МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

На правах рукописи

B. Omlanus

Отвагин Василий Федорович

Синтез и противоопухолевая активность новых конъюгатов фотосенсибилизаторов на основе природных хлоринов

02.00.03 — Органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой органической химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского Федоров Алексей Юрьевич

Содержание

| Список сокращений и обозначений | 4 |
|---|-----------|
| Введение | 6 |
| Литературный обзор | 11 |
| 1. Первые фотоактивные лекарства | 11 |
| 2. Фотодинамическая терапия: механизмы | 15 |
| 2.1 I Тип релаксации фотосенсибилизатора | 16 |
| 2.2 II Тип релаксации фотосенсибилизатора | 18 |
| 2.3 Конкуренция I и II типов релаксации фотосенсибилизатора | 22 |
| 2.4 Катионные и анионные фотосенсибилизаторы | 22 |
| 2.5 Дизайн амфифильного ФС | 24 |
| 2.6 Основные пути гибели клетки во время ФДТ | 24 |
| 2.7 Физико-химические свойства «идеального» фотосенсибилизатора | 29 |
| 3. Фотосенсибилизаторы фотодинамической терапии | 31 |
| 4. Фотодинамическая терапия опухолевых заболеваний | 33 |
| 5. Конъюгаты фотосенсибилизаторов – препараты нового поколения для фотодинамической терапии онкологических заболеваний | 38 |
| 5.1 Конъюгаты на основе цитотоксичных металлокомплексов | 40 |
| 5.2 Конъюгаты на основе цитостатиков-интеркаляторов ДНК | 51 |
| 5.3 Конъюгаты на основе ингибиторов клеточных белков | 53 |
| 5.4 Конъюгаты на основе антимитотических препаратов | 59 |
| 5.5 Конъюгаты на основе SERM-препарата тамоксифен | 61 |
| 5.6 Конъюгаты на основе различных цитотоксических соединений | 63 |
| 6. Заключение | 65 |
| Обоснование диссертационных исследований | 67 |
| Обсуждение результатов | 70 |
| 1. Выбор фотосенсибилизатора | 70 |
| 2. Синтез и противоопухолевые свойства конъюгатов на основе препарата вандетаниб и катионных хлоринов | 72 |
| 2.1 Синтез азидосодержащего производного вандетаниба | 73 |
| 2.2 Синтез и биологическая активность катионных конъюгатов на основе цинков металлокомплекса хлорина- <i>е</i> 6 | ого 75 |
| 2.3 Синтез и биологическая активность катионных конъюгатов на основе различи металлокомплексов хлоринов- <i>е</i> 6 и ПЭГ-линкеров | ных 84 |
| 3. Синтез и противоопухолевые свойства конъюгатов на основе препарата вандетаниб и углеводсодержащих хлоринов | 94 |

| 3.1 Синтез и противоопухолевые свойства углеводсодержащих хлоринов | 95 |
|--|---------|
| 3.2 Синтез и противоопухолевые свойства конъюгата углеводсодержащего хлорина производного вандетаниба | и 99 |
| 4. Синтез ферментативно-расщепляемого конъюгата углеводосодержащего хлорина и производного препарата кабозантиниб | 108 |
| 4.1 Синтез структурного блока на основе производного кабозантиниба | 111 |
| 4.2 Синтез структурного блока на основе цинкового металлокомплекса хлорина- <i>е</i> ₆ | 113 |
| 4.3 Синтез ферментативно-расщепляемого линкера | 113 |
| 4.4 Синтез ферментативно-расщепляемого конъюгата | 114 |
| 4.5 Фотофизические параметры ферментативно-расщепляемого конъюгата | 122 |
| 4.6 Ферментативное расщепление конъюгата | 124 |
| Экспериментальная часть | 128 |
| Выводы | 170 |
| Благодарности | 171 |
| Список литературы | 172 |

Список сокращений и обозначений

AscNa – аскорбат натрия

ADMA - антрацен-9,10-диил-бис-метилмалонат

Bn - бензил

Вос – трет-бутоксикарбонил

BSA – бычий сывороточный альбумин

СА4 – комбретастатин А4

CDT – хемодинамическая терапия

CuAAC – медь-катализируемое присоединение азида к алкину

Су – циклогексан

DCC – дициклогексилкарбодиимид

DCM – дихлорметан

DIC – диизопропилкарбодиимид

DIPEA – диизопропилэтиламин

DLI – интервал времени до облучения

DMAP – *N*,*N*-диметиламинопиридин

DMF (ДМФА) – диметилформамид

DOX – доксорубицин

DPBF – 1,3-дифенилизобенхофуран

EDC·HC1 – гидрохлорид (3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида

EGFR – рецептор фактора роста эпидермиса

ЕМА – Европейское медицинское агентство

GSH – глутатион

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

ICD – иммуногенная клеточная гибель

FA – фолиевая кислота

FAP – фибробласт-активирующий белок

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

НDMA – 1-[(диметиламино) (морфолино) метилен]-1*H*-[1, 2, 3]триазоло[4, 5b]пиридин-1-иум 3-оксид гексафторфосфат

Hpd – производное гематопорфирина

HRMS-ESI – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электроспреем

HSP – белок термического шока

LDL – липопротеин низкой плотности

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MePheid-*a* – метилфеофорбид-*a*

Phytyl – фитил

PBS – фосфатный буфер

РТХ – паклитаксел

РЕТ – позитронно-эмиссионная томография

ROS – активные формы кислорода

SERM – селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов

ТАСN – [1,4,7]-триазоциклононан

ТВТА – трис(бензилтриазолилметил)амин

ТЕА – триэтиламин

TFA – трифторуксусная кислота

TMS – триметилсилил

ТНF (ТГФ) – тетрагидрофуран

ТНР – тетрагидропиран

TNF – фактор некроза опухоли

ТРР – трифенилфосфоний

VDA – агенты, разрушающие сосуды

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – рецептор фактор роста эндотелия сосудов

ZnPc – фталоцианин цинка

ГГ – гидрофильная группа

СОД - супероксиддисмутаза

ДМСО – диметилсульфоксид

КХ – колоночная хроматография

МТТ – (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

ПУВА – метод терапии, основанный на применении псораленов и УВ-А излучения

ПЭ – петролейный эфир

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭР – эстрогеновые рецепторы

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Введение

Актуальность работы

Онкологические заболевания на сегодняшний день являются острейшей 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 развитию нежелательной фототоксичности. Кроме к 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 ингибирования клеточной пролиферации. Для механизмов 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.

B 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, *СиААС*-реакция). На сегодняшний момент были получены конъюгаты фотосенсибилизаторов с разнообразными ингибиторами металлосодержащими цитостатиками, 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 (Youngiae 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-а, 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 *СиААС*, 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 аффиностью к EGFRэкспрессирующей клеточной линии эпидермоидной карциномы человека А431. 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 А431. Получен конъюгат, показывающий синергетическую темновую и световую активность *in vivo* на животных с ксенотрансплантантами эпидермоидной карциномы человека А431.

3. Впервые синтезирован чувствительный к β-глюкуронидазе ферментативнорасщепляемый 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 металлокомплесов хлорина-е₆, связанных с цитостатиками вандетаниб или кабозантиниб с использованием различных, в том числе, ферментативно-Полученные расщепляемых линкеров. соединения обладают высокими фототерапевтическими индексами, повышенным накоплением в EGFRэкспрессирующих опухолевых клеточных линиях in vitro, а также показывают синергетическое ингибирование роста опухолей на свету и в темноте *in vivo*. В ходе установлены основные особенности работы были влияния строения конъюгированных агентов на их противоопухолевую активность. Созданные основой новых высокоэффективных соединения могут стать 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, ¹³C), 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 спектрофотометрииспектрофлуорометрии. 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 коньюгированных агентов на основе металлокомплесов 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 энзиматического расщепления ферментативно-расщепляющемого конъюгата цинкового металлокомплеса 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 коньюгированных 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 (MMP-И ИК-спектроскопией И массспектрометрией). Фотофизические характеристики целевых молекул были зарегистрированы с применением спектрофотометрии-спектрофлуорометрии. Данные по цитотоксической активности получены с помощью проведения МТТтестов 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 ксенотрансплантантами эпидермоидной карциномы человека А431; 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, 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.

Рост числа онкологических заболеваний в последние десятилетия в совокупности с отсутствием надежных методов их терапии приводит к необходимости создания новых эффективных лекарственных препаратов.

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений в этой области является разработка фотоактивных препаратов для фотодинамической терапии опухолевых заболеваний. Такие препараты, благодаря особенностям физикохимического строения, позволяют под действием излучения генерировать цитотоксические частицы, способные ингибировать рост злокачественных тканей. Благодаря низкой темновой токсичности и высокой направленности действия фотоактивные препараты обладают низкой системной токсичностью, что делает их использование перспективной альтернативой классическим методам химиотерапии.

Однако, применение фотоактивных соединений до сих пор не получило широкого распространения, поскольку недостаточная селективность накопления таких препаратов в опухолях прежде всего приводит к повреждению здоровых тканей. В то же время возникают трудности с терапией метастазирующих заболеваний, так как клинически используемые препараты не могут ингибировать клеточную пролиферацию в отсутствие излучения, а облучение всего организма не представляется возможным.

Хорошим ответом на современные вызовы в разработке фотоактивных лекарств стало создание конъюгированных агентов, которые, помимо фотоактивной части, содержат в себе разные векторные/цитостатические фрагменты. Такой подход позволяет обеспечивать направленную доставку лекарства в опухоль, а также увеличивает его общую противоопухолевую эффективность.

В литературном обзоре рассмотрены основные физико-химические принципы и актуальное состояние противоопухолевой фотодинамической терапии; дизайн новых фотоактивных соединений; проведен анализ существующих подходов по созданию конъюгированных агентов фотодинамической терапии на основе тетрапиррольных производных.

1. Первые фотоактивные лекарства

Человеческая цивилизация на протяжении своей истории много раз пыталась использовать энергию солнца для терапевтических целей. Первые упоминания об использовании солнечного света для лечения кожных заболеваний встречаются в источниках, дошедших до нас спустя тысячелетия от древних греков, египтян и индусов [1, 2]. Например, гелиотерапия – направление, основателем которого является греческий врач Геродот, постулировало прямую связь между нахождением под солнечными лучами и восстановлением здоровья во время болезней. Около 2000-1200 лет до н.э.-жители Древней Индии и Древнего Египта заметили, что натирание измельченными листьями псоралеи (*Psoralea*) (**Puc. 1A**) с последующим помогает лечить витилиго _ заболевание. нахождением на солнце характеризующееся нарушением пигментации кожи. В последствии целительные

свойства этого растения были приписаны наличию в них псоралена 1 (Рис. 1В) – простейшего фуранокумарина, который был впервые выделен в 1933 г. из псоралеи лещинолистной (*Psoralea corylifolia*) [3]. Псорален 1 относится к классу фотоактивных молекул – фотосенсибилизаторов (ФС) и, поглощая свет, приводит к запуску фотохимических реакций, которые и используются для лечения кожных заболеваний [4]. Таким образом, параллельно с развитием гелиотерапии возникает фотосенсибилизирующих соединений в комбинации с солнечным излучением. Псоралены, введенные в человеческий организм с последующим облучением ультрафиолетом диапазона УФ-А, и по сегодняшний день являются основой ПУВАтерапии (*PUVA, Psoralen UltraViolet A*) – широкораспространенным методом лечения различных дерматитов, в том числе витилиго и псориаза [4].





Спустя много столетий после первых наблюдений, солнечный свет доказал свою эффективность для лечения таких болезней как туберкулез, рахит, цинга, ревматизм и ряда других [5]. Прошло много лет, прежде чем учёные и врачи стали направленно изучать влияние света на лечение кожных заболеваний И конструировать искусственные источники света. На смену гелиотерапии пришла фототерапия, основателем которой принято считать датского учёного И физиотерапевта Н.Р. Финзена (N.R. Finsen). Ему удалось успешно применить источник красного света для предотвращения нагноения пустул во время оспы. В дальнейшем он перешел к использованию ультрафиолетового излучения, которое позволило эффективно победить туберкулезную волчанку [6], за что в 1903 г. он был удостоен Нобелевской премии в области физиологии и медицины.

Возникновение идейного наследника фотохимиотерапии – фотодинамической терапии (ФДТ), напрямую связано с работами проф. Г. фон Тапейнера (*H. von Tappeiner*) и его студента О. Рааба (*O. Raab*), который, по случайному стечению обстоятельств, подверг действию светового излучения инфузории, инкубированные в фотосенсибилизаторе – акридине красном **2**. В результате оплошности Рааб обнаружил гибель исследуемых микроорганизмов и в последствии изучил отдельно действие света, света вместе с акридином и акридина популяции инфузорий. Рааб по отдельности на продемонстрировал непосредственную *in vitro* токсичность облученного светом акридина и связал ее с образованием неизвестных продуктов флуоресценции [7]. Логичным продолжением работы стала статья, В которой фон Тапейнер ланной полтверлил фотосенсибилизационную природу акридина и ввел термин «фотодинамическое действие», описывающий эффект, наблюдаемый при действии светового потока на ΦC [8] во время *in vitro* экспериментов.

Первое задокументированное введение фотосенсибилизатора в организм человека было проведено в 1900 г. французским неврологом Ж. Праймом (*J. Prime*), который использовал фотосенсибилизатор эозин **3** для лечения неврологических расстройств. Прайм заметил, что после проведенной терапии на коже пациентов возникают дерматиты в местах, открытых для солнечного света [9]. Данное открытие привело к тому, что уже в 1905 г. фон Тапейнер и его коллега А. Йесионек (*A. Jesionek*) поделились с миром результатами по использованию эозина **3** для лечения кожных опухолевых образований [10]. Опубликование этой работы стало отправной точкой создания метода фотодинамической терапии.

Идеи фон Тапейнера побудили немецкого врача Ф. Майер-Бетца (*F. Meyer-Betz*) изучить действие гематопорфирина 4 на организм человека. Гематопорфирин 4 был известен с середины 19 века благодаря работам Г. Шерера (*H. Scherer*), который разработал методику его выделения из сухого остатка крови действием серной кислоты (**Puc. 2A**) [11]. Майер-Бетц в 1913 г. сделал себе инъекцию 200 мг гематопорфирина 4 и наблюдал возникновение отеков на участках кожи, доступных для воздействия солнечного света (**Puc. 2B**). Обнаруженные эффекты сохранялись до нескольких месяцев [12]. Позднее в 1925 г. французский ученый А. Поликар (*A. Policard*) показал индуцируемую лампой Вуда флуоресценцию гематопорфирина 4 в опухоли мыши [13].



Рис. 2. (А) Метод Шерера для выделения гематопорфирина. (В) Фотографии Ф. Майер-Бетца после введения гематопорфирина.

С.К. Шварц (*S. К. Schwartz*) в 1955 г. доказал, что продолжительная фотодинамическая активность, от которой страдал Майер-Бетц, была связана не с действием самого гематопорфирина **4**, а с его олигомерным производным [14], также образующимся во время выделения из сухой крови под действием серной кислоты. Полученное соединение было названо «производное гематопорфирина» **5** (схема 1) (*hematoporphyrin derivative*, HpD). Молекулы HpD **5** обладают повышенным сродством к различным опухолям и могут длительное время не выводится из организма, как показал Р.Л. Липсон (*R.L. Lipson*) в 1960 г. [15]. В дальнейшей своей работе с помощью предварительно введенного HpD **5** и источника света, сфокусированного на место локализации опухоли, Липсон провел успешное лечение метастаз в груди у женщины, чем ознаменовал возникновение фотодинамической терапии для лечения онкологических заболеваний [16].

Следующим пути современной важным шагом на развития противоопухолевой ФДТ стали работы Д. Догерти (J. Dougherty), по широкому исследованию активности HpD 5 на пациентах с кожными опухолями, не поддающимися лечению известными терапевтическими методами, которые проводились в конце 70-х – начале 80-х в Институте рака Розуэлл Парка США (Roswell Park Cancer Institute, USA). HpD 5 был введен 25 пациентам со 113 опухолевыми образованиями с последующим облучением ксеноновой лампой через 24-168 ч. Благодаря этому 98 опухолей были полностью вылечены, 13 опухолей показали частичный регресс, а опухоли у двух пациентов остались устойчивы к лечению [17]. Данные результаты доказали ценность нового метода лечения онкологических заболеваний, после чего начались клинические исследования HpD

14

5. Также Догерти с помощью ультрафильтрации удалось улучшить характеристики используемого HpD 5 [18], после чего на основе его разработок в 1991 г. была запатентована лиофилизированная форма HpD 5 – препарат Фотофрин, который и на сегодняшний день является «золотым стандартом» для создания новых ФС и используется для лечения опухолей пищевода и легких [19].

2. Фотодинамическая терапия: механизмы

Уникальные возможности метода ФДТ напрямую связаны с фотофизическими процессами, возникающими при поглощении молекулой ФС световой энергии. Для описания наблюдаемых переходов чаще всего используют адаптированную диаграмму Яблонского (**Рис. 3**) [20].



Рис. 3. Адаптированная диаграмма Яблонского.

Как и почти все молекулы в основном состоянии, фотосенсибилизатор находится в синглетной форме (S_0) (рис. 2). При дальнейшем воздействии источника света происходит переход ФС на возбужденный S_1 уровень (время жизни – наносекунды) [21], однако, общий спин системы остается прежним. Последующая релаксация с возвращением в основное состояние возможна путем излучательного или безызлучательного перехода. При этом, как следствие первого, возникает флуоресценция, а второго – термическое нагревание.

Ещё одним процессом, характерным для некоторых фотоактивных молекул, является переход из возбужденного синглетного состояния S₁ в триплетное T₁ (время жизни – микросекунды) [21] путем спин-орбитального взаимодействия, называемого интеркомбинационным переходом. Относительно высокое время жизни

триплетного состояния возникает из-за запрета его перехода в основное синглетное состояние без изменения спина, при этом инверсия спина происходит достаточно долго [22]. Вернутся в основное состояние ФС способен либо посредством излучательного перехода (фосфоресценция), либо посредством передачи своей энергии другим молекулам, что позволяет генерировать высокоактивные окислители, взаимодействующие с биологически значимыми субстратами. Логичным выводом из описанных взаимодействий является тот факт, что увеличение времени жизни **T**₁ прямо пропорционально вероятности передачи энергии третьим частицам.

Огромная работа по изучению релаксационных процессов, связанных с триплетным состоянием фотоактивных молекул, позволила выделить два основных типа передачи энергии от ФС к окружающим его молекулам во время проведения ФДТ [23].

2.1 I Тип релаксации фотосенсибилизатора

I Тип передачи энергии характеризуется переносом электрона от находящейся рядом молекулы-восстановителя фотосенсибилизатору, в результате чего образуется положительно и отрицательно – заряженные радикалы (**Рис. 3**).

Среди основных соединений, способных отдать электрон и одновременно присутствующих в живых системах, можно выделить NADPH, гуанин, триптофан и тирозин. Например, NADPH окисляется возбужденным состоянием $\Phi C^*(T_1)$ до NADP⁺с образованием анион-радикала ΦC^{*-} , который в аэробных условиях атакует молекулу кислорода, генерируя супероксид анион-радикал O_2^{*-} (супероксид) (Ур. 1, 2) [23]. Также не исключена реакция между $\Phi C^*(T_1)$ и молекулярным кислородом, приводящая к образованию ΦC^{*+} и O_2^{*-} (Ур. 3).

 $2\Phi C^* + NADPH \rightarrow 2\Phi C^{--} + NADP^+ + H^+ (1)$

 $\Phi C^{-} + \mathbf{0}_2 \rightarrow \Phi C + \mathbf{0}_2^{-} (2)$ $\Phi C^* + \mathbf{0}_2 \rightarrow \Phi C^{+} + \mathbf{0}_2^{-} (3)$

Супероксид относится к активным формам кислорода (*reactive oxygen species*, *ROS*) и играет существенную роль в процессах окислительного стресса. Он способен окислять небольшие молекулы, такие как сульфиты, тетрагидрофлавины, лейкофлавины, катехоламины и др. [24]. Однако сравнительно низкий окислительный потенциал (**Рис. 4**) делает супероксид мягким окислителем, неспособным разрушать липиды, нуклеиновые кислоты и т.д. [24, 25].



Рис. 4. Восстановительные превращения кислорода.

Несмотря на низкую «прямую» токсичность, связанную с действием супероксид-радикала, его «косвенная» токсичность может быть достаточно существенна для клеточных структур.

Например, реакция супероксида с нитроксид-радикалом NO[•], катализируемая супероксиддисмутазой^{*} (СОД), приводит к образованию пероксинитрита 0N00[–], который окисляет ряд биомолекул [26]. В последствии пероксинитрит также способен превращаться в активированный интермедиат ONOOH^{*}, сходный по своим окислительным свойствам с высокоактивным гидроксильным радикалом HO[•][27]. Кроме этого, взаимодействие супероксида с феноксильными радикалами, образующимися преимущественно из тирозина, может также приводить к выделению потенциально токсичных соединений, таких как пероксид тирозина [28].

Ещё одним окислителем, относящимся к группе ROS и способным проявлять выраженную токсичность, является пероксид водорода, образующийся в результате СОД - катализируемого диспропорционирования супероксид радикала (Ур. 4).

$20^{-}_{2} + 2H^{+} \rightarrow H_{2}O_{2} + O_{2}$ (4)

Несмотря на небольшой окислительный потенциал (**Рис. 4**), пероксид водорода обладает высоким временем жизни относительно других ROS и способен проходящему внутри клетки циклу Габера-Вейса (*Haber-Weiss cycle*) [29]. Первым превращением в этой цепочке является реакция Фентона (*Fenton reaction*) между H_2O_2 и растворенными в организме солями Fe^{2+} с образованием гидроксильного радикала HO' и Fe³⁺ (**Ур. 5**). Дальнейшее восстановление Fe³⁺действием супероксида приводит к регенерации солей Fe^{2+} (**Ур. 6**) [30]. Гидроксильный радикал HO', выделяющийся в ходе описываемых окислительно-восстановительных превращений, входит в группу *ROS* и является одним из сильнейших окислителей (**Рис. 4**), что определяет его высокую токсичность для организма. Например, гидроксильный радикал способен разрушать молекулы ДНК, липидов, белков и т.д., что в том числе приводит к запуску механизмов гибели клетки [31].

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow HO' + Fe^{3+} + HO^-$ (5)

^{*} Супероксиддисмутаза — антиоксидантный фермент, одной из основных функций которого является защита организма человека от высокотоксичных кислородных радикалов.

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$
 (6)

Ещё одним путем генерации гидроксильных радикалов может быть непосредственная реакция анион-радикала $\Phi C - c H_2 O_2$ по типу превращения Фентона (**Ур. 7**) [23].

$$\Phi C^{-} + H_2 O_2 \rightarrow HO^{-} + \Phi C + HO^{-}(7)$$

Таким образом, анализируя вышеописанные процессы, следует отметить, что хотя сам по себе Φ C не обладает какой-либо значимой токсичностью, результат взаимодействия его возбужденного состояния Φ C^{*}(T₁) с окружающими молекулами способен вызвать образование высокоактивных окислителей, провоцирующих повреждение биологически значимых соединений и, в конечном итоге, клеточную гибель.

2.2 II Тип релаксации фотосенсибилизатора

Абсолютно другим по своей природе является II тип релаксации триплетного состояния фотосенсибилизатора. Этот процесс состоит в переносе энергии от молекулы $\Phi C^*(T_1)$ на молекулу кислорода в триплетном состоянии ${}^{3}O_2$, что приводит к образованию высокотоксичного окислителя – синглетного кислорода ${}^{1}O_2$ (**Ур. 8**), также принадлежащего к семейству *ROS* [23].

$$\Phi C^*(T_1) + {}^3O_2 \to \Phi C + {}^1O_2 (8)$$

Впервые идею существования низколежащих синглетных форм кислорода выдвинул Р. Малликен (*R. Mulliken*) в 1928 г. Работая над орбитальной молекулярной теорией, он предположил, что кроме известной полосы поглощения Фраунхофера (*Fraunhofer line*) на 762 нм, кислород должен иметь полосу поглощения ~1500 нм [32]. В дальнейшем искомая полоса была зарегистрирована на ~1270 нм [33].

Вскоре после работ Малликена, австрийский химик Х. Каутский (*H. Kautsky*) в 1931 г. предположил, что ${}^{1}O_{2}$ может образовываться во время фотодинамического процесса под действием ФС и источника излучения [34]. Позднее Каутский подтвердил свою теорию с помощью облучения светом нанесенного ФС и субстрата на зерна силикагеля. Наблюдаемое окислительное превращение субстрата было отнесено к действию выделяющегося газообразного ${}^{1}O_{2}$ [35].

Сегодняшние представления о строении молекулярных орбиталей кислорода состоят в том, что при возбуждении основного триплетного состояния ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ молекула кислорода способна существовать в двух синглетных формах ${}^{1}\Delta_{g}$ и ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$, различающихся типом π - антисвязывающей орбитали (**Рис. 5**). Энергия перехода на первый синглетный уровень составляет 22.5 ккал/моль, а на второй 31.5 ккал/моль [36].



Рис. 5. Упрощенная интерпретация молекулярных орбиталей кислорода.

Возможность реализации фотодинамического действия ${}^{1}O_{2}$ связана с относительно долгим временем жизни его метастабильного ${}^{1}\Delta_{g}$ состояния: 45 минут в газовой фазе и 10^{-6} - 10^{-3} с в растворе. При этом время жизни высокоэнергетической ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ формы всего лишь 7-12 с в газовой фазе и 10^{-11} - 10^{-9} с в растворе. Что объясняется возможностью быстрого релаксационного перехода ${}^{1}\Sigma_{g}^{+} \rightarrow {}^{1}\Delta_{g}$, не запрещенного правилом орбитальной симметрии. Противоположная ситуация наблюдается для перехода ${}^{1}\Sigma_{g}^{+} \rightarrow {}^{3}\Sigma_{g}^{-}$, который является запрещенным и требует инверсии спина. Данные особенности электронного строения кислорода служат причиной наличия у него фосфоресценции (${}^{1}\Delta_{g}$, 1270 нм) [37].

После фотовозбуждения дальнейшая судьба синглетного состояния кислорода определяется взаимодействием с окружающей средой. Возможны два типа гашения: физический и химический. Первый – это, по сути, передача энергии другим молекулам **M** с одновременным изменением спина. Во время этого процесса не происходит расходования кислорода на окислительные реакции и образование новых продуктов (**Ур. 9**). Химическое гашение приводит к синтезу новых соединений **P** и связыванию кислорода с **M** (**Ур. 10**) [36].

$${}^{1}O_{2} + M \rightarrow {}^{3}O_{2} + M (9)$$

 ${}^{1}O_{2} + M \rightarrow P (10)$

Наличие вакантной орбитали и антипараллельных электронов позволяет метастабильной форме синглетного кислорода выступать в качестве электрофила и эффективно окислять различные субстраты в отличие от своего триплетного состояния. Кроме этого, синглетный кислород может быть диенофилом в процессах [4+2]-присоединения и енофилом в ен-реакциях (*Alder-ene reaction*) [38].

Таким образом, благодаря высокой реакционной способности ${}^{1}O_{2}$ способен оказывать токсическое действие на клетку, разрушая составляющие её биомолекулы. Основными биологическими целями для синглетного кислорода являются молекулы ДНК, РНК, белки, липиды и стеролы [39]. Показано, что основная мишень для окисления — это внутриклеточные белки, что связано с большими константами реакции «кислород-белок» (Рис. 6) [40].



Рис. 6. Смоделированный процент поглощения синглетного кислорода внутриклеточными молекулами-мишенями. Данные из [40].

Хорошо изучены реакции разрушения остатков триптофана 6 [41], тирозина 8 [42], гистидина 10 [43], метионина [44], цистеина [45] и цистина [45], которые являются важнейшими структурными элементами белковых соединений (Схема 1). Например, при действии ${}^{1}O_{2}$ на остатки триптофана 6 в белковых цепях происходит образование пероксидов и эндопероксидов, распадающихся через несколько последовательных стадий до производного кинуренина 7 [41] (Схема 1А). Тирозин 8 окисляется до гидропероксида, который затем разрушается с выделением спирта 9 (Схема 1В) [42]. А гистидин 10, окисляясь синглетным кислородом, образует два различных эндопероксида, деградирующих до мочевины 11, аспартамовой кислоты 12 и аспаргина 13 (Схема 1С) [43].



Схема 1

Таким образом, окислительное действие синглетного кислорода на биологически значимые субстраты вызывает образование нестабильных перекисных соединений, необратимо деградирующих и нарушающих биохимические циклы клеток.

Следует добавить, что несмотря на высокую активность, возможности синглетного кислорода по перемещению внутри клетки сильно лимитированы. Время жизни синглетного кислорода в чистой воде ограничено физическим гашением приблизительно до 4 мкс. Однако, в клетке химическое гашение снижает эту цифру в разы. Даже если представить, что химическое гашение отсутствует, то синглетный кислород способен преодолеть дистанцию, не превышающую ~220 нм [46]. При этом средний диаметр клетки человека – 100 мкм. Из этих фактов можно сделать вывод, что место локализации ФС в клетке во время его облучения напрямую определяет дальнейшее токсическое действие. И действительно, данное утверждение нашло подтверждение во множестве экспериментальных работ по созданию ФС, направленно аккумулирующихся в разных клеточных структурных единицах [47].

2.3 Конкуренция I и II типов релаксации фотосенсибилизатора

Принято считать, что и процесс переноса электрона (I Тип), и процесс передачи энергии (II Тип) происходят одновременно и конкурируют друг с другом. При этом выделяются всевозможные *ROS*. Но существует значительная разница в константах скоростей данных процессов: k (I Тип) $\leq 1 \times 10^7$ М⁻¹ с⁻¹ и k (II Тип) $\approx 1-3 \times 10^9$ М⁻¹ с⁻¹ [48], что определяет превалирующую скорость образования синглетного кислорода над образованием супероксида и др. радикальных форм. В совокупности с этим и тем фактом, что синглетный кислород более реакционноспособен, можно утверждать, что в основном эффективность его генерирования является главным фактором для успешной ФДТ.

Кроме этого, еще один момент, определяющий основную роль синглетного кислорода в ФДТ, это отсутствие собственных эволюционно-выработанных защитных механизмов клетки против его действия. При этом, супероксид и перекись водорода постоянно образуются и распадаются под действием различных СОД, пероксидаз, каталаз, низкомолекулярных антиокислителей (например, аскорбатов, дипептидов и т.д.) [49].

При этом, в настоящее время некоторые исследования по созданию новых ФС показывают, что в отдельных случаях радикальные *ROS* оказываются более токсичны, чем синглетный кислород [23].

2.4 Катионные и анионные фотосенсибилизаторы

Принципиальной особенностью, определяющей механизм гибели клетки, а значит и эффективность всего лечения, служит распределение фотоактивных молекул до их активации внутри клетки, поскольку время жизни *ROS*, генерируемых фотосенсибилизатором после облучения, чрезвычайно мало

Среди основных клеточных мишеней для накопления ФС можно выделить: митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), лизосомы и клеточную мембрану [50].

В каком виде фотоактивный препарат проникает и распределяется в клетке, определяется его липофильностью. Гидрофильные фотосенсибилизаторы не могут пройти сквозь липидный бислой и аккумулируются посредством эндоцитоза. В последствии такие молекулы чаще всего оказываются в лизосомах [51]. Липофильные фотосенсибилизаторы, напротив, после преодоления клеточной мембраны стремятся связаться с митохондриями и ЭПР, которые также имеют в своей структуре липидные мембраны [47].

Особое внимание во время создания ФС для ФДТ уделяется катионным соединениям. Например, положительный заряд на фотоактивной молекуле способствует быстрой клеточной интернализации, а значит, и высокой токсичности, как было показано, в том числе, в работе М.Р. Гамблина (*M.R. Hamblin*) по изучению катионных и анионных производных порфирина [52]. Также важной особенностью катионных фотосенсибилизаторов является их преобладающее аккумулирование в митохондриях за счёт взаимодействия с митохондриальной мембраной [47]. Этот процесс приводит к высокой фототоксичности [53]. Кроме этого, можно выделить

довольно любопытное свойство порфириновых катионных фотосенсибилизаторов – возможность таргетированного расщепления ДНК в клеточном ядре под действием света за счёт связывания с её анионными участками [54].

Увеличение количества положительно заряженных групп не всегда улучшает фармакодинамические свойства препарата, поскольку приводит к образованию высокогидрофильного фотосенсибилизатора, неспособного эффективно проходить сквозь клеточную мембрану. Например, в работе М.Г.Н. Висента (*M.G.H. Vicente*) [55] была изучена активность различных порфириновых ПЯТИ фотосенсибилизаторов 14-18, отличающихся как количеством катионных фрагментов, так и их расположением (Рис. 7). Исследование скорости накопления клетками HEp2 показало ее убывание в ряду 15>16>17>14>18. Это говорит о том, что дважды и трижды заряженные производные 15, 16 и 17 копятся быстрее всего, возможно, благодаря их амфифильному строению, обеспечивающему баланс между хорошей водорастворимостью липофильностью, необходимой И для интернализации. Производное 14 показало накопление в мембранах как самой клетки, так и почти всех её структурных единиц, в результате высокой липофильности. Соединение 15 с ДВУМЯ зарядами В орто-положениях преимущественно накапливалось в митохондриях, а 16 с *пара*-расположенными зарядами – в лизосомах. Агенты с тремя и четыремя зарядами 17 и 18 аккумулировались в митохондриях, также как и производное 15. При этом надо сказать, что 15-18 после проникновения в клетку отчасти беспорядочно распределялись в цитоплазме в отличие от молекулы 14. Поэтому, несмотря на наблюдаемую разницу в скоростях накопления, измеренная фотоиндуцируемая токсичность уменьшается в ряду 14>15>16>17>18, что соответствует росту гидрофильности.



Рис. 7. Структурные формулы катионных фотосенсибилизаторов, изучаемых в [55].

Анионные фотосенсибилизаторы обычно посредственно накапливаются в клеточных субъединицах по сравнению с катионными аналогами [56], что, как следствие, приводит к снижению их световой токсичности. Однако, наличие одного или двух отрицательно заряженных фрагментов у фотоактивного соединения может

улучшить водорастворимость и позволит создать амфифильную структуру, способную к преодолению клеточной мембраны. Если зарядов более чем два, то ФС обычно становится сильно гидрофильным и плохо аккумулируется в клетке [47].

Также следует упомянуть параметр, во многом определяющий путь локализации фотосенсибилизатора внутри клетки. Этот параметр называется «время до облучения лекарства» («*Drug-to-light interval*», *DLI*) и измеряется временем после инъекции фотоактивного лекарства, через которое происходит облучение пациента. Величина *DLI* напрямую влияет на достигнутый терапевтический эффект, как показано на примере препарата «Фоскан» [57]. Изменение DLI позволяет варьировать локализацию ФС и проводить облучение, когда его концентрация максимальна в опухолевых тканях.

2.5 Дизайн амфифильного ФС

Создание и развитие метода ФДТ для лечения опухолевых заболеваний было бы невозможно без разработки лекарств на основе порфиринов и родственных соединений (фталоцианины, хлорины и т.д.), которые на сегодняшний день также являются самыми распространёнными платформами для создания новых фотоактивных соединений.

Однако такие соединения обладают одной общей особенностью, а именно, обширной многоэлектронной π -системой, что определяет их поведение в растворе, связанное с π - π стэкингом (π - π stacking) [58]. В результате этого происходит образование агрегатов и снижение фотодинамической активности из-за уменьшения поглощения излучения и выхода генерации синглетного кислорода [59]. Также агрегирование затрудняет внутривенное введение препарата и негативно отражается на локализации внутри клетки, снижая фотодинамическую активность ФС [60].

Для решения данной проблемы можно использовать различные системы доставки (липосомы и т.д.) [61, 62] или вводить в состав ФС гидрофильные фрагменты (углеводы, катионные/анионные производные и т.д.) [63].

Таким образом, в общем случае при создании фотосенсибилизаторов нужно всегда учитывать несколько моментов, связанных с балансом липофильных и гидрофильных свойств получаемого соединения, а именно: 1) будет ли достаточно липофильным ФС, чтобы эффективно аккумулироваться в клетке; 2) будет ли ФС достаточно гидрофильным для системного введения и минимизации образования агрегатов во время ФДТ. Хорошим ответом на данные критерии чаще всего является разработка амфифильного агента [47].

2.6 Основные пути гибели клетки во время ФДТ

Генерируя *ROS*, фотосенсибилизатор индуцирует окислительный стресс, возникающий в клетке, и определяющий дальнейшую возможность её восстановления, если клеточные механизмы защиты в состоянии нивелировать действие окислителей; в противном случае происходит гибель клетки.

Механизмы защиты от фотоокислительного стресса достаточно сложны и включают в себя множество биохимических ответов [64].

Среди путей гибели клетки после проведения ФДТ обычно выделяют три основных: некроз, апоптоз и аутофагия [65].

Чаще всего во время ФДТ реализуются все три механизма. При этом может преобладать тот или иной вариант в зависимости условий проведения фотодинамического воздействия. Высокая фотодинамическая активность, связанная либо с большими мощностями облучения, либо с высокой концентрацией ФС в тканях, приводит к активации некроза. Умеренная токсичность под действием света способствует апоптозу, а низкая – аутофагии [64, 65]. Таким образом, например, на поверхности облучаемой ткани реализуется некроз за счет максимального поглощения излучения, а внутри ткани по мере прохождения вглубь и снижения интенсивности могут возникнуть апоптоз и другие формы программируемой клеточной смерти.

Кроме этого, важнейшую роль на механизмы гибели оказывает клеточное распределение молекул ФС. Поскольку во время повреждения тех или иных клеточных органелл возникают самые разнообразные варианты ответа на фотоокислительный стресс, этим определяется запуск некроза, апоптоза или аутофагии (**Рис. 8**) [23].



Рис. 8. Основные клеточные мишени для фотосенсибилизаторов и связанные с этим механизмы гибели клетки.

Некроз

Некроз представляет собой непрограммируемую форму клеточной гибели и не требует активации сигнальных путей, приводящих к синтезу белков, изменению энергетического баланса и т.п. Некроз возникает под действием сильных внешних деструктивных сил и характеризуется бесконтрольным увеличением проницаемости мембраны. В результате этого в клетку начинает поступать большие объемы воды, различных ионов (например, Ca²⁺), происходит набухание самой клетки и её органелл с нарушением деятельности ионных насосов. Также наблюдается конденсация хроматина и «блэббинг^{*}» (*«blebbing»*). В конечном итоге разрушение клеточной мембраны приводит к проникновению содержимого клетки во внешнюю область и развитию воспалительного процесса (**Рис. 8**) [66].

На сегодняшний день также широко признаны вклады программируемых форм некроза в фотоиндуцируемую гибель клеток [64, 67].

Отличительной чертой метода ФДТ является возможность модерирования путей гибели клетки. Например, некроз возникает под действием мощных источников облучения и/или увеличении концентрации ФС [68].

Учитывая, что основная характеристика некроза – это разрушение клеточной мембраны, то логично предположить преимущественную активацию такого процесса действием ФС, локализованных именно в клеточной мембране. Подобное действие было продемонстрировано, например, на примере гликоконъюгата хлорина [69].

Апоптоз

Апоптозом является программируемая форма клеточной гибели, которая контролируется различными сигнальными процессами, возникающими в клетке. Апоптоз — это нормальный генетически-запрограммированный клеточный механизм, служащий для уничтожения дефектных клеток, поддержания клеточного гомеостаза и т.д. [64, 66].

Выделяют два основных варианта развития апоптоза в клетке: рецепторзависимый путь и митохондриальный путь [64, 66].

Рецептор-зависимый путь включает в себя действие специфических лигандов на рецепторы клеточной гибели, экспрессированные на поверхности клеточной мембраны. Такой класс рецепторов относится к семейству факторов некроза опухоли (*tumor necrosis factor receptor, TNF*). В конечном итоге результатом такого связывания становится активация каспаз[†]. Митохондриальный путь протекает через повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий за счет внешних или внутренних факторов, что также приводит к активации каспаз. Оба пути приводят к разделению клетки на апоптотические тельца, которые перевариваются макрофагами[‡] [23, 64, 66].

В рамках ФДТ результатом токсического действия молекулы ФС чаще всего является митохондриальный сценарий апоптоза, происходящий при разрушении митохондрий, ЭПР и лизосом. Этот сценарий включает в себя выделение в цитоплазму апоптогенных белков (цитохром с) из межмембранного пространства митохондрий. Фотоокислительное действие также приводит к разрушению антиапоптотических белков семейства *Bcl*-2 в ЭПР и митохондриях, активируя апоптоз. Ещё одной менее прямой активацией митохондриального апоптоза может быть

^{*} Блэббинг (Blebbing) – процесс образования пузырьков цитоплазмы на поверхности клеточной мембраны, является нормальным физиологическим процессом. Однако, блэббинг активнее всего реализуется именно при повреждении клеточной мембраны.

⁺ Каспаза- сигнальная цистеиновая протеаза, расщепляющая белки. Действие каспаз приводит к активации механизмов саморазрушения клеточных составляющих.

^{*} Макрофаг – клетка, способная переваривать чужеродные и токсичные для организма частицы и клетки.

фоторазрушение лизосом с выделением протеаз^{*}, которые в свою очередь запускают выделение про-апоптотического белка *tBID*. *tBID* взаимодействует с митохондрией и запускает изменения в проницаемости наружной митохондриальной мембраны, аналогичные прямому разрушению митохондрии (**Рис. 8**) [23].

Таким образом локализация ФС в лизосомах, митохондрия и ЭПР может быть косвенной причиной активации апоптотических механизмов гибели клетки.

Аутофагия

Аутофагия – это процессы жизнедеятельности клетки, приводящие к: а) разборке ненужного или поврежденного клеточного материала (органелл), таким образом, молекула клетка может самовосстанавливаться; б) гибели клетки, в случае, если повреждения органелл будут происходить постоянно. Результатом аутофагии является образование вакуоли, называемой аутофагосомой, с поврежденными фрагментами клетки внутри. В последствии лизосомы переваривают содержимое аутофагосом, возвращая аминокислоты, нуклеотиды и жирные кислоты обратно в клетку [23, 64, 66].

Аутофагия, строго говоря, не является независимым механизмом клеточной гибели, поскольку может происходить только параллельно с другими программируемыми вариантами разрушения клетки (например, апоптозом). Поэтому для обозначения ее вклада используется термин «смерть с аутофагией» («death with autophagy») [70].

Фотодинамическая активация аутофагии пока недостаточно изучена. Но уже сейчас показано, что действие *ROS* приводит к возникновению аутофагии [71]. Ещё одним триггером может быть фоторазрушение белков семейства *Bcl*-2, которые, кроме апоптоза, также блокируют и аутофагию [72].

Интересным моментом, характерным для ФДТ, является способность аутофагии нивелировать действие ФС. Продемонстрировано, что блокирование аутофагии способствует увеличению фототоксичности препаратов [73, 74]. Но такой защитный механизм не проявляется, если целью ФС выступает лизосома из-за её участия в механизмах развития аутофагии [75]. Именно поэтому лизосома является отличной мишенью для препаратов ФДТ [65].

Противоопухолевый иммунный ответ

Одна из важнейших особенностей метода ФДТ – возникновение собственного иммунного ответа организма, направленного против уничтожаемых опухолевых клеток, что увеличивает эффективность лечения и позволяет бороться с метастазами.

Появление этого механизма связано с тем, что некроз, возникающий во время ФДТ, может приводить к развитию воспаления, связанного с поступлением фрагментов погибшей клетки в межклеточное пространство после разрушения мембраны. Среди таких фрагментов содержаться молекулы, ассоциированные с повреждениями (*damage-associated molecular patterns, DAMPs*), которые, связываясь

^{*} Протеаза – фермент, расщепляющий пептидные связи в белках.

с рецепторами опознавания молекулярных структур (*pattern recognition receptors*, *PRPs*), оказывают иммуностимулирующее действие [76].

Долгое время считалось, что апоптоз не может приводить к запуску подобных процессов из-за того, что не происходит разрушение внешней мембраны апоптотического тельца, поскольку оно быстро захватывается макрофагами. Однако сейчас это общепризнанный факт, что апоптоз способен в некоторых случаях активировать адаптивный иммунный ответ [64]. Возникновение адаптивного иммунного ответа как реакции на апоптоз связано с существованием разновидности апоптоза, называемой «иммуногенная клеточная смерть» (*immunogenic cell death*, *ICD*). Такой тип смерти может быть следствием, в том числе, действия ФДТ.



Рис. 9. Образование DAMPs и активация иммунного ответа. Рисунок из [64].

Во время *ICD* погибающая клетка продуцирует особые виды *DAMPs*, которые локализуются на ее поверхности и оказывают иммуностимулирующее действие **(Рис. 9)**. Среди *DAMPs* присутствуют опухолевые антигены^{*}, связываемые в дальнейшем дендритными клетками. Это приводит к передаче антигена наивной Т-клетке[†], которая превращается в эффекторные Т-лимфоциты[‡], направленно уничтожающие опухолевые клетки в организме человека. Таким образом

^{*} Антиген — чужеродное тело, которое специфически связывается с антителом. В некоторых случаях выделение антигенов вызывает массовую выработку антител, то есть иммунный ответ.

⁺ Наивная Т-клетка – иммунные клетки, не вступившие в реакцию с антигеном.

^{*} Эффекторные Т-клетки – иммунные клетки, вырабатываемые из наивных Т-клеток после активации

антигеном. Включают в себя множество различных классов Т-клеток, в том числе, цитотоксические Т-клетки.

реализуется действие приобретенного (адаптивного) иммунитета против опухоли [23, 64, 77].

Повреждение опухолевых сосудов

Еще одним существенным моментом, возникающим при использовании ФДТ, является повреждение сосудистой сети, питающей опухоль.

Особенно это становится актуально для крупных опухолей с размерами, превышающими 0.1 см в диаметре. Они вынуждены развивать собственную сосудистую сеть путем ангиогенеза^{*} [78].

Увеличение проницаемости опухолевых сосудов и их сужение – это классические последствия, вызванные действием ФС во время ФДТ. Результатом этого становится разрушение сосудистой системы и её закупорка [23]. С одной стороны, такое развитие событий приводит к нарушению поступления кислорода в опухоль, что приводит к её гипоксии и гибели. Но, с другой стороны, гипоксия может активировать продуцирование фактора роста эндотелия сосудов (*vascular endothelial growth factor, VEGF*), который снова запускает ангиогенез. Однако, несмотря на этот отрицательный эффект, ФДТ, которая таргетированно уничтожает опухолевые сосуды, на сегодняшний день представляет собой перспективный метод лечения, особенно, если она комбинируется с препаратами, ингибирующими процесс роста новых сосудов [79].

2.7 Физико-химические свойства «идеального» фотосенсибилизатора

Перед тем как перейти К рассмотрению конкретных структур фотосенсибилизаторов, используемых качестве агентов В ФДT, нужно определиться, какими именно свойствами должна обладать молекула-кандидат на создание фотоактивного лекарства.

Первым определяющим критерием является возможность молекулы поглощать излучение в области фототерапевтического окна (~650-850 нм) (Рис. 10) [80]. В тканях за пределами этого интервала в диапазоне <650 нм уже наблюдается абсорбция биологическими молекулами (нуклеиновые кислоты, белки и т.д.). А при >850 нм происходит сильное поглощение молекулами воды. Интервал фототерапевтического окна относится к области видимого света и ближнего инфракрасного излучения. И, помимо хорошей проницаемости, здесь свет также способен относительно глубоко проникать в ткани.

^{*} Ангиогенез – процесс образования новых сосудов в органе или ткани.



Рис. 10. Фототерапевтическое окно. Рисунок из [80].

Важнейшая характеристика любого эффективного ФС – это высокие квантовые выходы генерации *ROS*. Как уже было описано в предыдущих параграфах, фотодинамическая активность молекулы определяется процессами, происходящими с ней после перехода в метастабильное триплетное состояние. Конкуренцию данному переходу составляет, в том числе, флуоресценция. Поэтому ФС, демонстрирующие большие квантовые выходы флуоресценции, не способны эффективно генерировать синглетный кислород [80].

Ближайшей молекулой на пути *ROS* после их генерации является сама молекула ФС. Таким образом, она может быть разрушена до состояния, в котором не способна в дальнейшем участвовать в фотохимических реакциях. Поэтому только соединения с высокой фотостабильностью могут быть перспективными фотоактивными лекарствами.

Еще один немаловажный момент – поведение молекулы ФС в растворе, а именно, её склонность к агрегации. Высокоагрегированные соединения демонстрируют низкие выходы *ROS* и плохую интернализацию. Также подобные свойства сильно затрудняют внутривенное введение препарата [81, 82].

В идеальном случае фотоактивное соединение также должно иметь сродство к опухолевым тканям и преимущественно накапливается в них, что в итоге снижает повреждение здоровых клеток [81, 82].

Кроме этого, ФС должен обладать низкой токсичностью в отсутствие света (темновой токсичностью), быть стабильным в кровотоке и быстро выводиться из организма. Несоблюдение последнего может приводить к продолжительной фоточувствительности кожных покровов после ФДТ [81].

Таким образом потенциальный кандидат-ФС в идеальном случае должен поглощать свет в интервале 650-850 нм, иметь высокие квантовые выходы *ROS* и

сродство к опухолевым клеткам, быть фотоустойчивым и нетоксичным, обладать стабильностью в кровотоке и быстро выводиться из организма.

3. Фотосенсибилизаторы фотодинамической терапии

Электронное строение тетрапиррольных соединений

На сегодняшний день широко распространенным классом фотосенсибилизаторов для ФДТ являются тетрапиррольные макроциклы [83]. Уникальные фотофизические свойства этих соединений определяются наличием большой сопряженной электронной π-системы и особенностями электронного строения. Важнейшие представители этого семейства – порфирины, хлорины, бактериохлорины и фталоцианины (**Рис. 11**).

Отличительной чертой данных фотосенсибилизаторов служит наличие двух основных переходов $S_0 \rightarrow S_1$ (полоса Соре, ~ 400 нм) и $S_0 \rightarrow S_2$ (полосы Q, ~ 400-800 нм) (Рис. 11), которые относятся к переходам типа $\pi \rightarrow \pi^*$. Данные переходы описываются в рамках четырёхорбитальной модели Гутермана (*Gouterman four orbital model*) [84]. При этом для решения задач ФДТ используются только Q-полосы, лежащие в видимой и ближней ИК области.



Рис. 11. Спектры поглощения основных тетрапиррольных фотосенсибилизаторов. Спектры из [85].

Порфирины представляют собой π -системы, состоящие из 22 π -электронов и обладающие выраженной полосой Соре со слабыми Q-полосами (**Рис. 11**). Потеря симметрии порфирина путем восстановления одной периферической двойной связи приводит к образованию хлорина, интенсивно поглощающего красный свет в области >650 нм. Дальнейшее восстановление второй связи в хлорине позволяет

синтезировать бактериохлорин, молекулу, которая абсорбирует излучение уже в интервале 730-780 нм. Структура фталоцианина построена из четырех фрагментов изоиндола, что дополнительно увеличивает π -систему и сдвигает спектр поглощения по сравнению с порфирином в область красного света (~ 700 нм, полоса Q) [86].

Металлокомплексы тетрапиррольных соединений

Поскольку тетрапиррольный цикл обладает планарной структурой и высокой электронной делокализацией, он является идеальным лигандом для синтеза различных тетрадентатных металлокомплексов. Кроме этого, в подобных соединения возможна дальнейшая функционализация аксиального пространства металла. Данные особенности тетрапирролов позволили синтезировать металлкомплексы почти всех известных металлов [87].

Кроме прочего, тетрапиррольные металлокомплексы — это одни из важнейших и наиболее перспективных ФС для метода ФДТ онкологических заболеваний, поскольку зачастую внедрение металла позволяет добиться улучшения фотофизических параметров соединения [80, 88].

Среди определяющих факторов влияния различных катионов металлов на фотодинамическую активность металлокомплексов тетрапирролов можно выделить размер катиона и состояние его валентной оболочки (парамагнетик/диамагнетик).

Зачастую размер катиона способен влиять на локализацию ΦC в клетке. Например, сравнительный анализ комплексов Zn^{2+} и Pd^{2+} порфирина, показывает, что меньший гидродинамический радиус Pd^{2+} способствует прохождению сквозь мембрану [23].

Природа внедренного металла также позволяет изменять фотофизические параметры ΦC в достаточно широких пределах, поскольку влияет и на спектральные характеристики, и на процессы генерации *ROS*. Парамагнитные катионы, такие как Zn^{2+} , Pd^{2+} и Mg^{2+} , увеличивают время жизни триплетного состояния ΦC , что положительно сказывается на квантовых выходах окислителей гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Подобный эффект усиливается с увеличением атомного номера парамагнитного катиона и связан с «эффектом тяжелого атома». Cu²⁺ и $Co^{2+},$ катионы, например, находящиеся Диамагнитные внутри тетрапиррольного макроцикла, снижают выходы флуоресценции практически до нуля одновременно с уменьшением времён жизни возбужденных состояний. Это связано с возникновением взаимодействия между возбужденным состоянием и орбиталью неспаренного электрона. Подобное явление затрудняет возможность протекания бимолекулярных реакций между триплетным состоянием ФС и другими молекулами и снижает квантовые выходы ROS. Поэтому наиболее перспективными с точки зрения ФДТ являются парамагнитные катионы металлов [80].

Металлокомплексы тетрапиррольных фотосенсибилизаторов обычно демонстрирует бата- или гипсохромные сдвиги по сравнению с безметальными аналогами. Например, очень часто батахромные сдвиги характерны для металлокомплексов бактериохлоринов, в то время как гипсохромные характерны для порфиринов, хлоринов и фталоцианинов [80, 82].

Форма спектра поглощения может изменяться под влиянием металла. Порфирин в свободном состоянии имеет четыре Q-полосы и симметрию D_{2h}. Металлокомплексы на его основе обладают уже симметрией D_{4h}, что приводит к вырождению некоторых переходов и снижению количества Q-полос до двух (**Рис. 12**) [80, 82].



Рис. 12. Спектры поглощения порфирина и его металлокомплексов. Спектры из [80].

Внедрение металла – это, зачастую, доступный и эффективный способ увеличить фотодинамическую активность за счёт увеличения генерации *ROS* [80], при этом настройка фотофизических характеристик может осуществляться также за счет функционализации периферии макроцикла.

4. Фотодинамическая терапия опухолевых заболеваний

На сегодняшний день ФДТ онкологических заболеваний представляет собой важнейший инструмент для лечения опухоли простаты, молочной железы, шейки матки, кожи, головы и шеи, легких, и мочевого пузыря [89-91].

Уникальная фотодинамическая активность ФС, используемых в ФДТ, также может быть направлена на уничтожение грибковых [92], вирусных [93] или бактериальных заболеваний [94].

Стандартный протокол лечения ФДТ опухолевого заболевания предполагает внутривенное введения ФС в кровоток человека (Рис. 13). После чего ФС распределяется по организму и, спустя некоторое время, локализуется в злокачественных тканях. Затем производят направленное облучение пораженной области источником света, тем самым генерируя цитотоксичные *ROS*, приводящие к гибели опухолевых клеток.



Рис. 13. Схема лечения ФДТ.

Среди основных достоинств ФДТ – высокая направленность уничтожения именно опухолевых тканей, поскольку пучок света может быть направлен непосредственно на злокачественные ткани, где будут активированы молекулы ФС.

В качестве источников света в настоящее время активно используются лазеры и LED-источники излучения. Для доставки света во внутренние области организма применяется оптическое волокно [95].

Среди недостатков ФДТ можно выделить трудности при лечении опухолей с гипоксией, в которых затруднена генерация *ROS*. Преодолеть данную проблему можно путем варьирования дозы и мощности облучения, а также предварительной оксигенацией тканей [90].

Побочные эффекты лечения обычно ограничиваются болевыми ощущениями во время облучения и фоточувствительностью тканей после терапии [90].

Тетрапиррольные ФС в клинической ФДТ

В этой главе будут описаны только фотосенсибилизаторы, которые либо одобрены соответствующими надзорными органами разных стран для применения в ФДТ опухолей, либо на момент написания текущего обзора находятся в стадии клинических испытаний [91]. Также не рассмотрены различные вариации производных HpD **5** кроме препарата Фотофрин **19 (Рис. 14)**.

Все используемые в практической медицине или находящиеся на различных стадиях клинических испытаний ФС можно разделить по их происхождению на природные и синтетические [91]. К природным соединениям относятся препараты на основе тетрапирролов, выделяемых из крови, а также производные хлорофиллов. Фотофрин 19 представляет собой химически обработанный концентрат крови животных или человека. В класс хлорофиллоподобных соединений входят агенты Фотолон, Фотодитазин, Радахлорин и Талапорфин 20, получаемые из хлорина- e_6 21 (Рис.14, Табл. 1). Также на основе хлорофиллов получены препараты Паделипорфин 22 и Фотохлор 23. Другой группой ФС являются синтетические тетрапиррольные производные, такие как Редапорфин 24, Фоскан 25, РС4 26 и Фотосенс 27.

Фотофрин 19 одобрен в Канаде для лечения рака мочевого пузыря в Японии для лечения рака легких и в США для лечения рака пищевода и легких. Этот препарат является смесью различных порфириновых олигомеров, полученных из гема сухой крови. Фотофрин характеризуется достаточно низкими коэффициентами молярной экстинкции и поглощает свет на длине волны 630 нм (Табл. 1). Среди положительных качеств такого соединения можно выделить хорошую водорастворимость, что способствует легкому введению в кровоток пациента. Среди недостатков высокая и длительная светочувствительность после терапии [96].

Талапорфин 20 – это натриевая соль производного хлорина-е₆ 21 и аспартамовой кислоты 12. Талапорфин 20 одобрен в Японии для лечения рака легких [96]. Фотолон – это препарат, выпускаемый в Белоруссии предприятием «Белмедпрепараты». Он представляет собой хлорин-е₆ 21 смешанный с поливинилпирролидоном в соотношении 1:1 [97]. В России благодаря изобретению проф. Г. В. Пономарева был создан Фотодитазин, являющийся хлорином- e_6 21 в форме *N*-метилглюкаминовой соли [98]. Также российскими учеными был разработан агент Радахлорин, представляющий собой натриевую соль хлорина- $e_6 21$, хлорина- p_6 и пурпурина, и выпускаемый компанией ООО «Рада-фарма» [99]. Все эти лекарства обладают схожими фотофизическими характеристиками И характеризуются быстрым выведением из организма (Табл. 1).



Рис. 14. Фотосенсибилизаторы в клинической ФДТ.

Паделипорфин 22 представляет собой палладиевый комплекс бактериохлорина и одобрен в Европейском Союзе для лечения рака простаты. Паделипорфин 22 – это версия израильского препарата Тукад, которая была модифицирована таурином для улучшения водорастворимости. Паделипорфин 22
поглощает свет на длине волны 762 нм и обладает высоким коэффициентом молярной экстинкции [91, 96].

Фотохлор 23 был создан в Институте рака Розуэлл Парка США в результате работ Р. Пэнди (*R. Pendey*) и Т. Догерти (*T. Dougherty*). Фотохлор 23 является производным пирофеофорбида, поглощает свет на длине волны 660 нм и в настоящее время находится на стадии клинических испытания для лечения опухолей легких, пищевода, гортани и ротовой полости [91].

| ФС | λ _{max,} HM | Emax, M ⁻¹ cm ⁻¹ | Доза, мг/кг | Доза света, Дж/см ² | DLI, ч | Опухоли |
|--------------|-------------------------|---|----------------|--------------------------------------|-----------|---|
| Фотофрин | 630 | $2 \cdot 10^{3}$ | 2-5 | 100-200 | 24-48 | Легких, мочевого пузыря, пищевода |
| Фоскан | 650 | ~10 ⁵ | 0.15 | 20 | 96 | Головы и шеи |
| Талапорфин | 675 | $3 \cdot 10^{4}$ | 1 | 100 | 0.25-4 | Легких |
| Редапорфин | 750 | ~10 ⁵ | 0.5- 1.5 | 50-74 | 0.25 | Головы и шеи |
| Фотохлор | 660 | 4·10 ⁴ | 0.3-1 | 150-200 | 24 | Легких, пищевода, гортани, ротовой полости |
| Фотолон | 660 | ~104 | 2.5 | 50-600 | 4 | Кожи, молочной железы, слизистых оболочек, прямой кишки |
| Фотодитазин | 655 | ~10 ⁴ | 1 | 150-450 | 2 | Кожи, молочной железы, слизистых оболочек |
| Радахлорин | 650 | ~104 | 0.5- 2.4 | 200-300 | 3 | Кожи, легких |
| Паделипорфин | 762 | ~10 ⁵ | 4 | 200 | 0.25 | Простаты |
| PC4 | 675 | $\sim 10^{5}$ | 0.5-2 | 100 | 24-72 | Кожи |
| Фотосенс | 675 | ~10 ⁵ | 0.5-1 | 150-200 | 24-72 | Кожи, молочной железы, легких, гортани, головы и шеи, слизистых оболочек |

Табл. 1. Основные характеристики клинически используемых ФС.

Редапорфин 24 – это синтетический бактериохлорин с полосой поглощения на длине волны 750 нм. Этот препарат был разработан в научной группе Л. Арнаута (*L. Arnaut*) в Португалии и сейчас находится на стадии клинических испытаний; применяется для лечения опухолей головы и шеи. Редапорфин обладает плохой

водорастворимостью и используется вместе с солюбилизирующими добавками [91, 100].

Фоскан 25 одобрен в Европейском Союзе для лечения опухолей головы и шеи и представляет собой синтетический хлорин с интенсивной полосой поглощения на длине волны 650 нм [91]. Среди достоинств этого препарата – его высокая эффективность, которая, однако, может стать причиной повреждения здоровых тканей вокруг опухоли [101].

РС4 26 и Фотосенс 27 – комплексы фталоцианинов с кремнием и алюминием, соответственно; относятся к синтетическим тетрапирролам. Оба препарата обладают полосой поглощения на длине волны 675 нм и высокими коэффициентами молярной экстинкции. РС4 26 был создан в США и в настоящее время проходит клинические испытания для лечения рака кожи [102]. Фотосенс 27 – агент ФДТ, разработанный в России и являющийся смесью ди- три- и тетрасульфированных фталоцианинов алюминия. Фотосенс 27 производится ГНЦ «НИОПИК» и применяется для лечения опухолей кожи, молочной железы, легких, гортани, головы и шеи и слизистых оболочек [103].

Таким образом, на сегодняшний день тетрапиррольные ФС являются основой многих фотоактивных препаратов для ФДТ опухолевых заболеваний. Стоит отметить, что наибольшее применение нашли соединения, поглощающие свет в области >650 нм и обладающие коэффициентами молярной экстинкции не ниже 10⁴.

5. Конъюгаты фотосенсибилизаторов – препараты нового поколения для фотодинамической терапии онкологических заболеваний

Несмотря на бурное развитие ФДТ и выход на рынок ряда новых и перспективных препаратов, в последнее десятилетие активно исследуется возможность увеличение эффективности и селективности классических ФС за счет их связывания с молекулами, имеющими сродство к опухолевым тканям и обладающими цитотоксическими свойствами. Данные молекулы называются конюгированными соединениями или конъюгатами (Схема 2А).



Схема 2

В качестве фрагмента для создания конъюгированного фотосенсибилизатора чаще всего используются различные молекулы – цитостатики (Схема 2В). Такое связывание может усилить общее цитотоксическое действие коньюгата за счёт синергетического действия цитостатика и фотоактивной части. Описываемый подход позволяет использовать преимущества ФДТ и классической химиотерапии для борьбы с, например, резистентными формами опухолевых клеток [104]. Кроме этого, большинство известных цитостатиков обладают некоторой степенью селективности накопления в опухолевых тканях за счет связывания с опухольэкспрессируемыми белками, поэтому фотоактивный конъюгат на их основе тоже сможет проявить аналогичную избирательность.

Среди основных трудностей, возникающих при разработке конъюгированных молекул « Φ С-цитостатик» – снижение биологической активность цитостатика, поскольку эффективное связывание химиотерапевтического препарата с белковыми мишенями будет теоретически затруднено наличием тетрапиррольного макроцикла. Также присутствие цитостатика неизбежно приведет к снижению выхода генерации *ROS* за счёт переноса на него энергии с фотосенсибилизатора [105]. Не исключено также и окислительное разрушающее действие выделяющихся *ROS* на цитостатическую часть.

Для контроля подобных явлений можно применять подход по дистанцированию, заключающийся в варьировании длины линкера, связывающего фрагменты конъюгата [106]. Также широко распространены саморасщепляющиеся (*self-immolative*) линкеры, которые под влиянием различных параметров среды способны высвобождать активные фрагменты конъюгата внутри клетки [107].

5.1 Коньюгаты на основе цитотоксичных металлокомплексов

На сегодняшний день известен большой ряд комплексов переходных металлов, проявляющих значительную противоопухолевую активность и применяемых в клинической практике [108]. Коньюгирование противоопухолевых металлокомплексов с ФС позволяет: 1) создавать агенты комбинированного действия, приводящие к возникновению синергетических противоопухолевых эффектов; 2) конструировать таргетные молекулы и регулировать их поступление в различные клеточные органеллы; 3) изменять баланс гидро- и липофильности терапевтического агента.

Конъюгаты на основе платиносодержащих лекарств

Платиновые противоопухолевые препараты являются одними из наиболее успешных химиотерапевтических агентов, которые хорошо зарекомендовали себя в лечении опухолей мочевого пузыря, яичников, головы и шеи, легких и яичек [109]. Основным механизмом действия таких препаратов является ингибирование репарации и репликации ДНК путем образования аддуктов и сшитых участков за счет связывания аквакомплекса платины с азотистыми основаниями нуклеотидов (Схема 3) [110].



Схема 3

В 1994 г. проф. Г. Брюннер (*H. Brunner*) предложил использовать протопорфирин IX **31** (Схема 4) и его производные в качестве уходящего лиганда в комплексе с платиной [111]. Поскольку тетрапиррольные соединения известны своей аффиностью к липопротеину низкой плотности (*low density lipoprotein, LDL*), экспрессируемому опухолями [112], было сделано предположение, что подобное комплексообразование сможет увеличить селективность накопления Pt²⁺ в опухоли, нивелировав побочные эффекты, характерные для платиносодержащих лекарств Цисплатин **28**, Карбоплатин **29** и Оксалиплатин **30** [109]. В том же году Брюннер

изучил темновое и световое действие этого порфиринового комплекса платины на клеточную линию рака груди MDA-MB-231, впервые показав наличие независимого ингибирования роста клеток благодаря ФДТ и химиотерапевтическому эффекту [113].



Схема 4

Были сделаны попытки синтезировать конъюгированные молекулы на основе бензопорфиринов, которые способны поглощать более длинноволновый свет по сравнению с порфириновыми производными [114]. Так, по реакции Дильса-Альдера IX 31 диенофилами получены протопорфирина с различными смеси региоизомерных продуктов **32-34** по положениям «2», «3» и «7», «8» (Схема 4) [115]. Наилучшие результаты со световой токсичностью в интервалах 1-5 мкмоль и темновой токсичностью 5-10 мкмоль на клетках рака груди MDA-MB-231 показали смеси бензопорфиринов 33 и 34. С целью сдвига поглощения конъюгатов в длинноволновую область в группе Брюннера также были синтезированы цинксодержащие порфирины с увеличенной π -системой **35-40** за счёт связывания с арильными или другими фрагментами через ацетиленовые мостики (Схема 4) [115]. У полученных соединений была незначительная разница между темновой и световой токсичностью, при этом самый фототоксичный конъюгат 50 показал активность порядка 5 мкмоль для линии MDA-MB-231. Внедрение цинка в порфирин почти не оказало влияния на фотоиндуцируемую токсичность конъюгатов.

Была проведена функционализация периферийных двойных связей протопорфирина IX **31** с помощью ПЭГ-линкеров [116], что позволяло регулировать водорастворимость платиновых конъюгатов. Синтезированы разнообразные конъюгаты с различными азотсодержащими лигандами у платины 41-52 (Схема 4) [117-119]. Наиболее перспективными соединениями с точки зрения баланса световой и темновой токсичности оказались водорастворимые молекулы с амиачными и 1,2-диаминоциклогексильными лигандами 41 и 44. Световая и темновая токсичность данных водорастворимых конъюгатов составляет ~1 мкмоль и оказалась выше, чем у препаратов Фотофрин 19 и Цисплатин 28, соответственно на клетках TCCSUP и J82 (опухоли мочевого пузыря) [120]. Платиновые конъюгаты на основе ПЭГ-замещенных синтетических тетраарилпорфиринов демонстрируют протопорфириновым близкую активность К производным, причем ИХ фотоиндуцированная активность зависит от строения азотсодержащих лигандов [121, 122].

Интересным примером являются конъюгат фталоцианина кремния с пиридиновыми аксиальными лигандами, координированными на цис-комплекс платины 53, 54 (Рис. 15) [123]. В данном случае фталоцианин является «неуходящим» лигандом, т.е. не элиминируется при гидролизе. Действительно, поведение подобного конъюгата кардинально отличалось от ранее рассмотренных соединений. На клеточной линии *HeLa* агенты оказались практически нетоксичны (IC₅₀ (в темноте) ~ 100 мкмоль) несмотря на наличие платинового комплекса, а под действием излучения активность возрастала в 7-25 раз. Эксперименты по изучению локализации новых соединений внутри клетки показали, что платиновый фрагмент отвечает за накопление в клеточном ядре, связывая фталоцианин с ДНК и тем самым увеличивая фото-индуцируемый цитотоксический эффект.



Рис. 15. Платиновые конъюгаты.

Одной из лучших платформ для создания конъюгатов металлосодержащих лекарств может по праву считаться 4-тетрапиридилпорфирин 55 (Рис. 15), который способен эффективно связываться с различными металлами, а сам при этом не обладает заметной световой или темновой токсичностью [124]. В 2014 г. Б. Спинглером (B. Spingler) опубликован ряд цис- и тетраплатинированных комплексов порфиринов 56-58 (Рис. 15) [124], которые тестировались на линиях фибробластов человека MRC-5 (неопухолевая линия); HeLa; рака яичников человека А2780 (чувствительна к Цисплатину); рака яичников человека СР70 (резистентна к Цисплатину). Наиболее перспективным оказался транс-комплекс 56, который обладал низкой темновой антипролиферативной активностью (IC₅₀ (в темноте) >30-100 мкмоль), но в условиях фотооблучения демонстрировал впечатляющее увеличение цитотоксичности: $HeLa - IC_{50}$ (на свету) = 37 нМ; $A2780 - IC_{50}$ (на свету) = 21 нМ; СР70 – IC₅₀ = 19 нМ). Его фототерапевтический индекс^{*} (ФИ) достигал на клетках СР70 значений >5260, что, в совокупности с наномолярными диапазонами ингбирующих концентраций, делает соединение 56 высокоперспективным агентом ФДТ нового поколения. Конъюгат 56 накапливается в клеточном ядре и связывается с ДНК путем интеркаляции. Кроме этого, концентрация платины в случае комплекса 56 в ядре клетки была в несколько десятков раз больше, чем концентрация платины при применении цисплатина для аналогичных клеточных линий. Очевидно, порфирин увеличивает накопление платины в клетке, а связанный с ним платиновой

^{*} Фототерапевтический индекс (ФИ) — величина, показывающая, во сколько раз фотосенсибилизатор токсичнее на свету по сравнению с темновыми условиями. ФИ является мерой эффективности фотоактивного препарата и определяется, как ФИ = IC₅₀ (на свету) / IC₅₀ (в темноте).

комплекс таргетирует клеточное ядро. На основе полученных результатов был сделан вывод [124], что основной клеточной мишенью для тетраплатинированных порфиринов является, прежде всего, ДНК, поскольку происходит её фоторасщепление.

Успешные Б. исследования Спинглера использованию по тетраплатинированных порфиринов в ФДТ побудили М.Е. Альберто (*M. E. Alberto*) произвести квантово-химические расчеты подобных конъюгатов 56, 57 (Рис. 15), а также хлориновых и бактериохлориновых аналогов с применением метода DFT [125]. Показано, что наиболее перспективными скаффолдами для таких конъюгатов могут стать именно хлорины и бактериохлорины, поскольку они показывают смещение полосы поглощения в длинноволновую область. Наряду с этим, восстановленные макроциклы снижают скорость гидролиза платинового комплекса, что является причиной снижения побочных эффектов у платиновых лекарств [120]. По результатам расчётов *транс*-комплексы тетраплатиновых порфиринов должны показывать более медленный гидролиз по сравнению с иис-изомерами. Из результатов этих исследований можно сделать вывод, что наиболее эффективным препаратом для ФДТ может стать платинированный бактериохлорин с *транс*конфигурацией уходящего от платины лиганда.

В 2017 г. синтезирован галлий-содержащий тетрапиридинилпорфирин, на основе которого затем получены конъюгаты с цис- 59 или транс- 60 комплексами платины (Рис. 15) [126]. Показано, что введение в боковую цепь платинового металлокомплекса для галиевого тетрапиридилпорфирина увеличивает выход генерации синглетного кислорода в результате действия эффекта тяжёлого атома. На клеточных линиях аденокарциномы толстой кишки мыши Colon 26 и мышиной саркомы Sarcoma 180 конъюгаты 59, 60 продемонстрировали приблизительно одинаковую светоиндуцирующую токсичность с IC₅₀ (на свету) ~ 0.1 мкмоль. Темновая токсичность для *цис*-изомера 59 на указанных линиях составляла IC₅₀ (в темноте) >100 мкмоль, при этом *транс*-изомер был несколько более токсичным IC₅₀ (в темноте) ~ 20-70 мкмоль. Интересно, что эксперименты по клеточной локализации показывают высокое содержание конъюгатов именно в цитозоле, а не в ядре, как было продемонстрировано в работах Ж. Гуо [123] и Б. Спинглера [124] для соединений 53, 54, 56-58. Низкая темновая токсичность и, соответственно, высокий ФИ делает цис-соединение 59 наиболее перспективным агентом ФДТ. В связи с этим, для агента 59 были проведены эксперименты *in vivo* на мышах с привитыми опухолями Colon 26, в которых была показана высокая селективность накопления в опухолевых тканях. ФДТ с использованием галлиевого иис-конъюгата 59 на мышах с привитыми опухолями Colon 26 демонстрирует почти полное ингибирование опухоли в течение 12 недель.

Цинковый 61 и индиевый 62 *цис*-тетраплатиновые порфириновые конъюгаты (Рис. 15) [127] демонстрируют близкую световую токсичность на клетках *Colon* 26 и *Sarcoma* 180 (IC₅₀ (на свету) ~ 0.1 мкмоль), при этом темновая токсичность для комплекса 61 на линии *Colon* 26 (IC₅₀ (в темноте) = 3.76 мкмоль) оказалась на порядок выше, чем для для индиевого комплекса 62 (IC₅₀ (в темноте) = 32.89 мкмоль). Для индиевого конъюгата 62 было изучено биораспределение *in vivo* и

проведена успешная ФДТ мышей с привитыми опухолями *Colon* 26. При сравнении противоопухолевых свойств конъюгатов **59-62** с «безметальным» аналогом **63** на основе *транс*-1,2-диметилциклогексильного комплекса платины (**Рис. 15**) [128], показано, что на линии Colon 26 все пять конъюгатов обладали близкими цитотоксическими свойствами. В экспериментах с клеточной локализацией агент **63** преимущественно накапливался в мембранах клетки, что исследователи объясняют его относительно высокой липофильностью. Это же его свойство, по всей видимости, позволило провести эффективную ФДТ мышей с привитой опухолевой линией *Colon* 26, где конъюгат на 4-й день после облучения полностью уничтожил опухолевые ткани. При этом появление новых злокачественных образований не было обнаружено в течение 18 дней.

Конъюгаты на основе рутений-содержащих агентов

Несмотря на то, что в настоящий момент, комплексы рутения, ещё не прошли клинических испытаний [129], они являются хорошей альтернативой классическим платиновым лекарствам, поскольку обладают меньшей системной токсичностью. Механизм ингибирования опухолевых клеток для препаратов рутения является аналогичным платиносодержащим комплексам и предусматривает связывание с ДНК в ядре клетки [130]. Пионерскими исследованиями в области применения рутений-конъюгированных порфиринов для ФДТ стали работы Ш. Свейви (*S. Swavey*) и Л. Жюльера-Жаннерета (*L. Juillerat-Jeanneret*) вместе с Б. Терриеном (*B. Therrien*).

В 2008 г. Свейви опубликовал работу по изучению фотофизических свойств порфирина, конъюгированного фторированного с двумя рутениевыми бипиридиновыми комплексами [131]. Рутениевые комплексы были координированы через пиридиновые заместители в 15 и 20 мезо-положениях. Синтезированный конъюгат связывался с ДНК в растворе и расщеплял её под действием светового излучения. Также эксперименты по изучению токсичности на клеточных линиях фибробластов и меланомы человека показали, что рутениевый конъюгат оказался нетоксичным в темноте при концентрациях 5 и 10 мкмоль/л. При облучении происходило почти полное ингибирование клеточного роста линии меланомы при 5 мкмоль, однако, рост фибробластов при этой концентрации практически не ингибировался. Таким образом, рутениевый конъюгат предпочтительно оказывал цитотоксическое действие на опухолевые клетки.

Более подробное изучение механизмов действия комбинированных агентов на основе порфиринов и рутениевых металлокомплексов провели Жюльера-Жаннерет и Терриен. В 2008 г. опубликована работа, в которой описаны синтез тетрарутениевых порфиринов **64** (**Puc. 16**) [132] на основе тетрапиридилпорфирина **55**. Исследование клеточной локализации показало накопление рутениевого конъюгата в цитоплазме клеточной линии меланомы человека *Me*300, что не согласуется с типичным накоплением рутенивых соединений в клеточном ядре [129]. Изучение флуоресценции порфиринового и рутениевого фрагментов молекулы в клетке показывает отсутствие деградации металлосодержащей части. Рутениевые порфиринсодержащие конъюгаты демонстрируют низкую *in vitro*

темновую токсичность на клеточной линии *Me300*. При этом такие производные обладают высокой фототоксичностью – для некоторых соединений ингибирование роста *Me300* клеток достигало 60-80% уже при концентрации 10 мкмоль и энергии облучения 5 Дж/см², что является отличным результатом.



Рис. 16. Рутениевые конъюгаты.

Для изучения влияния количества арилрутениевых групп, а также способа их соединения через пиридиновый фрагмент на цитотоксичность, синтезированы тетрарутениевые производные 64, 65 (рис. 16), соединённые посредством 4пиридина с порфириновым ядром и монорутениевые комплексы 66 и 67 на основе 3-пиридилпорфирина [133]. В отличие от монорутениевых конъюгатов 66, 67, которые слабо ингибируют рост *Me300* клеток в темноте, их тетрарутениевые аналоги **64** и **65** демонстрируют значимую темновую токсичность (IC₅₀ (в темноте) ~ 20-50 мкмоль). Такой эффект может быть отнесен к синергетическому действию химиотерапевтической части агента. Эксперименты по изучению световой токсичности привели исследователей к выводу, что количество рутениевых фрагментов оказывает не столь значимое влияние, как паттерн связывания с пиридиновым фрагментом. Оказалось, что тетрарутенивый 3-пиридилпорфирин 65 является наиболее фотоактивным по сравнению с производными 64, 66 и 67 (эффективно ингибирует рост клеток при концентрациях 5 мкмоль и мощности облучения в 0.5 Дж/см²). Исследуемые конъюгаты предпочтительно накапливались в цитоплазме, при этом, 3-пиридилпорфирины были распределены по ней равномерно, в отличие от 4-пиридилпорфириновых аналогов.

Конъюгаты 65 и 67 были исследованы в качестве фотосенсибилизаторов ФДТ in vivo (Рис. 16) [134] на мышах с ксенотрансплантантами карциномы ротовой человека «некоординированным» 3полости в сравнении с Наиболее эффективным оказался тетрапиридилпорфирином. агентом ΦДТ тетрарутениевый **65**. Оптимальными порфирин параметрами лечения. позволившими стабилизировать рост опухолевых тканей в течение 30 дней и больше, стали DLI = 24 ч, мощность излучения – 10 Дж/см², плотность мощности – 50 mW/cm² и концентрация 65 – 0.44 мкмоль/кг. Среди особенностей поведения рутениевых конъюгатов порфиринов отмечено высокое время выведения из организма, которое составляло до нескольких недель. В надежде прояснить механизм действия агентов, были проведены исследования локализации на клеточной линии карциномы ротовой полости человека КВ. Однако, в очередной раз конъюгаты не показывали накопление в клеточном ядре, что позволяет предположить альтернативный механизм, не предполагающий связывание с ДНК.

С улучшения фотофизических показателей целью порфириновых производных 65 и 67, был синтезирован тетрарутениевый хлориновый конъюгат 68 Следует отметить, что производные хлорина могут быть (Рис. 16) [135]. активированы для генерации ROS в более длинноволновой области. Добившись заметного смещения полосы поглощения для хлоринов 68 в область 650 нм для новых молекул, исследователи столкнулись с их необычным поведением in vivo на мышах с ксенотрансплантантами карциномы ротовой полости человека. Оказалось, что наиболее эффективным препаратом являлся рутениевый комплекс [(пкумол)RuCl₂(пиридин)] 69, который не содержит в составе фотосенсибилизатор и использовался в качестве агента сравнения. Также было изучено противоопухолевое действие безрутениевого 3-тетрапиридилхлорина. Показано, что механизм действия конъюгата 68 не может быть комбинацией фотодинамического и цитотоксического действия, как это было для порфириновых производных 65. С целью выяснения причины такого поведения синтезированного хлорина, авторы изучили его клеточную локализацию и обнаружили преимущественное таргетирование ЭПР. При этом безрутениевый 3-тетрапиридилхлорин накапливался лишь в митохондриях и лизосомах. Основываясь на известном факте, что фотосенсибилизаторы, накапливающиеся в ЭПР, способны вызывать активацию аутофагии, которая, в свою очередь, ускоряет пролиферацию опухолевых клеток, авторы делают вывод, что именно это может быть причиной нивелирования действия цитотоксической аренрутениевой части. Несмотря на этот негативный эффект, конъюгат 68, тем не менее, способен заметно стабилизировать рост опухолевых тканей и поэтому является неплохим агентом ФДТ.

Еще одной научной группой, внесшей заметный вклад в создание рутениевых порфириновых конъюгатов является коллектив под руководством Т. Джианферрара (*T. Gianferrara*) и А. Бергамо (*A. Bergamo*). В их лаборатории был разработан метод по созданию тетрарутениевых порфириновых конъюгатов **70**, в которых порфириновая часть и рутениевый фрагмент связаны линкерами различной длины и гидрофильности (**Puc. 16**) [136, 137]. Исследования темновой токсичности *in vitro* на клеточных линиях *MDA-MB-231* (опухолевая линия) и *HBL-100* (неопухолевая

48

линия) показали, что синтезированные конъюгаты более токсичны по сравнению с рутениевыми комплексами, не содержащими порфирины. Авторы объясняют это что тем. тетрапиррольный фрагмент увеличивал накопление рутениевых цитостатиков в клетке. Кроме этого, темновая токсичность соединений находилась на уровне IC_{50} (в темноте) = 4-10 мкмоль, что является выраженным действием, цитотоксическим которое может быть отнесено только к синергетическому действию рутениевого комплекса. Фотодинамическая активность самого эффективного агента с линкером на основе ПЭГа находилась на уровне IC₅₀ (на свету) = 0.56 мкмоль при 1 Дж/см² для клеточной линии MDA-MB-231, что фактически на порядок больше, чем для рутениевых конъюгатов 64-68. Несмотря на то, что в первых экспериментах было показано, что комплексы 70 предпочтительно локализуются в клеточной цитоплазме [136, 137], более поздние исследования [138] демонстрируют возможность связывания этих комплексов с ДНК в растворе и её последующее фоторасщепление под действием света.

Таким образом, для рутениевых конъюгатов тетрапиррольных фотосенсибилизаторов не происходит их накопления в клеточном ядре в отличии от платиносодержащих комбинированных агентов. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что в случае с рутениевыми комплексами не происходит связывания с ДНК с последующим ингибированием ее репликации или фоторасщеплением под действием ФС. Вопрос о механизме действия рутениевых комплексов в составе таких конъюгатов остается открытым, что приводит к поиску новых клеточных мишеней для этого вида противоопухолевых агентов [139].

Конъюгаты на основе других цитотоксичных металлокомплексов

Наряду с платиновыми и рутениевыми комплексами тетрапиррольные производные рения, железа и меди также проявляют значительные цитотоксические свойства. Так, в 2015 г. были синтезированы металлоконъюгаты на основе порфиринов и рениевых комплексов [1,4,7]-триазоциклононана (*triazocyclononane*, *TACN*), содержащие один (конъюгат 71) или четыре (конъюгат 72) рениевых атома (Схема 5) [140]. Исследование их токсичности на клеточных линиях *HeLa*, опухоли легких человека H460M2 и неопухолевой линии HBL-100 показало, что, как и в случае рутениевых производных, наиболее токсичным в темноте и на свету оказался тетраконъюгат 72 (IC₅₀ (в темноте) = 7-30 мкмоль и IC₅₀ (на свету) ~ 0.5 -1 мкмоль при энергии облучения 10 Дж/см²). Аналогичное производное, содержащее 4 ТАСМлиганда, которые не координированы на рений, показало полное отсутствие темновой токсичности на всех клеточных линиях IC₅₀ (в темноте)> 100 мкмоль, при этом на свету IC₅₀ (на свету) ~ 1-10 мкмоль при энергии облучения 10 Дж/см². Таким металлокомплексы рения, связанные с порфирином, повышают образом, цитостатическую активность соединений за счет синергетического эффекта. Оба агента 71 и 72 аккумулируются в клеточной цитоплазме, как и в случае с большинством порфириновых конъюгатов рутения. Следует отметить, что необходимость использования энергии 10 Дж/см² для активации рениевых агентов против 1 Дж/см² для рутениевых аналогов говорит о сравнительно низкой токсичности конъюгатов 71 и 72.



Схема 5

Интересным примером по созданию комбинированного агента является работа Ж. Кси (Z. Xie), который связал два порфириновых фрагмента с производным на основе ферроцена. Полученный конъюгат **73** может быть использован для комбинированной ФДТ и хемодинамической терапии (*chemodynamic therapy, CDT*) (Схема **5**) [141]. *CDT* как метод лечения опухолевых заболеваний реализуется посредством образования *ROS* внутри клетки без использования внешнего источника облучения [142]. Например, ферроцены благодаря Фентоновским превращениям известны своей способностью к генерации высокотоксичного гидроксил-радикала. *CDT* не требует высокого содержания кислорода в опухолевых тканях для эффективного лечения, что позволяет преодолеть один из главных недостатков ФДТ – невозможность терапии гипоксичных злокачественных образований. Авторами было проведено исчерпывающее исследование темновой и фотоактивностей не только конъюгата **73**, но и составляющих его фрагментов порфирина и ферроцена по отдельности. В присутствии и отсутствии перекиси водорода они однозначно доказали наличие синергетического токсического

действия обоих частей агента. На клеточной линии опухоли груди МСF-7 фотодинамическая активность **73** составляла IC₅₀ = 25 мкмоль.

5.2 Конъюгаты на основе цитостатиков-интеркаляторов ДНК

Еще одним классом соединений, широко использующихся в дизайне конъюгированных фотосенсибилизаторов, являются цитостатики-интеркаляторы ДНК на основе различных органических молекул, в состав которых не входят металлокомплексы. Посредством связывания со структурными фрагментами цепочки ДНК данные агенты способны нарушать жизнедеятельность опухолевой клетки, вызывая её гибель. Таким образом, создавая комбинированные агенты на основе подобных цитостатиков, можно увеличивать общую терапевтическую активность препарата.

ДНК Среди цитостатиков-интеркаляторов особенно выделяется доксорубицин 74 (doxorubicin, DOX) (Схема 6), который представляет собой антрациклин и используется уже более 40 лет для лечения широкого круга опухолевых заболеваний [143]. Основной механизм действия доксорубицина 74 включает связывание с ДНК и белками, участвующими в транскрипции и репликации ДНК, что приводит к клеточной смерти [143]. Д.-Д. Хуанг синтезировал конъюгат 75 (Схема 6) [144], в котором фталоцианин цинка был связан доксорубицином посредством линкера, расщепляемого фибробласт-активирующим белком (Fibroblast activation protein, FAP), экспрессируемым в значительных количествах опухолевыми клетками [145]. В связанном состоянии во время активации конъюгата действием света реализуется процесс переноса энергии на доксорубицин, что блокирует образовании ROS. Если же конъюгат 75 находится в опухолевых тканях, FAP расщепляет его на части, активируя ФДТ параллельно с высвобождением доксорубицина 74, проявляющего собственную цитотоксичность. Таким образом, конъюгат 75 представляет собой про-лекарственную форму доксорубицина и фталоцианинового фотосенсибилизатора. Было показано, что добавление FAP способствует четырехкратному увеличению флуоресценции 75, что свидетельствует об ингибировании процессов переноса заряда за счёт расщепления пептидной связи, приводящего к высвобождению фталоцианина в свободном виде. Аналогичные выводы следовали и из изучения клеточной локализации фрагментов конъюгата 75, после его инкубирования с клетками гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 в присутствии FAP: происходило накопление доксорубицина в клеточном ядре, и фталоцианина 76 - в митохондриях. Исследования по измерению цитотоксичности на свету также свидетельствовали о том, что в присутствии FAP происходит активация конъюгата: без добавления *FAP* IC₅₀ (на свету) ~ 0.56 мкмоль; с добавлением *FAP* IC₅₀ (на свету) ~ 0.13 мкмоль. Кроме этого, благодаря добавке FAP к клеткам HepG2 возрастала темновая токсичность, что является результатом синергетического действия высвобожденного доксорубицина. Высокая опухолеспецифичность агента 75 была продемонстрирована in vivo на мышах с привитыми опухолями, где после введения соединения разгорание флуоресценции происходило преимущественно в опухолевых тканях.



Схема 6

В качестве другой стратегии синтеза гетеродимеров тетрапиррольных фотосенсибилизаторов с интеркаляторами ДНК выбрано конъюгирование несимметричного порфирина А₃В с криптолепином и карболином посредством медь-катализируемого диполярного циклоприсоединения азида к алкину (copper azide alkyne cycloaddition, CuAAC) [146] (Рис. 17). Фрагменты криптолепина и карболина входят в состав некоторых природных алкалоидов и способны связываться с ДНК и ингибировать её активность [147]. По сравнению со своими активными составными частями, конъюгат с криптолепином 77 демонстрирует синергетическое увеличение как световой, так и темновой токсичностей на клеточной линии карциномы легких A549 с IC_{50} (в темноте) = 33.6 мкмоль и IC_{50} (на свету) = 2.5 мкмоль [148]. Комбинированный агент с карболином 78 на той же клеточной линии был нетоксичен в темноте IC₅₀ (в темноте) >100 мкмоль и высокотоксичен на свету IC₅₀ (на свету) = 0.06 мкмоль [149]. Фотодинамическая активность 78 уже находится на наномолярном уровне и в совокупности с отсутствием темновой токсичности делает этот конъюгат высокоперспективным соединением для лечения опухолевых заболеваний. Возможно, столь значительная разница в поведении агентов 77 и 78 заключается не столько в типе цитостатика, сколько в разном количестве положительных зарядов, сосредоточенных на порфирине кардинально В мезо-положениях, что меняет клеточную

интернализацию. Хинаксолиновый конъюгат с А₃В порфирином **79** [150], также демонстрирует значительный синергетический эффект: для клеточной линии А549 обнаружено существенное увеличение фототоксичности (IC₅₀ (на свету) = 0.06 мкмоль) по сравнению со свободным порфириновым аналогом. Близкие значения световой токсичности для соединений **78** и **79** позволяет предположить, что тип цитостатика в данном случае оказывает минимальное влияние на биологическую активность конъюгатов – очевидно, пиридил-замещенный положительно-заряженный порфирин определяет *in vitro* поведение этих соединений.



Рис. 17. Конъюгаты порфиринов с цитостатиками-интеркаляторами ДНК.

5.3 Конъюгаты на основе ингибиторов клеточных белков

Одним из наиболее популярных ингибиторов тирозинкиназ, используемых для создания конъюгатов с ФС, является эрлотиниб (erlotinib) 80, который связывается с рецептором эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) и применяется для лечения опухолей поджелудочной железы и рака 18) Азидосодержащие фталоцианины легких (Рис. [151]. цинка легко конъюгируются с эрлотинибом по реакции *СиААС* [146]. Синтезированные гетеродимеры 81 показали высокую специфичность к EGFR-положительной клеточной линии *HepG2* с трехкратным избытком в накоплении по сравнению с EGFR-отрицательными HELF. контрольными клетками Незамешенный фталоцианин цинка (ZnPc), демонстрировал одинаковый уровень аккумуляции в обеих клеточных линиях. Показано, что увеличения длины линкера снижает фототоксичность конъюгатов 81. Таким образом, с помощью эрлотиниба удалось осуществить направленную доставку фталоцианина в опухолевые клетки [152]. Световая токсичность для незамещенного ZnPc и соединений 81 оказалась

приблизительно одинаковой (IC₅₀ (на свету) ~0.01-0.03 мкмоль для HepG2). Таким образом синергетический вклад EGFR-ингибирующей части оказался незначительным. В экспериментах *in vivo* на мышах с ксенотрансплантантами карциномы человека A431, конъюгат **81** демонстрирует пятикратное увеличение накопления в опухоли по сравнению со фталоцианином цинка.

В 2015 г. был синтезирован ряд гетеродимеров **82**, в которых эрлотиниб посредством полиэтиленгликолятных линкеров различной длины конъюгировался в α - или β -положения фталоцианина цинка [153]. Производные **82**, также как и их родственные гетеродимеры **81**, демонстрировали высокую опухолеспецифичность и фототоксичность, при этом конъюгаты с α -типом сочленения были более эффективными по сравнению с β -аналогами. С возрастанием длины линкера было отмечено небольшое снижение световой токсичности новых агентов **82**.

Существуют несколько примеров конъюгирования фталоцианина цинка по α и β -положением посредством полиэтиленгликолятных линкеров с производным эрлотиниба, не содержащим 3-этиниланилинового фрагмента с образованием гетеродимеров **83** [153]. Эти молекулы демонстрируют рекордную фотоиндуцируемая активность на *EGFR*-положительной клеточной линии *HepG2* (IC₅₀ (на свету) ~ 1-10 нМ).



α- и β– конъюгаты, n = 1, 2, 3.

Рис. 18. Конъюгаты порфиринов с препаратом эрлотиниб.

Известно, что фталоцианины кремния за счет наличия аксиальных лигандов не склонны к агрегации, которая может в значительной степени снижать фотодинамическую активность. Д.-Х. Джанг (*Z.-H. Zhang*) и Д.-П. Ху (*J.-P. Xue*) синтезировали несколько конъюгатов **84** с двумя аксиальными эрлотинибовыми лигандами, связанные с кремнием с использованием ПЭГилированного линкера,

присоединенного к хиназолиновому фрагменту цитостатика (Рис. 18) [154]. Как и ожидалось, в отличие от молекул 81-83, конъюгаты 84 не склонны к агрегации в разных растворителях. При этом, как и ранее разработанные агенты 81-83, кремниевые конъюгаты оказались селективны в отношении *EGFR*-экспрессирующей линии *HepG2* и показали фототоксичскую активность в области низких наномолярных концентраций (IC₅₀ (на свету) ~ 8-27 нМ). Показано, что увеличение длины линкера для соединений 84 приводило к снижению выхода *ROS* и, как следствие, к снижению световой токсичности.

В работе Панди для лечения опухоли мочевого пузыря созданы конъюгаты 85 и 86 (Рис. 19), состоящие из трёх различно-направленных активных частей, а именно, фотосенсибилизатора, EGFR-таргетирующего и PET (positron emission tomography) лигандов [155]. В этих конъюгатах в качестве фотоактивного соединения применяли производное пирофеофорбида-а; фрагмент эрлотиниба служил биологическим вектором к рецепторам факторов роста, и, наконец, в качестве РЕТ-составляющей был использован ¹²⁴I. Таким образом, благодаря присутствию в составе молекулы лиганда к EGFR, создаваемые соединения должны селективно накапливаться в опухоли мочевого пузыря, что может быть проконтролировано с помощью РЕТ и флуоресцентного имиджинга, при этом фрагменты феофорбида и эрлотаниба обеспечивают комбинированный характер терапии рака. С целью исследования селективности накопления конъюгатов в опухолевых клетках были выбраны две клеточные линии опухоли мочевого пузыря UMUC3 (EGFR-положительная) и *T24* (*EGFR*-отрицательная). Поскольку соединения 85 и 86 плохо растворимы в воде, как и большинство фефорбидных изучения их биологической активности использованы производных, для солюбилизирующие добавки *Tween* или *Pluronic*. Их выбор оказался критически важным для достижения высокой эффективности накопления конъюгатов в EGFRэкспрессирующей опухолевой линии. Установлено, что исследуемые конъюгаты с добавкой *Pluronic* были селективны в отношении UMUC3 клеток, причем, конъюгат 86 показал лучшие результаты. Измеренная фототоксичность для соединений составляла IC₅₀ (на свету) ~ 0.13-1 мкмоль для *T24* и IC₅₀ (на свету) ~ 0.03-0.3 мкмоль для UMUC3, что говорит о повышении токсичности в отношении EGFRположительных клеток. Очевидно, это можно объяснить синергетическим эффектом фрагмента эрлотиниба. Данные выводы подтверждаются экспериментами, демонстрирующими блокирование автофосфорелирования EGFR после лизиса конъюгат-содержащих клеток. Большая эффективность агента 86 по сравнению с аналогом 85 объяснена авторами на основе результатов по измерению уровня ROS после ФДТ. Оказалось, что, не смотря на одинаковое поведение конъюгатов в растворе, молекула 85 внутри клеток генерирует меньше ROS. Были проведены in vivo исследования по изучению фотодинамической активности соединения 86 на мышах с привитыми ксенотрансплантантами UMUC3. Высокая эффективность ФДТ объясняется селективностью накопления 86 в опухоли, что было зафиксировано методами флуоресцентного и *PET* имиджинга.



Рис. 19. Конъюгаты пирофеофорбида и фталоцианинов.

Еще одним удачным примером создания конъюгатов фотосенсибилизаторов, в которых цитостатическая часть является одновременно опухоль-направленным вектором и химиотерапевтическим агентом, является создание конъюгата 87 на основе фталоцианина цинка и производного ганетизиба (ganetesib) [156]. Ганетезиб относится к ингибиторам белка теплового шока Hsp90 (human shock protein), блокирование деятельности которого приводит к возникновению апоптоза и гибели опухолевых клеток. Эта терапевтическая молекула примечательна ещё и тем, что связывается только с активированным состоянием *Hsp90*, в котором этот белок преимущественно находится именно в опухолевых клетках, а не в здоровых [157]. Для исследования селективности накопления конъюгата были выбраны клетки опухоли груди MCF7, известные высокой экспрессией Hsp90, а также неопухолевая линия фибробластов мыши *NIH/3T3*. В серии клеточная сравнительных экспериментов по изучению флуоресценции конъюгата 87 показано, что для него характерно повышенное накопление именно в *Hsp90*-экспрессирующей линии Hsp90. При этом блокирование Hsp90 приводит к снижению аккумуляции 87. In vitro токсичности однозначно демонстрируют по темновой наличие данные синергетического действия ганетезиба в составе конъюгата 87 на ингибирование клеточного роста. Темновая токсичность конъюгата 87 оказалась сопоставима с цитотоксичностью интактного ганетезиба. Фототоксичность комбинированного агента 87 составляла IC₅₀ (на свету) ~ 0.04 мкмоль для *MCF7*, что было в несколько раз выше, чем у ZnPc. При *in vivo* исследованиях на мышах с ксенотрансплантантами опухоли груди 4T1, агент 87 аккумулировался в опухолевых тканях с более высокой

селективностью в сравнении с ZnPc, ингибировал рост опухоли и на свету, и в темноте, тем самым показывая комбинированную ФДТ и химиотерапию. При этом эффективность лечения опухолей с использованием конъюгата 87 была выше, чем у его составных частей по отдельности. Таргетированное действие в совокупности с отличной фототоксичностью и синергетическим химиотерапевтическим действием делает 87 весьма перспективным лекарством для фотодинамического лечения Hsp90-экспрессирующих опухолей.

В более поздней работе синтезировано конъюгированное производное 88 на основе фталоцианина цинка и ленватиниба (lenvatinib) [158] (**Рис. 19**). Ленватиниб одобрен FDA и EMA для лечения опухолей щитовидной железы, печени и почек [159]. Механизм его действия основан на ингибировании VEGFR и других тирозинкиназ. Однако, этот агент известен своей способностью вызывать лекарственную устойчивость, чему способствует высокий уровень глутатиона (glutathione, GSH) в опухолевых тканях [159]. Под влиянием GSH происходит связывание ленватиниба с Р-гликопротеином, который выводит препарат из клеток, ингибируя его терапевтическое действие. Идея создания конъюгата 88 заключалась в попытке преодоления GSH-зависимой лекарственной устойчивости благодаря действию комбинированному фотодинамическому фталоцианина, который способен разрушать GSH в клетках с помощью ROS. Изучение биологической активности *in vitro* проведено на трех клеточных линиях опухоли груди: MCF7, 4TI и MCF7/ADR (резистентная опухоль). Темновая токсичность конъюгатов была незначительна для всех клеток. Наилучшая фотодинамическая активность зафиксирована для конъюгата с линкером на основе С₈-углеродной цепочки. Изучение уровня GSH после облучения в инкубированных с 88 клетками показало значительное его снижение. По всей видимости, это и обуславливает возникновение высокой цитостатической активности в отношении резистентных MCF7/ADR клеток.

Более эффективное индуцирование апоптоза и ингибирование клеточной пролиферации при облучении в случае использования конъюгата 88 с С8 линкером (IC₅₀ (на свету) ~ 20-50 мкмоль для всех указанных выше опухолевых линий) по сравнению с ленватинибом и ZnPc, объяснено авторами ингибированием антиапоптотического белка Bcl-2 одновременно с фоторазрушением Р-гликопротеина. Рассчитанные индексы комбинированного действия показали наличие наибольшего синергизма именно для резистентной опухолевой линии MCF7/ADR с наивысшим уровнем GSH. Поскольку синтезированный С8 конъюгат 88 плохо растворим в водных растворах, было принято решение использовать его инкапсулированную форму на основе водорастворимых наночастиц PEG₂₀₀₀-PLA₂₀₀₀. In vivo изучение фотодинамической активности на мышах с ксенотрансплантантами 4T1 показало накопление препарата в раковых клетках, а действием света было произведено полное ингибирование роста опухоли, чего не удалось достичь ДЛЯ инкапсулированных ZnPc и ленватиниба.

Д. Ли (*J. Li*) и Д. Ху (*J. Xue*) синтезировали конъюгат **89** [160], составными частями, которого являются кремнийсодержащий фталоцианиновый фотосенсибилизатор, гефитинибовый (*gefitinib*) скаффолд, а также

трифенилфосфониевый фрагмент (ТРР). Гефитиниб известен своим избирательным действием в отношении EGFR (Рис. 20) [167]. Введение трифенилфосфониевого фрагмента обусловлено его способностью связываться с митохондриальными мембранами [161]. Таким образом, конъюгат 89 за счет EGFR-лиганда обладает таргетными свойствами, ТРР обеспечивает его поступление митохондрии, являющиеся перспективной мишенью для ФДТ [23], а фталоцианиновый фрагмент обеспечивает фотодинамическое действие. Для *in vitro* экспериментов по изучению токсичности и селективности были выбраны нормальная клеточная линия HELF (EGFR-отрицательная) и клеточная линия карциномы человека HeLa (EGFRположительная). Установлено, что конъюгат 89, в отличие от кремнийсодержащего фталоцианина и гетеродимеров, в которых соответствующий фталоцианин связан с гефитинибом или фрагментом TPP не только избирателен в отношении EGFRположительной *HeLa*, но также преимущественно накапливается в митохондриях. В условиях облучения соединение 89 ингибировало пролиферацию HeLa клеток в низких наномолярных концентрациях (IC₅₀ (на свету) = 1.5 нм), что на 1 - 2 порядка превосходит этот параметр для вышеуказанных соединений сравнения. Очевидно, реализация двойного таргетирования (по отношению к EGFR и митохондриальным мембранам) позволяет добиться высокой эффективности противоопухолевого действия ФС. Действительно, с применением методов молекулярной динамики, было показано, что после связывания с митохондиральной мембраной, вращение агента 89 может быть затруднено, что способствует улучшению фотодинамических параметров противоопухолевых фотосенсибилизаторов [162]. В отсутствии облучения соединение 89 оказалось приблизительно на порядок более токсичным по отношению к клеткам линии *HeLa* в сравнении со фталоцианином без гефитинибового фрагмента, что может быть объяснено возникновением синергизма.



Рис. 20. Конъюгаты феофорбида и фталоцианинов.

Концепцию двойного таргетирования иллюстрирует также коньюгат **90** [163], в котором фталоцианин кремния, в качестве одного аксиального лиганда содержит эрлотинибный фрагмент, а в качестве второго – метилсульфонамидный скаффолд. Последний известен своим избирательным накоплением в ЭПР, участвующем в ряде сигнальных процессов, повреждение которого вызывает ЭПР-стресс, что в итоге приводит к гибели клетки по пути апоптоза [164]. Таким образом, по замыслу авторов, таргетный ФС 90, должен связываться с EGFR-экспрессирующими опухолями, а затем аккумулироваться в ЭПР. Действительно, синтезированная молекула демонстрирует повышенное связывание с EGFR-положительной опухолевой клеточной линией А549, с предпочтительной локализацией в клеточном ЭПР. Конъюгат 90 оказался более фототоксичным, чем фталоцианины сравнения, не содержащие эрлотинибных и/или метилсульфонамидных фрагментов. Световая цитотоксичность 90 в отношении А549 показала выдающиеся значения IC₅₀ (на свету) = 7 нм. При этом видимого изменения токсичности в отсутствии облучения не было зафиксировано по сравнению с фталоцианином цинка, что, по всей синергетический эффект. видимости, исключает Таким образом, противоопухолевые свойства 89 И 90 конъюгатов демонстрируют привлекательность подхода по двойному таргетированию: накоплению агента сначала путем связывания с клеточным рецептором, c последующим проникновением в органеллу-мишень.

5.4 Конъюгаты на основе антимитотических препаратов

Одну из ключевых ролей в химиотерапии рака играет клеточный белок тубулин, ответственный за процесс деления клеток (митоз), внутриклеточный транспорт и метастазирование опухолей [165]. Такая глубокая вовлеченность тубулина в процессы, связанные с канцерогенезом, делает его важной мишенью для химиотерапии. Молекулы, ингибирующие динамические процессы полимеризации/деполимеризации клеточного белка тубулина называются антимитотическими агентами [166]. Использование антимитотических препаратов конъюгированных молекул представляет собой ДЛЯ создания ещё одну параметров альтернативную стратегию по улучшению фармакологических тетрапиррольных фотосенсибилизаторов.

качестве антимитотических агентов для конъюгирования ΦС В с использовались природный комбретастатин-А4 (СА-4) 91 (Рис. 21А), являющийся одним из самых перспективных лигандов колхицинового сайта тубулина [167], а также паклитаксел (РТХ) 92, – уже много лет применяемый в противоопухолевой практике [168]. Для получения конъюгатов 93 и 94 [169-172], CA-4 и PTX конъюгировались с тиопорфирином или фталоцианином кремния посредством аминоакрилатного линкера (Рис. 21В) [173], расщепляемого под действием синглетного кислорода, генерируемого, в свою очередь, при возбуждение ФС. Таким образом, при фотоактивации ФС, пролекарственные конъюгаты 93 и 94 (Рис. 21С) расщепляются с образованием свободного лекарственной ΦC И формы антимитотического агента.



Рис. 21. (А) Цитостатики. (В) Аминоакрилатный линкер. (С) Расщепляемые конъюгаты на основе аминоакрилатного линкера.

В *in vitro* экспериментах на клеточных линиях MCF7, SKOV3, конъюгаты 93 и 94 обладали относительно низкой темновой токсичностью, поскольку объёмный тетрапиррольный фрагмент затруднял связывание антимитотического агента с тубулином. Однако, при фотовозбуждении антипролиферативная активность возрастала в 5-20 раз (IC₅₀ (на свету) ~ 5-30 нМ). Установлено, что гетеродимеры 93 и 94 действительно расщепляются под действием света не только in vitro, но и in эффективное ингибирование роста опухолей *vivo*, показывая В мышах. Высвобождаемые при фоторасщеплении аминоакрилатного линкера СА4 и РТХ, вызывали гибель клеток, не подверженных облучению светом. С целью улучшения противоопухолевых параметров конъюгатов ФС с антимитотическими агентами, опубликован ряд работ по их «декорированию» фолиевой кислотой (Folic acid, FA) [174, 175], которая связывается с фолатными рецепторами, экспрессируемыми в значительных количествах опухолевыми клетками. Примером таких соединений является гетеродимеры 95 (Рис. 21С). Показано, что в случае их применения, также удается добиться комбинированного действия всех трех активных фрагментов конъюгата и обеспечить таргетное связывание конъюгатов **95** с опухолевыми клетками, экспрессирующими фолатные рецепторы на своей поверхности. Более подробно с результатами создания расщепляемых комбинированных ФС на основе аминоакрилатных линкеров можно ознакомиться в недавно вышедшем обзоре [176].

5.5 Конъюгаты на основе SERM-препарата тамоксифен

Наряду с классическими химиотерапевтическими препаратами интересной альтернативой для выбора цитостатической части конъюгатов может стать агент гормональной терапии, например, тамоксифен 96 (Рис. 22) [177]. Тамоксифен относится к классу SERM (selective estrogen-receptor modulator) агентов, которые способны ингибировать эстрогеновые рецепторы (ЭР), что в конечном счете приводит к запрограммированной клеточной смерти. Наиболее успешно этот препарат применяется лечения поскольку для рака груди, ИХ клетки характеризуются высокой экспрессией ЭР.

Гетеродимер 97, полученный на основе пирофеофорбида-а И 4гидрокситамоксифена – природного метаболита тамоксифена 96 (Рис. 22) [178], является первым примером конъюгирования ФС с SERM агентами. Для изучения его *in vitro* цитотоксичности была выбрана опухолевая линия груди MCF-7. В качестве использовали пирорфеофорбид-а без агента сравнения фрагмента 4гидрокситамоксифена. изучение фототоксичности Сравнительное этих фотосенсибилизаторов показало, что производное 97 эффективно ингибирует рост клеток MCF-7. Авторы не приводят данных о количественном значении ингибирующих концентраций на свету и в темноте, а также о накоплении и локализации исследуемых соединений в клетках. Поэтому достаточно трудно сказать, может ли высокая фототоксичность 97 быть следствием повышенного связывания с ЭР.



Рис. 22. Конъюгаты на основе тамоксифена.

Десятью годами позже был синтезирован конъюгат 98 монозамещенного в аположении фталоцианина цинка, с *N*-деалкилированным производным тамоксифена 96 (Рис. 22) [179]. В качестве клеточных линий с разным уровнем экспрессии ЭР были выбраны клетки рака груди: MCF-7 (ЭР-положительная) и MDA-MB-231 (ЭРотрицательная). Таргетное действие тамоксифена в составе коньюгата 98 было доказано по его избыточному накоплению в ЭР-положительных клетках MCF-7 по сравнению с клетками MDA-MB-231. Еще одним подтверждением определяющей роли тамоксифенового лиганда на биологическую активность стало изменение уровня содержания агента 98 в клетках при использовании внешнего источника эстрадиола. Поскольку эстрадиол конкурирует за связывание с ЭР, происходит снижение концентрации конъюгата 98 внутри клеток. Напротив, добавление эстрадиола к клеткам, инкубированным только с фталоцианином цинка без тамоксифенового фрагмента, не оказывало никакого видимого эффекта. Конъюгат 98 и неконъюгированный фталоцианин цинка имеют одинаковую фототоксичность на клеточной линии MCF-7 (IC₅₀ (на свету) = 11-14 нМ). Было показано, что увеличение уровня внешнего эстрадиола в клетках существенно снижало антипролиферативную активность комбинированного соединения 98. Также было показано, что соединение 98 обладает темновой цитостатической активностью (IC₅₀ (в темноте) ~ 12 мкмоль) превосходящий фталоцианин цинка (IC₅₀ (в темноте) ~ 18 мкмоль) и тамоксифен (IC_{50} (в темноте) > 25 мкмоль).

Противоопухолевая активность конъюгата **98** и фталоцианина цинка в качестве молекулы сравнения исследовалась *in vivo* на мышах с имплантированной ЭР-положительной опухолью MCF-7. Эксперименты показали, что конъюгат **98** демонстрирует почти трехкратное увеличенное накопление в опухоли по сравнению

с фталоцианином цинка, что свидетельствует о таргетной доставке комбинированного агента.

В 2019 г. синтезирован ряд новых конъюгатов **99**, в которых тамоксифеновый лиганд был соединен с фталоцианином цинка через α - или β - положения с помощью ПЭГилированных линкеров различной длины [180]. *In vitro* исследования световой токсичности на ЭР-положительной клеточной линии рака груди MCF-7 показали, что α - или β -замещенные производные имеют сравнимую эффективность (для α -производных IC₅₀ (на свету) = 13.80 - 80.51 нм; для β -аналогов (IC₅₀ (на свету) = 16.07 - 89.54 нм). Длина линкера оказывала неоднозначное влияние на фототоксичность конъюгатов **99**. В случае α -соединений линкер с n=2, по всей видимости, обеспечивал оптимальное дистанцирование фото- и гормонотерапевтической частей в пространстве, в отличие от линкеров n=1 и n=3, которые снижали фотоактивность соединений.

5.6 Конъюгаты на основе различных цитотоксических соединений

В 2018 г в группе Й.-В. Ким (Y.-W. Kim) были получены конъюгаты 100 хлорина-е₆ 21 с куркумином (Рис. 23) [181]. Куркумин является основным куркуминоидом, входящим в состав корня куркумы, широко используется в качестве пищевого красителя. В последние десятилетия куркумин является объектом биомедицинских исследований, В том числе, различных В качестве противоопухолевого агента. Его цитостатическая активность реализуется благодаря мультитаргетному действию, которое включает в себя ингибирование различных биологических мишеней [182]. Кроме этого, куркумин сам способен поглощать свет на ~400 нм и генерировать ROS [183]. Особенно эффективно куркумин проявил себя в борьбе с опухолями поджелудочной железы [184]. В конъюгатах 100, активные фрагменты куркумина и метилового эфира хлорина-е6 были соединены с помощью линкеров разной длины и липофильности. Поскольку авторы надеялись получить терапевтический агент для лечения злокачественных образований поджелудочной железы, для in vitro исследований цитостатической активности были выбраны клеточные линии опухоли поджелудочной железы AsPC-1, MIA PaCa-2 и PANC-1. Для всех синтезированных молекул 100 было зафиксировано значительное увеличение фототоксичности по сравнению с хлорином- e_6 21, а в ряде случаев, для агентов с ПЭГилированными линкерами индекс ингибирования клеточного роста опускался до наномолярных значений и составлял IC₅₀ (на свету) ~ 40 нм. Такая высокая фототоксичность может быть также обусловлена способностью куркумина генерировать ROS, благодаря процессам переноса энергии с хлоринового хромофора. Изучение темновой токсичности комбинированных соединений 100 показало, что все соединения оказались менее токсичны, чем хлорин-е₆ 21. Таким образом, хороший уровень фототоксичности наряду с отсутствием темновой активности делают конъюгаты 100 перспективными фотосенсибилизаторами ФДТ.



Рис. 23. Конъюгаты на основе различных цитостатиков.

Интересным подходом к дизайну конъюгированных агентов является связывание ФС с хальконами [185]. Хальконы относятся к антиваскулярным агентам (vascular disrupting agents, VDA), способным разрушать опухолевые капилляры [186]. Использование VDA агентов в комбинации с фотоактивным соединением может быть выигрышным сочетанием, поскольку одним из недостатков ФДТ является быстрый запуск процессов ангиогенеза после облучения [80]. В связи с этим, в конъюгате 101 фталоцианин цинка связывался с производным халькона с применением ПЭГ-линкера (Рис. 23) [185]. Для изучения способности полученного агента таргетировать ткани капилляров, в качестве объекта была выбрана эндотелиальная клеточная линия пупочной вены человека HUVEC. Показано, что конъюгат 101, в отличие от фталоцианина цинка, способен ингибировать рост *HUVEC* при низких микромолярных концентрациях IC₅₀ (в темноте) = 17 мкмоль. При фотоактивации было зафиксировано увеличение фототоксичности димера 101 (IC₅₀ (на свету) = 0.5 мкмоль) по сравнению с фталоцианином цинка для клеточной линии опухоли прямой кишки НТ-29. Одним из возможных объяснений полученных фактов является повышенное накопление агента 101 в клетках за счёт увеличения амфифильности конъюгата. Также, теоретически, халькон может оказывать собственный синергетический вклад в цитотоксическое действие на клеточные линии. Однако, авторы не проводили сравнительных исследований клеточного накопления 101 и фталоцианина цинка, поэтому такие догадки остаются гипотетической возможностью. Несмотря на отсутствие в работе [185] более глубоких биологических исследований,

предложенная концепция по созданию конъюгатов на основе ФС и VDA может оказаться вполне перспективной.

Еще одной перспективной идеей для создания конъюгированных терапевтических агентов может быть конъюгирование ФС с производными Такие конъюгаты до последнего времени преимущественно кумарина. использовались для получения материалов, поглощающих свет и способных к передаче энергии между хромофорами [187]. Известно, что 7-гидроксикумарин, также как и ряд его аналогов, способны ингибировать пролиферацию опухолевых клеток за счет антимитотического действия [188]. Поэтому конъюгирование кумаринового фрагмента с тетрапиррольным макроциклом может позволить создавать агенты с фото- и химиотерапевтическим синергетическим действием. Основываясь на этом предположении, были синтезированы соединения 102 и 103, являющиеся конъюгатами фталоцианина цинка, связанного через α- или βположения с производными 7-гидроксикумарина, посредством ПЭГилированного линкера (Рис. 23) [189]. Исследования *in vitro* фототоксичности на клеточной линии карциномы человека HepG2 показали, что все конъюгаты обладают значительной активностью (IC₅₀ (на свету) ~ 14–44 нм), соизмеримой с таковой для фталоцианина цинка. При этом производные 102 и 103 с R = CF₃ обладали большей фототоксичностью, что объясняется их повышенной амфифильностью, что, в конечном итоге, приводит к облегченному транспорту конъюгатов через клеточные мембраны. Среди комбинированных агентов 102 и 103 только одно α-производное с R = H оказалось токсично в темноте в отношении HepG2 с IC₅₀ (в темноте) = 4 мкмоль. В аналогичной концентрации фталоцианин цинка не проявляет токсических свойств. Также установлено, что этот α-конъюгат связывался с клеточным ядром, что указывает на его антимитотические свойства.

6. Заключение

Несмотря на то, что на сегодняшний день на рынке или на этапе клинических испытаний находится порядка 10 препаратов ФДТ для терапии разных видов злокачественных образований, до сих пор ведутся работы по созданию новых высокоэффективных фотосенсибилизаторов.

Анализ литературы последних лет показывает, что одним из наиболее многообещающих методов, способствующих повышению как общей активности, так и направленности действия фотосенсибилизаторов, является разработка коньюгированных агентов. Такие соединения чаще всего объединяют в своем составе фотоактивную и химиотерапевтическую части. При этом лечение опухолевого заболевания происходит двумя параллельными независимыми механизмами, которые способствуют преодолению лекарственной устойчивости и увеличению таргетирования конкретных типов опухолей.

Благодаря простоте синтеза и функционализации удобной платформой для создания комбинированных агентов ФДТ являются тетрапиррольные фотосенсибилизаторы — порфирины, хлорины, бактериохлорины и фталоцианины. На их основе получены конъюгаты самых химиотерапевтических соединений.

65

Весьма успешной оказалась концепция по объединению тетрапиррольного фотосенсибилизатора и ингибиторов клеточных белков, позволившая не только добиться возникновения комбинированного действия, но и увеличить селективность накопления конъюгированного производного в опухолевых тканях.

Обоснование диссертационных исследований

фотодинамическая Современная терапия для лечения опухолевых заболеваний использует фотосенсибилизаторы, которые практические не проявляют заметной токсичности без активации светом. Эта особенность была одной из основных причин, определивших бурное развитие ФДТ в последние 30 лет. Однако, подобное поведение препарата в том числе может быть и недостатком ФДТ, лимитирующим ее использование. Сравнивая ФДТ с классическими методами важнейшим химиотерапии, становится ясно. что отличием действия фотосенсибилизатора является почти полное отсутствие какой-либо собственной ингибирующей способности без облучения. Химиотерапевтический препарат, напротив, активен в любом состоянии и блокирует жизнеспособность опухолевых клеток за счет связывания с биологическими мишенями (белками, ДНК и т.д.).

Но что же делать с опухолевыми клетками, которые оказались вне поля активации? Такие образования могут привести к рецидиву заболевания. Отсюда возникает один из главных недостатков ФДТ, а именно, отсутствие специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками [81, 82]. Это связано, в первую очередь, с тем, что в отличие от препаратов, ингибирующих активность ДНК, у тетрапиррольных макроциклов нет каких-либо фрагментов, способных с высокой степенью селективности связываться с биологически значимыми молекулами. Первым следствием подобного недостатка становится необходимость ΦДТ комбинирования использования с введением химиотерапевтических препаратов, которые подавляют возможный рост выживших злокачественных тканей [190]. Таким же образом может быть решена проблема лечения метастазирующих опухолей, поскольку невозможно провести облучение всего организма.

В результате низкой таргетности фотосенсибилизатора очень часто для него наблюдается примерно равное распределение между опухолью и нормальной тканью, что приводит к снижению эффективности лечения и повреждению здоровых клеток. При этом для многих тетрапиррольных фотосенсибилизаторов было продемонстрировано некоторое избирательное накопление за счет связывания с экспрессируемыми опухолью *LDL* [112] или бензодиазепиновыми рецепторами [191]. Однако, на нынешнем уровне развития медицинской химии, использование таких мишеней уже недостаточно эффективно.

Так как фотодинамическое действие связано с наличием тетрапиррольного макроцикла, генерирующего *ROS*, становится очевидно, что один из немногих способов добавить фотосенсибилизатору новые онкоспецифичные свойства – это создание коньюгатов на его основе. В качестве второго фрагмента коньюгата могут быть использованы, в том числе, химиотерапевтические препараты, которые обладают избирательным связыванием с опухолью и ингибированием её роста. Среди таких препаратов особенно хорошо зарекомендовали себя ингибиторы клеточных белков, поскольку они одновременно позволяют добиться: 1) повышения селективности накопления коньюгата в опухоли за счет связывания с онкоэкспрессируемыми клеточными рецепторами; 2) увеличения терапевтической

67

активности конъюгата за счет цитотоксического действия. Первые работы в этом направлении были выполнены только в начале 2010-х годов и сейчас это - одна из самых динамично-развивающихся областей по разработке новых фотосенсибилизаторов ФДТ.

Настоящее диссертационное исследования посвящено созданию и изучению противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo* новых конъюгированных фотосенсибилизаторов, состоящих из фотоактивной части, соединенной через линкер различной длины и липофильности с производными ингибиторов клеточных белков (**Рис. 24**). Таким образом будет решена задача повышения накопления ФС в опухоли. Также собственное цитостатическое действие ингибитора позволит преодолеть проблему наличия переживших ФДТ опухолевых клеток.





Кроме этого, хорошо известно, что терапевтическая активность тетрапиррольного фотосенсибилизатора напрямую связана с его возможностями по образованию агрегатов в водных растворах, поскольку наличие агрегатов снижает выход генерации *ROS* и затрудняет приготовление препаратов для внутривенного введения. Усугубление этой ситуации наблюдается для конъюгированных производных фотосенсибилизаторов, которые, зачастую, состоят из двух или большего числа липофильных фрагментов. Подобные проблемы, например, были продемонстрированы в исследованиях Вея и Жао [158]. В нашей группе также имеется опыт по созданию фотоактивных конъюгатов, которые оказались нерастворимыми в водных средах: в диссертационной работе А.В. Нючева были получены комбинированные соединения на основе производных хлорина-*e*₆ [192]. Однако, отсутствие гидрофильных фрагментов в их составе сделали исследования биологической активности полностью невозможными.

Таким образом, целью этого диссертационного исследования является создание, прежде всего, амфифильных конъюгированных агентов. Такие производные будут одновременно минимально агрегированы в водных растворах и максимально доступны для прохождения через клеточные мембраны [47]. Достичь такого результата позволит внедрение гидрофильных фрагментов (ГФ) в состав конъюгата (**Рис. 24**).

Обсуждение результатов

1. Выбор фотосенсибилизатора

Как уже неоднократно отмечалось в литературной обзоре диссертации, наиболее изученными и доступными фотосенсибилизаторами ФДТ на сегодняшний день являются тетрапиррольные производные. В частности, соединения на основе хлорина-е₆ 21 (Рис. 14) представляют собой хорошую платформу для создания новых фотоактивных противоопухолевых препаратов. Это связано, в первую очередь, с тем, что они могут быть получены из доступных природных источников, и также легко функционализированы. Эти соединения поглощают излучение в красной области света с $\lambda_{max} \sim 660-670$ нм (Q полоса), тем самым позволяя ингибировать рост опухоли, относительно глубоко расположенные под покровом тканей. Высокая фотодинамическая активность хлоринов-е6 связана с эффективным генерированием *ROS*. Немаловажным фактом является возможность использования фотосенсибилизаторов-хлоринов-е6 для лечения человека, поскольку препараты на их основе обладают минимальной системной токсичностью и быстро выводятся из организма [91, 96, 97]. В нашей стране история создания фотоактивных препаратов, действующей частью которых служит производное хлорина-е6, насчитывает уже несколько десятилетий. На рынок были выведены лекарства Фотодитазин [98] и Радахлорин [99], применяемые для лечения рака кожи, легких и ряда других опухолевых заболеваний.

В настоящем диссертационном исследовании в качестве прекурсора для синтеза хлоринового фотосенсибилизатора был выбран метилфеофорбид-*a* (MePheid-*a*) **104** (Схема 7), который был предоставлен коллегами из группы чл.-корр. РАН О.И. Койфмана (ИХТГУ, Иваново). У феофорбидного производного имеется пятичленный экзоцикл, при дальнейшем раскрытии которого образуется хлориновое соединение.

Основными природными источниками метилфеофорбида-*а* **104** чаще всего являются шпинат или спирулина (сине-зеленые водоросли), которые известны благодаря высокому содержанию хлорофилла-*а* **105**. Распространенный метод выделения метилфеофорбида-*а* **104** включает метанольную экстракцию концентрата спирулины с выделением хлорофилла-*а* **105** (Схема 7) [193]. После чего с помощью кислотного деметаллирования синтезируют феофитин-*а* **106** и проводят его переэтерификацию с замещением фитильной группы (*Phytyl*) на метильную.





Благодаря наличию разнообразных функциональных групп метилфеофорбида 104 способен принимать участие в различных химических превращениях. Однако, наибольший интерес представляют три сайта функционализации, с помощью которых будет происходить дальнейшая сборка комбинированного агента (Схема 8). К ним относится винильная группа в «3» положении, обладающая способностью присоединения-элиминирования вступать реакции электрофильного в с образованием соединений типа 107 (путь А) [194, 195]. Также будет использована особенность метилфеофорбида-а, позволяющая проводить региоселективный гидролиз сложноэфирной связи в 17³ положении (путь В) [196]. В дальнейшем образование новых связей между частями конъюгата возможно, например, с помощью реакции амидирования. И последняя, интересующая нас, способность метилфеофорбида-а – раскрытие пятичленного экзоцикла под действием различных нуклеофилов, что приводит к образованию производного хлорина-е6 109 (путь С) [197, 198]. Таким образом, благодаря своей простоте и надежности указанные превращения позволят создавать необходимые комбинированные агенты, состоящие из нескольких структурных блоков.



Схема 8

С целью улучшения фотофизических показателей фотоактивной части, а именно выхода генерации *ROS*, в ходе работы будут использоваться преимущественно металлокомплексы хлориновых производных.

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

Главное целью этой части диссертационного исследования является создание комбинированных агентов, состоящих из фотосенсибилизатора–производного хлорина- e_6 и цитостатика вандетаниба (*vandetanib*) (Рис. 25). Для увеличения водорастворимости агентов и создания амфифильной структуры хлориновая часть будет превращена в катионную форму, где роль гидрофильных групп выполняют тетраалкиламмониевые группы. Кроме этого, достоинством катионных
фотосенсибилизаторов является высокая цитотоксичность за счёт накопления в митохондриях и клеточном ядре [52-56].

Поскольку известно, что количество положительных зарядов у ФС напрямую влияет на его распределение по клеточным органеллам и скорость интернализации [55], было принято решение синтезировать ди- и трикатионные конъюгаты (**Puc. 26**). С помощью сравнительного исследования их биологической активности нами будет выбран наиболее перспективный кандидат в качестве основы для создания нового противоопухолевого агента.



Рис. 26. Структура катионных комбинированных агентов.

2.1 Синтез азидосодержащего производного вандетаниба

В качестве химиотерапевтического фрагмента для создания конъюгированных фотосенсибилизаторов нами был выбран препарат вандетаниб. Вандетаниб (ZD6474) – цитотоксический агент, который относится к классу ингибиторов клеточных белков и выпускается под торговым названием Caprelsa компанией AstraZeneca [199]. Вандетаниб одобрен EMA и FDA для клинического щитовидной Механизм использования при лечении рака железы. противоопухолевого действия вандетаниб связан с его способностью ингибировать активность тирозинкиназ EGFR и VEGFR. Поскольку такие мишени активно экспрессируются различными опухолями, для создаваемых комбинированных агентов на его основе можно ожидать увеличения селективности связывания с опухолевыми клетками. В отношении EGFR вандетаниб проявляет ингибирующую активность в микромоллярном диапазоне концентраций ($IC_{50} = 0.5$ мкмоль) [199].

Синтез лиганда на основе вандетаниба был выполнен в соответствии с известной методикой (Схема 9) [200]. На первом этапе ванилиновая кислота 110 вступала в реакцию S_N с бензилбромидом, в результате которой образовывалось производное 111. После чего в соединение 111 была введена нитрогруппа действием

смеси азотной и серной кислот. Восстановление нитрогруппы в производном 112 проведено с использованием SnCl₂. На следующем этапе с применением формамидинацетата получали хинозалин 114, который затем подвергался галогенированию.



Схема 9

Реакция S_NAr между арилхлоридом 115 и 4-бромо-2-фтороанилином 116 с последующим гидролизом бензилового эфира действием ТFA приводила к выделению хиназолинола 117 (Схема 10). С помощью нескольких химических превращений такой хиназолинол 117 может быть модифицирован метилпиперидиновым фрагментом, что в итоге приведет к препарату вандетаниб [199].



Схема 10

Было принято решение использовать для дальнейших синтезов именно хиназолинол **117**, фенольная группа которого позволит проводить последующую функционализацию. Предлагаемое упрощение структуры вандетаниба не должно оказать серьёзного влияния на его противоопухолевую активность в составе комбинированного агента, поскольку именно хиназолиновый скаффолд отвечает за биологическую активность подобных препаратов [201]. На первом этапе хиназолинол **117** подвергался алкилированию с последующим азидированием, что приводило к азидам **118** и **119**, с выходами 70% и 61% соответственно, которые способны вступать в дальнейшие реакции *CuAAC* (Схема **11**).



Схема 11

2.2 Синтез и биологическая активность катионных конъюгатов на основе цинкового металлокомплекса хлорина-*e*₆

Для создания фотоактивной части конъюгатов метилфеофорбид-а 104 подвергался региоселективному гидролизу по литературной методике [196] действием концентрированной соляной кислоты в ацетоне; выход кислоты 120 составил 93% (Схема 12). Затем полученная кислота 120 была амидирована пропаргиламином 121 в условиях реакции Штеглиха [202]. В качестве карбодиимидного использовался EDC·HCl (гидрохлорид агента (3диметиламинопропил)-*N*-этилкарбодиимида); выход амида 122 составил 81%. Последним этапом стало раскрытие пятичленного экзоцикла [197, 198] при добавлении N,N'-диметилэтилендиамина 123 к производному 122 с дальнейшим внедрением цинка в макроцикл действием Zn(OAc)₂ [195]; выход хлорина 124 составил 92%.





Хиназолин 118 и алкинсодержащий хлорин 124 затем вступали в реакцию 1,3диполярного циклоприсоединения (*CuAAC*), катализируемой системой CuSO₄·5H₂O/AscNa в присутствии лиганда ТВТА, что приводило к конъюгату 125 с выходом 72% (Схема 13). ТВТА (*трис*(бензилтриазолилметил)амин) 126, способный координировать частицы Cu(I) [203], получен по известной методике из трипропаргиламина 127 и бензилазида (BnN₃) [204].



Схема 12

На следующем этапе конъюгат 125 подвергался реакции аминометилирования по экзо-кратной связи в положении «3». Для этого использовали разработанную в группе Д.В. Белых (Институт химии Коми НЦ УрО РАН) методику двойного диметиламинометилирования периферической двойной связи у производных хлорофилла-а [195]. При взаимодействии 125 с хлорина избытком (бисдиметиламино)метана 128 с 63% выходом получен конъюгат 129, содержащий две диметиламинометильные группы при периферической кратной связи (Схема Полобная реакция относится к элетрофильному присоединению-13). элиминированию возможна благодаря образованию И становится диметилметилиденаммонийного катиона 130 из (бисдиметиламино)метана 128 в кислой среде. После чего последовательные процессы присоединения катиона 130 к кратной связи с отщеплением Н⁺ приводят к продукту **129**.

Так как промежуточными интермедиатами, скорее всего, являются карбокатионные производные, их изомеризация приводит к образованию смеси Е/Z изомеров **129 (Схема 13)** [195]. Если учесть, что основная функция диметиламинных групп – придание гидрофильных свойств финальному конъюгату, то не было важно, с каким региоизомером мы работаем. В связи с этим хроматографическое разделение смесей соединения **129** и подобных им не проводилось.

77



Финальным шагом в создании комбинированного агента стала реакция кватернизации под действием йодистого метила с образованием катионного конъюгата 131 с количественным выходом. Стоит отметить, что образование гидрофильных аммониевых солей способствовало растворению 131 в водных растворах^{*} в отличии от нерастворимого конъюгата 129.

Для изучения комбинированного действия двух разнонаправленно действующих фрагментов в составе одного соединения нам был синтезирован «агент сравнения», не содержащий хиназолинового цитостатика. Для этого в MePheid-*a* **104** раскрывали экзо-цикл, проводили диметиламинометилирование и кватернизацию, что приводило к целевому продукту **134** суммарным выходом 51% после 3 стадий (Схема 14).

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгата в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.



Для соединений 131 и 134 были зарегистрированы спектры поглощения и испускания в водных растворах (Рис. 27, Табл. 2). Благодаря наличию хлоринового ядра молекулы 131 и 134 демонстрируют характерные спектры с четкими полосами Q и Cope.



Рис. 27. Спектры поглощения фотосенсибилизаторов 131 и 134 (С = 5 мкмоль) в воде.

Оба фотосенсибилизатора 131 и 134 обладают флуоресценцией в красной области спектра с λ_{em} ~ 640 нм. Измеренные квантовые выходы флуоресценции относительно родамина Б в воде составили 7.3% и 9.5% соответственно.

| Соединение | $\lambda_{abs}(HM)$ (log ε) | λem(HM) ^a | Ф _{фл} ^b (%) |
|------------|--|----------------------|----------------------------------|
| 131 | 412 (4.80) 632 (4.39) | 638 | 7.3 |
| 134 | 408 (4.96) 628 (4.44) | 636 | 9.5 |

Табл. 2. Фотофизические характеристики соединений 131 и 134

^аВозбуждение на 410 нм. ^ьОтносительно родамина Б в воде.

Поскольку коньюгат содержит 4-ариламинохиназолиновый фрагмент, связывающийся с рецепторами факторов роста, для исследований биологических свойств синтезированных молекул, нами было выбрано несколько клеточных линий, отличающихся уровнем экспрессии *EGFR*. В качестве *EGFR*-отрицательной клеточной линии нами использованы клетки *CHO* (клетки яичника китайского хомяка), а в качестве опухолевых линий, экспрессирующих EGFR, применялись клеточные линии *HeLa* (клетки опухоли шейки матки) и *A431* (плоскоклеточная опухоль кожи).

Для изучения относительного уровня экспрессии EGFR этими клеточными линиями была проведена их инкубация с анти-EGFR антителами, окрашенными фикоэритрином (ФЭ) (работы проводились совместно с кафедрой биофизики ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского; группа доц. И. В. Балалаевой). После чего с помощью проточной цитометрии исследовано количество связанных с анти-EGFR антителом клеток. С целью исключения неспецифического взаимодействия был использован изотипический контроль, который представляет собой антитело аналогичного изотипа, лишенное возможности связываться с EGFR.

EGFR-отрицательная клеточная линия CHO продемонстрировала наиболее низкий уровень экспресии EGFR, который почти не отличался от уровня ее связываемости с изотипическим контролем (**Рис. 28**). Клеточная линия HeLa показала семикратное увеличение уровня EGFR, в то время как клетки A431 показали увеличение уровня EGFR на несколько порядков.



Рис. 28. Анализ уровня экспрессии *EGFR* методом проточной цитометрии для клеток *CHO* (а), *HeLa* (b) и *A431* (c). Клетки были инкубированы с окрашенными Φ Э анти-*EGFR* антителами (красный) или изотипическим контролем (черный). Показано распределение клеток в зависимости от уровня флуоресценции Φ Э (d) Относительный уровень экспрессии *EGFR* на основе проточной цитометрии.

Затем соединения 131 и 134 были добавлены ко всем трём клеточным линиями и инкубированы в течении 4 часов. После чего была зарегистрирована флуоресценция хлоринового фотосенсибилизатора с помощью конфокального микроскопа. Из Рис. 29а видно, что хорин 134 светится ярче в клеточных линиях по сравнению с молекулой 131 и, следовательно, накапливается быстрее. По всей видимости, наличие одновременно гидрофильного (катионная часть) И липофильного фрагмента (ариламинохиназолин) образует амфифильную систему для 131, которая способна связаться с гидрофильной частью клеточной мембраны и пройти сквозь ее липофильную внутреннюю область. Кроме этого, конъюгат 131 селективно связывался с клеточной линией А431, которая обладает наибольшим количеством рецепторов EGFR (Рис. 29b). При этом такая избирательность реализуется даже несмотря на то, что домен связывания производного вандетаниба с EGFR находится во внутриклеточной области [199]. Скорее всего, селективность накопления в А431 реализуется именно в момент интернализации конъюгата 131 после прохождения сквозь клеточную мембрану.



Рис. 29. (а) Изображения, полученные на конфокальном микроскопе для СНО, *HeLa* и *A431* клеток после их инкубации с 5 мкмоль конъюгата **131** (нижний ряд) и соединения **134** (верхний ряд) в течении 4 ч. (b) Интенсивность флуоресценции для **131** и **134**. Были проанализированы по меньшей мере 10 клеток в 2-3 полях наблюдения; представлены значения среднего \pm SEM. $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{em} = 600-740$ нм.

Стандартный МТТ-тест был использован для определения концентрации 131 и 134 (ІС₅₀), способной ингибировать пролиферацию клеток на 50%. Для определения темновой токсичности 131 и 134 были добавлены к клеткам с последующей заменой ростовой среды на свежую через 4 ч. и дальнейшим инкубированием в течении 24 ч. Для определения световой токсичности инкубируемые 4 часа клетки были облучены с дозой света 20 Дж/см² ($\lambda = 615-635$ нм, мощность 40 мкВт/см²) и оставлены в темноте на 24 ч. Результаты представлены в Табл. 3. Для всех трёх клеточных линий комбинированный агент 131 оказался в 2-3 раза более токсичен (IC₅₀ (на свету) ~ 2.5 мкмоль) на свету по сравнению с катионным хлорином 134 (IC₅₀ (на свету) ~ 6 мкмоль), что соответствует различиям в скоростях интернализации этих соединений (Рис. 29). При этом для конъюгата 131 продемонстрировано увеличение темновой токсичности в 1.5-3 раза (IC₅₀ (в темноте) $\sim 25-48$ мкмоль), в отличие от фотосенсибилизатора 134 (IC₅₀ (в темноте) $\sim 70-100$ явление следствием мкмоль). Наблюдаемое может являться повышенной аккумуляции 131 в клеточных линиях. Однако, несмотря на показанную селективность накопления 131 (Рис. 29b), этот конъюгат не обладает специфической токсичностью по отношению к экспрессирующим EGFR клеткам A431. По всей видимости ингибирующую способность ариламинохиназолина (производное вандентаниба) в составе конъюгата 131 значительно снижена в силу стерических препятствий, возникновение синергетической тем самым подавляется цитотоксичности для 131.

| _ | | 131 | | | 134 | |
|--------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| | IС ₅₀ , м | кмоль, | | IC ₅₀ , 1 | мкмоль, | |
| Клеточная линия | [95% доверительный интервал] | | IС ₅₀ в темноте | [95% доверительный интервал] | | IС ₅₀ в темноте |
| | Ha | В | / IC ₅₀ на свету | Ha | В | / IC ₅₀ на свету |
| | свету | темноте | | свету | темноте | |
| СНО | 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 |

Таблица 3. In vitro световая и темновая токсичности для соединений 131 и 134.

Для изучения селективности накопления нового комбинированного агента 131 была проведена его инъекция мышам *Balb/c* с привитыми опухолями *CT-26* и изучена флуоресценция различных тканей с течением времени (**Puc. 30**). Производное 131 продемонстрировало высокую избирательность связывания с опухолевыми тканями, которая достигала максимума через 24 ч. (опухоль/норма = 4.2) (**Puc. 30c**). Также исследуемое соединение достаточно долго удерживалось в опухоли (опухоль/норма = 3.0 через 72 ч.).



Рис. 30. Распределение конъюгата **131** *in vivo*. (а) Динамика изменения флуоресценции в опухоли (красная линия) и нормальной ткани (черная линия) у животных после введения агента **131**. Представлены средние значения ± SEM. λ_{ex}= 615 нм, λ_{em}=660–740 нм. (b) Флуоресцентное изображение мыши после введения **131** через 24 часа. Опухоль отмечена стрелкой. (c) Соотношение интенсивностей сигнала флуоресценции **131** в опухоли к нормальной ткани.

К сожалению, в сравнительных тестах распределения *in vivo* нам не удалось изучить действие катионного хлорина **134**, поскольку введение его животным приводило к их гибели, вызванной, по всей видимости острой аллергической реакцией. Поэтому однозначно утверждать вызвана ли селективность накопления

131 в опухоли его таргетирующим действием по отношению к *EGFR*, не представляется возможным.

2.3 Синтез и биологическая активность катионных конъюгатов на основе различных металлокомплексов хлоринов-*е*₆ и ПЭГ-линкеров

Для улучшения фотодинамической активности хлоринового конъюгата с производным вандетаниба [205], были также синтезированы несколько новых молекул, в которых терапевтические фрагменты соединялись ПЭГилированными линкерами, и которые содержали в тетрапиррольном макроцикле Zn(II), In(III) или Pd(II). Известно, что длина, гибкость, а также гидрофильность или гидрофобность линкера [136, 153, 154, 158] могут в значительной степени влиять на биологические свойства фотосенсибилизаторов и их конъюгатов. Природа центрального металла в хлориновом макроцикле напрямую определяет способность ФС к генерации ROS, эффективность образования которых в большей степени ответственна за противоопухолевые свойства создаваемых агентов [80, 81]. Например, в работе П. Мроза (*P. Mroz*) и др. было показано, что для катионных порфиринов *in vitro* противоопухолевая активность металлокомплексов убывает в ряду Pd > In > Zn, при этом разница между фототоксичностью паладиевых и цинковых производных отличалась в десятки раз [52].

Для синтеза конъюгатов с ПЭГилированными линкерами алкинилсодержащий хлорин 124 вступал в медь-катализируемую реакцию диполярного циклоприсоединения с азидсодержащим хиназолином 119 (Схема 15). 79 % Полученный с выходом конъюгат 135 подвергался двойному аминометилированию с выходом 65% для соединения 136. Последующая кватернизация иодистым метилом приводила к целевому трикатионному производному 137 с количественным выходом.



Для синтезированного конъюгата 137 были зарегистрированы спектры поглощения и испускания в водном растворе (Рис. 31, Табл. 4). Вид спектров для молекулы 137 практически не отличался от ранее полученных спектров для конъюгата 131 с коротким линкером.



Рис. 31. Спектры поглощения и испускания конъюгата 137 (с = 5 мкмоль) в воде.

Стоит отметить, что новый комбинированный агент 137 обладает несколько более высоким коэффициентом молярной экстинкции (Табл. 4), чем агент 131 (Табл. 2). Такой результат может быть объяснён тем, что более гидрофильный линкер препятствует образованию агрегатов для конъюгата 137. Семикратное снижение относительного квантового выхода флуоресценции соединения 137 в сравнении с 131, по всей видимости, является следствием наличия длинного и гибкого линкера. Используемый линкер, теоретически, может провоцировать такую взаимную ориентацию хлориновой и ариламинохиназолиновых частей, в результате которой становится возможным эффективный перенос энергии между ними. Однако, дальнейшее изучение этого явления в ходе работы не проводилось.

| Табл. 4. Фо | тофизические | характеристики | конъюгата | 13' | 7 |
|--------------------|--------------|----------------|-----------|-----|---|
|--------------------|--------------|----------------|-----------|-----|---|

| Соединение | $\lambda_{abs}(HM)$ (log ε) | λ _{em} (HM) ^a | Ф _{фл} ^b (%) |
|------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| 137 | 411 (4.97) 634 (4.54) | 640 | 1.2 |

^аВозбуждение на 410 нм. ^ьОтносительно родамина Б в воде.

Благодаря использованию более длинного и гидрофильного линкера удалось улучшить противоопухолевую активность для агента **137** (**Табл. 5**). Это производное оказалось в 26 раз более фототоксично (IC₅₀ (на свету) = 0.1 мкмоль) по сравнению с молекулой **131** (IC₅₀ (на свету) = 2.6 мкмоль) (**Табл. 3**) для клеточной линии *А431*. При этом, соединение **131** оказалось практически нетоксично в темноте. Таким образом, рассчитанный фототерапевтический индекс (IC₅₀^{темнота}/ IC₅₀^{свет}) оказался >1000, что в совокупности с высокой световой токсичностью делает конъюгат **137** перспективным кандидатом для ФДТ опухолей.

| Клеточная | IС ₅₀ , м [95% дове инте | IC ₅₀ в темноте | |
|-----------|---|----------------------------|-----------------------------|
| линия | На свету [*] | В темноте [†] | / IC ₅₀ на свету |
| A431 | 0.1 | >100 | >1000 |

Таблица 5. In vitro световая и темновая токсичность для конъюгата 137.

Возможным объяснением для такого значительного роста цитотоксичности на свету может быть увеличение растворимости, а следовательно, и накопления конъюгированного соединения 137 за счет использования ПЭГ линкера. Низкая возникновения темновая токсичность не позволяет предположить комбинированного цитотоксического действия ариламинохиназолиновой части (производное вандетаниба) для синтезированного агента 137. Кроме этого, такое заметное снижение токсичности в отсутствие света, скорее всего, говорит об изменении клеточной локализации молекулы 137 по сравнению с аналогом 131, содержащим короткий линкер. Для ответа на эти вопросы в настоящее проводятся дополнительные исследования по изучению скорости интернализации производного 137, а также его распределению по клеточным органеллам. Кроме этого, будут осуществлены исследования по изучению селективности производного 137 в отношении EGFR-положительных опухолевых клеточных линий.

Также были синтезированы дикатионные конъюгаты, содержащие катионы цинка, палладия и индия. Для этого на первом этапе пятичленный экзоцикл в MePheid-*a* **104** подвергался нуклеофильной атаке с использованием избытка пропаргиламина **121**. Последующая обработка полученного хлорина ацетатом цинка приводила к образованию соответствующего комплекса хлорина **138** с суммарным выходом 89% (Схема 16). Алкин **138** вступал в реакцию *СиААС* с азидом **119**, что приводило к конъюгату **139** с выходом 73%. Производное **139** подвергалось двойному диметиламинометилированию с образованием конъюгата **140** (выход 59%). Дикатионной комбинированный агент **141** синтезирован количественно с использованием избытка йодистого метила.

^{*} Облучение клеток после инкубации с исследуемым соединением было проведено через 4 часа с дозой света 20 Дж/см² (λ = 615-635 нм, мощность 40 мкВт/см²), после чего ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа.

⁺ После 4-х часовой инкубации клеток с исследуемым соединением ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа.



Для синтеза индиевого конъюгата, на первом этапе исходя из цинкового комплекса 140 получен безметальный комбинированный агент 142 с выходом 86%, который затем был количественно кватернизован с образованием безметального конъюгата 143 (Схема 17). Конъюгат 142 подвергался кипячению с InCl₃ в смеси CH₃COOH/CH₃COONa [206], что приводило к образованию индиевого металлокомплекса 144 с выходом 45%. Относительно низкий выход реакции связан с тем, что образующаяся молекула 144 обладает высокой гидрофильностью и плохо

элюируется во время проведения КХ. Образование индиевого катионного агента **145** происходило количественно под действием йодистого метила.



Схема 37

Следует отметить, что соединение **145** уже не относится к классу дикатионных производных в прямом смысле, поскольку связь In-Cl по своей природе является ионной.

Для получения палладиевого комплекса, безметальный конъюгат **142** подвергался кипячению с Pd(OAc)₂ в ацетонитриле [207], однако, вместо ожидаемого продукта происходило образование смеси неизвестного состава.

Для преодоления этих трудностей было принято решение изменить порядок проведения реакции комплексообразования и реакции раскрытия экзоцикла. Действием Pd(OAc)₂ на MePheid-*a* **104** был получен соответствующий палладиевый комплекс, который затем подвергался нуклеофильному раскрытию с участием избытка пропаргиламина **121**; выход палладиевого хлорина **146** составил 52% после двух стадий (Схема **18**). Последующее циклоприсоединение алкина **146** к азиду **119** привело к конъюгату **147** с выходом 72%. После этого конъюгат был дважды диметиламинометиллирован действием бисамина **128** в кислой среде с получением производного **148** с выходом 63%. На финальной стадии синтеза действием йодистого метила из соединения **148** получен дикатионный комбинированный агент **149** с количественным выходом.



Таким образом, в ходе этой части работы были получены дикатионные комбинированные комплексы цинка 141 (Zn), индия 145 (In) и палладия 149 (Pd), а также безметальный конъюгат 143 (2H). Стоит отметить, что эти металлокомплексы оказались водорастворимы в микромолярном диапазоне концентраций^{*}. Однако в

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгата в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.

отличии от трикатионных соединений **131** и **137**, дикатионные агенты в течении короткого времени образуют осадки, что говорит о возросшей склонности к агрегации.

Для новых агентов 141 (Zn), 143 (2H), 145 (In) и 149 (Pd) были зарегистрированы спектры поглощения и испускания в водном растворе (Рис. 32, Рис. 33, Табл. 6). Форма спектров вполне согласуется с ранее полученными данными для трикатионных комбинированных агентов 131 и 137 (Рис. 27, Рис. 31). В ближневолновой области наибольшее поглощение наблюдается для молекул 143 (2H) и 145 (In). Наименьшее поглощение, а также и самую слабую флуоресценцию показывает соединение 149 (Pd), что также характерно для палладиевых комплексов производных [52]. Наибольшей флуоресценцией порфириновых обладает безметальный конъюгат 143 (2Н), что связано с низкой эффективностью образования триплетных состояний для безметальных порфириновых соединений [80]. Поэтому для них возвращение из возбужденного синглетного состояния происходит в основном посредством флуоресценции.



Рис. 32. Спектры поглощения конъюгатов 141, 143, 145 и 149 (с = 5 мкмоль) в воде.



Рис. 33. Спектры испускания конъюгатов 141, 142, 144 и 148 (с = 5 мкмоль) в воде.

Как и в случае трикатионного конъюгата 137, использование длинного линкера на основе триэтиленгликоля привело к тушению флуоресценции для молекул 141 (Zn), 143 (2H), 145 (In) и 149 (Pd), по всей видимости, посредством процессов переноса энергии (Табл. 6). Кроме этого, дальнейшее снижение флуоресценции для металлокомплексов 141 (Zn), 145 (In) и 149 (Pd) ($\Phi_{\phi\pi} \sim 0.03-0.8$ %) по сравнению с трикатионным цинковым производным 137 ($\Phi_{\phi\pi} = 1.2$ %, Табл. 4), скорее всего, является следствием усилившегося процесса образования агрегатов.

| Табл. 6. | Фотоф | ризические | е характерио | стики соед | инений 14 | 1 (Zn), | 143 (2H) | , 145 (| In) и |
|----------|-------|------------|--------------|------------|-----------|---------|----------|---------|-------|
| 149 (Zn) | | | | | | | | | |

| Соединение | $\lambda_{abs}(HM)$ (log ε) | λ _{em} (HM) ^a | Ф _{фл} ^b (%) |
|------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| 141 (Zn) | 411 (4.81) 633 (4.43) | 639 | 0.80 |
| 143 (2H) | 401 (4.98) 662 (4.49) | 636 | 1.40 |
| 145 (In) | 414 (4.96) 637 (4.48) | 644 | 0.37 |
| 149 (Pd) | 403 (4.60) 612 (4.48) | 614 | 0.03 |

^аВозбуждение на 410 нм. ^ьОтносительно родамина Б в воде.

Следующим этапом в создании водорастворимых комбинированных агентов на основе хлориновых фотосенсибилизаторов и лиганда *EGFR* было определение цитотоксической активности на свету и в темноте для новых дикатионных соединений **141** (**Zn**), **143** (**2H**), **145** (**In**) и **149** (**Pd**) (**Табл. 7**). В отношении клеточной линии A431 (плоскоклеточная опухоль кожи) цинковый металлокомплекс **141** (**Zn**)

 $(IC_{50} (на свету) = 0.59 мкмоль)$ оказался в 6 раз менее фототоксичен по сравнению с трикатионным аналогом **137** (IC₅₀ (на свету) = 0.1 мкмоль). Такой результат может быть объяснен в рамках увеличения образования агрегатов конъюгата **141** за счёт наличия только двух гидрофильных фрагментов. Поскольку фотосенсибилизаторы в агрегированном состоянии склонны к снижению выхода генерации *ROS* [59, 60].

Внедрение Pd и In в хлориновый макроцикл привело к увеличению фототоксичности на несколько порядков для комбинированных агентов 145 (In) (IC₅₀ (на свету) = 0.0068 мкмоль) и 149 (Pd) (IC₅₀ (на свету) = 0.018 мкмоль), как по сравнению с трикатионной молекулой 137 (IC₅₀ (на свету) = 0.1 мкмоль, Табл. 5), так и по сравнению с 141 (Zn). Таким образом индиевый и палладиевый металлокомплексы демонстрируют фотодинамическую активность в наномолярных концентрациях, что является выдающимся результатом на фоне используемых фотосенсибилизаторов в клинической практике [91]. Низкая темновая токсичность, по всей видимости, свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия ариламинохиназолина. При этом благодаря низкой темновой токсичности полученные конъюгированные соединения 145 (In) и 149 (Pd) показали отличные фототерапевтические индексы (IC₅₀ в темноте / IC₅₀ на свету), которые достигали значений 13971 и 4944 соответственно.

| | IС ₅₀ , мки | | |
|------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Kout lorat | [95% доверительн | ый интервал] | IC ₅₀ в темноте |
| KUN BIULAT | Ha | В | / IC ₅₀ на свету |
| | свету* | 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 |

Таблица 7. *In vitro* световая и темновая токсичность для конъюгатов 141 (Zn), 143 (2H), 145 (In) и 149 (Pd) в отношении клеточной линии A431.

К сожалению, на данном этапе исследований мы не можем объяснить, с чем связана настолько возросшая фотодинамическая активность при переходе от Zn к In и Pd. Можно с уверенностью сказать, что тип центрального атома не оказывает однозначного действия на биологическую активность, поскольку для безметального конъюгата 143 (2H) (IC₅₀ (на свету) = 0.026 мкмоль) также был зафиксирован рост фототоксичности (Табл. 7) по сравнению с 141 (Zn) (IC₅₀ (на свету) = 0.59 мкмоль). Для ответа на этот вопрос в настоящий момент проводятся дополнительные тесты,

^{*} Облучение клеток после инкубации с исследуемым соединением было проведено через 4 часа с дозой света 20 Дж/см² (λ = 615-635 нм, мощность 40 мкВт/см²), после чего ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа.

⁺ После 4-х часовой инкубации клеток с исследуемым соединением ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа.

связанные с изучением возможностей новых коньюгатов по проникновению в клетку и ее органеллы. Также сравнительные *in vitro* эксперименты на других клеточных линиях позволят определить степень селективности действия агентов 141 (Zn), 143 (2H), 145 (In) и 149 (Pd) в отношении *EGFR*-положительных опухолей. Кроме этого, важно провести исследования по измерению квантового выхода генерации ROS для этих соединений, чтобы определить их относительный противоопухолевый потенциал.

Таким образом, были получены катионные конъюгированные молекулы на основе хлориновых металлокомплексов и ариламинохиназолина (производное вандетаниба). С целью улучшения биологических и фотофизических свойств новых агентов ФДТ были использованы подходы: 1) варьирование длины/липофильности линкера, соединяющего разные фрагменты конъюгатов; 2) изменение количества положительных зарядов на периферии хлоринового фрагмента; 3) внедрение различных металлов в хлориновый макроцикл. К сожалению, не для всех полученных молекул на данный момент проведены необходимые биологические и фотофизические исследования. Однако, уже можно выделить наиболее перспективные производные 145 и 149 на основе индиевого или палладиевого комплекса соответственно.

В дальнейшем, после окончания *in vitro* экспериментов лучший комбинированный агент станет предметом исследования его противоопухолевой активности на животных с привитыми опухолями *in vivo*.

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

Другим перспективным направлением по созданию конъюгированных соединений является синтез порфириновых конъюгатов с углеводными лигандами [208]. Такой подход позволяет: 1) увеличить водорастворимость порфиринового фотосенсибилизатора; 2) увеличить направленность связывания с опухолевыми гликоспецифичными рецепторами [209]; 3) увеличить поглощение конъюгатов опухолевыми клетками за счет эффекта Варбурга [210]. Основываясь на данных фактах, был предложен комбинированный порфириновый агент ФДТ, содержащий производное вандетаниба и углеводный лиганд (Рис. 34).



Рис. 34. Предлагаемый углеводосодержащий конъюгат фотосенсибилизатора и производного вандетаниб.

3.1 Синтез и противоопухолевые свойства углеводсодержащих хлоринов

Прежде чем приступить к синтезу целевой молекулы (**Рис. 34**), необходимо было оценить солюбилизирующее влияние углеводного фрагмента на липофильный хлориновый макроцикл. Поэтому на первом этапе работы было решено создать молекулы, состоящие только из хлоринового фрагмента и углеводных остатков (**Рис. 35**).



Углеводсодержащий конъюгат

Рис. 35. Предлагаемый углеводосодержащий конъюгат.

В качестве прекурсоров углеводной части конъюгатов были выбраны моносахариды β-*D*-галактоза **150** и β-*D*-глюкоза **151**, которые были вначале проацилированы действием Ac₂O [211] с последующим азидированием (система SnCl₄/TMSN₃) (**Схема 19**) [212]. Выходы азидов **152** и **153** составили 82% и 77% после двух стадий. После чего с полученных производных углеводов **152** и **153** была удалена ацетатная защита действием MeONa с выделением азидосодержащих углеводов **154** и **155** с выходами 89 и 85% соответственно.



Кроме этого, исходя из β-*D*-мальтозы **156** по аналогичной схеме был синтезирован перацилированный азид **157** с выходом 73% после 2 стадий; производное **158** получено после удаления защитных групп с выходом 65% (Схема **20**).



Схема 20

Для создания конъюгированных производных был использован ранее синтезированный алкинсодержащий хлориновый металлокомплекс цинка **124**. Он вступал в реакцию *CuAAC* с азидами **154**, **155** и **158** в смеси DMF/H₂O с получением соответствующих углеводсодержащих конъюгатов **159-161** с выходами 83%, 69% и 65% соответственно (**Схема 21**).



Несмотря на наличие гидрофильного остатка углевода, только конъюгированное соединение 161 на основе дисахарида (мальтозы) проявило достаточную растворимость в воде. Для углеводсодержащего конъюгата 161 была показана водорастворимость в пределе концентраций 10⁻²-10⁻³ М. При этом, конъюгаты моносахаридов 159 и 160 не растворялись водных растворах.^{*} Для увеличения водорастворимости соединений 159 и 160 они обрабатывались избытком бромистого этила в течении 48 ч., в результате чего были получены аммонийные соли 162 и 163 с количественным выходом (Схема 22).



Схема 22

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгатов в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.

Углеводсодержащие катионные хлорины 162 и 163, в отличии от некватернизованных аналогов 159 и 160, продемонстрировали внушительное увеличение водорастворастворимости до предела концентраций 10⁻² M^{*}.

Для водных растворов соединений 162 и 163 были зарегистрированы спектры поглощения и испускания (Рис. 36, Табл. 8). Производные 162 и 163 продемонстрировали типичные формы спектров, свойственные цинковым металлокомплексам хлориновых фотосенсибилизаторов.



Рис. 36. Спектры поглощения и испускания конъюгатов 162 и 163 (с = 5 мкмоль) в воде.

Молекула, конъюгированная с остатком β-D-глюкозы **163**, показала в 3 раза меньшее значение относительного квантового выхода флуоресценции по сравнению с аналогом на основе β-D-галактозы **162**. Возможно, такое поведение соединения **162** связано с его большей тенденцией к образованию агрегатов в водном растворе.

| Соединение | λ_{abs} (HM) (log ε) | $\lambda_{em}(HM)^a$ | Ф _{фл} ^b (%) |
|------------|---|----------------------|----------------------------------|
| 162 | 410 (4.81) 636 (4.30) | 644 | 5.4 |
| 163 | 410 (4.80) 636 (4.25) | 644 | 1.7 |

Табл. 8. Фотофизические характеристики соединений 162 и 163.

^аВозбуждение на 410 нм. ^bОтносительно родамина Б в воде.

Значения световой и темновой токсичности (IC₅₀) для конъюгатов **162** и **163** в отношении клеток *А431* составили ~ 0.5 мкмоль и ~ 20 мкмоль соответственно. Таким образом, природа углеводного фрагмента для этих соединений не оказала влияние на цитотоксичность. Высокая темновая токсичность **162** и **163** относительно

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгатов в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.

ранее полученных ди- и трикатионных конъюгатов 131, 137, 141, 143, 145 и 149 может быть следствием более быстрой аккумуляции соединений 162 и 163 за счёт наличия векторного углеводного остатка. Однако, в рамках этой работы создавалась платформа для дальнейшего синтеза целевого конъюгата (Рис. 34), поэтому дальнейшие исследования *in vitro* аккумуляции и клеточной локализации не были проведены [213, 214].

| Контюгат | IС ₅₀ , мк [95% доверитель | IC ₅₀ в темноте | |
|----------|--|----------------------------|-----------------------------|
| Конъюгат | На свету [*] | В темноте [†] | / IC ₅₀ на свету |
| 161 | 0.47 [0.36; 0.56] | 25 [20; 29] | 49 |
| 162 | 0.41 [0.34; 0.49] | 20 [17; 24] | 54 |

Таблица 9. In vitro световая и темновая токсичность для конъюгатов 162 и 163.

3.2 Синтез и противоопухолевые свойства конъюгата углеводсодержащего хлорина и производного вандетаниба

В предыдущем разделе показано, что конъюгирование хлорина с дисахаридом позволяет получить водорастворимый фотосенсибилизатор, поэтому для создания таргетных водорастворимых конъюгатов хлоринов с производными вандетаниба было решено использовать в качестве третьего компонента фрагмент мальтозы.

Для этого алкинсодержащий феофорбид 122 подвергали раскрытию экзоцикла действием 2,2'-(этилендиокси)бис(этиламина) 164 с дальнейшим внедрением цинка в хлориновый макроцикл (Схема 23). После двух стадий выход хлоринового металлокомплекса 165 составил 72%. Аминогруппу в полученном комплексе 165 ацилировали янтарным ангидридом 166, что позволило получить кислоту 167 с количественным выходом.

^{*} Облучение клеток после инкубации с исследуемым соединением было проведено через 4 часа с дозой света 20 Дж/см² (λ = 615-635 нм, мощность 40 мкВт/см²), после чего ростовая среда была заменена на свежую с выполнением MTT-теста через 24 часа.

⁺ После 4-х часовой инкубации клеток с исследуемым соединением ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа



Карбоксильная группа в хлорине 167 подвергалась этерификации ариламинохиназолинолом 117 в условиях Штеглиха, что приводило к конъюгату 168 с выходом 58% (Схема 24). На последней стадии реакция циклоприсоединения *CuAAC* алкина 168 к азидсодержащему углеводу 158 позволила синтезировать целевой конъюгат 169 с выходом 88%. Таким образом, созданный комбинированный агент 169 состоит из фотоактивной хлориновой части, производного вандетаниба, а также гидрофильной группы на основе мальтозы.

Синтезированный конъюгат 169 продемонстрировал достаточную водорастворимость в пределе 10^{-4} M^{*} для проведения дальнейших биологических тестов. Следует, однако отметить, что при стоянии в течении нескольких часов из раствора 169 в воде выпадал хлопьевидный осадок. Такое поведение говорит о тенденции 169 к образованию ассоциатов в воде.

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгатов в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.



Схема 24

Спектры поглощения и испускания в воде для соединений 161 и 169 (Рис. 37, Табл. 10) характеристичны для цинковых металлокомплексов хлориновых фотосенсибилизаторов. Комбинированный агент 169 показал более слабое поглощение и испускание в сравнении с хлорином 161, что также отразилось и на относительном квантовом выходе флуоресценции, которые составляли 1.2% для конъюгата 169 и 6.7% для молекулы 161 (Табл. 10). Такой результат, скорее всего, связан с реализацией переноса энергии между хлориновой И ариламинохиназолиновой частями соединения 169. Также наблюдаемые результаты могут быть следствием снижения водорастворимости агента 169.



Рис. 37. Спектры поглощения и испускания конъюгатов 169 и 161 (с = 5 мкмоль) в воде.

Определение квантового выхода генерации синглетного кислорода для соединений 161 и 169 было проведено с использованием химических ловушек DPBF (1,3-дифенилизобенхофуран) 170 и ADMA (антрацен-9,10-диил-бис-метилмалонат) 171 (Схема 25) (работы проводились совместно с группой чл.-корр. Ю. Г. Горбуновой в Институте физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН).





При этом DPBF 170 применялся для изучения растворов 161 и 169 в ДМСО, а ADMA 171 для 1% раствора ДМСО в воде (Табл. 10). Добавка 1% ДМСО вызвана необходимостью растворения конъюгата 169. Квантовый выход генерации

синглетного кислорода в ДМСО и 1% раствора ДМСО в воде для соединения 169 составил ~20% относительно фталоцианина цинка (ZnPC). Для соединения 161 квантовый выход генерации синглетного кислорода в ДМСО был 20%, а в 1% растворе ДМСО в воде составил 28%, что вполне согласуется с отсутствием агрегационных свойств за счет высокой гидрофильности этого соединения. Все измеренные значения выхода генерации синглетного кислорода находятся в соответствии с литературными данными для цинковых металлокомплексов природных хлоринов [215].

| Соединение | λ _{abs} (HM) (log ε) | λem ^a (HM) | ${{ { { { \! \! \! \Phi}} } }_{ m F}}^{ m b} \left({ \! { \% } } ight)$ | Φ Δ ^c (%) |
|------------|-------------------------------|-----------------------|---|-----------------------------|
| 169 | 422 (4.69) | 646 | 1.2 | 21 (ДМСО) |
| | 646 (4.43) | | | 19 (1% ДМСО/Н2О) |
| 161 | 412 (5.07) | 646 | 6.7 | 20% (ДМСО) |
| | 636 (4.58) | | | 28% (1% ДМСО/Н2О) |

Табл. 10. Фотофизические характеристики соединений 169 и 161.

^аВозбуждение на 410 нм. ^ьОтносительно родамина Б в воде. ^сОпределено с использованием ловушек DPBF и ADMA (относительно ZnPc).

Изучение селективности действия *EGFR*-лиганда (производное вандетаниб) в составе конъюгата **169** было проведено на двух клеточных линиях: неопухолевая *CHO* (клетки яичника китайского хомяка, *EGFR*-отрицательная) и опухолевая *A431* (плоскоклеточная опухоль кожи, EGFR-положительная). Уровень экспрессии рецептора на этих клеточных линиях был измерен методом проточной цитометрии с флуоресцентным окрашиванием (**Рис. 28**).

В результате инкубации клеточных культур с агентами 161 и 169 было продемонстрировано, что они локализуются преимущественно внутри клеток (Рис. 38а). Изучение флуоресценции 161 и 169 показало, что оба соединения накапливаются быстрее в опухолевых клетках *А431* (Рис. 38b). При этом график на Рис. 38b говорит нам о том, что углеводсодержащий конъюгат 161 без лиганда EGFR накапливается более избирательно. Однако, 6-кратная разница в квантовом выходе флуоресценции между молекулами 161 и 169 (Табл. 10) позволяет предположить, что концентрация конъюгата 169 в обоих клеточных линиях значительно выше по сравнению с агентом 161.



Рис. 38. (а) Изображения, полученные на конфокальном микроскопе для СНО и A431 клеток после их инкубации с 5 мкмоль конъюгата 161 (нижний ряд) и соединения 169 (верхний ряд) в течении 4 ч. (b) Интенсивность флуоресценции для 161 и 169. Были проанализированы по меньшей мере 10 клеток в 2-3 полях наблюдения; представлены значения среднего \pm SEM. $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{em} = 600-740$ нм.

Поскольку комбинированные хлориновые производные 161 и 169 были локализованы внутри клеток, имело смысл изучить их субклеточную локализацию внутри клеточных органелл. Кроме этого, тип мишени, в которой оказывается фотоактивная молекула, напрямую влияет на ее фотодинамическую активность [23]. Для этого клетки *А431*, инкубированные с соединениями 161 и 169, были окрашены красителями, связывающимися с соответствующими субклеточными структурами (**Рис. 39**). Оба конъюгата 161 и 169 после прохождения клеточной мембраны оказываются преимущественно в лизосомах, а также в аппарате Гольджи. Наблюдаемые результаты позволяют предположить, что проникновение этих фотосенсибилизаторов в клетки происходит посредством эндоцитоза.



Рис. 39. Анализ внутриклеточной локализации **169** (А) и **161** (В) для клеточной линии *A431*. Клетки были инкубированы с соединениями **169** и **161** в течении 4 часов с последующим окрашиванием: *LysoTracker Green* для лизосом; *LysoTracker Green* для митохондрий; *ER*-*Tracker* для ЭПР и *BODYPY FL C5*-церамид с *BSA* для аппарата Гольджи. Представлены объединенные каналы флуоресценции; сигналы флуоресценции представлены вдоль белой стрелки на изображениях. Шкала: 10 мкм.

Следующим шагом стало определение фотодинамической и темновой цитотоксичностей вандетаниб-содержащего конъюгата 169 и углеводсодержащего хлорина 161. В темноте хлориновый фотосенсибилизатор 161 продемонстрировал выраженную токсичность на обоих клеточных линиях с IC₅₀ (в темноте) ~ 30-50 мкмоль (Табл. 11). После облучения цитотоксичность соединения 161 возросла в ~ 40 раз. Однако, ни в темноте, ни на свету конъюгат 161 без лиганда *EGFR* не показал селективности в отношении *EGFR*-положительной клеточной линии *A431*. Конъюгат 169, напротив, продемонстрировал 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 [107]. Кроме этого, для

конъюгата 169 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 169 перспективным противоопухолевым агентом.

| | | 161 | | | 169 | | |
|--------------------|---|----------------------|--|---|----------|-----------------------------|--|
| Клеточная линия | IC ₅₀ , мкмоль, [95% доверительный интервал] | | IС ₅₀ в _{темноте} / | IC ₅₀ , мкмоль, [95% доверительный интервал] | | IC ₅₀ в темноте | |
| | На | В | IС ₅₀ на | На | В | / IC ₅₀ на свету | |
| | свету* | темноте* | свету | свету * | темноте* | | |
| A431 | 0.91 [0.62; 1.32] | 37.6 [28.9; 48.7] | 41 | 0.19 [0.16; 0.24] | ~70 | ~368 | |
| СНО | 1.03 [0.77; 1.38] | 48.4 [38.5; 60.7] | 47 | 0.40 [0.34; 0.46] | >100 | >250 | |

| Таблица 11. <i>In vitro</i> световая и темновая токсичность для конъюгатов 161 и |
|--|
|--|

С целью углубленного изучения терапевтической активности, новый комбинированный агент 169 был введен мышам с привитыми опухолями A431 (Рис. 40 (А)). Конъюгат 169 показал преимущественное накопление в опухолевой ткани; соотношение сигналов опухоль/норма составляло 1.65 (через 1 ч.) и 2 (через 24 ч.) (Рис. 40 (В)). Почти полное выведение соединения 169 из организма животных наблюдалось через 4 дня.

Фотодинамическая терапия мышей с привитыми опухолями была проведена через 4 часа после введения им агента 169, поскольку в этой точки его накопление было максимально в опухолевой ткани (Рис. 40 (А)). Облучение области, где расположена опухоль, с дозой света 50 Дж/см² (мощность 100 мкВт/см²) привело к падению уровня флуоресценции, что связано с активным фотовыцветанием молекулы 169 (Рис. 40 (В)). После фотодинамического воздействия рост опухолей был остановлен и на месте их локализации образовывались рубцы (Рис. 41 (А)). Общий объём опухоли быстро снижался после ФДТ и не превышал ~15% на 7-9 день после лечения у животных (Рис. 41 (В)).

^{*} Облучение клеток после инкубации с исследуемым соединением было проведено через 4 часа с дозой света 20 Дж/см² (λ = 655-675 нм, мощность 32 мкВт/сm²), после чего ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа.

^{*} После 4-х часовой инкубации клеток с исследуемым соединением ростовая среда была заменена на свежую с выполнением МТТ-теста через 24 часа



Рис. 38. Изучение накопления конъюгата 169 *in vivo*. (А) Флуоресцентное изображение мыши после введения 169 ((15 мг/кг; 4 ч. после введения). Опухоль обозначена стрелкой. $\lambda_{ex} = 590$ нм, $\lambda_{em} = 600-700$ нм. (В) Динамика изменения флуоресценции в опухоли (красная кривая) и нормальной ткани (черная кривая) у животных после введения конъюгата 169. $\lambda_{ex} = 590$ нм, $\lambda_{em} = 600-700$ нм. Облучение с дозой 50 Дж/см² (620-655 нм) было проведено через 4 ч. после введения (отмечено стрелкой). Показаны выборочные кривые.

Необычным явлением стал эффект, возникающий у животных с введенным соединением **169**, но не подвергнутых облучению. У этих животных также наблюдалось ингибирование опухолевого роста (**Рис. 41B**), что может быть связано только с собственной активностью производного вандетаниба, которая заключается в ингибировании тирозинкиназ.



Рис. 41. ФДТ мышей с ксенотрансплантантами A431. (А) Выборочные примеры животных из контрольной группы (верхний ряд, контроль); животных с введенным конъюгатом 169 без облучения (средний ряд, 169); животные с введенным конъюгатом 169 с последующим облучением (нижний ряд, 169+ФДТ). (В) Относительные объемы опухолей в контрольной группе и группе животных после введения конъюгата 168. Представлены средние значениям \pm SEM. * – статистически значимое отличие от контрольной группы (р<0.05, ANOVA с тестом Даннета для множественных сравнений).

Таким образом, для соединения **168** в процессе терапии привитых опухолей у животных реализовывались одновременно механизмы фотодинамической и химиотерапии, что в совокупности повышает его общую терапевтическую активность. Полученный результат напрямую свидетельствует о успешности

выбранного нами подхода для создания конъюгированного соединения **168** на основе хлоринового фотосенсибилизатора и производного цитостатика вандетаниба [216].

4. Синтез ферментативно-расщепляемого конъюгата углеводосодержащего хлорина и производного препарата кабозантиниб

Выполнение этой части диссертационного исследования стало возможным благодаря сотрудничеству группы проф. РАН Федорова А.Ю. с лабораторией проф. Г.-Г. Шмальца (Университет Кёльна, Германия, при поддержке DAAD), где диссертантом была выполнена часть этой работы.

Одним из самых эффективных и распространенных методов создания комбинированных агентов является использование саморасщепляющихся линкеров [107]. Такие линкеры под воздействием различных стимулов (например, свет, изменение pH среды, действие ферментов и т.д.) способны расщепляться с выделением терапевтических соединений. Среди саморасщепляющихся линкеров особое место занимают β-глюкуронидные линкеры, в которых гликозидная связь чувствительна к действию фермента β-глюкуронидазы (Схема 26) [217]. Действием β-глюкуронидазы проиходит разрушение линкера с выделением лекарственного соединения. При этом применение β-глюкуронидных линкеров позволяет, в большей степени, избирательно расщеплять создаваемые конъюгаты именно в опухолевых тканях, поскольку последние известны своей высокой концентрацией фермента β-глюкуронидазы [217].



Схема 26

В качестве химиотерапевтической части для создания ферментативнорасщепляемого коньюгата был выбран цитостатик кабозантиниб (cabozantinib), который является ингибитором тирозинкиназ, таких как VEGFR-2 и c-Met [218]. ингибирующую активность кабозантиниб демонстрирует Однако, уже В наномолярном диапазоне концентраций, в отличие от ингибитора вандетаниба, который активен в микромолярных количествах. Кабозантиниб был одобрен FDA и ЕМА для лечения опухолей щитовидной железы и почек. Использование такого мощного цитостатика в составе комбинированного соединения позволит добиться эффективности одновременной фотодинамической максимальной при И химиотерапии опухолей.


Кабозантиниб

Мультитаргетный ингибитор тирозинкиназ; активен в наномолярном диапазоне концентраций

Рис. 42. Структура кабозантиниба.

Связывание кабозантиниба с хлориновым фотосенсибилизатором планировалось осуществить с помощью β-глюкуронидного линкера, имеющего дополнительный фрагмент на основе этилендиамина (Схема 27). Подобный дизайн был применен в ряде работ и доказал свою эффективность особенно для соединения больших и пространственно-затруднённых терапевтических фрагментов [217]. Под действием β-глюкуронидазы будет происходить расщепление линкера по гликозидной связи, что запускает каскад процессов, приводящих к самоциклизации оставшейся части линкера и выделению хлоринового фотосенсибилизатора наряду с образованием кабозанитиниба в форме фенола.



Схема 27

Таким образом, β-глюкуронидный линкер в составе комбинированного агента позволит произвести расщепление преимущественно в опухолевой ткани с выделением фотоактивного хлоринового фотосенсибилизатора и производного цитостатика кабозантиниба, что в совокупности приведет к синергетическому терапевтическому эффекту.

С этой целью предложен ферментативно-расщепляемый конъюгат **170** (Схема **28**), синтез которого планировалось осуществить параллельно из трех структурных блоков. Для этого выбран: 1) β-глюкуронидный линкер на основе *D*-(+)-Глюкуроно-3,6-лактона; 2) производное кабозантиниба, синтезированное на основе апоцинина и циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты; 3) фотоактивная часть на основе углеводосодержащего конъюгата хлоринового металлокомплекса.



4.1 Синтез структурного блока на основе производного кабозантиниба

Производное кабозантиниба было синтезировано по известной методике [219]. Исходным соединением для синтеза первого структурного блока стал апоцинин 171, который под действием бензилбромида был превращен в бензиловый эфир 171 с выходом 95% (Схема 29). После чего полученный эфир 172 подвергался нитрованию в смеси AcOH/HNO₃ с образованием нитропроизводного 173 с выходом 84%, которое было восстановлено с помощью железной стружки и формиата аммония до соответствующего производного анилина 174 с выходом 73%. Кипячение соединения 174 с этилформиатом и основанием позволило получить хинолинол 175 с выходом 81%, который был прохлорирован действием POCl₃ с образованием хлорзамещенного производного хинолина 176 с выходом 64%. Дальнейшая реакция S_NAr между соединением 176 и *n*-нитрофенолом 177 позволила получить нитропроизводное 178 с выходом 68%, которое затем действием SnCl₂·2H₂O было восстановлено до производного анилина 179 с выходом 59%.



Следующим шагом стал синтез второго фрагмента кабозантиниба из циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты 180. ИЗ которой был получен соответствующий хлорангидрид, вступающий в реакцию ацилирования с *n*фторанилином 181, в результате был получен амид 182 с выходом 83% (Схема 30). Ацилирование карбоксильной группы в соединении 182 с последующей реакцией с аминосодержащим хинолином 179 позволило синтезировать бензильное производное кабозантиниба 183 с выходом 57%, в котором защитный бензильный фрагмент может быть удален кислотным гидролизом.



Схема 30

Для связывания кабозантинибного фрагмента с ферментативнорасщепляемым линкером, было решено ввести в структуру **183** этиленгликолятный фрагменты по положению «7» этиленгликолятный фрагмент. С этой целью избыток этиленгликоля **184** был бромирован действием PBr₃, что привело к 2-бромэтанолу **185** с выходом 83% (Схема 31). После чего свободный гидроксил 2-бромэтанола **185** был защищен THP-фрагментом с образованием бромопроизводного **186** с выходом 84% [220].

Удаление бензильной защитной группы в производном кабозантиниба 183 было кипячением в TFA; выход производного хинолинола 187 составил 82% (Схема 31). Реакция нуклеофильного замещения между алкилбромидом 185 и соединением 187 привела к производному кабозантиниба 188 с выходом 75%, в котором THPзащитная группа была удалена действием TFA, что привело к целевое производному 189 с выходом 86%.



4.2 Синтез структурного блока на основе цинкового металлокомплекса хлорина-е6

В качестве фотоактивной части ферментативно-расщепляемого конъюгата был выбран цинковый металлокомплекс хлорина 167, который был синтезирован ранее исходя из метилфеофорбида-*а* 104 в 4 стадии и имеет в своем составе терминальный алкиновый и карбоксильные фрагменты. Для повышения водорастворимости целевого комбинированного агента к соединению 167 по реакции *СиААС* был присоединен азидсодержащий гептаацетат мальтозы 157 с образованием углеводосодержащего хлорина 190 с выходом 78% (Схема 32).



Схема 32

4.3 Синтез ферментативно-расщепляемого линкера

В качестве прекурсора для синтеза β-глюкуронидного линкера был выбран *D*-(+)-глюкуроно-3,6-лактон **191**, который является широкодоступным продуктом пищевой промышленности (**Схема 33**). По литературной методике [221] лактон **191** был раскрыт действием MeONa в метаноле с последующей реакцией ацилирования с образованием производного глюкуроновой кислоты **192** с защищенными карбоксильной и гидроксильными группами с выходом 55%. Дальнейшая реакция бромирования соединения **192** в 33% растворе HBr в уксусной кислоте приводила к бромзамещенному производному **193** с выходом 95% [222]. После чего с помощью смешивания бромсодержащего углевода **193** с 4-гидрокси-3-нитробензальдегидом **194** и стехиометрическими количествами Ag₂O по Уильямсону был синтезирован эфир **195** с выходом 60% [221]. Альдегид **195** был восстановлен до спирта **196** с выходом 96% [223]. После чего была предпринята безуспешная попытка восстановить нитрогруппу у соединения **196** по реакции с SnCl₂·H₂O. Восстановительная система, состоящая из железной стружки и формиата аммония, позволила получить производное анилина **197** с выходом 64%.



Схема 33

4.4 Синтез ферментативно-расщепляемого конъюгата

Для создания амидной связи между хлориновым производным **190** и линкером **197** были использованы различные системы амидирования по Штеглиху [202] (**Табл. 12**): DCC (дициклогексилкарбодиимид, опыт №1); DIC (диизопропилкарбодиимид, опыт №2); EDC·HCl (опыт №3). Однако, ни одна из использованных реакций не позволила выделить амид **198** с выходом более 21%. Дальнейшее амидирование с реагентом Ямагучи (2,4,6-трихлоробензоилхлорид) [224] позволило лишь слегка повысить выход целевого продукта (опыт №4). А применение HDMA (1-[(диметиламино) (морфолино) метилен]-1H-[1, 2, 3]триазоло[4, 5-b]пиридин-1-иум 3-оксид гексафторфосфат), который относится к классу азабензотриазольных каплинговых агентов [225], не приводило к амидированию соединения **190** (опыт **№5**).

Таблица 12. Оптимизация условий амидирования хлорина 190 соединением 197.



| № опыта | Реагент для амидирования | Основание | Температура | Выход конъюгата 197, % |
|------------|-----------------------------|------------------|-------------|------------------------------|
| 1 | 2 эквив. DCC | 0,5 эквив. DMAP | 0°C - rt | 10 |
| 2 | 2 эквив. DIC | 0,5 эквив. DMAP | 0°C - rt | 15 |
| 3 | 2 эквив. EDC·HCl | 0,5 эквив. DMAP | 0°C - rt | 21 |
| 4 | 2 эквив. Реагент | 3 эквив. ТЕА, | rt | 24 |
| | Ямагучи | 2 эквив. DMAP | | |
| 5 | 1,1 эквив. HDMA | DIPEA 2,2 эквив. | rt | _* |

*-по ТСХ

Очевидно, низкие выходы целевого продукта **198** обусловлены наличием в субстрате **197**, наряду с функционализируемой аминогруппой, спиртового нуклеофильного центра, находящегося в активированном бензильном положении. Поэтому, было решено ввести защитную группу по бензильному гидроксилу в соединении **197** в виде *N*, *N'*- диметилэтилендиаминного фрагмента, присоединенного к гидроксильной группе за счёт карбаматной связи. В этом случае, синтезируемый карбамат выступал не только в качестве защитной группы, но также

и в качестве фрагмента ферментативно-расщепляемого линкера. Для этого, исходя из субстрата 196, был синтезирован активированный карбонат 199 с выходом 85% (Схема 34) по реакции с *бис*(4-нитрофенил)карбонатом 200. Соединение 199 удалось превратить в карбамат 201 по реакции с N, N'- диметилэтилендиамином 202, однако выходы целевого продукта не превышали 23% (Табл. 13).



Таблица 13. Оптимизация условий синтеза карбамата **201** с помощью незащищенного *N*, *N'*-диметилэтилендиамина **202**.

| № опыта | Количество диамина 202, эквив. | Растворитель | Температура | Выход карбамата 201, % |
|------------|--------------------------------------|-------------------|-------------|------------------------------|
| 1 | 10 | DMF | rt | 20 |
| 2 | 10 | DMF | 0°C | 18 |
| 2 | 30 | DMF | rt | 23 |
| 4 | 30 | DMF | 0°C | 17 |
| 3 | 10 | CHCl ₃ | 0°C | 10 |
| 4 | 30 | CHCl ₃ | 0°C | 12 |

Для преодоления возникших затруднений из *N*, *N'*-диметилэтилендиамина **202** по известной методике [226] получено моно-*Boc*-защищённое производное **203** с выходом 81% (Схема **34**). Дальнейшая реакция амина **203** и карбоната **199** привела к образованию карбамата **204** с выходом 82%. К сожалению, этот синтетический путь также не завершился успехом, поскольку попытки удаления *Boc*-защитной группы в кислотных условиях в производном **204** приводили к образованию неразделимой смеси продуктов неизвестного состава, что обусловлено лабильностью карбаматного фрагмента и гликозидной связи у β-глюкуроновой структуры.

В связи с этим было принято решение сначала объединить фрагмент линкера на основе *N,N'*-диметилэтилендиамина **202** с гидроксилсодержащим производным кабозантиниба **189**, а уже затем собрать целевой конъюгат с использованием полученного строительного блока **205** (Схема **35**). Для этого действием *бис*(4-нитрофенил)карбоната **200** на соединение **189** был получен активированный карбонат **206** с выходом 94% (Схема **35**). После чего по реакции производного **206** с амином **203** синтезирован карбамат **207** с выходом 92%. Удаление *Boc*-защитной группы в соединении **207** в присутствии TFA приводило к целевому производному кабозантиниба **205**, содержащего фрагмент ферментативно-расщепляемого линкера с выходом 83%.



Схема 35

Для преодоления трудностей на этапе ключевого амидирования, нитрогруппа в производном бензальдегида 195 была селективно восстановлена действием SnCl₂·2H₂O с выходом 55% до соответствующего амина 208 (Схема 36). Последующее создание амидной связи между углеводсодержащим хлорином 190 и соединением 208 проводилось с использованием различных амидирующих систем (Табл. 14). Карбодиимидные агенты в условиях реакции Штеглиха оказались абсолютно неэффективны для проведения этой реакции (опыты №1-3). Применение реагента Ямагучи позволило получить конъюгат 209 с выходом 45% (опыт №4). Азабензотриазольный агент HDMA приводил к конъюгату 209 с 24% выходом (опыт №5).



Схема 36

| № опыта | Реагент для амидирования | Основание | Температура | Выход конъюгата 209, % |
|------------|-----------------------------|---------------|-------------|---------------------------|
| 1 | 2 эквив. DCC | 0,5 эквив. | 0°C - rt | _* |
| | | DMAP | | |
| 2 | 2 эквив. DIC | 0,5 эквив. | 0°C - rt | _* |
| | | DMAP | | |
| 3 | 2 эквив | 0,5 эквив. | 0°C - rt | _* |
| | EDC ·HCl | DMAP | | |
| 4 | 2 эквив. Реагент | 3 эквив. ТЕА, | rt | 45 |
| | Ямагучи | 2 эквив. DMAP | | |
| 5 | 1,1 эквив. | DIPEA 2,2 | rt | 24 |
| | HDMA | эквив. | | |

Таблица 14. Оптимизация условий амидирования хлорина 190 соединением 208.

*-по ТСХ

На следующем этапе карбонильная группа в конъюгате 209 была восстановлена до соответствующего спирта 210 (выход 80%), который превращался в активированный карбонат 211 с выходом 89% в реакции с *бис*(4-нитрофенил)карбонатом 200 (Схема 37).



И, наконец, финальным этапом сборки ферментативно-расщепляемого агента стала реакция активированного карбоната 211 и аминосодержащего производного кобозантиниба 205 с образованием с выходом 81% конъюгата 212, содержащего дополнительную карбаматную связь (Схема 38). Не смотря на достаточно сложное строение, для молекулы 212 нам удалось зарегистрировать ¹Н-ЯМР спектр в хорошем разрешении и соотнести необходимые пики (Рис. 43А). Кроме этого, полученный конъюгат 212 не продемонстрировал существенной фрагментации во время исследования его масс-спектра с помощью метода *MALDI* (Рис. 43В).





Рис. 43. (А) Фрагмент ¹Н-ЯМР спектра для конъюгата 212. (В) Масс-спектр *MALDI* для конъюгата 212. (С) Масс-спектр HRMS-ESI для конъюгата 170.

Все одиннадцать защитных групп в коньюгате 212 были удалены действием LiOH·H₂O, что привело к целевому агенту 170 с выходом 73% (Схема 38). Для подтверждения строения 170 была использована HRMS-ESI масс-спектрометрия, которая показала несколько пиков ионов, относящихся к целевому коньюгату (Рис. 43С).

Таким образом, нами был синтезирован комбинированный конъюгат **170** в 30 стадий, исходя из феофорбида, апоцинина и глюкуронолактона.

После получения целевого конъюгата **170**, были проведены исследования его водорастворимости^{*}. Оказалось, что в водном растворе изучаемое соединение **170** может быть растворено в пределе 10^{-4} М и при стоянии имеет тенденцию к агрегированию. Однако, повышение водорастворимости до 10^{-3} М с одновременным предотвращением образования агрегатов для молекулы **212** может быть осуществлено добавлением 1% ДМСО и добавки 10-20% ПЭГ2000 к её водному раствору. Такая солюбилизирующая среда совместима с изучением цитотоксичности *in vitro* и *in vivo*, поэтому достигнутый результат является удовлетворительным.

4.5 Фотофизические параметры ферментативно-расщепляемого конъюгата

Для синтезированного ферментативно-расщепляемого конъюгата 170 были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции (Рис. 44., Табл. 15). Синтезированный агент 170 демонстрирует наличие типичных для хлоринового металлокомплекса полос Соре и Q, также характерный спектр испускания с максимумом $\lambda_{em} = 648$ нм. При этом практический выход флуоресценции производного 170 находится на уровне 0,04% относительно родамина Б в воде и является самым низким среди полученных комбинированных соединений. Такое поведение 170 может быть следствием как процессом переноса энергии с хлориновой на хинолиновую структуры, так и следствием образования слабо испускающих ассоциатов в ПБС.

| Соединение | λ_{abs} (HM) (log ε) | $\lambda_{em} (HM)^a$ | $\Phi_{\phi \pi}{}^{b}$ (%) |
|------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| 170 | 416 (4.58) 641 (4.11) | 648 | 0,04 |

^аВозбуждение на 410 нм. ^ьОтносительно родамина Б в воде.

^{*} Изучение водорастворимости было проведено путем растворения заданных навесок конъюгата в воде и визуальным наблюдением за формированием осадка.





С целью изучения изменения фотофизических характеристик конъюгата 170 в процессе ферментативного расщепления были зарегистрированы его спектры испускания в различные моменты времени после добавления β-глюкуронидазы (*E. Coli*) (Рис. 45). При этом первые 24 часа наблюдался 8-кратный рост интенсивности испускания, что связано с разрушением структуры конъюгата 170, приводящему к блокированию процессов переноса энергии. По прошествии 72 часов после добавления фермента интенсивность испускания снизилась до значений, соответствующих точке «1 час». Такое гашение может быть связано с агрегированием выделившихся хлориновых фрагментов с течением времени.



Рис. 45. Спектры испускания конъюгата **170** (с = 5 мкмоль) в растворе ПБС с 10% добавкой ПЭГ2000 после добавления 4 ед/мл β-глюкуронидазы.

4.6 Ферментативное расщепление конъюгата

Оценка принципиальной возможности расщепления конъюгата 170 под действием β-глюкуронидазы была произведена с помощью ВЭЖХ. Для этого к соединению 170 в растворе ПБС (pH=7) с добавками ПЭГ2000 и ДМСО была прибавлена β-глюкуронидаза (*E.Coli*) и через определенные промежутки времени отбирались аликвоты, которые были проанализированы методом ВЭЖХ. Хроматограмма конъюгата 170 до добавления фермента представлена на Рис. 46.



Время, мин

Рис. 46. Хроматограмма для конъюгата **170** до добавления β-глюкуронидазы. Детектор PDA, λ=254 нм.

Хроматограмма через 4 часа после добавления β -глюкуронидазы представлена на **Рис. 47.** Анализ полученной хроматограммы показывает, что исходное соединение **170** путем ферментативного расщепления разделилось на несколько фрагментов. При этом выделилось неизвестное соединение **X**, которое скорее всего является отщепившейся глюкуроновой кислотой. Кроме этого, образуется неизвестный хлорин **Y** (хлориновое ядро видно по спектру поглощения), а также производное кабозантиниб в форме карбамата **205**. Подтверждение наличия выделяющегося производного проведено путем сопоставления Rt (**Puc. 48**) и спектров поглощения с синтезированным соединением **205** из его раствора ПБС с добавками ПЭГ2000 и ДМСО.



Рис. 48. Хроматограмма для конъюгата **170** через 4 ч после добавления β-глюкуронидазы. Детектор *PDA*, λ=254 нм.



Рис. 48. Хроматограмма для производного **205**. Детектор *PDA*, λ =254 нм.

Таким образом, под действием β -глюкуронидазы происходит расщепление конъюгата 170 с выделением производного кабозантиниб 205, у которого фрагмент этилендиамина не подвергается самоциклизации, как показано на Схеме 27. В настоящий момент для объяснения такого явления, а также для установления точных структур образующихся производных X и Y проводится анализ ферментативного расщепления для 170 с использованием ВЭЖХ-МС. Также сейчас проводятся исследования цитотоксичности полученного ферментативно-расщепляемого соединения 170 в присутствии и отсутствии β -глюкуронидазы, что позволит сделать выводы о перспективности такого конъюгата для лечения опухолевых заболеваний.

Экспериментальная часть

Общая информация

ЯМР-спектроскопия: ¹Н- и ¹³С-ЯМР спектры регистрировали на спектрометрах *Bruker AV* 600, *Bruker DRX* 500, *Agilent DD2* 400 или *Bruker DPX* 300. Химические сдвиги приведены в шкале δ (м.д.) относительно дейтерированного растворителя (CDCl₃, DMSO-d₆ или CD₃OD) в качестве внутреннего стандарта; значения *J* в Гц.

ИК-спектроскопия: ИК спектры регистрировали на спектрометре с Фурьепреобразователем Shimadzu IR Prestige-21.

Масс-спектрометрия: Масс-спектры (МС) были получены с использованием метода MALDI на спектрометре TOF Bruker Microflex и метода ESI (HRMS) на спектрометре Finnigan MAT 900.

ВЭЖХ: Хроматограммы был получены с использованием хроматографа Knauer Smartline S2600 с детектором PDA. Хроматография проводилась на обращенной фазе с колонкой Диасфер 110-С18 (4,0 х 100 мм²). Метод элюирования: скорость потока 0,7 мл/мин; режим градиента от 10% MeOH (0,1% TEA)/ 90% H₂O до 100% MeOH (0,1% TEA) в течении 10 минут, затем 100% MeOH (0.1% TEA) в течении 10 минут.

Коммерчески доступные реагенты («Sigma Aldrich», «Acros», «Alfa Aesar», «ABCR» и др.) использовали без предварительной очистки. Растворители готовили к использованию с применением стандартных методик очистки. Применяли петролейный эфир (ПЭ) с интервалом кипения 40-70 °C. Для проведения колоночной хроматографии использовали силикагель Merck 60 (70-230 mesh). Для проведения тонкослойной хроматографии использовали пластины Merck TLC Silica gel 60 с флуоресцентным индикатором (F₂₅₄).

Синтез конъюгатов

Методика проведения реакции алкилирования с последующим азидированием производного хиназолинола 117

(Синтез соединений 118 и 119)

В колбу Шленка было помещено производное хиназолинола **117** (1 эквив.), 1бромо-3-хлорпропан (5 эквив.) или дитозилат триэтиленгликоля (3 эквив.) и K₂CO₃ (3 эквив.), после чего воздух был вытеснен аргоном и был добавлен безводный DMF (6 мл). Смесь перемешивалась на магнитной мешалке в течение 24 ч. при 50 °C. После окончания реакции (TCX контроль) смесь охлаждалась и концентрировалась при пониженном давление. Остаток был растворен в CHCl₃ (100 мл), промыт H₂O (3 × 50 мл), высушен (Na₂SO₄) и заново сконцентрирован в колбе Шленка. После чего колба Шленка была заполнена аргоном и безводным DMF (3 мл) с добавлением NaN₃ (5 эквив.) и последующим перемешиванием в течение 24 ч. на магнитной мешалке при 60 °C. Затем растворитель был удален при пониженном давлении. Остаток был растворен в CHCl₃ (100 мл), промыт H₂O (3 × 50 мл), высушен (Na₂SO₄) и заново сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 118.



Использовано 0.250 г (0.68 ммоль) производного хиназолинола **117** и 0.534 г (3.4 ммоль) 1-бромо-3-хлорпропана. Элюент для КХ: EtOAc/ПЭ 90:10. Выделено 0.215 г (70%) в виде белого порошка.

¹H-HMR (400 ΜΓμ, DMSO-d₆): δ 9.54 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, CH), 7.80 (s, 1H, CH), 7.66 (d, *J* = 10 Hz, 1H, CH), 7.58-7.43 (m, 2H, 2CH), 7.21 (s, 1H, CH), 4.22 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, CH₃O), 3.55 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.12-2.00 (m, 2H, CH₂).
¹³C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆): δ 157.90, 156.88, 155.40, 153.44, 152.93, 149.01, 146.88, 129.53, 127.47, 126.44, 119.20, 117.59, 108.72, 107.82, 102.01, 65.55, 56.15, 47.64, 27.91.

MC (MALDI): Для C₁₈H₁₆BrFN₆O₂ рассчитано: m/z 447.1, 449.1: найдено m/z 447.1 [M+H]⁺ (⁷⁹Br), 449.1 [M+H]⁺ (⁸¹Br).

ИК: 2100 ст⁻¹ (полоса азидной группы).

Соединение 119.



Использовано 0.330 г (0.91 ммоль) производного хиназолинола **117** и 1.25 г (2.73 ммоль) дитозилата триэтиленгликоля. Элюент для КХ: EtOAc. Выделено 0.289 г (61%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.54 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, CH), 7.80 (s, 1H), 7.66 (dd, J = 10.0, 2.1 Hz, 1H), 7.58-7.43 (m, 2H, 2CH), 7.21 (s, 1H, CH), 4.29 – 4.25 (m, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, CH₃O), 3.86 – 3.83 (m, 2H, CH₂), 3.68 – 3.58 (m, 6H), 3.42 – 3.37 (m, 2H, CH₂).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 158.35, 157.31, 155.85, 154.02, 153.35, 149.41, 147.33, 130.00, 127.91, 126.90, 119.88, 117.93, 109.13, 108.20, 102.42, 70.43, 70.12, 69.71, 69.10, 68.52, 56.52, 50.44.

MC (MALDI): Для C₂₁H₂₂BrFN₆O₄ рассчитано: m/z 521.1, 523.1; найдено m/z; 521.8 [M+H]⁺ (⁷⁹Br), 523.8 [M+H]⁺ (⁸¹Br). **ИК:** 2100 сm⁻¹ (полоса азидной группы).

Методика проведения реакции раскрытия экзоцикла феофорбидов 104 и 122 с одновременным внедрением цинка в хлориновый макроцикл

(Синтез соединений 124, 132, 138, 165)

В круглодонную колбу с мешалкой был помещен соответствующий феофорбид 104 или 122 (1 эквив.), который затем был растворен в CHCl₃ (5-7 мл). После чего был добавлен избыток амина (20-40 эквив.) и содержимое колбы перемешивалось ~24 ч. при комнатной температуре до исчезновения пятна исходного феофорбида на пластине ТСХ. Затем содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 50 мл) для удаления непрореагировавшего амина. Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Затем содержимое колбы было растворено в CHCl₃/MeOH 3:1 (5-7 мл) и к нему добавлен Zn(OAc)₂·H₂O (5 эквив.). Содержимое перемешивалось до исчезновения темного пятна феофорбида на пластине ТСХ с образованием темно-зеленого пятна соответствующего цинкового комплекса 124, 132, 138 или 165. Затем растворитель был удален при пониженном давлении. Остаток был растворен в CHCl₃ (100 мл), промыт H₂O (3 × 50 мл), высушен (Na₂SO₄) и заново сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 124.



Использовано 0.180 г (0.29 ммоль) феофорбида **122** и 0.640 г (7.34 ммоль) *N*,*N*'-диметилэтилендиамина **123**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 95:5 до 85:15. Выделено 0.205 г (92%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.51 (s, 2H), 8.96 (br.s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.34 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.22 (dd, *J* = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 19.1 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), 4.42 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.20

(d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.91- 3.75 (m, 6H), 3.69 (br.s, 4H), 3.37 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.26-3.16 (m, 3H), 3.05 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 2.73 (br.s, 6H), 2.47-2.38 (m, 1H), 2.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 1.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.61 (d, *J* = 7.0 Hz).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.24, 171.72, 170.35, 165.14, 162.77, 151.66, 147.96, 146.14, 144.07, 143.10, 141.20, 140.74, 138.58, 137.23, 133.04, 132.29, 130.66, 119.20, 101.79, 101.75, 99.87, 93.16, 81.19, 72.81, 52.24, 51.65, 46.26, 43.88, 37.46, 32.02, 29.99, 27.78, 22.80, 18.87, 17.89, 12.30, 11.76, 10.93.

MC (MALDI): Для C₄₂H₄₉N₇O₄Zn рассчитано m/z 779.3; найдено m/z 779.0 [M]+.

Соединение 132.



Использовано 0.200 г (0.33 ммоль) метилфеофорбида-*а* **104** и 0.807 г (9.17 ммоль) *N*,*N*'-диметилэтилендиамина **123**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 98:2 до 90:10. Выделено 0.180 г (72%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.53 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.71 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.23 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 19.1 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 19.1 Hz, 1H), 4.43 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.27-3.16 (m, 1H), 2.67 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.61-2.54 (m, 1H), 2.33 (s, 6H), 2.12 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.68 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.60 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.34, 173.28, 169.91, 164.97, 162.11, 151.62, 148.15, 146.06, 144.00, 143.15, 141.40, 140.73, 138.56, 137.23, 134.06, 133.05, 132.24, 130.69, 119.20, 101.99, 101.75, 99.95, 93.04, 58.11, 51.98, 51.59, 51.26, 46.11, 45.36, 37.68, 37.35, 30.01, 29.19, 22.84, 18.90, 17.92, 12.31, 11.68, 10.95.

МС (MALDI): Для С₄₀Н₄₈N₆O₅Zn рассчитано m/z 756.3; найдено m/z 755.9 [M]+.

Соединение 138



Использовано 0.150 г (0.25 ммоль) метилфеофорбида-*а* **104** и 0.550 г (10 ммоль) пропаргиламина **121**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 98:2. Выделено 0.160 г (89%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.51 (br.s, 2H), 9.26 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.38 – 4.23 (m, 3H), 3.81 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.28 (s, 1H), 2.11 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 1.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.59 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.32, 173.28, 169.93, 165.14, 162.07, 151.73, 147.87, 146.20, 144.12, 143.10, 141.21, 140.82, 138.92, 137.29, 133.07, 133.01, 132.34, 130.65, 119.25, 101.98, 101.87, 99.91, 93.04, 81.24, 72.99, 51.96, 51.67, 51.25, 46.10, 37.30, 29.96, 29.19, 28.84, 22.81, 18.88, 17.91, 12.30, 11.59, 10.94.

МС (MALDI): Для С₃₉Н₄₁N₅O₅Zn рассчитано m/z 723.2; найдено m/z 723.1 [M]+.

Соединение 165.



Использовано 0.208 г (0.33 ммоль) феофорбида **122** и 1.015 г (6.86 ммоль) 2,2'-(этилендиокси)бис(этиламина) **164**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 80:20. Выделено 0.238 г (72%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.52 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.65 (s, 2H), 8.32 (s, 2H), 8.22 (dd, J = 17.7, 11.6 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 5.39 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.42 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.18 (s, 1H), 4.03 – 3.44 (m, 24H), 2.09 (s, 4H), 1.73 – 1.53 (m, 6H).

¹³**С-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 183.55, 173.24, 172.88, 171.69, 169.99, 164.99, 162.75, 151.52, 148.16, 145.96, 143.94, 143.11, 141.37, 140.62, 138.60, 137.13, 133.84, 132.98, 132.15, 119.11, 101.93, 99.98, 81.17, 72.79, 69.67, 69.60, 68.94, 59.55, 51.57, 46.27, 32.07, 30.68, 30.04, 27.77, 22.83, 18.87, 17.88, 14.67, 12.29, 11.61, 10.92. **МС (MALDI):** Для С₄₄H₅₃N₇O₆Zn рассчитано m/z 839.3; найдено m/z 838.8 [M]+.

Методика проведения реакции СиААС

(Синтез соединений 125, 135, 139, 147, 159-161, 169, 190)

В первую круглодонную колбу с магнитной мешалкой был помещен соответствующий алкин 124, 138, 146, 167 или 168 (1 эквив.) вместе с соответствующим азидом 118, 119, 154, 155, 157 или 158 (1-1,5 эквив.). После чего к исходным соединениям был добавлен растворитель *t*-BuOH/CHCl₃ 2:1 (6 мл); для синтеза углеводсодержащих хлоринов 159-161 использован DMF (4 мл). Содержимое первой колбы было оставлено перемешиваться при комнатной температуре. В это время во вторую круглодонную колбу с магнитной мешалкой были внесена каталитическая система, состоящая из CuSO₄·5H₂O (0,2 эквив.), AscNa (0,4 эквив.) и лиганда ТВТА 126 (0,2 эквив.). Затем к катализаторам была добавлена H₂O (4 мл) и они были оставлены перемешиваться в течении 5 минут. После этого содержимое второй колбы было перенесено в первую и оставлено перемешиваться при 50 °С до исчезновения исходного алкина (~1-1.5 ч.) на пластине ТСХ. Затем содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 50 мл) для удаления неорганических солей. Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 125.



Использовано 0.060 г (0.08 ммоль) алкина **124** и 0.045 г (0.09 ммоль) азида **118**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 95:5 до 80:20. Выделено 0.068 г (72%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.81 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 9.16 (br.s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.51 (br.s, 1H), 8.20 (dd, J = 17.8, 11.7 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.80 (br.s, 1H)

1H), 7.61 (d, J = 9.9 Hz, 7.55-7.26 (m, 3H), 6.20 (d, J = 18.2 Hz, 1H), 5.99 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 5.23 (br.s, 2H), 4.53 (br.s, 2H), 4.44-4.33 (m, 2H), 4.26 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.18-4.09 (m, 1H), 4.07-4.01 (m, 1H), 4.00-3.88 (m, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.83-3.73 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.56-3.48 (m, 2H), 3.25-3.16 (m, 4H), 2.98 (s, 6H), 2.44-2.26 (m, 4H), 2.07 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 1.65 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.45 (d, J = 6.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.52, 171.94, 170.28, 165.09, 162.46, 157.82, 156.65, 155.32, 153.18, 152.15, 151.63, 148.70, 148.03, 146.21, 145.13, 144.15, 143.13, 141.18, 140.84, 139.00, 137.20, 133.37, 133.03, 132.39, 130.59, 129.59, 127.46, 125.97, 125.85, 122.73, 119.39, 119.22, 119.16, 117.89, 117.81, 113.79, 108.03, 102.31, 101.99, 101.96, 99.95, 93.19, 65.21, 57.70, 56.14, 52.80, 52.17, 51.62, 46.27, 46.10, 43.90, 37.19, 34.06, 32.08, 29.56, 22.71, 18.86, 17.85, 12.28, 11.82, 10.92.

MC (MALDI): Для C₆₀H₆₅BrFN₁₃O₆Zn рассчитано m/z 1226.4; найдено m/z 1226.6 [M+H]+.

Соединение 135.



Использовано 0.070 г (0.09 ммоль) алкина **124** и 0.061 г (0.11 ммоль) азида **119**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 80:20. Выделено 0.092 г (79%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.53 (s, 1H), 9.50 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.37 – 8.27 (m, 1H), 8.21 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.64 (dd, J = 9.9, 1.9 Hz, 1H), 7.52 – 7.37 (m, 2H), 6.90 (s, 1H), 6.20 (dd, J = 17.8, 1.8 Hz, 1H), 5.98 (dd, J = 11.5, 1.7 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.45 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.39 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.16 – 4.11 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 – 3.68 (m, 7H), 3.65 (s, 3H), 3.50 (br.s, 5H), 2.71 (br.s, 2H), 2.36 (s, 6H), 2.13 – 1.98 (m, 2H), 1.66 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.56 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.31, 171.82, 170.01, 165.02, 162.76, 158.01, 156.81, 155.52, 153.46, 152.76, 151.51, 151.10, 148.86, 148.22, 146.56, 145.98, 144.70, 143.90, 143.12, 141.40, 140.62, 138.52, 137.14, 134.10, 133.97, 133.00, 132.14, 130.66, 129.53, 127.49, 126.35, 123.08, 119.41, 119.14, 107.41, 101.91, 93.23, 79.18, 69.74, 69.52, 68.75, 68.54, 68.03, 58.07, 56.03, 51.54, 49.26, 46.52, 45.24, 42.84, 38.89, 37.56, 34.16, 32.30, 25.23, 22.76, 18.82, 17.96, 12.33, 11.60, 10.85.

MC (MALDI): Для C₆₃H₇₁BrFN₁₃O₈Zn рассчитано m/z 1302.4; найдено m/z 1302.9 [M+H]+.

Соединение 139.



Использовано 0.085 г (0.12 ммоль) алкина **138** и 0.073 г (0.14 ммоль) азида **119**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.115 г (79%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.51 (br.s, 2H), 9.46 (s, 1H), 9.34 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.21 (dd, J = 17.9, 11.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.51 – 7.30 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.30 – 6.16 (m, 2H), 6.00 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.09 (d, J = 19.9 Hz, 1H), 4.88 – 4.77 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.67 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 4.42 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.95 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.90 – 3.75 (m, 7H), 3.70 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.04 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 1.64 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.56 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.27, 173.19, 170.05, 165.07, 161.96, 157.82, 156.68, 155.32, 153.39, 152.33, 151.74, 148.78, 148.03, 146.21, 145.65, 145.02, 144.07, 143.13, 141.25, 140.78, 138.91, 137.32, 133.43, 133.11, 132.33, 130.62, 129.54, 128.73, 127.72, 127.50, 125.98, 123.66, 119.42, 119.27, 119.19, 117.79, 117.70, 108.18, 106.57, 102.05, 101.87, 101.77, 99.97, 93.04, 70.02, 69.87, 69.11, 68.73, 68.17, 55.98, 52.01, 51.60, 51.22, 49.57, 29.88, 22.73, 18.84, 17.82, 12.30, 11.63, 10.91.

MC (MALDI): Для C₆₀H₆₃BrFN₁₁O₉Zn рассчитано m/z 1245.3; найдено m/z 1245.3 [M]+.

Соединение 147.



Использовано 0.055 г (0.08 ммоль) алкина **146** и 0.047 г (0.09 ммоль) азида **119**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.074 г (72%) в виде светлозеленого порошка.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 9.70 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 9.55 – 9.42 (m, 2H), 8.95 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 8.27 - 8.13 (m, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.63 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.44 (dt, J = 17.0, 8.5 Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 6.24 (d, J = 17.7 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 5.35 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 16.5 Hz, 1H), 4.87 – 4.58 (m, 6H), 4.41 (d, J = 9.6Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.93 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.84 – 3.74 (m, 5H), 3.69 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 2.65 (dt, J = 15.6, 7.7 Hz, 1H), 2.36 – 2.26 (m, 1H), 1.67 – 1.53 (m, 6H).

¹³C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆): δ 173.03, 172.42, 168.54, 156.77, 156.50, 155.31, 153.97, 153.50, 152.83, 148.88, 146.82, 144.63, 143.27, 140.25, 139.85, 138.80, 137.96, 137.06, 135.58, 135.42, 133.51, 132.88, 132.81, 132.21, 129.68, 129.41, 127.43, 127.40, 126.41, 126.29, 123.57, 120.69, 119.37, 119.14, 117.48, 117.39, 108.63, 107.70, 103.86, 103.35, 101.89, 95.37, 79.17, 69.87, 69.68, 69.00, 68.66, 68.04, 55.99, 51.84, 51.68, 51.33, 49.47, 45.95, 36.96, 35.26, 30.02, 28.27, 22.18, 18.72, 17.50, 12.23, 11.61, 10.86. **МС (MALDI):** Для C₆₀H₆₃BrFN₁₁O₉Pd рассчитано m/z 1286.3; найдено m/z 1286.1 [M]+.

Соединение 159.



Использовано 0.070 г (0.09 ммоль) алкина 124 и 0.020 г (0.11 ммоль) азида 154. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 80:20 до 50:50. Выделено 0.073 г (83%) в виде темнозеленого порошка.

¹H-**ЯМР (400 МГц, CD₃OD):** δ 9.58 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.13 (dd, J =17.8, 11.5 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 6.19 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 5.49 -5.38 (m, 2H), 5.20 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.39 - 4.26 (m, 3H), 4.02 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.93 - 3.80 (m, 4H), 3.76 (s, 3H), 3.70 - 3.66 (m, 1H), 3.65 - 3.55(m, 6H), 3.41 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.35 – 3.33 (m, 3H), 2.64 (s, 2H), 2.50 – 2.38 (m, 1H), 2.12 - 2.02 (m, 1H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.74 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.67 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C-ЯМР (101 МГц, CD₃OD): δ 176.50, 175.55, 167.13, 163.40, 154.23, 153.36, 148.77, 146.64, 146.35, 145.03, 142.77, 142.68, 140.32, 139.55, 134.42, 134.08, 131.86, 122.86, 119.85, 103.68, 102.79, 101.31, 94.15, 90.13, 79.80, 75.23, 71.31, 70.26, 62.27, 54.02, 52.79, 45.54, 35.57, 33.55, 31.65, 23.47, 20.28, 18.18, 12.39, 12.01, 11.14.

Соединение 160.



Использовано 0.050 г (0.06 ммоль) алкина **124** и 0.020 г (0.08 ммоль) азида **155**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 80:20 до 50:50. Выделено 0.043 г (69%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, CD₃OD):** δ 9.58 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.13 (dd, J = 17.9, 11.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 6.18 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 5.51 – 5.38 (m, 2H), 5.20 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 4.45 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 4.36 – 4.28 (m, 3H), 3.84 (q, J = 7.7 Hz, 3H), 3.80 – 3.72 (m, 6H), 3.62 – 3.55 (m, 2H), 3.49 – 3.42 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.35 (s, 1H), 3.34 (s, 2H), 2.71 (s, 2H), 2.50 – 2.38 (m, 1H), 2.32 (s, 6H), 2.29 – 2.19 (m, 1H), 2.12 – 2.02 (m, 1H), 1.96 – 1.85 (m, 1H), 1.74 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.67 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CD₃OD):** δ 176.49, 175.54, 167.13, 163.44, 154.23, 146.65, 146.16, 145.04, 142.77, 142.69, 140.33, 139.55, 134.43, 134.08, 133.21, 131.86, 123.34, 119.86, 103.69, 102.80, 101.32, 94.16, 89.48, 81.02, 78.40, 73.90, 70.81, 62.30, 58.99, 54.00, 52.78, 45.49, 35.51, 33.51, 31.63, 23.49, 20.27, 18.18, 12.40, 12.02, 11.15.

МС (MALDI): Для C₄₈H₆₀N₁₀O₉Zn рассчитано m/z 983.4; найдено m/z 983.4 [M]+.

Соединение 161.



Использовано 0.050 г (0.06 ммоль) алкина **124** и 0.026 г (0.07 ммоль) азида **158**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 80:20 до 50:50. Выделено 0.048 г (65%) в виде темнозеленого порошка. ¹**H-ЯМР (400 МГц, CD₃OD):** δ 9.61 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.14 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 6.21 (d, J = 19.5 Hz, 1H), 6.04 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.54 – 5.39 (m, 2H), 5.30 – 5.16 (m, 2H), 4.48 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.39 – 4.25 (m, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 1H), 3.95 – 3.56 (m, 21H), 3.53 – 3.35 (m, 14H), 2.96 (s, 6H), 2.56 – 2.46 (m, 1H), 2.32 – 2.22 (m, 1H), 2.17 – 2.02 (m, 1H), 1.98 – 1.87 (m, 1H), 1.76 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.70 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CD₃OD):** δ 176.49, 175.54, 174.77, 167.29, 163.45, 154.38, 148.99, 146.82, 146.18, 145.04, 142.83, 142.59, 140.44, 139.65, 134.50, 134.23, 132.53, 131.81, 123.30, 119.96, 103.85, 102.90, 102.73, 101.32, 94.21, 89.26, 80.27, 79.47, 78.13, 75.04, 74.85, 74.14, 73.47, 71.48, 62.72, 61.71, 59.00, 53.93, 52.85, 44.95, 39.61, 38.13, 35.51, 33.45, 32.76, 31.54, 23.50, 20.28, 18.18, 14.43, 12.40, 12.10, 11.15.

МС (MALDI): Для C₅₄H₇₀N₁₀O₁₄Zn рассчитано m/z 1146.4; найдено m/z 1145.8 [M]+.

Соединение 169.



Использовано 0.065 г (0.05 ммоль) алкина **168** и 0.022 г (0.06 ммоль) азида **158**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 80:20 до 60:40. Выделено 0.072 г (88%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-***H***P** (400 MΓ**u**, **DMSO-d**₆): δ 9.92 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.38 – 8.30 (m, 1H), 8.29 – 8.15 (m, 2H), 8.11 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.66 (dd, J = 9.9, 1.9 Hz, 1H), 7.55 – 7.42 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.21 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.99 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.72 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.68 – 5.39 (m, 6H), 5.15 – 5.00 (m, 2H), 4.97 – 4.90 (m, 3H), 4.58 – 4.50 (m, 3H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.36 – 4.18 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.85 – 3.43 (m, 31H), 3.12 – 3.02 (m, 2H), 2.86 (t, J =6.9 Hz, 2H), 2.55 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.66 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.59 (d, J = 7.0 Hz, 3H). ¹³**C-***M***P** (101 MΓ**u**, **DMSO-d**₆): δ 173.33, 171.92, 170.53, 170.47, 170.11, 165.08, 162.75, 157.35, 155.50, 153.18, 151.54, 150.21, 148.16, 145.98, 145.18, 145.12, 144.84, 143.91, 143.12, 141.41, 140.64, 138.66, 137.14, 133.91, 132.98, 132.17, 130.70, 129.67, 127.55, 125.99, 121.86, 120.58, 119.50, 119.23, 118.06, 113.15, 103.77, 101.95, 101.62, 100.91, 100.80, 99.89, 93.10, 89.89, 87.06, 79.11, 77.92, 77.31, 76.65, 76.25, 73.53, 73.22, 72.88, 72.41, 71.52, 69.85, 69.74, 69.66, 69.22, 68.96, 60.74, 60.23, 56.67, 52.39, 51.62, 46.40, 34.07, 32.12, 29.84, 28.96, 22.86, 18.88, 17.89, 12.32, 11.64, 10.93. **МС (ESI HRMS):** Для С₇₅H₈₇BrFN₁₃O₂₀Zn рассчитано m/z 1674.4540; найдено m/z 1674.4541 [M+Na]+.

Соединение 190.



Использовано 0.050 г (0.05 ммоль) алкина 167 и 0.050 г (0.075 ммоль) азида 157. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 95:5 до 70:30. Выделено 0.062 г (78%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 12.06 (br.s, 1H), 9.51 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.82 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.36 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.22 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.94 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.26 – 6.17 (m, 2H), 6.00 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.62 – 5.39 (m, 3H), 5.32 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.08 (d, J = 20.5 Hz, 1H), 5.00 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.90 (dd, J = 10.6, 3.9 Hz, 1H), 4.48 – 3.94 (m, 12H), 3.88 – 3.59 (m, 13H), 3.48 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.46 – 2.29 (m, 5H), 2.04 – 1.89 (m, 19H), 1.71 – 1.64 (m, 6H), 1.59 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³**C-9MP** (101 MΓ_μ, DMSO-d₆): δ 173.84, 173.31, 171.93, 171.08, 170.06, 169.97, 169.83, 169.67, 169.50, 169.16, 168.63, 165.03, 162.74, 151.52, 148.16, 145.97, 145.53, 143.91, 143.13, 141.40, 140.64, 138.66, 137.13, 133.93, 133.00, 132.16, 130.70, 128.74, 127.70, 121.83, 119.12, 101.96, 99.88, 95.72, 93.07, 83.30, 79.18, 74.43, 73.78, 73.34, 70.54, 69.72, 69.66, 69.39, 69.22, 68.96, 68.14, 67.67, 62.83, 61.36, 52.39, 51.58, 46.44, 40.15, 39.94, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89, 38.64, 33.97, 32.14, 29.95, 29.14, 22.83, 20.49, 20.42, 20.35, 20.31, 20.27, 19.90, 18.95, 17.90, 12.31, 11.64, 10.93.

МС (MALDI): Для С₇₄Н₉₂N₁₀O₂₆Zn рассчитано m/z 1600.6; найдено m/z 1600.8 [M]+.

Методика проведения реакции двойного диметиламинометиллирования перифирической двойной связи у хлориновых производных

(Синтез соединений 129, 133, 136, 140, 148)

В круглодонную колбу с магнитной мешалкой, содержащей растворенную в AcOH/THF (8-10 мл) навеску хлоринового производного **125**, **132**, **135**, **139** или **147** (1 эквив.), был добавлен избыток бис(диметиламино)метана **128** (~80-100 эквив.) и

смесь была оставлена перемешиваться на 1 ч. Затем содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой 2% NaOH (3 × 100 мл) и H₂O (1 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 129.



Использовано 0.070 г (0.06 ммоль) хлоринового производного **125** и 0.524 г (5.14 ммоль) бис(диметиламино)метана **128**. Элюент для KX: CHCl₃/MeOH-Et₃N 97:2:1 до 95:5:1. Выделено 0.048 г (63%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.61 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 9.43 (br.s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.57 (br.s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.61-7.50 (m, 3H), 7.43-7.24 (m, 2H), 7.23-7.10 (m, 1H), 5.26 (br.s, 2H), 4.59-4.51 (m, 2H), 4.51-4.41 (m, 2H), 4.34 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.27-4.19 (m, 1H), 4.16-4.11 (m, 2H), 4.05-3.89 (m, 3H), 3.82 (br.s, 8H), 3.64 (br.s, 5H), 3.61-3.49 (m, 3H), 3.26-3.13 (m, 4H), 2.71-2.66 (m, 3H), 2.35 (br.s, 10H), 2.22-2.13 (m, 10H), 2.11-1.99 (m, 3H), 1.66 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 179.04, 176.43, 175.30, 174.12, 166.97, 163.45, 159.21, 158.25, 156.70, 155.14, 153.61, 152.90, 150.88, 149.13, 148.65, 146.57, 145.76, 145.58, 145.30, 142.98, 142.78, 140.96, 139.51, 136.20, 134.63, 133.32, 130.09, 128.29, 126.38, 124.64, 120.41, 120.17, 119.65, 109.34, 103.96, 103.01, 102.16, 102.02, 94.19, 66.10, 58.99, 57.43, 56.70, 53.87, 52.69, 48.16, 47.67, 45.35, 44.24, 39.18, 38.71, 35.35, 33.49, 30.68, 23.43, 23.32, 20.29, 18.15, 14.20, 13.20, 12.13, 11.37, 11.21.

MC (MALDI): Для C₆₆H₇₉BrFN₁₅O₆Zn рассчитано m/z 1343.5; найдено m/z 1343.9 [M+H]+.

Соединение 133.



Использовано 0.050 г (0.07 ммоль) хлоринового производного **132** и 0.250 г (2.45 ммоль) бис(диметиламино)метана **128**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH-Et₃N 98:1:1 до 96:3:1. Выделено 0.044 г (76%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-***A***MP** (400 MГ**u**, **DMSO-d**₆): δ 9.63 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 8.71 (br.s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.21-7.12 (m, 1H), 5.44 (d, *J* = 18.6 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 19.1 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.67 (br.s, 5H), 3.55 (br.s, 5H), 2.76-2.70 (m, 1H), 2.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.62-2.53 (m, 1H), 2.32 (br.s, 9H), 2.16 (br.s, 11H), 1.68 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.59 (br.s, 3H).

¹³**С-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.33, 173.27, 170.02, 164.97, 162.09, 151.14, 148.12, 145.70, 143.17, 142.88, 142.82, 141.37, 140.71, 138.59, 138.49, 134.10, 133.55, 133.39, 132.81, 102.01, 101.76, 100.50, 92.97, 69.55, 58.14, 55.50, 51.98, 51.59, 51.27, 46.11, 45.40, 45.17, 37.73, 37.34, 30.09, 29.16, 22.82, 18.90, 17.91, 11.67, 11.29, 10.89. **МС (MALDI):** Для C₄₆H₆₂N₈O₅Zn рассчитано m/z 872.4; найдено m/z 872.9 [M]+.

Соединение 136.



Использовано 0.040 г (0.03 ммоль) хлоринового производного **135** и 0.251 г (2.45 ммоль) бис(диметиламино)метана **128**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH-Et₃N 98:1:1 до 94:5:1. Выделено 0.028 г (65%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.61 (s, 1H), 9.50 (br.s, 2H), 8.70 (t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.32 (s, 2H), 8.02 (d, *J* = 27.3 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.54 – 7.40 (m, 2H), 7.26 – 7.11 (m, 1H), 6.90 (d, *J* = 24.1 Hz, 1H), 5.45

(d, J = 14.9 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 4.53 – 4.33 (m, 3H), 4.32 – 4.09 (m, 6H), 3.88 (s, 3H), 3.85 – 3.45 (m, 20H), 2.79 – 2.70 (m, 1H), 2.66 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.47 – 2.36 (m, 3H), 2.32 (s, 6H), 2.26 – 2.14 (m, 10H), 2.10 – 2.00 (m, 3H), 1.67 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.58 – 1.51 (m, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.30, 171.80, 169.99, 169.87, 165.02, 162.71, 157.87, 156.80, 155.37, 153.47, 152.74, 151.03, 148.87, 148.21, 146.50, 145.61, 144.72, 143.13, 142.78, 141.38, 140.60, 138.55, 134.06, 133.54, 132.75, 129.52, 127.48, 126.29, 123.08, 119.41, 119.18, 117.51, 109.65, 108.57, 107.44, 101.90, 101.50, 100.47, 92.99, 79.17, 69.74, 69.53, 68.76, 68.54, 68.01, 58.13, 56.01, 55.49, 52.44, 52.35, 51.53, 49.26, 46.38, 45.37, 45.18, 37.71, 37.30, 34.99, 34.11, 32.25, 22.73, 21.07, 18.86, 17.86, 11.64, 11.26, 10.86.

MC (MALDI): Для C₆₉H₈₅BrFN₁₅O₈Zn рассчитано m/z 1417.5; найдено m/z 1417.3 [M+H]+.

Соединение 140.



Использовано 0.050 г (0.04 ммоль) хлоринового производного **139** и 0.327 г (3.21 ммоль) бис(диметиламино)метана **128**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 90:10. Выделено 0.032 г (59%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.71 – 9.41 (m, 4H), 9.34 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.71 – 7.54 (m, 2H), 7.45 – 7.29 (m, 2H), 7.27 – 7.07 (m, 2H), 5.40 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 5.09 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 4.86 – 4.58 (m, 3H), 4.46 – 4.35 (m, 1H), 4.28 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.02 – 3.47 (m, 28H), 2.82 – 2.66 (m, 2H), 2.30 – 2.12 (m, 12H), 2.12 – 1.97 (m, 3H), 1.85 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.58 (m, 6H), 1.60 – 1.44 (m, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.26, 173.18, 170.00, 165.08, 161.94, 157.83, 156.67, 155.33, 153.38, 152.42, 151.24, 148.76, 148.00, 145.86, 145.01, 143.15, 142.90, 141.25, 140.77, 138.94, 138.56, 133.73, 133.44, 132.86, 129.52, 127.47, 125.97, 123.73, 121.75, 119.42, 119.10, 117.76, 108.24, 106.53, 102.06, 101.69, 100.43, 70.02, 69.87, 69.11, 68.74, 68.15, 55.99, 55.43, 51.99, 51.61, 51.22, 49.57, 46.11, 45.06, 42.40, 42.21, 37.34, 35.31, 29.89, 29.04, 22.72, 21.09, 18.84, 17.83, 11.62, 11.29, 10.87.

MC (MALDI): Для C₆₆H₇₇BrFN₁₃O₉Zn рассчитано m/z 1363.4; найдено m/z 1363.0 [M+H]+.

Соединение 148.



Использовано 0.065 г (0.052 ммоль) хлоринового производного **139** и 0.443 г (4.34 ммоль) бис(диметиламино)метана **128**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 90:10. Выделено 0.045 г (63%) в виде светло-зеленого порошка.

¹H-*SIMP* (400 MΓu, DMSO-d₆): δ 9.82 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.53 – 9.44 (m, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.61 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 7.49 – 7.35 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.17 – 7.07 (m, 2H), 5.34 (d, J = 19.6 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 20.6 Hz, 1H), 4.88 – 4.51 (m, 5H), 4.39 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.91 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.80 (br.s, 5H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (s, 4H), 3.53 (s, 3H), 2.74 – 2.56 (m, 3H), 2.47 – 2.11 (m, 11H), 1.99 – 1.88 (m, 1H), 1.62 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.58 – 1.51 (m, 4H). ¹³C-*SIMP* (101 MΓu, DMSO-d₆): δ 173.04, 172.41, 169.99, 168.56, 157.83, 156.83,

156.56, 155.43, 154.06, 153.54, 152.87, 148.91, 146.85, 144.61, 140.31, 138.93, 137.57, 137.28, 135.69, 133.81, 133.44, 133.04, 132.98, 132.67, 129.48, 127.45, 126.31, 123.57, 119.39, 119.16, 117.53, 108.68, 107.74, 103.88, 103.46, 101.97, 95.48, 69.88, 69.68, 69.01, 68.66, 68.07, 56.04, 51.87, 51.63, 51.35, 49.47, 48.84, 45.93, 36.97, 35.25, 30.02, 28.35, 28.15, 22.18, 20.98, 18.74, 17.53, 11.61, 11.32, 10.90.

MC (MALDI): Для C₆₆H₇₇BrFN₁₃O₉Pd рассчитано m/z 1404.4; найдено m/z 1404.1 [M+H]+.

Методика проведения реакции кватернизации диметиламинометиллированных конъюгатов

(Синтез соединений 131, 134, 137, 141, 143, 145, 149, 162, 163)

В круглодонную колбу с магнитной мешалкой и растворенной в THF (~5 мл) навеской хлорина **129**, **133**, **136**, **140**, **142**, **144** или **149** (1 эквив.) был прибавлен избыток CH₃I (~60-100 эквив.). После чего содержимое оставлено перемешиваться в течение 15 минут. Образующийся в ходе реакции осадок был собран на фильтре Шотта и промыт небольшим количеством THF. Полученный осадок продукта был высушен при пониженном давлении. Для углеводсодержащих конъюгатов **159** и **160** (1 эквив.) в качестве кватернизирующего агента был использован C₂H₅Br (~200-300 эквив.), а в качестве растворителя CHCl₃/MeOH 2:3 (~5 мл); время перемешивания – 48 ч. По окончанию реакции (TCX контроль) реагент и растворители были удалены при пониженном давлении.

Соединение 131.



Использовано 0.025 г (0.02 ммоль) конъюгата **129** и 0.228 г (1.60 ммоль) CH₃I. Выделено 0.032 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.59 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 9.50 (br.s, 2H), 9.19 (s, 1H), 8.57 (br.s, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.68-7.51 (m, 2H), 7.45-7.32 (m, 2H), 7.23-7.05 (m, 1H), 5.23 (br.s, 2H), 4.55 (br.s, 2H), 4.48-4.34 (m, 2H), 4.32-4.19 (m, 2H), 4.12 (br.s, 2H), 4.04-3.89 (m, 3H), 3.86-3.78 (m, 11H), 3.69 (s, 5H), 3.10 (br.s, 12H), 2.89 (s, 9H), 2.73 (s, 9H), 2.45-2.29 (m, 3H), 2.18 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 2.13-1.94 (m, 3H), 1.65 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.43 (d, J = 5.8 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.42, 171.93, 169.85, 162.71, 157.86, 156.92, 156.70, 155.36, 153.21, 148.76, 147.87, 146.10, 145.09, 143.33, 141.15, 140.98, 133.18, 132.82, 129.59, 127.50, 122.78, 119.41, 119.19, 117.85, 102.06, 99.55, 93.27, 65.24, 63.65, 56.16, 54.91, 52.78, 52.38, 51.77, 46.28, 37.30, 34.04, 32.10, 31.28, 30.39, 29.51, 29.00, 27.88, 22.70, 21.05, 18.85, 17.88, 13.96, 11.91, 11.06.

Соединение 134.



Использовано 0.030 г (0.03 ммоль) хлорина **133** и 0.228 г (1.60 ммоль) CH₃I. Выделено 0.036 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.62 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 9.56 (s, 1H), 9.19 (br.s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.23-7.10 (m, 1H), 5.37 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 19.1 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.03-3.77 (m, 6H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.16 (br.s, 9H), 2.86 (br.s, 1H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.22 (d, J = 14.7 Hz, 2H), 2.17-2.08 (m, 2H), 1.71-1.65 (m, 3H), 1.60 (br.s, 3H).
¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.30, 173.23, 170.71, 165.32, 162.21, 151.07, 147.77, 146.11, 143.33, 142.61, 142.47, 141.14, 141.02, 138.87, 137.15, 134.05, 133.24, 132.82, 102.08, 101.89, 97.17, 93.18, 75.19, 68.76, 68.28, 65.71, 63.64, 62.72, 52.80, 52.42, 51.84, 51.30, 37.53, 34.00, 29.94, 29.14, 22.76, 18.86, 17.92, 11.88, 11.45, 11.07.

Соединение 137.



Использовано 0.040 г (0.03 ммоль) конъюгата **136** и 0.400 г (2.82 ммоль) CH₃I. Выделено 0.053 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.63 – 9.49 (m, 3H), 9.18 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.41 – 8.27 (m, 1H), 8.20 – 7.95 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.45 (br.s, 3H), 7.28 – 7.04 (m, 1H), 7.01 – 6.84 (m, 1H), 5.38 (d, *J* = 22.8 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 22.3 Hz, 1H), 4.46 (br.s, 2H), 4.33 – 4.11 (m, 5H), 4.00 – 3.46 (m, 30H), 3.13 (s, 9H), 2.85 (br.s, 2H), 2.27 – 1.97 (m, 8H), 1.66 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.56 (br.s, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.31, 171.61, 170.42, 162.65, 156.81, 155.39, 153.67, 153.19, 148.81, 144.66, 143.24, 140.78, 132.79, 129.63, 127.43, 123.34, 119.44, 101.94, 70.06, 69.54, 68.77, 68.50, 68.13, 56.06, 52.63, 52.53, 51.81, 49.44, 22.57, 21.18, 17.88, 11.84, 11.39, 11.02.

Соединение 141.



Использовано 0.030 г (0.02 ммоль) конъюгата **140** и 0.282 г (1.98 ммоль) CH₃I. Выделено 0.036 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.66 – 9.43 (m, 3H), 9.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.70 – 7.56 (m, 1H), 7.48 – 7.29 (m, 3H), 7.15 (dd, *J* = 17.7, 11.3 Hz,

1H), 5.39 (d, J = 21.7 Hz, 1H), 5.09 (d, J = 22.7 Hz, 1H), 4.88 – 4.61 (m, 4H), 4.41 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.25 – 4.07 (m, 2H), 3.95 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.90 – 3.75 (m, 10H), 3.73 – 3.42 (m, 16H), 3.12 (br.s, 18H), 2.21 (d, J = 12.6 Hz, 3H), 2.12 – 1.96 (m, 3H), 1.64 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.56 (d, J = 10.5 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.17, 169.87, 164.95, 162.14, 156.84, 153.64, 152.36, 151.34, 150.97, 148.82, 148.16, 145.92, 144.96, 143.34, 142.32, 141.40, 140.80, 139.10, 137.09, 133.86, 133.60, 133.49, 133.13, 129.53, 127.48, 126.14, 123.65, 119.43, 119.19, 108.40, 101.81, 79.18, 72.75, 69.88, 69.10, 68.71, 68.18, 56.02, 52.38, 51.63, 51.25, 49.56, 48.60, 46.18, 37.33, 35.51, 30.23, 22.79, 22.72, 21.06, 18.91, 17.84, 11.84, 11.02.

Соединение 143.



Использовано 0.040 г (0.03 ммоль) конъюгата **142** и 0.438 г (3.08 ммоль) CH₃I. Выделено 0.048 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.84 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 9.65 (s, J = 9.1 Hz, 1H), 9.50 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.64 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.39 (m, 2H), 7.34 – 7.13 (m, 2H), 5.85 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 5.49 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 5.31 (s, 3H), 4.83 (d, J = 18.2 Hz, 2H), 4.74 – 4.54 (m, 3H), 4.42 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 4.26 (br.s, J = 6.8 Hz, 4H), 4.07 – 3.41 (m, 25H), 3.12 (s, J = 3.8 Hz, 9H), 2.42 (t, J = 8.1 Hz, 3H), 2.32 – 2.21 (m, 4H), 2.26 (d, J = 11.7 Hz, 4H), 2.19 – 2.08 (m, 3H), 1.96 – 1.74 (m, 6H), -1.91 (s, 1H), -2.22 (s, 1H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.29, 173.03, 170.16, 169.30, 167.82, 162.21, 157.73, 157.23, 153.76, 152.87, 152.63, 149.01, 148.76, 147.03, 144.43, 136.23, 135.35, 135.10, 131.49, 129.75, 129.49, 127.52, 123.79, 119.66, 119.20, 117.56, 108.74, 107.75, 103.15, 102.03, 100.98, 97.15, 69.85, 69.65, 68.93, 68.59, 68.18, 68.02, 65.69, 60.03, 56.96, 55.98, 52.65, 52.54, 51.84, 51.40, 49.51, 48.16, 36.82, 35.37, 33.20, 31.56, 30.45, 30.04, 29.40, 28.45, 27.41, 25.42, 25.21, 23.36, 22.95, 22.43, 21.73, 20.98, 18.91, 17.87, 11.55, 11.43, 11.19.

Соединение 145.



Использовано 0.035 г (0.02 ммоль) конъюгата **144** и 0.343 г (2.42 ммоль) CH₃I. Выделено 0.041 г (количественно) в виде светло-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.13 – 9.33 (m, 3H), 8.39 – 8.17 (m, 2H), 7.90 – 6.78 (m, 5H), 5.63 – 5.26 (m, 1H), 4.97 – 4.53 (m, 6H), 4.40 – 4.16 (m, 2H), 4.13 – 3.52 (m, 18H), 2.44 – 2.11 (m, 2H), 2.07 – 1.89 (m, 1H), 1.83 – 1.47 (m, 6H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.03, 168.28, 153.60, 152.95, 150.23, 148.96, 146.73, 144.73, 134.39, 131.39, 129.04, 127.40, 123.66, 119.18, 118.39, 108.72, 107.75, 105.63, 97.16, 82.38, 69.68, 69.01, 68.68, 65.69, 63.06, 57.96, 56.17, 54.28, 52.33, 51.38, 49.49, 40.15, 39.94, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89, 35.31, 33.15, 32.14, 29.20, 27.36, 23.29, 19.98, 18.71, 17.61.

Соединение 149.



Использовано 0.030 г (0.02 ммоль) конъюгата **148** и 0.273 г (1.92 ммоль) CH₃I. Выделено 0.035 г (количественно) в виде светло-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.83 (s, 1H), 9.74 – 9.59 (m, 1H), 9.50 (br.s, 2H), 8.97 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.94 – 7.59 (m, 2H), 7.56 – 7.38 (m, 2H), 7.35 – 7.05 (m, 2H), 5.35 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 17.6 Hz, 2H), 4.91 – 4.52 (m, 6H), 4.50 – 4.18 (m, 3H), 4.07 – 3.45 (m, 24H), 3.24 – 3.01 (m, 9H), 3.01 – 2.78 (m, 2H), 2.76 – 2.56 (m, 2H), 2.40 – 2.13 (m, 3H), 2.06 – 1.89 (m, 2H), 1.73 – 1.51 (m, 6H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 174.25, 173.06, 172.42, 171.06, 169.90, 168.11, 157.14, 156.64, 155.40, 154.30, 153.45, 152.74, 148.95, 144.58, 142.48, 140.28, 139.04, 137.73, 136.62, 135.77, 133.90, 133.08, 132.95, 129.51, 127.49, 123.59, 119.42, 119.15, 108.66, 107.81, 104.00, 103.51, 101.80, 99.60, 95.35, 79.19, 69.89, 69.69, 69.01, 68.67,

67.02, 62.53, 60.40, 56.45, 56.06, 52.41, 51.89, 51.38, 49.49, 45.94, 36.97, 35.25, 30.01, 28.28, 25.13, 22.20, 21.01, 18.74, 17.56, 11.63, 11.55, 11.04.

Соединение 162.



Использовано 0.05 г (0.05 ммоль) конъюгата **159** и 1.66 г (15.21 ммоль) C_2H_5Br . Выделено 0.055 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, CD₃OD):** δ 9.61 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.11 (dd, J = 17.7, 11.9 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.18 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 – 5.09 (m, 2H), 4.52 – 4.41 (m, 1H), 4.41 – 4.25 (m, 3H), 4.05 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.95 – 3.79 (m, 4H), 3.74 – 3.67 (m, 5H), 3.66 – 3.58 (m, 4H), 3.43 – 3.33 (m, 9H), 3.08 – 2.90 (m, 6H), 2.58 – 2.45 (m, 1H), 2.30 – 2.19 (m, 1H), 2.19 – 2.07 (m, 1H), 1.95 – 1.83 (m, 1H), 1.75 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.68 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CD₃OD):** δ 175.52, 167.43, 154.57, 149.15, 146.95, 146.37, 142.45, 140.31, 139.75, 134.39, 131.74, 122.89, 103.98, 102.59, 101.34, 90.12, 79.81, 75.21, 71.33, 70.29, 62.31, 53.90, 52.88, 51.01, 44.49, 35.61, 33.50, 31.49, 23.44, 20.86, 18.20, 14.46, 12.38, 12.19, 11.14, 8.38.

Соединение 163.



Использовано 0.05 г (0.05 ммоль) конъюгата **160** и 1.66 г (15.21 ммоль) C_2H_5Br . Выделено 0.056 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, CD₃OD):** δ 9.60 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.11 (dd, J = 17.2, 12.0 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 6.18 (d, J = 17.7 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 5.43 – 5.10 (m, 2H), 3.90 – 3.69 (m, 10H), 3.64 – 3.57 (m, 3H), 3.52 – 3.45 (m, 3H), 3.44 – 3.33 (m, 9H), 3.12 (s, 6H), 2.57 – 2.46 (m, 1H), 2.31 – 2.19 (m, 1H), 2.19 – 2.08 (m, 1H), 1.95 – 1.83 (m, 1H), 1.75 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.69 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CD₃OD):** δ 175.54, 167.40, 154.50, 149.14, 146.95, 146.20, 145.05, 142.45, 140.31, 134.36, 131.76, 123.34, 103.98, 102.59, 101.32, 89.49, 81.05, 78.41, 73.93, 70.86, 62.31, 53.89, 52.89, 51.16, 44.46, 35.56, 33.48, 30.68, 23.47, 20.27, 18.18, 12.38, 12.18, 11.14, 8.49.

Методика проведения реакции Штеглиха

(Синтез соединений 122 и 168)

В колбу Шленка были помещены карбодиимид EDC·HCl (2 эквив.) и соответствующее производное карбоновой кислоты **120** (1 эквив.) или **167** (1 эквив.). После чего колба была дегазирована и заполнена аргоном с дальнейшим добавлением сухого CHCl₃ (~4-6 мл) для **120** или DMF (~4-6 мл) для **167**. Перемешивали при 0°C на ледяной бане в течение 30 мин. Во вторую колбу Шленка поместили амин **121** (2 эквив.) или производное хиназолинола **117** (2 эквив.) и DMAP (0.5 эквив.). После чего колба была дегазирована и заполнена аргоном с дальнейшим добавлением сухого CHCl₃ (~4-6 мл) для **121** или DMF (~4-6 мл) для **117**. Затем шприцем перенесли содержимое второй колбы в первую, и перемешивали смесь при 0°C в течение 3 ч. при г.t. в течении 15 ч. После чего содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осущителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 122.



Использовано 0.213 г (0.36 ммоль) фефорбида-*а* **120** и 0.040 г (0.73 ммоль) пропаргиламина **121**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 98:2. Выделено 0.188 г (81%) в виде темного порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃):** δ 9.49 (br.s, 2H), 8.63 (s, 1H), 7.98 (dd, J = 17.5, 11.5 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 18.2 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.20 (d, J = 19.9 Hz), 5.36 (br.s, 1H), 4.53 (br.s, 1H), 4.27 (br.s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.78-3.55 (m, 7H), 3.41 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 2.70 (br.s, 1H), 2.46 (br.s, 1H), 2.33-2.15 (m, 2H), 1.94 (s, 1H), 1.83 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.68 (t, J = 7.6 Hz), -1.66 (br.s, 2H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CDCl₃):** δ 189.36, 172.27, 171.76, 169.56, 137.93, 128.86, 104.64, 104.26, 97.59, 79.16, 64.77, 52.97, 51.52, 50.25, 29.69, 28.83, 23.31, 19.55, 17.19, 12.16, 11.26.

МС (MALDI): Для С₃₈Н₃₉N₅O₄ рассчитано m/z 630.3; найдено m/z 630.1 [M+H]+.

Соединение 168.



Использовано 0.095 г (0.1 ммоль) производного карбоновой кислоты 167 и 0.073 г (0.2 ммоль) производного хиназолинола 117. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 96:4. Выделено 0.075 г (58%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.75 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.84 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.32 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 8.09 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.67 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.56 – 7.44 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.22 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 4.41 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.96 – 3.89 (m, 4H), 3.83 (dd, J = 17.1, 5.2 Hz, 7H), 3.75 – 3.69 (m, 3H), 3.67 (s, 6H), 3.52 (t, J = 5.8 Hz, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.05 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.86 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.55 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.13 – 2.00 (m, 2H), 1.66 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.60 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.28, 171.70, 170.49, 170.46, 170.07, 165.00, 162.77, 157.95, 157.31, 155.45, 153.16, 151.52, 150.23, 148.17, 145.97, 145.18, 145.13, 143.91, 143.12, 141.40, 140.64, 138.67, 137.14, 133.93, 132.99, 132.15, 130.69, 129.65, 127.58, 126.01, 125.89, 120.63, 119.53, 119.29, 119.12, 118.10, 118.01, 113.10, 103.47, 101.94, 101.62, 99.90, 93.11, 81.18, 79.17, 72.80, 69.74, 69.65, 69.22, 68.94, 56.56, 52.28, 51.57, 46.23, 37.29, 32.07, 30.03, 29.82, 28.94, 27.78, 22.82, 18.86, 17.88, 12.31, 11.63, 10.92.

MC (MALDI): Для C₆₃H₆₆BrFN₁₀O₁₀Zn рассчитано m/z 1286.3; найдено m/z 1286.8 [M]+.

Методика проведения реакции синтеза активированных карбонатов

(Синтез соединений 199, 206 и 211)

В круглодонную колбу с магнитной мешалкой, содержащей растворенную в DMF (~2-4 мл) навеску производного **189**, **196** или **210** (1 эквив.) был добавлен избыток бис(4-нитрофенил)карбоната **200** (6 эквив.) и DIPEA (6 эквив.); смесь была

оставлена перемешиваться на 2 ч. После чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Соединение 199.



Использовано 0.100 г (0.21 ммоль) производного бензилового спирта **196**. Элюент для КХ: EtOAc/Cy 50:50 до 70:30. Выделено 0.114 г (85%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆):** δ 8.32 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.79 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.47 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 5.20 – 5.07 (m, 2H), 4.76 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 3H), 2.05 – 1.99 (m, 9H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 169.47, 169.28, 168.69, 166.86, 155.20, 151.78, 148.23, 145.22, 140.05, 134.47, 130.32, 125.41, 124.99, 122.60, 117.75, 97.71, 71.07, 70.66, 69.84, 68.65, 68.55, 54.90, 52.63, 20.27, 20.22, 20.18.

Соединение 206.



Использовано 0.200 г (0.37 ммоль) производного спирта **189**. Элюент для КХ: EtOAc. Выделено 0.247 г (94%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.18 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.48 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.24 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.15 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 6.44 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.68 (br.s, 2H), 4.51 (br.s, 2H), 3.96 (s, 3H), 1.48 (s, 4H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** 168.14, 168.10, 159.97, 159.45, 157.06, 155.24, 152.01, 151.21, 149.42, 149.26, 148.94, 146.24, 145.19, 136.43, 135.16, 126.18, 125.41, 122.56, 122.44, 122.36, 122.16, 121.18, 115.78, 115.41, 115.13, 114.91, 108.95, 103.14, 99.43, 67.23, 66.22, 55.77, 31.56, 26.33, 15.38.

MC (ESI-HRMS): Для C₃₆H₂₉FN₄O₁₀ рассчитано m/z 697.19405; найдено m/z 697.19355 [M+H]+.

Соединение 211.



Использовано 0.046 г (0.02 ммоль) производного бензилового спирта **210**. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.044 г (89%) в виде темнозеленого порошка.

¹**H-***S***MP** (400 MΓ**μ**, **DMSO-d**₆): δ 9.51 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.35 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 8.21 (dd, J = 17.9, 11.6 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.98 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.28 – 6.16 (m, 2H), 5.99 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.58 – 5.39 (m, 4H), 5.28 – 5.17 (m, 4H), 5.08 (t, J = 9.8 Hz, 2H), 4.99 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.90 (dd, J = 10.5, 3.9 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.47 – 3.93 (m, 13H), 3.85 – 3.76 (m, 4H), 3.74 – 3.68 (m, 3H), 3.68 – 3.62 (m, 8H), 3.54 – 3.46 (m, 5H), 2.60 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.12 – 1.85 (m, 30H), 1.65 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.58 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

MS (MALDI): Для C₁₀₁H₁₁₈N₁₂O₄₀Zn рассчитано m/z 2203.7; найдено m/z 2203.7 [M]+.

Синтез соединения 142.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой с навеской 0.140 г цинкового металлокомплекса **140** (0.1 ммоль) была добавлена TFA (5 мл). После чего

содержимое колбы перемешивалось в течение 15 минут при комнатной температуре. Удаление цинка из хлоринового ядра было проконтролировано с помощью TCX. Затем содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой 2% NaOH (3 × 100 мл) и H₂O (1 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт использовался без дальнейшей очистки. Выделено 0.115 г (86%) в виде бурого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.05 – 9.49 (m, 5H), 9.11 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.63 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 7.55 – 7.38 (m, 2H), 7.37 – 7.12 (m, 2H), 5.48 (d, J = 21.5 Hz, 1H), 5.29 (d, J = 21.7 Hz, 1H), 4.93 – 4.72 (m, 2H), 4.72 – 4.53 (m, 3H), 4.42 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.95 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.88 – 3.76 (m, 5H), 3.72 - 3.63 (m, 8H), 3.58 - 3.45 (m, 12H), 2.89 - 2.74 (m, 5H), 2.71 - 2.59 (m, 2H), 2.34 - 2.18 (m, 4H), 1.73 - 1.60 (m, 6H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** 173.03, 153.93, 148.98, 144.83, 129.54, 127.83, 123.99, 119.16, 108.63, 102.06, 69.88, 69.80, 69.12, 68.66, 68.24, 56.19, 52.63, 51.84, 51.39, 49.61, 48.18, 42.38, 30.56, 23.10, 17.96, 11.72, 11.37, 11.29

MC (MALDI): Для C₆₆H₇₉BrFN₁₃O₉ рассчитано m/z 1299.5; найдено m/z 1299.0 [M+H]+.

Синтез соединения 144.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой и навеской 0.08 г безметального коньюгата **142** (1 эквив., 0.06 ммоль) была добавлена CH₃COOH (16 мл) и CH₃COONa (0.08 г). После чего в колбу был внесено 0.08 г InCl₃ (6 эквив., 0.36 ммоль) и содержимое колбы перемешивалось при 118°C в течение 3 ч. Внедрение индия в хлориновое ядро было проконтролировано с помощью TCX. Затем содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой 2% NaOH (3×100 мл) и H₂O (1×100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: CHCl₃/MeOH-Et₃N 99:0:1 до 57:40:3. Выделено 0.04 г (56%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.10 – 9.45 (m, 4H), 8.89 (s, 1H), 8.47 – 8.14 (m, 2H), 7.94 – 7.38 (m, 4H), 7.22 (s, 2H), 5.45 (br.s, 2H), 5.01 – 4.40 (m, 7H), 4.26 (s, 3H), 4.08 – 3.57 (m, 17H), 2.21 (s, 6H), 2.06 – 1.77 (m, 2H), 1.69 (br.s, 6H).

¹³С-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆): δ 173.11, 168.88, 167.78, 156.81, 155.20, 153.54, 152.88, 148.91, 146.86, 144.57, 142.14, 134.71, 129.42, 127.45, 126.24, 123.64, 119.40, 119.16, 117.38, 108.69, 107.73, 101.94, 69.90, 69.69, 69.02, 68.69, 68.10, 56.00, 51.81, 51.27, 49.67, 49.49, 45.21, 45.11, 35.30, 29.52, 18.73, 17.57, 12.63, 11.66, 10.98. МС (MALDI): Для С₆₆H₇₇BrClFInN₁₃O₉ рассчитано m/z 1412.4; найдено m/z 1412.9

Синтез соединения 146.

[M-Cl]+.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой, обратным воздушным холодильником и растворенной в MeCN (60 мл) навеской 0.1 г метилфеофорбида-а **104** (1 эквив., 0.16 ммоль) было добавлено 0.059 г Pd(OAc)₂ (1,6 эквив., 0.26 ммоль). После чего содержимое колбы перемешивалось при 85°С в течение 3 ч. Образование палладиевого комплекса метилфеофорбида-а контролировалось с помощью TCX. Затем после концентрирования при пониженном давлении содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Полученный осадок был растворен CHCl₃ (5 мл) и к нему добавлено 0.354 г пропаргил амина **121** (40 эквив., 6.43 ммоль) с дальнейшим перемешиванием в течение 48 ч. После чего содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для КХ: CHCl₃. Выделено 0.063 г (52%) в виде светло-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃):** δ 9.57 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.98 (dd, J = 17.8, 11.5 Hz, 1H), 6.60 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 6.16 (d, J = 17.8 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 5.36 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 4.64 – 4.30 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.74 – 3.57 (m, 5H), 3.41 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.61 – 2.46 (m, 2H), 2.42 – 2.36 (m, 1H), 2.26 – 2.14 (m, 1H), 2.11 – 1.99 (m, 1H), 1.71 – 1.61 (m, 6H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, CDCl₃):** δ 173.80, 173.42, 169.92, 156.18, 153.22, 144.37, 140.79, 139.61, 139.56, 139.41, 138.12, 136.94, 136.34, 133.91, 132.83, 132.66, 130.72, 129.92, 120.77, 104.62, 103.06, 102.42, 95.10, 79.25, 72.52, 52.49, 52.41, 51.81, 47.43, 38.15, 30.85, 30.50, 28.77, 22.49, 19.61, 17.60, 12.46, 12.12, 11.31.

MC (MALDI): Для C₃₉H₄₁N₅O₅Pd рассчитано m/z 764.2; найдено m/z 764.6 [M]+.

Синтез соединения 167.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой было помещено 0.186 г хлорина **165** (1 эквив., 0.20 ммоль). После чего к нему был добавлен растворитель CHCl₃ (8 мл), 0.026 г DIPEA (1 эквив., 0.20 ммоль) и 0.026 г янтарного ангидрида (1,2 эквив., 0.26 ммоль). Содержимое колбы перемешивалось в течение 3 ч. при комнатной температуре, после чего содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: CHCl₃/MeOH 95:5 до 70:30. Выделено 0.184 г (количественно) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.51 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.33 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.42 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.88 – 3.56 (m, 15H), 3.48 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.04 (s, 1H), 2.39 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 2.33 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.07 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 1.67 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.60 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.30, 171.74, 171.15, 170.10, 165.01, 162.77, 151.53, 148.17, 145.98, 143.92, 143.13, 141.40, 140.64, 138.64, 137.15, 133.93, 133.00, 132.17, 130.70, 119.13, 101.94, 101.63, 99.90, 93.12, 81.20, 72.81, 69.73, 69.66, 69.22, 68.95, 52.29, 51.60, 46.26, 37.32, 32.07, 30.05, 29.31, 27.79, 22.84, 18.89, 17.91, 12.32, 11.65, 10.94.

МС (MALDI): Для C₄₈H₅₇N₇O₉Zn рассчитано m/z 939.3; найдено m/z 939.8 [M]+.

Синтез соединения 187.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.100 г производного хинолина **183** (1 эквив., 0.17 ммоль). Затем к нему была добавлена TFA (1 мл) с дальнейшим перемешиванием при 72°C в течение 1.5 ч. После чего содержимое колбы было охлаждено до комнатной температуры и сконцентрировано при пониженном давлении. Остаток в колбе был растворен в MeOH (~3-5 мл) и к нему прибавлялся водный раствор NH₃·H₂O до pH=9 (контроль с помощью индикаторной бумаги). Затем содержимое колбы концентрировалось при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: EtOAc/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.069 г (82%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.21 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.49 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 8.9, 5.1 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 6.47 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 1.48 (s, 4H).

¹³**С-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 168.16, 168.14, 161.63, 159.50, 158.02, 157.69, 157.08, 152.14, 149.71, 149.06, 146.85, 136.74, 135.18, 135.16, 122.46, 122.38, 122.18, 121.64, 121.22, 115.14, 114.92, 114.58, 102.38, 99.70, 62.79, 55.88, 31.61, 15.39. **МС (MALDI):** Для C₄₈H₅₇N₇O₉Zn рассчитано m/z 488.2; найдено m/z 488.1 [M+H]+.

Синтез соединения 188.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.300 г производного хинолинола **187** (1 эквив., 0.62 ммоль) вместе с 0.386 г бромосодержащего линкера **186** (3 эквив., 1.84 ммоль) и 0.255 г K₂CO₃ (3 эквив., 1.84 ммоль). После чего колба была дегазирована и заполнена аргоном с дальнейшим добавлением сухого DMF (10 мл). Реакционная смесь перемешивалась при 60°С в течение 16 ч. После чего растворитель был удален при пониженном давлении и содержимое колбы было разбавлено EtOAc (100 мл) и

перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: EtOAc/MeOH 100:0 до 98:2. Выделено 0.284 г (75%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃):** δ 9.40 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.46 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.47 (dd, J = 9.1, 4.8 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.16 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.06 – 7.02 (m, 2H), 6.44 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 4.40 – 4.34 (m, 2H), 4.17 (dt, J = 11.3, 4.8 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.99 – 3.89 (m, 2H), 3.57 – 3.50 (m, 1H), 1.96 – 1.45 (m, 10H).

¹³**C-ЯМР (126 МГц, CDCl₃):** δ 169.36, 168.88, 160.94, 160.77, 158.96, 152.35, 151.28, 149.97, 148.88, 147.02, 134.86, 133.27, 122.89, 122.82, 122.58, 121.77, 116.33, 116.04, 115.83, 109.10, 103.52, 99.79, 99.14, 68.42, 65.56, 62.39, 56.34, 30.68, 29.40, 27.02, 25.57, 19.48, 17.71.

МС (MALDI): Для С₃₄H₃₄FN₃O₇ рассчитано m/z 616.2; найдено m/z 616.2 [M+H]+.

Синтез соединения 189.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.330 г производного хинолина **188** (1 эквив., 0.54 ммоль). Затем к нему была добавлена TFA (6 мл) с дальнейшим перемешиванием при 72°C в течение 1.5 ч. После чего содержимое колбы было охлаждено до комнатной температуры и сконцентрировано при пониженном давлении. Остаток в колбе был растворен в MeOH (~10-12 мл) и к нему прибавлялся водный раствор NH₃·H₂O до pH=9 (контроль с помощью индикаторной бумаги). Затем содержимое колбы концентрировалось при пониженном давлении. Остаток в колбе был растворен в MeOH (~10-12 мл) и к нему прибавлялся водный раствор NH₃·H₂O до pH=9 (контроль с помощью индикаторной бумаги). Затем содержимое колбы концентрировалось при пониженном давлении. Остаток в колбе был растворен в CHCl₃ (100 мл) и перелит в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Выделено 0.241 г (86%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.18 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.46 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.23 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.15 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 6.43 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.95 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 – 3.78 (m, 2H), 1.48 (s, 4H).

¹³**C-ЯМР (151 МГц, DMSO-d₆):** δ 168.04, 159.93, 159.07, 157.90, 152.08, 149.79, 148.72, 146.59, 136.97, 135.26, 122.43, 122.38, 122.16, 121.18, 115.10, 114.96, 114.91, 108.41, 103.00, 99.16, 70.43, 59.37, 55.64, 31.64, 15.38.

MC (ESI-HRMS): Для C₂₉H₂₆FN₃O₆ рассчитано m/z 532.18784; найдено m/z 532.18747 [M+H]+.

Синтез соединения 197.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.100 г нитропроизводного **196** (1 эквив., 0.21 ммоль). Затем к нему был прибавлена смесь растворителей EtOH/H₂O 1:1 (6 мл), 0.07 г железной стружки (6 эквив., 1.25 ммоль) и 0.078 г формиата аммония (6 эквив., 1.24 ммоль). Содержимое колбы перемешивалось в течение 1.5 ч. при 65°С. После охлаждения до комнатной температуры реакционная смесь была отфильтрована и перелита в делительную воронку с EtOAc (100 мл). Дальнейшей промывка была проведена с помощью H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: EtOAc/Cy 70:30 до 100:0. Выделено 0.061 г (64%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆):** δ 6.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.45 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.48 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 9.8, 8.0 Hz, 1H), 5.05 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.97 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.31 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.65 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 6H).

¹³**C-ЯМР (126 МГц, DMSO-d₆):** δ 169.37, 169.33, 169.15, 167.06, 142.14, 138.27, 115.73, 114.27, 113.30, 99.02, 70.93, 69.02, 62.72, 52.50, 20.40, 20.21, 20.12.

Синтез соединения 204.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой, содержащей растворенную в DMF (3 мл) навеску 0.100 г производного **199** (1 эквив., 0.15 ммоль) был добавлено 0.044 г аминосодержащего производного **203** (1,5 эквив., 0.23 ммоль) и 0.03 г DIPEA (1,5 эквив., 0.23 ммоль); реакционная смесь была оставлена перемешиваться на 15 минут. После чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле.

Элюент для КХ: EtOAc/Cy 50:50 до 70:30. Выделено 0.086 г (82%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, CDCl₃):** δ 7.79 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.41 – 5.27 (m, 3H), 5.20 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.20 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.38 (br.s, 4H), 2.95 (s, 3H), 2.92 – 2.77 (m, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.43 (s, 9H).

Синтез соединения 207.



В круглодонную колбу с магнитной мешалкой, содержащей растворенную в DMF (3 мл) навеску 0.100 г производного **206** (1 эквив., 0.14 ммоль) был добавлено 0.039 г моно-Вос-диамина **203** (1,5 эквив., 0.21 ммоль) и 0.027 г DIPEA (1,5 эквив., 0.21 ммоль); реакционная смесь была оставлена перемешиваться на 30 минут. После чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: EtOAc/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.086 г (92%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГ ц, DMSO-d₆):** δ 10.19 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.47 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.22 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.15 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 6.43 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.38 (s, 4H), 3.93 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.79 – 2.67 (m, 3H), 1.48 (s, 4H), 1.44 – 1.27 (m, 13H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 168.13, 168.09, 159.92, 159.54, 156.93, 155.15, 149.46, 148.87, 146.29, 136.40, 135.16, 122.44, 122.36, 122.15, 121.14, 115.31, 115.12, 114.90, 108.78, 103.11, 99.32, 78.41, 55.72, 31.56, 27.92, 26.34, 15.38.

MC (ESI-HRMS): Для C₃₉H₄₄FN₅O₉ рассчитано m/z 746.31958; найдено m/z 746.31963 [M+H]+.

Синтез соединения 205.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.05 г Вос-содержащего производного хинолина **207** (1 эквив., 0.13 ммоль). Затем к нему была добавлена смесь TFA/DCM 1:1 (2 мл) с дальнейшим перемешиванием при rt в течение 1.5 ч. После чего реакционная смесь была разбавлена DCM (100 мл) и перелита в делительную

воронку с дальнейшей промывкой насыщенным водным раствором NaHCO₃ (1 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт использовался без дополнительной очистки. Выделено 0.071 г (83%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆):** δ 10.17 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.45 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.62 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.21 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.13 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 6.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.37 (s, 4H), 3.92 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.65 (br.s, 2H), 2.39 – 2.19 (m, 3H), 1.46 (s, 4H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 168.14, 168.10, 159.93, 159.45, 157.06, 155.47, 151.55, 149.46, 149.40, 148.89, 146.29, 136.41, 135.18, 122.44, 122.36, 122.16, 121.15, 115.32, 115.13, 114.91, 103.11, 99.14, 55.76, 31.57, 15.38.

МС (MALDI): Для С₃₄H₃₆FN₅O₇ рассчитано m/z 646.3; найдено m/z 646.2 [M+H]+.

Синтез соединения 208.



В круглодонную колбу, снабженную обратным воздушным холодильником и магнитной мешалкой, было помещено 0.500 г нитропроизводного **195** (1 эквив., 1.03 ммоль). Затем к нему был прибавлена смесь растворителей EtOH/EtOAc 1:1 (20 мл) и 1.17 г SnCl₂·2H₂O (5 эквив., 5.17 ммоль). Содержимое колбы перемешивалась в течение 2 ч. при 50°С. После охлаждения до комнатной температуры реакционная смесь была перелита в делительную воронку с EtOAc (100 мл). Дальнейшей промывка была проведена насыщенным водным растворов Na₂CO₃ (3 × 100 мл) и H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: EtOAc/Cy 50:50 до 70:30. Выделено 0.257 г (55%) в виде белого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.77 (s, 1H), 7.23 – 7.12 (m, 2H), 7.07 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.51 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.17 (dd, J = 9.7, 7.8 Hz, 1H), 5.09 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.97 (br.s, 2H), 4.75 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.05 – 2.00 (m, 9H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 192.01, 169.58, 169.49, 169.31, 167.02, 147.59, 138.72, 131.97, 120.27, 114.15, 113.01, 97.20, 70.98, 70.64, 70.62, 68.92, 52.61, 20.49, 20.32, 20.22.

MC (MALDI): Для C₂₀H₂₃NO₁₀ рассчитано m/z 441.1; найдено m/z 441.0 [M-CH₃+2H]+.

Синтез соединения 209.



В колбу Шленка были помещены 0.029 г 2,4,6-трихлоробензоил хлорида (реагента Ямагучи) (2 эквив., 0.12 ммоль) и 0.100 г производного карбоновой кислоты **190** (1 эквив., 0.06 ммоль) и 0.018 г ТЕА (3 эквив., 0.18 ммоль). После чего колба была дегазирована и заполнена аргоном с дальнейшим добавлением сухого DCM (3 м). Реакцию перемешивали при rt в течение 5 ч. Во вторую колбу Шленка поместили 0.032 г амина **208** (1,2 эквив., 0.07 ммоль) и 0.015 г DMAP (2 эквив., 0.12 ммоль). После чего колба была дегазирована и заполнена аргоном с дальнейшим с дальнейшим добавлением сухого DCM (1 мл). По прошествии 5 часов содержимое второй колбы было шприцем перенесено в первую с дальнейшим перемешиванием при rt в течение 18 ч. После чего содержимое колбы было разбавлено CHCl₃ (100 мл) и перелито в делительную воронку с дальнейшей промывкой H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: CHCl₃/MeOH 100:0 до 95:5. Выделено 0.055 г (45%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.88 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.83 (br.s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.22 (dd, J = 17.8, 11.7 Hz, 1H), 8.11 – 7.89 (m, 2H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.38 – 6.14 (m, 2H), 6.00 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 5.81 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.66 – 5.38 (m, 5H), 5.39 – 5.17 (m, 4H), 5.17 – 4.95 (m, 3H), 4.91 (dd, J = 10.6, 3.8 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.51 – 3.91 (m, 15H), 3.93 – 3.43 (m, 23H), 2.68 – 2.60 (m, 1H), 2.41 – 2.35 (m, 1H), 2.12 – 1.94 (m, 30H), 1.68 – 1.55 (m, 6H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 191.76, 173.47, 172.08, 171.50, 171.06, 170.26, 170.19, 170.12, 169.97, 169.79, 169.62, 169.48, 169.29, 168.75, 167.05, 165.16, 162.82, 151.62, 151.05, 148.21, 146.03, 145.60, 143.95, 143.26, 141.57, 140.84, 138.78, 137.27, 134.00, 133.17, 132.18, 131.34, 130.75, 128.98, 128.64, 128.31, 127.84, 127.56, 122.28, 121.86, 119.29, 114.54, 102.01, 96.86, 95.96, 93.19, 83.30, 83.29, 74.55, 73.87, 73.53, 71.05, 70.59, 69.71, 69.57, 69.44, 69.11, 68.83, 68.22, 67.97, 63.07, 61.51, 52.77, 51.69, 34.02, 31.50, 30.15, 22.94, 19.91, 19.00, 17.97, 12.38, 11.70, 11.00.

MC (MALDI): Для С₉₄H₁₁₃N₁₁O₃₆Zn рассчитано m/z 2037.7; найдено m/z 2037.1 [M+H]+.

Синтез соединения 210.



В круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, было помещено 0.035 г производного бензальдегида **209** (1 эквив., 0,02 ммоль) и 0.003 г NaBH₄ (5 эквив., 0.1 ммоль). Затем к ним была прибавлена смесь растворителей CHCl₃/i-PrOH 4:1 (1 мл) и содержимое колбы перемешивалось в течение 1 ч. при 0°С. После чего реакционная смесь была отфильтрована и перелита в делительную воронку с CHCl₃ (100 мл). Дальнейшей промывка была проведена с помощью H₂O (3 × 100 мл). Органический слой был осушен действием осушителя (Na₂SO₄) и сконцентрирован при пониженном давлении. Продукт использовался без дополнительной очистки. Выделено 0.033 г (80%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆):** δ 9.51 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.83 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 8.71 – 8.59 (m, 2H), 8.35 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.97 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.30 – 6.16 (m, 2H), 6.00 (d, J = 11.6Hz, 1H), 5.60 – 5.41 (m, 6H), 5.32 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.27 – 4.96 (m, 7H), 4.90 (dd, J = 10.6, 3.8 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.50 – 3.96 (m, 16H), 3.90 – 3.43 (m, 20H), 2.64 – 2.53 (m, 2H), 2.47 – 2.36 (m, 4H), 2.13 – 1.94 (m, 30H), 1.62 (dd, J = 29.9, 7.3 Hz, 6H).

¹³**C-9MP** (101 MΓ_μ, DMSO-d₆): δ 173.31, 171.91, 171.31, 170.38, 170.14, 170.10, 170.05, 169.96, 169.82, 169.77, 169.73, 169.67, 169.49, 169.32, 169.15, 168.63, 167.06, 165.03, 162.74, 151.51, 149.45, 148.15, 145.96, 145.53, 143.90, 143.12, 141.40, 140.64, 138.65, 137.42, 137.13, 133.94, 132.99, 132.15, 130.69, 128.09, 123.88, 122.47, 121.82, 120.47, 119.01, 115.04, 101.96, 101.54, 99.97, 98.20, 95.72, 93.08, 83.29, 74.43, 73.78, 73.33, 70.89, 70.80, 70.71, 70.53, 69.71, 69.65, 69.25, 68.96, 68.13, 67.66, 62.53, 61.36, 52.60, 52.28, 51.58, 46.35, 37.37, 33.97, 32.08, 31.38, 30.70, 30.19, 22.82, 20.48, 20.41, 20.35, 20.31, 20.27, 20.23, 19.89, 18.89, 17.89, 12.30, 11.63, 10.92.

MC (MALDI): Для C₉₄H₁₁₅N₁₁O₃₆Zn рассчитано m/z 2039.7; найдено m/z 2039.3 [M+H]+.

Синтез соединения 212.



В круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, было помещено 0.070 г активированного карбоната **211** (1 эквив., 0,03 ммоль), 0.030 г аминосодержащего производного хинолина **205** (1,5 эквив., 0.05 ммоль) и 0.006 г DIPEA (1,5 эквив., 0.05 ммоль). Затем к ним была прибавлен растворитель DMF (2 мл) и содержимое колбы перемешивалось в течение 1 ч. при rt. После чего растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для КХ: CHCl₃/MeOH 100:0 до 93:7. Выделено 0.070 г (81%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-***S***MP** (400 MΓ**μ**, **DMSO-d**₆): δ 10.18 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.82 (t, J = 3.3 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.34 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.97 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.45 – 7.32 (m, 1H), 7.28 – 7.00 (m, 7H), 6.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.25 – 6.17 (m, 2H), 5.99 (dd, J = 11.5, 1.7 Hz, 1H), 5.62 – 5.40 (m, 4H), 5.32 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.26 – 5.17 (m, 2H), 5.14 – 4.86 (m, 5H), 4.71 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.47 – 3.38 (m, 36H), 2.92 – 2.72 (m, 6H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 2.47 – 2.37 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.10 – 1.89 (m, 30H), 1.66 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.58 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.47 (s, 4H).

¹³**C-9MP** (101 MΓ_μ, DMSO-d₆): δ 173.30, 171.91, 171.29, 170.53, 170.05, 169.96, 169.82, 169.66, 169.49, 169.31, 169.15, 168.62, 168.15, 168.10, 167.01, 165.02, 162.73, 159.95, 159.51, 157.07, 155.25, 151.51, 149.44, 148.87, 148.15, 146.22, 145.96, 145.52, 143.90, 143.12, 141.39, 140.64, 138.65, 137.13, 136.41, 136.01, 135.18, 133.93, 132.98, 132.15, 130.68, 129.37, 128.12, 125.71, 122.45, 122.37, 122.16, 121.82, 121.17, 119.07, 115.29, 115.13, 114.91, 101.96, 97.88, 95.72, 83.29, 73.78, 70.90, 70.53, 69.69, 69.63, 69.38, 69.24, 68.93, 68.13, 67.66, 63.10, 62.83, 61.35, 55.69, 52.58, 52.33, 51.57, 46.38, 33.93, 31.55, 30.12, 22.81, 20.47, 20.40, 20.34, 20.30, 20.26, 20.22, 19.88, 19.35, 17.87, 15.40, 12.30, 11.62, 10.91.

MC (MALDI): Для C₁₂₉H₁₄₉FN₁₆O₄₄Zn рассчитано m/z 2710.9; найдено m/z 2710.6 [M+H]+.

Синтез соединения 170.



В круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, было помещено 0.033 г конъюгата **212** (1 эквив., 0.01 ммоль), растворенное в 2 мл ацетона. Затем к нему было прибавлено 0.01 г LiOH·H₂O в 2 мл H₂O (24 эквив., 0.24 ммоль). Содержимое колбы перемешивалось в течение 15 минут при 0°С. После чего к реакционной смеси был прибавлено 0.015 г АсOH (25 эквив., 0.25 ммоль), растворенной в H₂O (1 мл). После перемешивания в течение 15 минут растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт реакции был выделен с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Элюент для KX: CHCl₃/MeOH 80:20 до 50:50. Выделено 0.020 г (73%) в виде темно-зеленого порошка.

¹**H-97MP** (400 MΓu, DMSO-d₆): δ 10.18 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.82 (t, J = 3.3 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.34 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 17.8, 11.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.97 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.45 – 7.32 (m, 1H), 7.28 – 7.00 (m, 7H), 6.42 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.25 – 6.17 (m, 2H), 5.99 (dd, J = 11.5, 1.7 Hz, 1H), 5.62 – 5.40 (m, 4H), 5.32 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.26 – 5.17 (m, 2H), 5.14 – 4.86 (m, 5H), 4.71 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.47 – 3.38 (m, 36H), 2.92 – 2.72 (m, 6H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 2.47 – 2.37 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.10 – 1.89 (m, 30H), 1.66 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.58 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.47 (s, 4H).

¹³**C-ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆):** δ 173.31, 172.11, 171.94, 171.54, 170.74, 169.95, 168.59, 159.99, 155.85, 155.27, 151.35, 149.98, 149.01, 146.05, 143.55, 141.39, 140.60, 133.75, 132.57, 131.99, 130.63, 122.60, 122.19, 121.58, 114.97, 114.57, 103.20, 102.93, 100.14, 99.43, 69.51, 69.16, 68.76, 55.74, 55.44, 52.45, 41.58, 34.10, 32.33, 29.19, 28.68, 24.30, 22.88, 22.03, 17.85, 15.41, 14.16, 12.42, 10.85.

MC (MALDI): Для C₁₀₈H₁₂₇FN₁₆O₃₄Zn рассчитано m/z 2275.7976, 1137.3964; найдено m/z 2275.7929 [M]-, m/z 1137.3924 [M-H]2-.

Ферментативное расщепление

Конъюгат **170** в форме стокового раствора в ДМСО (1 мг/мл) в количестве 40 мкл был прибавлен к 1 мл раствора ПБС (0.02 М, pH = 7), содержащему 10% добавку ПЭГ2000. После чего к раствору была добавлено 20 мкл раствора β -глюкуронидаза в ПБС (25000 ед/мл) и смесь инкубировалась при 37 ⁰С течении 4 ч. В заданные момент времени отбирались аликвоты (40 мкл) и анализировались методом HPLC.

Исследование фотофизических параметров синтезированных конъюгатов

Регистрация спектров поглощения и испускания

Фотофизические характеристики синтезированных конъюгатов были определены для их 5 мкмоль растворов в деионизированной воде. Спектры поглощения и испускания были зарегистрированы с помощью Synergy MX спектрофотометра-спектрофлуориметра (*BioTek, USA*). Флуоресценция была возбуждена на 410 нм. Сигнал флуоресценции записывался на 550-850 нм.

Коэффициент молярной экстинкции был определен с использованием следующего уравнения:

$$\varepsilon = {}^D/_{cl}$$
 ,

где *D* – оптическая плотность; *l* – длина пути; *c* – концентрация.

Квантовый выход флуоресценции φ_1 был рассчитан с использованием уравнения:

$$\varphi_1 = \frac{\varphi_2 F_1 D_2}{F_2 D_1}$$

где *F*₁ и *D*₁ – интегральная интенсивность флуоресценции и оптическая плотность раствора исследуемого конъюгата.

 φ_2 – квантовый выход флуоресценции водного раствора родамина Б (Sigma, USA) (0.31); F_2 и D_2 – интегральная интенсивность флуоресценции и оптическая плотность водного раствора родамина Б.

Измерение квантового выхода генерации синглетного кислорода

Антрацен-9, 10-диил-бис-метилмалонат калия (ADMA) и 1,3дифенилизобенхофуран (DPBF) были использованы в качестве ловушек на синглетный кислород. DPBF использовался только для растворов DMSO; ADMA использовался для растворов DMSO и водных растворов (1% DMSO) углеводсодержащего хлорина 160 или конъюгата 168. Красный лазер (635 нм 5 mW, *S-5, Komoloff*) был использован для облучения образцов. Комбинированный источник света дейтериево-галогенная лампа (DH-2000, Ocean Optics) с аттенюатором и детектор (в режиме поглощения) были установлены ортогонально [227]. UV-Vis спектр поглощения регистрировался каждый 2 с (для DPBF) или 5 с (для ADMA). Раствор фталоцианин цинка в DMSO был использован в качестве

165

стандарта ($\Phi_{\Delta} = 0.67$) [228] для определения квантового выхода генерации синглетного кислорода исследуемыми образцами.

Образцы готовились в открытых кварцевых кюветах с 2.4 мл растворителя с концентрацией ~ 10^{-5} M; (1,3-дифенилизобенхофуран (DPBF)) = 5.0×10^{-5} M; с (Антрацен-9, 10-диил-бис-метилмалонат (ADMA)) = 1.4×10^{-4} М. Каждый образец измерялся при 37 °C с постоянным перемешиванием. Растворы не были дегазированы или дополнительно насыщены воздухом/кислородом.

Квантовый выход генерации синглетного кислорода был рассчитан по формуле с использованием метода стандартов:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{St} \frac{R \cdot I^{St}}{R^{St} \cdot I}$$

где Φ^{St}_{Δ} – это квантовых выход генерации синглетного кислорода для стандара; R и R^{St} – это скорости обесцвечивания DPBF/ADMA в присутствии исследуемого соединения и стандарта соответственно; I и I^{St} – это значения интегральной абсорбции света образца и стандарта соответственно.

In vitro исследования

Клеточные линии

Клеточные линии эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC номер CRL-1555TM), карциномы шейки матки человека HeLa (ATCC номер CCL-2TM) и клетки яичника китайского хомяка CHO (ATCC номер CCL-61) были культивированы в среде Eagle MEM (*PanEco, Russia*) с 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, USA) и 2 ммоль L-glutamine в 5% CO₂ при 37 °C. Все клетки были промыты 10 мМ водным раствором PBS.

Клетки аденокарциномы толстой кишки мыши СТ-26 (ATCC номер CRL-2638) были культивированы в среде RPMI (*HyClone, USA*) с аналогичными добавками и обработаны 0.25% раствором трипсин-EDTA (*PanEco, Russia*) на всех этапах пересева.

Анализ уровня экспрессии EGFR

Клетки (0.3×10^6) были перемещены в 500 µl 3% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Затем к ним были добавлены анти-EGFR антитела (0.1 µg/m, 3 µl), конъюгированные с фикоэритрином (Abcam, UK). Клетки инкубировались в течение 30 минут при вращении 15 грт и затем были промыты дважды 1% BSA в PBS.

Флуоресценция окрашенных клеток была сразу проанализирована с помощью FACSCalibur проточного цитометра (BD Biosciences, USA) с использованием 488 нм лазера и регистрации испускания фикоэритрина на 585/42 нм.

Чтобы исключить неспецифические взаимодействия был использован изотипический контроль. Клетки подвергались аналогичным манипуляциям, но анти-EGFR антитела были заменены антителами аналогичного изотипа.

Для оценки уровня экспресии EGFR были рассчитаны отношения интенсивности флуоресценции для EGFR-окрашенных и обработанных изотипическим контролем клеток.

Исследование поглощения конъюгатов клетками

Клетки были высажены в 96-луночные планшеты (*Corning, USA*) с плотностью 9×10^3 клеток на лунку с дальнейшей инкубацией 24 ч. в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Затем ростовая среда была заменена на свежую бессыворочную среду, содержащую 5 µM исследуемого соединения. Клетки затем инкубировались в течение 4 ч.

Поглощение соединений клетками было исследовано с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (*Carl Zeiss, Germany*) с C-Apochromat 63×water immersion линзой с числовой апертурой 1.2. Флуоресценция была возбуждена на 633 нм и зарегистрирована в диапазоне 650-735 нм.

Интенсивность флуоресценции в цитоплазматической области клеток была измерена с помощью компьютерной программы ZEN 2012; по меньшей мере 10 клеток в 2-3 полях зрения были проанализированы.

Для исследования субклеточной локализации клетки были инкубированы с исследуемыми соединениями в концентрации 5 μ M в течение 4 ч. После чего клетки были окрашены с помощью красителей (*ThermoFisherScientific*): 0.5 мкмоль LysoTracker Green DND-26, 0.5 мкмоль MitoTracker Green FM, 0.5 мкмоль ER-Tracker, 5 мкмоль BODIPY FL C5-ceramide с BSA для Аппарата Гольджи. Флуоресценция окрашенных органелл была возбуждена с помощью аргонового лазера на 488 нм и зарегисрирована в диапазоне 500-550 нм.

Измерение цитотоксичности

Влияние новых конъюгатов на жизнеспособность клеточных линий было оценено с помощью MTT-теста [228].

Клетки были высажены в 96-луночные планшеты с плотностью 4×10³ клеток на лунку с дальнейшей 24 ч. инкубацией. Ростовая среда была заменена на свежую бессывороточную среду, содержащую исследуемое соединение в заданной концентрации. После 4 ч. инкубации ростовая среда была заменена на свежую.

Для определения световой цитотоксичности исследуемых соединений клетки были подвергнуты облучению светом (655-675 нм, 32 мВт/см², 20 Дж/см²) с использованием LED источника света, обеспечивающего равномерное распределение излучения на 96-луночный планшет [230].

Облученные клетки были инкубированы в течение 24 ч. до измерения их жизнеспособности. После чего клетки инкубировались в течение 4 ч. с

бессывороточной средой, содержащей 0.5 мг/мл МТТ-реагента (3-(4,5-диметил-2тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромида, *Alfa Aesar, UK*). Образующийся в результате восстановления МТТ формазан был растворен в ДМСО с дальнейшим измерением оптической плотности полученного раствора на 570 нм. с помощью Synergy MX plate reader (*BioTeck, USA*).

Аналогичная процедура была проведена для определения темновой цитотоксичности новых конъюгатов за исключением того, что клетки не подвергались облучению LED источником света.

Жизнеспособность клеток была выражена в отношении оптической плотности клеток инкубированных с исследуемым соединением к оптической плотности клеток без добавления исследуемого соединения. Для каждого соединения были проведены три независимых эксперимента (каждый эксперимент повторялся трижды). Анализ полученных данных и измерение IC₅₀ проведено с помощью GraphPad Prism 6 software. Для этого была применена 4-х параметрическая модель логнормального распределения.

In vivo исследования

Модели опухолей

Для изучения распределения конъюгата **131** между нормальными и опухолевыми тканями была использована самка мыши *Balb/c* (возраст 8 недель; 17 г), которой были введены в левую ногу опухолевые клетки СТ-26 (10⁶ клеток) в растворе 0.2 мл PBS. Через 9 дней после прививки опухоли, когда она достигла размера ~100 мм³, растворенный в PBS конъюгат **131** был введен в подхвостовую вену в дозе 25 мкг/кг веса животного.

Для изучения биологической активности конъюгата **168** были использованы иммунодефицитные самки мыши *Balb/c* (19-23 г; 10 животных). Суспензия клеток A431 ($6 \cdot 10^6$ клеток) в 10 ммоль PBS (100 мкл.) была введена подкожно в правую ногу. Эксперименты по изучению ФДТ и темновой активности проводились через 16 дней после прививки опухолей, когда их размера достиг ~0.10 см³. Конъюгат **168** был использован в виде 0.9 мМ раствора в воде с 20% этанола и 30% PEG2000 и вводился в подхвостовую вену в дозе 15 мг/кг.

Были сформированы три группы животных: «168» группа (введение конъюгата 168 без ФДТ, n=4); «168+ФДТ» группа (введение конъюгата 168 с последующей ФДТ, n=3); и контрольная группа (введение растворителя без 168, n=3).

Все эксперименты были одобрены Комитетом по Биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Флуоресцентный имиджинг

Накопление и выведение конъюгатов **131** и **168** для опухолевых и нормальных тканей было изучено с помощью флуоресцентного имиджинга всего тела животного. Изображения были получены после введения **131** или **168** через разные промежутки

времени в течение 96 ч. Флуоресценция была возбуждена на 590 нм и зарегистрирована в области 600-700 нм.

Количественный анализ полученных изображений был проведен с использованием Image J freeware. Средние значения интенсивности флуоресценции рассчитаны для двух регионов: опухолевая области и аналогичная область на другой ноге («нормальная ткань»). Разница накопления исследуемого соединения между этими регионами выражена в отношении интенсивностей флуоресценции.

ФДТ

Чтобы вызвать фотодинамический эффект через 4 ч. после введения конъюгата **168** область опухоли была облучена LED источником света с дозой 50 Дж/см² (620-655 нм, 100 Вт/см²). Общее время облучения составляло 8 мин 20 с.

После ФДТ размер опухоли был измерен с помощью штангенциркуля. Размер опухоли был рассчитан по формуле

$$V = \pi \frac{x \cdot y \cdot z}{6},$$

где x, y, z соответствуют размеру опухоли в трех взаимно перпендикулярных измерениях. Коэффициент торможения роста опухоли был рассчитан по формуле:

$$TGI = \frac{V_{CTRL} - V_{EXP}}{V_{CTRL}} \times 100,$$

где V_{CTRL} и V_{EXP} — это средние значения размера опухоли в контрольной группе животных и животных с введенным конъюгатом **168** соответственно.

Статистический анализ был проведен с помощью 2-х факторного ANOVA с тестом Даннета для множественных сравнений.

Выводы

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 карциономы человека A431, а также обладают световой цитотоксичностью в наномолярном диапазоне концентраций с соотношением IC₅₀ (в темноте) / IC₅₀ (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 субмикромолярном диапазоне концентраций, а также соотношением IC₅₀ (в темноте) / IC₅₀ (на свету), достигающем 370 для опухолевой клеточной лини A431. Новое конъюгированное производное способно накапливаться в опухолевых тканях и ингибировать их рост на свету и в темноте для животных с привитыми ксенотрансплантантами эпидермоидной карциономы 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.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в работе сотрудникам ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского:

к.б.н. И.В. Балалаевой, к.б.н. Н.Ю. Шилягиной, асп. Н.Н. Песковой, асп. Л.В. Крыловой

Автор выражает благодарность за помощь в работе сотрудникам химического факультета и НИИХ ННГУ им. Н.И. Лобачевского:

д.х.н. И.Д. Гришину, к.х.н. Ю.Б. Малышевой, асп. А.О. Григорьевой

Автор выражает благодарность за помощь в работе сотрудникам ИФХЭ им А.Н. Фрумкина РАН:

чл.-корр. РАН Ю.Г. Горбуновой, к.х.н. И.Н. Мешкову

Автор выражает благодарность за помощь в работе сотрудникам ИГХТУ:

чл.-корр. РАН О.И. Койфману, к.х.н. Ю.В. Романенко

Зарубежные партнеры:

Проф. Г.-Г. Шмальц (Кельнский университет, Германия)

Список литературы

- 1. Epstein, J. M. Phototherapy and photochemotherapy / J. Epstein // N. Engl. J. Med. 1973. V. 32. P. 1149-1151.
- Allison, R. R. Clinical PD/PDT in North America: An Historical Review / R. R. Allison, H. C. Mota, C. H. Sibata // *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2004. V. 1. P. 263-277.
- 3. Jois, H. S. Chemical examination of the seeds of Psoralea corylifolia / H. S. Jois, B. L. Manjunath, S. Venkatarao // *J. Indian Chem. Soc.* 1933. V. 10. P. 41-46.
- 4. Stern, R. S. Psoralen and Ultraviolet A Light Therapy for Psoriasis / R. S. Stern // N. Engl. J. Med. – 2007. – V. 357. – P. 682-690.
- Saleeby, C. W. Sunlight and health / C. W. Saleeby. 3rd ed. London: Nisbet & Co 1928. – P. 178.
- 6. Roelandts, R. The history of phototherapy: Something new under the sun? / R. Roelandts // J. Am. Acad. Dermatol. 2004. V. 46. P. 926-930.
- Raab, O. On the effect of fluorescent substances on infusoria (German) / O. Raab // Z. Biology. – 1900. – V. 39. – P. 524.
- Von Tappeiner, H. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes. / H. Von Tappeiner, A. Joldlbauer // Arch. Klin. Med. – 1904. – V. 80. – P. 427-487.
- 9. Prime, J. Des Accidents Toxiques Prodult par l'Eosinate se Sodium/ J. Prime. 2nd ed. Paris: Jouve et Boyer. 1900.
- Jesionek, A. On the treatment of skin cancers with fluorescent substances / A. Jesionek, H. Von Tappeiner // Arch. Klin. Med. – 1905. – V. 82. – P. 223-227.
- 11. Scherer, H. Chemisch-physiologische untersuchungen / H. Scherer // Ann. Chem. Pharm. – 1841. – V. 40. – P. 1.
- Meyer-Betz, F. Untersuchungen uber die biologische photodynamische wirkung des hematoporphyrins und anderer derivative des blut und galenafarbstoffs / F. Meyer-Betz // Dtsch. Arch. Klin. – 1913. – V. 112. – P. 476–503.
- 13. Policard, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood / A. Policard // C. R. Hebd Soc. Biol. 1925. V. 91. P. 1422.
- Schwartz, S. K. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours / S. K. Schwartz, K. Absolon, H. Vermund // Univ. Minn. Med. Bull. – 1955. – V. 27. – P. 7–8.
- 15. Lipson, R. L, The photodynamic and fluorescent properties of a particular hematoporphyrin derivative and its use in tumor detection: Masters Thesis, R. L. Lipson 1960.
- Lipson, R. L. Proceedings of the 9th International Cancer Congress / R. L. Lipson // Tokyo, Japan – 1966 – P. 393.
- Dougherty, T.J. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors / T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman. // *Cancer Res.* – 1978 – V. 38 – P. 2628–2635.

- Dougherty, T.J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. Photochem. Photobiol / T. J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1987 – V. 45 – P. 879–889.
- Hueger, B. E. Stable Freeze Dried Polyhematoporphyrin Ether/Ester / B. E. Hueger, J. R. Lawter, V. H. Naringrekar, M. C. Cucolo // Patent 5059619 USA. – 1991.
- Jablonski, A. Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes / A. Jablonski // Nature 1933. – V. 131 – P. 839 - 840.
- 21. Schlag, E. W. Lifetimes in Excited States / E. W. Schlag, S. Schneider, S. F. Fischer // *Ann. Rev. Phys. Chem.* 1971. V. 22 P. 465 526.
- 22. Marian, C. M. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules / C. M. Marian // WIREs Comput. Mol. Sci. 2012. V. 2 P. 187 203.
- Dąbrowski, J. M. Chapter Nine Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. / J. M. Dąbrowski // Adv. Inorg. Chem. - 2017. - V. 20 - P. 343 - 394.
- 24. Fridovich, I. Oxygen toxicity: a radical explanation / I. Fridovich // J. Exp. Biol. 1998. V. 201 P. 1203 1209.
- 25. Fee, J. A. Is superoxide important in oxygen poisoning? / J. A. Fee // *Trends Biochem*. *Sci.* 1982. V. 7 P. 84 86.
- Ischiropoulos, H. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase / H. Ischiropoulos, L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. D. Smith, Joseph S.Beckman. // Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – V. 298 – P. 431-437.
- 27. Squadrito, G. L. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide / G. L. Squadrito, W. A. Pryor // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 25 P. 392-403.
- Winterbourn, C. C, Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity / C. C. Winterbourn, A. J. Kettle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 305 – P. 729-736.
- Winterbourn, C. C, Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction / C. C. Winterbourn // *Toxicol Lett.* – 1995. – V. 82-83 – P. 969-974.
- 30. Liochev, S. I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view / S. I. Liochev, I. Fridovich // *Red. Rep.* 2002. V. 7 P. 55-57.
- Kehrer, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity / J. P. Kehrer // *Toxicology*. – 2002. – V. 149 – P. 43-50.
- Mulliken, R.S. Interpretation of the atmospheric oxygen bands; electronic levels of the oxygen molecule / R.S. Mulliken // *Nature*. – 1928. – V. 122 – P. 505.
- Ellis, J.M. Kombinationsbeziehungen im Absorptionsspektrum des flüssigen Sauerstoffs / J.M. Ellis, H.O. Kneser // Z. Physik. B. – 1933. – V. 86 – P. 583-591.
- Kautsky, H. Die Aufklärung der Photoluminescenztilgung fluorescierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung / H. Kautsky, H. de Bruin // Naturwiss. – 1931. – V. 19 – P. 1043.

- 35. Kautsky, H. Energy Transfers at Surfaces. VII. Photosensitized Oxidation as the Action of an Active, Metastable State of the Oxygen Molecule / H. Kautsky, H. de Bruijn, R. Neuwirth, W. Baumeister. // Chem. Ber. – 1933. – V. 66 – P. 1588-1600.
- DeRosa, M. C. Photosensitized singlet oxygen and its applications / M. C. DeRosa, R. J. Crutchley // Coord. Chem. Rev. 2002. V. 233-234 P. 351-371.
- Krasnovsky, A.A. Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics / A.A. Krasnovsky // J. Photoch. Photobio. A. – 2008. – V. 196 – P. 210-218.
- Andrew, G. L. Diels–Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: transition states and mechanisms from contemporary theory / G. L. Andrew, K. N. Houka // Chem. Commun. – 2002. – V. 1 – P. 1243-1255.
- Plaetzer, K. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects / K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich. // Lasers Med. Sci. 2009. V. 24 P. 259-268.
- 40. Davies, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences / M. J. Davies // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 305 P. 761-770.
- Saito, I. Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives / I. Saito, T. Matsuura, M. Nakagawa, T. Hino. // Acc. Chem. Res. – 1977. – V. 10 – P. 346-352.
- Wright A. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides on tyrosine residues / A. Wright, W. A. Bubb, C. L. Hawkins, M. J. Davies. // J. Photochem. Photobiol. – 2002. – V. 76 – P. 35-46.
- 43. Kang, P. Synthesis of a C-13, N-15 labeled imidazole and characterization of the 2,5-endoperoxide and its decomposition / P. Kang, C.S. Foote // *Tetrahedron Lett.* 2000. V. 41 P. 9623-9626.
- Sysak, P. K. Chemistry of singlet oxygen—XXV. Photooxygenation of methionine / P. K. Sysak, C. S. Foote, T.-Y. Ching // J. Photochem. Photobiol. – 1977. – V. 26 – P. 19-27.
- Rougee, M. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity / M. Rougee, R. V. Bensasson, E. J. Land, R. Pariente. // J. Photochem. Photobiol. – 1988. – V. 47 – P. 485-489.
- 46. Redmond, R. W. Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen / R. W. Redmond, I. E. Kochevar // *J. Photochem. Photobiol.* 2006. V. 82 P. 1178-1186.
- Castano, A. P. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization / A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin // *Photodiagn. Photodyn.* – 2004. – V. 1 – P. 279-293.
- Davies, M. J. Reactive species formed on proteinsexposed to singlet oxygen / M. J. Davies // J. Photochem. Photobiol. - 2004. - V. 3 - P. 17-25.
- 49. Kohen, R. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification / R. Kohen, A. Nyska // *Toxicol. Pathol.* 2002. V. 30 P. 620-650.

- Robertson, C. A. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT / C. A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse // J. Photoch. Photobio. B. – 2009. – V. 1 – P. 1-8.
- Margaron, P. Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc Phthalocyanines / Margaron P. // *Photochem. Photobiol.* – 1996. – V. 63 – P. 217-223.
- Mroz, P. Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: Role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production / P. Mroz, J. Bhaumik, D. K. Dogutan, Z. Aly, Z. Kamal, L. Khalid, H. L. Kee, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey, M. R.Hamblin // *Cancer Lett.* – 2009. – V. 282 – P. 63-76.
- Engelmann, F. M. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes / F. M. Engelmann // J. Bioenerg. Biomembranes – 2007. – V. 39 – P. 175-185.
- McMillin, D. R. Understanding binding interactions of cationic porphyrins with Bform DNA / D. R. McMillin, A. H. Shelton, S. A. Bejune, P. E. Fanwick, R. K. Wall. // Coord. Chem. Rev. – 2005. – V. 39 – P. 1451-1459.
- Jensen, T. J. Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells / T. J. Jensen, M. G. H. Vicente, R. Luguya, J. Norton, F. R. Fronczek, K. M. Smith. // J. Photoch. Photobio. B. – 2010. – V. 100 – P. 100-111.
- 56. Kollar, J. Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes / J. Kollar, M. Machacek, M. Halaskova, J. Lenco, R. Kucera, J. Demuth, M. Rohlickova, K. Hasonova, M. Miletin, V. Novakova, P. Zimcik. // J. Med. Chem. – 2020. – V. 63 – P. 7616-7632.
- 57. Ris, H.-B. Effect of drug-light interval on photodynamic therapy with metatetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma / H.-B. Ris // Int. J. Cancer. – 1993. – V. 53 – P. 141-146.
- Mallamace, F. Fractal aggregation of dyes such as porphyrins and related compounds under stacking / F. Mallamace, N. Micali, A. Romeo, L. M. Scolaroa. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. – 2000. – V. 5 – P. 49-55
- 59. Ricchelli, F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes / F. Ricchelli // J. Photoch. Photobio. B. 1995. V. 29 P. 109-118.
- Boyle, R. W. Invited review: structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers / R. W. Boyle, D. Dolphin // *Photochem. Photobiol.* 1996. V. 64 P. 469-485.
- 61. Jin, C. S. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery / C. S. Jin, G. Zheng // Laser. Surg. Med. 2011. V. 43 P. 734-748.
- Bechet, D. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents / D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob. // *Trends Biotechnol.* – 2008. – V. 11 – P. 612-621.

- 63. Zhang, J. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy / J. Zhang, C. Jiang, J. P. F. Longo, R. Bentes, A. H. Zhang, L. A. Muehlmann. // Acta Pharm. Sin. B. – 2018. – V. 8 – P. 137-146.
- Donohoe, C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor Immunity / C. Donohoe, M. O. Senge, L. G. Arnaut, L. C. Gomes-da-Silva. // BBA-Rev. Cancer. – 2019. – V. 1872 – P. 188308.
- 65. Kessel, D. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update / D. Kessel, N. L. Oleinick // *Photochem. Photobiol.* 2018. V. 94 P. 213-218.
- Fink, S. L. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells / S. L. Fink, B. T. Cookson // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73 – P. 1907-1916.
- 67. S D'Arcy, M. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy / M. S D'Arcy // Cell Biol. Int. 2019. V. 43 P. 582-592.
- Miki, Y. Effect of talaporfin sodiummediated photodynamic therapy on cell death modalities in human glioblastoma T98G cells / Y. Miki, J. Akimoto, M. Hiranuma, Y. Fujiwara. // J. Toxicol. Sci. – 2014. – V. 39 – P. 821-827.
- 69. Thompson, S. A. Compromising the plasma membrane as a secondary target in photodynamic therapy-induced necrosis / S. A. Thompson, A. Aggarwal, S. Singh, A. P. Adam, J. P. C. Tome, C. M. Draina. // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26 P. 5224-5228.
- 70. Kroemer, G. Autophagic cell death: the story of a misnomer / G. Kroemer, B. Levine // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9 P. 1004-1010.
- Scherz-Shouval, R. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 / R. Scherz-Shouval, E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar. // *EMBO J.* – 2007. – V. 26 – P. 1749-1760.
- Kessel, D. Chapter 1 Initiation of Autophagy by Photodynamic Therapy / D. Kessel, N. L. Oleinick // Method Enzymol. – 2009. – V. 453 – P. 1-16.
- Dewaele, M. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage / M. Dewaele, T. Verfaillie, P. A. de Witte, J. Piette, P. Agostinis. // J. Cell. Mol. Med. 2011. V. 15– P. 1402-1414.
- Kessel, D. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy / D. Kessel, M. G. Vicente, J. J. Reiners Jr. // Autophagy. – 2006. – V. 2 – P. 289-290.
- 75. Kessel, D.H. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage / D. H. Kessel, M. Price, and J. J. Reiners Jr. // Autophagy. – 2012. – V. 8 – P. 1333-1341.
- Galluzzi, L. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / L. Galluzzi, A. Buqué, O. Kepp, L. Zitvogel, G. Kroemer. // Nat. Rev. Immunol. 2017. V. 17 P. 97-111.
- 77. Falk-Mahapatra, R. Photodynamic Therapy and Immunity: An Update / R. Falk-Mahapatra, S. O. Gollnick // *Photochem. Photobiol.* 2020. doi: 10.1111/php.13253.

- 78. Vaupel, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenviroнмent of Human Tumors: A Review / P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff // Cancer Res. – 1989. – V. 49 – P. 6449-6465.
- 79. Wang, W. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT / W. Wang, L. T. Moriyama, V. S. Bagnato // Laser Phys. Lett. – 2013. – V. 10 – P. 023001-023008.
- Dąbrowski, J. M. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers / J. M Dąbrowski, B. Pucelik, A. Regiel-Futyra, M. Brindell, O. Mazuryk, A. Kyzioł, G. Stochel, W. Macyk, L. G.Arnaut. // Coord. Che. Rev. – 2016. – V. 325 – P. 67-101.
- Barland, M. J. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments / M. J. Garland, C. M Cassidy, D. Woolfson, R. F Donnelly. // Future Med. Chem. 2009. V. 1 P. 667-691.
- Arnaut, L. G. Chapter 5 Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy / L. G. Arnaut. // Adv. Inorg. Chem. – 2011. – V. 63 – P. 187-233.
- St. Denis, G. T. Cyclic Tetrapyrroles in Photodynamic Therapy: The Chemistry of Porphyrins and Related Compounds in Medicine / T. G. St. Denis, Y.-Y. Huang, M. R. Hamblin // Handbook of Porphyrin Science – 2013. – V. 27 – P. 255-301.
- Gouterman, M. Spectra of porphyrins / M. Gouterman // J. Mol. Spectrosc. 1961. V. 6 – P. 138-163.
- Kashef, N. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale / N. Kashef, Y.-Y. Huang, Michael R. Hamblin // *Nanophotonics*. 2017. V. 6 P. 853-879.
- 86. Sekkat, N. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics / N. Sekkat, H. van den Bergh, T. Nyokong, N. Lange. // *Molecules*. 2011. V. 17 P. 98-144.
- 87. Dolphin, D. The Porphyrins V1: Structure and Synthesis / D. Dolphin. *Cambridge: Academic Press*, 1978.
- Ethirajan, M. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy / M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey. // Chem Soc Rev. - 2011. - V. 40 - P. 340-362.
- van Straten, D. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions / D. van Straten, V. Mashayekhi, H. S. De Bruijn, S. Oliveira, D. J. Robinson. // Cancers. -2017. - V. 9 - No. 19.
- 90. dos Santos, A. F. Photodynamic therapy in cancer treatment an update review / dos A. F. Santos, D. R. Q. de Almeida, L. F. Terra, M. cio S. Baptista, L. Labriola. // J. *Cancer. Metastasis. Treat.* – 2019. – V. 5– P. 25.
- 91. Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue / M. R. Hamblin. // *Photochem. Photobiol.* 2019. doi: 10.1111/php.13190.
- 92. Liang, Y. Photodynamic therapy as an antifungal treatment / Y. Liang, L.-M. Lu, Y. Chen, Y.-K. Lin. // *Exp. Ther. Med.* –2016. V. 12 P. 23-27.

- 93. Dai, T. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art / T. Dai, Y.-Y. Huang, M. R.Hamblin // Photodiagnosis Photodyn. Ther.-2009. V. 6 P. 170-188.
- 94. Maisch T. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology / T. Maisch, R.-M. Szeimies, G. Jori, C. Abels. // *Photochem. Photobiol. Sci.*-2004. V. 3 P. 907-917.
- Kim, M. M. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy / M. M. Kim, A. Darafsheh // Photochem. Photobiol. – 2020. – V. 96 – P. 280-294.
- Allison, R. R. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review / R. R. Allison, C. H. Sibata // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* –2010. – V. 7 – P. 61-75.
- 97. Copley, L. Photolon[™], a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and lightdependent cell death via necrosis / L. Copley, P. der Watt, K. W. Wirtz, M. I. Parker, V. D. Leaner // Int. J. Biochem. Cell Biol. -2008. - V. 40- P. 227-235.
- 98. Stranadko, E. P. First Experience of Photodithazine Clinical Application for Photodynamic Therapy of Malignant Tumors / E. P Stranadko, G. V. Ponomarev, V. M. Mechkov, M. V. Ryabov, A. V. Ivanov, A. V. Reshetnickov, U. M. Koraboyev. // *BiOS 2000.* –3909. – V. 40– P. 138-144.
- 99. Photosensitizer Radachlorin(R): Skin cancer PDT phase II clinical trials. / E. V. Kochneva, E. V. Filonenko, E. G. Vakulovskaya, E. G. Scherbakova, O. V. Seliverstov, N. A. Markichev, A. V. Reshetnickov. // Photodiagnosis Photodyn. Ther. –2010. V. 7– P. 258-267.
- 100. Dąbrowski, J. M. New halogenated water-soluble chlorin and bacteriochlorin as photostable PDT sensitizers: synthesis, spectroscopy, photophysics, and in vitro photosensitizing efficacy / J. M. Dąbrowski, L. G. Arnaut, M. M. Pereira, C. J. P. Monteiro, K. Urban'ska, S. Simes, G. Stochel. // *ChemMedChem.* –2010. – V. 5– P. 1770-1780.
- 101. Bryce, R. Burns after photodynamic therapy. Drug point gives misleading impression of incidence of burns with temoporfin (Foscan) / R. Bryce // BMJ. –2000. – V. 320– P. 1731-1732.
- 102. Kinsella, T. J. Preliminary clinical and pharmacologic investigation of photodynamic therapy with the silicon phthalocyanine photosensitizer pc 4 for primary or metastatic cutaneous cancers / T. J. Kinsella, E. D. Baron, V. C. Colussi, K. D. Cooper, C. L. Hoppel, S. T. Ingalls, M. E. Kenney, X. Li, N. L. Oleinick, S. R. Stevens, S. C. Remick. // Front. Oncol. –2011. – V. 1– P. 14.
- 103. Brilkina, A. A. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis / A. A. Brilkina e al. // J. Photochem. Photobiol. B.-2019. – V. 191– P. 128-134.
- 104. Spring, B. Q. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance / B. Q. Spring, I. Rizvi, N. Xu, T. Hasan. // Photoch. Photobio. Sci. –2015. – V. 14– P. 1476-1491.
- 105. Lovell, J. F. FRET Quenching of Photosensitizer Singlet Oxygen Generation / J. F. Lovell, J. Chen, M. T. Jarvi, W.-G. Cao, A. D. Allen, Y. Liu, T. T. Tidwell, B. C. Wilson, G. Zheng. // J. Phys. Chem. B. –2009. V. 113– P. 3203-3211.

- 106. Zhang, F.-L. Molecular-Target-Based Anticancer Photosensitizer:Synthesis and in vitro Photodynamic Activity of Erlotinib–Zinc(II) Phthalocyanine Conjugates / F.-L. Zhang. // Chem. Med. Chem. –2015. – V. 10– P. 312-320.
- 107. Leriche, G. Cleavable linkers in chemical biology / G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner // *Bioorg. Med. Chem.* –2012. V. 20– P. 571-582.
- 108. Muhammad, N. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents / N. Muhammad,
 Z. Guo // Curr. Opin. Chem. Biol. –2014. V. 19– P. 144-153.
- 109. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy / L. Kelland. // *Nat. Rev. Cancer.* –2007. V. 7– P. 573-584.
- 110. Jung, Y. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage / Y. Jung, Stephen J. Lippard // Chem. Rev. –2007. V. 107– P. 1387-1407.
- Brunner, H. Synthese und Antitumoraktivitat neuer Porphyrin-Platin(II)-Komplexe mit an den Porphyrin-Seitenketten gebundenem cytostatischen Platin-Rest / H. Brunner, E Maiterth, B. Treittinger // Chem. Ber. –1994. V. 127– P. 2141-2149.
- Nakajima, S. Tumor-localizing activity of porphyrin and its affinity to LDL, transferrin / S. Nakajima, T. Takemura, I. Sakata // *Cancer Lett.* –1995. – V. 92– P. 113-118.
- Brunner, H. Platinum(II) Complexes with Porphyrin Ligands- Additive Cytotoxic and Photodynamic Effect / H. Brunner, H. Obermeier / *Angew. Chem. Int. Ed.* –1994. V. 33– P. 2214-2215.
- 114. Richter, A. M. Preliminary Studies on a More Effective Phototoxic Agent Than Hematoporphyrin / A. M. Richter, B. Kelly, J. Chow, D. J. Liu, G. H. Towers, D. Dolphin, J. G. Levy. // J. Natl. Cancer Inst.-1987. - V. 79- P. 1327-1332.
- 115. Brunner, H. Benzoporphyrins and Acetylene-Substituted Porphyrins as Improved Photosensitizers in the Photodynamic Tumor Therapy with Porphyrin Platinum Conjugates / H. Brunner, K.-M. Schellerer / *Monatsh. Chem.* –2002. – V. 133– P. 679-705.
- 116. Brunner, H. Platin(II)-Komplexe mit Porphyrinliganden: Synthese und Synergismen bei der photodynamischen Tumortherapie / H. Brunner, H. Obermeier, R.-M. Szeimies // Chem. Ber. –1995. – V. 128– P. 173-181.
- 117. Lottner, C. Hematoporphyrin-Derived Soluble Porphyrin-Platinum Conjugates with Combined Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity / C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner. // J. Med. Chem. –2002. – V. 45– P. 2064-2078.
- 118. Brunner, H. New porphyrin platinum conjugates for the cytostatic and photodynamic tumor therapy / H. Brunner, K.-M. Schellerer // *Inorganica Chim. Acta.*–2003. V. 350– P. 39-48.
- 119. Lottner, C. Combined chemotherapeutic and photodynamic treatment on human bladder cells by hematoporphyrin–platinum(II) conjugates/ C. Lottner, R. Knuechel, G. Bernhardt, H. Brunner. // *Cancer lett.* –2004. V. 203– P. 171-180.
- 120. Abu-Surrah. Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin / Abu-Surrah, S. Adnan, M. Kettunen // Curr. Med. Chem. –2006. – V. 13– P. 1337-1357.

- 121. Lottner, C. Soluble Tetraarylporphyrin-Platinum Conjugates as Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Agents / C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner. // J. Med. Chem. –2002. – V. 45– P. 2079-2089.
- 122. Bart, K. C. Water-soluble porphyrin platinum compounds with high tumor selectivity and their use for the treatment of benign and malignant tumor diseases / K. C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, C. Lottner. // Patent 7087214 B2 USA. – 2006.
- 123. Mao, J. Molecular combo of photodynamic therapeutic agent silicon(IV) phthalocyanine and anticancer drug cisplatin / J. Mao, Y. Zhang, J. Zhu, C. Zhang, Zijian Guo. // Chem. Commun. –2009. P. 908-910.
- 124. Naik, A. Visible-Light-Induced Annihilation of Tumor Cells with Platinum Porphyrin Conjugates / A. Naik, R. Rubbiani, G. Gasser, B. Spingler. // Angew. Chem. Int. Ed. –2014. – V. 53– P. 6938-6941.
- 125. Alberto, M. E. Synergistic Effects in PtII–Porphyrinoid Dyes as Candidates for a Dual-Action Anticancer Therapy: A Theoretical Exploration / M. E. Alberto, C. Adamo // Chem. Eur. J. –2017. – V. 23– P. 15124-15132.
- 126. Hu, X. Water-soluble metalloporphyrinates with excellent photo-induced anticancer activity resulting from high tumor accumulation / X. Hu, K. Ogawa, T. Kiwada, A. Odani. // J. Inorg. Biochem. –2017. – V. 170– P. 1-7.
- 127. Hu, X. Synergistic Effect of Metalation on 4Cisplatin-Porphyrin in Cancer Photodynamic Therapy / X. Hu, K. Ogawa, S. Li, T. Kiwada, A. Odani. // Chem. Lett.– 2017. – V. 46– P. 764-766.
- 128. Hu, X. A Platinum Functional Porphyrin Conjugate: An Excellent Cancer Killer for Photodynamic Therapy/ X. Hu, K. Ogawa, S. Li, T. Kiwada, A. Odani. // B. Chem. Soc. Jpn.–2019. – V. 92– P. 790-796.
- 129. Coverdale, J.P.C. Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates? / J.P.C. Coverdale, T. Laroiya-McCarron, I. Romero-Canelón // *Inorganics.*-2019. – V. 7– P. 31-46.
- Lazarevic, T. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives / T. Lazarevic, A. Rilak, Z. D. Bugarcic // Eur. J. Med. Chem.-2017. - V. 142- P. 8-31.
- 131. Rani-Beeram, S. A Fluorinated Ruthenium Porphyrin as a Potential Photodynamic Therapy Agent: Synthesis, Characterization, DNA Binding, and Melanoma Cell Studies / S. A Rani-Beeram et. al // *Inorg. Chem.*-2008. – V. 47– P. 11278-11283.
- 132. Schmitt, F. Ruthenium Porphyrin Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer / F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süss-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien // J. Med. Chem.-2008. – V. 51– P. 1811-1816.
- Schmitt, F. Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy / F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süss-Fink, W. H. Ang, L. Juillerat-Jeanneret. // J. Biol. Inorg. Chem. – 2009. – V. 14– P. 101-109.
- 134. Pernot, M. Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds / M. Pernot, P. Govindaswamy, O.
Zava, G. Süss-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien. // J. Photoch. Photobio. B. – 2012. – V. 117– P. 80-89.

- 135. Pernot, M. Rational design of an arene ruthenium chlorin conjugate for in vivo anticancer activity / M. Pernot, N. P. E. Barry, T. Bastogne, C. Frochot, M. Barberi-Heyob, B. Therrien. // Inorganica Chim. Act. –2014. – V. 414– P. 134-140.
- 136. Gianferrara, T. Ruthenium-Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity / T. Gianferrara, A. Bergamo, I. Bratsos, B. Milani, C. Spagnul, G. Sava, E. Alessio. // J. Med. Chem.-2010. – V. 53– P. 4678-4690.
- 137. Gianferrara, T. Ruthenium-Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity / T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Iengo, B. Milani, A. Oštrić, C. Spagnul, E. Zangrando, E. Alessio. // Dalton Trans.-2009. – P. 10742-10756.
- Musetti, C. DNA Targeting by Cationic Porphyrin–Ruthenium (II) Conjugates / C. Musetti, C. Spagnul, G. Mion, S. Da Ros, T. Gianferrara, C. Sissi. // ChemPlusChem.– 2015.–V. 80– P. 158-168.
- 139. Heffeter, P. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339 / P. Heffeter, K. Böck, B. Atil, M. A. R. Hoda, W. Körner, C. Bartel, U. Jungwirth, B. K. Keppler, M. Micksche, W. Berger, G. Koellensperger. // J. Biol. Inorg. Chem.-2010.-V. 5- P. 737-748.
- 140. Mion, G. Phototoxic Activity and DNA Interactions of Water-Soluble Porphyrins and Their Rhenium(I) Conjugates / G. Mion, T. Gianferrara, A. Bergamo, G. Gasser, V. Pierroz, R. Rubbiani, R. Vilar, A. Leczkowska, E. Alessio. // ChemMedChem.– 2015.–V. 10– P. 1901-1914.
- 141. Lei, Z. Porphyrin-ferrocene conjugates for photodynamic and chemodynamic therapy / Z. Lei, X. Zhang, X. Zheng, S. Liu, Z. Xie. // Org. Biomol. Chem.-2018.-V. 16- P. 8613-8619.
- 142. Tang, Z. Chemodynamic Therapy: Tumour Microenviroнмent-Mediated Fenton and Fenton-like Reactions / Z. Tang, Y. Liu, M. He, W. Bu. // Angew. Chem. Int. Ed.–2018.–V. 58– P. 946-956.
- Carvalho, C. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect / C. Carvalho, R. X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. J. Oliveira, M. S. Santos, P. I. Moreira. // Curr. Med. Chem. –2009.–V. 16– P. 3267-3285.
- 144. Ke, M.-R. A tumor-targeted activatable phthalocyanine-tetrapeptidedoxorubicin conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy/ M.-R. Ke, S.-F. Chen, X.-H. Peng, Q.-F. Zheng, B.-Y. Zheng, C.-K. Yeh, J.-D. Huang. // Eur. J. Med. Chem. – 2017.–V. 127– P. 200-209.
- 145. Kraman, M. Suppression of Antitumor Immunity by Stromal Cells Expressing Fibroblast Activation Protein–α/ M. Kraman, P. J. Bambrough, J. N. Arnold, E. W. Roberts, L. Magiera, J. O. Jones, A. Gopinathan, D. A. Tuveson, D. T. Fearon. // *Science*. –2010.–V. 330– P. 827-830.
- 146. Liang, L. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview / L. Liang, D. Astruc. // Coord. Chem. Rev. –2011.– V. 255– P. 2933-2945.

- 147. Arzel, E. New Synthesis of Benzo-δ-carbolines, Cryptolepines, and Their Salts: In Vitro Cytotoxic, Antiplasmodial, and Antitrypanosomal Activities of δ-Carbolines, Benzo-δ-carbolines, and Cryptolepines / E. Arzel, P. Rocca, P. Grellier, M. Labaeïd, F. Frappier, F. Guéritte, C. Gaspard, F. Marsais, A. Godard, G. Quéguiner. // J. Med. Chem. –2001.– V. 44– P. 949-960.
- 148. Kumar, D. A Facile Synthesis and Cytotoxicity of a Novel Porphyrin-Cryptolepine Conjugate / D. Kumar, C. Shekar, B. Mishra, A. Kumar, K. Akamatsu, E. Kusaka, Takeo Ito. // J. Chem. Biol. –2012.– V. 2– P. 114-121.
- 149. Kumar, D. Remarkable photocytotoxicity of a novel triazole-linked cationic porphyrin-b-carboline conjugate / D. Kumar, B. A. Mishra, K. P. C. Shekar, A. Kumar, K. Akamatsu, E. Kusaka, T. Ito. // *Chem. Commun.* –2013.– V. 49– P. 683-685.
- 150. Kumar, D. Cationic porphyrin-quinoxaline conjugate as a photochemically triggered novel cytotoxic agent / D. Kumar, K. P. C. Shekar, B. Mishra, R. Kurihar, M. Ogura, T. Ito. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* –2013.– V. 23– P. 3221-3224.
- 151. Köhler, J. Afatinib, Erlotinib and Gefitinib in the First-Line Therapy of EGFR Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma: A Review / J. Köhler, M. Schuler. // Oncol. Res. Treat. –2013.– V. 36– P. 510-518.
- 152. Zhang, F.-L. A novel strategy for targeting photodynamic therapy. Molecular combo of photodynamic agent zinc(II) phthalocyanine and small molecule target-based anticancer drug erlotinib / F.-L. Zhang, Q. Huang, K. Zheng, J. Li, J.-Y. Liu, J.-P. Xue. // Chem. Commun. –2013.– V. 49– P. 9570-9572.
- 153. Zhang, F.-L. Molecular-Target-Based Anticancer Photosensitizer: Synthesis and *in vitro* Photodynamic Activity of Erlotinib– Zinc (II) Phthalocyanine Conjugates/ F.-L. Zhang, Q. Huang, J.-Y. Liu, M.-D. Huang, J.-P. Xue. // *ChemMedChem.* –2015.– V. 10– P. 312-320.
- 154. Chen, J.-J. Silicon Phthalocyanines Axially Disubstituted with Erlotinib toward Small-Molecular-Target-Based Photodynamic Therapy / J.-J. Chen, Y.-Z. Huang, M.-R. Song, Z.-H. Zhang, J.-P. Xue. // ChemMedChem. –2017.– V. 12– P. 1504-1511.
- 155. Cheruku, R. R. Epidermal Growth Factor Receptor Targeted Multifunctional Photosensitizers for Bladder Cancer Imaging and Photodynamic Therapy / R. R. Cheruku, J. Cacaccio, F. A. Durrani, W. A. Tabaczynski, R. Watson, A. Marko, R. Kumar, M. E. El-Khouly, S. Fukuzumi, J. R. Missert, R. Yao, M. Sajjad, D. Chandra, K. Guru, R. K. Pandey. // J. Med. Chem. –2019.– V. 62– P. 2598-2617.
- 156. Huang, L. A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy / L. Huang, G. Wei, X. Sun, Y. Jiang, Z. Huang, Y. Huang, Y. Shen, X. Xu, Y. Liao, C. Zhao. // Eur. J. Med. Chem.-2018. – V. 151– P. 294-303.
- 157. Jhaveri, K. Ganetespib: research and clinical development / K. Jhaveri, S. Modi. // Onco. Targets Ther. -2015.- V. 8- P. 1849-1858.
- 158. Wei, G. Lenvatinib-zinc phthalocyanine conjugates as potential agents for enhancing synergistic therapy of multidrug-resistant cancer by glutathione depletion/

G. Wei, L.-F Huang, Y. Jiang, Y. Shen, Z. Huang, Y. Huang, X. Sun, C. Zhao. // Eur. J. Med. Chem.-2019. – V. 169– P. 53-64.

- 159. Zhu, C. Safety and efficacy profile of lenvatinib in cancer therapy: a systematic review and meta-analysis / C. Zhu, X. Ma, Y. Hu, L. Guo, B. Chen, K. Shen, Y. Xiao. // Oncotarget.-2016. – V. 7– P. 44545-44557.
- 160. Zhao, X. A novel tumor and mitochondria dual-targeted photosensitizer showing ultra-efficient photodynamic anticancer activities / X. Zhao, Y. Huang, G. Yuan, K. Zuo, Y. Huang, J. Chen, J. Li, J. Xue. // Chem. Commun.–2019. – V. 55– P. 866-869.
- 161. Zielonka, J. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications / J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman. // Chem. Rev.-2017. – V. 117– P. 10043-10120.
- 162. Huang, Y. Probing the interactions of phthalocyanine-based photosensitizers with model phospholipid bilayer by molecular dynamics simulations / Y. Huang, Yichang Liu, Y. Chen, M. Song, M. Huang, J. Xue, L. Liu, J. Li. // J. Porphyr. Phthalocya.– 2018. – V. 22– P. 764-770.
- Zhao, X. An epidermal growth factor receptor-targeted and endoplasmic reticulumlocalized organic photosensitizer toward photodynamic anticancer therapy / X. Zhao, H. Ma, J. Chen, F. Zhang, X. Jia, J. Xue. // Eur. J. Med. Chem.–2019. – V. 182– P. 111925.
- 164. Xiao, H. Simultaneous Fluorescence Visualization of Endoplasmic Reticulum Superoxide Anion and Polarity in Myocardial Cells and Tissue / H. Xiao, C. Wu, P. Li, B. Tang. // Anal. Chem.-2018. – V. 90– P. 6081-6088.
- 165. Janke, C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions / C. Janke. // J. Cell Biol.-2014. V. 206- P. 461-472.
- 166. Steiнмetz, M. O. Microtubule-Targeting Agents: Strategies to Hijack the Cytoskeleton / M. O. Steiнмetz, A. E. Prota. // *Trends Cell Biol.*-2018. V. 28- P. 776-792.
- 167. Tron, G. C. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions / G. C. Tron, T. Pirali, G. Sorba, F. Pagliai, S. Busacca, A. A. Genazzani. // J. Med. Chem.-2006. - V. 49- P. 3033-3044.
- 168. Marupudi, N. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies / N. Marupudi, J. E Han, K. W Li, V. M. Renard, B. M. Tyler, H. Brem. // Expert Opin. Drug Saf.-2007. - V. 6- P. 609-621.
- 169. Bio, M. Site-specific and far-red-lightactivatable prodrug of combretastatin a-4 using photo-unclick chemistry / M. Bio, P. Rajaputra, G. Nkepang, S. G. Awuah, A. M. L. Hossion, Y. You. // J. Med. Chem.-2013. V. 56– P. 3936-3942.
- Bio, M. Far-red light activatable, multifunctional prodrug for fluorescence optical imaging and combinational treatment / M. Bio, P. Rajaputra, G. Nkepang, Y. You. // J. Med. Chem.-2014. - V. 57- P. 3401-3409.

- Rajaputra, P. Anticancer drug released from near ir-activated prodrug overcomes spatiotemporal limits of singlet oxygen / P. Rajaputra, M. Bio, G. Nkepang, P. Thapa, S. Woo, Y. You. // *Bioorgan. Med. Chem.*–2016. – V. 24– P. 1540-1549.
- 172. Thapa, P. Far-red light-activatable prodrug of paclitaxel for the combined effects of photodynamic therapy and site-specific paclitaxel chemotherapy / P. Thapa, M. Li, M. Bio, P. Rajaputra, G. Nkepang, Y. Sun, S. Woo, Y. You. // J. Med. Chem.-2016. – V. 59– P. 3204-3214.
- 173. Bio, M. Click and photo-unclick chemistry of aminoacrylate for visible lighttriggered drug release / M. Bio, G. Nkepang, Y. You. // Chem. Commun.-2012. - V. 48- P. 6517-6519.
- 174. Nkepang, G. Folate receptor-mediated enhanced and specific delivery of far-red light-activatable prodrugs of combretastatin A-4 to FR-positive tumor / G. Nkepang, M. Bio, P. Rajaputra, S. G. Awuah, Y. You. // *Bioconjug. Chem.*-2014. V. 25– P. 2175-2188.
- 175. Thapa, P. Folate-peg conjugates of a far-red light-activatable paclitaxel prodrug to improve selectivity toward folate receptor-positive cancer cells / P. Thapa, M. Li, R. Karki, M. Bio, P. Rajaputra, G. Nkepang, S. Woo, Y. You. // ACS Omega.-2017. – V. 2– P. 6349-6360.
- 176. Nguyen, L. Development of Prodrugs for PDT-Based Combination Therapy Using a Singlet-Oxygen-Sensitive Linker and Quantitative Systems Pharmacology / L. Nguyen, M. Li, S. Woo, Y. You. // J. Clin. Med.-2019. - V. 8- P. 2198-2217.
- 177. Clemons, M. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review: Antitumour treatment / M. Clemons, S. Danson, A. Howell. // *Cancer Treat. Rev.*-2002. V. 28– P. 165-180.
- 178. Gacio, A. F. Photodynamic Cell-Kill Analysis of Breast Tumor Cells with a Tamoxifen-Pyropheophorbide Conjugate / A. F. Gacio, C. Fernandez-Marcos, N. Swamy, D. Dunn, R. Ray. // J. Cell. Biochem. – 2006. – V. 99– P. 665-670.
- 179. Zhang, F.-L. A Molecular Combination of Zinc(II) Phthalocyanine and Tamoxifen Derivative for Dual Targeting Photodynamic Therapy and Hormone Therapy / F.-L. Zhang, M.-R. Song, G.-K. Yuan, H.-N. Ye, Y. Tian, M.-Do. Huang, J.-P. Xue, Z.-H. Zhang, J.-Y. Liu. // J. Med. Chem.-2017. – V. 60– P. 6693-6703.
- 180. Zhang, F.-L. Tamoxifen-Zinc(II) phthalocyanine conjugates for target-based photodynamic therapy and hormone therapy / F.-L. Zhang, N. Huang, H.-L. Weng, J.-P. Xue. // J. Porphyr. Phthalocya.-2019. – V. 23– P. 1073-1083.
- 181. Jalde, S. S. Synthesis of novel Chlorin e6-curcumin conjugates as photosensitizers for photodynamic therapy against pancreatic carcinoma/ S. S. Jalde, A. K. Chauhan, J. H. Lee, P. K. Chaturvedi, J.-S. Park, Y.-W. Kim. // Eur. J. Med. Chem.–2018. V. 147– P. 66-76.
- 182. Kwon, Y. Curcumin as a cancer chemotherapy sensitizing agent / Y. Kwon. // J. Korean Soc. Appl. Bi.-2014. V. 57– P. 273-280.
- Park, K. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways / K. Park, J.-H. Lee // Oncol. Rep. –2007. – V. 17– P. 537-540.

- 184. Bimonte, S. Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer / S. Bimonte, A. Barbieri, M. Leongito, M. Piccirillo, A. Giudice, C. Pivonello, C. De Angelis, Vincenza Granata, R. Palaia, F. Izzo. // Nutrients. –2016. V. 8– P. 433-445.
- 185. Tuncel, S. Assessing the dual activity of a chalcone-phthalocyanine conjugate: design, synthesis, antivascular and photodynamic properties activity / S. Tuncel, A. Trivella, D. Atilla, K. Bennis, H. Savoie, F. Albrieux, L. Delort, H. Billard, V. Dubois, V. Ahsen, F. Caldefie-Chézet, C. Richard, R. W. Boyle, S. Ducki, F. Dumoulin.// *Mol. Pharm.* –2013. – V. 10– P. 3706-3716.
- 186. Ducki, S. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivascular activity / S. Ducki, D. Rennison, M. Woo, A. Kendall, J. F. D. Chabert, A. T. McGown, N. J. Lawrence. // Bioorg. Med. Chem. –2009. – V. 17– P. 7698-7710.
- 187. Cerqueira, A. F. R. Coumarin–Tetrapyrrolic Macrocycle Conjugates: Synthesis and Applications / A. F. R. Cerqueira, V. A. S. Almodôvar, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé. // Molecules. –2017. – V. 22– P. 994-1020.
- Lopez-Gonzalez, J. S. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines / J. S. Lopez-Gonzalez, H. Prado-Garcia, D. Aguilar-Cazares, J. A. Molina-Guarneros, J. Morales-Fuentes, J. J. Mandoki. // Lung Cancer. –2004. – V. 43– P. 275-283.
- 189. Zhou, X.-Q. Synthesis and in vitro Anticancer Activity of Zinc(II) Phthalocyanines Conjugated with Coumarin Derivatives for Dual Photodynamic and Chemotherapy / X.-Q. Zhou, L.-B. Meng, Q. Huang, J. Li, K. Zheng, F.-L. Zhang, J.-Y. Liu, J.-P. Xue.// Chem. Med. Chem. -2015. - V. 10- P. 304-311.
- 190. Wentrup, R. Photodynamic Therapy Plus Chemotherapy Compared with Photodynamic Therapy Alone in Hilar Nonresectable Cholangiocarcinoma / R. Wentrup, N. Winkelmann, A. Mitroshkin, M. Prager, W. Voderholzer, G. Schachschal, C. Jürgensen, C. Büning. // *Gut Liver*. –2016. – V. 10– P. 470-475.
- 191. Taketani, S. Involvement of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors in the Intracellular Transport of Heme and Porphyrins / S. Taketani, H. Kohno, T. Furukawa, R. Tokunaga. // J. Biochem. –1995. – V. 117– P. 875-880.
- 192. Nyuchev, A. Synthesis of Chlorin-(Arylamino)Quinazoline Hybrids as Models for Multifunctional Drug Development / A. Nyuchev, V. F. Otvagin, A. E. Gavryushin, Y. I. Romanenko, O. I. Koifman, D. V. Belykh, H.-G. Schmalz, A. Yu. Fedorov. // Synthesis. -2015. - V. 47- P. 3717-3726.
- 193. Smith K.M. (Ed). Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, 1975.890 p.
- 194. Pandey, R.K. Synthesis of water-soluble cationic porphyrins and chlorins / R. K. Pandey, F.-Y. Shiau, N. W. Smith, T. J. Dougherty, K. M. Smith. // *Tetrahedron.* 1992. V. 48– P. 7591-7600.
- 195. Belykh, D.V. Aminomethylation of chlorophyll a derivatives using bis(N,Ndimethylamino) Methane / D.V. Belykh, I. S. Tarabukina, I. V. Gruzdev, M. I. Kodess, A. V. Kutchin. // J. Porphyr. Phthalocya. –2009. – V. 13– P. 949-956.

- 196. Pennington, F.C. Preparation and properties of pyrochlorophyll (a), methyl pyrochlorophide (a), pyropheophytin (a) and methyl pyropheophorbide (a) derived from chlorophyll by decarbomethoxylation / F.C. Pennington, H. H. Strain, W. A. Svec, J. J. Katz. // J. Amer. Chem. Soc. -1964. V. 86- P. 1418-1426.
- 197. Weller, A. The reaction of chlorophyll with amines / A. Weller, R. Livingston. // J. *Amer. Chem. Soc.* –1954. V. 76– P. 1575-1578.
- 198. Belykh, D.V. Opening of the extra ring in pheophorbide a methyl ester by the action of amines as a one-step method for introduction of additional fragments at the periphery of chlorin macroring / D.V. Belykh, E. A. Kopylov, I. V. Gruzdev, A. V. Kuchin. // Russ. J. Org. Chem. -2010. - V. 46- P. 577-585.
- 199. Chau, N. G. Vandetanib for the Treatment of Medullary Thyroid Cancer / N. G. Chau, R. I. Haddad // *Clin. Cancer Res.* –2013. V. 19– P. 524-529.
- 200. Gant, T. G. Substituted quinazoline inhibitors of growth factor receptor tyrosine kinases / T. G. Gant, S. Sarshar, M. Shahbaz // International patent WO 2010/028254 A2. – 2010.
- 201. Jafari, E. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities / E. Jafari, M. R. Khajouei, F. Hassanzadeh, G. H. Hakimelahi, G. A. Khodarahmi. // *Res. Pharm. Sci.* –2016. V. 11– P. 1-14.
- 202. Neises, B. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids / B. Neises, W. Steglich. // Angew. Chem. Int. Ed. –1978. V. 17– P. 522-524.
- 203. Donnelly, P.S. 'Click' cycloaddition catalysts: copper(i) and copper(ii) tris(triazolylmethyl)amine complexes / P.S. Donnelly, S. D. Zanatta. S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams. // Chem. Comm. –2008. P. 2459-2461.
- 204. Lee, B.-Y. A new solvent system for efficient synthesis of 1,2,3-triazoles / B.-Y Lee, S. R. Park, H. B. Jeon, K. S. Kim. // *Chem. Comm.* –2006. V. 47– P. 5105-5109.
- 205. Otvagin, V. F. Synthesis and Biological Evaluation of New Water-Soluble Photoactive Chlorin Conjugate for Targeted Delivery / 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. // Eur. J. Med. Chem.-2018. - V. 144- P. 740-750.
- 206. Chen, Y. Methyl Pyropheophorbide-a Analogues: Potential Fluorescent Probes for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. Effect of Central Metal in Photosensitizing Efficacy / Y. Chen, X. Zheng, M. P. Dobhal, A. Gryshuk, J. Morgan, T. J. Dougherty, A. Oseroff, R. K. Pandey. // J. Med. Chem.–2005. – V. 48– P. 3692-3695.
- 207. Ol'shevskaya, V. A. Novel boronated chlorin e6-based photosensitizers: synthesis, binding to albumin and antitumour efficacy / V. A. Ol'shevskaya, R. G. Nikitina, Arina N. Savchenko, M. V. Malshakova, A. M. Vinogradov, G. V. Golovina, D. V. Belykh, A. V. Kutchin, M. A. Kaplan, V. N. Kalinin, V. A. Kuzmin, A. A. Shtile. // *Bioorg. Med. Chem.*-2008. V. 17– P. 1297-1306.

- Singh, S. Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics / S. Singh, A. Aggarwal, N. V. S. D. K. Bhupathiraju, G. Arianna, K. Tiwari, C. M. Drain. // Chem. Rev. –2015. – V. 115– P. 10261-10306.
- 209. Hasan, S. S. Galectins Potential targets for cancer therapy / S. S. Hasan, G. Md. Ashraf, N. Banu. // *Canc. Lett.*–2007. V. 253– P. 25-33.
- 210. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells / O. Warburg. // Science.-2007. V. 123- P. 309-314.
- Flos, M. A. Potent Glycosidase Inhibition with Heterovalent Fullerenes: Unveiling the Binding Modes Triggering Multivalent Inhibition / M. A. Flos, M. I. G. Moreno, C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, J.-F. Nierengarten, S. P. Vincent. // Chem. Eur. J.– 2016. – V. 22– P. 11450-11460.
- 212. Salunke, S. B. Iron(iii) chloride as an efficient catalyst for stereoselective synthesis of glycosyl azides and a cocatalyst with Cu(0) for the subsequent click chemistry / S. B. Salunke, N. S. Babu, C.-T. Chen // Chem. Commun.-2011. V. 47- P. 10440-10442.
- 213. Kuzmina, N. S. Synthesis and antiproliferative activity of new chlorin e6 glycoconjugates / N. S. Kuzmina, V. F. Otvagin, L. V. Krylova, A. V. Nyuchev, Y. V. Romanenko, O. I. Koifman, I. V. Balalaeva, A. Yu. Fedorova. // Mend. Commun.–2020. V. 30– P. 159-161.
- 214. Федоров А. Ю. Производное цинкового металлокомплекса хлорина-е6 и его применение / А.Ю. Федоров, А. В. Нючев, И. В. Балалаева, В. Ф. Отвагин, Н. С. Кузьмина, Л. В. Крылова. // Патент РФ на изобретение RU 2691754 C1. – 2018.
- 215. Redmond, R. W. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules / R. W. Redmond, J. N. Gamlin. // Photochem. Photobiol.-1999. - V. 70- P. 391-475.
- 216. Otvagin, V. F. Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy / 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. // J. Med. Chem.– 2019. – V. 62– P. 11182-11193.
- 217. Tranoy-Opalinski, I. β-Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: An update / I. Tranoy-Opalinski, T. Legigan, R. Barat, J. Clarhaut, M. Thomas, B. Renoux, S. Papot. // Eur. J. Med. Chem.-2014. – V. 74– P. 302-313.
- 218. Yakes, F. M. Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth / F. M. Yakes, J. Chen, J. Tan, K. Yamaguchi, Y. Shi, P. Yu, F. Qian, F. Chu, F. Bentzien, B. Cancilla, J. Orf, A. You, A. D. Laird, S. Engst, L. Lee, J. Lesch, Y.-C. Chou, A. H. Joly. // Mol. Cancer Ther.-2011. – V. 10– P. 2298-2308.
- 219. Bannen, L. C. C-met modulators and methods of use / L. C. Bannen, D. S.-M. Chan, J. Chen, L. E. Dalrymple, T. P. Forsyth, T. P. Huynh, V. Jammalamadaka, R. G. Khoury, J. W. Leahy, M. B. Mac, G. Mann, L. W. Mann, J. M. Nuss, J. J. Parks, C. S. Takeuchi, Y. Wang, W. Xu. // International patent WO 2005030140A2. – 2005.

- 220. Vazifehasl, Z. Synthesis and Characterization of Novel Diglycidyl Methacrylate-Based Macromonomers on Isosorbide for Dental Composites / Z. Vazifehasl, S. Hemmati, M. Zamanloo, M. Jaymand. // Macromol. Res. – 2013. – V. 21– P. 427-434.
- 221. Cheng, T.-C. An Activity-Based Near-Infrared Glucuronide Trapping Probe for Imaging β-Glucuronidase Expression in Deep Tissues / T.-C. Cheng, S. R. Roffler, S.-C. Tzou, K.-H. Chuang, Y-C. Su, C.-H. Chuang, C.-H. Kao, C.-S. Chen, I.-H. Harn, K.-Y. Liu, T.-L. Cheng, Y.-L. Leu. // J. Am. Chem. Soc.-2012. – V. 134– P. 3103-3110.
- 222. Zhu, H.-H. Synthesis and positive inotropic activity evaluation of liguzinediol metabolites / H.-H. Zhu, Y.-q. Chen, D. Cheng, W. Li, T.-l. Wang, H.-m. Wen, L. Chen, J. Liu. // Bioorg. Med. Chem. Lett.-2016. - V. 26- P. 882-884.
- 223. Bouvier, E. A new paclitaxel prodrug for use in ADEPT strategy/ E. Bouvier, S. Thirot, F. Schmidt, C. Monnereta. // Org. Biomol. Chem.-2003. V. 1-P. 3343-3352.
- 224. Dhimitruka, I. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method / I. Dhimitruka, J. SantaLucia. // Org. Lett.-2006. V. 8– P. 47-50.
- 225. El-Faham, A. Novel Proton Acceptor Immonium-Type Coupling Reagents: Application in Solution and Solid-Phase Peptide Synthesis/ A. El-Faham, F. Albericio // Org. Lett.-2007. - V. 9- P. 4475-4477.
- 226. Xu, Z. Parallel Synthesis of Peptide-Like Macrocycles Containing Imidazole-4,5dicarboxylic Acid / Z. Xu, K. A. Wheeler, P. W. Baures. // *Molecules*.-2012. - V. 17-P. 5346-5362.
- 227. Meshkov, I. N. Tuning Photochemical Properties of Phosphorus(v) Porphyrin Photosensitizers / I. N. Meshkov, V. Bulach, Y. G. Gorbunova, F. E. Gostev, V. A. Nadtochenko, A. Yu. Tsivadze, M. W. Hosseini. // Chem. Commun.–2017. – V. 53– P. 9918-9921.
- Kuznetsova, N. A. Relationship between the Photochemical Properties and Structure of Pophyrins and Related Compounds / N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, E. A. Kalmykova, E. A. Makarova, S. N. Dashkevich, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya, E. A. Luk'yanets. // *Russ. J. Gen. Chem.*-2000. – V. 70– P. 133-140.
- 229. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann. // J. Immunol. Methods.-1983. - V. 65- P. 55-63.
- 230. Shilyagina, N. Y. LED Light Source for *In Vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy / N. Y. Shilyagina, V.I. Plekhanov, I.V. Shkunov, P.A. Shilyagin, L.V. Dubasova, A.A. Brilkina, E.A. Sokolova, I.V. Turchin, I.V. Balalaeva. // Sovrem. Tehnol. v Med.-2014. V. 8– P. 15-24.