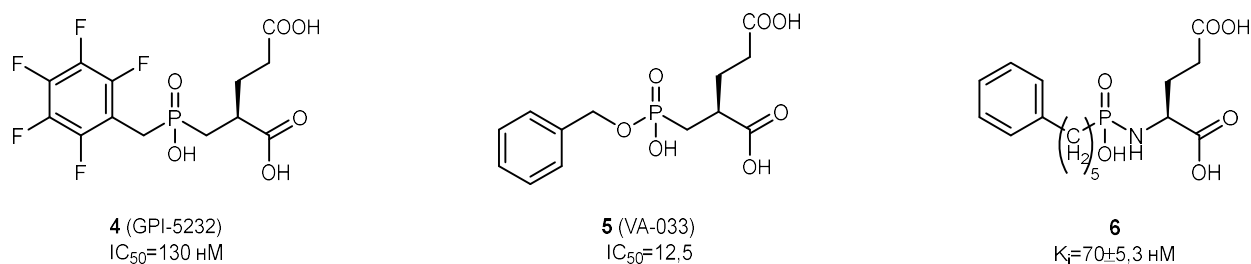


Рисунок 2.8. Лиганды ПСМА, полученные на основе 2-РМРА.

Также были проведены доклинические исследования, посвящённые использованию 2-РМРА в качестве препарата при заболеваниях, которые могут быть вызваны избыточным выделением глутамата в организме.[44–46] Серьёзным недостатком подобного типа лигандов является низкая пероральная биодоступность, в связи с чем данные соединения не нашли широкого применения в практике.

Другой обширной группой лигандов-аналогов переходного состояния являются лиганды, содержащие тиольную группу. В первой работе, посвящённой данному типу

ингибиторов GСPII, авторы провели исследования ряда соединений, содержащих глутаровый фрагмент и тиольную группу, с различной длиной углеводородной цепи (Рисунок 2.9, соединения **7a-f**).[47]

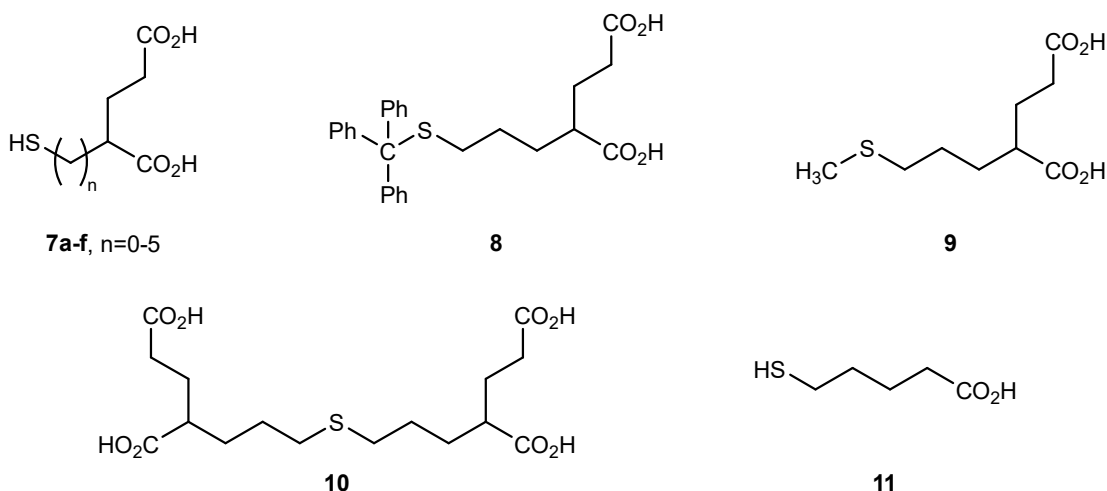


Рисунок 2.9. Структуры ряда тиол-содержащих лигандов ПСМА.

Также авторы оценили влияние модификации меркаптогруппы на ингибирующую способность и синтезировали ряд алкилированных аналогов (Рисунок 2.9, соединения **8-10**). Кроме этого, в рамках работы исследовалось влияние глутарового фрагмента на аффинность к мишени. Для этого авторы провели сравнительные исследования активности 5-меркаптопентановой кислоты (Рисунок 2.9, соединение **11**). Обобщённые значения IC_{50} для представленных в работе тиол-содержащих лигандов представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Значения IC_{50} для тиол-содержащих лигандов, описанных в работе [47]

Соединение	$IC_{50} \pm SD$, нМ
7a , (n=0)	2600 $\pm$ 800
7b , (n=1)	6000 $\pm$ 2800
7c , (n=2)	580 $\pm$ 190
7d , (n=3)	90 $\pm$ 26
7e , (n=4)	1100 $\pm$ 200
7f , (n=5)	2600 $\pm$ 500
8	>10000
9	6500 $\pm$ 1500
10	3100 $\pm$ 1500
11	1400 $\pm$ 500

Как видно из представленных значений IC_{50} , наилучшее ингибирование достигается при наличии трёх метиленовых фрагментов между глутаровым фрагментом и меркаптогруппой (соединение **7d**, также известно как 2-MPPA – 2-(3-меркаптопропил)пентадиовая кислота). При этом, модификация **7d** за счёт алкилирования приводит к значительному снижению эффективности ингибирования. Представленные данные демонстрируют значительное влияние наличия глутаратного фрагмента в структуре молекулы. Стоит также отметить, что хотя соединение 2-MPPA уступает 2-PMPA в

эффективности ингибирования, в тестах на животных моделях периферической невропатии оно продемонстрировало значительно более высокую пероральную биодоступность и эффективность.

В дальнейшем на основе 2-MPPA был получен набор лигандов, где модификации был подвергнут фрагмент P1. Так, использование данного подхода привело к созданию лигандов содержащих различные ароматические фрагменты (Рисунок 2.10).[48]

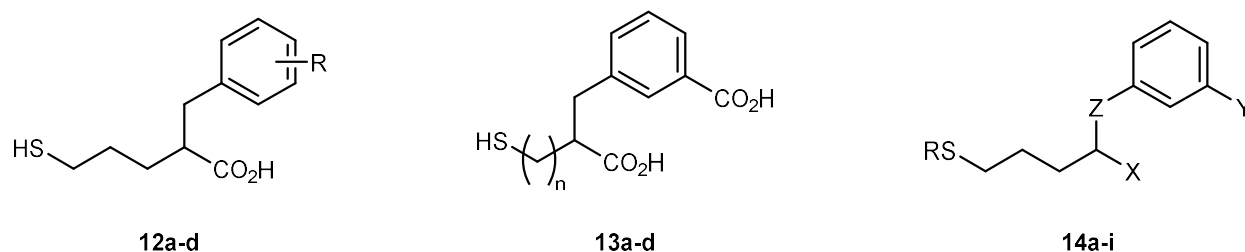


Рисунок 2.10. Тиол-содержащие лиганды с ароматическими фрагментами.

На первом этапе авторы осуществили замену глутаратного фрагмента на фрагмент 3-фенилпропановой кислоты или аналог с карбокси-группой в различных положениях кольца (**12a-d**). Полученные данные исследований ингибирующей активности (Таблица 2.2) показали, что наличие карбоксильной группы в 3 положении (**12c**, СМВА) приводит к наиболее высокой эффективности. Наличие данной группы в 4 положении (**12d**) приводит к некоторому падению активности, а в случае 2-замещённого лиганда или аналога, не содержащего карбоксильную группу в ароматическом фрагменте (**12a** и **12b**), значения IC_{50} находятся в микромолярном диапазоне, что говорит о значительно более низкой ингибирующей способности данных соединений.

Следующим этапом работы стало исследования влияния длины углеводородной цепи между фрагментом P1' и меркаптогруппой (соединения **13a-d**). Было показано, что любое изменение длины данного фрагмента приводит к значительному снижению ингибирующей активности, что дополнительно подтверждало данные, представленные в более ранних публикациях.[47] При этом выделить линейной зависимости между длиной этого фрагмента и активностью не представляется возможным.

На последнем этапе авторы синтезировали обширную серию лигандов на основе соединения **12c**. Модификации подвергались меркаптогруппа, карбоксильные группы как при ароматическом фрагменте, так и при алифатическом, а также проводилась замена бензильной метиленовой группы на гетероатом (соединения **14a-i**). Исследования ингибирующей способности полученных соединений показали, что замещение карбоксильной группы на сложноэфирную, амидную или циано-группу в любом из фрагментов (соединения **14c-g**) приводит к значительному уменьшению активности. Были дополнительно подтверждены данные, согласно которым алкилирование меркапто-группы

(соединения **14a** и **14b**) также приводит к значительному уменьшению активности. При этом соединения **14h** и **14i** продемонстрировали значения IC_{50} , сопоставимые с исходным лигандом **12c**. Кроме того, три этих соединения превосходят по данному параметру 2-MPPA ($IC_{50}(2-MPPA)=90\pm 26$ нМ).

Таблица 2.2. Обобщённые данные *in vitro* исследований лигандов **12a-d**, **13a-d** и **14a-i**.

<i>Исследование влияния положения заместителя в ароматическом фрагменте</i>					
Соединение		R		IC ₅₀ ±SD, нМ	
12a		H		1400±600	
12b		2-COOH		1700±100	
12c (CMBA)		3-COOH		15±10	
12d		4-COOH		63±32	
<i>Исследование влияния углеводородного радикала</i>					
Соединение		n		IC ₅₀ ±SD, нМ	
13a		1		440±180	
13b		2		1100±400	
13c		4		390±260	
13d		5		190±70	
<i>Исследования аналогов лиганда 12c</i>					
Соединение	R	X	Y	Z	IC ₅₀ ±SD, нМ
14a	CH ₃	CO ₂ H	CO ₂ H	CH ₂	>20000
14b	Ph ₃ C	CO ₂ H	CO ₂ H	CH ₂	>20000
14c	H	CO ₂ CH ₃	CO ₂ H	CH ₂	730±300
14d	H	CONH ₂	CO ₂ H	CH ₂	640±90
14e	H	CO ₂ H	CO ₂ CH ₃	CH ₂	2700±1700
14f	H	CO ₂ H	CONH ₂	CH ₂	2200±400
14g	H	CO ₂ H	CN	CH ₂	1800±800
14h	H	CO ₂ H	CO ₂ H	O	14±7
14i	H	CO ₂ H	CO ₂ H	S	32±14

В дальнейшем была также получена серия лигандов на основе 2-MPPA и CMBA, содержащая индольный фрагмент.[49] Однако, все синтезированные соединения (Рисунок 2.11) демонстрировали ингибирующую активность, сопоставимую или уступающую 2-MPPA и CMBA.

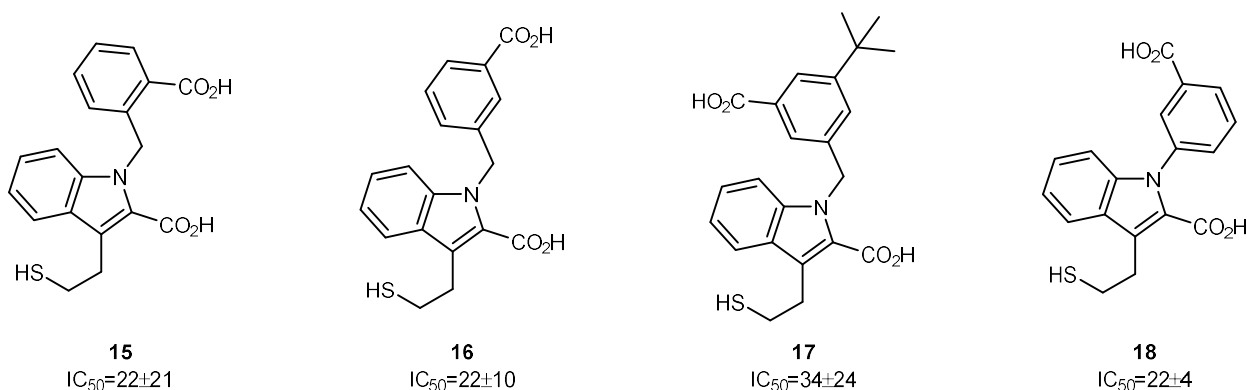


Рисунок 2.11. Примеры наиболее эффективных лигандов ПСМА с индольным фрагментом.

Несмотря на то, что тиолсодержащие лиганды ПСМА обладают гораздо более высокой биодоступностью в сравнении с фосфорсодержащими аналогами, они также не нашли обширного применения в связи их относительно низкой устойчивостью в условиях *in vivo* и невысокой аффинностью к мишени.[5] Кроме того, дополнительные модификации данных соединений приводят к значительному снижению ингибирующей активности, что в свою очередь, накладывает ограничение на возможность создания на их основе конъюгатов с различными терапевтическими или диагностическими агентами.

2.2.2 Лиганды – аналоги субстрата

Другой большой группой лигандов ПСМА являются лиганды-аналоги субстрата. Основной идеей при их дизайне стала замена фрагмента цинк-связывающей группы (ZBG) на некий фрагмент, который не будет подвергаться гидролизу в данных условиях (Рисунок 2.12).

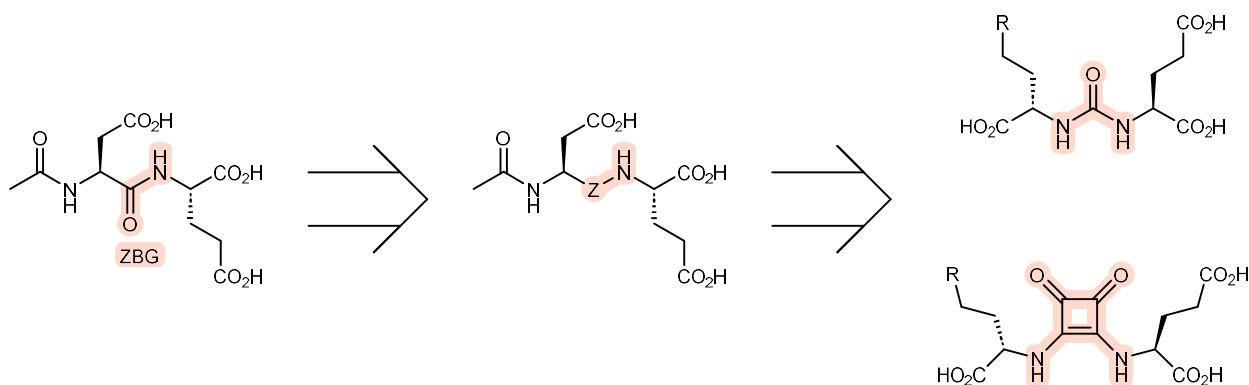


Рисунок 2.12. Схема замены ZBG в лигандах ПСМА.

На данный момент наибольшее распространение получили лиганды, в которых в качестве цинк-связывающей группы используется мочевиный фрагмент. Однако исторически первой была другая замена ZBG (Рисунок 2.13).[50]

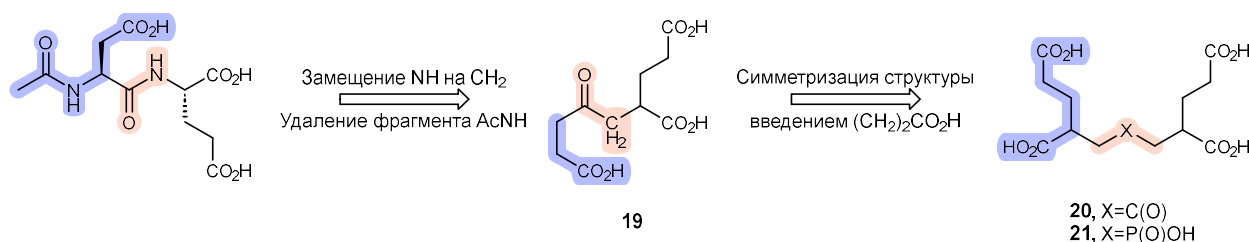


Рисунок 2.13. Стратегия дизайна лигандов с заменой ZBG на карбонильный и фосфиновый фрагменты.

На первом этапе дизайна нового лиганда авторы решили убрать расщепляемую ПСМА амидную связь путём замены атома азота на метиленовый фрагмент. Также они удалили из структуры молекулы ацилированную аминогруппу аспартата, так как она не была обязательной для эффективного связывания с белком.[38] На следующем этапе

оптимизации структуры осуществили симметризацию структуры путём введения в структуру второго фрагмента пентандиовой кислоты. Были получены три лиганда ПСМА (**19-21**) и проведена оценка их ингибирующей способности (Таблица 2.3).

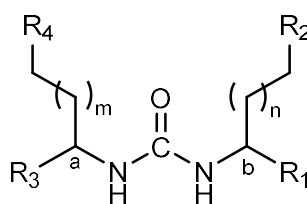
Таблица 2.3. Значения IC_{50} полученных для соединений **19-21**.

Соединение	$IC_{50} \pm SD$, нМ
19	35% ингибирования при 100 μ M
20	—
21 (смесь изомеров)	22 ± 2
(<i>R,R</i>)/(<i>S,S</i>)- 21 ^a	84 ± 21
(<i>S,S</i>)/(<i>R,R</i>)- 21 ^a	$6,9 \pm 0,7$
<i>мезо</i> - 21	22 ± 6

^a Абсолютная стереохимия не установлена

Как видно из представленных в Таблице 3 значений IC_{50} , введение в структуру карбонильной группы вместо амидной приводит к большому падению активности (**19**) или её полному отсутствию (**20**). При этом лиганд **21**, содержащий остаток фосфиновой кислоты, продемонстрировал наномолярные значения IC_{50} . Также стоит отметить, что один из энантиомеров соединения **21** превосходит *мезо*-форму, второй энантиомер и их смесь в активности. Однако в рамках данной работы авторами не была установлена абсолютная стереохимия выделенных индивидуальных изомеров, что не позволило установить предпочтительную конфигурацию стереоцентров лиганда.

Следующим шагом в развитии данного подхода стало замещение фосфинового фрагмента на мочевиный.[51] На основе рассмотренной выше работы авторы синтезировали серию лигандов ПСМА, содержащих мочевиный мостик (Рисунок 2.14).



22a-h

$R_1, R_2, R_3, R_4 = CO_2H, SH, SBut$
 $m, n = 0, 1$
 $a, b = S, R$

Рисунок 2.14. Общая структура лигандов с мочевиным мостиком, полученных в работе [51].

Используемый авторами синтетический подход позволял получать энантиомерно чистые конечные соединения. Значения IC_{50} , полученные для данной серии ингибиторов GCP II, представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.4. Значения IC₅₀ полученные для соединений **22a-h**

Соединение	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	m	n	a	b	IC ₅₀ ±SD, нМ
22a (DUPA)	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	1	1	<i>S</i>	<i>S</i>	47±5
22b	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	1	1	<i>R</i>	<i>R</i>	67% ингибирования при 100 μМ
22c	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	1	1	<i>R</i>	<i>S</i>	25% ингибирования при 1 μМ
22d	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	0	0	<i>S</i>	<i>S</i>	~3800
22e	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	0	1	<i>S</i>	<i>S</i>	46±1
22f	CO ₂ H	SH	CO ₂ H	SH	0	0	<i>R</i>	<i>R</i>	Неактивен при 1 μМ
22g	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	SBU ^t	0	1	—	<i>S</i>	29±6
22h	CO ₂ H	CO ₂ H	CO ₂ H	SH	0	1	<i>R</i>	<i>S</i>	6,9±0,4

Исходя из представленных в работе данных можно утверждать, что наличие в молекуле остатка *L*-глутаминовой кислоты является предпочтительным. Влияние второго стереоцентра менее значимо для эффективного связывания с белком. Также, можно отметить, что варьирование второго аминокислотного остатка (соединения **22e**, **22g**, **22h**) открывает широкий простор для различных модификаций. При этом соединение **22a** (DUPA – 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]пентадиовая кислота), хотя и уступает в ингибирующей способности некоторым другим полученным в данной работе лигандам, имеет обширный потенциал для модификации за счёт карбоксильной группы. Также данный лиганд считается более стабильным в сравнении с более эффективным ингибитором **22h**. В связи с этим, именно он стал основой для дальнейших исследований, а позднее и для ряда конъюгатов.

Одним из таких исследований стала работа, посвящённая синтезу аналогов DUPA, в которых была осуществлена биоизостерическая замена карбоксильной группы на тетразольный фрагмент (Рисунок 2.15).[52]

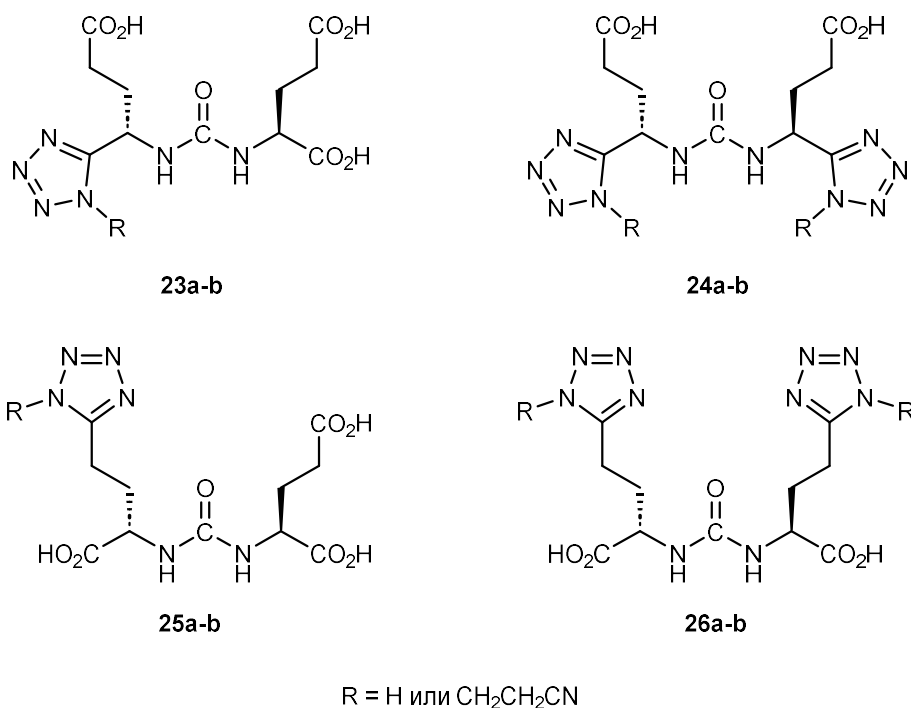


Рисунок 2.15. Структуры аналогов DUPA, содержащих тетразольный фрагмент.

In vitro исследования полученных соединений (**23-26**, значения K_i приведены в Таблице 2.5) подтвердили ранее представленные в литературе данные о влиянии структурных мотивов на эффективность ингибирования. Так, было показано, что отсутствие хотя бы одного остатка глутаминовой кислоты (**24a-b**, **26a-b**) приводит к значительному снижению аффинности к мишени. При этом в случае замещения обоих γ -карбоксильных фрагментов на тетразольный цикл (**26a**) снижение ингибирующей активности не настолько существенно, как при замене другой пары карбоксильных фрагментов (**24a-b**). Однако, при введении в тетразольный цикл заместителя (**26b**) значение константы ингибирования возрастает более чем на два порядка в сравнении с незамещённым аналогом (**26a**).

Таблица 2.5. Значения K_i полученные для соединений **23-26**.

Соединение	R	K_i , нМ
DUPA	—	8,0
23a	H	335
23b	CH ₂ CH ₂ CN	2711
24a	H	4388
24b	CH ₂ CH ₂ CN	>100000
25a	H	0,9
25b	CH ₂ CH ₂ CN	5,3
26a	H	14,9
26b	CH ₂ CH ₂ CN	4434

Также полученные данные продемонстрировали необходимость наличия карбоксильной группы во втором аминокислотном остатке при углеродном атоме,

связанном с мочевиным фрагментом (**23a-b**). Введение тетразольного фрагмента (**23a**) приводит к увеличению значения K_i в более чем 40 раз, а наличие заместителя в цикле (**23b**) приводит к получению значений K_i , находящихся в микромолярном диапазоне. При этом, замещение только одной γ -карбоксильной группы на подобный гетероциклический фрагмент приводит к увеличению аффинности к ПСМА (**25a**). Это вызвано наличием рядом с цинковым сайтом связывания кармана, имеющего сродство к ароматическим фрагментам. При этом введение заместителя в тетразольный цикл не приводит к существенному снижению эффективности ингибирования, что открывает широкий простор для последующей модификации данного положения различными диагностическими или терапевтическими агентами.

Ещё в одном исследовании, посвящённом модификации структуры лиганда DUPA, авторы осуществили замену мочевиного фрагмента на тиомочевинный.[53] Исходя из того, что ионы цинка (II) обладают высоким сродством к атомам серы (в том числе и в тиомочевинном фрагменте),[54,55] авторы рассчитывали на выявление более высокой ингибирующей активности у тиомочевинного аналога DUPA. Однако, замена атома кислорода на атом серы привела к увеличению значения IC_{50} в сто раз.

Другим направлением развития дизайна лигандов на основе мочевины стал синтез соединения **27**, также известного как ZJ-43 (Рисунок 2.16).[56]

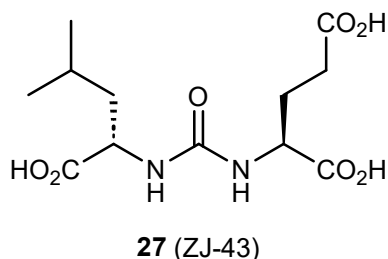


Рисунок 2.16. Структура лиганда ZJ-43.

Данный лиганд является уреидом глутаминовой кислоты и лейцина. Наличие в остатке лейцина гидрофобного фрагмента повысило эффективность связывания с карманом S1. Константа ингибирования данного соединения составила 0,8 нМ, что в 10 раз меньше в сравнении с лигандом DUPA ($K_i(\text{DUPA}) = 8 \text{ нМ}$). За счёт такой высокой аффинности к мишени ZJ-43, наряду с некоторыми другими ингибиторами GСРII, прошёл широкий спектр доклинических исследований как препарат для снижения нейропатической и воспалительной боли.[57]

Следующим шагом в развитии данного класса лигандов стало создание несимметричного ингибитора ПСМА, представляющего из себя уреид глутаминовой кислоты и лизина (Рисунок 2.17, соединение **28**).[8] На основе данного производного, также известного как DCL (*N*-[*N*-[(*S*)-1,3-дикарбоксипропил]карбамоил]-(*S*)-l-лизин) была

получена серия более сложных лигандов, содержащих ароматический фрагмент, сочленённый с ϵ -аминогруппой лизина через метиленовый фрагмент (**29a-i**), мочевиный мостик (**30a-e**), мочевиный мостик с метиленовым фрагментом (**31**) и сульфамидную группу (**32**).

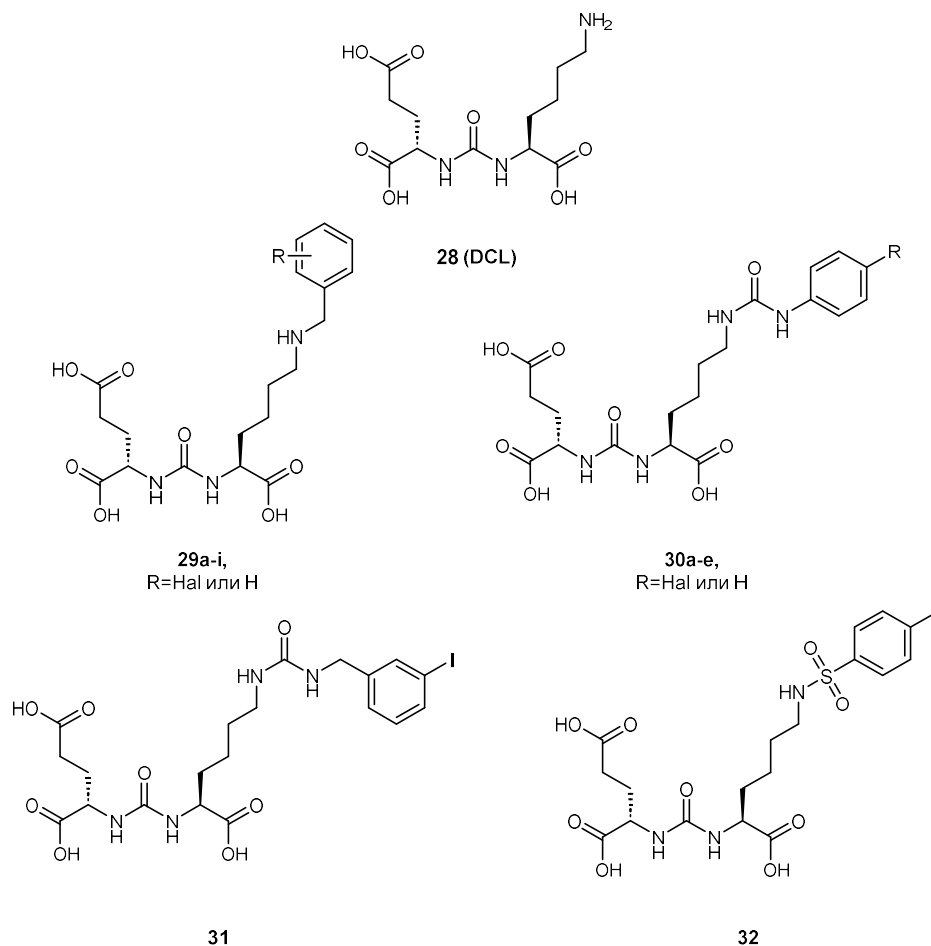


Рисунок 2.17. Структура DCL и его производных с ароматическим фрагментом при ϵ -аминогруппе лизина.

Последующие *in vitro* исследования данной серии лигандов (Таблица 2.6) показали, как положение заместителя в ароматическом кольце и его природа влияют на эффективность связывания с мишенью.

Серия бензил-содержащих лигандов **29** продемонстрировала, что наибольшая эффективность ингибирования достигается для производных, содержащих галоген в *пара*-положении (**29a**, **29d**, **29e**; за исключением **29h**). В случае иод-замещённых лигандов, *мета*-замещённое производное **29c** значительно уступало в аффинности как *пара*-производному **29a**, так и *орто*-производному **29b**. При этом хлор-содержащие лиганды демонстрировали существенное снижение аффинности относительно *пара*-замещённого аналога **29e** и в случае *мета*-производного **29g** и в случае *орто*-производного **29f**. Стоит отметить, что

лиганды с атомом фтора в *пара*-положении (**29h**) и незамещённым ароматическим фрагментом (**29i**) показали значительно более низкую эффективность ингибирования.

Таблица 2.6. Значения IC₅₀ полученные для лигандов **28-32**.

Соединение	R	IC ₅₀ , нМ
28 (DCL)	—	498
29a	<i>p</i> -I	22
29b	<i>o</i> -I	37
29c	<i>m</i> -I	443
29d	<i>p</i> -Br	43
29e	<i>p</i> -Cl	2
29f	<i>o</i> -Cl	245
29g	<i>m</i> -Cl	277
29h	<i>p</i> -F	1200
29i	H	2960
30a (MIP-1095)	<i>p</i> -I	10
30b	<i>p</i> -Br	2
30c	<i>p</i> -Cl	4
30d	<i>p</i> -F	3
30e	H	12
31	<i>m</i> -I	18
32	<i>p</i> -I	10

Введение в структуру вместо метиленового фрагмента мочевиного мостика (**30a-e**) привело к значительному увеличению аффинности в случае лигандов, содержащих фтор (**30d**) и незамещённый ароматический фрагмент (**30e**). Также некоторое увеличение аффинности наблюдалось для *p*-Br и *p*-I производных (**30a-b**). В случае с хлор-содержащим лигандом **30c** существенных изменений аффинности не наблюдалось. Использование сульфамидного фрагмента (**32**) и метил-мочевиного мостика (**31**) также приводило к довольно высокой эффективности ингибирования. Исходя из этого, было предположено, что кроме взаимодействия кармана с ароматическим фрагментом, серьёзное влияние на связывание может оказывать и способ сочленения данного фрагмента с амино-группой лизина.

В дальнейшем на основе лигандов **29a** и **30a** были получены аналоги, меченные ¹²³I.[58] Данные соединения показали в исследованиях *in vivo* на ксенографтных моделях большой потенциал в качестве препаратов для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

Рассмотренные выше данные о влиянии способа сочленения ароматического фрагмента с атомом азота привели к созданию серии лигандов на основе мочевины DCL с различными фрагментами при ϵ -аминогруппе лизина.[59] В указанной работе была синтезирована обширная серия ингибиторов ПСМА, однако наибольший интерес представляют четыре лиганда **33a-b** и **34a-b** (Рисунок 2.18).

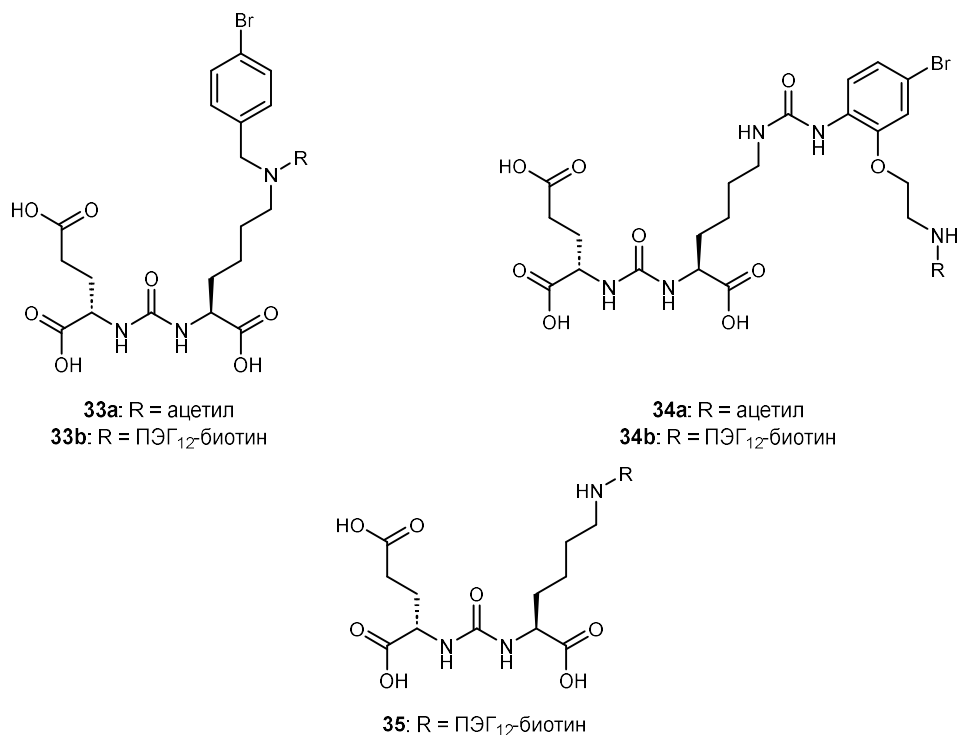


Рисунок 2.18. Структура лигандов, представленных в работе [59].

Было предложено два варианта введения линкера, один из которых предполагал связывание через ароматический фрагмент, а второй – через атом азота лизина. Модельные соединения **33a** и **34a** с ацетильным фрагментом продемонстрировали субнаномолярные значения константы ингибирования ($K_i(\mathbf{33a}) = 0,045 \pm 0,006$ нМ; $K_i(\mathbf{34a}) = 0,22 \pm 0,03$ нМ). Лиганды **33b** и **34b**, содержащие полиэтиленгликолевый линкер и биотиновый фрагмент для создания наночастиц, показали меньшую ингибирующую активность: $K_i(\mathbf{33b}) = 1,57 \pm 0,07$ нМ; $K_i(\mathbf{34b}) = 3,9 \pm 0,4$ нМ. При этом данные соединения превосходят в ингибирующей способности лиганд **35**, не содержащий ароматического фрагмента при атоме азота ($K_i(\mathbf{35}) = 11 \pm 1$ нМ). Из этих данных можно сделать вывод, что введение ароматического фрагмента к атому азота лизина является эффективной стратегией для увеличения аффинности к мишени, при этом последующая модификация ароматического фрагмента или атома азота лизина позволяет вводить различные объёмные функциональные фрагменты с сохранением высокой аффинности к мишени.

В дальнейшем, с опорой на эти данные, была получена серия соединений, содержащих кроме бензильного ароматического фрагмента при атоме азота лизина жёсткий линкерный фрагмент.[60] На основе лиганда был получен флуоресцентный конъюгат **36** (Рисунок 2.19).

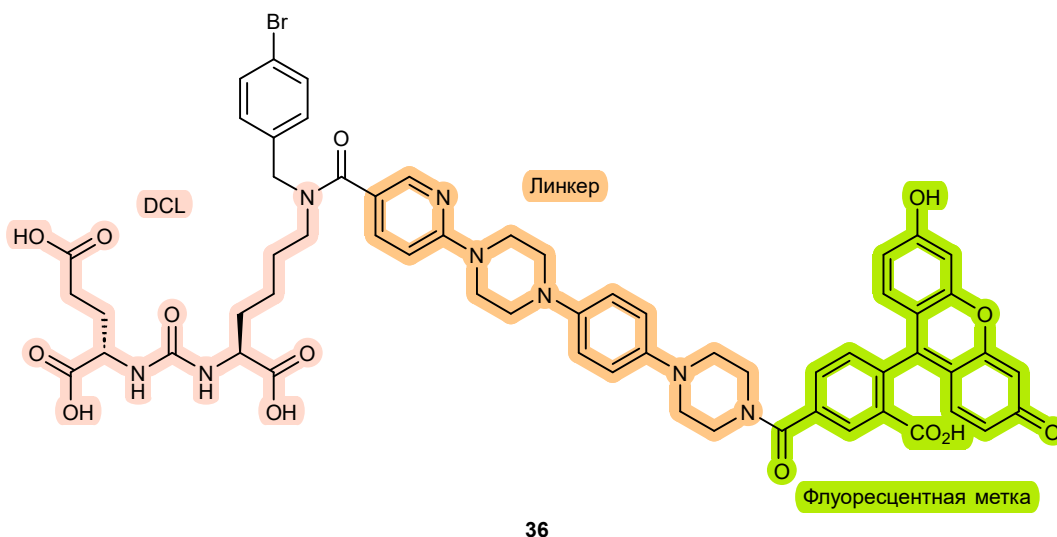


Рисунок 2.19. Структура конъюгата **36**.

Дополнительный «жёсткий» линкер на основе пиридина, бензола и пиперазина обладал достаточной длиной, чтобы закреплённый на его конце диагностический агент находился за пределами ведущей к активному сайту связывания воронки. При этом наличие ароматических остатков в его структуре привело к дополнительному увеличению аффинности к мишени. Значение K_i для соединения **36** составило $8,6 \pm 0,9$ пМ, что сопоставимо с данным показателем для лиганда DCIBzL, представленными в данной работе ($K_i(\text{DCIBzL}) = 3,0 \pm 0,1$ пМ). Следует отметить, что данные значения константы ингибирования получены при использовании в качестве расщепляемого субстрата фолил- γ -L-глутамата, а не NAAG как в большинстве тест-систем.

Структура линкера, соединяющего вектор-фрагмент с диагностической и терапевтической нагрузкой, также значительно влияет на сродство к ПСМА. На данный момент в литературе представлено большое количество различных лигандов ПСМА и конъюгатов на их основе с различным строением линкера, что отражено в обзорах по данной теме.[61]

Как было упомянуто ранее, карман S1 имеет воронкообразную форму, сужающуюся к активному сайту связывания (см. Раздел 2.1). Длина туннеля составляет около 20 Å и в его структуре, согласно данным молекулярного докинга, имеется три гидрофобных кармана. Основываясь на этих данных, была получена серия радиофармацевтических ПСМА-направленных конъюгатов с различной структурой линкера (Рисунок 2.20).[37]

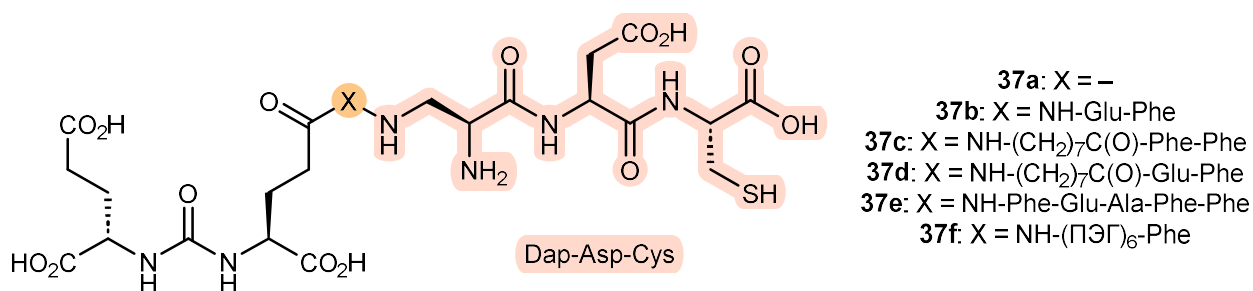


Рисунок 2.20. Структура конъюгатов лигандов ПСМА с различной структурой линкера.

В качестве векторного фрагмента авторы выбрали мочевины DUPA, а в качестве хелатирующего агента для связывания радионуклида – трипептидный фрагмент S-Dap-L-Asp-L-Cys. Выбор хелатора был обусловлен его высокой аффинностью к радионуклиду ^{99m}Tc и стабильностью образующегося комплекса.[62] В рамках этой работы авторы синтезировали серию из шести конъюгатов (**37a-f**) с различной длиной и структурой линкера. Оценка аффинности к ПСМА была осуществлена для радиомеченных конъюгатов, и исходя из полученных данных были рассчитаны значения K_D (Таблица 2.7).

Таблица 2.7. Значения K_D полученные для меченных ^{99m}Tc конъюгатов **37a-f**.

Соединение	Линкер X	K _D , нМ
37a	—	176
37b	NH-Glu-Phe	60
37c	NH-(CH ₂) ₇ C(O)-Phe-Phe	14±4 ^a
37d	NH-(CH ₂) ₇ C(O)-Glu-Phe	31
37e	NH-Phe-Glu-Ala-Phe-Phe	102
37f	NH-(ПЭГ) ₆ -Phe	338

^a SD (n=3)

Как видно из представленных данных, наиболее высоким сродством к белку обладает соединение **37c**, содержащее в своей структуре алифатический фрагмент и дипептид из двух остатков фенилаланина. Исходя из приведённых данных молекулярного докинга и этих экспериментальных данных, можно предположить, что бензильные фрагменты фенилаланиновых остатков встраиваются в карманы T2 и T3 туннеля, за счёт чего и происходит увеличение эффективности связывания. Это также коррелирует с тем, что замена N-концевого остатка фенилаланина на глутаминовую кислоты (соединение **37d**) приводит к увеличению значения константы диссоциации. Конъюгат **37a** без линкера также демонстрирует сравнительно высокое значение K_D. Замена алифатического фрагмента линкера на аминокислотную последовательность (**37e**) или полиэтиленгликолевый фрагмент (**37f**) тоже приводит к снижению аффинности к мишени. Удаление алифатического фрагмента из молекулы (**37b**) приводит к меньшему падению сродства к ПСМА.

При этом стоит отметить, что довольно обширный набор описанных к настоящему времени лигандов ПСМА и конъюгатов на их основе ограничиваются, тем не менее, алифатическим линкером либо линкером с более сложной структурой, но без ароматических фрагментов в боковой цепи линкера.

Так, на основе уреида глутаминовой кислоты и аминок-замещённого фенилаланина был получен конъюгат **38**, содержащий в своей структуре остаток глутаровой кислоты (Рисунок 2.21). Эффективность связывания с белком оценивали путём проведения эксперимента с конкурентным ингибированием ПСМА. В качестве модельного соединения был использован конъюгат **39**, а в качестве конкурирующего лиганда его аналог с $^3\text{H}_3\text{C}$ группой в остатке метионина. Полученные значения IC_{50} показали, что хоть соединение **38** и уступает лиганду **39** ($\text{IC}_{50}(\mathbf{38}) = 41 \pm 2 \text{ нМ}$; $\text{IC}_{50}(\mathbf{39}) = 15 \pm 2 \text{ нМ}$), но не существенно.

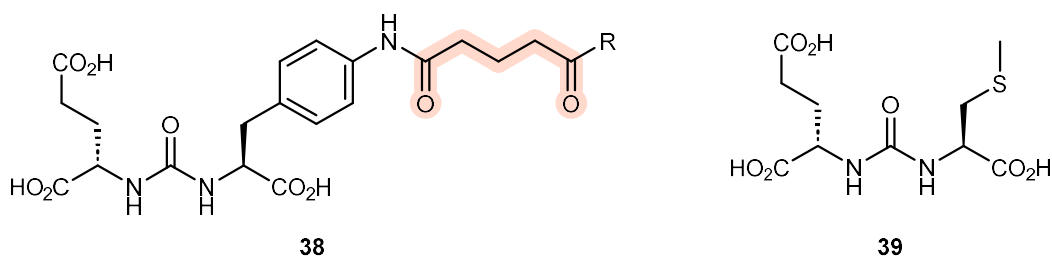


Рисунок 2.21. Структура конъюгата с алифатическим линкером на основе глутаровой кислоты

Другими примерами могут служить соединения **40a-b** — конъюгаты с хелатирующими агентами, в структуру которых в качестве линкера введён остаток 8-аминооктановой кислоты (Рисунок 2.22).[63]

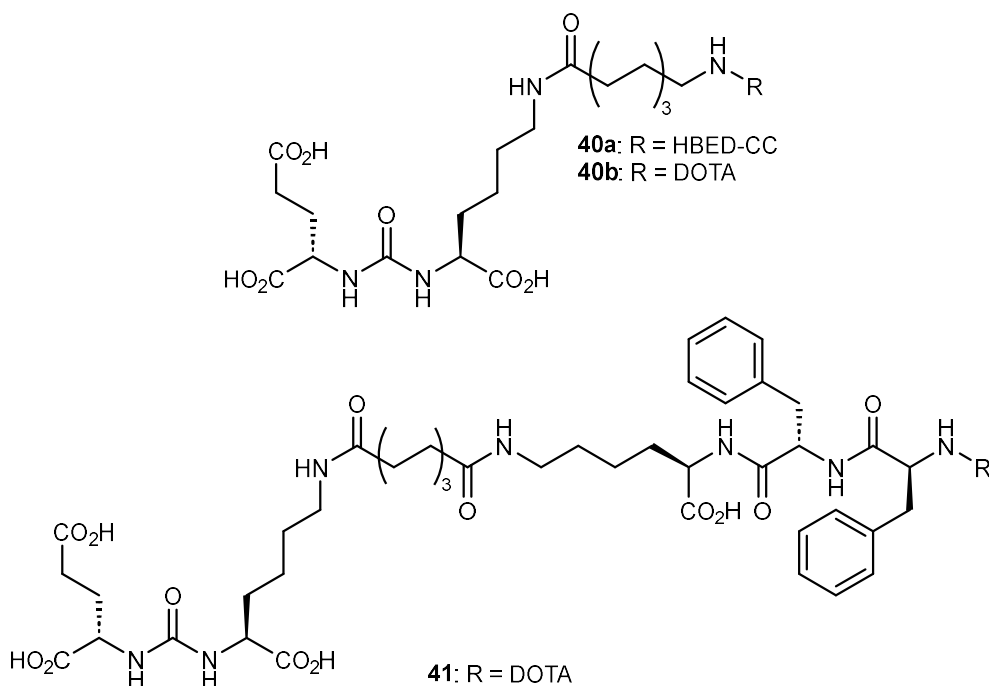
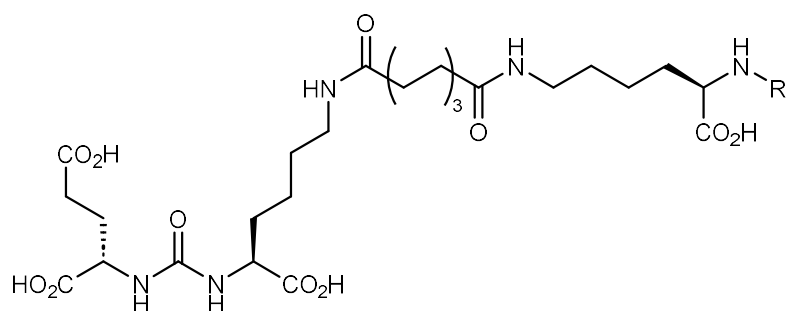


Рисунок 2.22. Структура конъюгатов с хелатирующими агентом **40a-b** и **41**.

Исследования аффинности *in vitro* полученных конъюгатов в форме комплексов со стабильным изотопом галлия показали их сопоставимую активность. При этом решающее влияние на значение K_i оказывал хелатирующий агент. Конъюгат с хелатором HBED-CC **40a** превосходил свой аналог с агентом DOTA: $K_i(\mathbf{40a}) = 12 \pm 3$ нМ против $K_i(\mathbf{40b}) = 38 \pm 14$ нМ. В рамках данного исследования авторы провели тестирование ещё одного соединения с хелатирующим агентом DOTA, но отличающейся структурой линкерного фрагмента. В структуру соединения **41** ввели в качестве алифатического участка остаток субериновой кислоты и лизина, а также добавили дипептидный фрагмент, содержащий два остатка фенилаланина. Для данного конъюгата удалось достичь значения K_i близкого к соединению **40a** ($K_i(\mathbf{41}) = 11 \pm 2$ нМ). Таким образом, введение подобных структурных мотивов смогло нивелировать эффект, который оказывал хелатирующий агент на эффективность связывания с мишенью.

В некоторой степени схожий подход с введением остатка субериновой кислоты и лизина в линкер, но без введения остатков фенилаланина, был реализован в дизайне флуоресцентного конъюгата **42** (Рисунок 2.23).[64]

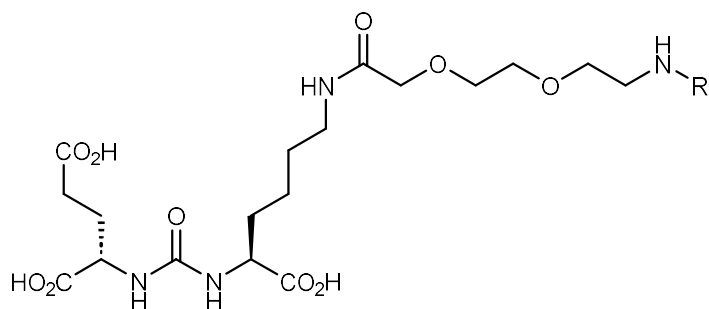


42: R = IRDye 800CW

Рисунок 2.23. Структура конъюгата **42** с алифатическим линкером.

Данное соединение показало в исследованиях аффинности значения $K_i = 0,4$ нМ, что превосходит данный показатель для лиганда ZJ-43 в аналогичном эксперименте ($K_i(\text{ZJ-43}) = 2,1$ нМ).

В дальнейшем была получена обширная библиотека конъюгатов подобной структуры как с хелатирующими,[65] так и с флуоресцентными агентами.[66] В данных работах в первую очередь оценивалось влияние структуры хелатирующих агентов и флуоресцентных меток на эффективность связывания. Стоит отметить, что для ряда конъюгатов с хелатирующими агентами авторам удалось достичь значений K_i , находящихся в субнанолярном диапазоне.[65] В работе, посвящённой влиянию природы флуоресцентных меток на сродство к ПСМА,[66] авторы также получили серию конъюгатов с полиэтиленгликолевым линкером **43** (Рисунок 2.24).



43: R = флуоресцентная метка

Рисунок 2.24. Общая структура конъюгатов с ПЭГ-фрагментом в линкере.

Для всех полученных флуоресцентных конъюгатов значения K_i находились в пикомолярном диапазоне. Однако, стоит отметить, что серия соединений **43** уступала в ряде случаев в аффинности своим аналогам с алифатическим линкером на основе суберата и лизина, а некоторых случаях – конъюгатам без линкера в структуре.

Другим примером модификации линкера является введение ароматических фрагментов непосредственно в линкерную цепь.

Примером подобных соединений может служить серия соединений **44a-g**, которые содержат в структуре линкера триазольный фрагмент, соединяющий ПЭГ-линкер различной длины и вектор-молекулу (Рисунок 2.25).[67]

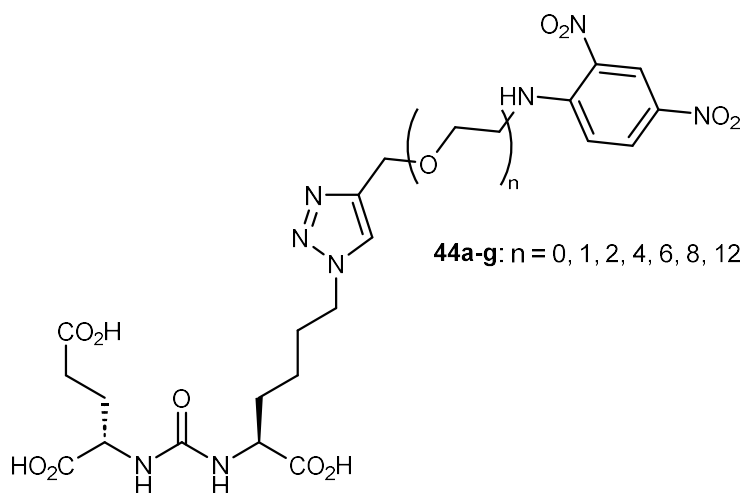


Рисунок 2.25. Структура соединений **44a-g**.

Авторы провели оценку ингибирующей активности данных соединений и показали, что наилучшее связывание с белком реализуется в случаях, когда линкер имеет два или четыре этиленгликолевых фрагмента ($K_i(n=2) = 0,024 \pm 0,008$ нМ; $K_i(n=4) = 0,020 \pm 0,008$ нМ). Увеличение или уменьшение количества этиленгликолевых звеньев приводит к снижению ингибирующей способности соединений ($K_i(n=0) = 0,078 \pm 0,018$ нМ; $K_i(n=12) = 1,7 \pm 0,7$ нМ).

Другой подход по введению ароматического фрагмента в цепь линкера реализуется за счёт введения алкилированного по фенольному атому кислорода остатка тирозина. С

использованием подобного подхода был получен ряд лигандов ПСМА и конъюгатов на их основе (Рисунок 2.26).[68,69]

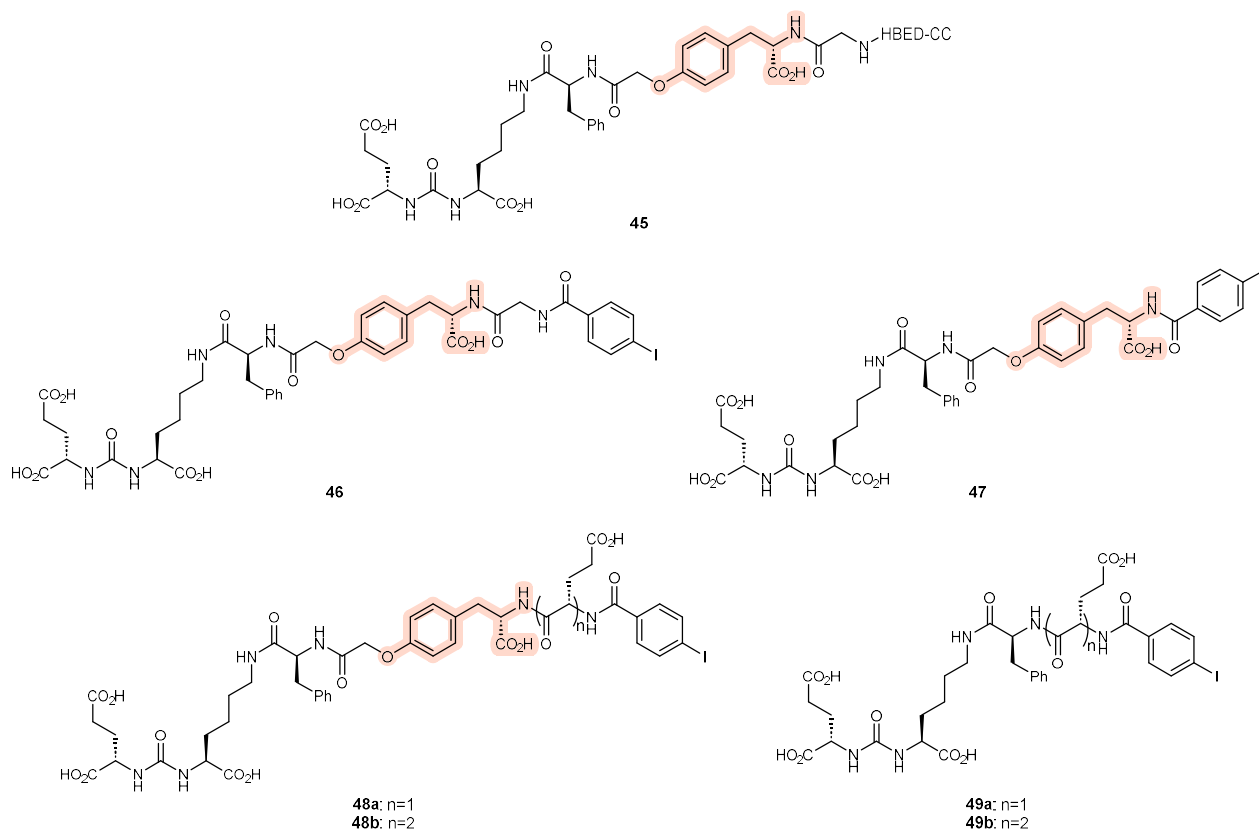


Рисунок 2.26. Структуры соединений с остатком тирозина в линкере и их аналоги. Цветом обозначен остаток тирозина.

Изначально данный подход был реализован в структуре соединения **45**, которое представляет из себя конъюгат лиганда ПСМА с хелатирующим агентом HBED-CC. Этот конъюгат также содержал остаток фенилаланина при ϵ -атоме азота лизина. Данное соединение в исследованиях *in vitro* показало значения IC_{50} равные 12 ± 5 нМ в виде конъюгата без атома металла и 17 ± 3 нМ в форме хелатного комплекса с ^{nat}Ga . Эти показатели близки к полученным в этой публикации значениям для конъюгата PSMA-11 ($IC_{50} = 17 \pm 2$ нМ), что позволило в дальнейшем провести клинические испытания данного конъюгата.[70] В более поздней исследовании авторы синтезировали серию лигандов ПСМА, содержащих в своей структуре остаток *para*-иодбензойной кислоты. На основе этих соединений в дальнейшем могут быть получены препараты, меченные ^{125}I . Авторы оценивали влияние наличия фрагмента глицина между остатком иодбензойной кислоты и тирозином (**46** и **47**), возможность замещения глицинового фрагмента на один или два остатка глутаминовой кислоты (**48a-b**), а также возможность введения вместо тирозинового и глицинового фрагментов одного или двух глутаматных фрагментов (**49a-b**). Полученные значения IC_{50} приведены в Таблице 2.8.

остатка с ароматическим фрагментом. В данном случае авторы использовали для модификации 2-нафтилаланин. Стоит отметить, что ароматический участок линкера сочленён с фрагментом, несущим радиометку, не напрямую, а через два остатка глутаминовой кислоты. При исследовании ингибирующей активности данного соединения было получено значение $K_i = 7 \pm 2$ нМ. Это сопоставимо с данным показателем, полученным для соединения **51**, также известным как PSMA-617 ($K_i = 2,3 \pm 2,9$ нМ). Данный конъюгат с хелатирующим агентом DOTA был взят за основу для создания соединения **50**. Основным отличием данного соединения является наличие в структуре линкера не ароматического фрагмента, а остатка транексамовой кислоты, которая является биоизостером аминокислоты лизина. Также в PSMA-617 отсутствуют два остатка глутаминовой кислоты между транексамовой кислотой и группой для последующего радионуклидного мечения (хелатором DOTA). В дальнейшем оба соединения прошли полный цикл доклинических и клинических исследований.[72–75] PSMA-617 на данный момент одобрен для использования в клинической практике FDA (управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) в форме, меченой радиоизотопом ^{177}Lu . [7]

Как упоминалось ранее (см. Раздел 2.1), ещё одним методом модификации структуры лиганда, способным значительно влиять на аффинность, является введение фрагментов, содержащих ароматические заместители в боковой цепи и разделённые с вектор-молекулой алифатическим участком линкера.

Так, на основе упомянутого выше соединения **37с**, содержащего в линкере остаток 8-аминооктановой кислоты и два остатка фенилаланина, в дальнейшем была получена серия конъюгатов с различными терапевтическими агентами.[76]

Схожий с этим подход был реализован в соединениях **52a-c** (Рисунок 2.28).[77] В данных конъюгатах с хелатирующими агентами в качестве вектор-фрагмента был использован уреид DCL, а линкер состоял из последовательно соединённых остатков субериновой кислоты, лизина (через ϵ -аминогруппу) и двух остатков фенилаланина. В соединениях **52a-b** все аминокислоты в линкере относятся к *L*-ряду, в то время как в соединении **52c** – к *D*-ряду. Исследования ингибирующей способности данных соединений показали, что все три полученных соединения обладают сопоставимым сродством к мишени: $\text{IC}_{50}(\mathbf{52a}) = 13 \pm 2$ нМ; $\text{IC}_{50}(\mathbf{52b}) = 10 \pm 2$ нМ; $\text{IC}_{50}(\mathbf{52c}) = 13,9 \pm 0,4$.

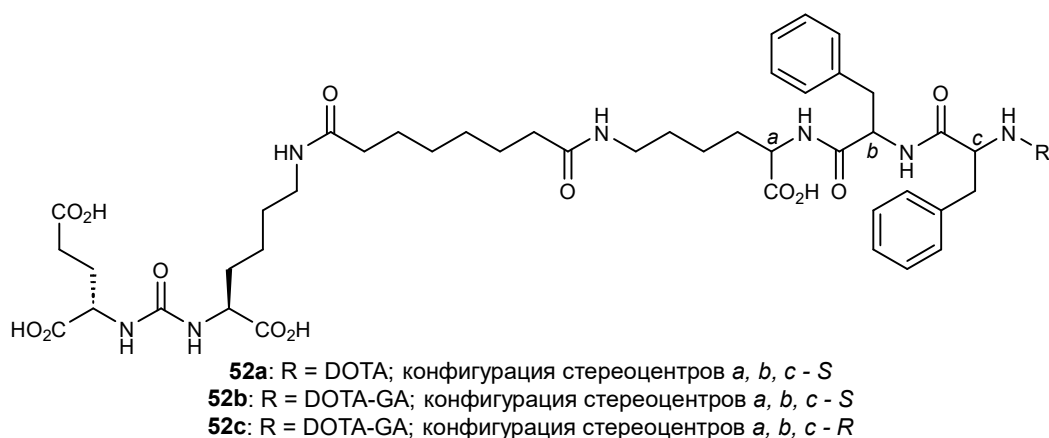


Рисунок 2.28. Общая структура конъюгатов **52a-c**.

В то же время, последующие биологические исследования показали, что соединение **52c** демонстрирует гораздо большую стабильность в условиях кровотока в сравнении с соединениями **52a-b**, что объяснялось тем, что его аминокислоты трипептидного фрагмента относятся к *D*-ряду.

В дальнейшем была осуществлена оптимизация данного подхода путём замещения одного из остатков фенилаланина на другую аминокислоту, содержащую ароматический фрагмент (Рисунок 2.29).

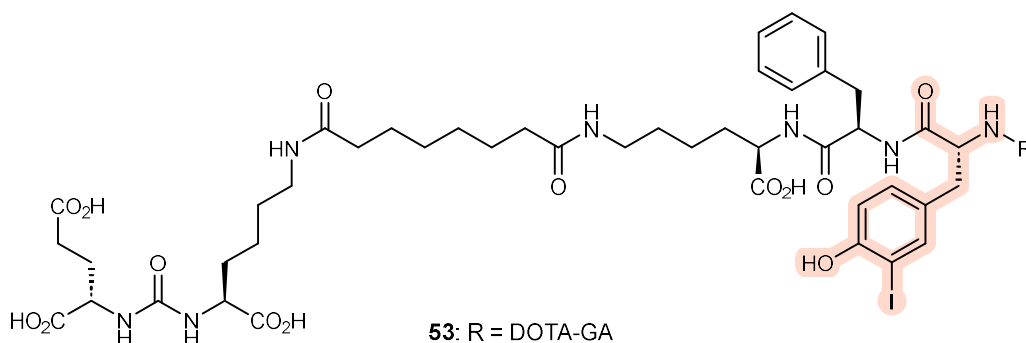


Рисунок 2.29. Структура конъюгата PSMA-I&T; цветом выделен фрагмент 3-иод-тирозина.

Путём подобной замены было получено соединение **53**, также известное как PSMA-I&T.[78] В качестве замены N-концевого аминокислотного остатка фенилаланина был выбран 3-иод-тирозин. Исходя из данных о большей стабильности в кровотоке, аминокислоты трипептидного участка линкера относятся к *D*-ряду. Исследования аффинности данного соединения показали, что в форме без хелатируемого атома металла значения IC_{50} близки к данному показателю для соединения **52c**: $IC_{50}(\mathbf{53}) = 10 \pm 4$ нМ; $IC_{50}(\mathbf{52c}) = 13,9 \pm 0,4$ нМ. Однако анализ ингибирующей способности комплексов данных соединений с галлием и лютецием продемонстрировал, что в случае соединения **53** наблюдается некоторое улучшение сродства к ПСМА в сравнении с соединением **52c**: $IC_{50}(\text{natGa-}\mathbf{53}) = 9 \pm 3$ нМ; $IC_{50}(\text{natLu-}\mathbf{53}) = 8 \pm 2$ нМ; $IC_{50}(\text{natGa-}\mathbf{52c}) = 15,9 \pm 0,5$ нМ; $IC_{50}(\text{natLu-}\mathbf{53})$

= 13 ± 2 нМ. При этом меченое как ^{68}Ga , так и ^{177}Lu соединение **53** продемонстрировало значительно более эффективную интернализацию на клеточной модели LNCaP. В связи с этим, в экспериментах *in vivo* на ксенографтных моделях РПЖ для соединения **53** наблюдалось улучшение соотношения опухоль-фон. Благодаря этим и некоторым другим фармакокинетическим преимуществам, данный радиофармацевтический препарат на данный момент находится на продвинутых стадиях клинических исследований, хотя и не получил пока одобрения для применения в клинической практике.[79,80] Также на основе данного подхода в дальнейшем был получен конъюгат PSMA-I&S, содержащий вместо остатков фенилаланина и 3-иод-тирозина остатки нафтилаланина и тирозина, а в качестве хелатирующего агента maS_3 – хелатор способный связывать радиоизотоп $^{99\text{m}}\text{Tc}$.[81] Согласно приведённым в публикации значениям IC_{50} , полученных в тестах *in vitro*, данный конъюгат в форме комплекса с рением уступает соединению **53** с ионом лютеция ($\text{IC}_{50}(\text{natRe-PSMA-I\&S}) = 16 \pm 3$ нМ против $\text{IC}_{50}(\text{natLu-PSMA-I\&T}) = 8 \pm 2$ нМ).

В литературе также широко представлен набор лигандов ПСМА и конъюгатов на их основе, сочетающих в себе сразу несколько из представленных выше подходов к повышению аффинности: модификацию ϵ -атома азота лизина фрагментом, содержащим ароматическую систему; введение линкера с алифатической частью и пептидным участком, в который входят аминокислотные остатки, содержащие ароматические фрагменты (Рисунок 2.30).[9,82,83]

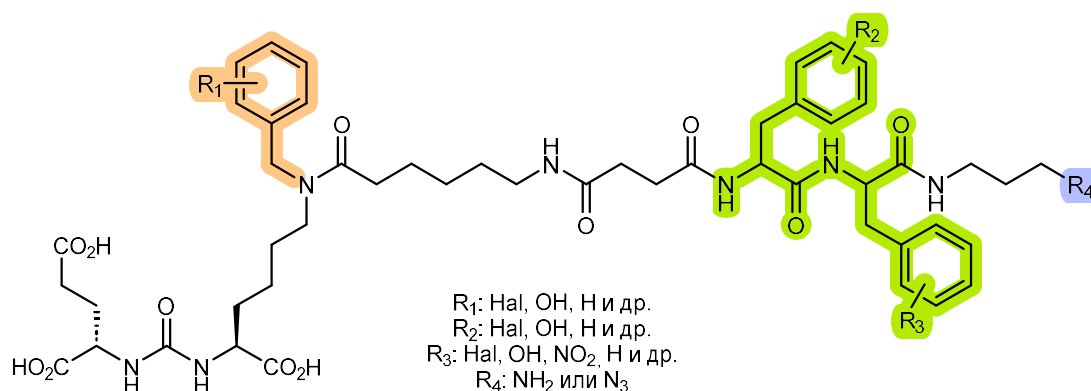


Рисунок 2.30. Общий дизайн лигандов ПСМА. Оранжевым выделен бензильный фрагмент при ϵ -аминогруппе лизина; зелёным – дипептидный мотив линкера; сиреневым – функциональная группа для последующего конъюгирования.

Например, в рамках одной из работ была получена серия конъюгатов с доксорубицином **54a-c** (Рисунок 2.31).[84] Модификация ϵ -атома азота лизина не проводилась. Соединения **54a-b** в качестве линкера имели остаток 6-аминогексановой (**54a**) или 11-аминоундекановой кислот, модифицированный по аминогруппе остатком

глутаровой кислоты. Линкер соединения **54c** состоял из остатков 6-аминогексановой кислоты, янтарной кислоты и двух остатков *L*-фенилаланина.

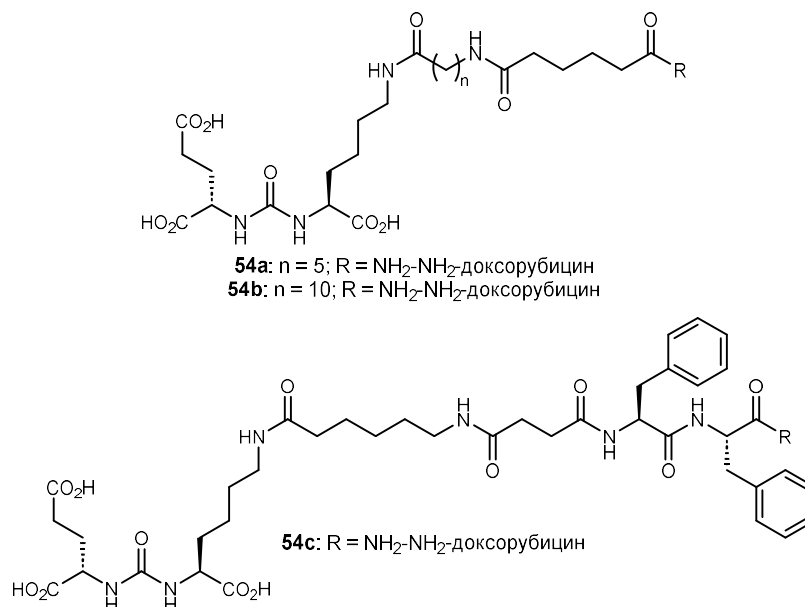


Рисунок 2.31. Структура конъюгатов содержащих доксорубин

Оценка цитотоксичности данных соединений на клеточной модели РПЖ показала, что наибольшую эффективность удаётся достичь для соединения **54c**, содержащего два остатка фенилаланина в структуре: $\text{CC}_{50}(\mathbf{54a}) = 331 \pm 15$ нМ; $\text{CC}_{50}(\mathbf{54b}) = 487 \pm 35$ нМ; $\text{CC}_{50}(\mathbf{54c}) = 95 \pm 11$ нМ. Соединение **54b**, содержащее остаток 11-аминоундекановой кислоты проявило наименьшую активность.

В другой работе авторы ввели в структуру лигандов ароматический фрагмент при ε -атоме азота лизина, а в качестве линкера использовали 6-азидогексановую и 11-азидоундекановую кислоты, азидогруппы которых в дальнейшем были использованы для конъюгации с модифицированным паклитакселом (Рисунок 2.32).[85]

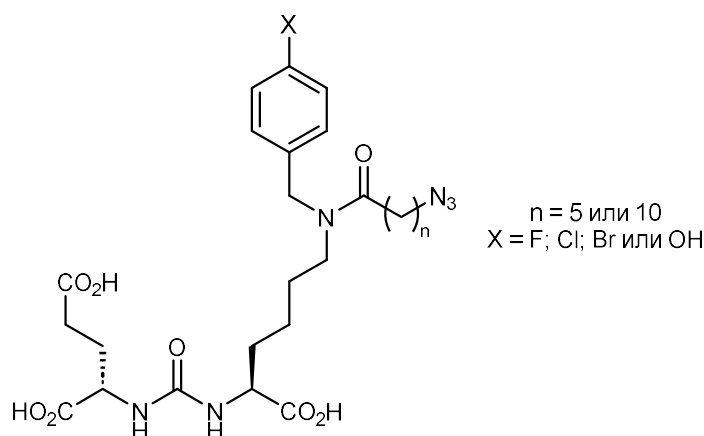


Рисунок 2.32. Общая структура лигандов ПСМА, полученных в работе [85]

В ароматическом фрагменте в качестве заместителей присутствовали атомы галогенов или гидроксильная группа. Наилучшие показатели ингибирующей активности

показали лиганды, содержащие остаток 6-азидогексановой кислоты и следующие заместители в ароматическом кольце: хлор ($IC_{50} = 110$ нМ), бром ($IC_{50} = 170$ нМ) и гидроксигруппу ($IC_{50} = 140$ нМ). При этом в рамках данного эксперимента было получено значение $IC_{50} = 1470$ нМ для мочевины DCL. Таким образом, полученные соединения значительно превосходили её в аффинности к мишени.

Следующим шагом в развитии данного дизайна лигандов ПСМА стало получение серии лигандов, содержащих дипептидный фрагмент в своей структуре и оценка их ингибирующей активности (Рисунок 2.33).[9]

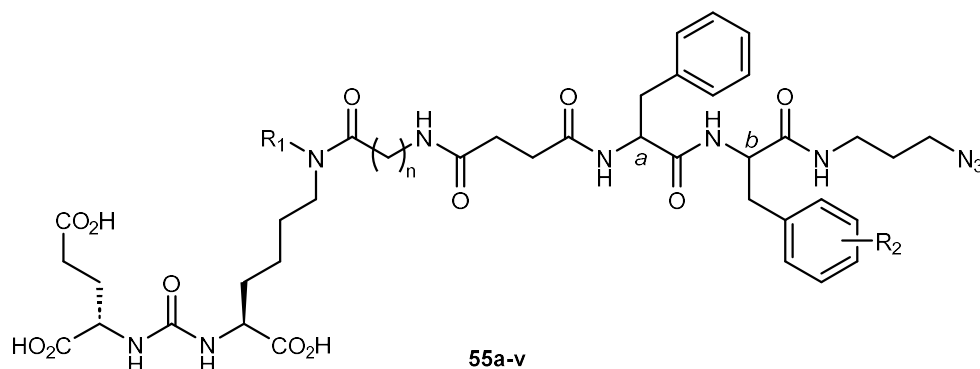


Рисунок 2.33. Общая структура лигандов **55a-v**

В рамках данного исследования было проведено варьирование следующих фрагментов лиганда: заместителя при ϵ -аминогруппе лизина; длины алифатического участка линкера, конфигурации аминокислотных остатков в пептидном фрагменте, заместителей в ароматическом фрагменте С-концевой аминокислоты. Полученные для данных соединений значения IC_{50} приведены в Таблице 2.9.

Из представленных данных видно, что использование вместо остатка 6-аминогексановой кислоты остатка γ -аминомаслянной кислоты приводит к заметному снижению аффинности к мишени (**55b** и **55c**). На примере соединений **55a** и **55c** показано, что при подобном дизайне молекулы модификация ϵ -аминогруппы лизина путём введения ароматического заместителя положительно сказывается на сродстве к ПСМА. В рамках данной работы в качестве заместителей в бензильном положении были использованы различные галогены. Среди полученных лигандов наименьшее значение IC_{50} показали соединения, содержащие хлор в третьем положении бензильного фрагмента (**55p**) и бром в четвертом положении (**55l**). При этом все полученные ингибиторы ПСМА с хлором в *para*-положении (**55d-g**) уступали в аффинности этим лигандом. Этот факт демонстрирует, что закономерности, описанные ранее для более простых субстратов **29a-i**, содержащих галоген-замещённые бензильные фрагменты, не сохраняются при введении в структуру лиганда линкерного фрагмента. Из представленных данных не удаётся выявить однозначной зависимости между аффинностью и конфигурацией стереоцентров в

дипептидном фрагменте. Так, в некоторых парах (**55b** и **55e**; **55h** и **55i**, **55u** и **55v**) наблюдалась более низкая биологическая активность в случае, если использовались аминокислоты, принадлежащие к *D*-ряду. В тоже время, в случае пары **55f** и **55g** были получены близкие значения IC_{50} , при этом лиганд **55g**, содержащий аминокислотные остатки, относящиеся к *D*-ряду, несколько превосходил по эффективности ингибирования соединение **55f**. Также в рамках данной работы было получено два лиганда с бромом-замещённым тирозином **55k** и **55q**, которые превосходили свои аналоги с незамещённым остатком тирозина в линкере (**55j** и **55o**).

Таблица 2.9. Значения IC_{50} соединений **55a-v**.

Соединение	n	R ₁	a	b	R ₂	IC ₅₀ ±SD, нМ
2-PMPA	—	—	—	—	—	80±24
55a	5	H	<i>S</i>	<i>S</i>	H	74±18
55b	3	Бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	175±37
55c	5	Бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	28±7
55d	5	<i>para</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	55±33
55e	5	<i>para</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	H	226±97
55f	5	<i>para</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	4-OH	46±25
55g	5	<i>para</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH	27±14
55h	5	<i>para</i> -Br-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	50±14
55i	5	<i>para</i> -Br-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	H	319±101
55j	5	<i>para</i> -Br-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH	3158±2789
55k	5	<i>para</i> -Br-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH, 3-Br	89±48
55l	5	<i>para</i> -Br-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	4-OH	17±6
55m	5	<i>meta</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	H	46±24
55n	5	<i>meta</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	38±12
55o	5	<i>meta</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH	107±38
55p	5	<i>meta</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	4-OH	9±3
55q	5	<i>meta</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH, 3-Br	80±50
55r	5	<i>ortho</i> -F- <i>para</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	43±22
55s	5	<i>meta</i> -F- <i>para</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	H	63±19
55t	5	<i>meta</i> -F- <i>para</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	H	294±96
55u	5	<i>meta</i> -F- <i>para</i> -Cl-бензил	<i>R</i>	<i>R</i>	4-OH	108±67
55v	5	<i>meta</i> -F- <i>para</i> -Cl-бензил	<i>S</i>	<i>S</i>	4-OH	62±19

Для оценки влияния конфигурации аминокислотных остатков в линкере на аффинность к ПСМА была синтезирована серия лигандов **56a-j** (Рисунок 2.34).[83]

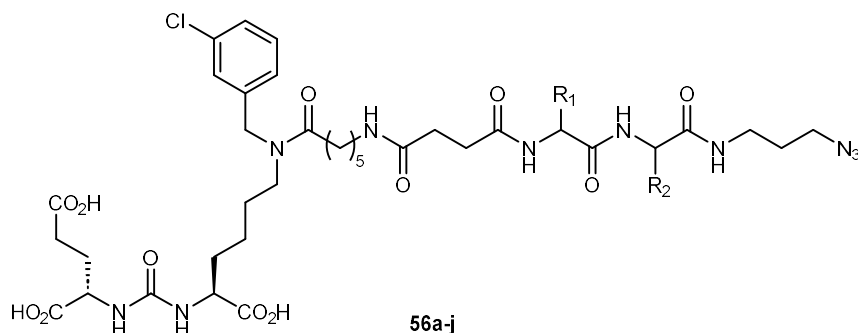


Рисунок 2.34. Общая структура лигандов **56a-j**.

Полученные значения K_i приведены в Таблице 2.10. В качестве соединений сравнения были выбраны лиганды **55m-q**. На примере соединений **56a-b** было оценено изменение аффинности при замещении одного из остатков фенилаланина на глицин. В обоих случаях данная замена привела к значительному увеличению K_i , однако замена С-концевого остатка (**56b**) привела к более значительному уменьшению ингибирующей активности. На примере соединений **55m-o** и **56c-f** было проанализировано влияние конфигурации аминокислотных остатков на аффинность. Как видно из приведённых данных, соединения со смешанной конфигурацией стереоцентров (**56c-f**) демонстрируют значительно более низкое сродство к ПСМА в сравнении с лигандами, в структуре которых представлены аминокислотные остатки, относящиеся к одному ряду (за исключением лиганда **55o**, который показал значение K_i больше, чем соединения **56c-d**). Лиганд **56g**, в котором линкер содержал остаток *D*-тирозина с N-конца и *L*-фенилаланина с С-конца, также значительно уступает в аффинности лиганду **55p**, который показал наименьшее значение K_i среди всех исследованных соединений. Также в рамках данной работы была получена серия лигандов **56h-j** с аминокислотными остатками, относящимися к одному ряду, но имеющих дополнительные заместители в ароматическом фрагменте. Все полученные соединения (**56h-j**) уступали в аффинности как ранее описанному лиганду **55q**, так и ряду других лигандов, исследованных в рамках этой работы.

Таблица 2.10. Значения K_i , полученные для серии соединений **56a-j**.

Соединение	Структура линкера	$K_i \pm SD$, нМ
56a	Gly- <i>L</i> -Phe	30 $\pm$ 4
56b	<i>L</i> -Phe-Gly	85 $\pm$ 17
55p	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr	2,4 $\pm$ 0,6
55m	<i>D</i> -Phe- <i>D</i> -Phe	6 $\pm$ 2
55n	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe	9 $\pm$ 3
56c	<i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Phe	29 $\pm$ 4
56d	<i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Phe	54 $\pm$ 12
55o	<i>D</i> -Phe- <i>D</i> -Tyr	86 $\pm$ 47
56e	<i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Tyr	112 $\pm$ 19
56f	<i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr	137 $\pm$ 32
56g	<i>D</i> -Tyr- <i>L</i> -Phe	77 $\pm$ 13
55q	<i>D</i> -Phe- <i>D</i> -Tyr(3-Br)	28 $\pm$ 16
56h	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe(4-NO ₂)	100 $\pm$ 11
56i	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-Br)	143 $\pm$ 35
56j	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-OH)	622 $\pm$ 117

В дальнейшем серия лигандов с различными заместителями в ароматических фрагментах линкера была расширена с получением соединений **57a-n** (Рисунок 2.35).[82]

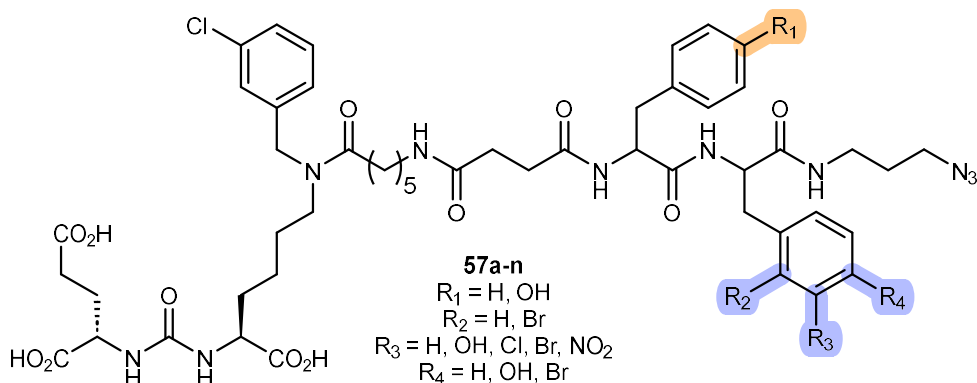


Рисунок 2.35. Структура лигандов ПСМА **57a-n**; оранжевым выделен фрагмент, варьлируемый в N-концевом аминокислотном остатке, сиреневым – фрагменты, варьлируемые в C-концевом остатке.

Полученные для данных соединений значения IC_{50} приведены в Таблице 2.11. В качестве соединения сравнения был выбран лиганд ZJ-43 (27).

Таблица 2.11. Значения IC_{50} , полученные для лигандов **57a-n**.

Соединение	Структура линкера	$IC_{50} \pm SD$, нМ
ZJ-43	–	11±3
57a	<i>L</i> -Tyr- <i>D</i> -Tyr	99±53
57b	<i>L</i> -Tyr- <i>D</i> -Phe	54±16
57c	<i>D</i> -Tyr- <i>L</i> -Tyr	41±14
57d	<i>L</i> -Tyr- <i>L</i> -Phe	2,6±0,8
57e	<i>L</i> -Tyr- <i>L</i> -Tyr	2±1
57f	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-NO ₂)	1,5±0,9
57g	<i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-NO ₂)	2±1
57h	<i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-Br)	5±3
57i	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe(4-Br)	1,9±0,8
57j	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe(3-Br)	3,1±0,9
57k	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe(2-Br)	5±1
57l	<i>D</i> -Phe- <i>D</i> -Phe(4-Br)	12±2
57m	<i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-OH)	17±3
57n	<i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Tyr(3-Cl)	3,6±0,9

Соединения **57a-e**, содержащие остаток тирозина в качестве N-концевой компоненты дипептидного фрагмента, в случае лигандов **57d-e** продемонстрировали аффинность, превосходящую данный показатель для соединения сравнения. При этом, также как и в случае ингибиторов ПСМА, описанных в предыдущей рассмотренной работе, лиганды со смешанной конфигурацией дипептидного фрагмента **57a-c** уступают в сродстве к белку как соединению сравнения, так и лигандам **57d-e**. На примере соединений **57i-k** было показано, что при введении заместителя в C-концевой остаток фенилаланина аффинность уменьшается в ряду *орто*- < *мета*- < *пара*-. При этом соединение **57i**, содержащее два аминокислотных остатка, относящихся к *L*-ряду, превосходит в сродстве к ПСМА аналог, в котором аминокислоты относятся к *D*-ряду (**57l**). Серия соединений, содержащих

заместитель в третьем положении ароматического кольца тирозина (**57f-h**, **57m-n**) показала довольно низкие значения IC_{50} . Однако нельзя однозначно сказать, что наличие в линкере смешанной конфигурации стереоцентров критически влияет на аффинность в случае соединений **57g-h**. Наиболее перспективными лигандами из представленных в работе являются соединения **57e**, **57f**, **57i**.

Ещё одним подходом к оптимизации структуры лигандов, которая активно развивается в последние годы, является модификация цинк-связывающей группы и/или фрагмента P1'.

С использованием подобного подхода была получена серия лигандов **58a-d** (Рисунок 2.36) – аналогов ZJ-43.[86] В данных соединениях вместо остатка глутаминовой кислоты использовали остаток *S*-2,3-диаминопропановой кислоты с модифицированной аминогруппой в третьем положении. Оценка ингибирующей активности *in vitro* показала, что среди данных соединений только соединение **58a** имеет K_i сопоставимую с значениями, полученными для ZJ-43 в рамках данной работы ($K_i(\mathbf{58a}) = 5,69$ нМ; $K_i(\text{ZJ-43}) = 3,53$ нМ). Соединения **58b-d** не проявили значимой активности.

Основываясь на этих данных, на следующем этапе авторы синтезировали ряд аналогов лиганда DCL (**59**, **60a-j**, Рисунок 2.37). Соединение **59** представляет собой аналог DCL с бензилоксикарбонильной (Cbz, Z) защитной группой при ϵ -аминогруппе лизина и остатка *S*-2,3-диаминопропановой кислоты, ацилированного янтарной кислотой по аминогруппе в третьем положении, в качестве P1' фрагмента. Подобная модификация данного фрагмента не показала эффективности и соединение **59** не проявило значимой ингибирующей активности.

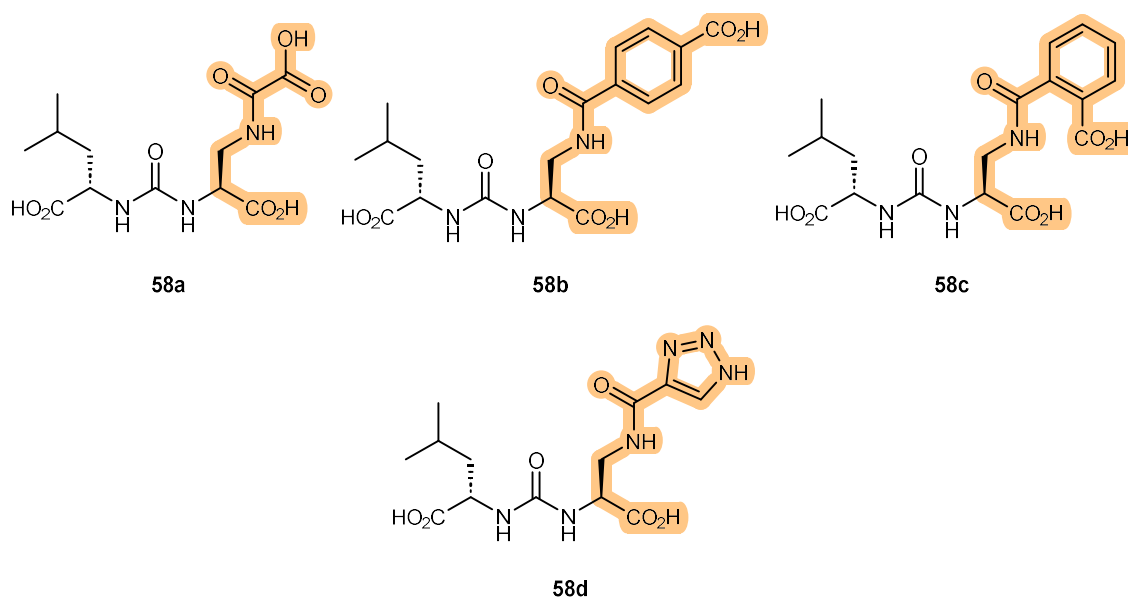
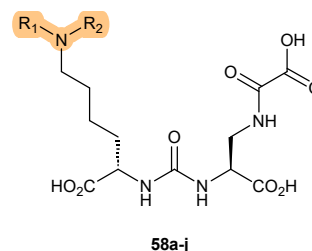
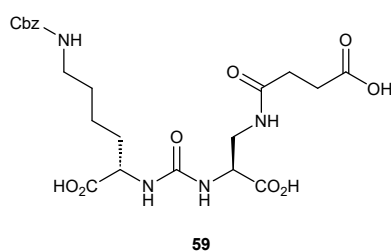


Рисунок 2.36. Структура аналогов ZJ-43 **58a-d**. Цветом выделен P1' фрагмент.

Соединения **60a-j** в своей структуре содержали фрагмент P1', аналогичный соединению **58a** и остаток лизина, модифицированный по атому азота в ϵ -положении. Все полученные соединения продемонстрировали ингибирующую активность, превосходящую или сопоставимую с лигандом ZJ-43. Значения K_i для данных соединений приведены в Таблице 2.12. Наибольшие значения K_i были получены для соединений **60b-c**, содержащих фтор в своей структуре, а также соединения **60f**, в структуре которого в качестве ароматического фрагмента при аминогруппе лизина выступает Cbz-защитная группа. Все остальные полученные лиганды превосходят в аффинности лиганд ZJ-43. При этом только соединение **60a** превосходит по данному показателю лиганд DCIBzL.

Таблица 2.12. Значения K_i соединений **60a-j**.

Соединение	K_i , нМ	Соединение	K_i , нМ
ZJ-43	3,53	DCIBzL	0,20
60a	0,08	60f	8,98
60b	3,81	60g	1,38
60c	5,74	60h	0,99
60d	2,37	60i	0,43
60e	0,37	60j	0,34



Соединение	60a	60b	60c	60d	60e
R_1					
R_2	H	H	H	H	H
Соединение	60f	60g	60h	60i	60j
R_1					
R_2	H	H	H	H	

Рисунок 2.37. Структура лигандов **59** и **60a-j**. Цветом выделен варьируемый фрагмент при атоме азота в ϵ -положении лизина

Ещё одним вариантом подобного подхода к модификации структуры лигандов является серия лигандов ПСМА, в структуру которых введён остаток сквараиновой кислоты.[87] На Рисунке 2.38 приведены некоторые из соединений (**61a-f**), полученных в рамках данной работы. Модификации подвергалась как цинк-связывающая группа, так и фрагмент P1'. Были получены как лиганды содержащие один фрагмент для связывания с активным сайтом (**61a, c-d**), так и два (**61b, e-f**). Соединения показали крайне низкую активность. Лиганд **61a** не проявил никакой значимой активности в исследуемом диапазоне концентраций, а его димерный аналог **61b** показал значение константы ингибирования $K_i(\mathbf{61b}) = 107 \pm 24$ нМ. Это говорит о значительно более низкой ингибирующей способности в сравнении с лигандами сравнения DCIBzL и DCFBzL, для которых в рамках данной работы были получены следующие значения константы ингибирования: $K_i(\text{DCIBzL}) = 0,05 \pm 0,01$ нМ, $K_i(\text{DCFBzL}) = 0,86 \pm 0,22$. Введение остатка сквараиновой кислоты в фрагмент P1' показало большую эффективность. Для соединений **61c-f** были получены следующие значения константы ингибирования: $K_i(\mathbf{61c}) = 1,35 \pm 0,35$ нМ, $K_i(\mathbf{61d}) = 0,40 \pm 0,05$ нМ, $K_i(\mathbf{61e}) = 0,90 \pm 0,18$ нМ, $K_i(\mathbf{61f}) = 0,41 \pm 0,05$ нМ, сопоставимые с лигандом DCFBzL. При этом димерные лиганды во всех рассмотренных случаях демонстрировали большую эффективность ингибирования.

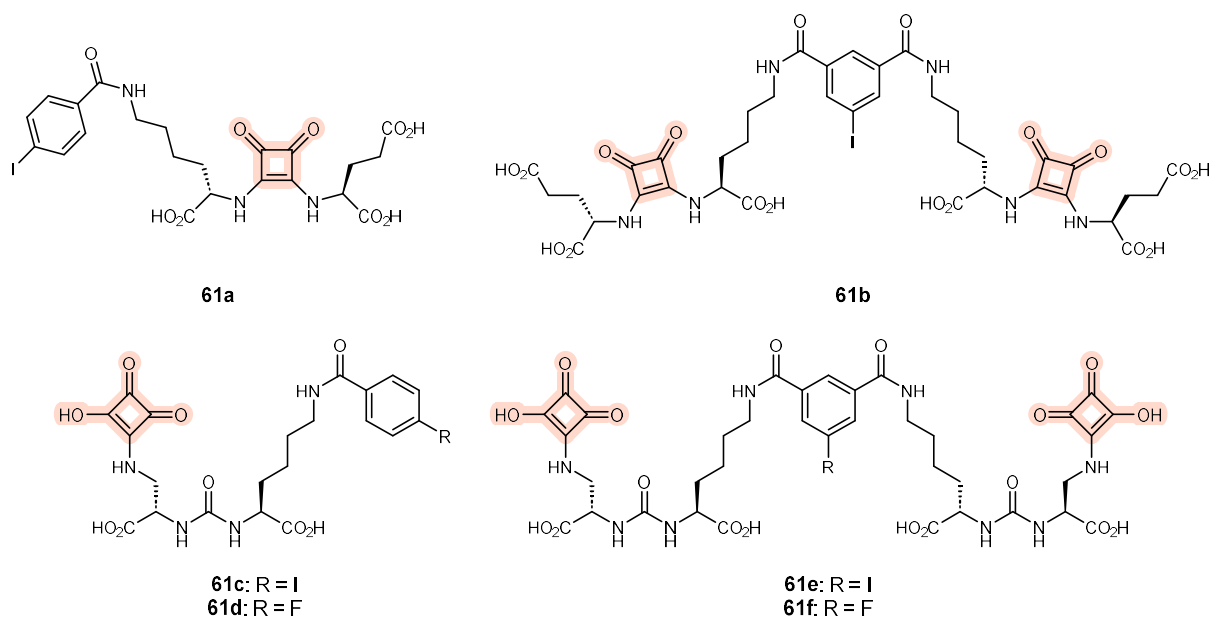


Рисунок 2.38. Лиганды ПСМА, содержащие остаток сквараиновой кислоты (выделен цветом).

2.2.3 Основные подходы к синтезу лигандов ПСМА на основе мочевины DCL

На данный момент лиганды на основе мочевины DCL (**28**) являются одними из наиболее распространённых низкомолекулярных систем доставки, направленных на GСРІІ. В связи с этим в литературе достаточно подробно представлены подходы к получению

данного класса ингибиторов ПСМА. Можно выделить следующие основные этапы получения данных соединений: (1) синтез защищённой мочевины DCL, (2) в некоторых случаях модификация ϵ -аминогруппы лизина, (3) введение линкерного фрагмента.

2.2.3.1 Подходы к созданию мочевинового фрагмента лигандов ПСМА

Существует два подхода к получению вектор-фрагмента мочевины DCL, выбор между которыми определяется стратегией последующей модификации.

Первый подход предполагает жидкофазный двухстадийный синтез три-*трет*-бутил-защищённой мочевины и будет рассмотрен в данном разделе. На первой стадии, исходя из ди-*трет*-бутил-защищённой глутаминовой кислоты и лизина с защищённой карбоксильной группой и ϵ -аминогруппой, получают мочевины, после чего на второй стадии удаляют защитную группу с ϵ -атома азота лизина.

Второй подход (Раздел 2.2.3.4) предполагает твердофазный синтез мочевинового фрагмента с последующей его модификацией на носителе

Для создания мочевинового фрагмента вектор-молекулы в растворе наибольшее распространение получил синтез с использованием трифосгена (Рисунок 2.39).[8,9,84,88,89] Данная методика предполагает генерацию из ди-*трет*-бутилового эфира глутаминовой кислоты соответствующего изоцианата, который в дальнейшем вводится в реакцию с *трет*-бутиловым эфиром лизина, ϵ -аминогруппа которого модифицирована защитной группой (чаще всего – бензилоксикарбонильной). Таким образом получают производное **62**.

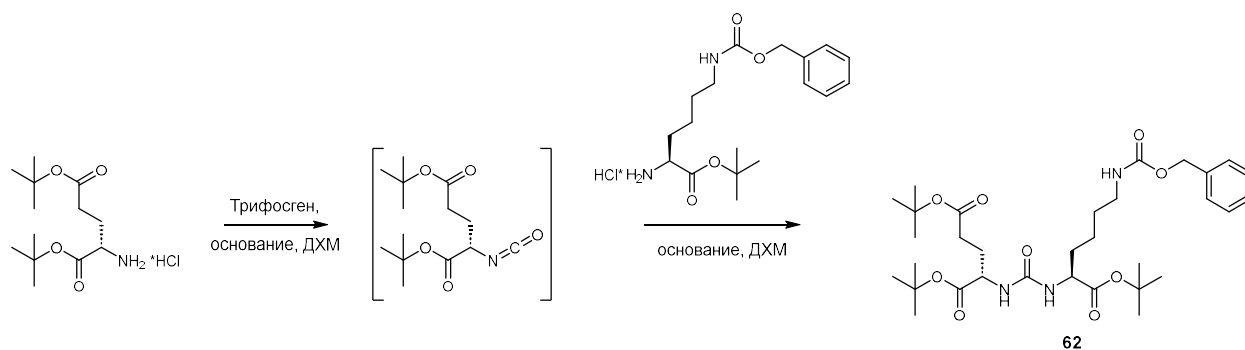


Рисунок 2.39. Схема получения защищённой мочевины DCL с использованием трифосгена.

В качестве основания в данной реакции используют триэтиламин или N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA).

В оригинальной работе по получению мочевины DCL, кроме методики с использованием трифосгена, был представлен альтернативный способ, который также был использован в ряде более поздних работ.[8,90] В альтернативном варианте синтеза α -аминогруппа глутаминовой кислоты взаимодействует с карбонилдиимидазолом (CDI) в

присутствии основания. Полученное производное **63** (Рисунок 2.40) дополнительно активируют, вводя в реакцию с метилтрифлатом (MeOTf) с получением соответствующего метилимидазолилтрифлата **63a**. Образовавшуюся соль вводят в реакцию с защищённым лизином с получением соединения **62**. В работе [90] приводят методику без дополнительной активации интермедиата **63** метилтрифлатом.

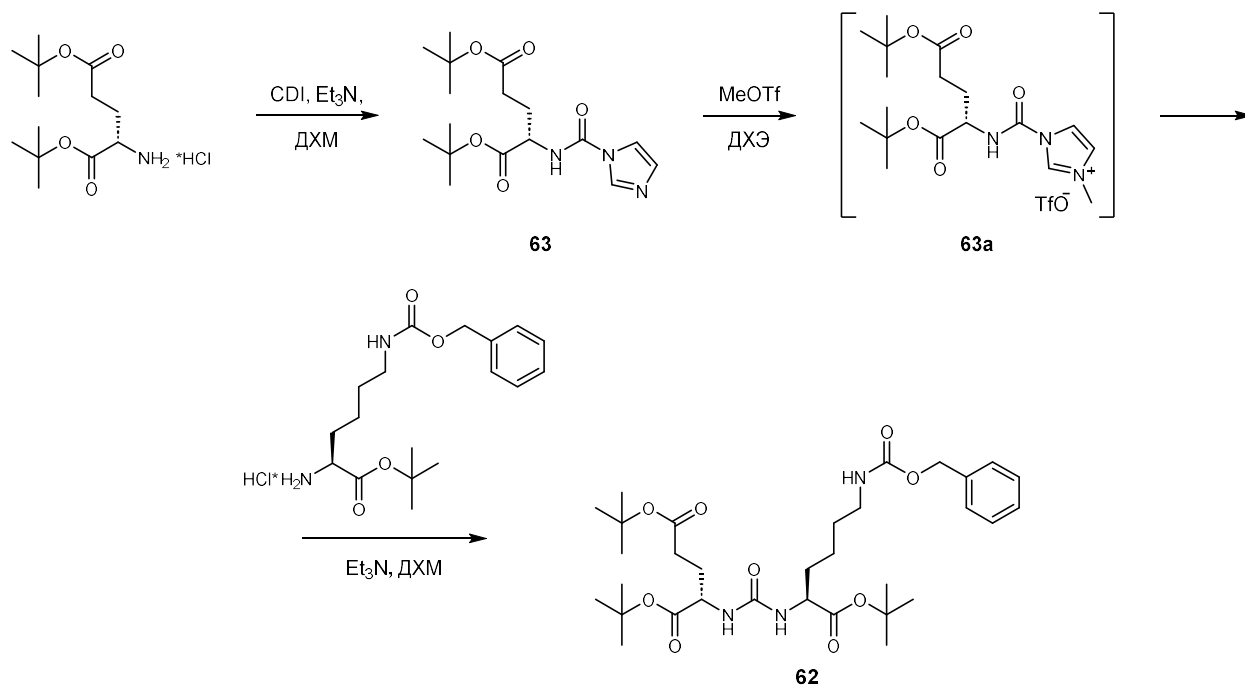


Рисунок 2.40. Схема получения защищённой мочевины DCL с использованием CDI.

В более поздних работах была предложена методика с использованием вместо трифосгена или CDI N,N'-дисукцинимидил карбоната (DSC), представленная на Рисунке 2.41.[91,92]

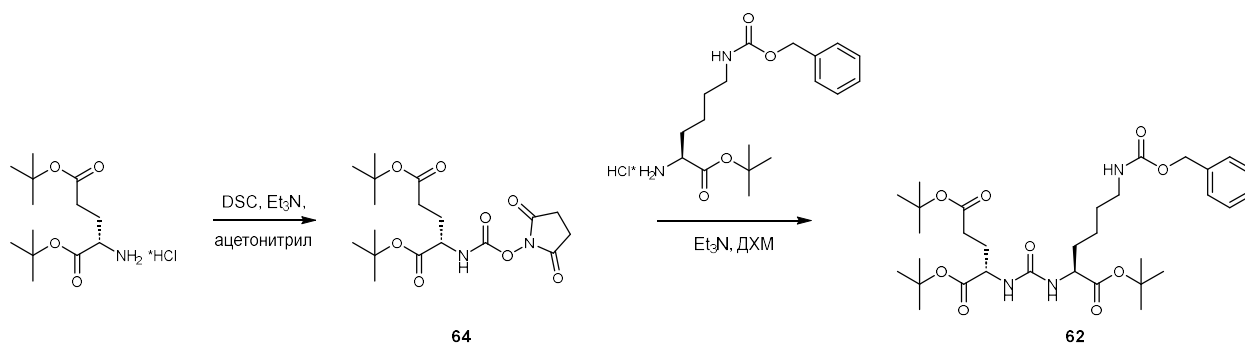


Рисунок 2.41. Схема получения защищённой мочевины DCL с использованием DSC

На первом этапе проводится реакция гидрохлорид глутаминовой кислоты с DSC в присутствии основания, в результате которой образуется производное **64**, которое затем вводят в реакцию с защищённым лизином с получением защищённой мочевины **62**.

Ещё один метод получения соединения **62**, предложенный в литературе, предполагает использование 4-нитрофенилхлорформиата.[93] Данная методика ранее использовалась для получения ингибиторов карбоксипептидазы G2.[94] На первой стадии

образуется карбамат **65**, который подвергается нуклеофильной атаке аминогруппы лизина с образованием целевого продукта (Рисунок 2.42).

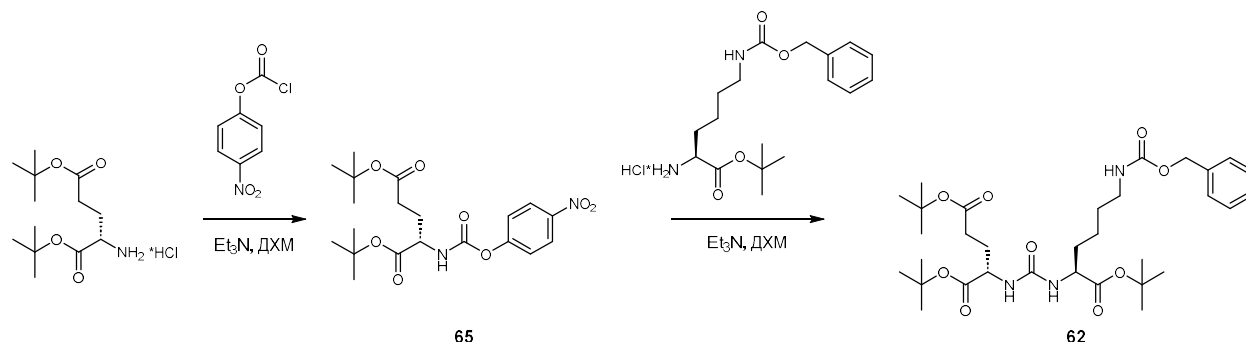


Рисунок 2.42. Схема получения соединения **62** с использованием 4-нитрофенил хлорформата.

На следующей стадии осуществляется удаление Cbz-защитной группы, обычно путём гидрогенолиза в присутствии палладия на активированном угле (Рисунок 2.43).[8,9,84,95] Использование таких условий позволяет удалить защитную бензилоксикарбонильную группу, не затрагивая кислотно-лабильные *трет*-бутильные фрагменты. В ряде работ использовались альтернативные доноры водорода, такие как 1,4-циклогексадиен или формиат аммония.[92,93]

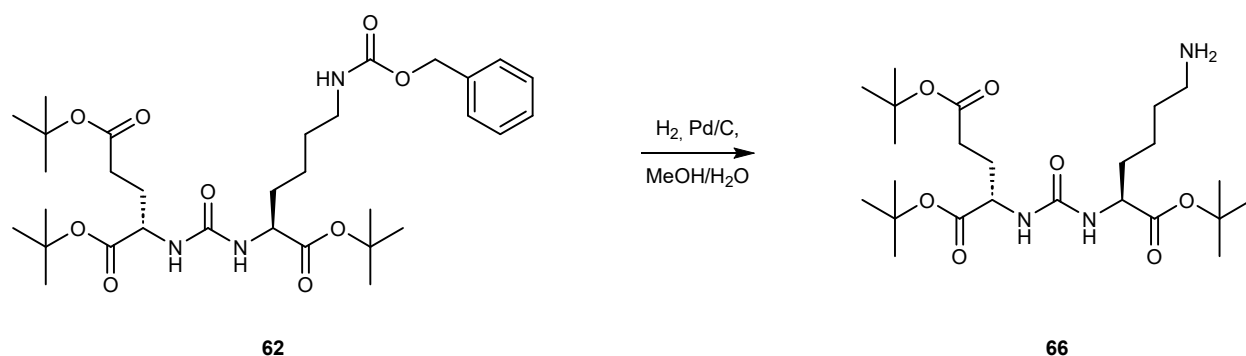


Рисунок 2.43. Удаление Cbz-защитной группы.

2.2.3.2 Способы введения ароматического фрагмента к ε-атому азот лизина

Дальнейшая модификация ε-аминогруппы лизина осуществляется исходя из дизайна целевого лиганда. Так, в структуру может быть введён фрагмент, содержащий ароматический мотив. Данная модификация осуществляется тремя возможными путями: алкилирование атома азота с использованием реакции восстановительного аминирования; ацилирование атома азота соответствующей бензойной кислотой; введение ароматического фрагмента за счёт создания мочевинового мостика (Рисунок 2.44).

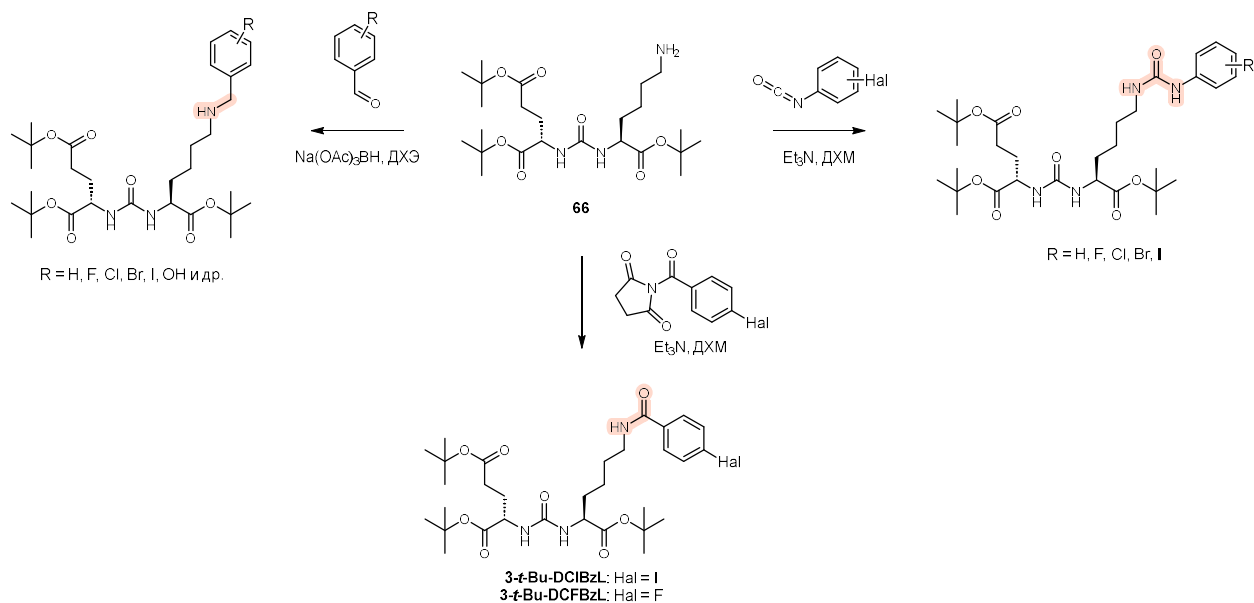


Рисунок 2.44. Способы модификации ϵ -атома азота лизина ароматическими фрагментами (цветом выделены образующиеся связи)

В качестве ацилирующих агентов для получения DCIBzL и DCFBzL (Раздел 2.2.2) используют NHS-эфиры соответствующих бензойных кислот, в связи с их лёгкой препаративной доступностью.[96] В случае соединений с мочевиным мостиком наиболее распространённым подходом является использование изоцианатов.[8] Для введения бензильного фрагмента используют реакцию восстановительного аминирования с триацетоксиборгидридом натрия или боргидридом натрия в качестве восстановителя.[8,9]

Также введение ароматического фрагмента, отвечающего за увеличение эффективности связывания с ПСМА за счёт взаимодействия с гидрофобным карманом рядом с активным сайтом связывания (см. Раздел 2.1), возможно путём реакции ацилирования аминокислотой, содержащей боковой ароматический радикал. Данная схема чаще реализуется при полной твердофазной стратегии синтеза лигандов и конъюгатов (см. Раздел 2.2.3.4). Однако имеется несколько примеров реализации такого синтеза в растворе (Рисунок 2.45).[68,69]

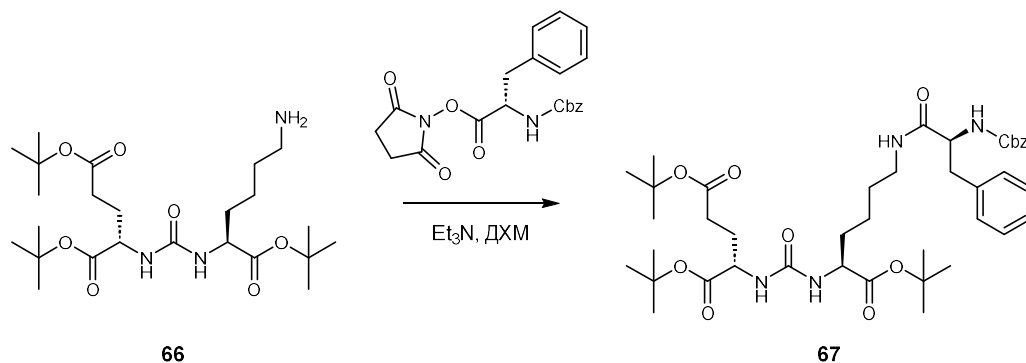


Рисунок 2.45. Пример введения аминокислотного остатка, содержащего боковой ароматический радикал, путём ацилирования ϵ -аминогруппы лизина.

В представленных работах авторы осуществляют модификацию атома азота лизина ацилированием соединения **66** NHS-эфиром *L*-фенилаланина, α -аминогруппа которого защищена бензилоксикарбонильной группой. Последующее наращивание линкера может быть осуществлено с применением различных подходов пептидного синтеза.

Также введение ароматического фрагмента за счёт реакции ацилирования может быть осуществлено согласно схеме, представленной на Рисунке 2.46. Представленный подход предполагает на первом этапе проведение реакции восстановительного аминирования, при помощи которой осуществляется введение в структуру линкера или его фрагмента. В одной из работ соединение **66** подвергалось модификации 5-азидопентаналем с получением соединения **68**.^[97] В качестве восстановителя был выбран цианоборгидрид натрия. Полученный вторичный амин в дальнейшем был введён в реакцию ацилирования с хлорангидридом флуорен-9-карбоновой кислоты в присутствии триэтиламина с получением азида **69**. Полученное соединение в дальнейшем подвергалось модификации по азидогруппе. В другой рассматриваемой публикации авторы получали вторичный амин **70** путём реакции соединения **66** с метиловым эфиром 3-оксопропановой кислоты в присутствии боргидрида натрия.^[98] Последующее ацилирование проводилось в условиях, аналогичным первому примеру. Таким образом, был получен метиловый эфир **71**, который может быть гидролизован без затрагивания *трет*-бутильных групп для последующего наращивания линкера.

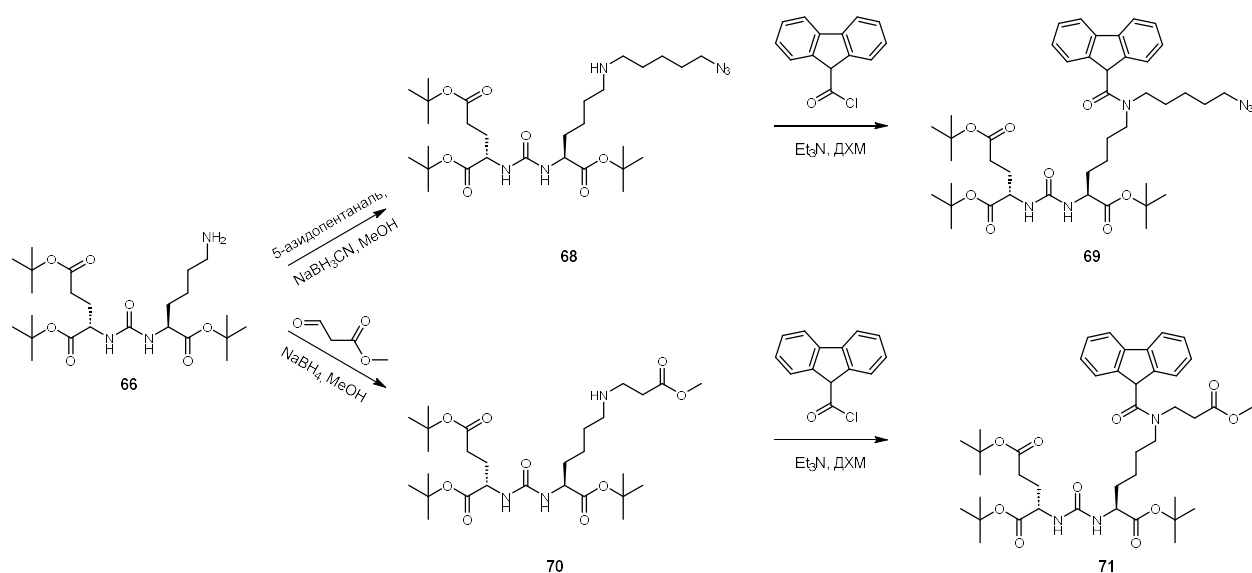


Рисунок 2.46. Введение остатка 9-карбоксифлуорена за счёт реакции ацилирования в структуру лиганда ПСМА.

2.2.3.3 Способы введения линкера в структуру лигандов ПСМА

При выборе подходов к введению линкера в структуру решающую роль имеет дизайн конечного лиганда и конъюгата. Используемые стратегии синтеза могут различаться исходя

из того, планируется ли введение в структуру дополнительного пептидного участка, или в качестве линкера выбран алифатический или ПЭГ-содержащий фрагменты.

Введение алифатического или ПЭГ-содержащего фрагмента чаще всего реализуется путём ацилирования ϵ -аминогруппы лизина. Так, в ряде работ был реализован подход, при котором соединение **72** было введено в реакцию с NHS-активированным эфиром субериновой кислоты с получением NHS-эфира **73** (Рисунок 2.47). В дальнейшем подобные NHS-эфиры взаимодействовали с ϵ -Вос-лизином или его аналогами с получением соединения **74**. Последующая модификация ϵ -положения возможна, например, за счёт ацилирования активированными эфирами флуоресцентных меток или хелатирующих агентов.[64–66,99,100] Схожий подход к введению остатка субериновой кислоты был реализован в работах по получению конъюгатов PSMA-I&T и PSMA-I&S и их аналогов (соединения **52a-c**, **53**, Рисунки 2.28 и 2.29).[77,78,81] Однако в случае этих соединений, обладающих более сложной структурой линкера, предварительно проводился твердофазный синтез пептидного фрагмента, который в дальнейшем вводился в реакцию ацилирования с NHS- или Pfr-эфиром в растворе.

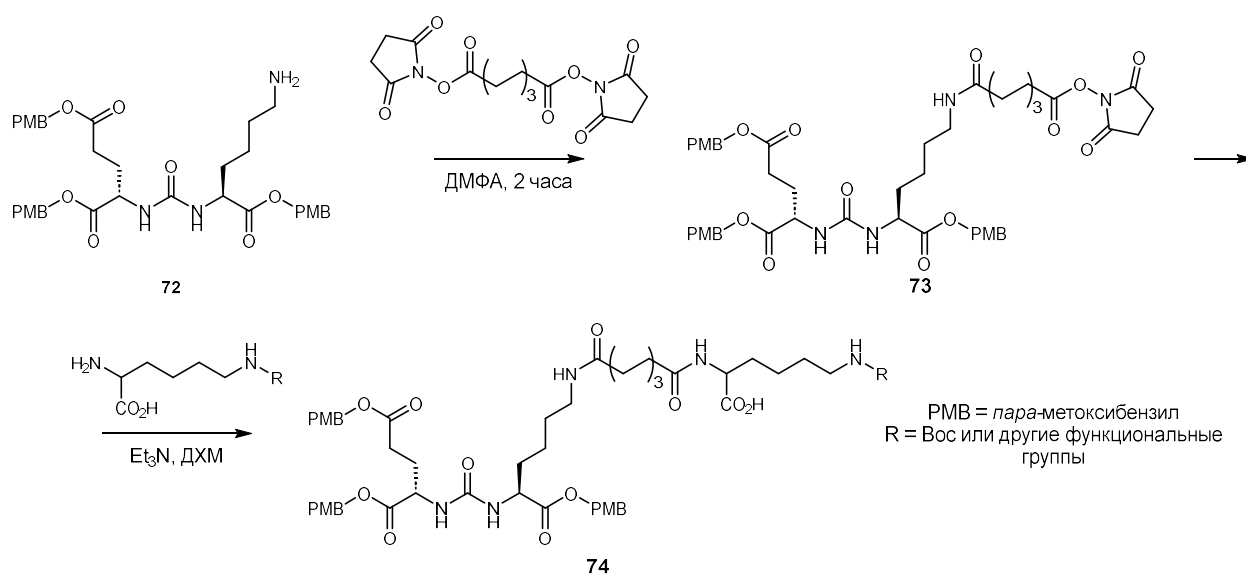


Рисунок 2.47. Схема получения лигандов ПСМА с остатком субериновой кислоты в линкере.

Иной вариант введения алифатического линкера представлен в ранее упомянутой работе, посвящённой получению конъюгатов лигандов ПСМА с доксорубицином.[84] Авторы осуществляли предварительную сборку линкера, исходя из карбоновых кислот с разной длиной углеводородной цепи и терминальной аминогруппой **75a-b** (Рисунок 2.48). На первом этапе получали соответствующие бензиловые эфиры **76a-b**, которые ацилировали монометиловым эфиром адипиновой кислоты. Полученные соединения **77a-b** подвергали гидрогенолизу для селективного удаления бензильной защитной группы, а

синтезированные таким образом карбоновые кислоты **78a-b** ацилировали защищённую мочевины **66**, в результате чего были получены соединения-предшественники лигандов ПСМА **79a-b**.

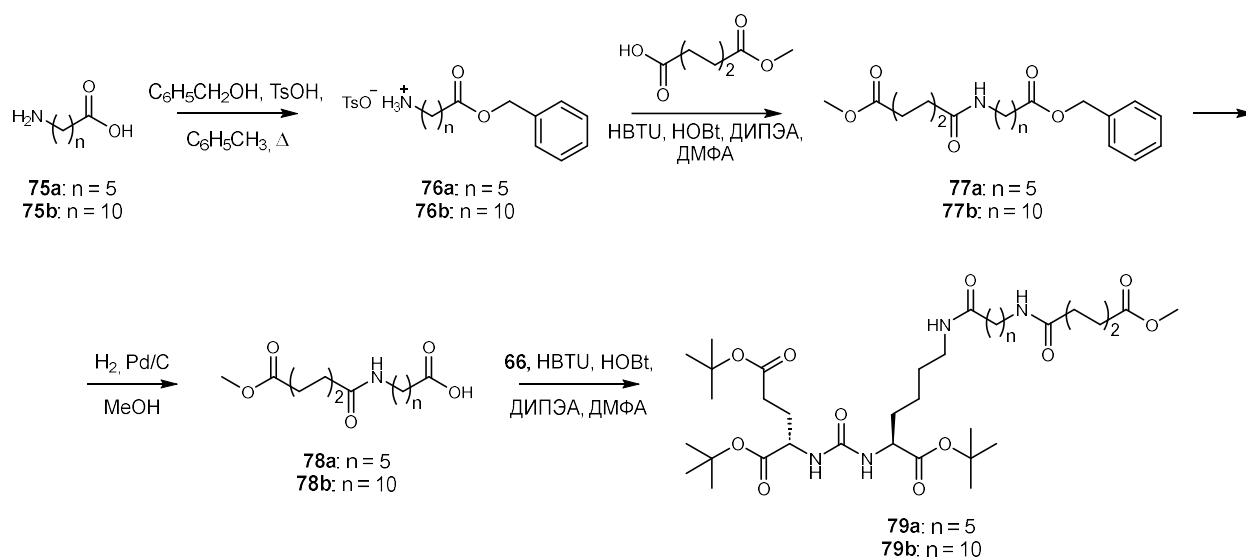


Рисунок 2.48. Схема получения лигандов ПСМА с разной длиной алифатического линкера.

В литературе представлен схожий подход для введения в алифатический фрагмент линкера остатков дикарбоновой кислоты и аминокислоты с терминальной аминогруппой (Рисунок 2.49).[9] Предложенная авторами схема предполагает на первой стадии введение бензильного заместителя в ϵ -положение лизина за счёт реакции восстановительного аминирования. Полученные таким образом амины **80a-f** ацилируют с 6-азидогексановой кислотой с получением соединений **81a-f**. Терминальную азидогруппу восстанавливают по реакции Штаудингера, и полученные амины **82a-f** вводят в реакцию ацилирования с получением соединений-предшественников лигандов ПСМА **83a-f**. Альтернативная схема синтеза с использованием Cbz-защищённой γ -аминомасляной кислоты начинается с реакции ацилирования вторичного амина **80a**. Полученное таким образом производное **84** подвергают гидрогенолизу для удаления защитной группы и амин **85** ацилируют янтарным ангидридом с образованием соединения **86**. Полученные таким образом соединения-предшественники лигандов ПСМА могут быть легко подвергнуты модификации по терминальной карбоксильной группе.

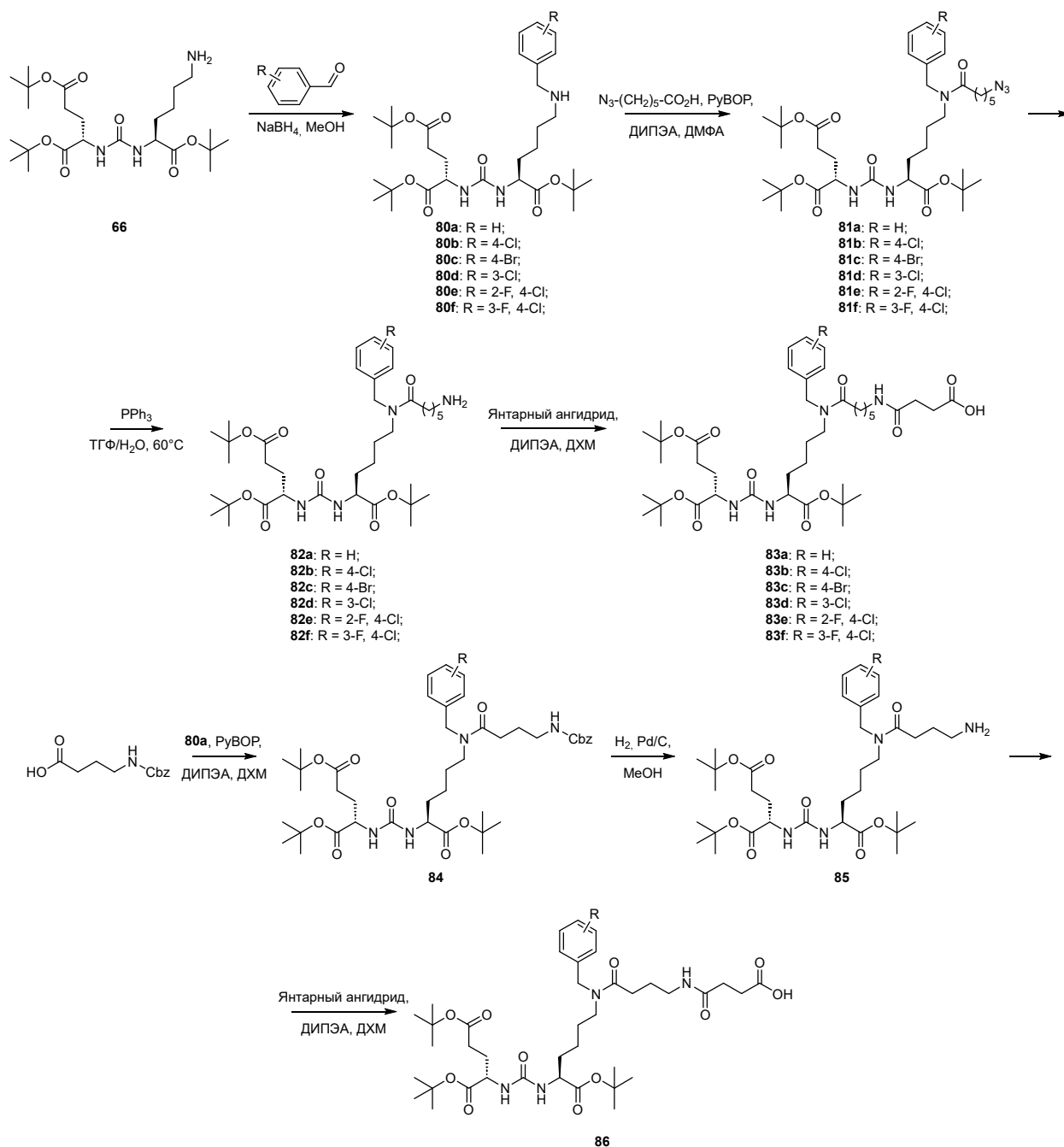


Рисунок 2.49. Подходы к получению соединений-предшественников лигандов ПСМА с фрагментами 6-аминогексановой и 4-аминобутановой кислот в структуре.

В литературе представлен схожий подход для введения в алифатический фрагмент линкера остатков дикарбоновой кислоты и аминокислоты с терминальной аминогруппой (Рисунок 2.49).[9] Предложенная авторами схема предполагает на первой стадии введение бензильного заместителя в ϵ -положение лизина за счёт реакции восстановительного аминирования. Полученные таким образом амины **80a-f** ацилируют с 6-азидогексановой кислотой с получением соединений **81a-f**. Терминальную азидогруппу восстанавливают по реакции Штаудингера, и полученные амины **82a-f** вводят в реакцию ацилирования с получением соединений-предшественников лигандов ПСМА **83a-f**. Альтернативная схема

синтеза с использованием Cbz-защищённой γ -аминомасляной кислоты начинается с реакции ацилирования вторичного амина **80a**. Полученное таким образом производное **84** подвергают гидрогенолизу для удаления защитной группы и амин **85** ацилируют янтарным ангидридом с образованием соединения **86**. Полученные таким образом соединения-предшественники лигандов ПСМА могут быть легко подвергнуты модификации по терминальной карбоксильной группе.

Введение ПЭГ-содержащих линкеров реакцией ацилирования ϵ -положения защищённой мочевины DCL представлено в публикациях [59,66].

Одна из предложенных схем включает ацилирование соединения **72** карбоновой кислотой с терминальной Boc-защищённой аминогруппой и двумя остатками этиленгликоля в структуре (Рисунок 2.50).[66] В качестве активатора использовался TBTU (O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния тетрафторборат), а в качестве основания – ДИПЭА. Полученное таким образом производное **87** подвергалось удалению кислотно-лабильных защитных групп с получением лиганда **88**.

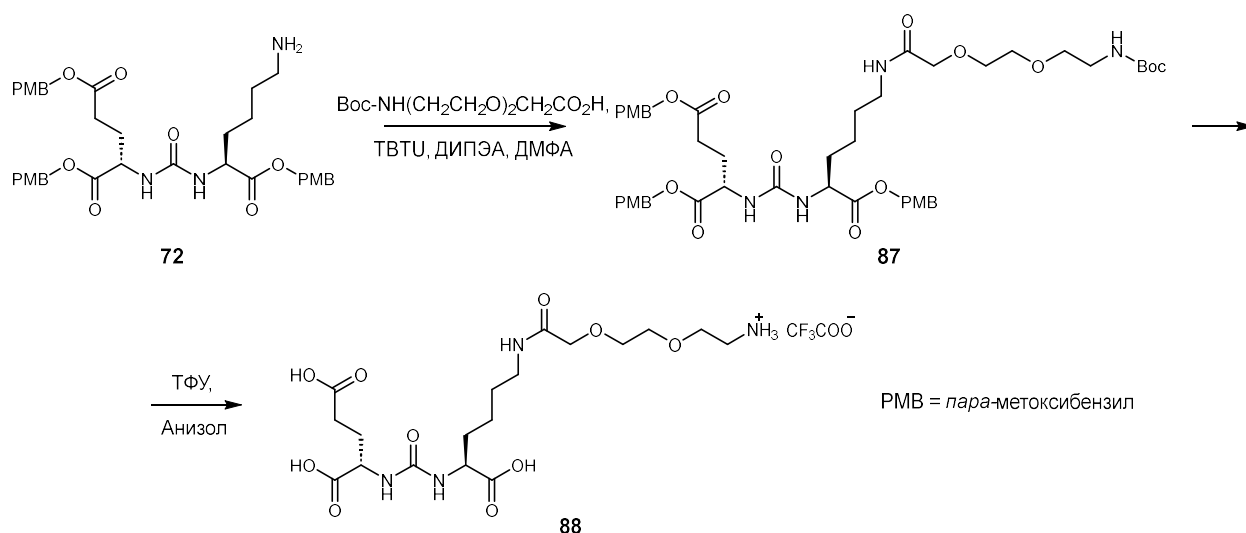


Рисунок 2.50. Схема синтеза лиганда **88** с диэтиленгликолевым фрагментом в линкере.

Схожая схема получения ПСМА-направленных соединений была реализована и в более поздней работе.[59] Были синтезированы соединения, содержащие биотиновый фрагмент и ПЭГ-фрагменты с различным количеством звеньев в линкере (Рисунок 2.51). При этом были реализованы две различные синтетические схемы. Для соединения с восемью этиленгликолевыми звеньями в линкере модификация соединения **66** осуществлялась в три стадии. На первой стадии ацилировали ϵ -аминогруппу лизина кислотой, содержащей ПЭГ-фрагмент и терминальную аминогруппу, защищённую Cbz-защитой, в присутствии TBTU и ДИПЭА. Затем удаляли Cbz-защиту гидрогенолизом и проводили ацилирование NHS-эфиром биотина с образованием соединения **89a**. В случае более длинного линкера авторы вводили в реакцию ацилирование ПЭГ-содержащую

кислоту, модифицированную по N-концу остатком биотина в аналогичных условиях с получением соединения **89b**. В обоих случаях на последней стадии проводилось удаление кислотно-лабильных защитных групп в трифторуксусной кислоте.

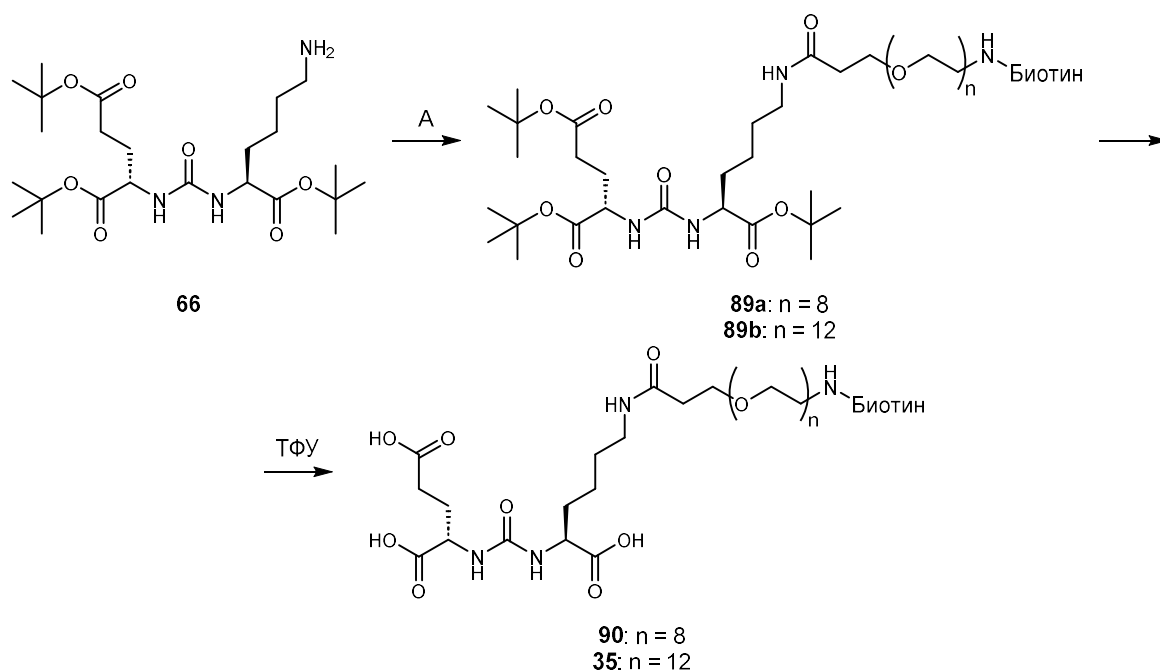


Рисунок 2.51. Схема синтеза ПСМА-направленных соединений, содержащих биотиновый фрагмент. Условие А при $n = 8$: 1) Z-NH-ПЭГ₈-COOH, TBTU, ДИПЭА, ДМФА; 2) H₂, Pd(OH)₂, MeOH; 3) NHS-Биотин, ДИПЭА, ДМФА. Условие А при $n = 12$: HOOC-ПЭГ₁₂-Биотин, TBTU, ДИПЭА, ДМФА.

Альтернативный вариант введения ПЭГ-содержащего линкера был предложен в ранее цитировавшейся работе по получению ПСМА-направленного соединения с остатком 9-карбоксифлуорена.[98] Полученное согласно Рисунку 2.46 соединение **71** подвергли щелочному гидролизу с получением карбоновой кислоты **91**, которую вводили в реакцию ацилирования с защищённым хелатирующим агентом DOTA, модифицированным ПЭГ-содержащими линкерами разной длины (Рисунок 2.52). В качестве активирующего агента был выбран HATU, а в качестве основания – ДИПЭА. Таким образом были получены два защищённых конъюгата **92a-b**.

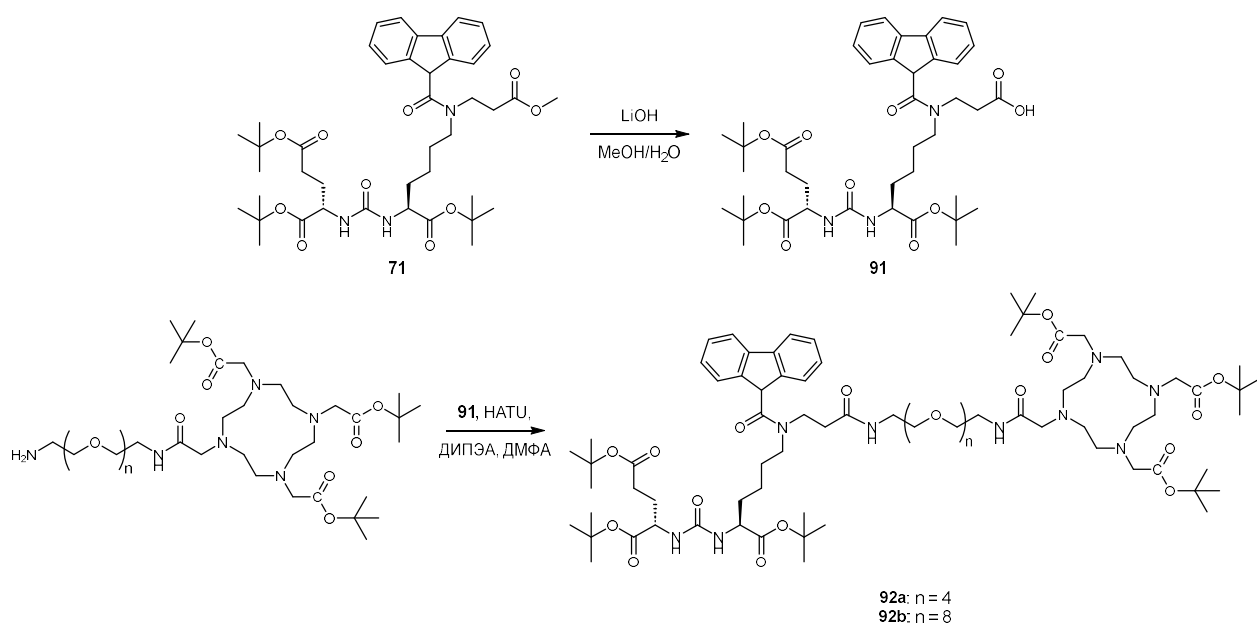


Рисунок 2.52. Схема синтеза ПЭГ-содержащих защищённых конъюгатов **92a-b**.

Как уже упоминалось ранее, синтез пептидного участка линкерного фрагмента обычно проводят отдельно. Для этого используют как твердофазные подходы, так и жидкофазные.

Примеры синтеза в растворе представлены в работах [9,82,83]. В данных исследованиях авторы проводили синтез серии лигандов с различными дипептидными фрагментами в структуре линкера согласно Рисунку 2.53.

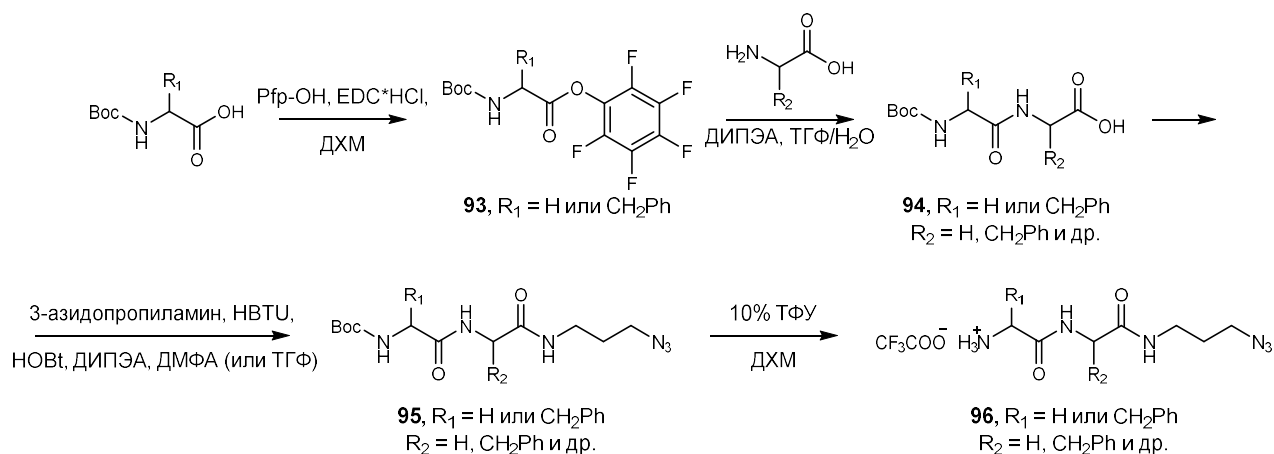


Рисунок 2.53. Общая схема получения дипептидных фрагментов в растворе.

Первая стадия данной схемы предполагает получение активированных пентафторфенильных эфиров **93**, исходя из соответствующих Вос-защищённых аминокислот. Полученные таким образом производные вводят в реакцию ацилирования с различными аминокислотами. Синтезированными дипептидами **94** затем ацилируют 3-азидопропиламин для введения в структуру азидогруппы для последующего конъюгирования с диагностическими агентами. На последней стадии с защищённых производных **95** удаляют защитные группы с выделением соответствующих

трифторацетатов **96**, которые далее вводят в реакции с производными **83a-f** (Рисунок 2.49) с получением защищённых форм лигандов ПСМА.

Несомненным преимуществом описанного подхода является возможность масштабирования. Однако, получение более сложных производных может быть затруднено; данная схема предполагает также большое число стадий с хроматографической очисткой целевых соединений. В связи с этим, для получения пептидных фрагментов активно используются подходы твердофазного синтеза.

Так, в одной из упомянутых выше работ, посвящённой влиянию заместителей на аффинность к ПСМА, целевые соединения были получены с применением твердофазного подхода согласно Рисунку 2.54.

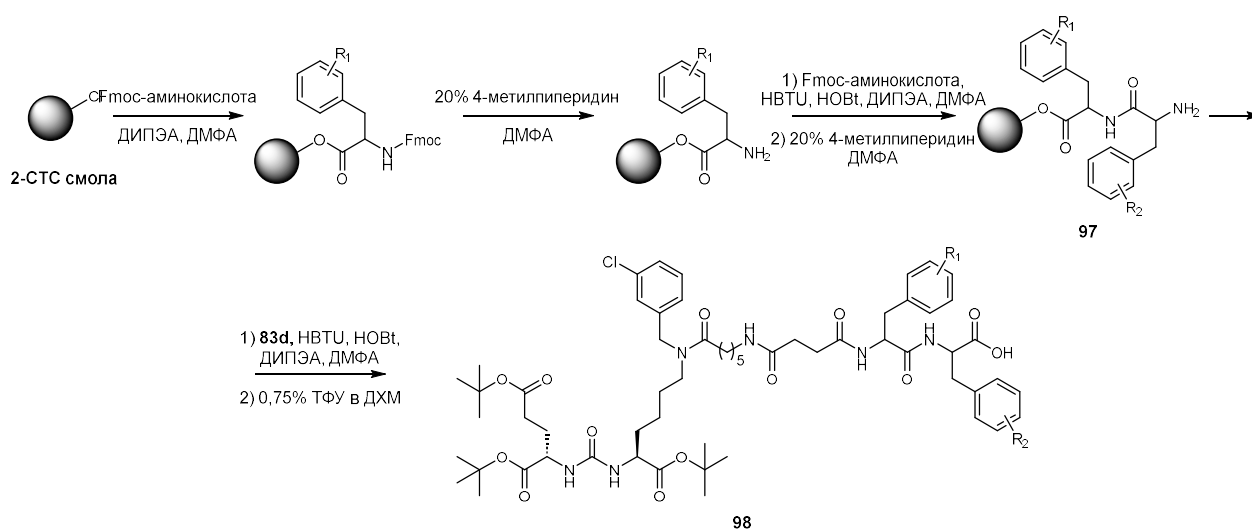


Рисунок 2.54. Общая схема получения лигандов ПСМА с пептидным фрагментом в линкере на 2-СТС смоле.

Данная синтетическая схема предполагает на первом этапе иммобилизацию аминокислоты на твердофазном носителе. В описываемой работе была выбрана 2-хлортритил хлоридная смола (2-СТС-смола), так как на ней удобно осуществлять синтез с использованием Fmoc-стратегии, а также возможно удаление полученных пептидных фрагментов со смолы без затрагивания кислотно-лабильных защитных групп. После иммобилизации на смоле Fmoc-защищённой аминокислоты проводилось удаление защитной группы с использованием раствора 4-метилпиперидина, затем реакция ацилирования второй аминокислотой в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА, и далее удаление Fmoc-группы. Полученный дипептид **97** после этого вводили в реакцию ацилирования с вектор-фрагментом **83d**, после чего проводилось удаление со смолы. Таким образом были получены соединения-предшественники лигандов **98**.

Другой подход к получению лигандов ПСМА с использованием твердофазного синтеза на носителе описан в работах по получению конъюгата PSMA-I&T и его аналогов.[77,78]

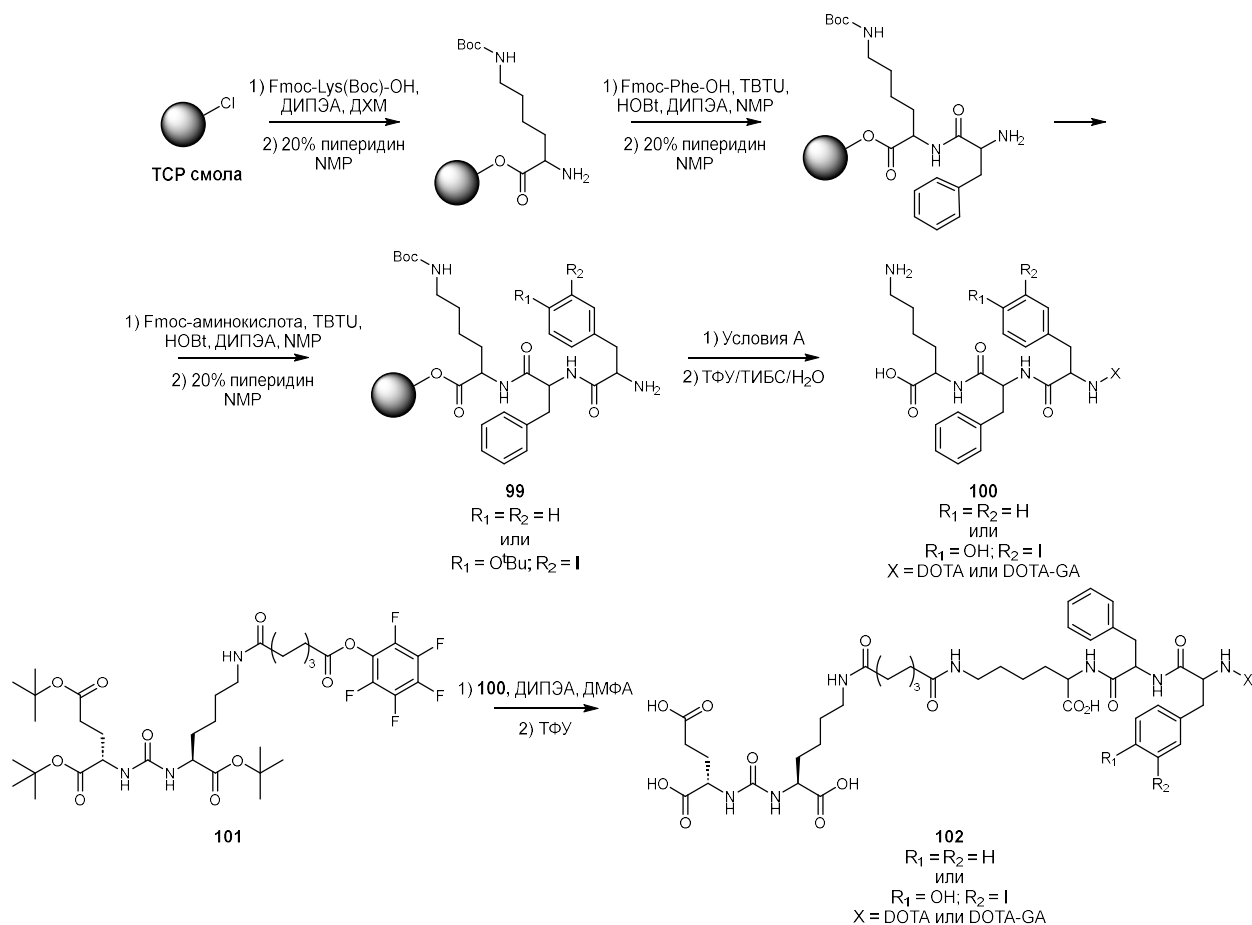


Рисунок 2.55. Общая схема получения конъюгата PSMA-I&T и его аналогов. Условие А при X = DOTA: DOTA-три-*трет*-бутиловый эфир, НАТУ, ДИПЭА, NMP. Условие А при X = DOTA-GA: DOTA-GA-ангидрид, ДИПЭА, NMP.

Предложенная авторами схема синтеза предполагает синтез на твердофазном носителе трипептидного фрагмента линкера с последующей модификацией его хелатирующим агентом (Рисунок 2.55). В качестве твердофазного носителя была выбрана тритилхлорид-полистирольная смола (TCP смола). На первой стадии проводилась иммобилизация лизина, ортогонально защищённого Fmoc- и Boc-защитными группами по α- и ε-аминогруппам соответственно. Последующее удаление Fmoc-защитной группы проводилось раствором пиперидина в N-метилпирролидоне. Затем осуществлялось наращивание пептидной последовательности на смоле с получением трипептидов **99**, которые ацилировали хелатирующими агентами, после чего удаляли полученные соединения с твердофазного носителя с одновременным удалением кислотно-лабильных защитных групп при помощи смеси трифторуксусной кислоты, три-*изо*-бутилсилана (ТИБС) и воды. Синтезированные производные **100** ацилировали активированным

петнафторфениловым эфиром **101** (синтез данного соединения аналогичен синтезу ранее упомянутого производного **73**, Рисунок 2.47), после удаляли защитные группы с получением целевых конъюгатов **102**. Схожий подход был реализован и при получении конъюгата PSMA-I&S, содержащего в линкере остатки нафтилаланина и тирозина.[81]

2.2.3.4 Твердофазные стратегии синтеза лигандов ПСМА

В данном разделе кратко рассмотрены подходы к получению конъюгатов и лигандов ПСМА с синтезом мочевинового фрагмента на твердофазном носителе. Наиболее часто подобный подход реализуется при получении конъюгатов лигандов ПСМА с хелатирующими агентами. Примером может являться синтез ранее упоминавшегося конъюгата PSMA-617 (Рисунок 2.56).[74]

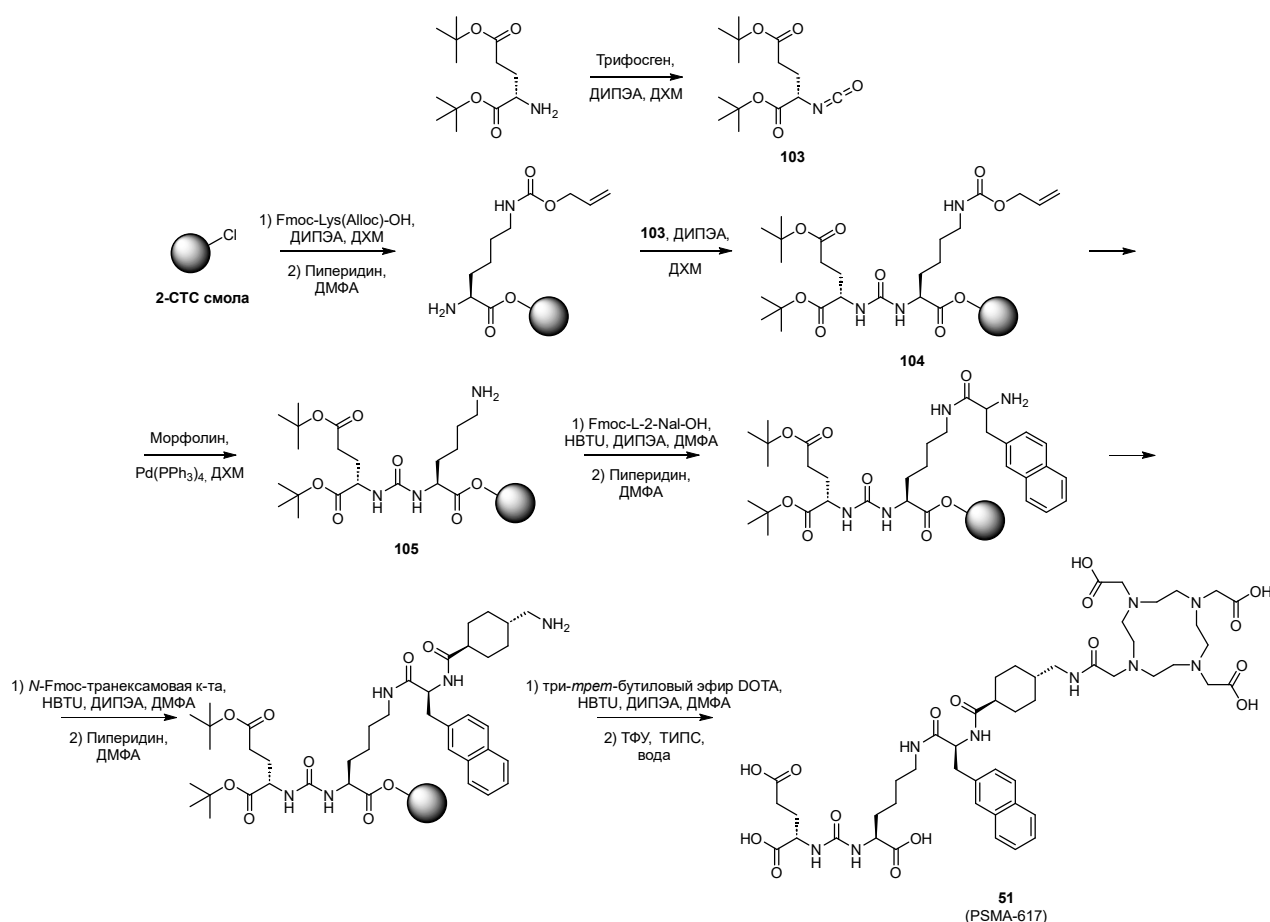


Рисунок 2.56. Синтез конъюгата PSMA-617 с использованием твердофазного подхода.

Первый этап этой схемы предполагает получение изоцианата глутаминовой кислоты **103**. После этого осуществляется иммобилизация на 2-СТС смоле остатка лизина, защищённого алилоксикарбонильной (Alloc) группой по ϵ -положению и Fmoc-группой по α -положению. Затем удаляют Fmoc-группы и создают мочевиновый фрагмент реакцией с изоцианатом **103**, с образованием защищённой формы мочевины DCL **104**. Следующим этапом является селективное удаление Alloc-группы под действием морфолина в присутствии тетракис(трифенилфосфин)палладия с получением пригодного для

дальнейшей модификации по аминокруппе производного **105**. В случае PSMA-617 последующая модификация включает введение остатков 2-нафтилаланина и транексамовой кислоты с использованием классической Fmoc-стратегии, ацилирование аминокруппы транексамовой кислоты трис-*трет*-бутиловым эфиром хелатора DOTA и удаление полученного продукта со смолы с одновременным удалением кислотно-лабильных защитных групп действием смеси трифторуксусной кислоты, три-*изо*-пропилсилана (ТИПС) и воды. Несмотря на то, что в литературе предложены альтернативные подходы к получению конъюгата PSMA-617, обычно используется именно твердофазная стратегия.[101] Аналогичные схемы синтеза реализованы в целом ряде публикаций.[63,102–104]

Стратегия с использованием Alloc-защитной группы не является единственной возможной, в литературе представлено несколько альтернативных вариантов твердофазной сборки фрагмента DCL на смоле (Рисунок 2.57). Так, есть пример использования 1-(4,4-диметил-2,6-диоксогекс-1-илиден)-3-метилбутильной (ivDde) защитной группы при ϵ -аминокруппе лизина.[105] Авторы данной публикации мочевиный фрагмент получали за счёт реакции с участием CDI, что также является менее распространённым подходом при твердофазном синтезе. Полученное производное **106** в дальнейшем было введено в реакцию с гидразингидратом для удаления защитной группы с получением иммобилизованного фрагмента **105**.

В другом альтернативном варианте проведения стадии получения мочевиного фрагмента на смоле используется 4-метилтритильная (Mtt) защитная группа.[11] Выбор альтернативной защитной группы в этом примере был обоснован используемым твердофазным носителем. В отличие от ранее рассмотренных случаев, авторы использовали смолу Ванга. На первой стадии проводили иммобилизацию защищённого лизина на смоле и удаляли Fmoc-защитную группу, после чего получали мочевины с использованием 4-нитрофенилхлорформиата и гидрохлорида ди-*трет*-бутилового эфира глутаминовой кислоты. Полученное таким образом производное **107** вводили в реакцию удаления Mtt-защитной группы под действием 1,8% раствора трифторуксусной кислоты в хлороформе. В подобных условиях удаление проходит селективно, не затрагивая *трет*-бутильные группы остатка глутаминовой кислоты, а также не происходит удаление иммобилизованного фрагмента с носителя.

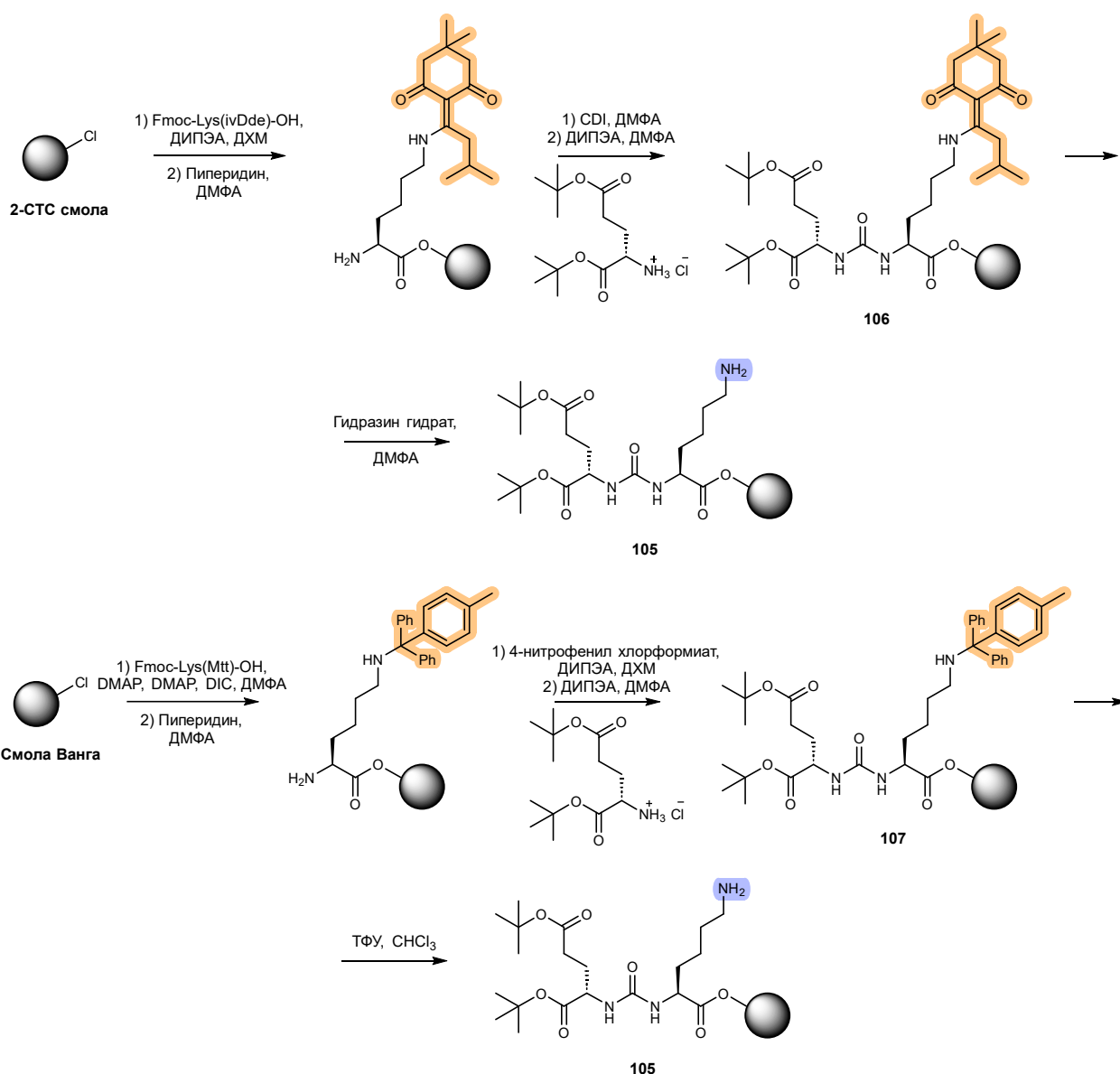


Рисунок 2.57. Альтернативные подходы к созданию защищённого фрагмента DCL на смоле. Оранжевым выделены защитные группы, синим –аминогруппа лизина.

2.3 Комбинационная терапия рака предстательной железы

Перспективным подходом к лечению РПЖ, активно развивающимся в последние годы, является комбинационная терапия. Данный подход подразумевает совместное использование двух и более терапевтических агентов с различными механизмами действия для достижения аддитивного или синергетического эффекта. При достижении синергизма между препаратами возможно снижение общих дозировок агентов, и как следствие – снижение побочных эффектов, вызванных ими.[106–110] В данном разделе обзора нами будут рассмотрены лишь основные работы по данной тематике.

Говоря о клинических исследованиях, стоит обратить внимание на работы, посвящённые обобщению и анализу данных по использованию различных комбинаций

препаратов. При сравнении комбинации препарата доцетаксел с андроген-депривационной терапией (АДТ) и комбинации ацетата абиратерона с АДТ не удалось выявить значительных различий в средней выживаемости как в случае РПЖ высокого риска и метастатическом раке простаты без предшествующей гормональной терапии, так и в случае метастатического впервые диагностированного РПЖ.[111] При этом байесовский анализ продемонстрировал высокую вероятность того, что предпочтительна комбинация Абиратерона с АДТ.

В работе [112] были обобщены данные по комбинации АДТ с различными терапевтическими препаратами (абиратерон, доцетаксел, бисфосфонат, целекоксиб) при метастазирующем гормонально-чувствительном РПЖ. Были выявлены преимущества комбинации абиратерона с АДТ; все рассмотренные комбинации превосходили в эффективности монотерапию с АДТ (Рисунок 2.58).

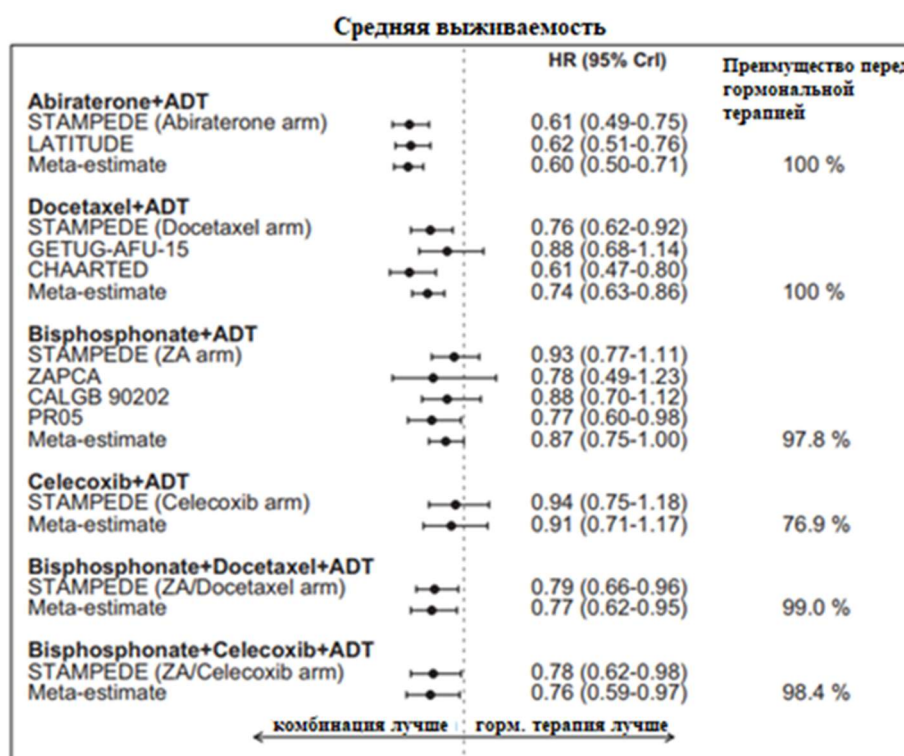


Рисунок 2.58. Сравнение комбинации гормональной и химиотерапии с гормональной терапией.

В литературе представлены и исследования, посвящённые комбинациям препаратов, не относящихся к АДТ. Исследования пары препаратов испинесиб и доцетаксел показало, что доцетаксел можно безопасно назначать вместе с ингибитором моторного веретена деления (испинесибом). [113] Совместное использование ингибитора андрогеновых рецепторов энзалутамида с ингибитором тубулина доцетакселом при метастазирующем кастрационно-резистентном РПЖ показало, что несмотря на повышенные показатели нейтропении и нейтропенической лихорадки использование данной комбинации

целесообразно, в связи с отличным от монотерапии доцетакселом фармакокинетическим профилем комбинации, однако требуются дополнительные исследования с увеличенным количеством пациентов.[114,115]

Удобным методом оценки синергизма, является расчёт комбинационного индекса (CI) по методу Чоу-Талалая (Формула 2.1).[116,117]

$$CI_x = \frac{[IC_x(A)]}{[IC'_x(A)]} + \frac{[IC_x(B)]}{[IC'_x(B)]} + \frac{[IC_x(A)] \times [IC_x(B)]}{[IC'_x(A)] \times [IC'_x(B)]}$$

Формула 2.1. Формула расчёта комбинационного индекса CI_x . $[IC_x(A)]$, $[IC_x(B)]$ – концентрации препаратов А и В в комбинации, при которых снижается выживаемость клеток до $x\%$; $[IC'_x(A)]$ и $[IC'_x(B)]$ – концентрации препаратов А и В по отдельности, при которых выживаемость клеток снижается до $x\%$.

Значение $CI > 1$ указывает на антагонизм комбинации, $CI = 1$ – на наличие аддитивного эффекта, а значение $CI < 1$ говорит о наличии у рассматриваемой комбинации синергетического эффекта.

В работе, посвящённой исследованию эффективности использования гинзенозида Rh2 (G-Rh2; соединение, выделяемое из женьшеня, потенциальный противоопухолевый агент[118,119]) совместно с химеотерапевтическими препаратами паклитакселом (Ptx) и митоксантроном (Mtx) показан синергетический эффект для обеих рассматриваемых комбинаций на клеточной модели РПЖ LNCaP: $CI_{50}(G-Rh2+Ptx) = 0,88$; $CI_{75}(G-Rh2+Ptx) = 0,95$; $CI_{50}(G-Rh2+Mtx) = 0,83$; $CI_{75}(G-Rh2+Mtx) = 0,84$. [120]

Схожее исследование комбинации субероиланилида гидроксамовой кислоты (SAHA), являющегося ингибитором гистондеацетилаз, и олапариба (Ola) – ингибитора поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) на трёх различных клеточных моделях предстательной железы: DU 145 (опухолевая модель), PC-3 (опухолевая модель) и RWPE-1 (здоровая модель) продемонстрировало синергизм на опухолевых моделях, в то время как в случае клеточной линии RWPE-1 наблюдается антагонизм вне зависимости от соотношения препаратов (Таблица 2.13).[121]

Таблица 2.13. Значения комбинационного индекса для пары олапари/ SAHA

Клеточная линия	Соотношение SAHA : Ola	CI_{50}	CI_{75}	CI_{90}	CI_{95}
DU 145	1 : 20	0,87	0,79	0,75	0,73
RWPE-1	1 : 20	1,30	1,20	1,14	1,12
PC-3	1 : 4	0,66	0,71	0,77	0,82
RWPE-1	1 : 4	1,48	1,67	2,08	2,46

Исследование эффективности совместного использования уже упомянутого PARP-ингибитора олапариба с ингибитором c-Met киназы PHA665752 *in vitro* показало, что

совместное ингибирование с-MET и PARP может синергетически подавлять пролиферацию, миграцию, инвазию и выживание клеток РПЖ, что вызвано снижением транслокации гена RAD51 в ядро за счёт ингибирования с-MET киназы, что в свою очередь значительно повышает чувствительность к PARP-ингибиторам через усиленный ответ на повреждение ДНК.[122] Расчёт комбинационного индекса не проводился.

Был исследован эффект применения ингибитора натрий-глюкозного котранспортёра-2 (SGLT-2) эмпаглифлозина в комбинации с ингибитором деполимеризации тубулина доцетакселом.[123] Несмотря на то, что эмпаглифлозин используется в клинической практике в качестве препарата для лечения диабета второго типа, ранее было показано, что SGLT-2 экспрессируется в клетках РПЖ, что стало причиной, по которой ингибиторы данного котранспортёра начали исследовать как потенциальные противоопухолевые агенты.[124] *In vitro* исследования подобной комбинации на двух клеточных моделях (DU 145 и LNCaP) показали наличие синергетического эффекта в широком диапазоне соотношений препаратов.

Исследования проводились также и для систем совместной доставки терапевтических агентов. В работе, посвящённой созданию высокомолекулярной платформы для совместной доставки абиратерона (Abi) и доцетаксела (Doc) было показано наличие синергизма именно при использовании совместной доставки.[125] Авторами были синтезированы наночастицы поли(DL-лактид-ко-гликолида) (PLGA) с инкапсулированными абиратероном и доцетакселом, *in vitro* исследования которых на клеточной линии LNCaP показали следующие значения CI: $CI_{50}(Abt+Doc) = 1,08$; $CI_{50}(PLGA-Abt+PLGA-Doc) = 1,45$; $CI_{50}(PLGA-(Abt+Doc)) = 0,93$. Как видно из представленных данных, полученные наночастицы с включёнными в их структуру абиратероном и доцетакселом демонстрируют синергетический эффект, в то время как смесь наночастиц с абиратероном и наночастиц с доцетакселом антагонистичны.

Наночастицы на основе гиалуроновой кислоты и амфипатического катионного крахмала с включёнными в них препаратами доксорубицин и доцетаксел (DDCNPs) при исследовании *in vitro* показали цитотоксичность и способность вызывать апоптоз такую же, как и смесь свободных препаратов. [126] Однако дальнейшая оценка *in vivo* показала, что используемая высокомолекулярная платформа может усиливать накопление лекарства в опухолях и снижать неспецифическое накопление в здоровых тканях. Исследования на ксенографтных моделях показали значительное увеличение эффективности торможения роста опухоли, что косвенно говорит о наличии синергетического эффекта.

В литературе также представлены примеры направленных на ПСМА высокомолекулярных систем совместной доставки, которые будут рассмотрены в Разделе 2.4.2.

2.4 Терапевтические конъюгаты лигандов ПСМА

На данный момент в литературе представлен крайне ограниченный набор систем совместной доставки терапевтических агентов, направленных на ПСМА. В связи с этим, в данном разделе рассмотрены примеры как мономодальных терапевтических конъюгатов, так и бимодальных диагностических и тераностических систем для более полного понимания подходов к дизайну и синтезу подобных структур.

2.4.1 Мономодальные терапевтические конъюгаты, направленные на ПСМА

На данный момент в клинической практике нет одобренных к применению низкомолекулярных конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами. Однако в литературе представлено довольно много примеров подобных соединений.[127] При выборе дизайна подобных структур важно обратить внимание на следующие аспекты: выбор типа связи или линкера, отвечающих за высвобождение свободного действующего вещества, и способ конъюгирования фрагментов лиганда ПСМА и терапевтического агента.

В целом известны различные варианты линкеров, отвечающих за высвобождение препаратов в клетке,[128,129] которые можно разделить на следующие группы:

1. Кислотно-расщепляемые линкеры (гидразоны, карбонаты, сложные эфиры, силиловые эфиры);
2. Расщепляемые внутриклеточным глутатионом (дисульфидные фрагменты);
3. Расщепляемые под действием различных ферментов (катепсин Б, β -глюкорнидаза, β -галактозидаза, пирофосфатаза и другие);
4. Расщепляемые под действием ионов железа (II) (1,2,4-триоксоланы);
5. Фоторасщепляемые линкеры (гептаметин цианин флуорофорные, *o*-нитробензильные и другие);
6. Нерасщепляемые линкеры (малеимидные, триазол-содержащие и другие);

При выборе способов конъюгирования, используемых для создания целевых молекул, наибольшее распространение получили методы, основанные на создании амидной связи, триазольного цикла (за счёт реакции азид-алкинового [3+2]-циклоприсоединения), сложноэфирного фрагмента, карбаматной группы и некоторых других функциональных фрагментов.

В случае ПСМА-направленных конъюгатов часто используются молекулы, содержащие в качестве расщепляемой связи дисульфидный мостик, разрывающийся под

действием внутриклеточного глутатиона (GSH), так как его концентрация значительно выше в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми.[130] Расщепление дисульфидной связи может происходить двумя различными путями (Рисунок 2.59).

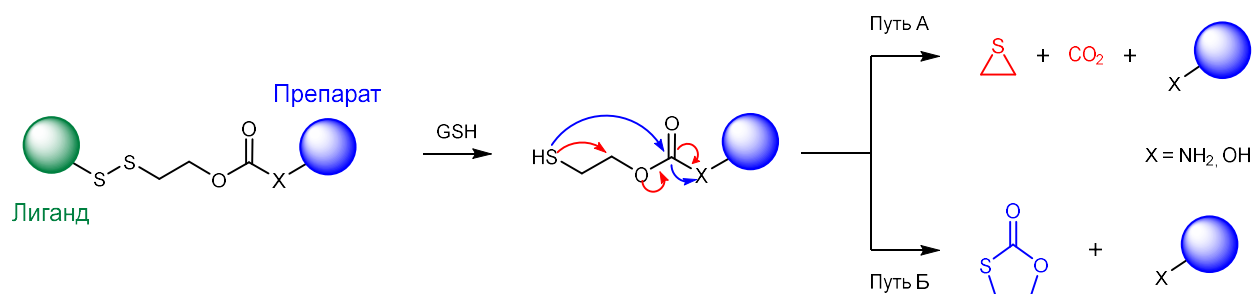


Рисунок 2.59. Два возможных механизма расщепления дисульфидной связи под действием GSH.

Путь А предполагает образование этиленсульфида, диоксида углерода и считается основным. Путь Б предполагает высвобождение препарата с образованием в качестве побочного продукта расщепления 1,3-оксатиолан-2-она и считается менее вероятным.[131]

Примером терапевтического конъюгата, направленного на ПСМА и содержащего дисульфидный фрагмент, является соединение **108**, содержащее в качестве терапевтической нагрузки ингибитор топоизомеразы I индотекал (Рисунок 2.60).[132]

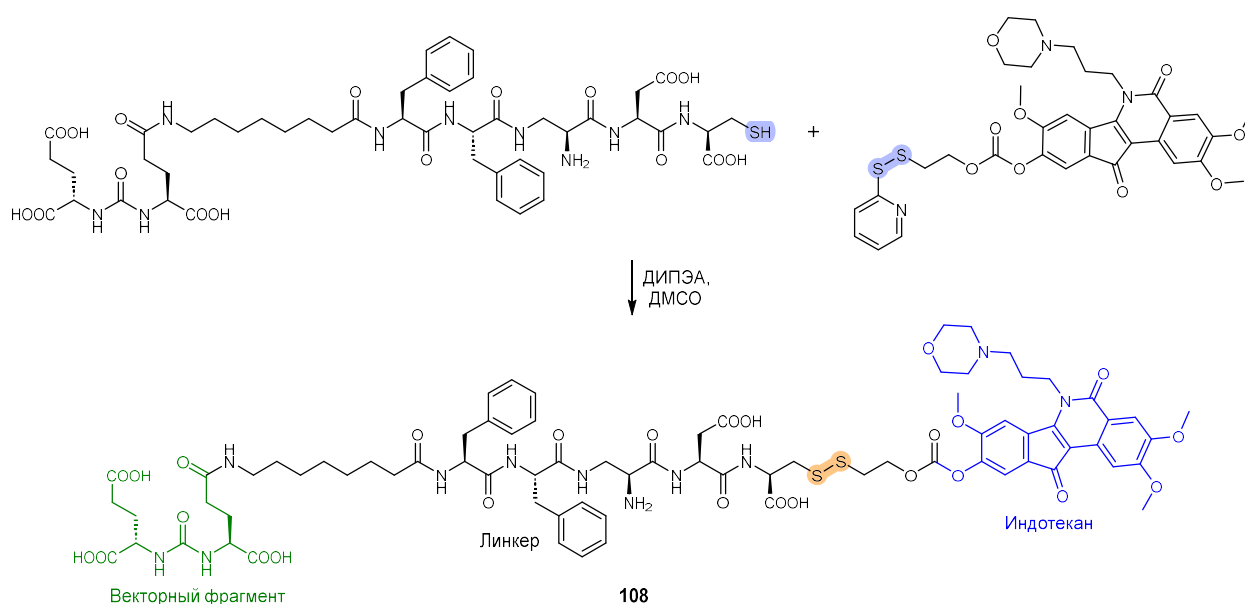


Рисунок 2.60. Схема получения конъюгата лиганда ПСМА с индотекалом.

Другим примером дисульфид-содержащего терапевтического конъюгата является соединение **109**, получаемое согласно Рисунку 2.61.[133]

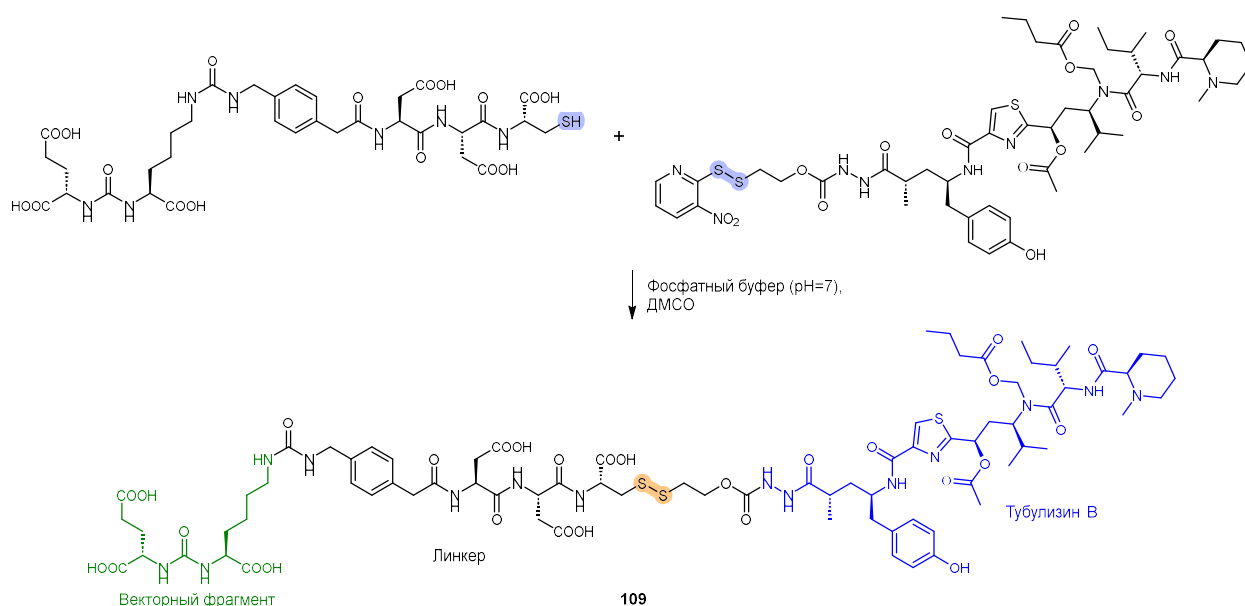


Рисунок 2.61. Схема синтеза конъюгата с Тубулизином В.

В качестве векторного фрагмента в данном конъюгате используется мочевиная DCL, а в качестве терапевтической нагрузки – гидразид Тубулизина В. Данный агент является ингибитором тубулина, значения IC_{50} для которого находятся в пикомолярном диапазоне. Соединение **109**, также известное как EC1169, показало высокий потенциал в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, в связи с чем было отобрано в качестве кандидата для клинических исследований.[134]

Дисульфид-содержащие конъюгаты с ингибиторами деполимеризации тубулина таксанового ряда, такими как паклитаксел, описаны в работе [135]. В отличие от рассмотренных выше примеров, авторы осуществляли конъюгирование препарата с лигандом за счёт создания амидной, а не дисульфидной связи (Рисунок 2.62). Предлагаемая схема высвобождения препарата включает расщепление дисульфидного мостика под действием GSH на первой стадии и последующий гидролиз сложного эфира с высвобождением свободного препарата на второй.

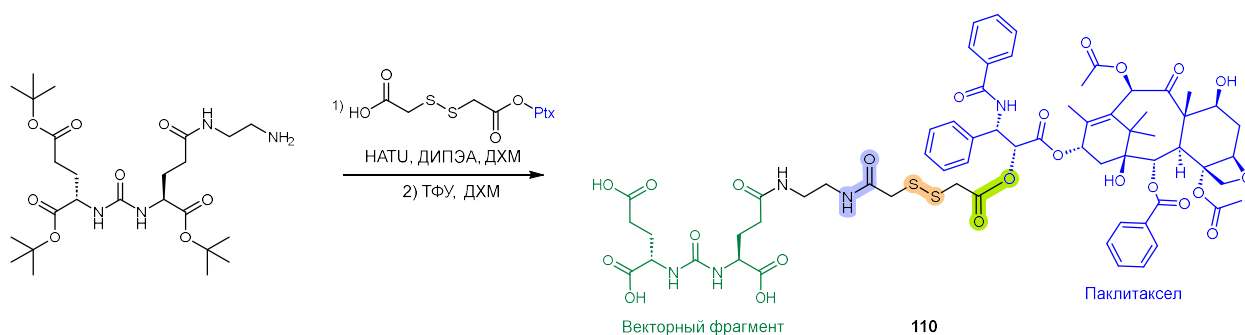


Рисунок 2.62. Схема синтеза направленного на ПСМА конъюгата с паклитакселом.

Ещё одним примером дисульфид-содержащего конъюгата является соединение **111**, содержащее производное сиригнолина в качестве терапевтического агента (Рисунок

2.63).[136] В данном случае конъюгирование осуществлялось при помощи азид-алкинового [3+2] циклоприсоединения; в роли катализатора используется иодид меди (I).

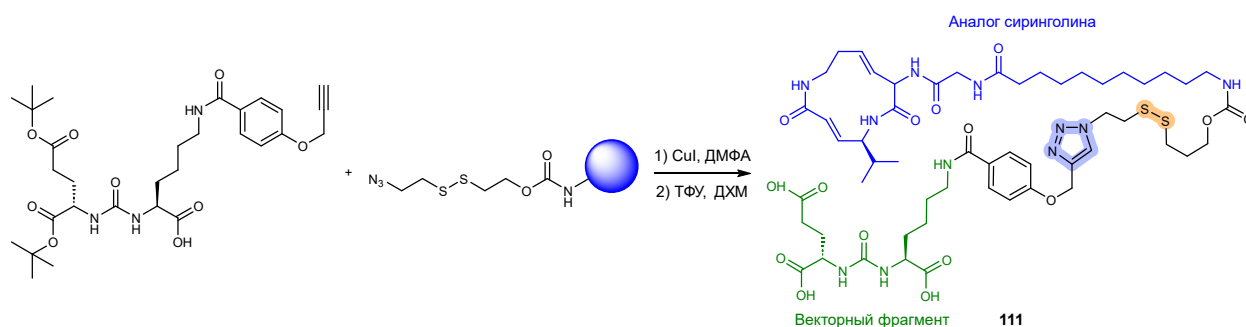


Рисунок 2.63. Схема получения конъюгата с аналогом сиринголина

Другой широко применяемый подход к дизайну терапевтических конъюгатов, направленных на ПСМА, предполагает высвобождение препарата путём гидролиза сложноэфирной связи.

Примером использования данного подхода может служить соединение **112**, содержащее активный метаболит камптотецина SN38, являющийся ингибитором топоизомеразы (Рисунок 2.64).[137] В данном случае конъюгирование осуществлялось за счёт взаимодействия малеимидного фрагмента с меркаптогруппой лиганда. В структуру лиганда она была введена ацилированием мочевины DCL цистеином.

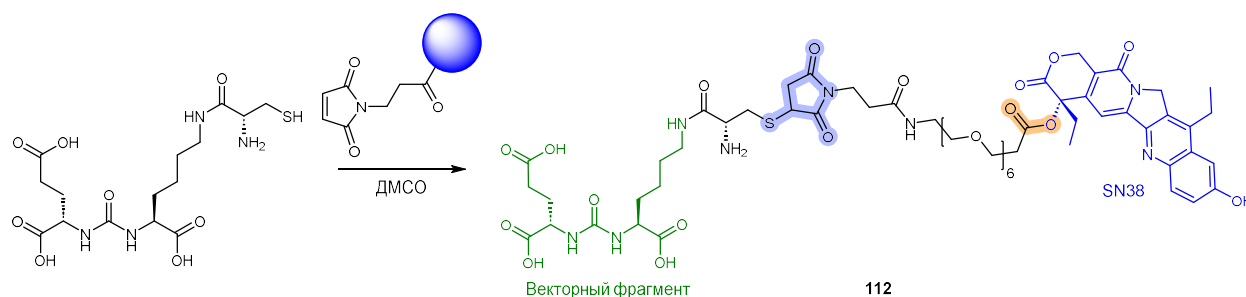


Рисунок 2.64. Схема синтеза конъюгата лиганда ПСМА с SN38

Другим примером конъюгатов со сложноэфирной связью является серия соединений **113a-g**, содержащих паклитаксел (Рисунок 2.65).[85] Конъюгирование было осуществлено за счёт реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

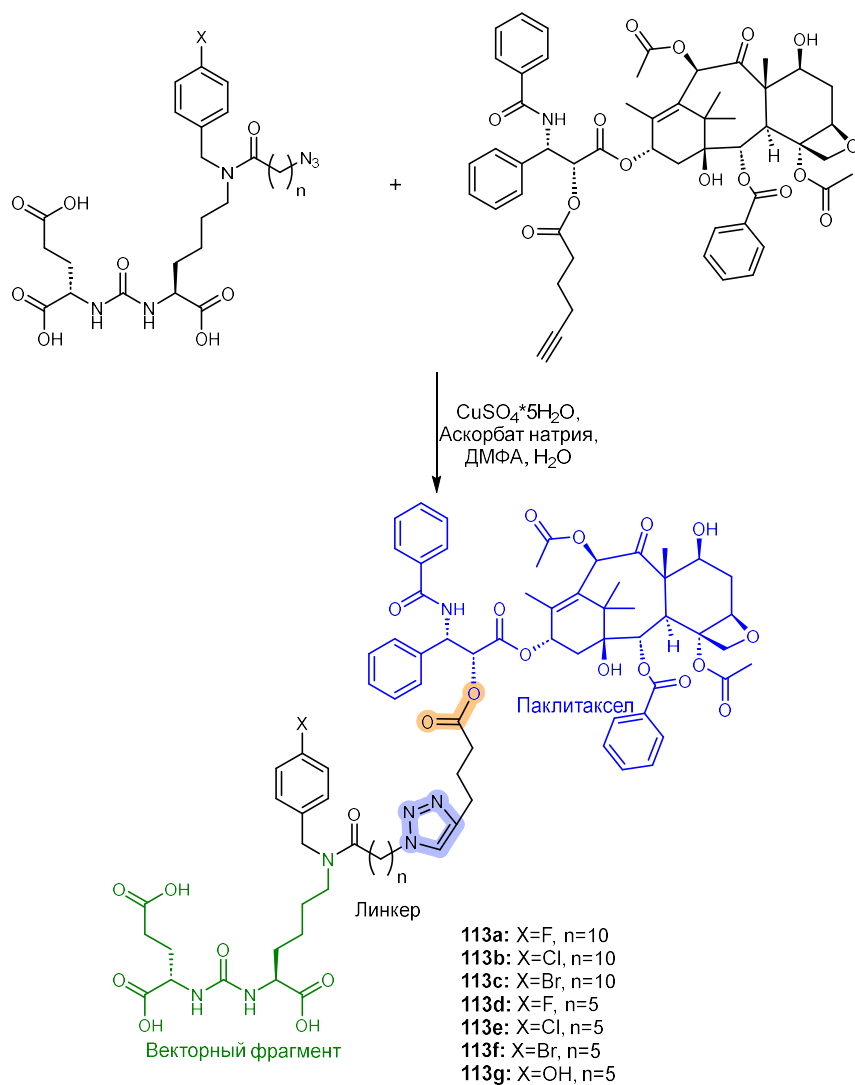


Рисунок 2.65. Схема получения конъюгатов с паклитакселом с различными заместителями в бензильном фрагменте и длиной линкера.

С использованием схожего подхода был синтезирован конъюгат **114** (Рисунок 2.66), содержащий линкер более сложной структуры и доцетаксел в качестве терапевтической нагрузки.[138] Как и в рассмотренном выше примере, объединение лигандного фрагмента и препарата осуществлялось путём создания триазольного цикла.

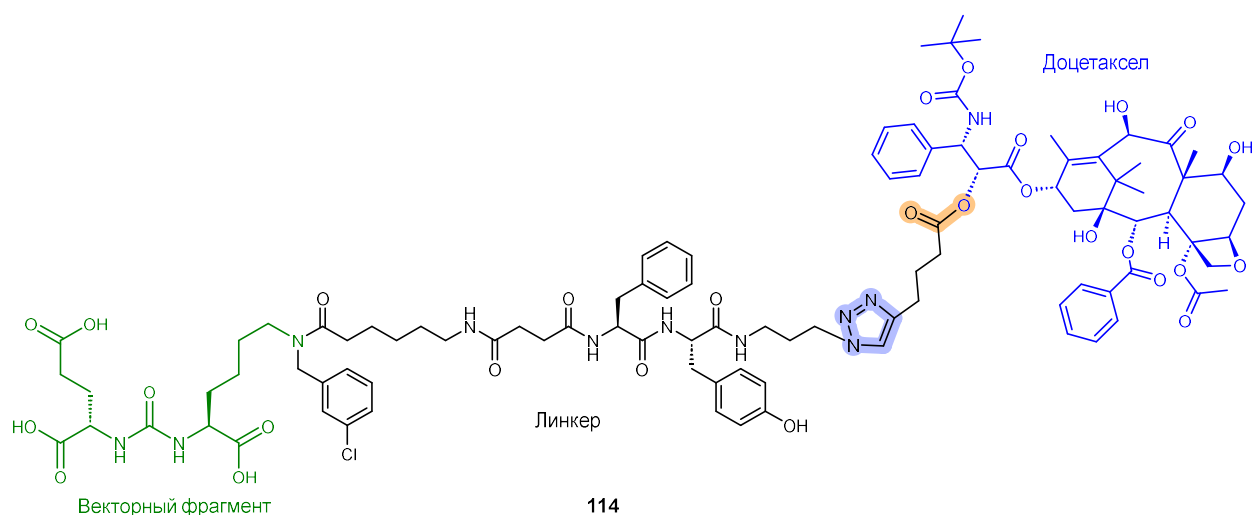


Рисунок 2.66. Структура конъюгата **114**, содержащего доцетаксел.

Аналогичный подход к дизайну использован и при создании конъюгата с абиратероном **115** (Рисунок 2.67).[139]

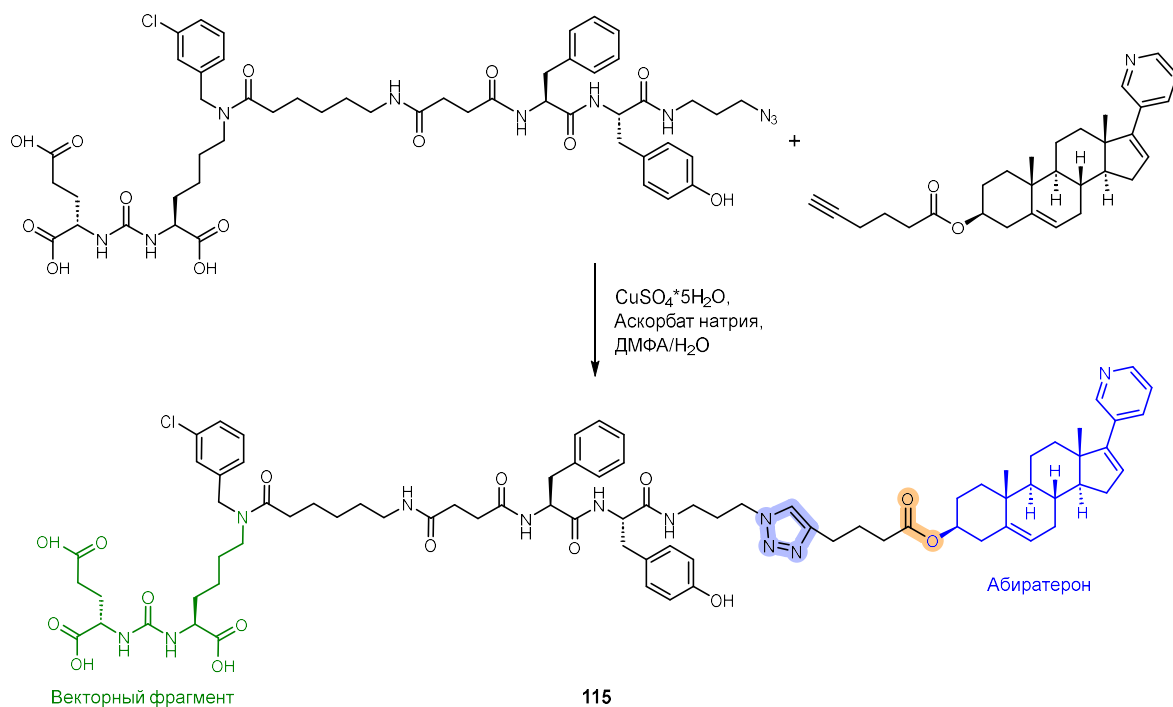


Рисунок 2.67. Схема получения конъюгата абиратерона с лигандом ПСМА.

При получении терапевтических конъюгатов, направленных на ПСМА, в качестве линкера, расщепляемого за счёт пониженного рН в липосомах опухолевых клеток, может быть использован гидразидный фрагмент. Подобный дизайн был осуществлён при создании соединения **54c**, упоминавшегося ранее и содержащего доксорубин (Рисунок 2.68).[84]

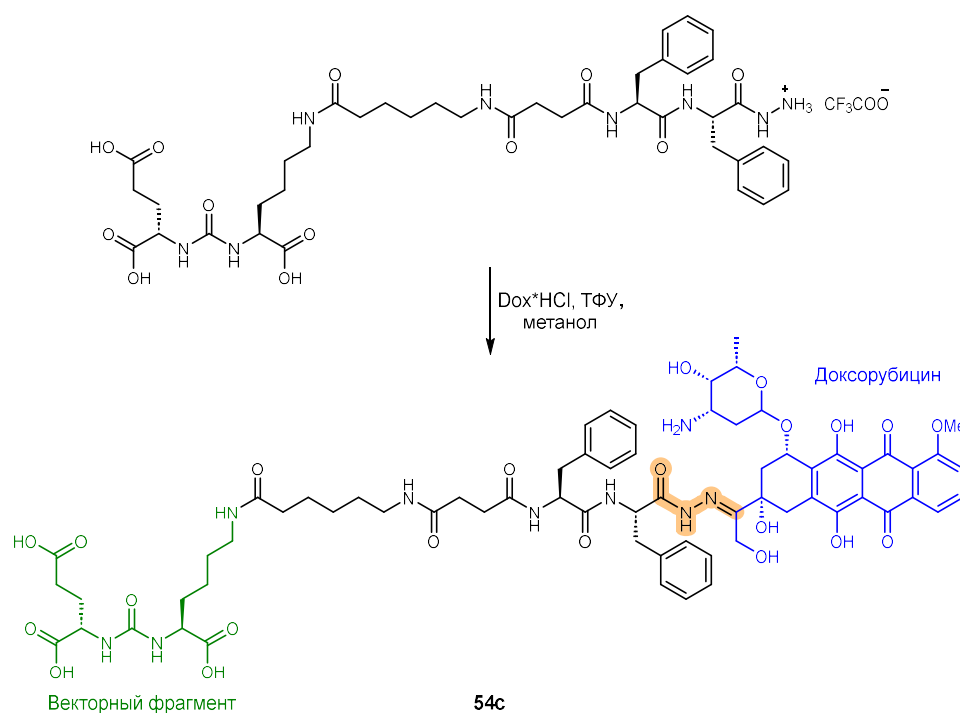


Рисунок 2.68. Схема синтеза конъюгата **54c** с гидразидным фрагментом.

Последующие исследования цитотоксичности *in vitro* показали значительно большую эффективность данного препарата в сравнении с аналогами **54a-b**, а также в сравнении с аналогом, где соединение с остатком доксорубина происходит через амидную связь.

Следующим подходом, реализуемым при дизайне ПСМА-направленных терапевтических конъюгатов, является создание амидной связи, которая может быть расщеплена под действием различных амидаз.

Данный подход был реализован при синтезе соединения **116** (Рисунок 2.69), содержащего ингибитор фосфоинозитид 3-киназы (PI3K).[140] В качестве лиганда была выбрана структура, аналогичная использованной в радиофармацевтическом препарате PSMA-617. Стоит отметить, что полученное соединение продемонстрировало высокую ингибирующую активность относительно PI3K ($IC_{50} = 0,4$ нМ), а последующие исследования *in vivo* на ксенографтных моделях показали высокую эффективность торможения роста опухоли.

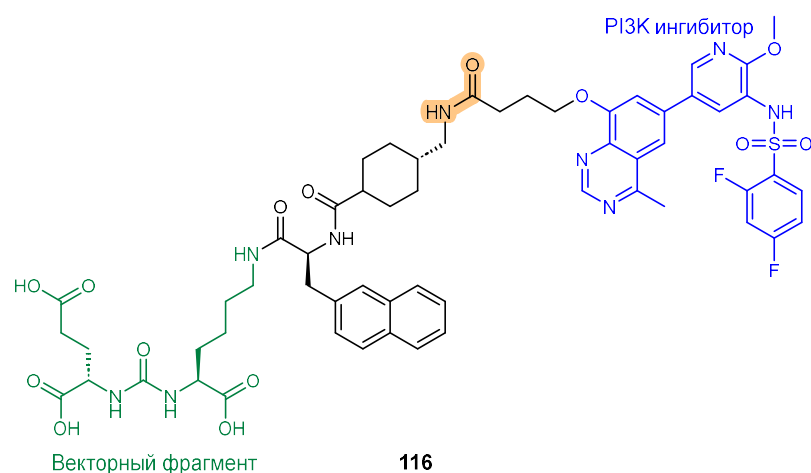


Рисунок 2.69. Структура конъюгата **116**.

Ещё один пример дизайна конъюгатов с амидной связью – соединение **117** (Рисунок 2.70). Данный препарат содержит олапариб (Ola) – ингибитор поли-(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP), который соединён с лигандом посредством амидной связи.[141] Этот конъюгат показал эффективность ингибирования PARP-1, близкую к свободному олапарибу ($IC_{50}(\text{Ola}) = 1,1 \pm 0,4$ нМ; $IC_{50}(\mathbf{117}) = 1,0 \pm 0,4$ нМ). Важно, что соединение **117** не демонстрировало гематологической токсичности, характерной для олапариба в исследованиях *in vivo*.

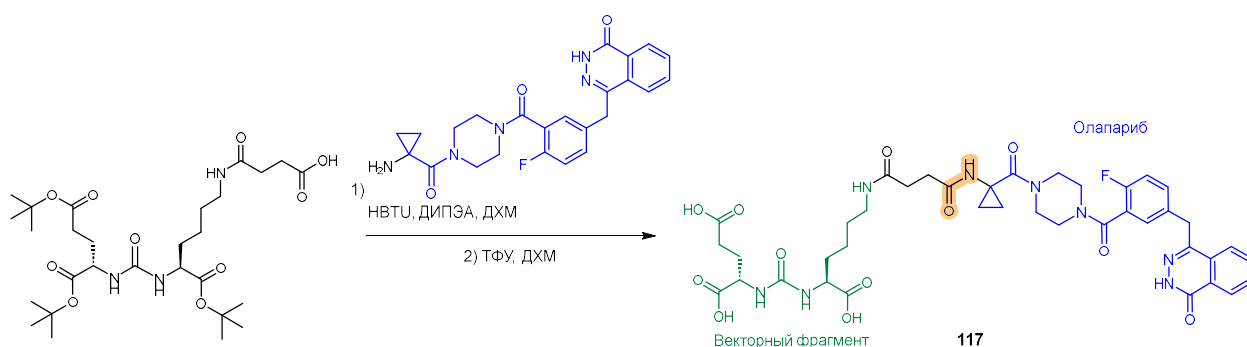


Рисунок 2.70. Схема получения конъюгата с олапарибом.

Для конъюгирования лигандов ПСМА с терапевтической нагрузкой описано использование оксима. Данная стратегия была применена при синтезе соединения **118** (Рисунок 2.71), содержащего N-гетероциклический карбеновый комплекс платины (II).[142] Однако этот подход представлен лишь единичным примером.

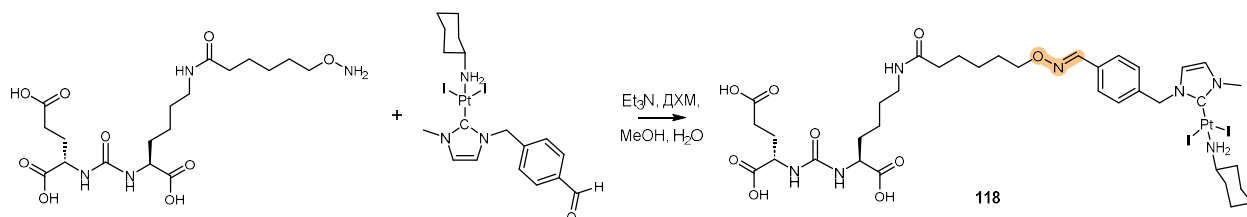


Рисунок 2.71. Схема синтеза конъюгата путём создания оксима.

При получении конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами, содержащими ферментативно расщепляемый фрагмент наибольшее распространение в случае рассматриваемых соединений получил линкер, расщепляемый под действием катепсина Б.

Примером может служить соединение **119** (Рисунок 2.72). В качестве катепсин-расщепляемого линкера была использована последовательность валина, цитруллина и *para*-аминобензилового спирта (Val-Cit-PAB).[143] Конъюгирование осуществляли через остаток сквараиновой кислоты. Использование диэфира сквараиновой кислоты в качестве реагента для конъюгирования особенно удобно благодаря его способности быстро, селективно и в мягких условиях присоединять два различных амина; реакция высокоселективна по отношению к аминам, что делает ненужным использование защитных групп для других нуклеофильных групп. Данная реакция может быть проведена как в водной, так и в органической среде.

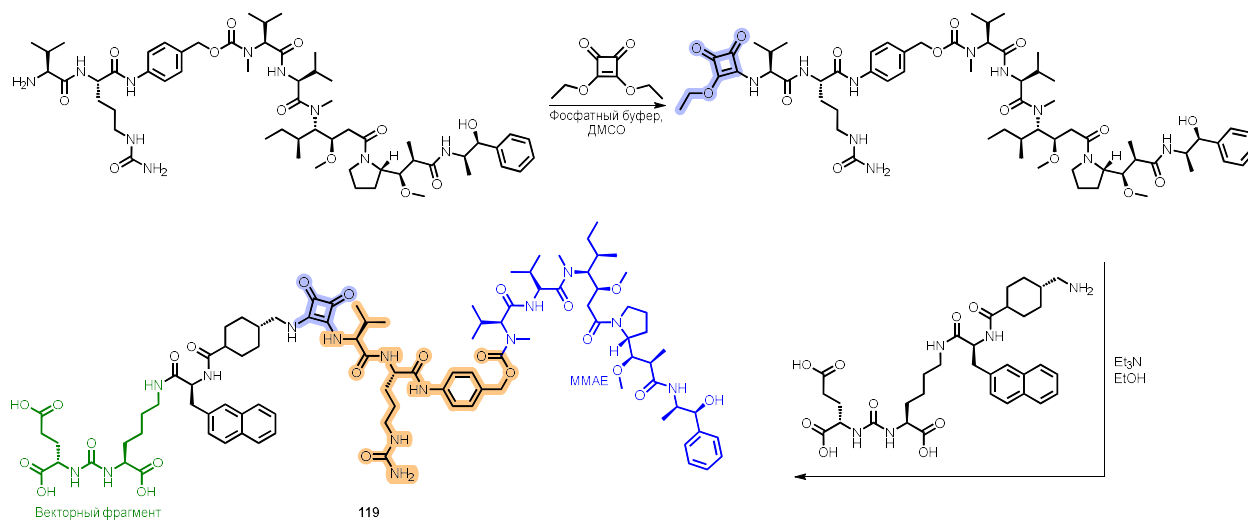


Рисунок 2.72. Схема получения конъюгата с ферментативно расщепляемым линкером.

Оранжевым выделен фрагмент Val-Cit-PAB.

Ещё одним примером использования данного ферментативно-расщепляемого линкера является соединение **120**, получаемое согласно Рисунку 2.73.[144] В отличие от описанных выше конъюгатов, в данном примере использовался лиганд PSMA-1-Cys-C6-Lys. Конъюгирование осуществлялось через малеимидный фрагмент, который был предварительно введён в структуру препарата монометил ауристатин Е.

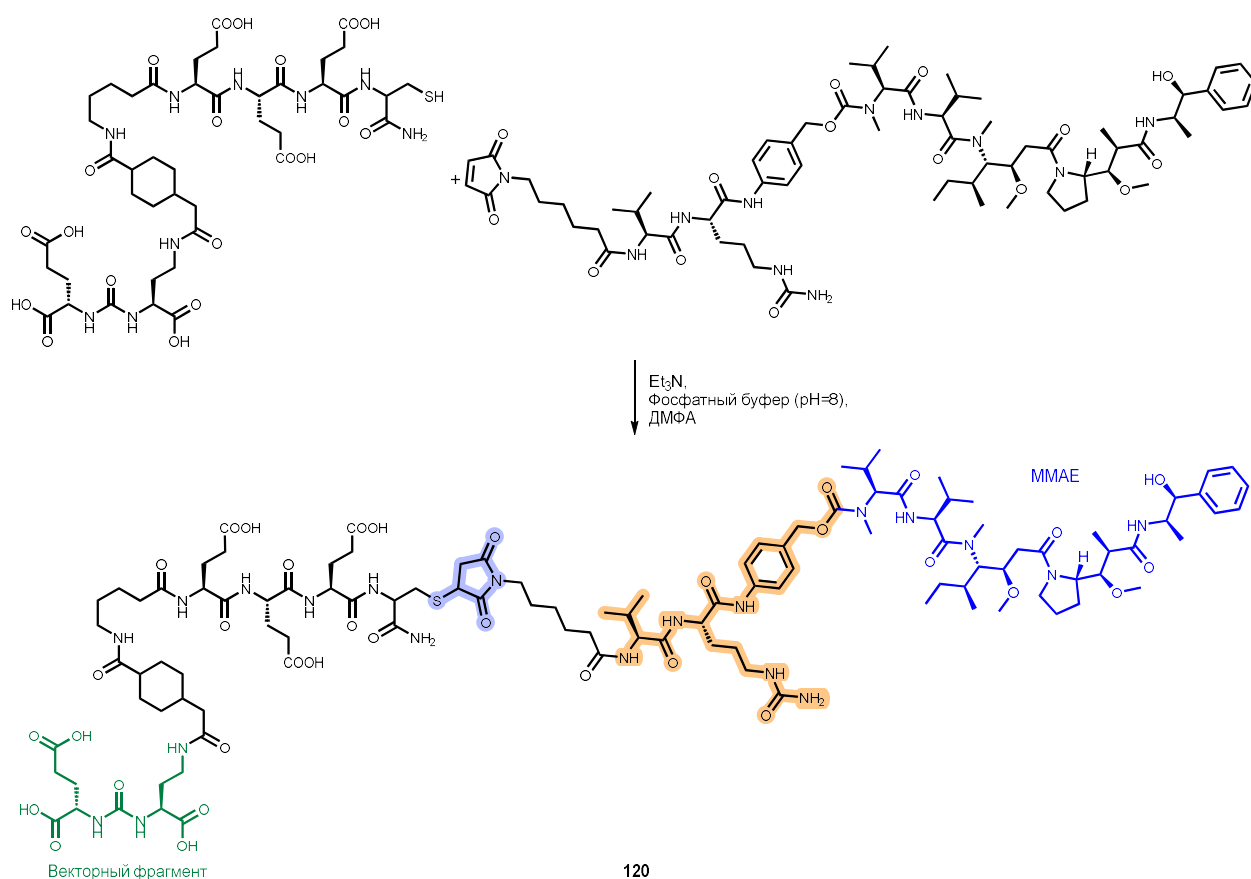


Рисунок 2.73. Схема синтеза конъюгата монометил ауристатина E, направленного на ПСМА.

2.4.2 ПСМА-направленные бимодальные конъюгаты и подходы к их получению

Бимодальные низкомолекулярные конъюгаты, направленные на ПСМА, представлены в литературе терапевтическими и диагностическими препаратами. Бимодальные терапевтические конъюгаты описаны в большинстве своём для высокомолекулярных средств доставки.

В одном из таких примеров в качестве терапевтических агентов использовались малая РНК, образующая шпильки (shRNA), и доксорубин.[145] Платформой был полиэтиленимин с привитым полиэтиленгликолем, выступающий в качестве транспортера shRNA. Направленная доставка к клеткам рака простаты осуществлялась за счёт анти-ПСМА аптамера, конъюгированного с сополимером. Bcl-xL специфичная shRNA в данном случае предназначена для нарушения процессов транскрипции, а доксорубин приводит к нарушению митоза клетки (Рисунок 2.74).

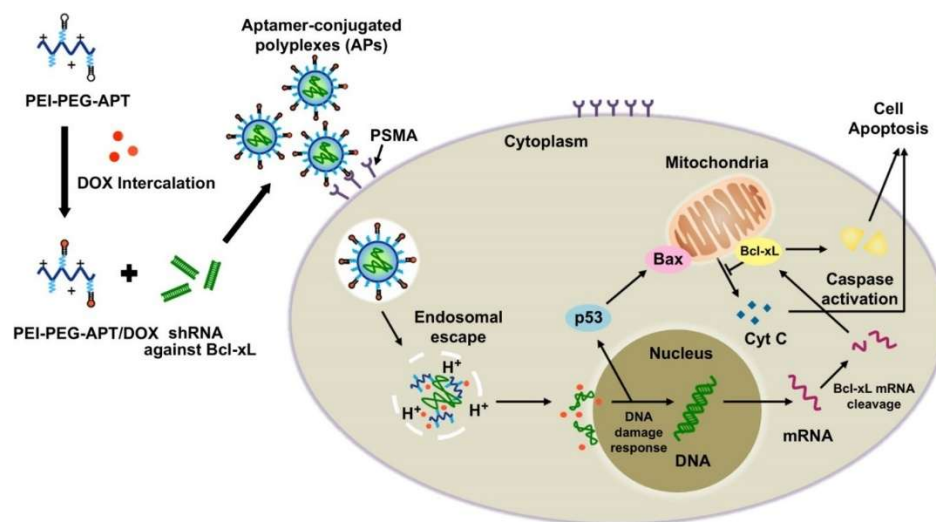


Рисунок 2.74. Схематическая иллюстрация совместной доставки shRNA и доксорубицина в клетку.

Полученные аптамер-конъюгированные полиплексы показали значение IC_{50} в 17 раз ниже простой смеси shRNA и доксорубицина, что свидетельствует о высоком потенциале подобной системы доставки.

Другим примером бимодальных терапевтических конъюгатов, направленных на ПСМА, являются фолат-направленные липосомы с включёнными в их структуру доксорубицином и липофильным пролекарством митомицином С.[13] Направленность на ПСМА в данном случае обуславливается показанной в более ранних работах возможность связывания ПСМА с фолат-модифицированными дендримерами, наночастицами и наноплексами.[14,146,147] Авторы провели сравнение полученных ими направленного и ненаправленного препаратов на основе липосом и смеси препаратов на клеточной культуре LNCaP. Полученные результаты показывают значительное преимущество фолат-направленных липосом в сравнении с другими исследованными объектами.

Говоря о синтетических подходах по созданию низкомолекулярных бимодальных конъюгатов, следует кратко рассмотреть представленные на данный момент в литературе методики синтеза диагностических или тераностических двойных конъюгатов.[15] В целом все существующие бимодальные конъюгаты можно разделить на две большие группы. В первой группе векторный фрагмент и агенты соединены между собой последовательно. Во второй группе в структуру лиганда введена так называемая «точка ветвления», например дополнительный остаток лизина.

Примерами соединений первой группы являются соединения **121a-d** (Рисунок 2.75).[148] Эти двойные диагностические конъюгаты содержат в своей структуре ациклический хелатирующий агент HBED-CC и различные флуоресцентные метки (AlexaFluor488, FITC, DyLight800, IRDye800CW). Хелатирующий агент является

связующим фрагментом между векторным фрагментом DCL и флуоресцентным агентом. Флуоресцентную метку присоединяли к хелатирующему агенту через полиэтиленгликолевый линкер. Для создания связи между хелатирующим агентом и терминальной аминогруппой лизина авторы применяли ранее описанные в литературе методики.[149,150] Чтобы предотвратить побочные реакции, на первой стадии вводили HBED-CC в реакцию комплексообразования с ионами Fe^{+3} , затем модифицировали карбоксильную группу хелатирующего агента 2,3,5,6-тетрафторфенолом (TFP) в присутствии 1,3-дициклогексилкарбодиимида и полученный активированный эфир вводили в реакцию с три-*трет*-бутил-защищённой мочевиной в присутствии основания ДИПЭА. Продукт последней реакции без выделения вводили в реакцию с 2,2'-(этилендиокси)бис(этиламино). Далее проводилось удаление защитных *трет*-бутильных групп и последующая модификация флуоресцентными агентами в виде NHS-эфиров, TFP-эфиров или изотиоцианата. На последней стадии из молекулы удалялись ионы хроматографией на C18 модифицированном силикагеле с использованием 1М HCl в качестве элюента.

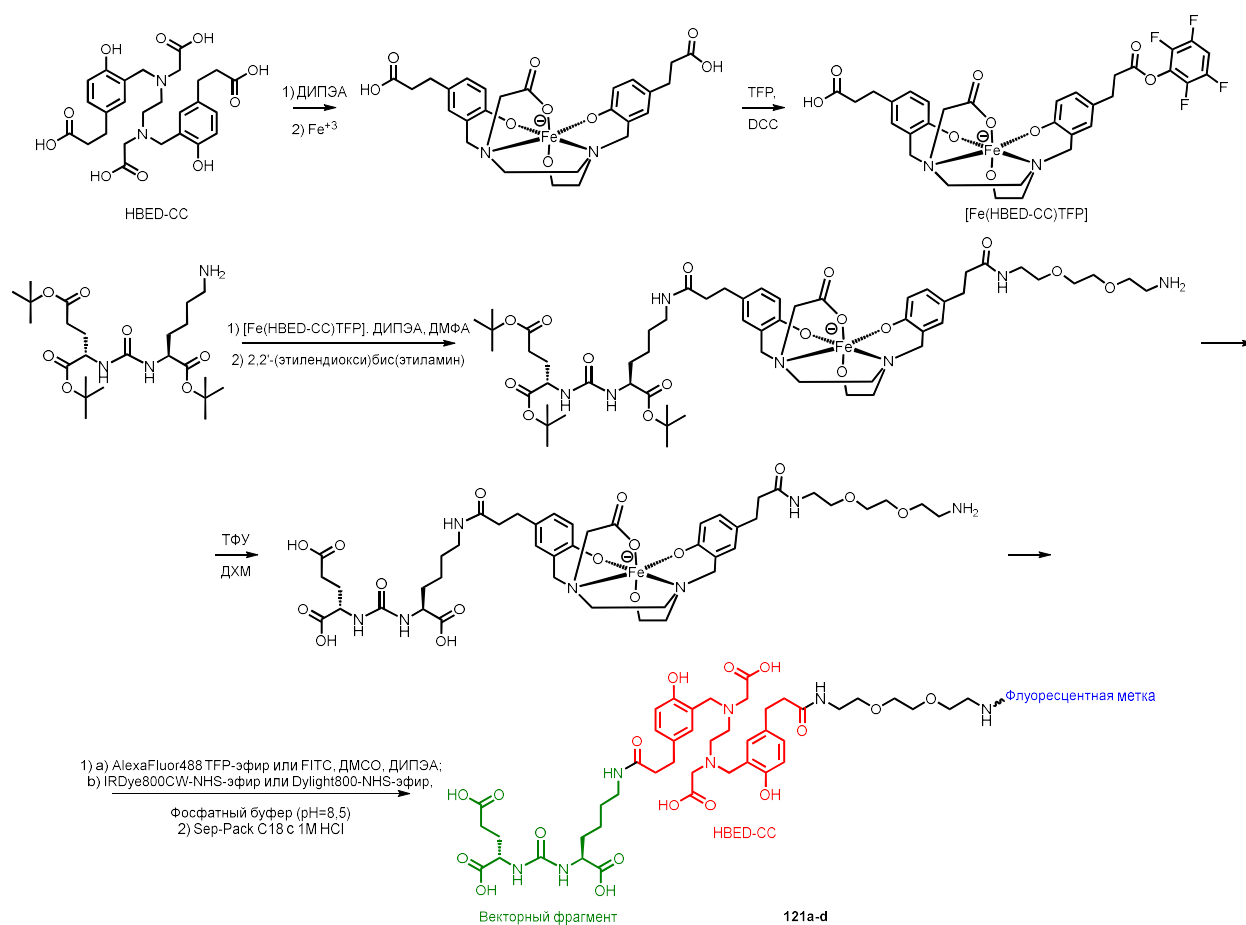


Рисунок 2.75. Схема синтеза двойных диагностических конъюгатов с HBED-CC в качестве хелатирующего агента

В работе, посвящённой синтезу и исследованиям конъюгата **122**, (Рисунок 2.76) векторный фрагмент и AMBF_3^+ фрагмент соединяли через флуоресцентную метку Sulfo-Cy3.[151] AMBF_3^+ фрагмент играет роль уловителя ^{19}F , используемого для PET-визуализации. Синтез проводили по следующей схеме: на первой стадии мочевиная реагировала с флуоресцентной меткой Sulfo-Cy3 в виде модификации Cy3.18.OH, полученной по ранее описанной методике в присутствии $\text{EDC} \times \text{HCl}$, HOBT и пиридина.[152] Далее вводили 1-азидобутиламин и удаляли *трет*-бутильные защитные группы при помощи трифторуксусной кислоты. На следующей стадии осуществлялась реакция [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого ионами Cu^+ с алкином, содержащим в структуре AMBF_3 фрагмент.

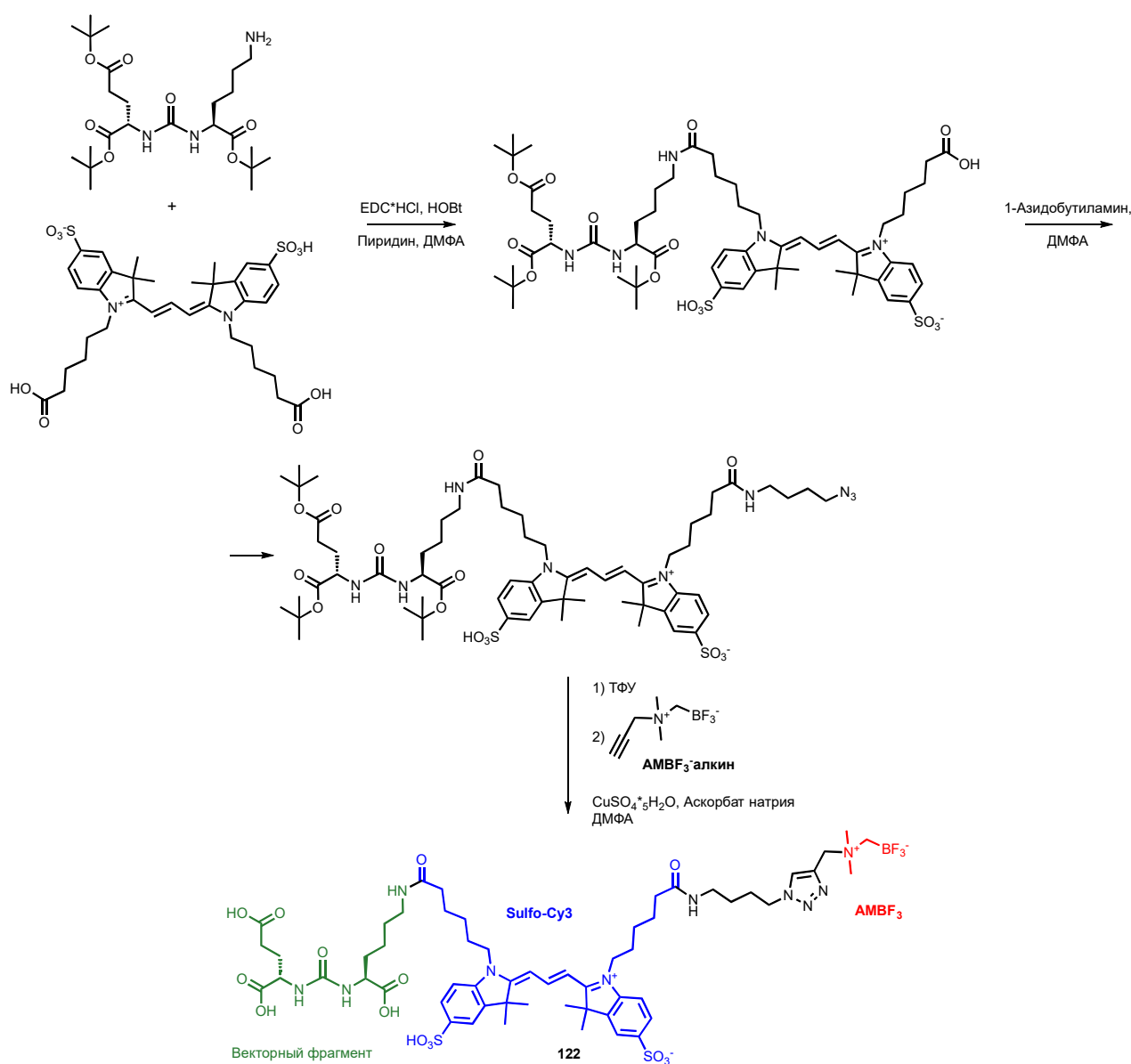


Рисунок 2.76. Схема синтеза $[^{18/19}\text{F}]$ -4 PET/FL ПСМА ингибитора.

Схожий дизайн был реализован при синтезе соединений **123a-d** (Рисунок 2.77).[93] Авторы получили четыре двойных конъюгата, содержащих хелатирующий агент mas3 и

векторный фрагмент DCL, соединённые между собой модифицированными флуоресцентными метками Cy5. В данной работе авторы применили сочетание жидкофазных и твердофазных методов синтеза. Хелатирующий агент maS₃ был модифицирован 6-аминогексановой кислотой с применением стандартной Fmoc-стратегии твердофазного синтеза на смоле Меррифилда. В дальнейшем продукт, удалённый со смолы, был превращён в NHS-эфир реакцией с гексафторфосфатом N,N,N',N'-бис(тетраметил)-O-(N-сукцинимидил)уруния (HSPyU) в присутствии ДИПЭА. Синтез (сульфо)индоловых фрагментов для синтеза Cy5-метки осуществлялся по ранее описанным методикам.[152,153] В дальнейшем флуоресцентные агенты вводились в реакцию с модифицированным хелатирующим агентом в присутствии основания, а полученные продукты соединялись с векторным фрагментом в присутствии PyBOP и N-метилморфолина. Полученные конъюгаты обрабатывали смесью триизопропилсилана и трифторуксусной кислоты для удаления защитных групп, целевой продукт выделяли препаративной ВЭЖХ.

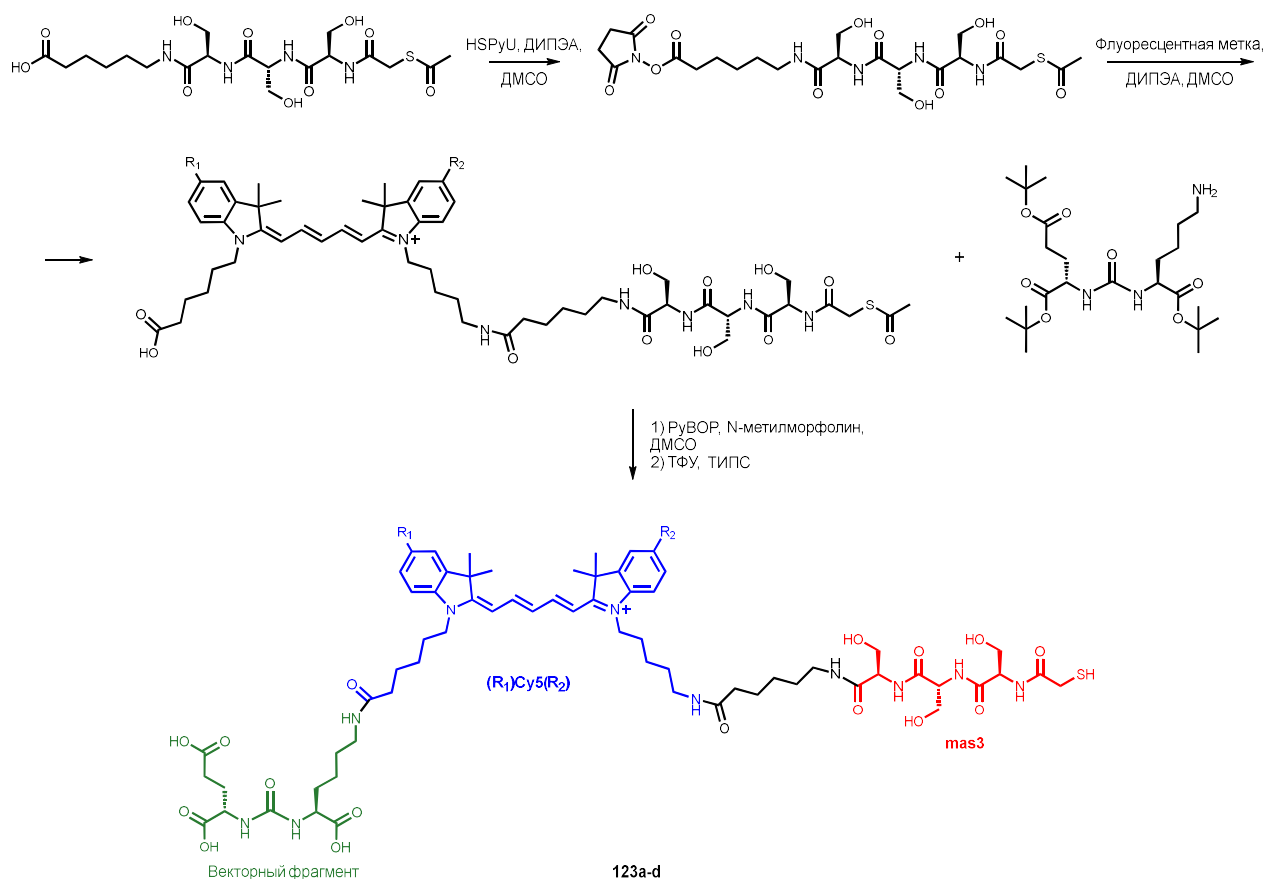
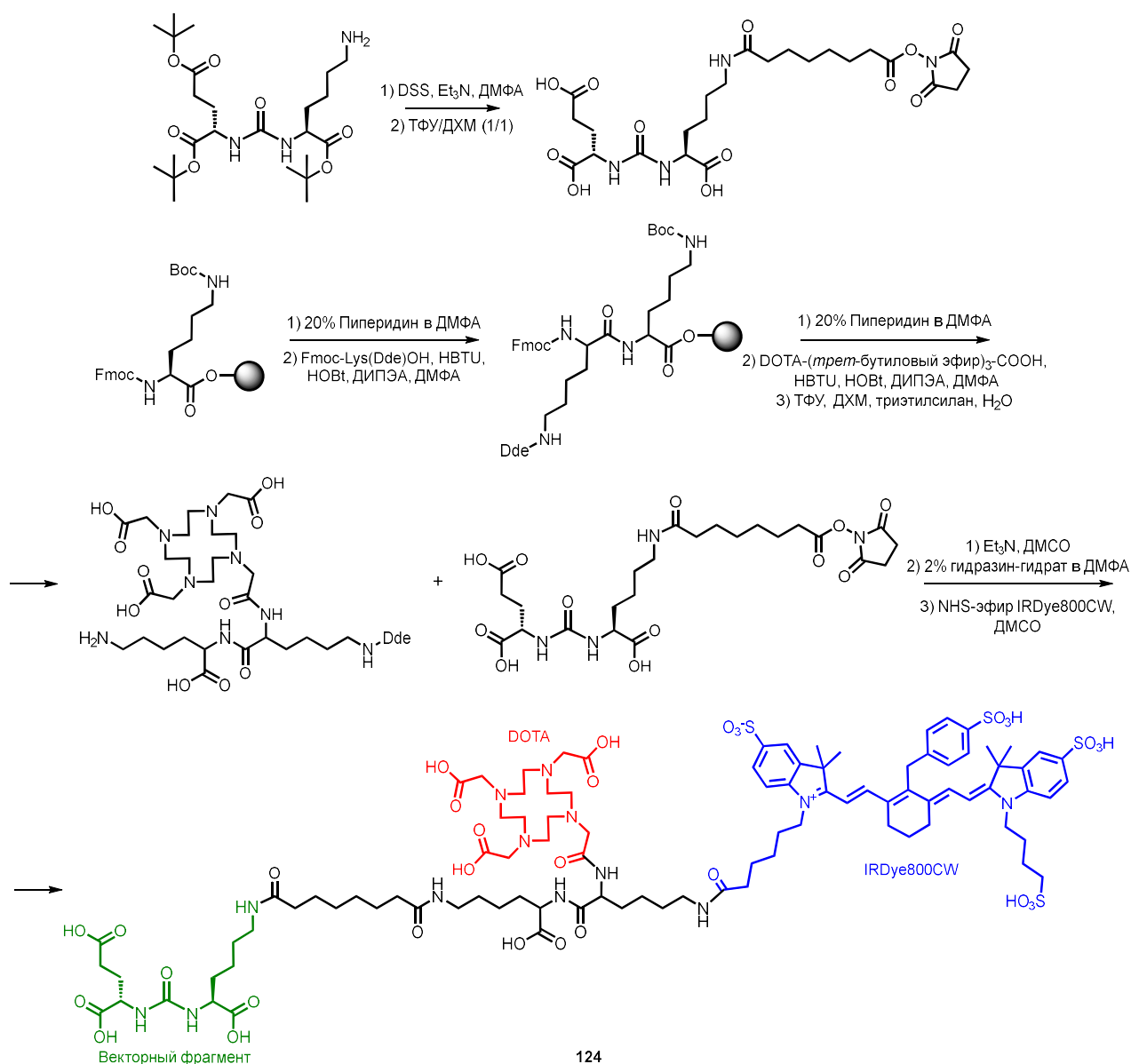


Рисунок 2.77. Схема синтеза двойных диагностических конъюгатов DCL-(R₁)Cy5(R₂)-maS₃

В качестве бимодального конъюгата, содержащего точку ветвления, можно привести соединение **124** (Рисунок 2.78). Вектором был мочевиный фрагмент DCL, а диагностическими агентами – хелатирующий агент DOTA и флуоресцентная метка

IRDye800-CW.[154] Синтетическая схема предполагала синтез по отдельности блоков, содержащих векторный фрагмент и хелатирующий агент, их последующее конъюгирование и модификацию на последней стадии флуоресцентной меткой. Для синтеза вектор-содержащего фрагмента три-*трет*-бутил-защищённая по карбоксильным группам мочевиная вводилась в реакцию с дисукцинимидил субератом (DSS), после чего удаляли *трет*-бутильные защитные группы. Создание блока, содержащего хелатирующий агент, включало в себя модификацию Boc-защищённого по терминальной аминокгруппе лизина с применением стратегии твердофазного пептидного синтеза. На первом этапе авторы удаляли Fmoc-защиту с α -аминогруппы, затем осуществляли реакцию с α -Fmoc-защищённым, ϵ -Dde-защищённым лизином в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА, после чего производилось удаление Fmoc-защитной группы и реакция с три-*трет*-бутиловым эфиром хелатирующего агента DOTA. Полученное вещество удаляли со смолы с одновременным удалением кислотно-лабильных защитных групп. Затем данные два фрагмента были введены в реакцию ацилирования в присутствии основания. В дальнейшем проводили удаление Dde-группы и вводили полученное вещество в реакцию с NHS-эфиром IRDye800CW.



124

Рисунок 2.78. Схема синтеза бимодального конъюгата содержащего хелатор DOTA и флуоресцентную метку IRDye800CW

Лизин как точка ветвления был использован и в работе, посвящённой синтезу и исследованиям биологической активности соединения **125** (Рисунок 2.79).[12] Данный конъюгат, созданный на основе мочевины DUPA, содержит хелатирующий агент ma(DAP-L)DC и родамин Б. На первом этапе был осуществлён твердофазный синтез хелатирующего агента с использованием Fmoc-стратегии, после чего в структуру вводили фрагмент лизина, ε-аминогруппа которого была защищена трифторацетильной группой. После этого путём последовательного наращивания пептидной цепи был получен линкерный фрагмент, и затем введён векторный фрагмент. Удаление трифторацетамидной защитной группы, ацилирование ε-аминогруппы лизина родамином Б и удаление конъюгата с твердофазного носителя совместно с удалением кислотно-лабильных защитных групп привело к целевому продукту.

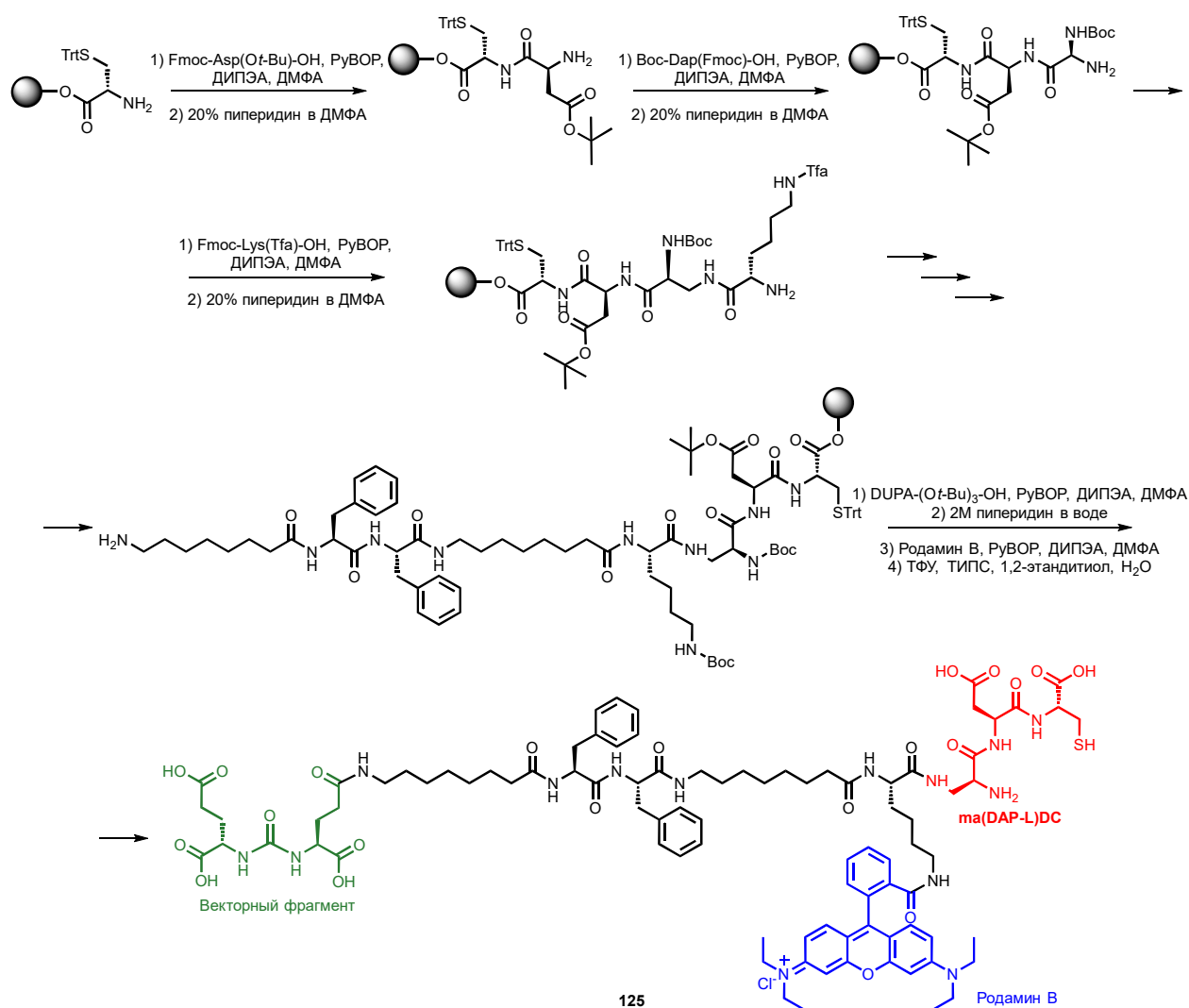


Рисунок 2.79. Схема синтеза бимодального конъюгата с родамином В и хелатирующим агентом ma(DAP-L)DC

С использованием подобного подхода также был получен бимодальный конъюгат – аналог конъюгата PSMA-I&T.[155] Соединение **126**, также известное как PSMA-I&F, содержит хелатирующий агент DOTA-GA и флуоресцентную метку SulfoCy5 (Рисунок 2.80). Синтез пептидной части линкера осуществлялся с применением твердофазных стратегий синтеза. После этого пептидный фрагмент линкера вводили в реакцию с хелатирующим агентом и далее проводили реакцию между модифицированным векторным фрагментом и блоком, содержащим хелатор, после чего терминальную аминогруппу лизина модифицировали флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5 в присутствии активирующего агента HATU и основания.

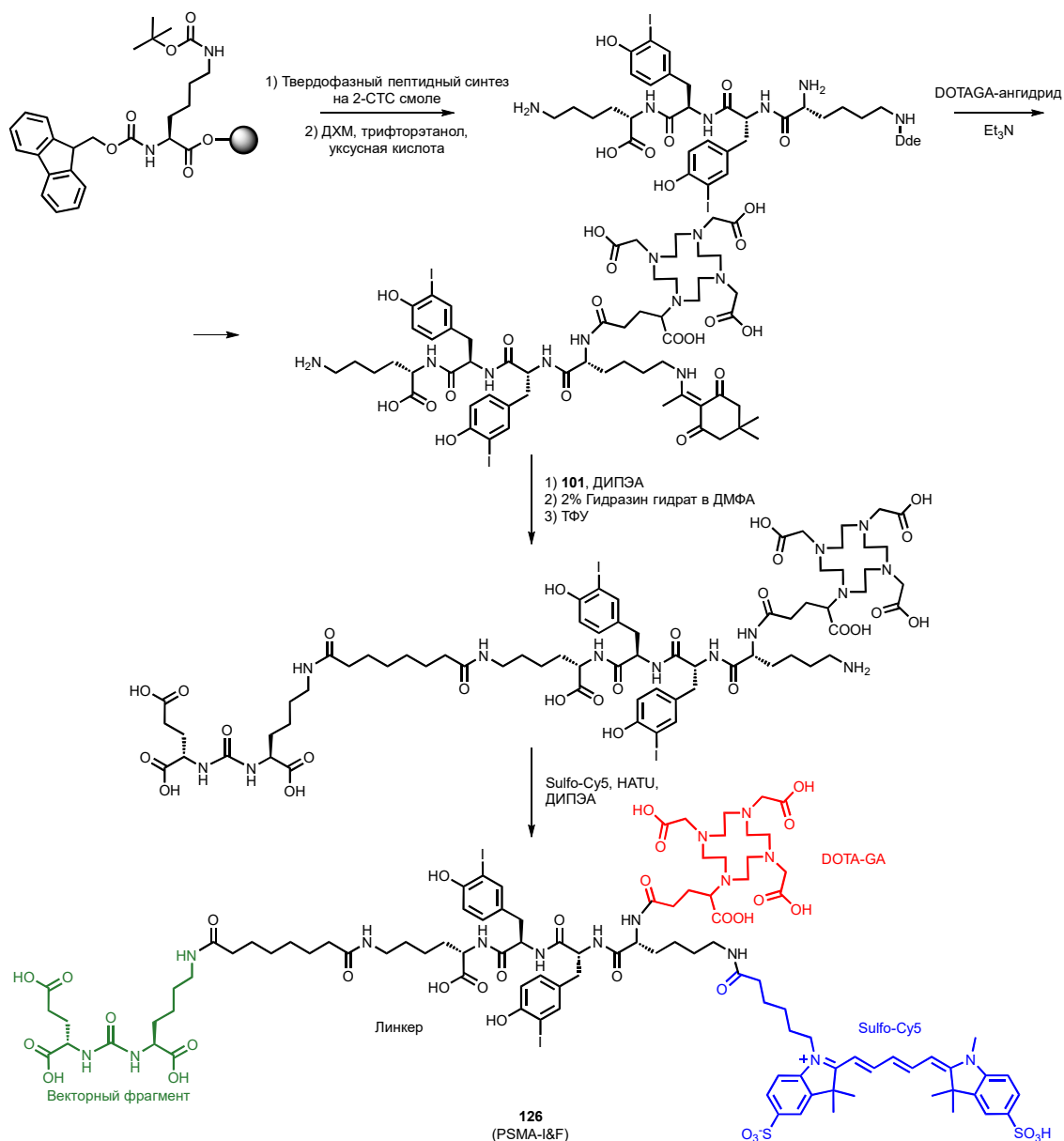


Рисунок 2.80. Схема синтеза PSMA-I&F.

В работе [11] была получена серия бимодальных конъюгатов **127** (Рисунок 2.81). Было проведено варьирование структуры линкера и использованы два различных хелатирующих агента – DOTA и DOTA-GA. Флуоресцентная метка IRDye700DX вводилась путём модификации терминальной аминогруппы лизина, включённого в структуру пептидного участка линкера. В качестве векторного фрагмента использовалась мочевиная DCL, иммобилизованная на твердофазном носителе с использованием подхода, представленного на Рисунке 2.57. Данный подход позволил провести синтез с использованием твёрдой фазы вплоть до получения конъюгата с хелатирующим агентом, после чего производилось удаление со смолы, удаление защитных групп и введение моноконъюгата в реакцию с флуоресцентной меткой.

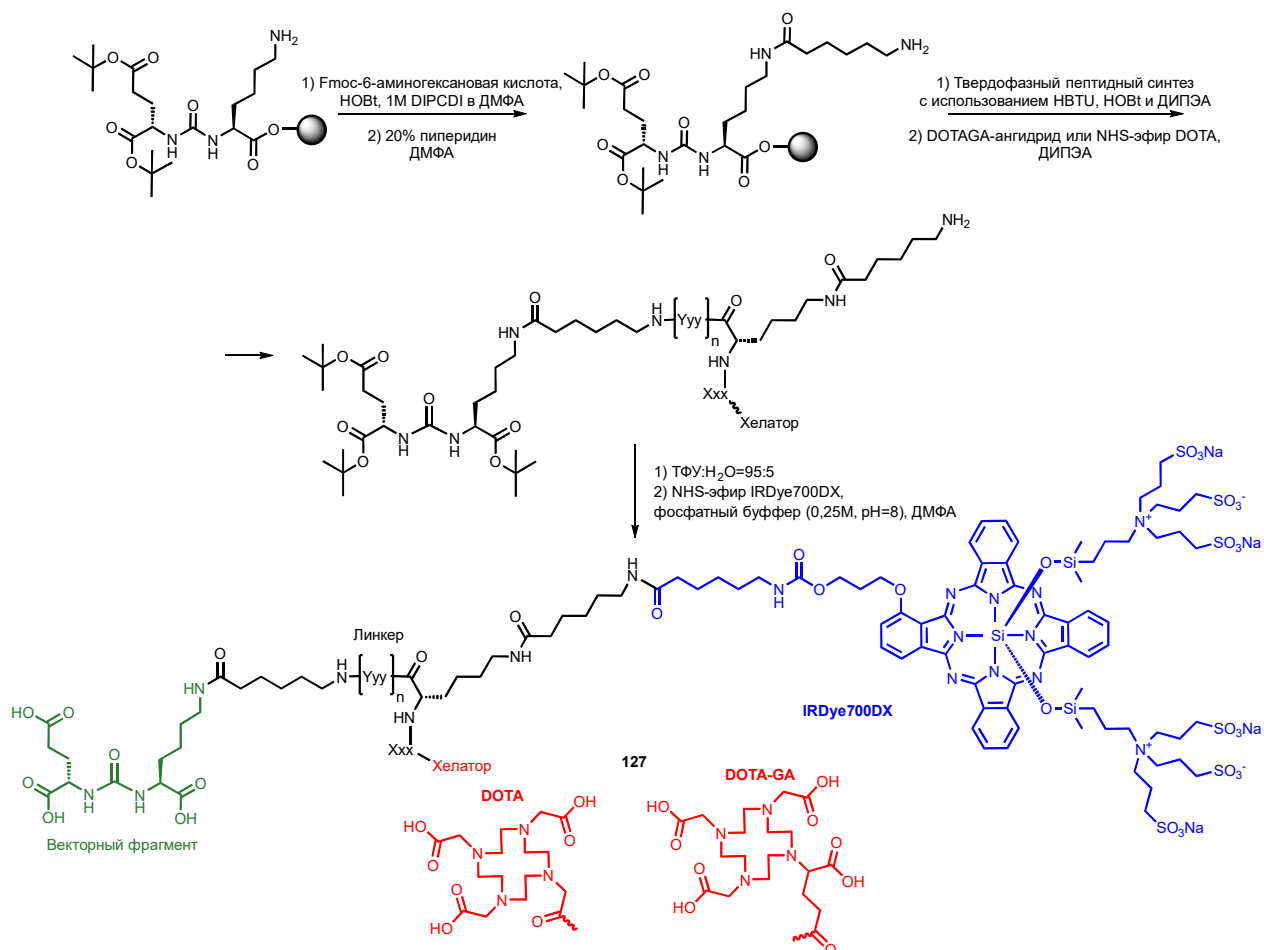


Рисунок 2.81. Схема получения конъюгатов общей структуры **127**.

Примером работы, посвящённой созданию тераностического бимодального конъюгата, является публикация, посвящённая синтезу и исследованиям биологической активности соединения **128** (Рисунок 2.82).[10] Данный препарат содержит в структуре доцетаксел в качестве терапевтического агента и метку Sulfo-Cy5 в качестве диагностического. На твердофазном носителе был осуществлён синтез трипептидной последовательности, содержащей остаток лизина, после чего полученный трипептид был введён в реакцию ацилирования с соединением **83d** (Рисунок 2.49) на твердофазном носителе. Затем проводилось уделение полученного продукта со смолы и последующая реакция ацилирования с азидопропиламином и удаление защитных групп. В дальнейшем авторы ввели полученный лиганд ПСМА в реакцию [3+2]-азидалкинового циклоприсоединения с модифицированным алкиновым фрагментом доцетакселем. Полученный моноконъюгат далее реагировал с NHS-эфиром флуоресцентной метки Sulfo-Cy5. Последующие исследования *in vitro* на ПСМА-экспрессирующих клеточных линиях (LNCaP 22Rv1) показали высокую перспективность подобного подхода, однако авторы указывают на необходимость дополнительных исследований для однозначного доказательства перспективности данной синтетической стратегии.

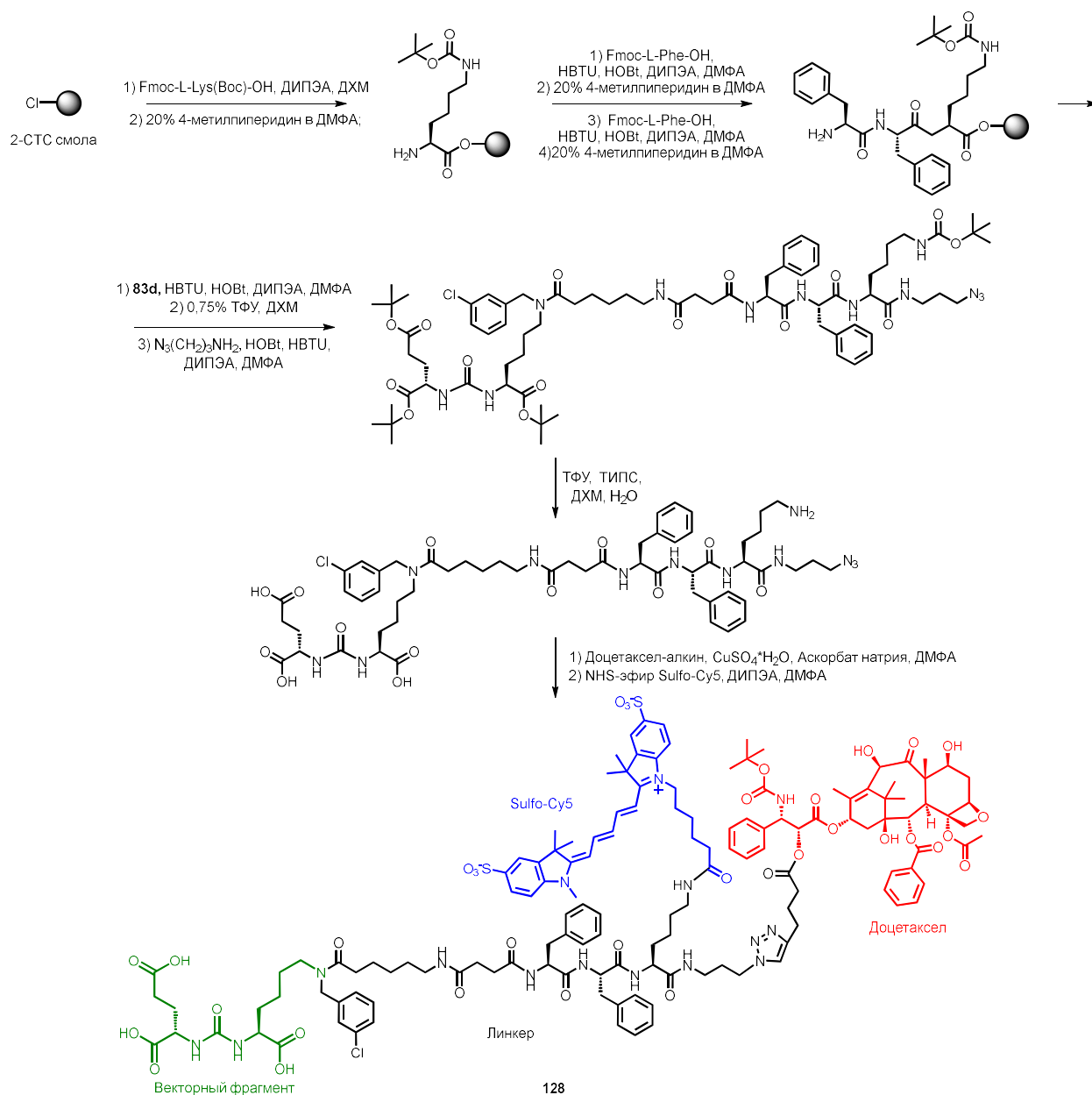


Рисунок 2.82. Схема синтеза тераностического конъюгата **128**.

2.5 Заключение

Таким образом, на данный момент в литературе подробно описаны подходы к дизайну и получению лигандов простатического специфического мембранного антигена, а также к созданию на их основе систем направленной доставки как одного агента, так и комбинации препаратов. Однако на данный момент в литературе очень ограничено представлены системы совместной доставки терапевтических агентов, направленные на ПСМА. В связи с этим поиск и создание новых ингибиторов ПСМА и создание на их основе бимодальных систем доставки представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

3. Обсуждение результатов¹

Обзор литературы позволяет заключить, что на данный момент в литературе представлен широкий набор работ, посвящённых созданию лигандов ПСМА и направленных систем доставки на их основе. Ингибиторы ПСМА находят применение как в диагностике, так и в терапии РПЖ. Однако продолжает оставаться актуальной дальнейшая модификация подобных структур, с целью увеличения их биологической активности. Также ограниченным является набор существующих подходов к получению лигандов ПСМА, способных нести двойную нагрузку.

В связи с этим, в рамках данной работы осуществлялась разработка методов синтеза новых лигандов простатического специфического мембранного антигена и бимодальных терапевтических конъюгатов на их основе.

В данной работе последовательно решались следующие задачи:

1. Разработка и получение новых лигандов простатического специфического мембранного антигена с различными заместителями при ε-положении лизина и последующие *in vitro* исследования ингибирующей активности полученных соединений;
2. Создание новых альтернативных подходов к синтезу соединений-предшественников лигандов ПСМА с концевой аминогруппой как точкой последующего конъюгирования;
3. Разработка методов получения лигандов ПСМА, пригодных к созданию на их основе двойных конъюгатов и исследование их ингибирующей активности *in vitro*;
4. Разработка, оптимизация и реализация синтеза бимодальных конъюгатов лигандов ПСМА с терапевтическими агентами, обладающими различными механизмами действия (монометил ауристатин Е, доцетаксел, абиратерон, энзалутамид и испинесиб);
5. Исследования цитотоксической активности синтезированных бимодальных конъюгатов *in vitro* на клеточных линиях РПЖ с различным уровнем экспрессии ПСМА;
6. Исследования противоопухолевой активности синтезированных бимодальных конъюгатов *in vivo* на ксенографтных моделях РПЖ.

¹ Нумерация соединений в данном разделе не совпадает с нумерацией, представленной в обзоре литературы.

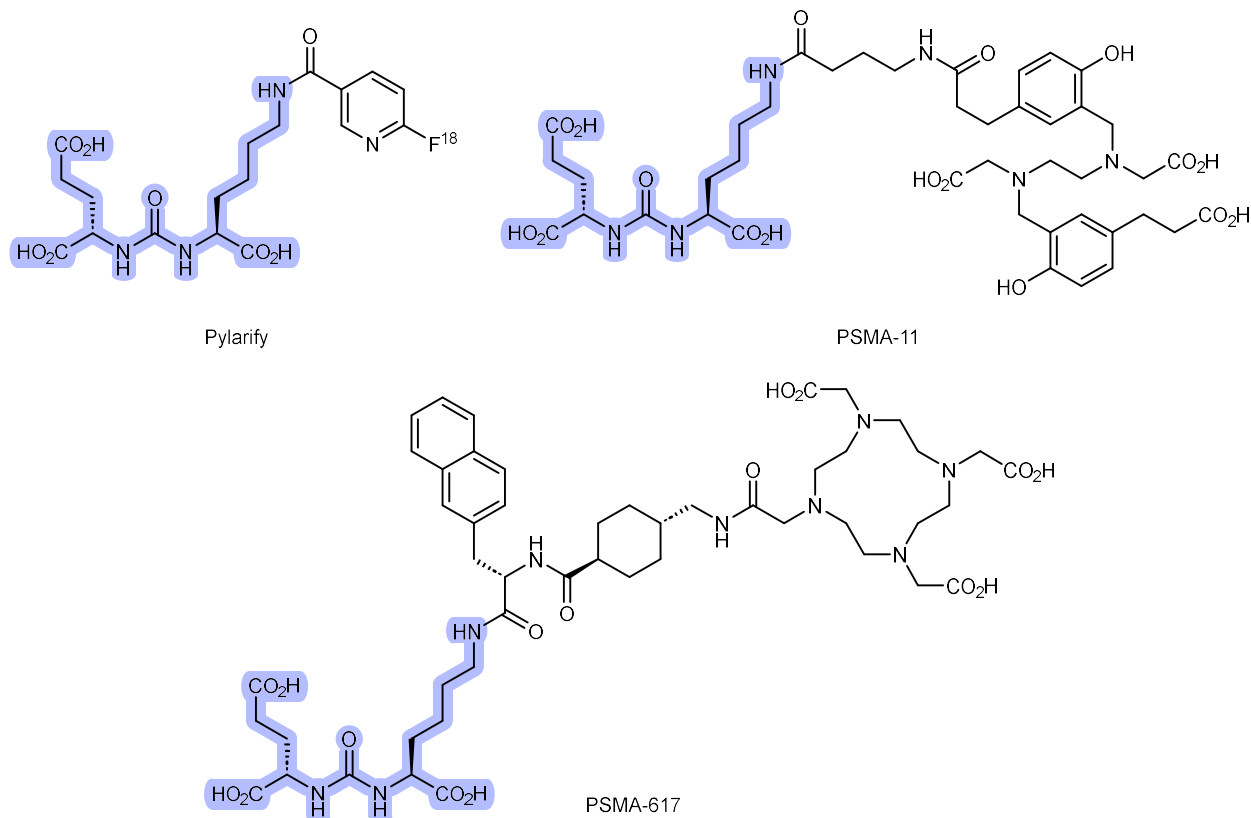


Рисунок 3.1. Структура низкомолекулярных ПСМА-направленных препаратов, одобренных FDA. Цветом выделен фрагмент мочевины DCL

Векторный фрагмент DCL был выбран в качестве основы для получаемых лигандов ПСМА. Общая структура синтезируемых в работе лигандов представлена на Рисунке 3.2.

2 При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. JIF 2.2 (Web of Science). Объем 0,681 п.л. Личный вклад автора – 30%

³ *In vitro* исследования, представленные в данном разделе работы выполнены совместно с сотрудниками кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., доцентом Скворцовым Д.А и к.х.н., инж. 2 категории Шафиковым Р.Р.

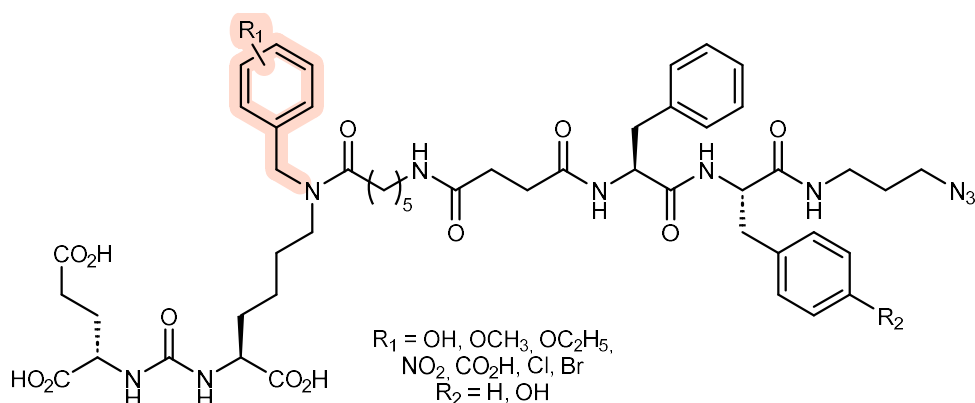


Рисунок 3.2. Общая структура лигандов ПСМА.

Выбранный структурный тип лигандов содержит замещённый бензильный фрагмент в ϵ -положении лизина, линкер, содержащий алифатический и дипептидный участки, и концевую азидогруппу как точку последующей модификации (конъюгирования) диагностическим или терапевтическим агентом.

Варьированию подвергался бензильный фрагмент при ϵ -аминогруппе лизина (выделен цветом на Рисунке 3.2). Ранее в литературе было подробно рассмотрено влияние природы и положения атома галогена в ароматическом кольце этого фрагмента на аффинность к ПСМА (см. Раздел 2.2.2).[8,9] Для лигандов с замещённой бензильной группой, представленных в работе [8], наибольшая ингибирующая активность наблюдалась для соединений, содержащих в *para*-положении ароматического кольца атомы хлора, иода или брома, в то время как фторзамещённое производное обладало крайне низкой ингибирующей активностью. В тоже время, лиганды с атомами хлора или иода в *ortho*- или *meta*-положении демонстрировали снижение аффинности к белку в сравнении с *para*-замещёнными аналогами. Влияние других заместителей на показатели аффинности оставалось неисследованным. При введении заместителей различной природы полярность получаемых лигандов и, соответственно, их водорастворимость, липофильность и фармакокинетические свойства также должны значительно изменяться.

Исходя из требуемой структуры целевых лигандов (Рисунок 3.2), была выбрана общая стратегия их получения на основе ранее предложенного в литературе подхода.[9] Данная схема предполагает первоначальный синтез векторного фрагмента с алифатическим участком линкера, после чего полученное производное вводится в реакцию с дипептидным фрагментом линкера, синтезируемым отдельно.

Для последующих исследований сравнительной ингибирующей активности синтезируемых соединений были получены два лиганда ПСМА **15a-b**, описанные в работе [9]. В этих соединениях при аминогруппе лизина находится *meta*-хлор- и *para*-бром-бензильный заместители. Дипептидный участок линкера этих соединений содержит

остатки фенилаланина и тирозина. Лиганды **15a-b** были выбраны в качестве соединений сравнения, так как они обладают высокой ингибирующей активностью по отношению к ПСМА и при этом структурно близки к получаемым в этой работе лигандам.

На первом этапе синтеза вводили *трет*-бутильную защитную группу к атому кислорода *пара*-формилбензойной кислоты, с применением литературной методики с использованием ди-*трет*-бутилдикарбоната (Boc_2O) и 4-диметиламинопиридина (DMAP) (Рисунок 3.3).[157]

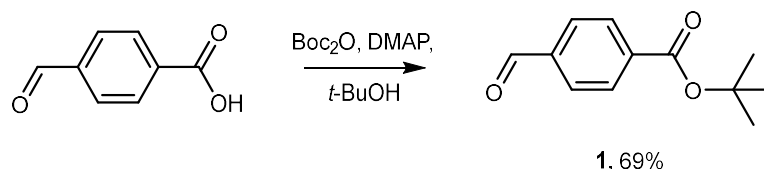


Рисунок 3.3. Схема получения *трет*-бутилового эфира *пара*-формилбензойной кислоты.

Следующим шагом стало получение три-*трет*-бутилзащищённой мочевины DCL **3** двухстадийным синтезом, представленным на Рисунке 3.4. Для мочевины **2** был выбран классический подход с использованием трифосгена.[8,9,84,88,89] На второй стадии удаляли Cbz-защитную группу путём гидрогенолиза с использованием палладия на активированном угле в качестве катализатора.

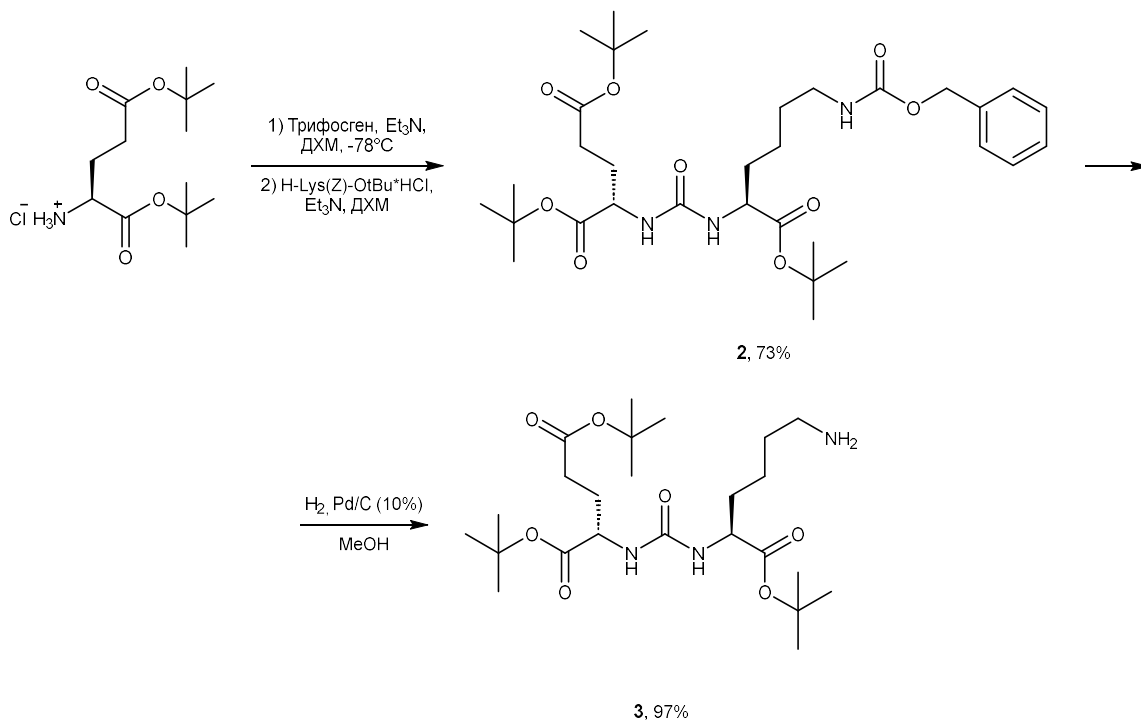


Рисунок 3.4. Схема синтеза защищённой мочевины DCL **3**

Для введения бензильного фрагмента к концевой аминогруппе соединения **3** использовалась реакция восстановительного аминирования соответствующего бензальдегида с защищённой мочевиной **3** (Рисунок 3.5). Реакцию восстановительного аминирования проводили в метаноле при комнатной температуре, в качестве

восстановителя был использован боргидрид натрия. Для предотвращения побочной реакции восстановления бензальдегида до соответствующего бензильного спирта, боргидрид натрия добавляли порционно, в течение 1,5 часов.

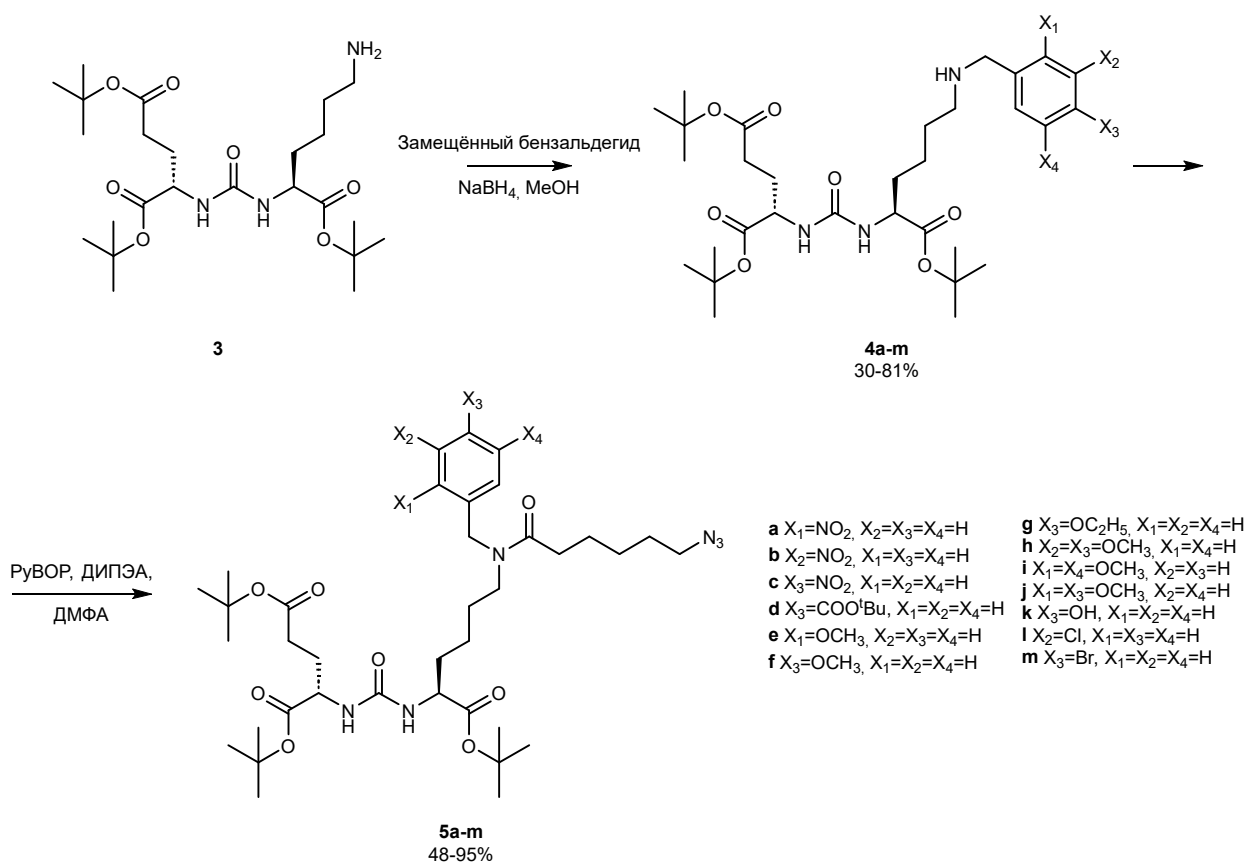


Рисунок 3.5. Схема синтеза азидов **5a-m**.

Полученные вторичные амины **4a-m** в дальнейшем были введены в реакцию ацилирования с 6-азидогексановой кислотой в присутствии PyBOP и ДИПЭА с получением азидов **5a-m**. В спектрах ЯМР ¹H и ¹³C полученных соединений **5a-m** наблюдается характерное удвоение ключевых сигналов, вызванное затруднённым вращением вокруг образовавшейся амидной связи. Наиболее явно это удвоение наблюдается для сигналов протонов CH₂-группы бензильного фрагмента и протонов при ароматическом кольце. Так, в случае *para*-бромзамещённого соединения **5m**, сигнал протонов бензильной группы смещается в область более слабого поля (3,76 м.д. для исходного соединения **4m**, 4,45-4,55 м.д. для азиды **5m**) и наблюдается характерное удвоение сигнала (Рисунок 3.6). Для протонов ароматического кольца также наблюдается удвоенный набор сигналов.

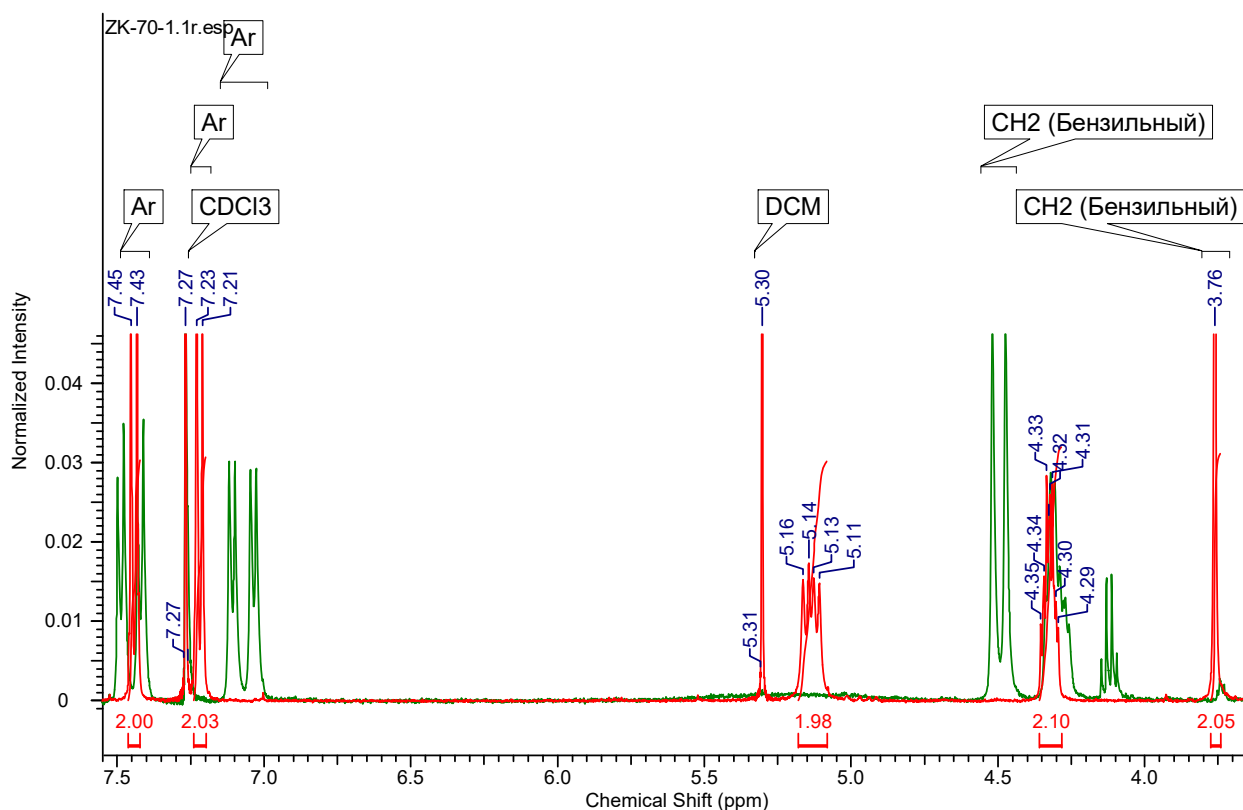


Рисунок 3.6. Фрагменты спектров ЯМР ^1H соединений **4m** (красный) и **5m** (зелёный).

Терминальная азидогруппа соединений **5** далее подвергалась восстановлению по Штаудингеру с использованием трифенилфосфина (Рисунок 3.7). Данный вариант восстановления азидогруппы был выбран, потому что реакция протекает селективно, не затрагивая другие функциональные группы реагирующих молекул, например нитрогруппы. Полученные таким образом амины **6a-m** были введены в реакцию ацилирования с янтарным ангидридом с получением соединений **7a-m**.

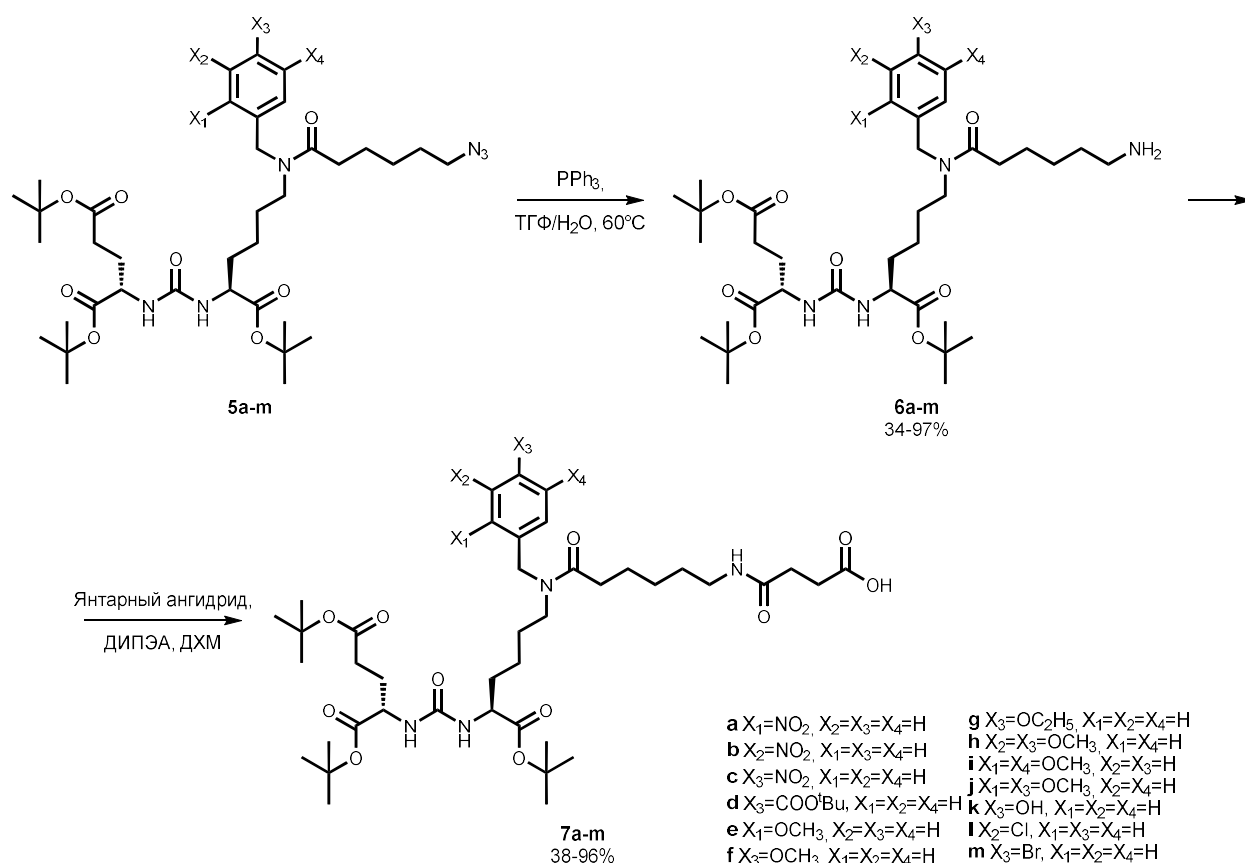


Рисунок 3.7. Получение производных янтарного ангидрида **7a-m**.

В качестве дипептидного фрагмента линкеров целевых лигандов ПСМА, вводимых далее в соединения **7**, были выбраны последовательности *L*-Phe-*L*-Phe и *L*-Phe-*L*-Tyr. Для первичного скрининга были выбраны соединения с двумя остатками фенилаланина в структуре, исходя из того, что лиганды с подобной структурой дипептидного фрагмента ранее продемонстрировали высокую аффинность к ПСМА (см. Раздел 2.2.2).[9] В дальнейшем был проведён также синтез нескольких лигандов с заменой одного из остатков фенилаланина на тирозин (соединения **15c-d**, Рисунок 3.10), что, предположительно, могло привести к увеличению аффинности. Ранее в литературе было показано, что для галогенсодержащих лигандов ПСМА подобная замена приводила к увеличению сродства к белку. Для создания дипептидного участка линкера был выбран классический подход синтеза в растворе с использованием Вос-стратегии. Для этого синтезировали пентафторфенил-активированный эфир Вос-защищённого по аминогруппе *L*-фенилаланина **8** (Рисунок 3.8), с использованием пентафторфенола (Pfp-OH) и гидрохлорида EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида). Синтезированный активированный эфир вводили в реакцию ацилирования с второй аминокислотой с получением дипептидов **9a-b**. Следующим шагом стала модификация дипептида ацилированием 3-азидопроламина в присутствии активирующих агентов HBTU и HOBT и основания ДИПЭА. За счёт этой реакции осуществляется введение в молекулу концевой азидгруппы, которая может быть

использована в дальнейшем как точка конъюгации с терапевтическим или диагностическим агентом реакцией [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения.

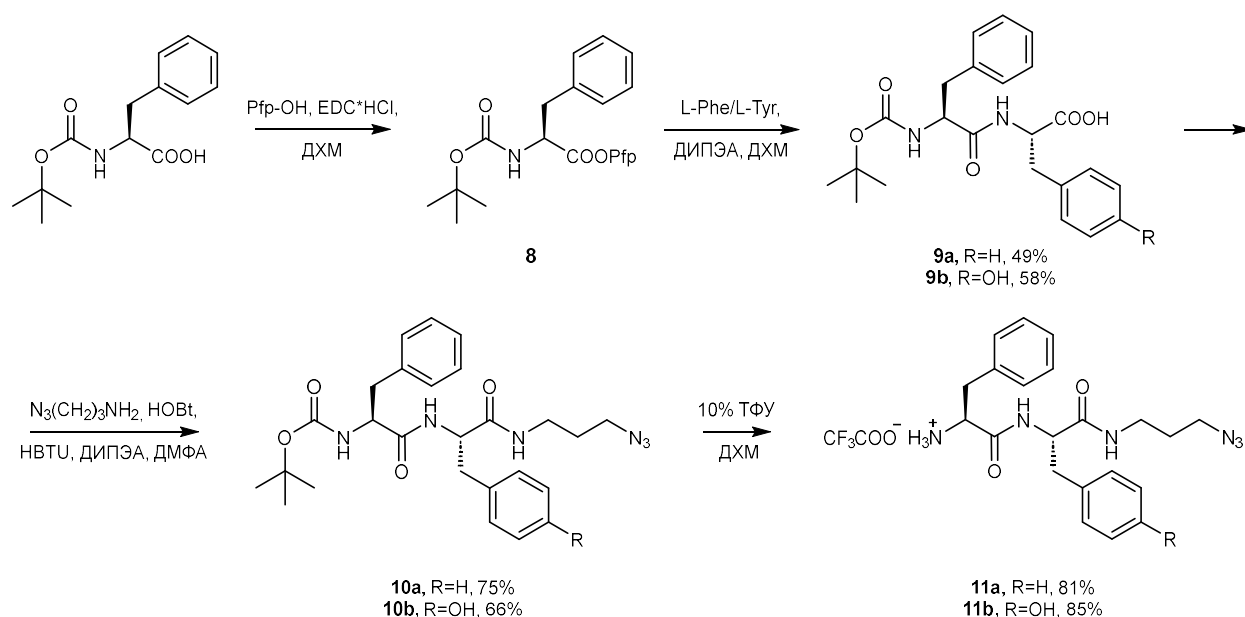


Рисунок 3.8. Схема синтеза дипептидного фрагмента линкера.

Стоит отметить, что реакция ацилирования может сопровождаться процессом эпимеризации C-концевого аминокислотного фрагмента реагирующего пептида (Рисунок 3.9). В основных условиях, после образования активированной формы дипептида **9** возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака атома кислорода остатка фенилаланина по атому углерода активированной карбоксильной группы с образованием оксазолон. Под действием основания возможно обратимое отщепление протона при хиральном атоме углерода, что приводит к образованию трудноразделимой смеси двух стереоизомеров. При дальнейшем синтезе лигандов ПСМА данный процесс может привести к получению смеси двух изомерных лигандов, обладающих различной ингибирующей способностью. С целью избежать протекания этого побочного процесса, использовали следующую методику проведения реакции: соединение **9** растворяли в диметилформамиде, после чего раствор охлаждали до 0°C, с целью снизить концентрацию активированной формы пептида, которая приводит к образованию оксазолон. Затем добавляли остальные реагенты строго в следующем порядке: 3-азидопропиламин, HOBT, DIPEA и NBTU. На последнем этапе синтеза модифицированного дипептида соединения **10a-b** были введены в реакцию удаления Вос-защитной группы с получением соединений **11a-b**.

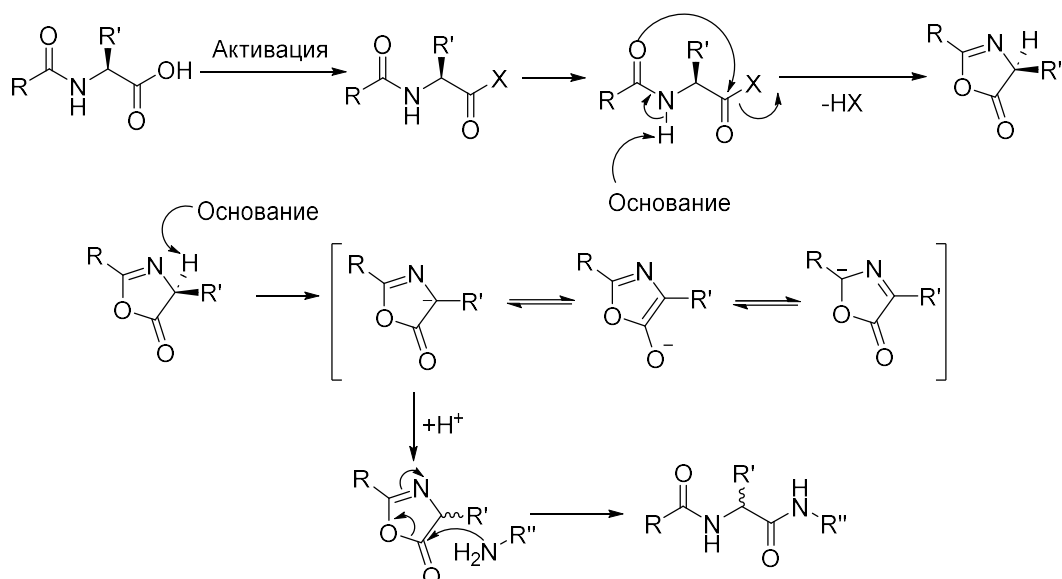


Рисунок 3.9. Механизм эпимеризации при реакции ацилирования пептидов.

Полученные таким образом дипептидные молекулы **11a-b** были введены в реакцию ацилирования с синтезированными ранее соединениями **7a-m** с образованием защищённых лигандов **12a-k**, содержащих два остатка фенилаланина в линкере, и **13a-b**, содержащих остаток тирозина. (Рисунок 3.10). После этого соединения **12** и **13** были введены в реакцию удаления кислотно-лабильных защитных групп с получением целевых лигандов **14a-k** и лигандов сравнения **15a-b**.

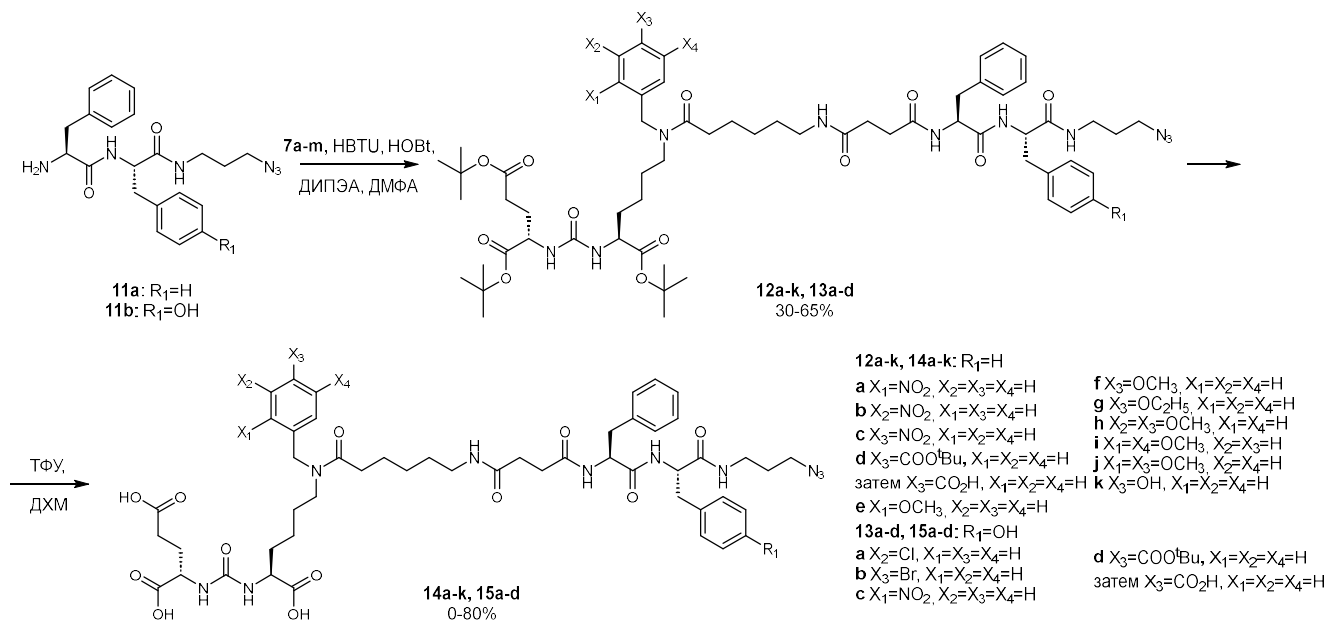


Рисунок 3.10. Схема получения лигандов ПСМА **14a-k** и **15a-d**.

Следует отметить, что выделить лиганд **14j**, содержащий две метокси-группы в *орто*- и *пара*-положениях ароматического фрагмента, нам не удалось. Исходя из данных ЯМР ¹H и ВЭЖХ-МС, предполагается, что в условиях, в которых проводится реакция

удаления защитных групп, происходит одновременное отщепление бензильного фрагмента при ϵ -атоме азота лизина с образованием структуры, представленной на Рисунке 3.11.

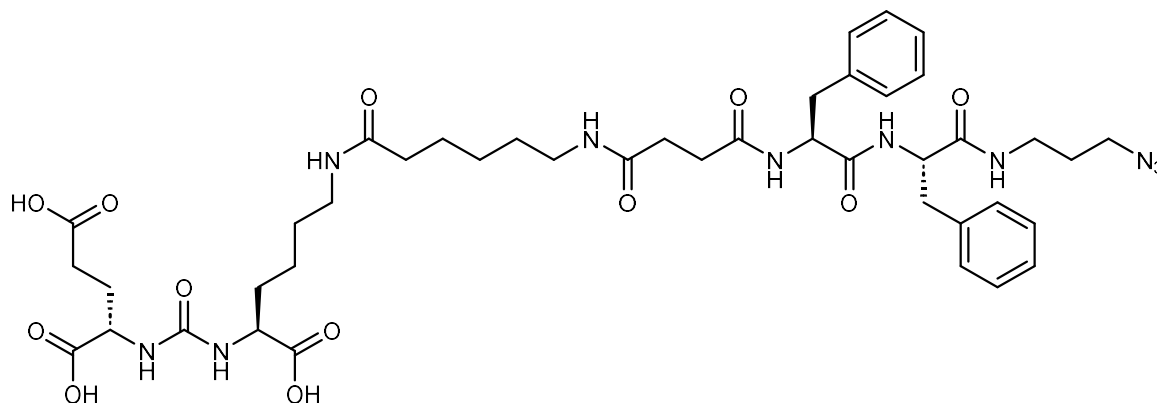


Рисунок 3.11. Предполагаемая структура соединения, образующегося при удалении *tert*-бутильных защитных групп у соединения **12j**.

Ингибирующая активность полученных десяти лигандов **14a-k**, содержащих в своей структуре два остатка фенилаланина, а также двух лигандов сравнения **15a-b**, была оценена *in vitro*. Для этого был проведён эксперимент по ингибированию реакции расщепления N-ацетиласпартилглутамата (NAAG) под действием ПСМА, на клеточной модели РПЖ LNCaP. Полученные значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) приведены в Таблице 3.1. Кроме лигандов **15a-b**, в качестве соединений сравнения использовались известные лиганды ПСМА ZJ-43 и 2-ПМРА (Рисунок 3.12, см. также Разделы 2.2.1 и 2.2.2). Данные соединения часто используются в литературе как соединения-сравнения в этом эксперименте в связи с их высокой ингибирующей активностью.[9,82,86]

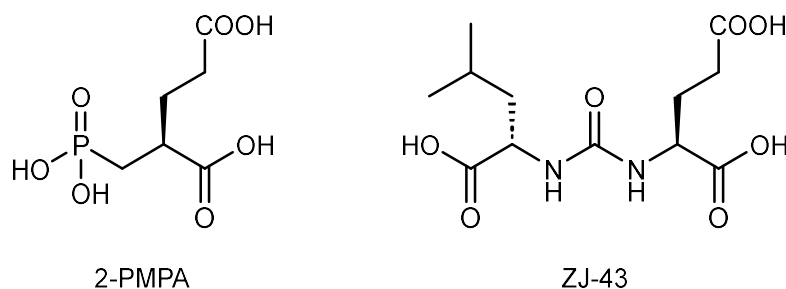


Рисунок 3.12. Структура лигандов сравнения 2-ПМРА и ZJ-43.

Как видно из представленных в Таблице 3.1 данных, наименьшую эффективность ингибирования показали лиганды **14f** и **14g** с алкоксильными группами в *para*-положении, при этом значение IC_{50} , 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 IC_{50} соединения **14f** и **14g**, но уступают другим полученным лигандам, например **14a** и **14d**.

Таблица 3.1. Значения IC₅₀ полученные для соединений **14a-k**, **15a-d**, ZJ-43 и 2-PMRA.

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	OH	9±3
15b	X ₃ =Br	OH	18±6
15c	X ₁ =NO ₂	OH	101±75
15d	X ₃ =COOH	OH	19±5
ZJ-43	—	—	11±3
2-PMRA	—	—	80±24

Данные, полученные для серии нитро-замещённых лигандов **14a-c**, указывают на снижение аффинности в ряду *орто*- > *мета*- > *пара*-замещённый. Лиганд **14a** с нитрогруппой в *орто*-положении показал наиболее высокую аффинность в сравнении с другими лигандами, содержащими заместители данной природы.

Наилучшую эффективность ингибирования реакции расщепления NAAG продемонстрировал лиганд **14d** с карбоксильной функцией в *пара*-положении. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что наличие в бензильном фрагменте при ε-атоме азота лизина полярных функциональных заместителей, таких как NO₂, OH и COOH, может вносить существенный вклад в увеличение аффинности лигандов ПСМА.

На основе лигандов **14d** и **14a**, как показавших наибольшую аффинность, далее была синтезирована дополнительная серия лигандов **15c-d** с фрагментом *L*-тирозина вместо одного из остатков фенилаланина в пептидном фрагменте линкера, так как ранее было показано, что подобная замена может приводит к увеличению эффективности связывания с мишенью.[9]

Синтез был осуществлён согласно Рисунку 3.10, с получением защищённых лигандов **13c-d**, удаление защитных групп с которых дало целевые лиганды **15c-d**. Как видно из данных *in vitro* исследований ингибирующей активности (Таблица 3.1), лиганды **15c-d** уступают в аффинности лигандам с *пара*-карбоксильной и *орто*-нитро группами 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 более значительному уменьшению

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

Для некоторых полученных лигандов **14** и **15** была проведена оценка их водорастворимости. ПСМА-направленные препараты чаще всего вводятся в организм пациента путём внутривенной инъекции. Из-за этого низкая водорастворимость может стать серьёзным препятствием для создания лекарственной формы препарата. В связи с этим, исследование водорастворимости лигандов ПСМА, на основе которых планируется создание направленных конъюгатов, позволяет оценить потенциал их применения в клинической практике. Первичное измерение водорастворимости полученных лигандов было проведено с помощью методики последовательных разбавлений.[158] Для этого навески массой 2-3 мг суспензировали в 10 мл деионизованной воды, далее добавляли по 2 мл воды до полного растворения осадков. Полученные значения приведены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2. Растворимость лигандов **14** и **15** в воде

Соединение	Заместитель		Водорастворимость, μМ
	ε-NH-бензил	R ₁	
14a	X ₁ =NO ₂	H	11
14b	X ₂ =NO ₂	H	11
14c	X ₃ =NO ₂	H	34
14e	X ₁ =OCH ₃	H	97
14f	X ₃ =OCH ₃	H	11
14h	X ₂ =X ₃ =OCH ₃	H	17
14k	X ₃ =OH	H	25
15a	X ₂ =Cl	OH	14
15d	X ₃ =COOH	OH	255

Как видно из приведённых данных, наибольшую водорастворимость ожидаемо демонстрирует лиганд **15d**, содержащий карбоксильную группу в бензильном фрагменте и остаток тирозина в линкерной части. При этом он значительно превосходит в этом показателе лиганд **15a**, который имеет аналогичный линкер, но атом хлора в качестве заместителя в бензильном фрагменте. Более точно водорастворимость лиганда **15d** была определена с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией согласно методике.[159] Для этого была приготовлена серия из 5 растворов с известной концентрацией (500 μМ, 400 μМ, 300 μМ, 200 μМ, 100 μМ). Далее был приготовлен насыщенный раствор лиганда в воде и по интенсивности соответствующих пиков в масс-спектре была определена концентрация соединения **15d** в насыщенном растворе. Этим методом было определено значение концентрации насыщенного раствора 189±14 μМ.

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**) и оценена их ингибирующая активность и водорастворимость. *In vitro* исследования эффективности ингибирования реакции расщепления NAAG под действием данных соединений показали, что лиганды **14a**, **14d** и **15d** обладают высокой аффинностью к мишени и могут в дальнейшем использоваться как основа для создания направленных диагностических и терапевтических препаратов.

3.2 Альтернативные подходы к твердофазному синтезу лигандов ПСМА с аминогруппой как точкой последующего конъюгирования⁴

При дизайне рассмотренных выше лигандов **14a-k** и **15a-d** (Рисунок 3.2) в качестве функциональной группы для последующего конъюгирования была выбрана азидогруппа. Ещё одной группой, способной выполнять эту роль, является аминогруппа. Использование аминной функциональной группы более предпочтительно для создания некоторых типов конъюгатов. Например, большинство хелатирующих агентов, таких как HBED-CC, DOTA и DOTA-GA, вводят в структуру ПСМА-направленных конъюгатов за счёт реакции ацилирования аминогруппы лиганда. Подобный подход удобен тем, что коммерчески доступные формы указанных хелаторов обычно представляют собой карбоновые кислоты или их производные (ангидриды или NHS-эфиры). При этом описанные до начала нашей работы методы получения лигандов ПСМА с концевой аминогруппой, как точкой последующей функционализации, довольно трудозатратны, ввиду структурной сложности синтезируемых молекул. Так, согласно методике, представленной в работе [77], посвящённой синтезу ПСМА-направленного мономодального конъюгата с хелатирующим агентами DOTA-GA, синтетическая схема предполагает проведение суммарно 13 стадий для получения немеченого радионуклидом конъюгата. В работе [10] приводится синтез лиганда, пригодного для создания на его основе бимодальных конъюгатов, с применением как жидкофазной стратегии (13 стадий, из них 10 с хроматографическим выделением), так и твердофазного подхода (16 стадий, 7 из которых с применением твердофазного синтеза, при этом 7 стадий предполагают хроматографическое выделение продукта). При этом подход, предполагающий частичную сборку на твердофазном носителе, несмотря на большее количество стадий, показал лучший итоговый выход продукта, а стадии ацилирования

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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 // Mendelev Communications – 2023. – Vol. 33. – № 4 – P. 472-475. JIF 1.7 (Web of Science). Объём 0,374 п.л. Личный вклад автора – 35%.

аминогруппы и удаления защитной Fmoc-группы протекают на смоле значительно быстрее, чем в жидкофазном варианте.

В связи с этим в настоящей работе была поставлена задача разработать альтернативный подход к получению защищённых форм лигандов ПСМА, содержащих аминогруппу (соединения **18a-j**) как точку последующего конъюгирования, оценить границы применимости предложенного метода синтеза и сравнить его с альтернативными подходами. Для введения аминогруппы в структуру лигандов в качестве спейсера использовали остаток 1,3-диаминопропана. Общая структура получаемых защищённых лигандов представлена на Рисунке 3.13. Синтез целевых соединений был осуществлён с применением двух альтернативных методов.

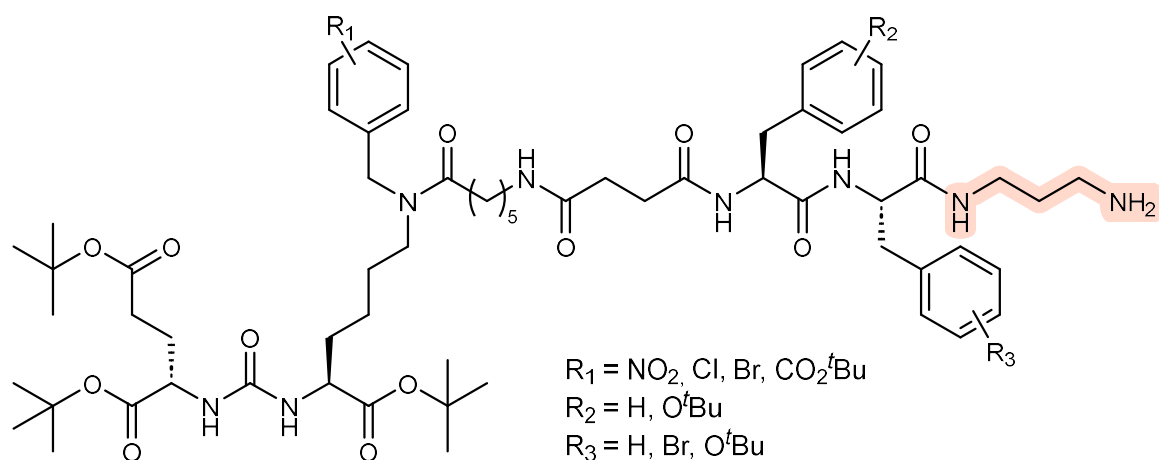


Рисунок 3.13. Общая структура получаемых защищённых лигандов **18a-j** с остатком 1,3-диаминопропана (выделен цветом).

Первый метод основан на использовании комбинации твердофазного подхода и классического синтеза в растворе. В качестве основы при разработке данного метода была использована методика синтеза лиганда ПСМА, представленная в работе [160]. Согласно Рисунку 3.14 был осуществлён синтез защищённых лигандов **18a-b**. На первой стадии осуществлялась иммобилизация остатка Fmoc-защищённого аминокислотного остатка (Fmoc-Phe-OH или Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH) на 2-хлортритил хлоридной смоле (2-СТС смола). Выбор твердофазного носителя обусловлен возможностью удаления иммобилизованного соединения с твердофазного носителя, без затрагивания кислотно-лабильных боковых защитных групп (*трет*-бутиловые эфиры и Boc-защитная группа). Таким образом была получена смола с привитой C-концевой аминокислотой, исходя из которой осуществлялась последующая сборка пептидной последовательности с применением классических методов твердофазного синтеза.[10,11,154] На второй стадии проводилось удаление Fmoc-защитной группы под действием пиперидина. После этого ацилировали α-аминогруппу Fmoc-

защищённым фенилаланином в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА и удаляли Fmoc-защитную группу.

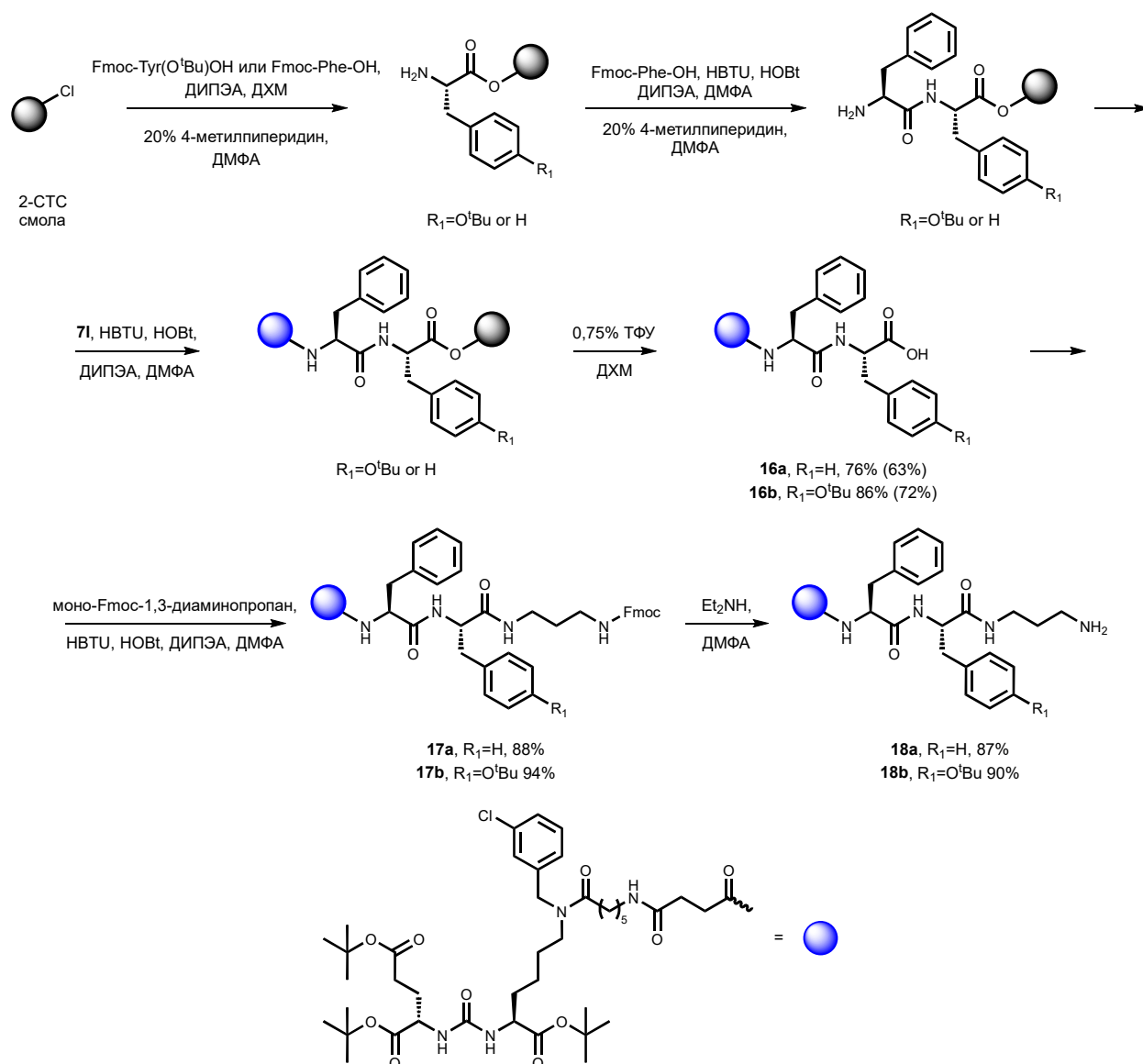


Рисунок 3.14. Схема получения защищённых лигандов **18a-b** с использованием комбинации твердофазного и жидкофазного синтеза. Для соединений **16a-b** без скобок указан выход, рассчитанный относительно смолы, в скобках указан выход, рассчитанный относительно соединения **71**.

На следующей стадии проводилось введение защищённого вектор-фрагмента **71**. В отличие от стандартных протоколов, применяемых при синтезе на смоле, для данной реакции использовали не двухкратный избыток карбоксильной компоненты, а 1,25 эквивалента соединения **71**, а для достижения более полной конверсии время протекания реакции было увеличено с двух часов до 12. Для последующей функционализации C-концевого фрагмента необходимо было осуществить уделение иммобилизованного фрагмента со смолы. Для этого использовался разбавленный раствор TFA (0,75 об.%),

действием которого соединения **16a-b** были удалены с твердофазной подложки. Затем проводилось введение в структуру 1,3-диаминопропанового спейсера реакцией по свободной карбоксильной группе соединений **16**. Для этого вначале проводилась реакция ацилирования моно-Fmoc-1,3-диаминопропана с образованием соединений **17a-b** и далее удаление Fmoc-защитной группы под действием диэтиламина. Таким образом удалось получить защищённые лиганды **18a-b**.

Описанный метод предполагает получение целевых соединений за восемь стадий, пять из которых проходят на смоле. Следует отметить, что на стадиях удаления со смолы, ацилирования защищённого диаминопропана и удаления Fmoc-группы выделение целевых продуктов осуществлялось с применением колоночной хроматографии. Суммарный выход предложенной схемы в случае соединения **18a** равен 58% относительно ёмкости смолы и 48% относительно вектор-фрагмента **71**, а в случае соединения **18b** 73% относительно ёмкости смолы и 61% относительно соединения **71**.

В качестве альтернативы, в рамках данной работы нами предложен подход к синтезу соединений **18**, подразумевающий предварительную иммобилизацию 1,3-диаминопропана на 2-СТС смоле. На первой стадии синтеза активировали смолу, после чего проводилась иммобилизация на неё 1,3-диаминопропана методом, описанным в литературе.[161] Полученная таким образом смола с привитым фрагментом диаминопропана была введена в реакции твердофазного пептидного синтеза в соответствии со стандартными протоколами для Fmoc-стратегии на 2-СТС смоле (Рисунок 3.15).

Иммобилизованный диаминопропан ацилировали защищённой аминокислотой в присутствии активирующих агентов HBTU и HOBT и основания (ДИПЭА). После этого удаляли Fmoc-защитную группу действием раствора 4-метилпиперидина в ДМФА. На следующем этапе вводили вторую аминокислоту в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА, и далее удаляли Fmoc-защитную группу. Таким образом были получены модифицированные пептидные фрагменты, иммобилизованные на смоле. Для подтверждения возможности эффективного удаления иммобилизованного фрагмента со смолы на примере соединения **19** была проведена пробная реакция. В отличие от стандартных процедур, применяемых при иммобилизации фрагментов на смоле за счёт взаимодействия карбоксильной группы с 2-хлортритильным фрагментом, двух последовательных промывок 0,75% раствором ТФУ в ДХМ в течение 15 минут оказалось недостаточно для полного удаления соединения **19** со смолы. Увеличение концентрации кислоты до 1% привело к более эффективному удалению вещества с носителя. Однако, последующий анализ данных спектроскопии ЯМР ^1H полученного продукта показал, что в результате этой реакции происходит частичное удаление *трет*-бутильной защитной группы при атоме кислорода остатка тирозина. В

спектре ЯМР ^1H соединения **19** имелось два набора сигналов в области, относящейся к ароматическим протонам тирозина (Рисунок 3.16). Дублеты с химическими сдвигами 7,11 м.д. и 6,87 м.д. относятся к протонам защищённой формы тирозина, в то время как дублеты с химическими сдвигами 7,00 м.д. и 6,66 м.д. соответствуют протонам тирозина со свободной гидроксильной группой. В результате двух промывок 0,75% раствором ТФУ и одной промывки 1% раствором ТФУ со 100 мг модифицированной смолы удалось получить 35 мг (68%) соединения **19**.

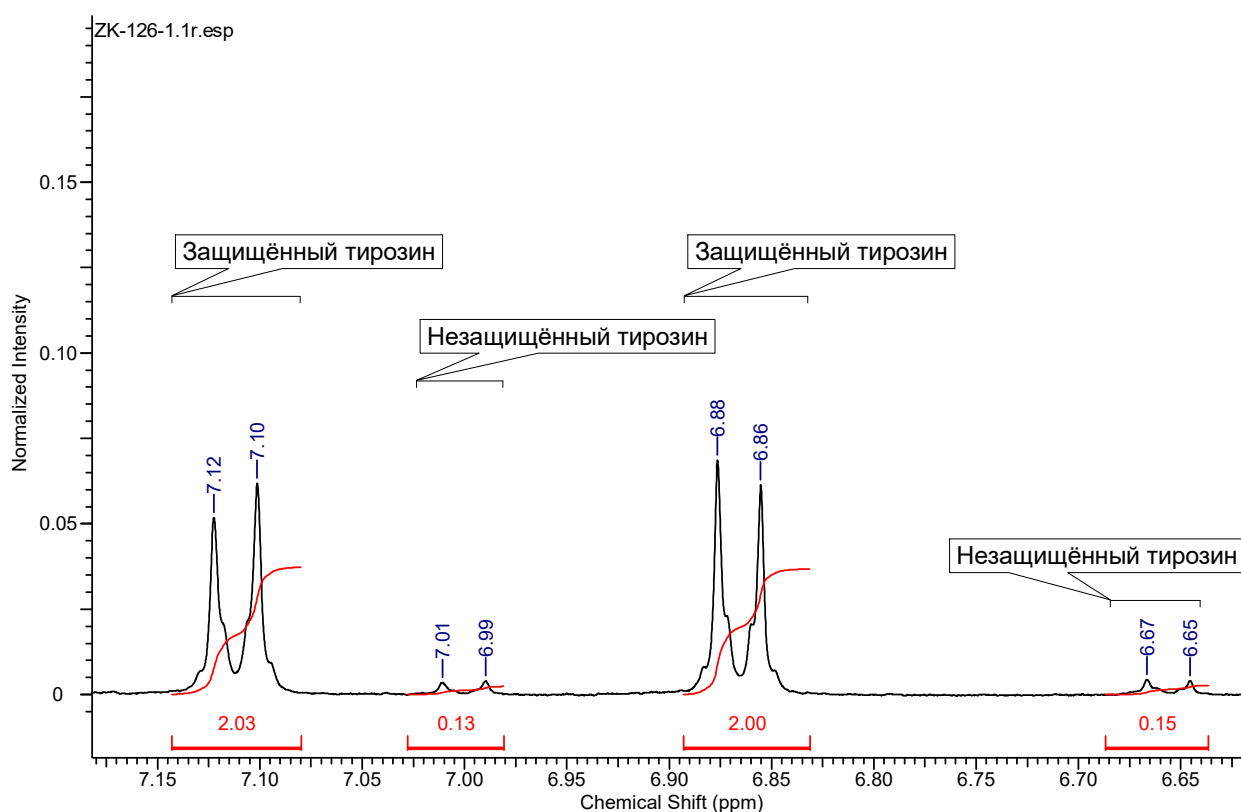


Рисунок 3.16. Фрагмент спектра ЯМР ^1H смеси соединения **19** с продуктом побочного процесса удаления *tert*-бутильной защитной группы.

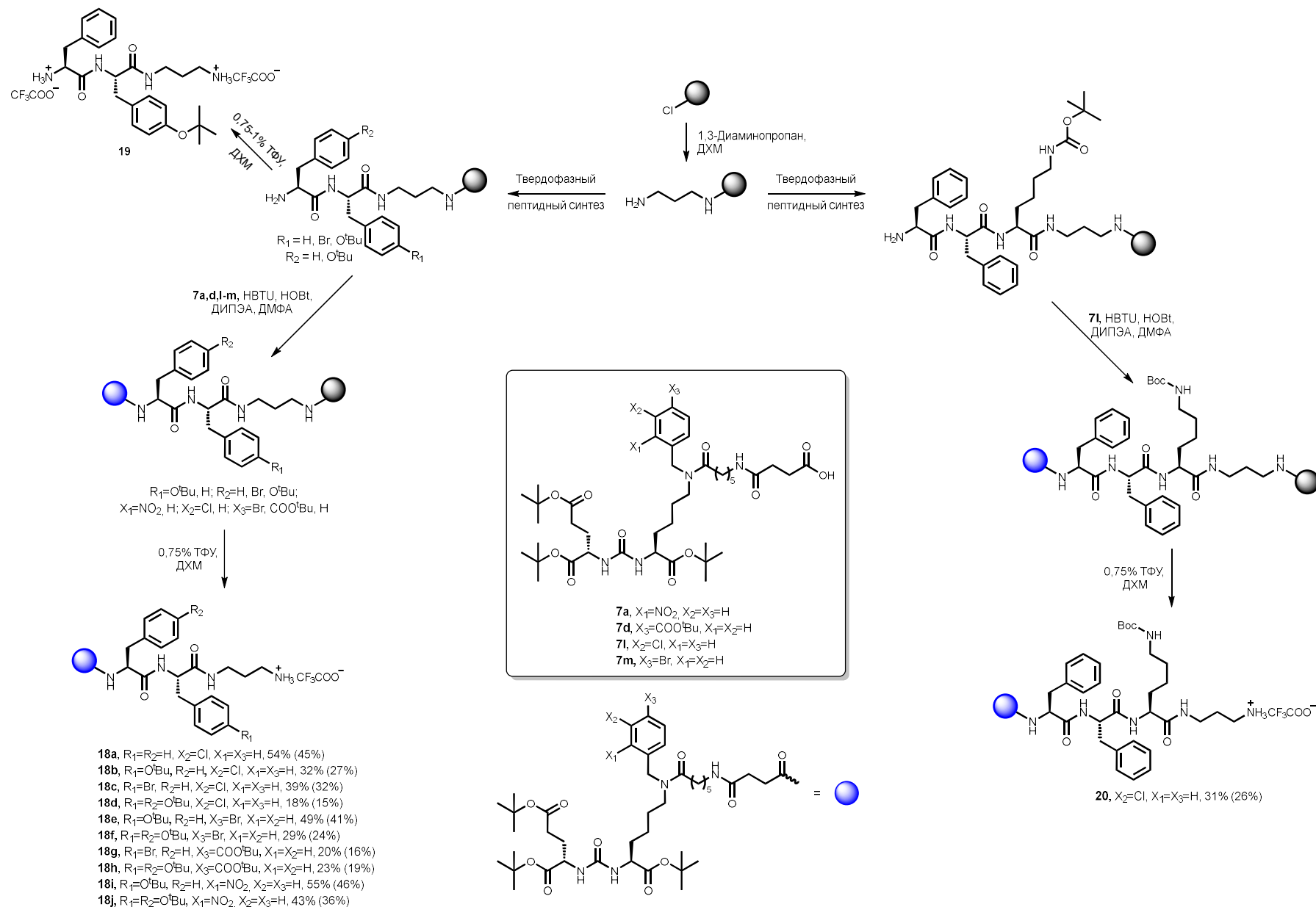


Рисунок 3.15. Схема синтеза защищённых лигандов **18a-j** с использованием твердофазного подхода.

В дальнейшем, на примере векторного фрагмента **7m** и иммобилизованного модифицированного пептида с остатками фенилаланина и тирозина в структуре была проведена модельная реакция получения защищённого лиганда **18e** (Рисунок 3.15). Для получения данного соединения смолу с иммобилизованным модифицированным дипептидом перемешивали в течение 16 часов с векторным фрагментом в присутствии HBTU, HOBT и ДИПЭА. Затем проводилось удаление соединения **18e** с твердофазного носителя. Для этого смолу перемешивали с 1% раствором ТФУ в ДХМ в течение 15 минут. Затем промывали трижды ДХМ по одной минуте. В результате проведения 3 таких промывок удалось получить небольшое количество целевого вещества. Масса полученного соединения **18e** составила 90 мг, что соответствовало выходу в 20%. После 7 дополнительных промывок смолы раствором ТФУ, с увеличением времени промежуточных промывок хлористым метиленом до 5 минут, и колоночной хроматографии в элюирующей системе 0,1% TFA в DCM/метанол удалось выделить целевое соединение **18e** в индивидуальном виде. Выход реакции ацилирования и последующего удаления со смолы составил 51% по смоле и 36% по вектор-молекуле **7m**. В результате данной реакции при выделении продукта по данным ЯМР также было зафиксировано образование побочного соединения (около 17 w/w% от общей массы смеси, полученной после удаления со смолы) без *трет*-бутильной группы в структуре тирозинового фрагмента. При этом следует отметить, что более кислотнo-лабильные *трет*-бутильные фрагменты при карбоксильных группах векторного фрагмента оказались в подобных условиях устойчивыми. Исходя из этих данных было принято решение проводить удаление со смолы в последующих экспериментах, применяя 0,75% раствор ТФУ в ДХМ.

На следующем этапе работы были проведены реакции получения защищённых лигандов **18a-b** с векторным фрагментом **7l**. Были использованы условия реакции ацилирования, оптимизированные на примере получения соединений **18a-b** согласно Рисунку 3.14.

Удаление иммобилизованных фрагментов со смолы проводили путём многократных промывок 0,75% раствором трифторуксусной кислоты. После каждой промывки раствором ТФУ и трёхкратной промывки хлористым метиленом фильтрат упаривали и проводили взвешивание для определения степени удаления целевого вещества со смолы. Данные, полученные после каждого подобного цикла, представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3. Масса смеси, полученной в результате удаления вещества с твердофазного носителя.

№ промывки	Масса, удалённого со смолы вещества, мг		
	18a	18b	20
1	1	1	1
2	20	23	19
3	71	103	87
4	135	188	171
5	181	237	244
6	213	263	276
7	239	271	300
8	252	285	312
9	268	285	313
10	271	285	313

Как видно из данных, приведённых в таблице, необходимо проведение минимум 6-7 промывок 0,75% раствором ТФУ для достижения достаточно высокой степени удаления иммобилизованного фрагмента со смолы.

Для расширения синтетической библиотеки и более полной оценки синтетического потенциала метода был проведён синтез дополнительной серии лигандов (**18c, d, f-j**) на основе вектор-молекул **7a,d,l-m**. При этом достигнуть выхода, сопоставимого с суммарными выходами, представленными на Рисунке 3.14, удалось лишь в случае лигандов **18a** (выход 43% относительно векторного фрагмента), **18e** и **18i**. Следует отметить, что только в случае лиганда **18j** удалось достичь относительно высоких выходов (36% относительно векторного фрагмента) для пептидной последовательности, содержащей два остатка защищённого L-тирозина. Также не удалось достичь высоких выходов для соединений **18c** и **18g**, содержащих пептидный фрагмент с остатками фенилаланина и бромзамещённого фенилаланина.

В дальнейшем проводилась оценка применимости предложенной на Рисунке 3.15 стратегии для синтеза лигандов для получения бимодальных конъюгатов. В качестве пептидной последовательности был выбран трипептидный фрагмент с двумя фрагментами фенилаланина и с фрагментом Вос-защищённого по ϵ -аминогруппе лизина (Рисунок 3.15). С применением представленных выше методик был получен защищённый лиганд **20**. Так же, как и в случае лигандов **18a-j**, удаление иммобилизованного соединения **20** со смолы 0,75% ТФУ требовало нескольких последовательных обработок кислотой (данные

представлены в Таблице 3.3). Выделение целевого соединения **20** привело к получению 111 мг чистого, согласно данным тонкослойной хроматографии (ТСХ) вещества. Однако, последующий анализ данных ВЭЖХ-МС этой фракции показал, полученный продукт представлял собой смесь из 4 компонентов, а содержание целевого продукта составляло лишь 21% (по данным ВЭЖХ-МС). В данной фракции, а также в некоторых других фракциях, полученных в результате хроматографического выделения, присутствовал продукт, не содержащий Вос-защитной группы (соединение **20a**, Рисунок 3.17). Исходя из этих данных, можно сделать вывод о том, что предложенный метод, основанный на иммобилизации 1,3-диаминопропана на 2-СТС смоле, не может быть применён в качестве альтернативы для традиционного синтеза лигандов ПСМА подобного строения, заключающегося в комбинации твердофазного и жидкофазного пептидного синтеза.

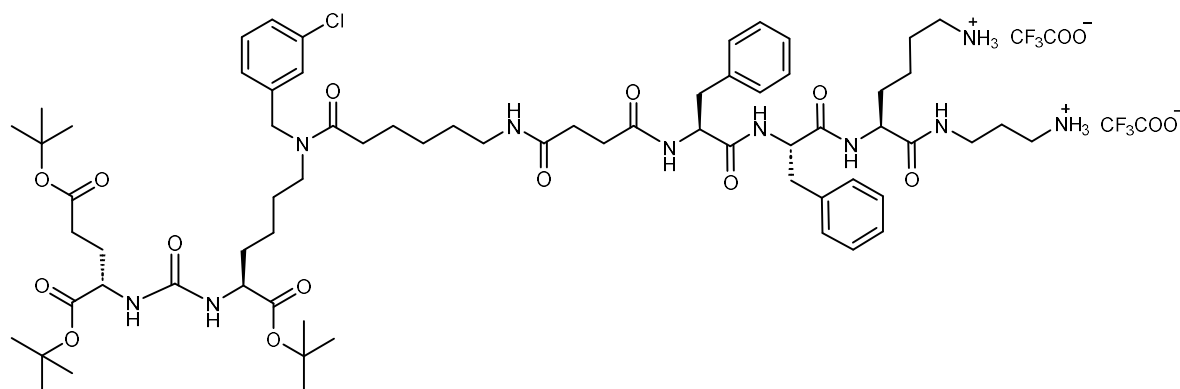


Рисунок 3.17. Структура соединения **20a**.

Обобщённые данные сравнения двух представленных на Схемат 7 и 8 подходов к получению соединений **18a-b** представлены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4. Обобщённые данные сравнения синтетических Схем 7 и 8 для получения соединений **18a-b**. SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) – твердофазный пептидный синтез.

Соединение	Согласно Рисунок 3.14			Согласно Рисунок 3.15		
	Количество стадий (из них SPPS)	Количество стадий с хроматографическим выделением	Выход относительно смолы (относительно векторного фрагмента 7l), %	Количество стадий (из них SPPS)	Количество стадий с хроматографическим выделением	Выход относительно смолы (относительно векторного фрагмента 7l), %
18a	8 (5)	3	58 (48)	7 (6)	1	54 (45)
18b	8 (5)	3	73 (61)	7 (6)	1	32 (27)

Первый рассмотренный синтетический маршрут (Рисунок 3.14) предполагает две дополнительные синтетические стадии с хроматографическим выделением целевых продуктов (стадии получения соединений **17a-b** и **18a-b**). Однако данный метод дает более высокие суммарные выходы целевых продуктов: 48% для соединения **18a** и 61% для **18b** (значения выходов рассчитаны относительно вектор-молекулы **7l**). Вторая синтетическая

схема (Рисунок 3.15) менее трудозатратна, так как хроматографическое выделение применяется только после удаления целевых соединений с твердофазного носителя, и обладает потенциалом автоматизации при помощи пептидного синтезатора. Однако выход целевых продуктов в целом несколько ниже, чем по первой синтетической схеме, хотя в некоторых случаях (а именно при отсутствии в пептидном фрагменте кислотно-лабильных функциональных групп) удастся достичь соизмеримых значений выходов. Попытка синтезировать данным методом соединение, пригодное для создания на его основе бимодальных конъюгатов, показала крайне низкую эффективность, и для получения подобных соединений более применимым выглядит метод, сочетающий твердофазный и жидкофазный синтез. Также твердофазный метод, представленный на Рисунке 3.15, сложнее поддаётся масштабированию.

Таким образом, при получении соединений-предшественников лигандов ПСМА, пригодных для синтеза на их основе 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 аминокислотной группы – если задачей является быстрая наработка библиотеки соединений для тестирования.

3.3 Синтез направленных на ПСМА систем совместной доставки

Как было отмечено в обзоре литературы (Раздел 2.3), комбинационная терапия с использованием нескольких лекарственных препаратов различного механизма действия является перспективным подходом в современной терапии РПЖ. При этом использование низкомолекулярных систем доставки терапевтических агентов исследовано недостаточно. В связи с этим в рамках данной работы был осуществлён синтез серии подобных соединений и исследована их биологическая активность *in vitro* и *in vivo*. Для этого необходимо было получить серию лигандов, пригодных для конъюгирования с двумя препаратами, оценить их ингибирующую активность *in vitro*, провести необходимую модификацию терапевтических препаратов и получить соответствующие бимодальные конъюгаты.

3.3.1 Синтез лигандов ПСМА, пригодных для создания бимодальных конъюгатов и оценка их ингибирующей активности⁵⁶

Для создания ингибиторов ПСМА, пригодных к конъюгированию с двумя терапевтическими агентами, был использован предложенный в литературе подход [10], где в качестве ортогональных функциональных групп для конъюгирования используются аминогруппа остатка лизина и азидогруппа остатка 3-азидопропиламина. При подобном дизайне лиганда возможно осуществить реакцию с одной из функциональных групп, не затрагивая вторую. На основании данных ингибирующей активности, представленных в Таблице 3.1, в качестве лигандов были выбраны соединения, содержащие *мета*-хлор-, *пара*-бром- и *пара*-карбоксильный заместители в бензильном фрагменте при ϵ -аминогруппе лизина мочевины. Последовательность *L*-Phe-*L*-Tyr-*L*-Lys была выбрана в качестве пептидного фрагмента линкера для соединений, содержащих хлор и бром в ароматическом кольце. Данный выбор сделан исходя из высокой аффинности описанных лигандов-аналогов без остатка лизина в структуре линкера.[9] На основе соединения **7d**, содержащего карбокси-группу, был осуществлён синтез двух лигандов со следующими вариантами пептидного участка линкера: *L*-Phe-*L*-Tyr-*L*-Lys и *L*-Phe-*L*-Phe-*L*-Lys. Выбор первого варианта обосновывается повышенной водорастворимостью не содержащего лизин лиганда-аналога **15d** и его относительно высокой ингибирующей активностью. Второй вариант обосновывается наибольшей эффективностью ингибирования для соединения-аналога **14d** среди всех синтезированных лигандов ПСМА в Разделе 3.1.

Для получения пептидного фрагмента линкера был проведен твердофазный синтез выбранных последовательностей согласно Рисунку 3.18.

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. JIF 4.9 (Web of Science). Объём 2,314 п.л. Личный вклад автора – 40%.

⁶ *In vitro* исследования, представленные в данном разделе работы выполнены совместно с сотрудниками кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., доцентом Скворцовым Д.А и к.х.н., инж. 2 категории Шафиковым Р.Р.

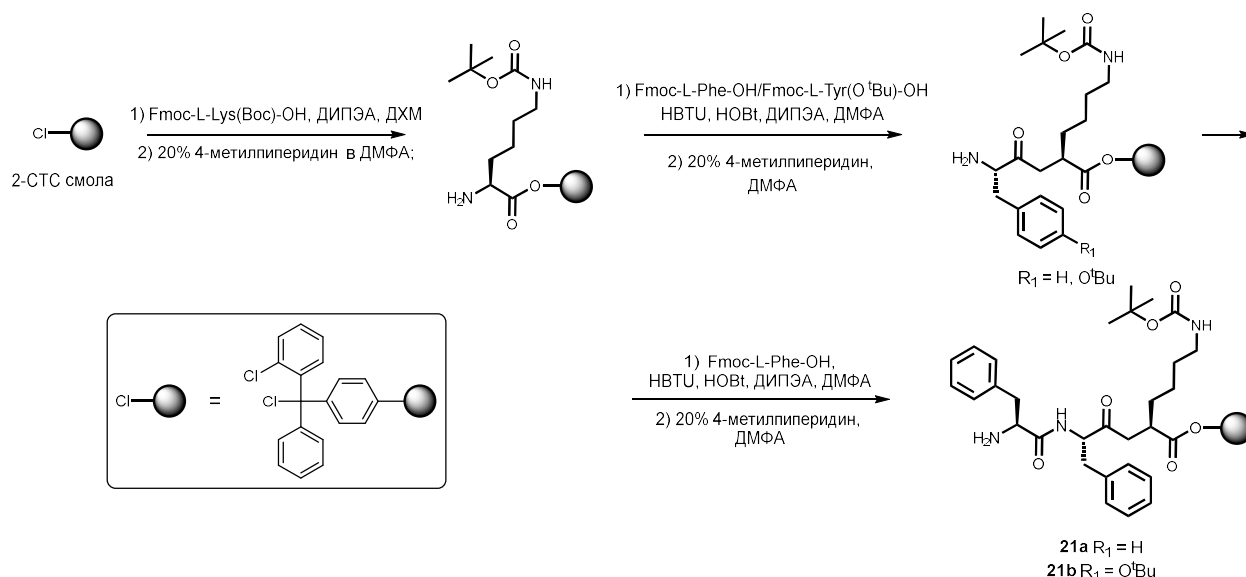


Рисунок 3.18. Твердофазный синтез трипептидных фрагментов.

В качестве фазы, на которой иммобилизовывался пептид, была выбрана 2-хлортритил хлоридная смола (2-СТС смола на Рисунке 3.18). Выбор смолы определялся возможностью удаления с нее пептидной последовательности без затрагивания кислотно-лабильных защитных групп (*трет*-бутоксикарбонильной (Boc) и *трет*-бутильной). На данном носителе возможна реализация пептидного синтеза с применением наиболее синтетически удобной Fmoc-стратегии.[162] На первом этапе проводилась активация смолы хлористым тионилем в присутствии каталитических количеств ДМФА при кипячении в дихлорметане для превращения возможного продукта гидролиза смолы влагой воздуха, образующегося при хранении, в необходимый хлорид (Рисунок 3.19).

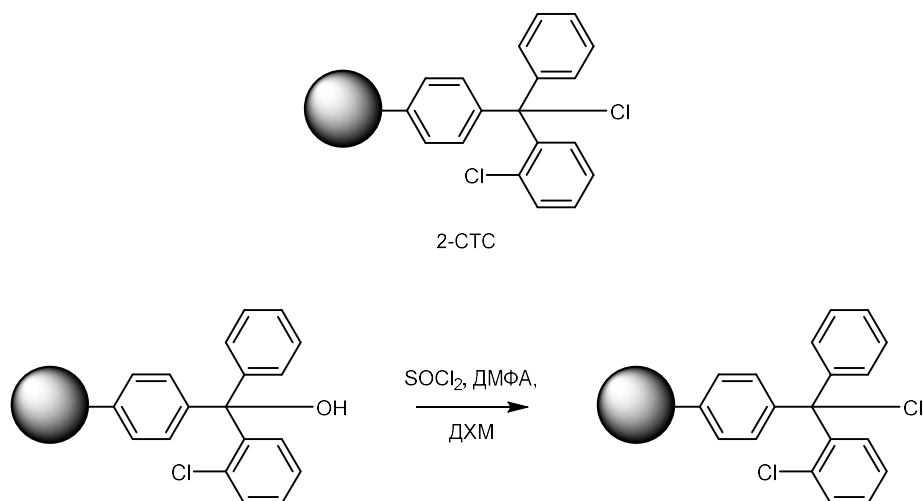


Рисунок 3.19. 2-СТС смола и схема реакции её активации

В дальнейшем на преактивированной смоле иммобилизовывали Fmoc-защищённый по α-аминогруппе и Boc-защищённый по ε-аминогруппе лизин. Реакцию проводили в ДХМ в присутствии большого избытка основания (10 экв.). После окончания реакции полученную массу промывали метанолом, чтобы перевести возможные

непрореагировавшие хлор-триметилсилильные группы смолы в неактивную форму. Далее удаляли Fmoc-защиту в основных условиях, реакцией с 20% раствором 4-метилпиперидина в ДМФА.

В качестве агентов для удаления Fmoc-защитной группы в органическом синтезе применяются различные вторичные амины, такие как диэтиламин, морфолин, пиперидин и его производные. Однако наибольшее применение в твердофазном синтезе получил пиперидин и его производные (например, использованный в этой работе 4-метилпиперидин), которые, в отличие от диэтиламина, взаимодействуют с дибензофульвеном, образующимся в результате реакции (Рисунок 3.20). За счёт этого последующая очистка становится менее трудозатратной, и заключается в последовательном промывании смолы ДМФА и хлористым метиленом.

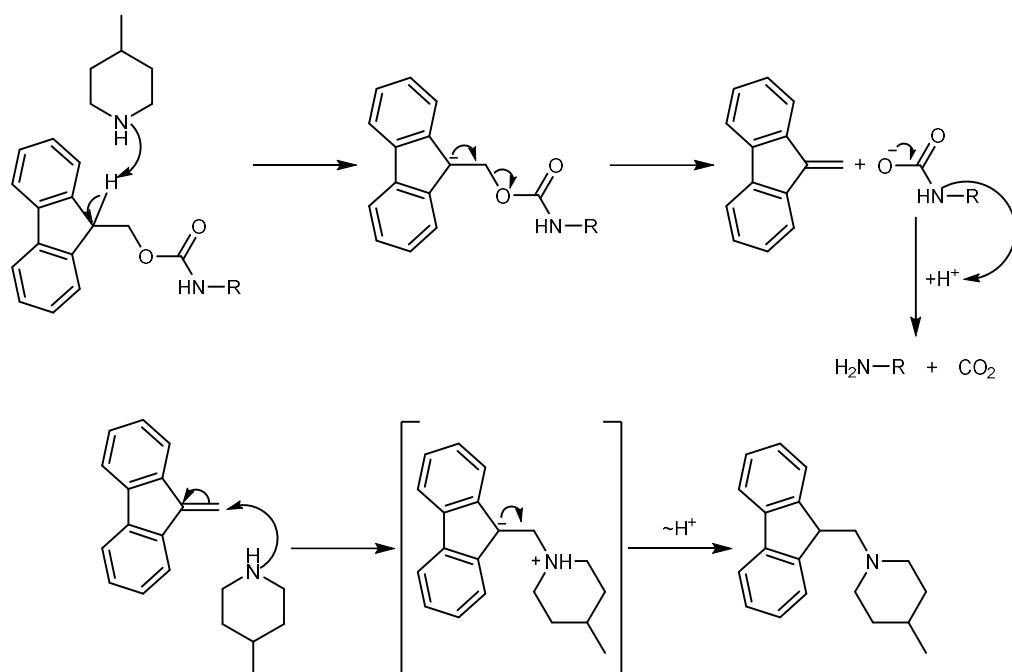


Рисунок 3.20. Механизм удаления Fmoc-защитной группы

На следующей стадии проводилось ацилирование лизина по α -аминогруппе Fmoc-защищённым фенилаланином или *N*-Fmoc-*O*-*трет*-бутил-защищённым тирозином (Рисунок 3.18). Данная реакция осуществлялась с использованием смеси активирующих агентов HBTU и HOBT в присутствии ненуклеофильного основания. После окончания реакции Fmoc-защиты удаляли при помощи раствора 4-метилпиперидина в ДМФА.

Полученные таким образом дипептиды далее вводили в реакцию с Fmoc-защищённым фенилаланином в аналогичных условиях (HBTU и HOBT в качестве активаторов, ДИПЭА – ненуклеофильное основание). После этого удаляли защитную группу при α -аминогруппе фенилаланина с получением трипептидов **21a-b** (Рисунок 3.18).

Трипептиды **21a-b** были введены в реакцию ацилирования с соединениями **7d,l-m** в присутствии НВТУ, НОВт и основания (Рисунок 3.21). Полученные 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 НВТУ, НОВт и ДИПЭА. Таким образом были получены защищённые лиганды **23a-d** с терминальной азидогруппой. На последнем этапе было проведено удаление защитных групп под действием смеси ТФУ/ТИПС/ДХМ/вода и методом обращённо-фазовой препаративной колоночной хроматографии были выделены лиганды **24a-d**. Чистота полученных лигандов была подтверждена методом ВЭЖХ-МС.

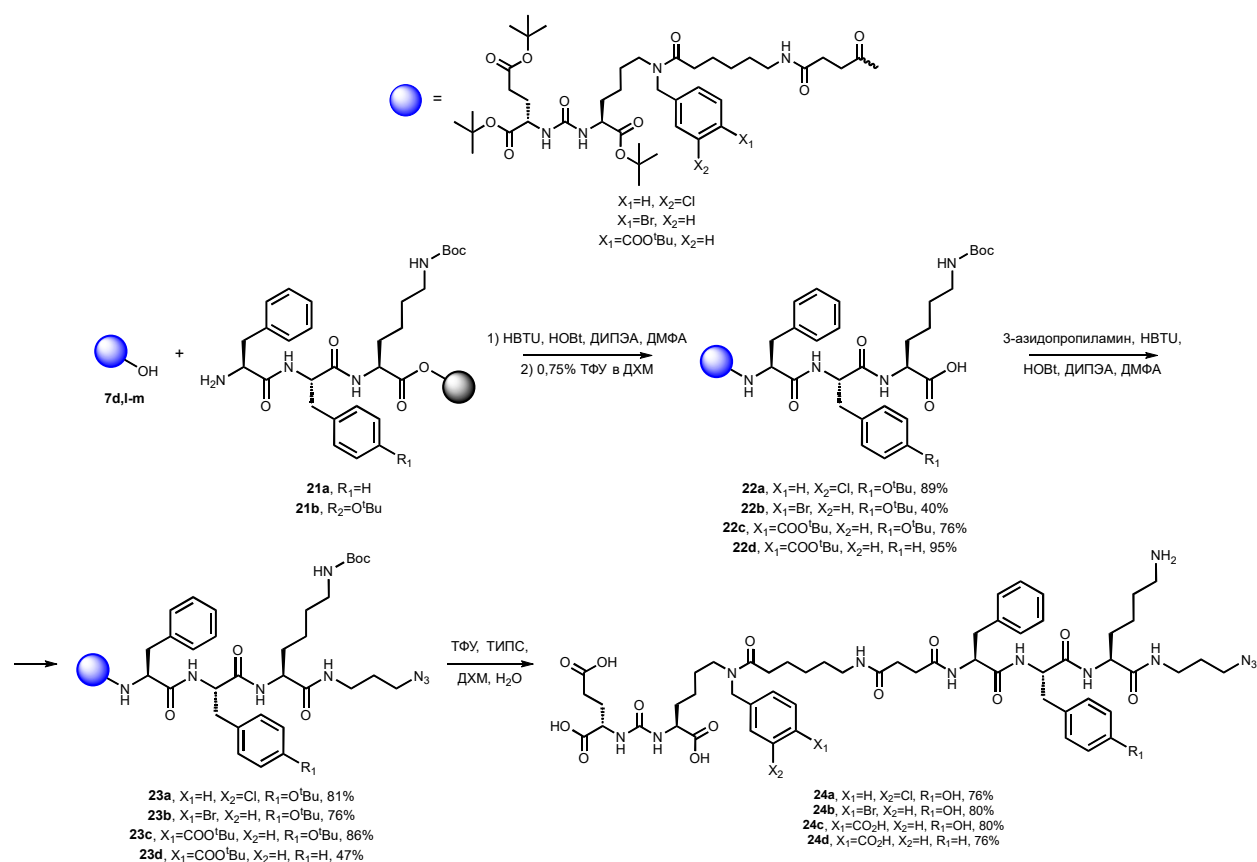


Рисунок 3.21. Схема синтеза лигандов ПСМА, пригодных для создания бимодальных конъюгатов.

Структура полученных лигандов ПСМА **24a-d** была доказана методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , а также масс-спектрометрией высокого разрешения. В спектрах ЯМР ^1H наиболее характеристичной является область от 4,00 до 9,50 м.д. Например, в случае спектра соединения **24c** (Рисунок 3.22), в области от 4,00 до 4,17 м.д. находится мультиплет, соответствующий протонам СН-групп фрагмента мочевины DCL и α -протону лизина. Мультиплет в области 4,27-4,40 м.д. соответствует протонам СН-фрагментов тирозина и фенилаланина. В более слабом поле (4,49-4,65 м.д.) находится несимметричный мультиплет, относящийся к CH_2 -группе бензильного фрагмента при ε -

аминогруппе лизина. Удвоение сигнала в спектре обусловлено наличием ротамерии, аналогично обсуждавшейся в Разделе 3.1 для соединений **5a-m**. В области 6,26-6,38 м.д. находится мультиплет, соответствующий протонам при атомах азота мочевиного фрагмента. Два дублета (6,66 и 7,05 м.д.) соответствуют протонам ароматического фрагмента тирозина. Подобный химический сдвиг говорит обо отсутствии *трет*-бутильной защитной группы при атоме кислорода (для соединения **22c** эти протоны проявляются при 6,87 и 7,11 м.д.). В более слабом поле присутствуют сигналы, соответствующие ароматическим протонам остатка фенилаланина и удвоенный набор сигналов ароматических протонов бензильного фрагмента. Сигнал при 7,56 м.д. соответствует амидному протону остатка 3-азидопропиламина, уширенный синглет на 7,66 относится к протонированной аминогруппе лизина. Мультиплет около 7,79 – сигнал амидного протона остатка лизина. Набор сигналов от 7,85 до 7,98 м.д. соответствует ароматическим протонам, находящимся в *орто*-положении к карбоксильной группе бензильного фрагмента и накладывающемуся на этот набор сигналов мультиплету амидного протона остатка 6-аминогексановой кислоты. В более слабом поле находятся два дублета, соответствующие амидным протонам остатков тирозина и фенилаланина, а уширенный синглет на 9,23 соответствует протону гидроксигруппы тирозина. Также в спектре наблюдается сильно уширенный синглет в области 12,57 м.д. с интегральной интенсивностью близкой к 4. Он соответствует протонам четырёх карбоксильных групп. В сильном поле отсутствуют сигналы протонов, относящихся к *трет*-бутильным защитным группам. В спектре ЯМР ^{13}C также отсутствуют сигналы, соответствующие четвертичным и первичным атомам углерода этих групп.

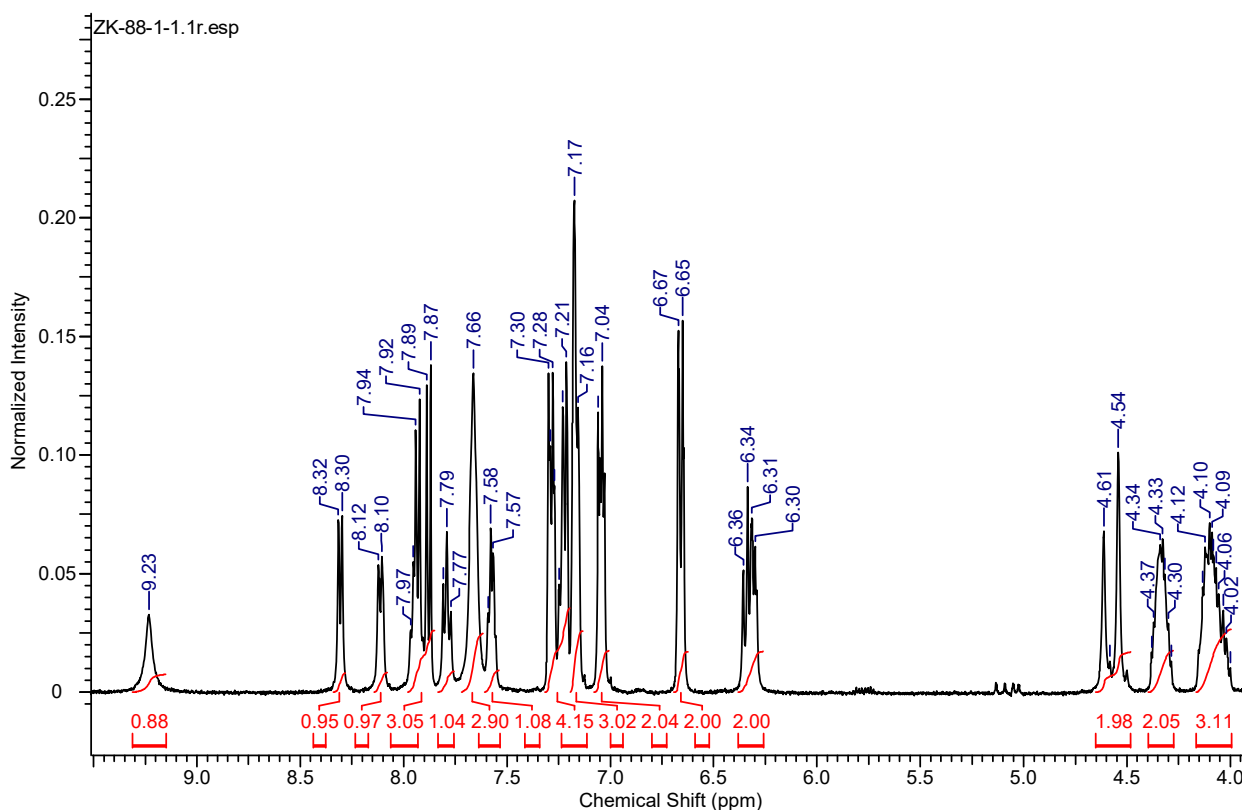


Рисунок 3.22. Фрагмент спектра ЯМР ^1H соединения **24c**.

Таким образом, было получено четыре новых лиганда ПСМА **24a-d**, имеющих в своей структуре остаток лизина, за счёт которого возможно осуществление синтеза на их основе различных терапевтических и диагностических бимодальных конъюгатов.

Следующим шагом стала *in vitro* оценка аффинности четырёх новых полученных лигандов к ПСМА методом ингибирования расщепления N-аспаратилглутамата (NAAG). В качестве лигандов сравнения были выбраны соединения-предшественники **14d** и **15a-b,d** без остатка лизина в структуре. Также в качестве референсных соединений были использованы описанные в литературе лиганды ZJ-43 и DCL. Полученные значения IC_{50} представлены в Таблице 3.5.

Как видно из приведённых значений IC_{50} , введение в структуру остатка лизина не приводит к значительным изменениям аффинности по сравнению с лигандами-предшественниками. При этом все полученные лиганды значительно превосходят исходную мочевины DCL по данному показателю. Синтезированные соединения **24a-d** демонстрируют близкие значения IC_{50} , сопоставимые с этим показателем у лиганда сравнения ZJ-43. Исходя из этих данных, сложно выделить в данной серии какое-то одно соединение-лидер.

Таблица 3.5. Результаты *in vitro* исследований ингибирования реакции расщепления NAAG соединениями **23a-d**

Соединение	Заместители			IC ₅₀ ±SD, 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	5.5±1.7
Соединения сравнения				
ZJ-43				11±3
DCL				547±389
15a	H	Cl	OH	9±3
15b	Br	H	OH	18±6
15d	COOH	H	OH	19±5
14d	COOH	H	H	7±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. Данные *in vitro* исследований показывают, что введение в пептидный фрагмент линкера остатка лизина не приводит к значительным изменениям ингибирующей активности лигандов.

3.3.2 Синтез конъюгата сравнения с терапевтическим агентом монометил ауристатин E⁷⁸

Для последующей оценки активности целевых бимодальных конъюгатов, содержащих терапевтические агенты, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, первоначально нами был синтезирован модельный конъюгат **25** (Рисунок 3.23), содержащий один терапевтический агент.

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. JIF 6.8 (Web of Science). Объем 3,043 п.л. Личный вклад автора – 15%.

⁸ Исследования методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса для соединения **24**, представленные в данном разделе, выполнены совместно с сотрудниками к НИИ магнитной томографии и спектроскопии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова д.х.н., в.н.с. Польшаковым В.И. и инж. Савельевой С.Ю.

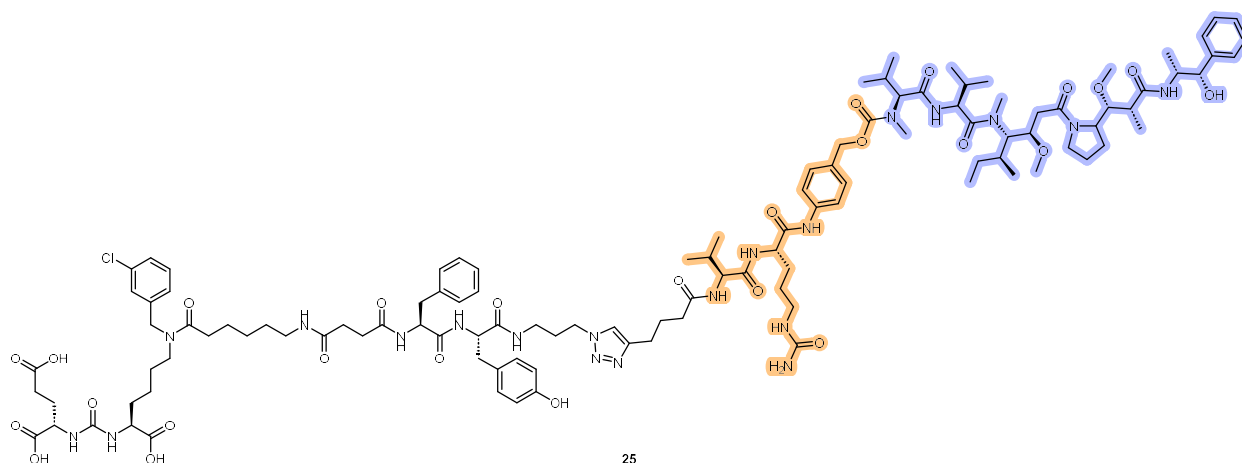


Рисунок 3.23. Структура конъюгата сравнения **25**. Оранжевым выделен фрагмент ферментативно-расщепляемого линкера. Фиолетовым выделен монометил ауристатин Е.

Соединение **15a**, содержащее *meta*-хлорбензильный фрагмент при ϵ -аминогруппе лизина мочевины было выбрано в качестве лиганда. В качестве терапевтического агента выбран монометил ауристатин Е (ММАЕ), являющийся ингибитором полимеризации тубулина. В связи с высокой цитотоксичностью, ММАЕ используется в терапевтической практике только в виде конъюгатов с моноклональными антителами.[163,164] Для достижения более высокой эффективности высвобождения препарата в его структуру был введён дополнительный линкер, содержащий остатки валина, цитруллина и *para*-аминобензильного спирта. Данный линкер селективно расщепляется под действием фермента катепсин Б, что увеличивает его стабильность в кровотоке, и поэтому он широко используется в дизайне как в низкомолекулярных систем доставки ММАЕ, так и конъюгатов этого препарата с моноклональными антителами (см. Раздел 2.4.1).[143,144,165]

Для конъюгирования лиганда с модифицированным ММАЕ была выбрана реакция [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения, в связи с чем предварительно была проведена модификация ММАЕ согласно Рисунку 3.24. Для последующего конъюгирования в структуру был введён остаток 5-гексиновой кислоты.

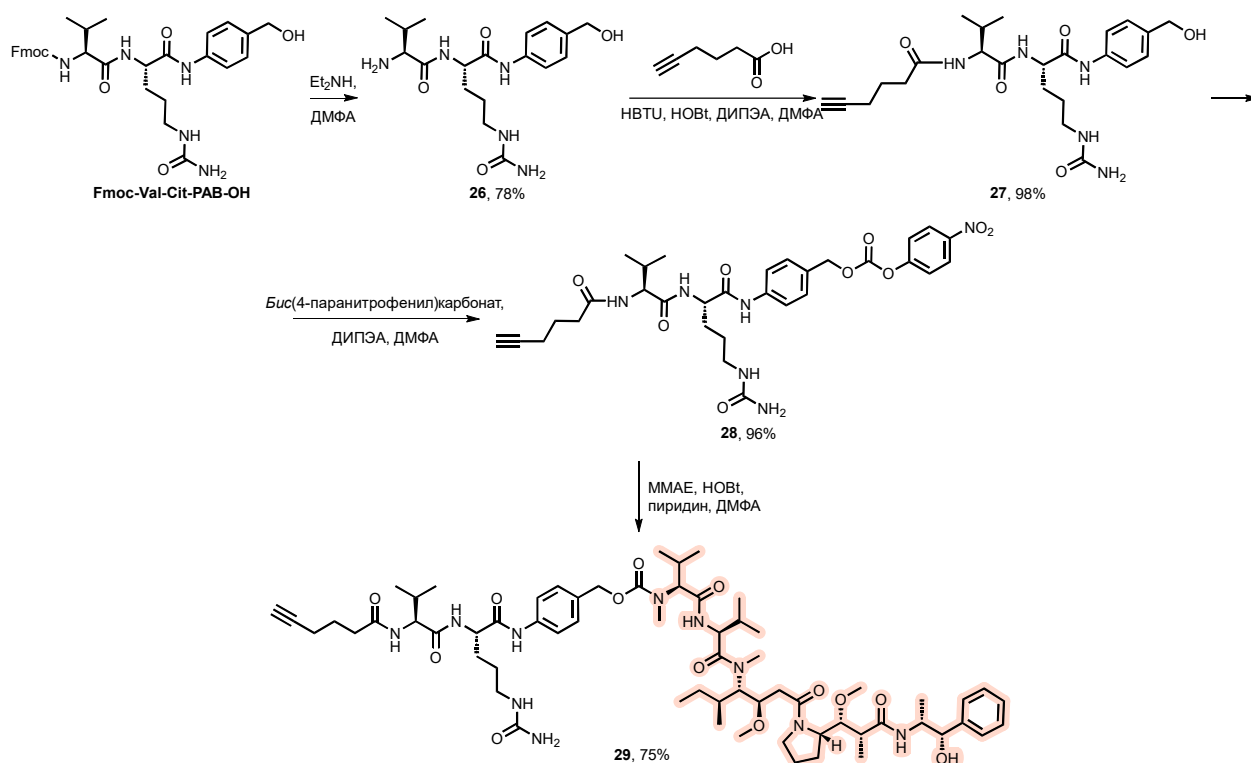


Рисунок 3.24. Схема модификации MMAE с введением ферментативно-расщепляемого линкера.

Для синтеза модифицированного MMAE исходили из коммерчески доступного Fmoc-защищённого L-валил-L-цитруллинового дипептида с введённым фрагментом *para*-аминобензилового спирта (PAB) (соединение **Fmoc-Val-Cit-PAB-OH** на Рисунке 3.24). На первой стадии проводилось удаление защитной группы под действием диэтиламина с получением соединения **26**. Следующим шагом стало введение алкинового фрагмента путём ацилирования аминогруппы валилового фрагмента 5-гексиновой кислотой в присутствии активирующих агентов HBTU и HOBT. В качестве основания использовали диизопропилэтиламин. Продукт **27** был выделен с высоким выходом (98%) методом обращённо-фазовой препаративной колоночной хроматографии. Для последующей модификации MMAE полученным линкерным фрагментом гидроксильную группу остатка PAB перевели в смешанный карбонат путём реакции соединения **27** с бис(4-паранитрофенил)карбонатом в присутствии основания, с образованием соединения **28**. Последним этапом модификации стала реакция между монометил ауристатином E и соединением **28** в присутствии HOBT и пиридина. Структура полученного соединения **29** была подтверждена методом спектроскопии ЯМР ^1H и масс-спектрометрией высокого разрешения. В спектре ПМР наблюдали характеристичный сигнал при 9,97-9,99 м.д., соответствующий протонам при атоме азота остатка *para*-аминобензилового спирта. В области 5,94-5,99 м.д. находится мультиплет, относящийся к протону NH-группы мочевинового фрагмента цитруллина. Сигнал протонов терминальной NH_2 -группы

мочевины наблюдали при 5,40 м.д. В области сильного поля (0,80-0,85 м.д.) находится мультиплет с интегральной интенсивностью равной 12, соответствующий протонам CH_3 -групп остатков валина.

На следующей стадии был получен целевой конъюгат **25** с использованием реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения (Рисунок 3.25). В качестве катализатора использовали ионы меди (I), генерируемые *in situ* из сульфата меди (II) под действием аскорбата натрия.

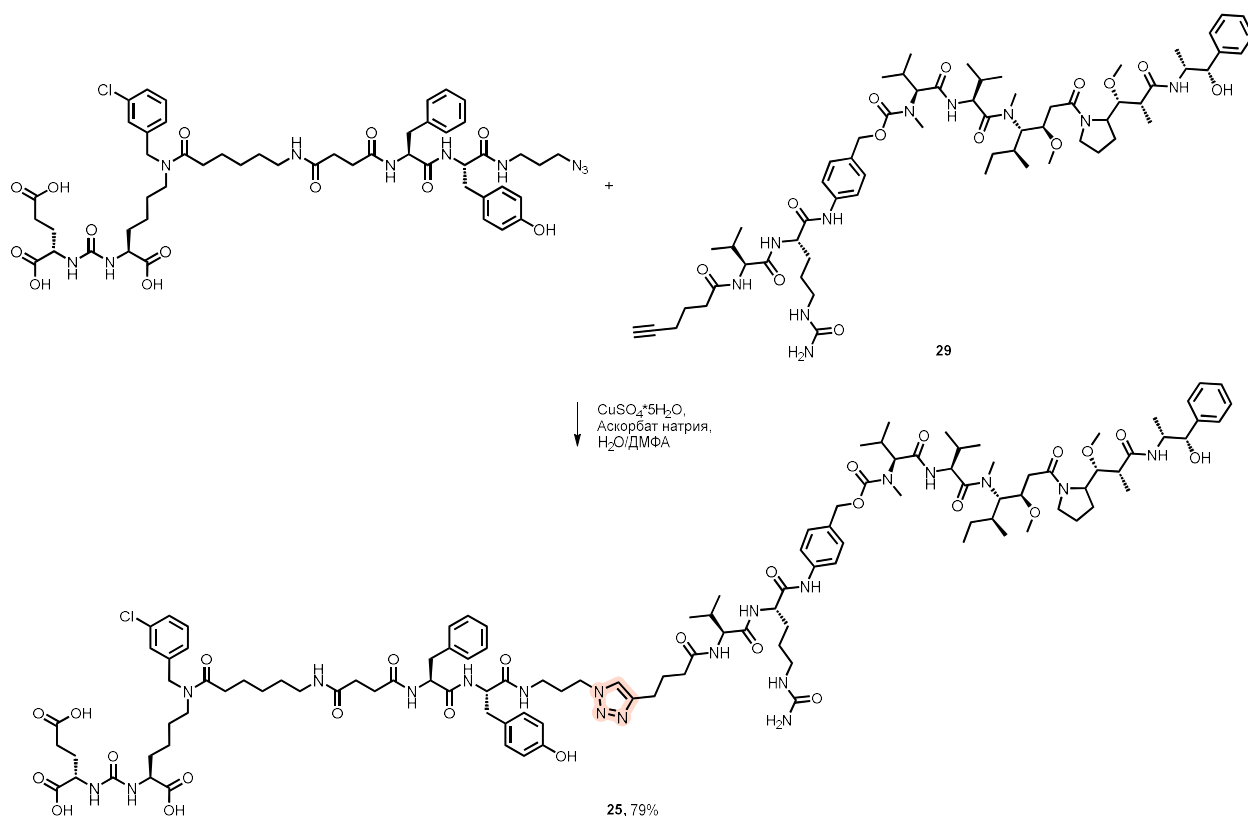


Рисунок 3.25. Схема синтеза конъюгата **25**.

Для очистки от солей меди реакцию смесь обрабатывали динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), а выделение целевого продукта в индивидуальном виде осуществляли методом препаративной обращённо-фазовой колоночной хроматографии. Состав полученного соединения **25** подтверждали методом масс-спектрометрии высокого разрешения, а чистоту – методом ВЭЖХ-МС. Для более полного подтверждения структуры синтезированного конъюгата были проведены 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 , представленное в Таблице 3.6. В Таблице 3.6 и во всех дальнейших рисунках использованы следующие обозначения отдельных атомов и групп, а также отдельных остатков соединения **25**, приведенные на Рисунке 3.26.

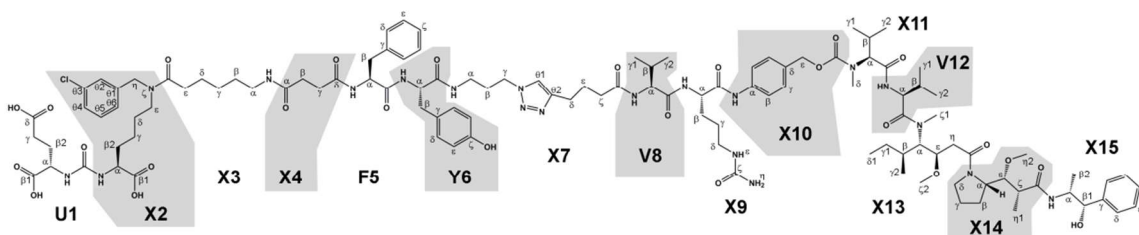


Рисунок 3.26. Используемая номенклатура обозначений остатков и отдельных атом и групп соединения **25**.

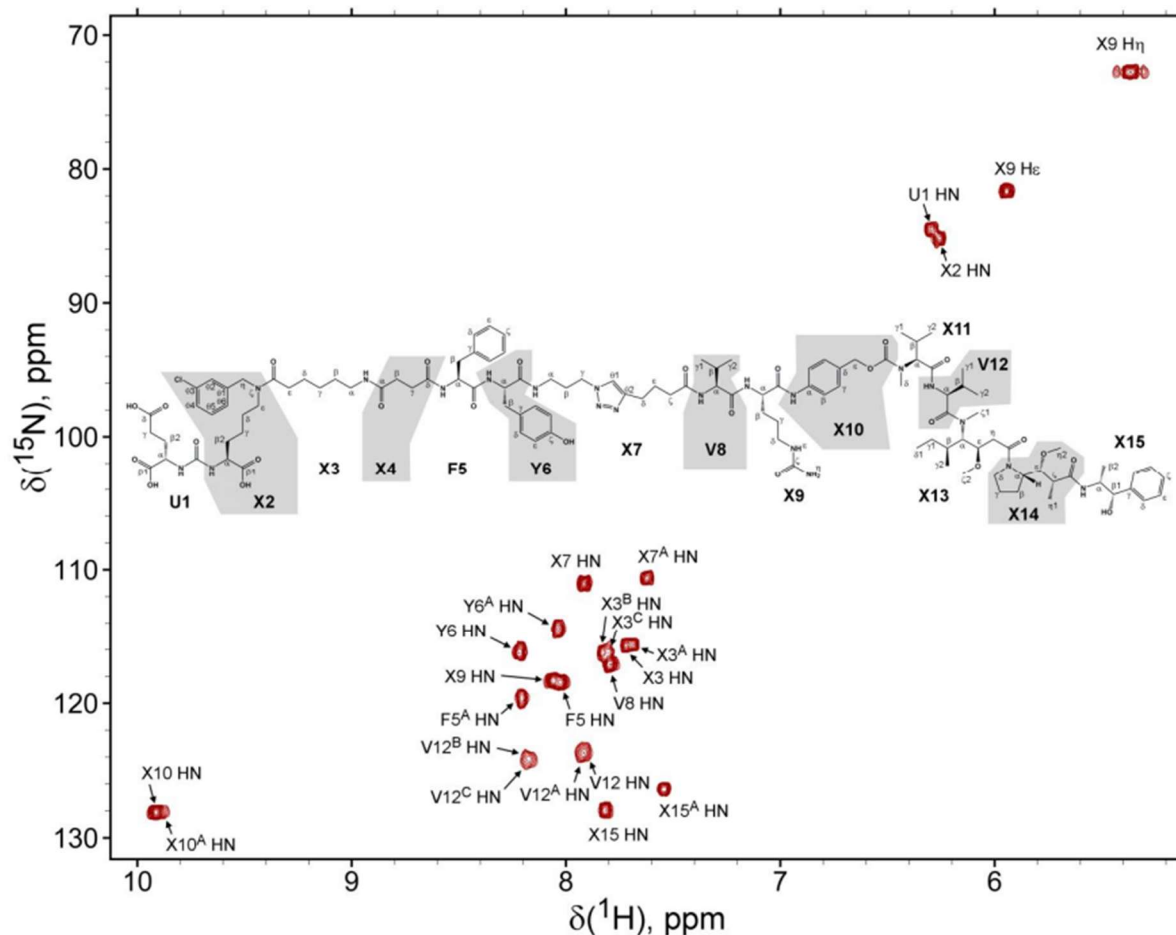


Рисунок 3.27. 2D спектр ^1H - ^{15}N HSQC соединения **25**, измеренный при естественном содержании изотопа ^{15}N , температуре 298K в растворе DMSO- d_6

Исследование соединения **25** показало, что вещество в растворе существует в виде четырех конформеров (*Z,E* изомеров) вследствие заторможенного вращения амидных связей между остатками X3-X4 и X13-X14. Наиболее репрезентативным спектром соединения **25** был 2D спектр ^{15}N - ^1H HSQC (Рисунок 3.27). На нем можно видеть удвоение большинства амидных сигналов и появление четырех сигналов для амидной группы остатка X3. Вероятно, это объясняется пространственной близостью этого остатка к обоим центрам изомерии. Следует отметить, что для большинства остатков наблюдается по меньшей мере два набора ЯМР-сигналов для каждого атома или группы. Для остатков X3 и V12 можно

наблюдать четыре набора резонансов (Таблица 3.6). Остатки X3, X4, V12, X13 и X14 демонстрируют наиболее заметные различия в химических сдвигах дублированных сигналов.

Анализ области спектра ROESY, которая содержит сигналы H η остатка X13 и сигналы H α и H ϵ остатка X14 (Рисунок 3.28), позволяет нам отнести остатки, помеченные X13 и X14, к Z-изомеру, а X13A и X14A – к E-изомеру.

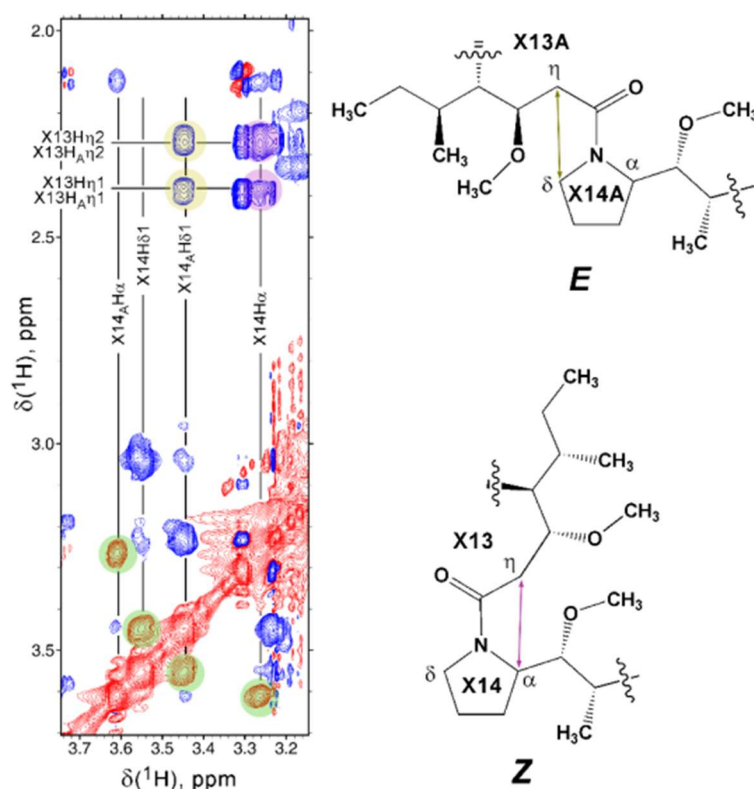


Рисунок 3.28. Фрагмент двумерного спектра ROESY (время смешивания 320 мс) соединения **25**, записанного в DMSO-d₆ на частоте 600 МГц и 298 КБ (слева). Фрагменты остатков X13-X14 для E- и Z-конфигураций, соответствующих пептидной связи между остатками, показаны справа. Желтым цветом выделены кросс-пики NOE, соответствующие E-конфигурации. Фиолетовым цветом выделены кросс-пики NOE, соответствующие Z-конфигурации. Зеленым цветом выделены обменные перекрестные пики между Z- и E-изомерами.

Следует также отметить, что положительные перекрестные пики в спектре ROESY между сигналами X14 H α и X14A H α , а также X14 H δ 1 и X14A H δ 1 указывают на то, что обмен между двумя изомерами происходит в течение времени смешивания (320 мс).

Аналогичный эффект также наблюдается для протонов вокруг пептидной связи между остатками X2 и X3 (Рисунок 3.29). Можно видеть, что остатки X2 и X3 представляют собой E-конфигурацию пептидной связи, тогда как X2A и X3A – Z-конфигурацию. Обмен

между конфигурациями E и Z происходит быстрее для пептидной связи X2-X3, чем для пептидной связи X13-X14. Во время перемешивания в эксперименте ROESY происходит более быстрый обмен намагниченностью между E- и Z-изомерами. В связи с этим на фрагменте X2-X3 можно наблюдать более слабые кросс-пики NOE X3A H ϵ – X2 H η , X3 H ϵ – X2A H η и X3 H ϵ – X2 H η .

Другие данные спектроскопии ЯМР для соединения **25** подробно изложены в работе [20].

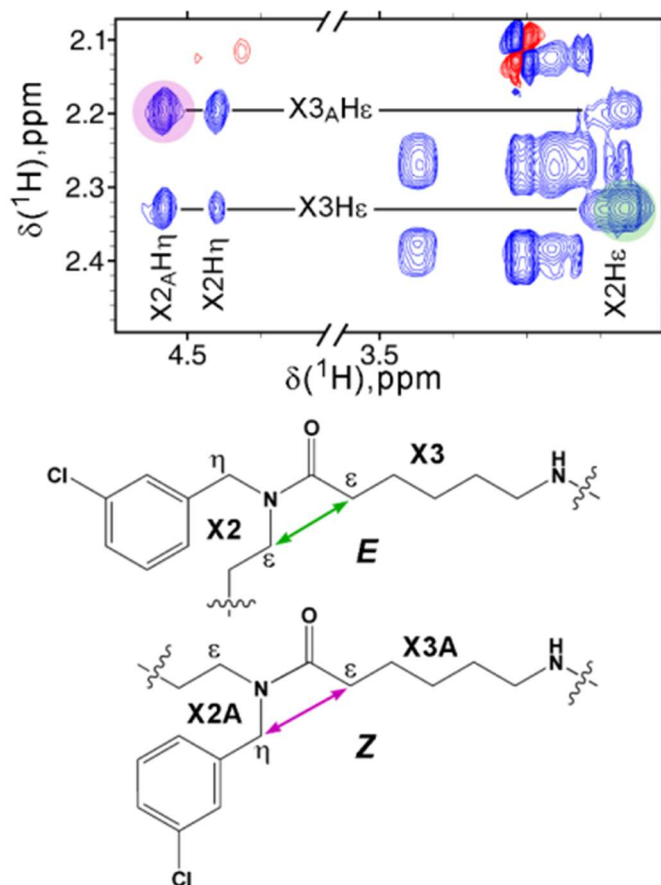


Рисунок 3.29. Фрагмент двумерного спектра ROESY (время смешивания 320 мс) соединения **25**, записанного в DMSO-d₆ на частоте 600 МГц и 298 КБ (сверху). Фрагменты остатков 2-3 для E- и Z-конфигураций с соответствующей пептидной связью между остатками показаны внизу. Зеленым цветом выделены кросс-пики NOE, соответствующие E-конфигурации. Фиолетовым цветом выделены кросс-пики NOE, соответствующие Z - конфигурации.

Таблица 3.6. Химические сдвиги соединения **25**, измеренного в растворе DMSO-d6 при 298К.

Фрагмент	Величины химических сдвигов, м.д																	Other
	¹⁵ N	¹³ CO	¹³ Ca	¹³ Cβ	¹³ Cγ	¹³ Cδ	¹³ Cε	¹³ Cζ	¹³ Cη	¹ HN	¹ Ha	¹ Hβ	¹ Hγ	¹ Hδ	¹ He	¹ Hζ	¹ Hη	
U1	84,4	157,3	51,9	27,8	30,1	173,8	-	-	-	6,30	4,09	1,89 1,70	2,24	-	-	-	-	
X2	85,2		52,3	32,0	22,5	28,0	47,0	-	47,3	6,26	4,06	1,62 1,50	1,23	1,46	3,17	-	4,46	¹³ Cβ1 174,5; ¹³ C01 141,3; ¹³ C02 127,3; ¹³ C03 133,1; ¹³ C04 126,6; ¹³ C05 130,3; ¹³ C06 126,2; ¹ H02 7,22; ¹ H04 7,29; ¹ H05 7,31; ¹ H06 7,14;
X2A	85,2		52,4	32,0	22,7	26,9	45,5	-	49,8	6,26	4,02	1,61 1,49	1,19	1,42	3,20	-	4,53	¹³ Cβ1 174,6; ¹³ C01 140,9; ¹³ C02 126,4; ¹³ C03 133,5; ¹³ C04 127,2; ¹³ C05 130,7; ¹³ C06 125,1; ¹ H02 7,20; ¹ H04 7,30; ¹ H05 7,37; ¹ H06 7,11;
X3	115,7	172,2	38,7	29,1	26,4	24,8	32,0	-	-	7,72	2,98	1,36	1,25	1,50	2,33	-	-	
X3A	115,6	172,2	38,7	29,0	26,3	24,7	32,4	-	-	7,69	2,93	1,38	1,15	1,43	2,20	-	-	
X4	-	-	172,6	30,8	30,8	174,9	-	-	-	-	-	2,20	2,22	-	-	-	-	
X4A	-	-	172,6	30,8	30,8	174,9	-	-	-	-	-	2,20	2,32	-	-	-	-	
F5	118,5	171,1	54,4	37,4	138,0	129,3	138,0	126,8	-	8,03	4,38	2,79 2,60	-	7,08	7,18	7,14	-	
F5A	119,7	171,1	54,9	37,0	138,0	129,3	138,0	126,8	-	8,21	4,33	2,91 2,68	-	7,15	7,19	7,14	-	
Y6	116,3	171,1	54,9	36,9	128,1	130,2	128,1	155,9	-	8,22	4,33	2,86 2,66	-	6,98	6,64	-	-	
Y6A	114,4	171,1	54,7	36,5	128,1	130,1	128,1	155,9	-	8,04	4,30	2,92 2,78	-	7,00	6,61	-	-	
X7	111,1	172,2	35,9	29,8	46,9	24,7	25,5	34,8	-	7,92	3,06 3,01	1,90	4,22	2,58	1,80	2,22	-	¹⁵ N4 245,8; ¹⁵ N5 59,6; ¹³ C01 122,0; ¹³ C02 146,5; ¹ H01 7,79;
X7A	110,6	172,2	35,9	29,8	46,9	24,7	25,5	34,8	-	7,62	3,03 2,97	1,87	4,20	2,57	1,80	2,22	-	¹⁵ N4 245,8; ¹⁵ N5 59,6; ¹³ C01 122,0; ¹³ C02 146,5; ¹ H01 7,78;
V8	117,2	171,3	57,8	30,5	18,3	-	-	-	-	7,80	4,20	1,96	0,83 0,85	-	-	-	-	
X9	118,3	170,6	53,3	29,4	26,8	38,7	-	159,0	-	8,06	4,38	1,69 1,59	1,43	-	5,94	-	5,37	¹⁵ Nε 81,7; ¹⁵ Nη 72,8
X10	128,1	156,3	138,6	119,1	128,3	131,9	66,2	-	-	9,89	-	7,56	7,30	-	5,05 4,98	-	-	
X10A	128,1	155,7	138,6	119,1	128,3	131,9	66,2	-	-	9,89	-	7,56	7,30	-	5,05 4,98	-	-	

X11	116,1	169,8	63,6	26,7	18,9	29,9	-	-	-	-	4,26	2,09	0,82	2,86	-	-	-	
X11A	116,4	170,0	63,5	27,0	18,9	29,9	-	-	-	-	4,23	2,05	0,79	2,83	-	-	-	
V12	123,6	172,5	54,2	30,1	18,4	-	-	-	-	7,91	4,49	1,98	0,81 0,76	-	-	-	-	
V12A	123,7	172,6	54,3	30,1	18,6	-	-	-	-	7,93	4,41	1,94	0,83 0,79	-	-	-	-	
V12B	124,1				18,9	-	-	-	-	8,18	4,50	1,98	0,81 0,76	-	-	-	-	
V12C	124,2				19,3	-	-	-	-	8,17	4,41	1,94	0,82 0,78	-	-	-	-	
X13		168,8	55,3	32,0	25,4	10,4	77,2	31,6	35,4	-	4,72	1,79	1,30 0,92	0,77	3,99	3,10	2,39 2,27	¹³ C γ 2 15,8; ¹³ C ζ 2 57,3; ¹ H γ 2 0,84; ¹ H δ 2 3,99; ¹ H ζ 2 3,18;
X13A		168,9	56,1	32,2	25,4	10,4	77,9	31,6	37,3	-	4,60	1,74	1,30 0,90	0,74	3,97	2,96	2,39 2,27	¹³ C γ 2 15,5; ¹³ C ζ 2 57,2; ¹ H γ 2 0,87; ¹ H δ 2 3,97; ¹ H ζ 2 3,18;
X14		172,4	58,3	25,5	24,5	46,3	85,6	43,4	15,6	-	3,26	1,72 1,47	1,75 1,48	3,55 3,04	3,31	2,12	1,03	¹³ C η 2 57,3; ¹ H η 2 3,17;
X14A		172,4	58,8	24,5	24,5	47,3	81,8	43,9	15,1	-	3,61	1,71 1,54	1,80 1,54	3,44 3,23	3,77	2,12	1,00	¹³ C η 2 60,4; ¹ H η 2 3,22;
X15	128,0	172,5	49,4	75,0	143,7	126,5	127,9	126,8	-	7,82	4,00	4,43	-	7,29	7,24	7,15	-	¹³ C β 2 16,0; ¹ H β 2 1,00;
X15A	126,5	172,4	49,9	74,9	143,7	126,5	127,9	126,8	-	7,54	3,94	4,48	-	7,29	7,24	7,15	-	¹³ C β 2 15,4; ¹ H β 2 0,97;

3.3.3 Синтез бимодального конъюгата с монометил ауристатином Е и испинесибом⁹¹⁰

В качестве первой пары терапевтических агентов для конъюгирования с полученными лигандами **24a-d** были выбраны препараты монометил ауристатин Е и испинесиб (Isp). Испинесиб является ингибитором белка веретена деления кинезина (Eg5, кинезина 5). Он не продемонстрировал достаточной эффективности в индивидуальном виде, однако использование его в комбинации с другими агентами оказывается эффективным.[113,166,167] На данный момент в литературе опубликован ряд исследований по совместному использованию испинесиба, однако данных по его применению совместно с ингибиторами полимеризации тубулина не представлено.[113,168,169] В связи с этим первоначально был проведён *in vitro* эксперимент для оценки цитотоксичности свободных препаратов MMAE и испинесиба (Рисунок 3.30), а также их эквимольной смеси.

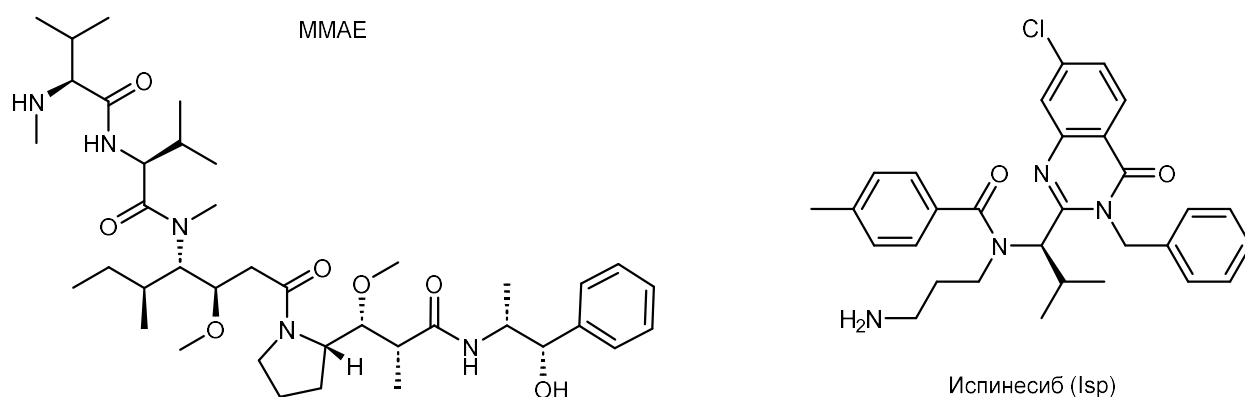


Рисунок 3.30. Структура монометил ауристатина Е и испинесиба

Для данного эксперимента были использованы клеточные линии аденокарциномы молочной железы (MCF7) и аденокарциномы лёгкого (A549) в качестве опухолевых моделей. В качестве отрицательного контроля были выбраны клеточные линии HEK293T (культура нормальных эмбриональных клеток почек человека) и VA13 (культура нормальных клеток лёгкого человека). Полученные значения CC_{50} представлены в Таблице 3.7.

Таблица 3.7. Значения CC_{50} полученные для MMAE, испинесиба и их эквимольной смеси

⁹ При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. JIF 1.7 (Web of Science). Объём 0,348 п.л. Личный вклад автора – 50%.

¹⁰ *In vitro* исследования, представленные в данном разделе работы выполнены совместно с сотрудником кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., доцентом Скворцовым Д.А и студенткой факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Колчановой А.Ю.

Клеточная линия	VA13	MCF7	A549	HEK293T
	CC ₅₀ , нМ	CC ₅₀ , нМ	CC ₅₀ , нМ	CC ₅₀ , нМ
Испинесиб	19±4	34±11	5±1	0,56±0,09
ММАЕ	29±10	8±2	1,6±0,2	0,29±0,04
Комбинация	19±8	7±2	1,5±0,3	0,32±0,04

На всех клеточных линиях исследуемая комбинация испинесиба и ММАЕ демонстрирует значения CC_{50} , сопоставимые с данным показателем для ММАЕ, что позволяет говорить об отсутствии антагонизма между препаратами при их эквимольном соотношении. Для оценки синергизма также был осуществлён расчёт комбинационного индекса с использованием описанного в литературе метода.[116] Полученные значения представлены в Таблице 3.8.

Таблица 3.8. Значение CI_{50} для пары препаратов ММАЕ/Isp.

Клеточная линия	VA13	MCF7	A549	HEK293T
CI_{50}	1,0±0,6	0,6±0,2	0,7±0,2	1,0±0,2
$CI_{50}(\max)$	2.29	1.04	1.00	1.38
$CI_{50}(\min)$	0.39	0.32	0.44	0.73

Данные Таблицы 8 демонстрируют наличие синергизма между испинесибом и монометил ауристатином Е на клеточных линиях MCF7 и A549 ($CI < 1$), однако на линиях VA13 и HEK293T можно говорить только об аддитивном эффекте ($CI \sim 1$). Значение полученных погрешностей значительно, что не позволяет более точно оценить синергетический эффект данной комбинации. При этом, при расчёте CI исходя из граничных значений CC_{50} , полученные данные также не позволяют однозначно говорить о наличии синергизма.

Для возможности конъюгирования с векторным фрагментом терапевтические агенты были предварительно модифицированы. Испинесиб был введён в реакцию ацилирования с янтарным ангидридом с получением производного **30**, которое в дальнейшем вводилось в реакцию с N-гидроксисукцинимидом (NHS) с получением активированного эфира **31** (Рисунок 3.31).

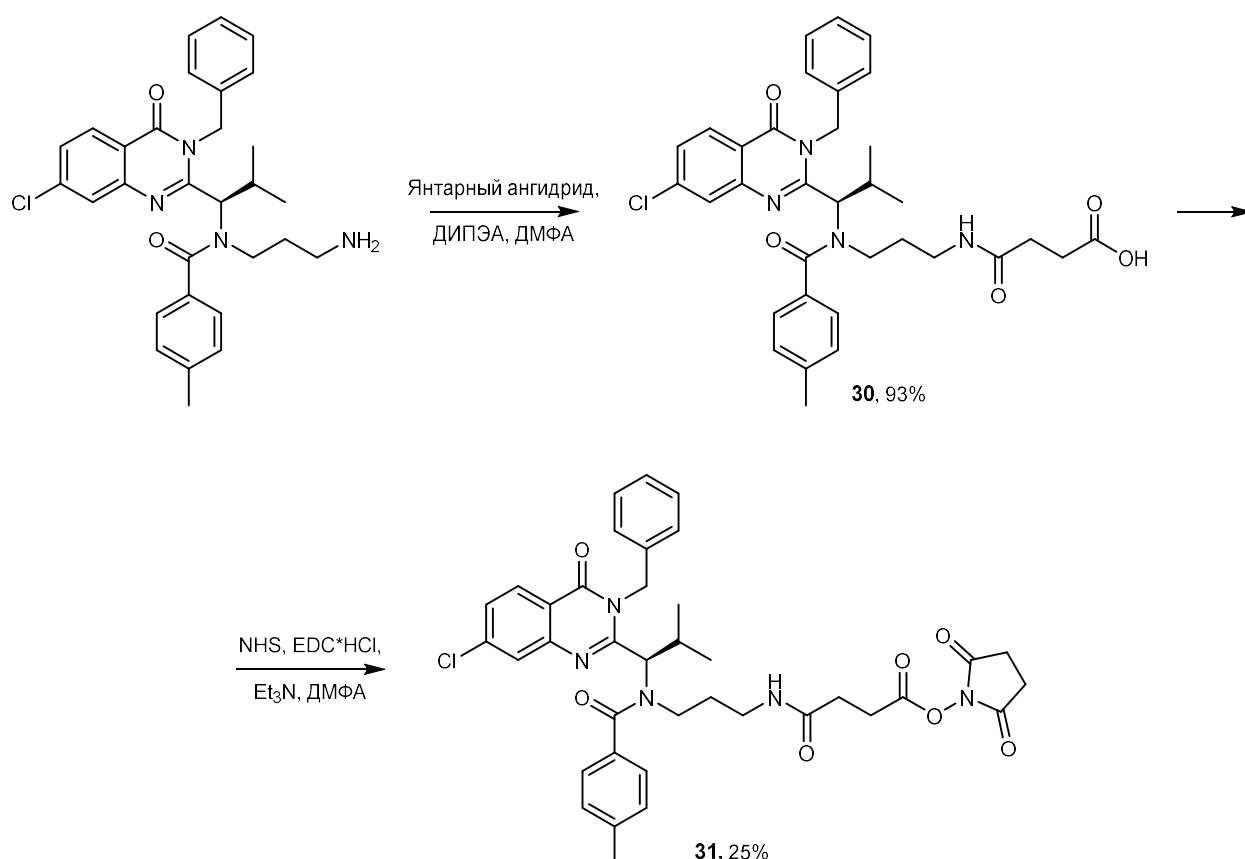


Рисунок 3.31. Схема получения модифицированной формы препарата испинесиба.

На первом этапе получения целевого бимодального конъюгата **33** проводилась реакция [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения между лигандом **24a** и соединением **29** (Рисунок 3.32). В качестве катализатора выступали ионы меди (I), генерируемые *in situ* путём восстановления сульфата меди (II) под действием аскорбата натрия. Полученный таким образом моноконъюгат **32a** был введён в реакцию ацилирования модифицированным испинесибом **31** с получением целевого бимодального конъюгата **33**. Структура полученного соединения была подтверждена спектроскопией ЯМР ¹H и масс-спектрометрией высокого разрешения, а чистота – методом ВЭЖХ-МС. В спектре ПМР наблюдали характеристичный сигнал при 5,49 м.д., соответствующий протону СН-группы испинесиба. При 2,28 м.д. находится синглет протонов метильной группы остатка *пара*-метилбензойной кислоты испинесиба. В области ароматических протонов наблюдали синглет при 7,84 м.д. – протон триалзольного цикла; дублет при 6,65 м.д. – протоны тирозина в *орто*-положении к гидроксильной группе. Суммарный выход соединения **33** после двух стадий конъюгирования составил 36%.

В дальнейшем проводились *in vitro* исследования цитотоксичности полученного бимодального конъюгата **33**, индивидуальных препаратов MMAE и испинесиба, а также моноконъюгата **25** (Рисунок 3.23). Тестирование проводили на клеточных линиях РПЖ с различным уровнем экспрессии ПСМА (PC-3 – неэкспрессирующая, LNCaP и 22Rv1 –

экспрессирующие), а также на клеточной линии фибробластов легкого VA13 в качестве отрицательного контроля. Значения CC_{50} представлены в Таблице 3.9.

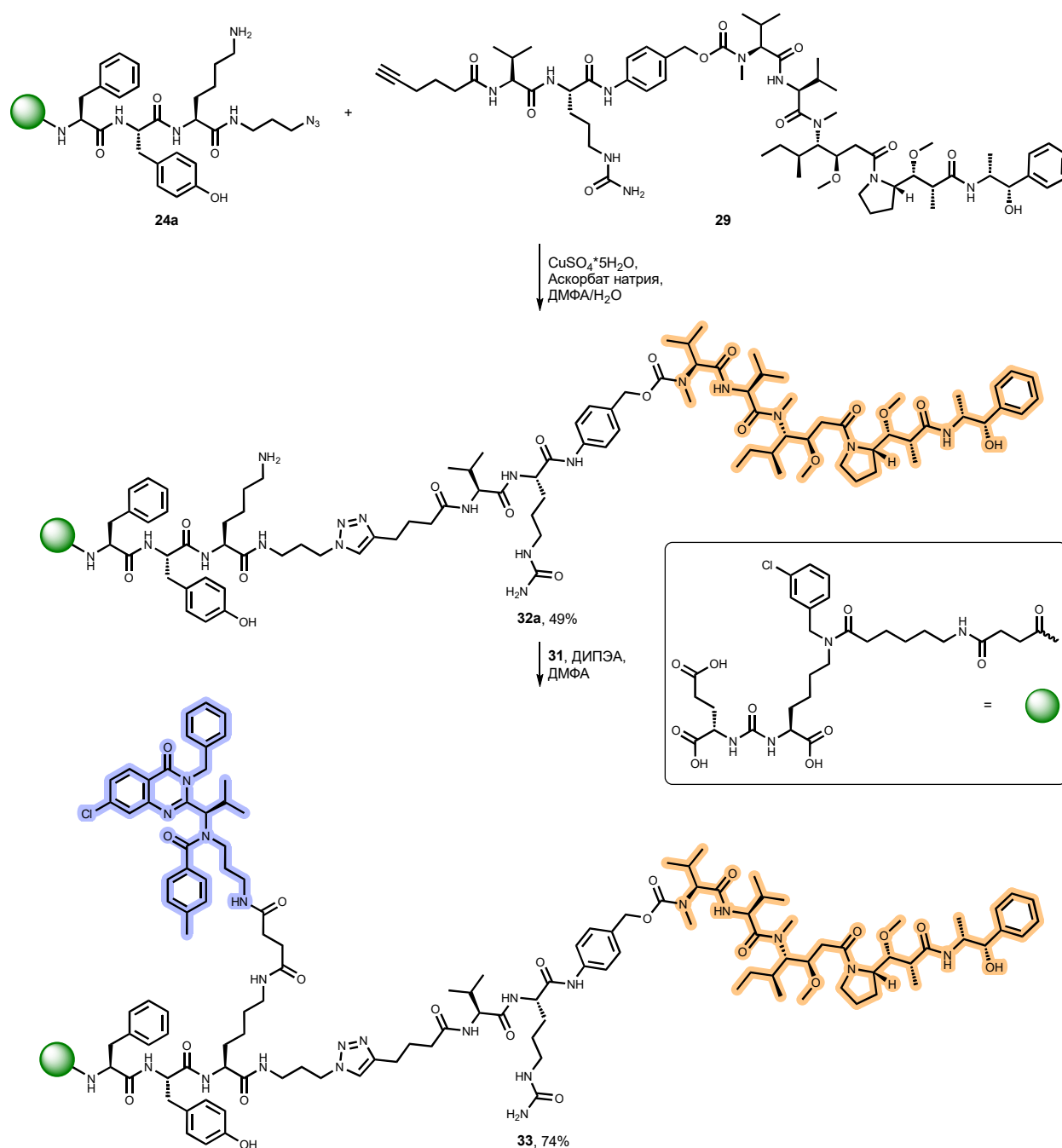


Рисунок 3.32. Схема синтеза бимодального конъюгата с испинесибом и MMAE. Цветом выделены следующие фрагменты: фиолетовым – испинесиб; оранжевым – MMAE.

Как видно из представленных в Таблице 3.9 данных, полученное соединение **33** продемонстрировало умеренную селективность в отношении ПСМА-экспрессирующих опухолевых моделей (SI (**33**)VA13/LNCaP = 16,4; SIVA13/22Rv1 = 17,4), что, однако, может быть объяснено селективным механизмом действия самих препаратов, на основе которых создан конъюгат (SI (испинесиб) VA13/LNCaP = 33,3). Конъюгат **33** значительно уступает в токсичности как свободным препаратам, так и мономодальному конъюгату лиганда ПСМА

с ММАЕ **25**. Стоит упомянуть, что соединения аналогичного строения, уступая в показателе CC_{50} свободным препаратам в экспериментах *in vitro*, часто демонстрируют высокую эффективность в экспериментах *in vivo*. Так, мономодальный конъюгат **25** продемонстрировал на порядок более низкую цитотоксичность *in vitro* ($CC_{50}(\mathbf{25}, 22Rv1)=29\pm2$ нМ против CC_{50} (доцетаксел, $22Rv1)=3,3\pm0,5$ нМ). При этом в эксперименте *in vivo* на ксенографтной модели конъюгат **25** (дозировка 0,3 мг/кг) продемонстрировал коэффициент торможения роста опухоли (ТРО) 85-70% на протяжении всего эксперимента, что сопоставимо с данным показателем у доцетаксела (дозировка 10 мг/кг; коэффициент ТРО – 87-84%). Учитывая это, конъюгат **33** в дальнейшем может продемонстрировать большую эффективность в эксперименте *in vivo*.

Таблица 3.9. Значения CC_{50} полученные для ММАЕ, испинесиба, конъюгатов **33** и **25**

Соединение	CC_{50} , нМ			
	PC-3	LNCaP	22Rv1	VA13
Испинесиб	$2,3\pm0,2$	$0,2\pm0,1$	$0,6\pm0,2$	5 ± 3
ММАЕ	$1,2\pm0,4$	$2,1\pm0,8$	$1,8\pm0,4$	3 ± 2
25	54 ± 14	55 ± 40	80 ± 31	~ 240
33	4814 ± 4432	2029 ± 1672	1915 ± 1772	~ 33333

Таким образом, в данном разделе работы была впервые синтезирована система совместной доставки монометил ауристатина Е и испинесиба на основе лиганда простатического специфического мембранного антигена. Полученный бимодальный конъюгат **33** был протестирован на цитотоксичность *in vitro* на клеточных линиях РПЖ. Была исследована цитотоксическая активность комбинации препаратов ММАЕ/испинесиб в эксперименте *in vitro*. Полученные данные показали, что при эквимольном соотношении вводимых препаратов не наблюдается их антагонизма.

3.3.4 Синтез серии бимодальных конъюгатов с ингибиторами тубулина и абиратероном/энзалутамидом.¹¹¹²

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

На первом этапе были получены бимодальные конъюгаты, содержащие стабилизирующий ингибитор тубулина доцетаксел и ингибитор CYP17A1 абиратерон. Данный выбор обоснован наличием данных о синергетическом эффекте для этой комбинации при их совместной доставке.[125] В связи с тем, что лиганды **24a-d** незначительно различаются в аффинности, были синтезированы бимодальные конъюгаты на основе каждого из них.

Для селективного присоединения терапевтических агентов к лигандам в начале была проведена реакция ϵ -аминогруппы лизина с модифицированным производным абиратерона (в форме NHS-эфира) **36**, а в дальнейшем осуществлялась реакция азид-алкинового циклоприсоединения доцетаксела, модифицированного алкин-содержащей группой. В связи с этим, на первом этапе синтеза проводилась модификация абиратерона. В начале провели его щелочной гидролиз раствором гидроксида калия в метаноле, получив соединение **34** с количественным выходом (Рисунок 3.33).

Следующим шагом стало создание сложноэфирной связи реакцией полученного соединения **34** с янтарной кислотой. Введение этого фрагмента определяется необходимостью создания относительно лабильной сложноэфирной связи с терапевтическим препаратом для максимального высвобождения агента в клетке. В то же время, вторая карбоксильная группа может быть легко переведена в активированный эфир для дальнейшего ацилирования ϵ -аминогруппы лизина. Для получения соединения **35** абиратерон ввели в реакцию с янтарным ангидридом в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP) в качестве катализатора и триэтиламина в качестве

¹¹ При подготовке данного раздела диссертации использована следующая публикация, выполненная автором в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. JIF 4.9 (Web of Science). Объем 2,314 п.л. Личный вклад автора – 40%.

¹² *In vitro* исследования, представленные в данном разделе работы выполнены совместно с сотрудником кафедры химии природных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова к.х.н., доцентом Скворцовым Д.А. и сотрудницей Лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ МИСИС, к.б.н., Гариной А.С. *In vivo* исследования, представленные в данном разделе работы выполнены совместно с сотрудниками отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, к.б.н., зав. отделением Панкратовым А.А. и к.б.н., с.н.с. Плотниковой Е.А.

основания. Для оценки полноты протекания процесса использовалась тонкослойная хроматография с элюентом дихлорметан/метанол (15/1). При этом реакция протекала очень медленно (~75 часов) и для её ускорения потребовалось кипячение реакционной смеси. Низкая скорость данного процесса может быть обусловлена низкой нуклеофильностью гидроксильной группы абиратерона.

Финальным этапом модификации абиратерона стал перевод кислоты в форму активированного NHS-эфира. Для этого соединение **35** ввели в реакцию с N-гидроксисукцинимидом в присутствии гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида в качестве активирующего агента и триэтиламина в качестве основания. Продукт **36** выделили в индивидуальном виде путём экстракции с высоким выходом (96%).

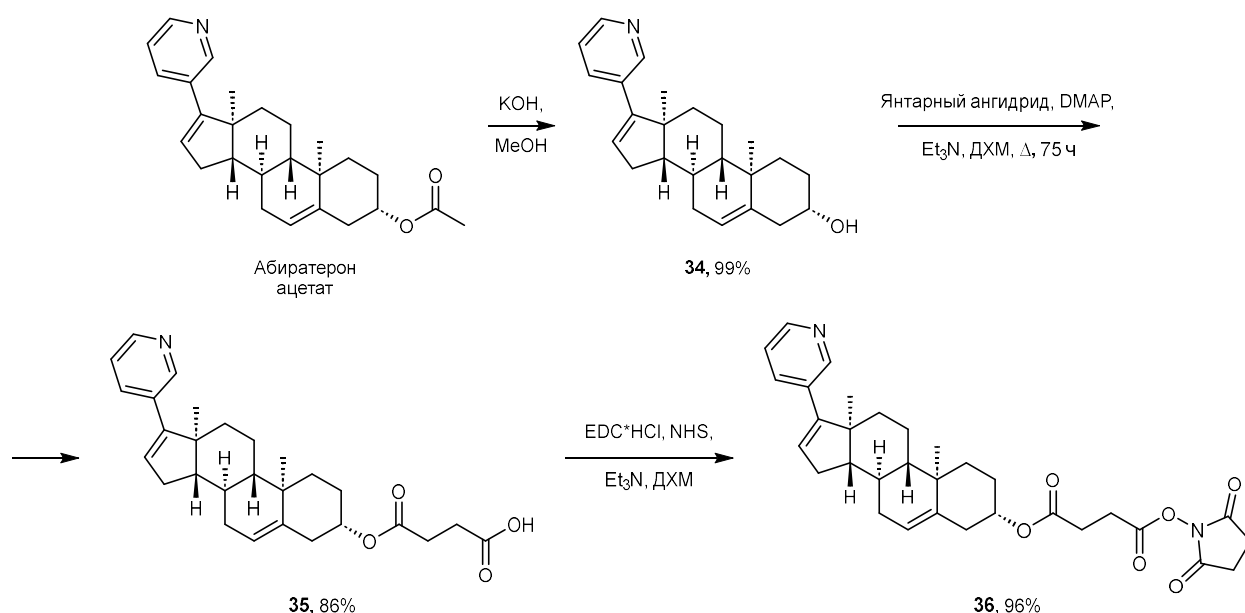


Рисунок 3.33. Схема синтеза модифицированной формы абиратерона.

В качестве модифицированной формы доцетаксела, содержащей алкиновую компоненту, использовали соединение **37** (Рисунок 3.34), синтез которого представлен в литературе.[138]

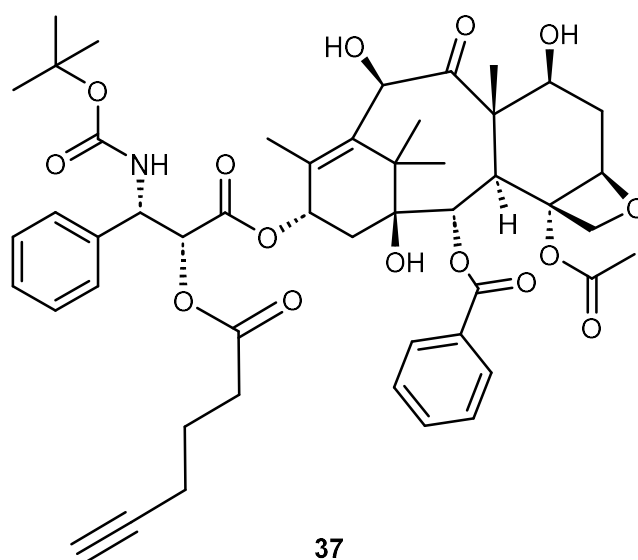


Рисунок 3.34. Структура модифицированного соединения доцетаксел.

Для получения целевых бимодальных конъюгатов **39a-d** с парой препаратов доцетаксел/абиратерон лиганды **24a-d** реагировали с модифицированным препаратом **36** в присутствии ненуклеофильного основания (Рисунок 3.35). Таким образом были синтезированы соединения **38a-d**, которые далее вводились в реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого медью, с модифицированным доцетакселом **37**. Полученные бимодальные конъюгаты **39a-d** были выделены в индивидуальном виде. Их структура была подтверждена методами спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. В спектре ПМР характеристичными являлись сигналы протонов следующих функциональных групп и фрагментов: синглет при 8,76 м.д. и два дублета при 8,62 с КССВ = 5,32 Гц и 8,33 м.д. с КССВ = 8,3 Гц относящиеся к пиридиновому циклу абиратерона; синглет при 7,78 м.д. соответствующий протону образовавшегося триазольного цикла; дублет при 6,65 м.д. характерный для протонов тирозина, а также синглет при 1,29 м.д., относящийся к протонам *трет*-бутильной группы доцетаксела. Чистота полученных конъюгатов **39a-d** была подтверждена методом ВЭЖХ-МС.

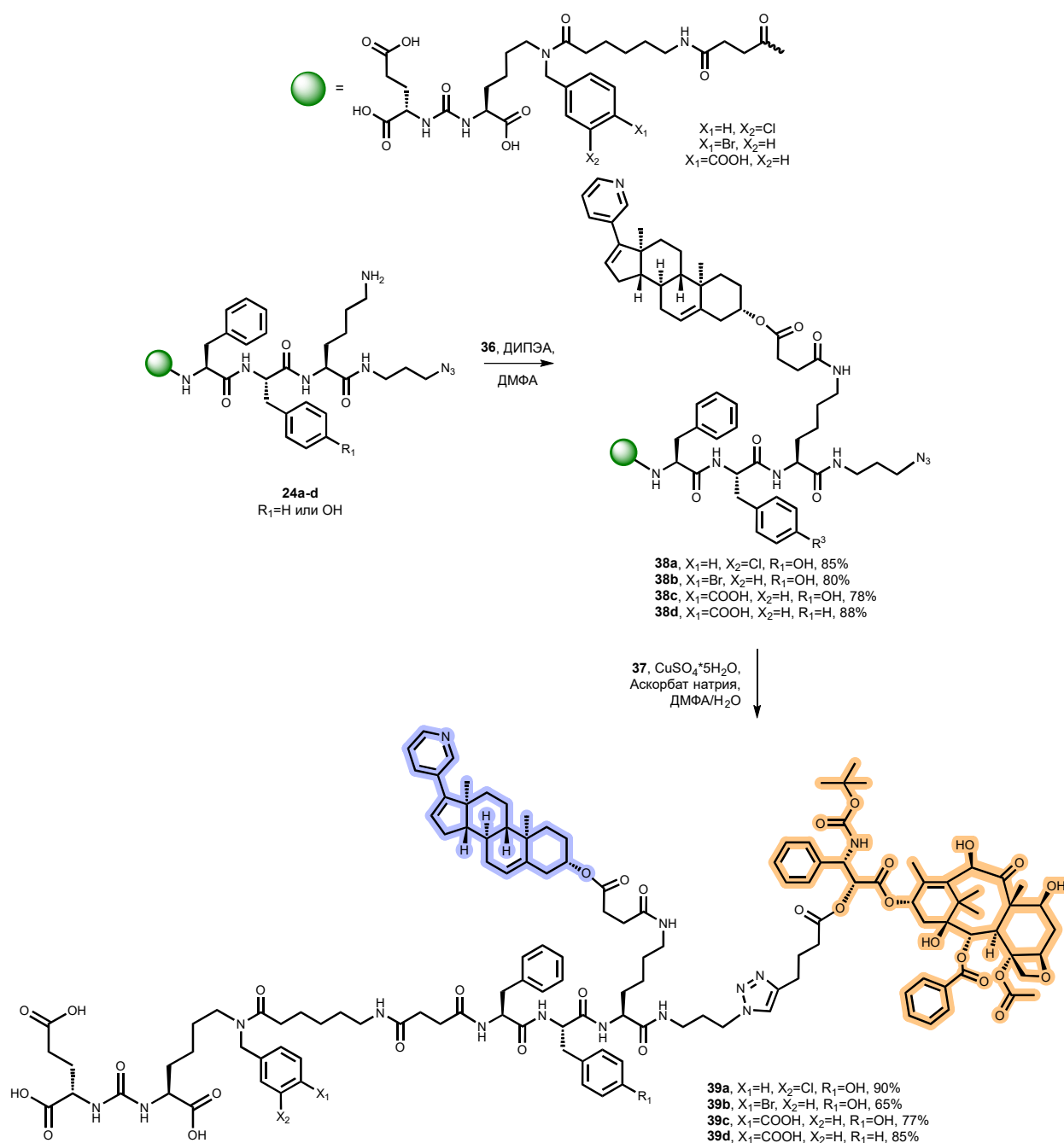


Рисунок 3.35. Схема получения бимодальных конъюгатов с парой доцетаксел/абиратерон.

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

Полученные бимодальные конъюгаты **39a-d** были протестированы *in vitro* на трёх клеточных культурах РПЖ: ПСМА-экспрессирующих клеточных линиях 22Rv1 и LNCaP, а также ПСМА-неэкспрессирующая клеточная линия PC-3. Подобный выбор клеточных культур обоснован тем, что клеточные линии 22Rv1 и LNCaP обладают различным уровнем экспрессии ПСМА, за счёт чего возможно оценить влияние уровня экспрессии на токсичность целевых препаратов. ПСМА-отрицательная клеточная линия PC-3 позволяет качественно оценить неспецифичную токсичность полученных соединений.

В качестве соединения сравнения в эксперименте с конъюгатами **39a-d** был использован препарат доцетаксел (Рисунок 3.36).

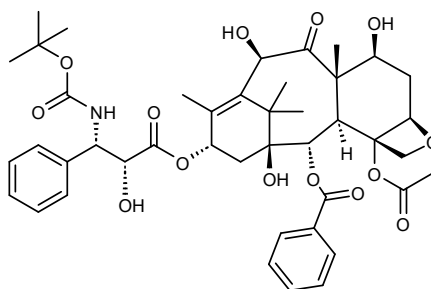


Рисунок 3.36. Структура препарата доцетаксел (Doc).

Полученные данные *in vitro* исследований цитотоксичности приведены в графическом виде на Рисунке 3.37.

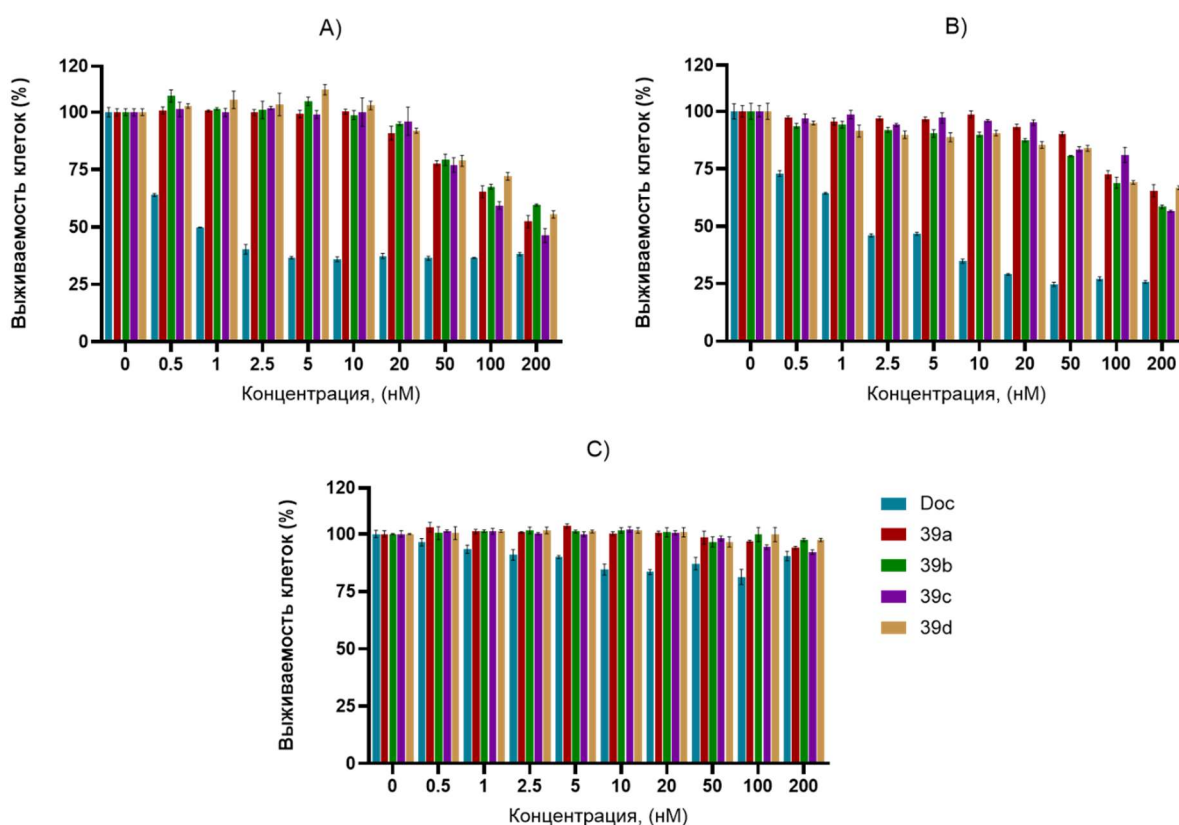


Рисунок 3.37. Графическое представление результатов *in vitro* эксперимента на клеточных линиях рака предстательной железы: А) LNCaP; В) 22Rv1; С) PC-3.

Как видно из представленных данных, на всех трёх клеточных линиях полученные соединения уступают в токсичности доцетакселу. При этом в случае ПСМА-неэкспрессирующей линии PC-3 (Рисунок 3.37; С)) это может быть связано с низкой неспецифичной токсичностью синтезированных конъюгатов. Исходя из данных цитотоксичности на ПСМА-экспрессирующих клеточных линиях LNCaP и 22Rv1 (Рисунок 3.37; А) и В)) можно утверждать, что все полученные соединения обладают близкими профилями цитотоксичности, и несмотря на несколько более высокую токсичность

соединения **39c** выделить какое-либо соединение-лидер не представляется возможным. Также стоит отметить, что на клеточной линии LNCaP, обладающей более высоким уровнем экспрессии ПСМА, наблюдается более высокая токсичность синтезированных соединений в сравнении с данным показателем на клеточной линии 22Rv1, у которой уровень экспрессии ПСМА ниже. Этот факт, в сочетании с низкими показателями токсичности на ПСМА-неэкспрессирующей клеточной линии PC-3, позволяет предположить, что цитотоксичность полученных конъюгатов **39a-d** находится в зависимости от уровня экспрессии ПСМА в клетках РПЖ.

Исходя из довольно низкой токсичности полученной серии соединений, в структуру последующих конъюгатов вместо доцетаксела вводили другой терапевтический агент – метил ауристатин Е, который является дестабилизирующим ингибитором тубулина.

Для создания бимодальных конъюгатов лигандов ПСМА с метил ауристатином Е и абиратероном **40a-d** первоначально была выбрана синтетическая схема, аналогичная схеме получения конъюгатов **39a-d** (Рисунок 3.35). Реализуемость подобного подхода была протестирована на примере моноконъюгата **38a**. Была проведена его клик-реакция с соединением **29** в условиях, аналогичных условиям получения бимодальных конъюгатов **39a-d** согласно Рисунку 3.38.

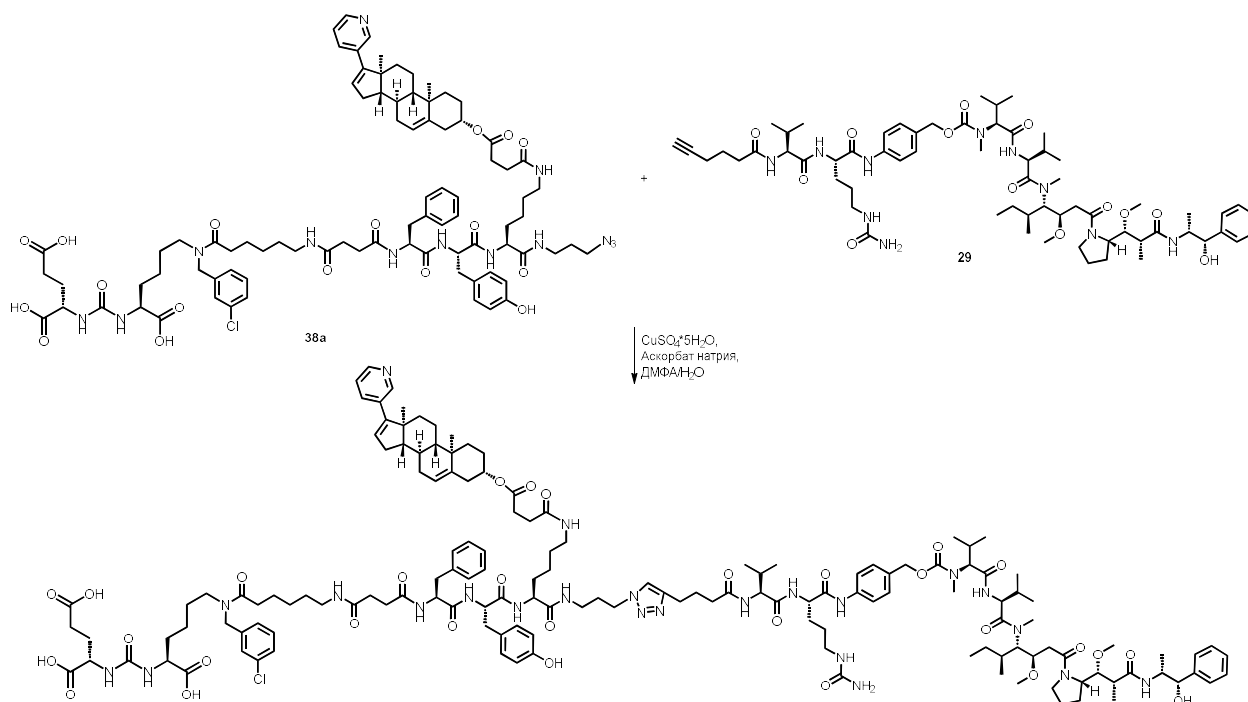
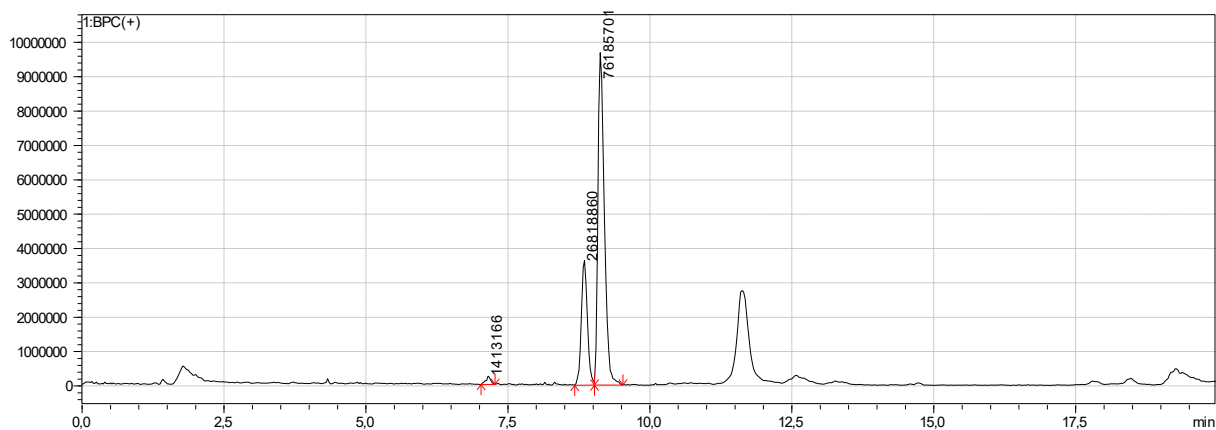


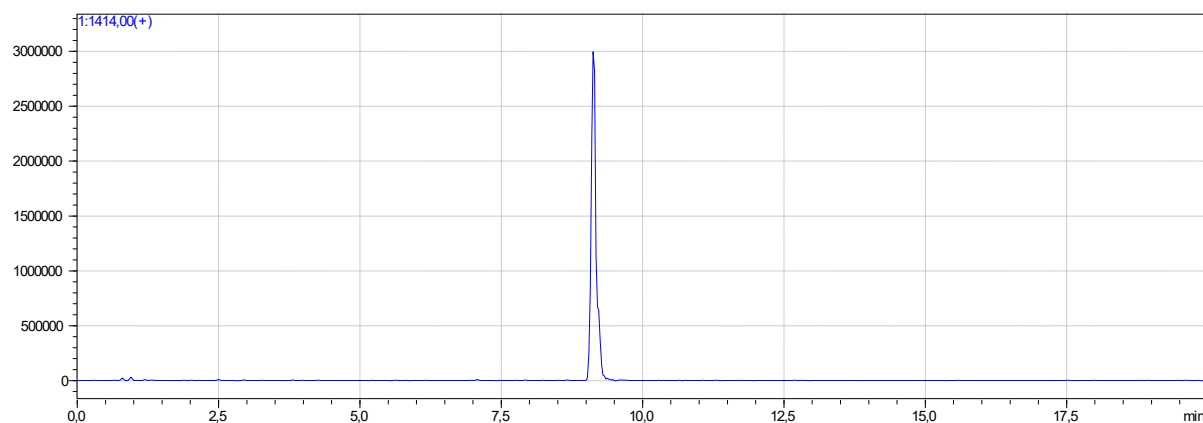
Рисунок 3.38. Схема синтеза бимодального конъюгата с абиратероном и ММАЕ исходя из моноконъюгата **38a**.

Однако при выделении целевого продукта при синтезе по схеме, представленной на Рисунке 3.38 не удалось подобрать элюирующую смесь, а также градиент, применение которых позволило бы избавиться от образующегося побочного продукта. Анализ

полученной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием показал содержание целевого продукта 73%, а примеси – 26% (Рисунок 3.39). Исходя из разницы m/z целевого продукта и примеси, равной 175, можно предположить, что побочный продукт представляет собой стабильный комплекс меди, содержащий фрагмент трифторуксусной кислоты, с полученным бимодальным конъюгатом.



(a)



(б)

Рисунок 3.39. Результаты ВЭЖХ-МС исследования реакции получения конъюгата: (а) полный ионный ток, в положительных ионах, содержание целевого соединения 73%, содержание побочного продукта – 26%; (б) «извлечение» иона целевого соединения $[M+2H]^{2+}$ из общего ионного тока.

В связи с невозможностью выделения целевого продукта из реакционной смеси в индивидуальном виде, было принято решение изменить синтетическую схему и вначале провести реакцию лигандов **24a-d** с соединением **29**, а в дальнейшем ввести полученный моноконъюгат в реакцию с модифицированным абиратероном **36** (Рисунок 3.40).

Для этого был проведён синтез соединений **32a-d** (Рисунок 3.40). Реакция осуществлялась в условиях, аналогичных условиям получения бимодальных конъюгатов,

содержащих доцетаксел. Таким образом удалось синтезировать моноконъюгаты ММАЕ **32a-d** с умеренными выходами. Структура полученных конъюгатов была подтверждена методами спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C и масс-спектрометрии высокого разрешения. Чистота всех полученных соединений была подтверждена методом ВЭЖХ-МС. Спектры ЯМР ^1H соединений **32a-d** достаточно сложны, однако в области 7,83 м.д. имеется характеристичный синглет, соответствующий протону образовавшегося триазольного цикла (Рисунок 3.41). При $\sim 6,00$ м.д. в спектре ЯМР ^1H соединений **32a-d** наблюдается сигнал протона, относящегося к NH-группе мочевиного фрагмента остатка цитруллина. В области сильного поля (0,80-0,88 м.д.) находится набор мультиплетов, соответствующих протонам метильных групп трёх остатков валина.

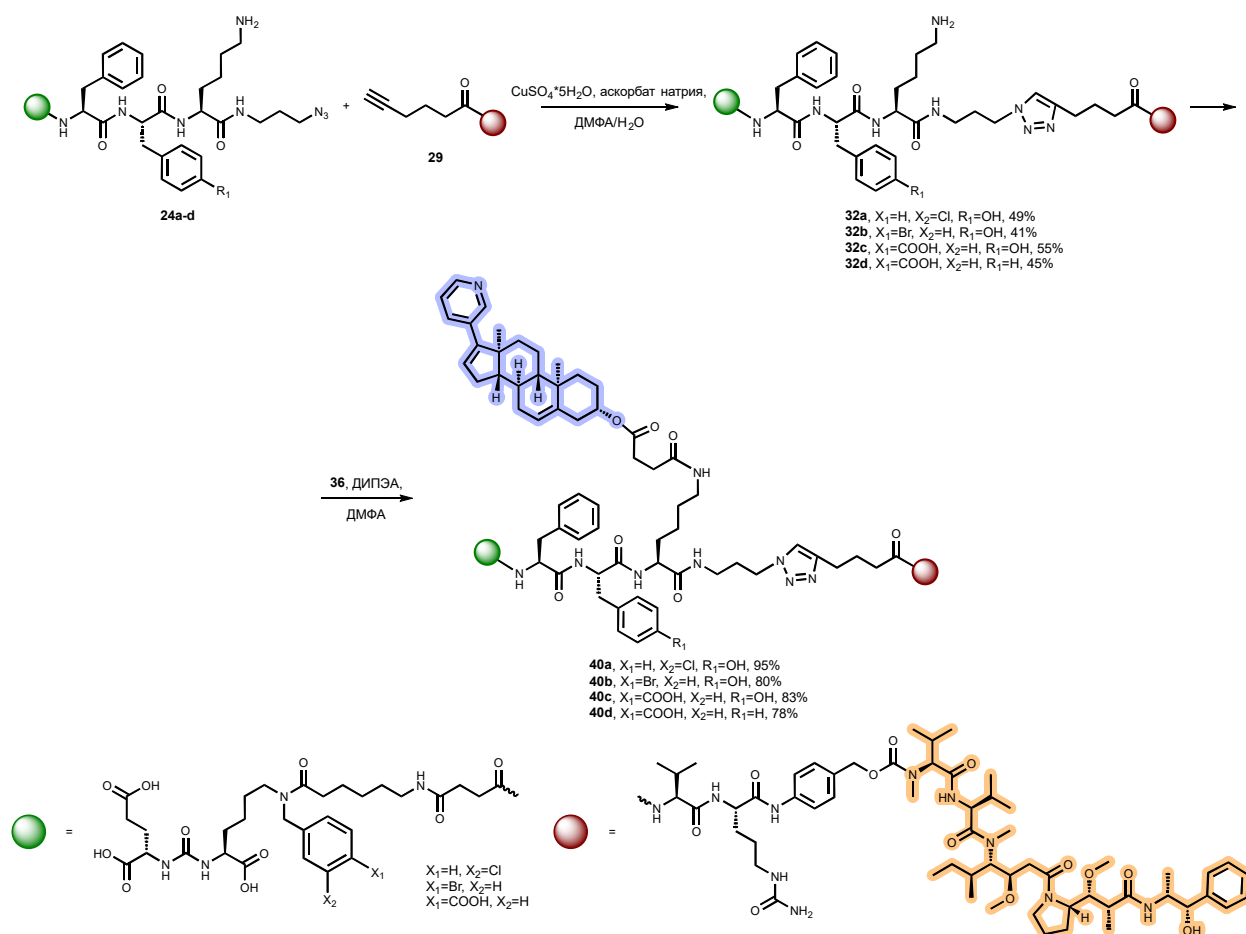


Рисунок 3.40. Синтез бимодальных конъюгатов **40a-d** содержащих комбинацию препаратов ММАЕ/абиратерон. Цветом выделены: оранжевым – фрагмент ММАЕ, фиолетовым – фрагмент абиратерона

Далее полученные моноконъюгаты **32a-d** были введены в реакцию с NHS-эфиром абиратерона **36**. Выделение целевых конъюгатов **40a-d** осуществляли высаживанием продукта ацетонитрилом с последующим многократным промыванием осадка. Таким образом были получены бимодальные конъюгаты **40a-d** с высокими выходами (78-95%). Структура и чистота всех продуктов подтверждена методами ЯМР спектроскопии ^1H и ^{13}C

и масс-спектрометрии высокого разрешения. Данные ВЭЖХ-МС анализа показали чистоту полученных бимодальных конъюгатов **40a-d** >96%.

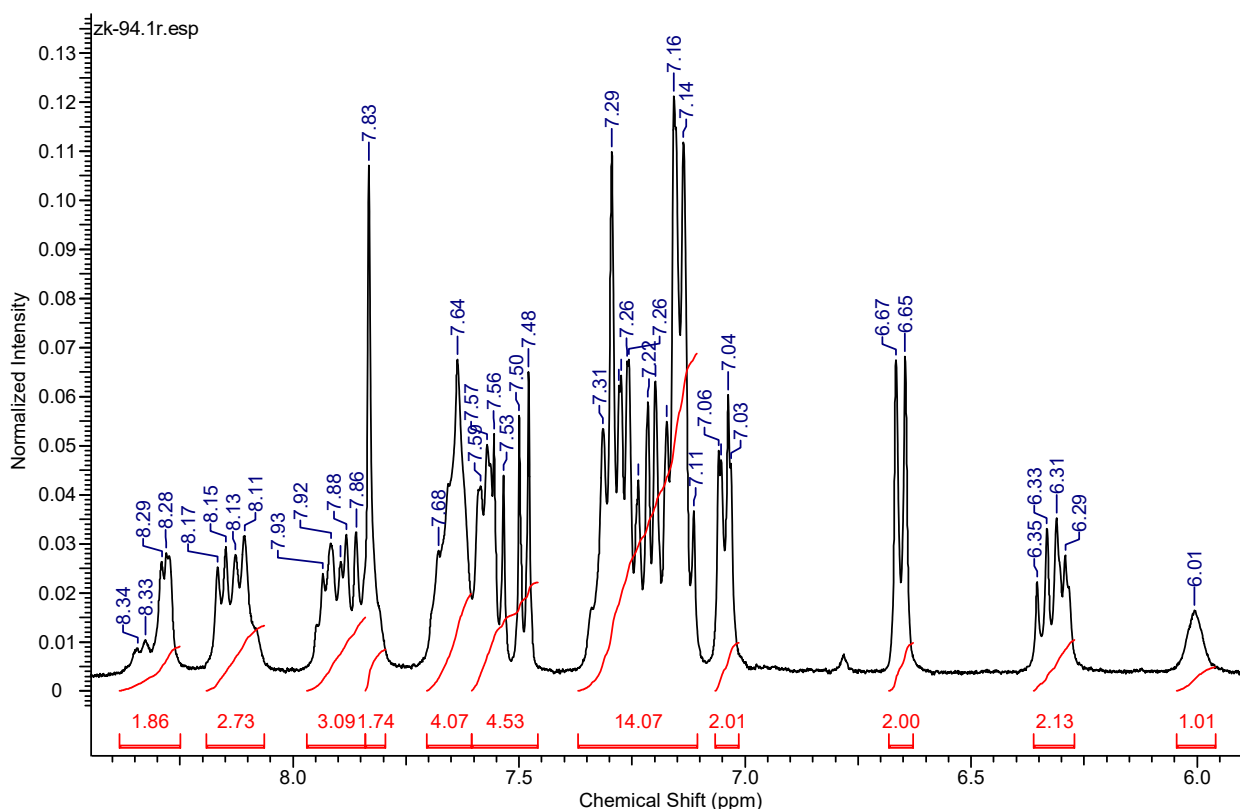


Рисунок 3.41. Фрагмент спектра ЯМР ^1H соединения **32b**.

По аналогии со схемой, представленной на Рисунке 3.40, далее был синтезирован конъюгат с парой препаратов ММАЕ/энзалутамид. Энзалутамид является антагонистом андрогенового рецептора, и согласно литературным данным, блокирование данного рецептора может приводить к увеличению уровня экспрессии ПСМА, что может дополнительно повышать специфичность создаваемых направленных препаратов.[170]

Синтез был осуществлён на примере *мета*-хлор-содержащего моноконъюгата **32a**. Для возможности конъюгирования препарата путём ацилирования аминогруппы лизина была осуществлена предварительная модификация энзалутамида согласно Рисунку 3.42.

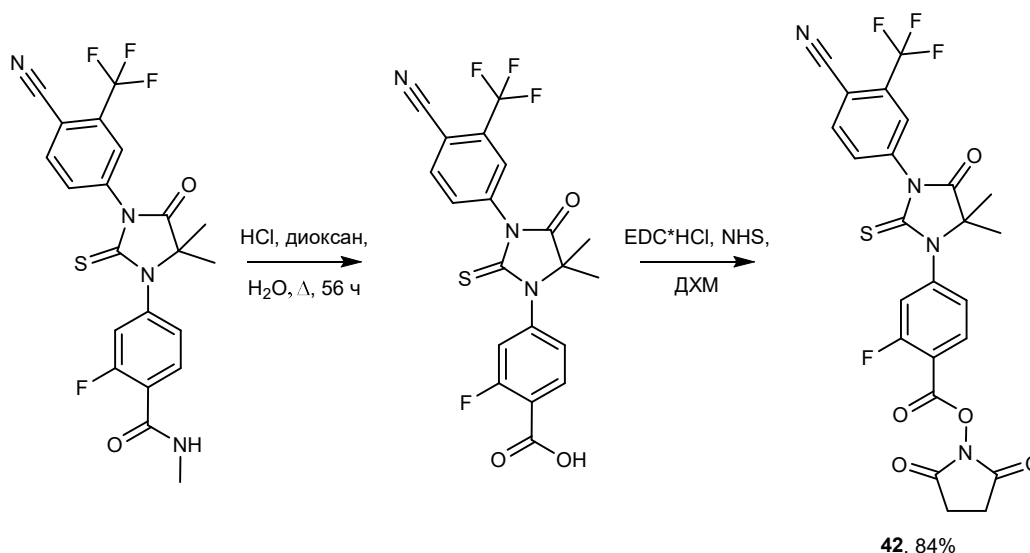


Рисунок 3.42. Схема синтеза модифицированной формы энзалутамида (Enz).

На первом стадии модификации проводился кислотный гидролиз амидной связи путём кипячения энзалутамида с соляной кислотой в смеси диоксана с водой с получением кислоты **41**. Для получения соответствующего NHS-эфира была проведена реакция соединения **41** с N-гидроксисукцинимидом в присутствии гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида. Протекание реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии (элюент – смесь хлористого метилена и метанола в соотношении 15:1). Целевой продукт выделяли при помощи экстракции и подтверждали структуру полученного соединения **42** методом спектроскопии ЯМР ^1H . В спектре ПМР наблюдался мультиплет с химическим сдвигом 2,90 м.д. и интегральной интенсивностью 4, соответствующий CH_2 -группам фрагмента сукцинимида.

Последующий синтез бимодального конъюгата был осуществлён согласно Рисунку 3.43. Реакция была проведена аналогично получению соединений **40a-d**, однако конъюгат **43** не удалось выделить в индивидуальном виде высаживанием ацетонитрилом. В связи с этим продукт был очищен от примесей методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии. В связи с изменением метода очистки целевое соединение **43** было получено с невысоким выходом (20%).

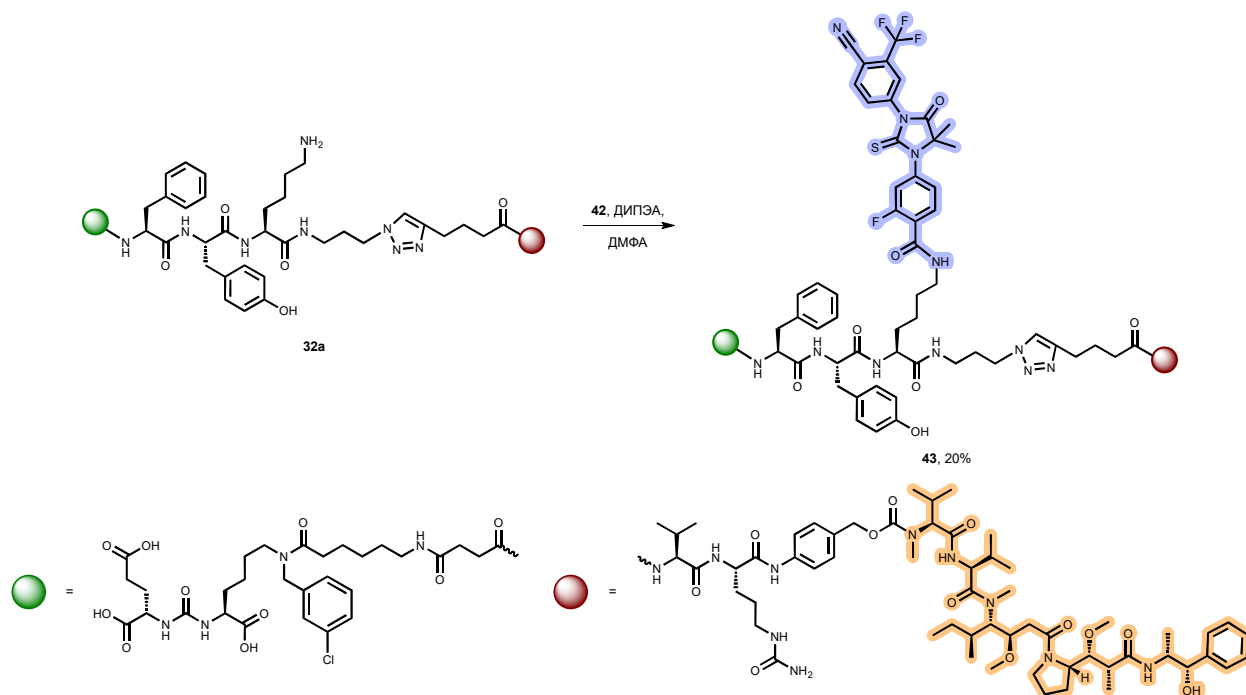


Рисунок 3.43. Схема синтеза бимодального конъюгата **43** с парой ММАЕ/энзалутамид. Цветом выделены: оранжевым – фрагмент ММАЕ, фиолетовым – фрагмент энзалутамида.

В рамках *in vitro* исследований соединений, содержащих ММАЕ, была оценена цитотоксичность как бимодальных конъюгатов **40a-d** и **43**, так и их мономодальных предшественников **32a-d**. В качестве соединений сравнения были выбраны моноконъюгат с ММАЕ (Рисунок 3.23, соединение **25**) и описанный ранее в литературе моноконъюгат лиганда ПСМА с абиратероном (Рисунок 3.44, соединение **44**), их эквимоллярная смесь (**Combo**) и свободный препарат ММАЕ.[139]

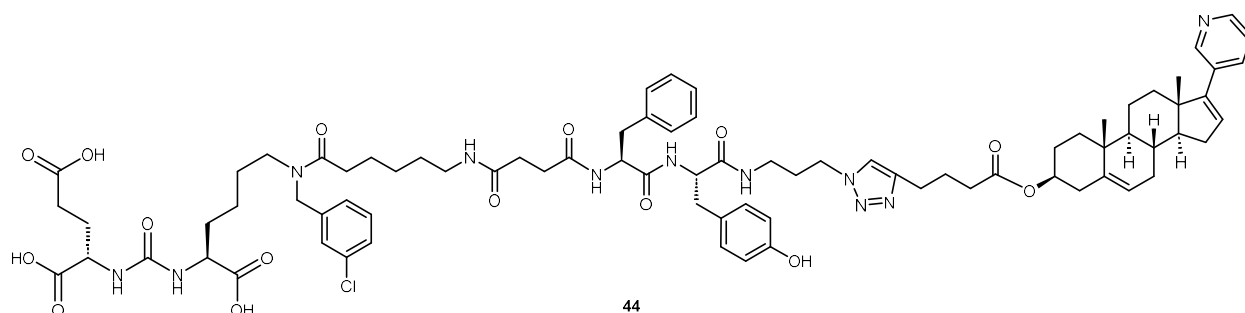


Рисунок 3.44. Структура мономодального конъюгата с абиратероном **44**.

Полученные в результате эксперимента по исследованию цитотоксичности на клеточных линиях РПЖ (LNCaP, 22Rv1 и PC-3) значения CC_{50} представлены в Таблице 3.10.

Таблица 3.10. Значения CC_{50} полученные в результате *in vitro* исследований цитотоксичности синтезированных соединений **32a-d**, **40a-d**, **43** и соединений сравнения **25**, **44** и MMAE на клеточных линиях LNCaP, 22Rv1 и PC-3.

Соединение	CC_{50} , нМ		
	LNCaP	22Rv1	PC-3
32a	157±2	268±4	>800
32b	183±2	248±3	>800
32c	178±2	454±10	>800
32d	198±3	463±8	>800
40a	173±3	156±2	>800
40b	130±2	129±2	>800
40c	159±3	192±3	>800
40d	213±4	192±2	>800
43	139±19	170±15	>800
MMAE	0,7±0,1	0,4±0,2	>800
25	78±1	78,5±0,8	>800
44	>800	>800	>800
Combo (25+44)	73±1	93±1	>800

Представленные данные показывают, что бимодальные конъюгаты **40a-d** и их соединения-предшественники **32a-d** обладают близкими показателями цитотоксичности на клеточной LNCaP с высокой экспрессией ПСМА. При этом на клеточной линии 22Rv1 бимодальные конъюгаты с парой терапевтических агентов абиратерон/MMAE показывают большую токсичность, чем соединения **32a-d**. На ПСМА-неэкспрессирующей линии PC-3 данные восемь соединений демонстрируют более низкую токсичность относительно ПСМА-экспрессирующих клеточных линий, что указывает на селективность действия полученных соединений. В сравнении с ранее описанным конъюгатом **25** (Рисунок 3.23), содержащим MMAE, серия соединений **40a-d** показывает несколько меньшую цитотоксичность на всех клеточных линиях. При этом значения CC_{50} всех полученных соединений значительно ниже этого показателя для моноконъюгата лиганда ПСМА с абиратероном **44**. Эквимольная смесь соединений **25** и **44** (**Combo**) демонстрирует большую цитотоксичность в сравнении с полученными конъюгатами **40a-d**, однако меньшее значение CC_{50} , полученное на клеточной линии PC-3 может указывать на увеличение неспецифической токсичности при использовании комбинации двух мономодальных конъюгатов.

Конъюгат **43** с комбинацией препаратов энзалутамид/ММАЕ показал несколько большую цитотоксичность, чем серия соединений с парой абиратерон/ММАЕ. При этом, данный препарат уступает в цитотоксичности конъюгату **25**.

Монометил ауристатин Е превосходит в цитотоксичности все представленные конъюгаты, при этом он демонстрирует и высокую неспецифическую токсичность, на что указывает значение CC_{50} , полученное на клеточной линии РС-3.

Для более полной оценки перспективности использования полученных бимодальных конъюгатов они были исследованы *in vivo*.¹³ Для эксперимента были выбраны конъюгаты **40a** и **43** и монометил ауристатин Е как соединение сравнения. Также в качестве соединения сравнения был использован конъюгат **25** (Рисунок 3.23), ранее описанный в литературе. В качестве отрицательного контроля использовался изотонический (0,9%) раствор хлорида натрия. Исследования проводились на ксенографтных моделях карциномы предстательной железы человека 22Rv1 и аденокарциномы предстательной железы РС-3 у иммунодефицитных мышей Balb/c Nude самцов.

Трехкратное введение субстанций в дозе 0,3 мг/кг не влияло на общее состояние и вес животных во всех группах, гибели мышей отмечено не было. Данные по массе тела животных представлены в Таблице 3.11.

Таблица 3.11. Масса тела мышей при изучении противоопухолевой эффективности соединений **40a**, **43**, **25** и ММАЕ.

Соединение	Сутки после начала лечения / масса±ошибка, г						
	7сутки(1-ое введение)	12сутки(2-ое введение)	10 сутки(3-е введение)	15 сутки	20 сутки	26 сутки	30 сутки
Карцинома предстательной железы человека 22Rv1							
40a	22,3±1,3	22,5±1,4	22,2±1,4	22,2±1,4	22,5±1,3	22,7±1,3	22,7±1,3
43	25,2±1,2	25,0±1,2	25,0±1,2	25,2±1,3	25,1±1,3	25,2±1,3	25,5±1,5
25	23,4±0,8	23,9±1,2	23,5±1,7	23,4±1,5	23,2±1,4	23,2±1,6	23,4±1,5
ММАЕ	24,0±1,3	23,7±1,3	23,4±1,3	23,5±1,3	23,8±1,3	24,0±1,3	24,2±1,4
0.9% NaCl	25,5±2,1	25,7±1,7	26,0±1,7	26,3±1,5	26,5±1,5	26,9±1,4	26,9±1,4
Аденокарцинома предстательной железы человека РС-3							
40a	24,9±1,2	24,7±1,5	24,8±1,4	25,0±1,4	25,1±1,3	25,2±1,2	25,3±1,2
43	23,9±2,1	23,8±2,1	24,0±2,2	24,4±2,3	24,8±2,1	24,9±1,8	25,1±1,9
25	22,4±2,1	22,8±1,8	22,4±1,6	22,8±1,4	23,0±1,3	23,2±1,4	23,1±1,3
ММАЕ	22,4±1,2	22,7±1,5	22,4±1,4	23,0±1,4	23,1±1,3	23,2±1,2	23,3±1,2
0.9% NaCl	24,1±1,2	24,7±1,5	24,8±1,4	25,0±1,4	25,1±1,3	25,2±1,2	25,5±1,2

При воздействии конъюгатов **40a**, **43** и **25** на опухоль 22Rv1 достигался высокий противоопухолевый эффект, среднее значение объема опухоли увеличивалось медленно по отношению к среднему объему опухоли контрольной группы (Рисунок 3.45, А), торможение

¹³ Указанный эксперимент проводился в соответствии с этическими нормами работы с животными. Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, выписка из протокола №23 от 22.06.2021 г.

роста опухоли 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%, ММАЕ – 43,0 – 64,7% (Рисунок 3.46). При воздействии на опухоль РС-3 (Рисунок 3.45, В) противоопухолевый эффект был значительно слабее: ТРО при лечении конъюгатом **40a** не превышало 44,9%, **43** – 51,7%, **25** – 37,7%, ММАЕ – 38,4% (Рисунок 3.46). Данные в численном виде представлены в Таблицах 3.12 и 3.13.

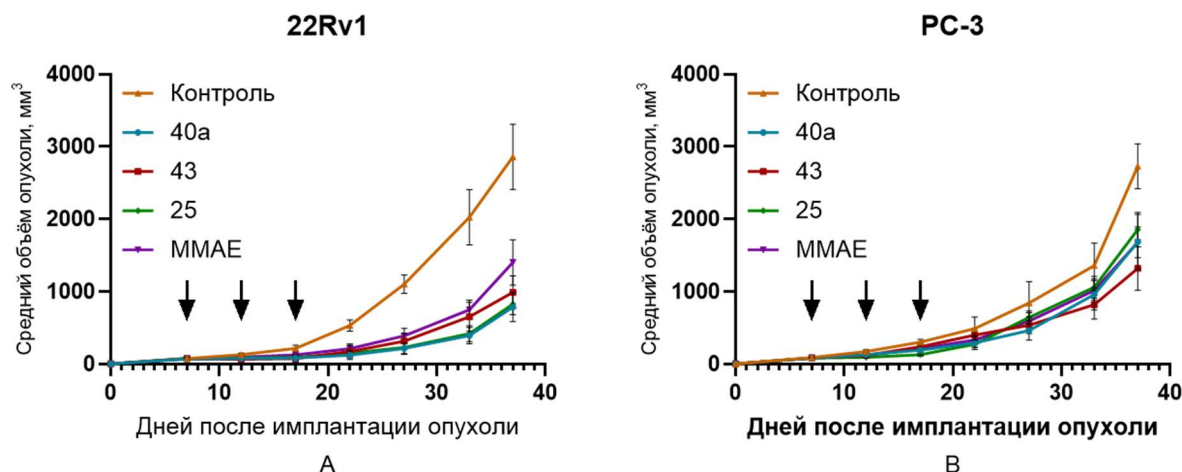


Рисунок 3.45. Графики динамики роста опухолей 22Rv1 (А) и РС-3 (В) у мышей при внутривенном трёхкратном введении **40a**, **43**, **25** и ММАЕ (разовая доза 0,3 мг/кг). Стрелками обозначены дни инъекций.

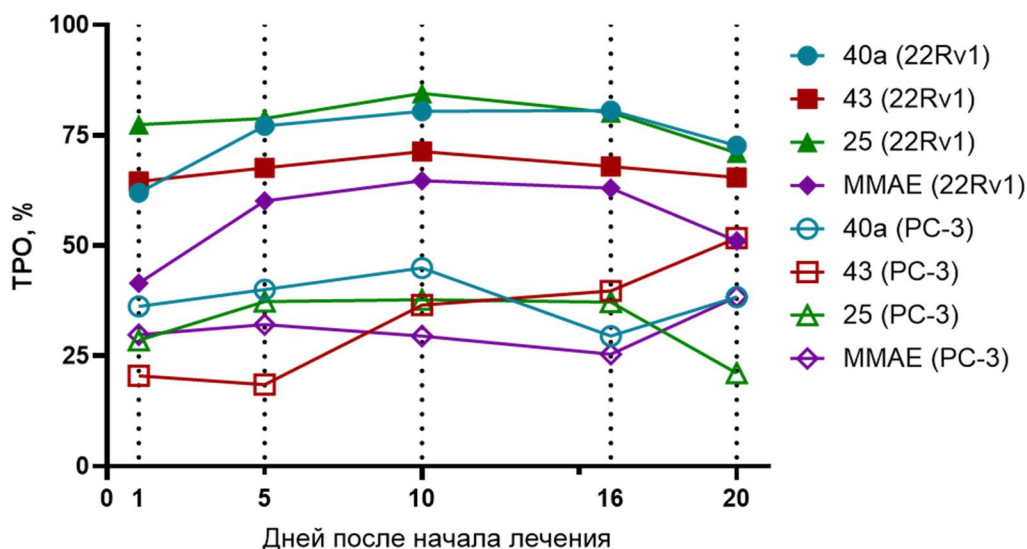


Рисунок 3.46. Динамика коэффициента торможения роста опухоли (ТРО) на ксенографтной модели 22Rv1 и РС-3.

Как видно из представленных графиков, несмотря на то что на модели *in vitro* соединение **43** показывало несколько большую цитотоксичность, на *in vivo* модели данное соединение уступает бимодальному конъюгату с парой препаратов абиратерон/ММАЕ. При

этом конъюгат **40a** показывает на ксенографтных моделях близкие, хоть и несколько уступающие, показатели в сравнении с описанным в литературе моноконъюгатом **25**.

Таблица 3.12. Динамика роста опухолей 22Rv1 и PC-3 у мышей при внутривенном трёхкратном введении соединений **40a**, **43**, **25** и MMAE (разовая доза 0,3 мг/кг).

Соединение	Сутки после начала лечения / $V_{оп} \pm m$, мм ³						
	0 сутки (1-ое введение)	5 сутки (2-ое введение)	10 сутки (3-е введение)	15 сутки	20 сутки	26 сутки	30 сутки
Карцинома предстательной железы человека 22Rv1							
40a	69,6±17,0	77,2±9,3	81,4±25,8	121,7±58,5	215,9±74,3	391,6±112,4	784,0±201,9
43	73,3±8,8	64,7±15,3	76,1±46,5	171,6±85,6	315,5±108,6	650,1±199,9	988,7±225,8
25	78,3±16,3	85,4±25,5	92,6±34,8	147,7±56,3	227,7±98,3	419,5±112,6	824,4±145,3
MMAE	73,7±14,3	93,6±5,7	125,3±28,8	211,7±64,5	388,2±103,6	749,3±134,3	1402,3±313,3
0,9% NaCl	73,4±15,5	129,3±21,8	214,4±42,6	530,2±77,1	1100,7±128,6	2023,7±381,9	2859,3±451,3
Аденокарцинома предстательной железы человека PC-3							
40a	82,2±5,9	127,5±48,2	192,2±72,2	292,5±92,8	463,1±135,4	958,0±212,3	1684,0±380,1
43	83,1±6,8	117,6±16,2	239,5±60,3	397,0±98,4	534,3±113,8	819,8±198,7	1318,4±300,3
25	80,3±4,5	92,6±14,8	128,9±19,5	271,7±42,6	641,6±91,7	1059,1±152,2	1855,5±236,6
MMAE	85,9±8,7	117,9±29,4	211,3±59,6	330,9±104,5	592,6±116,2	1014,3±137,2	1679,9±215,0
0,9% NaCl	88,0±7,1	170,7±25,3	301,1±36,2	487,2±162,6	840,8±294,5	1359,4±311,1	2728,7±309,4

Оценку противоопухолевого эффекта проводили, сравнивая объемы опухолей в опытных и контрольных группах, а также по величине торможения роста опухоли (ТРО). ТРО рассчитывали по Формуле 3.1.

$$ТРО = \left(\frac{V_K - V_O}{V_K} \right) * 100\%$$

Формула 3.1. Расчёт ТРО, V_K и V_O – средний объем опухоли в контрольной и опытной группах, соответственно.

Таблица 3.13. Противоопухолевая эффективность соединений **40a**, **43**, **25** и MMAE у мышей с ксенографтами 22Rv1 и PC-3.

Соединение	Торможение роста опухоли, %				
	Сутки после лечения				
	1	5	10	16	20
Карцинома предстательной железы человека 22Rv1					
25	77,4	78,8	84,5	80,1	71,0
40a	62,0	77,1	80,4	80,6	72,6
43	64,5	67,6	71,3	67,9	65,4
MMAE	41,5	60,1	64,7	63,0	51,0
Аденокарцинома предстательной железы человека PC-3					
25	28,5	37,3	37,7	37,2	21,1
40a	36,2	40,0	44,9	29,5	38,3
43	20,5	18,5	36,5	39,7	51,7
MMAE	29,8	32,1	29,5	25,4	38,4

При сравнительном изучении противоопухолевой эффективности конъюгатов **40a**, **43** у животных с ксенографтами предстательной железы 22Rv1 и PC-3, выявлены преимущества лечения животных с опухолями 22Rv1, что возможно связано с более высоким уровнем экспрессии ПСМА. При этом оба бимодальных конъюгата несколько уступают моноконъюгату **25** в эффективности. Наиболее низкий эффект выявлен при использовании свободного препарата MMAE.

Таким образом, в настоящей работе было получено девять новых бимодальных терапевтических конъюгатов с векторными фрагментами к ПСМА различной структуры. Четыре синтезированных конъюгата (соединения **39a-d**) содержат в качестве терапевтической нагрузки пару препаратов доцетаксел/абиратерон, различаясь между собой структурой лиганда ПСМА. Ещё четыре соединения (**40a-d**) имеют в структуре пару препаратов MMAE/абиратерон и также различаются структурой исходных лигандов. Кроме того, получен один бимодальный конъюгат с парой препаратов MMAE/энзалутамид (**43**) на основе лиганда **24a**.

In vitro исследования цитотоксичности соединений **39a-d** показали селективность воздействия данных препаратов на клетки РПЖ, экспрессирующих ПСМА. При этом показатели цитотоксичности оказались умеренными. Исследования *in vitro* серии соединений **32a-d**, **40a-d** и **43** показали, что полученные соединения демонстрируют токсичность, сопоставимую с ранее описанным в литературе моноконъюгатом монометил ауристатина Е **25**. Дальнейшие исследования *in vivo* на ксенографтных моделях РПЖ продемонстрировали для двух бимодальных конъюгатов **40a** и **43** эффективность, сопоставимую с ранее описанным конъюгатом с MMAE и превосходящую свободный препарат MMAE. Стоит отметить, что полученные соединения использовались в меньших мольных дозировках, по сравнению с MMAE и конъюгатом **25** (разовая дозировка всех

препаратов составляла 0,3 мг/кг), что может свидетельствовать о большей эффективности данных препаратов. Также, за счёт использования ПСМА-экспрессирующей и ПСМА-неэкспрессирующей моделей было дополнительно подтверждено значительное увеличение эффективности подобных соединений для клеток РПЖ с большей экспрессией ПСМА. Исходя из вышесказанного, конъюгаты **40a** и **43** обладают потенциалом для дальнейшего исследования и оптимизации структуры. Одним из возможных вариантов их оптимизации может стать изменение способа конъюгирования терапевтических агентов абиратерон и энзалутамид, для достижения большей эффективности высвобождения данных препаратов в опухолевой ткани.

4. Экспериментальная часть

4.1. Общая информация

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре BrukerAvance 400 (400 МГц для ^1H и 101 МГц для ^{13}C) в CDCl_3 или DMSO-d_6 . Препаративную колоночную хроматографию выполняли на хроматографе INTERCHIM puriFlash 430. Для очистки и анализа образцов использовали систему Shimadzu Prominence LC-20 с хроматографической колонкой Phenomenex Luna 3 мкм C18 90A (150x4,6 мм) с колоночным термостатом при 40°C и коллектором фракций, соединенным с одноквадрупольным масс-спектрометром Shimadzu LCMS-2020 с двойным источником ионизации (DUIS-ESI-APSI, ИРЭП-ХИАД). Подвижные фазы: А – 0,1% муравьиная кислота в воде, В – 9 мМ формиат аммония в воде, Д – ацетонитрил. Параметры аналитической жидкостной хроматографии: скорость потока – 1 мл/мин (градиент: 0 – 0,5 мин – 5% Д, 0,5 – 9,5 мин – от 5% до 90% Д, 9,5 – 12 мин – 90% Д, 12 – 14,5 мин – от 90% до 5% Д) с опциональным УФ детектированием для некоторых соединений. Параметры массспектрометра: скорость потока газа-осушителя 15,0 л/мин, газа-распылителя 1,5 л/мин, температура 250°C, температура нагревательного блока 400°C, напряжение на интерфейсе –3,5 кВ, напряжение коронного разряда –3,5 кВ. Положительно заряженные (диапазон масс 250 – 2000 Да, в некоторых случаях 155 – 2000 Да) и отрицательно заряженные ионы (диапазон масс 90 – 2000 да) регистрировали одновременно. Для очистки использовали те же хроматографические параметры, за исключением градиента, который подбирали отдельно для каждого соединения. Фракционирование основывалось только на УФ детектировании. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на массспектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific) с ESI. Для ввода растворов с концентрацией 0,1 – 9 мкг/мл (в 1% муравьиной кислоте в ацетонитриле) использовали прямой ввод в источник ионов с применением шприцевого насоса (5 мкл/мин). Напряжение при распылении $\pm 3,5$ кВ, температура капилляра 275°C. Масс-спектры регистрировали с помощью анализатора Orbitrap с разрешением 480000 (1 микроскан). Максимальное время ввода 900 мс, усреднение по 9 спектрам, диапазон масс 90 – 2000 Да, в некоторых случаях 200 – 4000 Да. Для внутренней калибровки использовали сигналы ДМСО и диизооктилфталата (m/z 157,03515 и 413,26623) в положительной моде и сигнал додецилсульфата (m/z 265,14790) в отрицательной моде.

Спектры ^1H ЯМР для соединения **25** регистрировали на спектрометре Bruker AVANCE при 600 МГц, 298 К в DMSO-d_6 при концентрации 19,5 мМ. Отнесение сигналов ^1H , ^{15}N и ^{13}C при естественном содержании было получено с использованием набора 2D-экспериментов: DQF-COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, ^{13}C - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HMBC, ^{15}N - ^1H

HSQC и ^{15}N - ^1H HMBC. Время выдержки для экспериментов TOCSY, ROESY и NOESY составляло 80, 320 и 350 мс соответственно. Химические сдвиги ^1H измеряли с помощью TMS в качестве внутреннего стандарта, а химические сдвиги ^{13}C определяли косвенно, используя метод γ -соотношений.[171] Спектры обрабатывали с помощью NMRPipe[172] с использованием стандартного протокола, который включает функцию Лоренца-Гаусса, прямое обратное линейное предсказание и полиномиальную коррекцию базовой линии. 2D-спектры анализировали с помощью NMRFAM-Sparky.[173] Спектры 1D ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы Mnova (Mestrelab Research, Испания).

Очистку растворителей производили согласно стандартным методикам.[174] В работе использовали коммерческие реактивы (“SigmaAldrich”, “FlukaAnalytical”, “abc”, “Carbosynth”, “Lumiprobe”) без дополнительной очистки.

4.2. Синтез соединений

Синтез *трет*-бутилового эфира *пара*-формилбензойной кислоты (соединение 1)

4-формилбензойную кислоту (2 г, 13,322 ммоль, 1 экв.), ди-*трет*-бутилдикарбонат (7,704 г, 35,303 ммоль, 2,65 экв.) и DMAP (977 мг, 7,993 ммоль, 0,6 экв.) растворили в *трет*-бутаноле (40 мл). Смесь перемешивали 8 ч при нагревании до 50 °C и 16 ч при комнатной температуре. Затем прилили 30 мл H_2O и экстрагировали диэтиловым эфиром (3*30 мл). Органическую фракцию сушили над сульфатом натрия. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь петролейный эфир - этилацетат (Interchim Puriflash 120г, 50μ, 50 мл/мин, градиент от 0% EtOAc до 10% в течение 60 минут).

Получили 1,758 г (64%) продукта в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 10,09 (с, 1H, COH), 8,14 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H, Ar), 7,93 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H, Ar), 1.62 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 191,36, 164,20, 138,37, 136,60, 129,57, 128,97, 81,58, 27,68.

Синтез *три-трет*-бутилового эфира (9*S*,13*S*)-3,11-диоксо-1-фенил-2-окса-4,10,12-триазапентадекан-9,13,15-трикарбоновой кислоты (соединение 2)

Гидрохлорид ди-*трет*-бутилового эфира L-глутаминовой кислоты (25 г, 84,52 ммоль, 1 экв.) растворили в 350 мл дихлорметана. Далее добавили триэтиламин (38,5 мл, 276,22 ммоль, 3,3 экв.), полученный раствор охладили до -78°C. В реакционную смесь при -78 °C по каплям добавляли раствор трифосгена (8,5 г, 28,73 ммоль, 0,33 экв.) в ДХМ (200 мл). Смесь довели до комнатной температуры и перемешивали еще 1 ч. Добавили гидрохлорид H-Lys(Z)-O^tBu (25,2 г, 67,61 ммоль, 0,8 экв.) и триэтиламин (9,4 мл, 67,6 ммоль,

0,8 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем разбавили реакционную смесь 450 мл хлористого метилена и промыли водой (2*500 мл). Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. Удалили растворитель при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью метода колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь петролейный эфир – этилацетат (Interchim Puriflash 240 г, 50μ, градиент от 20% этилацетата до 80% этилацетата за 45 минут, скорость потока – 50 мл/мин). Таким образом было получено 38 г (выход 73%) соединения **2** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,25-7,32 (м, 5H, Ar(Cbz)), 5,50 (уш.с., 3H, NH), 5,05-5,10 (м, 2H, $\text{CH}_2(\text{Cbz})$), 4,30-4,34 (м, 2H, CH), 3,12-3,15 (м, 2H, CH_2), 2,24-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,21-2,26 (м, 2H, CH_2), 1,68-1,86 (м, 1H, CH_2), 1,55-1,57 (м, 1H, CH_2), 1,39-1,46 (м, 29H, $3^*\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,29-1,34 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,5, 172,4, 157,0, 156,6, 136,7, 128,5, 128,1, 128,0, 82,2, 81,7, 80,5, 66,5, 52,3, 53,0, 40,6, 32,6, 31,6, 29,3, 28,3, 28,1, 28,0, 22,3.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 622,3704, найдено: 622,3702; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 644,3523, найдено: 644,3521; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}]^+$: 660,3262, найдено: 660,3259.

Синтез ди-трет-бутил (((S)-6-амино-1-(трет-бутоксид)-1-оксогексан-2-ил)карбамоил)-L-глутамата (соединение 3)

К раствору соединения **2** (38 г, 61,1 ммоль) в 350 мл метанола добавили суспендированный в воде (50 мл) 10% Pd/C (3,8 г, 10% масс). Колбу вакуумировали, далее заполнили водородом. Смесь перемешивали 20 часов. Раствор отфильтровали на пористом фильтре с подложкой Kieselgur (2 см). Удалили растворитель при пониженном давлении.

Получили 28,774 г (выход 97%) амина **3** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 5,67-5,70 (м, 2H, NH), 4,28-4,34 (м, 2H, CH), 2,69 (т, $J = 6,6$ Гц, 2H, CH_2), 2,20-2,35 (м, 2H, CH_2), 1,99-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,77-1,84 (м, 1H, CH_2), 1,67-1,75 (м, 1H, CH_2), 1,53-1,63 (м, 2H, CH_2), 1,41-1,50 (м, 22H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,39 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,29-1,36 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,34, 172,04, 156,90, 81,48, 81,08, 80,00, 52,90, 52,38, 40,21, 31,87, 31,23, 27,99, 27,63, 27,59, 27,57, 21,76.

ESI-HRMS: m/z рассчитано $[\text{M}+\text{H}]^+$: 488,3336, найдено: 488,3340; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 510,3155, найдено: 510,3150.

Общая методика реакции восстановительного аминирования

К раствору соединения **3** (1 эквивалент) в метаноле добавили соответствующий бензальдегид (1 эквивалент) и перемешивали 16 часов. Затем порционно прибавили боргидрид натрия (1,5 эквивалента) и перемешивали 2 часа. Далее удалил 2/3 растворителя и прилили 1М раствор гидроксида натрия в воде (1,5 эквивалента по отношению к боргидриду натрия). Полученный раствор экстрагировали 3 раза дихлорметаном, органическую фракцию промывали насыщенным раствором хлорида натрия. Сушили над безводным сульфатом натрия. Выделение продукта проводили методом колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь хлористый метилен - метанол.

Синтез соединения **4a**

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 2-нитробензальдегида (310 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4a** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 60% (770 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,91 (дд, $J = 8,1$ Гц, 1 Гц, 1H, Ar), 7,53-7,60 (м, 2H, Ar), 7,35-7,39 (м, 1H, Ar), 5,24-5,28 (м, 2H, NH), 4,29-4,34 (м, 2H, CH), 3,99 (с, 2H, CH_2), 2,58 (т, $J = 7$ Гц, 2H, CH_2), 2,24-2,31 (м, 2H, CH_2), 2,02-2,08 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,84 (м, 4H, CH_2), 1,54-1,61 (м, 2H, CH_2), 1,46-1,52 (м, 3H, CH_2), 1,40-1,42 (м, 30H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,21, 172,00, 171,80, 156,47, 148,66, 135,34, 132,71, 130,78, 127,43, 124,27, 81,49, 81,18, 80,02, 53,02, 52,52, 50,35, 48,75, 32,54, 31,14, 29,20, 28,01, 27,63, 27,58, 27,55, 22,34.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 623,3656, найдено: 623,3660.

Синтез соединения **4b**

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 3-нитробензальдегида (332 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 72% (920 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,22 (с, 2H, Ar), 8,10 (дд, $J = 8,2$ Гц, 1,2 Гц, 1H, Ar), 7,73 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H, Ar), 7,49 (т, $J = 7,9$ Гц, 1H, Ar), 5,26-5,32 (м, 2H, NH), 4,29-4,35 (м, 2H, CH), 2,65 (тд, $J = 6,9$ Гц, 2,4 Гц, 2H, $\text{CH}_2(\text{Bz})$), 2,22-2,35 (м, 2H, CH_2), 2,01-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,71-1,88 (м, 2H, CH_2), 1,52-1,64 (м, 3H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,07, 171,99, 171,95, 156,48, 147,90, 134,12, 128,95, 122,75, 121,85, 81,61, 81,30, 80,08, 53,03, 52,97, 52,56, 52,27, 48,35, 32,41, 31,15, 28,69, 27,94, 27,64, 27,58, 27,56, 22,34.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 623,3656, найдено: 623,3662; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{Cl}^-]$ 657,3266, найдено: 657,3272; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{HCOO}^-]$ 667,3554, найдено: 667,3555.

Синтез соединения 4с

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 4-нитробензальдегида (310 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4с** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 55% (707 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,16 (д, $J = 8,7$ Гц, 2H, Ar), 7,49 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H, Ar), 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,30-4,34 (м, 2H, CH), 2,59 (т, $J = 7$ Гц, 2H, CH_2 (Bz)), 2,25-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,04-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,73-1,84 (м, 2H, CH_2), 1,58-1,62 (м, 2H, CH_2), 1,47-1,54 (м, 2H, CH_2), 1,41-1,44 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,33-1,38 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,12, 172,00, 171,82, 156,36, 147,98, 146,53, 128,18, 123,15, 81,64, 81,31, 80,10, 52,98, 52,74, 52,26, 48,77, 32,71, 31,14, 29,24, 27,99, 22,41.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 623,3656, найдено: 623,3651.

Синтез соединения 4d

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), бензальдегида **1** (423 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4d** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 78% (1084 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,92 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H, Ar), 7,36 (д, $J = 8,3$ Гц, 2H, Ar), 5,23-5,28 (м, 2H, NH), 4,28-4,35 (м, 2H, CH), 3,83 (с, 2H, CH_2), 2,59 (т, $J = 7$ Гц, 2H, CH_2), 2,25-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,01-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,87 (м, 2H, CH_2), 1,57 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,41-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,30-1,36 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,12, 171,98, 171,86, 156,46, 130,41, 129,15, 127,56, 126,74, 81,54, 81,21, 80,44, 80,03, 53,00, 52,90, 52,64, 52,54, 48,34, 32,48, 31,15, 27,99, 27,76, 27,64, 27,58, 27,56, 22,40.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 678,4330, найдено: 678,4330; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 712,3940, найдено: 712,3943; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 722,4228, найдено: 722,4230.

Синтез соединения 4е

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 2-метоксибензальдегида (279 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4е** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 58% (718 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,20-7,23 (м, 2H, Ar), 6,83-6,91 (м, 2H, Ar), 5,19-5,22 (м, 2H, NH), 4,29-4,33 (м, 2H, CH), 3,82 (с, 3H, OCH_3), 3,76 (с, 2H, CH_2), 2,56 (т, $J = 7,1$ Гц, 2H, CH_2), 2,25-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,03-2,09 (м, 2H, CH_2), 1,70-1,87 (м, 2H, CH_2),

1,57-1,64 (м, 1H, CH₂), 1,48-1,52 (м, 2H, CH₂), 1,38-1,41 (м, 28H, C(CH₃)₃), 1,28-1,37 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,18, 172,03, 171,75, 157,16, 156,40, 129,44, 127,78, 119,93, 109,75, 81,53, 81,17, 80,03, 54,80, 53,10, 52,52, 48,79, 48,42, 32,54, 31,14, 29,21 28,04, 27,65, 27,59, 27,57, 22,47.

ESI-HRMS: для C₃₂H₅₃N₃O₈: m/z рассчитано для [M+H⁺] 608,3911, найдено: 608,3918.

Синтез соединения 4f

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 4-метоксибензальдегида (279 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4f** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 62% (776 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,18 (д, J = 8,6 Гц, 2H, Ar), 6,81 (д, J = 8,6 Гц, 2H, Ar), 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,26-4,30 (м, 2H, CH), 3,75 (с, 3H, OCH₃), 3,67 (с, 2H, CH₂), 2,55 (т, J = 7,1 Гц, 2H, CH₂), 2,22-2,29 (м, 2H, CH₂), 2,18-2,21 (м, 2H, CH₂), 1,97-2,06 (м, 1H, CH₂), 1,66-1,84 (м, 3H, CH₂), 1,53-1,60 (м, 2H, CH₂), 1,44-1,49 (м, 3H, CH₂), 1,38-1,41 (м, 27H, C(CH₃)₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,57, 172,42, 172,21, 158,60, 156,94, 131,90, 129,38, 113,75, 81,89, 81,56, 80,45, 55,19, 53,41, 53,20, 52,90, 50,40, 48,75, 32,83, 31,55, 29,39 28,39, 28,02, 27,96, 27,95, 22,82.

ESI-HRMS: для C₃₂H₅₃N₃O₈: m/z рассчитано для [M+H⁺] 608,3911, найдено: 608,3907.

Синтез соединения 4g

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 4-этоксibenзальдегида (308 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4g** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 33% (425 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,18 (д, J = 8,5 Гц, 2H, Ar), 6,81 (д, J = 8,5 Гц, 2H, Ar), 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,29-4,34 (м, 2H, CH), 3,96-4,01 (м, 2H, CH₂), 3,67 (с, 2H, CH₃), 3,41 (с, 1H, CH₃), 2,57 (т, J = 7,1 Гц, 2H, CH₂), 2,24-2,33 (м, 2H, CH₂), 2,01-2,08 (м, 1H, CH₂), 1,80-1,90 (м, 2H, CH₂), 1,70-1,76 (м, 1H, CH₂), 1,56-1,61 (м, 1H, CH₂), 1,46-1,50 (м, 2H, CH₂), 1,40-1,42 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,23-1,33 (м, 2H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,23, 172,01, 171,83, 157,50, 156,49, 131,74, 128,89, 113,89, 81,49, 81,15, 80,02, 62,94, 53,03, 52,92, 52,50, 48,52, 32,58, 31,14, 29,18, 28,02, 27,63, 27,58, 27,56, 22,48, 14,43.

ESI-HRMS: для $C_{33}H_{55}N_3O_9$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 622,4067, найдено: 623,4058; m/z рассчитано для $[M+Cl^-]$ 656,3672, найдено: 656,3682; m/z рассчитано для $[M+HCOO^-]$ 666,3960, найдено: 666,3960.

Синтез соединения 4h

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 3,4-диметоксибензальдегида (283 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4h** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 66% (863 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 6,85 (м, 1H, Ar), 6,77-6,82 (м, 2H, Ar), 5,27 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,27-4,34 (м, 2H, CH), 3,84 (д, $J = 9$ Гц, 6H, OCH_3), 3,68 (с, 2H, CH_2), 3,41 (с, 2H, CH_2), 2,57 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H, CH_2), 2,24-2,31 (м, 2H, CH_2), 2,00-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,85 (м, 3H, CH_2), 1,55-1,60 (м, 1H, CH_2), 1,47-1,52 (м, 2H, CH_2), 1,40-1,42 (м, 27H, $C(CH_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 172,19, 172,00, 171,80, 156,48, 148,45, 147,49, 132,52, 119,77, 110,91, 110,51, 81,51, 81,17, 80,04, 55,44, 55,38, 53,37, 53,01, 52,50, 49,99, 48,67, 32,60, 31,13, 29,22, 28,01, 27,62, 27,57, 27,55, 22,49.

ESI-HRMS: для $C_{33}H_{55}N_3O_9$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 638,4017, найдено: 638,4009.

Синтез соединения 4i

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 2,5-диметоксибензальдегида (341 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4i** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 73% (1017 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 6,88 (д, $J = 2,6$ Гц, 1H, Ar), 6,73-6,78 (м, 2H, Ar), 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,27-4,34 (м, 2H, CH), 3,78 (с, 4H, OCH_3), 3,75 (с, 2H, OCH_3), 3,42 (с, 2H, CH_2), 2,60 (к, $J = 6,7$ Гц, 2H, $CH_2(Bz)$), 2,26-2,33 (м, 2H, CH_2), 2,00-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,84 (м, 2H, CH_2), 1,50-1,60 (м, 3H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 27H, $C(CH_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 172,10, 172,03, 171,86, 156,59, 152,98, 151,41, 115,85, 112,39, 110,74, 81,44, 81,09, 80,00, 55,38, 55,30, 53,06, 52,49, 50,05, 48,28, 47,76, 32,17, 31,17, 28,48, 28,02, 27,64, 27,58, 27,56, 22,35.

ESI-HRMS: для $C_{33}H_{55}N_3O_9$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 638,4017, найдено: 638,4020; m/z рассчитано для $[M+Cl^-]$ 672,3627, найдено: 672,3631; m/z рассчитано для $[M+HCOO^-]$ 682,3915, найдено: 682,3916.

Синтез соединения 4j

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 2,4-диметоксибензальдегида (341 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4j** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 46% (508 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,20 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H, Ar), 6,42-6,45 (м, 2H, Ar), 5,48-5,50 (м, 2H, NH), 4,27-4,34 (м, 2H, CH), 3,82-3,83 (м, 3H, OCH_3), 3,79 (м, 3H, OCH_3), 2,58-2,71 (м, 1H, CH_2), 2,28-2,35 (м, 2H, CH_2), 2,02-2,11 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,88 (м, 2H, CH_2), 1,56-1,65 (м, 3H, CH_2), 1,42-1,45 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,04, 172,02, 171,96, 158,43, 156,77, 131,27, 103,71, 98,10, 81,36, 81,02, 79,94, 55,02, 54,95, 53,03, 52,45, 46,86, 31,49, 31,23, 28,00, 27,66, 27,60, 27,59, 22,17.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 638,4017, найдено: 638,4021; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{Cl}^-]$ 672,3627, найдено: 672,3631; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{HCOO}^-]$ 682,3915, найдено: 682,3918.

Синтез соединения **4k**

Из соединения **3** (1000 мг, 2,051 ммоль), 4-гидроксибензальдегида (200 мг, 2,051 ммоль) в 60 мл метанола в присутствии боргидрида натрия 116 мг (3,077 ммоль) было получено соединение **4k** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 60% (582 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,07 (м, $J = 8,44$ Гц, 2H, Ar), 6,65 (м, $J = 8,50$ Гц, 2H, Ar), 5,30-5,33 (м, 2H, NH), 4,79 (уш. с., 1H, OH), 4,24-4,37 (м, 2H, CH), 3,67 (с, 2H, CH_2Ar), 2,61 (т, $J = 7,34$ Гц, 2H, CH_2), 2,25-2,35 (м, 2H, CH_2), 1,99-2,12 (м, 1H, NH), 1,77-1,88 (м, 1H, CH_2), 1,65-1,77 (м, 1H, CH_2), 1,56-1,63 (м, 1H, CH_2), 1,48-1,53 (м, 2H, CH_2), 1,40-1,47 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,25-1,36 (м, 2H, CH_2), 1,15-1,28 (м, 1H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,17, 172,07, 171,94, 156,70, 155,98, 129,39, 115,43, 81,66, 81,30, 80,16, 53,09, 52,72, 52,58, 48,14, 32,31, 31,18, 28,44, 27,91, 27,65, 27,57, 22,49.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_8$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 594,3754, найдено: 594,3762.

Синтез соединения **4l**

Из соединения **3** (38,97 г, 79,92 ммоль), 3-хлорбензальдегида (11,234 г, 79,92 ммоль) в 550 мл метанола в присутствии 4,837 г (127,87 ммоль) боргидрида натрия было получено соединение **4l** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 64% (31,311 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,41 (с, 1H, Ar), 7,32-7,25 (м, 3H, Ar), 5,84 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, NH), 5,28 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H, NH), 4,33 (м, 2H, CH), 3,89 (с, 2H, CH_2), 2,80-2,63 (м, 2H, CH_2), 2,40-2,23 (м, 2H, CH_2), 2,10-2,02 (м, 1H, CH_2), 1,88-1,68 (м, 2H, CH_2), 1,67-1,55 (м, 2H, CH_2), 1,50-1,40 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,40-1,26 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,7, 172,4, 172,3, 157,33, 134,5, 130,0, 129,4, 128,4, 127,4, 81,9, 81,5, 80,4, 53,2, 52,8, 51,5, 47,2, 32,0, 31,6, 28,5, 28,4, 28,1, 28,0, 27,4, 22,4.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_7$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 612,3410, найдено 612,3417.

Синтез соединения **4m**

Из соединения **3** (1 г, 2,051 ммоль), 4-бромбензальдегида (379 мг, 2,051 ммоль) в 70 мл метанола в присутствии 116 мг (3,077 ммоль) боргидрида натрия было получено соединение **4m** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 46% (619 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,61 (уш. с., 1H, NH), 7,41 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H, Ar), 7,32 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H, Ar), 6,07 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, NH), 5,95 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H, NH), 4,31 (м, 1H, CH), 4,19 (м, 1H, CH), 3,92 (с, 2H, CH_2), 2,81–2,73 (м, 1H, CH_2), 2,70–2,62 (м, 1H, CH_2), 2,25 (м, 2H, CH_2), 1,99 (м, 1H, CH_2), 1,79–1,71 (м, 1H, CH_2), 1,68–1,48 (м, 4H, CH_2), 1,43–1,22 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,6, 172,3, 172,2, 157,5, 131,9, 131,7, 123,1, 81,6, 81,3, 80,2, 53,2, 52,6, 50,5, 46,2, 31,5, 31,5, 28,5, 28,0, 27,9, 26,2, 22,3.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_7^{79}\text{Br}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 656,2905, найдено 656,2925; для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_7^{81}\text{Br}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 658,2885, найдено 658,2901.

Общая методика ацилирования с использованием RuBOP

Вторичный амин **4a-m** (1 экв.) растворили в ДМФА, добавили DIPEA (2 экв.) и 6-азидогексановую кислоту (1,04 экв.). К полученной смеси добавили RuBOP (1,2 экв.) и реакционную смесь перемешивали 16 часов. После окончания реакции удалили растворитель при пониженном давлении. Сухой остаток растворили в дихлорметане и промыли два раза водой и один раз насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фракцию сушили над Na_2SO_4 . Дальнейшую очистку проводили с помощью колоночной хроматографии в качестве элюента была использована смесь этилацетат – петролейный эфир.

Синтез соединения **5a**

Из соединения **4a** (629 мг, 1,01 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (238 мг, 1,515 ммоль), DIPEA (355 мкл, 2,02 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента RuBOP (631 мг, 1,212 ммоль) было получено соединение **5a** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 65% (502 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,99-8,19 (м, 1H, Ar), 7,37-7,69 (м, 2H, Ar), 7,24-7,30 (м, 1H, Ar), 5,33-5,49 (м, 1H, NH), 5,12-5,18 (м, 1H, NH), 4,91 (м, 2H, CH_2), 4,28-4,34 (м, 2H, CH), 3,27-3,36 (м, 2H, CH_2), 3,20-3,24 (м, 2H, CH_2), 2,45 (т, $J = 7,4$ Гц, 1H,

CH₂), 2,26-2,32 (м, 2H, CH₂), 2,19-2,23 (м, 1H, CH₂), 2,04-2,08 (м, 1H, CH₂), 1,78-1,86 (м, 1H, CH₂), 1,70-1,76 (м, 2H, CH₂), 1,51-1,69 (м, 6H, CH₂), 1,41-1,44 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,27-1,36 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,27, 172,03, 171,62, 158,67, 133,13, 133,06, 128,14, 127,45, 126,83, 125,47, 81,65, 81,37, 81,14, 52,78, 52,60, 50,82, 48,73, 45,89, 45,76, 32,42, 31,45, 28,36, 28,27, 28,20, 28,11, 27,96, 27,65, 27,58, 26,32, 25,96, 25,60, 24,36, 24,09, 22,01.

ESI-HRMS: для C₃₇H₅₉N₇O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 762,4402, найдено: 762,4406.

Синтез соединения **5b**

Из соединения **4b** (915 мг, 1,469 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (346 мг, 2,203 ммоль), DIPEA (510 мкл, 2,938 ммоль) в 60 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (917 мг, 1,763 ммоль) было получено соединение **5b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 73% (812 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,08-8,16 (м, 1H, Ar), 8,03 (м, 1H, Ar), 7,54-7,58 (м, 1H, Ar), 7,45-7,52 (м, 1H, Ar), 5,72 (м, 1H, NH), 4,63-4,65 (м, 2H, CH₂), 4,25-4,33 (м, 2H, CH), 3,27-3,37 (м, 3H, CH₂), 3,20-3,25 (м, 2H, CH₂), 2,42 (т, J = 7,4 Гц, 1H, CH₂), 2,22-2,37 (м, 3H, CH₂), 2,04-2,09 (м, 1H, CH₂), 1,79-1,88 (м, 1H, CH₂), 1,70-1,78 (м, 2H, CH₂), 1,62-1,67 (м, 3H, CH₂), 1,54-1,60 (м, 3H, CH₂), 1,41-1,43 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,31-1,37 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,61, 172,05, 171,63, 170,77, 156,51, 147,96, 139,82, 138,97, 133,52, 131,65, 129,66, 129,13, 122,32, 121,87, 120,75, 81,72, 81,62, 80,21, 59,97, 52,71, 52,62, 52,51, 50,83, 50,02, 47,73, 47,33, 32,59, 32,25, 31,10, 28,34, 27,88, 27,62, 27,57, 27,54, 26,26, 26,09, 26,00, 24,44, 24,23, 22,06, 20,62, 13,75.

ESI-HRMS: для C₃₇H₅₉N₇O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 762,4402, найдено: 762,4397; m/z рассчитано для [M+Na⁺] 784,4221, найдено: 784,4221; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 796,4012, найдено: 796,4018; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 806,4300, найдено: 806,4302.

Синтез соединения **5c**

Из соединения **4c** (412 мг, 0,661 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (156 мг, 0,992 ммоль), DIPEA (230 мкл, 1,322 ммоль) в 30 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (413 мг, 0,793 ммоль) было получено соединение **5c** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 85% (427 мг).

Спектр ЯМР¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,14-8,23 (м, 2H, Ar), 7,33-7,39 (м, 2H, Ar), 5,32-5,43 (м, 1H, NH), 4,62-4,65 (м, 1H, NH), 4,29-4,34 (м, 2H, CH), 3,27-3,36 (м, 2H, CH₂), 3,17-3,25 (м, 2H, CH₂), 2,39-2,42 (т, J = 7,4 Гц, 1H, CH₂), 2,22-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,03-2,08 (м, 1H, CH₂), 1,79-1,86 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,75 (м, 2H, CH₂), 1,62-1,67 (м, 2H, CH₂), 1,53-1,60 (м, 3H, CH₂), 1,42-1,43 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,31-1,36 (м, 2H, CH₂), 1,23-1,27 (м, 2H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,47, 171,98, 171,75, 171,70, 156,29, 146,76, 145,31, 144,23, 128,05, 126,50, 123,81, 123,37, 81,69, 81,60, 81,42, 81,17, 80,17, 80,05, 53,03, 52,28, 52,58, 50,83, 50,80, 47,86, 47,30, 32,70, 32,62, 31,14, 28,34, 28,26, 28,13, 27,93, 27,85, 27,64, 27,58, 27,56, 26,12, 26,01, 24,38, 24,20, 22,02.

ESI-HRMS: для C₃₇H₅₉N₇O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 762,4402, найдено: 762,4406; m/z рассчитано для [M+Na⁺] 784,4222, найдено: 784,4199.

Синтез соединения **5d**

Из соединения **4d** (1000 мг, 1,476 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (348 мг, 2,214 ммоль), DIPEA (515 мкл, 2,952 ммоль) в 60 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (922 мг, 1,771 ммоль) было получено соединение **5d** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 95% (1140 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,89-7,97 (м, 2H, Ar), 7,18-7,25 (м, 2H, Ar), 5,32 (уш.с., 2H, NH), 4,56-4,65 (м, 2H, CH₂), 4,26-4,34 (м, 2H, CH), 3,34 (т, J = 7,2 Гц, 1H, CH₂), 3,28 (т, J = 6,9 Гц, 1H, CH₂), 3,23 (т, J = 6,9 Гц, 1H, CH₂), 3,14 (т, J = 7,6 Гц, 1H, CH₂), 2,37-2,40 (м, 1H, CH₂), 2,27-2,33 (м, 3H, CH₂), 2,04-2,07 (м, 1H, CH₂), 1,80-1,89 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,78 (м, 2H, CH₂), 1,62-1,67 (м, 2H, CH₃), 1,57 (с, 11H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,42-1,43 (м, 27H, C(CH₃)₃), 1,29-1,39 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,01, 172,35, 172,10, 171,58, 170,75, 165,12, 164,85, 156,80, 156,48, 142,18, 141,11, 131,07, 130,60, 129,66, 129,28, 127,20, 125,47, 81,76, 81,61, 81,54, 81,21, 80,78, 80,53, 80,24, 80,15, 59,97, 53,15, 52,80, 52,64, 52,49, 50,85, 50,81, 50,60, 47,81, 46,80, 45,53, 32,57, 32,29, 31,35, 31,09, 28,34, 28,24, 28,05, 27,89, 27,82, 27,74, 27,63, 27,57, 27,55, 26,26, 26,13, 26,00, 24,49, 24,27, 22,08, 21,99, 20,62, 19,12, 13,76.

ESI-HRMS: для C₄₂H₆₈N₆O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 817,5075, найдено: 817,5073; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 851,4685, найдено: 851,4680; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 861,4973, найдено: 861,4974.

Синтез соединения **5e**

Из соединения **4e** (647 мг, 1,064 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (251 мг, 1,596 ммоль), DIPEA (370 мкл, 2,128 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента

РyBOP (664 мг, 1,277 ммоль) было получено соединение **5e** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 83% (658 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,26-7,29 (м, 1H, Ar), 6,99-7,00 (м, 1H, Ar), 6,92-6,95 (м, 1H, Ar), 6,82-6,89 (м, 1H, Ar), 5,07-5,64 (м, 2H, NH), 4,46-4,59 (м, 2H, CH_2), 4,23-4,27 (м, 2H, CH), 3,81-3,84 (м, 3H, OCH_3), 3,16-3,34 (м, 4H, CH_2), 2,24-2,39 (м, 4H, CH_2), 2,05-2,11 (м, 1H, CH_2), 1,78-1,87 (м, 1H, CH_2), 1,63-1,72 (м, 4H, CH_2), 1,54-1,59 (м, 4H, CH_2), 1,42-1,44 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,29-1,38 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,36, 172,05, 171,97, 171,68, 156,66, 156,51, 128,15, 127,80, 126,04, 124,29, 120,20, 109,66, 81,26, 80,93, 79,95, 59,99, 54,83, 54,75, 53,15, 52,90, 52,34, 50,87, 46,25, 45,17, 32,35, 31,19, 28,27, 28,23, 28,01, 27,65, 27,59, 27,57, 26,26, 26,02, 24,54, 24,32, 22,00, 20,64, 13,77.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 747,4657, найдено: 747,4662; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 781,4267, найдено: 781,4273; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 791,4555, найдено: 791,4556.

Синтез соединения **5f**

Из соединения **4f** (726 мг, 1,194 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (281 мг, 1,791 ммоль), DIPEA (420 мкл, 2,388 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента РyBOP (745 мг, 1,433 ммоль) было получено соединение **5f** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 83% (737 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,04-7,15 (м, 2H, Ar), 6,80-6,88 (м, 2H, Ar), 5,43-5,62 (м, 1H, NH), 5,14-5,23 (м, 1H, NH), 4,44-4,49 (м, 2H, CH_2), 4,24-4,35 (м, 2H, CH), 3,76-3,79 (м, 3H, OCH_3), 3,21-3,32 (м, 3H, CH_2), 3,09-3,13 (м, 1H, CH_2), 2,27-2,36 (м, 4H, CH_2), 2,03-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,80-1,84 (м, 1H, CH_2), 1,60-1,71 (м, 5H, CH_2), 1,46-1,58 (м, 4H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,26-1,37 (м, 3H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,93, 172,15, 172,00, 171,81, 171,65, 158,61, 158,38, 156,66, 156,34, 129,53, 128,96, 128,19, 126,98, 113,86, 113,46, 81,67, 81,47, 81,27, 80,96, 79,96, 59,99, 54,88, 54,80, 53,06, 52,76, 52,54, 52,34, 50,84, 50,13, 47,16, 46,24, 45,05, 32,63, 32,39, 31,28, 31,13, 28,35, 28,26, 27,99, 27,64, 27,58, 26,13, 26,04, 24,52, 24,35, 22,00, 20,64, 13,77.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 747,4657, найдено: 747,4667; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 781,4267, найдено: 781,4273; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 791,4555, найдено: 791,4555.

Синтез соединения **5g**

Из соединения **4g** (366 мг, 0,589 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (139 мг, 0,884 ммоль), DIPEA (205 мкл, 1,178 ммоль) в 30 мл диметилформаида в присутствии реагента PyBOP (368 мг, 0,707 ммоль) было получено соединение **5g** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 80% (360 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,04-7,15 (м, 2H, Ar), 6,80-6,88 (м, 2H, Ar), 5,18-5,29 (м, 2H, NH), 4,44-4,50 (м, 2H, CH_2), 4,25-4,35 (м, 2H, CH), 3,98-4,04 (м, 2H, CH_2), 3,22-3,33 (м, 3H, CH_2), 3,11-3,15 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H, CH_2), 2,23-2,39 (м, 4H, CH_2), 2,06-2,11 (м, 1H, CH_2), 1,81-1,86 (м, 1H, CH_2), 1,64-1,78 (м, 4H, CH_2), 1,53-1,60 (м, 4H, CH_2), 1,39-1,45 (м, 31H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,29-1,37 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,16, 171,56, 171,28, 156,86, 135,29, 128,99, 127,02, 123,88, 114,44, 114,07, 81,20, 80,28, 80,17, 63,08, 53,24, 52,89, 50,86, 45,08, 32,53, 31,09, 28,32, 28,04, 27,65, 27,59, 27,57, 26,14, 26,05, 24,44, 21,98, 14,39.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 761,4813, найдено: 761,4805; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{Cl}^-]$ 795,4423, найдено: 795,4431; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{HCOO}^-]$ 805,4711, найдено: 805,4713.

Синтез соединения **5h**

Из соединения **4h** (789 мг, 1,237 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (291 мг, 1,855 ммоль), DIPEA (430 мкл, 2,474 ммоль) в 40 мл диметилформаида в присутствии реагента PyBOP (772 мг, 1,484 ммоль) было получено соединение **5h** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 85% (816 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6,77-6,82 (м, 1H, Ar), 6,71-6,75 (м, 1H, Ar), 6,61-6,66 (м, 1H, Ar), 5,39-5,59 (м, 1H, NH), 5,16-5,25 (м, 1H, NH), 4,43-4,49 (м, 2H, CH_2), 4,24-4,34 (м, 2H, CH), 3,83 (дд, $J = 8,1$ Гц, 4,7 Гц, 6H, OCH_3), 3,30-3,33 (м, 1H, CH_2), 3,20-3,27 (м, 2H, CH_2), 3,11 (т, 1H, CH_2), 2,21-2,36 (м, 4H, CH_2), 2,03-2,07 (м, 1H, CH_2), 1,76-1,84 (м, 1H, CH_2), 1,59-1,73 (м, 4H, CH_2), 1,52-1,57 (м, 4H, CH_2), 1,40-1,42 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,26-1,36 (м, 3H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,89, 172,10, 171,98, 171,83, 171,82, 171,68, 148,92, 148,63, 147,96, 147,82, 130,13, 128,74, 119,94, 117,70, 110,91, 110,39, 108,75, 81,56, 81,42, 81,25, 80,94, 80,08, 79,94, 59,97, 55,49, 55,45, 55,41, 53,01, 52,74, 52,51, 52,30, 50,82, 50,33, 47,50, 46,25, 45,11, 32,68, 32,58, 32,38, 31,36, 31,16, 28,35, 28,27, 28,20, 27,62, 27,57, 27,54, 26,23, 26,14, 26,05, 24,56, 24,34, 22,12, 22,00, 20,62, 13,75.

Синтез соединения **5i**

Из соединения **4i** (915 мг, 1,469 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (346 мг, 2,203 ммоль), DIPEA (510 мкл, 2,938 ммоль) в 60 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (917 мг, 1,763 ммоль) было получено соединение **5i** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 79% (919 мг).

Спектр ЯМР¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,70-6,79 (м, 2H, Ar), 6,57 (м, 1H, Ar), 5,53 (м, 2H, NH), 4,43-4,56 (м, 2H, CH₂), 4,23-4,33 (м, 2H, CH), 3,75-3,78 (м, 3H, OCH₃), 3,71-3,72 (м, 3H, OCH₃), 3,31-3,34 (м, 1H, CH₂), 3,15-3,28 (м, 3H, CH₂), 2,23-2,40 (м, 4H, CH₂), 2,03-2,07 (м, 1H, CH₂), 1,77-1,86 (м, 1H, CH₂), 1,60-1,74 (м, 4H, CH₂), 1,50-1,58 (м, 4H, CH₂), 1,40-1,42 (м, 28H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,30-1,35 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,38, 172,08, 171,80, 171,47, 156,75, 153,35, 150,62, 125,45, 112,99, 111,61, 110,46, 81,35, 81,00, 80,01, 59,96, 55,43, 55,26, 55,15, 53,20, 52,40, 50,84, 46,24, 45,23, 32,24, 31,26, 31,12, 28,34, 28,23, 28,14, 27,62, 27,57, 27,55, 26,26, 26,01, 24,34, 22,00, 20,61, 13,75.

ESI-HRMS: для C₃₉H₆₄N₆O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 777.4762, найдено: 777.4757; m/z рассчитано для [M+Na⁺] 799.4582, найдено: 799.4583; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 811.4372, найдено: 811.4379; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 821.4660, найдено: 821.4662.

Синтез соединения **5j**

Из соединения **4i** (428 мг, 0,671 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (158 мг, 1,006 ммоль), DIPEA (235 мкл, 1,342 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (419 мг, 0,805 ммоль) было получено соединение **5i** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 77% (401 мг).

Спектр ЯМР¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,89-7,13 (м, 1H, Ar), 6,43-6,45 (м, 2H, Ar), 5,53 (м, 2H, NH), 4,39-4,52 (м, 2H, CH₂), 4,23-4,35 (м, 2H, CH), 3,78-3,80 (м, 6H, OCH₃), 3,15-3,32 (м, 4H, CH₂), 2,24-2,40 (м, 4H, CH₂), 2,04-2,10 (м, 1H, CH₂), 1,65-1,78 (м, 4H, CH₂), 1,49-1,61 (м, 4H, CH₂), 1,42-1,44 (м, 27H, C(CH₃)₃), 1,27-1,39 (м, 4H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,08, 172,02, 171,54, 157,06, 156,74, 144,29, 137,11, 127,15, 114,89, 81,42, 81,34, 80,99, 54,99, 54,81, 53,47, 53,18, 52,37, 50,87, 46,08, 32,25, 31,15, 28,26, 27,64, 27,59, 27,57, 26,07, 24,43, 21,99.

ESI-HRMS: для C₃₉H₆₄N₆O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 777.4762, найдено: 777,4743; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 811,4372, найдено: 811,4379; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 821,4660, найдено: 821,4662.

Синтез соединения **5k**

Из соединения **4k** (593 мг, 1 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (220 мг, 1,5 ммоль), DIPEA (350 мкл, 2 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (624 мг, 1,2 ммоль) было получено соединение **5k** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 67% (490 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6,99-7,05 (м, 1H, Ar), 6,92-6,98 (м, 1H, Ar), 6,81-6,87 (м, 1H, Ar), 6,74-6,80 (м, 1H, Ar), 5,65-5,77 (м, 1H, NH), 5,20–5,43 (м, 1H, NH), 4,37-4,42 (м, 1H, CH), 4,27-4,36 (м, 1H, CH), 4,05-4,17 (м, 2H, CH_2Ar), 3,19-3,31 (м, 2H, CH_2), 1,98-2,39 (м, 8H, CH_2), 1,77-1,90 (м, 1H, OH), 1,51-1,7 (м, 6H, CH_2), 1,37-1,49 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,17-1,31 (м, 6H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,32, 170,89, 172,07, 171,76, 156,59, 156,06, 129,06, 128,12, 127,26, 115,54, 115,17, 81,51, 81,13, 81,13, 60,04, 50,81, 50,62, 28,28, 28,01, 27,63, 27,54, 27,55, 26,11, 26,02, 24,44, 20,64, 13,76.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_9$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 777,4750, найдено: 777,4747; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 799,4519, найдено: 799,4576; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 811,4367, найдено: 811,4379; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 821,4655, найдено: 821,4662.

Синтез соединения **5l**

Из соединения **4l** (31,311 г, 51,15 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (8,041 г, 53,19 ммоль), DIPEA (18 мл, 103 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (31,94 г, 61,38 ммоль) было получено соединение **5k** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 75% (28,96 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,41 (с, 1H, Ar), 7,25-7,32 (м, 3H, Ar), 5,84 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, NH), 5,28 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H, NH), 4,33–4,31 (м, 2H, CH), 3,89 (с, 2H, CH_2), 2,63-2,80 (м, 2H, CH_2), 2,23-2,40 (м, 2H, CH_2), 2,02-2,10 (м, 1H, CH_2), 1,67-1,88 (м, 2H, CH_2), 1,55–1,68 (м, 3H, CH_2), 1,40-1,50 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,40-1,26 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,2, 172,7, 172,3, 172,3, 172,2, 172,1, 157,0, 156,8, 140,0, 139,1, 134,9, 134,3, 130,2, 129,8, 127,78, 127,7, 127,4, 126,2, 126,0, 124,2, 82,0, 81,9, 81,7, 81,4, 80,5, 80,4, 53,4, 53,1, 53,0, 52,8, 51,24, 51,20, 50,5, 47,8, 47,2, 45,8, 33,1, 32,9, 32,7, 31,9, 31,55, 31,53, 28,7, 28,6, 28,5, 28,4, 28,2, 28,0, 27,9, 26,9, 26,7, 26,5, 26,4, 24,8, 24,7, 22,5, 22,4.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_8\text{Cl}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 751,4156, найдено: 751,4160; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 773,3975, найдено: 773,3976; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}]^+$ 789,3714, найдено: 789,3712.

Синтез соединения **5m**

Из соединения **4m** (619 мг, 0.943 ммоль), 6-азидогексановой кислоты (149 мг, 0.981 ммоль), DIPEA (329 мкл, 1.886 ммоль) в 40 мл диметилформамида в присутствии реагента PyBOP (589 мг, 1,132 ммоль) было получено соединение **5m** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 67% (501 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,49 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, Ar), 7,42 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, Ar), 7,11 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, Ar), 7,04 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, Ar), 5,56 (уш. с, 1H, NH), 5,29 (уш. с, 1H, NH), 4,5 (д, $J = 17,7$ Гц, 2H, CH_2), 4,29 (м, 2H, CH), 3,31 (м, 2H, CH_2), 3,25 (т, $J = 6,9 \times 2$ Гц, 1H, CH_2), 2,35 (м, 4H, CH_2), 2,08 (м, 1H, CH_2), 1,85 (м, 1H, CH_2), 1,7 (м, 4H, CH_2), 1,58 (м, 3H, CH_2), 1,45 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,33 (м, 3H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 176,8, 174,6, 173,3, 172,8, 172,4, 172,4, 172,3, 172,1, 157,2, 156,9, 136,9, 135,9, 131,9, 131,5, 129,7, 127,8, 121,3, 121,0, 82,1, 81,9, 81,8, 81,5, 80,5, 80,4, 53,4, 53,1, 52,9, 52,8, 51,2, 51,2, 47,8, 47,1, 45,8, 33,7, 32,9, 32,7, 31,9, 31,5, 28,7, 28,6, 28,5, 28,3, 28,1, 28,0, 27,9, 27,9, 26,7, 26,5, 26,4, 26,2, 24,8, 24,7, 24,3, 22,4, 22,4, 20,7.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_8^{79}\text{Br}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 795,3651, найдено: 795,3654; для $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_8^{81}\text{Br}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 797,3631, найдено: 797,3639.

Общая методика восстановления по Штаудингеру

К раствору азида (1 экв.) в смеси ТГФ/ H_2O =4/1 был добавлен трифенилфосфин (2 экв.) и перемешивали 6 часов при температуре 60 °С. Затем удалили растворитель при пониженном давлении. Дальнейшую очистку проводили с помощью колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь 1% триэтиламин в хлористом метиле - метанол.

Синтез соединения **6a**

Из соединения **5a** (522 мг, 0,685 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (316 мг, 1,370 ммоль) было получено соединение **6a** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 80% (403 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,81-8,00 (м, 1H, Ar), 7,21-7,53 (м, 2H, Ar), 7,08-7,15 (м, 1H, Ar), 5,79 (уш. с., 2H, NH), 4,74 (д, $J = 9$ Гц, 2H, CH_2), 4,10-4,18 (м, 2H, CH), 2,96-3,18 (м, 4H, CH_2), 2,50-2,61 (м, 1H, CH_2), 2,28-2,32 (м, 1H, CH_2), 2,03-2,18 (м, 3H, $\text{CH}_2 + \text{NH}_2$), 1,79-1,91 (м, 2H, CH_2), 1,52-1,66 (м, 5H, CH_2), 1,40-1,47 (м, 5H, CH_2), 1,24-1,25 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,07-1,20 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,01, 171,99, 171,95, 133,15, 133,05, 132,48, 125,38, 124,56, 81,08, 79,92, 79,84, 52,94, 52,73, 52,36, 45,76, 41,44, 32,48, 31,62, 31,21, 28,11, 27,99, 27,62, 27,58, 27,54, 26,45, 26,12, 25,97, 24,31, 22,08, 11,04.

ESI-HRMS: для $C_{37}H_{61}N_5O_{10}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 736,4497, найдено: 736,4492; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 770,4107, найдено: 770,4110; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 780,4395, найдено: 780,4389.

Синтез соединения **6b**

Из соединения **5b** (573 мг, 0,752 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (395 мг, 1,504 ммоль) было получено соединение **6b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 96% (530 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 8,01-8,11 (м, 2H, Ar), 7,44-7,56 (м, 2H, Ar), 5,80-5,84 (м, 2H, NH), 4,57-4,67 (м, 2H, CH_2), 4,26-4,27 (м, 2H, CH), 3,54-3,59 (м, 2H, CH_2), 3,15-3,31 (м, 6H, CH_2+NH_2), 2,70-2,78 (м, 2H, CH_2), 2,25-2,40 (м, 4H, CH_2), 1,99-2,01 (м, 1H, CH_2), 1,76-1,83 (м, 1H, CH_2), 1,63-1,70 (м, 3H, CH_2), 1,51-1,60 (м, 4H, CH_2), 1,41-1,42 (м, 30H, $C(CH_3)_3$), 1,20-1,32 (м, 3H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 172,87, 172,10, 171,95, 156,83, 147,93, 139,87, 133,54, 129,61, 129,13, 122,23, 121,89, 121,83, 81,39, 81,25, 80,11, 62,75, 52,89, 52,73, 52,54, 52,41, 49,97, 47,50, 47,18, 45,67, 40,95, 32,30, 32,18, 31,18, 27,94, 27,63, 27,58, 27,55, 25,93, 24,43, 22,04, 10,60.

ESI-HRMS: для $C_{37}H_{61}N_5O_{10}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 736,4497, найдено: 736,4475; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 770,4107, найдено: 770,4101; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 780,4395, найдено: 780,4396.

Синтез соединения **6c**

Из соединения **5c** (400 мг, 0,525 ммоль) в 24 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (275 мг, 1,05 ммоль) было получено соединение **6c** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 97% (373 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 7,05-7,16 (м, 2H, Ar), 6,81-6,89 (м, 2H, Ar), 5,59-5,72 (м, 1H, NH), 5,33-5,44 (м, 1H, NH), 4,44-4,57 (м, 2H, CH_2), 4,25-4,36 (м, 2H, CH), 3,27-3,39 (м, 1H, CH_2), 3,79 (д, $J = 7,2$ Гц, 3H, CH_2), 3,12-3,17 (м, 1H, CH_2), 3,11-3,12 (м, 1H, CH_2), 2,71-2,77 (м, 1H, CH_2), 2,25-2,38 (м, 6H, CH_2+NH_2), 2,05-2,08 (м, 1H, CH_2), 1,80-1,87 (м, 1H, CH_2), 1,64-1,74 (м, 4H, CH_2), 1,50-1,57 (м, 4H, CH_2), 1,42-1,45 (м, 29H, $C(CH_3)_3+CH_2$), 1,31-1,36 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 173,02, 172,81, 172,07, 171,96, 171,92, 171,82, 156,74, 156,63, 146,96, 146,66, 145,35, 144,37, 128,00, 126,54, 123,69, 123,28, 81,40, 81,30, 81,22, 81,00, 80,05, 79,96, 52,77, 52,56, 52,46, 52,34, 50,17, 47,70, 47,22, 45,70, 45,45, 41,29, 41,20, 32,58, 32,50, 32,37, 32,26, 31,68, 31,16, 28,02, 27,93, 27,83, 27,58, 27,54, 27,51, 26,27, 26,07, 25,95, 24,57, 24,39, 21,97, 21,88.

ESI-HRMS: для $C_{37}H_{61}N_5O_{10}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 736,4497, найдено: 736,4496; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 770,4107, найдено: 770,4109.

Синтез соединения 6d

Из соединения **5d** (1,5 г, 1,636 ммоль) в 100 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (858 мг, 3,272 ммоль) было получено соединение **6d** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 69% (894 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 7,89-8,02 (м, 2H, Ar), 7,17-7,24 (м, 2H, Ar), 5,50-5,79 (м, 1H, NH), 5,07-5,37 (м, 1H, NH), 4,50-4,65 (м, 2H, CH_2), 4,28-4,31 (м, 2H, CH), 4,01 (уш.с, 1H, NH_2), 3,27-3,43 (м, 1H, CH_2), 3,15 (м, 1H, CH_2), 2,77-2,84 (м, 1H, CH_2), 2,23-2,45 (м, 4H, CH_2), 2,04-2,05 (м, 1H, CH_2), 1,81-1,84 (м, 1H, CH_2), 1,62-1,71 (м, 4H, CH_2), 1,53-1,57 (м, 11H, $CH_2+C(CH_3)_3$), 1,41-1,42 (м, 27H, $C(CH_3)_3$), 1,22-1,35 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 172,53, 172,14, 172,02, 156,90, 129,62, 129,27, 127,18, 125,53, 125,39, 81,51, 81,35, 81,07, 80,75, 80,52, 80,04, 53,01, 52,85, 52,54, 52,48, 52,37, 46,79, 32,18, 31,79, 31,52, 31,18, 28,49, 27,90, 27,74, 27,64, 27,59, 27,56, 26,52, 25,60, 24,60, 23,96, 22,04, 21,94, 19,12, 16,72, 16,61.

ESI-HRMS: для $C_{42}H_{70}N_4O_{10}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 791,5170, найдено: 791,5174; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 825,4780, найдено: 825,4784; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 835,5068, найдено: 835,5068.

Синтез соединения 6e

Из соединения **5e** (594 мг, 0,796 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (418 мг, 1,592 ммоль) было получено соединение **6e** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 61% (350 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 6,98-7,25 (м, 2H, Ar), 6,81-6,93 (м, 2H, Ar), 5,36-5,74 (м, 2H, NH), 4,45-4,62 (м, 2H, CH_2), 4,22-4,35 (м, 2H, CH), 3,79-3,82 (м, 3H, OCH_3), 3,25-3,36 (м, 2H, CH_2), 3,16-3,18 (м, 1H, CH_2), 2,64-2,73 (м, 1H, CH_2), 2,27-2,40 (м, 4H, CH_2), 2,02-2,15 (м, 3H, CH_2+NH_2), 1,77-1,84 (м, 1H, CH_2), 1,60-1,72 (м, 4H, CH_2), 1,49-1,54 (м, 4H, CH_2), 1,40-1,42 (м, 29H, $C(CH_3)_3+CH_2$), 1,23-1,33 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 172,07, 172,05, 171,87, 156,74, 156,51, 128,07, 126,07, 124,38, 120,16, 109,61, 81,18, 80,85, 79,92, 54,73, 53,11, 52,33, 46,16, 45,77, 45,02, 41,38, 32,62, 32,57, 32,41, 31,29, 31,23, 28,15, 28,08, 27,64, 27,59, 27,57, 26,35, 26,16, 26,02, 24,47, 22,01, 11,02.

ESI-HRMS: для $C_{38}H_{64}N_4O_9$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 721,4752, найдено: 721,4759; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 755,4362, найдено: 755,4366; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 765,4650, найдено: 765,4652.

Синтез соединения 6f

Из соединения **5f** (537 мг, 0,719 ммоль) в 24 мл смеси ТГФ/Н₂О (4/1) в присутствии Ph₃P (377 мг, 1,438 ммоль) было получено соединение **6f** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 91% (471 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,92-7,01 (м, 2H, Ar), 6,68-6,75 (м, 2H, Ar), 6,14-6,18 (м, 2H, NH), 4,32-4,37 (м, 2H, CH₂), 4,10-4,18 (м, 2H, CH), 3,65 (д, J = 7,2 Гц, 3H, OCH₃), 3,16-3,21 (м, 1H, CH₂), 3,01-3,06 (м, 1H, CH₂), 2,17-2,27 (м, 4H, CH₂+NH₂), 1,89-1,94 (м, 1H, CH₂), 1,63-1,73 (м, 3H, CH₂), 1,45-1,61 (м, 4H, CH₂), 1,34-1,44 (м, 3H, CH₂), 1,42-1,45 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,36, 172,06, 171,83, 156,85, 156,71, 132,52, 128,95, 127,03, 113,80, 113,43, 81,10, 80,80, 79,90, 54,87, 54,80, 52,99, 52,75, 52,33, 50,07, 46,14, 45,77, 32,42, 31,22, 28,01, 27,80, 27,64, 27,60, 27,56, 26,02, 24,70, 24,51, 22,08, 22,00, 10,97.

ESI-HRMS: для C₃₈H₆₄N₄O₉: m/z рассчитано для [M+H⁺] 721,4752, найдено: 721,4751; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 755,4362, найдено: 755,4365; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 765,4650, найдено: 765,4651.

Синтез соединения **6g**

Из соединения **5g** (275 мг, 0,361 ммоль) в 18 мл смеси ТГФ/Н₂О (4/1) в присутствии Ph₃P (189 мг, 0,722 ммоль) было получено соединение **6g** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 64% (170 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,61 (уш. с., 2H, NH), 7,01 (м, 2H, Ar), 6,79 (м, 2H, Ar), 6,39 (м, 1H, NH), 4,25-4,39 (м, 4H, CH₂+CH), 3,94 (м, 2H, CH₂), 2,99-3,36 (м, 4H, CH₂), 2,26 (м, 4H, CH₂+NH₂), 1,98 (м, 2H, CH₂), 1,61 (м, 6H, CH₂), 1,35 (м, 35H, C(CH₃)₃+CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,39, 172,03, 171,97, 157,72, 157,02, 129,05, 128,79, 127,86, 127,20, 114,36, 114,02, 81,26, 80,98, 79,93, 62,99, 62,91, 53,01, 52,49, 52,39, 50,08, 31,82, 31,23, 27,60, 27,53, 26,40, 25,33, 22,20, 14,36.

ESI-HRMS: для C₃₉H₆₆N₄O₉: m/z рассчитано для [M+H⁺] 735,4908, найдено: 735,4895; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 769,4518, найдено: 769,4521; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 779,4806, найдено: 779,4807.

Синтез соединения **6h**

Из соединения **5h** (696 мг, 0,896 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/Н₂О (4/1) в присутствии Ph₃P (470 мг, 1,792 ммоль) было получено соединение **6h** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 90% (608 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,73-6,81 (м, 2H, Ar), 6,61-6,66 (м, 1H, Ar), 5,46-5,74 (м, 2H, NH), 4,42-4,47 (м, 2H, CH₂), 4,25-4,34 (м, 2H, CH), 3,81-3,84 (м, 6H,

CH₃), 3,26-3,35 (м, 1H, CH₂), 3,11-3,12 (м, 1H, CH₂), 2,62-2,69 (м, 2H, CH₂), 2,22-2,32 (м, 4H, CH₂+NH₂), 2,01-2,05 (м, 1H, CH₂), 1,78-1,83 (м, 2H, CH₂), 1,64-1,69 (м, 5H, CH₂), 1,46-1,56 (м, 3H, CH₂), 1,39-1,40 (м, 31H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,22-1,34 (м, 5H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,02, 171,89, 171,74, 156,75, 156,58, 131,70, 131,60, 131,53, 131,51, 128,12, 128,00, 81,37, 81,14, 80,86, 55,50, 55,41, 52,98, 52,31, 45,78, 44,92, 41,50, 32,92, 32,86, 31,21, 27,63, 27,58, 27,55, 26,19, 26,12, 24,85, 11,13.

ESI-HRMS: для C₃₉H₆₆N₄O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 751,4857, найдено: 751,4859; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 785,4467, найдено: 785,4471; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 795,4755, найдено: 795,4757.

Синтез соединения бi

Из соединения **5i** (684 мг, 0,881 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/Н₂O (4/1) в присутствии Ph₃P (462 мг, 1,762 ммоль) было получено соединение **бi** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 77% (508 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,71-6,79 (м, 2H, Ar), 6,56 (м, 1H, Ar), 5,68-5,80 (м, 1H, NH), 5,52-5,60 (м, 1H, NH), 4,42-4,60 (м, 2H, CH₂), 4,23-4,32 (м, 2H, CH), 3,70-3,77 (м, 6H, OCH₃), 3,30-3,54 (м, 3H, CH₂), 3,17-3,22 (м, 1H, CH₂), 3,11-3,12 (м, 1H, CH₂), 2,67-2,79 (м, 1H, CH₂), 2,23-2,41 (м, 4H, CH₂+NH₂), 2,02-2,05 (м, 1H, CH₂), 1,76-1,84 (м, 1H, CH₂), 1,65-1,70 (м, 2H, CH₂), 1,58-1,64 (м, 2H, CH₂), 1,47-1,53 (м, 3H, CH₂), 1,40-1,42 (м, 27H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,26-1,35 (м, 4H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,03, 171,89, 171,83, 153,33, 150,65, 125,57, 118,68, 112,97, 111,90, 111,52, 110,44, 81,50, 81,27, 81,15, 80,89, 79,95, 55,43, 55,28, 55,15, 53,12, 52,92, 52,38, 51,75, 45,02, 40,83, 32,25, 31,24, 29,48, 28,13, 28,03, 27,63, 27,58, 27,56, 26,48, 25,82, 24,10, 22,08.

ESI-HRMS: для C₃₉H₆₆N₄O₁₀: m/z рассчитано для [M+H⁺] 751,4857, найдено: 751,4867; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 785,4467, найдено: 785,4471; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 795,4755, найдено: 795,4756.

Синтез соединения бj

Из соединения **5j** (316 мг, 0,407 ммоль) в 24 мл смеси ТГФ/Н₂O (4/1) в присутствии Ph₃P (214 мг, 0,814 ммоль) было получено соединение **бj** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 79% (240 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,86-7,06 (м, 1H, Ar), 6,41-6,44 (м, 2H, Ar), 5,56-5,99 (м, 2H, NH), 4,36-4,49 (м, 2H, CH₂), 4,22-4,29 (м, 2H, CH), 3,76-3,89 (м, 6H, CH₃), 3,14-3,33 (м, 3H, CH₂), 2,86 (м, 1H, CH₂), 2,69 (м, 7H, CH₂), 2,30-2,35 (м, 5H, CH₂+NH₂), 2,03 (м, 1H, CH₂), 1,75-1,82 (м, 1H, CH₂), 1,61-1,67 (м, 5H, CH₂), 1,40-1,42 (м, 28H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,26 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,55, 172,13, 157,97, 142,24, 121,91, 103,44, 98,17, 97,80, 80,99, 80,14, 80,05, 54,98, 54,80, 53,09, 52,44, 52,36, 50,13, 31,21, 28,04, 27,62, 27,55, 22,13.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_{10}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 751,4857, найдено: 751,4854; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 785,4467, найдено: 785,4471; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 795,4755, найдено: 795,4758.

Синтез соединения **6k**

Из соединения **5k** (423 мг, 0,578 ммоль) в 24 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (300 мг, 1,156 ммоль) было получено соединение **6k** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 63% (256 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6,88-7,04 (м, 2H, Ar), 6,71-6,83 (м, 2H, Ar), 5,51-5,86 (м, 2H, CH), 4,89-5,39 (м, 1H, OH), 4,50-4,86 (м, 2H, NH_2), 4,39-4,54 (м, 1H, CH), 4,29-4,38 (м, 2H, CH_2), 4,18-4,28 (м, 1H, CH), 3,20-3,36 (м, 1H, CH_2), 3,00-3,17 (м, 1H, CH_2), 2,69-2,80 (м, 2H, CH_2), 2,58-2,69 (м, 2H, CH_2), 2,21-2,39 (м, 4H, CH_2), 1,76-2,11 (м, 2H, CH_2), 1,54-1,75 (м, 4H, CH_2), 1,50-1,45 (м, 2H, CH_2), 1,39-1,45 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,03-1,11 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,16, 172,11, 156,22, 131,71, 131,61, 128,19, 127,09, 115,88, 81,31, 81,02, 80,20, 80,09, 53,12, 52,43, 45,45, 39,96, 31,27, 27,64, 27,56, 24,01.

Синтез соединения **6l**

Из соединения **5l** (28,956 г, 38,54 ммоль) в 500 мл смеси ТГФ/ H_2O (4/1) в присутствии Ph_3P (20,217 г, 77,08 ммоль) было получено соединение **6l** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 90% (25,16 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,28 (м, 1H, Ar), 7,21 (д, 2H, Ar), 7,13 (м, 1H, Ar), 5,68 (уш. с, 1H, NH), 5,49 (уш. с, 1H, NH), 4,58-4,48 (м, 2H, CH), 4,31 (м, 2H, CH_2), 3,46-3,17 (м, 2H, CH_2), 2,76-2,73 (м, 2H, CH_2), 2,64-2,59 (м, 6H, CH_2), 2,31 (уш. с, 1H, CH_2), 1,71 (м, 8H, CH_2), 1,43-1,42 (м, 27H, CH_3), 1,10-1,06 (м, 10H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, δ , м.д.): 173,6, 173,0, 172,5, 172,6, 172,4, 157,0, 156,8, 139,2, 130,2, 129,8, 127,9, 127,8, 127,7, 127,4, 126,3, 126,1, 124,2, 82,0, 81,8, 81,5, 80,6, 80,5, 53,4, 53,2, 53,0, 52,8, 50,5, 47,7, 47,1, 46,2, 45,6, 41,9, 41,8, 33,1, 33,0, 32,9, 32,8, 32,1, 31,9, 31,7, 31,4, 28,5, 28,3, 28,1, 28,0, 27,9, 26,7, 26,5, 25,1, 24,9, 22,4, 22,3.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{ClN}_4\text{O}_8$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 725,4251, найдено: 725,4249.

Синтез соединения **6m**

Из соединения **5m** (501 мг, 0,63 ммоль) в 60 мл смеси ТГФ/Н₂О (4/1) в присутствии Ph₃P (331 мг, 1,26 ммоль) было получено соединение **6m** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 78% (376 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 7,51 (м, 2H, Ar), 7,14 (м, 2H, Ar), 6,28 (м, 2H, NH), 4,48 (м, 2H, CH₂), 4,02 (м, 1H, CH), 3,95 (м, 1H, CH), 3,18 (м, 2H, CH₂), 2,34 (т, J = 7,4 Гц, 1H, CH₂), 2,2 (м, 3H, CH₂), 1,85 (м, 1H, CH₂), 1,65 (м, 1H, CH₂), 1,60-1,41 (м, 6H, CH₂), 1,37 (м, 29H, CH₃+CH₂), 1,28 (м, 2H, CH₂), 1,2 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,6, 173,0, 172,9, 172,8, 172,6, 172,5, 157,9, 136,9, 135,8, 131,9, 132,6, 129,6, 128,0, 121,3, 121,0, 81,8, 81,7, 81,5, 81,3, 80,6, 80,5, 53,5, 53,4, 52,9, 50,4, 47,5, 46,9, 45,5, 39,7, 39,4, 32,4, 32,3, 32,0, 31,8, 29,6, 28,3, 28,1, 27,0, 26,6, 26,5, 25,6, 25,3, 24,1, 23,6, 22,5.

ESI-HRMS: для C₃₇H₆₀BrN₄O₈: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 770,3779, найдено: 770,3779.

Общая методика ацилирования янтарным ангидридом

К раствору соединения **6a-m** (1 экв.) в дихлорметане добавили янтарный ангидрид (1,05 экв.) и ДИПЭА (2 экв.) и перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Затем добавили в реакционную смесь метанол (2 экв.) и перемешивали 1 час. Растворитель удаляли при пониженном давлении, полученный остаток растворяли в дихлорметане и промывали дважды 0,1 М раствором соляной кислоты и дважды насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. После этого удаляли растворитель при пониженном давлении с получением целевого соединения **7a-m**.

Синтез соединения 7a

Из соединения **6a** (354 мг, 0,481 ммоль) в 20 мл ДХМ, янтарного ангидрида (51 мг, 0,505 ммоль) в присутствии DIPEA (168 мкл, 0,962 ммоль) было получено соединение **7a** в виде желтого порошка с выходом 38% (153 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,99-8,19 (м, 1H, Ar), 7,70 (т, J = 7,6 Гц, 1H, Ar), 7,49-7,59 (м, 1H, Ar), 7,40 (т, J = 7,8 Гц, 1H, Ar), 6,17 (м, 2H, NH), 4,90-4,91 (м, 2H, CH₂), 4,29-4,36 (м, 2H, CH), 3,45-3,50 (м, 1H, CH₂), 3,26-3,34 (м, 4H, CH₂), 2,69-2,81 (м, 2H, CH₂), 2,60 (т, J = 6,7 Гц, 1H, CH₂), 2,51 (м, 1H, CH₂), 2,43-2,46 (м, 1H, CH₂), 2,23-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,01-2,08 (м, 1H, CH₂), 1,82-1,87 (м, 1H, CH₂), 1,70-1,75 (м, 3H, CH₂), 1,51-1,61 (м, 5H, CH₂), 1,43-1,46 (м, 31H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,29-1,35 (м, 3H, CH₂).

Синтез соединения 7b

Из соединения **6b** (463 мг, 0,630 ммоль) в 20 мл ДХМ, янтарного ангидрида (66 мг, 0,662 ммоль) в присутствии DIPEA (220 мкл, 1,26 ммоль) было получено соединение **7b** в виде желтого порошка с выходом 72% (378 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,02-8,16 (м, 2H, Ar), 7,46-7,58 (м, 2H, Ar), 6,94-7,13 (м, 1H, NH), 5,94 (м, 2H, NH), 4,58-4,72 (м, 2H, CH_2), 4,29-4,34 (м, 2H, CH), 3,33-3,49 (м, 1H, CH_2), 3,25-3,26 (м, 3H, CH_2), 2,64-2,76 (м, 2H, CH_2), 2,50-2,57 (м, 2H, CH_2), 2,40-2,43 (м, 2H, CH_2), 2,26-2,34 (м, 3H, CH_2), 2,00-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,79-1,88 (м, 1H, CH_2), 1,66-1,71 (м, 3H, CH_2), 1,48-1,63 (м, 6H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,24-1,27 (м, 4H, CH_2).

Синтез соединения **7c**

Из соединения **6c** (365 мг, 0,496 ммоль) в 20 мл ДХМ, янтарного ангидрида (52 мг, 0,521 ммоль) в присутствии DIPEA (173 мкл, 0,992 ммоль) было получено соединение **7c** в виде желтого порошка с выходом 88% (365 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,08-8,12 (м, 2H, Ar), 7,36-7,44 (м, 2H, Ar), 6,81 (уш. с., 1H, NH), 5,64-5,74 (м, 3H, NH), 4,44-4,70 (м, 2H, CH_2), 4,25-4,28 (м, 2H, CH), 3,13-3,21 (м, 5H, CH_2), 3,01 (м, 1H, CH_2), 2,60 (м, 1H, CH_2), 2,46 (м, 1H, CH_2), 2,27-2,29 (м, 2H, CH_2), 2,03 (м, 1H, CH_2), 1,79-1,83 (м, 1H, CH_2), 1,66 (м, 2H, CH_2), 1,48 (м, 6H, CH_2), 1,40 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,23-1,30 (м, 6H, CH_2).

Синтез соединения **7d**

Из соединения **6c** (688 мг, 0,870 ммоль) в 30 мл ДХМ, янтарного ангидрида (92 мг, 0,913 ммоль) в присутствии DIPEA (305 мкл, 1,740 ммоль) было получено соединение **7c** в виде белого порошка с выходом 84% (654 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,90-7,98 (м, 2H, Ar), 7,18-7,26 (м, 2H, Ar), 4,57-4,69 (м, 2H, CH_2), 4,31 (м, 2H, CH), 3,18-3,39 (м, 4H, CH_2), 2,56-2,76 (м, 3H, CH_2), 2,33-2,45 (м, 5H, CH_2), 2,05-2,07 (м, 1H, CH_2), 1,81-1,87 (м, 1H, CH_2), 1,63-1,73 (м, 4H, CH_2), 1,58-1,59 (м, 14H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,42-1,44 (м, 31H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,21-1,34 (м, 5H, CH_2).

Синтез соединения **7e**

Из соединения **6e** (343 мг, 0,476 ммоль) в 10 мл ДХМ, янтарного ангидрида (50 мг, 0,500 ммоль) в присутствии DIPEA (166 мкл, 0,952 ммоль) было получено соединение **7e** в виде бесцветного порошка с выходом 83% (324 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,28-7,30 (м, 1H, Ar), 7,11-7,24 (м, 1H, Ar), 6,92-7,00 (м, 2H, Ar), 6,83-6,91 (м, 1H, Ar), 5,96 (уш. с., 1H, NH), 4,48-4,69 (м, 2H, CH_2), 4,27-4,39 (м, 2H, CH), 3,81-3,84 (м, 3H, CH_3), 3,34-3,42 (м, 1H, CH_2), 3,23-3,30 (м, 3H, CH_2), 2,66-2,75 (м, 2H, CH_2), 2,49-2,59 (м, 2H, CH_2), 2,25-2,43 (м, 4H, CH_2), 2,04-2,08 (м, 1H, CH_2),

1,80-1,86 (м, 1H, CH₂), 1,67-1,72 (м, 2H, CH₂), 1,57-1,63 (м, 3H, CH₂), 1,52-1,54 (м, 3H, CH₂), 1,42-1,44 (м, 29H, C(CH₃)₃+ CH₂), 1,32-1,37 (м, 4H, CH₂).

Синтез соединения 7f

Из соединения **6f** (184 мг, 0,255 ммоль) в 10 мл ДХМ, янтарного ангидрида (27 мг, 0,268 ммоль) в присутствии DIPEA (90 мкл, 0,510 ммоль) было получено соединение **7f** в виде бесцветного порошка с выходом 80% (168 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,04-7,14 (м, 2H, Ar), 6,81-6,89 (м, 2H, Ar), 5,94 (м, 1H, NH), 4,42-4,55 (м, 2H, CH₂), 4,27-4,36 (м, 2H, CH), 3,77-3,79 (м, 3H, OCH₃), 3,36 (т, J = 6,8 Гц, 1H, CH₂), 3,26-3,27 (м, 2H, CH₂), 3,16 (м, 1H, CH₂), 2,69-2,74 (м, 1H, CH₂), 2,49-2,58 (м, 2H, CH₂), 2,34-2,37 (м, 2H, CH₂), 2,25-2,32 (м, 2H, CH₂), 2,05-2,07 (м, 1H, CH₂), 1,83-1,87 (м, 1H, CH₂), 1,59-1,72 (м, 4H, CH₂), 1,50-1,54 (м, 4H, CH₂), 1,42-1,44 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,31-1,37 (м, 4H, CH₂).

Синтез соединения 7g

Из соединения **6g** (187 мг, 0,254 ммоль) в 10 мл ДХМ, янтарного ангидрида (27 мг, 0,267 ммоль) в присутствии DIPEA (89 мкл, 0,508 ммоль) было получено соединение **7g** в виде бесцветного порошка с выходом 95% (201 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,02-7,10 (м, 2H, Ar), 6,79-6,90 (м, 2H, Ar), 5,71 (уш. с., 1H, NH), 5,27-5,28 (м, 1H, NH), 4,42-4,47 (м, 2H, CH₂), 4,26-4,31 (м, 2H, CH), 3,98-3,99 (м, 2H, CH₂), 3,25-3,32 (м, 3H, CH₂), 3,12 (м, 1H, CH₂), 2,62-2,68 (м, 2H, CH₂), 2,50-2,53 (м, 1H, CH₂), 2,29-2,34 (м, 4H, CH₂), 2,03 (м, 1H, CH₂), 1,81 (м, 1H, CH₂), 1,61-1,66 (м, 4H, CH₂), 1,50 (м, 4H, CH₂), 1,41 (м, 31H, C(CH₃)₃+ CH₂), 1,30 (м, 4H, CH₂).

Синтез соединения 7h

Из соединения **6h** (608 мг, 0,810 ммоль) в 25 мл ДХМ, янтарного ангидрида (85 мг, 0,850 ммоль) в присутствии DIPEA (285 мкл, 1,62 ммоль) было получено соединение **7h** в виде бесцветного порошка с выходом 72% (494 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 6,72-6,85 (м, 2H, Ar), 6,63-6,67 (м, 1H, Ar), 5,96 (уш. с., 1H, NH), 4,41-4,60 (м, 2H, CH₂), 4,28-4,38 (м, 2H, CH), 3,83-3,87 (м, 6H, CH₃), 3,36-3,40 (м, 1H, CH₂), 3,27 (м, 2H, CH₂), 3,15-3,19 (м, 1H, CH₂), 2,70-2,74 (м, 2H, CH₂), 2,50-2,59 (м, 2H, CH₂), 2,26-2,40 (м, 4H, CH₂), 2,04-2,07 (м, 1H, CH₂), 1,83-1,87 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,74 (м, 2H, CH₂), 1,60-1,67 (м, 3H, CH₂), 1,52-1,56 (м, 3H, CH₂), 1,42-1,44 (м, 29H, C(CH₃)₃+ CH₂), 1,32-1,38 (м, 4H, CH₂).

Синтез соединения 7i

Из соединения **6i** (454 мг, 0,605 ммоль) в 20 мл ДХМ, янтарного ангидрида (64 мг, 0,635 ммоль) в присутствии DIPEA (210 мкл, 1,210 ммоль) было получено соединение **7i** в виде белого порошка с выходом 85% (410 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6,58-6,78 (м, 3H, Ar), 5,82 (м, 1H, NH), 4,44-4,56 (м, 2H, CH_2), 4,25-4,35 (м, 2H, CH), 3,72-3,78 (м, 6H, OCH_3), 3,22-3,38 (м, 4H, CH_2), 2,49-2,72 (м, 3H, CH_2), 2,28-2,41 (м, 4H, CH_2), 2,05-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,81-1,85 (м, 1H, CH_2), 1,67-1,71 (м, 3H, CH_2), 1,51-1,61 (м, 5H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,24-1,33 (м, 4H, CH_2).

Синтез соединения 7j

Из соединения **6j** (204 мг, 0,272 ммоль) в 20 мл ДХМ, янтарного ангидрида (29 мг, 0,286 ммоль) в присутствии DIPEA (85 мкл, 0,544 ммоль) было получено соединение **7j** в виде бесцветного порошка с выходом 86% (200 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 6,90-7,12 (м, 1H, Ar), 6,46 (м, 2H, Ar), 4,42-4,52 (м, 2H, CH_2), 4,26-4,33 (м, 2H, CH), 3,80-3,90 (м, 6H, CH_3), 3,33-3,35 (м, 3H, CH_2), 2,72 (м, 1H, CH_2), 2,62-2,63 (м, 1H, CH_2), 2,51 (м, 2H, CH_2), 2,31-2,33 (м, 2H, CH_2), 2,06 (м, 1H, CH_2), 1,86 (м, 1H, CH_2), 1,71 (м, 4H, CH_2), 1,54 (м, 3H, CH_2), 1,42-1,44 (м, 28H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,24 (м, 5H, CH_2).

Синтез соединения 7k

Из соединения **6k** (250 мг, 0,354 ммоль) в 25 мл ДХМ, янтарного ангидрида (37 мг, 0,372 ммоль) в присутствии DIPEA (123 мкл, 0,708 ммоль) было получено соединение **7f** в виде бесцветного порошка с выходом 63% (180 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,04-7,14 (м, 2H, Ar), 6,81-6,89 (м, 2H, Ar), 5,94 (м, 1H, NH), 4,42-4,55 (м, 2H, CH_2), 4,27-4,36 (м, 2H, CH), 3,36 (т, $J = 6,8$ Гц, 1H, CH_2), 3,26-3,27 (м, 2H, CH_2), 3,16 (м, 1H, CH_2), 2,69-2,74 (м, 1H, CH_2), 2,49-2,58 (м, 2H, CH_2), 2,34-2,37 (м, 2H, CH_2), 2,25-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,05-2,07 (м, 1H, CH_2), 1,83-1,87 (м, 1H, CH_2), 1,59-1,72 (м, 4H, CH_2), 1,50-1,54 (м, 4H, CH_2), 1,42-1,44 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,31-1,37 (м, 4H, CH_2).

Синтез соединения 7l

Из соединения **6l** (889 мг, 1,226 ммоль) в 75 мл ДХМ, янтарного ангидрида (129 мг, 1,287 ммоль) в присутствии DIPEA (427 мкл, 2,452 ммоль) было получено соединение **7l** в виде желтоватого порошка с выходом 96% (972 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,06 (уш. с, 1H, COOH), 7,72-7,88 (м, 1H, NH), 7,27-7,43 (м, 2H, Ar), 7,24 (с, 1H, Ar), 7,16 (д, $J = 7,40$ Гц, 1H, Ar), 6,22-6,34 (м, 2H, NH), 4,56 (с, 1H, CH_2), 4,48 (с, 1H, CH_2), 3,89-4,08 (м, 2H, CH), 3,14-3,25 (м, 2H, CH_2), 2,92-3,06 (м, 2H, CH_2), 2,32-2,44 (м, 4H, CH_2), 2,14-2,32 (м, 6H, CH_2), 1,79-1,91 (м, 1H, CH_2), 1,42-1,70 (м, 7H, CH_2), 1,33-1,41 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,14-1,33 (м, 6H, CH_2).

Синтез соединения 7m

Из соединения **6m** (365 мг, 0,474 ммоль) в 35 мл ДХМ, янтарного ангидрида (50 мг, 0,498 ммоль) в присутствии DIPEA (165 мкл, 0,948 ммоль) было получено соединение **7m** в виде желтоватого порошка с выходом 86% (355 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,43 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, Ar), 7,37 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, Ar), 7,06 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H, Ar), 7,00 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, Ar), 6,24-6,21 (м, 1H, NH), 6,18 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, NH), 4,51-4,41 (м, 2H, CH_2), 4,27-4,20 (м, 2H, CH), 3,39-3,34 (м, 1H, CH_2), 3,28-3,17 (м, 1H, CH_2), 2,50 (уш. с, 2H, CH_2), 2,42-2,33 (м, 1H, CH_2), 2,32-2,24 (м, 3H, CH_2), 2,04-1,97 (м, 1H, CH_2), 1,85-1,78 (м, 3H, CH_2), 1,71-1,66 (м, 2H, CH_2), 1,64-1,58 (м, 2H, CH_2), 1,55-1,44 (м, 4H, CH_2), 1,43-1,42 (м, 2H, CH_2), 1,39-1,38 (с, 29H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 1,31-1,24 (м, 2H, CH_2).

Общая методика получения Вос-защищённых дипептидов **9a-b**

EDC*HCl (1,12 экв.) и пентафторфенол (1,12 экв.) добавили к раствору Вос-фенилаланина (1 экв.) в дихлорметане. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Добавили силикагель (10-кратный избыток относительно Вос-фенилаланина) и полученную суспензию хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент: дихлорметан). Продукт выделяли осаждением смесью петролейного эфира и хлороформа (1:1) при охлаждении на ледяной бане. Полученное соединение **8** без дополнительной очистки растворяли в смеси ТГФ с водой (5:1) и добавляли аминокислоту (*L*-фенилаланин или *L*-тирозин, 2 экв.), ДИПЭА (2 экв.) и перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Водный остаток подкисляли 1 М раствором HCl до pH = 2 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали насыщенными растворами NaHCO_3 и NaCl, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Полученное вещество растворяли в минимальном количестве диэтилового эфира и осаждали равным объемом петролейного эфира.

Синтез (*трет*-бутоксикарбонил)-*L*-фенилаланин-*L*-фенилаланина (соединение **9a**)

Из (*трет*-бутоксикарбонил)-*L*-фенилаланина (7,282 г, 27,46 ммоль) в 100 мл ДХМ, пентафторфенола (5,66 г, 30,76 ммоль) и EDC*HCl (5,90 г, 30,76 ммоль) было получено соединение **8**. Из соединения **8** и *L*-фенилаланина (9,07 г, 54,92 ммоль) в присутствии DIPEA (9,6 мл, 54,92 ммоль) было получено соединение **9a** в виде бесцветного маслянистого вещества с суммарным выходом 49% (5,55 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, δ , м.д.): 8,25-8,34 (м, 1H, NH), 7,09-7,27 (м, 10H, Ar), 6,70-6,75 (м, 1H, NH), 4,42-4,52 (м, 1H, CH), 3,98-4,21 (м, 1H, CH), 3,01-3,13 (м, 2H, CH_2), 2,79-2,90 (м, 2H, CH_2), 1,30 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 172,89, 171,50, 155,10, 138,14, 138,14, 137,43, 137,20, 129,29, 129,21, 128,17, 127,92, 126,51, 126,10, 77,93, 55,37, 53,31, 28,15.

Синтез (*трет*-бутоксикарбонил)-*L*-фенилаланин-*L*-тирозина (соединение 9b)

Из (*трет*-бутоксикарбонил)-*L*-фенилаланина (7,08 г, 26,69 ммоль) в 100 мл ДХМ, пентафторфенола (5,50 г, 29,89 ммоль) и EDC*HCl (5,73 г, 29,89 ммоль) было получено соединение **8**. Из соединения **8** и *L*-тирозина (9,67 г, 53,38 ммоль) в присутствии DIPEA (9,3 мл, 53,38 ммоль) было получено соединение **9b** в виде бесцветного маслянистого вещества с суммарным выходом 58% (6,63 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 9,19 (уш. с., 1H, OH), 8,19-8,21 (м, 1H, NH), 7,09-7,29 (м, 5H, Ar), 6,95-7,05 (м, 2H, Ar), 6,74 (д, $J=8,74$ Гц, 1H, NH), 6,58-6,65 (м, 2H, Ar), 4,32-4,44 (м, 1H, CH), 4,04-4,22 (м, 1H, CH), 2,89-2,99 (м, 2H, CH_2), 2,69-2,78 (м, 2H, CH_2), 1,33 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 172,45, 170,86, 155,43, 154,54, 137,61, 129,65, 128,67, 128,55, 127,60, 127,37, 126,79, 125,54, 114,39, 77,38, 54,84, 53,05, 27,58.

Общая методика ацилирования 3-азидопропиламина

Вос-защищённый дипептид (1 экв.) растворили в ДМФА и полученную смесь охладили до 0°C. Затем в строгом порядке добавили 3-азидопропиламин (1,5 экв.), HOBT (1,2 экв.), ДИПЭА (2 экв.) и HBTU (1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток растворяли в ДХМ и промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (два раза), водой (два раза) и насыщенным раствором хлорида натрия (один раз). Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии с элюентом хлористый метилен/метанол.

Синтез *трет*-бутил ((*S*)-1-(((*S*)-1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (соединение 10a)

Из соединения **9a** (3,97 г, 9,62 ммоль) в 70 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (1,44 г, 14,43 ммоль), HOBT (1,56 г, 11,54 ммоль) и HBTU (4,38 г, 11,54 ммоль) в присутствии DIPEA (3,4 мл, 19,24 ммоль) было получено соединение **10a** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 75% (3,57 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,29-7,35 (м, 3H, Ar), 7,22-7,24 (м, 3H, Ar), 7,17 (д, $J=6,7$ Гц, 2H, Ar), 7,01 (м, 2H, Ar), 6,44 (уш. с., 2H, NH), 4,94 (д, $J=5,2$ Гц, 1H, NH), 4,65 (д, $J=6,5$ Гц, 1H, CH), 4,28 (q, $J=6$ Гц, 1H, CH), 3,21-3,31 (м, 2H, CH_2), 3,17 (т, $J=6,6$ Гц, 2H, CH_2), 3,05-3,12 (м, 2H, CH_2), 2,99-3,04 (м, 1H, CH_2), 2,82-2,88 (м, 1H, CH_2), 1,63 (quin, $J=6,7$ Гц, 2H, CH_2), 1,30 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 170,53, 170,00, 155,42, 135,75, 135,55, 128,86, 128,81, 128,45, 128,31, 126,90, 126,73, 80,37, 59,99, 55,80, 53,22, 48,37, 36,34, 36,82, 28,02, 27,69.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_4$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 495,2714, найдено: 495,2725; m/z рассчитано для $[\text{M}-\text{H}^-]$ 493,2558, найдено: 493,2560.

Синтез трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (соединение 10b)

Из соединения **9b** (1 г, 2,33 ммоль) в 40 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (350 мг, 3,495 ммоль), NOt (378 мг, 2,796 ммоль) и NBtU (1,06 г, 2,796 ммоль) в присутствии DIPEA (812 мкл, 4,66 ммоль) было получено соединение **10b** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 66% (785 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,28-7,32 (м, 2H, Ar), 7,15 (т, $J = 6,2$ Гц, 3H, Ar), 6,82 (с, 2H, Ar), 6,72 (д, $J = 8,5$ Гц, 2H, Ar), 5,25 (д, $J = 6,6$ Гц, 1H, NH), 5,03 (м, 1H, NH), 4,57 (м, 1H, CH), 4,27 (дд, $J = 6,0$ Гц, 1H, CH), 3,27 (дд, $J = 13,2$ Гц, 6,7 Гц, 2H, CH_2), 3,09-3,21 (м, 2H, CH_2), 3,03 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H, CH_2), 2,69-2,80 (м, 1H, CH_2), 2,54 (м, 1H, CH_2), 1,61-1,67 (м, 3H, CH_2), 1,30 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 171,28, 170,93, 155,60, 130,36, 129,28, 129,20, 128,90, 128,81, 128,04, 127,37, 126,67, 115,78, 80,37, 36,95, 36,92, 36,63, 28,37, 28,22, 28,22, 28,09, 27,69.

Общая методика удаления Вос-защитной группы

Вос-защищённое соединение **10** растворили в 10% растворе ТФУ в хлористом метиле и перемешивали 6 часов. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток переупарили из ДХМ несколько раз. Продукт выделяли высаживанием из диэтилового эфира.

Синтез трифторацетата ((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амин (соединение 11a)

Из соединения **10a** (2,71 г, 5,483 ммоль) было получено соединение **11a** в виде белого аморфного порошка с выходом 81% (2,26 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,87 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, NH), 8,16 (с, 4H, $\text{NH}+\text{NH}_3^+$), 7,18-7,30 (м, 10H, Ph), 4,48 (q, $J = 7,6$ Гц, 1H, CH), 4,04 (уш,с., 1H, CH), 3,15 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H, CH_2), 3,05-3,12 (м, 2H, CH_2), 2,98-3,03 (м, 1H, CH_2), 2,91-2,97 (м, 2H, CH_2), 2,83-2,88 (м, 1H, CH_2), 1,49-1,56 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 170,09, 167,76, 137,29, 134,75, 129,62, 129,22, 128,47, 128,23, 127,12, 126,51, 54,51, 53,13, 48,12, 38,05, 36,94, 35,71, 28,21.

ESI-HRMS: для $C_{21}H_{26}N_6O_2$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 395,2195, найдено: 395,2200; m/z рассчитано для $[M-H^-]$ 393,2039, найдено: 393,2044.

Синтез трифторацетата (*S*)-1-(((*S*)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амин (соединение 11b)

Из соединения **10b** (2,31 г, 4,527 ммоль) было получено соединение **11b** в виде белого аморфного порошка с выходом 85% (2,02 г).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 8,11 (м, 4H, $NH+NH_3^+$), 7,22-7,28 (м, 5H, Ar), 7,00 (д, $J = 8,1$ Гц, 2H, Ar), 6,64 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H, Ar), 4,40 (q, $J = 7,4$ Гц, 1H, CH), 4,02 (м, 1H, CH), 3,20 (т, $J = 6,7$ Гц, 2H, CH_2), 2,98-3,15 (м, 3H, CH_2), 2,90-2,96 (м, 1H, CH_2), 2,80-2,85 (м, 1H, CH_2), 2,70-2,75 (м, 1H, CH_2), 1,52-1,59 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 170,31, 167,88, 156,05, 134,75, 130,10, 129,62, 128,47, 127,25, 127,12, 115,02, 109,74, 64,95, 54,84, 53,14, 48,15, 37,32, 36,95, 35,72, 28,25, 15,18.

ESI-HRMS: для $C_{21}H_{26}N_6O_3$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 411,2145, найдено: 411,2141; m/z рассчитано для $[M-H^-]$ 409,1988, найдено: 409,1994.

Общая методика синтеза защищённых лигандов 12a-k и 13a-d

Векторный фрагмент (1 моль) растворили в ДМФА и добавили HBTU (1,5 моль), HOBT (1,5 моль), DIPEA (2 моль) и перемешивали 2 часа. Далее добавляли модифицированный дипептид (1,2 моль) и перемешивали 16 часов. После окончания реакции удалили растворитель, сухой остаток растворили в хлористом метиле и промыли дважды водой и насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фракцию сушили над Na_2SO_4 . Удалили растворитель при пониженном давлении. Дальнейшую очистку проводили с помощью метода колоночной хроматографии с элюентом хлористый метил/метанол.

Синтез соединения 12a

Из соединения **7a** (138 мг, 0,165 ммоль), соединения **11a** (101 мг, 0,198 ммоль), DIPEA (58 мкл, 0,330 ммоль) в 5 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (94 мг, 0,248 ммоль) и HOBT (33 мг, 0,248 ммоль) было получено соединение **12a** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 55% (110 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 7,13-7,23 (м, 10H, Ar), 6,99-7,03 (м, 4H, Ar), 4,82-4,86 (м, 3H, CH_2), 4,53-4,68 (м, 4H, CH_2), 4,31 (м, 3H, CH), 4,30-4,31 (м, 2H, $CH+CH_2$), 3,24-3,29 (м, 3H, CH_2), 3,20-3,22 (м, 2H, CH_2), 3,15-3,19 (м, 3H, CH_2), 3,10-3,11 (м, 2H, CH_2), 2,93-3,01 (м, 3H, CH_2), 2,71-2,75 (м, 1H, CH_2), 2,57-2,68 (м, 2H, CH_2), 2,33-2,39 (м,

4H, CH₂), 2,23-2,31 (м, 3H, CH₂), 2,14-2,18 (м, 1H, CH₂), 2,00-2,03 (м, 2H, CH₂) 1,78-1,85 (м, 2H, CH₂), 1,63-1,70 (м, 4H, CH₂), 1,47-1,58 (м, 6H, CH₂), 1,38-1,40 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,84, 173,38, 172,50, 172,47, 172,44, 172,35, 171,33, 171,28, 171,17, 171,15, 157,13, 157,08, 148,46, 147,70, 137,73, 136,21, 136,16, 134,36, 133,54, 133,26, 133,12, 129,14, 128,97, 128,67, 128,35, 127,90, 127,22, 126,94, 126,53, 125,82, 124,98, 82,02, 81,91, 81,87, 80,56, 80,50, 55,25, 54,83, 53,35, 53,10, 52,87, 52,75, 48,72, 48,17, 46,16, 39,22, 38,61, 37,20, 36,61, 33,08, 32,61, 32,42, 32,28, 31,66, 31,50, 30,95, 28,69, 28,49, 28,35, 28,04, 28,01, 27,98, 26,90, 26,30, 26,19, 24,29, 24,15, 22,48, 22,42.

ESI-HRMS: для C₆₂H₈₉N₁₁O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1212,6663, найдено: 1212,6644; m/z рассчитано для [M+Na⁺] 1249,6483, найдено: 1249,6454; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 1246,6274, найдено: 1246,6289; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 1256,6562, найдено: 1256,6571.

Синтез соединения 12b

Из соединения **7b** (200 мг, 0,239 ммоль), соединения **11a** (146 мг, 0,287 ммоль), DIPEA (83 мкл, 0,478 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (136 мг, 0,359 ммоль) и HOBT (48 мг, 0,359 ммоль) было получено соединение **12b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 65% (190 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,04-8,12 (м, 2H, Ar), 7,78-7,83 (м, 1H, NH), 7,21 (т, J = 3,9 Гц, 3H, Ar), 7,14-7,19 (м, 4H, CH₂), 6,98-7,02 (м, 3H, Ar), 5,62-5,66 (м, 3H, NH), 4,62-4,70 (м, 2H, CH₂), 4,56-4,58 (м, 2H, CH₂), 4,49-4,59 (м, 1H, CH), 4,26-4,32 (м, 3H, CH), 3,24-3,34 (м, 4H, CH₂), 3,11-3,23 (м, 6H, CH₂), 2,94-3,05 (м, 3H, CH₂), 2,61-2,74 (м, 3H, CH₂), 2,33-2,46 (м, 4H, CH₂), 2,20-2,30 (м, 5H, CH₂), 1,99-2,07 (м, 2H, CH₂), 1,76-1,86 (м, 2H, CH₂), 1,66-1,72 (м, 4H, CH₂), 1,49-1,62 (м, 6H, CH₂), 1,39-1,41 (м, 29H, C(CH₃)₃+CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173,24, 172,46, 172,40, 172,36, 171,37, 171,13, 157,06, 148,36, 140,21, 136,19, 133,85, 129,55, 129,14, 128,92, 128,67, 128,35, 126,95, 126,50, 122,25, 122,13, 82,03, 81,91, 80,57, 55,28, 54,86, 53,43, 52,98, 52,89, 48,74, 39,30, 38,62, 37,02, 36,62, 31,60, 28,64, 28,51, 28,04, 28,00, 27,97, 26,25, 24,43, 22,36.

ESI-HRMS: для C₆₂H₈₉N₁₁O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1212,6663, найдено: 1212,6599; m/z рассчитано для [M+Na⁺] 1249,6483, найдено: 1249,6426; m/z рассчитано для [M+Cl⁻] 1246,6274, найдено: 1246,6289; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 1256,6562, найдено: 1256,6572.

Синтез соединения 12c

Из соединения **7c** (200 мг, 0,239 ммоль), соединения **11a** (146 мг, 0,287 ммоль), DIPEA (83 мкл, 0,478 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (146 мг,

0,359 ммоль) и НОВt (48 мг, 0,359 ммоль) было получено соединение **12c** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 36% (104 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,82 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H, NH), 7,13-7,21 (м, 7H, Ar), 7,05-7,16 (м, 2H, Ar), 6,97-7,01 (м, 2H, Ar), 6,67-6,76 (м, 3H, Ar), 6,52-6,61 (м, 2H, NH), 4,47-4,67 (м, 4H, CH_2), 4,35-4,43 (м, 2H, CH), 4,30-4,31 (м, 3H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,23-3,30 (м, 4H, CH_2), 3,12-3,20 (м, 5H, CH_2), 2,91-3,3,03 (м, 3H, CH_2), 2,64-2,73 (м, 2H, CH_2), 2,19-2,36 (м, 7H, CH_2), 1,99-2,04 (м, 2H, CH_2), 1,78-1,80 (м, 2H, CH_2), 1,65-1,69 (м, 3H, CH_2), 1,53-1,62 (м, 3H, CH_2), 1,43-1,52 (м, 4H, CH_2), 1,39-1,38 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,22, 172,78, 172,15, 172,03, 171,93, 170,94, 156,75, 146,69, 145,26, 144,22, 137,27, 135,81, 128,74, 128,58, 128,23, 127,95, 127,91, 126,51, 126,14, 123,75, 123,34, 81,62, 81,47, 80,16, 77,02, 76,70, 76,38, 54,78, 54,62, 54,43, 53,06, 52,44, 48,28, 47,82, 47,24, 38,83, 36,85, 36,20, 32,47, 32,06, 31,22, 30,67, 29,23, 28,42, 28,19, 28,06, 27,62, 27,59, 27,56, 25,98, 25,91, 24,08, 23,97, 21,95.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{62}\text{H}_{89}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1212,6624, найдено: 1212,665.

Синтез соединения **12d**

Из соединения **7d** (300 мг, 0,337 ммоль), соединения **11a** (206 мг, 0,404 ммоль), DIPEA (117 мкл, 0,674 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов НВТУ (192 мг, 0,506 ммоль) и НОВt (68 мг, 0,506 ммоль) было получено соединение **12d** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 39% (167 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,89-7,91 (м, 2H, Ar), 7,83-7,86 (м, 2H, Ar), 7,10-7,19 (м, 8H, Ar), 6,98-6,99 (м, 2H, Ar), 4,48-4,65 (м, 6H, CH_2), 4,27-4,29 (м, 3H, CH), 3,24-3,29 (м, 3H, CH_2), 3,13-3,22 (м, 4H, CH_2), 3,03-3,3,12 (м, 4H, CH_2), 2,86-2,99 (м, 4H, CH_2), 2,59-2,73 (м, 4H, CH_2), 2,45-2,53 (м, 2H, CH_2), 2,21-2,32 (м, 8H, CH_2), 1,98-2,00 (м, 2H, CH_2), 1,76-1,77 (м, 2H, CH_2), 1,63-1,69 (м, 4H, CH_2), 1,55-1,60 (м, 2H, CH_2), 1,51-1,52 (м, 10H, CH_2), 1,41-1,48 (м, 5H, CH_2), 1,41-1,45 (м, 32H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 167,74, 167,31, 167,27, 167,10, 167,05, 166,19, 166,04, 160,28, 160,07, 151,94, 132,84, 132,76, 131,06, 125,72, 124,80, 124,44, 123,92, 123,88, 123,69, 123,44, 123,11, 122,33, 122,17, 121,69, 121,24, 120,71, 76,65, 76,52, 76,18, 75,98, 75,76, 75,27, 49,66, 48,25, 47,64, 47,52, 43,51, 40,60, 31,76, 31,39, 27,78, 26,40, 24,42, 23,67, 23,44, 23,31, 22,93, 22,82, 22,79, 22,75, 21,08, 19,13.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{67}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1267,7337, найдено: 1267,7314; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 1301,6947, найдено: 1301,6959; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 1311,7235, найдено: 1311,7244.

Синтез соединения **12e**

Из соединения **7e** (200 мг, 0,241 ммоль), соединения **11a** (147 мг, 0,289 ммоль), DIPEA (84 мкл, 0,482 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (137 мг, 0,362 ммоль) и HOBT (49 мг, 0,362 ммоль) было получено соединение **12e** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 62% (182 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,96 (уш. с., 1H, NH), 7,21-7,24 (м, 5H, Ar), 7,14-7,18 (м, 5H, Ar), 7,09 (уш. с., 1H, NH), 7,01-7,02 (м, 2H, NH), 6,89-6,95 (м, 2H, Ar), 6,79-6,87 (м, 2H, Ar), 5,78-5,92 (м, 2H, NH), 4,65-4,71 (м, 1H, CH), 4,53 (м, 2H, CH), 4,43 (м, 1H, CH), 4,24-4,33 (м, 2H, CH), 3,76-3,79 (м, 3H, OCH_3), 3,26-3,29 (м, 4H, CH_2), 3,08-3,22 (м, 6H, CH_2), 2,94-3,04 (м, 2H, CH_2), 2,71-2,76 (м, 1H, CH_2), 2,60-2,70 (м, 2H, CH_2), 2,41-2,42 (м, 1H, CH_2), 2,27-2,37 (м, 6H, CH_2), 2,00-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,78-1,83 (м, 1H, CH_2), 1,67-1,72 (м, 3H, CH_2), 1,54-1,61 (м, 3H, CH_2), 1,47-1,50 (м, 3H, CH_2), 1,41-1,44 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,23-1,32 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,22, 172,07, 172,02, 171,95, 171,05, 156,85, 156,55, 137,56, 135,93, 128,72, 128,53, 128,24, 127,92, 126,49, 126,14, 126,06, 124,12, 120,15, 109,75, 81,41, 81,01, 80,07, 54,98, 54,81, 54,74, 54,50, 53,06, 52,34, 48,31, 46,22, 38,19, 36,63, 36,20, 36,11, 32,22, 31,25, 31,02, 28,32, 28,08, 27,63, 27,59, 27,56, 26,47, 25,83, 23,97, 22,07.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}^+]$ 1197,6918, найдено: 1197,6968; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 1219,6738, найдено: 1219,6810; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{HCOO}^-]$ 1241,6827, найдено: 1241,6816.

Синтез соединения **12f**

Из соединения **7f** (168 мг, 0,205 ммоль), соединения **11a** (125 мг, 0,246 ммоль), DIPEA (71 мкл, 0,410 ммоль) в 5 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (117 мг, 0,308 ммоль) и HOBT (42 мг, 0,308 ммоль) было получено соединение **12f** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 42% (104 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,94 (уш. с., 1H, NH), 7,17-7,24 (м, 6H, Ar), 7,02-7,12 (м, 4H, Ar), 6,79-6,86 (м, 3H, Ar), 6,65 (м, 1H, Ar), 5,57-5,83 (м, 2H, NH), 4,62-4,68 (м, 1H, CH), 4,41-4,51 (м, 3H, $\text{CH} + \text{CH}_2$), 4,25-4,32 (м, 2H, CH), 3,75-3,77 (м, 3H, OCH_3), 3,28-3,32 (м, 3H, CH_2), 3,08-3,21 (м, 5H, CH_2), 2,94-3,05 (м, 2H, CH_2), 2,74-2,82 (м, 1H, CH_2), 2,62-2,70 (м, 1H, CH_2), 2,42-2,43 (м, 1H, CH_2), 2,23-2,32 (м, 5H, CH_2), 2,00-2,08 (м, 1H, CH_2), 1,76-1,83 (м, 1H, CH_2), 1,63-1,69 (м, 4H, CH_2), 1,56-1,61 (м, 2H, CH_2), 1,47-1,50 (м, 4H, CH_2), 1,41-1,45 (м, 32H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,24-1,35 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,07, 171,91, 171,15, 156,66, 128,72, 128,51, 128,29, 127,99, 127,09, 113,87, 113,52, 110,32, 81,54, 81,31, 81,05, 55,30, 54,87, 54,82,

54,16, 53,04, 50,08, 48,27, 36,21, 32,48, 31,23, 31,18, 30,61, 29,17 28,26, 28,04, 27,64, 27,59, 27,56, 26,32, 19,99.

ESI-HRMS: для $C_{63}H_{92}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1197,6918, найдено: 1197,6885; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1219,6738, найдено: 1219,6716; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 1231,6528, найдено: 1231,6544; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 1241,6816, найдено: 1241,6825.

Синтез соединения **12g**

Из соединения **7g** (221 мг, 0,265 ммоль), соединения **11a** (162 мг, 0,318 ммоль), DIPEA (92 мкл, 0,530 ммоль) в 10 мл диметилформаида в присутствии реагентов HBTU (151 мг, 0,398 ммоль) и HOBT (54 мг, 0,398 ммоль) было получено соединение **12g** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 35% (113 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 7,15-7,26 (м, 9H, Ar), 6,99-7,09 (м, 3H, Ar), 6,77-6,83 (м, 2H, Ar), 5,66-5,93 (м, 2H, NH), 4,60-4,68 (м, 1H, CH_2), 4,27-4,52 (м, 4H, $CH+CH_2$), 3,94-3,98 (м, 2H, CH_2), 3,14-3,25 (м, 6H, CH_2), 3,07-3,12 (м, 2H, CH_2), 2,92-3,04 (м, 3H, CH_2), 2,71-2,84 (м, 2H, CH_2), 2,61-2,63 (м, 2H, CH_2), 2,29-2,40 (м, 5H, CH_2), 2,02-2,03 (м, 1H, CH_2), 1,81 (м, 1H, CH_2), 1,64-1,68 (м, 3H, CH_2), 1,56-1,59 (м, 4H, CH_2), 1,39-1,41 (м, 27H, $C(CH_3)_3+CH_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 171,94, 171,07, 170,93, 156,83, 136,15, 128,88, 128,69, 128,52, 128,26, 128,10, 127,95, 127,05, 126,51, 126,09, 114,38, 114,03, 81,40, 81,06, 80,08, 63,06, 54,51, 52,31, 48,37, 48,30, 43,40, 38,70, 36,22 32,50, 31,21, 29,24, 28,06, 27,63, 27,59, 27,56, 26,40, 22,06, 14,40.

ESI-HRMS: для $C_{64}H_{94}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1211,7075, найдено: 1211,7024; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1233,6894, найдено: 1233,6877; m/z рассчитано для $[M+Cl]^-$ 1245,6685, найдено: 1245,6698; m/z рассчитано для $[M+HCOO]^-$ 1255,6973, найдено: 1255,6984.

Синтез соединения **12h**

Из соединения **7h** (200 мг, 0,235 ммоль), соединения **11a** (143 мг, 0,282 ммоль), DIPEA (82 мкл, 0,470 ммоль) в 10 мл диметилформаида в присутствии реагентов HBTU (134 мг, 0,353 ммоль) и HOBT (48 мг, 0,353 ммоль) было получено соединение **12h** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 55% (160 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 7,81 (уш. с., 1H, NH), 7,22-7,24 (м, 4H, Ar), 7,17-7,20 (м, 4H, Ar), 7,09 (уш. с., 1H, NH), 7,03-7,05 (м, 2H, Ar), 7,00 (м, 1H, NH), 6,70-6,82 (м, 2H, Ar), 6,62-6,65 (м, 1H, Ar), 5,69-5,88 (м, 2H, NH), 4,69 (м, 1H, CH), 4,50-4,57 (м, 1H, CH), 4,43-4,47 (м, 2H, CH_2), 4,28-4,39 (м, 2H, CH), 3,81-3,84 (м, 6H, OCH_3), 3,28-3,31 (м, 5H, CH_2), 3,14-3,23 (м, 5H, CH_2), 2,96-3,08 (м, 2H, CH_2), 2,65-2,80 (м, 3H, CH_2), 2,41-2,49 (м,

^1H , CH_2), 2,24-2,36 (м, 6H, CH_2), 2,01-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,78-1,88 (м, 1H, CH_2), 1,66-1,74 (м, 4H, CH_2), 1,57-1,64 (м, 2H, CH_2), 1,48-1,51 (м, 4H, CH_2), 1,41-1,44 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,26-1,37 (м, 5H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172,11, 171,98, 171,00, 156,58, 135,74, 128,74, 128,55, 128,30, 127,99, 126,60, 126,14, 119,81, 117,82, 111,02, 110,91, 109,05, 81,50, 81,12, 80,16, 55,52, 55,49, 55,46, 54,48, 53,02, 52,38, 48,34, 36,71, 36,26, 32,36, 32,08, 31,67, 31,27, 31,19, 30,97, 28,27, 28,09, 27,64, 27,61, 27,58.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{64}\text{H}_{94}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1227,7024, найдено: 1227,6990; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1249,6843, найдено: 1249,6799; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 1261,6634, найдено: 1261,6647; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 1271,6922, найдено: 1271,6932.

Синтез соединения 12i

Из соединения **7i** (200 мг, 0,235 ммоль), соединения **11a** (143 мг, 0,235 ммоль), DIPEA (82 мкл, 0,470 ммоль) в 10 мл диметилформаида в присутствии реагентов HBTU (134 мг, 0,353 ммоль) и HOBT (48 мг, 0,353 ммоль) было получено соединение **12i** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 33% (96 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,13-7,21 (м, 7H, Ar), 6,97-7,01 (м, 4H, Ar), 6,67-6,76 (м, 3H, Ar), 6,52-6,61 (м, 2H, NH), 4,47-4,67 (м, 4H, CH_2), 4,35-4,43 (м, 2H, CH), 4,30-4,31 (м, 2H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 4,22 (м, 1H, CH), 3,65-3,75 (м, 6H, OCH_3), 3,23-3,30 (м, 4H, CH_2), 3,12-3,20 (м, 5H, CH_2), 2,91-3,3,03 (м, 3H, CH_2), 2,67-2,73 (м, 2H, CH_2), 2,19-2,36 (м, 7H, CH_2), 1,99-2,04 (м, 2H, CH_2), 1,78-1,80 (м, 2H, CH_2), 1,65-1,69 (м, 3H, CH_2), 1,53-1,62 (м, 3H, CH_2), 1,43-1,52 (м, 4H, CH_2), 1,39-1,38 (м, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 167,29, 167,15, 167,05, 166,25, 166,19, 166,02, 152,00, 151,87, 148,45, 145,89, 132,83, 123,94, 123,92, 123,72, 123,47, 123,40, 123,11, 121,72, 121,23, 120,83, 120,65, 108,47, 106,61, 105,84, 105,65, 76,59, 76,20, 75,28, 50,58, 50,50, 50,46, 50,35, 50,27, 49,67, 48,27, 47,67, 47,55, 43,54, 41,35, 40,27, 33,96, 33,41, 31,78, 31,40, 27,30, 26,45, 26,39, 23,50, 23,40, 23,32, 22,84, 22,80, 22,77, 21,64, 20,97, 17,22.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{64}\text{H}_{94}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1227,7024, найдено: 1227,6967; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1249,6843, найдено: 1249,6782; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 1261,6634, найдено: 1261,6648; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 1271,6922, найдено: 1271,6931.

Синтез соединения 12j

Из соединения **7j** (189 мг, 0,222 ммоль), соединения **11a** (135 мг, 0,266 ммоль), DIPEA (77 мкл, 0,444 ммоль) в 3 мл диметилформаида в присутствии реагентов HBTU (126 мг,

0,333 ммоль) и НОВт (45 мг, 0,333 ммоль) было получено соединение **12j** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 30% (81 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,88-7,86 (м, 1H, NH), 7,24 (м, 4H, Ar), 7,17-7,18 (м, 5H, Ar), 7,03 (м, 4H, Ar), 5,63-5,85 (м, 2H, NH), 4,47-4,72 (м, 3H, CH_2+CH), 4,24-4,37 (м, 4H, CH_2), 3,76-3,78 (м, 6H, OCH_3), 3,22-3,35 (м, 7H, CH_2), 3,15-3,21 (м, 1H, CH_2), 2,96-3,06 (м, 2H, CH_2), 2,70-2,78 (м, 2H, CH_2), 2,41-2,46 (м, 4H, CH_2), 2,23-2,34 (м, 7H, CH_2), 2,04-2,09 (м, 1H, CH_2), 1,80-1,87 (м, 1H, CH_2), 1,70-1,73 (м, 3H, CH_2), 1,57-1,64 (м, 4H, CH_2), 1,47-1,50 (м, 4H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 31H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$), 1,28-1,37 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 174,11, 173,74, 172,49, 172,27, 171,41, 171,39, 171,15, 160,47, 158,02, 157,21, 136,24, 129,12, 128,91, 128,65, 128,31, 127,64, 126,90, 126,42, 116,67, 104,23, 103,91, 98,54, 98,20, 81,76, 81,36, 80,47, 60,36, 55,37, 55,31, 55,25, 55,18, 54,88, 53,46, 53,46, 53,18, 52,73, 48,73, 46,34, 45,07, 39,17, 36,96, 36,59, 32,56, 31,66, 31,59, 30,91, 28,69, 28,51, 28,27, 28,03, 27,99, 27,96, 26,73, 26,21, 24,34, 22,38, 21,02.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{64}\text{H}_{94}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1212,6663, найдено: 1212,6598; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1249,6483, найдено: 1249,6431; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Cl}^-]$ 1246,6274, найдено: 1246,6285; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{HCOO}^-]$ 1256,6562, найдено: 1256,6571.

Синтез соединения **12k**

Из соединения **7k** (132 мг, 0,164 ммоль), соединения **11a** (100 мг, 0,197 ммоль), DIPEA (57 мкл, 0,328 ммоль) в 3 мл диметилформаида в присутствии реагентов НВТУ (93 мг, 0,246 ммоль) и НОВт (33 мг, 0,246 ммоль) было получено соединение **12k** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 47% (91 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,15-7,21 (м, 10H, Ar), 6,98-7,02 (м, 4H, Ar), 7,00-7,08 (м, 2H, Ar), 6,91-6,93 (м, 1H, OH), 6,77-6,84 (м, 2H, NH), 5,71-5,82 (м, 2H, NH), 4,60-4,71 (м, 2H, CH_2), 4,26-4,45 (м, 4H, CH), 3,24-3,34 (м, 3H, CH_2), 3,10-3,17 (м, 6H, CH_2), 2,99-3,03 (м, 2H, CH_2), 2,76-2,80 (м, 1H, CH_2), 2,59-2,69 (м, 1H, CH_2), 2,36-2,45 (м, 3H, CH_2), 2,29-2,33 (м, 4H, CH_2), 2,04-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,81-1,85 (м, 1H, CH_2), 1,66-1,68 (м, 2H, CH_2), 1,57-1,58 (м, 2H, CH_2), 1,47-1,49 (м, 3H, CH_2), 1,41-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{CH}_2$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,63, 172,16, 172,09, 172,00, 171,22, 171,12, 170,91, 156,95, 156,81, 156,23, 137,21, 135,80, 128,75, 128,62, 128,27, 127,98, 127,09, 126,94, 126,54, 126,20, 81,78, 81,55, 81,48, 81,12, 80,22, 80,15, 54,52, 53,04, 52,50, 52,40, 48,27, 36,87, 36,29, 32,09, 31,26 31,02, 28,25, 28,02, 27,64, 27,60, 27,58, 25,88, 24,07, 22,09.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{62}\text{H}_{90}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1183,6762, найдено: 1183,6741; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1205,6581, найдено: 1205,6560; m/z рассчитано для

[M+Cl⁻] 1217,6372, найдено: 1217,6381; m/z рассчитано для [M+HCOO⁻] 1227,6660, найдено: 1227,6667.

Синтез соединения 13а

Из соединения **7l** (1,75 г, 2,12 ммоль), соединения **11b** (1,334 г, 2,554 ммоль), DIPEA (739 мкл, 4,24 ммоль) в 30 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (1,206 г, 3,18 ммоль) и HOBT (430 мг, 3,18 ммоль) было получено соединение **13a** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 92% (2,375 г).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7,88-7,77 (м, 1H, NH), 7,49-7,12 (м, 7H, Ar), 6,94-7,12 (м, 4H, Ar), 6,80-6,59 (м, 2H, Ar), 5,98-5,55 (м, 2H, NH), 4,70-4,55 (м, 1H, CH), 4,54-4,42 (м, 2H, CH₂), 4,39-4,22 (м, 2H, CH), 3,39-2,95 (м, 11H, CH₂), 2,84-2,58 (м, 2H, CH₂), 2,55-2,15 (м, 7H, CH₂), 2,10-1,96 (м, 1H, CH₂), 1,92-1,78 (м, 1H, CH₂), 1,78-1,46 (м, 9H, CH₂), 1,46-1,37 (м, 27H, CH₃), 1,37-1,25 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 172,6, 171,6, 170,7, 169,8, 168,3, 167,4, 166,2, 162,7, 157,2, 137,6, 136,2, 134,9, 130,3, 129,9, 129,3, 128,9, 128,5, 128,5, 127,6, 126,9, 126,6, 126,3, 125,8, 124,4, 82,2, 80,7, 60,4, 55,5, 54,6, 53,5, 52,9, 48,7, 39,2, 36,6, 32,7, 31,6, 29,7, 26,7, 28,6, 28,4, 28,0, 27,9, 26,6, 26,2, 22,4, 21,1, 14,2.

ESI-HRMS: для C₆₂H₉₀ClN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1201,6423, найдено: 1201,6416.

Синтез соединения 13b

Из соединения **7m** (735 мг, 0,845 ммоль), соединения **11b** (532 мг, 1,014 ммоль), DIPEA (218 мкл, 1,69 ммоль) в 15 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (481 мг, 1,268 ммоль) и HOBT (171 мг, 1,268 ммоль) было получено соединение **13b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 70% (747 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,38-8,30 (м, 1H, NH), 8,19-8,08 (м, 1H, NH), 7,53 (д, J = 8,1 Гц, 1H, Ar), 7,48 (д, J = 7,7 Гц, 1H, Ar), 7,27-7,19 (м, 5H, Ar), 7,16-7,07 (м, 5H, Ar), 6,34-6,27 (м, 2H, Ar), 4,73-4,52 (м, 2H, CH), 4,50-4,39 (м, 2H, CH₂), 4,39-4,28 (м, 2H, CH), 4,09-4,01 (м, 2H, CH₂), 3,39-3,34 (м, 6H, CH₂), 3,26-3,22 (м, 2H, CH₂), 3,20-3,13 (м, 2H, CH₂), 3,09-2,88 (м, 6H, CH₂), 2,79-2,72 (м, 1H, CH₂), 2,67-2,52 (м, 1H, CH₂), 2,35-2,28 (м, 2H, CH₂), 2,25-2,18 (м, 4H, CH₂), 1,91-1,88 (м, 1H, CH₂), 1,76-1,66 (м, 1H, CH₂), 1,61-1,54 (м, 3H, CH₂), 1,49-1,36 (м, 27H), 1,30-1,14 (м, 4H, CH₂).

Синтез соединения 13c

Из соединения **7a** (525 мг, 0,628 ммоль), соединения **11b** (369 мг, 0,754 ммоль), DIPEA (220 мкл, 1,256 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (357 мг, 0,942 ммоль) и HOBT (127 мг, 0,942 ммоль) было получено соединение **13b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 71% (548 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,94-8,21 (м, 1H, Ar), 7,66 (т, $J=7,55$ Гц, 1H, Ar), 7,55 (т, $J=7,52$ Гц, 1H, Ar), 7,48 (т, $J=7,73$ Гц, 1H, Ar), 7,37 (т, $J=7,64$ Гц, 1H, Ar), 7,13-7,25 (м, 5H, Ar), 7,03-7,12 (м, 2H, Ar), 6,91 (д, $J=6,79$ Гц, 2H, Ar), 6,63-6,79 (м, 2H, Ar), 5,74-6,19 (м, 2H, NH), 4,79-4,97 (м, 2H, CH_2), 4,57-4,70 (м, 2H, CH_2), 4,25-4,42 (м, 2H, CH), 3,37-3,48 (м, 1H, CH_2), 3,26-3,33 (м, 1H, CH_2), 3,11-3,26 (м, 6H, CH_2), 2,94-3,08 (м, 2H, CH_2), 2,76-2,93 (м, 2H, CH_2), 2,46-2,56 (м, 1H, CH_2), 2,35-2,47 (м, 4H, CH_2), 2,25-2,34 (м, 2H, CH_2), 2,17-2,25 (м, 1H, CH_2), 2,04-2,12 (м, 1H, CH_2), 1,76-1,89 (м, 1H, CH_2), 1,69-1,76 (м, 2H, CH_2), 1,62-1,68 (м, 2H, CH_2), 1,47-1,61 (м, 5H, CH_2), 1,38-1,45 (м, 28H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 1,31-1,37 (м, 3H, CH_2), 1,27-1,32 (м, 1H, CH_2).

Синтез соединения **13d**

Из соединения **7d** (300 мг, 0,337 ммоль), соединения **11b** (212 мг, 0,404 ммоль), DIPEA (117 мкл, 0,674 ммоль) в 10 мл диметилформамида в присутствии реагентов HBTU (192 мг, 0,505 ммоль) и HOBT (68 мг, 0,505 ммоль) было получено соединение **13b** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 23% (99 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,88-7,96 (м, 2H, Ar), 7,15-7,20 (м, 6H, Ar), 7,08-7,10 (м, 3H, Ar), 6,91-6,93 (м, 2H, Ar), 6,68-6,75 (м, 2H, NH), 5,87-6,09 (м, 2H, NH), 4,67 (м, 2H, CH), 4,54 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H, CH_2), 4,34-4,40 (м, 2H, CH), 3,37-3,48 (м, 1H, CH_2), 3,21-3,31 (м, 7H, CH_2), 3,10 (м, 1H, CH_2), 3,01 (м, 2H, CH_2), 2,86-2,88 (м, 2H, CH_2), 2,42 (м, 4H, CH_2), 2,29-2,34 (м, 4H, CH_2), 2,05-2,06 (м, 1H, CH_2), 1,78-1,86 (м, 1H, CH_2), 1,61-1,71 (м, 6H, CH_2), 1,56-1,57 (м, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,52 (м, 4H, CH_2), 1,40-1,43 (м, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{CH}_2$), 1,24-1,36 (м, 6H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173,88, 173,26, 172,75, 172,55, 172,40, 172,35, 171,48, 171,39, 165,53, 165,25, 157,36, 157,21, 155,66, 142,40, 141,20, 136,37, 131,54, 131,03, 130,22, 130,06, 129,68, 129,11, 128,53, 127,90, 127,41, 126,89, 125,94, 115,49, 82,07, 82,00, 81,92, 81,63, 81,24, 81,01, 80,50, 55,16, 54,72, 53,43, 53,16, 52,99, 52,82, 48,33, 36,72, 33,05, 32,71, 32,60, 31,70, 31,65, 28,83, 28,53, 28,14, 28,03, 27,98, 27,96, 26,93, 26,39, 26,13, 24,59, 24,37, 22,29, 19,47.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{67}\text{H}_{98}\text{N}_{10}\text{O}_{15}$: m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1283,7266, найдено: 1283,7317; m/z рассчитано для $[\text{M} - \text{H}]^-$ 1281,7129, найдено: 1281,7136; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 1317,6896, найдено: 1317,6890; m/z рассчитано для $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$ 1327,7184, найдено: 1327,7185.

Общая методика удаления защитных групп

Защищённый лиганд растворили в смеси трифторуксусной кислоты (10 об.%) и дихлорметана из расчёта 5 мл смеси на 100 мг лиганда. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. Далее удалили растворитель при пониженном давлении, после чего сухой

остаток высаживали диэтиловым эфиром, декантировали и промывали осадок три раза Et₂O. Продукт выделяли в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь 0,1 об.% трифторуксусной кислоты в воде - ацетонитрил.

Синтез соединения 14a

Из соединения **12a** (100 мг, 82,47 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14a** с выходом 48% (41 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12,50 (уш. с., 2H, COOH), 8,16-8,34 (м, 2H, Ar), 8,01-8,13 (м, 1H, Ar), 7,90-7,96 (м, 1H, Ar), 7,65-7,77 (м, 1H, NH), 7,47-7,60 (м, 2H, NH), 7,16-7,29 (м, 1H, Ar+NH), 6,28-6,32 (м, 2H, NH), 4,74-4,89 (м, 2H, CH₂), 4,29-4,41 (м, 2H, CH), 3,99-4,07 (м, 2H, CH), 3,21-3,24 (м, 6H, CH₂), 3,03-3,12 (м, 5H, CH₂), 2,88-2,96 (м, 3H, CH₂), 2,60-2,67 (м, 1H, CH₂), 2,38-2,42 (м, 1H, CH₂), 2,30-2,35 (м, 2H, CH₂), 2,19-2,24 (м, 3H, CH₂), 2,07-2,17 (м, 2H, CH₂), 1,87-1,88 (м, 1H, CH₂), 1,67-1,72 (м, 1H, CH₂), 1,55-1,63 (м, 3H, CH₂), 1,49-1,51 (м, 3H, CH₂), 1,35-1,43 (м, 4H, CH₂), 1,14-1,28 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 173,93, 173,05, 171,74, 171,20, 170,83, 157,35, 155,19, 149,93, 147,84, 141,01, 138,01, 137,89, 134,08, 129,88, 128,99, 128,20, 128,10, 126,34, 121,91, 55,13, 54,50, 52,21, 48,14, 36,72, 35,90, 31,79, 30,69, 30,07, 28,98, 28,10, 27,90, 27,69, 26,23, 24,72.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅N₁₁O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1044,4785, найдено: 1044,4791; m/z рассчитано для [M-Na⁺] 1042,4629, найдено: 1042,4662.

Синтез соединения 14b

Из соединения **12b** (96 мг, 79,18 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14b** с выходом 56% (87 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,33-8,36 (м, 1H, NH), 8,18-8,22 (м, 1H, NH), 8,06-8,12 (м, 1H, Ar), 7,94-8,01 (м, 2H, NH), 7,56-7,64 (м, 3H, Ar), 7,12-7,26 (м, 10H, Ar), 6,30-6,34 (м, 2H, NH), 4,57-4,67 (м, 2H, CH₂), 4,36-4,37 (м, 2H, CH), 4,26 (м, 2H, CH), 3,20-3,23 (м, 6H, CH₂), 3,00-3,11 (м, 6H, CH₂), 2,86-2,96 (м, 4H, CH₂), 2,60-2,66 (м, 2H, CH₂), 2,34-2,36 (м, 3H, CH₂), 2,14-2,26 (м, 5H, CH₂), 1,87-1,89 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,72 (м, 1H, CH₂), 1,55-1,57 (м, 3H, CH₂), 1,49-1,53 (м, 4H, CH₂), 1,37-1,42 (м, 3H, CH₂), 1,15-1,29 (м, 5H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 173,93, 173,05, 171,74, 171,20, 170,83, 157,35, 155,19, 149,93, 147,84, 141,01, 138,01, 137,89, 134,08, 129,88, 128,99, 128,20, 128,10, 126,34, 121,91, 55,13, 54,50, 52,21, 48,14, 36,72, 35,90, 31,79, 30,69, 30,07, 28,98, 28,10, 27,90, 27,69, 26,23, 24,72.

ESI-HRMS: для $C_{50}H_{65}N_{11}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1044,4785, найдено: 1044,4771; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1066,4605, найдено: 1066,4610; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1042,4629, найдено: 1042,4642.

Синтез соединения **14c**

Из соединения **12c** (96 мг, 79,18 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14c** с выходом 20% (17 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,30 (д, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH), 8,21 (д, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH), 8,16 (д, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar), 7,91-7,96 (м, 1H, NH), 7,57-7,60 (м, 1H, NH), 7,43 (д, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar), 7,14-7,28 (м, 10H, Ar), 6,27-6,33 (м, 2H, NH), 4,58-4,69 (м, 2H, CH_2), 4,26-4,41 (м, 3H, CH), 4,01-4,11 (м, 3H, $CH+CH_2$), 3,15-3,24 (м, 5H, CH_2), 3,01-3,10 (м, 5H, CH_2), 2,88-2,97 (м, 3H, CH_2), 2,61-2,67 (м, 1H, CH_2), 2,30-2,38 (м, 4H, CH_2), 2,14-2,25 (м, 5H, CH_2), 1,89-1,93 (м, 1H, CH_2), 1,66-1,74 (м, 1H, CH_2), 1,55-1,63 (м, 3H, CH_2), 1,42-1,51 (м, 5H, CH_2), 1,36-1,41 (м, 3H, CH_2), 1,18-1,32 (м, 5H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 174,96, 174,18, 173,75, 172,81, 172,29, 172,22, 171,59, 171,11, 170,70, 157,27, 146,88, 146,73, 146,51, 146,37, 138,06, 138,00, 129,22, 129,03, 128,38, 128,19, 128,08, 127,56, 126,32, 126,26, 123,86, 123,53, 54,98, 54,41, 52,10, 51,67, 48,17, 47,64, 38,65, 37,06, 36,82, 35,88, 31,90, 31,81, 30,66, 30,54, 29,93, 29,06, 28,17, 27,76, 27,56, 26,30, 26,21, 24,67, 22,32.

ESI-HRMS: для $C_{50}H_{65}N_{11}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1044,4785, найдено: 1044,4797; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1066,4605, найдено: 1066,4628; m/z рассчитано для $[M+K]^+$ 1082,4344, найдено: 1082,4357; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1042,4629, найдено: 1042,4641.

Синтез соединения **14d**

Из соединения **12d** (154 мг, 121 мкмоль) в 10 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14d** с выходом 20% (25 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 12,52 (уш. с., 2H, COOH), 8,18-8,33 (м, 2H, Ar), 7,86-7,96 (м, 2H, Ar), 7,57-7,59 (м, 1H, NH), 7,15-7,29 (м, 10H, Ar), 6,28-6,34 (м, 2H, NH), 4,53-4,60 (м, 2H, CH), 4,26-4,39 (м, 2H, CH), 4,03-4,17 (м, 2H, CH_2), 3,09-3,26 (м, 7H, CH_2), 3,03-3,11 (м, 4H, CH_2), 2,89-2,95 (м, 2H, CH_2), 2,61-2,67 (м, 1H, CH_2), 2,33-2,36 (м, 3H, CH_2), 2,16-2,25 (м, 4H, CH_2), 1,89-1,91 (м, 1H, CH_2), 1,67-1,72 (м, 1H, CH_2), 1,56-1,58 (м, 2H, CH_2), 1,37-1,51 (м, 6H, CH_2), 1,22-1,26 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 174,59, 174,56, 174,24, 173,95, 173,31, 172,47, 171,90, 171,29, 170,95, 167,35, 167,26, 157,43, 143,65, 143,19, 137,93, 137,76, 129,77, 129,67, 129,47, 129,33, 129,00, 128,97, 128,24, 128,16, 127,34, 126,44, 126,41, 55,23, 54,57,

52,15, 51,72, 48,09, 36,81, 36,63, 35,93, 31,60, 31,65, 30,58, 30,46, 29,91, 28,89, 28,80, 28,03, 27,68, 27,47, 26,21, 26,13, 24,67, 24,51, 22,47, 22,29.

ESI-HRMS: для $C_{51}H_{66}N_{10}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1043,4833, найдено: 1043,4860; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1041,4676, найдено: 1041,4684.

Синтез соединения 14e

Из соединения **12e** (187 мг, 156 мкмоль) в 10 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14e** с выходом 25% (40 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,32-8,35 (м, 1H, NH), 8,18-8,22 (м, 1H, NH), 7,93-7,96 (м, 1H, NH), 7,58-7,59 (м, 1H, Ar), 7,14-7,25 (м, 10H, Ar), 6,86-7,00 (м, 3H, Ar), 6,28-6,30 (м, 2H, NH), 4,28-4,41 (м, 4H, CH+CH₂), 3,99-4,08 (м, 2H, CH₂), 3,77-3,78 (м, 3H, OCH₃), 3,16-3,24 (м, 6H, CH₂), 3,01-3,06 (м, 4H, CH₂), 2,88-2,98 (м, 3H, CH₂), 2,61-2,67 (м, 1H, CH₂), 2,31-2,33 (м, 2H, CH₂), 2,16-2,25 (м, 5H, CH₂), 1,86-1,89 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,72 (м, 1H, CH₂), 1,55-1,59 (м, 3H, CH₂), 1,44-1,52 (м, 3H, CH₂), 1,37-1,42 (м, 2H, CH₂), 1,25-1,33 (м, 3H, CH₂), 1,15-1,22 (м, 3H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 174,92, 174,60, 174,23, 171,98, 171,52, 171,11, 157,67, 157,20, 138,45, 138,38, 129,42, 128,57, 128,47, 126,71, 126,65, 55,68, 55,44, 55,00, 54,85, 48,55, 47,31, 46,32, 37,41, 37,16, 36,27, 28,55, 28,13, 26,71.

ESI-HRMS: для $C_{51}H_{68}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1029,5040, найдено: 1029,5030; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1051,4860, найдено: 1051,4848; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1027,4884, найдено: 1027,4896.

Синтез соединения 14f

Из соединения **12f** (104 мг, 86,85 мкмоль) в 10 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14f** с выходом 80% (72 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,18-8,38 (м, 2H, NH), 7,56-7,99 (м, 2H, NH), 7,16-7,28 (м, 7H, Ar), 7,11-7,13 (м, 3H, Ar), 7,06-7,08 (м, 2H, Ar), 6,82-6,89 (м, 2H, Ar), 6,30-6,32 (м, 2H, NH), 4,33-4,41 (м, 4H, CH+CH₂), 4,24-4,25 (м, 2H, CH), 3,96-4,04 (м, 5H, CH₂), 3,18-3,22 (м, 4H, CH₂), 3,12-3,15 (м, 2H, CH₂), 3,04-3,07 (м, 5H, CH₂), 2,93-3,01 (м, 3H, CH₂), 2,85-2,90 (м, 2H, CH₂), 2,59-2,65 (м, 2H, CH₂), 2,29-2,35 (м, 2H, CH₂), 2,26-2,27 (м, 2H, CH₂), 2,21-2,24 (м, 3H, CH₂), 2,15-2,16 (м, 1H, CH₂), 1,83-1,87 (м, 1H, CH₂), 1,71-1,72 (м, 1H, CH₂), 1,55-1,58 (м, 3H, CH₂), 1,44-1,48 (м, 4H, CH₂), 1,35-1,39 (м, 2H, CH₂), 1,27-1,33 (м, 2H, CH₂), 1,19-1,23 (м, 4H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 174,64, 174,30, 174,04, 171,77, 171,21, 170,85, 158,43, 137,97, 137,84, 130,24, 128,98, 128,22, 128,12, 127,76, 126,33, 114,08, 113,78, 59,48, 55,14, 55,08, 55,04, 54,52, 54,26, 48,14, 35,92, 30,67, 30,18, 28,08, 26,23, 24,75, 24,62, 22,36.

ESI-HRMS: для $C_{51}H_{68}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1029,5040, найдено: 1029,5001; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1051,4860, найдено: 1051,4882; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1027,4884, найдено: 1027,4893.

Синтез соединения **14g**

Из соединения **12g** (114 мг, 93,27 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14g** с выходом 10% (10 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,18-8,37 (м, 1H, NH), 7,58-7,96 (м, 1H, NH), 7,14-7,28 (м, 10H, Ar), 7,05-7,10 (м, 2H, Ar), 6,81-6,89 (м, 2H, Ar), 6,30-6,31 (м, 2H, NH), 4,38-4,42 (м, 2H, CH_2+CH), 4,28 (м, 1H, CH), 4,01-4,05 (м, 2H, CH), 3,94-3,98 (м, 2H, CH_2), 3,22-3,28 (м, 5H, CH_2), 3,14-3,17 (м, 3H, CH_3), 2,97-3,08 (м, 6H, CH_2), 2,88-2,92 (м, 2H, CH_2), 2,62-2,77 (м, 2H, CH_2), 2,26-2,35 (м, 3H, CH_2), 2,16-2,24 (м, 4H, CH_2), 1,82-1,90 (м, 1H, CH_2), 1,72-1,74 (м, 3H, CH_2), 1,56-1,59 (м, 3H, CH_2), 1,48-1,50 (м, 4H, CH_2), 1,38-1,40 (м, 2H, CH_2), 1,27-1,30 (м, 4H, CH_2), 1,19-1,22 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,59, 174,24, 173,93, 171,77, 171,58, 171,13, 170,74, 157,70, 157,55, 157,24, 138,08, 138,01, 130,22, 129,52, 129,16, 129,04, 128,94, 128,39, 128,19, 128,08, 127,75, 126,32, 126,25, 114,54, 114,25, 62,99, 62,93, 55,05, 54,46, 53,96, 52,22, 51,90, 48,16, 38,60, 37,04, 36,84, 35,87, 32,40, 31,83, 30,69, 30,40, 29,03, 28,16, 27,99, 26,27, 24,78, 22,42, 14,70.

ESI-HRMS: для $C_{52}H_{70}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1043,5197, найдено: 1043,5194; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1041,5040, найдено: 1041,5050.

Синтез соединения **14h**

Из соединения **12h** (155 мг, 126 мкмоль) в 10 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14h** с выходом 32% (43 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,50-12,59 (уш. с., 1H, COOH), 8,19-8,32 (м, 2H, NH), 7,58-7,95 (м, 2H, NH), 7,14-7,26 (м, 10H, Ar), 6,83-6,91 (м, 2H, Ar), 6,63-6,89 (м, 2H, Ar), 6,24-6,33 (м, 2H, NH), 4,39-4,43 (м, 3H, $CH+CH_2$), 4,29 (м, 1H, CH), 4,02-4,07 (м, 2H, CH), 3,68-3,70 (м, 6H, OCH_3), 3,16-3,26 (м, 5H, CH_2), 3,00-3,10 (м, 8H, CH_2), 2,88-2,94 (м, 2H, CH_2), 2,61-2,67 (м, 1H, CH_2), 2,30-2,34 (м, 3H, CH_2), 2,21-2,23 (м, 4H, CH_2), 2,16 (м, 1H, CH_2), 1,86-1,89 (м, 1H, CH_2), 1,71 (м, 2H, CH_2), 1,57-1,58 (м, 3H, CH_2), 1,47-1,51 (м, 5H, CH_2), 1,21-1,25 (м, 4H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,95, 174,60, 174,20, 173,25, 172,24, 171,97, 171,51, 171,11, 157,66, 138,44, 138,38, 129,42, 128,57, 128,46, 126,71, 126,65, 111,89, 55,91, 55,82, 55,76, 55,42, 54,82, 48,52, 41,91, 37,22, 36,26, 31,06, 30,98, 30,44, 28,55, 28,14, 28,09, 26,70, 26,38.

ESI-HRMS: для $C_{52}H_{70}N_{10}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1059,5146, найдено: 1059,5098; m/z рассчитано для $[M+Na]^+$ 1081,4965, найдено: 1081,5015; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1057,4989, найдено: 1057,4996.

Синтез соединения 14i

Из соединения **12i** (96 мг, 79,18 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14i** с выходом 20% (17 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,20-8,37 (м, 2H, Ar), 7,60-7,96 (м, 2H, Ar), 7,16-7,27 (м, 10H, Ar), 6,74-6,90 (м, 1H, NH), 6,30-6,52 (м, 2H, NH), 4,29-4,39 (м, 3H, CH), 4,00-4,06 (м, 2H, CH+CH₂), 3,72 (с, 2H, OCH₃), 3,64 (д, $J = 8$ Hz, 3H, OCH₃), 3,21-3,24 (м, 3H, CH₂), 3,17 (м, 2H, CH₂), 3,01-3,10 (м, 3H, CH₂), 2,94-3,01 (м, 3H, CH₂), 2,87-2,91 (м, 2H, CH₂), 2,61-2,72 (м, 2H, CH₂), 2,30-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,16-2,22 (м, 4H, CH₂), 1,98-2,02 (м, 1H, CH₂), 1,83-1,88 (м, 1H, CH₂), 1,69-1,74 (м, 1H, CH₂), 1,55-1,60 (м, 3H, CH₂), 1,42-1,49 (м, 4H, CH₂), 1,32-1,40 (м, 4H, CH₂), 1,14-1,24 (м, 5H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,72, 174,35, 173,97, 172,87, 171,98, 171,88, 171,61, 171,15, 170,75, 157,28, 153,20, 153,12, 151,03, 150,86, 138,08, 138,00, 129,03, 128,20, 128,08, 126,92, 126,41, 126,32, 126,27, 111,66, 111,43, 79,33, 79,00, 78,67, 55,73, 55,67, 55,33, 55,22, 55,07, 54,45, 52,38, 51,91, 48,14, 38,60, 38,33, 37,00, 36,81, 35,86, 35,38, 32,11, 31,86, 30,74, 30,66, 30,53, 30,32, 29,04, 28,87, 28,15, 27,93, 26,28, 26,21, 25,08, 24,82, 24,56, 22,69.

ESI-HRMS: для $C_{52}H_{70}N_{10}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1059,5146, найдено: 1092,5146; m/z рассчитано для $[M-H]^-$ 1057,4989, найдено: 1057,4994.

Синтез соединения 14k

Из соединения **12k** (68 мг, 66,99 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14k** с выходом 15% (10 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,38 (уш. с., 2H, COOH), 8,31 (д, $J = 6,9$ Hz, 1H, NH), 8,16-8,18 (м, 1H, NH), 7,93-7,94 (м, 1H, NH), 7,57-7,59 (м, 1H, NH), 7,15-7,28 (м, 10H, Ar), 6,97 (дд, $J = 10,4$ Hz, 8,6 Hz, 2H, Ar), 6,66-6,73 (м, 2H, Ar), 6,27-6,33 (м, 2H, NH), 4,34-4,37 (м, 3H, CH+CH₂), 4,29 (м, 1H, CH), 4,01-4,09 (м, 2H, CH), 3,22-3,24 (м, 2H, CH₂), 3,14 (м, 2H, CH₂), 2,98-3,07 (м, 6H, CH₂), 2,88-2,93 (м, 2H, CH₂), 2,61-2,67 (м, 1H, CH₂), 2,28-2,34 (м, 3H, CH₂), 2,16-2,25 (м, 5H, CH₂), 1,89-1,92 (м, 1H, CH₂), 1,67-1,70 (м, 1H, CH₂), 1,57-1,58 (м, 3H, CH₂), 1,48-1,50 (м, 4H, CH₂), 1,31-1,38 (м, 3H, CH₂), 1,18-1,24 (м, 4H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,49, 174,18, 173,77, 172,85, 172,81, 171,69, 171,58, 171,11, 170,71, 157,28, 156,51, 156,34, 138,06, 138,00, 129,03, 128,97, 128,53, 128,19, 128,08, 127,77, 126,32, 126,26, 115,44, 115,13, 54,99, 54,42, 52,17, 51,70, 48,17, 38,66, 37,06, 36,81, 35,88, 31,81, 30,68, 30,53, 29,99, 29,05, 28,17, 27,63, 26,32, 24,79, 24,68.

ESI-HRMS: для $C_{50}H_{66}N_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 1015,4884, найдено: 1015,4850; m/z рассчитано для $[M+Na^+]$ 1037,4703, найдено: 1037,4682; m/z рассчитано для $[M-H^-]$ 1013,4727, найдено: 1013,4738.

Синтез соединения 15a

Из соединения **12k** (68 мг, 66,99 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **14k** с выходом 80% (10 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 12,33 (уш. с., 3H, COOH), 8,28 (с, 1H, NH), 8,07 (с, 1H, NH), 7,89 (с, 1H, NH), 7,78–7,55 (м, 2H, Ar), 7,30–6,99 (м, 13H, Ar), 6,67–6,62 (м, 2H, Ar), 6,29 (м, 2H, Ar), 4,54 (с, 1H, CH_2), 4,46 (с, 1H, CH_2), 4,08 (м, 2H, CH), 3,62–3,37 (м, 4H, CH_2), 3,51 (м, 9H, CH_2), 3,26–2,93 (м, 2H, CH_2), 3,26–2,99 (м, 16H, CH_2), 2,22 (м, 8H, CH_2), 1,90 (с, 1H, CH_2), 1,24 (м, 18H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 175,3, 174,9, 174,6, 171,8, 172,9, 172,4, 171,8, 158,1, 138,8, 131,4, 131,0, 130,9, 130,7, 129,9, 129,8, 128,8, 128,8, 127,9, 127,6, 125,1, 126,8, 115,8, 54,4, 52,5, 49,0, 48,9, 47,8, 42,7, 36,6, 32,7, 30,7, 29,9, 29,0, 28,6, 28,4, 27,0, 25,5, 18,9, 17,5, 13,3.

ESI-HRMS: для $C_{50}H_{66}ClN_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 1050,4527, найдено: 1050,4583.

Синтез соединения 15b

Из соединения **13b** (68 мг, 66,99 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **15b** с выходом 70% (10 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 12,52 (уш. с., 3H, COOH), 8,31 (с, 1H, NH), 8,09 (с, 1H, NH), 7,91 (с, 1H, NH), 7,79 (с, 1H, NH), 7,54 (с, 2H, Ar), 7,47 (с, 2H, Ar), 7,15 (м, 7H, Ar), 6,30 (м, 2H, NH), 4,51–4,43 (м, 4H, CH_2+CH), 4,08 (м, 2H, CH), 3,26–2,93 (м, 8H, CH_2), 2,71 (м, 2H, CH_2), 2,22 (м, 6H, CH_2), 2,19 (м, 4H, CH_2), 1,90 (с, 1H, CH_2), 1,47 (м, 9H, CH_2), 1,16 (м, 5H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 207,2, 174,9, 174,6, 174,2, 174,5, 172,5, 171,5, 171,3, 157,7, 138,5, 138,7, 131,9, 131,6, 130,5, 130,4, 130,1, 129,6, 129,5, 129,1, 128,5, 128,4, 126,7, 54,0, 52,1, 48,6, 36,3, 32,3, 32,2, 31,1, 30,3, 29,5, 28,5, 27,9, 26,7, 25,1.

ESI-HRMS: для $C_{50}H_{65}BrN_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H^+]$ 1091,3832, найдено: 1091,3823.

Синтез соединения 15c

Из соединения **12c** (550 мг, 0,448 ммоль) в 10 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **15c** с выходом 32% (152 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,39–8,28 (м, 1H, NH), 8,19–8,00 (м, 2H, NH+Ar), 8,00–7,88 (м, 1H, NH), 7,80–7,63 (м, 1H, Ar), 7,62–7,45 (м, 2H, NH+Ar), 7,29–7,11

(м, 6H, Ar), 7,06-6,94 (м, 2H, Ar), 6,74-6,58 (м, 2H, Ar), 6,41-6,22 (м, 2H, NH), 4,99-4,66 (м, 2H, CH₂), 4,39-4,21 (м, 2H, CH), 4,15-3,96 (м, 2H, CH), 3,30-3,18 (м, 4H, CH₂), 3,12-2,86 (м, 6H, CH₂), 2,86-2,73 (м, 1H, CH₂), 2,72-2,60 (м, 1H, CH₂), 2,46-2,10 (м, 8H, CH₂), 1,96-1,83 (м, 1H, CH₂), 1,78-1,66 (м, 1H, CH₂), 1,66-1,10 (м, 14H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,59, 174,56, 174,26, 173,87, 172,85, 172,83, 172,60, 172,58, 171,60, 171,57, 171,10, 170,93, 170,90, 157,30, 155,87, 148,20, 147,75, 138,05, 134,41, 133,79, 133,71, 133,61, 129,98, 129,96, 129,08, 128,10, 128,01, 126,28, 125,43, 124,81, 118,54, 118,16, 115,00, 55,05, 54,86, 52,67, 52,30, 51,76, 49,28, 48,18, 47,74, 45,81, 44,37, 38,71, 38,60, 36,89, 36,32, 35,87, 32,05, 31,89, 31,84, 30,69, 30,56, 30,06, 29,07, 28,95, 28,20, 27,71, 26,32, 26,17, 24,63, 22,63, 22,46.

Синтез соединения 15d

Из соединения **14d** (90 мг, 70,12 мкмоль) в 5 мл смеси 9:1 (ДХМ/ТФУ) было получено соединение **15d** с выходом 40% (30 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12,53 (уш. с., 2H, COOH), 8,09-8,31 (м, 2H, Ar), 7,86-7,93 (м, 3H, Ar), 7,55-7,58 (м, 1H, NH), 7,27-7,29 (м, 2H, Ar), 7,20-7,23 (м, 2H, Ar), 7,15-7,17 (м, 3H, Ar), 6,98-7,02 (м, 2H, Ar), 6,64-6,65 (м, 2H, NH), 6,28-6,33 (м, 2H, NH), 4,53-4,61 (м, 2H, CH₂), 4,27-4,29 (м, 3H, CH), 4,01-4,07 (м, 3H, CH₂+CH), 3,17-3,25 (м, 4H, CH₂), 2,98-3,09 (м, 3H, CH₂), 2,89-2,95 (м, 3H, CH₂), 2,76-2,81 (м, 1H, CH₂), 2,62-2,67 (м, 1H, CH₂), 2,28-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,18-2,25 (м, 4H, CH₂), 1,89-1,91 (м, 1H, CH₂), 1,67-1,71 (м, 1H, CH₂), 1,54-1,63 (м, 3H, CH₂), 1,37-1,53 (м, 6H, CH₂), 1,22-1,26 (м, 5H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,54, 174,50, 174,21, 173,78, 172,81, 172,12, 171,58, 171,07, 170,88, 167,22, 167,14, 157,29, 155,83, 143,79, 138,01, 129,96, 129,47, 129,05, 128,08, 127,39, 126,47, 126,26, 114,97, 55,00, 54,82, 52,25, 52,12, 51,65, 48,15, 47,49, 38,65, 36,85, 36,26, 35,84, 31,89, 31,78, 30,66, 30,54, 29,91, 29,05, 28,95, 28,17, 27,77, 27,53, 26,30, 26,22, 24,72, 24,58, 22,53, 22,36.

ESI-HRMS: для C₅₁H₆₆N₁₀O₁₅: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1059,4787, найдено: 1059,4821; m/z рассчитано для [M-H⁻] 1057,4631, найдено: 1041,4636.

Общие методы твердофазного синтеза пептидов

1) Активация 2-СТС смолы:

2-СТС-смола (1 экв., ёмкость 1,0-1,6 ммоль г⁻¹) перемешивали в ДХМ (10 мл на 1 г смолы) в течение 30 минут. Затем по каплям добавляли SOCl₂ (3 экв.), после чего добавляли ДМФА (5% по объёму относительно SOCl₂). Полученную смесь перемешивали при температуре 40°C в течение 4 часов. Затем смолу отфильтровывали, переносили в полипропиленовый реактор и промывали ДМФА (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы) и дихлорметаном (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы).

2) Иммобилизация первой аминокислоты:

К активированной 2-СТС смоле (1 экв., ёмкость 1,0-1,6 ммоль г⁻¹) в ДМФА (10 мл на 1 г смолы) добавляли Fmoc-защищённую аминокислоту (2 экв.) и ДИПЭА (10 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч, после чего смолу фильтровали и последовательно промывали метанолом (3 раза по 5 мин, 10 мл на 1 г смолы), дихлорметаном (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы), ДМФА (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы) и ДХМ (3 раза по 1 мин, по 10 мл на 1 г смолы).

3) Удаление Fmoc-защитной группы:

Fmoc-защищённую аминокислоту, иммобилизованную на 2-СТС смоле, промывали ДМФА (2 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы), затем добавляли раствор 4-метилпиперидина в ДМФА (20% по объёму, 10 мл на 1 г смолы) и перемешивали в течение 15 мин.. Смолу отфильтровывали, промывали ДМФА (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы), добавляли раствор 4-метилпиперидина в ДМФА (20% об./об., 10 мл на 1 г смолы) и перемешивали в течение 15 минут. Затем смолу отфильтровывали, промывали ДМФА (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы) и дихлорметаном (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы).

4) Реакция ацилирования с использованием HBTU и HOBT:

К смоле с иммобилизованным фрагментом (1 экв.) добавляли ДМФА (10 мл на 1 г смолы). К полученной смеси добавляли Fmoc-защищённую аминокислоту (2 экв.), HOBT (0,5 экв.), HBTU (2 экв.) и ДИПЭА (3 экв.) и смесь перемешивали в течение 2 часов. Затем смолу отфильтровывали и промывали ДМФА (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы) и дихлорметаном (3 раза по 1 мин, 10 мл на 1 г смолы).

5) Общая методика ацилирования векторной молекулой 7a,d,l-m:

К фрагменту, иммобилизованному на смоле (1 экв.), добавляли ДМФА (10 мл на 1 г смолы). К полученной смеси добавляли соединение **7a,d,l-m** (1,2 экв.), HOBT (0,5 экв.), HBTU (2 экв.) и ДИПЭА (3 экв.) и перемешивали смесь в течение 16 ч. Затем смолу отфильтровывали и промывали ДМФА (4 раза по 2 мин, 10 мл на 1 г смолы) и дихлорметаном (4 раза по 2 мин, 10 мл на 1 г смолы).

6) Общая методика удаления иммобилизованного фрагмента с 2-СТС смолы:

Смолу перемешивают в течение 30 минут в растворе DCM (10 мл на 1 г смолы), после чего растворитель удаляется. Затем добавляют 0,75%-ный раствор трифторуксусной кислоты в ДХМ (15 мл на 1 г смолы) и перемешивают в течение 15 минут. Фильтрат собирают в колбу, после чего смолу промывают ДХМ (3 раза по 5 минут каждый, 10 мл на 1 г смолы), промывные фракции также собирают в колбу. Промывку раствором ТФУ в ДХМ продолжают до тех пор, пока иммобилизованный фрагмент не будет полностью удален из смолы. Фильтрат выпаривают, а целевой продукт выделяют с помощью препаративной

колоночной хроматографии с использованием следующих элюирующих систем: ДХМ/метанол; 0,1% раствор ТФУ в ДХМ/метанол; вода/ацетонитрил; 0,1% раствор ТФУ в воде/ацетонитрил.

Синтез соединения 16a

Из 1 г не активированной 2-СТС смолы последовательным выполнением шагов: : 1) 305 мкл SOCl_2 (4,2 ммоль), 16 мкл ДМФА; 2) 1,085 г Fmoc-Phe(L)-ОН (2,8 ммоль), 2,44 мл ДИПЭА (14 ммоль); 3) 15 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА; 4) 1,085 г Fmoc-Phe(L)-ОН (2,8 ммоль), 95 мг НОВт (0,7 ммоль), 1,062 г НВТУ (2,8 ммоль) и 730 мкл ДИПЭА (4,2 ммоль); 3) 15 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА; 5) исходя из 751 мг смолы с иммобилизованным дипептидом (0,54 ммоль) и 535 мг соединения **7I** (0,648), 37 мг НОВт (0,27 ммоль), 410 мг НВТУ (1,08 ммоль) и 282 мкл ДИПЭА (1,62 ммоль) и 6) было получено 460 мг (выход 76%) соединения **16a**.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 12,71 (с, 1H, COOH), 8,27 (д, J = 8,2 Гц, 1H, NH), 8,03 – 8,09 (м, 1H, NH), 7,71 – 7,83 (м, 1H, NH), 7,08 – 7,47 (м, 14H, Ar), 6,24 – 6,33 (м, 2H, NH), 4,34 – 4,64 (м, 4H, CH+CH₂), 3,99-4,08 (м, 1H, CH), 3,90 – 3,99 (м, 1H, CH), 2,86 – 3,26 (м, 7H, CH₂), 2,58 – 2,75 (м, 1H, CH₂), 2,35 (т, J = 7,4 Гц, 1H, CH₂), 2,30 – 2,10 (м, 7H, CH₂), 1,80 – 1,92 (м, 1H, CH₂), 1,62 – 1,71 (м, 1H CH₂), 1,54 – 1,62 (м, 1H, CH₂), 1,40 – 1,54 (м, 5H, CH₂), 1,40 – 1,34 (м, 27H, CH₃), 1,10 – 1,34 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 172,77, 172,25, 172,21, 172,14, 172,12, 171,93, 171,45, 171,42, 171,37, 171,16, 171,15, 157,15, 157,14, 141,19, 140,78, 138,13, 137,57, 133,44, 133,09, 130,61, 130,25, 129,18, 128,23, 127,99, 127,22, 127,16, 126,87, 126,45, 126,32, 126,18, 126,07, 124,96, 80,58, 80,41, 80,32, 79,76, 53,67, 53,63, 53,00, 52,87, 52,19, 49,61, 47,10, 46,80, 45,20, 38,53, 38,47, 37,34, 36,61, 32,33, 31,95, 31,83, 30,93, 30,82, 30,75, 29,12, 29,02, 27,75, 27,66, 27,63, 26,72, 26,29, 26,19, 24,76, 24,62, 22,44, 22,27.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{59}\text{H}_{83}\text{ClN}_6\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1119,5779, найдено: 1119,5746.

Синтез соединения 16b

Из 1 г не активированной 2-СТС смолы последовательным выполнением шагов: : 1) 305 мкл SOCl_2 (4,2 ммоль), 16 мкл ДМФА; 2) 1,287 Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН (2,8 ммоль), 2,44 мл ДИПЭА (14 ммоль); 3) 15 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА; 4) 1,085 г Fmoc-Phe(L)-ОН (2,8 ммоль), 95 мг НОВт (0,7 ммоль), 1,062 г НВТУ (2,8 ммоль) и 730 мкл ДИПЭА (4,2 ммоль); 3) 15 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА; 5) исходя из 300 мг смолы с иммобилизованным дипептидом (0,255 ммоль) и 252 мг соединения **7I** (0,306), 17 мг НОВт (0,128 ммоль), 193 мг НВТУ (0,51 ммоль) и 133 мкл ДИПЭА (0,765 ммоль) и 6) было получено 260 мг (выход 86%) соединения **16b**.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,68 (с, 1H, COOH), 8,26 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H, NH), 8,05 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, NH), 7,69 – 7,83 (м, 1H, NH), 7,27 – 7,43 (м, 2H, Ar), 7,18 – 7,26 (м, 5H, Ar), 7,08 – 7,18 (м, 4H, Ar), 6,89 – 6,80 (м, 2H, Ar), 6,20 – 6,35 (м, 2H, NH), 4,42 – 4,59 (м, 3H, CH+CH₂), 4,33 – 4,42 (м, 1H, CH), 3,89 – 4,07 (м, 2H, CH), 3,12 – 3,25 (м, 2H, CH₂), 2,85 – 3,07 (м, 5H, CH₂), 2,69 – 2,57 (м, 1H, CH₂), 2,34 (т, $J = 7,4$ Гц, 1H, CH₂), 2,29 – 2,11 (м, 7H, CH₂), 1,91 – 1,80 (м, 1H, CH₂), 1,61 – 1,72 (м, 1H, CH₂), 1,61 – 1,54 (м, 1H, CH₂), 1,40 – 1,54 (м, 5H, CH₂), 1,34 – 1,40 (м, 27H, CH₃), 1,32 – 1,26 (м, 2H, CH₂), 1,22 – 1,26 (м, 9H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 172,74, 172,20, 172,16, 172,14, 171,88, 171,42, 171,37, 171,32, 171,15, 171,14, 157,13, 157,12, 153,58, 141,15, 140,74, 138,09, 133,43, 133,08, 132,10, 130,59, 130,20, 129,67, 129,13, 127,96, 127,19, 127,13, 126,84, 126,29, 126,15, 126,05, 124,94, 123,43, 80,57, 80,40, 80,31, 79,74, 77,63, 53,72, 53,59, 53,00, 52,86, 52,21, 49,64, 47,12, 46,81, 45,19, 38,52, 38,45, 37,36, 35,97, 32,31, 31,94, 31,82, 30,91, 30,85, 30,76, 29,08, 28,97, 28,55, 27,73, 27,64, 27,63, 26,69, 26,26, 26,16, 24,74, 24,59, 22,42, 22,23.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{ClN}_6\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1191,6355, найдено: 1191,6363.

Синтез соединения **17a**

К раствору 300 мг соединения **16a** (1 экв., 0,268 ммоль) в 10 мл ДМФА добавили 165 мг трифторацетат моно-*Fmoc*-1,3-диаминопропана (1,5 экв., 0,402 ммоль), 117 мкл ДИПЭА (2,5 экв., 0,67 ммоль) в 5 мл ДМФА, 54 мг *NOBt* (1,5 экв., 0,402 ммоль) и 152 мг *NBTU* (1,5 экв., 0,402 ммоль). Смесь перемешивали 12 часов при инертной атмосфере. Растворитель удалили при пониженном давлении и дважды переупарили полученную смесь из хлористого метилена. Остаток растворили в 30 мл ДХМ и промывали водой (2*30 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2*30 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, после чего удалили растворитель при пониженном давлении. Последующую очистку проводили методом препаративной колоночной хроматографии (элюент – ДХМ/метанол). Таким образом было получено 330 мг (выход 88%) соединения **17a** в виде бледно-жёлтого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,30 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H, NH), 8,13 – 8,23 (м, 1H, NH), 7,74 – 7,97 (м, 3H, NH+Ar), 7,67 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H, Ar), 7,52 – 7,60 (м, 1H, NH), 7,44 – 7,35 (м, 2H, Ar), 7,34 – 7,08 (м, 16H, Ar), 6,21 – 6,36 (м, 2H, NH), 4,44 – 4,58 (м, 2H, CH₂), 4,44 – 4,36 (м, 1H, CH), 4,24 – 4,36 (м, 3H, CH+CH₂), 4,20 (т, $J = 6,9$ Гц, 1H, CH), 3,99 – 4,08 (м, 1H, CH), 3,99 – 3,90 (м, 1H, CH), 3,12 – 3,25 (м, 2H, CH₂), 3,11 – 2,84 (м, 9H, CH₂), 2,60 – 2,70 (м, 1H, CH₂), 2,40 – 2,12 (м, 8H, CH₂), 1,80 – 1,92 (м, 1H, CH₂), 1,62 – 1,72

(м, 1H, CH₂), 1,55 – 1,62 (м, 1H, CH₂), 1,40 – 1,55 (м, 7H, CH₂), 1,40 – 1,35 (м, 27H, CH₃), 1,34 – 1,11 (м, 2H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172,79, 172,76, 172,24, 172,20, 172,15, 172,13, 171,92, 171,57, 171,45, 171,11, 170,67, 157,15, 156,12, 143,94, 141,16, 140,77, 138,12, 138,02, 133,44, 133,09, 130,59, 130,23, 129,04, 128,16, 128,06, 127,63, 127,21, 127,15, 127,09, 126,86, 126,29, 126,24, 126,05, 125,17, 124,95, 120,13, 80,59, 80,42, 80,33, 79,77, 65,32, 54,94, 54,40, 53,01, 52,87, 52,20, 49,62, 47,11, 46,80, 45,19, 38,65, 38,60, 37,90, 37,11, 36,82, 36,39, 32,32, 31,95, 31,82, 30,93, 30,69, 30,58, 29,20, 29,05, 28,96, 27,74, 27,65, 27,62, 26,69, 26,31, 26,22, 24,73, 24,60, 22,43, 22,25.

ESI-HRMS: для C₇₇H₁₀₁ClN₈O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1397,7199, найдено: 1397,7210.

Синтез соединения 17b

К раствору 258 мг соединения **16b** (1 экв., 0,217 ммоль) в 10 мл ДМФА добавили 93 мг трифторацетат моно-Фмос-1,3-диаминопропана (1,05 экв., 0,402 ммоль), 87 мкл ДИПЭА (2,3 экв., 0,498 ммоль) в 5 мл ДМФА, 29 мг НОВt (1 экв., 0,217 ммоль) и 123 мг НВТУ (1,5 экв., 0,325 ммоль). Смесь перемешивали 12 часов при инертной атмосфере. Растворитель удалили при пониженном давлении и дважды переупарили полученную смесь из хлористого метилена. Остаток растворили в 30 мл ДХМ и промывали водой (2*30 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2*30 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, после чего удалили растворитель при пониженном давлении. Последующую очистку проводили методом препаративной колоночной хроматографии (элюент – ДХМ/метанол). Таким образом было получено 300 мг (выход 94%) соединения **17b** в виде бледно-жёлтого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,34-8,26 (уш. д., 1H, NH), 8,20-8,11 (уш. д., 1H, NH), 7,84 – 7,97 (м, 3H, NH+Ar), 7,67 (д, J = 7,5 Гц, 2H, Ar), 7,58-7,50 (м, 1H, NH), 7,44-7,35 (м, 2H, Ar), 7,36-7,26 (м, 4H, Ar), 7,26-7,18 (м, 3H, Ar), 7,18-7,08 (м, 6H, Ar), 6,86 (д, J=7,9 Гц, 2H, Ar), 6,35-6,20 (м, 2H, NH), 4,44 – 4,57 (м, 2H, CH₂), 4,40-4,24 (м, 3H, CH+CH₂), 4,20 (т, J = 6,9 Гц, 1H, CH), 4,07-3,99 (м, 1H, CH), 3,99-3,90 (м, 1H, CH), 3,21 (т, J=7,3 Гц) & 3,16 (т, J=7,3 Гц) (2H, K₂H_ε), 3,07-2,77 (м, 9H, CH₂), 2,68-2,57 (м, 1H, CH₂), 2,40-2,10 (м, 8H, CH₂), 1,91-1,79 (м, 1H, CH₂), 1,72-1,62 (м, 1H, CH₂), 1,62-1,54 (м, 1H, CH₂), 1,54-1,10 (м, 13H, CH₂), 1,40-1,34 (м, 27H, CH₃), 1,23 (с, 9H, CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172,72, 172,18, 172,08, 171,90, 171,51, 171,43, 171,03, 170,67, 157,12, 156,08, 153,40, 143,93, 141,15, 140,75, 138,00, 133,41, 133,06, 132,74, 130,56, 130,21, 129,53, 129,00, 128,04, 127,61, 127,19, 127,12, 127,06, 126,84, 126,29, 126,22, 126,04, 125,15, 124,93, 123,50, 120,12, 80,55, 80,38, 80,29, 79,74, 77,59, 65,29, 54,98,

54,40, 52,97, 52,84, 52,17, 49,58, 47,07, 46,77, 45,17, 38,62, 38,58, 37,88, 36,90, 36,49, 36,35, 32,30, 31,92, 31,81, 30,90, 30,67, 30,57, 29,21, 29,04, 28,94, 28,52, 27,72, 27,62, 26,68, 26,30, 26,21, 24,71, 24,57, 22,41, 22,24.

ESI-HRMS: для $C_{81}H_{109}ClN_8O_{15}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1469,7774, найдено: 1469,7751.

Синтез соединения 18a

562 мг соединения **17a** (1 экв., 0,402 ммоль) растворили в смеси диэтиламина и ДМФА (25 экв. Et_2NH , 20 мл ДМФА). Смесь перемешивали 20 минут, после чего растворитель удалили при пониженном давлении и остаток переупарили из 0,1% раствора ТФУ в ДХМ и дважды переупарили из хлористого метилена. Остаток высаживали диэтиловым эфиром и декантировали. Осадок дважды промывали диэтиловым эфиром. Последующую очистку проводили методом препаративной колоночной хроматографии (элюент – ДХМ/0,1% р-р ТФУ в ДХМ/метанол). Таким образом было получено 493 мг соединения **18a** (выход 87%).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,37 (д, $J = 7,3$ Гц, 1H, NH), 8,20 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H, NH), 8,04 – 7,92 (м, 1H, NH), 7,82 (уш. с., 3H, NH_3^+), 7,69 – 7,77 (м, 1H, NH), 7,02 – 7,42 (м, 14H, Ar), 6,39 – 6,23 (м, 2H, NH), 4,43 – 4,59 (м, 2H, CH_2), 4,34 – 4,41 (м, 1H, CH), 4,22 – 4,33 (м, 1H, CH), 3,89 – 4,07 (м, 2H, CH), 3,11 – 3,27 (м, 3H, CH_2), 3,11 – 2,86 (м, 6H, CH_2), 2,78 – 2,60 (м, 3H, CH_2), 2,41 – 2,10 (м, 8H, CH_2), 1,79 – 1,92 (м, 1H, CH_2), 1,62 – 1,73 (м, 3H, CH_2), 1,61 – 1,55 (м, 1H, CH_2), 1,41 – 1,55 (м, 6H, CH_2), 1,34 – 1,40 (м, 27H, CH_3), 1,33 – 1,11 (м, 6H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 172,91, 172,88, 172,24, 172,20, 172,15, 172,13, 171,92, 171,61, 171,46, 171,23, 171,09, 157,18, 157,16, 141,18, 140,78, 138,08, 138,02, 133,41, 133,07, 130,61, 130,25, 129,05, 128,20, 128,07, 127,20, 127,15, 126,86, 126,34, 126,31, 126,25, 126,06, 124,97, 80,55, 80,38, 80,30, 79,77, 55,10, 54,53, 53,01, 52,88, 52,19, 49,62, 47,10, 46,81, 45,22, 38,64, 38,58, 36,92, 36,79, 36,58, 35,81, 32,33, 31,95, 31,79, 30,92, 30,66, 30,57, 29,05, 28,97, 27,75, 27,66, 27,63, 27,57, 27,09, 26,70, 26,32, 26,23, 24,74, 24,60, 22,45, 22,26.

ESI-HRMS: для $C_{62}H_{91}ClN_8O_{12}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$ 1175,6518, найдено: 1175,6520.

Синтез соединения 18b

200 мг соединения **17a** (1 экв., 0,143 ммоль) растворили в смеси диэтиламина и ДМФА (25 экв. Et_2NH , 10 мл ДМФА). Смесь перемешивали 20 минут, после чего растворитель удалили при пониженном давлении и остаток переупарили из 0,1% раствора ТФУ в ДХМ и дважды переупарили из хлористого метилена. Остаток высаживали диэтиловым эфиром и декантировали. Осадок дважды промывали диэтиловым эфиром.

Последующую очистку проводили методом препаративной колоночной хроматографии (элюент – ДХМ/0,1% р-р ТФУ в ДХМ/метанол). Таким образом было получено 249 мг соединения **18b** (выход 90%).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,35 (д, $J=7,13$ Гц, 1H, NH), 8,15 (д, $J=8,02$ Гц, 1H, NH), 7,98-7,89 (м, 1H, NH), 7,76-7,62 (м, 4H, NH+NH $_3^+$), 7,40-7,29 (м, 2H, Ar), 7,28-7,18 (м, 4H, Ar), 7,18-7,09 (м, 6H, Ar), 6,86 (д, $J=8,41$ Гц, 2H, Ar), 6,21-6,34 (м, 2H, NH), 4,56-4,44 (м, 2H, CH $_2$), 4,37-4,29 (м, 1H, CH), 4,29-4,23 (м, 1H, CH), 3,24-3,07 (м, 4H, CH $_2$), 3,08-2,90 (м, 5H, CH $_2$), 2,89-2,81 (м, 2H, CH $_2$), 2,78-2,70 (м, 2H, CH $_2$), 2,68-2,57 (м, 2H, CH $_2$), 2,37-2,30 (м, 3H, CH $_2$), 2,29-2,12 (м, 5H, CH $_2$), 1,91-1,79 (м, 1H, CH $_2$), 1,71-1,57 (м, 4H, CH $_2$), 1,56-1,40 (м, 7H, CH $_2$), 1,40-1,32 (м, 29H, CH $_2$ +CH $_3$), 1,32-1,11 (м, 20H, CH $_2$ +CH $_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 173,10, 172,19, 171,93, 171,69, 171,48, 171,25, 158,70, 158,37, 157,21, 153,48, 141,17, 138,00, 132,78, 128,36, 127,50, 124,33, 122,82, 80,59, 80,38, 79,79, 77,66, 56,02, 53,90, 51,59, 29,55, 29,16, 28,30, 27,95, 27,07, 26,73, 25,94.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{66}\text{H}_{99}\text{ClN}_8\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1247,7020, найдено: 1247,7130.

Синтез соединений 18a-j за счёт иммобилизации остатка 1,3-диаминопропана на твердофазном носителе

Получение 2-СТС смолы с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана

Исходя из 1 грамма не активированной 2-СТС смолы был выполнен шаг 1). Затем, активированную смолу промыли трижды ДМФА (10 мл по 1 минуте) и трижды ДХМ (10 мл по 1 минуте). После этого смолу перемешивали 30 минут в 10 мл ДХМ, после чего в реактор добавили раствор 1,3-диаминопропана (4 экв.) в ДХМ (6,24 мл ДХМ и 520 мкл 1,3-диаминопропана) и перемешивали полученную смесь 16 часов. После этого удалили раствор из реактор и последовательно промывали смолу ДМФА (4 раза по одной минуте, 6 мл), ДХМ (4 раза по одной минуте, 6 мл), смесью ДХМ, ДИПЭА и метанола (4 раза по две минуты, 6 мл, соотношение ДХМ/ДИПЭА/метанол = 17/2,5/1), метанолом (3 раза по одной минуте, 6 мл), 20% раствором триэтиамина в ДМФА (3 раза по одной минуте, 6 мл), метанолом (3 раза по одной минуте, 6 мл) и хлористым метиленом (3 раза по одной минуте, 6 мл).

Синтез соединения 18a

Исходя из 195 мг 2-СТС смолы (0,255 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 198 мг Fmoc-(L)-Phe-OH, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг HBTU, 17 мг HOBT, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 198 мг Fmoc-(L)-Phe-OH, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг HBTU, 17 мг HOBT, 3) 6 мл

20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 253 мг соединения **7l**, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 178 мг (выход 54%) соединения **18a**.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСO-d₆, δ , м.д.): 8,37 (д, $J=7,3$ Гц, 1H, NH), 8,20 (д, $J=8,2$ Гц, 1H, NH), 8,04 – 7,92 (м, 1H, NH), 7,82 (уш. с., 3H, NH_3^+), 7,69 – 7,77 (м, 1H, NH), 7,02 – 7,42 (м, 14H, Ar), 6,39 – 6,23 (м, 2H, NH), 4,43 – 4,59 (м, 2H, CH_2), 4,34 – 4,41 (м, 1H, CH), 4,22 – 4,33 (м, 1H, CH), 3,89 – 4,07 (м, 2H, CH), 3,11 – 3,27 (м, 3H, CH_2), 3,11 – 2,86 (м, 6H, CH_2), 2,78 – 2,60 (м, 3H, CH_2), 2,41 – 2,10 (м, 8H, CH_2), 1,79 – 1,92 (м, 1H, CH_2), 1,62 – 1,73 (м, 3H, CH_2), 1,61 – 1,55 (м, 1H, CH_2), 1,41 – 1,55 (м, 6H, CH_2), 1,34 – 1,40 (м, 27H, CH_3), 1,33 – 1,11 (м, 6H, CH_2).

Синтез соединения **18b**

Исходя из 205 мг 2-СТС смолы (0,268 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 246 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 140 мкл ДИПЭА, 203 мг НВТУ, 18 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 208 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 140 мкл ДИПЭА, 203 мг НВТУ, 18 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 266 мг соединения **7l**, 140 мкл ДИПЭА, 203 мг НВТУ, 18 мг НОВt и 6) было получено 117 мг (выход 32%) соединения **18b**.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСO-d₆, δ , м.д.): 8,35 (д, $J=7,13$ Гц, 1H, NH), 8,15 (д, $J=8,02$ Гц, 1H, NH), 7,98-7,89 (м, 1H, NH), 7,76-7,62 (м, 4H, $\text{NH}+\text{NH}_3^+$), 7,40-7,29 (м, 2H, Ar), 7,28-7,18 (м, 4H, Ar), 7,18-7,09 (м, 6H, Ar), 6,86 (д, $J=8,41$ Гц, 2H, Ar), 6,21-6,34 (м, 2H, NH), 4,56-4,44 (м, 2H, CH_2), 4,37-4,29 (м, 1H, CH), 4,29-4,23 (м, 1H, CH), 3,24-3,07 (м, 4H, CH_2), 3,08-2,90 (м, 5H, CH_2), 2,89-2,81 (м, 2H, CH_2), 2,78-2,70 (м, 2H, CH_2), 2,68-2,57 (м, 2H, CH_2), 2,37-2,30 (м, 3H, CH_2), 2,29-2,12 (м, 5H, CH_2), 1,91-1,79 (м, 1H, CH_2), 1,71-1,57 (м, 4H, CH_2), 1,56-1,40 (м, 7H, CH_2), 1,40-1,32 (м, 29H, CH_2+CH_3), 1,32-1,11 (м, 20H, CH_2+CH_3).

Синтез соединения **18c**

Исходя из 222 мг 2-СТС смолы (0,25 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 140 мг Fmoc-(L)-Phe(4-Br)-ОН, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 193 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 247 мг соединения **7l**, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 133 мг (выход 39%) соединения **18c**.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСO-d₆, δ , м.д.): 8,33 (д, $J=7,29$ Гц, 1H, NH), 8,14 - 8,23 (м, 1 H), 7,87 - 7,98 (м, 1H, NH), 7,68 (уш. с., 4H, $\text{NH}+\text{NH}_3^+$), 7,46 (д, $J=8,28$ Гц, 2H, NH), 7,26 - 7,35 (м, 2H, Ar), 7,10 - 7,25 (м, 10H, Ar), 6,23 - 6,34 (м, 2H, NH), 4,54 (с, 1H, CH_2), 4,46 (с, 1H), 4,36 – 4,31 (м, 1H, CH_2), 4,29 – 4,24 (м, 1H, CH), 4,01 - 3,96 (м, 2H, CH), 3,09 - 3,21 (м,

3H, CH₂), 3,03 (д, $J=13,37$ Гц, 3H, CH₂), 2,97 – 2,94 (м, 1H, CH₂), 2,90 -2,88 (м, 1H, CH₂), 2,73 (д, $J=7,34$ Гц, 2H, CH₂), 2,27 - 2,35 (м, 3H, CH₂), 2,14 - 2,26 (м, 4H, CH₂), 1,85 (д, $J=7,67$ Гц, 1H, CH₂), 1,65 (д, $J=6,96$ Гц, 4H, CH₂), 1,43 - 1,55 (м, 5H, CH₂), 1,34 - 1,39 (м, 28H, CH₂+CH₃), 1,27 -1,24 (м, 3H, CH₂).

ESI-HRMS: для C₆₂H₉₀ClN₈O₁₂: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1255,5602, найдено: 1255,5610.

Синтез соединения 18d

Исходя из 490 мг 2-СТС смолы (0,5 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 459 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 256 мкл ДИПЭА, 379 мг HBTU, 34 мг HOBT, 3) 5 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 459 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 256 мкл ДИПЭА, 379 мг HBTU, 34 мг HOBT, 3) 8 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 495 мг соединения **7l**, 256 мкл ДИПЭА, 379 мг HBTU, 34 мг HOBT и 6) было получено 131 мг (выход 18%) соединения **18d**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 7,24 - 7,37 (м, 2H, Ar) 7,15 - 7,20 (м, 1H, Ar) 7,12 (дд, $J=8,44$, 2,85 Гц, 3H, Ar) 6,99 (д, $J=7,29$ Гц, 2H, Ar) 6,85 (д, $J=8,55$ Гц, 2H, Ar) 6,78 (д, $J=8,33$ Гц, 2H, Ar) 4,51 (м, 1H, CH) 4,44 (м, $J=2,69$ Гц, 1H, CH) 4,28 (дд, $J=9,48$, 4,44 Гц, 1H, CH) 4,14 - 4,21 (м, 1H, CH) 3,99 (дд, $J=7,86$, 5,29 Гц, 1H, CH) 3,88 - 3,96 (м, 1H, CH) 3,10 - 3,19 (м, 3H, CH₂) 2,94 - 3,05 (м, 4H, CH₂) 2,80 - 2,89 (м, 1H, CH₂) 2,67 - 2,76 (м, 3H, CH₂) 2,52 - 2,63 (м, 1H, CH₂) 2,28 - 2,38 (м, 4H, CH₂) 2,13 - 2,22 (м, 4H, CH₂) 1,83 (дд, $J=12,99$, 5,97 Гц, 1H, CH₂) 1,63 (с, 3H, CH₂) 1,41 - 1,52 (м, 5H, CH₂) 1,31 - 1,38 (м, 31H, C(CH₃)₃) 1,27 (с, 2H, CH₂) 1,18 - 1,24 (м, 24H, C(CH₃)₃) 1,13 (с, 2H, CH₂).

ESI-HRMS: для C₇₀H₁₀₇ClN₈O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1319,7668, найдено: 1319,7669.

Синтез соединения 18e

Исходя из 251 мг 2-СТС смолы (0,328 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 302 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 171 мкл ДИПЭА, 249 мг HBTU, 22 мг HOBT, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 254 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 171 мкл ДИПЭА, 249 мг HBTU, 22 мг HOBT, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 342 мг соединения **7m**, 171 мкл ДИПЭА, 249 мг HBTU, 22 мг HOBT и 6) было получено 228 мг (выход 49%) соединения **18e**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,34 (д, $J=7,34$ Гц, 1H, NH), 8,14 (д, $J=8,22$ Гц, 1H, NH), 7,97-7,87 (м, 1H, NH), 7,67 (уш. с., 4H, NH₃⁺), 7,43-7,56 (м, 2H, Ar), 7,26-7,17 (м, 3H, Ar), 7,17-7,08 (м, 7H, Ar), 6,87 (д, $J=7,62$ Гц, 2H, Ar), 6,34-6,21 (м, 2H, NH), 4,52-

4,41 (м, 2H, CH₂), 4,37-4,30 (м, 1H, CH), 4,30-4,21 (м, 1H, CH), 4,05-3,98 (м, 1H, CH), 3,98-3,89 (м, 1H, CH), 3,21-3,08 (м, 4H, CH₂), 3,07-2,93 (м, 5H, CH₂), 2,90-2,80 (м, 2H, CH₂), 2,79-2,68 (м, 3H, CH₂), 2,68-2,57 (м, 1H, CH₂), 2,39-2,28 (м, 4H, CH₂), 2,28-2,11 (м, 6H, CH₂), 1,89-1,80 (м, 1H, CH₂), 1,70-1,58 (м, 4H, CH₂), 1,58-1,41 (м, 7H, CH₂), 1,41-1,30 (м, 36H, CH₂+CH₃).

Синтез соединения 18f

Исходя из 250 мг 2-СТС смолы (0,25 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 261 мг соединения **7m**, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 107 мг (выход 29%) соединения **18f**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 7,24 - 7,37 (м, 2H, Ar) 7,15 - 7,20 (м, 1H, Ar) 7,12 (дд, *J*=8,44, 2,85 Гц, 3H, Ar) 6,99 (д, *J*=7,29 Гц, 2H, Ar) 6,85 (д, *J*=8,55 Гц, 2H, Ar) 6,78 (д, *J*=8,33 Гц, 2H, Ar) 4,51 (м, 1H, CH) 4,44 (м, *J*=2,69 Гц, 1H, CH) 4,28 (дд, *J*=9,48, 4,44 Гц, 1H, CH) 4,14 - 4,21 (м, 1H, CH) 3,99 (дд, *J*=7,86, 5,29 Гц, 1H, CH) 3,88 - 3,96 (м, 1H, CH) 3,10 - 3,19 (м, 3H, CH₂) 2,94 - 3,05 (м, 4H, CH₂) 2,80 - 2,89 (м, 1H, CH₂) 2,67 - 2,76 (м, 3H, CH₂) 2,52 - 2,63 (м, 1H, CH₂) 2,28 - 2,38 (м, 4H, CH₂) 2,13 - 2,22 (м, 4H, CH₂) 1,83 (дд, *J*=12,99, 5,97 Гц, 1H, CH₂) 1,63 (с, 3H, CH₂) 1,41 - 1,52 (м, 5H, CH₂) 1,31 - 1,38 (м, 31H, C(CH₃)₃) 1,27 (с, 2H, CH₂) 1,18 - 1,24 (м, 24H, C(CH₃)₃) 1,13 (с, 2H, CH₂).

ESI-HRMS: для C₇₀H₁₀₇BrN₈O₁₄: *m/z* рассчитано для [M+H⁺] 1363,7163, найдено: 1363,7157.

Синтез соединения 18g

Исходя из 222 мг 2-СТС смолы (0,25 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 140 мг Fmoc-(L)-Phe(4-Br)-ОН, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 193 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 267 мг соединения **7d**, 128 мкл ДИПЭА, 190 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 70 мг (выход 20%) соединения **18g**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,31 (д, *J*=6,41 Гц, 1H, NH), 8,17 (д, *J*=6,85 Гц, 1H), 7,94 (д, *J*=5,21 Гц, 1H, NH), 7,87 (д, *J*=8,00 Гц, 1H, NH), 7,82 (д, *J*=8,06 Гц, 1H), 7,74 (уш. с., 4H, NH₃⁺), 7,45 (д, *J*=8,28 Гц, 2H, Ar), 7,24 - 7,31 (м, 3H, Ar), 7,12 - 7,24 (м, 8H, Ar), 6,24 - 6,34 (м, 2H, NH), 4,60 (с, 2H, CH₂), 4,53 (с, 3H, CH₂), 3,89 - 4,06 (м, 5H, CH), 3,20 - 3,18 (м, 1H, CH₂), 3,07 - 3,17 (м, 3H, CH₂), 2,98 - 3,07 (м, 3H, CH₂), 2,95 - 2,90 (м, 2H, CH₂), 2,88 - 2,85 (м, 2H, CH₂), 2,75 - 2,73 (м, 2H, CH₂), 2,65 - 2,63 (м, 1H, CH₂), 2,26 - 2,38

(м, 4Н, CH₂), 2,13 - 2,24 (м, 5Н, CH₂), 1,60 - 1,70 (м, 3Н, CH₂), 1,52 (с, 11Н, CH₃), 1,40 - 1,48 (м, 4Н, CH₂), 1,33 - 1,39 (м, 31Н, CH₃), 1,29 (м, 3Н, CH₂), 1,20 - 1,24 (м, 6Н, CH₃).

Синтез соединения 18h

Исходя из 250 мг 2-СТС смолы (0,25 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 267 мг соединения 7d, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 85 мг (выход 23%) соединения 18h.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,33 (д, *J*=2,74 Гц, 1Н, NH) 8,12 (д, *J*=9,76 Гц, 1Н, NH) 7,85 - 7,96 (м, 2Н, Ar) 7,82 (д, *J*=8,33 Гц, 1Н, Ar) 7,65 (уш. с., 4Н, NH₃⁺) 7,21 - 7,30 (м, 2Н, Ar) 7,09 - 7,16 (м, 2Н, Ar) 7,02 (д, *J*=8,77 Гц, 2Н, Ar) 6,83 - 6,90 (м, 2Н, Ar) 6,80 (д, *J*=8,50 Гц, 2Н, Ar) 6,22 - 6,31 (м, 2Н, NH) 4,60 (уш. с., 2Н, CH) 4,53 (д, *J*=5,81 Гц, 2Н, CH) 4,32 (уш. с., 3Н, CH) 4,22 (уш. с., 2Н, CH) 3,89 - 4,05 (м, 3Н, CH) 3,15 (т, *J*=7,26 Гц, 3Н, CH₂) 2,93 - 3,06 (м, 4Н, CH₂) 2,85 (дд, *J*=15,10, 9,13 Гц, 2Н, CH₂) 2,68 - 2,80 (м, 3Н, CH₂) 2,55 - 2,68 (м, 1Н, CH₂) 2,33 (д, *J*=8,11 Гц, 4Н, CH₂) 2,12 - 2,28 (м, 5Н, CH₂) 1,76 - 1,90 (м, 1Н, CH₂) 1,58 - 1,69 (м, 3Н, CH₂) 1,52 (д, *J*=1,48 Гц, 11Н, C(CH₃)₃) 1,33 - 1,39 (м, 30Н, C(CH₃)₃) 1,23 (дд, *J*=1,59, 1,48 Гц, 22Н, CH₃).

ESI-HRMS: для C₇₀H₁₀₇BrN₈O₁₄: m/z рассчитано для [M+H⁺] 1385,8582, найдено: 1385,8575.

Синтез соединения 18i

Исходя из 783 мг 2-СТС смолы (1,024 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 941 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 535 мкл ДИПЭА, 777 мг НВТУ, 78 мг НОВt, затем, исходя из 586 мг модифицированной смолы выполняли следующие шаги: 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 397 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 268 мкл ДИПЭА, 389 мг НВТУ, 39 мг НОВt, 3) 8 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, и получили таким образом 549 мг смолы с иммобилизованным фрагментом. После чего осуществили шаги 5) 144 мг соединения 7a, 171 мкл ДИПЭА, 249 мг НВТУ, 22 мг НОВt и 6) и получили 108 мг (выход 55%) соединения 18i.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,35 (д, *J*=7,13 Гц, 1Н, NH), 8,18-8,00 (м, 2Н, NH+Ar), 7,98-7,86 (м, 1Н, NH), 7,80-7,60 (м, 5Н, NH+Ar+NH₃⁺), 7,60-7,47 (м, 1Н, Ar), 7,30-7,08 (м, 8Н, Ar), 6,92-6,82 (м, 2Н, Ar), 6,35-6,20 (м, 2Н, NH), 4,96-4,70 (м, 2Н, CH₂), 4,39-4,29 (м, 1Н, CH), 4,29-4,21 (м, 1Н, CH), 4,07-3,88 (м, 2Н, CH+CH), 3,32-3,09 (м, 3Н, CH₂),

3,08-2,90 (м, 4Н, CH₂), 2,89-2,81 (м, 2Н, CH₂), 2,80-2,69 (м, 2Н, CH₂), 2,68-2,60 (м, 1Н, CH₂), 2,45-2,10 (м, 8Н, CH₂), 1,91-1,79 (м, 1Н, CH₂), 1,71-1,57 (м, 4Н, CH₂), 1,56-1,40 (м, 7Н, CH₂), 1,40-1,32 (м, 29Н, CH₂+CH₃), 1,32-1,11 (м, 20Н, CH₂+CH₃).

Синтез соединения 18j

Исходя из 250 мг 2-СТС смолы (0,25 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 235 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 200 мг соединения **7a**, 132 мкл ДИПЭА, 195 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 124 мг (выход 43%) соединения **18j**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,39-8,25 (м, 1Н, NH), 8,18-8,00 (м, 2Н, NH+Ar), 7,98-7,86 (м, 1Н, NH), 7,80-7,60 (м, 5Н, NH+Ar+NH₃⁺), 7,60-7,47 (м, 1Н, Ar), 7,30-7,08 (м, 8Н, Ar), 6,92-6,82 (м, 2Н, Ar), 6,35-6,20 (м, 2Н, NH), 4,96-4,70 (м, 2Н, CH₂), 4,39-4,29 (м, 1Н, CH), 4,29-4,21 (м, 1Н, CH), 4,07-3,88 (м, 2Н, CH+CH), 3,32-3,09 (м, 3Н, CH₂), 3,08-2,90 (м, 4Н, CH₂), 2,89-2,81 (м, 2Н, CH₂), 2,80-2,69 (м, 2Н, CH₂), 2,68-2,60 (м, 1Н, CH₂), 2,45-2,10 (м, 8Н, CH₂), 1,91-1,79 (м, 1Н, CH₂), 1,71-1,57 (м, 4Н, CH₂), 1,56-1,40 (м, 7Н, CH₂), 1,40-1,32 (м, 29Н, CH₂+CH₃), 1,32-1,11 (м, 20Н, CH₂+CH₃).

Синтез соединения 20

Исходя из 195 мг 2-СТС смолы (0,255 ммоль) с иммобилизованным фрагментом 1,3-диаминопропана путём последовательного выполнения шагов 4) 239 мг Fmoc-(L)-Lys(ε-NH₂)-ОН, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 4 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 198 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 198 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг НВТУ, 17 мг НОВt, 3) 6 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 5) 253 мг соединения **7l**, 134 мкл ДИПЭА, 193 мг НВТУ, 17 мг НОВt и 6) было получено 111 мг (выход 21%) соединения **20**.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,36 (д, *J*=6,91 Гц, 1Н, NH), 8,20 (д, *J*=7,40 Гц, 1Н, NH), 8,03-7,93 (м, 1Н, NH), 7,75-7,60 (м, 5Н, NH+NH₃⁺), 7,40-7,08 (м, 14Н, Ar), 6,78 (т, *J*=4,52 Гц, 1Н, NH), 6,34-6,21 (м, 2Н, NH), 4,57-4,45 (м, 2Н, CH₂), 4,44-4,39 (м, 1Н, CH), 4,32-4,24 (м, 1Н, CH), 3,23-3,07 (м, 5Н, CH₂), 3,07-2,90 (м, 5Н, CH₂), 2,89-2,82 (м, 3Н, CH₂), 2,80-2,71 (м, 2Н, CH₂), 2,69-2,60 (м, 1Н, CH₂), 2,39-2,27 (м, 4Н, CH₂), 2,26-2,11 (м, 5Н, CH₂), 1,90-1,80 (м, 1Н, CH₂), 1,71-1,61 (м, 4Н, CH₂), 1,60-1,40 (м, 9Н, CH₂), 1,39-1,29 (м, 43Н, CH₂+CH₃), 1,29-1,10 (м, 9Н, CH₂+CH₃).

Синтез трипептида 21a, иммобилизованного на 2-СТС смоле

Исходя из 713 мг не активированной 2-СТС смолы с путём последовательного выполнения шагов 1) 15 мл ДХМ, 197 мкл SOCl_2 , 17 мкл ДМФА, 2) 935 мг Fmoc-(L)-Lys(ϵ -NHvoc)-ОН, 1739 мкл ДИПЭА, 3) 8 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 772 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 522 мкл ДИПЭА, 750 мг HBTU, 68 мг HOBT, 3) 8 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 772 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 522 мкл ДИПЭА, 750 мг HBTU, 68 мг HOBT, 3) 10 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, было получено 968 мг смолы с иммобилизованным трипептидом **21a**.

Синтез трипептида 21b, иммобилизованного на 2-СТС смоле

Исходя из 1000 мг не активированной 2-СТС смолы с путём последовательного выполнения шагов 1) 20 мл ДХМ, 276 мкл SOCl_2 , 24 мкл ДМФА, 2) 1378 мг Fmoc-(L)-Lys(ϵ -NHvoc)-ОН, 2617 мкл ДИПЭА, 3) 8 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 1351 мг Fmoc-(L)-Tyr(OtBu)-ОН, 768 мкл ДИПЭА, 1115 мг HBTU, 99 мг HOBT, 3) 10 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, 4) 1139 мг Fmoc-(L)-Phe-ОН, 768 мкл ДИПЭА, 1115 мг HBTU, 99 мг HOBT, 3) 15 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА, было получено 2050 мг смолы с иммобилизованным трипептидом **21a**.

Синтез соединения 22a

Исходя из 1,025 г смолы с иммобилизованным трипептидом **21b** путём последовательного выполнения шагов 5) 758 мг соединения **7l**, 384 мкл ДИПЭА, 557 мг HBTU, 50 мг HOBT и 6) было получено 937 мг (выход 89%) соединения **22a** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,15 (м, 2H, NH), 7,87 (м, 2H, NH), 7,24-7,33 (м, 2H, Ar), 7,20 (м, 3H, Ar), 7,07-7,18 (м, 6H, Ar), 6,84 (д, $J=7,95$ Гц, 2H, Ar), 6,76 (м, 1H, NH), 6,19-6,34 (м, 2H, NH), 4,43-4,58 (м, 3H, CH_2+CH), 4,31 (м, 1H, CH), 4,11 (м, 1H, CH), 3,88-4,06 (м, 3H, CH), 3,12-3,19 (м, 2H, CH_2), 2,84-3,09 (м, 9H, CH_2), 2,54-2,63 (м, 1H, CH_2), 2,30-2,38 (м, 2H, CH_2), 2,08-2,30 (м, 7H, CH_2), 1,78-1,91 (м, 1H, CH_2), 1,66 (м, 2H, CH_2), 1,40-1,62 (м, 8H, CH_2), 1,30-1,40 (м, 42H, CH_3+CH_2), 1,12-1,30 (м, 18H, CH_3+CH_2).

Синтез соединения 22b

Исходя из 576 мг смолы с иммобилизованным трипептидом **21b** путём последовательного выполнения шагов 5) 413 мг соединения **7m**, 195 мкл ДИПЭА, 288 мг HBTU, 26 мг HOBT и 6) было получено 223 мг (выход 40%) соединения **22a** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,51 (уш. с., 1H, COOH), 8,15 (д, $J=7,4$ Гц, 2H, NH), 7,79-7,94 (м, 2H, NH), 7,44-7,56 (м, 2H, Ar), 7,08-7,24 (м, 9H, Ar), 6,84 (д, $J=7,89$ Гц, 2H, Ar), 6,78 (т, $J=5,26$ Гц, 1H, NH), 6,21-6,32 (м, 2H, NH), 4,41-4,53 (м, 2H, CH_2+CH), 4,29-4,37 (м, 1H, CH), 4,12 (м, 1H, CH), 4,02 (м, 1H, CH), 3,94 (м, 1H, CH), 3,15 (м,

2H, CH₂), 2,91-3,08 (м, 4H, CH₂), 2,77-2,90 (м, 4H, CH₂), 2,55-2,66 (м, 1H, CH₂), 2,11-2,36 (м, 8H, CH₂), 1,82-1,90 (м, 1H, CH₂), 1,66 (м, 2H, CH₂), 1,53-1,63 (м, 2H, CH₂), 1,41-1,53 (м, 4H, CH₂), 1,31-1,40 (м, 42H, CH₂+CH₃), 1,13-1,31 (м, 18H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 173,32, 172,24, 172,20, 172,07, 172,00, 171,92, 171,45, 171,38, 171,04, 157,13, 155,59, 153,39, 138,13, 138,00, 137,51, 135,54, 132,64, 131,56, 131,24, 129,72, 129,66, 129,03, 128,66, 128,04, 126,20, 123,44, 120,15, 119,93, 115,04, 80,59, 80,42, 80,33, 79,78, 77,60, 77,38, 54,52, 53,81, 52,97, 52,84, 52,18, 51,98, 49,56, 46,92, 46,65, 45,11, 38,59, 37,02, 36,44, 32,34, 31,97, 31,80, 30,91, 30,77, 30,64, 29,18, 29,07, 28,57, 28,29, 27,75, 27,66, 27,64, 26,70, 26,32, 26,23, 24,73, 24,60, 22,71, 22,54, 22,45, 22,26.

Синтез соединения 22с

Исходя из 621 мг смолы с иммобилизованным трипептидом **21b** путём последовательного выполнения шагов 5) 496 мг соединения **7d**, 233 мкл ДИПЭА, 338 мг НВТУ, 30 мг НОВт и 6) было получено 523 мг (выход 76%) соединения **22с** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12,54 (уш. с, 1H, COOH), 8,15 (д, J=6,17 Гц, 2H, NH), 7,80-7,90 (м, 4H, Ar+NH), 7,27 (д, J=8,19 Гц, 2H, Ar), 7,11-7,24 (м, 7H, Ar), 6,84 (д, J=8,4 Гц, 2H, Ar), 6,77 (м, 1H, NH), 6,21-6,31 (м, 2H, NH), 4,60 (м, 1H, CH), 4,44-4,56 (м, 2H, CH₂), 4,33 (м, 1H, CH), 4,12 (м, 1H, CH), 3,89-4,05 (м, 2H, CH), 3,11-3,23 (м, 2H, CH₂), 2,91-3,08 (м, 4H, CH₂), 2,75-2,84 (м, 1H, CH₂), 2,54-2,64 (м, 1H, CH₂), 2,29-2,37 (м, 2H, CH₂), 2,22-2,29 (м, 2H, CH₂), 2,12-2,22 (м, 4H, CH₂), 1,82-1,90 (м, 1H, CH₂), 1,60-1,73 (м, 2H, CH₂), 1,40-1,60 (м, 13H, CH₂+CH₃), 1,39-1,48 (м, 4H, CH₂), 1,35 (м, 41H, CH₂+CH₃), 1,12-1,31 (м, 18H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 173,32, 172,19, 172,12, 172,05, 171,92, 171,45, 171,39, 171,04, 164,81, 164,73, 157,13, 155,59, 153,38, 145,42, 143,77, 143,31, 138,13, 135,53, 132,79, 132,65, 130,25, 129,98, 129,65, 129,47, 129,17, 129,03, 128,03, 127,45, 126,51, 126,20, 123,44, 115,04, 87,97, 85,65, 80,68, 80,57, 80,41, 80,32, 79,78, 77,59, 77,37, 54,53, 53,81, 52,96, 52,81, 52,18, 51,97, 50,05, 47,41, 46,78, 45,30, 40,90, 38,60, 38,54, 37,01, 36,42, 35,83, 32,37, 31,99, 31,79, 30,91, 30,77, 30,64, 29,18, 29,07, 28,56, 28,28, 27,81, 27,75, 27,65, 27,62, 26,71, 26,32, 26,24, 24,74, 24,59, 22,71, 22,46, 22,24.

Синтез соединения 22d

Исходя из 572 мг смолы с иммобилизованным трипептидом **21a** путём последовательного выполнения шагов 5) 379 мг соединения **7d**, 178 мкл ДИПЭА, 258 мг НВТУ, 23 мг НОВт и 6) было получено 457 мг (выход 95%) соединения **22d** в виде жёлтого маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,56 (уш. с., 1H, COOH), 8,15 (д, $J = 7,89$ Гц, 2H, NH), 7,90-8,01 (м, 1H, NH), 7,79-7,89 (м, 3H, Ar+NH), 7,11-7,30 (м, 12H, Ar), 6,78 (м, 1H, NH), 6,21-6,31 (м, 2H, NH), 4,47-4,63 (м, 3H, CH+CH₂), 4,35 (м, 1H, CH), 4,13 (м, 1H, CH), 3,89-4,05 (м, 2H, CH), 3,04-3,23 (м, 3H, CH₂), 2,82-3,04 (м, 6H, CH₂), 2,56-2,67 (м, 1H, CH₂), 2,31-2,37 (м, 1H, CH₂), 2,10-2,30 (м, 6H, CH₂), 1,79-1,91 (м, 1H, CH₂), 1,61-1,72 (м, 2H, CH₂), 1,42-1,61 (м, 16H, CH₂+C(CH₃)₃), 1,35 (м, 42H, C(CH₃)₃+CH₂), 1,10-1,30 (м, 8H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 173,34, 172,23, 172,19, 172,13, 172,06, 171,92, 171,45, 171,38, 171,05, 171,00, 164,82, 164,74, 157,13, 155,60, 143,77, 143,31, 138,12, 137,97, 135,53, 130,26, 129,98, 129,47, 129,17, 129,06, 128,09, 128,02, 127,45, 126,51, 126,25, 126,19, 115,04, 80,69, 80,57, 80,41, 80,33, 79,78, 77,38, 54,39, 53,77, 52,97, 52,82, 52,19, 51,97, 50,07, 47,42, 46,80 45,30, 38,60, 38,53, 37,06, 36,95, 31,99, 31,78, 30,91, 30,76, 30,63, 29,18, 29,07, 28,29, 27,81, 27,75, 27,65, 27,63, 26,71, 26,32, 26,24, 24,75, 24,59, 22,54, 22,24, 22,73.

Общая методика ацилирования 3-азидопропиламина

Соединение **22a-d** (1 экв.) растворили в ДМФА и полученную смесь охладил до 0°C. Затем в строгом порядке добавили 3-азидопропиламин (2 экв.), НОВт (1,5 экв.), ДИПЭА (2 экв.) и НВТУ (1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток растворяли в ДХМ и промывали водой (два раза), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (два раза) и насыщенным раствором хлорида натрия (один раз). Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии с элюентом хлористый метилен/метанол.

Синтез соединения 23a

Из соединения **22a** (927 мг, 0,653 ммоль) в 30 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (131 мг, 1,306 ммоль), НОВт (132 мг, 0,979 ммоль) и НВТУ (371 мг, 0,979 ммоль) в присутствии DIPEA (227 мкл, 1,306 ммоль) было получено соединение **23a** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 81% (796 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7,97 (т, $J = 6,11$ Гц, 1H, NH), 7,79 (м, 1H, NH), 7,29-7,35 (м, 2H, Ar), 6,87-7,26 (м, 11H, Ar), 6,08-6,23 (м, 1H, NH), 4,41-4,57 (м, 3H, CH₂+CH), 4,21-4,41 (м, 4H, CH), 3,20-3,47 (м, 7H, CH₂), 2,85-3,20 (м, 6H, CH₂), 2,80 (м, 1H, CH₂), 2,53 (м, 1H, CH₂), 2,43 (м, 1H, CH₂), 2,13-2,39 (м, 6H, CH₂), 1,99-2,13 (м, 2H, CH₂), 1,79-1,91 (м, 3H, CH₂), 1,50-1,74 (м, 9H, CH₂), 1,36-1,50 (м, 40H, CH₂+CH₃), 1,19-1,36 (м, 17H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 174,83, 172,85, 172,39, 172,11, 172,05, 172,00, 171,86, 171,67, 171,63, 156,58, 156,10, 154,94, 153,57, 139,58, 138,75, 135,18, 134,45,

133,92, 132,78, 129,82, 129,40, 128,99, 128,54, 128,24, 127,25, 126,96, 125,76, 125,51, 123,84, 81,46, 81,33, 81,06, 80,11, 80,04, 78,98, 77,95, 77,91, 76,89, 56,72, 56,64, 56,39, 53,49, 52,91, 52,70, 52,48, 52,38, 50,02, 48,33, 47,46, 46,79, 45,35, 40,29, 39,13, 36,49, 36,17, 34,62, 32,52, 32,22, 31,78, 31,17, 30,84, 30,35, 28,79, 28,43, 28,15, 27,98, 27,95, 27,76, 27,64, 27,59, 27,56, 26,28, 24,39, 23,78, 22,05.

Синтез соединения **23b**

Из соединения **22b** (270 мг, 0,1844 ммоль) в 23 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (37 мг, 0,369 ммоль), НОВт (37 мг, 0,277 ммоль) и НВТУ (105 мг, 0,277 ммоль) в присутствии DIPEA (64 мкл, 0,369 ммоль) было получено соединение **23b** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 76% (218 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,32 (д, $J=7,09$ Гц, 1H, NH), 8,16 (д, $J=7,83$ Гц, 1H, NH), 7,90-7,98 (м, 1H, NH), 7,67 (д, $J=8,13$ Гц, 1H, NH), 7,60 (м, 1H, NH), 7,53 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,47 (д, $J=8,38$ Гц, 1H, Ar), 7,18-7,23 (м, 2H, Ar), 7,09-7,18 (м, 7H, Ar), 6,85 (д, $J=8,25$ Гц, 2H, Ar), 6,76 (м, 1H, NH), 6,27-6,31 (м, 1H, NH), 6,24 (м, 1H, NH), 4,49-4,43 (м, 2H, CH_2), 4,35-4,41 (м, 1H, CH), 4,28 (м, 1H, CH), 4,10 (м, 1H, CH), 3,98-4,05 (м, 1H, CH), 3,91-3,98 (м, 1H, CH), 3,30 (м, 2H, CH_2), 2,93-3,19 (м, 8H, CH_2), 2,82-2,92 (м, 4H, CH_2), 2,59-2,67 (м, 1H, CH_2), 2,31 (т, $J=7,06$ Гц, 3H, CH_2), 2,23-2,28 (м, 1H, CH_2), 2,13-2,23 (м, 4H, CH_2), 1,80-1,90 (м, 1H, CH_2), 1,58-1,70 (м, 5H, CH_2), 1,40-1,58 (м, 8H, CH_2), 1,31-1,39 (м, 43H, CH_3+CH_2), 1,13-1,27 (м, 17H, CH_3+CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172,77, 172,24, 172,20, 172,04, 171,97, 171,92, 171,70, 171,62, 171,45, 171,29, 170,87, 157,12, 155,59, 153,45, 137,99, 137,89, 137,49, 132,61, 131,56, 131,24, 129,72, 129,58, 128,98, 128,63, 128,08, 126,29, 123,51, 120,15, 119,94, 80,59, 80,41, 80,33, 79,78, 77,64, 77,38, 55,10, 54,70, 52,97, 52,83, 52,17, 49,56, 48,23, 46,93, 46,64, 45,13, 38,69, 36,92, 35,81, 32,33, 31,97, 31,80, 31,60, 30,91, 30,73, 30,58, 29,25, 29,07, 29,00, 28,55, 28,28, 27,75, 27,65, 27,63, 26,70, 26,33, 26,24, 24,72, 24,60, 22,80, 22,45, 22,26.

Синтез соединения **23c**

Из соединения **22c** (329 мг, 0,2214 ммоль) в 25 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (44 мг, 0,443 ммоль), НОВт (45 мг, 0,332 ммоль) и НВТУ (126 мг, 0,332 ммоль) в присутствии DIPEA (77 мкл, 0,443 ммоль) было получено соединение **23c** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 86% (300 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,33 (д, $J=7,03$ Гц, 1H, NH), 8,17 (д, $J=7,76$ Гц, 1H, NH), 7,91-8,00 (м, 1H, NH), 7,87 (д, $J=8,38$ Гц, 1H, Ar), 7,82 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,66 (м, 1H, Ar), 7,59 (м, 1H, Ar), 7,24-7,31 (м, 2H, Ar), 7,18-7,24 (м, 2H, Ar), 7,10-7,18 (м, 5H, Ar), 6,85 (м, 2H, Ar), 6,76 (м, 1H, NH), 6,21-6,30 (м, 2H, NH), 4,59 (м, 1H, CH_2), 4,53 (м, 1H, CH_2), 4,34-4,42 (м, 1H, CH), 4,28 (м, 1H, CH), 4,09 (м, 1H, CH), 3,98-4,05 (м, 1H, CH),

3,89-3,98 (м, 1H, CH), 3,30 (м, 2H, CH₂) 3,12-3,22 (м, 2H, CH₂), 3,05-3,12 (м, 2H, CH₂), 2,93-3,05 (м, 3H, CH₂), 2,81-2,93 (м, 4H, CH₂), 2,59-2,68 (м, 1H, CH₂), 2,28-2,36 (м, 3H, CH₂), 2,12-2,28 (м, 5H, CH₂), 1,79-1,90 (м, 1H, CH₂), 1,58-1,70 (м, 4H, CH₂), 1,52 (м, 10H, CH₂+CH₃), 1,39-1,49 (м, 5H, CH₂), 1,31-1,39 (м, 39H, CH₂+CH₃), 1,24-1,31 (м, 3H, CH₂), 1,12-1,24 (м, 15H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172,79, 172,18, 172,09, 172,02, 171,92, 171,71, 171,63, 171,45, 171,29, 170,87, 164,81, 164,73, 157,12, 155,58, 153,45, 143,76, 143,29, 137,88, 132,61, 130,25, 129,98, 129,57, 129,47, 129,16, 128,98, 128,08, 127,45, 126,48, 126,28, 123,51, 80,68, 80,57, 80,40, 80,32, 79,78, 77,63, 77,37, 55,13, 54,71, 52,87, 52,18, 48,23, 38,69, 36,90, 35,81, 32,35, 31,98, 31,79, 31,59, 30,91, 30,72, 30,58, 29,24, 29,07, 28,54, 28,28, 27,80, 27,75, 27,64, 26,71, 26,34, 24,73, 24,58, 22,80, 22,46, 22,24.

Синтез соединения 23d

Из соединения **22d** (179 мг, 0,127 ммоль) в 15 мл ДМФА, 3-азидопропиламина (25 мг, 0,253 ммоль), НОВт (26 мг, 0,19 ммоль) и НВТУ (72 г, 0,19 ммоль) в присутствии DIPEA (44 мкл, 0,253 ммоль) было получено соединение **23d** в виде жёлтого маслянистого вещества с выходом 47% (129 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8,33 (д, J=7,21 Гц, 1H, NH), 8,19 (д, J=7,64 Гц, 1H, NH), 7,90-7,99 (м, 1H, NH), 7,87 (д, J=8,19 Гц, 1H, Ar), 7,82 (д, J=8,19 Гц, 1H, Ar), 7,66-7,75 (м, 1H, NH), 7,55-7,64 (м, 1H, NH), 7,22-7,29 (м, 6H, Ar), 7,11-7,22 (м, 6H, Ar), 6,76 (м, 1H, NH), 6,21-6,32 (м, 2H, NH), 4,59 (м, 1H), 4,53 (м, 1H, CH), 4,38-4,47 (м, 1H, CH₂), 4,30 (м, 1H, CH₂), 4,10 (м, 1H, CH), 3,89-4,05 (м, 2H, CH), 3,16-3,23 (м, 1H, CH₂), 3,11-3,16 (м, 1H, CH₂), 3,03-3,11 (м, 3H, CH₂), 2,91-3,03 (м, 3H, CH₂), 2,82-2,91 (м, 3H, CH₂), 2,27-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,19-2,25 (м, 2H, CH₂), 2,12-2,19 (м, 2H, CH₂), 1,77-1,91 (м, 1H, CH₂), 1,58-1,71 (м, 4H, CH₂), 1,52 (м, 11H, CH₂+CH₃), 1,29-1,50 (м, 49H, CH₂+CH₃), 1,25 (м, 2H, CH₂), 1,11-1,23 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172,74, 172,23, 172,18, 172,11, 172,03, 171,92, 171,75, 171,61, 171,45, 171,30, 170,84, 164,82, 164,73, 157,13, 155,59, 143,76, 143,29, 137,95, 137,92, 130,26, 129,98, 129,47, 129,16, 129,08, 129,00, 128,16, 128,07, 127,45, 126,49, 126,32, 126,27, 80,69, 80,57, 80,41, 80,32, 79,78, 77,38, 55,00, 54,62, 52,96, 52,90, 52,81, 52,18, 50,06, 48,23, 47,41, 46,79, 45,33, 38,68, 36,81, 36,61, 35,82, 32,36, 31,98, 31,78, 31,58, 30,91, 30,70, 30,55, 29,25, 29,07, 28,28, 27,81, 27,75, 27,65, 27,62, 26,72, 26,34, 26,25, 24,74, 24,58, 22,81, 22,45, 22,25.

Общая методика удаления защитных групп с получением соединений 24a-d

Соединения **23a-d** растворили в смеси трифторуксусной кислоты (50% об.), дихлорметана (40% об.), триизопропилсилана (5% об.) и воды (5% об.) и перемешивали в течение 4 часов. Растворитель удалили при пониженном давлении, остаток трижды переупарили из хлористого метилена, после чего высаживали диэтиловым эфиром. Осадок декантировали и трижды промывали диэтиловым эфиром. Выделение продукта в индивидуальном виде осуществляли методом обращённо-фазовой препаративной хроматографии (элюент – 0,1% раствор ТФУ в воде/ацетонитрил).

Синтез соединения **24a**

Из 795 мг соединения **23a** (0,529 ммоль) в 15 мл смеси ТФУ/ДХМ/ТИПС/вода было получено 517 мг соединения **24a** (выход 76%) в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,30-8,36 (м, 1H, NH), 8,12 (д, $J=7,52$ Гц, 1H, NH), 7,91-8,00 (м, 1H, NH), 7,74 (м, 1H, NH), 7,49-7,57 (м, 1H, NH), 7,24-7,39 (м, 2H, Ar), 7,07-7,24 (м, 7H, Ar), 7,03 (м, 2H, Ar), 6,65 (д, $J=8,38$ Гц, 2H, Ar), 6,28-6,38 (м, 2H, NH), 4,38-4,59 (м, 2H, CH_2), 4,22-4,35 (м, 2H, CH), 3,96-4,13 (м, 3H, CH), 3,25-3,33 (м, 2H, CH_2), 3,11-3,22 (м, 2H,), 3,07 (м, 2H, CH_2), 2,86-3,04 (м, 4H, CH_2), 2,76-2,86 (м, 1H, CH_2), 2,59-2,76 (м, 3H, CH_2), 2,11-2,39 (м, 8H, CH_2), 1,84-1,95 (м, 1H, CH_2), 1,55-1,75 (м, 5H, CH_2), 1,32-1,55 (м, 10H, CH_2), 1,07-1,32 (м, 7H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 174,87, 174,58, 174,15, 173,07, 172,56, 171,95, 171,62, 171,46, 157,70, 156,28, 141,58, 138,89, 138,32, 133,44, 130,98, 130,62, 130,42, 129,40, 128,47, 128,22, 127,57, 127,24, 126,67, 126,45, 125,34, 115,38, 58,52, 55,38, 52,99, 52,55, 52,06, 48,63, 47,29, 45,72, 39,07, 37,41, 37,28, 36,25, 32,16, 31,57, 31,16, 30,98, 30,31, 29,47, 29,37, 28,64, 27,95, 27,01, 26,67, 25,10, 22,68.

$$[\alpha]_{20}^D = -11.0^\circ$$

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.9%, $t_R=11,05$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{56}\text{H}_{77}\text{ClN}_{12}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1177,5371, найдено: 1177,5443; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1199,5269, найдено: 1199,5263.

Синтез соединения **24b**

Из 199 мг соединения **23b** (0,129 ммоль) в 7 мл смеси ТФУ/ДХМ/ТИПС/вода было получено 126 мг соединения **24b** (выход 80%) в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,45 (уш. с., 3H, COOH), 9,22 (уш. с., 1H, OH), 8,29 (д, $J=7,34$ Гц, 1H, NH), 8,10 (д, $J=8,13$ Гц, 1H, NH), 7,88-7,96 (м, 1H, NH), 7,75-7,82 (м, 1H, NH), 7,65 (уш. с, 3H, NH_3^+), 7,55-7,59 (м, 1H, NH), 7,54 (д, $J=8,38$ Гц, 1H, Ar), 7,48 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,19-7,25 (м, 2H, Ar), 7,09-7,19 (м, 5H, Ar), 7,03 (м, 2H, Ar), 6,65 (д, $J=8,38$ Гц, 2H, Ar), 6,26-6,37 (м, 2H, NH), 4,49-4,43 (м, 2H, CH_2), 4,28-4,38 (м, 2H, CH), 4,08 (м, 3H, CH), 3,27-3,32 (м, 2H, CH_2), 3,12-3,21 (м, 2H, CH_2), 3,05-3,12 (м, 2H, CH_2),

2,88-3,05 (м, 4H, CH₂), 2,77-2,85 (м, 1H, CH₂), 2,73 (м, 2H, CH₂), 2,61-2,69 (м, 1H, CH₂), 2,26-2,35 (м, 3H, CH₂), 2,14-2,26 (м, 5H, CH₂), 1,85-1,96 (м, 1H, CH₂), 1,65-1,75 (м, 2H, CH₂), 1,57-1,65 (м, 3H, CH₂), 1,45-1,55 (м, 6H, CH₂), 1,34-1,44 (м, 3H, CH₂), 1,31 (м, 1H, CH₂), 1,12-1,29 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,55, 174,26, 173,82, 172,71, 172,07, 171,77, 171,59, 171,24, 171,08, 157,32, 155,91, 138,02, 137,94, 131,55, 131,24, 130,03, 129,72, 129,02, 128,64, 128,09, 127,84, 126,29, 120,14, 119,92, 114,99, 55,00, 52,61, 52,17, 51,73, 51,24, 48,23, 46,74 38,66, 36,87, 35,85, 31,90, 31,17, 30,77, 30,58, 29,97, 29,07, 28,26, 27,59, 26,65, 26,29, 24,72, 24,59, 22,31.

$[\alpha]_{20}^D = -9,0^\circ$

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.9%, $t_R=10,8$ мин.

ESI-HRMS: для C₅₆H₇₇BrN₁₂O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 1221,49383, найдено: 1221,4937.

Синтез соединения 24с

Из 282 мг соединения **23с** (0,1799 ммоль) в 11 мл смеси ТФУ/ДХМ/ТИПС/вода было получено 126 мг соединения **24с** (выход 80%) в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12,56 (уш. с., 3H, COOH), 9,22 (уш. с., 1H, OH), 8,29 (д, J=7,40 Гц, 1H, NH), 8,10 (д, J=7,70 Гц, 1H, NH), 7,89-7,97 (м, 2H, NH+Ar), 7,87 (д, J=8,25 Гц, 1H, Ar), 7,74-7,82 (м, 1H, NH), 7,65 (м, 3H, NH), 7,53-7,60 (м, 1H, NH), 7,25-7,32 (м, 2H, Ar), 7,18-7,25 (м, 2H, Ar), 7,12-7,18 (м, 3H, Ar), 7,03 (м, 2H, Ar), 6,60-6,69 (м, 2H, Ar), 6,25-6,38 (м, 2H, NH), 4,60-4,53 (м, 2H, CH₂), 4,26-4,38 (м, 2H, CH), 3,98-4,16 (м, 3H, CH), 3,32 (т, J=6,85 Гц, 2H, CH₂), 3,17 (м, 2H, CH₂), 3,05-3,13 (м, 2H, CH₂), 2,88-3,05 (м, 4H, CH₂), 2,69-2,86 (м, 3H, CH₂), 2,60-2,69 (м, 1H, CH₂), 2,30-2,39 (м, 2H, CH₂), 2,24-2,30 (м, 2H, CH₂), 2,20 (м, 4H, CH₂), 1,84-1,96 (м, 1H, CH₂), 1,56-1,74 (м, 5H, CH₂), 1,37-1,55 (м, 9H, CH₂), 1,32 (м, 1H, CH₂), 1,14-1,29 (м, 6H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,50, 174,21, 173,78, 172,62, 171,73, 171,55, 171,23, 171,07, 167,21, 157,30, 155,89, 137,94, 130,04, 129,78, 129,47, 129,02, 128,09, 127,83, 127,38, 126,29, 114,98, 54,97, 52,56, 52,13, 51,67, 48,23, 38,68, 36,88, 35,85, 31,78, 29,91, 28,26, 27,52, 26,62, 24,71, 22,27.

$[\alpha]_{20}^D = -9,7^\circ$

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.0%, $t_R=10,25$ мин.

ESI-HRMS: для C₅₆H₇₈N₁₂O₁₆: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 1187,57315, найдено: 1187,572.

Синтез соединения 24d

Из 119 мг соединения **23d** (0,0796 ммоль) в 6 мл смеси ТФУ/ДХМ/ТИПС/вода было получено 71 мг соединения **24d** (выход 76%) в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,55 (уш. с., 3H, COOH), 8,30 (д, $J=7,28$ Гц, 1H, NH), 8,17 (д, $J=7,89$ Гц, 1H, NH), 7,89-7,99 (м, 2H, NH+Ar), 7,87 (д, $J=8,19$ Гц, 1H, Ar), 7,77-7,84 (м, 1H, NH), 7,56-7,68 (м, 3H, NH+Ar), 7,22-7,30 (м, 6H, Ar), 7,20 (м, 2H, Ar), 7,15 (м, 3H, Ar), 6,26-6,36 (м, 2H, NH), 4,60-4,53 (м, 2H, CH₂), 4,39-4,48 (м, 1H, CH), 4,31 (м, 1H, CH), 3,98-4,17 (м, 3H, CH), 3,32 (т, $J=6,76$ Гц, 2H, CH₂), 3,12-3,25 (м, 2H, CH₂), 3,07-3,12 (м, 2H, CH₂), 2,97-3,07 (м, 3H, CH₂), 2,87-2,97 (м, 3H, CH₂), 2,73 (м, 2H, CH₂), 2,59-2,69 (м, 1H, CH₂), 2,30-2,38 (м, 2H, CH₂), 2,13-2,30 (м, 6H, CH₂), 1,85-1,96 (м, 1H, CH₂), 1,64 (м, 5H, CH₂), 1,50 (м, 6H, CH₂), 1,41 (м, 3H, CH₂), 1,12-1,34 (м, 7H, CH₂).

$$[\alpha]_{20}^D = -7.9^\circ$$

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.9%, $t_R=10,7$ мин.

ESI-HRMS: для C₅₆H₇₈N₁₂O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 1171,57824, найдено: 1171,5782.

Синтез соединения **26**

450 мг (0,748 ммоль) Fmoc-Val-Cit-PAВ-ОН и диэтиламин (3,7 мл, 20 ммоль) растворили в 8 мл ДМФА. Полученный раствор перемешивали в течение 3 часов. Далее удалили растворитель при пониженном давлении и продукт осаждали этилацетатом (5*13 мл), полученный гель центрифугировали и промывали диэтиловым эфиром. Получили 220 мг (выход 78%) соединения **26** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10,02 (с, 1H, NH), 8,10 (м, 1H, NH), 7,53 (д, $J=8,2$ Гц, 2H, Ar), 7,23 (д, $J=8,2$ Гц, 2H, Ar), 5,95 (с, 1H, NH), 5,39 (с, 2H, NH₂), 5,09 (т, $J=5,5$ Гц, 1H, OH), 4,46 (м, 1H, CH), 4,42 (д, $J=5,3$ Гц, 2H, CH₂), 3,00-3,01 (д, 2H, NH₂), 2,91-2,98 (м, 2H, CH₂), 1,90-1,96 (м, 2H, CH₂), 1,79, 1,65-1,167, 1,55-1,57, 1,36-1,39 (м, 6H, CH₂), 0,87 (д, $J=6,8$ Гц, 3H, CH₃), 0,77 (д, $J=6,7$ Гц, 3H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 175,31, 171,31, 159,68, 138,33, 138,27, 127,76, 119,76, 63,41, 60,50, 53,31, 32,18, 31,00, 27,54, 20,40, 17,74, 14,92.

Синтез соединения **27**

1000 мг (2,635 ммоль) соединения **26** растворили в 20 мл ДМФА, добавили 505 мкл (2,899 ммоль) ДИПЭА, 1,099 г (2,899 ммоль) НВТУ и 325 мг (2,899 ммоль) 5-гексиновой кислоты. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов. Целевой продукт выделили в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь вода - ацетонитрил. Соединение **27** получили в виде белого порошка в количестве 1223 мг (выход 98%).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9,89 (с, 1H, NH), 8,06 (д, $J=7,6$ Гц, 1H, NH), 7,88 (д, $J=8,6$ Гц, 1H, NH), 7,53 (д, $J=8,3$ Гц, 2H, Ar), 7,22 (д, $J=8,3$ Гц, 2H, Ar), 5,97 (т, $J=5,5$ Гц, 1H, NH), 5,40 (с, 2H, NH_2), 5,09 (т, $J=5,6$ Гц, 1H, OH), 4,41 (д, $J=5,4$ Гц, 2H, CH_2), 4,34-4,37 (м, 1H, CH), 4,17 (т, $J=7,6$ Гц, 1H, CH), 2,90-3,03 (м, 2H, CH_2), 2,77 (т, $J=2,4$ Гц, 1H, CH), 2,21-2,31 (м, 2H, CH_2), 2,12-2,16 (м, 2H, CH_2), 1,92-1,99 (м, 1H, CH_2), 1,56-1,69 (м, 4H, CH_2), 1,32-1,44 (м, 2H, CH_2), 1,11-1,22 (м, 2H, CH_2), 0,85 (д, $J=6,7$ Гц, 3H, CH_3), 0,82 (д, $J=6,7$ Гц, 3H, CH_3)

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172,31 (C(O)), 171,70, 170,86, 159,35, 137,99, 137,86, 127,38, 119,29, 71,92, 70,26, 63,05, 58,18, 53,55, 34,49, 30,78, 29,79, 27,28, 24,91, 19,70, 18,66, 17,85.

ESI-HRMS: m/z рассчитано для $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 474,2711, найдено: 474,2715, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 496,2530, найдено: 496,2536, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}^+]$: 512,2270, найдено: 512,2283.

Синтез соединения 28

1223 мг (2,582 ммоль) соединения **27**, 2357 мг (7,747 ммоль) бис(4-паранитрофенил)карбоната, растворили в 40 мл ДМФА, прибавили 494 мкл (2,84 ммоль) ДИПЭА и перемешивали в течение 5 часов. Далее растворитель удалили при пониженном давлении, полученный осадок промыли раствором этилацетата. Дальнейшее выделение осуществляли методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь вода – ацетонитрил. Получили 1584 мг (выход 96%) соединения **28** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10,06 (с, 1H, NH), 8,30 (д, $J=9,0$ Гц, 2H, Ar) 8,11 (д, $J=7,3$ Гц, 1H, NH), 7,87 (д, $J=8,7$ Гц, 1H, NH), 7,64 (д, $J=8,4$ Гц, 2H, Ar), 7,56 (д, $J=9,2$ Гц, 2H, Ar), 7,22 (д, $J=8,6$ Гц, 2H, Ar), 5,97 (т, $J=5,5$ Гц, 1H, NH), 5,41 (с, 2H, NH_2), 5,23 (с, 2H, CH_2), 4,35-4,40 (м, 1H, CH), 4,18 (т, $J=7,6$ Гц, 1H, CH), 2,90-3,03 (м, 2H, CH_2), 2,76-2,78 (м, 1H, CH), 2,22-2,32 (м, 2H, CH_2), 2,07-2,16 (м, 2H, CH_2), 1,92-2,01 (м, 1H, CH), 1,58-1,69 (м, 4H, CH_2), 1,33-1,44 (м, 2H, CH_2), 0,86 (д, $J=6,8$ Гц, 3H, CH_3), 0,83 (д, $J=6,7$ Гц, 3H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171,83, 171,30, 170,77, 158,91, 155,29, 151,97, 145,17, 139,42, 129,51, 125,41, 122,64, 119,01, 84,14, 71,47, 70,26, 62,60, 57,67, 53,17, 34,04, 30,37, 29,22, 26,86, 24,47, 19,24, 18,22, 17,40.

ESI-HRMS: m/z рассчитано для $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}^+]$: 639,2773, найдено: 639,2787, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 661,2592, найдено: 661,2612, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}^+]$: 677,2332, найдено: 677,2346.

Синтез соединения 29

934 мг (1,436 ммоль) соединения **28**, 1000 мг (1,393 ммоль) монометил ауристатина Е и 40 мг (0,307 ммоль) НОВt растворили в 20 мл ДМФА. К полученной смеси прибавили 2,667 мл (33,11 ммоль) пиридина и перемешивали в течение 16 часов. Удалили растворитель при пониженном давлении. Полученную реакционную смесь вылили в 40 мл этилацетата. Выпавший осадок несколько раз промыли этилацетатом. Соединение **29** в количестве 1,276 г (выход 75%) в индивидуальном виде выделили методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь вода – ацетонитрил. Продукт был получен в виде бледно-жёлтого аморфного порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 9,98 (м, 1H, NH), 8,30 (м, 1H, NH), 8,10 (м, 2H, NH), 7,84-7,93 (м, 2H, NH), 7,64 (д, $J=8,01$ Гц, 1H, NH), 7,57 (д, $J=7,89$ Гц, 2H, Ar), 7,20-7,35 (м, 6H, Ar), 7,10-7,19 (м, 1H, NH), 5,97 (м, 1H, NH), 5,32-5,46 (м, 3H, CH+NH₂), 4,90-5,11 (м, 1H, CH), 4,30-4,51 (м, 1H, CH), 4,20-4,29 (м, 1H, CH), 4,17 (т, $J=7,52$ Гц, 1H, CH), 3,88-4,04 (м, 2H, CH), 3,26-3,31 (м, 1H, CH₂), 3,07-3,26 (м, 4H, CH₂), 2,79-3,06 (м, 4H, CH+CH₂), 2,76 (д, $J=2,32$ Гц, 1H, CH), 2,39 (д, $J=15,83$ Гц, 1H,), 2,25 (д, $J=3,00$ Гц, 3H, CH₂), 2,07-2,17 (м, 2H, CH₂), 1,96 (дд, $J=13,69, 6,91$ Гц, 1H, CH₂), 1,60-1,86 (м, 3H, CH₂), 1,49-1,60 (м, 1H, CH₂), 1,20-1,49 (м, 2H, CH₂), 0,94-1,07 (м, 3H, CH₃), 0,64-0,94 (м, 12H, CH₃+CH₂).

ESI-HRMS: для $\text{C}_{64}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$ m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1217,7544, найдено: 1217,7544; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1239,7364, найдено: 1239,7361, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1255,7103, найдено: 1255,7090

Синтез соединения **25**

Соединения **15a** (1,408 г, 1,341 ммоль) и **29** (1,633 г, 1,341 ммоль) растворили в смеси 35 мл ДМФА и 10 мл деионизованной воды в колбе Шленка. Колбу заполнили аргоном, после чего в смесь добавили пентагидрат сульфата меди (II) (135 мг, 0,536 ммоль) и аскорбат натрия (318 мг, 1,608 ммоль). Смесь перемешивали 24 часа, после чего добавили в реакционную смесь 313 мг динатриевой соли ЭДТА (1,072 ммоль) и перемешивали ещё 2 часа. Затем удалили растворитель при пониженном давлении и высаживали остаток ацетонитрилом. Выделение целевого соединения осуществляли методом обращённо-фазовой препаративной колоночной хроматографии. Таким образом было получено 2,390 г (выход 79%) соединения **25** в виде белого аморфного порошка.

Данные спектроскопии ЯМР для данного соединения подробно приведены в разделе 3.3.2

ESI-HRMS: для $\text{C}_{114}\text{H}_{168}\text{ClN}_{20}\text{O}_{26}$ m/z рассчитано для $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 756,4048, найдено: 756,4039; m/z рассчитано для $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1134,1036, найдено: 1134,1046.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.9%, $t_R=6,12$ мин.

Синтез соединения **30**

25 мг (0,0484 ммоль, 1 экв.) испинесиба растворили в 10 мл ДМФА, добавили 8 мг (0,0799 ммоль, 1,65 экв.) янтарного ангидрида и 40 мкл (0,2300 ммоль, 4,75 экв.) ДИПЭА и перемешивали до завершения реакции. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ (система элюирования: 5% метанола в дихлорметане). После завершения реакции растворитель удалили при пониженном давлении, полученную смесь растворили в 25 мл дихлорметана, экстрагировали 0,1 М HCl (2*20 мл), водой (2*20 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (1*20 мл). Органическую фракцию сушили над сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Получили 28 мг соединения **30** (выход 93%) в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,31 (д, $J=8,55$ Гц, 1H, Ar), 7,69 (д, $J=1,53$ Гц, 1H, Ar), 7,48 (д, $J=8,50$ Гц, 1H, Ar), 7,37–7,42 (м, 2H, Ar), 7,28–7,35 (м, 3H, Ar), 7,18–7,25 (м, 4H, Ar), 6,12 (д, $J=15,57$ Гц, 1H, CH_2 (бензильный фрагмент)), 5,70 (д, $J=10,58$ Гц, 1H, CH), 5,18 (д, $J=15,68$ Гц, 1H, CH_2 (бензильный фрагмент)), 3,29–3,45 (м, 2H, CH_2), 2,60–2,82 (м, 3H, CH_2+CH), 2,40–2,54 (м, 2H, CH_2), 2,36 (с, 3H, CH_3), 2,06–2,22 (м, 2H, CH_2), 1,20–1,36 (м, 2H, CH_2+NH_2), 0,95 (д, $J=6,63$ Гц, 3H, CH_3), 0,78–0,91 (м, 1H, CH_2), 0,39 (д, $J=6,30$ Гц, 3H, CH_3).

Синтез соединения **31**

52 мг (0,0843 ммоль, 1 экв.) соединения **30** растворили в 20 мл дихлорметана. Добавили 44 мг (0,2276 ммоль, 2,7 экв.) EDC*HCl, 26 мг (0,2276 ммоль, 2,7 экв.) N-гидроксисукцинимид и 60 мкл (0,4299 ммоль, 5,1 экв.) триэтиламина. Полученную смесь перемешивали в течение 16 часов в инертной атмосфере. Растворитель удалили при пониженном давлении. Сухой остаток растворили в 40 мл дихлорметана и промыли насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (3*30 мл) и водой (3*30 мл). Органическую фракцию сушили над сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Продукт выделяли в индивидуальном виде методом препаративной хроматографии. Таким образом было получено 18 мг соединения **31** (выход 30%) в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8,31 (д, $J=8,55$ Гц, 1H, Ar), 7,71 (д, $J=1,92$ Гц, 1H, Ar), 7,50 (дд, $J=8,55, 1,97$ Гц, 1H, Ar), 7,37–7,42 (м, 2H, Ar), 7,27–7,35 (м, 3H, Ar), 7,19–7,26 (м, 4H, Ar), 6,11 (д, $J=15,62$ Гц, 1H, CH_2 (бензильный фрагмент)), 5,70 (д, $J=10,58$ Гц, 1H, CH), 5,19 (д, $J=15,68$ Гц, 1H, CH_2 (бензильный фрагмент)), 4,70–4,79 (м, 1H, NH), 3,29–3,48 (м, 2H, CH_2), 2,83–2,90 (м, 7H, $\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$), 2,65–2,82 (м, 3H, CH_2), 2,39 (с, 3H, CH_3), 2,19–2,34 (м, 2H, CH_2), 1,24–1,37 (м, 1H, CH_2), 0,96 (д, $J=6,74$ Гц, 3H, CH_3), 0,88 (дт, $J=12,25, 5,93$ Гц, 1H, CH_2), 0,38 (д, $J=6,36$ Гц, 3H, CH_3).

Общая методика проведения реакции [3+2]-азид-алкинового циклоприсоединения лигандов 24a-d с модифицированным MMAE 29

Лиганд **24a-d** (1,1 экв.) и ММАЕ-алкин (соединение **29**, 1 экв.) растворили в смеси ДМФА и воды. Колбу заполнили аргоном, затем в систему ввели водные растворы аскорбата натрия (1,2 экв.) и пентагидрата сульфата меди (0,4 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 18 часов. После этого прибавили ЭДТА (0,8 экв.) и перемешивали ещё три часа. Удалили растворитель при пониженном давлении, затем сухой остаток высаживали ацетонитрилом и декантировали. Далее производили выделение продукта в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ацетонитрил - вода.

Синтез соединения **32a**

Из 104 мг (0,0805 ммоль) соединения **24a**, 89 мг (0,0732 ммоль) соединения **29**, 17 мг (0,08784 ммоль) аскорбата натрия, 6 мг (0,02928 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 13,5 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 17 мг (0,05856 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 86 мг (выход 49%) соединения **32a** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,53 (с, 1H, Py), 8,39 (д, $J=4,59$ Гц, 1H, Py), 8,15 (д, $J=6,79$ Гц, 1H, NH), 8,01 (м, 1H, NH), 7,84-7,92 (м, 1H, NH), 7,74 (д, $J=7,82$ Гц, 1H, Py), 7,55-7,64 (м, 1H, NH), 7,47 (м, 1H, NH), 7,23-7,40 (м, 3H, Ar+Py), 7,08-7,23 (м, 7H, Ar), 6,98-7,08 (м, 2H, Ar), 6,65 (д, $J=8,01$ Гц, 2H, Ar), 6,28-6,38 (м, 2H, NH), 6,08 (уш. с., 1H, CH), 5,27-5,38 (м, 1H, CH), 4,36-4,52 (м, 3H, CH_2+CH), 4,24 (м, 2H, CH), 3,95-4,12 (м, 3H, CH), 3,28 (т, $J=6,72$ Гц, 2H, CH_2), 3,14 (м, 2H, CH_2), 2,99-3,10 (м, 3H, CH_2), 2,97 (м, 3H, CH_2), 2,74-2,93 (м, 4H, CH_2), 2,58-2,69 (м, 1H, CH_2), 2,42 (м, 2H, CH_2), 2,08-2,38 (м, 13H,), 1,92-2,01 (м, 3H, CH_2), 1,89 (м, 1H, CH_2), 1,78 (м, 2H, CH_2), 1,54-1,73 (м, 9H, CH_2), 1,26-1,53 (м, 14H, CH_2), 1,08-1,26 (м, 7H, CH_2+CH_3), 0,84-1,08 (м, 9H, CH_2+CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,50, 174,20, 173,77, 172,52, 172,17, 172,11, 171,71, 171,50, 171,34, 171,10, 170,62, 169,85, 168,75, 158,96, 157,29, 155,88, 146,46, 143,69, 141,22, 137,88, 133,41, 133,05, 130,62, 130,26, 130,05, 129,03, 128,18, 128,08, 127,83, 127,77, 127,19, 126,86, 126,68, 126,43, 126,29, 126,09, 124,97, 121,96, 118,81, 114,98, 114,84, 81,64, 74,82, 66,11, 63,29, 60,95, 58,18, 57,56, 57,14, 54,92, 53,18, 52,57, 52,15, 51,66, 50,28, 49,75, 49,18, 47,23, 46,86, 46,26, 43,77, 43,21, 38,71, 37,14, 36,97, 35,81, 35,06, 34,67, 32,28, 31,81, 31,57, 31,21, 30,79, 30,59, 30,47, 29,91, 29,84, 29,34, 29,10, 27,79, 27,54, 26,83, 26,65, 26,29, 25,43, 24,66, 24,37, 23,14, 22,52, 22,26, 19,28, 18,95, 18,77, 18,56, 18,40, 18,24, 15,91, 15,48, 15,33, 15,05, 10,32. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 97%, $t_R=8,26$ мин.

ESI-HRMS: для $C_{120}H_{177}ClN_{22}O_{27}$: m/z рассчитано для $[M+2H]^{2+}$ 1197,64938, найдено: 1197,645

Синтез конъюгата 33

54 мг (0,0225 ммоль, 1 экв.) моноконъюгата **32a** растворили в 5 мл диметилформамида, добавили 19 мг (0,0271 ммоль, 1,2 экв.) соединения **31** и 24 мкл (0,1350 ммоль, 6 экв.) ДИПЭА. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 часов, после чего растворитель удалили при пониженном давлении. Сухой остаток высадили ацетонитрилом, образовавшийся осадок декантировали и трижды промыли ацетонитрилом. Растворитель удалили при пониженном давлении. Получили 50 мг (выход 74%) соединения **33** в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 9,95–10,20 (м, 1H, NH), 8,47–9,03 (м, 1H, NH), 8,17–8,41 (м, 3H, Ar+NH), 7,97–8,13 (м, 2H), 7,82–7,96 (м, 3H, Ar+NH), 7,80 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,53–7,69 (м, 3H, Ar), 7,40–7,50 (м, 1H, NH), 7,07–7,39 (м, 25H, Ar), 7,04 (д, $J=7,46$ Гц, 2H, Ar), 6,66 (д, $J=8,01$ Гц, 2H, Ar), 6,06–6,43 (м, 2H, NH), 5,87 (д, $J=16,51$ Гц, 1H, CH_2), 5,35–5,57 (м, 3H, $CH+CH_2$), 4,90–5,15 (м, 3H, CH_2), 4,58–4,79 (м, 1H, CH), 4,07–4,56 (м, 13H, $CH+CH_2$), 3,74–4,07 (м, 6H, $CH+CH_2$), 2,78–3,08 (м, 19H, CH_2), 2,64–2,78 (м, 3H, CH_2), 2,06–2,41 (м, 19H, CH_2+CH_3), 1,13–2,04 (м, 42H, CH_2+CH_3+CH), 0,92–1,12 (м, 10H, CH_2+CH_3), 0,69–0,91 (м, 28H, CH_2+CH_3), 0,46 (д, $J=5,75$ Гц, 3H, CH_3).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99.9%, $t_R=8,69$ мин.

ESI-HRMS: для $C_{154}H_{212}Cl_2N_{26}O_{31}$: m/z рассчитано для $[M+3H]^{3+}$ 998,18024, найдено: 998,180; m/z рассчитано для $[M+2H]^{2+}$ 1496,76672, найдено: 1496,766; m/z рассчитано для $[M-2H]^{2-}$ 1494,75217, найдено: 1494,757

Синтез соединения 34

1000 мг (2,554 ммоль) ацетата абиратерона растворили в 12,5 мл метанола, после чего прилили 20 мл 10% раствора гидроксида калия в метаноле. Реакционную смесь перемешивали до полного окончания реакции (контроль за протеканием реакции осуществляли по ТСХ в системе хлористый метилен/метанол=15/1). Удалили растворитель при пониженном давлении, сухой остаток растворили в хлористом метиле, к полученному раствору прилили воду и перемешивали в течение часа. Органическую фракцию отделили, промыли два раза водой, после чего сушили над безводным сульфатом натрия и удалили растворитель при пониженном давлении, получив 892 мг (выход 99%) соединения **34** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 8,62 (д, $J=1,65$ Гц, 1H, Py), 8,46 (дд, $J=4,80, 1,56$ Гц, 1H, Py), 7,65 (дт, $J=7,93, 1,93$ Гц, 1H, Py), 7,22 (дд, $J=7,92, 4,86$ Гц, 1H, Py), 6,00 (дд, $J=3,21, 1,74$ Гц, 1H, CH), 5,37–5,42 (м, 1H, CH), 3,47–3,61 (м, 1H, CH), 2,21–2,37 (м,

3H, CH₂), 2,01-2,12 (м, 3H, CH₂), 1,82-1,90 (м, 2H, CH₂), 1,74-1,82 (м, 1H, CH₂), 1,70-1,74 (м, 2H, CH₂), 1,64-1,70 (м, 3H, CH+CH₂), 1,44-1,64 (м, 4H, CH₂), 1,01-1,17 (м, 8H, CH₂+CH₃).

Синтез соединения 35

300 мг (0,858 ммоль) соединения **34**, 129 мг (1,287 ммоль, 1,5 экв.) янтарного ангидрида, 10 мг 4-диметиламинопиридина (0,0858 ммоль, 0,1 экв.) растворили в 20 мл дихлорметана. К смеси добавили 180 мкл (1,287 ммоль, 1,5 экв.) триэтиламина и перемешивали в течение 75 часов при кипячении. Удалили растворитель при пониженном давлении, после чего сухой остаток высаживали 0,1 М раствором соляной кислоты. Полученный твёрдый остаток промывали метанолом. Остаток метанола удалили при пониженном давлении. Получили 311 мг (выход 86%) вещества **35** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,75 (с, 1H, Py), 8,61 (д, J=5,38 Гц, 1H, Py), 8,42 (д, J=8,62 Гц, 1H, Py), 7,86 (т, J=7,03 Гц, 1H, Py), 6,39 (уш. с., 1H, CH), 5,35 (д, J=3,55 Гц, 1H, CH), 4,42 (д, J=7,46 Гц, 1H, CH), 2,44 (м, 4H, CH₂), 2,24 (м, 3H, CH₂), 2,00-2,14 (м, 2H, CH₂), 1,98 (м, 1H, CH₂), 1,81 (м, 1H, CH₂), 1,57-1,76 (м, 4H, CH), 1,44-1,57 (м, 3H, CH+CH₂), 1,37 (м, 1H, CH₂), 1,18 (с, 1H, CH₂), 0,92-1,09 (м, 8H, CH+CH₃+CH₂).

Синтез соединения 36

303 мг (0,623 ммоль, 1 экв.) соединения **35**, 188 мг (0,981 ммоль, 1,45 экв.) гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида, 113 мг (0,981 ммоль, 1,45 экв.) N-гидроксисукцинимиды растворили в 15 мл хлористого метилена. К полученной смеси добавили 245 мкл (1,758 ммоль, 2,8 экв.) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 часов, после чего удалили растворитель при пониженном давлении, сухой остаток растворили в дихлорметане и экстрагировали два раза водой, один раз насыщенным раствором гидрокарбоната натрия и один раз насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия, после чего удалили растворитель при пониженном давлении. Получили соединение **36** в виде белого порошка в количестве 354 мг (выход 96%).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8,59 (д, J=1,96 Гц, 1H, Ar), 8,44 (дд, J=5,09, 1,57 Гц, 1H, Ar), 7,72 (дт, J=7,92, 1,91 Гц, 1H, Ar), 7,28 (дд, J=7,83, 5,09 Гц, 1H, Ar), 6,01 (дд, J=2,93, 1,76 Гц, 1H, CH), 5,38 (д, J=4,30 Гц, 1H, CH), 4,57-4,69 (м, 1H, CH), 2,88-2,95 (м, 2H, CH₂), 2,80 (с, 4H, CH₂), 2,66-2,72 (м, 2H, CH₂), 2,32 (д, J=7,43 Гц, 2H, CH₂), 2,25 (ддд, J=15,94, 6,55, 3,33 Гц, 1H, CH), 1,97-2,09 (м, 3H, CH₂+CH), 1,79-1,88 (м, 2H, CH₂), 1,70-1,79 (м, 1H, CH), 1,51-1,70 (м, 6H, CH₃), 1,40-1,50 (м, 1H, CH), 1,06-1,19 (м, 2H, CH₂), 1,05 (с, 3H, CH₃), 1,01 (с, 3H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 170,27, 168,88, 167,75, 151,02, 146,30, 139,85, 134,94, 133,55, 130,22, 123,52, 122,30, 74,66, 57,39, 50,12, 47,30, 37,89, 36,81, 36,72, 35,09, 31,82, 31,43, 30,31, 28,99, 27,52, 26,30, 25,54, 20,74, 19,19, 16,53.

Общая методика реакции ацилирования лигандов 24a-d соединением 36

1 экв. соединения **24a-d** растворили в ДМФА. К раствору прибавили соединение **36** (1,2 экв.) и ДИПЭА (6 экв.). Реакционную смесь перемешивали до полного окончания реакции (контроль за протеканием реакции проводили по ТСХ в системе 10% метанол в дихлорметане + 1% трифторуксусной кислоты). Удалили растворитель при пониженном давлении. Сухой остаток высадили ацетонитрилом, после чего декантировали и промывали осадок три раза ацетонитрилом.

Синтез соединения 38a

Из 100 мг (0,0774 ммоль) соединения **24a**, 51 мг (0,0929 ммоль) соединения **36** в присутствии 81 мкл (0,4644 ммоль) ДИПЭА в 10 мл ДМФА было получено 131 мг (выход 85%) соединения **38a** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,53 (с, 1H, Py), 8,39 (д, $J=4,59$ Гц, 1H, Py), 8,15 (д, $J=6,79$ Гц, 1H, NH), 8,01 (м, 1H, NH), 7,84-7,92 (м, 1H, NH), 7,74 (д, $J=7,82$ Гц, 1H, Py), 7,55-7,64 (м, 1H, NH), 7,47 (м, 1H, NH), 7,23-7,40 (м, 3H, Ar+Py), 7,08-7,23 (м, 7H, Ar), 6,98-7,08 (м, 2H, Ar), 6,65 (д, $J=8,01$ Гц, 2H, Ar), 6,28-6,38 (м, 2H, NH), 6,08 (уш. с., 1H, CH), 5,27-5,38 (м, 1H, CH), 4,36-4,52 (м, 3H, CH_2+CH), 4,24 (м, 2H, CH), 3,95-4,12 (м, 3H, CH), 3,28 (т, $J=6,72$ Гц, 2H, CH_2), 3,14 (м, 2H, CH_2), 2,99-3,10 (м, 3H, CH_2), 2,97 (м, 3H, CH_2), 2,74-2,93 (м, 4H, CH_2), 2,58-2,69 (м, 1H, CH_2), 2,42 (м, 2H, CH_2), 2,08-2,38 (м, 13H,), 1,92-2,01 (м, 3H, CH_2), 1,89 (м, 1H, CH_2), 1,78 (м, 2H, CH_2), 1,54-1,73 (м, 9H, CH_2), 1,26-1,53 (м, 14H, CH_2), 1,08-1,26 (м, 7H, CH_2+CH_3), 0,84-1,08 (м, 9H, CH_2+CH_3).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 97%, $t_R=8,26$ мин.

Синтез соединения 38b

Из 81 мг (0,0606 ммоль) соединения **24b**, 40 мг (0,0727 ммоль) соединения **36** в присутствии 63 мкл (0,3637 ммоль) ДИПЭА в 9 мл ДМФА было получено 80 мг (выход 80%) соединения **38b** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,54 (с, 1H, Py), 8,39 (д, $J=4,59$ Гц, 1H, Py), 8,28-8,34 (м, 1H, NH), 8,15 (м, 1H, NH), 7,97-8,05 (м, 1H, NH), 7,92-7,97 (м, 1H, NH), 7,82-7,92 (м, 1H, NH), 7,74 (д, $J=8,07$ Гц, 1H, Py), 7,61 (т, $J=8,34$ Гц, 1H, NH), 7,41-7,55 (м, 3H, Ar+NH), 7,33 (м, 1H, Py), 6,98-7,24 (м, 9H, Ar), 6,65 (д, $J=7,58$ Гц, 2H, Ar), 6,26-6,36 (м, 2H, NH), 6,08 (уш. с., 1H, CH), 5,32 (м, 1H, CH), 4,33-4,53 (м, 3H, CH_2+CH), 4,25 (м, 2H, CH), 3,94-4,10 (м, 3H, CH), 3,28 (т, $J=6,82$ Гц, 2H, CH_2), 2,74-3,22 (м, 13H, CH_2), 2,58-2,70 (м, 1H,

CH₂), 2,38-2,45 (м, 2Н, CH₂), 2,08-2,38 (м, 14Н, CH₂), 1,83-2,08 (м, 5Н, CH₂), 1,26-1,82 (м, 26Н, CH₂), 1,08-1,26 (м, 7Н, CH₂+CH₃), 0,84-1,07 (м, 9Н, CH₂+CH₃).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 97%, t_R =8,40 мин.

Синтез соединения 38с

Из 32 мг (0,0246 ммоль) соединения **24с**, 16 мг (0,0295 ммоль) соединения **36** в присутствии 30 мкл (0,1722 ммоль) ДИПЭА в 5 мл ДМФА было получено 31 мг (выход 78%) соединения **38с** в виде белого порошка.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R =4,60 мин.

ESI-HRMS: для C₈₅H₁₁₁N₁₃O₁₉: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 1618,8119, найдено: 1618,82.

Синтез соединения 38d

Из 48 мг (0,0373 ммоль) соединения **24d**, 24 мг (0,0448 ммоль) соединения **36** в присутствии 45 мкл (0,2611 ммоль) ДИПЭА в 7 мл ДМФА было получено 53 мг (выход 88%) соединения **38d** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 8,54 (с, 1Н, Py), 8,39 (м, 1Н, Py), 8,22 (м, 1Н, NH), 8,05 (м, 1Н, NH), 7,81-7,93 (м, 2Н, NH), 7,74 (м, 1Н, Py), 7,62 (м, 1Н, NH), 7,53 (м, 1Н, NH), 7,33 (м, 1Н, Py), 7,21-7,29 (м, 6Н, Ar), 7,06-7,21 (м, 6Н, Ar), 6,31 (м, 1Н, NH), 6,08 (м, 1Н, CH), 5,32 (м, 1Н, CH), 4,50-4,57 (м, 2Н, CH₂), 4,38 (м, 2Н, CH), 4,23 (м, 1Н, CH), 4,06 (м, 2Н, CH), 4,01 (м, 1Н, CH), 3,29 (м, 2Н, CH₂), 2,78-3,13 (м, 13Н, CH₂), 2,57-2,68 (м, 1Н, CH₂), 2,43 (м, 2Н, CH₂), 2,15-2,30 (м, 13Н, CH₂), 1,88-1,99 (м, 4Н, CH₂), 1,77 (м, 2Н, CH₂), 1,53-1,69 (м, 9Н, CH₂), 1,30-1,50 (м, 14Н, CH₂), 1,19 (м, 6Н, CH₂+CH₃), 0,97 (м, 9Н, CH₂+CH₃).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R =6,89 мин.

Общая методика медь-катализируемой клик-реакции моноконъюгатов 38a-d с модифицированным доцетакселом 37

Моноконъюгат **38a-d** (1 экв.) и доцетаксел-алкин **37** (1,2 экв.) растворили в смеси ДМФА и воды. Колбу заполнили аргоном, затем в систему ввели водные растворы аскорбата натрия (1,2 экв.) и пентагидрата сульфата меди (0,4 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 18 часов. После этого прибавили ЭДТА (0,8 экв.) и мешали ещё три часа. Удалили растворитель при пониженном давлении, затем сухой остаток высаживали ацетонитрилом и декантировали. Далее производили выделение продукта в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ацетонитрил - вода.

Синтез соединения 39a

Из 60 мг (0,0373 ммоль) соединения **38a**, 37 мг (0,040 ммоль) доцетаксел-алкина **37**, 9 мг (0,04476 ммоль) аскорбата натрия, 4 мг (0,01492 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 8 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 9 мг (0,02984 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 85 мг (выход 90%) соединения **39a** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,76 (с, 1H, Py), 8,62 (д, $J=5,32$ Гц, 1H, Py), 8,33 (д, $J=8,3$ Гц, 1H, Py), 7,94 (д, $J=7,40$ Гц, 2H, Ar), 7,82 (м, 1H, Py), 7,78 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,69 (м, 1H, Ar), 7,56-7,66 (м, 2H, Ar), 7,21-7,44 (м, 6H, Ar), 6,97-7,21 (м, 10H, Ar), 6,65 (д, $J=8,01$ Гц, 2H, Ar), 6,37 (уш. с., 1H, CH), 5,75 (м, 1H, CH), 5,36 (д, $J=7,09$ Гц, 1H, CH), 5,31-5,34 (м, 1H, CH), 4,98-5,09 (м, 3H, CH), 4,84-4,90 (м, 1H, CH), 4,36-4,52 (м, 3H, CH_2+CH), 4,19-4,33 (м, 4H, CH_2+CH), 4,03-4,11 (м, 2H, CH), 3,93-4,03 (м, 4H, CH_2), 3,14 (м, 2H, CH_2), 2,97 (м, 7H, CH_2), 2,77-2,90 (м, 2H, CH_2), 2,54-2,70 (м, 3H, CH_2), 2,37-2,46 (м, 4H, CH_2), 2,30 (д, $J=6,42$ Гц, 6H, CH_2), 2,20-2,26 (м, 6H, CH_2), 2,19 (м, 4H, CH_2), 2,15 (м, 2H, CH_2), 2,04-2,08 (м, 1H, CH_2), 1,97-2,02 (м, 1H, CH_2), 1,72-1,97 (м, 9H, CH_2), 1,68-1,72 (м, 2H, CH_2), 1,66 (м, 4H, CH_3+CH_2), 1,54-1,64 (м, 5H, CH_2), 1,47 (м, 11H, CH_3+CH_2), 1,29 (с, 10H, CH_3+CH_2), 0,98 (д, $J=3,24$ Гц, 8H, CH_2), 0,94 (уш. с., 6H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 209,29, 174,39, 174,05, 173,76, 172,45, 172,18, 171,87, 171,81, 171,57, 171,24, 170,89, 169,66, 169,20, 165,40, 157,34, 155,64, 155,23, 148,53, 145,94, 141,01, 140,76, 140,59, 140,28, 139,83, 137,58, 136,76, 136,10, 134,62, 133,57, 133,35, 133,07, 130,62, 130,28, 129,99, 129,88, 129,58, 128,92, 128,74, 128,64, 128,13, 128,00, 127,39, 127,08, 126,88, 126,38, 126,20, 126,00, 124,92, 122,13, 121,86, 118,22, 114,94, 83,80, 80,22, 78,65, 76,75, 75,03, 74,68, 73,62, 73,24, 71,20, 70,67, 56,96, 56,88, 55,22, 52,86, 52,13, 51,51, 49,49, 46,88, 46,65, 42,84, 37,62, 36,25, 35,68, 34,57, 33,99, 32,62, 31,87, 31,52, 31,18, 30,85, 30,61, 29,75, 28,94, 28,73, 28,03, 27,32, 26,38, 26,21, 24,70, 24,25, 24,09, 22,81, 22,47, 20,76, 20,26, 18,87, 15,92, 13,66, 9,78. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=9,96$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{133}\text{H}_{169}\text{ClN}_{14}\text{O}_{32}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2510,1716, найдено: 2510,18.

Синтез соединения **39b**

Из 40 мг (0,0242 ммоль) соединения **38b**, 24 мг (0,0266 ммоль) доцетаксел-алкина **37**, 6 мг (0,029 ммоль) аскорбата натрия, 3 мг (0,0097 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 8 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 6 мг (0,0194 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 40 мг (выход 65%) соединения **39b** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,73 (с, 1H, Py), 8,60 (д, $J=5,01$ Гц, 1H, Py), 8,26 (д, $J=7,82$ Гц, 1H, Py), 7,94 (м, 2H, Ar), 7,78 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,66-7,77 (м, 2H, Ar), 7,58-7,66 (м, 2H, Ar), 7,50 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,45 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,38 (м, 2H, Ar), 7,31 (м, 2H, Ar), 7,13-7,22 (м, 3H, Ar), 7,00-7,13 (м, 7H, Ar), 6,65 (д, $J=7,89$ Гц, 2H, Ar), 6,33 (уш. с., 1H, CH), 5,74 (т, $J=8,34$ Гц, 1H, CH), 5,29-5,40 (м, 2H, CH), 4,97-5,10 (м, 3H, CH+OH), 4,87 (м, 1H, CH), 4,40-4,46 (м, 3H, CH+CH₂), 4,18-4,33 (м, 4H, CH), 3,92-4,12 (м, 7H, CH₂+CH), 3,06-3,22 (м, 3H, CH₂), 2,90-3,06 (м, 8H, CH₂), 2,80-2,88 (м, 2H, CH₂), 2,66 (м, 1H, CH₂), 2,58 (т, $J=7,37$ Гц, 2H, CH₂), 2,42 (м, 5H, CH₂), 2,26-2,37 (м, 7H, CH₂), 2,10-2,26 (м, 12H, CH₂), 1,54-1,92 (м, 21H, CH₂), 1,47 (м, 12H, CH₂), 1,33-1,42 (м, 6H, CH₂), 1,29 (м, 11H, CH₃+CH₂), 1,07-1,25 (м, 8H, CH₂), 0,83-1,05 (м, 15H, CH₃+CH₂).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=10,06$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{133}\text{H}_{169}\text{BrN}_{14}\text{O}_{32}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2554,1211, найдено: 2554,13.

Синтез соединения 39с

Из 15 мг (0,00926 ммоль) соединения **38с**, 10 мг (0,0111 ммоль) доцетаксел-алкина **37**, 2,2 мг (0,0111 ммоль) аскорбата натрия, 1 мг (0,0037 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 6,7 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 2,2 мг (0,00741 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 14 мг (выход 77%) соединения **39с** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8,82 (уш. с., 1H, NH), 8,69 (уш. с., 1H, NH), 8,49 (д, $J=8,07$ Гц, 1H, Py), 7,87-8,01 (м, 4H, Ar+Py), 7,85 (д, $J=8,07$ Гц, 1H, Py), 7,78 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,65-7,75 (м, 1H, Py), 7,57-7,65 (м, 2H, Ar), 7,34-7,47 (м, 2H, Ar), 7,31 (м, 2H, Ar), 7,25 (м, 2H, Ar), 7,13 (м, 2H, Ar), 7,17 (м, 2H, Ar), 6,98-7,11 (м, 4H, Ar), 6,65 (д, $J=6,42$ Гц, 2H, Ar), 6,43 (уш. с., 1H, CH), 5,69-5,79 (м, 1H, CH), 5,29-5,39 (м, 2H, CH+OH), 4,97-5,08 (м, 3H, CH), 4,87 (д, $J=9,96$ Гц, 1H, CH), 4,45-4,57 (м, 2H, CH₂), 4,40 (уш. с., 1H, OH), 4,15-4,32 (м, 4H, CH+CH₂), 4,05 (м, 2H, CH), 3,91-4,03 (м, 4H, CH+CH₂), 3,58-3,60 (м, 1H, CH), 3,15 (м, 2H, CH₂), 2,89-3,09 (м, 8H, CH₂), 2,84 (м, 2H, CH₂), 2,64 (м, 1H, CH₂), 2,58 (м, 2H, CH₂), 2,42 (д, $J=6,66$ Гц, 4H, CH₂), 2,30 (м, 7H, CH₂), 2,10-2,26 (м, 11H, CH₂), 2,03-2,10 (м, 2H, CH₂), 1,97 (м, 1H, CH₂), 1,72-1,93 (м, 8H, CH₂), 1,69 (м, 2H, CH₂), 1,66 (м, 4H, CH₂), 1,58 (с, 2H,), 1,61 (с, 3H,), 1,47 (уш. с., 12H,), 1,31-1,41 (м, 6H,), 1,29 (с, 9H, CH₂), 1,19 (м, 6H, CH₂+CH₃), 1,08 (м, 2H, CH₂), 0,83-1,06 (м, 15H, CH₂+CH₃).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=8,81$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{134}\text{H}_{170}\text{N}_{14}\text{O}_{34}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2520,2004, найдено: 2520,21.

Синтез соединения 39d

Из 48 мг (0,0299 ммоль) соединения **38d**, 30 мг (0,0329 ммоль) доцетаксел-алкина **37**, 7 мг (0,0359 ммоль) аскорбата натрия, 3 мг (0,0119 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 10,6 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 7 мг (0,0238 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 64 мг (выход 85%) соединения **39d** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8,82 (уш. с., 1H, Py), 8,69 (д, $J=5,32$ Гц, 1H, Py), 8,51 (д, $J=7,95$ Гц, 1H, Py), 7,92-7,99 (м, 3H, Ar), 7,80-7,92 (м, 2H, Py+Ar), 7,78 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,65-7,75 (м, 1H, Ar), 7,58-7,65 (м, 2H, Ar), 7,28-7,41 (м, 4H, Ar), 7,20-7,28 (м, 7H, Ar), 7,01-7,20 (м, 8H, Ar), 6,44 (уш. с., 1H, CH), 5,67-5,79 (м, 1H, CH), 5,36 (д, $J=7,09$ Гц, 1H, CH), 5,31 (м, 1H, CH), 4,97-5,08 (м, 3H, CH), 4,87 (д, $J=9,54$ Гц, 1H, CH), 4,50-4,57 (м, 2H, CH_2), 4,32-4,45 (м, 2H, CH), 4,17-4,31 (м, 3H, CH), 3,92-4,12 (м, 7H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,59 (д, $J=6,36$ Гц, 1H, CH_2), 3,09-3,22 (м, 3H, CH_2), 2,89-3,09 (м, 9H, CH_2), 2,78-2,89 (м, 1H, CH_2), 2,54-2,68 (м, 3H, CH_2), 2,41 (д, $J=7,15$ Гц, 4H, CH_2), 2,10-2,36 (м, 18H, CH_2), 1,77-2,10 (м, 11H, CH_2), 1,54-1,74 (м, 12H, CH_2), 1,47 (м, 12H, CH_2), 1,24-1,41 (м, 16H, CH_3+CH_2), 1,06-1,24 (м, 8H, CH_2), 0,98 (д, $J=5,87$ Гц, 8H, CH_3+CH_2), 0,94 (уш. с., 6H, CH_3).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=9,49$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{134}\text{H}_{170}\text{N}_{14}\text{O}_{33}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2504,2055, найдено: 2504,21.

Синтез соединения **32b**

Согласно общей методике описанной выше из 80 мг (0,06546 ммоль) соединения **24b**, 73 мг (0,05951 ммоль) соединения **29**, 14 мг (0,07141 ммоль) аскорбата натрия, 6 мг (0,0238 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 10,8 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 14 мг (0,04761 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 60 мг (выход 41%) соединения **32b** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,52 (уш. с., 3H, COOH), 9,99 (м, 1H, NH), 9,20 (уш. с., 1H, OH), 8,24-8,37 (м, 2H, NH), 8,11-8,15 (м, 3H, NH), 7,84-7,96 (м, 3H, NH), 7,82 (с, 2H, $\text{NH}+\text{Триазольный фрагмент}$), 7,59-7,70 (м, 4H, Ar), 7,51-7,59 (м, 3H, $\text{NH}+\text{Ar}$), 7,48 (д, $J=8,31$ Гц, 1H, Ar), 7,08-7,35 (м, 13H, Ar), 7,03 (м, 2H, Ar), 6,65 (д, $J=7,76$ Гц, 2H, Ar), 6,29-6,33 (м, 2H, NH), 6,00 (уш. с., 1H, NH), 5,41 (уш. с., 2H, NH), 4,95-5,14 (м, 2H, CH_2), 4,62-4,73 (м, 1H, CH), 4,23-4,53 (м, 10H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,38-4,23 (м, 27H, $\text{H}_2\text{O}+\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,08-3,26 (м, 10H, CH_2+CH_3), 2,78-3,08 (м, 13H, CH_2+CH_3), 2,70-2,78 (м, 2H, CH_2), 2,60-2,69 (м, 1H, CH_2), 2,52-2,60 (м, 2H, CH_2), 2,15-2,42 (м, 11H, CH_2), 2,11 (м, 1H, CH_2), 1,84-2,04 (м, 5H, CH_2), 1,63-1,84 (м, 7H, CH_2), 1,33-1,58 (м, 13H, CH_2+CH_3), 1,11-1,33 (м, 7H, CH_2), 0,89-1,08 (м, 6H, CH_2), 0,65-0,89 (м, 21H, CH_2+CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,51, 174,22, 173,78, 172,37, 172,09, 171,71, 171,50, 171,35, 171,10, 168,74, 158,96, 157,28, 155,88, 146,45, 143,70, 138,03, 137,88, 131,57, 131,25, 130,05, 129,73, 129,03, 128,65, 128,19, 128,08, 127,83, 126,47, 121,97, 119,93, 114,98, 74,80, 60,95, 60,31, 57,18, 54,92, 54,15, 51,65, 46,86, 43,21, 38,70, 37,48, 36,99, 35,80, 34,67, 31,80, 30,48, 29,91, 29,02, 27,54, 26,65, 26,30, 25,43, 24,65, 24,36, 22,27, 19,28, 18,24, 15,49, 15,32, 10,31. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R =11,68 мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{120}\text{H}_{177}\text{BrN}_{22}\text{O}_{27}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1219,62412, найдено: 1219,6244.

Синтез соединения **32c**

Согласно общей методике описанной выше из 100 мг (0,08423 ммоль) соединения **24c**, 93 мг (0,07657 ммоль) соединения **29**, 18 мг (0,09188 ммоль) аскорбата натрия, 8 мг (0,03063 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 13,5 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 18 мг (0,06126 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 101 мг (выход 55%) соединения **32c** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,62 (уш. с., 3H, COOH), 9,99 (д, $J=7,46$ Гц, 1H, NH), 9,22 (уш. с., 1H, OH), 8,24-8,37 (м, 2H, NH), 8,10-8,16 (м, 3H, NH), 7,84-7,96 (м, 5H, Ar+NH), 7,82 (с, 2H, NH+Триазольный фрагмент), 7,54-7,66 (м, 6H, Ar+NH), 7,10-7,35 (м, 15H, Ar), 7,03 (дд, $J=8,41$, 3,82 Гц, 2H, Ar), 6,64 (дд, $J=8,44$, 1,96 Гц, 2H, Ar), 6,23-6,40 (м, 2H, NH), 6,00 (уш. с., 1H, NH), 5,41 (уш. с., 2H, NH_2), 4,91-5,13 (м, 2H, CH_2), 4,73 (уш. с., 1H, CH), 4,18-4,66 (м, 13H, $\text{CH}+\text{CH}_2+\text{CH}_3$), 4,03-4,18 (м, 4H, CH), 3,89-4,03 (м, 4H, $\text{CH}+\text{H}_2\text{O}$), 3,13-3,27 (м, 10H, CH_2+CH_3), 2,91-3,10 (м, 12H, CH_2), 2,79-2,91 (м, 5H, CH_2), 2,54-2,79 (м, 6H, CH_2), 2,13-2,39 (м, 12H, CH_2), 2,11 (м, 1H, CH_2), 1,84-2,01 (м, 5H, CH_2), 1,34-1,84 (м, 24H, CH_2+CH_3), 1,10-1,34 (м, 9H, CH_2), 0,93-1,08 (м, 7H, CH_2), 0,64-0,90 (м, 26H, CH_2+CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,50, 174,21, 173,77, 172,53, 172,31, 172,10, 171,71, 171,51, 171,34, 171,10, 170,60, 169,91, 169,85, 168,74, 167,21, 158,96, 157,89, 157,28, 155,88, 146,45, 143,77, 143,69, 137,88, 130,05, 129,78, 129,47, 129,02, 128,19, 128,08, 127,83, 127,77, 127,39, 126,67, 126,47, 126,42, 126,28, 121,96, 118,95, 114,98, 89,66, 74,80, 60,95, 60,31, 58,68, 57,57, 57,17, 54,95, 54,14, 53,15, 52,57, 52,12, 51,65, 46,87, 40,44, 38,71, 37,02, 35,81, 34,68, 32,32, 31,78, 31,54, 31,22, 30,80, 30,48, 29,91, 29,84, 29,35, 29,12, 27,53, 26,65, 26,31, 25,43, 25,37, 24,66, 24,36, 23,14, 22,52, 22,25, 19,28, 18,98, 18,24, 15,49, 15,32,

15,05, 10,33. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R =11,32 мин.

ESI-HRMS: для $C_{121}H_{178}N_{22}O_{29}$: m/z рассчитано для $[M+2H]^{2+}$ 1202,66378, найдено: 1202,664.

Синтез соединения **32d**

Согласно общей методике описанной выше из 50 мг (0,04269 ммоль) соединения **24d**, 47 мг (0,03881 ммоль) соединения **29**, 9 мг (0,04657 ммоль) аскорбата натрия, 4 мг (0,01552 ммоль) пентагидрата сульфата меди в 9,5 мл смеси ДМФА/вода (3/1), с последующим добавлением 9 мг (0,03105 ммоль) ЭДТА было выделено в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии 43 мг (выход 45%) соединения **32d** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 12,45 (уш. с., 3H), 9,99 (уш. с., 1H, NH), 8,23-8,39 (м, 2H, NH), 8,02-8,23 (м, 2H, NH), 7,79-8,01 (м, 6H, Ar+NH+Триазольный фрагмент), 7,56-7,74 (м, 5H, NH), 7,10-7,38 (м, 16H, Ar), 6,17-6,44 (м, 2H, NH), 6,00 (уш. с., 1H, NH), 4,93-5,18 (м, 3H, CH_2), 4,72 (уш. с., 1H, CH), 4,24-4,66 (м, 15H, $CH+CH_2+CH_3+H_2O$), 3,56 (д, $J=5,20$ Гц, 1H,), 3,28-3,58 (м, 4H, CH_2), 3,08-3,26 (м, 10H, CH_3+CH_2), 2,79-3,08 (м, 12H, CH_2), 2,75 (уш. с., 2H, CH_2), 2,53-2,61 (м, 2H, CH_2), 2,08-2,40 (м, 10H, CH_2), 1,85-2,00 (м, 4H, CH_2), 1,62-1,84 (м, 7H, CH_2), 1,34-1,62 (м, 12H, CH_2+CH_3), 1,09-1,34 (м, 7H, CH_2), 0,94-1,08 (м, 5H, CH_2), 0,66-0,92 (м, 19H, CH_2+CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 174,55, 174,50, 174,21, 173,78, 172,54, 172,09, 171,75, 171,53, 171,33, 170,94, 168,74, 158,95, 157,28, 146,46, 143,70, 137,83, 129,78, 129,46, 129,37, 129,12, 129,01, 128,18, 128,08, 127,83, 127,77, 127,39, 126,76, 126,45, 121,98, 74,81, 57,14, 54,50, 52,60, 51,65, 46,87, 38,71, 35,83, 31,80, 30,55, 29,91, 29,12, 27,55, 26,65, 26,33, 25,44, 24,70, 23,14, 22,27, 19,28, 18,96, 18,24, 15,49, 15,32, 15,06, 10,32. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R =11,46 мин.

ESI-HRMS: для $C_{121}H_{178}N_{22}O_{28}$: m/z рассчитано для $[M+2H]^{2+}$ 1194,66632, найдено: 1194,6669.

Общая методика проведения реакции моноконъюгатов **32a-d** с NHS-эфиром абиратерона **36**

Моноконъюгат **32a-d** (1 экв.) растворили в ДМФА, прибавили NHS-эфир абиратерона **36** (1,2 экв.) и ДИПЭА (6 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 часов, после чего удалили растворитель при пониженном давлении. Сухой остаток

высадили ацетонитрилом, полученный осадок декантировали и три раза промывали ацетонитрилом. Остаток растворителя удалили при пониженном давлении.

Синтез соединения 40a

Из 34 мг (0,0142 ммоль) соединения **32a**, 9 мг (0,01703 ммоль) соединения **36** и 15 мкл (0,08514 ммоль) ДИПЭА было получено 38 мг (выход 95%) соединения **40a** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,46 (уш. с., 3H, COOH), 9,99 (уш. с., 1H, NH), 9,20 (м, 1H, OH), 8,58 (уш. с., 1H, Py), 8,42 (м, 1H, Py), 8,33 (д, $J=6,58$ Гц, 1H, Py), 8,03-8,21 (м, 3H, NH), 7,83-8,01 (м, 4H, NH), 7,81 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,68-7,78 (м, 2H, Ar), 7,51-7,67 (м, 4H, Ar), 7,08-7,40 (м, 18H, Ar), 7,04 (д, $J=8,50$ Гц, 2H, Ar), 6,64 (д, $J=7,95$ Гц, 2H, Ar), 6,23-6,37 (м, 2H, NH), 6,10 (с, 1H, CH), 5,98 (м, 1H, NH), 5,42 (уш. с., 2H, NH₂), 5,35 (м, 1H, CH), 4,91-5,15 (м, 2H, CH₂), 4,59-4,77 (м, 1H, CH), 4,16-4,59 (м, 12H, CH₂+CH), 4,03-4,16 (м, 3H, CH), 3,88-4,03 (м, 2H, CH), 3,57 (м, 1H, CH), 3,13-3,26 (м, 9H, CH₂+CH₃), 3,11 (с, 2H, CH₂), 2,90-3,08 (м, 11H, CH₂+CH), 2,77-2,89 (м, 5H, CH₂), 2,60-2,70 (м, 1H, CH₂), 2,53-2,60 (м, 2H, CH₂), 2,43 (м, 2H, CH₂), 2,13-2,40 (м, 7H, CH₂), 1,85-2,13 (м, 4H, CH₂), 1,74-1,84 (м, 2H, CH₂), 1,56-1,74 (м, 4H, CH₂), 1,44-1,56 (м, 4H, CH₂+CH₃), 1,11-1,43 (м, 7H, CH₂+CH₃), 0,92-1,11 (м, 6H, CH₂), 0,67-0,92 (м, 10H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,50, 174,20, 173,77, 172,38, 172,31, 172,10, 171,79, 171,58, 171,48, 171,34, 171,09, 170,56, 169,90, 169,84, 168,75, 158,92, 157,27, 155,86, 151,01, 147,84, 147,20, 146,40, 143,69, 141,22, 140,81, 139,87, 137,86, 133,33, 133,05, 132,16, 130,59, 130,24, 130,00, 129,01, 128,17, 128,05, 127,94, 127,76, 127,21, 126,75, 126,42, 126,25, 126,08, 124,96, 123,43, 121,98, 121,92, 118,98, 114,98, 85,43, 74,81, 73,17, 60,94, 60,30, 58,67, 58,19, 57,59, 57,14, 56,99, 54,99, 54,17, 53,17, 52,88, 52,17, 51,68, 49,63, 49,18, 47,16, 46,84, 46,66, 46,27, 43,78, 43,22, 38,44, 37,71, 36,42, 36,31, 35,77, 34,67, 34,55, 32,29, 31,87, 31,54, 31,33, 30,96, 30,75, 30,57, 30,45, 29,95, 29,89, 29,36, 29,10, 28,91, 27,80, 27,60, 27,35, 26,84, 26,30, 25,41, 24,66, 24,36, 23,14, 22,91, 22,35, 20,40, 19,27, 18,93, 18,58, 18,24, 16,28, 15,87, 15,48, 15,30, 15,04, 10,43. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99%, $t_R=8,78$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{148}\text{H}_{210}\text{ClN}_{23}\text{O}_{30}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ 1435,25435, найдено: 1435,2559.

Синтез соединения 40b

Из 35 мг (0,01435 ммоль) соединения **32b**, 10 мг (0,01722 ммоль) соединения **36** и 16 мкл (0,0861 ммоль) ДИПЭА было получено 33 мг (выход 80%) соединения **40b** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,40 (уш. с., 3H, COOH), 9,98 (уш. с., 1H, NH), 9,21 (уш. с., 1H, OH), 8,58 (уш. с., 1H, Py), 8,39-8,46 (м, 1H, Py), 8,32 (д, $J=6,9$ Гц, 1H, Ar), 8,10-8,19 (м, 2H, Ar+NH), 7,96-8,10, (м, 1H, NH), 7,82-7,96, (м, 4H, Ar+NH+Py), 7,78-7,82 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,74 (д, $J=8,7$ Гц, 1H, Ar), 7,50-7,65 (м, 4H, Ar+NH), 7,47 (д, $J=6,1$ Гц, 1H, Ar), 7,08-7,41 (м, 16H, Ar), 7,04 (д, $J=6,7$ Гц, 2H, Ar), 6,64 (д, $J=8,3$ Гц, 2H, Ar), 6,24-6,36 (м, 2H, NH), 6,10 (уш. с., 1H, CH), 5,97 (уш. с., 1H, NH), 5,32-5,45 (м, 3H, NH_2+CH), 4,92-5,12 (м, 2H, CH_2), 4,56-4,79 (м, 1H, CH_2), 4,18-4,51 (м, 12H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,90-4,14 (м, 5H, $\text{CH}+\text{CH}_2$), 3,51-3,60 (м, 1H, CH_2), 3,08-3,24 (м, 12H, CH_2), 2,90-3,06 (м, 12H, CH_2+CH_3), 2,80-2,90 (м, 5H, CH_2), 2,52-2,70 (м, 3H, CH_2), 2,15-2,35 (м, 16H, CH_2), 1,85-2,13 (м, 10H, CH_2), 1,74-1,84 (м, 5H, CH_2), 1,63-1,74 (м, 6H, CH_2), 1,55-1,63 (м, 4H, CH_2), 1,44-1,55 (м, 9H, CH_2), 1,29-1,44 (м, 9H, CH_2), 1,12-1,28 (м, 7H, CH_2), 0,94-1,05 (м, 13H, CH_2), 0,70-0,88 (м, 25H, CH_2+CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174,53, 174,24, 173,81, 172,38, 172,11, 171,80, 171,60, 171,49, 171,35, 171,12, 170,57, 169,85, 168,76, 158,93, 157,28, 155,87, 151,00, 147,84, 147,19, 146,40, 143,69, 139,87, 137,85, 133,33, 132,14, 131,56, 131,24, 130,01, 129,73, 129,01, 128,66, 128,18, 128,06, 127,94, 127,83, 127,77, 126,74, 126,47, 126,27, 123,45, 121,99, 120,15, 119,93, 118,96, 114,99, 81,64, 74,80, 73,17, 60,95, 60,31, 57,59, 57,17, 56,99, 55,02, 54,17, 53,17, 52,89, 52,13, 51,69, 49,63, 46,83, 46,65, 46,28, 43,78, 43,23, 38,44, 37,71, 36,41, 36,31, 35,83, 34,66, 34,54, 31,80, 31,33, 30,96, 30,45, 29,89, 29,36, 29,10, 28,91, 27,74, 27,62, 27,35, 26,84, 26,32, 25,41, 24,73, 24,65, 24,36, 22,92, 22,36, 20,40, 19,27, 18,94, 18,55, 18,25, 16,28, 15,86, 15,65, 15,48, 15,31, 15,05, 10,32. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=9,27$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{148}\text{H}_{210}\text{BrN}_{23}\text{O}_{30}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ 1457,22909, найдено: 1457,2319.

Синтез соединения 40с

Из 50 мг (0,02079 ммоль) соединения **32с**, 14 мг (0,02495 ммоль) соединения **36** и 22 мкл (0,1247 ммоль) ДИПЭА было получено 49 мг (выход 83%) соединения **40с** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12,47 (уш. с., 4H, COOH), 9,98 (уш. с., 1H, NH), 9,21 (уш. с., 1H, OH), 8,58 (м, 1H, Py), 8,42 (м, 1H, Py), 8,24-8,36 (м, 2H, NH), 8,10-8,17 (м, 2H, NH+Ar), 8,02-8,10 (м, 1H, NH), 7,82-8,01 (м, 5H, Py+Ar+NH), 7,81 (с, 1H, Триазольный фрагмент), 7,67-7,77 (м, 2H, Ar+NH), 7,53-7,64 (м, 3H, Ar), 7,22-7,33 (м, 9H, Ar), 7,16-7,22 (м, 2H, Ar), 7,10-7,16 (м, 4H, Ar), 7,00-7,07 (м, 2H, Ar), 6,64 (д, $J=8,5$ Гц, 2H, Ar), 6,25-6,34 (м, 2H, NH), 6,10 (с, 1H, CH), 5,97 (уш. с., 1H, NH), 5,30-5,44 (м, 4H, NH_2+CH_2),

4,91-5,10 (м, 2H, CH), 4,68-4,87 (м, 1H, CH), 6,50-4,61 (м, 2H, CH₂), 4,39-4,50 (м, 3H, CH+CH₂), 4,30-4,39 (м, 3H, CH+CH₂), 4,16-4,30 (м, 5H, CH₂+CH), 4,04-4,14 (м, 3H, CH), 3,89-4,03 (м, 3H, CH), 3,50-3,60 (м, 1H, CH), 3,12-3,24 (м, 11H, CH₂+CH₃), 3,10 (уш. с., 2H, CH₂), 2,90-3,07 (м, 13H, CH₂), 2,80-2,89 (м, 5H, CH₂), 2,61-2,69 (м, 1H, CH₂), 2,56 (т, J=7,4 Гц, 2H, CH₂), 2,41-2,46 (м, 3H, CH₂), 2,16-2,34 (м, 16H, CH₂), 1,84-2,07 (м, 10H, CH₂), 1,74-1,83 (м, 5H, CH₂), 1,56-1,74 (м, 11H, CH₂), 1,29-1,56 (м, 10H, CH₂), 1,11-1,29 (м, 8H, CH₂), 0,95-1,05 (м, 14H, CH₂), 0,70-0,89 (м, 25H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,55, 174,22, 173,79, 172,37, 172,31, 172,12, 171,79, 171,60, 171,49, 171,35, 171,11, 170,57, 169,84, 168,75, 167,22, 158,93, 157,28, 155,86, 151,01, 147,81, 147,16, 146,40, 143,76, 143,69, 139,86, 137,85, 133,30, 130,01, 129,77, 129,46, 129,01, 128,18, 128,06, 127,94, 127,82, 127,77, 127,39, 126,67, 126,47, 126,27, 121,98, 121,92, 118,98, 114,98, 85,42, 74,80, 73,17, 60,95, 60,31, 58,18, 57,60, 57,14, 56,98, 55,07, 53,18, 52,89, 52,15, 51,68, 49,62, 49,18, 46,83, 46,65, 46,27, 43,22, 38,43, 37,71, 36,41, 36,31, 35,86, 34,67, 34,53, 31,82, 31,50, 31,33, 30,96, 30,74, 30,46, 29,94, 29,88, 29,35, 28,90, 27,58, 27,34, 26,84, 26,23, 25,41, 24,65, 24,38, 23,14, 22,91, 22,37, 20,39, 19,27, 18,93, 18,41, 18,25, 16,27, 15,87, 15,65, 15,48, 15,31, 15,05, 10,32. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, t_R=7,53 мин.

ESI-HRMS: для C₁₄₉H₂₁₁N₂₃O₃₂: m/z рассчитано для [M+2Na]²⁺ 1440,26875, найдено: 1440,2652.

Синтез соединения 40d

Из 38 мг (0,0159 ммоль) соединения **32d**, 11 мг (0,01909 ммоль) соединения **36** и 17 мкл (0,0955 ммоль) ДИПЭА было получено 35 мг (выход 78%) соединения **40d** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12,53 (уш. с., 3H, COOH), 9,98 (уш. с., 1H, NH), 8,57 (уш. с., 1H, Py), 8,42 (уш. с., 1H, Py), 8,05-8,36 (м, 4H, NH), 7,79-8,01 (м, 7H, Ar+Py+Триазольный фрагмент+NH), 7,74 (д, J=7,46 Гц, 2H, NH), 7,53-7,70 (м, 3H, NH+Ar), 7,02-7,40 (м, 21H, Ar), 6,30 (м, 2H, NH), 6,10 (уш. с., 1H, CH), 5,98 (уш. с., 1H, NH), 5,35-5,42 (м, 3H, NH+CH), 4,93-5,14 (м, 2H, CH₂), 4,72 (уш. с., 1H, CH), 4,34-4,66 (м, 8H, CH₂+CH), 4,16-4,33 (м, 5H, CH₂+CH), 3,88-4,16 (м, 5H, CH), 3,14-3,25 (м, 11H, CH₂), 2,79-3,14 (м, 20H, CH₂+CH₃), 2,53-2,70 (м, 4H, CH₂), 2,43 (д, J=5,93 Гц, 2H, CH₂), 1,84-2,40 (м, 29H, CH₂), 1,10-1,84 (м, 43H, CH+CH₂+CH₃), 0,93-1,10 (м, 15H, CH₂), 0,68-0,93 (м, 26H, CH₂+CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174,53, 174,23, 173,80, 172,10, 171,80, 171,62, 171,35, 170,96, 170,57, 169,85, 168,74, 156,93, 150,99, 147,18, 146,40, 143,69, 139,86,

137,93, 137,82, 133,34, 129,76, 129,46, 129,08, 129,00, 128,18, 128,07, 127,83, 127,38, 126,68, 126,46, 123,45, 122,00, 121,92, 118,93, 81,75, 77,71, 74,80, 73,17, 60,95, 60,31, 57,59, 57,14, 56,98, 54,99, 54,67, 53,17, 52,92, 49,62, 46,84, 46,64, 46,26, 43,24, 37,70, 36,40, 36,31, 35,79, 34,54, 31,81, 31,54, 31,33, 30,96, 30,46, 29,87, 29,34, 29,12, 28,91, 27,63, 27,34, 26,85, 26,32, 25,42, 24,65, 24,37, 23,14, 22,91, 20,40, 19,27, 18,93, 18,42, 18,25, 16,27, 15,48, 15,31, 15,05, 10,31. Количество сигналов в спектре меньше числа углеродных атомов в соединении, поскольку часть сигналов имеет низкую интенсивность.

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 96%, t_R =8,41 мин.

ESI-HRMS: для $C_{149}H_{211}N_{23}O_{31}$: m/z рассчитано для $[M+2Na]^{2+}$ 1432,27129, найдено: 1432,2719.

Синтез соединения 41

200 мг энзалутамида (0,431 ммоль) растворили в 1,4-диоксане. К полученной смеси добавили концентрированную соляную кислоту с получением смеси соляная кислота/1,4-диоксан 16/3 по объёму. Полученную смесь кипятили в течение 60 часов, затем экстрагировали ДХМ, органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Таким образом было получено 100 мг (выход 51%) соединения **41** в виде белого аморфного порошка.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 13,55 (уш. с., 1H, COOH) 8,40 (д, $J=8,25$ Гц, 1H, Ar) 8,28 (д, $J=1,28$ Гц, 1H, Ar) 7,99-8,11 (м, 2H, Ar) 7,45 (дд, $J=11,10$, 1,62 Гц, 1H, Ar) 7,36 (дд, $J=8,28$, 1,68 Гц, 1H, Ar) 1,54 (с, 6H, CH_3).

Синтез соединения 42

94 мг (0,208 ммоль, 1 экв.) соединения **41**, 50 мг (0,26 ммоль, 1,25 экв.) гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида и 30 мг (0,26 ммоль, 1,25 экв.) N-гидроксисукцинимиды растворили в 10 мл дихлорметана. Реакционную смесь перемешивали до полного окончания реакции. Полноту протекания реакции контролировали по ТСХ (в качестве элюента смесь ДХМ – метанол = 15/1). Удалили растворитель при пониженном давлении. Сухой остаток растворили в 20 мл дихлорметана и экстрагировали водой, насыщенным раствором гидрокарбоната натрия и насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. Удалили растворитель при пониженном давлении. Получили 96 мг (выход 84%) соединения **42** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 8,41 (д, $J=8,25$ Гц, 1H, Ar), 8,24-8,32 (м, 2H, Ar), 8,06-8,11 (м, 1H, Ar), 7,69 (дд, $J=11,19$, 1,71 Гц, 1H, Ar), 7,54 (дд, $J=8,38$, 1,71 Гц, 1H, Ar), 2,90 (м, 4H, CH_2), 1,57 (с, 6H, CH_3).

Синтез соединения 43

86 мг (0,0359 ммоль, 1 экв.) соединения **32a**, 24 мг (0,0431 ммоль, 1,2 экв.) соединения **42** растворили в 20 мл ДМФА. К полученному раствору прилили 38 мкл (0,2154 ммоль, 6 экв.) ДИПЭА. Реакционную смесь перемешивали 24 часа, после чего удалили растворитель при пониженном давлении. Затем высаживали продукт ацетонитрилом, декантировали и промывали образовавшийся осадок ацетонитрилом. Целевой продукт выделили в индивидуальном виде методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента была использована смесь ацетонитрил - вода. Получили 20 мг (выход 20%) соединения **43** в виде белого порошка.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12,49 (уш. с., 3H, COOH), 9,99 (уш. с., 1H, NH), 9,20 (уш. с., 1H, OH), 8,35-8,62 (м, 1H, NH), 8,28 (уш. с., 2H, NH), 8,02-8,20 (м, 3H, Ar+NH), 7,70-7,98 (м, 6H, Ar), 7,49-7,69 (м, 3H, Ar), 6,94-7,45 (м, 21H, Ar), 6,63 (уш. с., 2H, Ar), 6,29 (уш. с., 2H, NH), 5,97 (уш. с., 1H, NH), 5,29-5,47 (м, 2H, NH), 5,03 (уш. с., 1H, CH_2), 4,72 (уш. с., 1H, CH), 4,18-4,65 (м, 13H, CH_2+CH), 3,87-4,15 (м, 6H, CH_2+CH), 3,50-3,80 (м, 3H, CH_2+CH), 3,08-3,26 (м, 14H, CH_2), 2,75-3,07 (м, 18H, CH_2), 2,62-2,74 (м, 3H, CH_2), 2,03-2,36 (м, 16H, CH_2), 1,90 (м, 6H, CH_2), 1,63-1,83 (м, 10H, CH_2), 1,09-1,61 (м, 28H, CH_2+CH_3), 0,99 (д, $J=5,14$ Гц, 8H, CH_2+CH_3), 0,64-0,89 (м, 26H, CH_2+CH_3).

ВЭЖХ-МС: содержание целевого соединения – 99,9%, $t_R=9,20$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{140}\text{H}_{188}\text{ClF}_4\text{N}_{25}\text{O}_{29}\text{S}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ 1436,15673, найдено: 1436,1587.

4.3. *In vitro* исследования полученных соединений

***In vitro* определение концентрации полумаксимального ингибирования реакции расщепления NAAG под действием ПСМА**

LNCaP – андроген-чувствительная клеточная линия аденокарциномы человека, являются адherentными эпителиальными клетками, растут в виде агрегатов и одиночных клеток. ПСМА-положительные.

Клетки линии LNCaP культивировались в среде RPMI с 10% FBS (Gibco), 1x Glutamax (Gibco) и 1x смесью пенициллин-стрептомицин (Gibco). Для суспендирования клеток с 25 cm^2 флакона убрали культуральную среду, промывали клетки буфером PBS и инкубировали 5 минут с 0,25% трипсином (1 мл). Трипсин инактивировали полной культуральной средой (2 мл), промывали PBS, переносили 10⁶ клеток в пробирку и добавляли 500 мкл лизирующего буфера (0,5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1x Proteinase Inhibition cocktail). Суспензию инкубировали 30 минут во льду и обрабатывали ультразвуком (7 раз по 7 секунд с интервалами 20-30 секунд) во льду во избежание перегрева.

Центрифугировали 10 мин 1000g на 4°C и надосадочный раствор использовали в дальнейшем анализе.

Анализ ингибирования препаратами ПСМА проводился по нерадиоактивному протоколу с детекцией высвобождаемого в ходе реакции глутамата. Экстракт клеток линии LNCaP (10 мкл) смешивался с 2 мкл препарата соответствующего разведения. Для первичного тестирования использовалась серия разведений препаратов 2 нМ-100 мкМ с шагом разведения 3-5 раз. К полученной смеси добавлялся 1 мкл 100 мкМ раствора NAAG. Полученная смесь инкубировалась 2 часа при 37°C. После инкубации смесь разводилась вдвое реакционным буфером (13 мкл) из набора Amplex Red Glutamic Acid Kit (Molecular Probes Inc., Eugene) и добавлялась многокомпонентная реакционная смесь для детекции глутамата, приготовленная в соответствии с протоколом производителя (26 мкл). Рабочий раствор Amplex Red: 5 мкл Amplex® Red reagent stock solution, 1,25 мкл HRP stock solution, 8 мкл L-глутаматоксидазы, 2,5 мкл L-глутамат-пируват трансминазы, 0,5 мкл L-аланина, 483 мкл 1X реакционного буфера. Проводилась инкубация 1 час при 37°C. Флуоресценция резорубина, полученного в результате сопряженных реакций глутаматдетектирующего набора детектировалась на планшетном мультidetекторе VICTORX5 (Perkin Elmer Inc.) при длине возбуждения 555 нм и детекции при 580 нм. В качестве контроля эндогенного уровня глутамата с заменой раствора NAAG на воду.

***In vitro* определение цитотоксичности конъюгатов**

Цитотоксичность каждого образца была протестирована *in vitro* против клеток человека в течение 72 часов путем серии разведений образца в МТТ-тесте.[175]

Были проведены тесты на опухолевых адгезивных клетках аденокарциномы молочной железы MCF7, аденокарциномы легкого A549, андроген-независимого рака предстательной железы PC3, андроген-чувствительного рака предстательной железы LNCaP, андроген-реагирующего рака предстательной железы 22Rv1, этиологически неопухолевых адгезивных клеток эмбриональной почки человека HEK293T и иммортализованных фибробластов легкого VA13. В качестве контрольного теста использовали препарат с известной цитотоксичностью - доксорубин.

5000 клеток VA13, или 3000 клеток A549, или 6000 клеток MCF7, или 2500 клеток HEK293T на лунку высевали на 96-луночные планшеты в среду DMEM-F12, содержащую 10% FBS, 50 ед/мл пенициллина, 0,05 мг/мл стрептомицина. Среда DMEM-F12 для клеток MCF7 дополнительно содержит 0,01 мг/мл инсулина.

2500 клеток PC3, или 4000 клеток LNCaP, или 3000 клеток 22Rv1 на лунку высевали на 96-луночные планшеты в среду RPMI, содержащую 10% FBS, 50 ед/мл пенициллина, 0,05 мг/мл стрептомицина.

После 18 часов выращивания в клетки добавляли образцы, разведенные в ДМСО (8-14 концентраций с шагом в 3 раза, максимальная концентрация в клетках составляла 11111 нмоль для испинесиба и 100000 нмоль для других соединений). Клетки с добавленными соединениями инкубировали в течение 72 часов при 37°C и 5%-ном содержании CO₂. 1 г реагента МТТ растворяли в 200 мл PBS в ультразвуковой ванне и затем фильтровали (фильтр 0,45 мкм) (концентрация раствора МТТ 5 мг/мл). После этого в клетки добавляли МТТ с конечной концентрацией 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 2-4 часов при температуре 37°C в инкубаторе, в атмосфере 5% CO₂.

Затем удаляли раствор МТТ и добавляли 140 мкл ДМСО на лунку. Таблетки встряхивали в течение 10 минут на шейкере (80 об/мин) для растворения формазана. Поглощение измеряли с помощью планшетного считывателя (VICTOR X5 Light Plate Reader, PerkinElmer, США) при длине волны 565 нм. Результаты были обработаны в программе GraphPad (Сан-Диего, Калифорния), были получены значения CC₅₀.

При обработке результатов теста была отмечена концентрация, приводящая к уменьшению количества клеток на 50% (CC₅₀).

4.4. *In vivo* исследования полученных соединений

Исследования выполнены в соответствии с международными и национальными требованиями, регламентирующими проведение доклинических исследований по оценке эффективности новых лекарственных средств, а именно:

- Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»;
- ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики.
- Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. N 2010/63/ЕС "О защите животных, использующихся для научных целей"
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая. Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012.

Все процедуры в исследовании выполнены согласно Стандартным Операционным Процедурам (СОП) отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии и экспериментально-биологической клиники.

Животные

В работе использовали мышей линии BALB/c *nu/nu* (*nude*), самцов, возраст 8-12 недель. Животные получены из ЦКП «SPF-вивария» г. Новосибирска. Мыши поступили с ветеринарным паспортом и сертификатом качества. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с национальными и международными стандартами, регламентирующие использование экспериментальных животных в научных целях.

Опухолевые модели

Эксперименты выполнены на мышах с опухолями предстательной железы 22Rv1 и PC-3 (клеточные культуры предоставлены проф. А.Г. Мажугой, ATCC коллекция, США). Для прививки животным использовали клетки 6-10 пассажа, которые культивировали во флаконах с площадью поверхности 75 см² (Costar, США) на среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) в стандартных условиях культивирования.

Для получения подкожных ксенографтов 22Rv1 и PC-3 суспензию опухолевых клеток в количестве 5×10^6 инокулировали мышам-самцам подкожно в паховую впадину в объеме 0,1 мл. Для прививки животным клеток 22Rv1 использовали Матригель (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences).

Подготовка материала для гистологического и иммуногистохимического исследования

Образцы тканей, полученные при аутопсии животных на 14-21 сутки после инокуляции клеток, фиксировали в нейтральном забуференном 10% формалине и после стандартной гистологической проводки заключали в парафин. Готовили серийные срезы тканей толщиной 4 мкм. Для гистологического анализа срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э) по стандартной методике.

Иммуногистохимическое окрашивание

Для выявления экспрессии ПСМА использовали поликлональные кроличьи антитела Ab58779 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:100. Срезы окрашивали с использованием общепринятой техники непрямого иммунопероксидазного анализа. Для демаскировки антигена стёкла с депарафинизированными срезами выдерживали в 0,1 M натрий-цитратном буфере (pH 6,0) при 95°C в течение 20 мин. Система вторичных реагентов включала биотинилированные поликлональные антитела к иммуноглобулинам кролика (Santa Cruz Biotechnology, Inc), конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Dako, Дания) и хромогенный субстрат Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, Дания). На контрольные срезы вместо первичных антител наносили неспецифические иммуноглобулины кролика (Santa Cruz Biotechnology, Inc). После завершения реакции клетки и срезы докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам.

Микропрепараты анализировали под микроскопом Olympus BX51, оснащенным системой документирования изображений.

Оценка противоопухолевой эффективности *in vivo*

Для изучения противоопухолевой эффективности конъюгаты **25**, **40a**, **43** и ММАЕ вводили внутривенно в дозе 0,3 мг/кг мышам-опухоленосителям трехкратно с интервалом в 5 дней, введение начинали через 7-8 дней после инокуляции клеток животным, размер опухоли составлял 70-90 мм³. В качестве контрольного вещества использовали 0,9% раствор натрия хлорида. Экспериментальные группы состояли из 4 животных.

В ходе наблюдения за животными регистрировали наличие опухолевых образований и их размеры, а также массу тела мышей 1 раз в 5 дней. В соответствии с гуманными принципами эвтаназии животных проводили путем помещения мышей в ингаляционную CO₂-камеру (ZOONLAB GmbH, Германия).

Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = d_1 \times d_2 \times d_3 \times 0,52$, где d_1 , d_2 и d_3 - три взаимно перпендикулярных размера опухоли.

Гистохимическое исследование опухоли

100% выход опухолей при использовании клеток линий 22Rv1 и PC-3 достигался при инокуляции животным опухолевого материала в количестве не менее 5×10^6 клеток.

По результатам гистологического исследования, подкожные ксенографты опухолей 22Rv1 и PC-3 имели солидно-железистое строение, в тканях опухолей определялось большое количество митозов (Рисунок 4.1 а, б и 4.2 а, б). Обе опухоли были хорошо васкуляризированы. На 21 сутки в ткани опухоли 22Rv1 обнаружены очаги некрозов. В окружающей соединительной ткани обеих опухолей наблюдался воспалительный инфильтрат.

По результатам оценки иммуногистологической реакции, экспрессия ПСМА выявлена в клетках подкожных ксенотрансплантатов рака предстательной железы 22Rv1 (Рисунок 4.1 в) и PC-3 (Рисунок 4.2 в). В клетках 22Rv1 и PC-3 наблюдали как окрашивание цитоплазмы, так и окрашивание поверхностной мембраны. Следует отметить, что общая интенсивность окрашивания ксенографтов 22Rv1 во всех исследованных случаях была существенно выше, чем интенсивность окрашивания ксенографтов PC-3, таким образом, уровень экспрессии ПСМА в клетках PC-3 гораздо ниже, чем в клетках 22Rv1.

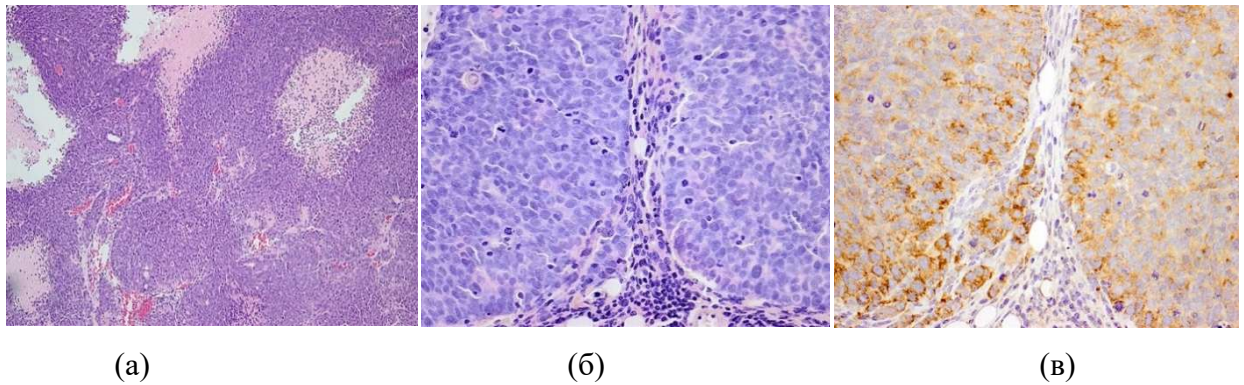


Рисунок 4.1 - Гистологические препараты подкожного ксенографта карциномы предстательной железы человека 22Rv1 у мышей *nude*. 21-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином, ув. x40 и x400 *а* и *б* — общая морфологическая картина, Г&Э; *в* — экспрессия ПСМА в опухолевых клетках, иммунопероксидазная реакция с антителами к ПСМА (Ab58779, разведение 1:100), докрашивание гематоксилином.

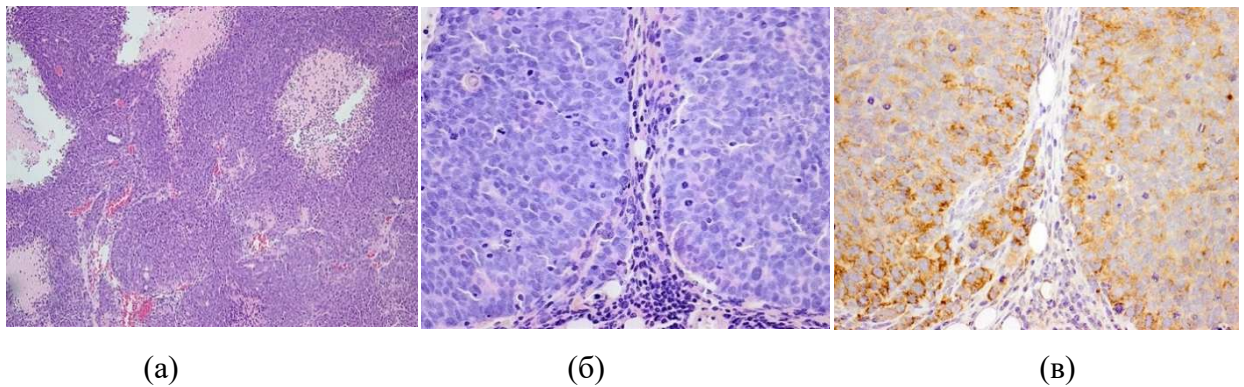


Рисунок 4.2 - Гистологические препараты подкожного ксенографта аденокарциномы предстательной железы человека PC-3 у мышей *nude*. 21-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином, ув. x100 и x400 *а* и *б* — общая морфологическая картина, Г&Э; *в* — экспрессия ПСМА в опухолевых клетках, иммунопероксидазная реакция с антителами к ПСМА (Ab58779, разведение 1:100), докрашивание гематоксилином.

5. 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*-карбоксо- 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-замещённых 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*-карбоксо-группу. Лиганды, содержащие *п*-карбоксо- 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.

6. Список литературы

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin. American Cancer Society*, 2024. T. 74, № 3. C. 229–263.
2. Potosky A.L., Davis W.W., Hoffman R.M., Stanford J.L., Stephenson R.A., Penson D.F., Harlan L.C. Five-Year Outcomes After Prostatectomy or Radiotherapy for Prostate Cancer: The Prostate Cancer Outcomes Study // *JNCI Journal of the National Cancer Institute. J Natl Cancer Inst*, 2004. T. 96, № 18. C. 1358–1367.
3. Taylor L.G., Canfield S.E., Du X.L. Review of major adverse effects of androgen-deprivation therapy in men with prostate cancer // *Cancer. Cancer*, 2009. T. 115, № 11. C. 2388–2399.
4. Taylor J.M., Chen V.E., Miller R.C., Greenberger B.A. <p>The Impact of Prostate Cancer Treatment on Quality of Life: A Narrative Review with a Focus on Randomized Data</p> // *Res Rep Urol. Dove Press*, 2020. T. 12. C. 533–546.
5. 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 // *J Drug Target*. 2016. T. 24, № 8. C. 679–693.
6. Hennrich U., Eder M. [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer // *Pharmaceuticals. Pharmaceuticals (Basel)*, 2021. T. 14, № 8. C. 713.
7. Fallah J., Agrawal S., Gittleman H., Fiero M.H., Subramaniam S., John C., Chen W., Ricks T.K., Niu G., Fotenos A., Wang M., Chiang K., Pierce W.F., Suzman D.L., Tang S., Pazdur R., Amiri-Kordestani L., Ibrahim A., Kluetz P.G. FDA Approval Summary: Lutetium Lu 177 Vipivotide Tetraxetan for Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer // *Clinical Cancer Research. Clin Cancer Res*, 2023. T. 29, № 9. C. 1651–1657.
8. Maresca K.P., Hillier S.M., Femia F.J., Keith D., Barone C., Joyal J.L., Zimmerman C.N., Kozikowski A.P., Barrett J.A., Eckelman W.C., Babich J.W. A Series of Halogenated Heterodimeric Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) as Radiolabeled Probes for Targeting Prostate Cancer // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2009. T. 52, № 2. C. 347–357.
9. Machulkin A.E., Shafikov R.R., Uspenskaya A.A., Petrov S.A., Ber A.P., Skvortsov D.A., Nimenko E.A., Zyk N.U., Smirnova G.B., Pokrovsky V.S., Abakumov M.A., Saltykova I. V., Akhmirov R.T., Garanina A.S., Polshakov V.I., Saveliev O.Y., Ivanenkov Y.A.,

- Aladinskaya A. V., Finko A. V., Yamansarov E.U., Krasnovskaya O.O., Erofeev A.S., Gorelkin P. V., Dontsova O.A., Beloglazkina E.K., Zyk N. V., Khazanova E.S., Majouga A.G. Synthesis and Biological Evaluation of PSMA Ligands with Aromatic Residues and Fluorescent Conjugates Based on Them // *J Med Chem*. 2021. T. 64, № 8. C. 4532–4552.
10. Petrov S.A., Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Zyk N.Y., Nimenko E.A., Garanina A.S., Petrov R.A., Polshakov V.I., Grishin Y.K., Roznyatovsky V.A., Zyk N. V., Majouga A.G., Beloglazkina E.K. Polypeptide-Based Molecular Platform and Its Docetaxel/Sulfo-Cy5-Containing Conjugate for Targeted Delivery to Prostate Specific Membrane Antigen // *Molecules*. NLM (Medline), 2020. T. 25, № 24. C. 5784.
 11. Derks Y.H.W., Rijpkema M., Amatdjais-Groenen H.I.V., Kip A., Franssen G.M., Sedelaar J.P.M., Somford D.M., Simons M., Laverman P., Gotthardt M., Löwik D.W.P.M., Lütje S., Heskamp S. Photosensitizer-based multimodal PSMA-targeting ligands for intraoperative detection of prostate cancer // *Theranostics*. 2021. T. 11, № 4. C. 1527–1541.
 12. Sengupta S., Krishnan M.A., Dudhe P., Reddy R.B., Giri B., Chattopadhyay S., Chelvam V. Novel solid-phase strategy for the synthesis of ligand-targeted fluorescent-labelled chelating peptide conjugates as a theranostic tool for cancer // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2018. T. 14. C. 2665–2679.
 13. Patil Y., Shmeeda H., Amitay Y., Ohana P., Kumar S., Gabizon A. Targeting of folate-conjugated liposomes with co-entrapped drugs to prostate cancer cells via prostate-specific membrane antigen (PSMA) // *Nanomedicine*. 2018. T. 14, № 4. C. 1407–1416.
 14. Chen Y., Wang G., Kong D., Zhang Z., Yang K., Liu R., Zhao W., Xu Y. Double-targeted and double-enhanced suicide gene therapy mediated by generation 5 polyamidoamine dendrimers for prostate cancer // *Mol Carcinog*. 2013. T. 52, № 3. C. 237–246.
 15. Petrov S.A., Zyk N.Y., Machulkin A.E., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. PSMA-targeted low-molecular double conjugates for diagnostics and therapy // *Eur J Med Chem*. Elsevier Masson, 2021. T. 225. C. 113752.
 16. 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., Machulkin A.E. Synthesis and initial in vitro evaluation of PSMA-targeting ligands with a modified aromatic moiety at the lysine ϵ -nitrogen atom // *Bioorg Med Chem Lett*. Pergamon, 2022. T. 71. C. 128840.
 17. Zyk N.Yu., Petrov S.A., Zavertkina M. V., Uspenskaya A.A., Krasnikov P.A., Dashkova N.S., Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Zyk N. V., Machulkin A.E. Choice of the optimal synthetic approach for the polypeptide ligands of prostatic specific membrane antigen preparation // *Mendeleev Communications*. 2023. T. 33, № 4. C. 472–475.

18. 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., Machulkin A.E. Synthesis of Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Bimodal Conjugates of Cytotoxic Agents and Antiandrogens and Their Comparative Assessment with Monoconjugates // *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2023. T. 24, № 14. C. 11327.
19. Zyk N.Y., Kolchanova A.Y., Volkova N.S., Uspenskaia A.A., Skvortsov D.A., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Majouga A.G., Machulkin A.E. A novel molecular platform for co-delivery of monomethyl auristatin E and ispinesib to prostate cancer cells // *Mendeleev Communications. Mendeleevskie Soobshcheniya*, 2025. T. 35, № 4. C. 440–443.
20. 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., Zamyatnin Jr A.A., Erofeev A., Gorelkin P., Beloglazkina E.K., Zyk N. V., Khazanova E.S., Majouga A.G. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin E Conjugate // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2021. T. 64, № 23. C. 17123–17145.
21. Horoszewicz J.S., Kawinski E., Murphy G.P. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. // *Anticancer Res.* 1987. T. 7, № 5B. C. 927–935.
22. Silver D.A., Pellicer I., Fair W.R., Heston W.D., Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. // *Clinical cancer research.* 1997. T. 3, № 1. C. 81–85.
23. O’Keefe D.S., Bacich D.J., Heston W.D.W. Comparative analysis of prostate-specific membrane antigen (PSMA) versus a prostate-specific membrane antigen-like gene // *Prostate.* 2004. T. 58, № 2. C. 200–210.
24. Mhawech-Fauceglia P., Zhang S., Terracciano L., Sauter G., Chadhuri A., Herrmann F.R., Penetrante R. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using mutiple tumour tissue microarray technique // *Histopathology.* 2007. T. 50, № 4. C. 472–483.
25. Šácha P., Zámečník J., Bařinka C., Hlouchová K., Vřcha A., Mlřochová P., Hilgert I., Eckschlager T., Konvalinka J. Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain // *Neuroscience.* 2007. T. 144, № 4. C. 1361–1372.

26. Lauri C., Chiurchioni L., Russo V.M., Zannini L., Signore A. PSMA Expression in Solid Tumors beyond the Prostate Gland: Ready for Theranostic Applications? // J Clin Med. MDPI, 2022. T. 11, № 21. C. 6590.
27. Kawakami M., Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. // Cancer Res. 1997. T. 57, № 12. C. 2321–2324.
28. Rawlings N.D., Barrett A.J. Structure of membrane glutamate carboxypeptidase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. Elsevier, 1997. T. 1339, № 2. C. 247–252.
29. Bakht M.K., Beltran H. Biological determinants of PSMA expression, regulation and heterogeneity in prostate cancer // Nat Rev Urol. Nature Publishing Group, 2025. T. 22, № 1. C. 26–45.
30. Davis M.I., Bennett M.J., Thomas L.M., Bjorkman P.J. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 2005. T. 102, № 17. C. 5981–5986.
31. Speno H.S., Luthi-Carter R., Macias W.L., Valentine S.L., Joshi A.R.T., Coyle J.T. Site-Directed Mutagenesis of Predicted Active Site Residues in Glutamate Carboxypeptidase II // Mol Pharmacol. Elsevier, 1999. T. 55, № 1. C. 179–185.
32. Nikfarjam Z., Zargari F., Nowroozi A., Bavi O. Metamorphosis of prostate specific membrane antigen (PSMA) inhibitors // Biophys Rev. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022. T. 14, № 1. C. 303–315.
33. Mesters J.R., Barinka C., Li W., Tsukamoto T., Majer P., Slusher B.S., Konvalinka J., Hilgenfeld R. Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer // EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. T. 25, № 6. C. 1375–1384.
34. Barinka C., Rojas C., Slusher B., Pomper M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer // Curr Med Chem. Bentham Science Publishers Ltd., 2012. T. 19, № 6. C. 856–870.
35. Bařinka C., Rovensk M., Mlochov P., Hlouchov K., Plechanovov A., Majer P., Tsukamoto T., Slusher B.S., Konvalinka J., Lubkowski J. Structural Insight into the Pharmacophore Pocket of Human Glutamate Carboxypeptidase II // J Med Chem. American Chemical Society , 2007. T. 50, № 14. C. 3267–3273.
36. Barinka C., Byun Y., Dusich C.L., Banerjee S.R., Chen Y., Castanares M., Kozikowski A.P., Mease R.C., Pomper M.G., Lubkowski J. Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Urea-Based Inhibitors: Structural Characterization // J Med Chem. 2008. T. 51, № 24. C. 7737–7743.

37. Kularatne S.A., Zhou Z., Yang J., Post C.B., Low P.S. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted ^{99m}Tc -Radioimaging Agents // *Mol Pharm.* American Chemical Society, 2009. T. 6, № 3. C. 790–800.
38. Subasinghe N., Schulte M., Chan M.Y.M., Roon R.J., Koerner J.F., Johnson R.L. Synthesis of acyclic and dehydroaspartic acid analogs of Ac-Asp-Glu-OH and their inhibition of rat brain N-acetylated α -linked acidic dipeptidase (NAALA dipeptidase) // *J Med Chem.* American Chemical Society, 1990. T. 33, № 10. C. 2734–2744.
39. Serval V., Galli T., Cheramy A., Glowinski J., Lavielle S. In vitro and in vivo inhibition of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate catabolism by N-acylated L-glutamate analogs. // *J Pharmacol Exp Ther.* 1992. T. 260, № 3. C. 1093–1100.
40. Jackson P.F., Cole D.C., Slusher B.S., Stetz S.L., Ross L.E., Donzanti B.A., Trainor D.A. Design, Synthesis, and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated α -Linked Acidic Dipeptidase // *J Med Chem.* American Chemical Society, 1996. T. 39, № 2. C. 619–622.
41. Tang H., Brown M., Ye Y., Huang G., Zhang Y., Wang Y., Zhai H., Chen X., Shen T.Y., Tenniswood M. Prostate targeting ligands based on N-acetylated α -linked acidic dipeptidase // *Biochem Biophys Res Commun.* Academic Press, 2003. T. 307, № 1. C. 8–14.
42. Maung J., Mallari J.P., Girtsman T.A., Wu L.Y., Rowley J.A., Santiago N.M., Brunelle A.N., Berkman C.E. Probing for a hydrophobic binding register in prostate-specific membrane antigen with phenylalkylphosphonamides // *Bioorg Med Chem.* 2004. T. 12, № 18. C. 4969–4979.
43. Jackson P., Slusher B. Design of NAALADase Inhibitors A Novel Neuroprotective Strategy // *Curr Med Chem.* Bentham Science Publishers Ltd., 2001. T. 8, № 8. C. 949–957.
44. Yamamoto T., Nozaki-Taguchi N., Sakashita Y., Inagaki T. Inhibition of spinal N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase produces an antinociceptive effect in the rat formalin test // *Neuroscience.* Elsevier, 2001. T. 102, № 2. C. 473–479.
45. Long J.B., Yourick D.L., Slusher B.S., Robinson M.B., Meyerhoff J.L. Inhibition of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) protects against dynorphin A-induced ischemic spinal cord injury in rats // *Eur J Pharmacol.* Elsevier, 2005. T. 508, № 1–3. C. 115–122.
46. Cai Y., Qiu Y., Wei L., Zhang W., Hu S., Smith P.R., Crabtree V.P., Tong S., Thakor N. V., Zhu Y. Complex character analysis of heart rate variability following brain asphyxia // *Med Eng Phys.* Elsevier, 2006. T. 28, № 4. C. 297–303.
47. Majer P., Jackson P.F., Delahanty G., Grella B.S., Ko Y.-S., Li W., Liu Q., Maclin K.M., Poláková J., Shaffer K.A., Stoermer D., Vitharana D., Wang E.Y., Zakrzewski A., Rojas C.,

- Slusher B.S., Wozniak K.M., Burak E., Limsakun T., Tsukamoto T. Synthesis and Biological Evaluation of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II: Discovery of an Orally Active GCP II Inhibitor // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2003. T. 46, № 10. C. 1989–1996.
48. Majer P., Hin B., Stoermer D., Adams J., Xu W., Duvall B.R., Delahanty G., Liu Q., Stathis M.J., Wozniak K.M., Slusher B.S., Tsukamoto T. Structural Optimization of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II by Modification of the P1' Side Chain // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2006. T. 49, № 10. C. 2876–2885.
 49. Grella B., Adams J., Berry J.F., Delahanty G., Ferraris D. V., Majer P., Ni C., Shukla K., Shuler S.A., Slusher B.S., Stathis M., Tsukamoto T. The discovery and structure–activity relationships of indole-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II // *Bioorg Med Chem Lett. Pergamon*, 2010. T. 20, № 24. C. 7222–7225.
 50. Nan F., Bzdega T., Pshenichkin S., Wroblewski J.T., Wroblewska B., Neale J.H., Kozikowski A.P. Dual Function Glutamate-Related Ligands: Discovery of a Novel, Potent Inhibitor of Glutamate Carboxypeptidase II Possessing mGluR3 Agonist Activity // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2000. T. 43, № 5. C. 772–774.
 51. Kozikowski A.P., Nan F., Conti P., Zhang J., Ramadan E., Bzdega T., Wroblewska B., Neale J.H., Pshenichkin S., Wroblewski J.T. Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase) // *J Med Chem*. 2001. T. 44, № 3. C. 298–301.
 52. Kozikowski A.P., Zhang J., Nan F., Petukhov P.A., Grajkowska E., Wroblewski J.T., Yamamoto T., Bzdega T., Wroblewska B., Neale J.H. Synthesis of Urea-Based Inhibitors as Active Site Probes of Glutamate Carboxypeptidase II: Efficacy as Analgesic Agents // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2004. T. 47, № 7. C. 1729–1738.
 53. Young J.D., Ma M.T., Eykyn T.R., Atkinson R.A., Abbate V., Cilibrizzi A., Hider R.C., Blower P.J. Dipeptide inhibitors of the prostate specific membrane antigen (PSMA): A comparison of urea and thiourea derivatives // *Bioorg Med Chem Lett. Pergamon*, 2021. T. 42. C. 128044.
 54. Dhumane N.R., Hussaini S.S., Dongre V.G., Shirsat M.D. Influence of glycine on the nonlinear optical (NLO) properties of zinc (tris) thiourea sulfate (ZTS) single crystal // *Opt Mater (Amst). North-Holland*, 2008. T. 31, № 2. C. 328–332.
 55. Krężel A., Maret W. The biological inorganic chemistry of zinc ions // *Arch Biochem Biophys. Academic Press*, 2016. T. 611. C. 3–19.
 56. Olszewski R.T., Bukhari N., Zhou J., Kozikowski A.P., Wroblewski J.T., Shamimi-Noori S., Wroblewska B., Bzdega T., Vicini S., Barton F.B., Neale J.H. NAAG peptidase inhibition

- reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR // *J Neurochem*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. T. 89, № 4. C. 876–885.
57. Zhou J., Neale J.H., Pomper M.G., Kozikowski A.P. NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy // *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group, 2005. T. 4, № 12. C. 1015–1026.
 58. Hillier S.M., Maresca K.P., Femia F.J., Marquis J.C., Foss C.A., Nguyen N., Zimmerman C.N., Barrett J.A., Eckelman W.C., Pomper M.G., Joyal J.L., Babich J.W. Preclinical Evaluation of Novel Glutamate-Urea-Lysine Analogues That Target Prostate-Specific Membrane Antigen as Molecular Imaging Pharmaceuticals for Prostate Cancer // *Cancer Res*. 2009. T. 69, № 17. C. 6932–6940.
 59. Tykvart J., Schimer J., Bařinková J., Pachl P., Pořtová-Slavětínská L., Majer P., Konvalinka J., Šácha P. Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCP II) inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery // *Bioorg Med Chem*. Elsevier Ltd, 2014. T. 22, № 15. C. 4099–4108.
 60. Tykvart J., Schimer J., Jančařík A., Bařinková J., Navrátil V., Starková J., Šřámková K., Konvalinka J., Majer P., Šácha P. Design of Highly Potent Urea-Based, Exosite-Binding Inhibitors Selective for Glutamate Carboxypeptidase II // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2015. T. 58, № 10. C. 4357–4363.
 61. Uspenskaya A.A., Nimenko E.A., Machulkin A.E., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. The Importance of Linkers in the Structure of PSMA Ligands // *Curr Med Chem*. Bentham Science Publishers Ltd., 2022. T. 29, № 2. C. 268–298.
 62. Leamon C.P., Parker M.A., Vlahov I.R., Xu L.-C., Reddy J.A., Vetzal M., Douglas N. Synthesis and Biological Evaluation of EC20: A New Folate-Derived, ^{99m}Tc-Based Radiopharmaceutical // *Bioconjug Chem*. American Chemical Society, 2002. T. 13, № 6. C. 1200–1210.
 63. Eder M., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Hull W.-E., Wängler C., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M. ⁶⁸Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging // *Bioconjug Chem*. 2012. T. 23, № 4. C. 688–697.
 64. Chen Y., Dhara S., Banerjee S.R., Byun Y., Pullambhatla M., Mease R.C., Pomper M.G. A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer // *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc., 2009. T. 390, № 3. C. 624–629.
 65. Ray Banerjee S., Pullambhatla M., Foss C.A., Falk A., Byun Y., Nimmagadda S., Mease R.C., Pomper M.G. Effect of Chelators on the Pharmacokinetics of ^{99m}Tc-Labeled Imaging Agents for the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2013. T. 56, № 15. C. 6108–6121.

66. Chen Y., Pullambhatla M., Banerjee. S.R., Byun Y., Stathis M., Rojas C., Slusher B.S., Mease R.C., Pomper M.G. Synthesis and Biological Evaluation of Low Molecular Weight Fluorescent Imaging Agents for the Prostate-Specific Membrane Antigen // *Bioconjug Chem.* 2012. T. 23, № 12. C. 2377–2385.
67. Zhang A.X., Murelli R.P., Barinka C., Michel J., Cocleaza A., Jorgensen W.L., Lubkowski J., Spiegel D.A. A Remote Arene-Binding Site on Prostate Specific Membrane Antigen Revealed by Antibody-Recruiting Small Molecules // *J Am Chem Soc. American Chemical Society*, 2010. T. 132, № 36. C. 12711–12716.
68. Yao X., Zha Z., Ploessl K., Choi S.R., Zhao R., Alexoff D., Zhu L., Kung H.F. Synthesis and evaluation of novel radioiodinated PSMA targeting ligands for potential radiotherapy of prostate cancer // *Bioorg Med Chem. Pergamon*, 2020. T. 28, № 5. C. 115319.
69. Zha Z., Ploessl K., Choi S.R., Wu Z., Zhu L., Kung H.F. Synthesis and evaluation of a novel urea-based ⁶⁸Ga-complex for imaging PSMA binding in tumor // *Nucl Med Biol. Elsevier*, 2018. T. 59. C. 36–47.
70. Green M.A., Hutchins G.D., Bahler C.D., Tann M., Mathias C.J., Territo W., Sims J., Polson H., Alexoff D., Eckelman W.C., Kung H.F., Fletcher J.W. [⁶⁸Ga]Ga-P16-093 as a PSMA-Targeted PET Radiopharmaceutical for Detection of Cancer: Initial Evaluation and Comparison with [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in Prostate Cancer Patients Presenting with Biochemical Recurrence // *Mol Imaging Biol. Springer*, 2020. T. 22, № 3. C. 752–763.
71. Cardinale J., Schäfer M., Benešová M., Bauder-Wüst U., Leotta K., Eder M., Neels O.C., Haberkorn U., Giesel F.L., Kopka K. Preclinical Evaluation of ¹⁸F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging // *Journal of Nuclear Medicine*. 2017. T. 58, № 3. C. 425–431.
72. Giesel F.L., Hadaschik B., Cardinale J., Radtke J., Vinsensia M., Lehnert W., Kesch C., Tolstov Y., Singer S., Grabe N., Duensing S., Schäfer M., Neels O.C., Mier W., Haberkorn U., Kopka K., Kratochwil C. F-18 labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients // *Eur J Nucl Med Mol Imaging. Springer Berlin*, 2017. T. 44, № 4. C. 678–688.
73. Umbricht C.A., Benešová M., Schmid R.M., Türlér A., Schibli R., van der Meulen N.P., Müller C. ⁴⁴Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ¹⁷⁷Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with ⁶⁸Ga-PSMA-11 and ⁶⁸Ga-PSMA-617 // *EJNMMI Res.* 2017. T. 7, № 1. C. 9.
74. Benešová M., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Afshar-Oromieh A., Kratochwil C., Mier W., Haberkorn U., Kopka K., Eder M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and

- Endoradiotherapy of Prostate Cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2015. T. 56, № 6. C. 914–920.
75. Eppard E., de la Fuente A., Benešová M., Khawar A., Bundschuh R.A., Gärtner F.C., Kreppel B., Kopka K., Essler M., Rösch F. Clinical Translation and First In-Human Use of [⁴⁴Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2017. T. 7, № 18. C. 4359–4369.
 76. Kularatne S.A., Venkatesh C., Santhapuram H.-K.R., Wang K., Vaitilingam B., Henne W.A., Low P.S. Synthesis and Biological Analysis of Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Anticancer Prodrugs // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2010. T. 53, № 21. C. 7767–7777.
 77. Weineisen M., Simecek J., Schottelius M., Schwaiger M., Wester H.-J. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer // *EJNMMI Res*. EJNMMI Res, 2014. T. 4, № 1. C. 63.
 78. Weineisen M., Schottelius M., Simecek J., Baum R.P., Yildiz A., Beykan S., Kulkarni H.R., Lassmann M., Klette I., Eiber M., Schwaiger M., Wester H.-J. ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies // *Journal of Nuclear Medicine*. Society of Nuclear Medicine, 2015. T. 56, № 8. C. 1169–1176.
 79. Schuchardt C., Zhang J., Kulkarni H.R., Chen X., Müller D., Baum R.P. Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy Using ¹⁷⁷Lu-PSMA I&T and ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Comparison of Safety, Biodistribution, and Dosimetry // *Journal of Nuclear Medicine*. Society of Nuclear Medicine, 2022. T. 63, № 8. C. 1199–1207.
 80. Ling S. wai, de Lussanet de la Sablonière Q., Ananta M., de Blois E., Koolen S.L.W., Drexhage R.C., Hofland J., Robbrecht D.G.J., van der Veldt A.A.M., Verburg F.A., Brabander T. First real-world clinical experience with [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer beyond VISION and TheraP criteria // *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Springer, 2025. T. 52, № 6. C. 2034–2040.
 81. Robu S., Schottelius M., Eiber M., Maurer T., Gschwend J., Schwaiger M., Wester H.-J. Preclinical Evaluation and First Patient Application of ^{99m}Tc-PSMA-I&S for SPECT Imaging and Radioguided Surgery in Prostate Cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2017. T. 58, № 2. C. 235–242.
 82. Uspenskaya A.A., Nimenko E.A., Shafikov R.R., Zyk N.Y., Evteev S.A., Dashkova N.S., Ivanenkov Y.A., Majouga A.G., Skvortsov D.A., Garanina A.S., Beloglazkina E.K., Machulkin A.E. Optimization of the dipeptide motifs in the PSMA ligands linker structure:

- synthesis and in vitro evaluation // *Medicinal Chemistry Research*. Springer, 2023. T. 32, № 1. C. 32–37.
83. Uspenskaya A.A., Machulkin A.E., Nimenko E.A., Shafikov R.R., Petrov S.A., Skvortsov D.A., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. Influence of the dipeptide linker configuration on the activity of PSMA ligands // *Mendeleev Communications*. Elsevier Ltd, 2020. T. 30, № 6. C. 756–759.
 84. 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., Vorobyeva 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 // *Bioorg Med Chem Lett*. Elsevier Ltd, 2019. T. 29, № 10. C. 1246–1255.
 85. Machulkin A.E., Skvortsov D.A., Ivanenkov Y.A., Ber A.P., Kavalchuk M. V., Aladinskaya A. V., Uspenskaya A.A., Shafikov R.R., Plotnikova E.A., Yakubovskaya R.I., Nimenko E.A., Zyk N.U., Beloglazkina E.K., Zyk N. V., Koteliansky V.E., Majouga A.G. Synthesis and biological evaluation of PSMA-targeting paclitaxel conjugates // *Bioorg Med Chem Lett*. Elsevier Ltd, 2019. T. 29, № 16. C. 2229–2235.
 86. Duan X., Liu F., Kwon H., Byun Y., Minn I., Cai X., Zhang J., Pomper M.G., Yang Z., Xi Z., Yang X. (*S*)-3-(Carboxyformamido)-2-(3-(carboxymethyl)ureido)propanoic Acid as a Novel PSMA Targeting Scaffold for Prostate Cancer Imaging // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2020. T. 63, № 7. C. 3563–3576.
 87. Wang X., Chen Y., Xiong Y., Zhang L., Wang B., Liu Y., Cui M. Design and Characterization of Squaramic Acid-Based Prostate-Specific Membrane Antigen Inhibitors for Prostate Cancer // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2023. T. 66, № 10. C. 6889–6904.
 88. Murelli R.P., Zhang A.X., Michel J., Jorgensen W.L., Spiegel D.A. Chemical Control over Immune Recognition: A Class of Antibody-Recruiting Small Molecules That Target Prostate Cancer // *J Am Chem Soc*. American Chemical Society, 2009. T. 131, № 47. C. 17090–17092.
 89. Zhou H., Liu Y., Zhang X., Chen K., Li Y., Xu X., Xu B. A Preliminary Study of PSMA Fluorescent Probe for Targeted Fluorescence Imaging of Prostate Cancer // *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. T. 27, № 9. C. 2736.
 90. Gade N.R., Kaur J., Bhardwaj A., Ebrahimi E., Dufour J., Wuest M., Wuest F. *N* -Alkyl Carbamoylimidazoles as Versatile Synthons for the Synthesis of Urea-Based PSMA

- Inhibitors // ACS Med Chem Lett. American Chemical Society, 2023. T. 14, № 7. C. 943–948.
91. Kapcan E., Lake B., Yang Z., Zhang A., Miller M.S., Rullo A.F. Covalent Stabilization of Antibody Recruitment Enhances Immune Recognition of Cancer Targets // Biochemistry. American Chemical Society, 2021. T. 60, № 19. C. 1447–1458.
 92. Wang L., Tang L., Liu Y., Wu H., Liu Z., Li J., Pan Y., Akkaya E.U. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) targeted singlet oxygen delivery *via* endoperoxide tethered ligands // Chemical Communications. The Royal Society of Chemistry, 2022. T. 58, № 12. C. 1902–1905.
 93. Hensbergen A.W., Buckle T., van Willigen D.M., Schottelius M., Welling M.M., van der Wijk F.A., Maurer T., van der Poel H.G., van der Pluijm G., van Weerden W.M., Wester H.-J., van Leeuwen F.W.B. Hybrid Tracers Based on Cyanine Backbones Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen: Tuning Pharmacokinetic Properties and Exploring Dye–Protein Interaction // Journal of Nuclear Medicine. 2020. T. 61, № 2. C. 234–241.
 94. Khan T.H., Eno-Amooquaye E.A., Searle F., Browne P.J., Osborn H.M.I., Burke P.J. Novel Inhibitors of Carboxypeptidase G₂ (CPG₂): Potential Use in Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy // J Med Chem. American Chemical Society, 1999. T. 42, № 6. C. 951–956.
 95. Greene's Protective Groups in Organic Synthesis / под ред. Wuts P.G.M. Wiley, 2014.
 96. Chen Y., Foss C.A., Byun Y., Nimmagadda S., Pullambhatla M., Fox J.J., Castanares M., Lupold S.E., Babich J.W., Mease R.C., Pomper M.G. Radiohalogenated Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Based Ureas as Imaging Agents for Prostate Cancer // J Med Chem. American Chemical Society, 2008. T. 51, № 24. C. 7933–7943.
 97. Cai P., Tang S., Xia L., Wang Y., Liu Y., Feng Y., Liu N., Chen Y., Zhou Z. Improve the Biodistribution with Bulky and Lipophilic Modification Strategies on Lys-Urea-Glu-Based PSMA-Targeting Radiotracers // Mol Pharm. American Chemical Society, 2023. T. 20, № 2. C. 1435–1446.
 98. Liu Y., Xia L., Li H., Cai P., Tang S., Feng Y., Liu G., Chen Y., Liu N., Zhang W., Zhou Z. Exploring the impact of PEGylation on pharmacokinetics: a size-dependent effect of polyethylene glycol on prostate-specific membrane antigen inhibitors // EJNMMI Res. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2024. T. 14, № 1. C. 15.
 99. Ray Banerjee S., Chen Z., Pullambhatla M., Lisok A., Chen J., Mease R.C., Pomper M.G. Preclinical Comparative Study of ⁶⁸Ga-Labeled DOTA, NOTA, and HBED-CC Chelated Radiotracers for Targeting PSMA // Bioconjug Chem. American Chemical Society, 2016. T. 27, № 6. C. 1447–1455.

100. Banerjee S.R., Foss C.A., Castanares M., Mease R.C., Byun Y., Fox J.J., Hilton J., Lupold S.E., Koziowski A.P., Pomper M.G. Synthesis and Evaluation of Technetium-99m- and Rhenium-Labeled Inhibitors of the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2008. T. 51, № 15. C. 4504–4517.
101. Kumar K.S.A., Mathur A. A convenient total synthesis of PSMA-617: A prostate specific membrane antigen (PSMA) ligand for prostate cancer endotherapeutic applications // *European Journal of Medicinal Chemistry Reports. Elsevier Masson*, 2022. T. 6. C. 100084.
102. Benešová M., Bauder-Wüst U., Schäfer M., Klika K.D., Mier W., Haberkorn U., Kopka K., Eder M. Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors // *J Med Chem*. 2016. T. 59, № 5. C. 1761–1775.
103. Liolios C., Schäfer M., Haberkorn U., Eder M., Kopka K. Novel Bispecific PSMA/GRPr Targeting Radioligands with Optimized Pharmacokinetics for Improved PET Imaging of Prostate Cancer // *Bioconjug Chem. American Chemical Society*, 2016. T. 27, № 3. C. 737–751.
104. Lundmark F., Olanders G., Rinne S.S., Abouzayed A., Orlova A., Rosenström U. Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Optimised PSMA-Targeting Radioligands // *Pharmaceutics. MDPI*, 2022. T. 14, № 5. C. 1098.
105. Tsuchihashi S., Nakashima K., Tarumizu Y., Ichikawa H., Jinda H., Watanabe H., Ono M. Development of Novel $^{111}\text{In}/^{225}\text{Ac}$ -Labeled Agent Targeting PSMA for Highly Efficient Cancer Radiotheranostics // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2023. T. 66, № 12. C. 8043–8053.
106. Mattana F., Muraglia L., Barone A., Colandrea M., Saker Diffalah Y., Provera S., Cascio A.S., Omodeo Salè E., Ceci F. Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Therapy in Prostate Cancer: History, Combination Therapies, Trials, and Future Perspective // *Cancers (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2024. T. 16, № 9. C. 1643.
107. Zhao J., Guercio B.J., Sahasrabudhe D. Current Trends in Chemotherapy in the Treatment of Metastatic Prostate Cancer // *Cancers (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. T. 15, № 15. C. 3969.
108. Chen K., O'Brien J., McVey A., Jenjitrant P., Kelly B.D., Kasivisvanathan V., Lawrentschuk N., Murphy D.G., Azad A.A. Combination treatment in metastatic prostate cancer: is the bar too high or have we fallen short? // *Nat Rev Urol. Nature Research*, 2023. T. 20, № 2. C. 116–123.
109. Posdich P., Darr C., Hilser T., Wahl M., Herrmann K., Hadaschik B., Grünwald V. Metastatic Prostate Cancer—A Review of Current Treatment Options and Promising New

- Approaches // *Cancers* (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. T. 15, № 2. C. 461.
110. Zhao J., Tang B., Shen P., Zeng H., Wei Q. Empowering PARP inhibition through rational combination: Mechanisms of PARP inhibitors and combinations with a focus on the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer // *Crit Rev Oncol Hematol*. Elsevier, 2025. T. 210. C. 104698.
 111. Wallis C.J.D., Klaassen Z., Bhindi B., Goldberg H., Chandrasekar T., Farrell A.M., Boorjian S.A., Kulkarni G.S., Karnes R.J., Satkunasivam R. Comparison of Abiraterone Acetate and Docetaxel with Androgen Deprivation Therapy in High-risk and Metastatic Hormone-naïve Prostate Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis // *Eur Urol*. 2018. T. 73, № 6. C. 834–844.
 112. Tan P.S., Aguiar P., Haaland B., Lopes G. Addition of abiraterone, docetaxel, bisphosphonate, celecoxib or combinations to androgen-deprivation therapy (ADT) for metastatic hormone-sensitive prostate cancer (mHSPC): a network meta-analysis // *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018. T. 21, № 4. C. 516–523.
 113. Blagden S.P., Molife L.R., Seebaran A., Payne M., Reid A.H.M., Protheroe A.S., Vasist L.S., Williams D.D., Bowen C., Kathman S.J., Hodge J.P., Dar M.M., de Bono J.S., Middleton M.R. A phase I trial of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, with docetaxel in patients with advanced solid tumours // *Br J Cancer*. Nature Publishing Group, 2008. T. 98, № 5. C. 894–899.
 114. Fleming M.T., Rathkopf D.E., Gibbons J., Peterson A.C., Hannah A., Forer D., Scher H.I., Morris M.J. Enzalutamide in combination with docetaxel in men with prostate cancer (PC): Preliminary results from a phase I study. // *Journal of Clinical Oncology*. 2013. T. 31, № 6_suppl. C. 63–63.
 115. Morris M.J., Rathkopf D.E., Novotny W., Gibbons J.A., Peterson A.C., Khondker Z., Ouatas T., Scher H.I., Fleming M.T. Phase Ib Study of Enzalutamide in Combination with Docetaxel in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer // *Clinical Cancer Research*. 2016. T. 22, № 15. C. 3774–3781.
 116. Chou T.-C., Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem // *Trends Pharmacol Sci*. Elsevier, 1983. T. 4. C. 450–454.
 117. Chou T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method // *Cancer Res*. 2010. T. 70, № 2. C. 440–446.
 118. Xiaodan S., Ying C. Role of ginsenoside Rh2 in tumor therapy and tumor microenvironment immunomodulation // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier Masson, 2022. T. 156. C. 113912.

119. Guan W., Qi W. Ginsenoside Rh2: A shining and potential natural product in the treatment of human nonmalignant and malignant diseases in the near future // *Phytomedicine*. Urban & Fischer, 2023. T. 118. C. 154938.
120. Xie X., Eberding A., Madera C., Fazli L., Jia W., Goldenberg L., Gleave M., Guns E.S. Rh2 Synergistically Enhances Paclitaxel or Mitoxantrone in Prostate Cancer Models // *Journal of Urology*. Wolters KluwerPhiladelphia, PA, 2006. T. 175, № 5. C. 1926–1931.
121. Chao O.S., Goodman O.B. Synergistic Loss of Prostate Cancer Cell Viability by Coinhibition of HDAC and PARP // *Molecular Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 2014. T. 12, № 12. C. 1755–1766.
122. Wang Z., Dai Z., Wang B., Gao Y., Gao X., Wang L., Zhou S., Yang L., Qiu X., Liu Z. Targeting c-MET to Enhance the Efficacy of Olaparib in Prostate Cancer // *Onco Targets Ther*. Dove Press, 2021. T. 14. C. 4383–4389.
123. Cumaoglu A., Akdeniz S.N., Karzoon A., Alaama M., Yerer M.B. Effects of empagliflozin and its combination with docetaxel on LNCaP and DU- 145 prostate cancer cell lines: cytotoxicity and molecular pathway analysis // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2025. C. 1–13.
124. Scafoglio C., Hirayama B.A., Kepe V., Liu J., Ghezzi C., Satyamurthy N., Moatamed N.A., Huang J., Koepsell H., Barrio J.R., Wright E.M. Functional expression of sodium-glucose transporters in cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 2015. T. 112, № 30. C. E4111–E4119.
125. Sokol M.B., Nikolskaya E.D., Yabbarov N.G., Zenin V.A., Faustova M.R., Belov A. V., Zhunina O.A., Mollaev M.D., Zabolotsky A.I., Tereshchenko O.G., Severin E.S. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019. T. 107, № 4. C. 1150–1158.
126. Li K., Zhan W., Chen Y., Jha R.K., Chen X. Docetaxel and Doxorubicin Codelivery by Nanocarriers for Synergistic Treatment of Prostate Cancer // *Front Pharmacol*. 2019. T. 10.
127. Nakajima R. Targeted Therapy for Prostate Cancer by Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Small-Molecule Drug Conjugates // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. The Pharmaceutical Society of Japan, 2024. T. 72, № 2. C. c23-00535.
128. Bargh J.D., Isidro-Llobet A., Parker J.S., Spring D.R. Cleavable linkers in antibody–drug conjugates // *Chem Soc Rev*. The Royal Society of Chemistry, 2019. T. 48, № 16. C. 4361–4374.

129. Su Z., Xiao D., Xie F., Liu L., Wang Y., Fan S., Zhou X., Li S. Antibody–drug conjugates: Recent advances in linker chemistry // *Acta Pharm Sin B*. Elsevier, 2021. T. 11, № 12. C. 3889–3907.
130. Canada A.T., Roberson K.M., Vessella R.L., Trump D.L., Robertson C.N., Fine R.L. Glutathione and glutathione S-transferase in benign and malignant prostate cell lines and prostate tissues // *Biochem Pharmacol*. Elsevier, 1996. T. 51, № 1. C. 87–90.
131. Pillow T.H., Sadowsky J.D., Zhang D., Yu S.-F., Del Rosario G., Xu K., He J., Bhakta S., Ohri R., Kozak K.R., Ha E., Junutula J.R., Flygare J.A. Decoupling stability and release in disulfide bonds with antibody-small molecule conjugates // *Chem Sci*. The Royal Society of Chemistry, 2017. T. 8, № 1. C. 366–370.
132. Roy J., Nguyen T.X., Kanduluru A.K., Venkatesh C., Lv W., Reddy P.V.N., Low P.S., Cushman M. DUPA Conjugation of a Cytotoxic Indenoisoquinoline Topoisomerase I Inhibitor for Selective Prostate Cancer Cell Targeting // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2015. T. 58, № 7. C. 3094–3103.
133. Leamon C.P., Reddy J.A., Bloomfield A., Dorton R., Nelson M., Vetzal M., Kleindl P., Hahn S., Wang K., Vlahov I.R. Prostate-Specific Membrane Antigen-Specific Antitumor Activity of a Self-Immolative Tubulysin Conjugate // *Bioconjug Chem*. Bioconjug Chem, 2019. T. 30, № 6. C. 1805–1813.
134. Morris M., Vogelzang N.J., Sartor O., Armour A., Groaning M., Messmann R., Robarts A., Petrylak D.P., Tolcher A., Gordon M.S., Babiker H. Phase 1 study of the PSMA-targeted small-molecule drug conjugate EC1169 in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) // *Annals of Oncology*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2017. T. 28, № 15_suppl. C. v273.
135. Lv Q., Yang J., Zhang R., Yang Z., Yang Z., Wang Y., Xu Y., He Z. Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Therapy of Prostate Cancer Using a DUPA–Paclitaxel Conjugate // *Mol Pharm*. American Chemical Society, 2018. T. 15, № 5. C. 1842–1852.
136. Obara T., Kawano N., Tatsumi K., Katsuyama A., Nakajima K., Ogawa M., Ichikawa S. Development of small molecule–drug conjugates based on derivatives of natural proteasome inhibitors that exhibit selectivity for PSMA-expressing cancer cells // *Bioorg Med Chem*. Pergamon, 2024. T. 108. C. 117773.
137. Lee S., Lee Y., Kim H., Lee D.Y., Jon S. Bilirubin Nanoparticle-Assisted Delivery of a Small Molecule-Drug Conjugate for Targeted Cancer Therapy // *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 2018. T. 19, № 6. C. 2270–2277.
138. Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Zyk N.Y., Nimenko E.A., Ber A.P., Petrov S.A., Shafikov R.R., Skvortsov D.A., Smirnova G.B., Borisova Y.A., Pokrovsky V.S.,

- Kolmogorov V.S., Vaneev A.N., Ivanenkov Y.A., Khudyakov A.D., Kovalev S. V., Erofeev A.S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E.K., Zyk N. V., Khazanova E.S., Majouga A.G. PSMA-targeted small-molecule docetaxel conjugate: Synthesis and preclinical evaluation // *Eur J Med Chem. Elsevier Masson*, 2022. T. 227. C. 113936.
139. Machulkin A.E., Nimenko E.A., Zyk N.U., Uspenskaia A.A., Smirnova G.B., Khan I.I., Pokrovsky V.S., Vaneev A.N., Timoshenko R. V., Mamed-Nabizade V. V., Zavertkina M. V., Erofeev A., Gorelkin P., Majouga A.G., Zyk N. V., Khazanova E.S., Beloglazkina E.K. Synthesis and Preclinical Evaluation of Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Abiraterone Conjugate // *Molecules. MDPI*, 2022. T. 27, № 24. C. 8795.
 140. Peng S., Li H., Cui W., Xiong T., Hu J., Qi H., Lin S., Wu D., Ji M., Xu H. Design, synthesis and biological evaluation of a novel PSMA–PI3K small molecule drug conjugate // *RSC Med Chem. RSC*, 2024. T. 15, № 10. C. 3485–3494.
 141. Chen Q., Wu Z., Zhu H., Zhang X., Yu Y., Chen W. A Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeting Small Molecule–Drug Conjugate Strategy to Overcome the Hematological Toxicity of Olaparib // *J Med Chem. American Chemical Society*, 2024. T. 67, № 21. C. 19586–19611.
 142. Borré E., Dahm G., Guichard G., Bellemin-Lapponnaz S. Post-functionalization of platinum–NHC complexes by oxime ligation for ligand targeted therapy // *New Journal of Chemistry. The Royal Society of Chemistry*, 2016. T. 40, № 4. C. 3164–3171.
 143. Lahnif H., Grus T., Salvanou E.-A., Deligianni E., Stellas D., Bouziotis P., Rösch F. Old Drug, New Delivery Strategy: MMAE Repackaged // *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2023. T. 24, № 10. C. 8543.
 144. Wang X., Shirke A., Walker E., Sun R., Ramamurthy G., Wang J., Shan L., Mangadlao J., Dong Z., Li J., Wang Z., Schluchter M., Luo D., Wang Y., Stauffer S., Brady-Kalnay S., Hoimes C., Lee Z., Basilion J.P. Small Molecule-Based Prodrug Targeting Prostate Specific Membrane Antigen for the Treatment of Prostate Cancer // *Cancers (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021. T. 13, № 3. C. 417.
 145. Kim E., Jung Y., Choi H., Yang J., Suh J.-S., Huh Y.-M., Kim K., Haam S. Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex // *Biomaterials*. 2010. T. 31, № 16. C. 4592–4599.
 146. Hattori Y., Maitani Y. Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer // *Journal of Controlled Release*. 2004. T. 97, № 1. C. 173–183.

147. Hattori Y., Maitani Y. Folate-linked nanoparticle-mediated suicide gene therapy in human prostate cancer and nasopharyngeal cancer with herpes simplex virus thymidine kinase // *Cancer Gene Ther.* 2005. T. 12, № 10. C. 796–809.
148. Baranski A.-C., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Roscher M., Schmidt J., Stenau E., Simpfendorfer T., Teber D., Maier-Hein L., Hadaschik B., Haberkorn U., Eder M., Kopka K. PSMA-11-Derived Dual-Labeled PSMA Inhibitors for Preoperative PET Imaging and Precise Fluorescence-Guided Surgery of Prostate Cancer // *Journal of Nuclear Medicine.* 2018. T. 59, № 4. C. 639–645.
149. Eder M., Wängler B., Knackmuss S., LeGall F., Little M., Haberkorn U., Mier W., Eisenhut M. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for ^{68}Ga -labeled small recombinant antibodies // *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008. T. 35, № 10. C. 1878–1886.
150. Schäfer M., Bauder-Wüst U., Leotta K., Zoller F., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M., Eder M. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ^{68}Ga -PET imaging of prostate cancer // *EJNMMI Res.* Springer Verlag, 2012. T. 2, № 1. C. 23.
151. Kommidi H., Guo H., Nurili F., Vedvyas Y., Jin M.M., McClure T.D., Ehdaie B., Sayman H.B., Akin O., Aras O., Ting R. ^{18}F -Positron Emitting/Trimethine Cyanine-Fluorescent Contrast for Image-Guided Prostate Cancer Management: rapid-communication // *J Med Chem.* American Chemical Society, 2018. T. 61, № 9. C. 4256–4262.
152. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters // *Bioconjug Chem.* American Chemical Society, 1993. T. 4, № 2. C. 105–111.
153. Lopalco M., Koini E.N., Cho J.K., Bradley M. Catch and release microwave mediated synthesis of cyanine dyes // *Org Biomol Chem.* Royal Society of Chemistry, 2009. T. 7, № 5. C. 856.
154. Banerjee S.R., Pullambhatla M., Byun Y., Nimmagadda S., Foss C.A., Green G., Fox J.J., Lupold S.E., Mease R.C., Pomper M.G. Sequential SPECT and Optical Imaging of Experimental Models of Prostate Cancer with a Dual Modality Inhibitor of the Prostate-Specific Membrane Antigen // *Angewandte Chemie International Edition.* 2011. T. 50, № 39. C. 9167–9170.
155. Schottelius M., Wurzer A., Wissmiller K., Beck R., Koch M., Gorpas D., Notni J., Buckle T., van Oosterom M.N., Steiger K., Ntziachristos V., Schwaiger M., van Leeuwen F.W.B., Wester H.-J. Synthesis and Preclinical Characterization of the PSMA-Targeted Hybrid

- Tracer PSMA-I&F for Nuclear and Fluorescence Imaging of Prostate Cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2019. T. 60, № 1. C. 71–78.
156. Morris M.J., Rowe S.P., Gorin M.A., Saperstein L., Pouliot F., Josephson D., Wong J.Y.C., Pantel A.R., Cho S.Y., Gage K.L., Piert M., Iagaru A., Pollard J.H., Wong V., Jensen J., Lin T., Stambler N., Carroll P.R., Siegel B.A. Diagnostic Performance of ¹⁸F-DCFPyL-PET/CT in Men with Biochemically Recurrent Prostate Cancer: Results from the CONDOR Phase III, Multicenter Study // *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 2021. T. 27, № 13. C. 3674–3682.
 157. Hishikawa K., Nakagawa H., Furuta T., Fukuhara K., Tsumoto H., Suzuki T., Miyata N. Photoinduced Nitric Oxide Release from a Hindered Nitrobenzene Derivative by Two-Photon Excitation // *J Am Chem Soc*. American Chemical Society, 2009. T. 131, № 22. C. 7488–7489.
 158. Fürer R., Geiger M. A simple method of determining the aqueous solubility of organic substances // *Pestic Sci*. John Wiley & Sons, Ltd, 1977. T. 8, № 4. C. 337–344.
 159. Tong S., Chu C., Wei Y., Wang L., Gao X., Xu X., Yu J. Preparation and effects of 2,3-dehydrosilymarin, a promising and potent antioxidant and free radical scavenger // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Oxford Academic, 2011. T. 63, № 2. C. 238–244.
 160. Petrov S.A., Machulkin A.E., Petrov R.A., Tavgorkin A.N., Bondarenko G.N., Legkov S.A., Nifant'ev I.E., Dolzhikova V.D., Zyk N. V., Majouga A.G., Beloglazkina E.K. Synthesis and organogelating behaviour of urea- and Fmoc-containing diphenylalanine based hexaamide // *J Mol Struct*. Elsevier, 2021. T. 1234. C. 130127.
 161. Wodtke R., Pietzsch J., Löser R. Solid-Phase Synthesis of Selectively Mono-Fluorobenz(o)ylated Polyamines as a Basis for the Development of ¹⁸F-Labeled Radiotracers // *Molecules*. Molecules, 2021. T. 26, № 22. C. 7012.
 162. Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F. Amino Acid-Protecting Groups // *Chem Rev*. American Chemical Society, 2009. T. 109, № 6. C. 2455–2504.
 163. Liu K., Li M., Li Y., Li Y., Chen Z., Tang Y., Yang M., Deng G., Liu H. A review of the clinical efficacy of FDA-approved antibody–drug conjugates in human cancers // *Mol Cancer*. BioMed Central, 2024. T. 23, № 1. C. 62.
 164. Goldmacher V.S., Chittenden T., Chari R.V.J., Kovtun Y. V., Lambert J.M. Antibody–Drug Conjugates for Targeted Cancer Therapy // *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press, 2012. T. 47. C. 349–366.
 165. Senter P.D., Sievers E.L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma // *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group, 2012. T. 30, № 7. C. 631–637.

166. El-Nassan H.B. Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents // *Eur J Med Chem. Elsevier Masson*, 2013. T. 62. C. 614–631.
167. Garcia-Saez I., Skoufias D.A. Eg5 targeting agents: From new anti-mitotic based inhibitor discovery to cancer therapy and resistance // *Biochem Pharmacol. Elsevier*, 2021. T. 184. C. 114364.
168. Purcell J.W., Davis J., Reddy M., Martin S., Samayoa K., Vo H., Thomsen K., Bean P., Kuo W.L., Ziyad S., Billig J., Feiler H.S., Gray J.W., Wood K.W., Cases S. Activity of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor Ispinesib (SB-715992) in Models of Breast Cancer // *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research*, 2010. T. 16, № 2. C. 566–576.
169. Bregante J., Schönbichler A., Pölöske D., Degenfeld-Schonburg L., Monzó Contreras G., Hadzijušufovic E., de Araujo E.D., Valent P., Moriggl R., Orlova A. Efficacy and Synergy of Small Molecule Inhibitors Targeting FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia // *Cancers (Basel). MDPI*, 2021. T. 13, № 24. C. 6181.
170. Evans M.J., Smith-Jones P.M., Wongvipat J., Navarro V., Kim S., Bander N.H., Larson S.M., Sawyers C.L. Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets prostate-specific membrane antigen // *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences*, 2011. T. 108, № 23. C. 9578–9582.
171. Wishart D.S., Bigam C.G., Yao J., Abildgaard F., Dyson H.J., Oldfield E., Markley J.L., Sykes B.D. ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR // *J Biomol NMR. Kluwer Academic Publishers*, 1995. T. 6, № 2. C. 135–140.
172. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister Geerten W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J Biomol NMR. ESCOM Science Publishers B.V., Leiden/Kluwer Academic Publishers*, 1995. T. 6, № 3. C. 277–293.
173. Lee W., Tonelli M., Markley J.L. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy // *Bioinformatics. Oxford Academic*, 2015. T. 31, № 8. C. 1325–1327.
174. Tietze L. F. E.T. *Preparative Organic Chemistry (in Rus)*. Mir, Moscow, Russia., 1999.
175. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods. J Immunol Methods*, 1983. T. 65, № 1–2. C. 55–63.