

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Петров Станислав Александрович

**Полипептидные молекулы и их конъюгаты с диагностическими и
терапевтическими агентами для адресной доставки в раковые
клетки предстательной железы**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2021

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

Научный руководитель

Белоглазкина Елена Кимовна
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты

Юсубов Мехман Сулейман Оглы
доктор химических наук, профессор, Руководитель стратегической ставки Группы стратегических инициатив ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Щекотихин Андрей Егорович
доктор химических наук, профессор РАН, директор ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, заведующий кафедрой органической химии ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»,

Зефирова Ольга Николаевна
доктор химических наук, профессор кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «15» декабря 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

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

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/405131202/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

О.А. Малошицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак предстательной железы (РПЖ) является одной из наиболее распространённых онкологических патологий среди мужчин в России и во всем мире. Перспективным методом лечения рака простаты является использование адресной доставки лекарственных средств – направленный транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, органа или клетки. Преимуществами этого метода является уменьшение побочных эффектов и вводимой дозы препарата при улучшении качества диагностики и терапии. В терапии и диагностике рака простаты возможна направленная доставка целевых молекул в ткани опухоли и в ее метастазы за счет взаимодействия с простатическим специфическим мембранным антигеном (ПСМА) – трансмембранным гликопротеином, локализованным на поверхности клеток простаты и суперэкспрессирующимся в опухолевых клетках. На сегодняшний день предложен ряд низкомолекулярных соединений, селективно связывающихся с ПСМА и имеющих потенциал для использования их в качестве адресных агентов, среди которых самыми перспективными являются производные мочевины (DUPA и DCL). Лиганд DCL (((S)-5-амино-1-карбоксипентил)карбамоил)-L-глутаминовая кислота), считается наиболее перспективным для адресной доставки к ПСМА, однако методология синтеза ПСМА-направленных конъюгатов с терапевтическими и диагностическими молекулами на его основе остается недостаточно разработанной.

Общая структура таких конъюгатов должна включать ПСМА-вектор, соединенный с терапевтическим или диагностическим фрагментом с помощью линкера, увеличивающего аффинность к рецептору.

Степень разработанности темы. В настоящее время несколько конъюгатов на основе мочевины DCL для визуализации и терапии рака простаты приняты в клиническую практику или проходят стадию клинических испытаний (^{68}Ga PSMA-11 1.12.2020 и ^{18}F -DCFPyL 27.05.2021 г приняты FDA для диагностики РПЖ; ^{177}Lu -PSMA-617 и ^{177}Lu -PSMA-I&T рассматриваются FDA для терапии РПЖ). Однако, продолжается поиск оптимальной структуры и стереоселективных методов синтеза полипептидных линкеров, соединяющих векторный и терапевтический/диагностический фрагменты целевых конъюгатов, для достижения максимальной аффинности к ПСМА-рецептору. К настоящему времени в литературе отсутствуют данные о получении низкомолекулярных двойных ПСМА-направленных конъюгатов, имеющих в составе одновременно диагностический и терапевтический фрагменты, а двойные диагностические конъюгаты на основе DCL представлены единичными примерами.

Целью работы является разработка методов стереоселективного синтеза новых полипептидных векторных молекул, содержащих фрагмент DCL для направленной доставки к ПСМА рецептору терапевтических и диагностических агентов различной природы, получение

на их основе моно- и бимодальных конъюгатов с терапевтическими препаратами, хелаторами для радионуклидной диагностики и терапии, флуоресцентными метками, и первичное биологическое исследование полученных конъюгатов на возможность применения в диагностике и терапии РПЖ.

Задачами работы являются: (1) выбор оптимального метода сборки трипептидной линкерной последовательности целевых ПСМА-направленных молекул на основе мочевины DCL с использованием жидкофазного или твердофазного пептидного синтеза (LPPS и SPPS); (2) получение полипептидных векторных платформ с двумя ортогональными функциональными фрагментами (NH₂Boc-NH-Fmoc; NH₂Boc-N₃) для синтеза двойных ПСМА-направленных конъюгатов; (3) получение полипептидных векторных платформ с концевыми NH₂/N₃ фрагментами для получения мономодальных ПСМА-направленных конъюгатов; (4) получение мономодальных конъюгатов полученных векторных молекул с хелаторами различной природы (DOTA, биспидин) и их тестирование на возможность хелатирования радионуклидов, аффинность к ПСМА рецептору и накопление и интернализацию на клеточных культурах РПЖ; (5) получение бимодального тераностического конъюгата с противоопухолевым препаратом доцетакселом и флуоресцентным красителем Sulfo-Cy5 и его биологическое тестирование; (6) получение бимодального диагностического конъюгата с хелатирующим агентом DOTA и флуоресцентным красителем Sulfo-Cy5 и его биологическое тестирование.

Предметом исследования являются методы получения низкомолекулярных полипептидных молекул на основе мочевины DCL, способных связываться с ПСМА рецептором.

Научная новизна работы состоит в: 1) разработке методов получения новых тканеспецифических полипептидных векторных молекул для доставки к ПСМА, сравнении жидкофазного и твердофазного методов синтеза трипептидной последовательности целевых соединений; 2) получении ранее неизвестных мономодальных конъюгатов синтезированных лигандов с хелатирующим агентом DOTA и производными биспидина; 3) исследовании для полученных конъюгатов с DOTA способности к хелатированию радионуклидов, аффинности к ПСМА рецептору, накопления и интернализации на клеточных культурах РПЖ; 4) разработке методов синтеза неизвестных ранее двойных конъюгатов, включающих в себя цитостатический агент и флуоресцентную метку, на основе ингибитора ПСМА для адресной доставки в клетки злокачественных опухолей простаты; 5) получении нового бимодального диагностического конъюгата с комбинацией функциональных фрагментов «флуоресцентная метка – хелатирующий агент».

Теоретическая и практическая значимость. 1) Проведено сравнение и предложен оптимальный метод синтеза полипептидной линкерной последовательности молекулярных платформ на основе мочевины DCL для адресной доставки к ПСМА рецептору; 2) впервые предложены препаративные методики синтеза мономодальных конъюгатов с хелатирующим агентом DOTA и производными биспирина на основе новых разработанных лигандов ПСМА рецептора; 3) разработана методика получения низкомолекулярных ПСМА-направленных бимодальных конъюгатов с комбинацией структурных фрагментов «цитостатический агент - флуоресцентная метка» и «хелатирующий агент - флуоресцентная метка»; 4) проведено биологическое тестирование моно- и бимодальных ПСМА-направленных конъюгатов с хелатором DOTA; исследована цитотоксическая активность и внутриклеточное распределение полученного тераностического конъюгата; исследовано биораспределение на нормальных мышцах для бимодального диагностического конъюгата.

Методология диссертационного исследования. Целевые соединения были получены с использованием реакций жидкофазного и твердофазного пептидного синтеза, азид-алкинового циклоприсоединения, реакции Штаудингера. Очистка полученных соединений проводилась методами колоночной хроматографии, перегонки, перекристаллизации, экстракции. Структура, состав и чистота полученных соединений определялись методами ТСХ, спектроскопии ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, ВЭЖХ-МС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Стереоселективный синтез полипептидных векторных молекул на основе мочевины DCL может быть осуществлен путем последовательной твердофазной сборки пептидной последовательности линкера, соединения полипептида с векторным фрагментом, присоединения 3-аминопропилазида, и удаления защитных групп;
2. Мономодальные ПСМА-направленные конъюгаты с хелатирующим агентом DOTA получают при взаимодействии $\text{OH-DOTA}(\text{tBu})_3$ с полипептидными векторами с концевыми аминогруппами;
3. Мономодальные ПСМА-направленные конъюгаты с хелатирующим агентом на основе производного биспирина образуются в реакции пропаргил-содержащего биспирина и азид-терминированного векторного фрагмента;
4. Бимодальный тераностический конъюгат с цитостатическим агентом доцетакселом и флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5 может быть получен последовательным присоединением к полипептидной векторной платформе соответствующих функциональных фрагментов;

5. Бимодальный диагностический конъюгат с хелатирующим агентом DOTA и флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5 получается на основе Lys-содержащей векторной платформы ее последовательной модификацией OH-DOTA (tBu)₃ и NHS-SulfoCy5;
6. Синтезированные конъюгаты полипептидных векторных молекул на основе DCL демонстрируют селективность и цитотоксичность в отношении ПСМА-положительных клеточных линий.

Личный вклад автора состоял в поиске и анализе литературных данных, постановке локальных задач, проведении синтетических и аналитических экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке материалов к публикации, представлении полученных результатов на конференциях.

Публикации. По материалам работы опубликованы 11 печатных работ: 3 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ для публикации результатов научно-квалификационных работ, 1 патент и 7 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде докладов на следующих конференциях: V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (Владикавказ, Россия, 10-14 сентября **2018**), IX Российская конференция с международным участием "Радиохимия 2018" (Санкт-Петербург, Россия, 17-21 сентября **2018**), Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней (Красновидово, Россия, 18-21 января **2019**), Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения» (Красновидово, Россия, 17-20 января **2020**), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 10-27 ноября **2020**), Всероссийская конференция «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней». Школа-Конференция молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность» (Сочи, Россия, 8-11 октября **2021**), Кост-2021. Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (Сочи, Россия, 12-16 октября **2021**).

Структура и объем работы. Работа состоит из пяти разделов: введения, обзора литературы на тему «Низкомолекулярные двойные диагностические и терапевтические конъюгаты для направленной доставки к простатическому специфическому мембранному антигену (ПСМА)», обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 215 страницах текста и включает 31 рисунок, 33 схемы, 13 таблиц и список цитируемой литературы из 209 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

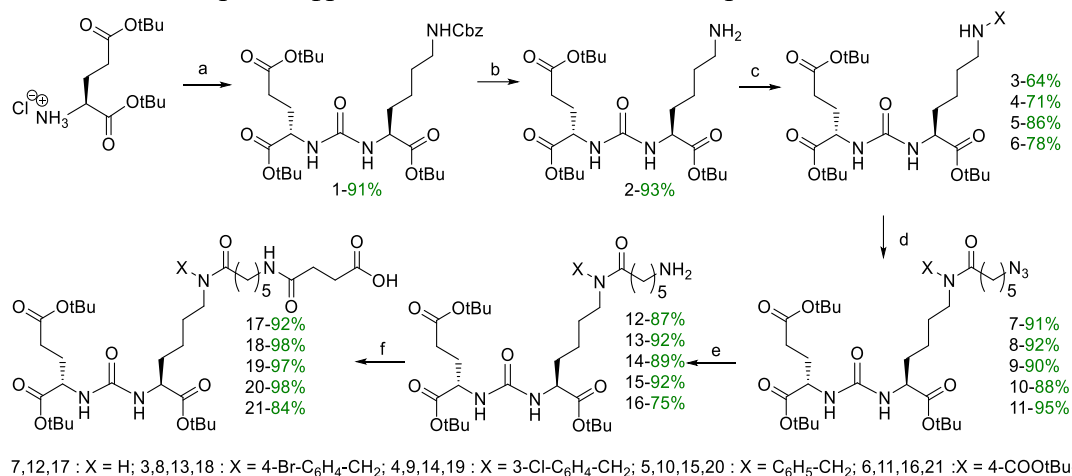
В рамках данной работы была проведена разработка синтетических подходов к новым аффинным и селективным молекулярным платформам для адресной доставки к рецептору ПСМА на основе лиганда DCL и полипептидных линкеров, имеющих в своем составе пептидную последовательность Phe-Phe и ароматический фрагмент при ζ -NH₂K₂ группе фрагмента DCL. На основе разработанных соединений были получены моно- и бимодальные конъюгаты с диагностическими и терапевтическими агентами, структура которых представлена на Рис. 1.

1.1 Получение ПСМА-векторов 17-31.

Синтезированные векторные молекулы **17-31** состоят из двух структурных фрагментов: (1) фрагмент, обеспечивающий направленную доставку конъюгата в клетки рака простаты и (2) полипептидный линкер, обеспечивающий возможность связывания векторного фрагмента с терапевтическими и/или диагностическими агентами и увеличивающий аффинность к ПСМА рецептору. В работе было проведено варьирование структуры линкера и сравнение методов синтеза целевых молекул с использованием жидкофазной и твердофазной последовательностей.

Для синтеза соединений **29-31** использовалась следующая последовательность стадий получения: 1) синтез ПСМА-векторов **17-21**, представляющих собой производные мочевины (Схема 1); 2) получение трипептидного линкера при использовании LPPS или SPPS (путь 1 и 2, Схемы 2, 3); и 3) соединение векторного фрагмента с трипептидным линкером (Схемы 2, 3). Ключевой задачей исследования являлось сравнение эффективности и стереоселективности жидкофазного и твердофазного способов сборки векторов с пептидными линкерами для получения DCL-модифицированных трипептидов **29-31**.

Схема 1. Синтез векторного фрагмента на основе ингибитора ПСМА.



Реагенты и условия: (a) (1) трифосген, DCM, -78°C; (2) H-Lys(Cbz)-O-tBu·HCl, Et₃N, 20°C; (b) H₂, Pd/C (10%), MeOH; (c) (1) 4-Br-C₆H₄-CHO или 3-Cl-C₆H₄-CHO или C₆H₅-CHO или 4-CO₂tBu-C₆H₄-CHO, DCM (2) NaBH₄; (d) PyBOP, DIPEA, DMF, N₃(CH₂)₅COOH; (e) THF/H₂O, Ph₃P, 50°C; (f) (1) S.A., DCM, DIPEA; (2) MeOH; (3) HCl (0.1M). Все аминокислоты имеют L-конфигурацию.

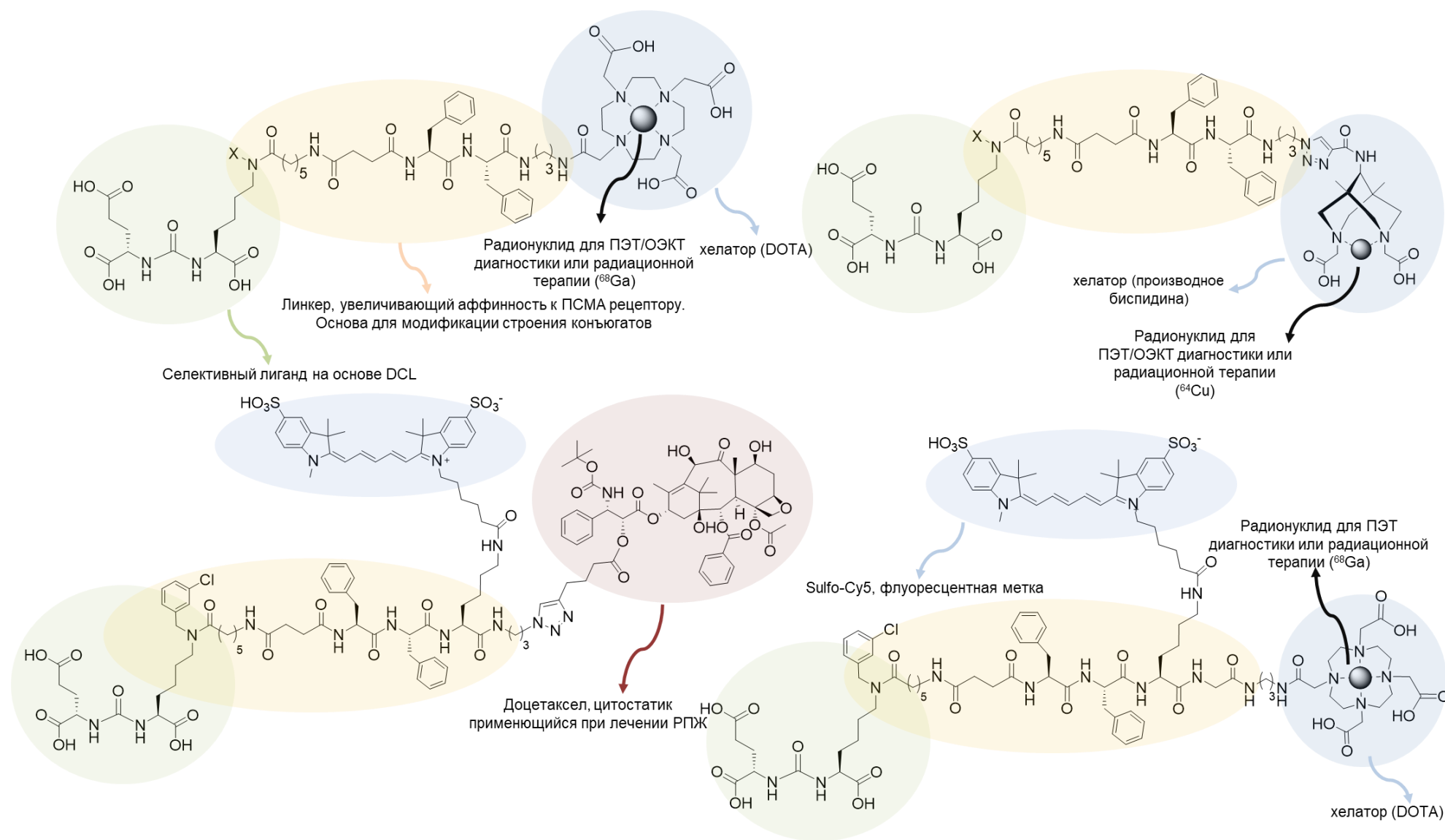
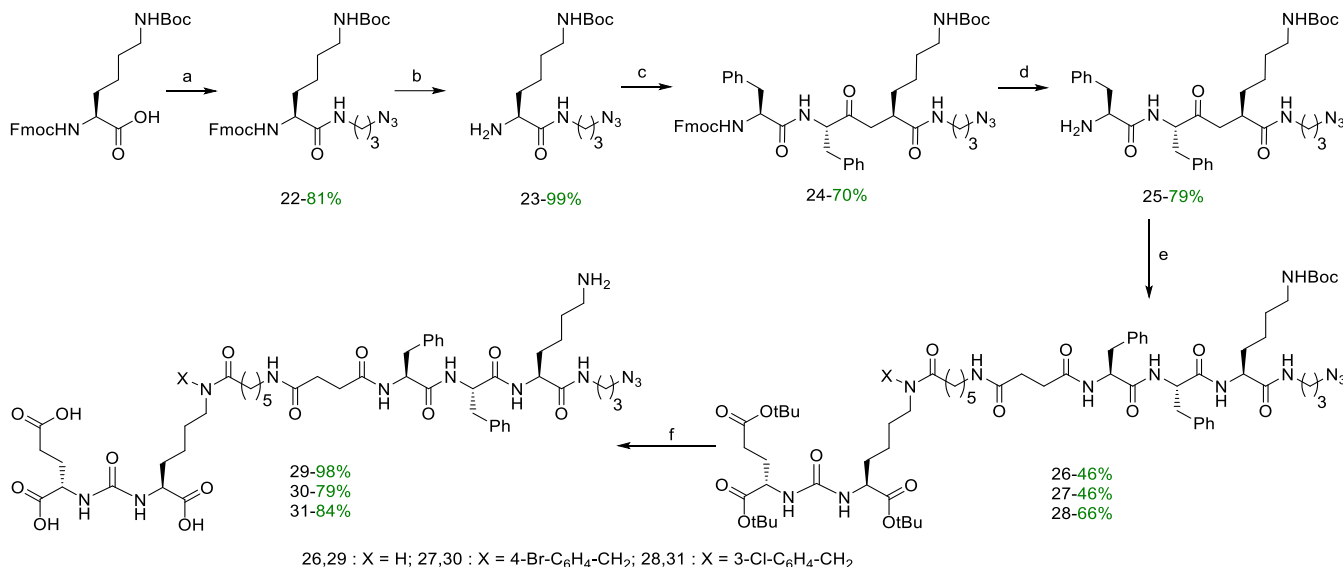


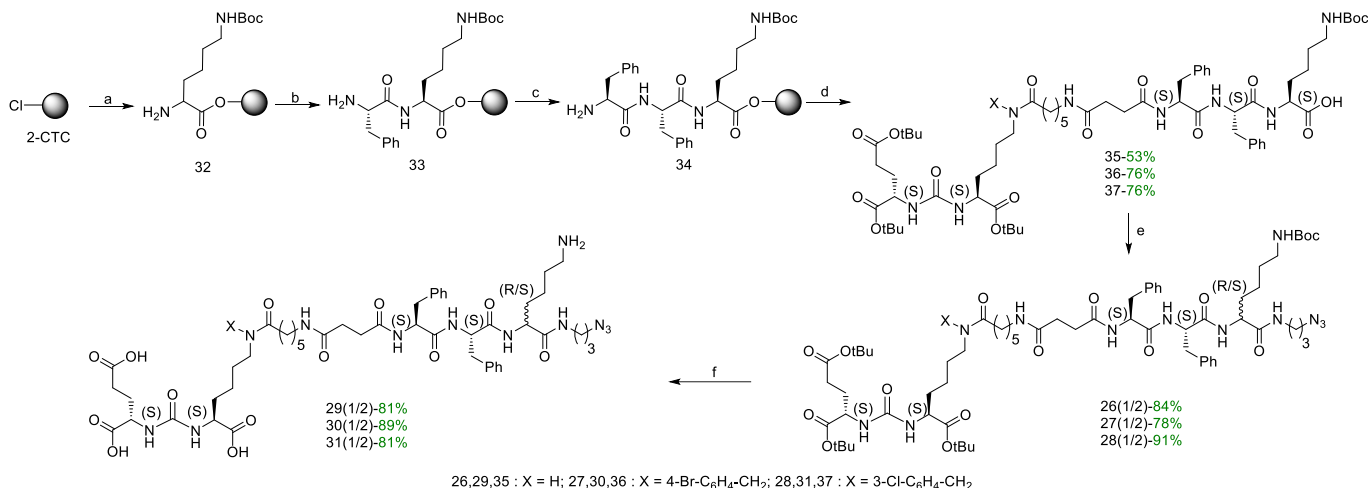
Рис. 1. Моно- и бимодальные конъюгаты, синтезированные в данной работе (X = H; 4-Br-C₆H₄-CH₂- ; 3-Cl-C₆H₄-CH₂- ; C₆H₅-CH₂- ; 4-COOtBu-C₆H₄-CH₂-).

Схема 2. Синтез векторного фрагмента для конъюгации с двумя функциональными фрагментами с использованием жидкофазного метода сборки трипептидной последовательности. Путь 1.



Реагенты и условия: (a) (1) HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (2) N₃(CH₂)₃NH₂; (b) Et₂NH, DMF; (c) HBTU, HOBT, DIPEA, FmocPhePhe-OH, DMF; (d) Et₂NH, DMF; (e) (1) **17**; **18**; **19**, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (2) **25**; (f) DCM/TFA. Все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию.

Схема 3. Синтез векторного фрагмента для конъюгации с двумя функциональными фрагментами с использованием твердофазного метода сборки трипептидной последовательности. Путь 2.



Реагенты и условия: (a) (1) FmocLys(L)(NHBoc), DIPEA, DMF; (2) 4-methylpiperidine/DMF; (b) (1) FmocPhe(L), HBTU, HOBT, DIPEA; (2) 4-methylpiperidine/DMF; (c) (1) FmocPhe(L), HBTU, HOBT, DIPEA; (2) 4-methylpiperidine/DMF; (d) (1) **17**; **18**; **19**, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (2) DCM/TFA; (e) (1) HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (2) N₃(CH₂)₃NH₂; (f) DCM/TFA/TIPS/H₂O. *Примечание:* 1/2 обозначение для смеси эпимеров LLLLL&LLLLD.

Сборка пептидной последовательности. В качестве пептидной последовательности для получения высокоспецифичных векторов ПСМА мы синтезировали трипептиды (Phe(L)-Phe(L)-

Lys(L)-(CH₂)₃-N₃) на основе природных аминокислот *L*-фенилаланин и *L*-лизин; наличие в составе линкера дипептидных фрагментов Phe(L)-Phe(L) улучшает связывание с рецептором, а также может улучшить биоразлагаемость и снизить несистемную токсичность векторов ПСМА. Присоединение к Phe(L)-Phe(L) линкеру дополнительной аминокислоты лизина и азидосодержащего фрагмента обеспечивает возможность дальнейшей модификации терапевтическим и диагностическим препаратами в ортогональных условиях.

Сборка трипептидной последовательности с использованием LPPS. Путь 1. Синтез с использованием жидкофазной сборки пептидной последовательности осуществляли следующим способом (Схема 2): α-Fmoc, ε-Boc-(L)-Лизин вводили в реакцию пептидного синтеза с аминопропилазидом с получением соединения **22**, с которого в дальнейшем удаляли защитную группу Fmoc, получая продукт **23**, содержащий свободную amino-группу. Параллельно был синтезирован Fmoc-защищенный дипептид Phe(L)-Phe(L); реакция пептидного синтеза между соединениями **23** и Fmoc-Phe(L)-Phe(L)-ОН дала продукт **24**, удаление Fmoc защиты с которого позволило получить целевое соединение **25** в виде индивидуального стереоизомера.

Сборка трипептидной последовательности с использованием SPPS. Путь 2. Твердофазная сборка пептидной последовательности проводилась на полимерной подложке из полистирола, сшитого с 1% дивинилбензола (2-СТС, Схема 3) по классической схеме пептидного синтеза: 1) иммобилизация N-замещенной аминокислоты на твердофазную подложку; 2) снятие защитной группы; 3) модификация NH₂-группы аминокислоты (стадии 2 и 3 повторяются необходимое количество раз); 4) удаление модифицированной аминокислотной последовательности с подложки.

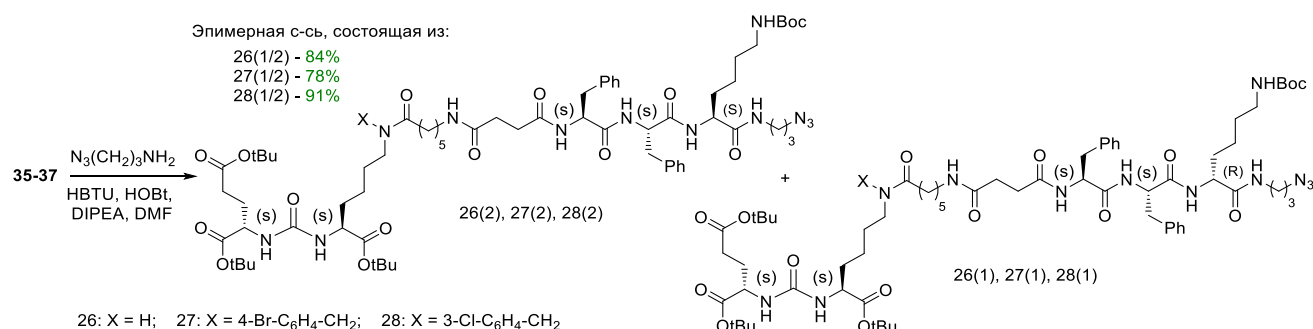
Соединение векторных фрагментов с пептидными последовательностями с получением соединений 26-28. При осуществлении Схемы 2 (жидкофазный метод сборки пептидной последовательности) для соединения трипептида с векторными фрагментами соединения **17**, **18**, **19** проводили реакцию пептидного синтеза с преактивацией карбоксильной компоненты, к которой далее прибавляли пептид **25**. Продукты этих реакций *LLLLL*-**26**, *LLLLL*-**27**, *LLLLL*-**28** были выделены и охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа. Все полученные вещества представляли собой индивидуальные стереоизомеры.

При использовании твердофазного пептидного синтеза (Схема 3), векторный фрагмент присоединяли к закрепленному на смоле 2-СТС трипептиду **34**, после чего модифицированный трипептид удаляли с полимерной подложки обработкой DCM/TFA (Схема 3). В результате были выделены соединения *LLLLL*-**35**, *LLLLL*-**36**, *LLLLL*-**37**, представляющие собой индивидуальные стереоизомеры.

Осуществляя синтетическую Схему 3, далее по свободной карбоксильной группе соединений **35**, **36**, **37** необходимо было присоединить 3-аминопропилазид. На основании литературных данных, такое присоединение может быть проведено одним из трех возможных **методов**: (1) добавление активирующего агента (карбодиимид, соли фосфония и карбения и т. п.) и третичного амина к смеси кислоты и амина; (2) добавление амина к раствору активирующего агента и кислоты; (3) добавление амина к одной из активированных форм кислоты (активированный эфир, ацилазид, ангидрид и т. п.);

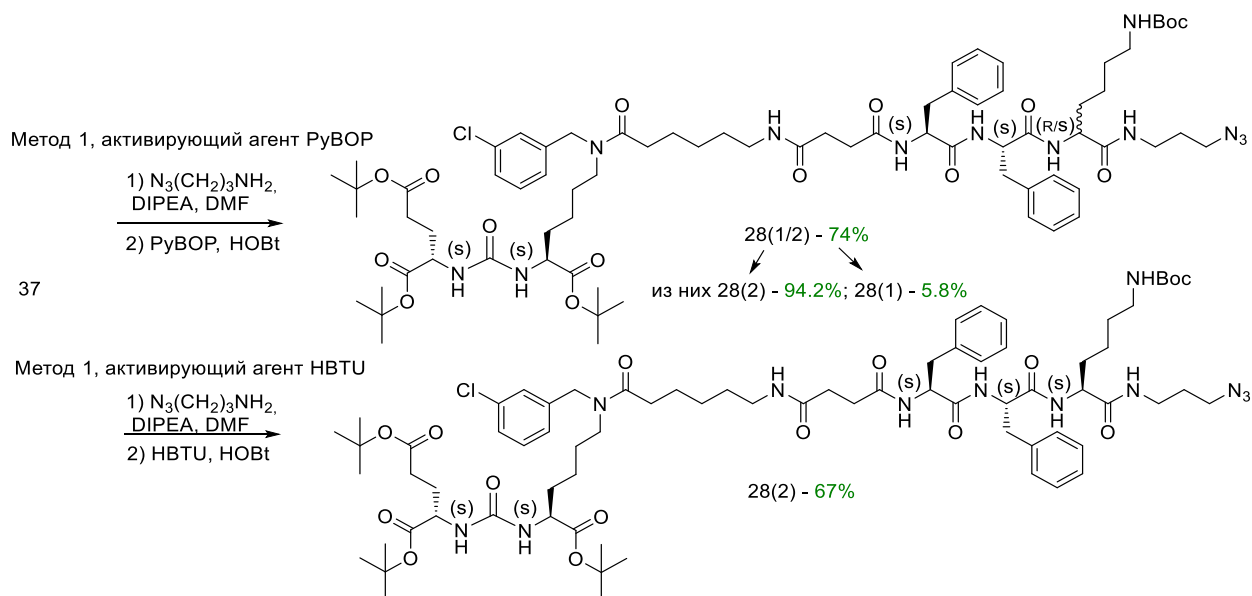
Использование **метода 2** с предварительной активацией карбоксильной компоненты соединений **LLLLL-35**, **LLLLL-36**, **LLLLL-37** (Схема 4) привело к образованию продуктов в виде эпимерной смеси.

Схема 4. Реакция соединений **LLLLL-35**, **LLLLL-36**, **LLLLL-37** с 3-аминопропилазидом по **методу 2**.



Метод 1 без предварительной активации карбоксильной компоненты соединений **LLLLL-35**, **LLLLL-36**, **LLLLL-37** привел к получению индивидуального стереоизомера соединения **28** (Схема 5).

Схема 5. Получение соединения **LLLLL-28** по **методу 1** добавлением активирующего агента и третичного амина к смеси кислоты и амина.



Удаление защитных групп и получение векторных молекул 29, 30, 31. Заключительной стадией синтеза целевых векторных платформ **29, 30, 31** для получения двойных конъюгатов было удаление защитных *трет*-бутильных групп с карбоксильных фрагментов и *Вос* группы с ϵ -NH₂-группы лизина (Схемы 2, 3). Удаление защиты проводили двумя методами: обработкой соединений **26-28** смесью TFA/DCM или системой DCM/TFA/TIPS/H₂O. В результате получили целевые соединения *LLLLL-29, LLLLL-30, LLLLL-31* (при введении в реакцию диастеремерно чистых *LLLLL-26, LLLLL-27, LLLLL-28* по Схеме 2) или смеси диастереомеров *LLLLD&LLLLL-29, LLLLD&LLLLL-30, LLLLD&LLLLL-31* (в случае, если исходные соединения представляли собой смеси диастереомеров).

Полученные пары диастереомеров *LLLLD&LLLLL-29, LLLLD&LLLLL-30, LLLLD&LLLLL-31* были разделены с использованием колоночной хроматографии; все индивидуальные изомеры *LLLLD-29, LLLLL-30, LLLLD-31, LLLLL-29, LLLLD-30, LLLLL-31* были охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа – ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, HRMS, LCMS с полным соотношением сигналов в спектрах ЯМР.

В Таблице 1 приведено сравнение эффективности методик синтеза векторного пептида **31** на основании выхода целевых соединений в расчете на исходную аминокислоту, входящую в состав линкера (Fmoc-Lys(L)(NH*Вос*)), и в расчете на исходный векторный фрагмент лиганда **19**, а также с учетом параметра трудоемкости синтеза, учитывающего общее количество синтетических стадий и количество стадий с хроматографическим выделением целевого продукта.

Синтетический путь 1 (жидкофазный, Схема 2) с применением **метода 2** для создания пептидной связи между **25** и векторным фрагментом лиганда (Схема 2) характеризуется максимальным выходом по вектору **19**, однако минимальным выходом по исходной аминокислоте; помимо этого, общее количество стадий с применением трудоемкого хроматографического выделения также велико.

Синтетический путь 2 (твердофазный, Схема 3) с применением **метода 2** для создания пептидной связи между **35, 36, 37** и 3-аминопропилазидом (Схема 4) имеет наилучший выход по исходной аминокислоте, хороший выход по соединению **19**, а также менее трудоемок, что характерно для всех методов с применением твердофазного синтеза, позволяющих упростить выделение целевых веществ и избежать дополнительных стадий очистки. Однако использование данной последовательности на стадии присоединения 3-аминопропилазида приводит к эпимеризации и получению смеси диастереомеров (Схема 4), которые возможно разделить, но выход целевого продукта **31(2)-(LLLLL)** при этом резко падает.

Синтетический путь 2 (твердофазный, Схема 3) с применением **метода 1** для создания пептидной связи между **37** и 3-аминопропилазидом (Схема 5) при активации HBTU

представляется оптимальным, так как позволяет получить необходимый индивидуальный *LLLLL*-изомер целевого соединений с хорошими выходами как по исходной аминокислоте, так и по соединению **19**.

Таблица 1. Сравнение исследованных подходов к получению векторных молекул **29-31**.

	Путь 1 (Схема 2) Метод 2 при взаимодействии 25 и 19 (добавление амина к раствору активирующего агента, третичного амина и кислоты)	Путь 2 (Схема 3) Метод 2 при взаимодействии 37 и 3-аминопропилазида (добавление амина к раствору активирующего агента, третичного амина и кислоты, Схема 4)	Путь 2 (Схема 3) Метод 1 при взаимодействии 37 и 3-аминопропилазида (добавление активирующего агента и третичного амина к смеси кислоты и амина, Схема 5)
Выход по исходной аминокислоте Fmoc-Lys(L)(NH ₂ Boc), входящей в состав линкера	25%	Общий выход 56% (31(1) -24%; 31(2) -32%)	45%
Выход по вектору 19	55%	Общий выход 47% (31(1) -20%; 31(2) -27%)	37%
Общее количество стадий синтеза (в том числе с хроматографическим разделением)	13 (10)	16 (7)	16 (7)

Таким образом, в данной части работы была разработана общая методика стереоселективного синтеза векторных молекул **29-31** для доставки к ПСМА-рецептору на основе мочевины DCL с трипептидным линкером, имеющих в составе амидную и азидную терминальные группировки для последующего присоединения терапевтических и/или диагностических агентов. Определены условия стереоселективного проведения синтеза. Выявлена оптимальная методика стереоселективного синтеза молекулярных платформ на основе полипептидов для направленной доставки терапевтических и/или диагностических агентов к рецептору ПСМА, заключающаяся в твердофазной сборке пептидной последовательности линкера, соединении полипептида с векторным фрагментом, последующем присоединении 3-аминопропилазида, и заключительном удалении защитных групп.

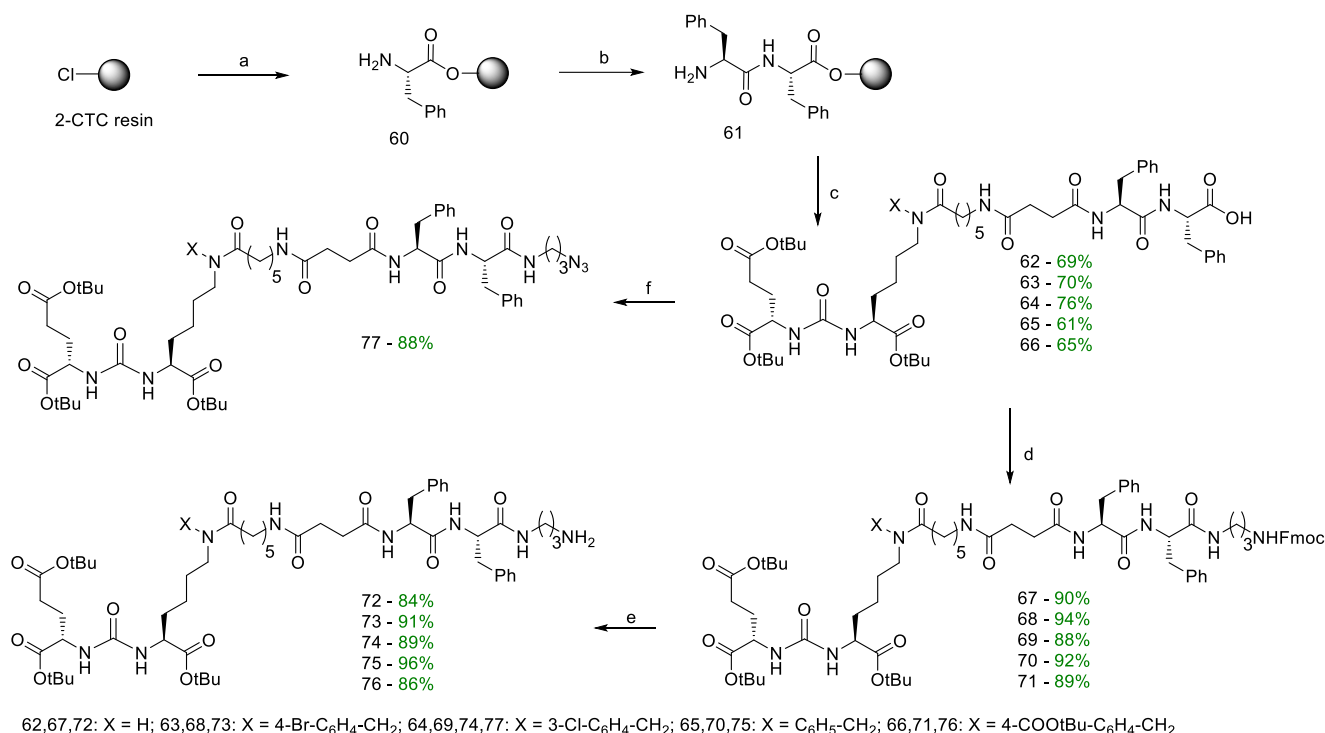
2. Синтез векторных молекул для конъюгации с одним функциональным фрагментом.

В данном разделе работы была проведена разработка и оптимизация синтетических подходов к молекулярным платформам для адресной доставки к ПСМА рецептору, имеющих в составе одну терминальную группу для последующего присоединения функциональных фрагментов, в качестве которых в работе были использованы хелатирующие группировки различной природы. Общая синтетическая схема получения целевых векторных платформ представлена на Схеме 6.

Начальные стадии синтеза ПСМА-векторов были аналогичны описанным в разделе 1 для получения соединений **17-21** (Схема 1). Сборку пептидной последовательности проводили по

описанному в разделе 1 способу с применением твердофазного метода синтеза. Векторный фрагмент был присоединен к закрепленному на смоле 2-СТС дипептиду **39**, после чего этого модифицированный пептид был удален с полимерной подложки с получением соединения **62-66** (Схема 6).

Схема 6. Синтез векторных молекул для конъюгации с одним функциональным фрагментом.

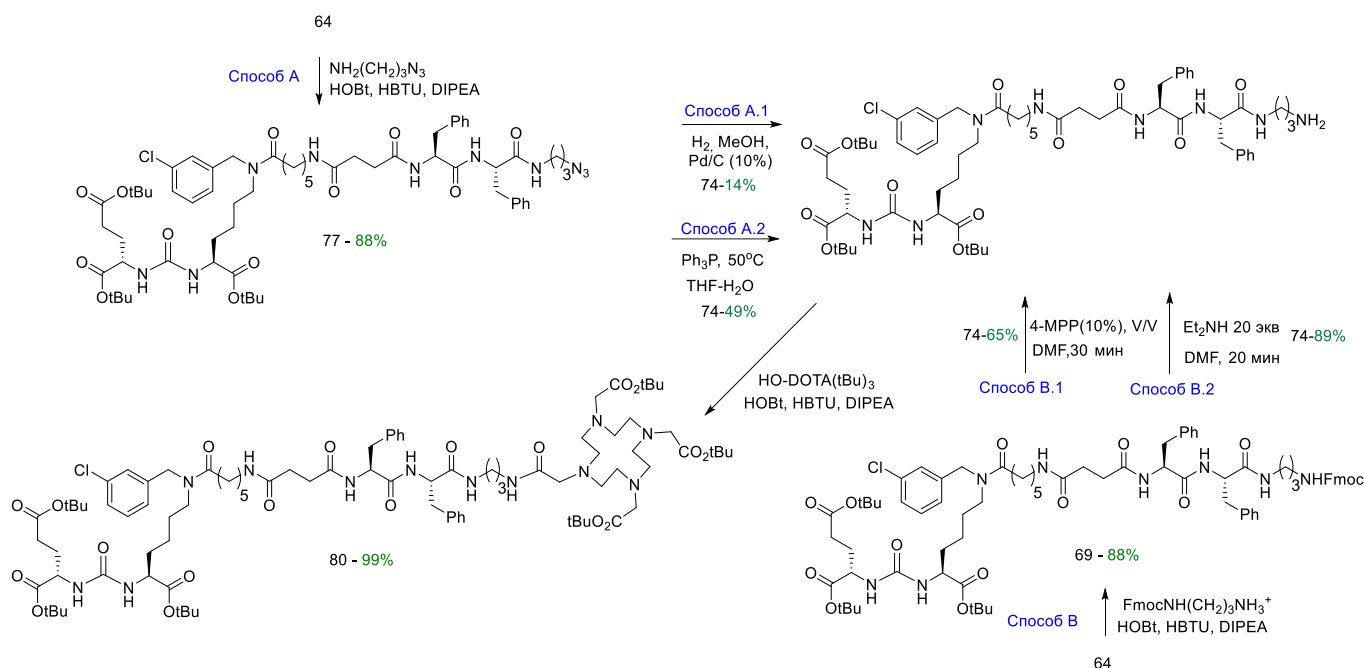


Реагенты и условия: (a) (1) FmocPhe(L), HBTU, HOBT, DIPEA; (2) 4-метилпиперидин/DMF; (b) (1) FmocPhe(L), HBTU, HOBT, DIPEA; (2) 4-метилпиперидин /DMF; (c) (1) **17-21**, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (2) DCM/TFA (99.25%/0.75%; V/V); (d) FmocNH(CH₂)₃NH₃⁺TFA⁻, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (e) Et₂NH/DMF; (f) NH₂(CH₂)₃N₃, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF. Все аминокислоты имеют L-конфигурацию.

В качестве векторного фрагмента для оптимизации методов введения в молекулу хелатора DOTA было выбрано соединение **64**. Все испробованные в данной работе варианты конъюгирования векторной молекулярной платформы **64** с DOTA представлены на Схеме 7.

Оптимизация методики получения соединений **74**, **77** с использованием показанных на Схеме 7 **Способов А и В** продемонстрировала, что оптимальным является использование твердофазного пептидного синтеза, с дальнейшим присоединением фрагмента NH₂(CH₂)₃NHFmoc, снятием Fmoc защиты с использованием Et₂NH и получением продукта с концевой NH₂ группой (**Способ В.2**). При проведении реакции в данных условиях с последующей очисткой высаживанием в Et₂O и обращенно-фазовой колоночной хроматографией продукт **74** был выделен с выходом 89%. Эта методика использовалась нами в дальнейшем для получения соединений **72-76** (Схема 6) с выходами 84-96%.

Схема 7. Соединение векторной платформы **64** с хелатором DOTA.



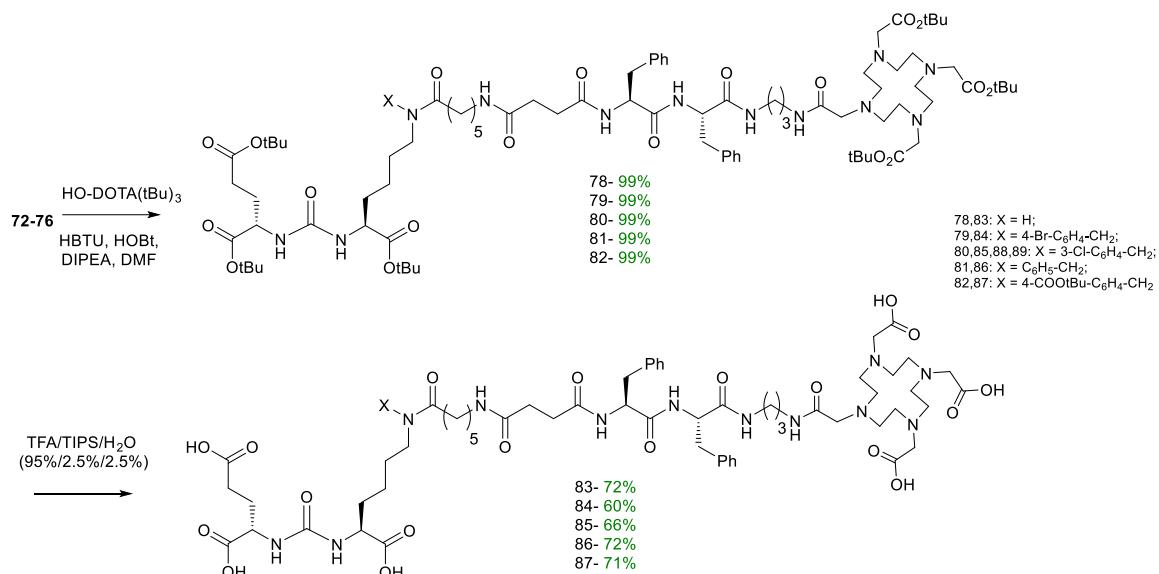
3. Получение мономодальных конъюгатов.

На следующем этапе работы, чтобы продемонстрировать возможность использования соединений **72-76** и **77** в качестве молекулярных платформ для получения мономодальных конъюгатов, были получены их функциональные производные **83-87** и **89**, содержащие хелатирующие группировки различной природы (Схема 8).

Получение мономодальных конъюгатов с DOTA. Для получения мономодальных ПСМА-направленных конъюгатов **83-87** к концевой аминогруппе соединений **72-76** был присоединен коммерчески доступный хелатирующий агент DOTA. Этот хелатор был выбран нами из-за его отличных хелатирующих свойств по отношению к ^{68}Ga (ПЭТ/КТ диагностика) и ^{177}Lu (радионуклидная терапия) и многочисленных примеров успешного биомедицинского применения.

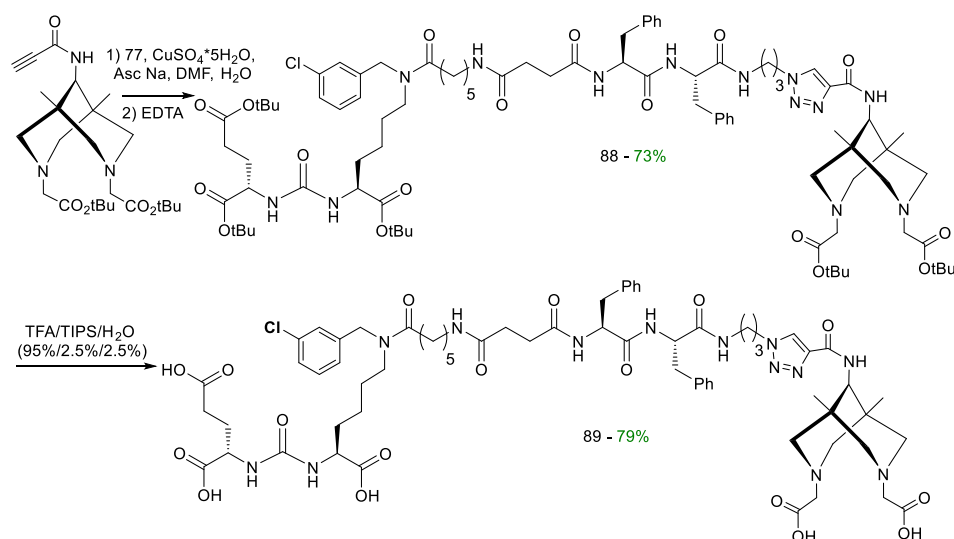
Для введения хелатирующего агента DOTA с созданием амидной связи мы использовали OH-DOTA(tBu)₃ для получения соединений **78-82** с использованием **метода 2** (Схема 4) для объединения пептидных последовательностей. На следующей стадии синтеза защитные *трет*-бутильные группы соединений **78-82** удаляли обработкой смесью TFA/TIPS/ H_2O . Таким образом были получены целевые соединения **83-87** с выходами от 60% до 72% (Схема 8).

Схема 8. Синтез конъюгатов с хелаторами на основе DOTA.



Получение мономодальных конъюгатов с производным биспидина. Выбор биспидина в качестве координирующего ион металла фрагмента был обусловлен его высокой способностью к хелатированию радионуклида ⁶⁴Cu и образованию устойчивых комплексов, который широко используется для диагностики методом ПЭТ. Для получения конъюгата **89** азид **77** и пропаргил-содержащий биспидин (Схема 9)¹ вводили в реакцию CuAAC. После присоединения хелатора проводили удаление защитных *трет*-бутильных групп обработкой соединения **88** системой TFA/TIPS/H₂O.

Схема 9. Синтез конъюгата с хелатором на основе биспидина.



¹Исходный биспидин был предоставлен д.х.н., проф. С.З. Вацадзе и к.х.н., м.н.с. А.В. Медведько (Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова)

4. Исследование хелатирующей способности соединений 83-87 по отношению к ^{68}Ga , проникновения образующихся хелатов через клеточную мембрану и их накопления в клетках.²

Полученные конъюгаты DOTA с векторами ПСМА далее были протестированы на возможность хелатирования ^{68}Ga ; в результате были получены соединения $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-83}$ - $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-87}$. Определение радиохимической чистоты полученных препаратов было выполнено методами радио-ВЭЖХ и радио-ТСХ. Радиохимическая чистота всех препаратов $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-83}$ - $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-87}$, используемых для биологических исследований, составляла $\geq 98\%$.

Для изучения рецепторного связывания *in vitro* использовали линии клеток рака предстательной железы человека, экспрессирующих (22Rv1) и не экспрессирующих (PC-3) ПСМА. Полученные результаты представлены на Рис. 2, 3.

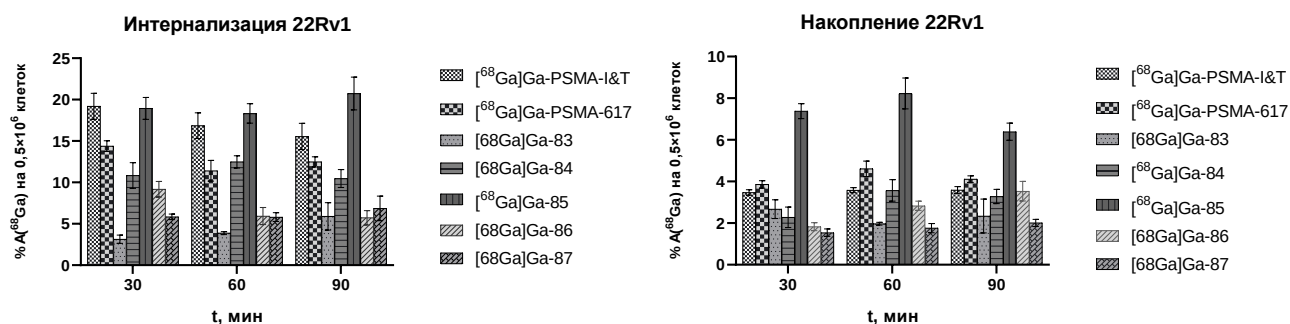


Рис. 2. Накопление и интернализация ^{68}Ga -содержащих конъюгатов **83-87** на клеточной культуре 22Rv1.

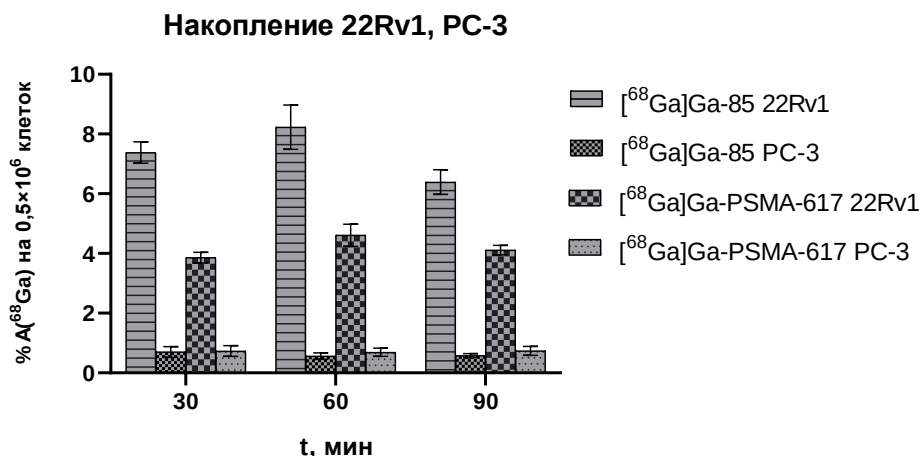


Рис. 3. Сравнение накопления ^{68}Ga -содержащего конъюгата **85** и PSMA-617 на клеточных культурах 22Rv1 и PC-3.

По данным проведенных исследований, конъюгат **85** является наиболее эффективным ПСМА-вектором (его накопление и интернализация на ПСМА-экспрессирующей клеточной

² Данная часть работы выполнена совместно с ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (к.х.н., н.с. Ларенков А.А.)

линии 22Rv1 приблизительно вдвое превышает литературные аналоги), тогда как конъюгаты **83**, **84**, **86**, **87** оказались сопоставимы с ранее описанными соединениями PSMAI&T и PSMA-617.

Таким образом, в разделах 3 и 4 данной работы была проведена разработка методов синтеза соединений для адресной доставки хелатирующих агентов к рецептору ПСМА. Показано, что оптимальным является путь получения целевых соединений при помощи твердофазного пептидного синтеза, с дальнейшим присоединением фрагмента $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NHFMoc}$, снятием Fmoc защиты с использованием Et_2NH и получением продукта с концевой NH_2 группой, его последующим сочетанием с хелатором DOTA и удалением *трет*-бутильных защит в системе TFA/TIPS/ H_2O .

По результатам проведенных исследований по оценке накопления соединений **83-87** в клетках и интернализации в зависимости от количества ПСМА на поверхности клетки показано, что конъюгат **85** является наиболее эффективными ПСМА-вектором, тогда как конъюгаты **83**, **84**, **86**, **87** сопоставимы с PSMA I&T и PSMA-617. Таким образом, конъюгат **85** представляется наиболее перспективным для его дальнейшего исследования *in vivo*.

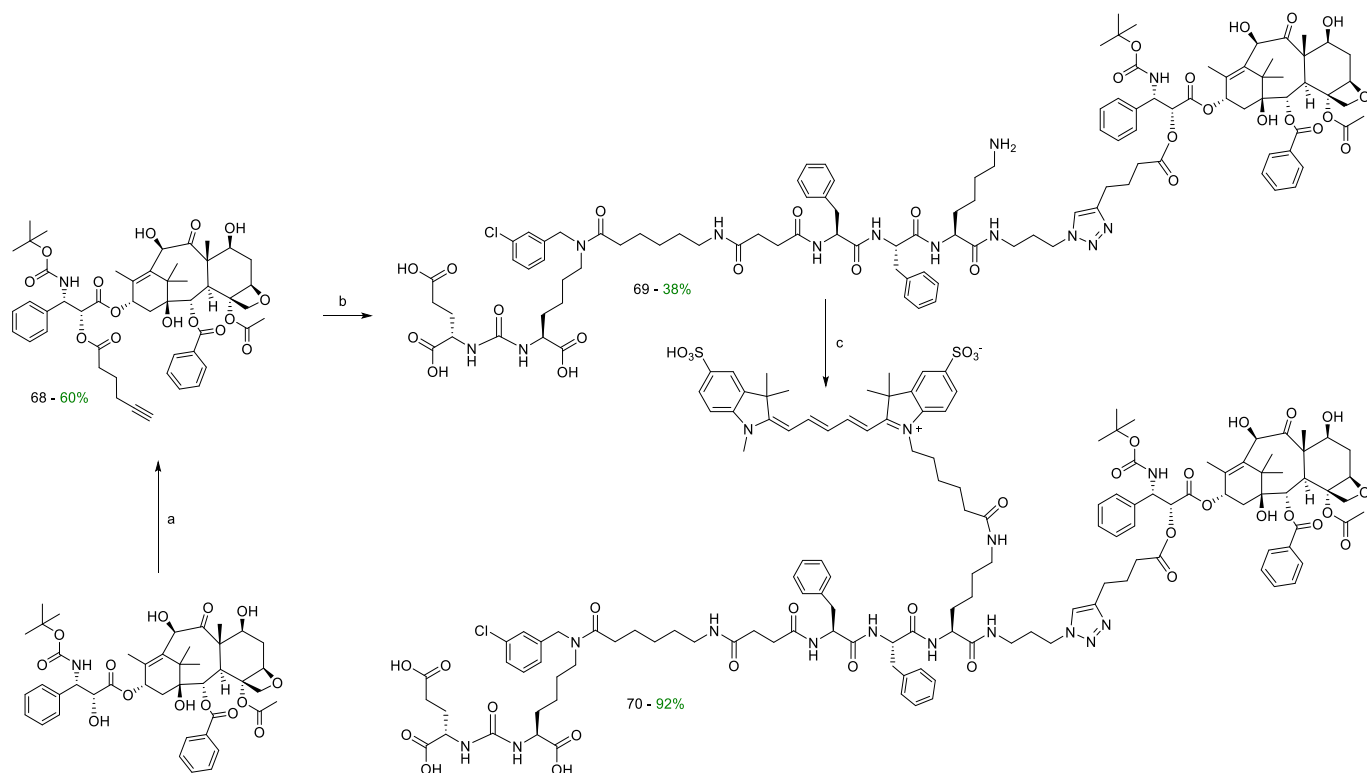
5. Получение бимодальных конъюгатов и их биологическое тестирование.

5.1. Синтез бимодального тераностического конъюгата 92.

На следующем этапе работы, чтобы продемонстрировать возможность использования соединений **29-31** в качестве молекулярных платформ для получения бимодальных ПСМА-направленных конъюгатов, был синтезирован двойной конъюгат соединения **31** с противоопухолевым препаратом доцетакселом и флуоресцентным красителем Sulfo-Cy5.

Для этого была проведена реакция доцетаксела (DTX) с гекс-5-иновой кислотой с получением соединения **90** (Схема 10). Для получения конъюгата **91** из азида *LLLLL*-**31** и алкина **90** использовалась реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая медью (I). На следующем этапе NHS-активированный сложный эфир флуоресцентной метки Sulfo-Cy5 был присоединен к свободной NH_2 -группе соединения **91**. В результате был получен целевой бимодальный конъюгат **92**.

Схема 10. Синтез бимодального конъюгата доцетаксел/sulfoCy5 **92**.



Реагенты и условия: (a) Гекс-5-иновая к-та, DMAP, DCM; (2) DIC; (b) (1) **31**, CuSO₄*5H₂O, аскорбат натрия, DMF, H₂O; (2) EDTA; (c) (1) DIPEA, DMF; (2) sulfo-Cyanine 5 NHS-активированный эфир.

5.2 Биологическое тестирование соединения **92**³

На первом этапе биологического тестирования была исследована селективность конъюгата **92** по отношению к трем линиям клеток рака простаты человека, которые различаются по уровню экспрессии ПСМА: LNCaP (PSMA++), 22Rv1 (PSMA+) и PC-3 (PSMA-) с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные данные продемонстрировали, что эффективность избирательного взаимодействия конъюгата **92** с клетками LNCaP выше, чем с клетками 22Rv1, а взаимодействие соединения **92** с клетками PC-3 значительно слабее, чем с обеими исследованными ПСМА-положительными клеточными линиями.

Кроме того, бимодальный конъюгат **92**, а также его синтетические предшественники (конъюгат **91**, содержащий доцетаксел, но не содержащий флуоресцентной метки, пептидный вектор LLLLL-**31** и доцетаксел в качестве вещества сравнения) оценивали на цитотоксичность *in vitro* по отношению к двум ПСМА-положительным клеточным линиям LNCaP и 22Rv1 (Рис. 6). Конъюгаты **91** и **92** показали хорошую активность в отношении обеих клеточных линий с несколько более выраженным действием на клетки LNCaP: для LNCaP IC₅₀ = 100 нМ и 200 нМ

³ Биологические исследования выполнены совместно с лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» МИСиС, к.б.н., н.с. Гараниной А.С.

соответственно, а для 22Rv1 $IC_{50} = 130$ нМ и >200 нМ. Доцетаксел сам по себе вызывал значительную гибель клеток в обеих культурах: для LNCaP $IC_{50} = 1$ нМ и для 22Rv1 $IC_{50} = 2,1$ нМ. Эти данные согласуются с селективностью полученных конъюгатов по отношению к клеточным линиям, экспрессирующим ПСМА.

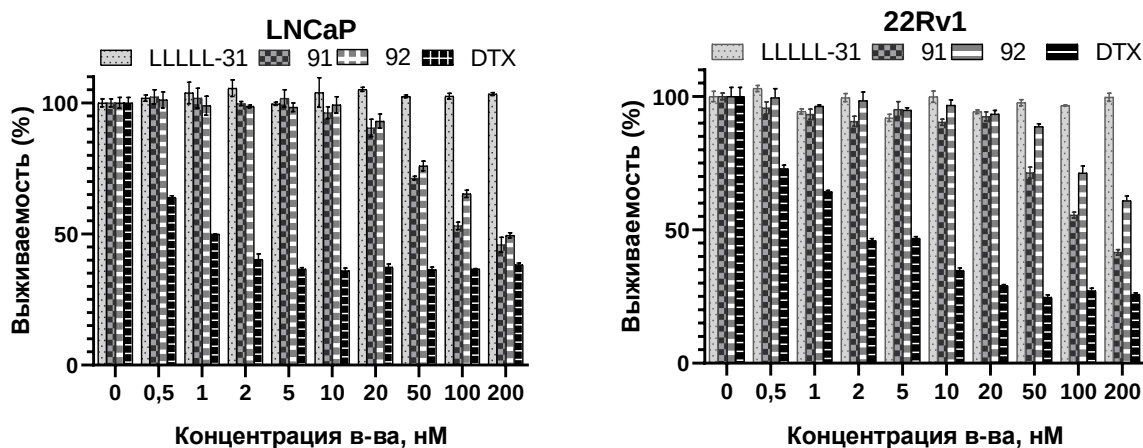


Рис. 6. Цитотоксичность соединений *LLLLL-31*, **91**, **92** и доцетаксела (DTX) по отношению к клеточным линиям LNCaP и 22Rv1. MTS-тест.

Основываясь на этих данных, можно сделать вывод, что разработанный конъюгат демонстрирует селективность и токсичность в отношении ПСМА-положительных клеток и, следовательно, перспективен для дополнительного более подробного исследования для направленной доставки, по крайней мере, в ПСМА-сверхэкспрессирующие клетки LNCaP. Важно подчеркнуть, что соединение **92** является первым описанным в литературе примером низкомолекулярного бимодального ПСМА-направленного тераностического конъюгата с комбинацией флуоресцентной метки и цитостатического агента. При этом набор вводимых в молекулу полученных векторных платформ **29-31** фрагментов не ограничивается использованной в соединении **92** комбинацией «доцетаксел - SulfoCy5», и может быть расширен с получением библиотеки бимодальных терапевтических, диагностических и тераностических конъюгатов с различным набором функциональных фрагментов.

5.3. Синтез бимодального диагностического конъюгата **97**.

На основе Lys-содержащей векторной платформы **51** мы также синтезировали бимодальный диагностический конъюгат **97** (Схема 11), содержащий хелатирующий агент DOTA и флуоресцентный краситель Sulfo-Cy5.

Вначале, в качестве ортогональной, относительно ζ -NH(Boc), функциональной группы в векторную молекулу **51** был введен фрагмент $NH_2(CH_2)_3NH$ Fmoc). Реакция была выполнена по методу **2** (Схема 4), в результате с выходом 92% получили соединение **93**, охарактеризованное данными HRMS, LCMS, 1H ЯМР, ^{13}C ЯМР. Далее провели удаление защитной группы Fmoc обработкой соединения **93** смесью Et_2NH -DMF; продукт **94** был выделен с выходом 89%.

Последующая реакция соединения **94** с OH-DOTA(tBu)₃ проводилась с использованием HBTU как активирующего агента и привела к получению соединения **95** с выходом 97%.

Последующее удаление *трет*-бутильных и Вос защитных групп выполняли по оптимизированной методике (Раздел 3) с использованием системы TFA/TIPS/H₂O, что позволило минимизировать количество образующихся побочных продуктов. Соединение **96** было получено с выходом 92%. На заключительном этапе была проведена реакция между NHS-SulfoCy5 и соединением **96**. В результате был получен конечный конъюгат **97** с выходом 86%. Структура и чистота конечного и промежуточного продуктов были подтверждены методами HRMS, LCMS, ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, а также 2D ЯМР.

5.4 Биологическое тестирование соединения 97⁴

Для соединения **97** и его синтетического предшественника **96** было проведено первичное биологическое исследование с целью оценки нормального распределения в различных органах на животных моделях *in vivo* (Таблица 2).

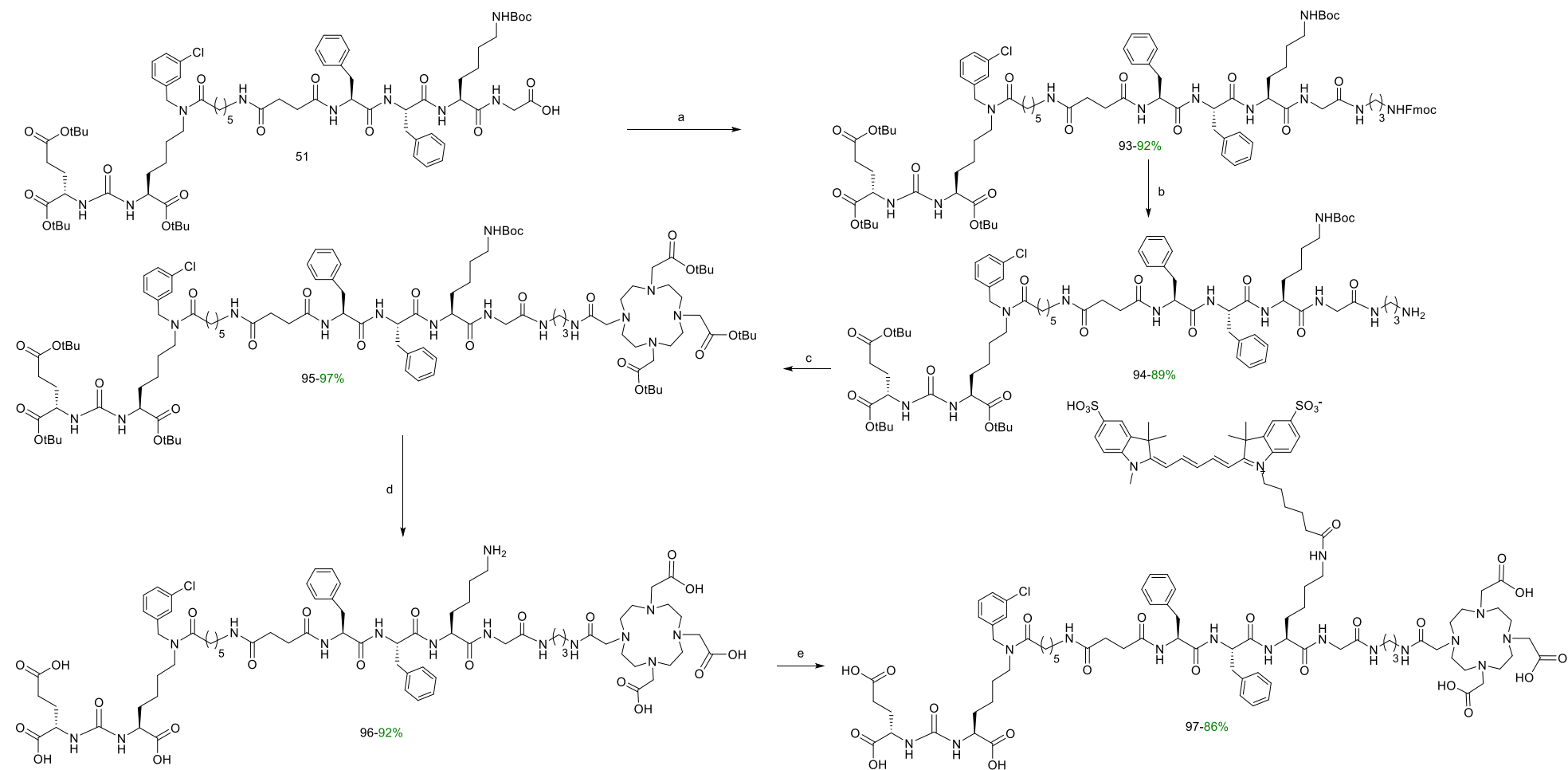
Таблица 2. Нормальное биораспределение соединений **96** и **97** на мышинных моделях.

	ID/г, %							
	30 мин		60 мин		90 мин		120 мин	
	96	97	96	97	96	97	96	97
Кровь	0,52±0,11	0,42±0,14	0,3±0,1	0,26±0,03	0,1±0,02	0,33±0,05	0,08±0,02	0,4±0,03
Печень	0,1±0,02	0,09±0,04	0,08±0,02	0,06±0,01	0,03±0,02	0,08±0,03	0,05±0,01	0,09±0
Почки	7,17±1,52	2,36±0,74	8,42±2,62	2,12±0,21	6,9±0,83	4,04±0,96	7,47±0,56	4,68±0,3
Простата	0,2±0,09	0,05±0,02	0,06±0,01	0,04±0,02	0,06±0,02	0,05±0,02	0,05±0,01	0,04±0,02
Мышца	0,09±0,03	0,04±0,03	0,06±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,06±0,02	0,04±0,03	0,05±0,01
Слюн. Ж.	0,15±0,07	0,1±0,01	0,09±0,03	0,07±0,02	0,05±0,02	0,07±0,02	0,07±0,02	0,06±0,01

Из полученных результатов видно, что для соединения **97** содержание в кровотоке практически не изменяется во времени, в отличие от моноконъюгата **96**, максимум содержания в крови, для которого наблюдается при 30 мин., и далее постоянно снижается. Помимо этого, содержание бимодального конъюгата **97** в почках во всех временных точках оказалось заметно ниже, чем для соединения **96**. Поскольку накопление в почках и быстрое выведение из кровотока представляет собой существенную проблему использования большинства ПСМА-направленных конъюгатов, соединение **97** тем самым демонстрирует потенциал для дальнейших более подробных исследований.

⁴ Данная часть работы выполнена совместно с ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (к.х.н., н.с. Ларенков А.А.)

Схема 11. Синтез бимодального диагностического конъюгата 97.



Реагенты и условия: (a) FmocNH(CH₂)₃NH₃⁺TFA⁻, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (b) Et₂NH/DMF; (c) HO-DOTA(tBu)₃, HBTU, HOBT, DIPEA, DMF; (d) TFA/TIPS/H₂O (95%/2.5%/2.5%; V/V).; (e) (1) DIPEA, DMF; (2) sulfo-Cyanine 5 NHS-активированный эфир

ВЫВОДЫ

1. Разработана стратегия стереоселективного синтеза векторных молекул для доставки к простатическому специфическому мембранному антигену на основе мочевины DCL (((S)-5-амино-1-карбоксипентил)карбамоил)-L-глутаминовая кислота) с трипептидными линкерами, имеющих в составе амидную и азидную терминальные группы для последующего присоединения терапевтических и/или диагностических агентов.

2. Предложены методы синтеза новых мономодальных ПСМА-направленных конъюгатов с хелатором DOTA и дипептидным линкером между хелатирующим и векторным фрагментами.

3. Разработан метод синтеза мономодальных ПСМА-направленных конъюгатов, содержащих биспидиновый фрагмент.

4. Впервые синтезирован бимодальный тераностический конъюгат для доставки к простатическому специфическому мембранному антигену с цитотоксическим препаратом (доцетаксел) и флуоресцентной меткой (Sulfo-Cy5). Показана общая возможность создания и селективного действия бимодальных конъюгатов для направленной доставки к ПСМА рецептору на основе разработанной молекулярной платформы.

5. Впервые синтезирован бимодальный диагностический конъюгат векторной молекулы на основе DCL для доставки к простатическому специфическому мембранному антигену с хелатирующим агентом (DOTA) и флуоресцентной меткой (Sulfo-Cy5).

6. По результатам первичного биологического тестирования полученных моно- и бимодальных конъюгатов *in vitro* и *in vivo* продемонстрирована их селективность и цитотоксичность в отношении ПСМА-положительных клеточных линий.

Основные результаты работы изложены в публикациях:

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. **Petrov S.A.**, Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Zyk N.Yu, 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 for targeted delivery of bimodal agents to PSMA receptor and its Docetaxel/Sulfo-Cy5-containing conjugate. // Molecules. – 2020. – V. 25. – № 24, P. 5784. Impact Factor (Web of Science) = **4.412**.

2. **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. // Journal of Molecular Structure. – 2021. – V. 1234. – P. 130127. Impact Factor (Web of Science) = **3.196**.

3. **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. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. - № 113752. Impact Factor (Web of Science) = **6.514**.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

4. Мачулкин А.Э., Мажуга А.Г., Бер А.П., **Петров С.А.**, Иваненков Я.А., Скворцов Д.А., Белоглазкина Е.К., Егорова Б.В., Калмыкова Т.П. Соединение для диагностики опухолей, экспрессирующих ПСМА, и композиция на его основе // Патент № RU2730507C1, 2020.

5. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э. Синтез конъюгатов на основе ингибитора простатического специфического мембранного антигена для адресной доставки диагностических агентов. // WSOC 2019. Марковниковские Чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней. Красновидово, Россия, 18-21 января 2019, с. 78.

6. Калмыкова Т.П., Егорова Б.В., Калмыков С.Н., **Петров С.А.**, Зык Н.В., Ларенков А.А., Кодина Г.Е., Белоглазкина Е.К., Мажуга А.Г., Мачулкин А.Э. // IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018», Санкт-Петербург, Россия, 17–21 сентября 2018, с 498.

7. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э., Ларенков А.А., Калмыков С.Н., Белоглазкина Е.К., Мажуга А.Г., Зык Н.В., Кодина Г.Е. Синтез конъюгатов на основе ингибитора простатического специфического мембранного антигена для адресной доставки диагностических и агентов. // V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии, Владикавказ, Россия, 10-14 сентября 2018, с. 425

8. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э., Зык Н.Ю., Нищенко Е.А. Двойные конъюгаты диагностических агентов и противоопухолевых препаратов с лигандами простатического специфического мембранного антигена. // Всероссийская научная конференция «Марковниковские Чтения» (WSOC-2020), Красновидово, Россия, 17-20 января 2020, с. 77

9. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э., Успенская А.А. Дизайн и синтез конъюгатов для адресной доставки диагностических и терапевтических агентов с лигандами простатического специфического мембранного антигена. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», Москва, Россия, 10-27 ноября 2020, с. 883.

10. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э., Зык Н.Ю., Успенская А.А. Синтез конъюгатов на основе ингибитора ПСМА с хелатирующим агентом DOTA для адресной доставки диагностического радионуклида ⁶⁸Ga. // «Кост-2021». Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений, Сочи, Россия, 12-16 октября 2021, с. 133

11. **Петров С.А.**, Мачулкин А.Э., Зык Н.Ю., Успенская А.А. Синтез и изучение гелирующих свойств низкомолекулярного пептидного гелеобразователя содержащего Fmoc и мочевиновую группы. // WSOC 2021. Марковниковские Чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней, Сочи, Россия, 8-11 октября 2021, с. 71