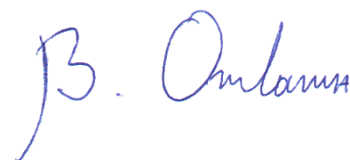


На правах рукописи



Отвагин Василий Федорович

**СИНТЕЗ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ
КОНЬЮГАТОВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ
ПРИРОДНЫХ ХЛОРИНОВ**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2020

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского»

Научный руководитель: **Федоров Алексей Юрьевич**
доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

**Официальные
оппоненты:** **Федорова Ольга Анатольевна**
Доктор химических наук, профессор, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук

Вацадзе Сергей Зурабович
Доктор химических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией супрамолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «23» декабря 2020 года в 14-00 часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.130.02 на базе Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и Института металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН по адресу: 603950, Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2020/1056/diss-Otvagin-1056.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года

Учёный секретарь диссертационного совета,



А.В. Гущин, доктор химических наук, профессор

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Онкологические заболевания на сегодняшний день являются острой социальной проблемой и по данным ВОЗ находятся на втором месте в мире среди причин смертности. Только в 2018 году рак был причиной гибели 9.6 миллионов жизней. При этом еще в 2012 году цифра смертности составляла 8.2 миллиона случаев, что говорит о прогрессирующем характере этой проблемы.

До сих не существует универсального высокоэффективного способа терапии опухолевых заболеваний. На данный момент наибольшее распространение нашли химиотерапия, лучевая и фотодинамическая терапия.

Фотодинамическая терапия — это минимально инвазивный способ лечения онкологических заболеваний, основанный на введении в организм пациента фотоактивных соединений (фотосенсибилизаторов) с их последующей активацией излучением видимой области спектра. Основным достоинством фотодинамической терапии является низкая системная токсичность, высокая направленность действия и активация иммунного противоопухолевого ответа.

На сегодняшний день использование фотосенсибилизаторов все еще сильно лимитировано и показано только для применения при опухолях простаты, молочной железы, шейки матки, кожи, головы и шеи, легких и мочевого пузыря. Основные недостатки применяемых в клинической практике препаратов связаны с низкой эффективностью накопления в опухолевых клетках, что, в свою очередь, может приводить к развитию нежелательной фототоксичности. Кроме этого, фотосенсибилизаторы лишены собственного цитотоксического действия в отсутствие света и не способны бороться с опухолевыми клетками, не попавшими в радиус светового облучения. Таким образом, при наличии метастазирующих опухолевых заболеваний, имеющих множественные очаги поражения, применение фотосенсибилизаторов сильно затруднено.

Ещё один недостаток большинства препаратов фотодинамической терапии связан с их высокой липофильностью, затрудняющей приготовление растворов для внутривенного введения.

В настоящее время наиболее динамично развивающейся областью по созданию новых препаратов для фотодинамической терапии является разработка мультимодальных конъюгированных соединений. Подобные агенты, помимо фотоактивной части, содержат в себе различные векторные и/или цитотоксические фрагменты. Использование такого подхода позволяет модифицировать активность исходного фотосенсибилизатора с целью улучшения его фармакологических показателей. Кроме этого, конъюгирование с гидрофильными производными позволяет настраивать амфифильность получаемых соединений.

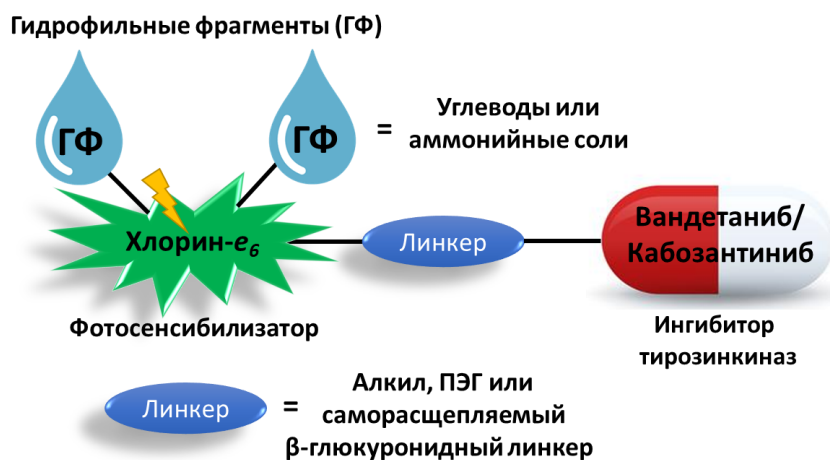
Особенно эффективными показали себя конъюгированные агенты на основе фотосенсибилизаторов, связанных с цитостатиками. В таких соединениях

цитостатик в большинстве случаев позволяет: 1) избирательно доставлять конъюгат к опухолевым клеткам в результате связывания с клеточными мишенями; 2) увеличивать общую противоопухолевую активность за счёт собственных механизмов ингибирования клеточной пролиферации. Для связывания разнонаправленных частей могут быть использованы ферментативно-расщепляемые линкеры, обеспечивающие высвобождение терапевтических фрагментов преимущественно в опухолевых тканях под действием различных внешних или внутренних факторов (действие ферментов, pH среды, световое облучение и др.).

Степень разработанности темы.

В последние десятилетия разработка мультимодальных фотосенсибилизаторов является одной из наиболее быстроразвивающихся областей фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Это стало, во многом, возможно благодаря созданию универсальных и доступных методов синтеза конъюгированных соединений (например, CuAAC-реакция). На сегодняшний момент были получены конъюгаты фотосенсибилизаторов с разнообразными металлосодержащими цитостатиками, ингибиторами клеточных белков, антагонистами эстрогена, интеркаляторами ДНК и тубулин-связывающими агентами. Однако до сих пор известны лишь некоторые примеры успешного создания таких мультимодальных производных, которые были бы способны обеспечивать эффективную терапию опухолевых заболеваний. Наибольший вклад в развитие этой области внесли Ёнджэ Ю (*Youngjae You*) из Университета Оклахомы (США), Цзинь-Пин Сюэ (*Jin Ping Xue*) из университета Фучжоу (Китай) и Равиндра Панди (*Ravindra Pandey*) из Института рака Розуэлл Парка (США).

Целью диссертационного исследования является разработка методов синтеза новых конъюгированных соединений на основе производных фотосенсибилизатора хлорина- e_6 , связанного с цитостатиками-ингибиторами тирозинкиназ (вандетаниб или кабозантиниб) и содержащего гидрофильные фрагменты:



В качестве прекурсора хлориновой части использован метилфеофорбид- a , который выделен из возобновляемых природных источников. Были получены

различные структурные блоки на основе цинковых, палладиевых или индиевых металлокомплексов хлорина-*e*₆, а также синтезированы функционализированные производные препаратов вандетаниб и кабозантиниб. С применением реакций амидирования/этерификации, а также реакции *CuAAC*, на основе созданных блоков было получено 8 новых конъюгированных соединений, отличающихся строением линкера, наличием катионных или углеводных остатков, типом цитостатика. В качестве линкера были использованы алкильные, ПЭГ фрагменты или ферментативно-расщепляемый β -глюкуронидный линкер. Модификация водорастворимости была осуществлена путем введения углеводных или аммонийных остатков. Для новых конъюгированных молекул были определены ключевые фотофизические характеристики. Противоопухолевая активность конъюгатов изучена *in vivo* и *in vitro*.

Таким образом, настоящая диссертационная работа посвящена: 1) разработке новых подходов синтеза конъюгированных соединений на основе хлорина-*e*₆ и цитостатиков вандетаниба или кабозантиниба; 2) определению фотофизических характеристик полученных соединений и их *in vivo/in vitro* противоопухолевой активности.

Научная новизна

1. Разработаны и реализованы подходы по созданию новых конъюгированных соединений на основе полученных из природных возобновляемых источников (сине-зеленые водоросли, шпинат) хлориновых фотосенсибилизаторов, связанных с цитостатиками вандетаниб или кабозантиниб с помощью линкеров различной природы, и модифицированных гидрофильными углеводными или катионными аммонийными группами.

2. Синтезирован конъюгат, обладающий аффинностью к EGFR-экспрессирующей клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431. Синтезирован конъюгат, проявляющий фотодинамическую активность в наномолярном диапазоне концентраций с отличным соотношением IC₅₀ (в темноте) / IC₅₀ (на свету) ~ 14000 для клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431. Получен конъюгат, показывающий синергетическую темновую и световую активность *in vivo* на животных с ксенотрансплантатами эпидермоидной карциномы человека A431.

3. Впервые синтезирован чувствительный к β -глюкуронидазе ферментативно-расщепляемый конъюгат фотосенсибилизатора и цитостатика кабозантиниб. Для полученного агента изучено расщепление под действием β -глюкуронидазы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны общие методы синтеза конъюгированных соединений на основе металлокомплексов хлорина-*e*₆, связанных с цитостатиками вандетаниб или кабозантиниб с использованием различных, в том числе, ферментативно-расщепляемых линкеров. Полученные соединения обладают высокими фототерапевтическими индексами, повышенным накоплением в EGFR-

экспрессирующих опухолевых клеточных линиях *in vitro*, а также показывают синергетическое ингибирование роста опухолей на свету и в темноте *in vivo*. В ходе работы были установлены основные особенности влияния строения конъюгированных агентов на их противоопухолевую активность. Созданные соединения могут стать основой новых высокоэффективных препаратов фотодинамической терапии, обладающих направленным действием в отношении ряда опухолей. Использование возобновляемых природных источников для создания хлориновых фотосенсибилизаторов позволит минимизировать затраты на производство подобных противоопухолевых соединений.

Методология и методы исследования

При выполнении диссертационного исследования были использованы современные методы тонкого органического синтеза, в том числе реакции *CuAAC* и амидирования/этерификации по Штеглиху и Ямагучи. При работе с веществами, чувствительными к кислороду воздуха, применялась техника Шленка (работа в атмосфере аргона). Идентификация и подтверждение строения полученных соединений проводилось с применением ЯМР (^1H , ^{13}C), ИК спектроскопии и масс-спектрометрии (MALDI, HRMS-ESI). Эксперименты по расщеплению целевых конъюгатов проводились с помощью ВЭЖХ. Очистка соединений проводилась с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Определение фотофизических характеристик проводилось с использованием UV-Vis спектрофотометрии-спектрофлуорометрии. Противоопухолевая активность для целевых конъюгатов была изучена с помощью *in vitro* MTT тестов на свету и в темноте, а также с помощью *in vivo* испытаний на животных с привитыми опухолями.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальные данные о синтезе 8 новых конъюгированных агентов на основе металлокомплексов хлорина-*e*₆, связанных с цитостатиками вандетанибом или кабозантинибом с использованием различных, в том числе, ферментативно-расщепляемых линкеров.
2. Результаты исследований фотофизических характеристик полученных конъюгатов.
3. Результаты исследований противоопухолевой активности (*in vitro/in vivo*) полученных конъюгатов.
4. Результаты изучения процессов ферментатического расщепления ферментативно-расщепляющего конъюгата цинкового металлокомплекса хлорина-*e*₆, конъюгированного с цитостатиком кабозантинибом.

Личный вклад автора

Все новые соединения, представленные в диссертационном исследовании, были полностью синтезированы лично диссертантом. Соискатель принимал активное участие в постановке целей и задач исследования, разработке структур целевых конъюгированных производных и методов их синтеза. Диссертант участвовал в анализе и обсуждении результатов фотофизических экспериментов,

также результатов биологических испытаний и обобщении результатов. Подготовка научных публикаций проводилась совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Степень достоверности полученных результатов

Строение синтезированных соединений было подтверждено современными физико-химическими методами (ЯМР- и ИК-спектроскопией и масс-спектрометрией). Фотофизические характеристики целевых молекул были зарегистрированы с применением спектрофотометрии-спектрофлуориметрии. Данные по цитотоксической активности получены с помощью проведения МТТ-тестов на клеточных культурах в присутствии/отсутствии светового облучения. Анализ клеточной локализации выполнен посредством конфокальной микроскопии. *In vivo* активность целевых молекул исследована с помощью иммунодефицитных мышей с ксенотрансплантатами эпидермоидной карциномы человека A431; оценка противоопухолевого эффекта проведена методом контрольных групп.

Апробация работы

Результаты исследования были представлены на ряде международных, всероссийских и региональных конференций: XVIII Конференция Молодых Учёных-химиков Нижегородской Области (РФ, г. Нижний Новгород, 2015); Оргхим-2016 (РФ, г. Санкт-Петербург, 2016); XII Международная Конференция «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (РФ, г. Иваново, 2016); XIX Конференция Молодых Ученых-химиков Нижегородской области (РФ, г. Н. Новгород, 2016); VI Международная Конференция по физической химии краун-соединений, порфиринов и фталоцианинов (РФ, г. Туапсе, 2016); Зимняя школа по органической химии WSOC-2017 (РФ, Красновидово, 2017); XX Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием) (РФ, г. Нижний Новгород, 2017); XI Международная школа-конференция молодых учёных по химии порфиринов и их аналогов (РФ, г. Иваново, 2017); XX школа-конференция по органической химии (РФ, г. Казань, 2017); 20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2017) (Кёльн, Германия, 2017); Workshop «Macrocycles in medicine» (Норвич, Великобритания, 2018); Chemistry conference for young scientists (Бланкенберг, Бельгия, 2018); XXI Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием) (РФ, г. Нижний Новгород, 2018); XXII Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием) (РФ, г. Нижний Новгород, 2019); Advances in synthesis and complexing (РФ, г. Москва, 2019).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах *J. Med. Chem. (ACS)*, *Eur. J. Med. Chem* и *Mendeleev Communications* (Elsevier), входящих в международные реферативные базы данных, а также 1 патент Российской Федерации.

Структура диссертации

Диссертационная работа состоит из списка условных обозначений и сокращений, введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 188 страницах машинописного текста и включает в себя 48 рисунков, 38 схем, 15 таблиц. Список литературы включает 230 наименований.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Изложенный материал соответствует пунктам: 1. «Выделение и очистка новых соединений», 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», 7 «Выявление закономерностей типа «структура – свойство» паспорта специальности 02.00.03 – «Органическая химия».

Благодарности

Автор выражает благодарность за проведение биологических испытаний к.б.н. И.В. Балалаевой, к.б.н. Н.Ю. Шилягиной, асп. Н.Н. Песковой и асп. Л.В. Крыловой – сотрудникам кафедры биофизики ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, чл.-корр. РАН Ю.Г. Горбуновой и к.х.н. И.Н. Мешкову – сотрудникам лаборатории новых физико-химических проблем ИФХЭ им А.Н. Фрумкина РАН за помощь в проведении фотофизических экспериментов, чл.-корр. РАН О.И. Койфману и к.х.н. Ю.В. Романенко – сотрудникам кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений ИГХТУ – за предоставленный метилфеофорбид-*a*, проф. Г.Г. Шмальцу за возможность стажировки в Кельнском университете, д.х.н. И.Д. Гришину и асп. А.О. Григорьевой за регистрацию масс-спектров, к.х.н. Ю.Б. Малышевой за регистрацию ЯМР-спектров.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез и противоопухолевые свойства конъюгатов на основе препарата вандетаниб и катионных хлоринов

Целью данной части работы являлась разработка методов получения конъюгированных агентов на основе различных металлокомплексов производных хлорина-*e*₆, соединенных с производным цитостатика вандетаниб (*vandetanib*) с использованием линкеров различной длины и гидрофильности. вандетаниб обладает избирательным действием в отношении экспрессируемых опухолями EGFR рецепторов.

Производное вандетаниба **1** со свободной фенольной группой было получено исходя из ванилиновой кислоты **2** в 7 стадий по известной методике¹ (**Схема 1**). На следующем этапе с помощью реакций алкилирования и азидирования были синтезированы соединения **3** и **4** на основе вандетаниба, содержащие различные линкеры.

¹ Международный патент WO 2010/028254 A2, 2010.

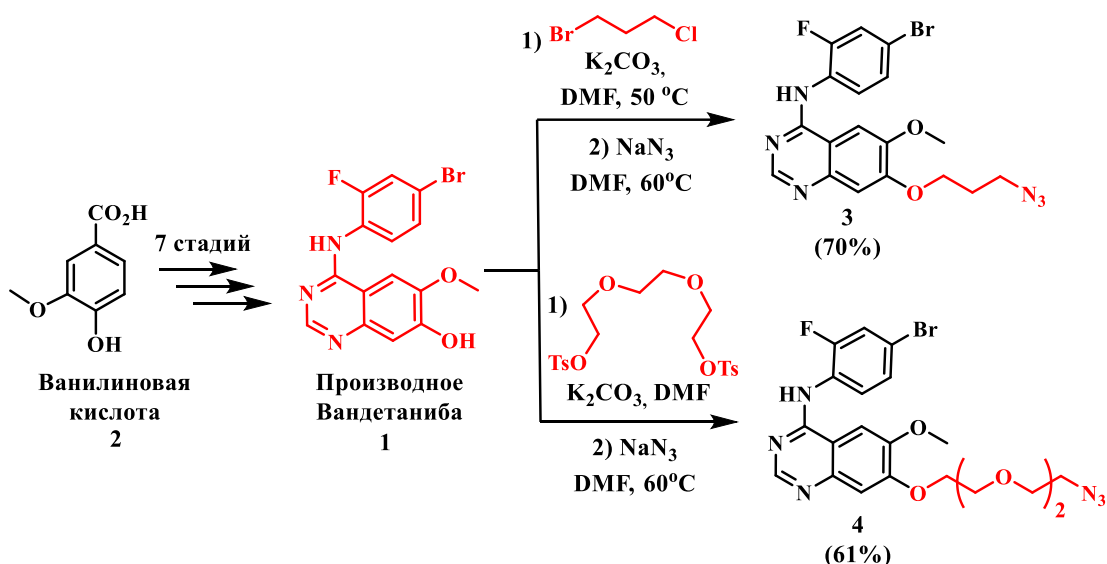


Схема 1

В качестве прекурсора для создания фотоактивной части был выбран метилфеофорбид-а **5**, из которого путем региоселективного кислотного гидролиза синтезировано соединение **6** с выходом 93% (Схема 2). Дальнейшее амидирование по Штеглиху² действием пропаргиламина с привело к выделению алкина **7** с выходом 81%. Хлориновый металлокомплекс **8** синтезирован с выходом 92% путем последовательного раскрытия пятичленного экзоцикла у производного **7** действием *N,N*-диметилэтилендиамина с внедрением цинка по реакции с $\text{Zn}(\text{OAc})_2$.

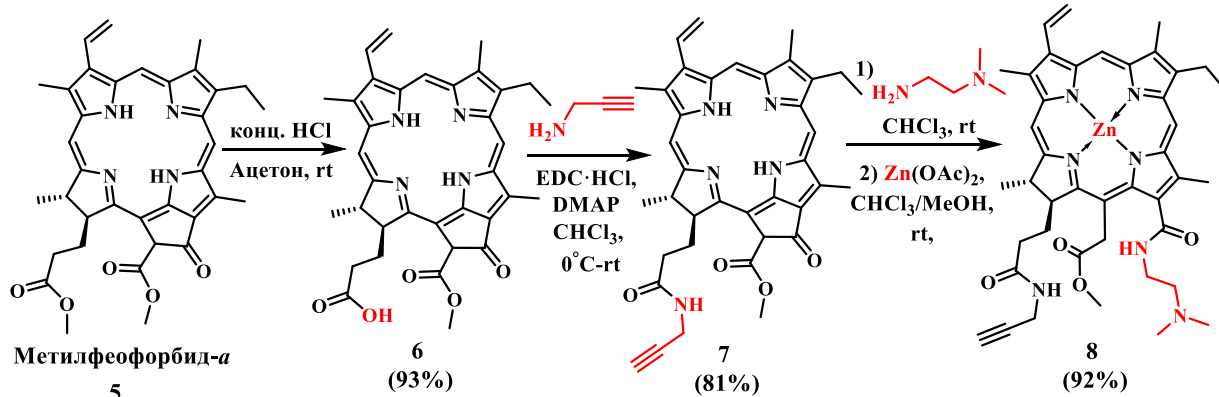


Схема 2

Конъюгат **9** получен из строительных блоков **3** и **8** по реакции CuAAC в присутствии ТВТА-лиганда³ с выходом 72% (Схема 3). В конъюгате **9** периферическая двойная связь у хлоринового макроцикла была дважды диметиламинометилирована под действием (бисдиметиламино)метана в кислой среде⁴ с выделением производного **10** с выходом 63%. Конъюгат **10** был количественно превращен в соответствующую трикатионную аммонийную соль **11** с использованием MeI.

² Chem. Soc. Rev., **2009**, 38, 606-631.

³ Chem. Comm., **2008**, 2459-2461.

⁴ J. Porphyr. Phthalocya, **2009**, 13, 949-956.

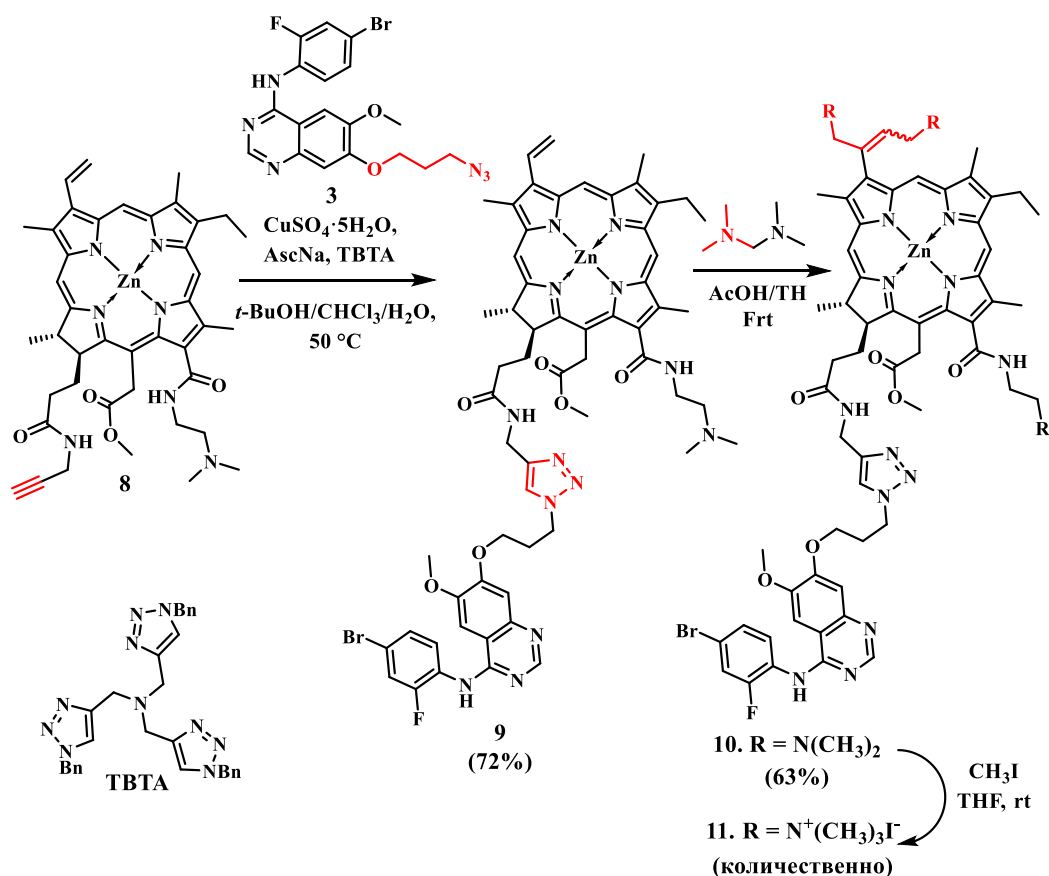


Схема 3

Аналогично, исходя из метилфеофорбида-*a*, **5** в 3 стадии был получен цинковый металлокомплекс **12** с суммарным выходом 51% (Схема 4). Производное **12** получено в форме аммонийной соли и не содержит фрагмента вандетаниба в своем составе.

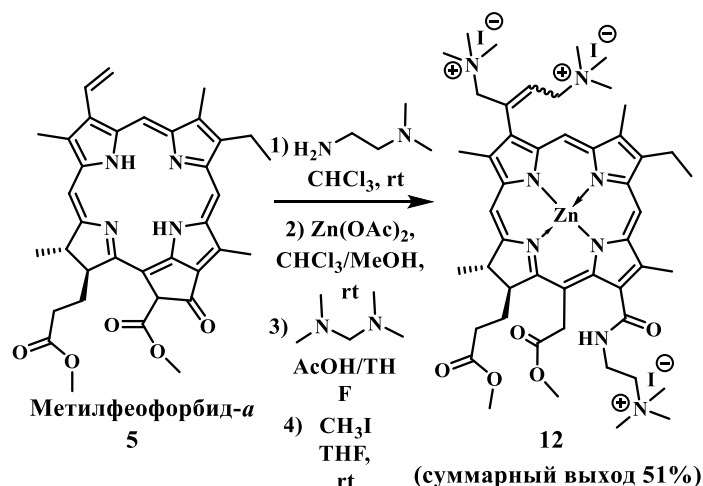


Схема 4

Изучение биологической активности синтезированных молекул **11** и **12** проводилось на клеточных линиях: 1) CHO (клетки яичника китайского хомяка) 2) HeLa (клетки опухоли шейки матки); 3) A431 (плоскоклеточная опухоль кожи), которая обладает повышенной экспрессией EGFR (подтверждено путем цитометрии с иммунофлуоресцентным окрашиванием). С помощью конфокальной микроскопии

было показано, что конъюгат **11**, в отличие от хлорина **12**, способен селективно накапливаться в EGFR-экспрессирующих клетках A431.

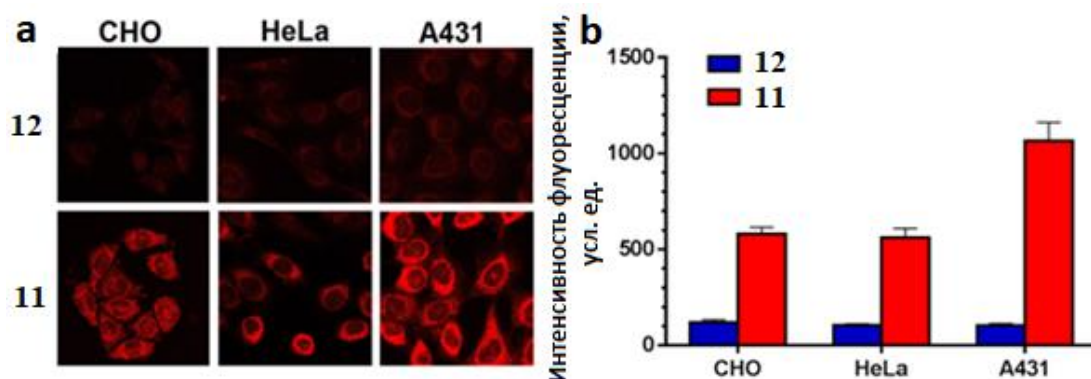


Рис. 1. (а) Изображения, полученные на конфокальном микроскопе для CHO, HeLa и A431 клеток после их инкубации с 5 мкМ конъюгата **11** (нижний ряд) и соединения **12** (верхний ряд) в течении 4 ч. (б) Интенсивность флуоресценции для **11** и **12**. Были проанализированы по меньшей мере 10 клеток в 2-3 полях наблюдения; представлены значения среднего $\pm$ SEM.

Для определения концентрации **11** и **12** (IC_{50}), способной ингибировать пролиферацию клеток на 50%, был использован стандартный МТТ тест (Табл. 1). Для всех трех клеточных линий конъюгат **11** оказался в 2-3 раза более токсичен (IC_{50} (на свету) $\sim$ 2.5 мкМ) на свету по сравнению с катионным хлорином **12** (IC_{50} (на свету) $\sim$ 6 мкМ), что соответствует различиям в скоростях интернализации этих соединений (Рис. 1a,b). При этом для конъюгата **11** продемонстрировано увеличение темновой токсичности в 1.5-3 раза (IC_{50} (в темноте) $\sim$ 25-48 мкМ) в отличие от фотосенсибилизатора **12** (IC_{50} (в темноте) $\sim$ 70-100 мкМ). Однако, несмотря на показанную селективность накопления **11** (Рис. 1b), этот конъюгат не обладает специфической токсичностью по отношению к экспрессирующим EGFR клеткам A431. По всей видимости, ингибирующую способность ариламинохиназолина (производное вандентаниб) в составе конъюгата **11** значительно снижена в силу стерических препятствий, тем самым подавляется возникновение синергетической цитотоксичности для **11**.

Таблица 1. *In vitro* световая и темновая токсичности для соединений **11** и **12**.

Клеточная линия	11			12		
	IC ₅₀ , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC ₅₀ в темноте / IC ₅₀ на свету	IC ₅₀ , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC ₅₀ в темноте / IC ₅₀ на свету
	На	В		На	В	
	свету	темноте		свету	темноте	
	CHO	2.7 [2.4; 3.0]	32 [28; 36]	12	6.1 [5.8; 6.4]	>100 -
HeLa	2.2 [2.0; 2.3]	25 [21; 29]	11	6.5 [5.7; 7.3]	72 [64; 80] 11	
A431	2.6 [2.5; 2.7]	48 [43; 55]	18	5.5 [4.9; 6.2]	72 [63; 81] 13	

Полученный агент **11** продемонстрировал высокую избирательность связывания с опухолевыми тканями у животных с привитыми опухолями колоректальной карциномы СТ-26. Концентрация **11** в опухоли достигала максимума через 24 ч (опухоль/нормальные ткани = 4.2).

С применением ранее отработанных методик из вандетаниб-содержащего блока с ПЭГ-линкером **4** и хлорина **8** был синтезирован конъюгат **13** с выходом 79% (Схема 5), превращённый затем в соответствующее диметиламинометилованное производное **14** с выходом 65%. Трикатионный агент **15** получен из соединения **14** в результате обработки MeI.

Благодаря использованию более длинного и гидрофильного линкера производное **15** оказалось в 26 раз более фототоксично (IC_{50} (на свету) = 0.1 мкМ, Табл. 2) по сравнению с молекулой **11** (IC_{50} (на свету) = 2.6 мкМ, Табл. 1) в отношении клеточной линии A431. При этом, соединение **15** оказалось практически нетоксично в темноте. Таким образом рассчитанный фототерапевтический индекс ($IC_{50\text{темнота}} / IC_{50\text{свет}}$) оказался >1000, что в совокупности с высокой световой токсичностью делает конъюгат **15** перспективным кандидатом для ФДТ опухолей.

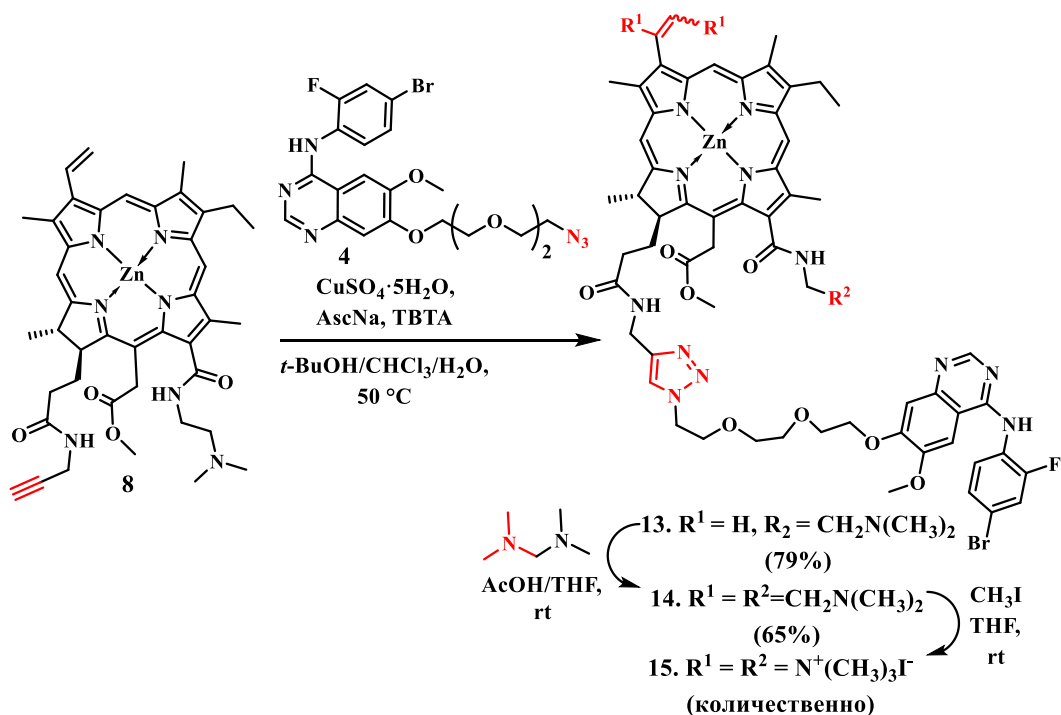


Схема 5

Таблица 2. *In vitro* световая и темновая токсичность для конъюгата **15**.

Клеточная линия	IC_{50} , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC_{50} в темноте / IC_{50} на свету
	На	В	
	Свету	Темноте	
A431	0.1 [0.86; 1.24]	>100	>1000

Были предложены соединения на основе комплексов In, Zn и Pd, содержащие два катионных фрагмента. Катионные фотосенсибилизаторы, отличающиеся количеством зарядов, а также их различные металлокомплексы зачастую демонстрируют значительное изменение противоопухолевой активности⁵. Из метилфеофорбида-*a* были синтезированы производные хлорина-*e*₆ **16** (цинковый комплекс) и **17** (палладиевый комплекс) с выходами 89% и 52% соответственно (Схема 6). После чего из полученных фотоактивных структурных блоков собраны дикатионные агенты **18** и **19** с выходами 41% и 23% соответственно.

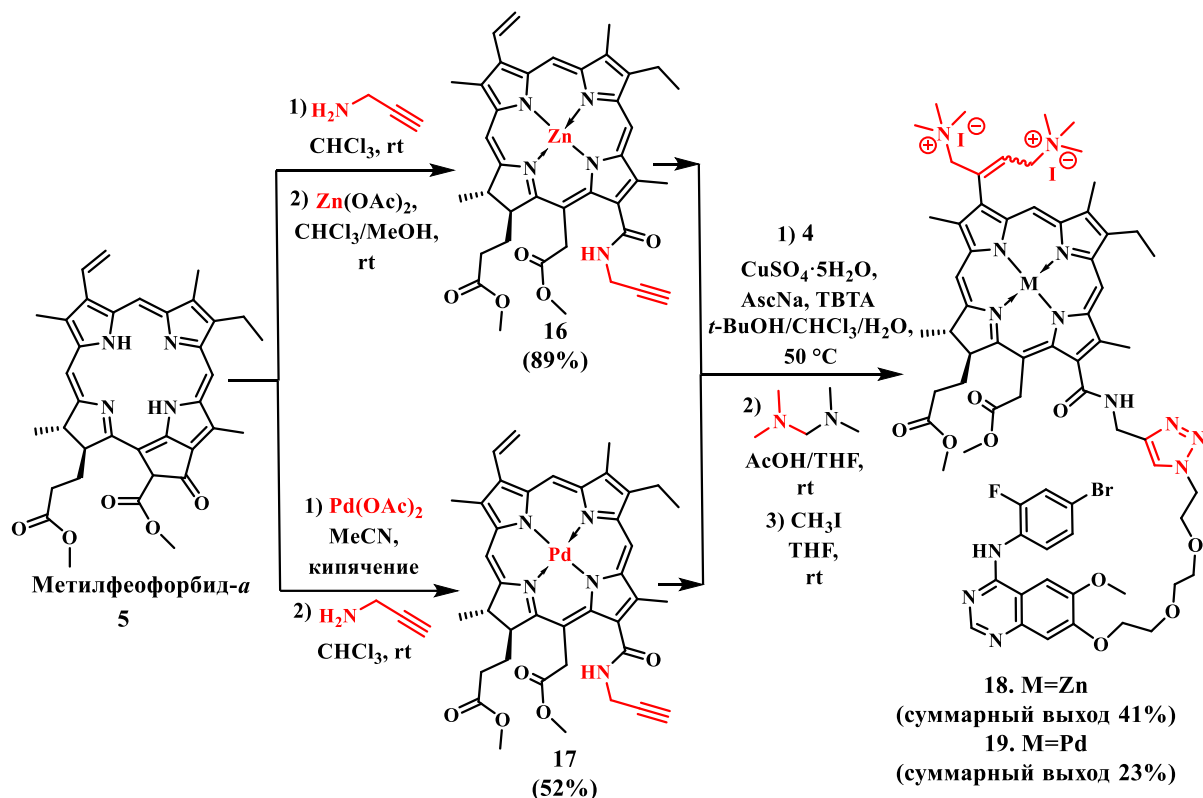


Схема 6

Из цинкового конъюгата **20** в кислой среде было получено безметальное соединение **21** с выходом 86%, которое затем было кватернизовано с количественным выходом, что привело к образованию конъюгированного агента **22** (Схема 7). Индиевый металлокомплекс **23** был получен из **20** с выходом 56% путем его кипячения с InCl_3 . Обработка иодистым метилом привела к индий-содержащему конъюгату **24** с количественным выходом.

Цинковый металлокомплекс **18** (Zn) (IC_{50} (на свету) = 0.59 мкМ) оказался в 6 раз менее фототоксичен по сравнению с трикатионным аналогом **15** (IC_{50} (на свету) = 0.1 мкМ) в отношении клеточной линии A431 (Табл. 3). Внедрение Pd и In в хлориновый макроцикл привело к увеличению фототоксичности на несколько порядков для конъюгатов **24** (In) (IC_{50} (на свету) = 0.0068 мкМ) и **19** (Pd) (IC_{50} (на свету) = 0.018 мкМ), как по сравнению с трикатионной молекулой **15**, так и по сравнению с **18** (Zn). Индиевый и палладиевый металлокомплексы демонстрируют

⁵ J. Med. Chem., 2020, 63, 7616-7632; Coord. Chem. Rev., 2016, 325, 67-101.

фотодинамическую активность в наномолярном диапазоне концентраций, что является выдающимся результатом применяемых в клинической практике фотосенсибилизаторов. Низкая темновая токсичность свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия ариламинохиназолина. При этом, благодаря низкой темновой токсичности, полученные конъюгированные соединения **24 (In)** и **19 (Pd)** показали отличные фототерапевтические индексы (IC_{50} (в темноте) / IC_{50} (на свету)), которые достигали значений 13971 и 4944 соответственно).

Следует отметить, что для безметалльного конъюгата **22 (2H)** (IC_{50} (на свету) = 0.026 мкМ) также был зафиксирован рост фототоксичности (Табл. 3) по сравнению с **15 (Zn)** (IC_{50} (на свету) = 0.59 мкМ).

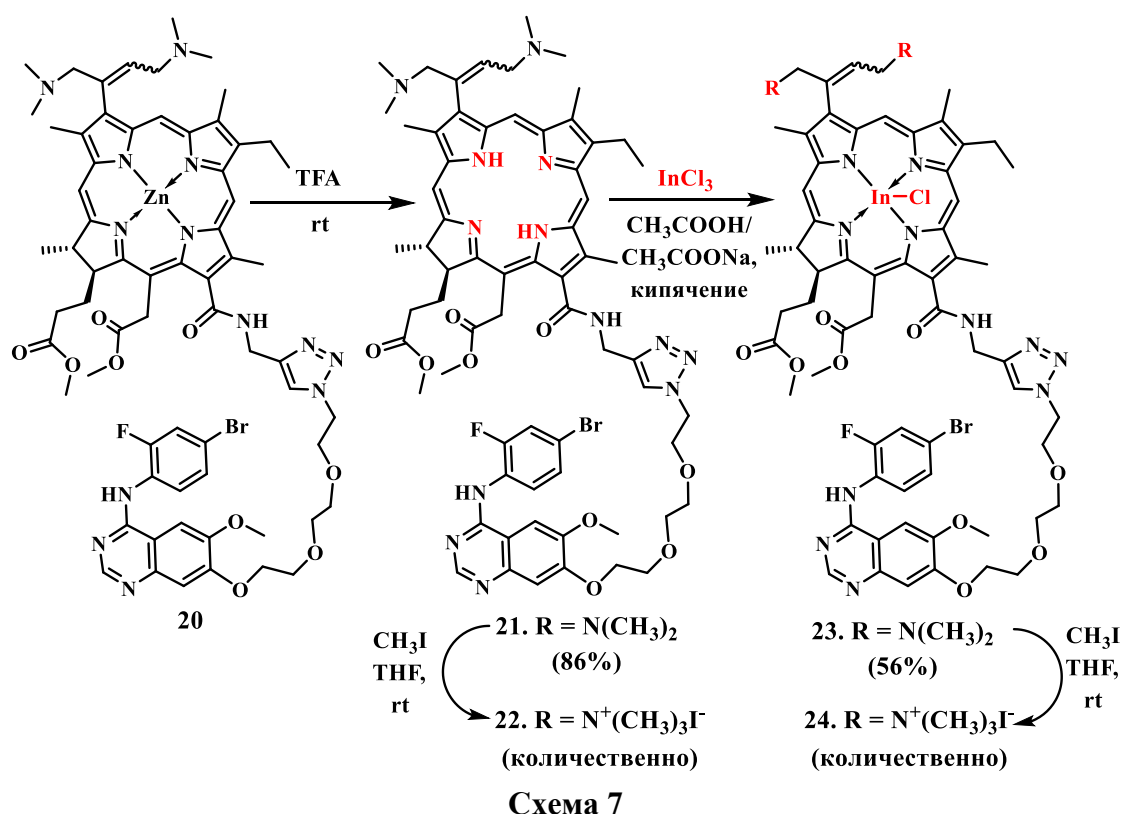


Таблица 3. *In vitro* световая и темновая токсичность для конъюгатов **18 (Zn)**, **19 (Pd)**, **22 (2H)** и **24 (In)** в отношении клеточной линии A431.

Конъюгат	IC_{50} , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC_{50} в темноте / IC_{50} на свету
	На Свету	В Темноте	
141 (Zn)	0.59 [0.45; 0.7]	>100	>170
143 (2H)	0.026 [0.021; 0.031]	>100	>3846
145 (In)	0.0068 [0.0052; 0.0084]	95 [81; 107]	13971
149 (Pd)	0.018 [0.015; 0.021]	89 [75; 98]	4944

2. Синтез и противоопухолевые свойства конъюгатов на основе препарата вандетаниб и углеводсодержащих хлоринов

Для повышения гидрофильности также были использованы фрагменты углеводов, которые, кроме того, могут увеличить селективность поглощения конъюгатов опухолевыми клетками за счет эффекта Варбурга⁶ и связывания с гликоспецифичными рецепторами⁷.

Углеводный строительный блок был получен из β -D-мальтозы **25** путем последовательного ацилирования, азидирования и удаления защитных групп с образованием азида **26** с выходом 47% (Схема 8).

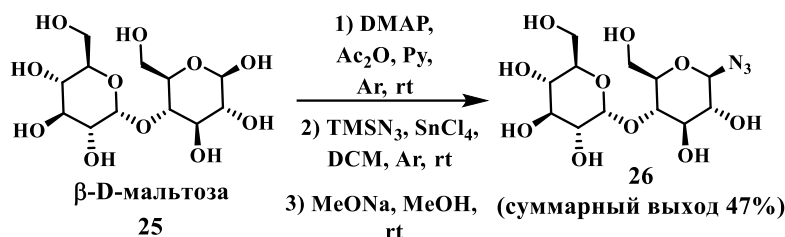


Схема 8

Затем из ранее полученного производного феофорбида **7** путем раскрытия экзоцикла действием 2,2'-(этилендиокси)бис(этиламина) с внедрением цинка и раскрытием янтарного ангидрида получено соединение **27** с выходом 72% после 2 стадий (Схема 9). Этерификация по Штеглиху с хиназолинолом **1** и последующая реакция CuAAC с азидом мальтозы **26** привела к образованию конъюгата **28** с выходом 51% после двух стадий.

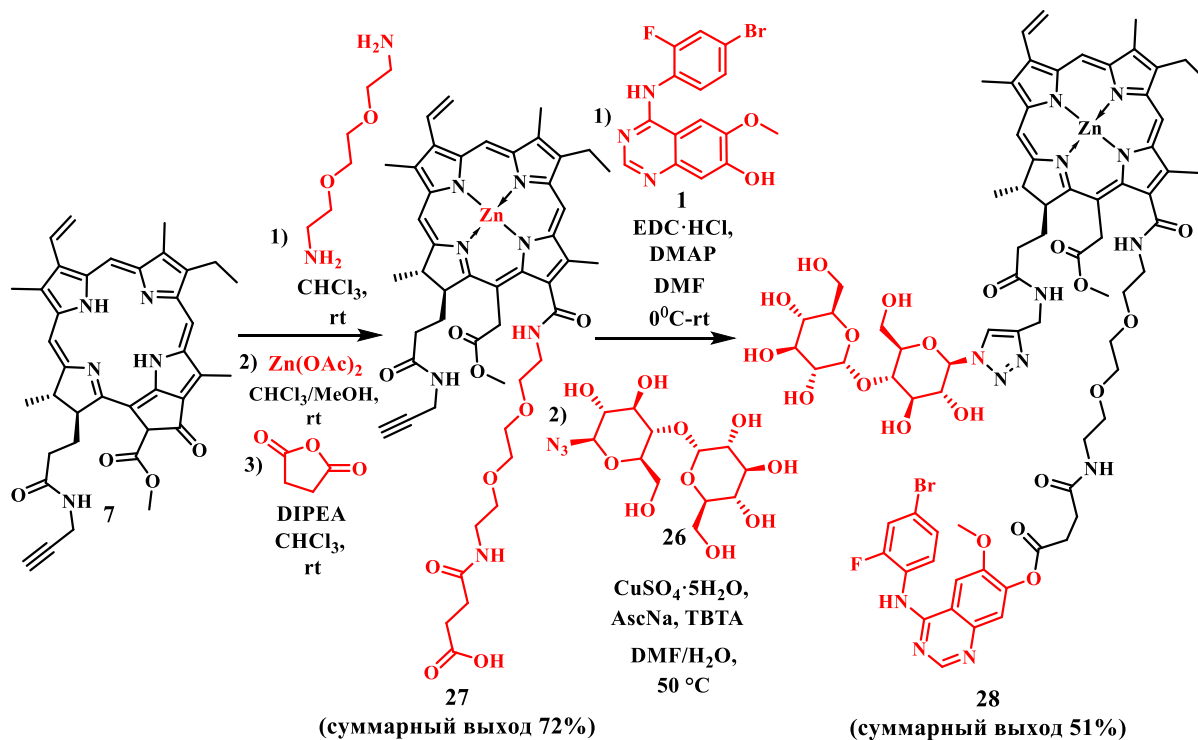


Схема 9

⁶ *Science*, **2007**, 123, 309-314.

⁷ *Canc. Lett.*, **2007**, 253, 25-33.

С помощью CuAAC реакции азида мальтозы **26** и алкин-содержащего хлорина **8** был также получен конъюгат сравнения **29**, не содержащий фрагмент вандетаниба (выход 65%).

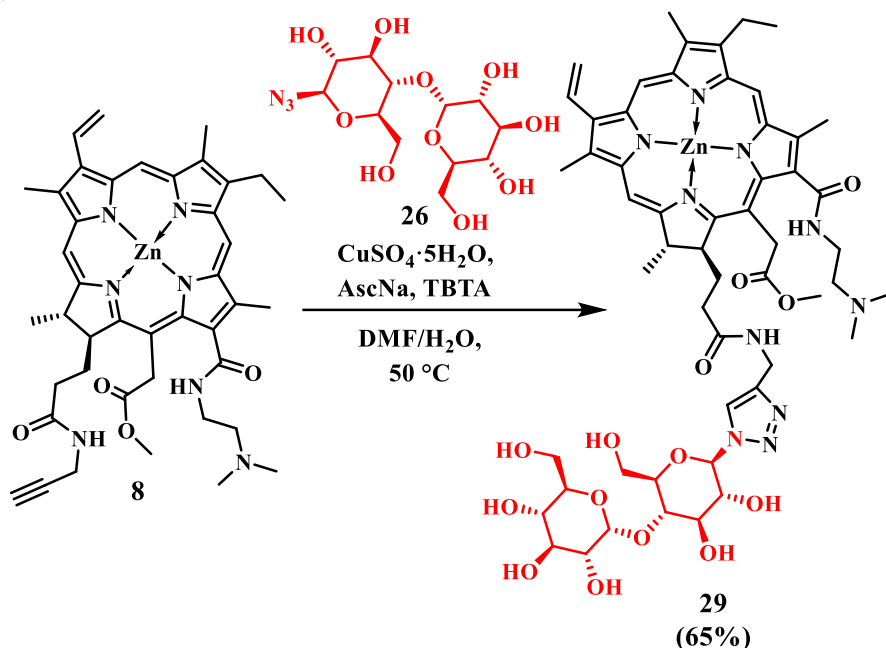


Схема 9

В темноте хлориновый фотосенсибилизатор **29** продемонстрировал выраженную токсичность на обеих клеточных линиях A431 (EGFR-положительная) и CHO (EGFR-отрицательная) с IC_{50} (в темноте) $\sim 30\text{--}50$ мкМ (Табл. 4). После облучения цитотоксичность соединения **29** возросла в ~ 40 раз. Однако, ни в темноте, ни на свету конъюгат **29** без лиганда EGFR не показал селективности в отношении EGFR-положительной клеточной линии A431. Конъюгированное соединение **28**, напротив, продемонстрировало увеличение световой и темновой токсичностей в отношении EGFR-положительной клеточной линии A431. Такое его поведение, скорее всего, связано с независимой цитостатической активностью производного вандетаниба, которое может высвобождаться путем гидролиза сложноэфирной связи под действием клеточных эстераз. Кроме этого, для конъюгата **28** индекс терапевтической активности на клеточных линиях CHO и A431 составлял >250 и ~ 368 соответственно. Такие высокие значения в совокупности с синергизмом цитотоксического действия в отношении EGFR-положительных опухолевых клеток делают молекулу **28** перспективным противоопухолевым агентом.

Таблица 4. *In vitro* световая и темновая токсичность для конъюгатов **28** и **29**.

Клеточная линия	28			29		
	IC_{50} , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC_{50} в темноте / IC_{50} на свету	IC_{50} , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC_{50} в темноте / IC_{50} на свету
	На Свету	В Темноте		На Свету	В Темноте	
	На Свету	В Темноте		На Свету	В Темноте	
A431	0.19 [0.16; 0.24]	~70	~368	0.91 [0.62; 1.32]	37.6 [28.9; 48.7]	41
CHO	0.40 [0.34; 0.46]	>100	>250	1.03 [0.77; 1.38]	48.4 [38.5; 60.7]	47

Новый конъюгат **28** был протестирован на мышах с привитыми опухолями A431 (**Рис. 2а**) и показал преимущественное накопление в опухолевой ткани; соотношение сигналов опухоль/норма составляло 1.65 (через 1 ч.) и 2 (через 24 ч.) (**Рис. 2б**). Практически полное элиминирование соединения **28** из организма животных наблюдалось через 4 дня.

Фотодинамическая терапия мышей с привитыми опухолями была проведена через 4 часа после введения агента **28**, поскольку в этой точки его накопление было максимально в опухолевой ткани (**Рис. 2а**). После фотодинамического воздействия рост опухолей был остановлен и их объем быстро снижался после ФДТ и не превышал ~15% на 7-9 день после лечения у животных (**Рис. 2б**).

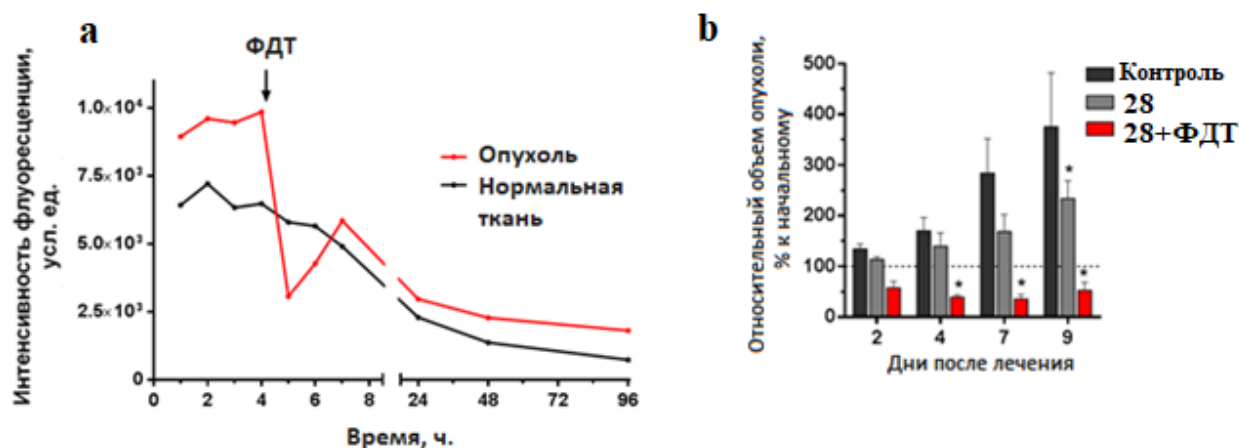


Рис. 2. (а) Динамика изменения флуоресценции в опухоли (красная кривая) и нормальной ткани (черная кривая) у животных после введения конъюгата **28**. Облучение с дозой 50 Дж/см² (620-655 нм) было проведено через 4 ч. после введения (отмечено стрелкой). Показаны выборочные кривые. (б) Относительные объемы опухолей в контрольной группе и группе животных после введения конъюгата **28**. Представлены средние значения± SEM.

Примечательным результатом стал эффект, возникающий у животных с введенным соединением **29**, но не подвергнутых облучению. У этих животных также наблюдалось ингибирование опухолевого роста (**Рис. 2б**), что может быть связано только с собственной активностью производного вандетаниба, которая заключается в ингибировании тирозинкиназ. Таким образом, для конъюгата **29** в процессе

терапии привитых опухолей у животных реализовывались одновременно механизмы фотодинамической терапии и химиотерапии, что в совокупности повышает его общую терапевтическую активность.

3. Синтез ферментативно-расщепляемого конъюгата углеводсодержащего хлорина и производного препарата кабозантиниба

Целью этого раздела диссертационного исследования стало создание конъюгата, способного расщепляться под действием фермента β -глюкуронидазы, концентрация которой особенно высока в опухолевых тканях⁸. Использование такого подхода позволит добиться высвобождения цитостатического фрагмента преимущественно в опухолевых клетках, что увеличит общее противоопухолевое действие.

В качестве цитотоксической части конъюгата был выбрано производное кабозантиниба (*cabozantinib*), препарата, активного в наномолярном диапазоне концентраций и избирательного ингибирующего различные тирозинкиназы.

Конъюгирование фотоактивной и цитостатической частей планировалось осуществить с помощью β -глюкуронидного линкера⁷, который под действием β -глюкуронидазы способен принимать участие в процессах расщепления с выделением терапевтического фрагмента кабозантиниба (Схема 10).

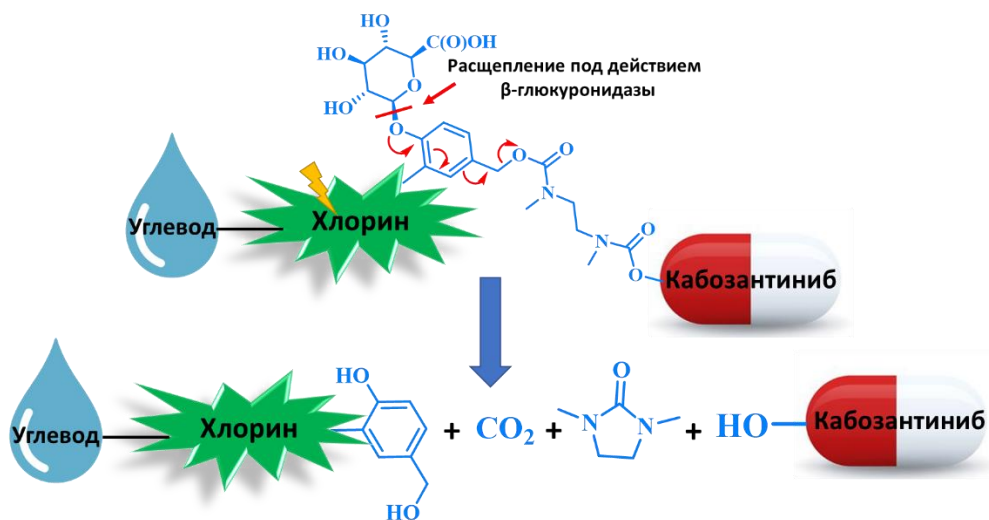


Схема 10

Производное препарата кабозантиниб **30** было синтезировано в 9 стадий по известной методике⁹ из апоцинина **31** и циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты **32** (Схема 11). Кипячением в TFA с соединения **30** была удалена бензильная защитная группа с образованием производного хинолина **33** с выходом 82%, которое затем было алкилировано бромсодержащим линкером на основе этиленгликоля с THP (2-тетрагидропиранильная группа) защитной группой с образованием производного **34** с выходом 75%. Далее действием TFA защитная THP группа была удалена, что

⁸ Eur. J. Med. Chem., **2014**, 74, 302-313.

⁹ Международный патент WO 2005030140A2, **2005**.

приводило к соединению **35** с выходом 86%. На следующей стадии из **35** был получен активированный карбонат **36** с выходом 94% действием бис(4-нитрофенил)карбоната. Затем на основе карбоната **36** и моно-Вос-защищенного *N,N'*-диметилэтилендиамина был синтезирован карбамат **37** с выходом 92%. На последней стадии Вос-группа была удалена с выделением кабозантиниб-содержащего строительного блока **38** с выходом 83%.

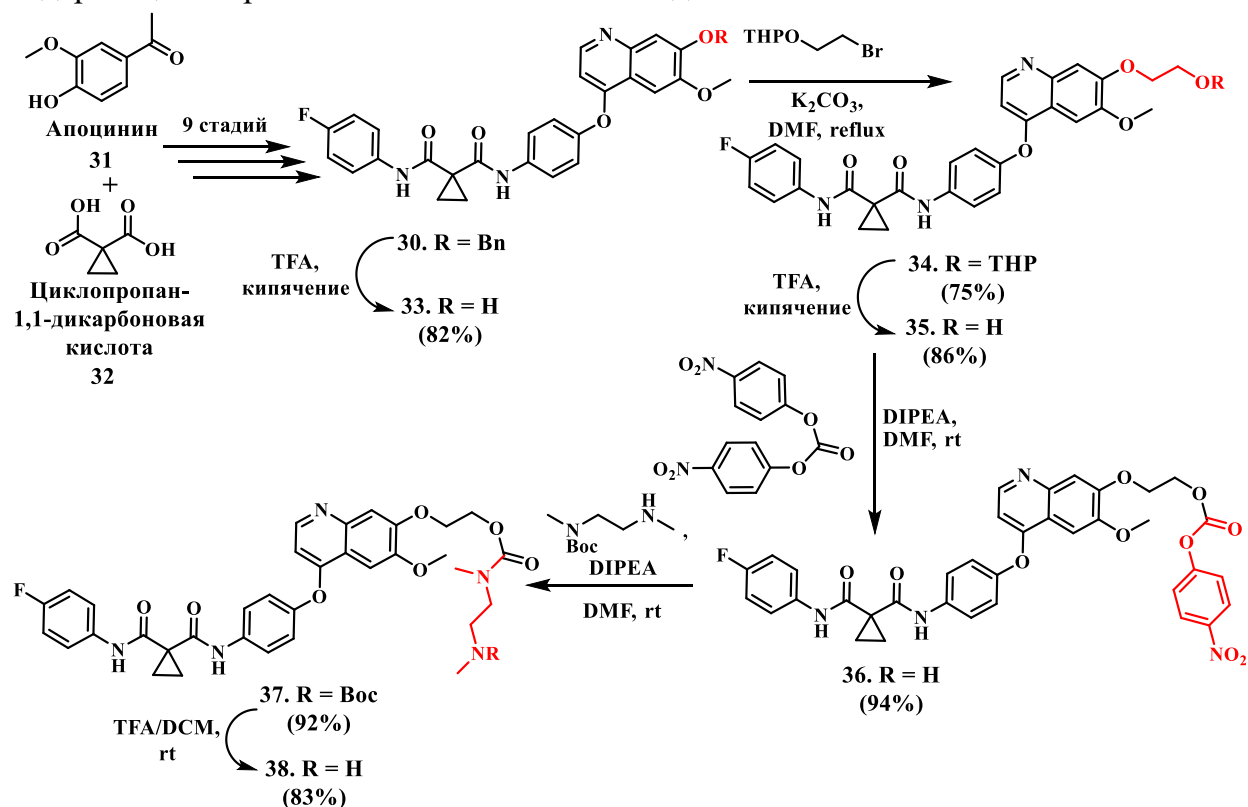


Схема 11

В качестве прекурсора для синтеза β-глюкуроидного линкера был выбран D-(+)-глюкуроно-3,6-лактон **39**, который является доступным продуктом пищевой промышленности (Схема 12). Лактон **39** был раскрыт действием MeONa и ацилирован уксусным ангидридом; после чего продукт участвовал в реакции бромирования в 33% растворе HBr в уксусной кислоте, что привело к бромзамещённому производному **40** с выходом 52% после двух стадий¹⁰. На следующем этапе по реакции Уильямсона был синтезирован эфир **41** с выходом 60%⁹. Дальнейшее селективное восстановление нитрогруппы под действием SnCl₂·H₂O позволило синтезировать производное анилина **42** с выходом 55%.

¹⁰ J. Am. Chem. Soc., **2012**, 134, 3103-3110.

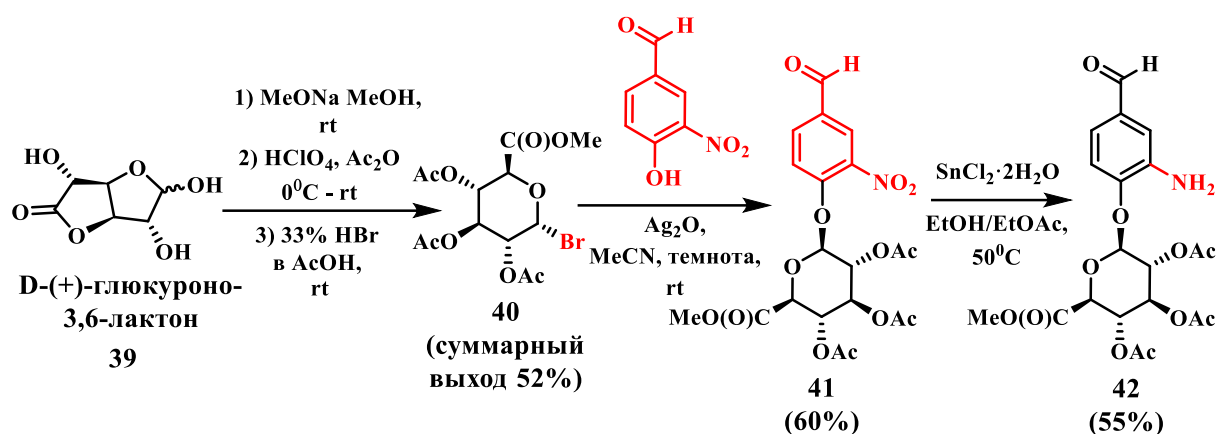


Схема 12

Синтезированный ранее алкин-содержащий хлорин 27 был объединен с азидом перацелированной мальтозы 43, что привело к конъюгату 44 с выходом 78%. На следующей стадии для создания амидной связи между β-глюкуронидным линкером 42 и углеводсодержащим хлорином 44 использовали реакцию Ямагучи¹¹, что позволило получить конъюгат 45 с выходом в 45%, из которого в две стадии с суммарным выходом 71% был синтезирован активированный карбонат 47 (Схема 13).

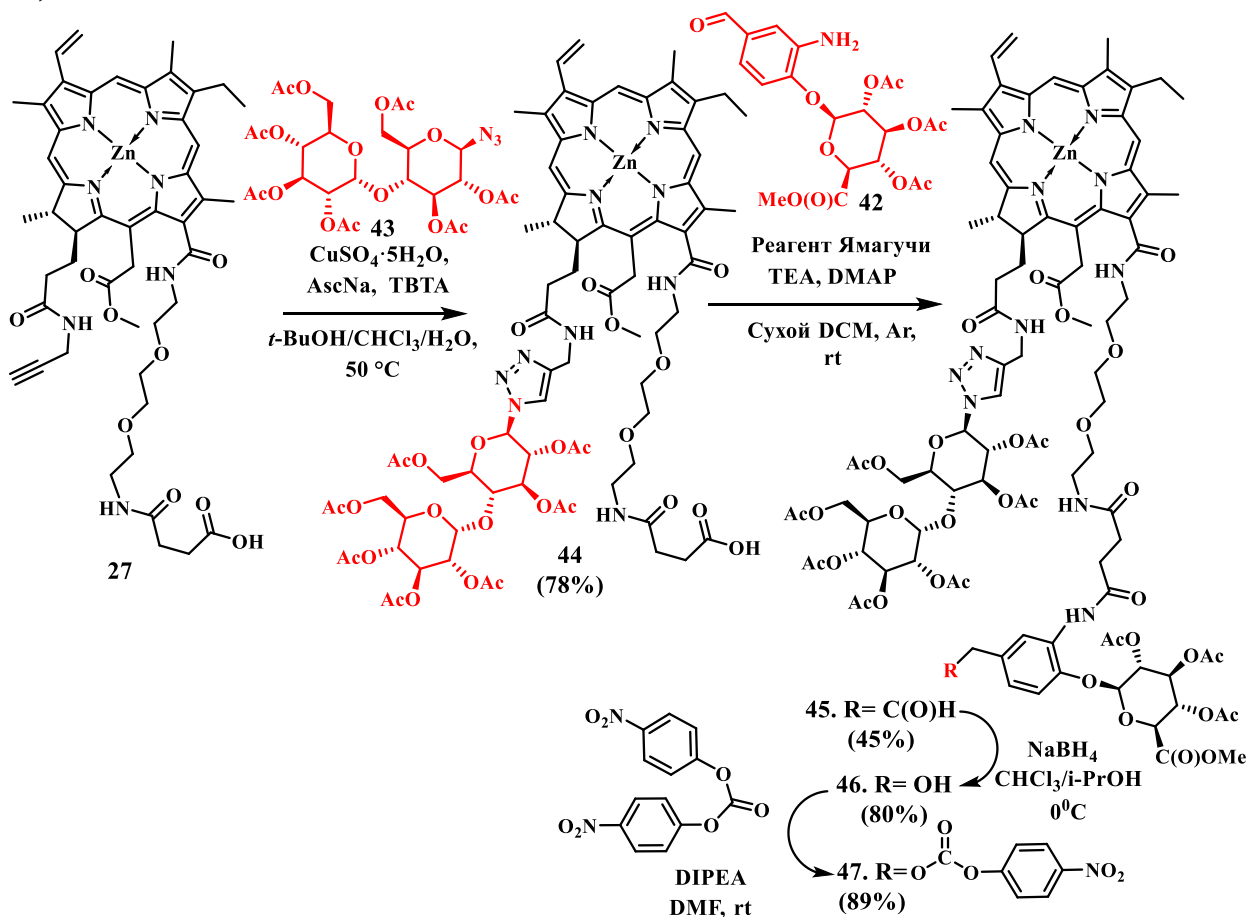


Схема 13

¹¹ Org. Lett, 2006, 8, 47-50.

Финальным этапом сборки ферментативно-расщепляемого конъюгата стала реакция между активированным карбонатом **47** и аминоксодержащим производным кобозантиниба **38**, приводящая к образованию конъюгата **48** (выход 81%), содержащего дополнительную карбаматную связь (Схема 14).

Не смотря на достаточно сложное строение, для молекулы **48** удалось зарегистрировать ^1H -ЯМР- и масс-спектр в хорошем разрешении и соотнести необходимые для идентификации соединения пики.

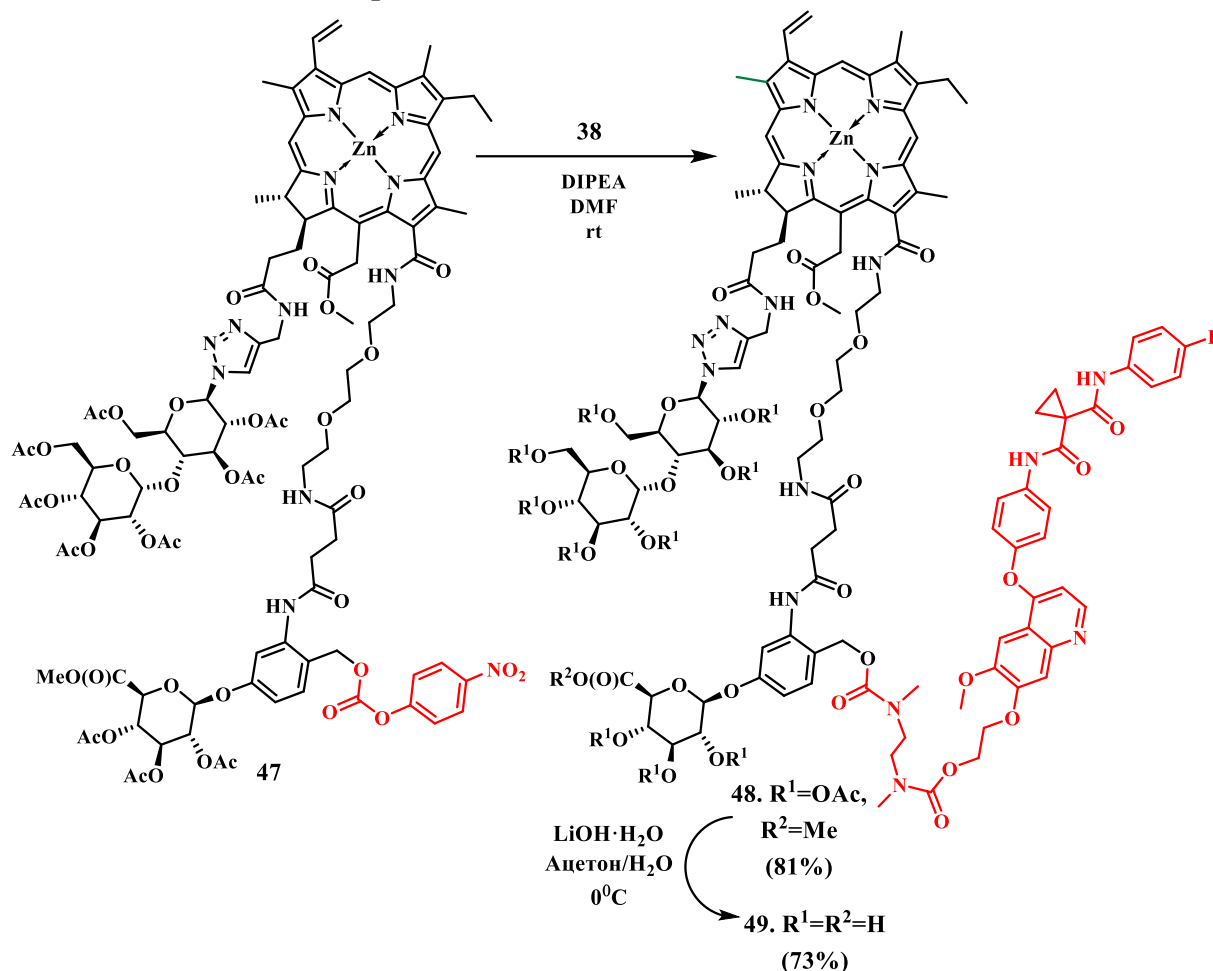


Схема 14

И, наконец, все одиннадцать защитных групп в конъюгате **48** были удалены действием $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, что привело к целевому агенту **49** с выходом 73% (Схема 14). Для подтверждения строения **49** была также использована HRMS-ESI масс-спектрометрия, которая показала несколько пиков двухзарядных анионов, относящихся к целевому конъюгату.

Оценка принципиальной возможности расщепления конъюгата **49** под действием β -глюкуронидазы была произведена с помощью ВЭЖХ. Для этого к соединению **49** в растворе ПБС (рН=7) с добавками ПЭГ2000 и ДМСО была прибавлена β -глюкуронидаза (*E.Coli*) и через некоторые промежутки времени отбирались аликвоты, которые были проанализированы методом ВЭЖХ. Хроматограмма через 4 часа после добавления β -глюкуронидазы представлена на Рис. 3. Анализ хроматограммы показывает, что исходное соединение **49** путем

ферментативного расщепления разделилось на несколько фрагментов. При этом выделилось неизвестное соединение **X**, которое, скорее всего, является элиминированной глюкуроновой кислотой. Кроме этого, образуется неизвестный хлорин **Y** (хлориновое ядро обнаружено по спектру поглощения), а также производное кабозантиниба в форме карбамата **38**. Подтверждение наличия выделяющегося производного проведено путем сопоставления времени удержания (Rt) и спектров поглощения с синтезированным соединением **38** из его раствора ПБС с добавками ПЭГ2000 и ДМСО.

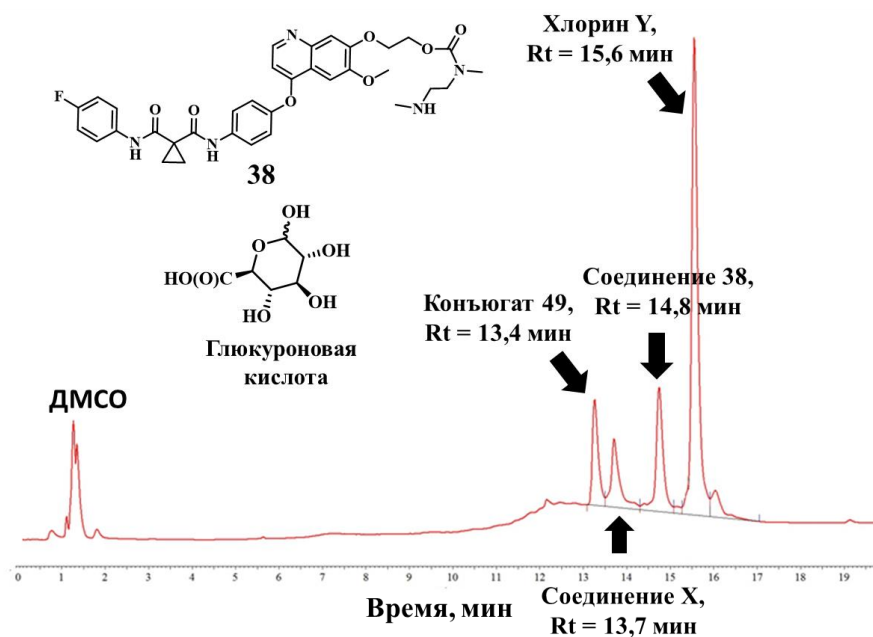


Рис. 3. Хроматограмма для конъюгата **49** через 4 ч после добавления β -глюкуронидазы. Детектор PDA, $\lambda=254$ нм.

Таким образом, под действием β -глюкуронидазы происходит расщепление конъюгата **49** с выделением производного кабозантиниба **38**, у которого фрагмент этилендиамина не подвергается самоциклизации, как показано на **Схеме 10**. В настоящий момент для объяснения такого явления, а также для установления точных структур образующихся производных **X** и **Y** проводится анализ ферментативного расщепления соединения **49** с использованием LC-MS. Также в настоящее время проводятся исследования цитотоксичности полученного ферментативно-расщепляемого соединения **49** в присутствии и отсутствии β -глюкуронидазы, что позволит сделать выводы о перспективности такого мультимодального агента для лечения онкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана методика синтеза и получены конъюгированные соединения на основе катионных металлокомплексов (Zn, In, Pd) хлорина-*e*₆, соединенных с производными препарата вандетаниба с использованием линкеров различной длины и гидрофильности. Некоторые из полученных соединений демонстрируют селективное связывание с EGFR-экспрессирующей клеточной линией

эпидермоидной карциномы человека A431, а также обладают световой цитотоксичностью в наномолярном диапазоне концентраций с соотношением IC_{50} (в темноте) / IC_{50} (на свету), достигающем 14000.

2. Получен конъюгат на основе углеводсодержащего цинкового металлокомплекса хлорина-*e*₆, соединенного с производным препарата вандетаниб. Полученное соединение обладает световой цитотоксичностью в субмикромольном диапазоне концентраций, а также соотношением IC_{50} (в темноте) / IC_{50} (на свету), достигающем 370 для опухолевой клеточной линии A431. Новое конъюгированное производное способно накапливаться в опухолевых тканях и ингибировать их рост на свету и в темноте для животных с привитыми ксенотрансплантатами эпидермоидной карциномы человека A431.

3. Синтезирован ферментативно-расщепляемый конъюгат на основе углеводсодержащего цинкового металлокомплекса хлорина-*e*₆, соединенного с производным препарата кабозантиниб с использованием чувствительного к β -глюкуронидазе линкера. Под действием β -глюкуронидазы полученное соединение расщепляется с выделением хлоринового и кабозантинибного фрагментов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **V. F. Otvagin**, A. V. Nyuchev, N. S. Kuzmina, I. D. Grishin, A. E. Gavryushin, Y. V. Romanenko, O. I. Koifman, D. V. Belykh, N. N. Peskova, N. Yu. Shilyagina, I. V. Balalaeva, A. Yu. Fedorov, Synthesis and Biological Evaluation of New Water-Soluble Photoactive Chlorin Conjugate for Targeted Delivery, *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 144, 740–750.
2. **V. F. Otvagin**, N. S. Kuzmina, L. V. Krylova, A. B. Volovetsky, A. V. Nyuchev, A. E. Gavryushin, I. N. Meshkov, Y. G. Gorbunova, Y. V. Romanenko, O. I. Koifman, I. V. Balalaeva, A. Yu. Fedorov, Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy, *J. Med. Chem.*, **2019**, 62, 11182–11193.
3. N. S. Kuzmina, **V. F. Otvagin**, L. V. Krylova, A. V. Nyuchev, Y. V. Romanenko, O. I. Koifman, I. V. Balalaeva, A. Yu. Fedorov, Synthesis and antiproliferative activity of new chlorin e6 glycoconjugates, *Mendeleev Communications*, **2020**, 30, 159–161.
4. А. Ю. Федоров, А. В. Нючев, И. В. Балалаева, **В. Ф. Отвагин**, Н. С. Кузьмина, Л. В. Крылова, «Производное цинкового металлокомплекса хлорина-*e*₆ и его применение», RU 2691754 C1.
5. **В. Ф. Отвагин**, А. В. Нючев, Н. Н. Пескова, И. В. Балалаева, О. И. Койфман, А. Ю. Федоров, Создание водорастворимых мультифункциональных агентов комбинированной терапии, содержащих хлориновый фотоактивный фрагмент и хиназолиновый лиганд селективной доставки, VI Международная Конференция по Физической Химии Краун-соединений, Порфиринов и Фталоцианинов, Туапсе, РФ, **2016**, Сборник тезисов, стр. 42.
6. **В. Ф. Отвагин**, А. В. Нючев, И. В. Балалаева, Н. Н. Пескова, О. И. Койфман, А. Ю. Федоров, Синтез и свойства гибридных конъюгатов для фотодинамической

терапии на основе металлокомплексов природных порфиринов и различных агентов селективной доставки, Зимняя Школа по Органической Химии WSOC-2017, Красновидово, РФ, **2017**, Сборник тезисов, стр. 196-197.

7. **V. F. Otvagin**, N. S. Kuzmina, A. V. Nyuchev, O. I. Koifman, A. Yu. Fedorov, Synthesis of novel photoactive hybrid conjugates based on chlorin-e₆ and selective delivery agents for antitumor photodynamic therapy, 20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2017), Cologne, Germany, **2017**, № MCB014.

8. **V. F. Otvagin**, N. S. Kuzmina, A. V. Nyuchev, A. Yu. Fedorov, Development of third generation photosensitizers based on chlorin-e₆ metallocomplexes and selective delivery agents for antitumor photodynamic therapy, Chemistry Conference for Young Scientists, Blankenberge, Belgium, **2018**, p. 75.

9. **V. F. Otvagin**, A. V. Nyuchev, N. S. Kuzmina, M. A. Urazaeva, A. Yu. Fedorov, Synthesis and biological evaluation of new water-soluble photoactive chlorin conjugates for targeted delivery, Advances in Synthesis and Complexing, Moscow, Russia, **2019**, p. 41.