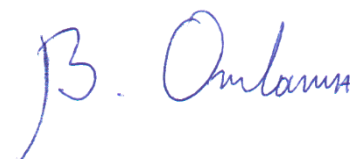


*На правах рукописи*



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 пор 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.

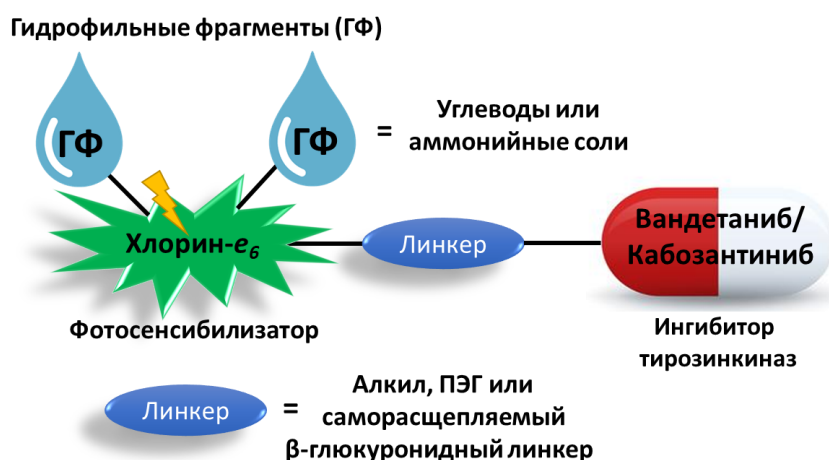
Особенно эффективными показали себя конъюгированные агенты на основе фотосенсибилизаторов, связанных с цитостатиками. В таких соединениях

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*<sub>6</sub>, 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*<sub>6</sub>, 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*<sub>6</sub> 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 IC<sub>50</sub> (в темноте) / IC<sub>50</sub> (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*<sub>6</sub>, 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 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), 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-спектрофлуориметрии. 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-*e6*, 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 ферментативного расщепления ферментативно-расщепляющего конъюгата цинкового металлокомплекса хлорина-*e6*, 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*<sub>6</sub>, 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 методике<sup>1</sup> (**Схема 1**). На следующем этапе с помощью реакций алкилирования и азидирования были синтезированы соединения **3** и **4** на основе вандетаниба, содержащие различные линкеры.

---

<sup>1</sup> Международный патент WO 2010/028254 A2, 2010.



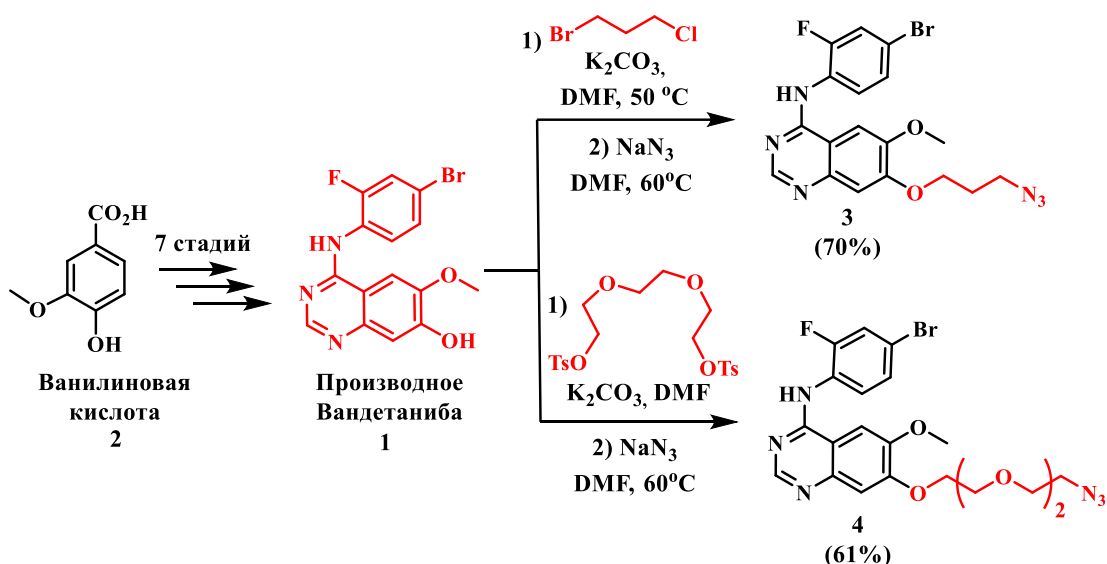


Схема 1

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 Штеглиху<sup>2</sup> 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  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ .

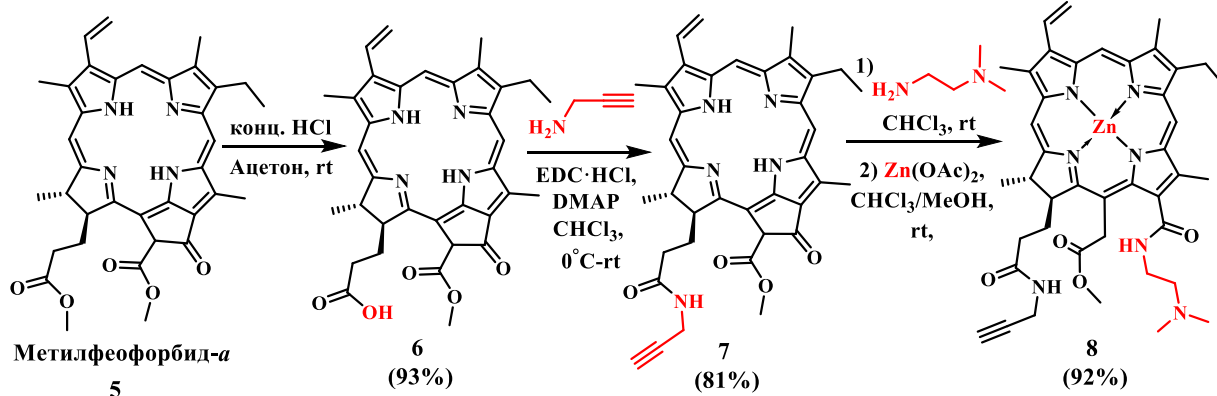


Схема 2

Конъюгат **9** получен из строительных блоков **3** и **8** по реакции CuAAC в присутствии ТВТА-лиганда<sup>3</sup> с выходом 72% (Схема 3). В конъюгате **9** периферическая двойная связь у хлоринового макроцикла была дважды диметиламинометилирована под действием (бисдиметиламино)метана в кислой среде<sup>4</sup> с выделением производного **10** с выходом 63%. Конъюгат **10** был количественно превращен в соответствующую трикатионную аммонийную соль **11** с использованием  $\text{MeI}$ .

<sup>2</sup> Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 606-631.

<sup>3</sup> Chem. Comm., 2008, 2459-2461.

<sup>4</sup> J. Porphyr. Phthalocya., 2009, 13, 949-956.

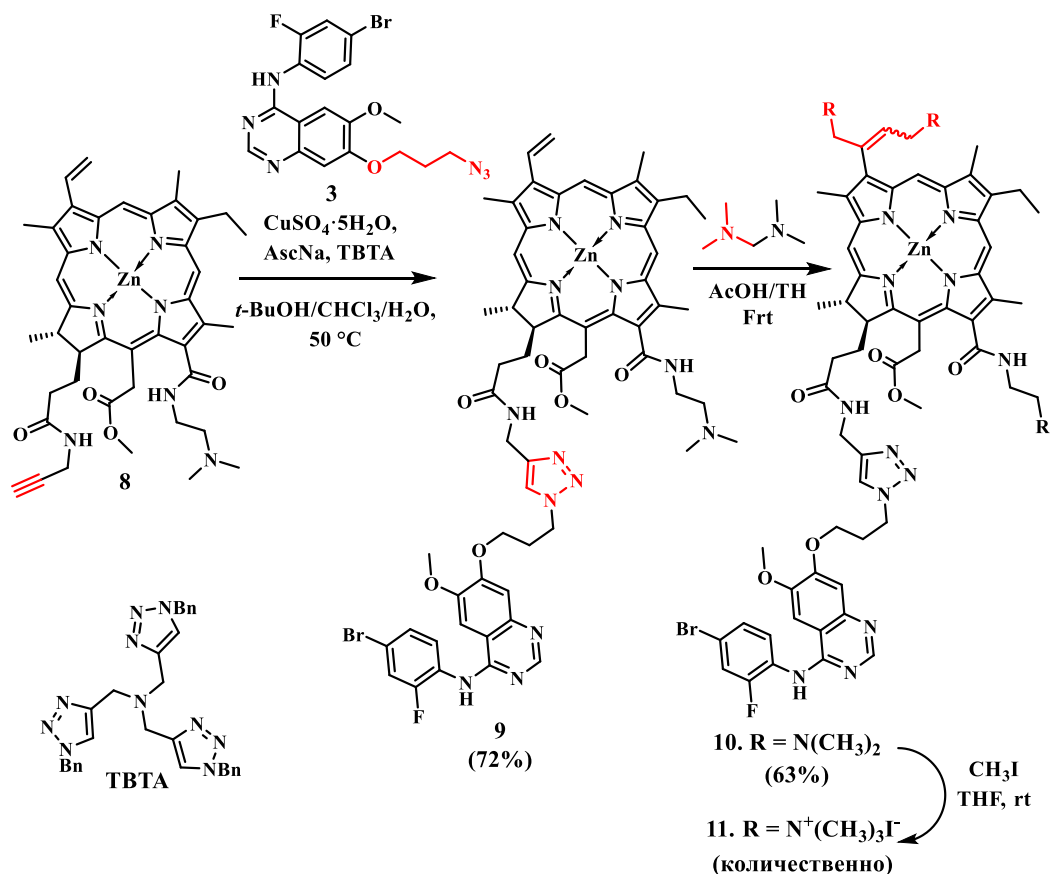


Схема 3

Аналогично, исходя из метилфеорбида-а, **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.

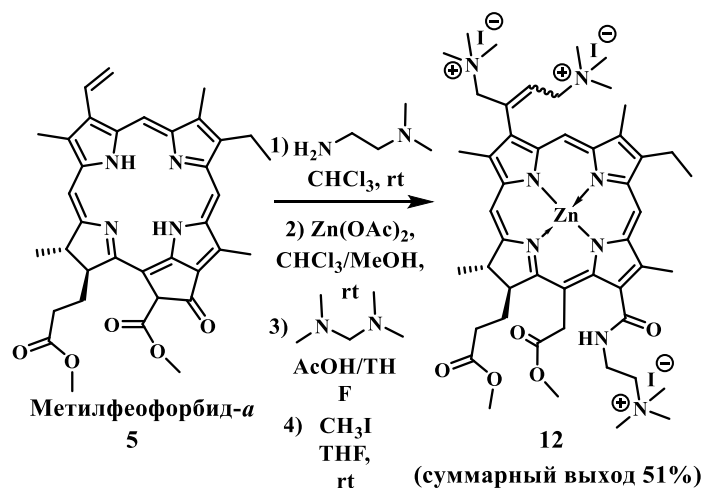
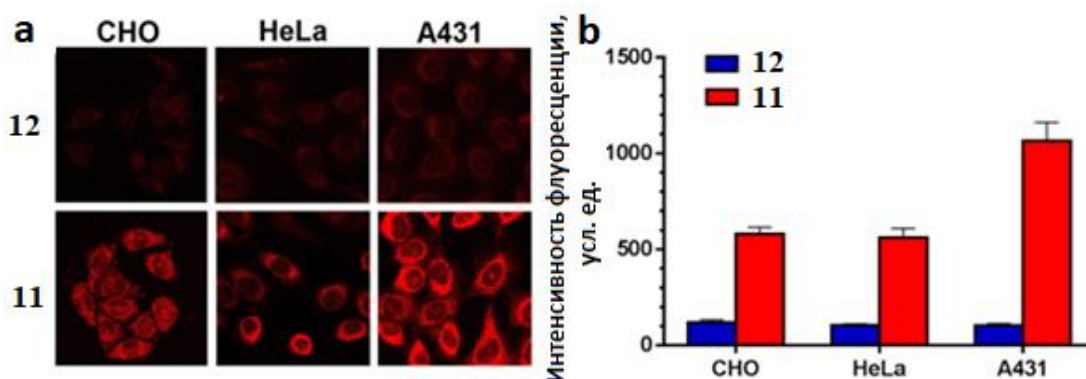


Схема 4

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		$IC_{50}$ в темноте / $IC_{50}$ на свету	12		$IC_{50}$ в темноте / $IC_{50}$ на свету
	$IC_{50}$ , мкМ, [95% доверительный интервал]			$IC_{50}$ , мкМ, [95% доверительный интервал]		
	На свету	В темноте		На свету	В 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.

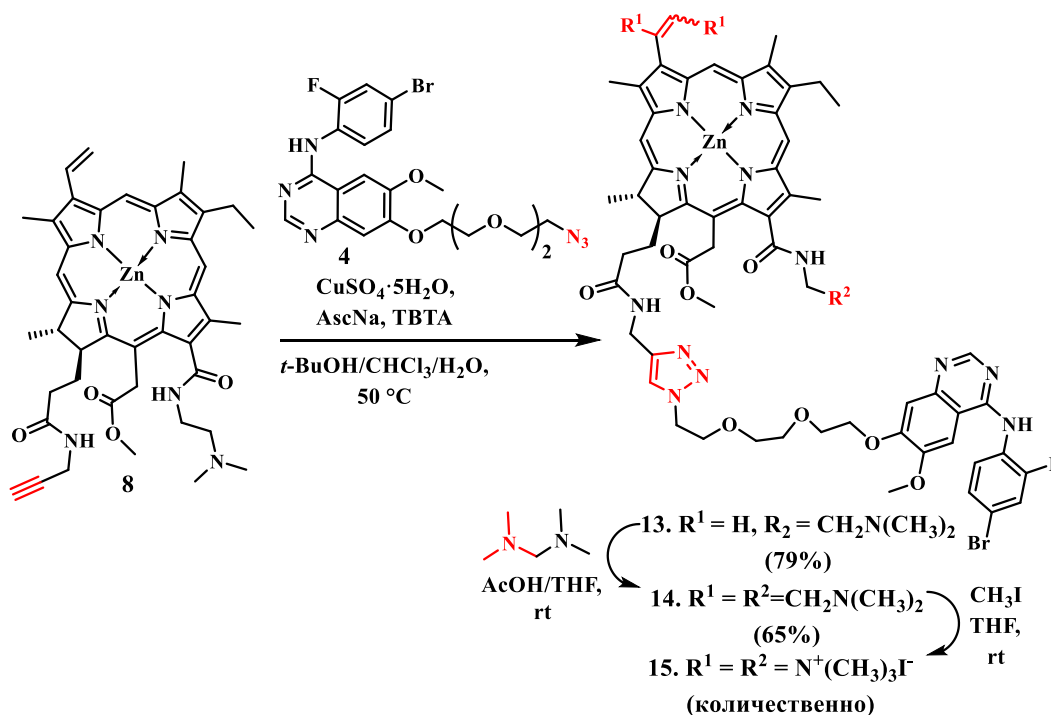


Схема 5

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 Свету	В 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 активности<sup>5</sup>. Из метилфеофорбида-*a* были синтезированы производные хлорина-*e*<sub>6</sub> **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.

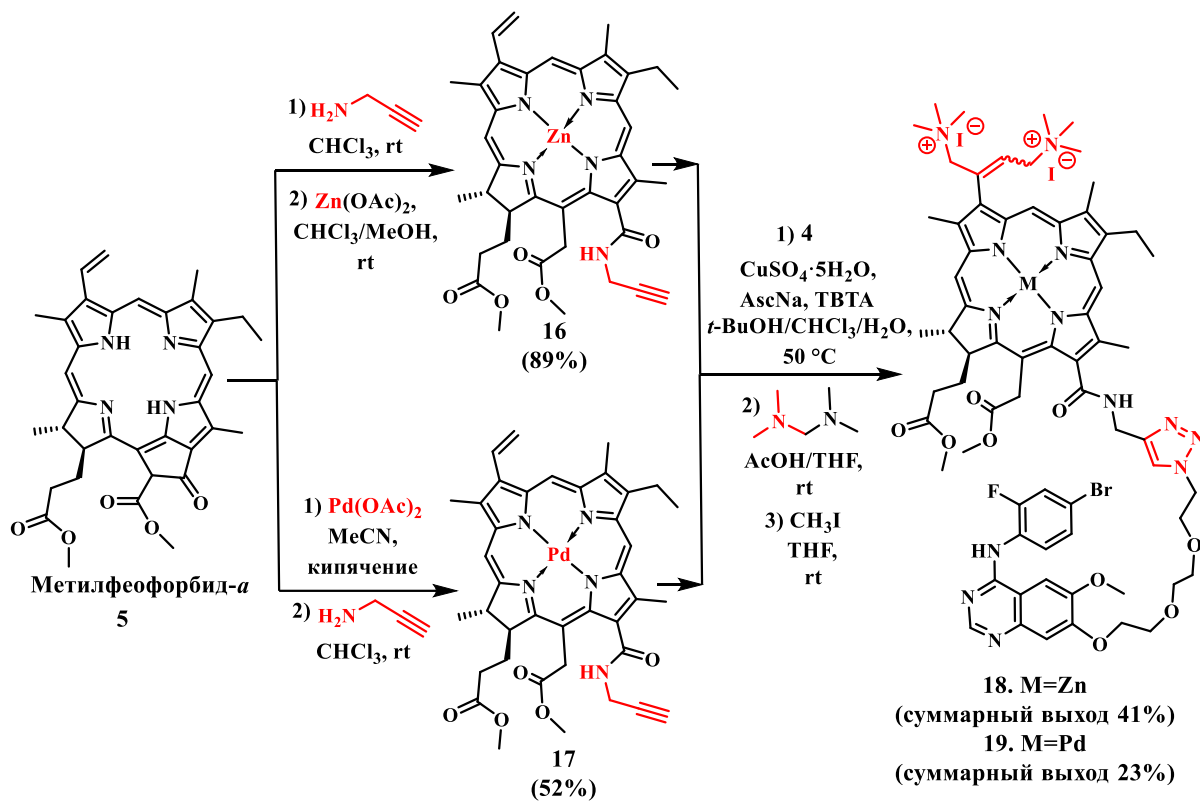


Схема 6

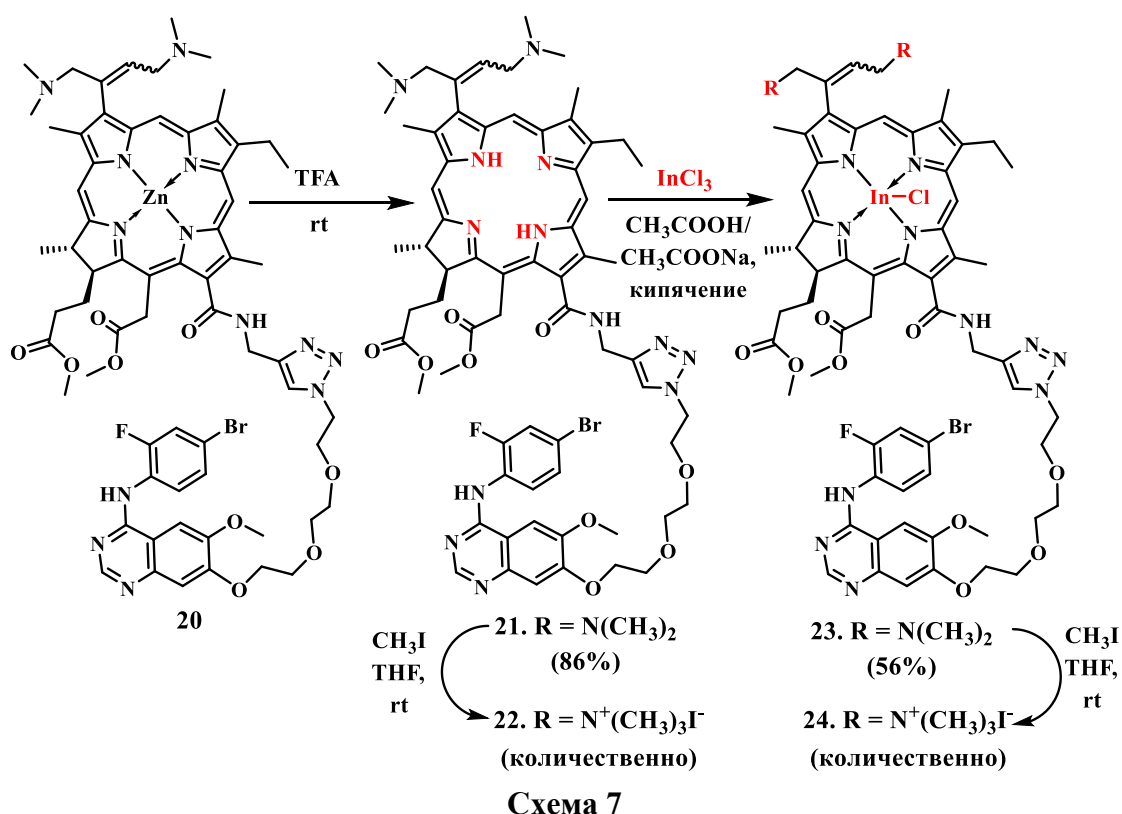
Из цинкового конъюгата **20** в кислой среде было получено безметальное соединение **21** с выходом 86%, которое затем было кватернизовано с количественным выходом, что привело к образованию конъюгированного агента **22** (Схема 7). Индиевый металлокомплекс **23** был получен из **20** с выходом 56% путем его кипячения с  $\text{InCl}_3$ . Обработка иодистым метилом привела к индий-содержащему конъюгату **24** с количественным выходом.

Цинковый металлокомплекс **18** (**Zn**) ( $\text{IC}_{50}$  (на свету) = 0.59 мкМ) оказался в 6 раз менее фототоксичен по сравнению с трикатионным аналогом **15** ( $\text{IC}_{50}$  (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**) ( $\text{IC}_{50}$  (на свету) = 0.0068 мкМ) и **19** (**Pd**) ( $\text{IC}_{50}$  (на свету) = 0.018 мкМ), как по сравнению с трикатионной молекулой **15**, так и по сравнению с **18** (**Zn**). Индиевый и палладиевый металлокомплексы демонстрируют

<sup>5</sup> *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 ариламинохинолина. 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	
<b>141 (Zn)</b>	0.59 [0.45; 0.7]	>100	>170
<b>143 (2H)</b>	0.026 [0.021; 0.031]	>100	>3846
<b>145 (In)</b>	0.0068 [0.0052; 0.0084]	95 [81; 107]	13971
<b>149 (Pd)</b>	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 Варбурга<sup>6</sup> и связывания с гликоспецифичными рецепторами<sup>7</sup>.

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

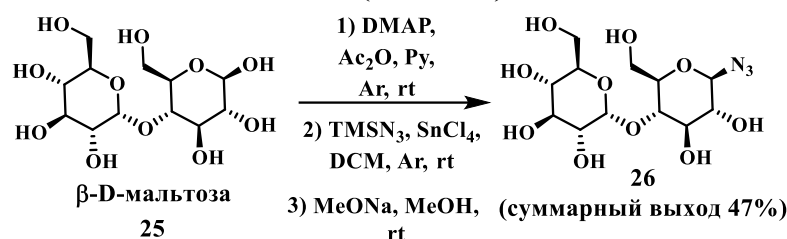


Схема 8

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.

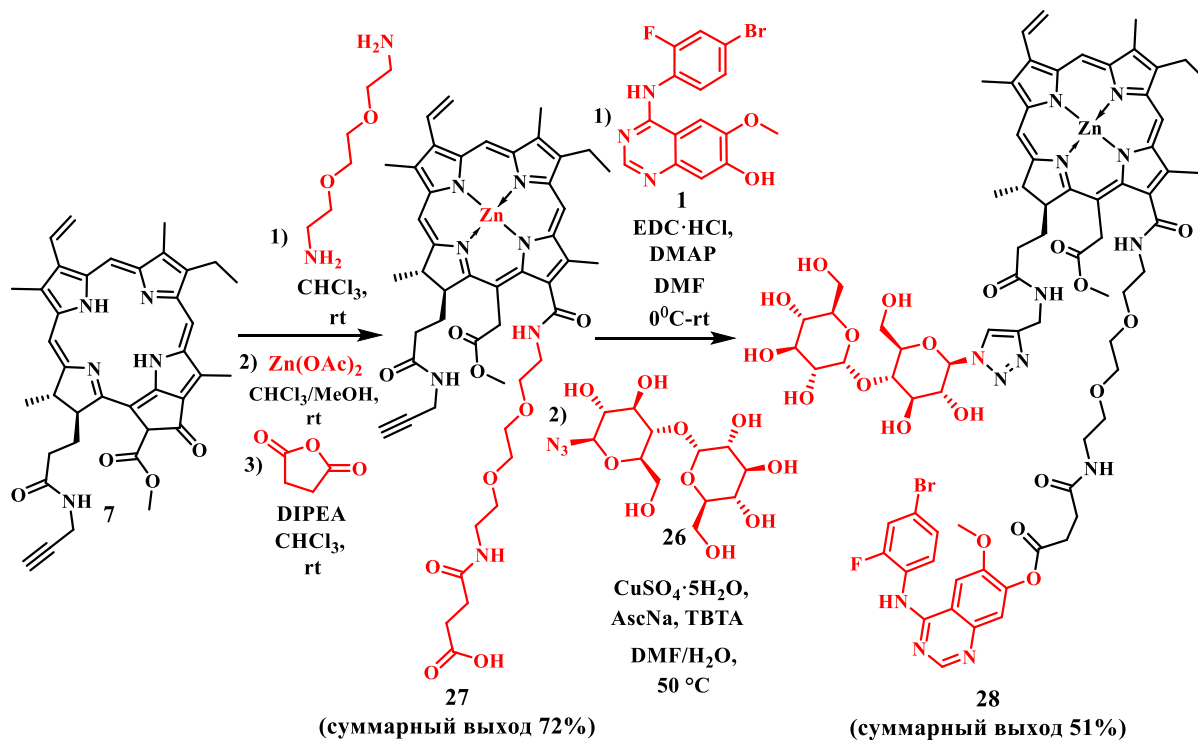


Схема 9

<sup>6</sup> *Science*, **2007**, 123, 309-314.

<sup>7</sup> *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%).

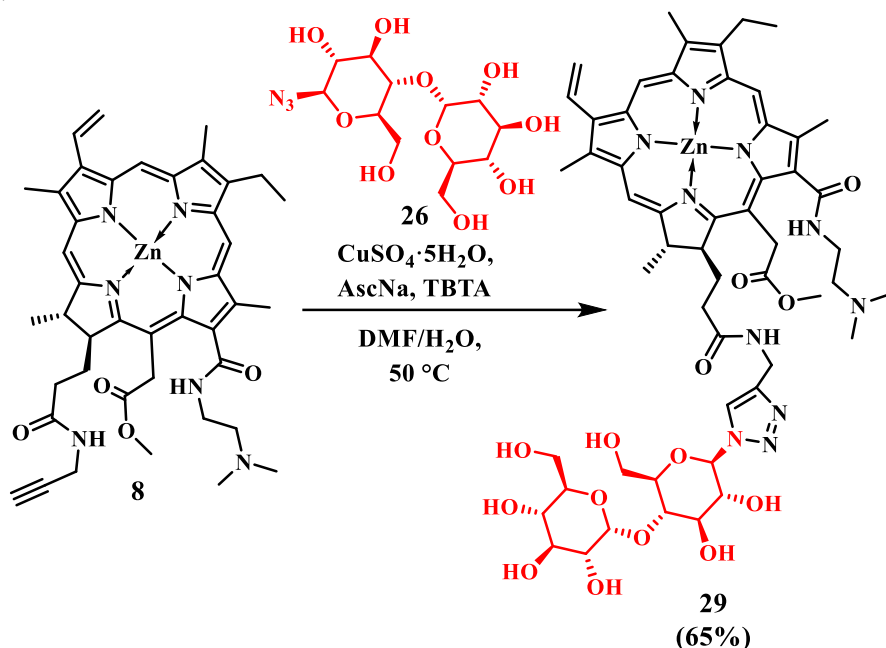


Схема 9

В темноте хлориновый фотосенсибилизатор **29** продемонстрировал выраженную токсичность на обеих клеточных линиях A431 (EGFR-положительная) и CHO (EGFR-отрицательная) с  $\text{IC}_{50}$  (в темноте)  $\sim 30\text{-}50$  мкМ (Табл. 4). После облучения цитотоксичность соединения **29** возросла в  $\sim 40$  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  $\sim 368$  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	<b>28</b>			<b>29</b>		
	IC <sub>50</sub> , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC <sub>50</sub> <sup>в</sup> темноте / IC <sub>50</sub> <sup>на</sup> свету	IC <sub>50</sub> , мкМ, [95% доверительный интервал]		IC <sub>50</sub> <sup>в</sup> темноте / IC <sub>50</sub> <sup>на</sup> свету
	На Свету	В Темноте		На Свету	В Темноте	
	На Свету	В Темноте	На Свету	В Темноте	IC <sub>50</sub> <sup>в</sup> темноте / IC <sub>50</sub> <sup>на</sup> свету	
A431	0.19 [0.16; 0.24]	~70	~368	0.91 [0.62; 1.32]	37.6 [28.9; 48.7]	41
СНО	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).

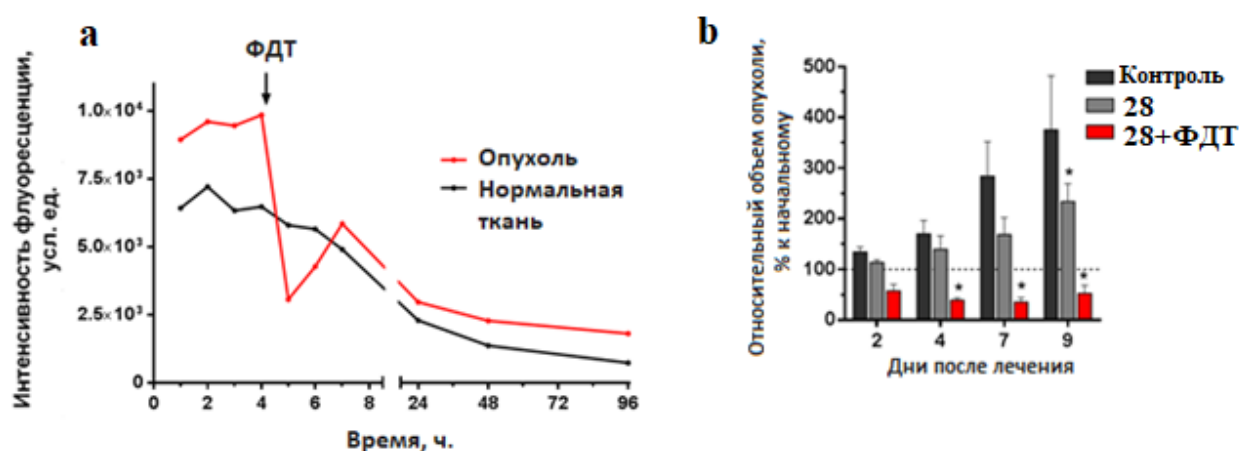


Рис. 2. (а) Динамика изменения флуоресценции в опухоли (красная кривая) и нормальной ткани (черная кривая) у животных после введения конъюгата **28**. Облучение с дозой 50 Дж/см<sup>2</sup> (620-655 нм) было проведено через 4 ч. после введения (отмечено стрелкой). Показаны выборочные кривые. (б) Относительные 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 кабозантиниб

Целью этого раздела диссертационного исследования стало создание конъюгата, способного расщепляться под действием фермента  $\beta$ -глюкуронидазы, концентрация которой особенно высока в опухолевых тканях<sup>8</sup>. 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  $\beta$ -глюкуронидного линкера<sup>7</sup>, который под действием  $\beta$ -глюкуронидазы способен принимать участие в процессах расщепления с выделением терапевтического фрагмента кабозантиниба (Схема 10).

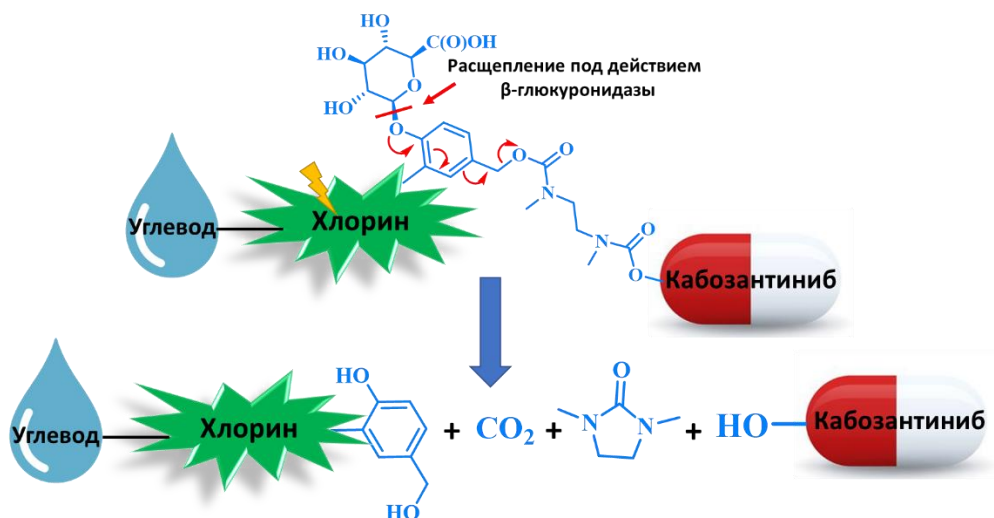


Схема 10

Производное препарата кабозантиниб **30** было синтезировано в 9 стадий по известной методике<sup>9</sup> 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 ТНР (2-тетрагидропиранильная группа) защитной группой с образованием производного **34** с выходом 75%. Далее действием TFA защитная ТНР группа была удалена, что

<sup>8</sup> Eur. J. Med. Chem, 2014, 74, 302-313.

<sup>9</sup> 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'*-диметилендиамина был синтезирован карбамат **37** с выходом 92%. На последней стадии Вос-группа была удалена с выделением кабозантиниб-содержащего строительного блока **38** с выходом 83%.

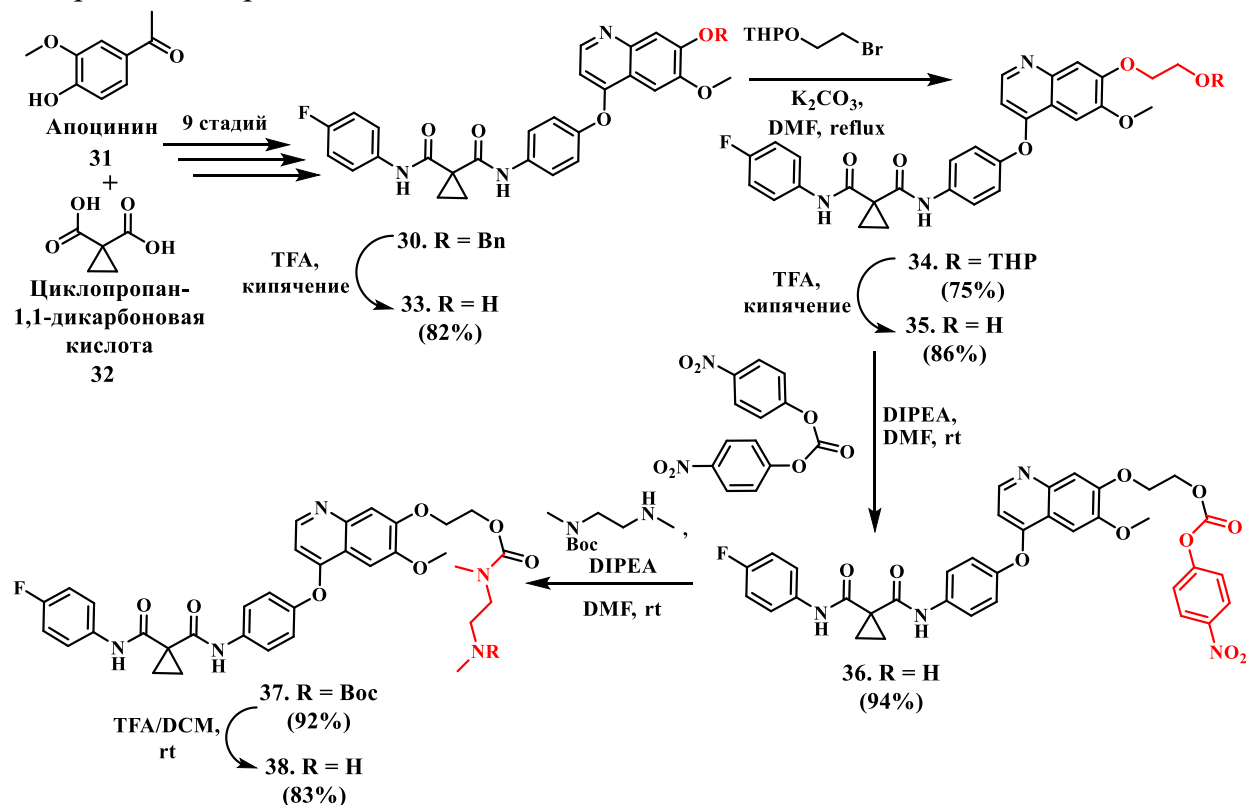


Схема 11

В качестве прекурсора для синтеза β-глюкуронового 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 стадий<sup>10</sup>. На следующем этапе по реакции Уильямсона был синтезирован эфир **41** с выходом 60%<sup>9</sup>. Дальнейшее селективное восстановление нитрогруппы под действием SnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O позволило синтезировать производное анилина **42** с выходом 55%.

<sup>10</sup> *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 3103-3110.

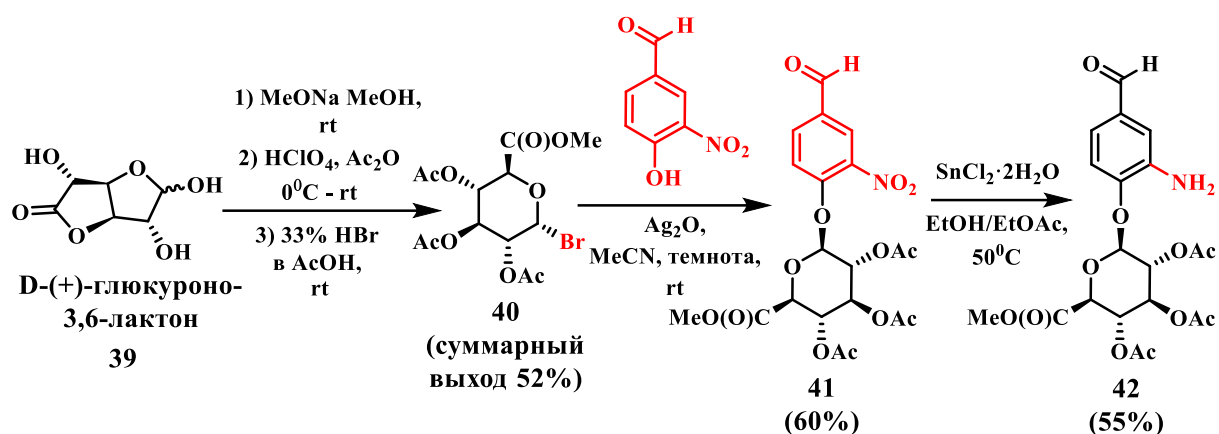


Схема 12

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 Ямагучи<sup>11</sup>, 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).

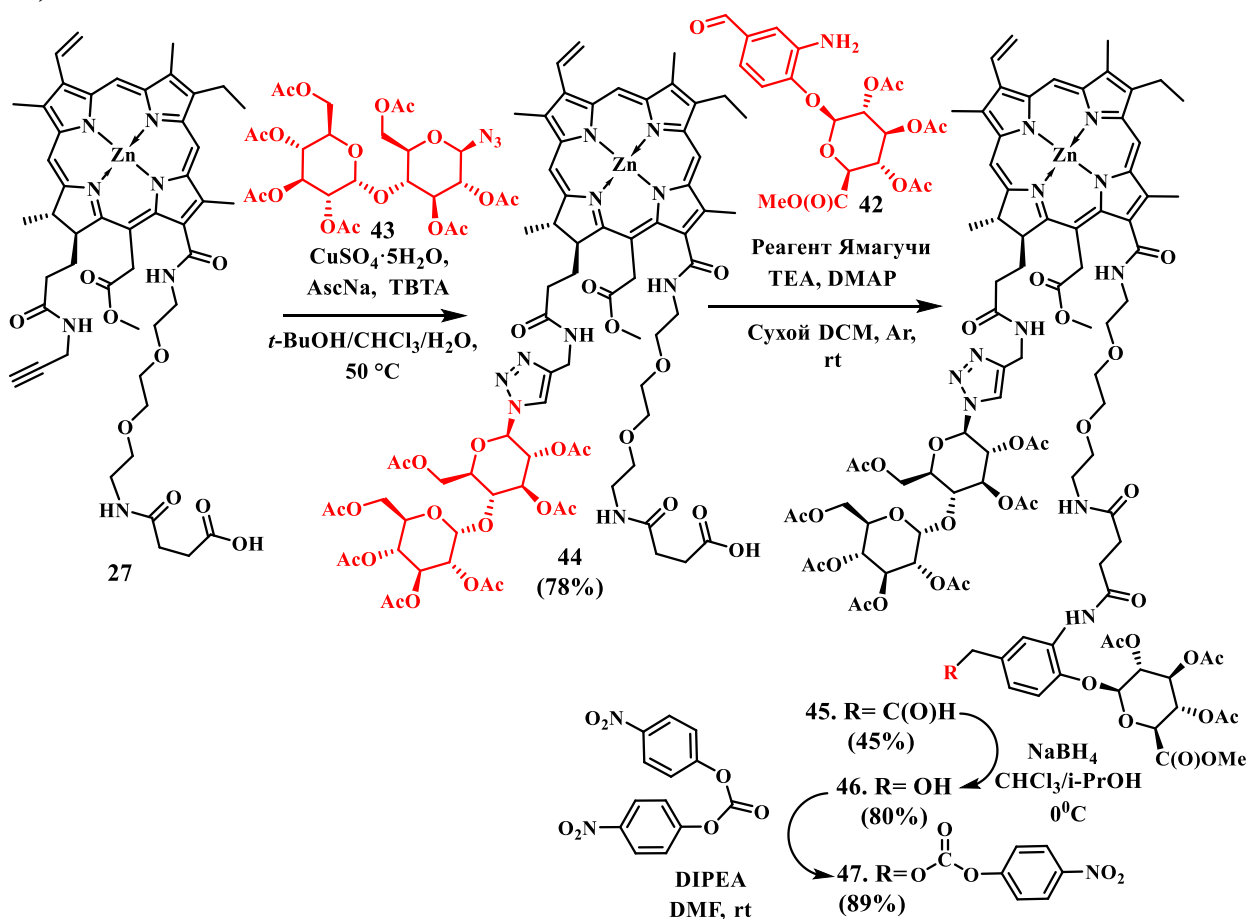


Схема 13

<sup>11</sup> *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  $^1\text{H}$ -ЯМР- и масс-спектр в хорошем разрешении и соотнести необходимые для идентификации соединения пики.

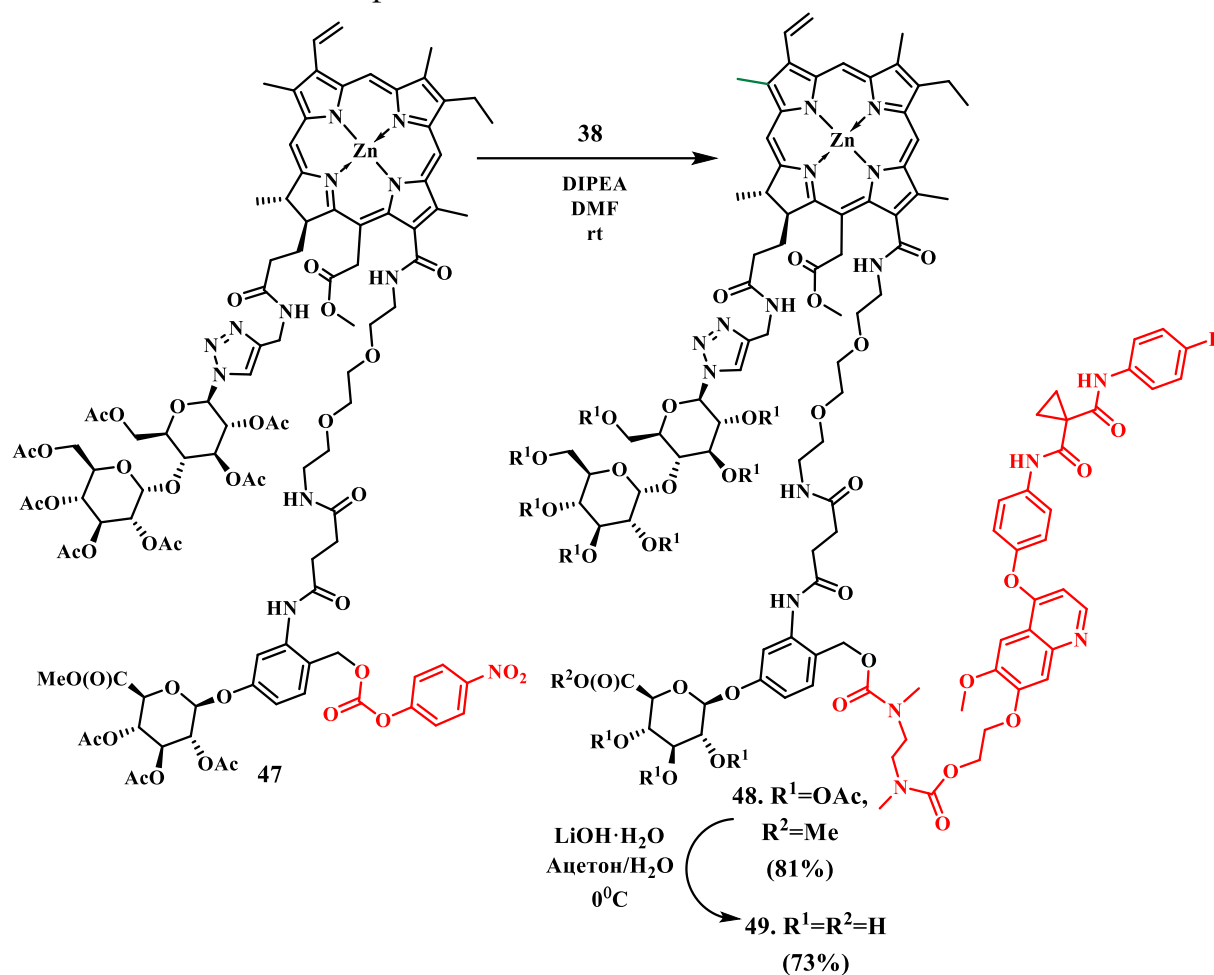
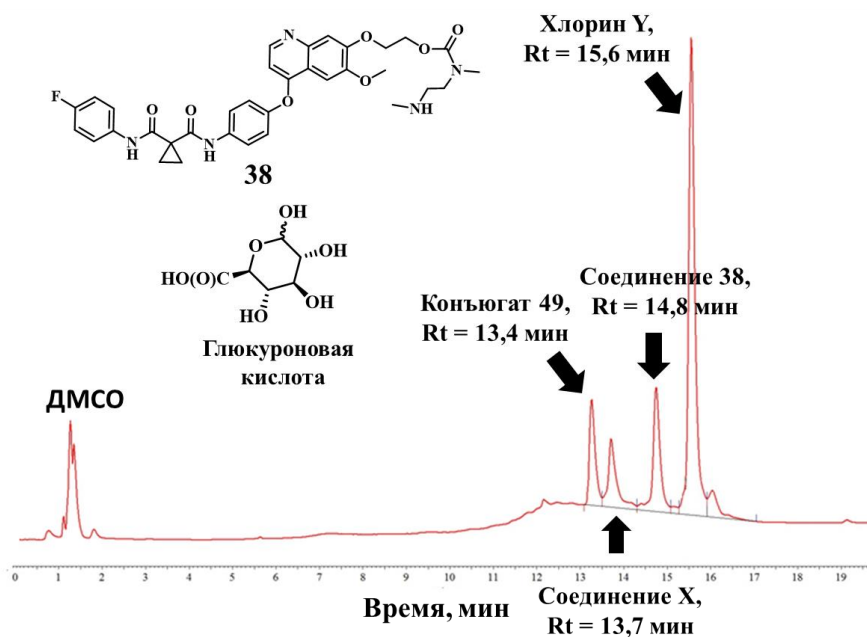


Схема 14

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  $\beta$ -глюкуронидазы была произведена с помощью ВЭЖХ. Для этого к соединению **49** в растворе ПБС (рН=7) с добавками ПЭГ2000 и ДМСО была прибавлена  $\beta$ -глюкуронидаза (*E.Coli*) и через некоторые промежутки времени отбирались алиquotы, которые были проанализированы методом ВЭЖХ. Хроматограмма через 4 часа после добавления  $\beta$ -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  $\beta$ -глюкуронидазы. Детектор PDA,  $\lambda=254$  нм.

Таким образом, под действием  $\beta$ -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  $\beta$ -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*<sub>6</sub>, 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*<sub>6</sub>, 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*<sub>6</sub>, 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 e<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> 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-e<sub>6</sub> 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-e<sub>6</sub> 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.