

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Маклакова Светлана Юрьевна

**Лиганды асиалогликопротеинового рецептора и конъюгаты на их основе с
терапевтическими и диагностическими агентами**

02.00.03 – Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель

д.х.н., профессор

Мажуга А.Г.

Москва – 2018

Оглавление

Список использованных обозначений	4
1. Введение	5
2. Обзор литературы	9
2.1. Асиалогликопротеиновый рецептор	11
2.2. Лиганды ASGPR природного происхождения	13
2.3. Синтетические лиганды ASGPR	15
2.4. Ковалентные конъюгаты лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленного транспорта противоопухолевых препаратов	24
2.5. Подходы к синтезу пролекарств паклитаксела	31
3. Обсуждение результатов	36
3.1. Синтез лигандов ASGPR на основе <i>N</i> -ацетилгалактозамина и их изомеров на основе <i>N</i> -ацетилглюкозамина	37
3.2. Поиск неуглеводных лигандов ASGPR	47
3.3. Конъюгаты лигандов ASGPR	56
3.3.1. Конъюгаты с <i>ми</i> РНК	56
3.3.2. Конъюгаты с флуоресцентным красителем <i>sulfo-Cy5</i>	58
3.3.3. Конъюгаты паклитаксела	63
4. Экспериментальная часть	68
4.1 Синтез разветвленных лигандов ASGPR	68
4.1.1 Синтез трикарбоновой кислоты 4	68
4.1.2 Синтез агликона 6	71
4.1.3 Синтез гликозидов 11a,b и 14a,b	72
4.1.4 Синтез лигандов 12a,b и 17a,b	77
4.2. Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот	83
4.2.1. Синтез карбонильных соединений	83
4.2.2. Синтез индолин-2,3-дионов 22-24 и 28,29	84
4.5 Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот	87
4.3. Синтез конъюгатов лигандов ASGPR	90
4.3.1. Синтез конъюгата <i>ми</i> РНК с лигандом 12b	90
4.3.2. Синтез конъюгатов с флуоресцентными красителями	90
4.3.3. Синтез конъюгатов с паклитакселом	92
4.4. Биологические испытания	96

4.4.1. Исследование связывания лигандов с асиалогликопротеиновым рецептором методом ППР	96
4.4.2. Исследование конъюгата 34а методом проточной цитофлуориметрии.....	97
4.4.3. Интравитальная микроскопия печени	98
4.4.4. Измерение гидролиза конъюгата 38.....	98
4.4.5. Определение цитотоксичности.....	98
5. Основные результаты и выводы.....	100
6. Список литературы	101
7. Приложение	1105

Список использованных обозначений

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

*mi*РНК – малые интерферирующие РНК

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор (Asialoglycoprotein Receptor)

CuAAC – медь-катализируемое 1,3-диполярное циклоприсоединение азидов к ацетиленам (Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition)

DIC – *N,N'*-диизопропилкарбодиимид

EPR-эффект – эффект усиленного проникновения и удержания (Enhanced Permeability and Retention effect)

FBS – фетальная бычья сыворотка

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration)

Gal – D-галактоза

GalNAc – *N*-ацетил-D-галактозамин

GSH – глутатион

MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2H-тетразолиум (тетразолиевый краситель, который применяют для оценки метаболической активности клеток)

PBS – натрий-фосфатный буфер

PXL – противоопухолевый препарат паклитаксел

Sito-G – β -ситостерол- β -D-глюкозид

sulfo-Cy5 – водорастворимый цианиновый краситель, содержащий 5 метиновых групп

TRIS – трис(гидроксиметил)аминометан

1. Введение

Актуальность работы. Направленный транспорт лекарственных препаратов – перспективный подход медицинской химии, который позволяет: 1) обеспечить проникновение активной молекулы в целевой орган, ткань или клетку в эффективной концентрации; 2) защитить действующее вещество от разрушения и дезактивации под влиянием физиологических условий; 3) ограничить взаимодействие лекарства с нецелевыми клетками [1,2]. Благодаря этому снижается необходимая доза введения препарата, а также побочные эффекты от его приема. Наиболее распространенный вид онкологических патологий печени – гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – с трудом поддается лечению, особенно в неоперабельных случаях, что связано с низкой эффективностью и высокой общей токсичностью существующих препаратов для химиотерапии [3]. Считается, что преодолеть выше обозначенные проблемы поможет создание системы направленного транспорта.

На поверхности паренхимных клеток печени содержится порядка 0.5 – 1 млн асиалогликопротеиновых рецепторов (ASGPR) [4]. Способность ASGPR переносить через мембрану гликозилированные белки, высокая степень экспрессии, быстрый цикл регенерации и преимущественное расположение на поверхности гепатоцитов и клеток ГЦК делают его перспективной мишенью для адресной доставки биологически активных веществ. ASGPR селективно связывается с D-галактозой (Gal) и *N*-ацетил-D-галактозамином (GalNAc), это позволяет осуществлять направленный транспорт лекарственных препаратов и средств диагностики в клетки печени с помощью векторных (адресных) фрагментов на основе этих углеводов [5]. Активное применение нашли липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы, модифицированные Gal или GalNAc, в то время как ковалентные конъюгаты лигандов ASGPR с лекарственными препаратами представлены единичными примерами [6]. В связи с этим вызывает интерес их синтез и исследование.

Медь-катализируемое 1,3-диполярное циклоприсоединение азидов к ацетиленам (CuAAC) – удобный способ синтеза ковалентных конъюгатов сложных природных соединений [7]. Для реализации данного подхода к получению конъюгатов необходимо предложить лиганды ASGPR с азидогруппой или терминальной тройной связью и разработать методики их синтеза. На сегодняшний день известен ряд селективных лигандов ASGPR – производных *N*-ацетилгалактозамина, однако

поскольку гликозилированные соединения могут вызывать иммунный ответ, актуальной задачей также является поиск лигандов ASGPR неуглеводной природы. Такие соединения помимо всего прочего должны выгодно отличаться простотой синтеза и низкой стоимостью.

Цель работы заключалась в синтезе новых типов лигандов асиалогликопротеинового рецептора и разработке методов получения конъюгатов на их основе с терапевтическими и диагностическими агентами.

Задачи работы состояли в а) разработке синтетического подхода к лигандам ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомерам на основе *N*-ацетилглюкозамина, содержащим азидогруппу; б) поиске новых классов низкомолекулярных органических соединений, способных связываться с асиалогликопротеиновым рецептором, разработке методов получения предложенных структур; в) синтезе конъюгатов полученных в работе лигандов с противоопухолевым препаратом паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5 при помощи медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения; г) *in vitro* и *in vivo* исследовании биологических свойств полученных конъюгатов.

Научная новизна. Оптимизированы методики синтеза селективных лигандов асиалогликопротеинового рецептора с тремя остатками *N*-ацетилгалактозамина и гидрофобным линкером с терминальной азидогруппой. Это открыло возможность последующего их соединения с терапевтическими и диагностическими молекулами с помощью реакции медь-катализируемого [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения. Помимо модифицированных лигандов получены изомерные им соединения на основе *N*-ацетилглюкозамина. В результате выделено и охарактеризовано набором физико-химических методов анализа четыре новых углеводсодержащих соединения, готовых для конъюгирования с лекарственными средствами. На их основе получены конъюгаты с терапевтическими (*миРНК* и противоопухолевый препарат паклитаксел) и диагностическими (флуоресцентный краситель *sulfo*-Cy5 алкин) агентами. Для полученных соединений впервые проведены *in vitro* и *in vivo* исследования влияния введения векторного фрагмента на распределение конъюгата в организме и его способность проникать в целевые клетки. Впервые предложено использовать в качестве лигандов асиалогликопротеинового рецептора вещества неуглеводной природы – производные 3-гидроксихинолин-4-карбоновой кислоты.

Практическая значимость. Разработана стратегия синтеза лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и изомерных им соединений – производных *N*-ацетилглюкозамина. Структурные изменения, которые были внесены в эффективные и селективные лиганды ASGPR, открыли возможность конъюгировать их с терапевтическими и диагностическими агентами с помощью удобной в исполнении реакции CuAAC, что позволило использовать предложенные лиганды для модификации биологически активных соединений различного строения (*ми*РНК, противоопухолевого препарата паклитаксела, флуоресцентного красителя *sulfo*-Cy5 алкин). Разработаны методы синтеза ранее не известных лигандов ASGPR - 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот.

Положения, выносимые на защиту: 1) синтез лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и изомерных им соединений на основе *N*-ацетилглюкозамина; 2) 3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты как новый класс низкомолекулярных органических соединений, способных связываться с ASGPR; 3) методология синтеза 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)хинолин-4-карбоновых кислот с этинильным заместителем в бензольном кольце хинолинового ядра; 4) получение с помощью CuAAC конъюгатов флуоресцентного красителя *sulfo*-Cy5 и противоопухолевого препарата паклитаксела с предложенными в работе лигандами; 5) *in vitro* и *in vivo* исследования распределения конъюгатов в организме, их проникновения в целевые клетки и способности проявлять терапевтический эффект.

Публикации. По материалам работы опубликована 21 печатная работа: 3 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ для публикации результатов диссертационных работ, и 18 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2015» (Красновидово, Россия, 2015); Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "KOST-2015" (Москва, Россия, 2015); XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry (Мец, Франция, 2015); 2ая Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC-2016» (Красновидово, Россия, 2016); XIII Всероссийской

научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 2016); I Всероссийская молодёжная школа-конференция “Успехи синтеза и комплексообразования” (Москва, Россия, 2016); International conference «Dombay Organic Conference Cluster» (DOCC-2016) (Домбай, Россия, 2016); Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней (Красновидово, Россия, 2017); XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 2017); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017" (Москва, Россия, 2017); The Fourth International Scientific Conference «Advances in Synthesis and Complexing" (Москва, Россия, 2017); VII Молодежная конференция ИОХ РАН (Москва, Россия, 2017); 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry (Дубровник, Хорватия, 2017); 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry «Med Chem Russia 2017» (Казань, Россия, 2017); XV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, Россия, 2018); Всероссийская молодежная научная школа-конференция “Актуальные проблемы органической химии” (Шерегеш, Россия, 2018); V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (Владикавказ, Россия, 2018).

Личный вклад автора. Автор проводил сбор и анализ литературных данных по теме исследования, синтез, выделение и очистку целевых и промежуточных соединений, анализ данных, полученных методами ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии, принимал участие в составлении плана исследований, обсуждении полученных результатов, подготовке их к публикации в научных журналах и их представлении на научных конференциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант №14-34-00017), РФФИ (проект №18-33-01237\18), Сколковского института науки и технологий (договор № 182-MRA от 01.10.2013 г).

2. Обзор литературы

В начале XX века Пауль Эрлих сформулировал концепцию «*magic bullet*», идеального лекарства, способного действовать исключительно на пораженные ткани и клетки, не причиняя вреда здоровым [8]. Эта идея легла в основу нового направления медицинской химии – нацеленного (направленного, адресного) транспорта лекарственных молекул. Данный подход предполагает селективное размещение активного вещества в выбранной цели в действенной концентрации, что позволяет снизить общий токсический эффект и увеличить эффективность действия препарата [9]. Данной теме посвящен ряд обзорных статей [10,11], монографии [1], специальные выпуски научных периодических изданий (например, 161 том *Journal of Controlled Release*, 2012 год [12]).

Избирательность действия препарата достигают разными путями. В 1950-1980 гг. на заре исследований по направленному транспорту лекарственных средств, внимание ученых было в основном сосредоточено на разработке «механических» способов доставки (кремы и гели для наружного применения, трансдермальные системы и импланты, инвазивные инструменты точечного введения) [13]. В 1980-х произошел ряд открытий, который спровоцировал новый виток развития данного направления. Достижения в области биологии, физиологии, генетики и молекулярной биологии показали, что можно использовать индивидуальные особенности строения клеток, органов и тканей. К примеру, в 1986 году Маида и коллеги [14] открыли и исследовали эффект усиленного проникновения и удержания (EPR-эффект от англ. *enhanced permeability and retention effect*), характерный для опухолевых клеток. В результате было предложено использовать для адресной доставки наноформуляции лекарственных средств. За последние 50 лет в качестве носителей противоопухолевых препаратов исследовались разные типы наночастиц (нанотрубки, наногели, липосомы, мицеллы и т.д.), распределение которых в организме контролируют, варьируя размер и форму. Преимущественное накопление таких систем в опухолевых клетках происходит благодаря EPR-эффекту. Так, в начале 90-х годов на рынок фармацевтических товаров было выпущено несколько подобных препаратов направленного действия, например, ДоксилTM (липосомальная форма доксорубицина) [15].

В результате достижений молекулярной биологии и открытия ряда поверхностных рецепторов были предложены системы направленного транспорта

лекарственных средств, нацеленные на конкретную молекулярную мишень. В данном случае тропность системы доставки достигается за счет введения в нее адресных фрагментов, способных селективно взаимодействовать с рецептором. В качестве векторных молекул находят применение низкомолекулярные соединения, пептиды, аптомеры, антитела, которые либо используют для модификации поверхности наноносителя, либо получают на их основе ковалентные конъюгаты с действующим веществом. Для успешной реализации данного подхода необходимо: 1) выявить рецептор, который преимущественно и в больших количествах располагается на поверхности целевых клеток; 2) подобрать лиганд, который будет селективно взаимодействовать с рецептором-мишенью; 3) провести модификацию лекарственного препарата векторным фрагментом, не вызвав при этом ухудшения биологических свойств.

Печень выполняет ряд защитных для организма функций, участвует в процессах дезинтоксикации, является важной частью ретикулоэндотелиальной системы. Она содержит большое количество кровеносных сосудов, особенностью которых является более высокая проницаемость по сравнению с сосудами других органов, поэтому многие лекарства после введения быстро накапливаются в печени. Однако в случае препаратов для химиотерапии гепатоцеллюлярной карциномы их концентрация оказывается недостаточной, а повышение однократной дозы приема ведет к развитию серьезных побочных эффектов.

Существует ряд рецепторов, располагающихся на поверхности гепатоцитов и клеток гепатоцеллюлярной карциномы, которые используют как мишени для направленного транспорта препаратов, например, рецепторы глицирретиновой кислоты, фолатный рецептор и др. [2,16]. Наиболее часто для этих целей находят применение асиалогликопротеиновый рецептор. Способность ASGPR переносить через мембрану высокомолекулярные структуры, его преимущественное расположение на поверхности гепатоцитов и опухолевых клеток печени, высокая степень экспрессии, быстрый цикл регенерации делают его привлекательной мишенью для адресной доставки биологически активных веществ [5]. Известно, что ASGPR может селективно связываться с остатками галактозы и *N*-ацетилгалактозамина, это позволяет осуществлять направленный транспорт с помощью галактозилированных векторных фрагментов [5,17].

2.1. Асиалогликопротеиновый рецептор

Асиалогликопротеиновый рецептор – первый мембранный лектин млекопитающих, описанный Ашвеллом и Мореллом в 60-ых годах 20 века [18,19]. Его биологическая роль заключается в регулировании баланса десилированных гликопротеинов в сыворотке крови. ASGPR эффективно связывается с этими молекулами и посредством эндоцитоза переносит их внутрь клетки, образуя эндосому, где происходит расщепление комплекса субстрат-рецептор, после чего последний высвобождается обратно на поверхность. Данный процесс занимает около 15 минут.

В 1971 году Роджерс и Корнфилд [20], исходя из работ Ашвелла и Морелла, ковалентно соединили белки альбумин и лизозим с гликопротеином асиалофетуином. В экспериментах *in vivo* на крысах было выявлено, что полученные конъюгаты быстро и эффективно захватывались из кровотока преимущественно гепатоцитами. В тоже время, немодифицированные белки способностью проникать в клетки печени не обладали. Таким образом, была впервые продемонстрирована возможность использования ASGPR как мишени для транспорта биологически активных соединений в гепатоциты [21].

На поверхности каждого гепатоцита насчитывается около 500000 сайтов связывания лигандов ASGPR [22]: ~ 90% - на синусоидальной поверхности и ~ 10% - на латеральной [23,24]. Помимо паренхимных клеток печени ASGPR представлен и в других типах клеток, включая перитонеальные макрофаги и моноциты, сперматозоиды, эпителиальные клетки кишечника, а также клетки колоректального рака, образованные в результате метастаз рака печени [25]. Но на поверхности гепатоцитов и опухолевых клеток печени количество рецепторов несравнимо больше. В случае некоторых заболеваний уровень его экспрессии может изменяться. Например, при циррозе печени продукция рецептора составляет 28% по сравнению со здоровыми клетками [26]. Аналогичный эффект наблюдается в условиях диабета и гепатэктомии [27]. Помимо этого, негативное влияние на экспрессию ASGPR оказывают тетрахлорметан, этанол и анти-Fas антитела (антитела апоптоза) [5].

В 2018 году было изучено, насколько сильно оказывает влияние снижение уровня продуцирования рецептора на эффективность направленного транспорта терапевтических препаратов [28]. Для этого авторы измеряли фармакокинетические и фармакодинамические параметры конъюгатов малых интерферирующих РНК и селективного лиганда ASGPR на нескольких животных моделях, характеризующихся

низкой представленностью ASGPR на поверхности клеток (на пример, модель алкогольной болезни печени). Было показано, что даже в случае 50%-ного снижения уровня экспрессии ASGPR терапевтический эффект от препарата сохраняется.

Кроме того, есть данные [29], что уровень экспрессии ASGPR можно повысить добавлением биотина или солей кальция в культуральную среду.

Уровень экспрессии ASGPR в клетках гепатоцеллюлярной карциномы также несколько отличается от нормальных гепатоцитов [30,31]. Так авторами [32] было исследовано 177 гистологических образцов гепатоцеллюлярной карциномы человека на различных этапах развития заболевания. Уровень экспрессии ASGPR в опухолевых клетках на первой стадии заболевания практически не отличался от нормальных гепатоцитов, но падал в более продвинутых случаях. В тоже время в редких случаях наблюдали увеличение продукции рецептора даже на III стадии ГЦК. Таким образом, данные несколько разнятся. Авторы [32] призывают продолжать исследование возможности использования ASGPR как мишени для направленной химиотерапии ГЦК, однако рекомендуют проводить предварительную биопсию перед началом терапии.

ASGPR млекопитающих представлен в виде двух гомологичных субъединиц: главной субъединицы H1 (ASGPR I) и второстепенной – H2 (ASGPR II) [25]. Обе субъединицы включают в себя: N-концевой цитоплазматический домен, трансмембранный домен, внеклеточный связывающий домен и углевод-распознающий домен (Рис. 1а) [33]. Углевод-распознающий домен асиалогликопротеинового рецептора содержит три иона Ca^{2+} . Один из них находится в сайте связывания ASGPR и обеспечивает взаимодействие с терминальными углеводными остатками лигандов, в то время как два других отвечают за целостность структуры (Рис. 1б). Лиганды связываются с углевод-распознающим доменом ASGPR благодаря взаимодействию между гидроксильными группами в 3-ем и 4-ом положениях углеводного скелета с ионом кальция, а распознавание Gal и GalNAc происходит за счет образования дополнительных водородных связей [34].

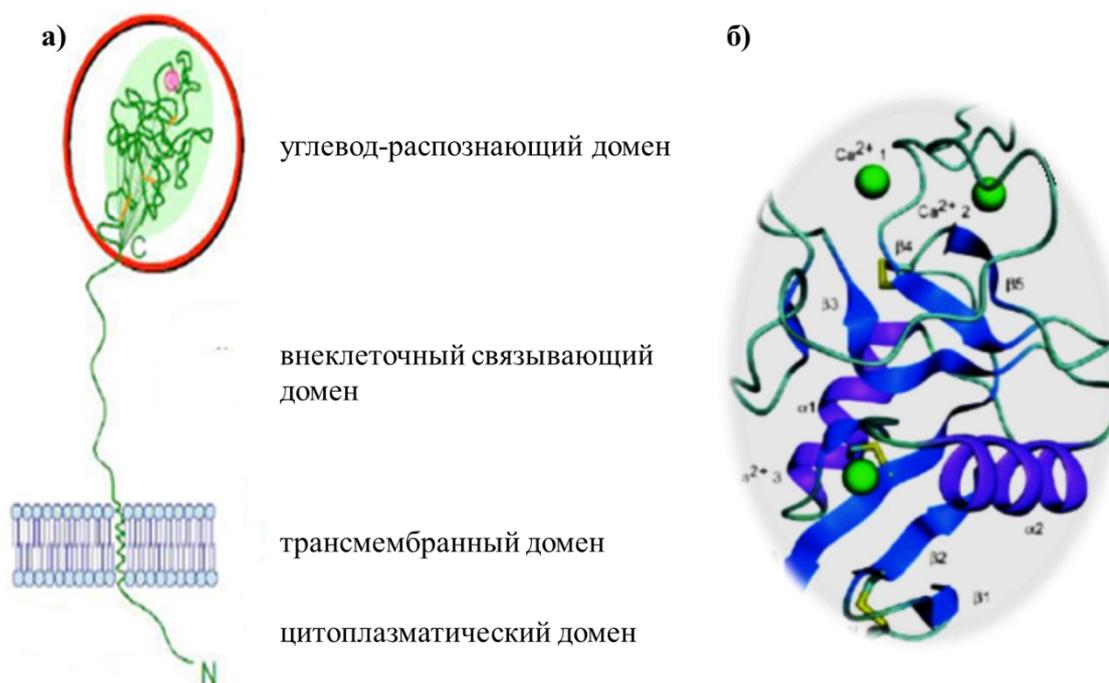


Рис. 1. а) общее строение двух гомологичных субъединиц ASGPR; б) углевод-распознающий домен субъединицы H1 [33].

На поверхности клеток печени ASGPR в основном представлен в виде тримера, состоящего из двух субъединиц H1 и одной H2. Образование такого олигомерного комплекса происходит благодаря переплетению внеклеточных доменов.

2.2. Лиганды ASGPR природного происхождения

Гликопротеины асиалооросомукоид и асиалофетуин – наиболее изученные эндогенные лиганды ASGPR. Оба получены из природных источников и представляют собой сложные разветвленные высокомолекулярные соединения. На одну молекулу асиалооросомукоида приходится 20 остатков галактозы, а асиалофетуин содержит 3 остатка *N*-ацетилгалактозамина и 12 – галактозы. Оба природных лиганда находят применение для транспорта белков и олигонуклеотидов [35,36]. Однако сложное строение и высокая молекулярная масса делают нецелесообразным их использование для доставки низкомолекулярных терапевтических препаратов.

Помимо гликопротеинов в качестве векторных фрагментов для транспорта посредством ASGPR можно применять и другие природные соединения, например, арабиногалактан [5], пуллулан [37] или β -ситостерол- β -D-глюкозид (Sito-G) [38] (Рис. 2). Арабиногалактан – полисахарид, состоящий в основном из остатков галактозы, выделенный из *Larix occidentalis* (Лиственница западная), был одобрен FDA (от англ. *Food and Drug Administration* –

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) в качестве диетических волокон. Лиганд демонстрирует хорошее связывание с ASGPR, но достаточно быстро выводится из организма почками. Другой полисахарид, пуллулан, несмотря на то, что состоит из остатков глюкозы, также связывается с ASGPR, хотя и хуже, чем арабиногалактан или асиалофетуин. Пуллулан получают из крахмала. Этот полисахарид нетоксичен, не канцерогенен, одобрен FDA. Sito-G был выделен из соевых бобов. Учитывая его строение (молекула содержит гидрофильную и гидрофобную часть), Sito-G обычно используют для получения липосом или мицелл, декорированных остатками глюкозы [38].

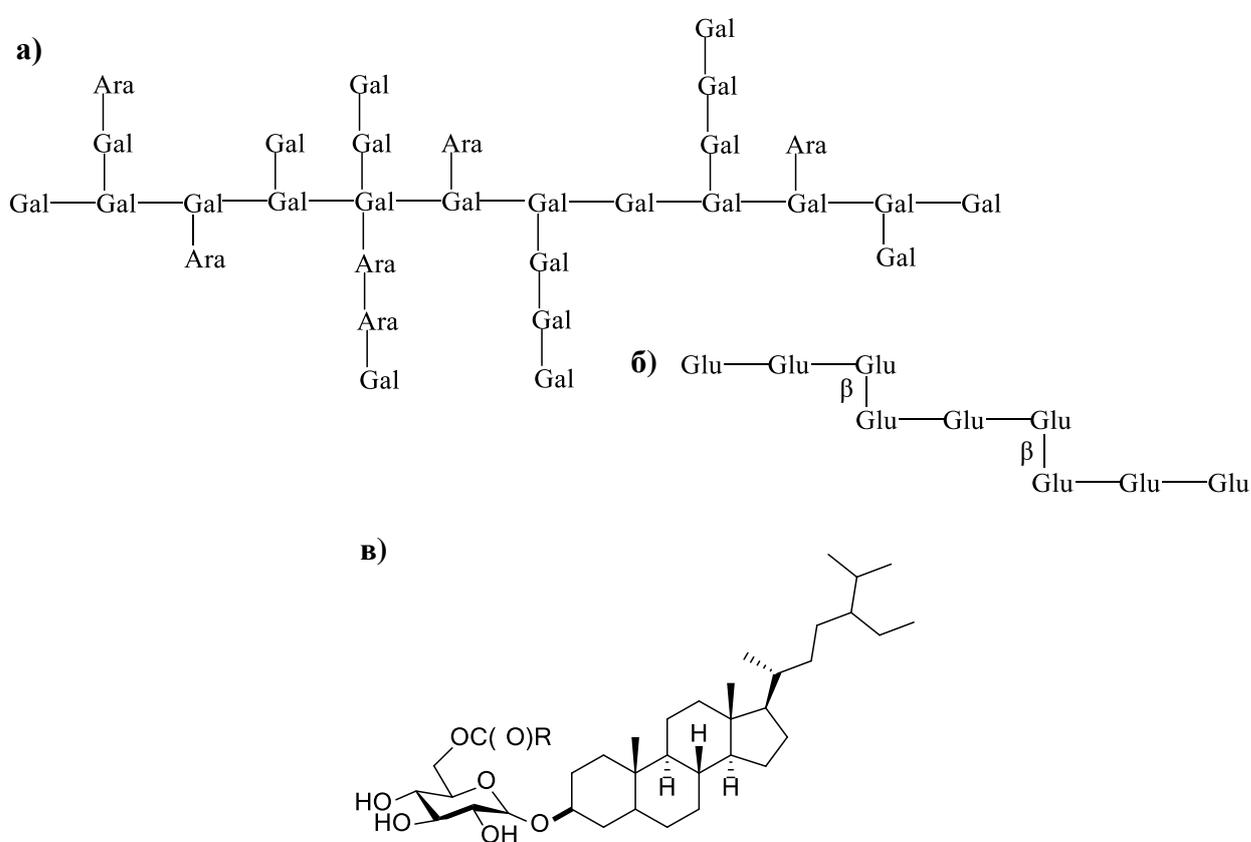


Рис. 2. Природные соединения, которые находят применение для доставки лекарственных препаратов посредством ASGPR: а) арабиногалактан; б) пуллулан; в) sito-G.

Однако по сравнению с описанными выше гликопротеинами и полисахаридами наибольшее распространение для создания систем направленного транспорта лекарств в гепатоциты *via* ASGPR получили моно- и дисахариды (D-галактоза, D-галактозамин, N-ацетил-D-галактозамин, лактоза) и их производные (например, лактобионовая кислота) (Рис. 3).

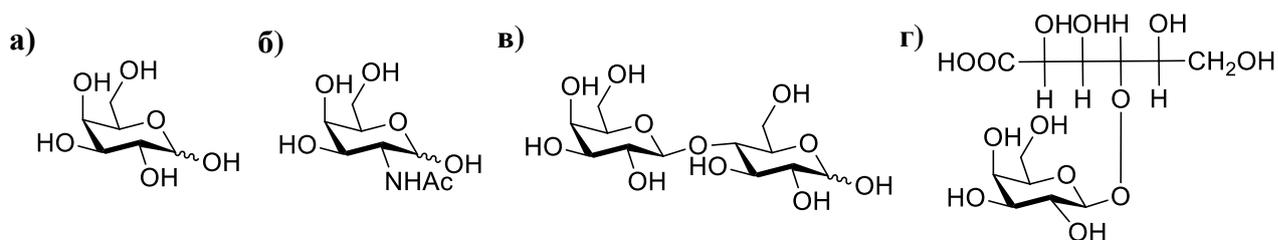


Рис. 3. Моно- и дисахариды, способные связываться с ASGPR: а) галактоза; б) *N*-ацетилгалактозамин; в) лактоза; г) лактобионовая кислота.

Поскольку углеводы являются эндогенными соединениями, предполагается, что их введение в лекарственную молекулу не станет причиной появления новых побочных эффектов. Кроме того, такая модификация в ряде случаев помогает значительно повысить гидрофильность соединения, что может быть очень полезно при дизайне пролекарств противоопухолевых препаратов, обладающих низкой растворимостью в водных средах [39].

Часто вышеупомянутые углеводы используют для синтеза гликозилированных полимеров или липидов, из которых далее формируют наноразмерные системы для транспорта терапевтических молекул [40 - 44].

2.3. Синтетические лиганды ASGPR

В последние два десятилетия большое внимание ученых было уделено разработке синтетических лигандов асиалогликопротеинового рецептора разветвленного строения, содержащих несколько углеводных остатков [45]. Такие структуры демонстрируют большую селективность по отношению к ASGPR, что связано с особенностями его строения.

Константы связывания разветвленных гликопротеинов асиалооросомукоида и асиалофетуина с ASGPR равны соответственно 1.7 нМ и 17 нМ [24], в то время как аналогичные величины для молекул галактозы и *N*-ацетилгалактозамина находятся в среднем микромолярном диапазоне [46]. Причина такого различия в аффинности кроется в так называемом «кластерном эффекте», источником которого является олигомерность асиалогликопротеинового рецептора (на поверхности клеток ASGPR существует в виде тримера, образованного из близкорасположенных двух H1- и одной H2-субъединиц). Вследствие этого, сайты связывания в углевод-распознающих доменах оказываются в пространстве на расстоянии 15-25 Å, образуя треугольник (Рис. 4) [47].

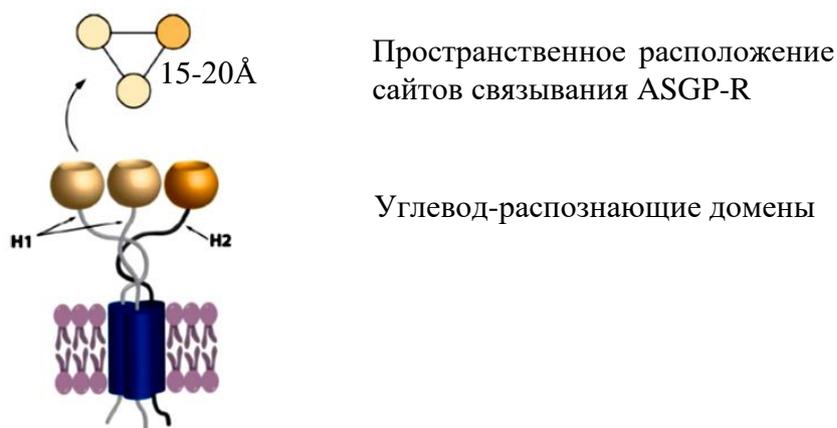


Рис. 4. Схематическое строение олигомерного комплекса ASGPR [45].

«Кластерный эффект» заключается в усиленном связывании с рецептором разветвленных молекул, содержащих несколько углеводных остатков, соединенных так, чтобы один углеводный остаток взаимодействовал с одним центром в отдельном углевод-распознающем домене. Значения IC_{50} уменьшаются в ряду для тетра-, три- ди- и моногликозилированных соединений (тетра- \approx три- \gg ди- \gg моно-, $IC_{50} = 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-9}$, 10^{-6} и 10^{-3} М соответственно) [48]. То есть аффинность Gal-содержащих лигандов возрастает на шесть порядков при переходе от моновалентных к тривалентным, однако существенной разницы при переходе к тетравалентным производным не наблюдается. Таким образом, было установлено, что наибольший выигрыш в связывании достигается в случае лигандов, содержащих три углеводных остатка. Такие лиганды могут быть различными, например: разветвленными симметричными (**1a**, Рис. 5), разветвленными асимметричными (**2a**, Рис. 5) или «гребенко-подобными» (**3a**, Рис. 5).

В 1999 году был предложен лиганд, содержащий три остатка галактозы **1a** (Рис. 5), который проявил высокую аффинность по отношению к ASGPR [49], а в 2012 году компания *Alnylam Pharmaceutical* усовершенствовала его, заменив углеводный остаток на *N*-ацетилгалактозамин **2a** (Рис. 5) [50]. На основе лиганда **2a** были получены конъюгаты с терапевтическими молекулами (*mi*РНК) [51], которые на сегодняшний день находятся на второй фазе клинических испытаний для лечения генетических заболеваний печени [16]. Такие олигонуклеотида-углеводные конъюгаты показали значительные преимущества при проникновении в клетки и распределении в организме *in vivo*, низкую токсичность и иммуногенность, даже в высоких концентрациях. Но самым главным свойством таких производных оказалась высочайшая селективность и быстрое проникновение в гепатоциты.

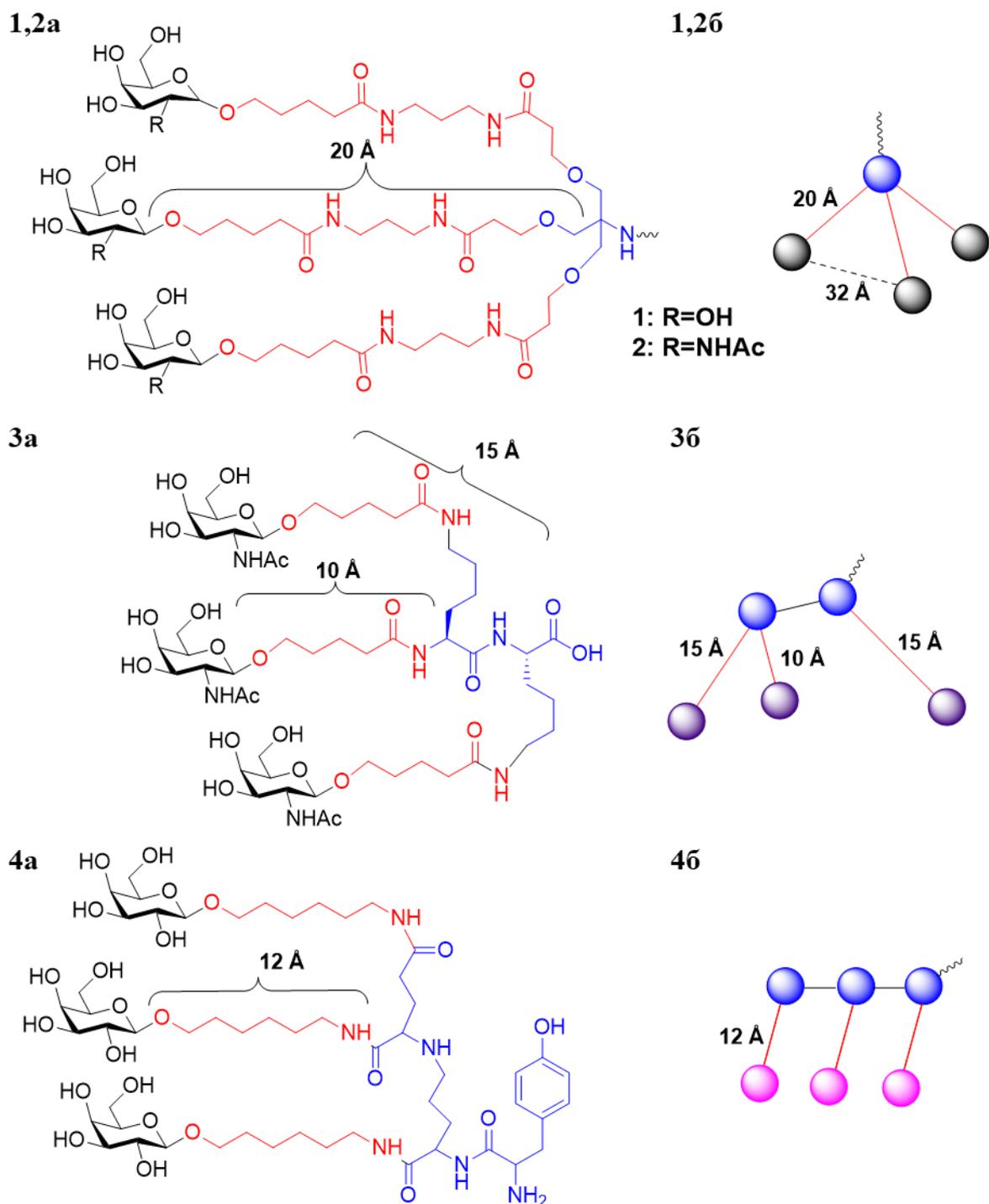


Рис. 5. а) Примеры структур разветвленных лигандов, содержащих три углеводных остатка; б) их схематические изображения (**1a** [49], **2a** [50], **3a** [52], **4a** [53]).

Синтез лиганда **2a** основан на последовательном добавлении структурных звеньев к трис(гидроксиметил)аминометану (TRIS) (Схема 1). На каждой стадии образуется смесь моно-, ди- и трипроизводных, требующая хроматографического разделения соединений, близких по свойствам.

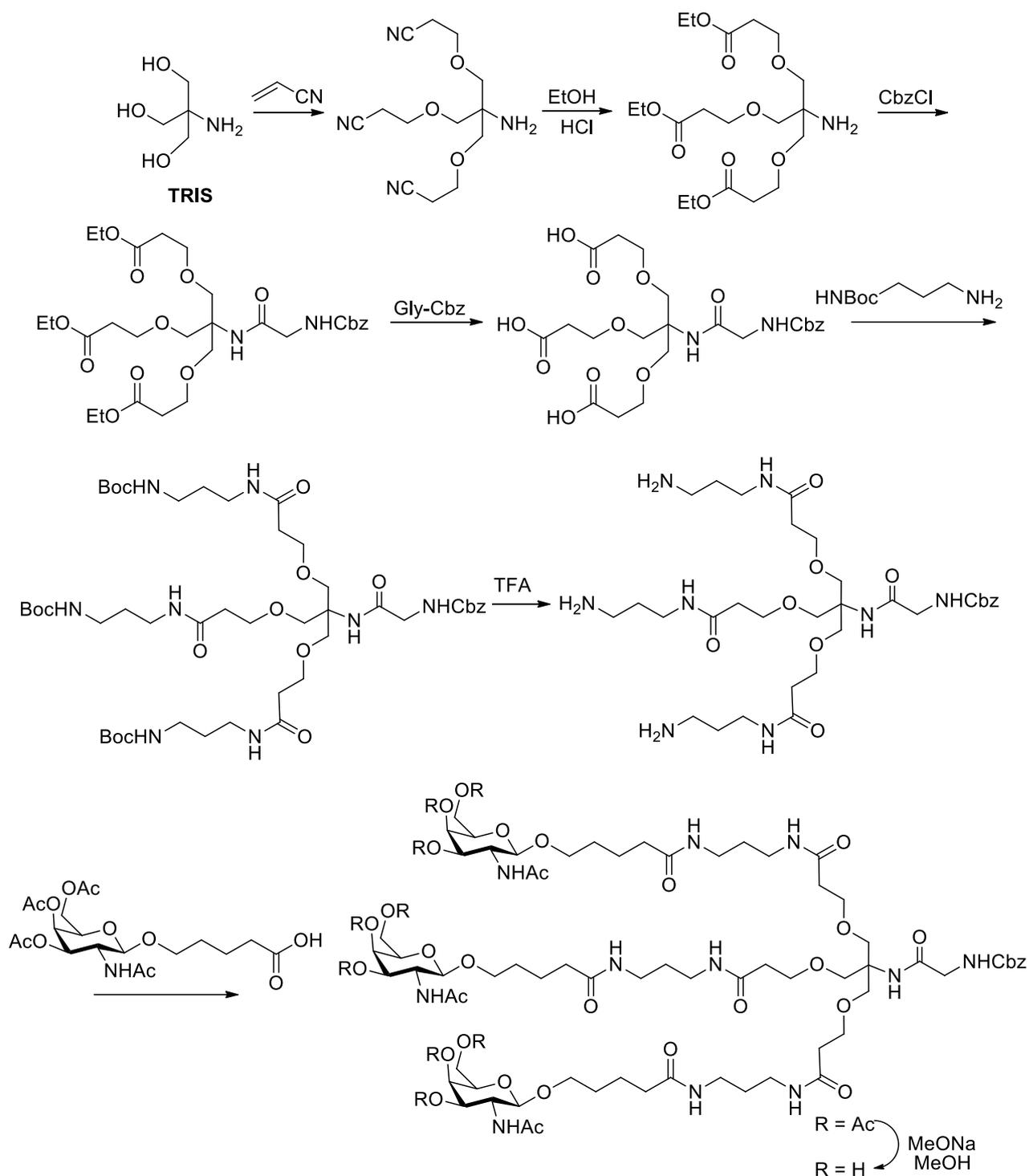


Схема 1.

Помимо этапов, представленных на схеме, синтез осложнен дополнительными синтетическими шагами, которые надо предпринять, чтобы ввести в молекулу линкер с функциональной группой для дальнейшего конъюгирования с действующим веществом. Таким образом, синтез лигандов, подобных соединению **2a** – сложный многостадийный процесс, использование которого редко бывает оправдано. В связи с этим ведутся исследования, направленные на оптимизацию синтетических подходов к таким структурам, а также поиск альтернативных лигандов.

едавно было предложено соединение с упрощенной структурой (Рис. 6) [54]. Ряд биологических *in vitro* и *in vivo* исследований не выявил существенной разницы в связывании с ASGPR его и известного лиганда **2a**. Для обоих лигандов были получены примерно одинаковые значения K_i , IC_{50} и ED_{50} .

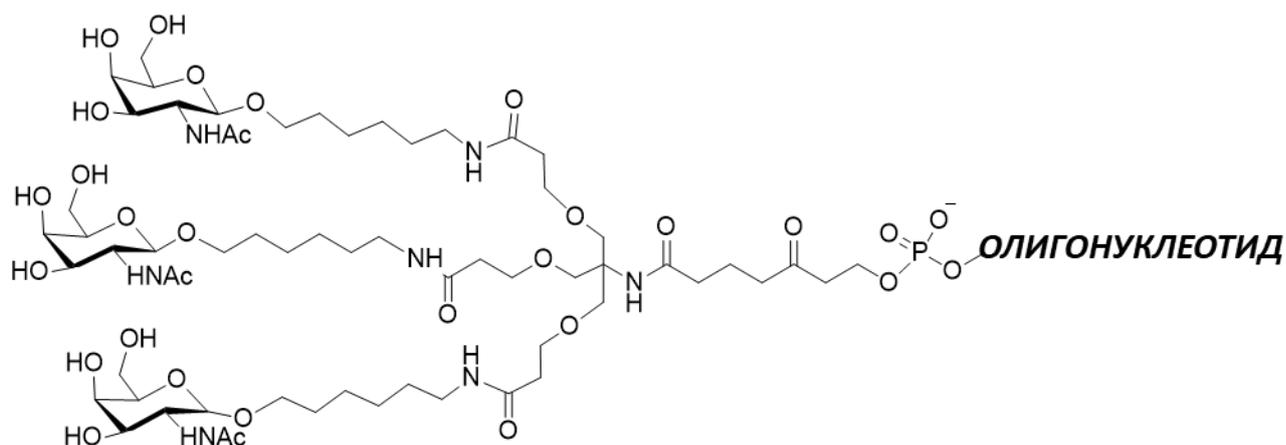


Рис. 6. Конъюгаты лиганда ASGPR, полученные в работе [54].

Переход к лигандам с последовательно соединенными углеводными остатками вместо симметричных разветвленных лигандов позволил не только сократить синтетический путь на пять стадий, но и применить удобный в исполнении твердофазный синтез (Схема 2) [55]. Однако полученные лиганды значительно уступали по биологическим свойствам лиганду **2a**.

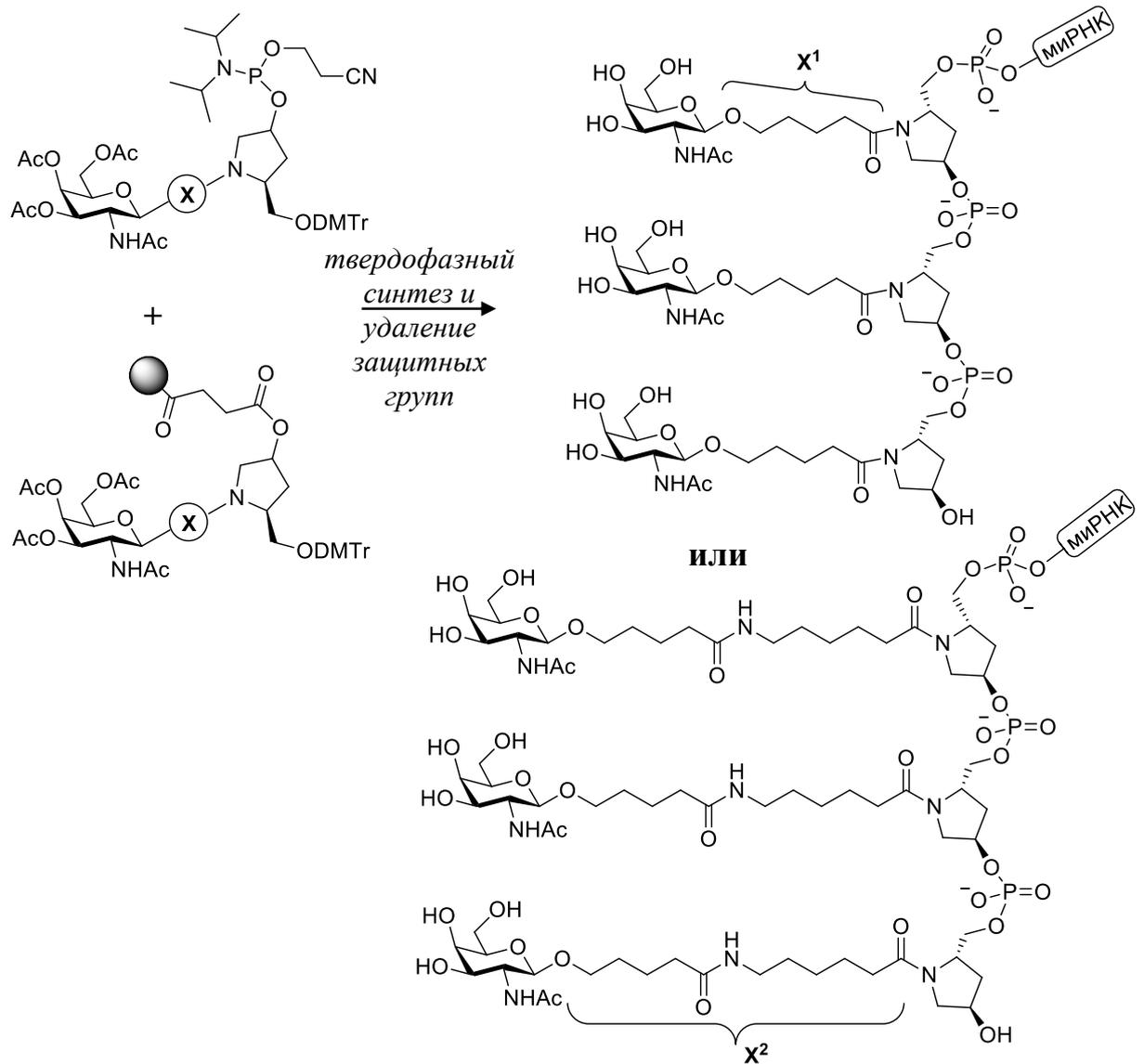


Схема 2.

Интересная идея была выдвинута группой французских ученых [56- 58]. Они синтезировали трех- и четырехвалентные гликоконъюгаты, используя в качестве центрального фрагмента само действующее вещество: в данном случае цистеин-содержащие пептиды, способные эффективно хелатировать ионы меди (+1), избыток которых образуется в гепатоцитах при развитии болезни Вильсона (Схема 3). Таким образом, авторам удалось и извлечь выгоду из «кластерного эффекта», и избежать отдельного синтеза многовалентного лиганда. Однако, к сожалению, такой подход лишен универсальности.

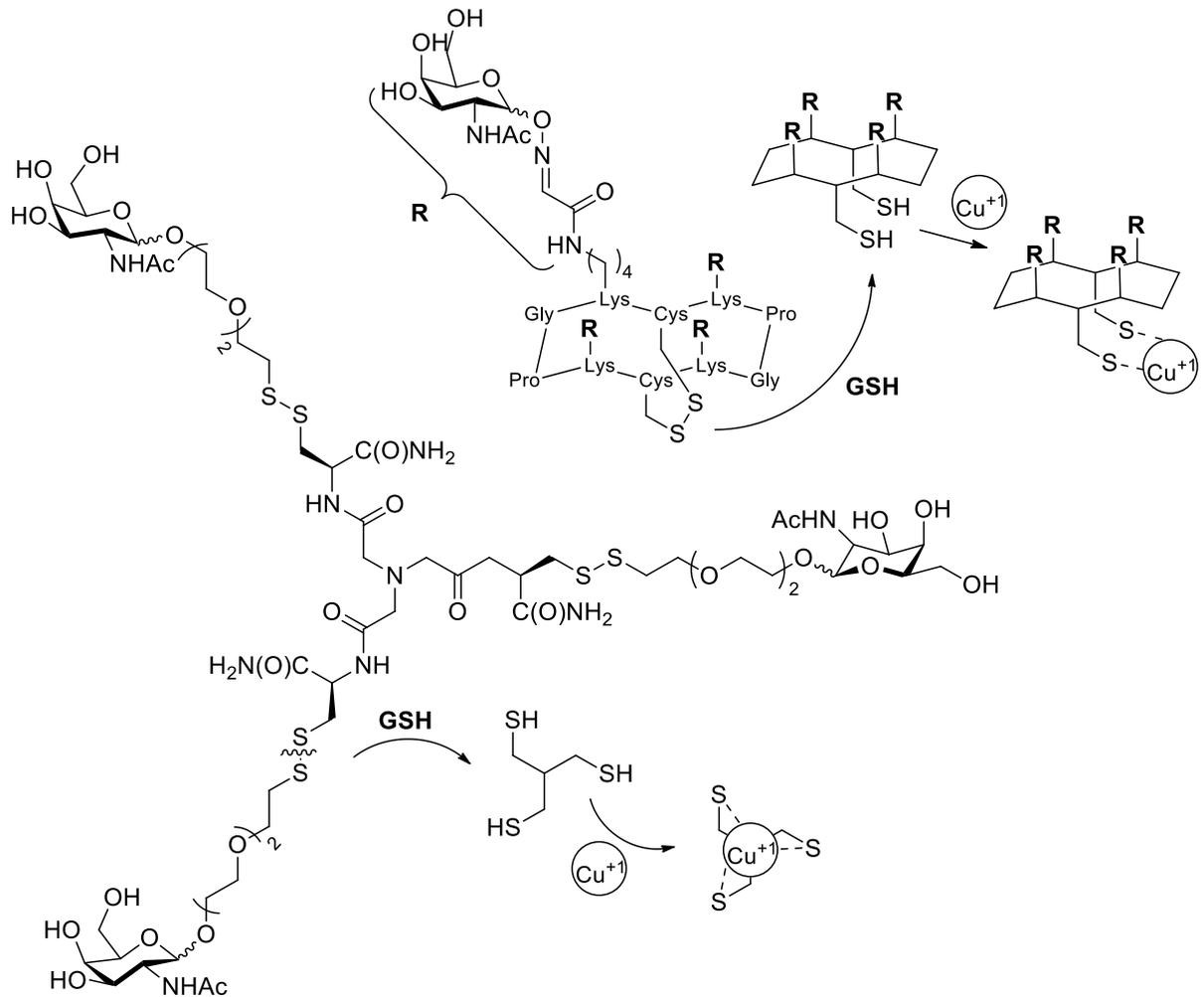


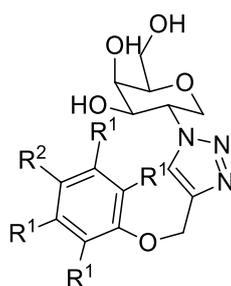
Схема 3.

Большинство из разработанных и исследованных синтетических лигандов с несколькими углеводными остатками, а также некоторые из их конъюгатов с терапевтическими препаратами подробно обсуждены в недавнем обзоре [45]. В результате анализа ряда структур авторы [45] сделали следующие выводы: 1) соединения на основе *N*-ацетилгалактозамина демонстрируют лучшее связывание с рецептором в сравнении с производными галактозы; 2) определяющую роль играет геометрическое расположение углеводных остатков: разветвленные симметричные/асимметричные лиганды лучше «подстраиваются» под сайты связывания ASGPR, чем последовательно-соединенные «гребенко-подобные» лиганды; 3) важно подобрать оптимальную длину соединяющего углеводные остатки спейсера: считается, что она должна лежать в диапазоне 19-32 Å.

Несмотря на предпринятые модификации, синтез лигандов ASGPR разветвленного строения остается весьма трудоемким. Актуальной задачей является поиск альтернативных соединений, способных связываться с рецептором.

В тоже время работы, посвященные разработке более простых селективных моновалентных лигандов, немногочисленны и направлены на синтез производных галактозы и *N*-ацетилгалактозамина [59-62]. Так, Эрнст и соавторы варьировали заместители во втором положении галактопиранозного цикла (Таблица 1) [61].

Таблица 1. Влияние заместителя во втором положении на связывание с рецептором [61]



R ¹	R ²	IC ₅₀ ±SD (отн. значение)
GalNAc		1.0
-H	-H	1.1±0.2
-H	-CN	0.5±0.1
-H	-NO ₂	0.8±0.2
-F	-F	1.4±0.3
-H	-COONa	8.7
-H		0.9±0.1

Для полученных соединений определили IC₅₀ (методом конкурентного связывания) и K_D (методом поверхностного плазмонного резонанса): три из них проявили большую аффинность по отношению к ASGPR в сравнении с GalNAc. Соединение-лидер (1-(1,5-ангидро-2-дезоксид-D-галактитол-2-ил)-4-(4-цианофенилокси)метил-1,2,3-триазол) было предложено использовать как миметик *N*-ацетилгалактозамина в синтезе систем для направленного транспорта в гепатоциты.

Представителями компании *Pfizer* опубликованы две работы по теме низкомолекулярных лигандов - ASGPR-миметиков углеводов. В статье 2012 года [62] авторы исследовали 82 соединения, варьируя заместители в первом, втором и пятом положениях углеводного цикла (Рис. 7). Они установили, что замена ацетамидной группы во втором положении на трифторацетамидную увеличивает сродство к рецептору, такое же влияние оказывает аллильный фрагмент в первом положении. Объемные заместители в шестом положении не сильно ухудшают связывание, а иногда даже улучшают его. В итоге авторам удалось получить ряд высоко аффинных лигандов ASGPR с субмикромольными значениями констант диссоциации комплекса рецептор-лиганд.

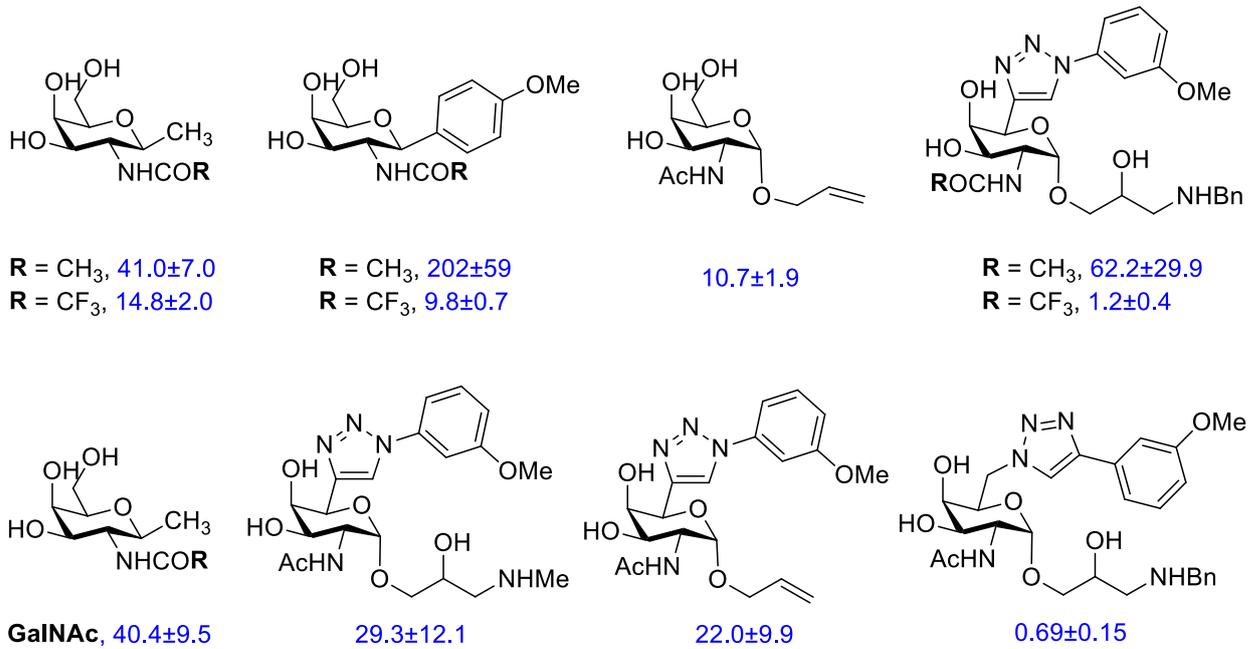


Рис. 7. Некоторые из соединений, синтезированных в статье [62]. Синим показана константа диссоциации комплекса рецептор-лиганд, измеренная методом поверхностного плазмонного резонанса (K_D , мкМ).

Этот же коллектив авторов в 2017 году предложил новый «компактный» лиганд ASGPR, представляющий собой бициклический ацеталь (Рис. 8) [63].

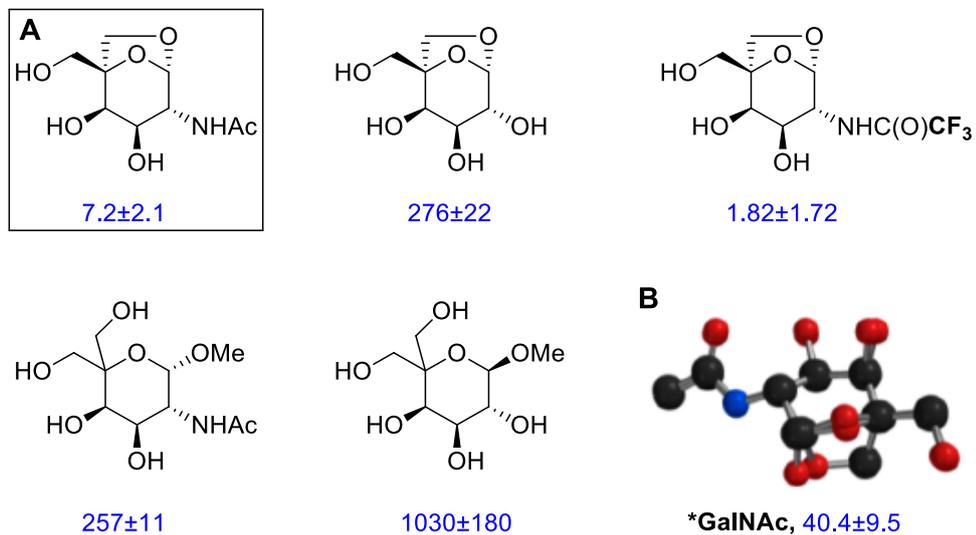


Рис. 8. А - лиганды ASGPR, предложенные в статье [63]. Синим – константа диссоциации комплекса рецептор-лиганд (K_D , мкМ), вычисленная по формуле $K_D = 1/K_{ads}$, где K_{ads} – коэффициент Лэнгмюра, измеренный методом поверхностного плазмонного резонанса. В – суперпозиция двух структур: предложенного лиганда и GalNAc.

Исследование связывания с рецептором ряда похожих соединений показало, что введение второго цикла благоприятно влияет на связывание. Как и в предыдущей работе, замена ацетамидной группы на трифторацетамидную приводила к снижению константы диссоциации, однако авторы не были уверены в стабильности трифторацетильных производных в физиологических условиях, поэтому дальнейшие биологические испытания проводили с *N*-ацетильным производным.

Авторы выявили, что алкилирование полученного соединения по шестому положению не влечет снижения аффинности. Опираясь на этот факт, было предложено получать на основе нового углеводного производного разветвленные лиганды (Рис. 9).

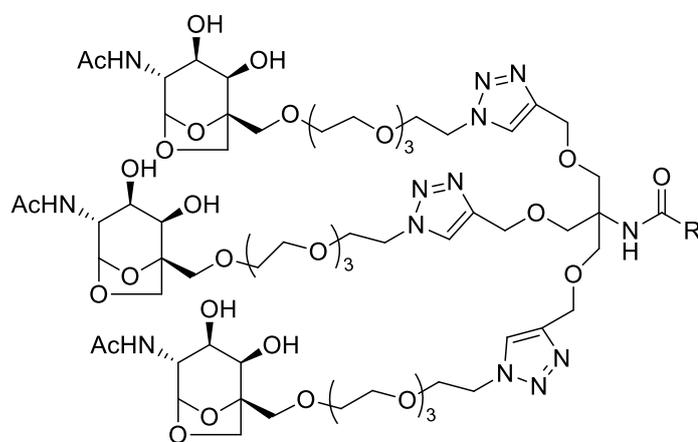


Рис. 9. Лиганд ASGPR, предложенный в работе [63].

Исследование распределения в организме животных лигандов, конъюгированных с флуоресцентным красителем, показало, что тривалентные производные «компактного» миметика *N*-ацетилгалактозамина эффективнее накапливаются в гепатоцитах и дольше в них удерживаются в сравнении с аналогичными соединениями на основе самого GalNAc. Однако хотелось бы отметить, что и в данном случае улучшение биологических свойств лигандов удалось достичь, только существенно усложнив их синтез.

2.4. Ковалентные конъюгаты лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленного транспорта противоопухолевых препаратов

Наиболее распространенным видом первичных злокачественных новообразований печени является гепатоцеллюлярная карцинома [3,64,65]. Данное заболевание с трудом поддается лечению: только в 1 случае из 5 удается достичь положительный отклик на химиотерапию.

Среди систем для адресной доставки противоопухолевых препаратов в клетки ГЦК особенно заметно доминирование наноразмерных носителей [6]. Например, для направленного транспорта паклитаксела были получены модифицированные галактозой наночастицы силикагеля (Рис. 10) [66].

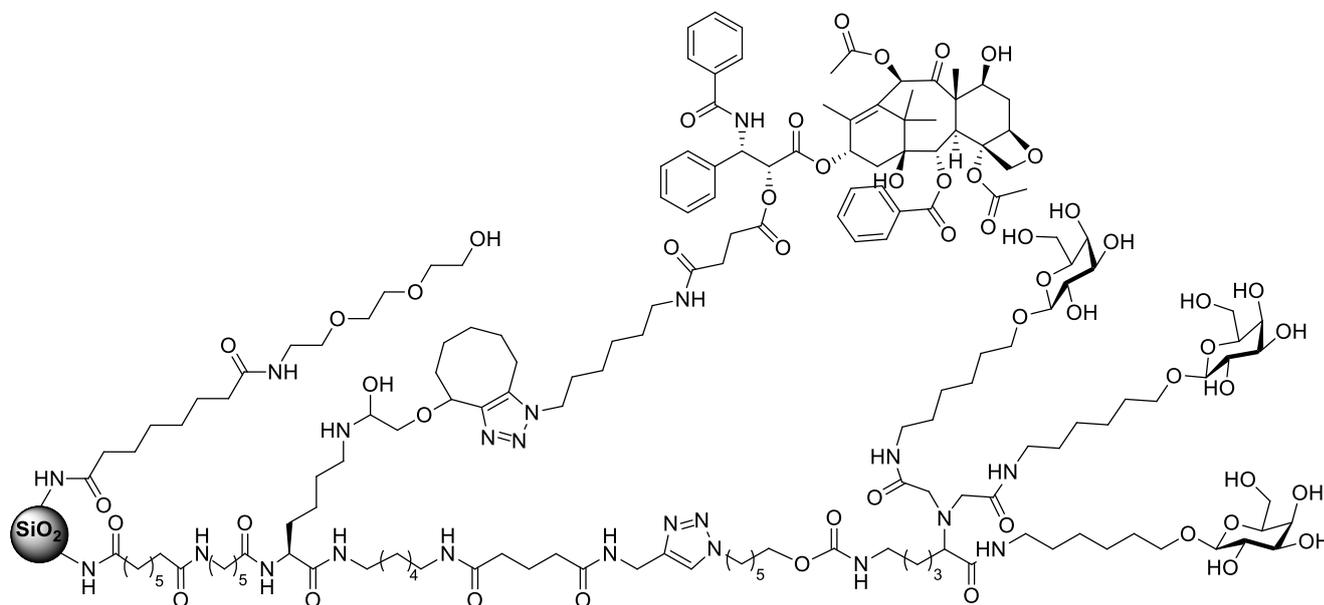


Рис. 10. Структура системы для направленного транспорта паклитаксела на основе наночастиц силикагеля [67].

Также, в литературе описано соединение **PK2**, которое исследовалось в первой фазе клинических испытаний для терапии рака печени [67]. Оно представляет собой систему (полимерный конъюгат) для направленного транспорта доксорубина на основе поли-*N*-(2-гидроксипропил)-метакриламида, функционализированного D-галактозамином (Рис. 11).

На примере с **PK2** было показано, что использование галактозного остатка способствует проникновению препарата в клетки ГЦК и гепатоциты, снижает негативное воздействие на другие органы [32,67,68], к сожалению, в нормальных гепатоцитах **PK2** накапливался в 5 раз сильнее, чем в опухолевых клетках, но авторы [32] высказали предположение, что данную проблему можно решить, если использовать для химиотерапии препараты, оказывающие большее действие на активно пролиферирующие клетки.

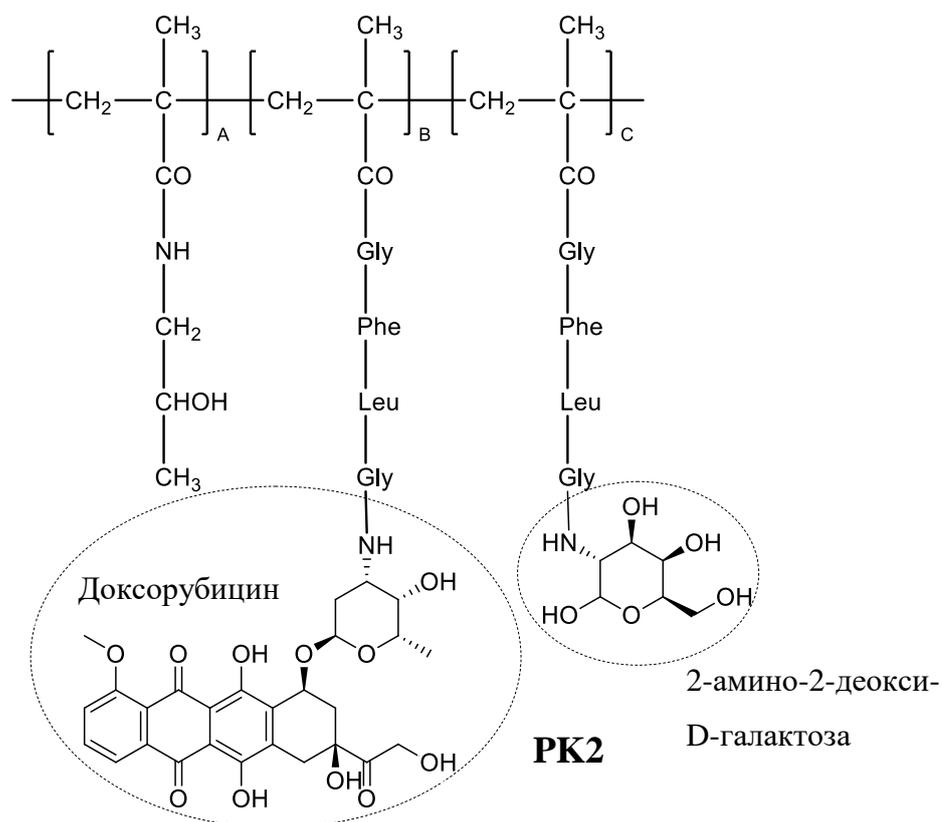


Рис. 11. Структура полимерного конъюгата **PK2**. А = 96.1 моль%, В = 2.4 моль%, С = 1.5 моль% [67].

В общем случае у наноразмерных носителей, подобных **PK2**, есть ряд и других недостатков. Например, известно, что системы, содержащие остатки D-галактозы, с размером более 15 нм в основном захватываются клетками Купфера (макрофаги печени), а не гепатоцитами и опухолевыми клетками печени.

В сравнении с наноносителями примеры ковалентных конъюгатов противоопухолевых препаратов и лигандов ASGPR немногочисленны, многие из них появились в последние годы [63,69]. Однако есть и более ранние: так, в конце 90-ых годов для снижения общей токсичности известного препарата 5-фторурацила было предложено использовать для лечения гепатоцеллюлярной карциномы его галактозилированный аналог **OGT 719** (1-галактопиранозил-5-фторурацил) (Рис. 12) [70].

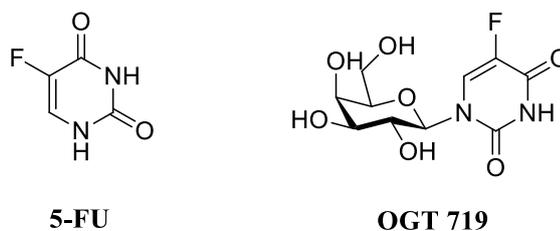


Рис. 12. Структуры 5-фторурацила (**5-FU**) и 1-галактопиранозил-5-фторурацил (**OGT 719**).

В *in vitro* тестированиях было продемонстрировано, что полученное соединение оказывает цитотоксическое действие по отношению к ASGPR-экспрессирующим клеточным линиям, а биологические испытания *in vivo* на ксенографтных мышинных моделях гепатомы человека показали, что при внутрибрюшинном введении **OGT 719** способствует торможению роста опухоли и увеличивает время выживания животных. Для препарата были инициированы клинические испытания, однако его использование не приводило к уменьшению размеров опухолей, в связи с чем дальнейшее изучение было остановлено [71]. Пожалуй, пока это единственный ковалентный конъюгат низкомолекулярного противоопухолевого препарата и лиганда ASGPR, дошедший до стадии клинических испытаний.

В 2014 году был описан конъюгат, содержащий в своем составе камптотецин (противоопухолевый препарат), нафталимид (флуоресцентный краситель) и остаток *D*-галактозы (Рис. 13) [72].

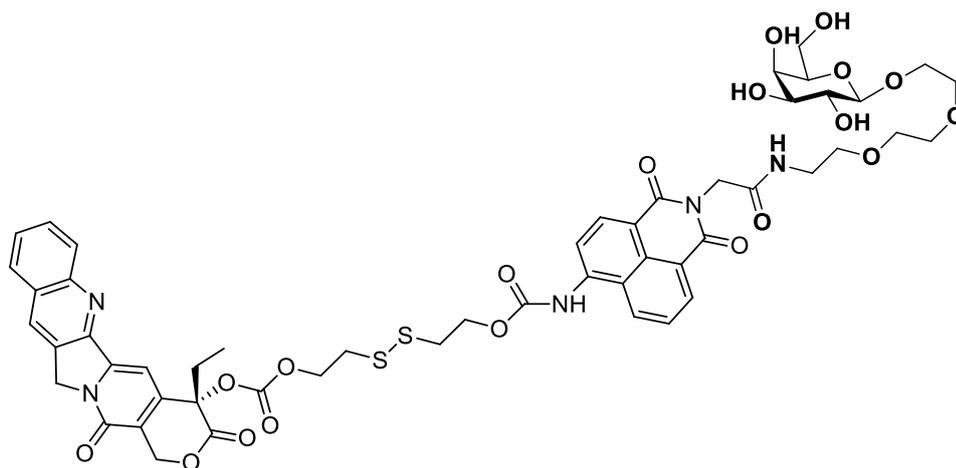


Рис. 13. Конъюгат камптотецина, нафталимида и *D*-галактозы [72].

Данное вещество можно рассматривать как активируемый тераностический агент (тераностика, от англ. *theranostics* – подход к созданию фармацевтических средств, в которых диагностический агент сочетается с терапевтическим). Глутатион (GSH),

концентрация которого в опухолевых клетках выше, чем в здоровых, восстанавливает дисульфидную связь, высвобождая действующее вещество. Кроме того, расщепление дисульфидной связи приводит и к изменению спектра флуоресценции нафталимидного красителя (Схема 4).

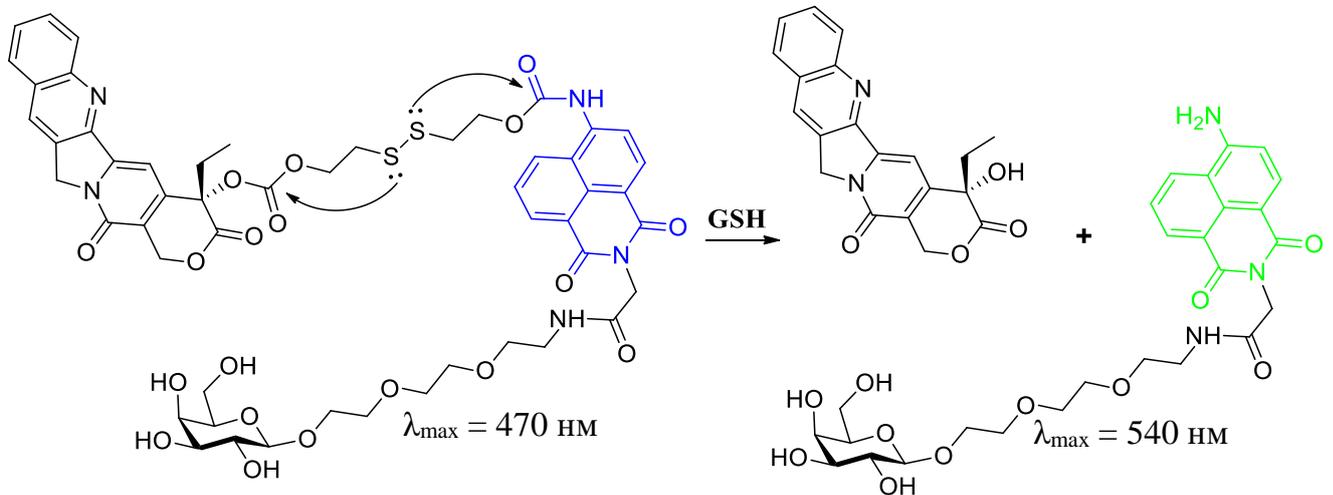


Схема 4.

Данное соединение продемонстрировало селективное проникновение в клетки линии HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека). Также наблюдали смещение спектра флуоресценции в более длинноволновую область. Однако препарат выявил низкую цитотоксичность в отношении целевых клеток. Авторы предполагают, что это связано с тем, что его расщепление происходило в лизосомах, где лизосомальные эстеразы могли дезактивировать молекулу камптотецина путём раскрытия лактонового цикла. Возможно, улучшить биологические свойства конъюгата позволит замена действующего вещества на более устойчивый в физиологических условиях цитостатический препарат.

Японскими авторами был синтезирован конъюгат цисплатина и лиганда ASGPR с четырьмя терминальными остатками галактозы **6** (Таблица 2), цитотоксичность которого исследовали на клеточной линии HepG2 в сравнении с двумя аналогами: с одним углеводным остатком **7** и лигандом, не содержащим галактозный фрагмент **8**. Полученные значения IC_{50} были того же порядка, что и для немодифицированного цисплатина, при этом наилучший результат показал именно конъюгат **6** [73]. Специальных исследований проникновения веществ в клетки в работе не проводили.

Таблица 2. Конъюгаты цисплатина и значения цитотоксичности, измеренные на клеточной линии НерG2 [73].

R	№	IC ₅₀ , M
	6	$2.3 \cdot 10^{-4}$
	7	$3.1 \cdot 10^{-4}$
H	8	$10.5 \cdot 10^{-4}$
	цисплатин	$0.4 \cdot 10^{-4}$

Совсем недавно была предпринята попытка использовать для направленного транспорта 5-фтор-2'-дезоксифуридина в клетки гепатоцеллюлярной карциномы лиганд ASGPR, содержащий три остатка GalNAc (Рис. 14) [74].

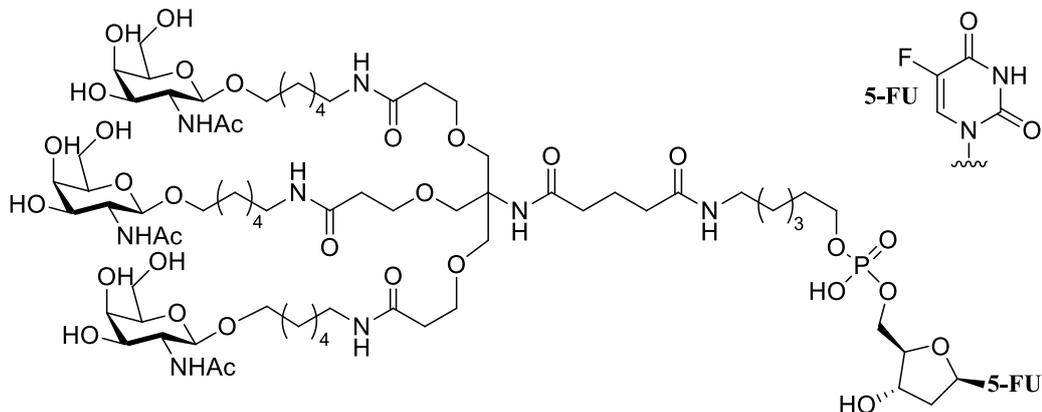


Рис. 14. Конъюгат 5-фтор-2'-дезоксифуридина и разветвленного лиганда ASGPR [74].

При разработке дизайна конъюгата (выборе линкера) авторы отталкивались от своего опыта работы с конъюгатами антисмысловых олигонуклеотидов и GalNAc-содержащих лигандов ASGPR. Введением фосфоэфирной связи они надеялись повысить эффективность препарата (Схема 5). Известно, что для обеспечения своего цитотоксического действия 5-фтор-2'-дезоксифуридин при попадании в клетку должен подвергнуться действию киназ, обеспечивающих его фосфорилирование. Использование же непосредственно фосфорилированного 5-фтор-2'-дезоксифуридина затруднено из-за его низкой устойчивости в организме [75].

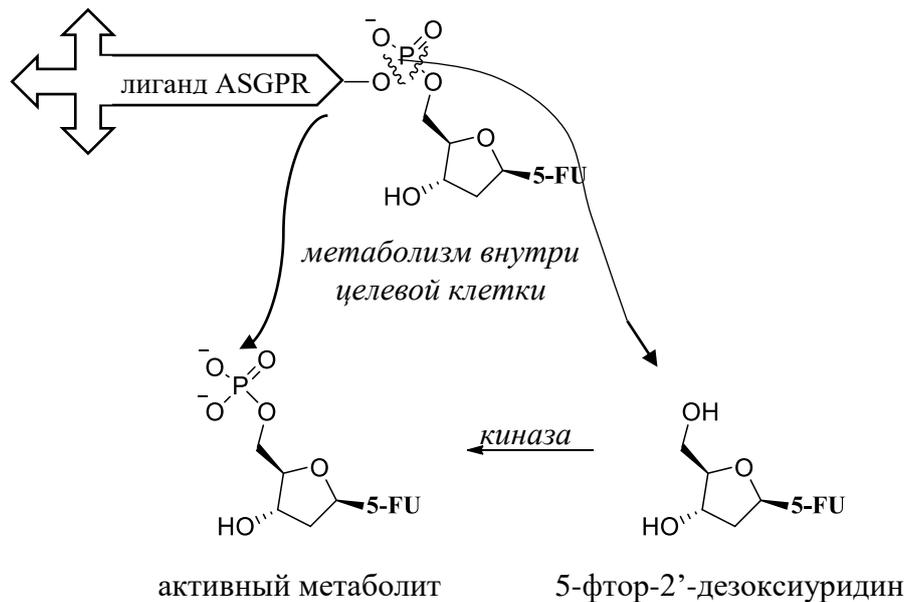


Схема 5.

Для синтеза целевого соединения авторами были получены два основных фрагмента: Вz-защищенный 5'-фосфорамидит 5-фтор-2'-дезоксифуридина и лиганд ASGPR с терминальной OH-группой (Схема 6). Соединение двух фрагментов привело к формированию фосфорамидита, который подвергли окислению действием йода. После удаления защитных групп раствором аммиака выделяли конечный продукт.

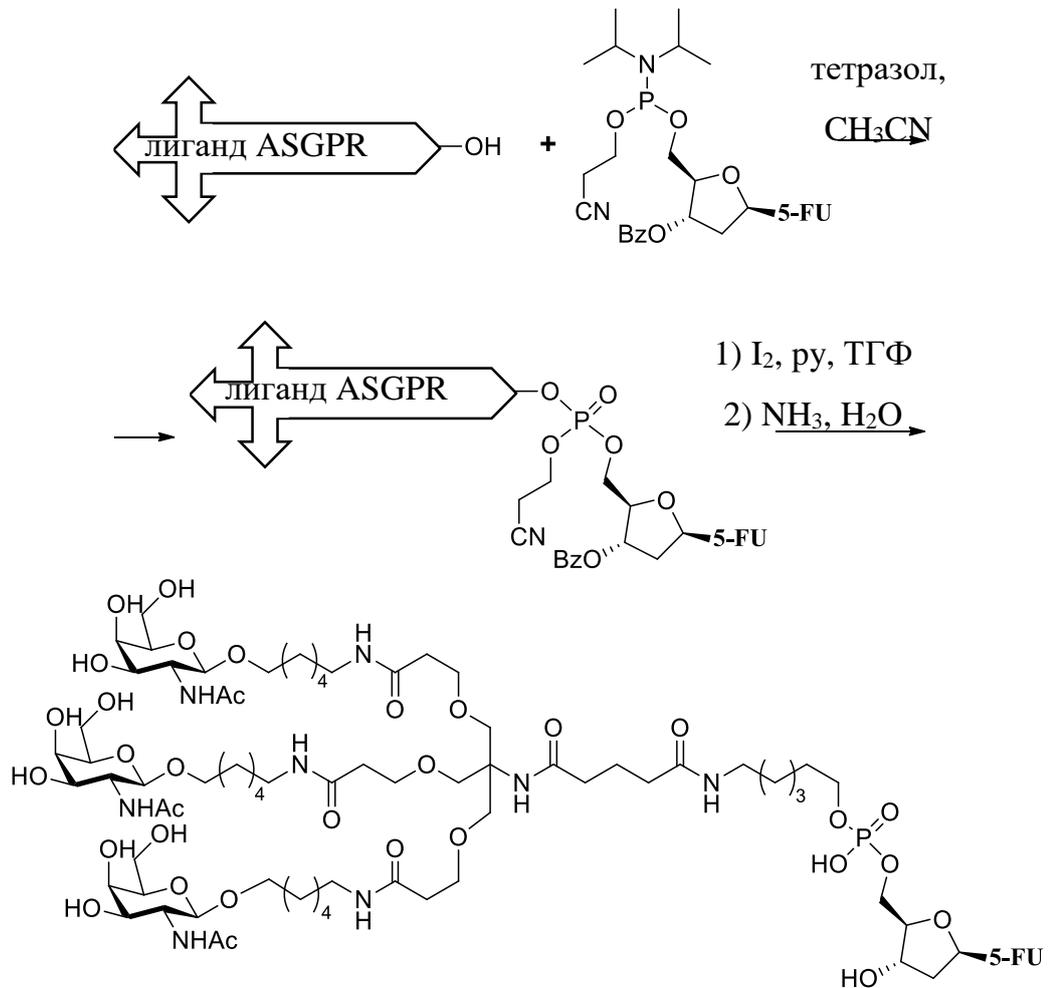


Схема 6.

In vitro исследование цитотоксичности конъюгата проводили на клеточной линии НерG2. Полученное соединение показало схожие результаты в сравнении с немодифицированным 5-фтор-2'-деоксиуридином, лишь немногим уступая ему. Подводя итог, авторы отмечают, что рецептор-опосредованная адресная доставка низкомолекулярных терапевтических агентов хотя и не может привести к повышению эффективности их действия в *in vitro* экспериментах, однако, вероятнее всего, позволит существенно улучшить терапевтический индекс в *in vivo* испытаниях за счет лучшего распределения по тканям организма и снижения побочных эффектов.

2.5. Подходы к синтезу пролекарств паклитаксела

Противоопухолевая активность паклитаксела (Таксол™, PXL) (Рис. 15) известна с 1971 года. Действие препарата основано на блокировании процесса деления клеток: при попадании в клетку паклитаксел способствует полимеризации тубулина и приводит к образованию стабилизированных микротрубочек, которые не могут далее выполнять

свои функции на стадии митоза. Это приводит к неспособности клетки образовывать веретено деления в профазе митоза и к запуску процесса программируемой смерти клетки – апоптозу [76]. Поступление препарата на фармацевтический рынок позволило значительно увеличить продолжительность жизни пациентов, однако нельзя не отметить ряд недостатков Таксола. Прежде всего, внутривенное введение PXL осложнено его плохой растворимостью в водных средах, поэтому приходится прибегать к использованию солюбилизаторов, которые делают процесс введения длительным и снижают противоопухолевую активность препарата. Кроме того, в ряде случаев не удается достичь оптимальной концентрации PXL в опухолевых клетках, а повышение однократной дозы приема сопряжено с развитием тяжелых побочных эффектов.

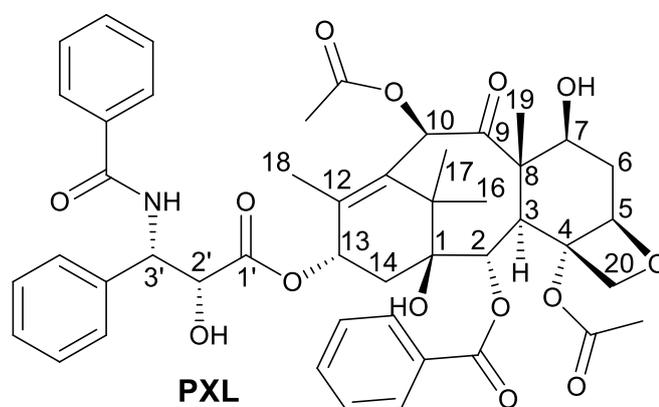


Рис. 15. Структура противоопухолевого препарата паклитаксела.

Существует два основных способа оптимизации фармакокинетических параметров паклитаксела: 1) разработка формуляций, например, инкапсулирование действующего вещества в липосомы или мицеллы; 2) синтез новых производных, например, путем введения гидрофильных или направляющих фрагментов. В случае создания пролекарств важным моментом является выбор подходящей функциональной группы для модификации действующего вещества. На данный момент описано большое количество различных производных паклитаксела, определены важные для проявления цитостатических свойств фрагменты молекулы. Результаты исследований, посвященных пролекарствам паклитаксела, были собраны в ряде обзорных статей [77,78].

Модификация таксанового скелета. Наиболее полно результаты работ, посвященных модификации скелета паклитаксела, изложены в обзорной статье [79]. Так, ацетоксильный заместитель в положении С4 паклитаксела и его аналогов [80,81], оксетановый цикл [82,83] и наличие и стереохимия бензоильной группы в положении С2 [84] критически важны для тубулин-связывающих свойств паклитаксела. Наличие же

и конфигурация гидроксильных групп в положениях **C7** и **C10** несущественны для проявления соединением противоопухолевой активности, что было показано при исследовании встречающихся в природе таксанов [85,86], а модификация данных гидроксильных групп не приводит к снижению активности у получаемых аналогов [87].

Модификация боковой цепи. Позиция **C13** в таксановом скелете паклитаксела связана с производным фенилизосерина. Модификация ацильного заместителя при аминогруппе **C3'** не критична для проявления антипролиферативной активности: так, более мощный и используемый в клинической практике аналог паклитаксела – доцетаксел – был получен путём введения защитной Вос-группы по данному положению.

В случае модификации гидроксильной группы в положении **C2'** возможно сильное снижение цитотоксичности производных (например, при образовании простых эфиров паклитаксела по данному положению) [88]. Исключение составляют ацилированные по данной группе производные. В таком случае активность получаемого соединения в *in vitro* испытаниях остаётся на уровне немодифицированного паклитаксела, что объясняется гидролизом сложноэфирной группы внутриклеточными эстеразами.

Таким образом, модификацию паклитаксела лучше всего проводить, затрагивая ОН-группы в положениях **C7** и **C2'** путем ацилирования для сохранения антимитотической активности.

Приведем несколько примеров. Значительного улучшения растворимости паклитаксела удастся достичь, если ввести в молекулу углеводный остаток [89,90]. Так, для повышения растворимости авторами [90] было получено пролекарство, содержащее в **C2'**-положении заместитель с окисленным остатком глюкозы (Схема 7), которое тестировали на клеточной линии OVCAR-3 (рак яичников). Отметим легкость модификации паклитаксела по **C2'**-ОН группе: необходимо взять один эквивалент кислоты и активирующий агент (чаще всего *N,N'*-диизопропилкарбодимид, в качестве сопутствующего основания DMAP) [90,91]. Реакция протекает с выходами, близкими к количественным.

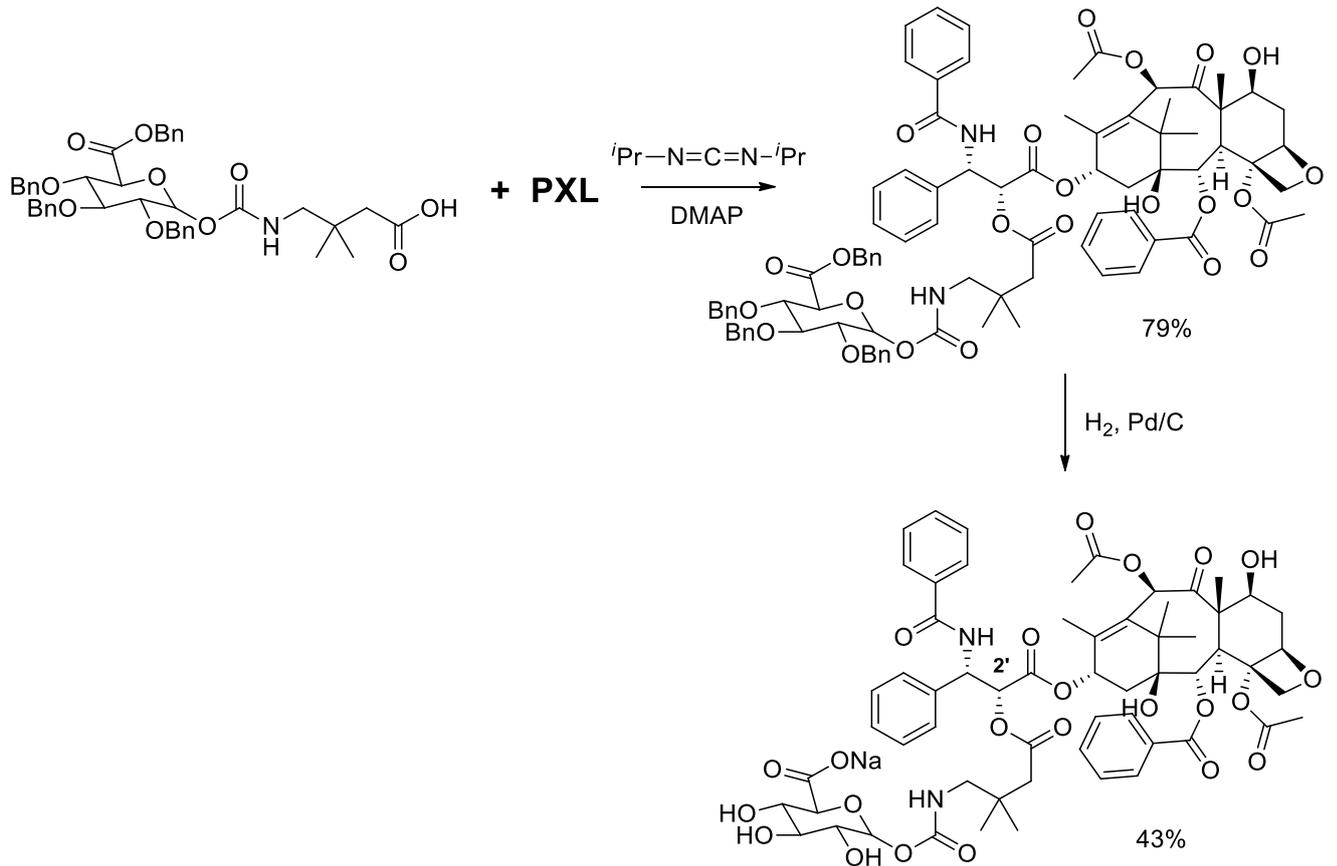


Схема 7.

Проведение же реакции по **C10**-ОН группе сопряжено с необходимостью постановки защитной группы на **C2'**-ОН обычно с помощью *трет*-бутилдиметилсилил хлорида (TBSCl) (Схема 8) [92]. Силильную защитную группу можно удалить действием фторида тетрабутиламмония.

И в случае производных по **C-2'** положению, и в случае производных по **C-7** положению не наблюдают существенного падения биологической активности, однако, с точки зрения простоты проведения синтеза предпочтительнее оказывается первый вариант. Меньшее количество синтетических стадий позволяет сократить потери относительно дорогостоящего цитостатического агента.

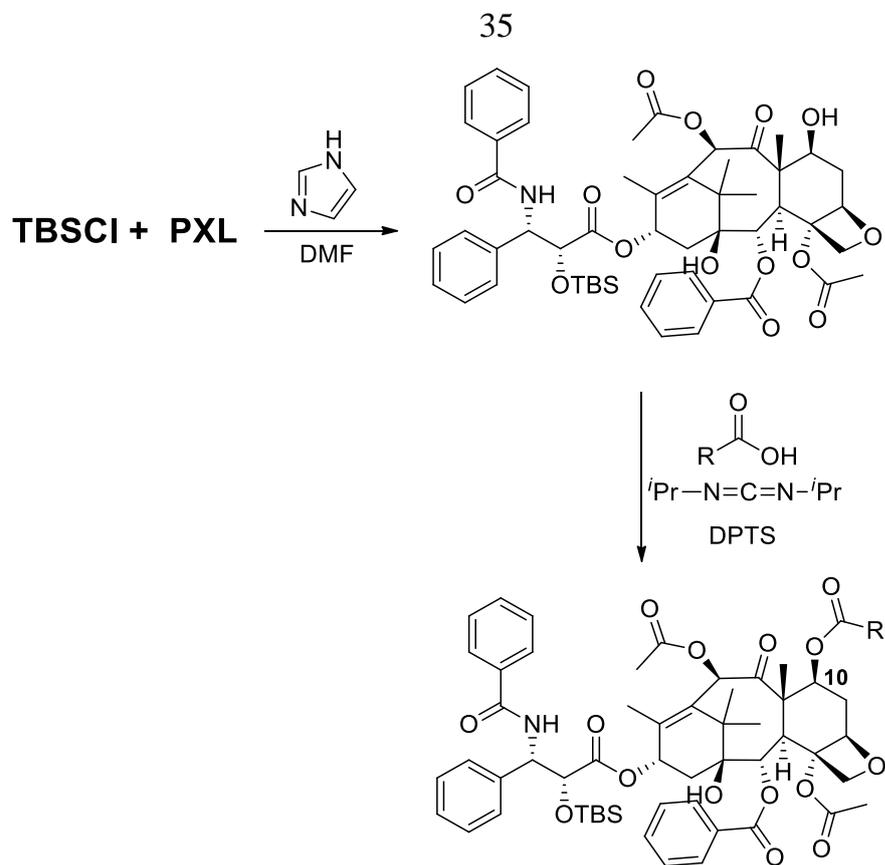


Схема 8.

Таким образом, в результате анализа и систематизации литературных данных было выявлено, что поиск систем для направленного транспорта лекарственных препаратов в клетки печени – весьма актуальная задача, о чем свидетельствует большое количество публикаций, посвященных данной тематике. При этом асиалогликопротеиновый рецептор – наиболее изученная и удобная молекулярная мишень для адресной доставки терапевтических агентов для лечения различных патологий печени. Были проанализированы данные по эффективным лигандам ASGPR, выявлены наиболее перспективные из них. Подобные соединения могут быть успешно применены для направленного транспорта противоопухолевых препаратов в клетки гепатоцеллюлярной карциномы путем создания ковалентных конъюгатов, тем не менее, примеры таких систем немногочисленны. Кроме того, отдельной задачей является поиск новых селективных лигандов ASGPR, которые позволят удешевить и облегчить синтез целевых лекарственных препаратов направленного действия.

3. Обсуждение результатов

Получение ковалентных конъюгатов лигандов асиалогликопротеинового рецептора с противоопухолевыми препаратами сопряжено с решением двух основных задач: разработкой синтетических подходов к лигандам рецептора (как известного строения, так и новых структур, способных связываться с биологической мишенью) и оптимизацией условий модификации терапевтического агента. В данном исследовании в качестве противоопухолевого препарата был выбран паклитаксел, а ключевой реакцией в получении конъюгатов стало катализируемое солями Cu(I) 1,3-диполярное циклоприсоединение азидо и алкина [93], которое широко используется в биоконъюгации последнее время [94,95] (Рис. 16).

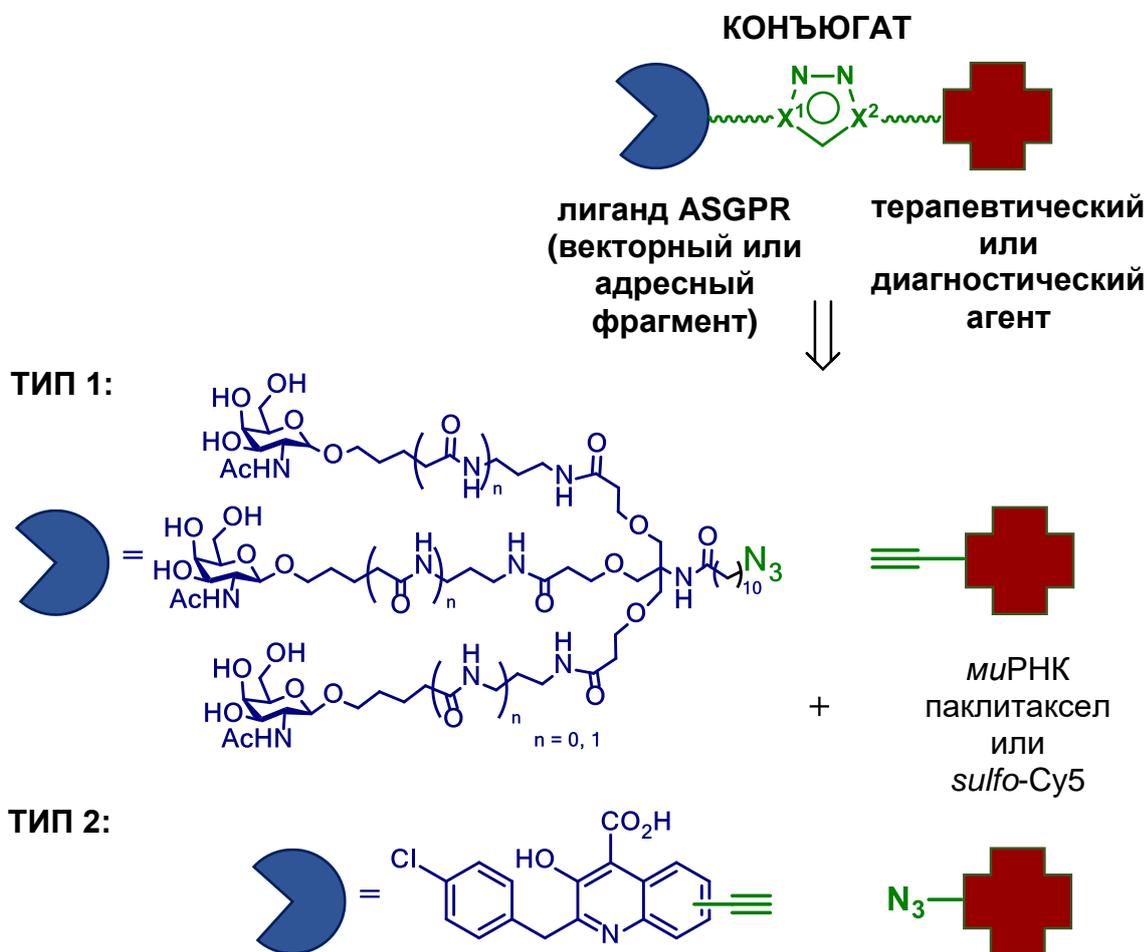


Рис. 16. Схематическое изображение конъюгатов лигандов ASGPR с терапевтическими и диагностическими агентами, полученных в данном исследовании.

Для успешного решения поставленных задач, прежде всего, потребовалось реализовать синтез лигандов ASGPR с терминальной тройной связью или азидной группой. Первая часть работы посвящена разработке новой конвергентной стратегии и

оптимизации методов синтеза известных разветвленных лигандов ASGPR с тремя остатками *N*-ацетилгалактозамина, содержащих азидогруппу, изучению их физико-химических свойств (Тип 1 на **Рис. 16**. Схематическое изображение конъюгатов лигандов ASGPR с терапевтическими и диагностическими агентами, полученных в данном исследовании. Рис. 16). Вторая часть данного исследования посвящена поиску принципиально новых лигандов ASGPR, не содержащих в своем составе остатков галактозы или *N*-ацетилгалактозамина. До начала наших исследований примеров таких соединений в литературе не было (Тип 2 на **Рис. 16**. Схематическое изображение конъюгатов лигандов ASGPR с терапевтическими и диагностическими агентами, полученных в данном исследовании. Рис. 16).

В заключительной части работы оценивали потенциал использования полученных лигандов на примере создания ковалентных конъюгатов с *mi*РНК, противоопухолевым препаратом паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5.

3.1. Синтез лигандов ASGPR на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомеров на основе *N*-ацетилглюкозамина

При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [95,96]

Исходя из обзора литературы, лучшей селективности по отношению к ASGPR удастся достичь при использовании лигандов, содержащих в своей структуре 3 остатка *N*-ацетилгалактозамина. На сегодняшний день известен ряд препаратов направленного действия для генной терапии различных патологий печени [97], которые представляют собой ковалентные конъюгаты такого лиганда ASGPR и олигонуклеотидов (*mi*РНК) (Рис. 17). Данные конъюгаты хорошо зарекомендовали себя как в доклинических испытаниях, так и в клинических [2]. Особенно хотелось бы отметить эффективность и избирательность проникновения структур в целевые клетки, что удалось достичь благодаря введению фрагмента-вектора.

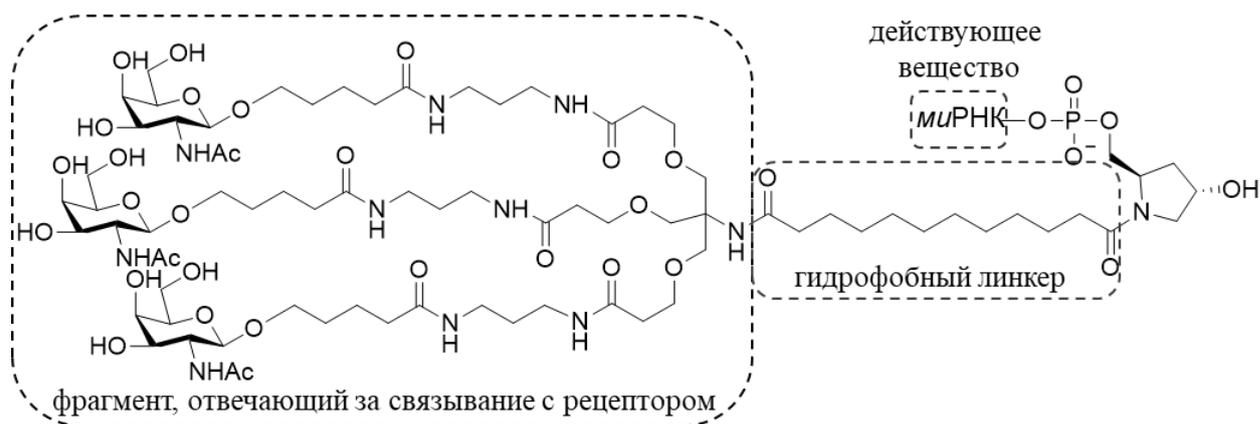


Рис. 17. Общее строение конъюгатов *miRNA* и лиганда ASGPR [51].

В соответствии с поставленной целью и выбранной тактикой синтеза для дальнейшего конъюгирования с терапевтическими и диагностическими агентами к концевому атому углерода гидрофобного линкера (ундекановой кислоты) была введена азидогруппа.

Для синтеза разветвленного лиганда широкое применение нашла стратегия [51], заключающаяся в последовательном наращивании скелета 2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диола (TRIS). Сначала проводят его присоединение по Михаэлю к производным акриловой кислоты, далее их гидролиз, взаимодействие с *N*-Вос-1,3-диаминопропаном, удаление защитных групп и ацилирование углеводсодержащей карбоновой кислотой (см. Раздел 2.3. Схема 4). Линкер с фрагментом *транс*-4-гидроксипролина вводят на конечном этапе, в связи с чем количество стадий синтеза растет, что ведет к потерям целевого вещества.

Нами впервые предложен альтернативный конвергентный подход к целевым соединениям (Схема 9.).

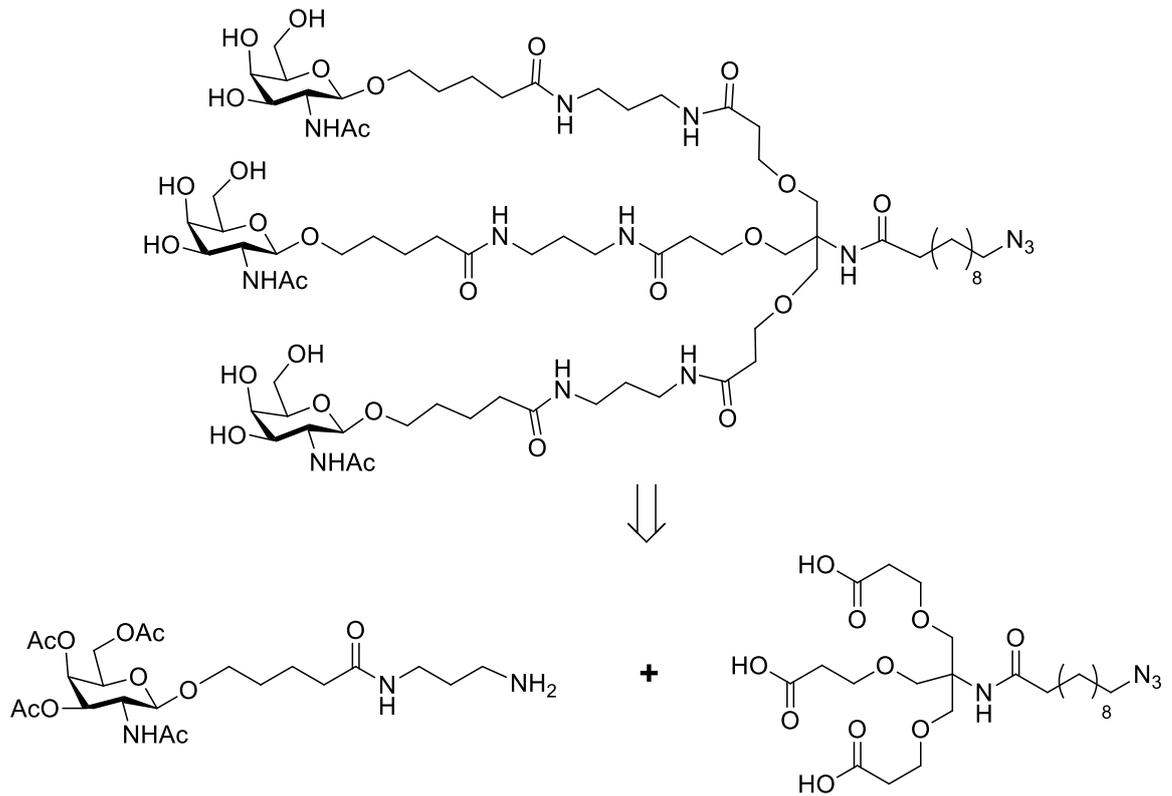


Схема 9.

Основное преимущество данной стратегии заключается в сокращении числа стадий, в ходе которых реакция протекает сразу по трем функциональным группам, что, по нашему мнению, должно привести к повышению общего выхода целевого продукта. С использованием разработанной стратегии также осуществляли синтез изомерного соединения, содержащего остатки *N*-ацетилглюкозамина. Известно, что производные *N*-ацетилглюкозамина связываются с ASGPR на несколько порядков хуже, чем производные *N*-ацетилгалактозамина, что позволяет использовать их в качестве контроля при проведении биологических испытаний.

На первых этапах синтеза получали трикарбоновую кислоту, необходимую для создания каркаса целевых соединений (Схема 10).

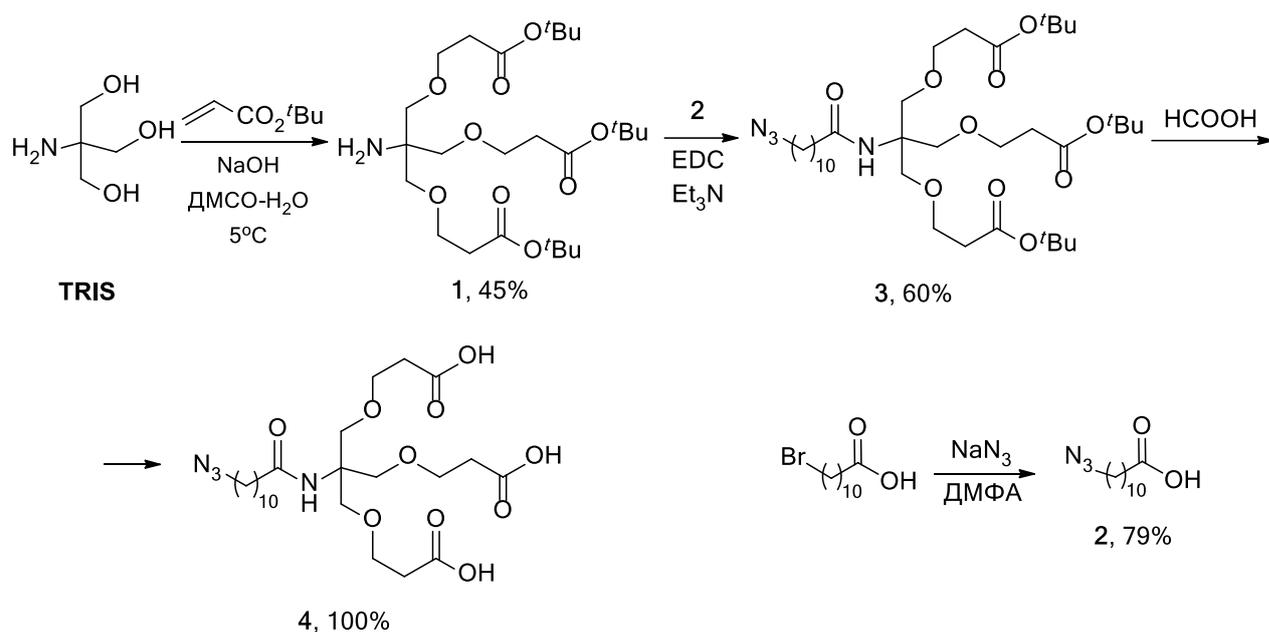


Схема 10.

Синтез начинали с присоединения по Михаэлю *tert*-бутилового эфира акриловой кислоты к молекуле TRIS. В качестве акцептора Михаэля можно использовать акрилонитрил [98] или этиловый эфир акриловой кислоты [99], однако наиболее удобным в работе является именно *tert*-бутилакрилат, в связи с легкостью удаления *tert*-бутильных групп на последующих стадиях. Невысокий выход соединения **1** (45%) обусловлен в первую очередь образованием побочных продуктов моно- и ди-присоединения; данные процессы всегда осложняют подобные реакции.

Производное **1** далее вводили в реакцию с 11-азидоундекановой кислотой (**2**), которая была получена нуклеофильным замещением атома брома 11-бромундекановой кислоты на азидогруппу действием азиды натрия. Таким образом, в разработанном нами подходе линкер с функциональной группой для дальнейшего конъюгирования с препаратом вводится на начальных этапах синтеза, что позволило сократить количество стадий: нет необходимости в постановке и удалении защитных групп. При ацилировании соединения **1** 11-азидоундекановой кислотой в качестве активирующего агента использовали EDC из-за простоты удаления из реакционной смеси побочных продуктов (как правило, достаточно водной экстракции).

Заключительная стадия синтеза соединения **4** представляла собой удаление *tert*-бутильных групп действием муравьиной кислоты. Полученная трикарбоновая кислота **4**,

а также промежуточное соединение **3** являются неописанными ранее соединениями и были охарактеризованы полным комплексом физико-химических методов анализа. Их состав подтверждали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, строение – с помощью ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C . Об успешности введения азидогруппы также дополнительно судили по ИК-спектрам полученных соединений, в которых наблюдали полосу поглощения $\approx 2095\text{ см}^{-1}$, характерную для азидопроизводных.

Синтез второго структурного фрагмента лиганда, содержащего углеводный остаток, начинали с получения агликона (Схема 11). Для этого была использована реакция раскрытия δ -валеролактона *N*-Boc-1,3-диаминопропаном (**5**) в присутствии каталитических количеств *p*-толуолсульфокислоты.

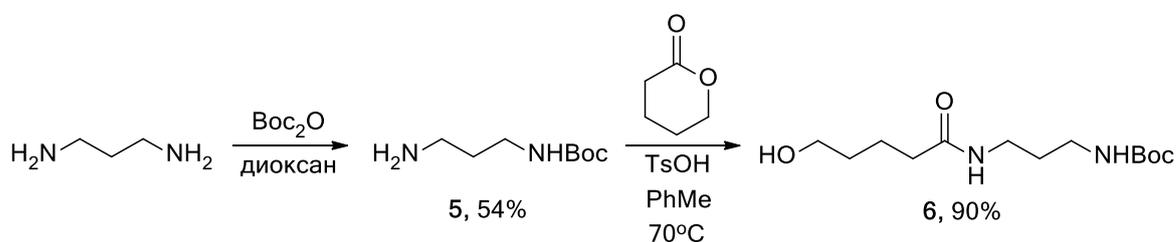


Схема 11.

Следующей стадией синтеза стало гликозилирование *tert*-бутил-(3-(5-гидроксипентанамидо)-пропил)-карбамата (**6**) остатками *N*-ацетилгалактозамина (**7a**) и *N*-ацетилглюкозамина (**7b**) (Схема 12).

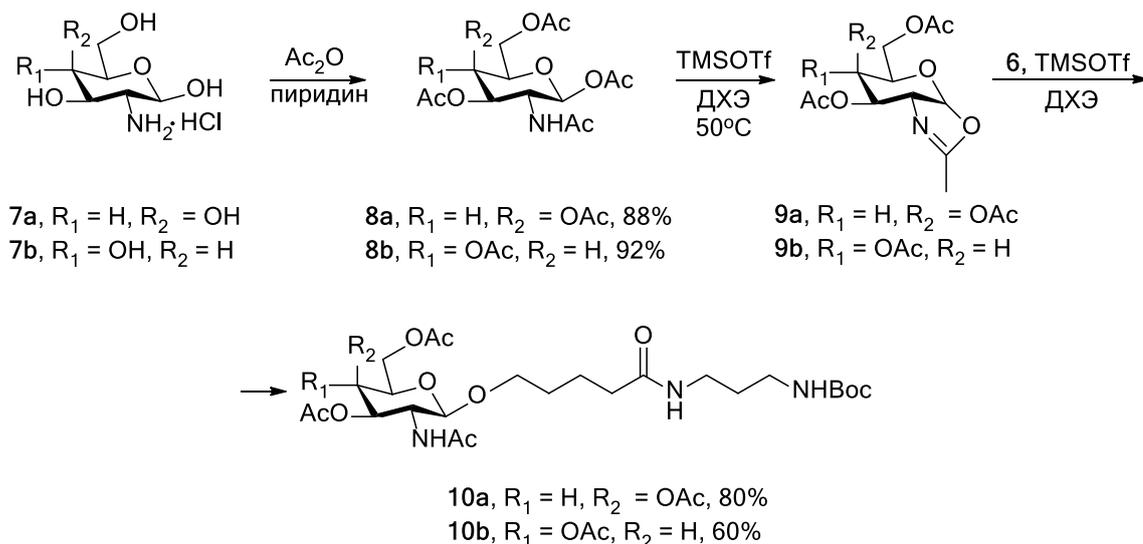


Схема 12.

В качестве гликозилирующих агентов выступали 1,2-оксазолины, которые получали из пентаацетатов 2-дезоксидезокси-2-аминогексапираноз **8a,b** действием кислоты Льюиса. В нашем случае в качестве такой кислоты выступал триметилсилилтрифторсульфонат (TMSOTf). Оксазолины **9a,b** сразу вводили в реакцию со спиртом **6** без специфической очистки в условиях катализа субэквивалентными количествами TMSOTf.

По спектрам ^1H ЯМР судили о конфигурации атомов C-1 углеводных остатков гликозидов **10a,b**. Так, в спектрах обоих гликозидов наблюдали дублеты в области 4.50-4.60 м.д. с константами спин-спинового взаимодействия 8-9 Гц (сигналы атомов водорода в первом положении гексапиранозного цикла). Сопоставление полученных значений с эмпирическими данными кривой Карплуса указывало на то, что в нашем случае имеет место *транс*-диаксиальная конфигурация протонов Н-1 и Н-2, то есть гликозиды выделяли в виде β -аномеров. Сравнение полученных значений КССВ и хим. сдвигов с имеющимися в литературе данными для подобных соединений [51] также это подтверждает.

Полученные гликозиды **10a,b** обрабатывали трифторуксусной кислотой для удаления защитной *трет*-бутоксикарбонильной группы. Соответствующие соли-трифторацетаты **11a,b** получали с количественными выходами (Схема 13).

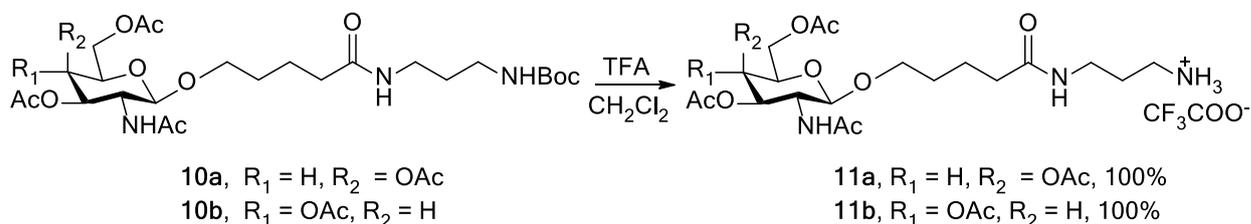


Схема 13.

После получения аминогликозидов **11a,b** и трикарбоновой кислоты **4**, было сделано несколько попыток получения целевых соединений **12a,b** в различных условиях (Схема 14, Таблица 3). Лучших результатов удалось достичь при использовании ДМФА в качестве растворителя и НВТУ с НОВт для активации карбоксильных групп.

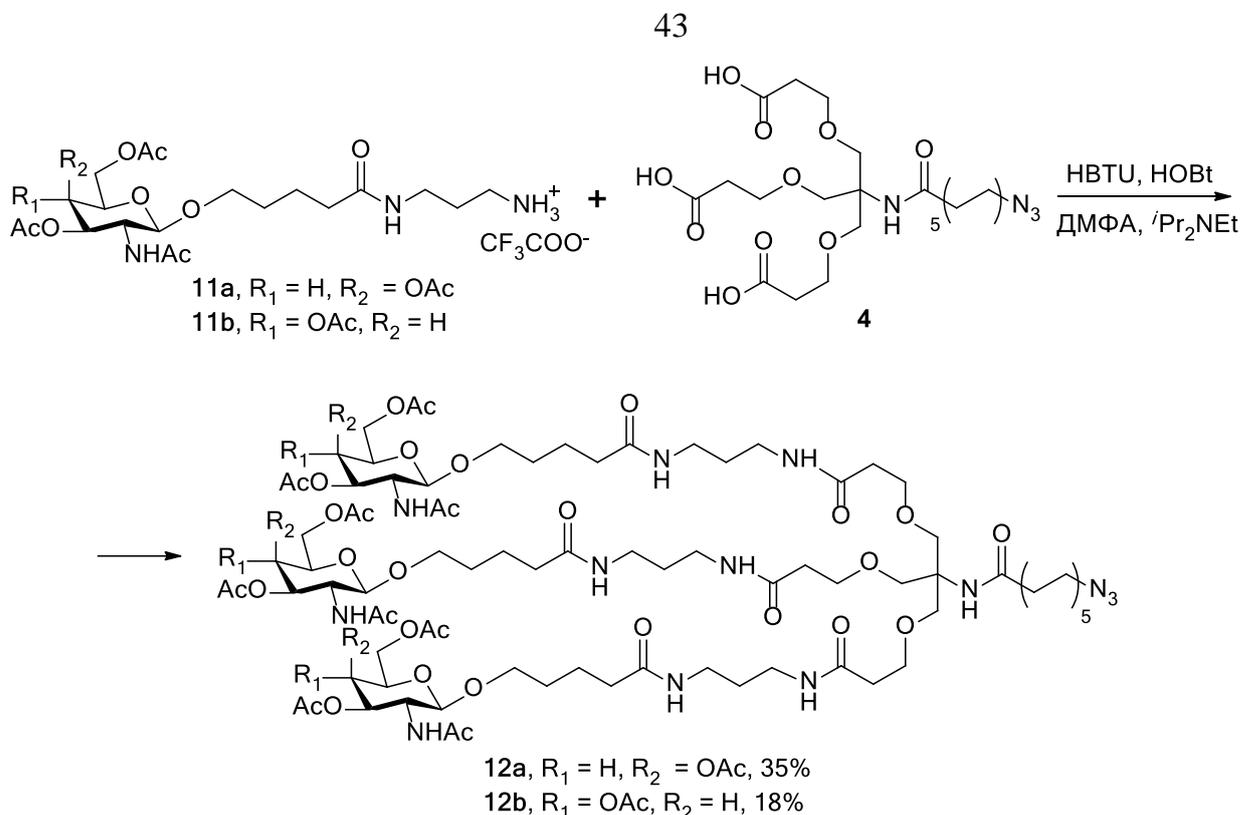


Схема 14.

Таблица 3. Оптимизация условий получения соединений **12a,b** (реакции проводили с использованием гликозида **11a**).

Активирующий агент	Агент сочетания	Растворитель	Выход
HBTU	-	DMF	13%
EDC	-	DMF	10%
HBTU	HOBT	ТГФ	30%
HBTU	HOBT	DMF	35%

Несмотря на большое количество попыток соединить два фрагмента и варьирование условий, выхода в реакции более чем 35% добиться не удалось. Во-первых, кислота **4** содержит три карбоксильные группы, следовательно, при проведении амидного синтеза наблюдается образование продуктов моно- и диприслоения. Во-вторых, выделение целевого продукта с помощью колоночной хроматографии сильно осложнено: молекула содержит в себе достаточно большое количество полярных групп и поэтому трудно элюируется, а поскольку продукты моно- и ди-прислоения обладают близкими с целевым веществом значениями фактора удерживания, требуется два-три последовательных хроматографических разделения. Тем не менее, соединения **12a,b** были выделены в индивидуальном виде, охарактеризованы с помощью ЯМР

спектроскопии и масс-спектрометрии. Сложность синтеза делает использование лигандов **12a** и **12b** нецелесообразным для получения конъюгатов с низкомолекулярными терапевтическими препаратами, однако они могут быть полезны в синтезе конъюгатов более сложных и дорогостоящих малых интерферирующих РНК (*mi*РНК). Так, было проведено несколько пробных реакций азидо-алкинового циклоприсоединения лигандов **12a,b** с *mi*РНК для иллюстрации потенциала использования векторных фрагментов. Результаты отражены в разделе 3.3.1. Защитные ацетильные группы удаляли после соединения с олигонуклеотидами.

Для конъюгирования же с низкомолекулярными противоопухолевыми препаратами был проведен синтез лиганда ASGPR с несколько упрощенным строением (Рис. 18).

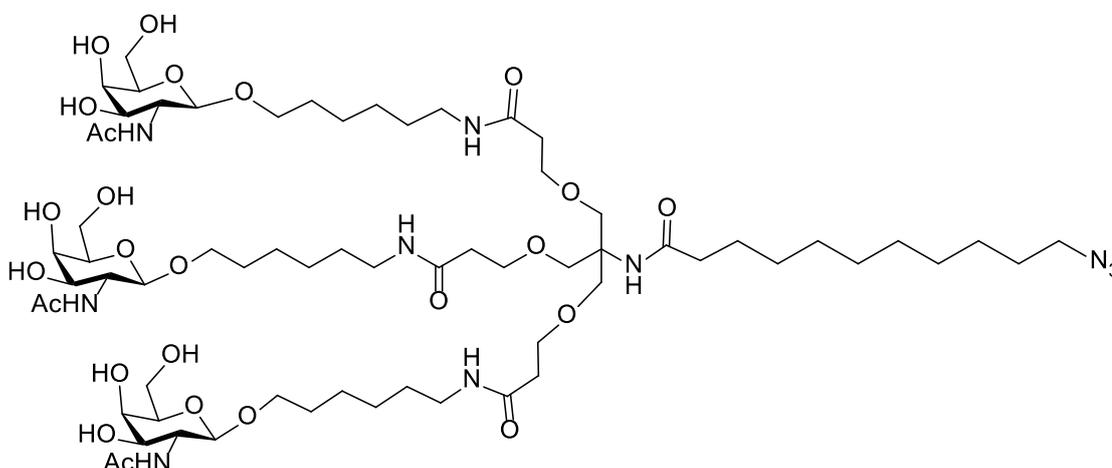


Рис. 18. Структура лиганда ASGPR упрощенного строения с гидрофильным линкером и концевой азидогруппой.

Векторный фрагмент данной структуры демонстрирует в целом аналогичное сродство к ASGPR [54], однако обладает меньшей гидрофильностью, чем соединения **12a,b**, в связи с этим его выделение в индивидуальном виде с помощью колоночной хроматографии должно проходить проще. Кроме того, для его синтеза требуется меньшее количество стадий.

Синтез гликозидов **13a,b** был проведен аналогично соединениям **10a,b** (Схема 15). В качестве агликона использовали коммерчески доступный *N*-карбоксибензил-6-аминогексан-1-ол. Свободные амины из соединений **13a,b** получали удалением защитной группы гидролизом.

45

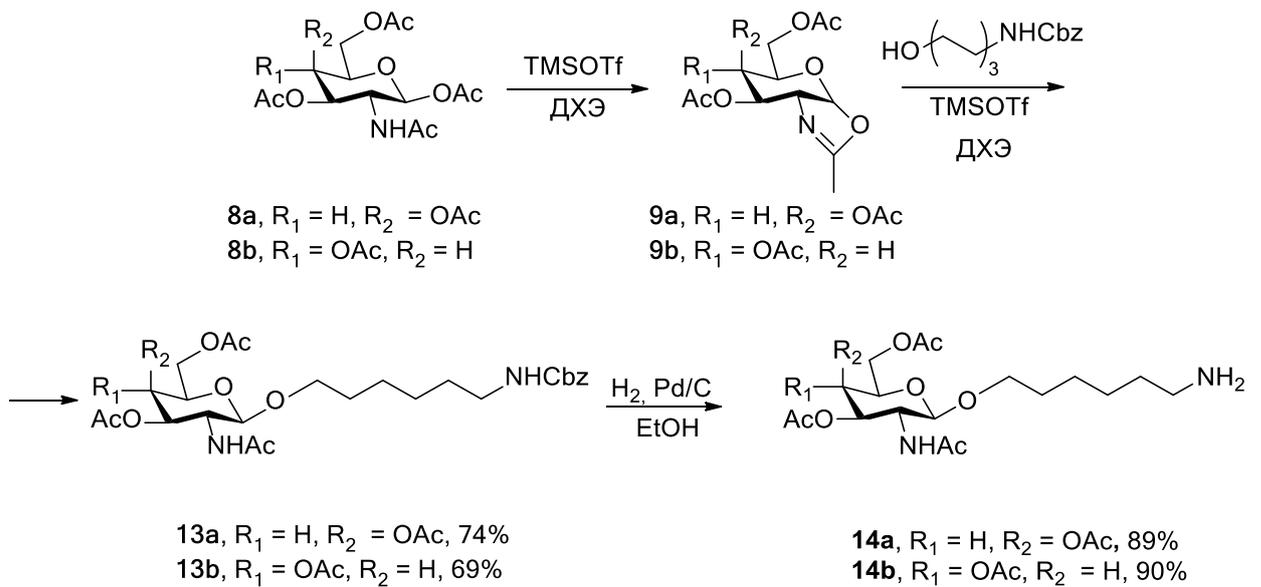


Схема 15.

Перед соединением двух фрагментов молекулы, из кислоты **4** получали ее активированное производное – пентафторфениловый эфир **15** (Схема 16). Соединение **15** было выделено в индивидуальном виде с помощью простой экстракции, выход составил 97%.

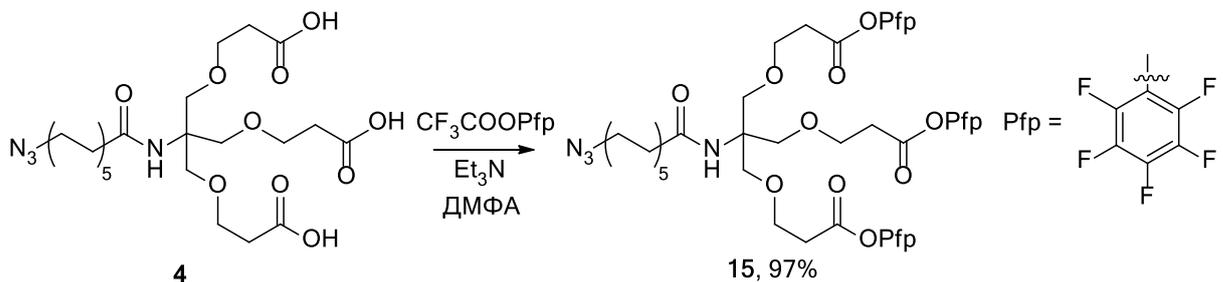


Схема 16.

Производные **16a,b** из пентафторфенильного эфира получали обычным смешением компонентов реакции в присутствии триэтиламина (Схема 17). Продукты выделяли со значительно большими выходами в сравнении с аналогичным синтезом при получении лигандов **12a,b** предыдущего структурного типа.

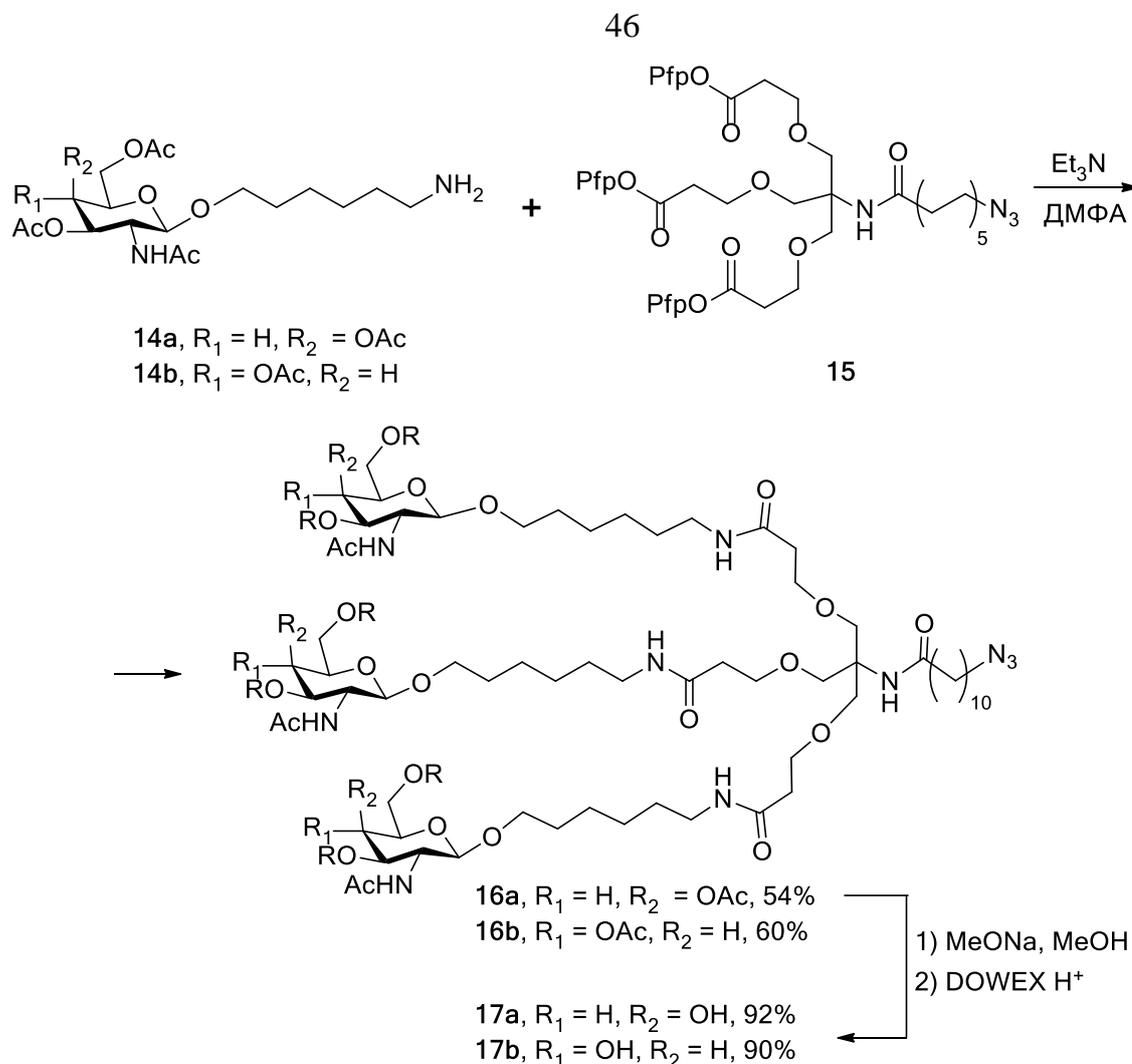


Схема 17.

Для удаления защитных ацетильных групп с гидроксильных углеводов остатков был использован алкоголиз сложных эфиров в основной среде (реакцию проводили с помощью свежеприготовленного 0.1M раствора метилата натрия в метаноле). Избыток основания нейтрализовали катионообменной смолой.

Таким образом, в результате первой части работы была предложена новая стратегия многостадийного синтеза разветвлённых углеводсодержащих соединений – лигандов ASGPR и их аналогов. Полученные производные *N*-ацетилгалактозамина могут служить в качестве векторных фрагментов в синтезе диагностических и терапевтических конъюгатов для направленного транспорта в клетки печени, а производные *N*-ацетилглюкозамина могут быть использованы как отрицательный контроль в биологических испытаниях.

3.2. Поиск неуглеводных лигандов ASGPR

При подготовке данного раздела использована собственная публикация автора [100].

Для идентификации новых низкомолекулярных органических соединений, которые могли бы эффективно связываться с ASGPR, с помощью 3D молекулярного докинга было проанализировано 10 тысяч структур, специально отобранных из библиотеки ChemDiv*. Из них были выбраны 100 молекул, для которых далее методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) были определены константы диссоциации комплекса рецептор-лиганд. В результате было выявлено 33 наиболее аффинных по отношению к ASGPR соединения. В их число также вошла хинолин-4-карбоновая кислота (Рис. 19), которая продемонстрировала лучшее связывание с асиалогликопротеиновым рецептором, чем природный лиганд – D-галактоза (константы диссоциации комплекса рецептор-лиганд, определенные методом ППР, для данных соединений составили 761 и 8820 мкМ соответственно).

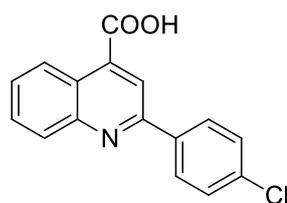


Рис. 19. Структура хинолин-4-карбоновой кислоты, идентифицированная в работе.

Подобные соединения ранее [101] было предложено использовать в качестве низкомолекулярных антагонистов Р-селектина (трансмембранный белок, который относится к классу молекул клеточной адгезии и состоит из единственной полипептидной цепи). Р-селектин имеет характерное сходство с лектинами типа С (к которым относится ASGPR) благодаря N-концевой последовательности аминокислот и кальций-зависимому связыванию [102]. В связи с этим можно предположить, что низкомолекулярные соединения, селективные по отношению к Р-селектину, покажут хорошую аффинность и по отношению к ASGPR.

В публикациях [101,103] авторы провели масштабный скрининг подобных соединений, выявили важные для связывания структурные фрагменты. В результате было предложено соединение-лидер **PSI-697** (Рис. 20) [101]. Было показано, что гидроксильная группа в 3-ем положении и карбоксильная в 4-ом оказывают

* *In silico* скрининг был проведен сотрудниками Лаборатории медицинской химии и биоинформатики, МФТИ

значительное влияние на аффинность соединения по отношению к Р-селектину, а в качестве наиболее эффективного заместителя во 2-ом положении был выбран *n*-хлорбензильный фрагмент.

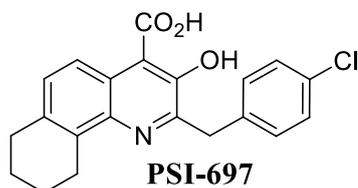
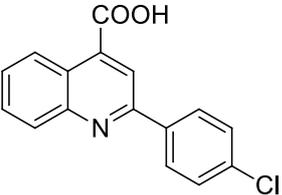
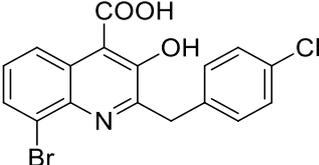


Рис. 20. Соединение-лидер **PSI-697**, предложенное в работе [101].

Исходя из отмеченной выше схожести Р-селектина и ASGPR можно ожидать, что полученные при разработке **PSI-697** данные о связи структура-активность будут также полезны при оптимизации строения лигандов ASGPR. Особый интерес представляет исследование эффекта от введения гидроксильной группы в 3-е положение и замены заместителя во 2-ом положении на *n*-хлорбензил. Судя по результатам работ [101,103], заместители в положениях 6 - 8 не сильно влияют на связывание. Эти положения могут быть использованы для введения функциональных групп удобных для дальнейшего конъюгирования с лекарственными препаратами.

Для первичных *in vitro* тестирований нами была синтезирована 8-бром-3-гидроксихинолин-4-карбоновая кислота (обсуждение синтеза приведено ниже), для которой методом поверхностного плазмонного резонанса определили аффинность по отношению к асиалогликопротеиновому рецептору. Производное хинолина показало лучшее связывание с ASGPR, чем галактоза и *N*-ацетилгалактозамин (Таблица 4).

Таблица 4. Термодинамические константы диссоциации протеин-лигандного комплекса, определенные методом ППР-спектроскопии*

Лиганд	K_D , мкМ
Gal	8820
	761
GalNAc	448
	$327 \cdot 10^{-3}$

Для возможности последующего конъюгирования с молекулой паклитаксела посредством реакции медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения были получены 3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты с тройной связью в 8-ом или 6-ом положениях (Рис. 21).

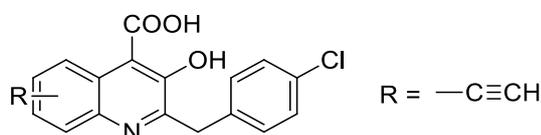


Рис. 21. Общее строение этинил-3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот, полученных в работе.

В качестве основного этапа в синтезе целевых соединений была выбрана реакция Пфитцингера (Схема 18). Это удобный метод, который позволяет получать хинолин-4-карбоновые кислоты из изатинов и карбонильных соединений, содержащих в α -положении хотя бы одну метиленовую группу, при этом заместители в хинолиновом ядре могут варьироваться в широких пределах в зависимости от исходных соединений [104,105].

* Измерение K_D методом ППР проводилось аспирантом кафедры химической энзимологии Лопуховым А.В.

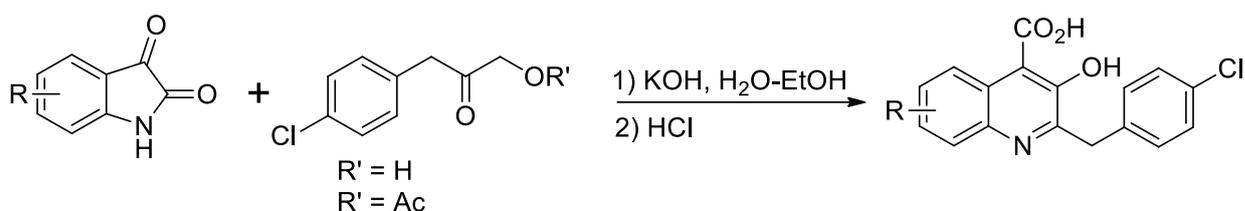


Схема 18.

Получать хинолины, содержащие одновременно и карбоксильную, и гидроксильную группы можно, если вводить в реакцию с изатином α -гидроксикетоны или α -ацилоксикетоны, которые можно, в свою очередь, синтезировать окислением олефинов [106], диолов [107], эпоксидов [108], удлинением углеродной цепи хлорангидридов карбоновых кислот [109], замещением атома галогена α -галагенкетоноров [101,110] и т.д.

В работе для синтеза целевых хинолинов использовали 3-(4-хлорфенил)-2-оксопропил ацетат и 1-(4-хлорфенил)-3-гидроксипропан-2-он. В качестве прекурсора была выбрана коммерчески доступная *n*-хлорфенилуксусная кислота. В обоих случаях синтез карбонильных соединений начинали с получения её хлорангидрида **18** (Схема 19). Реакцию проводили действием на кислоту либо оксалилхлорида в ТГФ, либо тионилхлорида в толуоле. Выходы 2-(4-хлорфенил)ацетилхлорида (**18**) оказывались количественными вне зависимости от выбранного подхода.

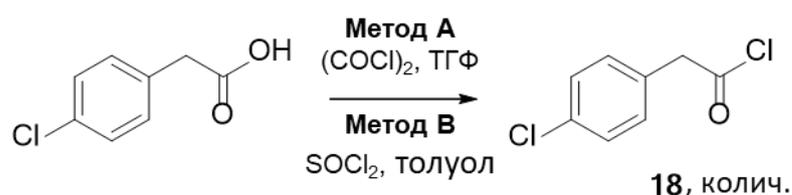


Схема 19.

Изначально, исходя из доступности реагентов, для удлинения углеродной цепи в молекуле хлорангидрида **18** использовали диазометан, который получали из *N*-метил-*N*-нитрозомочевины [111]. Раствор диазометана в эфире вводили в реакцию с хлорангидридом (Схема 20). В результате нуклеофильной атаки по карбонильному атому углерода и последующего элиминирования N_2 группы под действием HCl, был получен α -хлоркетон **19**, который вводили в реакцию с раствором ацетата калия в воде с добавлением уксусной кислоты. Происходило замещение атома галогена с образованием целевого 3-(4-хлорфенил)-2-оксопропил ацетата.

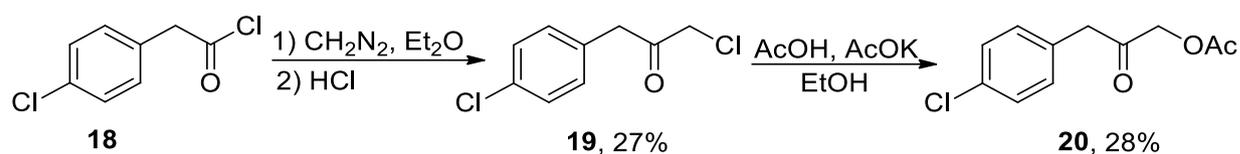


Схема 20.

Соединение **20** использовали только на начальных этапах работы для синтеза 2-(4-хлорбензил)-3-гидрокси-8-бромхиолин-4-карбоновой кислоты. Позже от этой стратегии решено было отказаться, так как CH_2N_2 токсичен, не удобен в использовании, реакции с ним не поддаются масштабированию. Выходы веществ **19** и **20** оказывались невысокими.

Альтернативным подходом к синтезу карбонильных соединений стало удлинение углеродного скелета *n*-хлорфенилуксусной кислоты при помощи 1,1,2-трис(триметилсилилокси)этилена (Схема 21) [112]. В результате был получен 1-(4-хлорфенил)-3-гидроксипроп-2-он (**21**) с большим выходом по сравнению с реакцией с диазометаном.

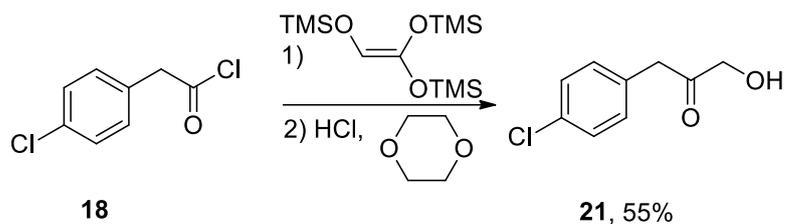


Схема 21.

Данная реакция протекает либо при нагревании, либо после добавления кислоты Льюиса. Требуется 2 эквивалента трис(триметилсилилокси)этилена: один эквивалент нуклеофильно присоединяется по карбонильному атому хлорангидрида, а второй эквивалент связывает выделяющуюся HCl (Схема 22) [112]. Образовавшийся силиловый енолят затем гидролизуется до β -кетокислоты, которая после декарбоксилирования таутомеризуется в желаемый α -гидроксикетон [113].

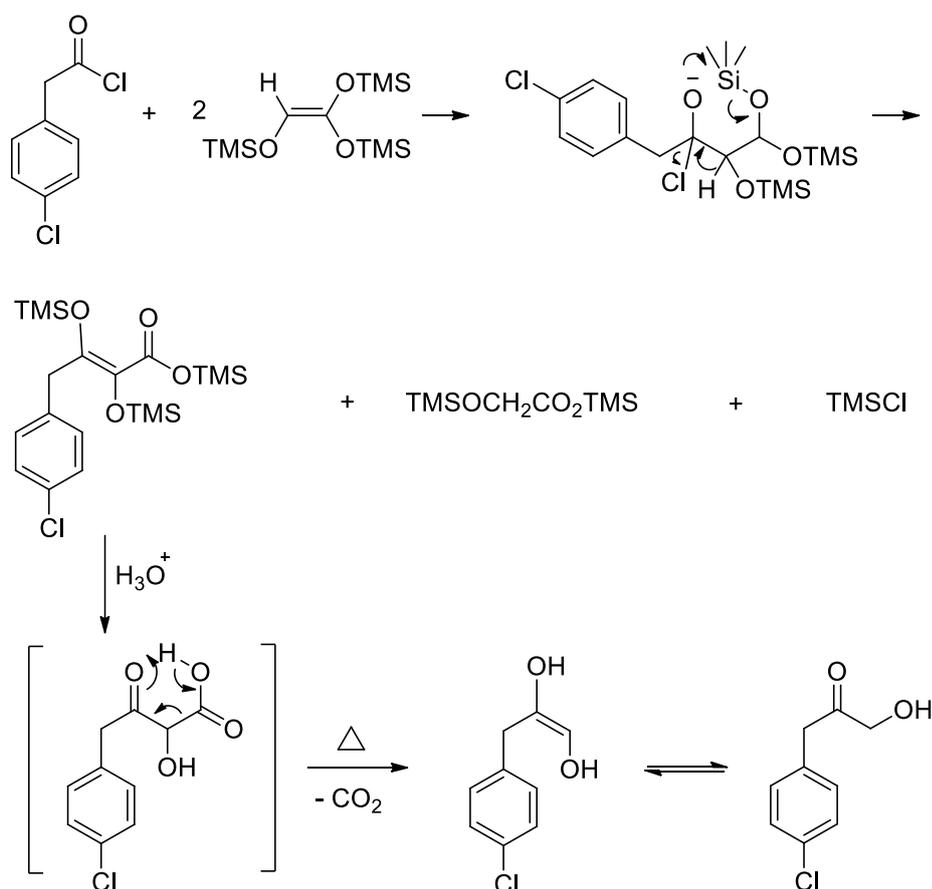


Схема 22.

Для синтеза целевых 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот с терминальной тройной связью была предложена следующая ретросинтетическая схема (Схема 23):

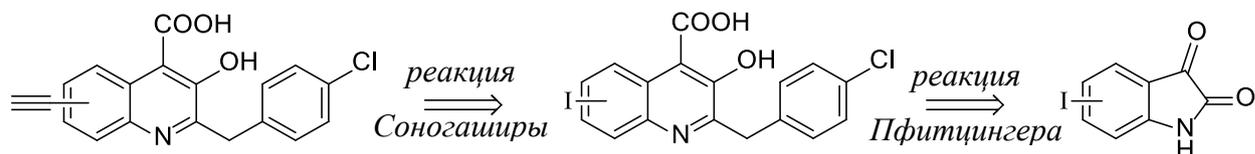
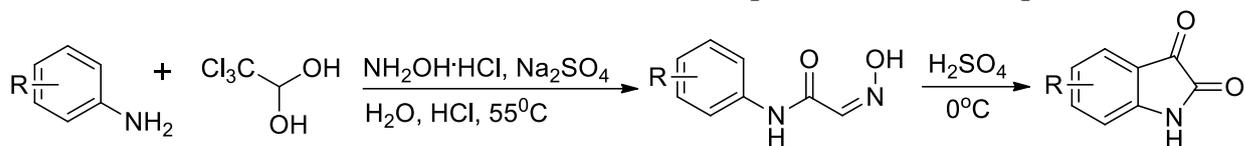


Схема 23.

Успешная реализация предложенной стратегии потребовала синтеза ряда производных изатина. В работе использовали метод Зандмейера, который находит широкое применения для синтеза галогенированных, алкилированных, арилированных и полициклических производных изатина [114]. На первой стадии получают изонитрозоацетанилид: анилин конденсируется с хлоральдоксимом, который образуется в реакционной смеси из хлоральгидрата и гидроксиламина. На второй стадии изонитрозоацетанилид под действием концентрированной серной кислоты претерпевает внутримолекулярную циклизацию, превращаясь в соответствующий изатин (Схема к **Таблица 5.** Синтез галогензамещенных изатинов по реакции Зандмейера **Таблица 5).** По

реакции Зандмейера были с высокими выходами получены галогензамещенные изатины **22-24** (Таблица 5).

Таблица 5. Синтез галогензамещенных изатинов по реакции Зандмейера

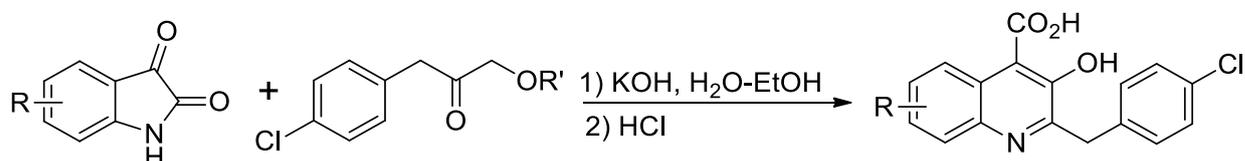


Анилин R	Изатин		Выход, %
	№	R	
<i>o</i> -Br	22	7-Br	62
<i>o</i> -I	23	7-I	67
<i>n</i> -I	24	5-I	66

При введении в реакцию Пфитцингера изатинов **22-24** и кетонов **20,21** были выделены галоген-3-гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты **25-27**. Выходы составили 34-42% (

Таблица 6).

Таблица 6. Синтез галоген-3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот



Изатин	R	Кетон	R'	Хинолин	R	Выход, %
22	7-Br	20	Ac	25	8-Br	34
23	7-I	21	H	26	8-I	42
24	5-I	21	H	27	6-I	36

На примере йодхинолин-4-карбоновой кислоты **26** была проведена пробная реакция Соногаширы с триметилсилилацетиленом (Схема 24), однако выделить целевой продукт с удовлетворительным выходом не удалось. Варьирование времени реакции, температуры и замена катализатора на Pd(Ph₃P)₄ также не привели к значительным улучшениям.

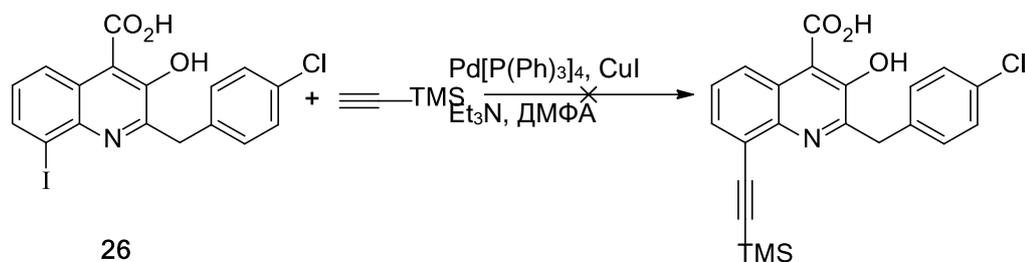


Схема 24.

В результате стратегию синтеза целевых этинил-3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот было решено изменить (Схема 25).

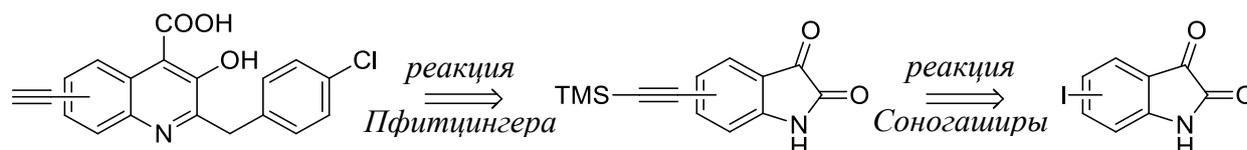


Схема 25.

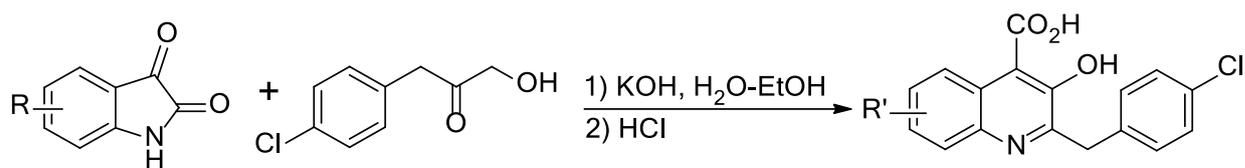
Альтернативным подходом стало проведение реакции Соногаширы с изатинами. Реакцию проводили в стандартных для данного варианта кросс-сочетания условиях, в качестве катализатора использовали $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$. Отметим, что в литературе синтез соединения **28** упоминается только один раз, при этом авторам удалось выделить продукт с выходом только 5% [115]. Физико-химические свойства соединения описаны не были. В нашем случае выход изатина **28** составил 48% (Таблица 7) и соединения **28**, **29** были охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа.

Таблица 7. Синтез изатинов с TMS-этинильным фрагментом по реакции Соногаширы

Изатин	R	Изатин'	R'	Выход, %
23	7-I	28	7-C≡C-TMS	48
24	5-I	29	5-C≡C-TMS	22

Для получения целевого лиганда α -гидроксикетон **21** вводили в реакцию Пфитцингера с содержащими тройную связь изатинами **28,29** (). Триметилсилильная группа удалялась в щелочном растворе, поэтому дополнительной стадии получения свободного терминального алкина не потребовалось.

Таблица 8. Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот с этинильным заместителем



Изатин	R	Хинолин	R'	Выход, %
28	7-C≡C-TMS	30	8-C≡CH	16
29	5-C≡C-TMS	31	6-C≡CH	14

3-Гидроксихинолин-4-карбоновые кислоты, которые содержат в 6-ом и 8-ом положениях этинильный фрагмент, были получены впервые. Их состав подтверждали методом масс-спектрометрии высокого разрешения, а строение – с помощью ¹H и ¹³C ЯМР и ИК-спектроскопии.

3.3. Конъюгаты лигандов ASGPR

Для оценки перспективности использования полученных лигандов для направленного транспорта препаратов в клетки печени были получены их конъюгаты с *миРНК*, паклитакселом и флуоресцентным красителем *sulfo-Cy5*.

3.3.1. Конъюгаты с *миРНК*

При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [95,116].

миРНК – двухцепочечные РНК, длиной 20-25 нуклеотидов. При попадании внутрь клетки они способны взаимодействовать с матричной РНК (*мРНК*), вызывать ее деградацию и, как следствие, снижать экспрессию целевого гена. Такой механизм действия открывает возможность применения *миРНК* для лечения метаболических, вирусных и онкологических заболеваний.

Основными проблемами на пути широкого использования *миРНК* являются: их быстрая деградация под действием эндонуклеаз крови, выведение почками, неспособность проникать через клеточные мембраны [117]. Первый недостаток удалось преодолеть путем модификации строения самих олигонуклеотидов, для устранения последнего же потребовалась разработка эффективного способа направленного транспорта в целевые клетки. Изначально для этих целей было предложено применять наноразмерные носители (липосомальные и катионные наночастицы), однако в связи с их токсичностью в высоких концентрациях и низкой селективностью фармацевтические компании обратили внимание на ковалентные конъюгаты *миРНК* с лигандами рецепторов [21].

На примере лиганда **12b** была проведена медь-катализируемая реакция [3+2] азидо-ацетиленового циклоприсоединения с модельным олигонуклеотидом **dT₂₀**, содержащим терминальный алкин на 5'-конце (Схема 26).^{*} Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 12 часов в присутствии ТВТА-CuSO₄-аскорбиновой кислоты и двух эквивалентов азиды. Деблокирование олигонуклеотида и удаление защитных групп осуществляли действием насыщенного водного аммиака при 55°C в

^{*} Соединение лигандов с олигонуклеотидами проводилось сотрудниками Центра трансляционной медицины, Сколковского института наук и технологий

течение 18 часов. Образование конъюгата **33** подтверждали с помощью ВЭЖХ-МС. Степень превращения составила более 95% (Схема 26.).

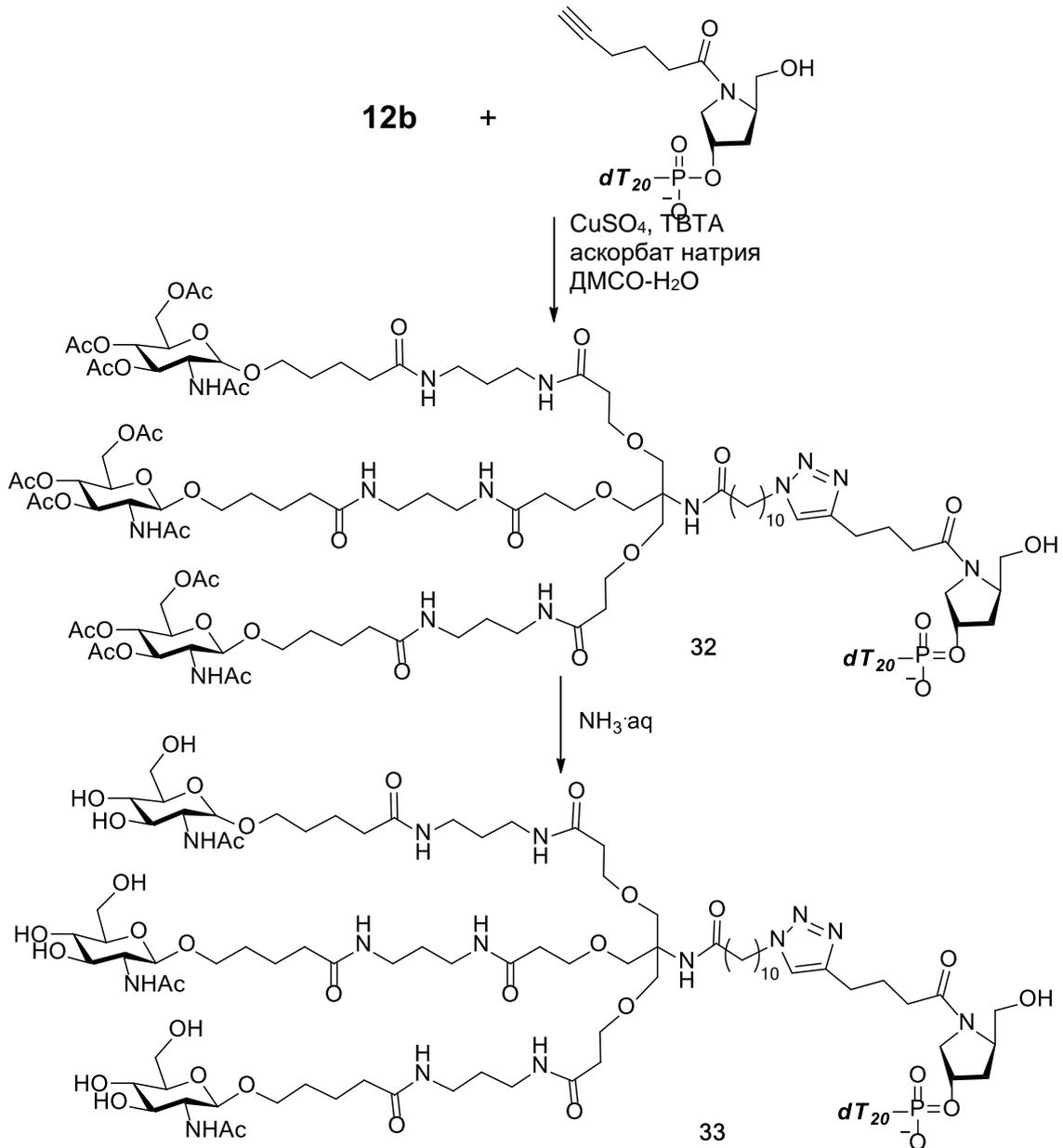


Схема 26.

Таким образом, апробирован способ постсинтетического присоединения полученных в работе лигандов к олигонуклеотидам, содержащим терминальный алкин на 5'-конце. Исследованный способ постсинтетической модификации *mi*РНК открывает возможность использовать лиганд **12a** и медь-катализируемую реакцию [3+2] азидо-ацетиленового циклоприсоединения для скрининга новых нуклеотидных последовательностей. Соединение **12b** также может быть полезно в синтезе конъюгатов для отрицательного контроля.

3.3.2. Конъюгаты с флуоресцентным красителем *sulfo-Cy5*

Для исследования специфичности лиганда **17a** по отношению к гепатоцитам и клеткам ГЦК с помощью медь-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения был получен конъюгат **34a** с водорастворимым коммерчески доступным флуоресцентным красителем *sulfo-Cy5* алкином. Реакцию проводили в инертной атмосфере в системе вода-ДМФА с использованием сульфата меди и аскорбата натрия (Схема 27). В результате с хорошим выходом (94%) был получен конъюгат **34a**. По аналогичной методике был синтезирован продукт **34b** на основе *N*-ацетилглюкозамина.

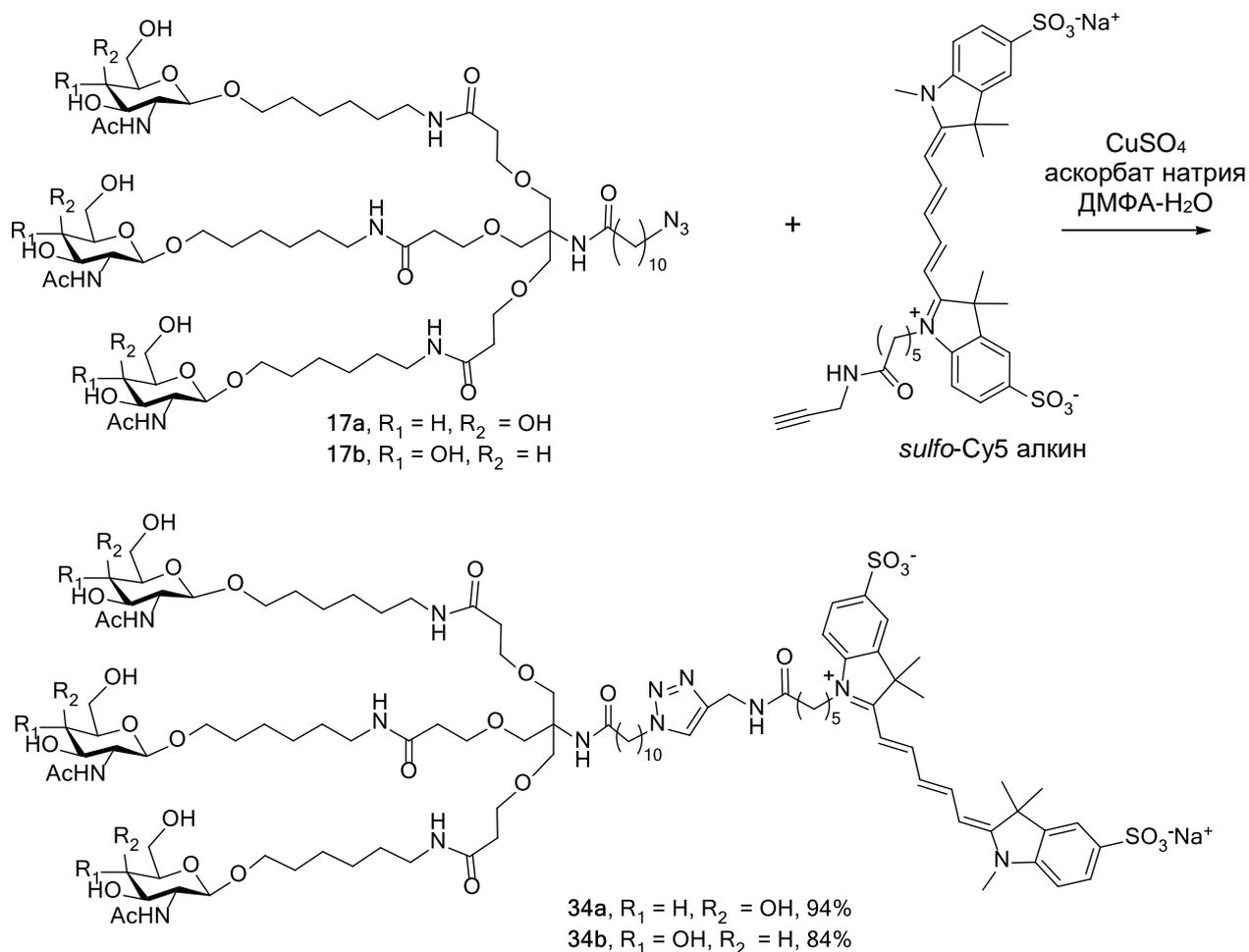


Схема 27.

Строение соединений подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , а состав посредством масс-спектрометрии высокого разрешения. Структура соединения **34a** дополнительно подтверждена данными корреляционного 2D ЯМР эксперимента (Рис. 22).

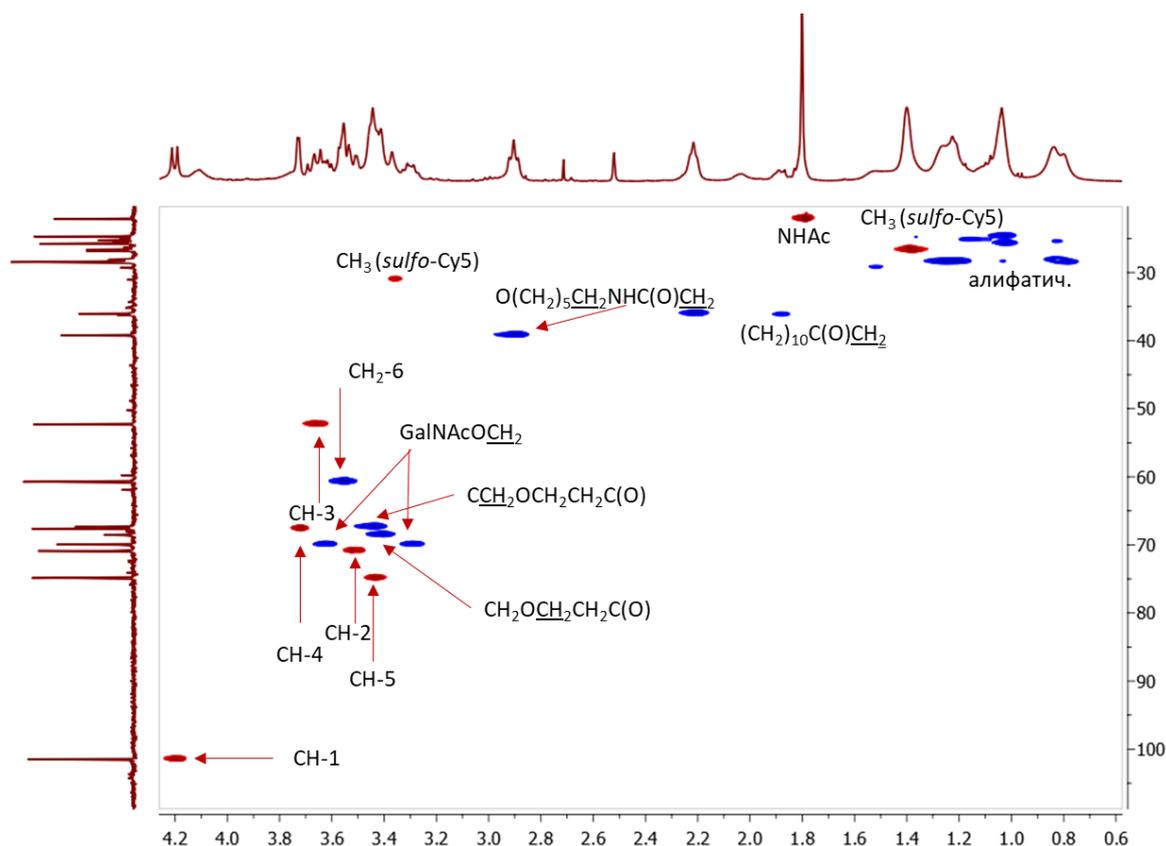


Рис. 22. Область алифатических сигналов $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ – HSQCAD спектра* соединения **34a**.

В электронных спектрах поглощения полученных веществ **34a,b** (Рис. 23) наблюдали максимум поглощения при 646 нм (при той же длине волны, что и для исходного флуорофора [118]).

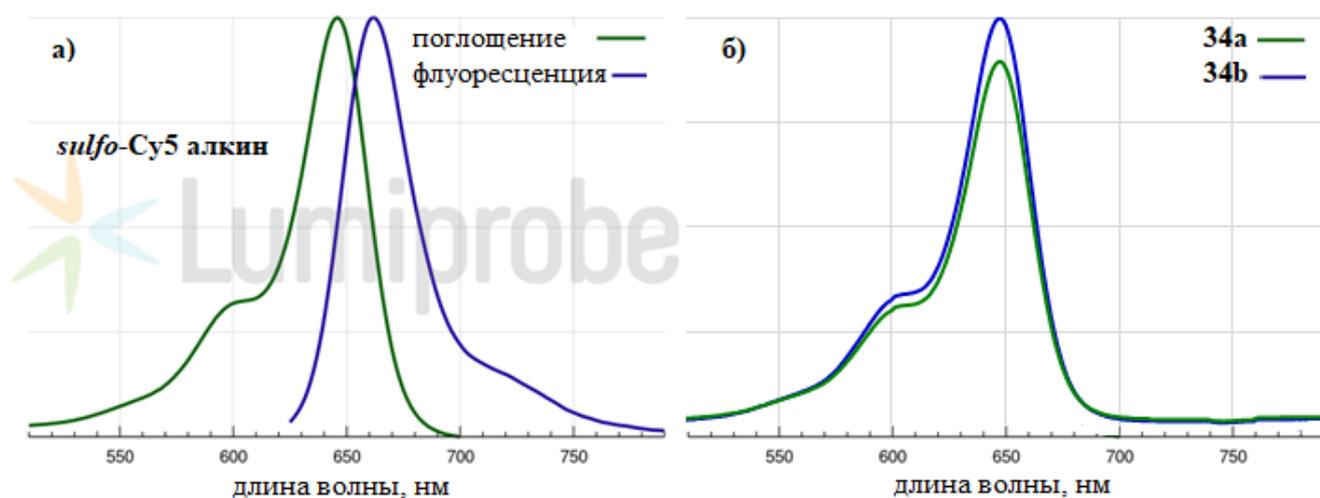


Рис. 23. Спектры а) поглощения и флуоресценции *sulfo-Cy5* алкина, приведенные на сайте производителя [118]; б) поглощения соединений **34a,b**.

* Автор выражает благодарность к.ф.-м.н. Рознятовскому Виталию Александровичу и д.х.н. Гришину Юрию Константиновичу за проведение корреляционного 2D ЯМР эксперимента

Соединение **34a** было использовано в нескольких биологических тестах *in vitro* и *in vivo*. Эксперимент *in vitro* был направлен на исследование проникновения подобных структур в различные типы клеток.* Клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), содержащие на поверхности ASGPR, и эмбриональные клетки почек (HEK-293), на поверхности которых рецептор отсутствует, обрабатывали раствором соединения **34a** и измеряли интенсивность флуоресценции методом проточной цитофлуориметрии. Параллельно проводили подобный эксперимент, только перед тем как добавить к клеточным линиям флуоресцентный конъюгат **34a**, их обрабатывали раствором лиганда **17a**, концентрация которого в 100 раз превосходила концентрацию конъюгата **34a**. Лиганд не содержит фрагмент флуорофора, но способен связываться с ASGPR (Рис. 24).

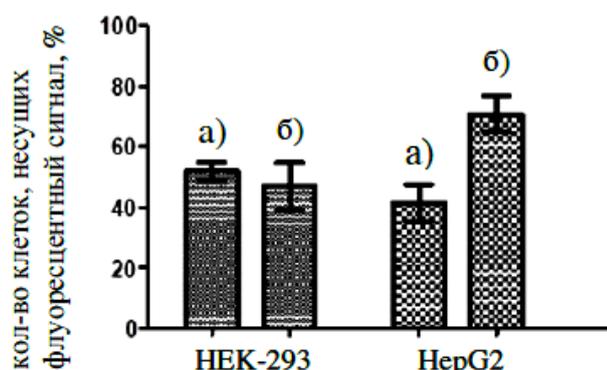


Рис. 24. Процент клеток, несущих сигнал флуоресценции, измеренный: а) после последовательной обработки клеточных линий HEK-293 и HepG2 лигандом **17a** и конъюгатом **34a**; б) - после обработки клеточных линий конъюгатом **34a**.

При проведении измерений на клеточной линии HEK-293 не было обнаружено значимой разницы между полученными результатами в разных вариантах эксперимента, в то же время на клеточной линии HepG2 наблюдали снижение проникновения конъюгата **34a** в клетки в случае блокирования рецептора лигандом **17a**. Интенсивный сигнал флуоресценции во всех четырех случаях (более 40% клеток), по-видимому, вызван неспецифическим взаимодействием конъюгата **34a** с клеточными мембранами (известно, что флуорофоры цианинового ряда могут адсорбироваться на поверхности клеток). Метод флуоресцентной проточной цитометрии не позволяет определить, где именно локализуется конъюгат: на поверхности или внутри клетки. Однако

* Автор выражает благодарность к.м.н. Салтыковой И.В. за проведение *in vitro* исследования и помощь в интерпретации результатов.

наблюдаемая тенденция к усиленному накоплению конъюгата **34a** клетками HepG2, экспрессирующими ASGPR, в сравнении с клетками HEK-293, на которых рецептор не представлен, а также снижение количества клеток HepG2, несущих сигнал флуоресценции, после блокировки рецептора, говорит в пользу того, что помимо неспецифической адсорбции конъюгат **34a** способен проникать в клетки гепатоцеллюлярной карциномы посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Помимо *in vitro* тестирования проводили *in vivo* исследование динамики распределения конъюгата **34a** по клеткам печени с помощью интравитальной (прижизненной) микроскопии.* Для этого животное вводили в наркоз, проводили разрез кожи и брюшины, перерезали печеночно-диафрагмальную и печеночно-желудочную связки и помещали печень на покровное стекло на подогреваемой платформе инвертированного конфокального микроскопа. Для окраски макрофагов и нейтрофилов до начала съемки в вену вводили флуоресцентно-меченные антитела, специфичные по отношению к данным клеткам. Лиганд, конъюгированный с *sulfo-Cy5*, вводили в момент съемки.

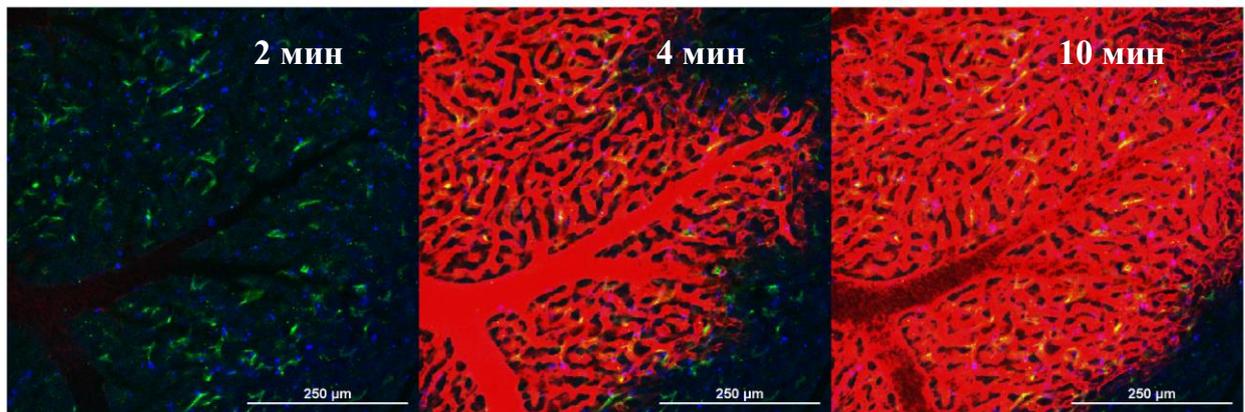


Рис. 25. Кадры из видеосъемки, полученной при проведении интравитальной микроскопии печени мыши. Зеленым цветом окрашены макрофаги печени, синим – нейтрофилы, красный цвет – сигнал флуоресценции конъюгата **34a**.

Интравитальная микроскопия дает возможность исследовать взаимодействие вещества с клетками *in vivo* в режиме реального времени. Сразу после введения животному конъюгата **34a** наблюдали его циркуляцию в печеночных синусоидах. К 10-й минуте концентрация препарата в сосудах уменьшалась, а в паренхиме органа,

* Данная часть исследований была выполнена совместно с лабораторией «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ «МИСиС». Автор выражает благодарность к.м.н. Науменко В.А. за проведение интравитальной микроскопии и помощь в интерпретации результатов.

напротив, увеличивалась (Рис. 25). На протяжении всего времени съемки (2 часа) наблюдали устойчивый сигнал флуоресценции с характерной для *sulfo-Cy5* длиной волны. Таким образом, лиганд **34a** способствует быстрому и эффективному проникновению и флуорофора в целевые клетки, его накоплению и удержанию.

ASGPR относится к классу лектинов (рецепторов, распознающих терминальные углеводные остатки). Представители этого класса присутствуют на поверхности других типов клеток печени, поэтому углеводсодержащие лиганды теоретически могут захватываться нецелевыми типами клеток. Чтобы подтвердить специфичность проникновения вещества в гепатоциты, исследовали взаимодействие конъюгата с другими клетками - макрофагами и нейтрофилами печени, которые выявляли с помощью флуоресцентных антител (анти-F4/80-Alexa-488 и анти-Ly6G-BV421, соответственно). Съемку проводили в трех каналах (DAPI/FITC/Cy5) (Рис. 26). Было показано, что конъюгат **34a** не попадает в макрофаги и нейтрофилы, а проникает исключительно в гепатоциты.

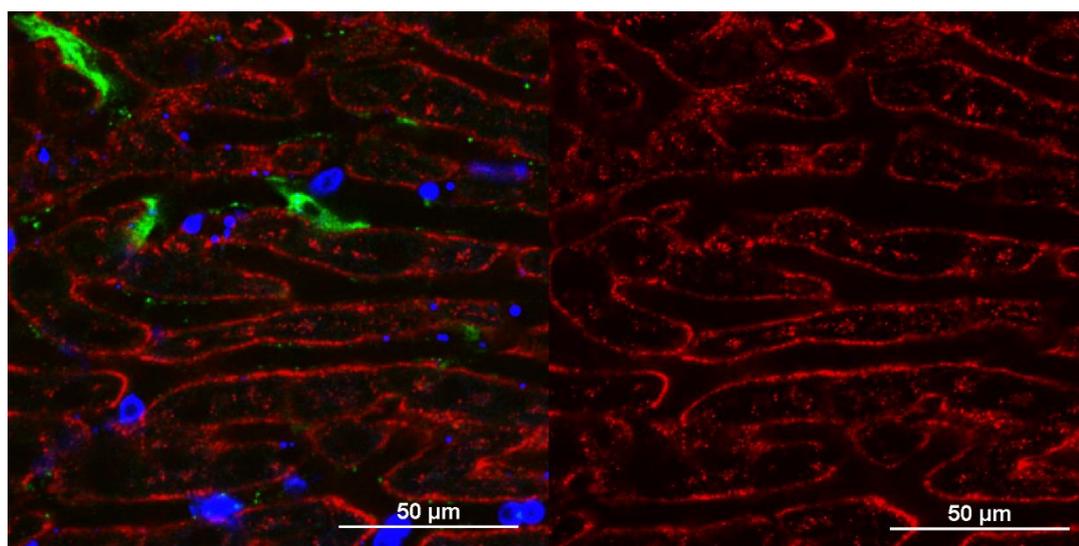


Рис. 26. Снимки клеток печени с введенным соединением **34a**, зарегистрированные в различных спектральных диапазонах. Зеленый цвет соответствует макрофагам, синий – нейтрофилам, красный цвет – сигнал флуоресценции конъюгата **34a**.

На изображениях, полученных при проведении интравитальной микроскопии видно (Рис. 25 и Рис. 26), что конъюгат распределяется по клетке неравномерно: часть вещества остается на мембране, часть накапливается в цитоплазматических везикулах, предположительно в эндосомах. Полученный результат согласуется с данными экспериментов *in vitro*, говорит в пользу частичного неспецифического взаимодействия вещества с клеточной мембраной.

Конъюгат **34b** на основе *N*-ацетилглюкозамина также был исследован с помощью интравитальной микроскопии. В отличие от GalNAc-содержащего изомера **34a** конъюгат **34b** не продемонстрировал способности проникать в гепатоциты, а накапливался на поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих печеночные синусоиды (Рис. 27).

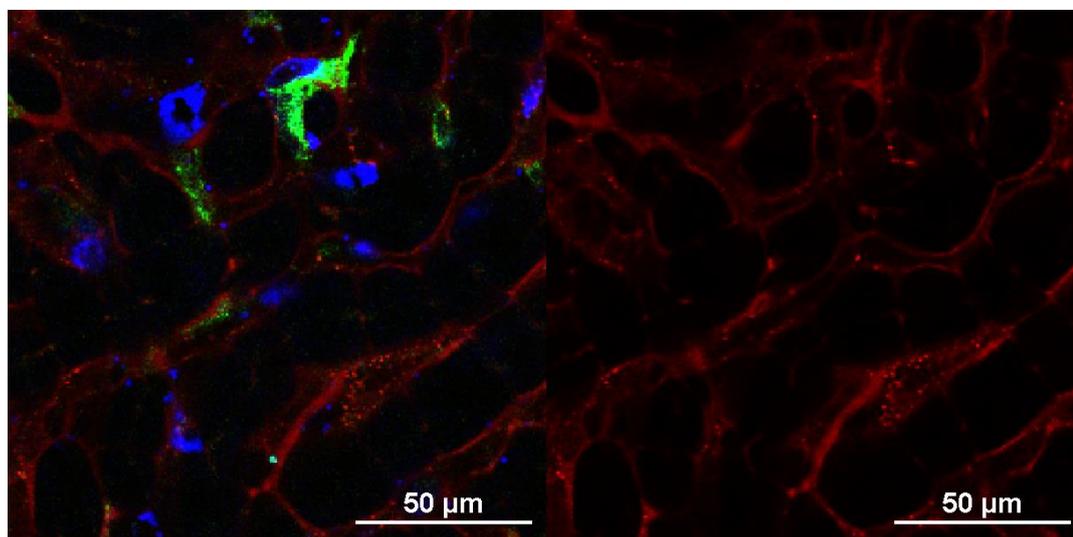


Рис. 27. Снимки клеток печени с введенным соединением **34b**, зарегистрированные в различных спектральных диапазонах. Зеленый цвет соответствует макрофагам, синий – нейтрофилам, красный цвет – сигнал флуоресценции конъюгата **34b**.

Полученные в *in vitro* и *in vivo* экспериментах данные говорят в пользу того, что лиганд **17a** способствует быстрому, специфичному и эффективному проникновению и флуорофора в целевые клетки, его накоплению и удержанию. *In vivo* исследование конъюгатов **34a,b** с помощью интравитальной микроскопии проведено впервые и доказывает принципиальную возможность использования лиганда **17a** для доставки лекарственных препаратов и средств диагностики в клетки печени.

3.3.3. Конъюгаты паклитаксела

При подготовке данного раздела использована собственная публикация автора [96].

Анализ литературных данных показал, что разработка конъюгатов паклитаксела, обладающих лучшей растворимостью в воде и селективно абсорбируемых опухолевыми клетками, является актуальной задачей, а также, что для получения пролекарств паклитаксела направленного действия его обычно модифицируют по 2'-ОН или 7-ОН группам, образуя сложные эфиры, которые легко гидролизуются после попадания в клетку. И в случае производных по С-2' положению, и в случае производных по С-7

положению не наблюдают существенного падения биологической активности, однако, с точки зрения простоты проведения синтеза предпочтительнее оказывается первый вариант.

Для модификации паклитаксела в данной работе использовались 6-азидогексановая кислота (**35**) и гекс-5-иновая кислота. 6-Азидогексановая кислота предварительно была получена из 6-бромгексановой кислоты по реакции нуклеофильного замещения атома брома с помощью азид натрия (Схема 28).

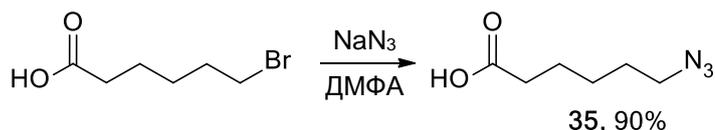


Схема 28.

Паклитаксел был модифицирован реакцией этерификации по положению 2'-ОН (Схема 29). В результате были получены производные **36**, **37**.

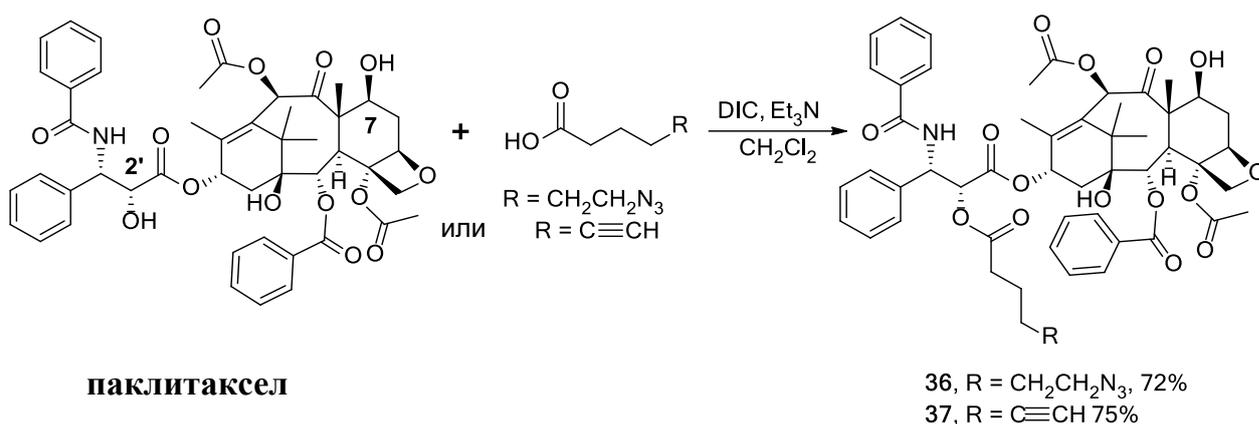


Схема 29.

На заключительном этапе работы соединения **36**, **37** и лиганды ASGPR были введены в реакцию медь-катализируемого [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения. В первом случае модифицированный паклитаксел **37** вводили в реакцию с углеводным лигандом **17a**, содержащим в своем составе три остатка *N*-ацетилгалактозамина. Реакцию проводили в стандартных условиях реакции [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии сульфата меди и аскорбата натрия в смеси вода-ДМФА (Схема 30).

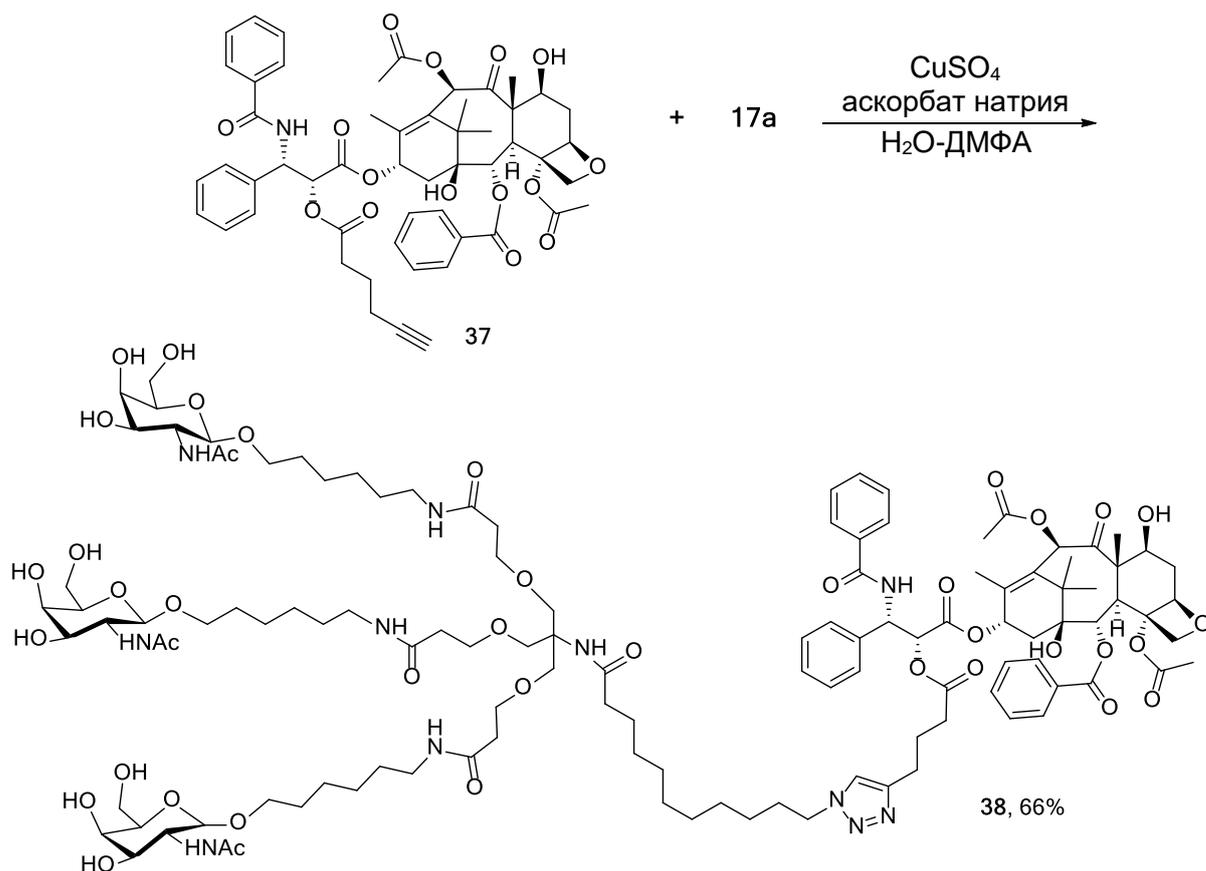


Схема 30.

Конъюгат **38** выделяли с помощью колоночной хроматографии. Выход продукта составил 66%. Полученное соединение **38** продемонстрировало хорошую стабильность в физиологических условиях: анализ с помощью ВЭЖХ-МС не выявил продуктов гидролиза в водных средах pH 5.0 и 7.4 даже через 24 часа (Рис. 28). В связи с этим, ожидается, что конъюгат не будет подвержен быстрой деградации в кровотоке при внутривенном введении и успешно достигнет целевых тканей.

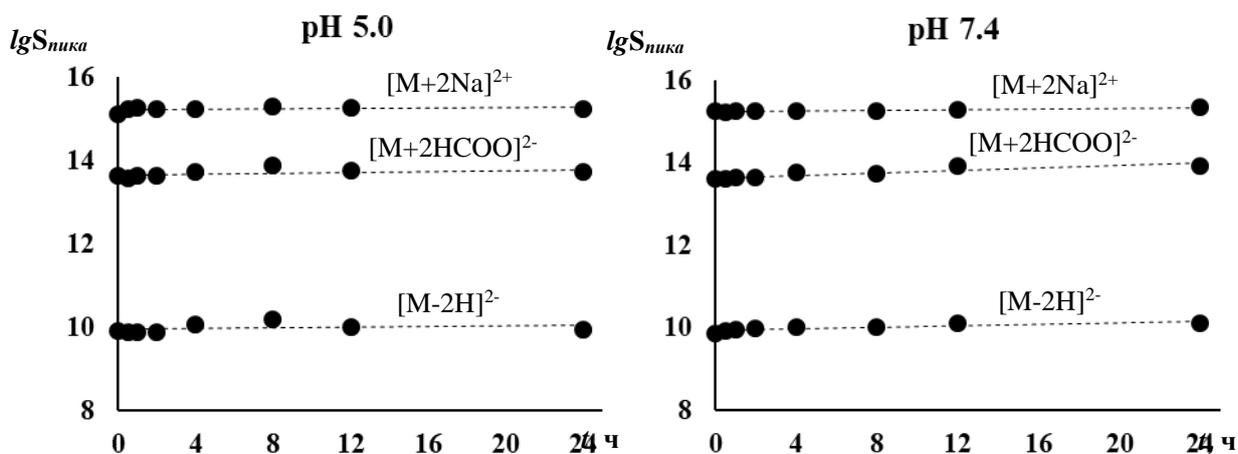


Рис. 28. Кинетика гидролиза конъюгата **38** в водной среде.

В то же время при выдерживании соединения **38** с раствором эстеразы печени свиньи в хроматограммах, полученных с помощью ВЭЖХ-МС, наблюдали постепенное уменьшение количества исходного соединения (Рис. 29).

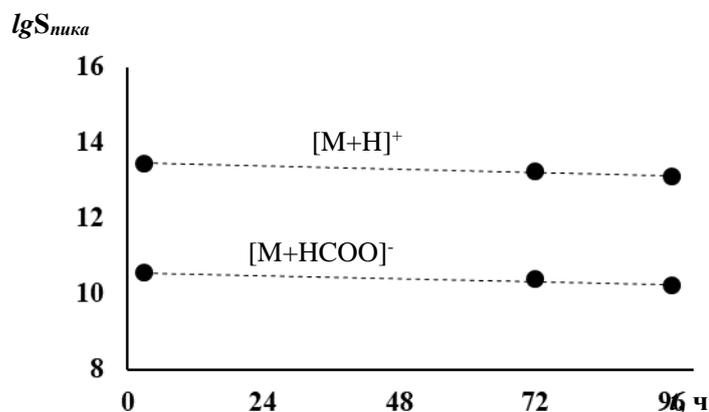


Рис. 29. Кинетика гидролиза конъюгата **38** под действием эстеразы печени свиньи.

Для исследования цитотоксичности полученного соединения использовали стандартный MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолиум) тест (Таблица 9). Для контроля полученных результатов использовали экспериментальные данные, опубликованные ранее в работе [119].

Таблица 9. Цитотоксичность полученного конъюгата **38** в сравнении с немодифицированным паклитакселом, измеренная с помощью MTS теста*

Соединение	38	паклитаксел	
CC ₅₀ , мкМ	0.11±0.12	0.12±0.01	0.21±0.03 [119]

Соединение **38**, как и ожидалось, продемонстрировало цитотоксическую активность на уровне с немодифицированным препаратом. По-видимому, после попадания в клетку сложноэфирная связь разрушается под действием внутриклеточных эстераз и терапевтический агент высвобождается. Таким образом, конъюгирование паклитаксела с лигандом **17a** не приводит к снижению эффективности действия препарата. Важным моментом также стало существенное повышение растворимости лекарственного средства в воде.

Исходя из данных биологических исследований вещества **38** и конъюгата с флуоресцентным красителем **34a**, можно предположить, что введение адресного

* Автор выражает благодарность к.м.н. Салтыковой И.В. за проведение биологических экспериментов для определения цитотоксичности

фрагмента в молекулу паклитаксела приведет к улучшению его фармакокинетических параметров в последующих *in vivo* тестах.

Во втором случае производное паклитаксела **36** конъюгировали с неуглеводным лигандом **30** в тех же условиях (Схема 31).

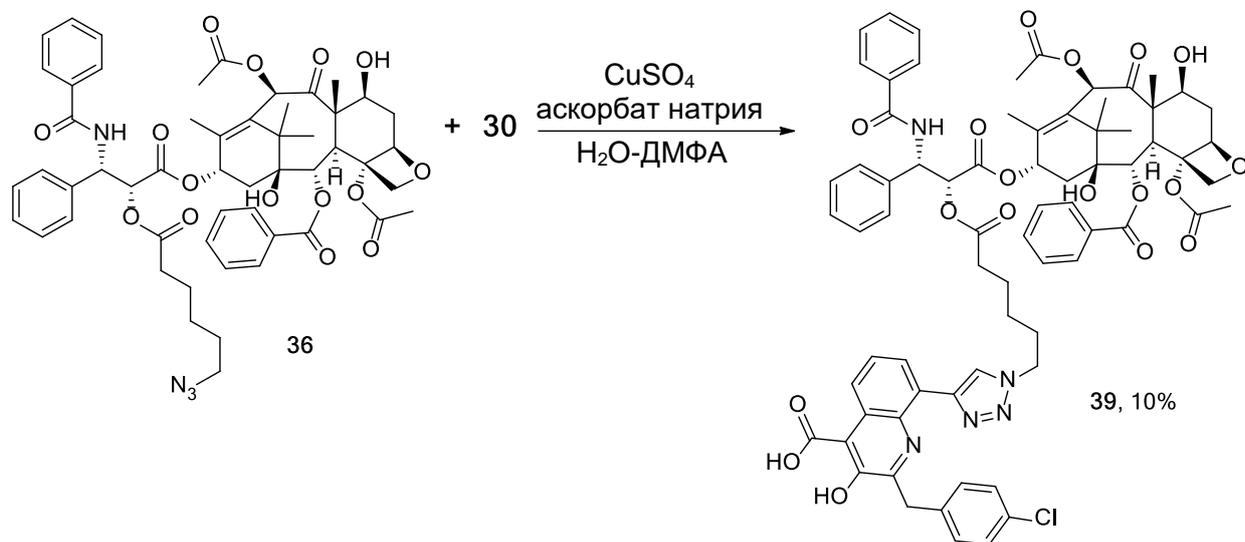


Схема 31.

Соединение **39** выделяли колоночной хроматографией. Строение и состав конъюгата подтверждали с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

В результате, на примере соединения **30** и производного паклитаксела **36** показано, что предложенные в работе лиганды могут быть использованы для синтеза конъюгатов противоопухолевых препаратов для направленного транспорта в клетки гепатоцеллюлярной карциномы.

Таким образом, в ходе выполнения диссертационного исследования была разработана стратегия синтеза *N*-ацетилгалактозамин-содержащих лигандов ASGPR двух структурных типов, а также изомерных им соединений – производных *N*-ацетилглюкозамина, предложен метод получения ранее не известных лигандов ASGPR - 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот. Показано, что синтезированные в работе векторные фрагменты могут быть использованы для конъюгирования с терапевтическими и диагностическими агентами различного строения (на примере *mi*РНК, противоопухолевого препарата паклитаксела, флуоресцентного красителя *sulfo*-Cy5 алкин).

4. Экспериментальная часть

ЯМР спектры ^1H и ^{13}C регистрировали на приборах Bruker Avance 400 с рабочими частотами 400 и 100 МГц, Agilent 400 MR с частотами 400 и 100 МГц.

Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре высокого разрешения Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific). Растворы образцов в ацетонитриле с 1% муравьиной кислоты вводили в источник ионизации методом электрораспыления.

Очистку и анализ образцов методом ВЭЖХ-МС проводили с использованием системы Shimadzu Prominence LC-20 с конвекционной колонкой и коллектором фракций, соединенным с одиночным квадрупольным масс-спектрометром Shimadzu LCMS-2020 с двойным источником ионизации DUIS-ESI-APCI. Аналитической и препаративной колонкой была Phenomenex Luna 3u C18 100A.

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье IR200 (ThermoNicolet, USA) с разрешением 4 см^{-1} .

Электронные спектры поглощения регистрировали на приборе HITACHI U-2900.

Температуры плавления измеряли на приборе Optimelt MPA100.

Контроль за ходом реакции и чистотой хроматографического разделения веществ осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках MACHEREY-NAGEL DC-Fertigfolien ALUMOGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄.

Хроматографическое разделение проводили на колонках с силикагелем марки MACHEREY-NAGEL Kieselgel 60 0.04-0.063 mm.

Очистку растворителей проводили согласно стандартным методикам [120]. В работе использовали коммерческие реактивы (“Sigma-Aldrich”, “Fluka®Analytical”, “abc”, “Carbosynth”, “Lumiprobe”) без дополнительной очистки.

4.1 Синтез разветвленных лигандов ASGPR

4.1.1 Синтез трикарбоновой кислоты 4

трис-{[2-(*трет*-Бутоксикарбонил)этокси]метил}метиламин (1)

Синтез *трис*-{[2-(*трет*-бутоксикарбонил)этокси]метил}метиламина проводили согласно методике [121]. К раствору 2-амино-2-(гидроксиметил)-пропан-1,3-диола (1.2

г, 10 ммоль) в смеси 5М NaOH (200 мкл) и ДМСО (2 мл) в атмосфере аргона при охлаждении добавляли по каплям *трет*-бутилакрилат (5 мл, 34 ммоль), после чего реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение суток, выливали в 50 мл воды и дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические вытяжки промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (гексан/EtOAc + 0.05об.% NH₃(водн), 1/1 → 1/2, v/v).

Получали 1.2 г (45%) бесцветного масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 3.63 (т, *J* = 6.4 Гц, 6H, 3xC(O)CH₂CH₂O); 3.31 (с, 6H, 3xOCH₂C); 2.43 (т, *J* = 6.4 Гц, 6H, 3xC(O)CH₂CH₂O); 2.01 (уш.с, 2H, NH₂); 1.42 (с, 27H, 3x(CH₃)₃C).

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 170.8 (C=O'Bu); 80.3 (C(CH₃)₃); 72.7 (CCH₂O); 67.0 (OCH₂CH₂); 55.9 (H₂NC); 36.2 (CH₂COO'Bu); 28.0 (OC(CH₃)₃).

Спектры ¹H и ¹³C ЯМР согласуются с литературными данными [121].

11-азидоундекановая кислота (2)

11-бромундекановую кислоту (3.0 г, 11.3 ммоль) и азид натрия (3.7 г, 56.6 ммоль) растворяли в ДМФА. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 часов, выливали в воду, экстрагировали этилацетатом. Органическую фракцию промывали водой. Растворитель удаляли при пониженном давлении.

Получали 2.2 г (79 %) прозрачного масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 11.91 (уш. с, 1H, COOH), 3.29 (т, *J* = 6.9 Гц, 2H, CH₂N₃), 2.17 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H, CH₂COOH), 1.56 – 1.47 (м, 4H, C(O)CH₂(CH₂)₉, CH₂CH₂N₃), 1.33 – 1.26 (м, 12H, (CH₂)₆CH₂CH₂N₃).

Спектр ¹H ЯМР согласуется с литературными данными [122].

N-трис-{[2-(*трет*-Бутоксикарбонил)этокси]метил}метиламид 11-азидоундекановой кислоты (3)

К раствору 11-азидоундекановой кислоты (235 мг, 1 ммоль), EDC (190 мг, 1 ммоль) и Et₃N (0.2 мл, 1.3 ммоль) в 2 мл CH₂Cl₂ добавляли 500 мг (1 ммоль) амина **1**. Полученную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на 12 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в эфире и

промывали 0.5M раствором HCl, насыщенным раствором NaCl, высушивали над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученное масло очищали колоночной хроматографией (CHCl₃/MeOH, 100/0 → 50/1, v/v).

Получали 350 мг (60%) прозрачного масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 6.03 (уш. с, 1H, NH), 3.70 (с, 6H, 3xOCH₂C), 3.64 (т, *J* = 6.3 Гц, 6H, 3xC(O)CH₂CH₂O), 3.25 (т, *J* = 6.9 Гц, 2H, CH₂N₃), 2.44 (т, *J* = 6.3 Гц, 6H, 3xC(O)CH₂CH₂O), 2.14 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H, C(O)CH₂(CH₂)₉), 1.62 – 1.54 (м, 4H, (CH₂)₈CH₂CH₂C(O), CH₂CH₂N₃), 1.44 (с, 27H, 3x(CH₃)₃C), 1.39 – 1.27 (м, 12H, (CH₂)₆CH₂CH₂N₃).

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 173.5 (N₃(CH₂)₁₀C(O)NH), 170.9 (COO'Bu), 80.4 (C(CH₃)₃), 69.2 (NHCCCH₂O), 67.0 (OCH₂CH₂COO'Bu), 59.6 (NHCCCH₂O), 51.5 (N₃CH₂), 37.3 (CH₂C(O)NH), 36.2 (OCH₂CH₂COO'Bu), 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.8, (N₃CH₂CH₂CH₂(CH₂)₅), 28.1 (C(CH₃)₃), 26.7 (N₃CH₂CH₂CH₂), 25.7 (CH₂CH₂C(O)NH).

ИК (CDCl₃), ν/cm⁻¹: 3361, 3421 (N-H); 2096 (N₃); 1730, 1677 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₃₆H₆₆N₄O₁₀Na [M+Na]⁺ *m/z*: 737.4671, найдено – 737.4662.

***N*-трис-{[2-Карбоксиэтокси]метил}метиламид 11-азидоундекановой кислоты (4)**

трет-Бутиловый эфир **3** (350 мг, 0.5 ммоль) перемешивали в 7 мл муравьиной кислоты в течение 12 часов, после чего муравьиную кислоту удаляли при пониженном давлении.

Получали 265 мг (выход количественный) белого кристаллического вещества.

*T*_{пл} 89–90 °C.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 10.90 (уш. с, 3H, 3xCOOH), 6.09 (уш. с, 1H, NH), 3.70 – 3.69 (м, 12H, 3xC(O)CH₂CH₂O, 3xOCH₂C), 3.24 (т, *J* = 6.9 Гц, 2H, CH₂N₃), 2.57 (т, *J* = 6.0 Гц, 6H, 3xC(O)CH₂CH₂O), 2.15 (т, *J* = 7.6 Гц, 2H, C(O)CH₂(CH₂)₉), 1.61 – 1.54 (м, 4H, (CH₂)₈CH₂CH₂C(O), CH₂CH₂N₃), 1.36 – 1.23 (м, 12H, (CH₂)₆CH₂CH₂N₃).

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 176.7 (COOH), 174.7 ((CH₂)₁₀C(O)NH), 69.1 (NHCCCH₂O), 66.4 (OCH₂CH₂), 59.7 (NHCCCH₂O), 51.4 (N₃CH₂), 37.0 (CH₂C(O)NH), 34.7 (CH₂COOH), 29.4 (N₃CH₂CH₂), 29.3, 29.2, 29.0, 28.9, 28.7, 26.6, 25.6 (N₃CH₂(CH₂)₇).

ИК-спектр (CDCl₃), ν/cm⁻¹: 2096 (N₃); 1716, 1631 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $C_{24}H_{42}N_4O_{10}Na$ $[M+Na]^+$ m/z 569.2793, найдено – 569.2798.

4.1.2 Синтез агликона 6

Моно-Вос-1,3-диаминопропан (5)

Синтез моно-Вос-1,3-диаминопропана проводили согласно методике [123]. К раствору 1,3-диаминопропана (23.5 мл, 283.5 ммоль) в 50 мл 1,4-диоксана при температуре 0 °С постепенно добавляли раствор Woc_2O (8.1 мл, 35.0 ммоль) в 50 мл 1,4-диоксана. После перемешивания в течение ночи растворитель удаляли при пониженном давлении. Полученное белое масло растворяли в 60 мл воды, отфильтровывали выпавший осадок, фильтрат экстрагировали 4×25 мл CH_2Cl_2 . Объединенные органические фракции высушивали над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении.

Получали 3.34 г (52%) бесцветного масла.

1H ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д.): 5.11 (уш. с, 1H, $C(O)NH$), 3.13 – 3.08 (м, 2H, CH_2NHWoc), 2.66 (т, $J = 6.7$ Гц, 2H, NH_2CH_2), 1.51 (кв, $J = 6.7$ Гц, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.34 (с, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.21 (уш. с, 2H, NH_2).

Спектр 1H ЯМР согласуется с литературными данными [123].

трет-Бутил{3-[(5-гидроксипентаноил)амино]пропил}карбамат (6)

В 50 мл толуола растворяли δ -валеролактон (0.6 мл, 7 ммоль), Вос-1,3-диаминопропан (1.2 г, 7 ммоль) и оставляли перемешиваться в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты на 24 часа при температуре 70°С. После упаривания толуола полученное желтое масло очищали с помощью колоночной хроматографии (этилацетат/метанол, 10/1, v/v).

Получали 1.7 г (90%) белого кристаллического вещества.

$T_{пл}$ 58–60 °С.

1H ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д.): 6.72 (уш. с, 1H, $NHC(O)$), 5.10 (уш. с, 1H, $NHWoc$), 3.63 (т, $J = 6.2$ Гц, 2H, $HOCH_2$), 3.27 (к, $J = 6.1$ Гц, 2H, $C(O)NHCH_2(CH_2)_2NH$), 3.19 (уш. с, 1H, CH_2OH), 3.18 – 3.10 (м, 2H, CH_2NHWoc), 2.25 (т, $J = 7.2$ Гц, 2H, $HO(CH_2)_3CH_2C(O)$), 1.78 – 1.68 (м, 2H, CH_2CH_2OH), 1.65 – 1.54 (м, 4H, CH_2CH_2NH , $CH_2CH_2C(O)$), 1.42 (с, 9H, $OC(CH_3)_3$).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 173.7 ($\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 156.7 (NHCOO^tBu), 79.4 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 62.0 (HOCH_2), 37.1 (CONHCH_2), 36.0 (CH_2NHBOc), 35.9 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 31.9 (HOCH_2CH_2), 30.1 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$) 28.4 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 21.8 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$).

ИК (CDCl_3), ν/cm^{-1} : 3361, 3338 (N-H); 1689, 1637 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : 297.1785, найдено – 297.1785.

4.1.3 Синтез гликозидов 11a,b и 14a,b

Общая методика синтеза 2-(ацетамидо)-2-дезоксид-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-*D*-гексапираноз

Синтез 2-(ацетамидо)-2-дезоксид-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-*D*-гексапираноз проводили согласно методике [124]. К раствору 2-амино-2-дезоксидпиранозы гидрохлорида (4 г, 22.2 ммоль) в 20 мл безводного пиридина добавляли 10 мл уксусного ангидрида. Полученную смесь перемешивали в течение 10 часов при комнатной температуре.

1,3,4,6-Тетра-*O*-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид- β -*D*-галактопираноза (8a)

Реакционную смесь выливали в воду, выпавший белый осадок отфильтровывали и промывали водой.

Получали 7.6 г (88%) белого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 237–240 °C [125].

^1H ЯМР ($\text{DMFSO}-d_6$, δ , м.д.): 7.90 (д, $J = 9.2$ Гц, 1H, NHAc), 5.64 (д, $J = 8.8$ Гц, 1H, H-1), 5.27 (д, $J = 3.1$ Гц, 1H, H-4), 5.06 (дд, $J = 11.3, 3.4$ Гц, 1H, H-3), 4.22 (м, 1H, H-5), 4.13 – 3.94 (м, 3H, H-2, H-6', H-6''), 2.12, 2.03, 1.99, 1.90 (все с, все по 3H, $4 \times \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.76 (с, 3H, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [126].

1,3,4,6-Тетра-*O*-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид- β -*D*-глюкопираноза (8b)

Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, остаток растворяли в 100 мл CH_2Cl_2 , промывали водой, насыщенными растворами NaHCO_3 и NaCl , высушивали над безводным Na_2SO_4 и удаляли растворитель при пониженном давлении.

Получали 8 г (92%) белого аморфного вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 6.18 (д, $J = 3.6$ Гц, 1H, NHAc), 5.55 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, H-1), 5.28 – 5.19 (м, 2H, H-3, H-4), 4.49 (ддд, $J = 8.7, 6.7, 3.6$ Гц, 1H, H-2), 4.26 (дд, $J = 12.5, 4.0$ Гц, 1H, H-6'), 4.07 (дд, $J = 12.5, 2.3$ Гц, 1H, H-6''), 4.00 (ддд, $J = 9.6, 4.0, 2.3$ Гц, 1H, H-5), 2.20, 2.10, 2.05, 2.04 (все с, все 3H, 4xOAc), 1.95 (с, 3H, NHAc).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [127].

Общая методика получения гликозидов 10a,b и 13a,b

К раствору соответствующей 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-*D*-гексапиранозы **8a** или **8b** в 1,2-дихлорэтане (1.0M) добавляли 1.2 экв TMSOTf и оставляли перемешиваться при температуре 50 °C на 4 часа. После охлаждения в реакционную смесь добавляли Et_3N (1.5 экв), перемешивали в течение 1.5 часов. Полученную смесь наносили на тонкий слой силикагеля, тщательно промывали CH_2Cl_2 , элюировали этилацетатом промежуточный оксазолин. Полученное светло-желтое масло растворяли в 1,2-дихлорэтане (0.3M), добавляли соответствующий агликон (1.2 экв) и перемешивали в течение 30 минут с молекулярными ситами 4Å. После этого добавляли 0.5 экв TMSOTf и оставляли при комнатной температуре на сутки. Продукт выделяли колоночной хроматографией ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20/1, v/v).

трет-Бутил-*N*-[10-(2-ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-*O*-ацетил- β -*D*-галактопиразиноксид)-5-оксо-4-аза-нонил]-карбамат (10a)

Из 1 г (2.7 ммоль) 2-(ацетиламино)-2-дезоксид-1,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-*D*-галактопиранозы (**8a**) и 0.9 г (3.3 ммоль) спирта **6** получали 1.3 г (80%) гликозида **10a** в виде бесцветного масла.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.06 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H, NHAc), 6.94 (уш. с, 1H, CONHCH_2), 5.33 (уш. с, 1H, NHBOc), 5.25 (д, $J = 2.8$, 1H, H-4), 5.10 (дд, $J = 11.6, 2.8$ Гц, 1H, H-3), 4.53 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H, H-1), 4.07 – 3.95 (м, 3H, $\text{OCH}'\text{H}''(\text{CH}_2)_3$, H-6', H-6''), 3.85 – 3.82 (м, 2H, H-2, H-5), 3.43 – 3.38 (м, 1H, $\text{OCH}'\text{H}''(\text{CH}_2)_3$), 3.23 – 3.13 (м, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 3.06 – 3.04 (м, 2H, CH_2NHBOc), 2.17 – 2.07 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 2.04, 1.94, 1.88, 1.86 (все с, все по 3H, 4xAc), 1.72 – 1.64, 1.57 – 1.47 (оба м, всего 6H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBOc}$), 1.33 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [128].

трет-Бутил-N-[10-(2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкопиранозил)-5-оксо-4-аза-нонил]-карбамат (10b)

Из 1.5 г (4.0 ммоль) 2-(ацетиламино)-2-дезоксиглюкопиранозы (**8b**) и 1.3 г (4.9 ммоль) спирта **6** получали 1.4 г (60%) гликозида **10b** в виде бесцветного масла.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 6.85 (уш. с, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 6.74 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H, NHAc), 5.24 (т, $J = 9.7$ Гц, 1H, H-4), 5.21 (уш. с, 1H, NHBOc), 5.03 (т, $J = 9.7$ Гц, 1H, H-3), 4.63 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H, H-1), 4.24 (дд, $J = 12.2$, 4.8 Гц, 1H, H-6'), 4.09 (дд, $J = 12.2$, 2.1 Гц, 1H, H-6''), 3.94 – 3.83 (м, 2H, $\text{OCH}'\text{H}''(\text{CH}_2)_3$, H-2), 3.68 (ддд, $J = 9.7$, 4.8, 2.1 Гц, 1H, H-5), 3.52 – 3.46 (м, 1H, $\text{OCH}'\text{H}''(\text{CH}_2)_3$), 3.31 – 3.22 (м, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 3.16 – 3.11 (м, 2H, CH_2NHBOc), 2.34 – 2.14 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 2.05, 1.99, 1.99 (все с, все по 3H, 3xOAc), 1.93 (с, 3H, NHAc), 1.79 – 1.70, 1.64 – 1.55 (оба м., всего 6H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBOc}$) 1.41 (с, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 173.6 ($\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.8 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 170.7, 170.7, 169.4 (3x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$), 156.5 (NHCOO^tBu), 100.4 (C-1), 79.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 72.6 (C-3), 71.6 (C-5), 69.3 (C-4), 68.7 (OCH_2CH_2), 62.1 (C-6), 54.4 (C-2), 37.1 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 36.0 (CH_2NHBOc), 35.7 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 30.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBOc}$), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.0 (OCH_2CH_2), 23.1 ($\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$), 22.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 20.7 20.6, 20.6 (3x $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$).

ИК (CDCl_3), ν/cm^{-1} : 3313 (N-H); 1751, 1687, 1660 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : 626.2895, найдено – 626.2892.

1-[N-Карбоксибензил-6-аминогексил]-2-(ацетиамидо)-2-дезоксиглюкопираноза (13a)

Из 1.5 г (4.0 ммоль) 2-(ацетиламино)-2-дезоксиглюкопиранозы (**8a**) и 1.2 г (4.8 ммоль) N-карбоксибензил-6-аминогексан-1-ола получали 1.7 г (74 %) гликозида **13a** в виде аморфного вещества белого цвета.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.36 – 7.29 (м, 5H, аром.), 6.14 (уш. с, 1H, NHAc), 5.34 (д, $J = 2.3$ Гц, 1H, H-4), 5.26 (дд, $J = 11.2$, 2.3 Гц, 1H, H-3), 5.15 – 5.07 (м, 2H, CH_2Ph), 4.92 (уш. с, 1H, NHCBz), 4.64 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H, H-1), 4.18 – 4.08 (м, 2H, H-6, H-6'), 4.01 – 3.94 (м, 1H, H-2), 3.89 – 3.83 (м, 2H, H-5, $\text{OCH}'\text{H}''\text{CH}_2$), 3.47 (дт, $J = 10.0$, 6.4 Гц, 1H,

ОСН'Н"СН₂), 3.25 – 3.13 (м, 2Н, О(СН₂)₅СН₂ННСbz), 2.13, 2.04, 1.99 (все с, все по 3Н, 3хОС(О)СН₃), 1.95 (с, 3Н, ННС(О)СН₃), 1.62 – 1.42, 1.39 – 1.28 (оба м, всего 8Н, ОСН₂(СН₂)₄).

Спектры ¹Н ЯМР соответствуют литературным данным [54].

1-[N-Карбоксибензил-6-аминогексил]-2-(ацетамидо)-2-дезоксидезокси-3,4,6-три-О-ацетил-D-глюкопираноза (13b)

Из 1.4 г (3.7 ммоль) 2-(ацетиламино)-2-дезоксидезокси-1,3,4,6-тетраа-О-ацетил-D-глюкопиранозы (**8b**) и 1.1 г (4.4 ммоль) N-карбоксибензил-6-аминогексан-1-ола получали 1.6 г (69%) гликозида **13b** в виде белого кристаллического вещества.

T_{пл} 113–116 °С [129].

¹Н ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.25 – 7.20 (м, 5Н, аром.), 6.87 (д, J = 8.7 Гц, 1Н, НAc), 5.34 (уш. с, 1Н, НCbz), 5.21 (т, J = 9.7 Гц, 1Н, Н-4), 5.06 – 4.92 (м, 3Н, Н-3, СН₂Ph), 4.57 (д, J = 8.3 Гц, 1Н, Н-1), 4.16 (дд, J = 12.2, 4.6 Гц, 1Н, Н-6'), 4.01 (дд, J = 12.2, 2.5 Гц, 1Н, Н-6"), 3.82 – 3.71 (м, 2Н, Н-5, ОСН'Н"СН₂), 3.60 – 3.52 (м, 1Н, Н-2), 3.39 (дт, J = 9.8, 6.2 Гц, 1Н, ОСН'Н"СН₂), 3.14 – 3.00 (м, 2Н, СН₂ННСbz), 1.97 (с, 3Н, ОС(О)СН₃), 1.91 (с, 6Н, 2хОС(О)СН₃), 1.83 (с, 3Н, ННС(О)СН₃), 1.62 – 1.45, 1.40 – 1.25 (оба м, всего 8Н, ОСН₂(СН₂)₄).

Спектр ¹Н ЯМР соответствует литературным данным [129].

Общая методика синтеза N-(3-аминопропил)-5-[[2-(ацетамидо)-2-деокси-3,4,6-три-О-ацетил-D-гексапиранозил]окси]-пентанамидов (11a,b)

Соответствующее соединение **10a** или **10b** (0.6 г, 1 ммоль) перемешивали в течение 1.5 часов с 12 мл трифторуксусной кислоты в 48 мл СН₂Сl₂. Растворитель удаляли при пониженном давлении.

N-(3-Аминопропил)-5-[[3,4,6-три-О-ацетил-2-(ацетамидо)-2-дезоксидезокси-β-D-галактопиранозил]окси]-пентанамид (11a)

Получали 0.5 г (колич.) желтого масла.

¹Н ЯМР (DMSO-d₆, δ, м.д.) 7.94 (уш. с, 1Н, С(О)ННСН₂), 7.85 (д, J = 9.2 Гц, 1Н, НAc), 7.69 (уш. с, 3Н, NH₃⁺), 5.21 (д, J = 2.9 Гц, 1Н, Н-4), 4.96 (дд, J = 11.2, 2.9 Гц, 1Н, Н-3), 4.48 (д, J = 8.3 Гц, 1Н, Н-1), 4.06 – 3.99 (м, 3Н, Н-5, Н-6, Н-6'), 3.91 – 3.84 (м, 1Н,

H-2), 3.75 – 3.66 (м, 1H, OCH'H"CH₂), 3.45 – 3.36 (м, 1H, OCH'H"CH₂), 3.10 (к, $J = 6.3$ Гц, 2H, C(O)NHCH₂), 2.76 (к, $J = 6.8$ Гц, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.12 – 2.05 (м, 2H, CH₂C(O)NH), 2.10, 1.99, 1.89 (все с, все по 3H, 3xOC(O)CH₃), 1.77 (с, 3H, NHC(O)CH₃), 1.69 – 1.63, 1.46 – 1.44 (оба м., всего 6H, OCH₂(CH₂)₂, CH₂CH₂NH₃⁺).

Спектр ¹H ЯМР согласуется с литературными данными [130].

***N*-(3-Аминопропил)-5-[[3,4,6-три-*O*-ацетил-2-(ацетамидо)-2-деокси-β-*D*-глюкопиранозил]окси]-пентанамид (11b)**

Получали 0.5 г (колич.) желтого масла.

¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 7.96 (д, $J = 9.3$ Гц, 1H, NHAc), 7.92 (т, $J = 5.7$ Гц, 1H, C(O)NHCH₂), 7.71 (уш. с, 3H, NH₃⁺), 5.07 (т, $J = 9.8$, 1H, H-4), 4.82 (т, $J = 9.8$ Гц, 1H, H-3), 4.58 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H, H-1), 4.18 (дд, $J = 12.2, 4.8$ Гц, 1H, H-6'), 4.00 (дд, $J = 12.2, 1.9$ Гц, 1H, H-6''), 3.81 (ддд, $J = 9.8, 4.8, 1.9$ Гц, 1H, H-5), 3.76 – 3.65 (м, 2H, OCH'H"CH₂, H-2), 3.42 (дт, 1 H, $J = 10.0, 5.9$ Гц, OCH'H"CH₂), 3.09 (к, $J = 6.4$ Гц, 2H, C(O)NHCH₂), 2.80 – 2.72 (м, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.10 – 2.05 (м, 2H, CH₂C(O)NH), 2.01, 1.96, 1.90, 1.76, (все с, все по 3H, 4xAc), 1.69 – 1.62, 1.53 – 1.44 (оба м, всего 6H, OCH₂(CH₂)₂, CH₂CH₂NH₃⁺).

¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆, δ, м.д.): 172.6 (NHC(O)CH₃), 170.1 (C(O)NHCH₂), 169.6, 169.3, 169.3 (3xOC(O)CH₃), 100.3 (C-1), 72.7 (C-3), 70.7 (C-4), 68.7 (C-5), 68.7 (OCH₂CH₂), 61.9 (C-6), 53.2 (C-2), 36.8 (C(O)NHCH₂), 35.4 (CH₂NH₃⁺), 34.9 (CH₂C(O)NHCH₂), 28.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.6 (OCH₂CH₂), 22.6 (NHC(O)CH₃), 21.8 (CH₂CH₂C(O)NHCH₂), 20.5, 20.4, 20.3 (3xOC(O)CH₃)

ИК (CDCl₃), $\nu/\text{см}^{-1}$: 3354, 3282 (N-H); 1747, 1660 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₂₂H₃₈N₃O₁₀ [M]⁺ m/z : 504.2552, найдено – 504.2549.

Общая методика синтеза 1-[6-аминогексил]-2-(ацетамидо)-2-деокси-3,4,6-три-*O*-ацетил-*D*-гексапираноз (14a,b)

Соответствующую 1-[*N*-карбоксибензил-6-аминогексил]-2-(ацетамидо)-2-деокси-3,4,6-три-*O*-ацетил-*D*-гексапиранозу (13a или 13b) (540 мг, 1 ммоль) растворяли в этаноле (10 мл), в полученную смесь добавляли палладий на угле (54 мг) и выдерживали в атмосфере водорода при комнатной температуре в течение ночи. Далее смесь пропускали через целит, фильтрат концентрировали при пониженном давлении.

Получаемые соединения вводили в дальнейшие превращения без дополнительной очистки.

1-[6-Аминогексил]-2-(ацетамидо)-2-дезоксигалактопираноза (14a)

Получали 400 мг (89%) белых кристаллов.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д): 8.01 (уш. с, 3H, NH_3^+); 7.93 (д, $J = 9.4$ Гц, 1H, NHAc); 5.21 (д, $J = 3.3$ Гц, 1H, H-4); 4.96 (дд, $J = 11.2, 3.3$ Гц, 1H, H-3); 4.51 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, H-1); 4.04 – 3.48 (м, 3H, H-5, H-6, H-6'); 3.87 (дт, $J = 11.2, 8.4$ Гц, 1H, H-2); 3.70 (дт, $J = 9.8, 6.1$ Гц, 1H, $\text{OCH}'\text{H}''\text{CH}_2$); 3.41 (дт, $J = 9.8, 6.5$ Гц, 1H, $\text{OCH}'\text{H}''\text{CH}_2$); 2.73 (т, $J = 7.4$ Гц, 2H, CH_2NH_3^+); 2.10, 1.99, 1.89, 1.78 (все с, все по 3H, 4xAc); 1.57 – 1.45, 1.30 – 1.25 (оба м, всего 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}_3^+$).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [54].

1-[6-Аминогексил]-2-(ацетамидо)-2-дезоксиглюкопираноза (14b)

Получали 405 мг (90%) белых кристаллов.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д): 7.98 (д, $J = 9.3$ Гц, 1H, NHAc); 7.58 (уш. с., 2H, NH_2); 5.07 (т, $J = 9.9$ Гц, 1H, H-4); 4.81 (т, $J = 9.9$ Гц, 1H, H-3); 4.58 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, H-1); 4.17 (дд, $J = 12.0, 4.0$ Гц, 1H, H-6'); 4.06 – 3.93 (м, 1H, H-6''); 3.84 – 3.76 (м, 1H, H-5); 3.74 – 3.63 (м, 2H, H-2, $\text{OCH}'\text{H}''$); 3.47 – 3.36 (м, 1H, $\text{OCH}'\text{H}''$); 2.73 (т, $J = 7.6$ Гц, 2H, CH_2NH_2); 2.02, 1.97, 1.91 (все с, все по 3H, 3xOAc); 1.76 (с, 3H, NHAc); 1.53 – 1.40, 1.30 – 1.19 (оба м, всего 8H, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}_2$).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [129129].

4.1.4 Синтез лигандов 12a,b и 17a,b

Общая методика синтеза соединений 12a,b

К раствору кислоты **4** (55 мг, 0.10 ммоль), соответствующего амина **11a** или **11b** (255 мг, 0.50 ммоль) и *N,N*-диизопропилэтиламина (0.2 мл, 1.15 ммоль) в 8 мл ДМФА добавляли НВТУ (140 мг, 0.37 ммоль), НОВт (84 мг, 0.37 ммоль) и перемешивали в течение 36 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 , промывали H_3PO_4 (1М р-р), NaHCO_3 (1 М р-р) и насыщенным раствором NaCl .

Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (CH₂Cl₂/MeOH, 50/0 → 5/1, v/v).

***N*-(11-Азидоундециламидо)-трис-{2-окса-6,10-диаза-5,11-диоксо-15-[3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетамидо-2-деокси-β-*D*-галактопиранозилокси]пентадецил}метан (12a)**

Получали 50 мг (35%) белого аморфного вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.47 (уш. с, 3H, 3xNH), 7.38 (уш.с, 3H, 3xNH), 7.18 (д, *J* = 9.0 Гц, 3H, 3xNHAc), 6.55 (уш. с, 1H, (CH₂)₉CONH), 5.29 (д, *J* = 3.1 Гц, 3H, H-4), 5.19 – 5.15 (м, 3H, H-3), 4.61 (д, *J* = 8.3 Гц, 3H, H-1), 4.23 – 4.03 (м, 9H, 3xH-6, 3xH-6', 3xH-5), 3.94 – 3.89 (м, 3H, 3xH-2), 3.70 – 3.36 (м, 15H, 3xOCH₂CH₂C(O), 3xCCH₂O, 3xOCH'H'' (CH₂)₃), 3.51 – 3.46 (м, 3H, 3xOCH'H''(CH₂)₃), 3.29 – 3.21 (м, 14H, CH₂N₃, 3xNHCH₂CH₂CH₂NH), 2.44 – 2.41 (м, 6H, 3xOCH₂CH₂CONH), 2.29 – 2.21 (м, 6H, 3xCH₂CONH), 2.15 (т, *J* = 6.1 Гц, 2H, (CH₂)₈CH₂CO), 2.12, 2.02, 1.96, 1.95 (все с, все по 9H, 12xCOCH₃); 1.77 – 1.50 (м., 22H, CH₂CH₂N₃, 3xNHCH₂CH₂CH₂NH, 3xOCH'H''CH₂CH₂, 3x(CH₂)₈CH₂CH₂C(O)NH), 1.35 – 1.25 (м, 12H, (CH₂)₆).

Масс-спектр MALDI-TOF: вычислено для C₉₀H₁₄₈N₁₃O₃₇ [M+H]⁺ *m/z*: 2004, найдено – 2004.

***N*-(11-Азидоундециламидо)-трис-{2-окса-6,10-диаза-5,11-диоксо-15-[3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетамидо-2-деокси-β-*D*-глюкопиранозилокси]пентадецил}метан (12b)**

Получали 37 мг (18%) белого аморфного вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 7.28 – 7.29 (м, 3H, 3xNH₂C(O)CH₂); 7.03 (т, *J* = 5.6 Гц, 3H, 3xNH₂C(O)CH₂); 6.91 (д, *J* = 8.8, 3H, 3xNHAc); 6.48 (уш. с, 1H, (CH₂)₉CONH); 5.24 (т, *J* = 9.6 Гц, 3H, 3xH-4); 5.04 (т, *J* = 9.6 Гц, 3H, 3xH-3); 4.64 (д, *J* = 8.2 Гц, 3H, 3xH-1); 4.26 (дд, *J* = 12.3, 4.5 Гц, 3H, 3xH-6'); 4.11 (дд, *J* = 12.3, 1.2 Гц, 3H, 3xH-6''); 3.94 – 3.87 (м, 6H, 3xH-2, 3xH-5); 3.71 – 3.65 (м, 15H, 3xOCH'H''CH₂, 3xCCH₂OCH₂); 3.46 – 3.51 (м, 3H, 3xOCH'H'''); 3.27 – 3.23 (м, 14H, CH₂N₃, 3xNHCH₂CH₂CH₂NH); 2.46 – 2.41 (м, 6H, 3xOCH₂CH₂C(O)NH); 2.30 – 2.25 (м, 6H, 3xCH₂CONH); 2.18 – 2.12 (м, 2H, (CH₂)₈CH₂C(O)); 2.07, 2.01, 1.93 (все с, всего 36H, 12xC(O)CH₃); 1.76 – 1.54 (м., 22H, CH₂CH₂N₃, 3xNHCH₂CH₂CH₂NH, 3xOCH'H''CH₂CH₂, 3x(CH₂)₈CH₂CH₂C(O)NH); 1.35 – 1.25 (м, 12H, (CH₂)₆).

Масс-спектр MALDI-TOF: вычислено для $C_{90}H_{147}N_{13}O_{37}Na$ $[M+Na]^+$ m/z : 2026, найдено – 2026.

бис(Пентафторфенил) 3,3'-((2-(11-азидоундеканамидо)-2-((3-оксо-3-(пентафторфенокси) пропокси)метил)пропан-1,3-диил)бис(окси))дипропаноат (15)

Трикарбоновую кислоту **4** (546 мг, 1 ммоль) растворяли в 5 мл безводного ДМФА, добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (1.4 мл, 8 ммоль) и медленно прикапывали Pfp-TFA (0.7 мл, 4 ммоль). Оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь выливали в насыщенный раствор K_2CO_3 , экстрагировали EtOAc, промывали органическую вытяжку водой, насыщенным раствором NaCl, сушили над Na_2SO_4 и удаляли растворитель при пониженном давлении.

Получали 980 мг (97%) оранжевого масла.

1H ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д.): 5.73 (уш.с, 1H, NH); 3.81 (т, $J = 5.8$ Гц, 6H, $3 \times C(O)CH_2CH_2O$); 3.79 (с, 6H, $3 \times OCH_2C$); 3.24 (т, $J = 6.9$ Гц, 2H, CH_2N_3); 2.90 (т, $J = 5.8$ Гц, 6H, $3 \times C(O)CH_2CH_2O$); 2.08 (т, $J = 7.6$ Гц, 2H, $C(O)CH_2(CH_2)_9$); 1.61–1.52 (м, 4H, $(CH_2)_8CH_2CH_2C(O)$, $CH_2CH_2N_3$); 1.36–1.24 (м, 12H, $(CH_2)_6CH_2CH_2N_3$).

^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д.): 173.5 (с, $C(O)NH$); 167.5 (с, $COOPfp$); 141.0 (м, $^1J_{CF} = -251$ Гц), 139.2 (м, $^1J_{CF} = -256$ Гц), 137.8 (м, $^1J_{CF} = -251$ Гц), 124.9 (м.) аром.; 69.1 (с, CH_2O); 65.9 (с, $OCH_2CH_2C(O)$); 59.3 (NHC); 51.4 (с, CH_2N_3); 37.1 (с, $(CH_2)_8CH_2C(O)$); 34.1 (с, $OCH_2CH_2C(O)$); 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.7, 26.6, 25.4 (8с, $(CH_2)_8$).

^{19}F ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д., 376 МГц): -152.99 (д, $J_{FF} = -17.0$ Гц, 6F, *орто*-) -158.14 (т, $J_{FF} = -21.5$ Гц, 3F, *пара*-); -162.78 – -162.47 (м, 6F, *мета*-).

ИК-спектр ($CDCl_3$), ν/cm^{-1} : 3354 (N-H); 2094 (N_3); 1728, 1682 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $C_{42}H_{39}F_{15}N_4O_{10}Na$ $[M+Na]^+$ m/z 1067.2319, найдено – 1067.2321.

Общая методика синтеза соединений **16a,b**

К раствору 235 мг (0.2 ммоль) активированного эфира **15** в 5 мл ДМФА в атмосфере аргона добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (3.6 экв) и 350 мг (0.8 ммоль) соответствующего амина **14a** или **14b**. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт очищали хроматографически ($CH_2Cl_2/MeOH$, 10/1, v/v).

***N*-(11-Азидоундеканоил)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-деокси- β -*D*-галактозамин)-карбоксиэтоксиметил]-метан (16a)**

Получали 200 мг (54%) соединения **16a** в виде белого аморфного вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 7.00 (уш. с, 3H, 3xNH); 6.73 (уш. с, 3H, 3xNH); 6.37 (уш. с, 1H, NH); 5.37 (д, $J = 3.2$, 3H, 3xH-4) 5.29 (дд, $J = 11.1, 3.2$ Гц, 3H, 3xH-3); 4.70 (д, $J = 8.3$ Гц, 3H, 3xH-1); 4.20 – 4.09 (м, 6H, 3xH-6', 3xH-6''); 4.03 – 3.86 (м, 9H, 3xH-2, 3xH-5, 3xOCH'Н''), 3.74 – 3.63 (м, 12H, 3xCC $\underline{\text{H}}_2$ OCH $\underline{\text{H}}_2$); 3.50 – 3.45 (м, 3H, 3xOCH'Н''); 3.29 – 3.20 (м, 8H, 3xO(CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{C}}_5$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH, CH $\underline{\text{H}}_2$ N $\underline{\text{H}}_3$); 2.46 (т, $J = 5.0$ Гц, 6H, 3xC(O)CH $\underline{\text{H}}_2$ CH $\underline{\text{H}}_2$ O); 2.21-2.17 (м, 2H, C(O)CH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_9$); 2.14, 2.05, 2.00, 1.98 (все с, все по 9 H, 12xC(O)CH $\underline{\text{H}}_3$); 1.62-1.48 (м, 16H) и 1.40-1.25 (м, 24H) 3xOCH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH, N $\underline{\text{H}}_3$ CH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_8$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 173.9 (C(O)NH $\underline{\text{C}}$); 171.5 (C(O)NHCH $\underline{\text{H}}_2$); 170.8, 170.4, 170.3, 170.3 (4xC(O)CH $\underline{\text{H}}_3$); 100.9 (C-1); 70.4 (C-4); 70.0 (C-3); 69.6 (C-5); 69.6 (CCH $\underline{\text{H}}_2$ OCH $\underline{\text{H}}_2$); 67.3 (CH $\underline{\text{H}}_2$ OGal); 66.7 (CCH $\underline{\text{H}}_2$ OCH $\underline{\text{H}}_2$); 61.4 (C-6); 59.4 (C(O)NH $\underline{\text{C}}$); 51.4 (C-2); 51.3 (N $\underline{\text{H}}_3$ CH $\underline{\text{H}}_2$); 36.4 (OCH $\underline{\text{H}}_2$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)); 37.1 ((CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_8$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)); 39.2 (OCH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH); 29.4, 29.3, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.7, 26.6, 26.3, 25.7, 25.3 ((OCH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH, N $\underline{\text{H}}_3$ CH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_8$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)); 23.2, 20.6, 20.6, 20.6 (C(O)CH $\underline{\text{H}}_3$).

ИК-спектр (ZnSe), ν/cm^{-1} : 3309, 3282 (N-H); 2094 (N $\underline{\text{H}}_3$); 1743, 1645 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{N}_{10}\text{O}_{34}$ $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ m/z 916.4761, найдено 916.4769.

***N*-(11-Азидоундеканоил)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-деокси- β -*D*-глюкозамин)-карбоксиэтоксиметил]-метан (16b)**

Получали 220 мг (60%) соединения **16b** в виде белого аморфного вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 6.90 (уш. с, 1H, NH), 6.72 (д, $J = 8.1$ Гц, 3H, 3xNH), 6.35 (уш.с., 1H, NH), 5.31 (т, $J = 9.7$ Гц, 3H, 3xH-4), 5.03 (т, $J = 9.7$ Гц, 3H, 3xH-3), 4.71 (д, $J = 8.3$ Гц, 3H, 3xH-1), 4.25 (дд, $J = 12.2, 4.7$ Гц, 3H, 3xH-6), 4.11 (дд, $J = 12.2, 1.8$ Гц, 3H, 3xH-6'), 3.87 – 3.76 (м, 6H, 3xH-2, 3xH-5), 3.72 – 3.65 (м, 15H, 3xOCH'Н''), 3xCC $\underline{\text{H}}_2$ OCH $\underline{\text{H}}_2$), 3.48 – 3.42 (м, 3H, 3xOCH'Н''), 3.25-3.17 (м, 8H, 3x(CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH, N $\underline{\text{H}}_3$ CH $\underline{\text{H}}_2$), 2.44 – 2.40 (м, 6H, 3xOCH $\underline{\text{H}}_2$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)), 2.16 (т, $J = 7.4$ Гц, 2H, (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_8$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)), 2.06, 2.00, 2.00, 1.95 (все с, по 9H, 12xC(O)CH $\underline{\text{H}}_3$), 1.59 – 1.49 (м, 16H, N $\underline{\text{H}}_3$ CH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_8$ CH $\underline{\text{H}}_2$ C(O)), 1.33 – 1.26 (м, 24H, (3xOCH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $\underline{\text{H}}_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH)).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д): 173.9 ($\underline{\text{C}}\text{ONHC}$), 171.5 ($\underline{\text{C}}\text{ONHCH}_2$), 170.7, 170.6, 170.6, 169.4 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 100.5 (C-1), 72.4 (C-5), 71.5 (C-3), 69.5 ($\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCH}_2$), 68.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{GluNAc}_4$), 67.4 ($\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCH}_2$), 62.2 (C-6), 59.4 (CONHC), 54.7 (C-2), 51.4 ($\text{N}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 39.2 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_4\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$), 37.1 ($(\text{CH}_2)_8\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 36.4 ($\text{OCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 29.4, 29.3, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.7, 26.6, 26.4, 25.7, 25.4 ($(\text{OCH}_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{N}_3\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_8\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$); 23.1, 20.7, 20.6, 20.6 (COCH_3).

ИК-спектр (ZnSe), ν/cm^{-1} : 3337 (N-H); 2098 (N_3); 1745, 1650 (C=O).

Масс-спектр (ИЭР-МС): вычислено для $\text{C}_{84}\text{H}_{138}\text{N}_{10}\text{O}_{34}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1853.93, найдено 1854.15.

Общая методика удаления ацетильных групп

Растворяли 100 мг исходного соединения **16a** или **16b** в 9 мл метанола, добавляли 1.5 мл 0.02М раствора MeONa в MeOH . Перемешивали в течение 2 часов, добавляли Dowex 50W-X8 hydrogen form пока не получали pH 6, отфильтровывали ионно-обменную смолу, промывали метанолом. Удаляли растворитель при пониженном давлении.

N-(11-Азидоундеканоил)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетамидо-2-деокси- β -D-галактопиранозил)-карбоксиэтоксиметил]-метан (**17a**)

Из соединения **16a** получали 73 мг (92%) белого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 114–116 °C.

^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 4.37 (д, $J = 8.4$ Гц, 3H, 3xH-1); 3.88 – 3.79 (м, 9H, 3xH-4, 3xH-3, 3xOCH'N"); 3.72 – 3.57 (м, 24H, 3xH-2, 3xH-6', 3xH-6'', 3xH-5, 3xCC $\underline{\text{H}}_2$ OCH $\underline{\text{H}}_2$); 3.50 (дт, $J = 9.9$, 6.3 Гц, 3H, 3xOCH'N"); 3.23 (т, $J = 6.7$ Гц, 2H, CH_2N_3); 3.12 (т, $J = 6.6$ Гц, 6H, 3xO(CH $\underline{\text{H}}_2$) $_5$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH); 2.40 (т, $J = 4.6$ Гц, 6H, 3xC(O)CH $\underline{\text{H}}_2$ CH $\underline{\text{H}}_2$ O); 2.14 (т, $J = 6.0$ Гц, 2H, C(O)CH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $_9$); 1.96 (с, 9H, 3xNH $\underline{\text{C}}$ (O)CH $\underline{\text{H}}_3$); 1.52–1.44 (м, 16H) и 1.26–1.18 (м, 24H), (3xOCH $\underline{\text{H}}_2$ (CH $\underline{\text{H}}_2$) $_4$ CH $\underline{\text{H}}_2$ NH, $\text{N}_3\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_8\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$)

^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 175.8 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{NHC}$); 174.1 ($\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$); 173.3 ($\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2$); 101.6 (C-1); 74.9 (C-5); 71.0 (C-2); 70.0 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}$); 68.7 (CH_2OCH_2); 67.7 (C-4); 67.5 ($\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$); 60.8 (C-6); 59.8 ($\underline{\text{C}}\text{CH}_2\text{O}$); 52.4 (C-3); 51.1 ($\text{N}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 39.3 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 36.4 ($(\text{CH}_2)_8\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}(\text{O})$); 36.1 ($\text{OCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}(\text{O})$); 29.1, 29.0, 28.9, 28.7, 28.6,

28.6, 28.6, 28.4, 26.4, 25.9, 25.5, 24.9 (OCH₂(CH₂)₄CH₂NH, N₃CH₂(CH₂)₈CH₂C(O)); 22.3 (C(O)CH₃).

ИК-спектр, ν/cm^{-1} : 3309, 3371, 3332, 3313, 3273, 3174 (N-H, O-H); 2094 (N₃); 1741, 1701, 1647 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₆₆H₁₂₀N₁₀O₂₅ [M]²⁺ m/z 727.4286, найдено 727.4293.

***N*-(11-Азидоундеканойл)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетиамидо-2-деокси-β-D-глюкопиранозил)-карбокситоксиметил]-метан (17b)**

Из соединения **16b** получали 71 мг (90%) белого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 123–125 °C.

¹H ЯМР (D₂O, δ , м.д): 4.44 (д, $J = 8.4$ Гц, 3H, 3xH-1), 3.87 – 3.80 (м, 6H, 3xH-2, 3xH-5), 3 3.71 – 3.59 (м, 18H, 3xH-4, 3xOCH'N", 3xCCH₂OCH₂), 3.54 (м, 6H, 3xH-3, 3xOCH'N"), 3.41 – 3.37 (м, 6H, 3xH-6, 3xH'), 3.26 (т, $J = 6.8$ Гц, 2H, N₃CH₂), 3.13 (т, $J = 6.9$ Гц, 6H, 3x(CH₂)₄CH₂NH), 2.41 (т, $J = 5.6$ Гц, 6H, 3xOCH₂CH₂C(O)), 2.16 (т, $J = 7.0$ Гц, 2H, (CH₂)₈CH₂C(O)), 1.97 (с, 9H, 3xNHAc) 1.57 – 1.45 (м, 16H, N₃CH₂(CH₂)₈CH₂C(O)), 1.32 – 1.22 (м, 24H, (3xOCH₂(CH₂))

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ , м.д): 173.9 (CONHC), 171.5 (CONHCH₂), 170.7, 170.6, 170.6, 169.4 (COCH₃), 100.5 (C-1), 72.4 (C-5), 71.5 (C-3), 69.5 (CCH₂OCH₂), 68.8 (CH₂GluNAc₄), 67.4 (CCH₂OCH₂), 62.2 (C-6), 59.4 (CONHC), 54.7 (C-2), 51.4 (N₃CH₂), 39.2 (OCH₂(CH₂)₄CH₂NH), 37.1 ((CH₂)₈CH₂CO), 36.4 (OCH₂CH₂CO), 29.4, 29.3, 29.3, 29.3, 29.2, 29.0, 29.0, 28.7, 26.6, 26.4, 25.7, 25.4 ((OCH₂(CH₂)₄CH₂NH, N₃CH₂(CH₂)₈CH₂C(O)); 23.1, 20.7, 20.6, 20.6 (COCH₃).

ИК-спектр (KBr), ν/cm^{-1} : 3290, 3100 (O-H, N-H); 2097 (N₃); 1640 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₆₆H₁₂₀N₁₀O₂₅K [M+K]²⁺ m/z 765.3845, найдено 765.3821.

4.2. Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот

4.2.1. Синтез карбонильных соединений

(4-Хлорфенил)ацетилхлорид (18)

В 5 мл тионилхлорида растворяли 1 г (5.9 ммоль) *n*-хлорфенилуксусной кислоты. Реакцию перемешивали в течение 1 часа при 78°C, после чего избыток растворителя удаляли при пониженном давлении. Полученное вещество несколько раз переупаривали толуолом.

Получали 1 г (колич.) светло-зеленой жидкости.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д): 7.35 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.20 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H) аром.; 4.12 (с, 2H, CH₂).

¹³C ЯМР (CDCl₃, δ, м.д): 171.5 (C=O); 134.2, 130.8, 129.6, 129.1 аром.; 52.2 (CH₂).

Синтез 1-хлор-3-(4-хлорфенил)-2-оксопропилацетата (20) проводили согласно последовательности стадий, предложенной ранее [101]. Спектры ¹H ЯМР полученных соединений согласуются с литературными данными [101].

1-Хлор-3-(4-хлорфенил)пропан-2-он (19)

В стакан помещали 10 мл раствора диазометана [131] (0.57 ммоль/мл) в эфире. Затем медленно при охлаждении и перемешивании с помощью капельной воронки добавляли 1 г (5.2 ммоль) (4-хлорфенил)ацетилхлорида (18), растворенный в 5 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем снова охлаждали до 0°C и пропускали поток HCl до окончания выделения газов. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч и выливали в 85 мл ледяной воды. После проводили экстракцию эфиром (2x100 мл). Объединенные эфирные фракции последовательно промывали 5% раствором NaHCO₃ и насыщенным раствором NaCl. Сушили над безводным сульфатом магния, растворитель удаляли при пониженном давлении.

Получали 0.3 г (27%) белого аморфного вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д): 7.31 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.15 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H) аром.; 4.12 (с, 2H, ArCH₂C(O)); 3.87 (с, 2H, CH₂Cl).

1-Хлор-3-(4-хлорфенил)-2-оксопропилацетат (20)

В круглодонную колбу на 50 мл, снабженную обратным холодильником, добавляли 5.5 мл этанола, 0.5 г (5.1 ммоль) 1-хлор-3-(4-хлорфенил)пропан-2-она (19),

0.3 мл уксусной кислоты и раствор 0.3 г (5.5 ммоль) ацетата калия в 3 мл воды. Реакционную смесь кипятили 3 ч, а затем охлаждали и удаляли этанол при пониженном давлении. Далее проводили экстракцию в системе EtOAc-H₂O. Промывали органическую фракцию раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl. Сушили над безводным MgSO₄. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт выделяли в индивидуальном виде с помощью колоночной хроматографии (EtOAc/гексан, 1/4, v/v).

Получали 0.3 г (28%) белого аморфного вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д): 7.32 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.15 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H) аром.; 4.70 (с, 2H, ArCH₂C(O)); 3.72 (с, 2H, CH₂OAc); 2.17 (с, 3H, C(O)CH₃).

1-Гидрокси-3-(4-хлорфенил)пропан-2-он (21)

Для синтеза 1-гидрокси-3-(4-хлорфенил)пропан-2-она адаптировали методику [103]. К 0.6 г (3 ммоль) (4-хлорфенил)ацетилхлорида (**18**) добавляли 2 мл (6 ммоль) 1,1,2-трис(триметилсилилокси)этилена. Реакционную смесь нагревали в течение 16 часов при 100 °С в атмосфере аргона. После добавляли 0.5 мл 1М HCl и 2.5 мл диоксана при 50 °С. Затем нагревали реакционную смесь в течение 2 ч при 80 °С. Растворитель удаляли при пониженном давлении, проводили экстракцию в системе вода-диэтиловый эфир, промывали раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl. Сушили над безводным MgSO₄. Очистку проводили с помощью колоночной хроматографии (EtOAc/гексан, 1/2, по объёму).

Получали 0.3 г (55%) белого кристаллического вещества.

*T*_{пл} 57 °С

¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д): 7.28 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.12 (д, *J* = 8.4 Гц, 2H) аром.; 4.26 (с, 2H, ArCH₂C(O)); 3.66 (с, 2H, CH₂OH); 3.21 (уш. с, 2H, CH₂OH).

Спектр ¹H ЯМР согласуется с литературными данными [132].

4.2.2. Синтез индолин-2,3-дионон 22-24 и 28,29

Общая методика синтеза галогензамещенных индолин-2,3-дионон

Синтез галогензамещенных индолин-2,3-дионон проводили согласно методике [101]. В круглодонную колбу, содержащую суспензию гидроксиламин гидрохлорида (3.6 экв.), сульфата натрия (7.6 экв.) и соответствующего анилина (1 экв.) в воде и 2М водного раствора HCl, добавляли хлоральгидрат (1.2 экв.). Смесь

перемешивали при 55 °С в течение ночи. После охлаждали до комнатной температуры, соответствующий гидроксиминоацетанилид отфильтровывали, промывали водой и высушивали на воздухе. Полученное соединение добавляли малыми порциями, при перемешивании в стакан, содержащий H₂SO₄ (конц.), нагретую до 55 °С. Температуру реакционной смеси поддерживали ниже 70 °С. После того как весь гидроксиминоацетанилид был добавлен, смесь кипятили 10 минут при 80 °С. Затем охлаждали до комнатной температуры и выливали в стакан с колотым льдом. Осадок собирали фильтрованием, трижды промывали водой и высушивали на воздухе.

7-Броминдолин-2,3-дион (22)

Из *o*-броманилина 3.2 г (18.5 ммоль) получали 3.6 г (82%) изонитрозоацетанилида в виде светло-бежевого кристаллического вещества.

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.45 (с, 1H, OH); 9.45 (с, 1H, NH); 7.91 (дд, *J* = 8.2, 1.6 Гц, 1H), 7.69 (дд, *J* = 8.0, 1.6 Гц; 1H) аром.; 7.66 (с, 1H, C_H=NOH); 7.41 (ддд, *J* = 8.2, 7.8, 1.6 Гц, 1H), 7.15 (ддд, *J* = 8.0, 7.8, 1.6 Гц, 1H) аром.

Из 3.5 г 2-(гидроксиимин)-*N*-(2-бромфенил)ацетамида получали 2.6 г (76%) 7-броминдолин-2,3-диона в виде красного кристаллического вещества.

*T*_{пл} 194–195 °С [133].

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 11.31 (с, 1H, NH); 7.79 (д, *J* = 8.2 Гц, 1H), 7.51 (д, *J* = 7.4 Гц, 1H), 7.02 (дд, *J* = 8.2, 7.4 Гц, 1H) аром.

Спектр ¹H ЯМР согласуется с литературными данными [101].

7-Йодиндолин-2,3-дион (23)

Из 4.0 г (18.5 ммоль) *o*-йоданилина получали 4.5 г (84%) изонитрозоацетанилида в виде светло-бежевого кристаллического вещества.

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.44 (с, 1H, OH); 9.40 (с, 1H, NH); 7.89 (д, *J* = 7.8 Гц, 1H), 7.76 (д, *J* = 8.0 Гц, 1H) аром.; 7.63 (с, 1H, C_H=NOH); 7.41 (т, *J* = 7.7 Гц, 1H), 6.98 (т, *J* = 7.6 Гц, 1H) аром.

Из 4.4 г 2-(гидроксиимин)-*N*-(2-иодфенил)ацетамида получали 3.3 г (80%) 7-йодиндолин-2,3-диона в виде красного-бордового кристаллического вещества.

*T*_{пл} 202–205 °С.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.02 (с, 1H, NH); 7.94 (д, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.50 (д, $J = 7.3$ Гц, 1H), 6.88 (т, $J = 7.6$ Гц, 1H) аром.

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [101].

5-Йодиндолин-2,3-дион (24)

Из 4.0 г (18.5 ммоль) *n*-йоданилина получали 4.3 г (81%) изонитрозоацетанилида в виде светло-бежевого кристаллического вещества.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.22 (с, 1H, OH); 10.40 (с, 1H, NH); 7.67 (с, 1H, $\text{C}=\text{N}-\text{OH}$); 7.66 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.54 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H) аром.

Из 4.4 г 2-(гидроксиимин)-*N*-(4-иодфенил)ацетамида получали 3.4 г (82%) 4-йодиндолин-2,3-диона в виде темно-оранжевого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 252–253 °С [134].

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.11 (с, 1H, NH); 7.88 (дд, $J = 8.2, 1.6$ Гц, 1H), 7.76 (д, $J = 1.6$ Гц, 1H), 6.76 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H) аром.

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [135].

Общая методика синтеза ((триметилсилил)этинил)индолин-2,3-дионов

Соответствующий йодизатин (1 экв.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.02 экв.), CuI (0.1 экв.), растворяли в ДМФА, добавляли триэтиламин (2.4 экв.) и перемешивали в течение 1 ч. После добавляли триметилсилилацетилен (1.5 экв.) и реакционную смесь перемешивали при 80 °С. Через 4 ч охлаждали и фильтровали через слой целита. Растворяли в EtOAc и промывали водой и насыщенным раствором NaCl . Сушили над безводным MgSO_4 , растворитель удаляли при пониженном давлении, проводили очистку с помощью колоночной хроматографии (CHCl_3).

7-((Триметилсилил)этинил)индолин-2,3-дион (28)

Из 475 мг (1.7 ммоль) 7-йодиндолин-2,3-диона (23) получали 192 мг (48%) 7-((триметилсилил)этинил)индолин-2,3-диона в виде оранжевого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 189–190 °С.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.31 (уш. с, 1H, NH); 7.60 (дд, $J = 7.8, 1.2$ Гц, 1H), 7.56 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H), 7.08 (т, $J = 7.7$ Гц, 1H) аром; 0.30 (с, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 183.7 (C(O)); 159.9 (C(O)); 152.0, 140.0, 131.4, 124.9, 122.7, 118.3 аром.; 106.7 (C \equiv C $\underline{\text{C}}\text{Si}$); 98.0 ($\underline{\text{C}}\equiv\text{CSi}$); - 0.2 (Si($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3$).

ИК-спектр (CDCl $_3$), ν/cm^{-1} : 3181 (N-H); 2166 (C \equiv C); 1747 (перекрывающийся контур двух C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C $_{13}$ H $_{12}$ NO $_2$ Si [M-H] $^-$ m/z 242.0643, найдено 242.0633.

5-((Триметилсилил)этинил)индолин-2,3-дион (29)

Из 350 мг (1.3 ммоль) 5-йодиндолин-2,3-диона (24) получали 70 мг (22%) 5-((триметилсилил)этинил)индолин-2,3-диона в виде оранжевого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 216–218 °С.

^1H ЯМР (CDCl $_3$, δ , м.д.): 8.04 (уш. с, 1H, NH); 7.72 (д, $J = 1.7$ Гц, 1H); 7.66 (дд, $J = 8.2, 1.7$ Гц, 1H); 6.88 (д, $J = 8.2$ Гц, 1H); 0.26 (с, 9H, Si(CH $_3$) $_3$).

^{13}C ЯМР (CDCl $_3$ +CD $_3$ OD, δ , м.д.): 183.3 (C(O)); 159.3 (C(O)); 149.8, 141.5, 128.3, 118.2, 117.3, 112.2 аром.; 102.7 (C \equiv C $\underline{\text{C}}\text{Si}$); 94.6 ($\underline{\text{C}}\equiv\text{CSi}$); - 0.65 (Si(CH $_3$) $_3$).

ИК-спектр (CDCl $_3$), ν/cm^{-1} : 3222 (N-H); 2150 (C \equiv C); 1763, 1745 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C $_{13}$ H $_{12}$ NO $_2$ Si [M-H] $^-$ m/z 242.0643, найдено 242.0643.

4.5 Синтез 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот

Общая методика синтеза 3-гидроксихинолин-4-карбоновых кислот

В двугорлую круглодонную колбу на 50 мл, снабженную обратным холодильником, помещали соответствующий индолин-2,3-дион (1 экв.) в 6M водном растворе КОН и нагревали до 100 °С. 1-Гидрокси-3-(4-хлорфенил)пропан-2-он (21) или 3-(4-хлорфенил)-2-оксопропил ацетат (20) (1.26 экв.) растворяли в этаноле и добавляли в реакционную смесь небольшими порциями в течение 1 ч. После этого реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Затем охлаждали до комнатной температуры, и удаляли растворители при пониженном давлении. Осадок растворяли в воде и отфильтровали. Фильтрат подкисляли до pH 1 с помощью 1M водного раствора HCl. Осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили под вакуумом. Очистку проводили с помощью колоночной хроматографии

(EtOAc/CH₃CN/MeOH, 70/5/2.5 + 0.5% Et₃N, v/v). Выделенную фракцию растворяли в смеси ацетонитрил-вода, добавляли 1М водный раствор HCl до pH 1 и собирали продукт фильтрованием. После промывания водой, высушивали осадок на воздухе.

8-Бром-3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновая кислота (25)

Из 100 мг (44 ммоль) 7-броминдолин-2,3-диона (**22**) и соединения (**20**) получали 59 мг (34%) 8-бром-3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновой кислоты в виде желтого кристаллического вещества.

T_{пл} 186–188 °С.

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.43 (д, J = 6.9 Гц, 1H), 7.84 (д, J = 7.3 Гц, 1H), 7.41 (т, J = 8.8 Гц, 1H), 7.34 (с, 4H) аром.; 4.33 (с, 2H, CH₂).

Спектр ¹H ЯМР согласуется с литературными данными [101].

3-Гидрокси-8-йод-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновая кислота (26)

Из 100 мг (0.37 ммоль) 7-йодиндолин-2,3-диона (**23**) и соединения (**21**) получали 68 мг (42%) 3-гидрокси-8-йод-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновой кислоты в виде желтого кристаллического вещества.

T_{пл} 190–192 °С

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.79 (д, J = 7.8 Гц, 1H), 8.08 (д, J = 7.8 Гц, 1H), 7.40 (д, J = 8.3 Гц, 2H), 7.34 (д, J = 8.3 Гц, 2H), 7.22 (т, J = 7.8 Гц, 1H) аром.; 4.31 (с, 2H, CH₂).

¹³C ЯМР (ДМСО-d₆, δ, м.д.): 170.3 (COOH); 155.4, 151.8, 139.7, 137.0, 136.7, 131.1, 131.0, 128.9, 128.2, 125.3, 125.1, 115.0, 104.3 аром.; 38.2 (CH₂).

ИК-спектр (KBr), ν/cm⁻¹: 3170 (O-H); 1641 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₁₇H₁₂ClINO₃ [M-H]⁻ m/z 439.9476, найдено 439.9478.

3-Гидрокси-6-йод-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновая кислота (27)

Из 100 мг (0.37 ммоль) 5-йодиндолин-2,3-диона (**24**) и соединения (**21**) получили 58 мг (36%) 3-гидрокси-6-йод-2-(4-хлорбензил)-хинолин-4-карбоновой кислоты в виде желтого кристаллического вещества.

T_{пл} 219–220 °С

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.16 (с., 1H), 7.80 (дд., $J = 8.7$ Гц, $J = 1.8$ Гц, 1H), 7.67 (д., $J = 8.7$ Гц, 1H), 7.32 (с., 4H) аром.; 4.29 (с., 2H, CH_2).

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 170.8 (COOH); 155.6, 154.9, 138.4, 136.7, 134.4, 133.1, 131.1, 130.9, 129.7, 128.3, 127.1, 112.2, 95.3 аром.; 37.9 (CH_2).

ИК-спектр (KBr), ν/cm^{-1} : 3115 (O-H); 1637 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClINO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 439.9545, найдено 439.9547.

3-Гидрокси-2-(4-хлорбензил)-8-этинилхинолин-4-карбоновая кислота (30)

Из 130 мг (0.6 ммоль) 7-((триметилсилил)этинил)индолин-2,3-диона (**28**) и соединения (**21**) получили 30 мг (16%) 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)-8-этинилхинолин-4-карбоновой кислоты в виде коричневого кристаллического вещества.

$T_{\text{пл}}$ 110-112 °C

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.58 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H), 7.73 (д, $J = 7.4$ Гц, 1H), 7.53 (тд, $J = 8.6$, 2.0 Гц, 1H), 7.32 (с, 4H) аром.; 4.41 (с, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$); 4.30 (с, 2H, CH_2).

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.2 (COOH); 155.5, 152.5, 141.8, 137.7, 131.5, 131.3, 131.2, 128.7, 127.7, 125.9, 125.4, 122.2, 115.2, аром.; 86.3 ($\text{Ar}-\text{C}\equiv\text{CH}$); 82.3 ($\text{Ar}-\text{C}\equiv\text{CH}$); 38.9 (CH_2).

ИК-спектр (KBr), ν/cm^{-1} : 3560 (O-H); 3276 ($\equiv\text{C}-\text{H}$); 1658 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClINO}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 336.0433, найдено 336.0430.

3-Гидрокси-2-(4-хлорбензил)-6-этинилхинолин-4-карбоновая кислота (31)

Из 34 мг (0.14 ммоль) 5-((триметилсилил)этинил)индолин-2,3-диона (**29**) и соединения (**21**) получили 7 мг (14%) 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)-6-этинилхинолин-4-карбоновой кислоты в виде коричневого кристаллического вещества.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.87 (с, 1H), 7.90 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H), 7.56 (дд, $J = 8.6$, 1.7 Гц, 1H), 7.33 (с, 4H) аром.; 4.34 (с, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$); 4.32 (с, 2H, CH_2).

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.2 (COOH); 156.4, 151.8, 141.5, 137.3, 131.5, 131.3, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 124.3, 121.4, 111.7, аром.; 84.2 ($\text{Ar}-\text{C}\equiv\text{CH}$); 82.3 ($\text{Ar}-\text{C}\equiv\text{CH}$); 38.4 (CH_2).

ИК-спектр (KBr), ν/cm^{-1} : 3298 (O-H); 2917 ($\equiv\text{C}-\text{H}$); 1658 (C=O).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $C_{19}H_{11}ClNO_3$ $[M-H]^-$ m/z 336.0433, найдено 336.0436.

4.3. Синтез конъюгатов лигандов ASGPR

4.3.1. Синтез конъюгата *миРНК* с лигандом **12b**

Синтез олигонуклеотида и его производных. Олигонуклеотид dT₂₀, содержащий терминальный алкин на 5'-конце синтезировали аналогично [136] на автоматизированном олигонуклеотидном синтезаторе ACM-1000 по амидофосфитной схеме согласно рекомендациям производителя с использованием 3'-амидофосфита 2'-дезокситимидина, S-этилтио-1H-тетразола и стекла с контролируемым размером пор 500 Å с иммобилизованным универсальным линкером (Unylinker-CPG) (GlenResearch, USA). Очистку олигонуклеотида проводили с использованием обращено-фазового картриджа Glen-Pak (GlenResearch, USA) согласно рекомендациям производителя. Конъюгация олигонуклеотида с азидопроизводным **12b** - катализируемое Cu(I) 1,3-диполярное циклоприсоединение - проводилась аналогично [137].

4.3.2. Синтез конъюгатов с флуоресцентными красителями

Общая методика синтеза конъюгатов лигандов с *sulfo-Cy5* алкином

Реакцию проводили в инертной атмосфере. К раствору соответствующего лиганда **17a** или **17b** (12 мг, 8 мкмоль) в дистиллированной воде (2.5 мл), добавляли раствор *sulfo-Cy5* алкина (5 мг, 7 мкмоль) в перегнанном ДМФА (2.5 мл). В полученную смесь добавляли 167 мкл 0.05М раствора аскорбата натрия и 139 мкл 0.05М раствора сульфата меди, перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. После чего к раствору добавляли 139 мкл 0.05М раствора динатриевой соли ЭДТА. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, остаток растворяли в этаноле и охлаждали до 0°C. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат концентрировали при пониженном давлении, остаток лиофилизировали.

Конъюгат *N*-(11-азидоундеканойл)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетамидо-2-деокси- β -D-галактопиранозамино)-карбокситоксиметил]-метана с флуорофором *sulfo*-Cy5 (34a)

Получали 14 мг (94%) синего кристаллического вещества.

Электронный спектр поглощения: $\lambda_{\text{макс.}} = 646$ нм [138].

^1H ЯМР (600 МГц, D_2O , δ , м.д) 7.99 (уш. с, 2H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 7.81–7.67 (м, 5H, аром. Cy5 (4H)+триазол(1H)), 7.25 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, аром. Cy5), 7.19 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H, аром. Cy5), 6.47 (т, $J = 11.2$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 6.16 (д, $J = 12.2$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 6.10 (д, $J = 13.2$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 4.33 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, C-1), 4.28 – 4.22 (м, 4H, N^+CH_2 , CONHCH_2C), 3.86 – 3.84 (м, 3H, 3xH-4), 3.81 – 3.74 (м, 6H, 3xOCH'N''), 3xH-3), 3.71 – 3.64 (м, 11H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9$ 3xH-2, 3xH-6', 3xH-6''), 3.60 – 3.55 (м, 15H, 3xH-5, 3x CCH_2OCH_2), 3.51 (с, 3H, CH_3 (Cy5)), 3.42 (дт, $J = 12.1$, 6.3 Гц 3H, 3xOCH'N''), 3.04 (т, $J = 7.1$ Гц, 6H, 3x $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{OGalNAc}$), 2.35 (т, $J = 6.0$ Гц, 6H, 3x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.16 – 2.14 (м, 2H, CH_2CONH (Cy5)), 2.02 (т, $J = 6.3$ Гц, 2H, $\text{N}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.93 (с, 9H, 3x CH_3CONH), 1.59 – 1.70 (м, 4H, 2x CH_2), 1.54 (с, 12H, 4x CH_3 (Cy5)), 1.44 – 1.30 (м, 16H, 8x CH_2), 1.27 – 1.14 (м, 16H, 8x CH_2), 1.06 – 0.92 (м, 10H, 5x CH_2).

^{13}C ЯМР (150 МГц, D_2O , δ , м.д) 176.1, 175.7, 174.4, 174.2, 173.4, 154.3, 153.9, 144.5, 143.8, 141.4, 139.6 (C-триазол), 126.5, 125.9 (CH-триазол), 119.7, 110.8, 104.3, 103.6, 101.5, 74.9, 74.1, 70.9, 70.0, 68.6, 68.06, 67.6, 67.4, 61.9, 60.8, 59.8, 52.3, 50.3, 48.9, 39.3, 36.3, 36.1, 35.2, 31.1, 29.3, 28.6, 28.5, 28.4, 28.2, 28.1, 26.8, 26.6, 26.3, 25.8, 25.6, 25.3, 24.9, 24.7, 22.2.

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{101}\text{H}_{160}\text{N}_{13}\text{O}_{32}\text{S}_2^-$, $[\text{M}]^{2-}$ m/z 1065.5372 найдено 1065.5359.

Конъюгат *N*-(11-азидоундеканойл)амино-трис-[(1-(6-амидогексил)-2-ацетамидо-2-деокси- β -D-глюкозамин)-карбокситоксиметил]-метана с флуорофором *sulfo*-Cy5 (34b)

Продукт дополнительно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ.

Получали 13 мг (87%) синего кристаллического вещества.

Электронный спектр поглощения: $\lambda_{\text{макс.}} = 646$ нм [138].

^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д): 8.01 – 7.96 (м, 2H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 7.81 – 7.73 (м, 5H, аром. Cy5 (4H)+триазол(1H)), 7.25 (д, $J = 8.1$ Гц, 1H, аром. Cy5), 7.19 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H, аром. Cy5), 6.45 (т, $J = 11.1$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 6.14 (д, $J = 13.3$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 6.08 (д, $J = 11.2$ Гц, 1H, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 4.40 (д, $J = 8.4$ Гц, 3H, 3xH-1), 4.35 – 4.20 (м, 2H, N^+CH_2 , CONHCH_2C), 3.84 – 3.73 (м, 6H, 3xOCH'Н", 3xH-3), 3.67 – 3.39 (м, 26H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9$ 3xH-2, 3xH-6', 3xH-6'', 3xH-5, 3x CCH_2OCH_2), 3.38 – 3.32 (м, 6H, CH_3 (Cy5), 3xOCH'Н"), 3.04 (т, $J = 6.1$ Гц, 6H, 3x $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{OGlcNAc}$), 2.39 – 2.35 (м, 6H, 3x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.18 – 2.15 (м, 2H, CH_2CONH (Cy5)), 2.02 (т, $J = 5.5$ Гц, 2H, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.94 (с, 9H, 3x CH_3CONH), 1.70 – 1.58 (м, 4H, 2x CH_2), 1.53 (с, 12H, 4x CH_3 (Cy5)), 1.45 – 1.31 (м, 16H, 8x CH_2), 1.24 – 1.17 (м, 16H, 9x CH_2), 1.05 – 0.94 (м, 10H, $(\text{CH}_2)_7$).

^{13}C ЯМР (D_2O , δ , м.д): 176.2, 174.5, 174.1, 173.5, 154.0, 152.1, 144.6, 143.9, 141.5, 139.8, 126.6, 126.6, 119.7, 110.8, 103.8, 102.4, 101.0, 75.8, 73.8, 70.1, 69.9, 68.7, 67.5, 60.7, 59.9, 55.6, 50.3, 48.9, 48.9, 39.3, 36.3, 36.2, 36.0, 31.1, 29.4, 28.7, 28.6, 28.5, 28.5, 28.4, 28.3, 28.2, 26.9, 26.8, 26.4, 25.9, 25.6, 25.3, 24.8, 22.2.

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{101}\text{H}_{160}\text{N}_{13}\text{O}_{32}\text{S}_2^-$, $[\text{M}]^{2-}$ m/z 1065.5361 найдено 1065.5336.

4.3.3. Синтез конъюгатов с паклитакселом

Синтез производных паклитаксела

6-Азидогексановая кислота (35)

В круглодонную колбу на 50 мл помещали 6-бромгексановую кислоту 10.0 г (51 ммоль) и 9.9 г NaN_3 (153 ммоль) в 15 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч, выливали в EtOAc, промывали водой и насыщенным раствором NaCl. Сушили над безводным MgSO_4 , растворитель удаляли при пониженном давлении.

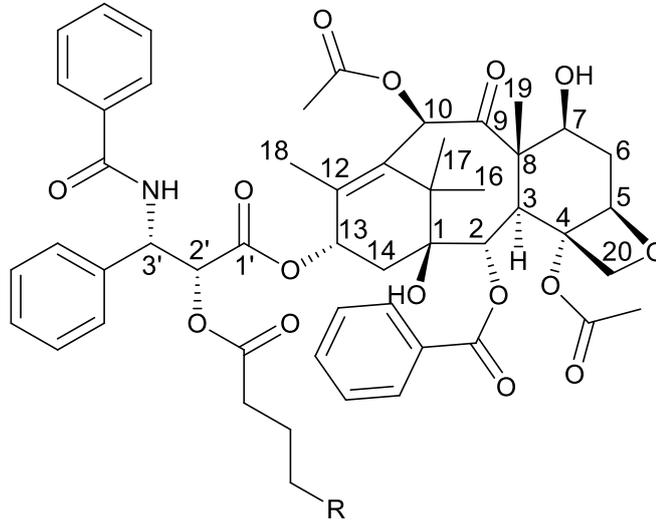
Получали 7.2 г (90%) прозрачной жидкости.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 3.25 (т, $J = 6.8$ Гц, 2H, CH_2N_3); 2.33 (т, $J = 7.4$ Гц, 2H, CH_2COOH); 1.69-1.52 (м., 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); 1.44-1.34 (м., 2H, CH_2).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [139].

Общая методика ацилирования паклитаксела

В CH_2Cl_2 растворяли паклитаксел (1 экв.), соответствующую карбоновую кислоту (1.1 экв.) и N,N' -диизопропилкарбодиимид (DIC, 1.5 экв.). Смесь перемешивали в течение 1.5 суток, удаляли растворитель. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50/1, v/v).



2'-*O*-(6-Азидогексаноил)–паклитаксел (36)

Из 300 мг (0.35 ммоль) паклитаксела и 60 мг (0.39 ммоль) 6-азидогексановой кислоты получили 205 мг (72%) белого кристаллического вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.13 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.74 (д, $J = 7.6$ Гц, 2H), 7.61 (т, $J = 7.3$ Гц, 1H), 7.51-7.45 (м, 3H), 7.44-7.32 (м, 7H) аром.; 6.93 (д, $J = 9.2$ Гц, NH); 6.29 (с, 1H, H-10); 6.24 (т, $J = 9.0$ Гц, 1H, H-13); 5.96 (дд, $J = 9.2, 3.3$ Гц, 1H, H-3'); 5.67 (д, $J = 7.0$ Гц, 1H, H-2); 5.51 (д, $J = 3.3$ Гц, 1H, H-2'); 4.96 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H, H-5); 4.44 (дд, $J = 10.8, 6.7$ Гц, 1H, H-7); 4.30 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -20); 4.19 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -20); 3.86-3.76 (м, 2H, H-3, -OH); 3.20 (т, $J = 6.8$ Гц, 2H CH_2N_3); 2.58-2.33 (м, 5H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{N}_3$, -OH, $\text{CH}'\text{H}''$ -14, $\text{CH}'\text{H}''$ -6); 2.45 (с, 3H, OAc-4); 2.21 (с, 3H, OAc-10); 2.18-2.12 (м, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -14); 1.94 (с, 3H, CH_3 -18); 1.94-1.81 (м, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -6); 1.67 (с, 3H, CH_3 -19); 1.65-1.50 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 1.37-1.29 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 1.22 (с, 3H, CH_3 -16); 1.13 (с, 3H, CH_3 -17).

Спектр ^1H ЯМР согласуется с литературными данными [91].

2'-O-(Гекс-5-иноил)–паклитаксел (37)

Из 30 мг (0.035 ммоль) паклитаксела и 4.3 мкл (0.039 ммоль) гекс-5-иновой кислоты получили 25 мг (75%) белого кристаллического вещества.

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.15 (д, $J = 7.2$ Гц, 2H), 7.75 (д, $J = 7.2$ Гц, 2H), 7.62 (т, $J = 7.4$ Гц, 1H), 7.55-7.48 (м, 3H), 7.45-7.34 (м, 7H) аром.; 6.90 (д, $J = 9.2$ Гц, NH); 6.30 (с, 1H, H-10); 6.27 (т, $J = 8.4$ Гц, 1H, H-13); 5.97 (дд, $J = 9.2, 3.0$ Гц, 1H, H-3'); 5.69 (д, $J = 7.1$ Гц, 1H, H-2); 5.51 (д, $J = 3.0$ Гц, 1H, H-2'); 4.98 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H, H-5); 4.45 (дд, $J = 10.9, 6.7$ Гц, 1H, H-7); 4.33 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -20); 4.21 (д, $J = 8.4$ Гц, 1H, $\text{CH}'\text{H}''$ -20); 3.82 (д, $J = 7.1$ Гц, 1H, H-3); 2.67-2.48 (м, 3H, $\text{CH}'\text{H}''$ -6, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); 2.47 (с, 3H, OAc-4); 2.41-2.15 (м., 5H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $\text{CH}'\text{H}''$ -14, $\text{CH}'\text{H}''$ -6); 2.23 (с, 3H, OAc-10); 1.99-1.80 (м, 3H, $\text{CH}'\text{H}''$ -14, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); 1.95 (с, 3H, CH_3 -18); 1.69 (с, 3H, CH_3 -19); 1.24 (с, 3H, CH_3 -16); 1.14 (с, 3H, CH_3 -17).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 203.7 (C-9); 172.0 (C-1'); 171.2 (10-OAc); 169.7 (4-OAc); 168.0 ($\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{CH}$); 167.0 (2-OC(O)Ph); 166.9 (3'-NH $\text{C}(\text{O})\text{Ph}$); 142.7 (C-12); 136.9, 133.6, 133.5, 132.7, 132.0, 130.1, 129.1, 129.0, 128.7, 128.7, 128.6, 128.4, 127.0, 126.4 (аром.); 84.4 (C-5); 82.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$); 80.9 (C-4); 79.0 (C-1); 76.4 (C-20); 75.5 (C-10); 75.0 (C-2); 73.9 (C-2'); 72.0 (C-7); 71.8 (C-13); 69.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$); 58.4 (C-8); 52.7 (C-3'); 45.5 (C-3); 43.1 (C-15); 35.4 (C-6); 32.2 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{CH}$); 26.7 (C-17); 23.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); 22.6 (4-OAc); 22.1 (C-16); 20.8 (10-OAc); 17.4 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$); 14.7 (C-18); 9.5 (C-19).

Конъюгат 38 паклитаксела и лиганда 17a

В смеси из 10 мл ДМФА и 10 мл воды растворяли 21 мг ($22 \cdot 10^{-3}$ мкмоль) производного паклитаксела **37** и 40 мг (28 мкмоль) лиганда **17a**. Добавляли по 2.2 мл 0.05M растворов CuSO_4 и аскорбата натрия и перемешивали в течение ночи. После этого добавляли 2.2 мл 0.05M раствора ЭДТА, перемешивали 15 минут и удаляли растворители при пониженном давлении. Полученную смесь очищали с помощью ВЭЖХ-МС.

Получали 35 мг (66%) белого кристаллического вещества.

^1H ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 8.12 (д, $J = 7.1$ Гц, 2H), 7.82 (д, $J = 7.2$ Гц, 2H), 7.73-7.65 (м, 2H), 7.63-7.41 (м, 9H), 7.27 (т, $J = 7.3$ Гц, 1H), 6.46 (с, 1H), 6.07 (т, $J = 8.9$ Гц, 1H), 5.84 (д, $J = 6.4$ Гц, 2H), 5.64 (д, $J = 7.2$ Гц, 2H), 5.48 (д, $J = 6.4$ Гц, 2H), 5.01 (д, $J = 9.7$ Гц, 2H), 4.38-4.32 (м, 6H), 3.94-3.58 (м, 33H), 3.50-3.44 (м, 6H), 3.20-3.13 (м, 6H), 2.76-2.72 (м,

2H), 2.51-2.46 (м, 3H), 2.42-2.40 (м, 9H), 2.18-2.15 (м, 6H), 2.08-1.77 (м, 16H), 1.66 (с, 3H), 1.59-1.47 (м, 15H), 1.41-1.29 (м, 25H), 1.15 (с, 3H), 1.14 (с, 3H).

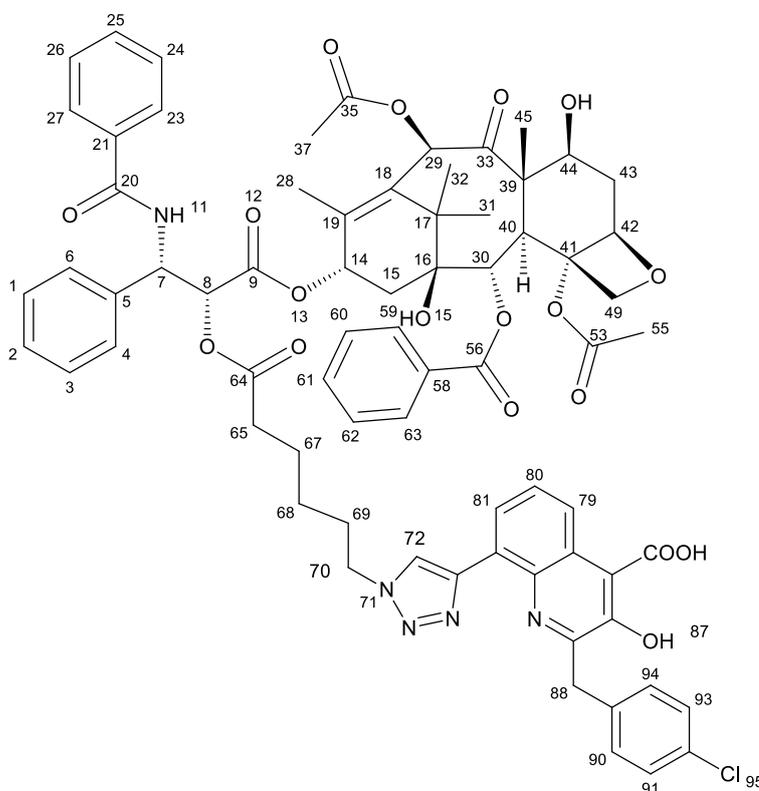
Отнесение сигналов ^1H и ^{13}C ЯМР вместе со схемой нумерации приведено в *Приложениях 1 и 2*.

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для $\text{C}_{119}\text{H}_{177}\text{N}_{11}\text{O}_{40}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 2424.2080 найдено 2424.2062.

Конъюгат **39** паклитаксела и лиганда **30**

В смеси из 1.6 мл ДМФА и 0.4 мл воды растворяли 30 мг ($0.3 \cdot 10^{-3}$ ммоль) производного паклитаксела **36** и 10 мг ($0.3 \cdot 10^{-3}$ ммоль) лиганда **30**. Добавляли по 40 мкл (50 моль%) 0.1М растворов CuSO_4 и аскорбата натрия и перемешивали в течение 3 дней. После этого растворители удаляли при пониженном давлении. Целевое соединение выделяли в индивидуальном виде с помощью колоночной хроматографии ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10/1, v/v).

Получали 4 мг (10 %) продукта в виде желтого кристаллического вещества.



^1H ЯМР ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$, δ , м.д.): 8.07 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H, CH-59, CH-63); 7.76 (д, $J = 9.4$ Гц, 1H, CH-79); 7.75 (д, $J = 7.4$ Гц, 2H, CH-27, CH-23); 7.58-7.54 (м, 2H, CH-61, CH-72); 7.48-7.52 (м, 16H, CH-81, CH-80, CH-90, CH-94, CH-91, CH-93, CH-60, CH-62, CH-

25, CH-1-4, CH-6, CH-24, CH-26); 6.28 (с, 1H, CH-29); 6.13 (т, $J = 8.4$ Гц, 1H, CH-14); 5.91-5.88 (м., 1H, CH-7); 5.64 (д, $J = 7.2$ Гц, 1H, CH-30); 5.40 (д, $J = 3.4$ Гц, 1H, CH-8); 4.93 (д, $J = 9.0$ Гц, 1H, CH-42); 4.39-4.00 (м., 7H, CH-44, CH₂-49, CH-40, CH₂-88, -OH); 3.76-3.74 (м, 2H, CH₂-70); 2.52-2.24 (м, 5H, CH'N"-43, CH₂-65, CH'N"-15, -OH); 2.35 (с, 3H, CH₃-55); 2.15 (с, 3H, CH₃-37); 2.14-2.04 (м, 1H, CH'N"-15); 1.89 (с, 3H, CH₃-28); 1.85-1.75 (м, 3H, CH'N"-43, CH₂-69) 1.63 (с, 3H, CH₃-45); 1.35-1.23 (м, 4H, CH₂-67, CH₂-68); 1.20 (с, 3H, CH₃-31); 1.14 (с, 3H, CH₃-32).

Масс-спектр высокого разрешения: вычислено для C₇₂H₇₁ClN₅O₁₈ [M-H]⁻ *m/z* 1328.4488 найдено 1328.4491.

4.4. Биологические испытания

4.4.1. Исследование связывания лигандов с асиалогликопротеиновым рецептором методом ППР

Эксперимент проводили на приборе Biacore X100 (Biacore AB, Уппсала, Швеция) с использованием чипа-носителя CM5, состоящего из золотой пластины, покрытой слоем карбоксиметилированного декстрана. Поверхность чипа включала в себя две проточных ячейки: на одной иммобилизован анализируемый белок, вторая ячейка – ячейка сравнения. Количество иммобилизованного белка ASGPR - 2000 RU (RU, resonance units). Лиганды, исследуемые на аффинность к ASGPR, растворяли в рабочей буферной смеси (150 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 10 mM TRIS, pH 7.4). К образцам с низкой растворимостью добавляли ДМСО. Каждый лиганд был представлен в широком диапазоне концентраций, от 10⁻² М до 5·10⁻¹¹ М. Скорость потока 20 мкл/мин, лиганд подавался в течение 180 с (время связывания), и далее в течение 60 с изучалась диссоциация комплекса. Для восстановления чип-носитель обрабатывали 20 мкл 20 mM раствора ЭДТА. Эксперименты проводили при 25° С. Все буферные растворы были дегазированы и профильтрованы. Полученные данные обрабатывались при помощи программного обеспечения BIAevaluation 3.0, проводилась интерполяция экспериментальных кривых уравнением вида $dR/dt = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d) R_t$, где dR/dt - скорость изменения ППР-сигнала (в RU, resonance units) во время взаимодействия лиганда с иммобилизованным белком ASGRP, k_a и k_d - константы скорости связывания и диссоциации соответственно, C - концентрация лиганда, и R_{max} - максимальная

зафиксированная емкость иммобилизованного белка. K_D была получена из отношения k_a/k_d .

4.4.2. Исследование конъюгата 34а методом проточной цитофлуориметрии

Клеточные культуры HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека) и Нек297 (эмбриональные клетки печени человека) рассаживали в 12-луночный планшет, инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение ночи. Далее отмывали холодной средой RPMI, содержащей 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Эксперимент проводили в трех повторностях как при частичном блокировании рецептора (при внесении избытка анализируемого лиганда), так и без дополнительной нагрузки избытком лиганда. Избыток лиганда достигался внесением к клеткам 720 мкл среды RPMI (1% FBS), содержащей 400 мкМ (100-кратное превышение по концентрации) флуоресцентно немеченого лиганда тождественного по строению анализируемому, инкубацию проводили в стандартных условиях культивирования в течение 1 часа. В качестве образцов сравнения использовали лунки с клетками, в которые вносили 720 мкл среды RPMI (1% FBS), эти лунки с клетками также инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение 1 часа. По истечении времени инкубации в каждую лунку вносили 80 мкл среды RPMI (1% FBS), содержащей анализируемый конъюгат в концентрации 40 мкМ для достижения конечной концентрации в лунке 4 мкМ. Проводили инкубацию в стандартных условиях культивирования в течение 30 минут. В качестве контрольных образцов использовали клетки, которые инкубировали со средой RPMI (1% FBS) с эквивалентным содержанием ДМСО в течение 30 мин.

Клетки снимали с поверхности пластика трипсинизацией, инактивацию трипсина проводили с использованием натрий-фосфатного буфера (PBS), содержащего 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки центрифугировали и отмывали дважды в PBS (10% FBS), полученные клетки ресуспендировали в 500 мкл PBS и использовали далее для проточной цитофлуориметрии (прибор Becton Dickinson FACSAria III).

4.4.3. Интравитальная микроскопия печени

Животное вводили в наркоз путем внутривентрального введения смеси кетамина (200 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг). После этого устанавливали катетер в хвостовую вену для последующего введения поддерживающего наркоза, флуоресцентных антител и исследуемых лигандов. Убедившись, что рефлексы отсутствуют, проводили разрез кожи и брюшины по средней линии живота для получения доступа к печени. Животное укладывали на правый бок, перерезали печеночно-диафрагмальную и печеночно-желудочную связки, после чего помещали печень на покровное стекло (45x50 мм) на платформе инвертированного конфокального микроскопа Nikon AR1. Для окраски макрофагов и нейтрофилов в вену вводили 5-10 мкг антител анти-F4/80-Alexa-488 и анти-Ly6G-BV421, соответственно. Съемку проводили со скоростью 2-6 кадров/минуту, в трех каналах (DAPI/FITC/Cy5) с использованием объективов 20x, 40x. Раствор исследуемого конъюгата (3 мг/кг) вводили в момент съемки. Продолжительность сеанса интравитальной микроскопии составляла в среднем 2ч. Для каждого конъюгата количество животных в группе равнялось 3.

4.4.4. Измерение гидролиза конъюгата 38

Для исследования гидролиза в водной среде подготавливали буферные растворы с pH 5.0 и 7.4 и растворяли в них исследуемый конъюгат (1.4 мл, 40 мкМ). Для исследования ферментативного гидролиза готовили такой же раствор конъюгата в натрий-фосфатном буфере, а затем добавляли 150 мкл раствора эстеразы печени свиньи с концентрацией 20 мкг/мл. Растворы инкубировали при 37 °С, отбирали пробы по 200 мкл с разными временными интервалами. Пробу разбавляли метанолом до объема 800 мкл, центрифугировали, отделяли надосадочную жидкость и анализировали ее при помощи ВЭЖХ-МС. По изменению площади пика анализируемого вещества определяли изменение концентрации конъюгата.

4.4.5. Определение цитотоксичности

Культивирование клеток. В работе использовали клеточную линию HepG2. Клетки культивировали во флаконах (25 см²) в CO₂-инкубаторе в газовой среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37°С. Культивирование проводили в среде

DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотики (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). Пересев культуры проводили на 2-4 сут.

Анализ цитотоксичности. Проводили культивирование клеток HepG2 в 96-луночных планшетах (5000 клеток в лунке) в течение 24 часов, вносили анализируемые вещества, растворенные в ДМСО в различных концентрациях. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные с ДМСО в соответствующих концентрациях. Оценку цитотоксичности выполняли после 48 часов инкубации с использованием MTS-анализа (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation). Анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя. К 100 мкл среды в лунке 96-луночного планшета добавляли 20 мкл MTS-реагента, проводили инкубацию в течение 3 часов до появления характерной окраски бурого цвета. Снимали значение оптической плотности (используемая длина волны 490 нм). Значения оптической плотности, полученные для клеток, инкубированных с конъюгатом, и клеток, инкубированных с соответствующими концентрациями ДМСО (контроль), использовали для определения выживаемости. Исследование осуществляли при помощи устройства для считывания микропланшетов Thermo Fisher Varioskan Lux.

5. Основные результаты и выводы

В результате работы были получены следующие наиболее значимые результаты и могут быть сделаны следующие выводы:

1. Впервые предложена конвергентная стратегия синтеза лигандов асиалогликопротеинового рецептора на основе *N*-ацетилгалактозамина и их изомеров на основе *N*-ацетилглюкозамина. Разработанный подход позволил получить 4 новых углеводсодержащих векторных соединения с терминальной азидогруппой.
2. Предложен препаративный метод получения конъюгатов *N*-ацетилгалактозамин- и *N*-ацетилглюкозамин-содержащих лигандов с флуоресцентным красителем *sulfo*-Cy5 алкином и противоопухолевым препаратом паклитакселом на основе катализируемого солями меди азидо-алкинового циклоприсоединения. Впервые проведено исследование распределения полученных соединений в организме животного методом интравитальной микроскопии. Показано, что лиганд на основе *N*-ацетилгалактозамина способствует быстрому проникновению флуорофора из кровотока в гепатоциты, минуя эндотелиальные клетки печени и макрофаги.
3. На примере пролекарства паклитаксела показано, что введение адресного фрагмента на основе *N*-ацетилгалактозамина не влечет за собой снижения биологической активности противоопухолевого препарата при увеличении его водорастворимости.
4. Найден новый класс лигандов ASGPR неуглеводной природы – производные 3-гидроксихинолин-4-карбоновой кислоты. Разработан синтетический подход к 3-гидрокси-2-(4-хлорбензил)хинолин-4-карбоновым кислотам, содержащим в бензольном кольце этинильный заместитель. На примере паклитаксела показано, что предложенные лиганды могут быть использованы для синтеза конъюгатов противоопухолевых препаратов для направленного транспорта в клетки гепатоцеллюлярной карциномы.

6. Список литературы

1. Devarajan P. V., Sanyog Jain. (ed.). Targeted drug delivery: concepts and design. – New York : Springer, 2015
2. Ivanenkov Y.A., Maklakova S.Yu., Beloglazkina E.K., Zyk N.V., Nazarenko A.G., Tonevitsky A.G., Kotelianski V.E., Majouga.A.G. Development of liver cell-targeted drug delivery systems: experimental approaches // *Russ. Chem. Rev.* – **2017**. – V. 86. – №8. – P. 750-776.
3. Zhang X., Leng H., Lu A., Lin C., Zhou L., Lin G., Zhang Y., Yang Z., Zhang H. Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: Current and future. // *Nanomed. Nanotech. Bio. Med.* – **2016**. – V. 12. – №4. – P. 853-869.
4. Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors // *Biochemistry.* – **1990**. – V. 29. – №43. – P. 10009-10018.
5. D'Souza A. A., Devarajan P. V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting—Strategies and applications // *J. Control. Release.* – **2015**. – V. 203. – P. 126-139.
6. Li M., Zhang W., Wang B., Gao Y., Song Z., Zheng Q.C. Ligand-based targeted therapy: a novel strategy for hepatocellular carcinoma // *Int. J. Nanomedicine.* – **2016**. – V. 11. – P. 5645–5669.
7. King M., Wagner A. Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions – Past and Present Trends // *Bioconjugate Chem.* – **2014**. – V. 25. – №5. – P. 825–839.
8. Северин Е. С. Новые подходы к избирательной доставке лекарственных препаратов в опухолевые клетки // *Успехи химии.* – **2015**. – Т. 84. – №1. – С. 43-60.
9. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress // *Nat. Rev. Cancer.* – **2008**. – V. 8. – №6. – P. 473-480.
10. Lammers T., Kiessling F., Hennink W. E., Storm G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress // *J. Control. Release.* – **2012**. – V. 161. – №2. – P. 175–187.
11. Fernandes E., Ferreira J., Peixoto A., Lima L., Barroso S., Sarmiento B., Santos L. New trends in guided nanotherapies for digestive cancers: A systematic review // *J. Control. Release.* – **2015**. – V. 209. – P. 288-307.

12. Edited by Twan Lammers. Drug Delivery Research in Europe // *J. Control. Release.* – **2012.** – V. 161. – №2. – P. 151-712.
13. Lammers T. Drug delivery research in Europe // *J. Control. Release.* – **2012.** – V. 161. – №2. – P. 151-151.
14. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs // *Cancer Res.* – **1986.** – V. 46. – №12. – P. 6387-6392.
15. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin // *Clinical pharmacokinetics.* – **2003.** – V. 42. – №5. – P. 419-436.
16. Wang Y., Du H., Zhai G. Recent advances in active hepatic targeting drug delivery system // *Curr. Cancer Drug Targets.* – **2014.** – V. 15. – №6. – P. 573-599.
17. Ahmed M., Narain R. Carbohydrate-based materials for targeted delivery of drugs and genes to the liver // *Nanomedicine.* – **2015.** – V. 10. – №14. – P. 2263-2288.
18. Morell A.G., Irvine R.A., Sternlieb I., Scheinberg I.H., Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin *in vivo* // *J. Biol. Chem.* – **1968.** – V. 243. – №1. – P. 155-159.
19. Ashwell G., Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver // *Annu. Rev. Biochem.* – **1982.** – V. 51. – №1. – P. 531-554.
20. Rogers J. C., Kornfeld S. Hepatic uptake of proteins coupled to fetuin glycopeptide // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – **1971.** – V. 45. – №3. – P. 622-629.
21. Springer A. D., Dowdy S. F. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics // *Nucl. Acid Ther.* In press. DOI 10.1089/nat.2018.0736.
22. Schwartz A.L., Rup D., Lodish H.F. Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte // *J. Biol. Chem.* – **1980.** – V. 255. – P. 9033-9036.
23. R.K.Gupta, G.S.Gupta. In *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications. V. 1.* (Ed. G.S.Gupta). Springer-Verlag, Wien, 2012.
24. Shi B., Abrams M., Sepp-Lorenzino L. Expression of asialoglycoprotein receptor 1 in human hepatocellular carcinoma // *J. Histochem. Cytochem.* – **2013.** – V. 61. – №12. – P. 901-909.
25. Harris R.L., van der Berg C.W., Bowen D.J. ASGR1 and ASGR2, the genes that encode the asialoglycoprotein receptor (Ashwell receptor), are expressed in peripheral blood

- monocytes and show interindividual differences in transcript profile // *Mol. Biol. Int.* – **2012.** – V. 2012. – Article ID 283974.
26. Colquhoun S.D., Connelly C.A., Vera D.R. Portal-systemic shunts reduce asialoglycoprotein receptor density in rats // *J. Nucl. Med.* – **2001.** – V. 42. – №1. – P. 110-116.
27. Dodeur M., Durand D., Dumont J., Durand G., Feger J., Agneray J. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus on the Binding and Uptake of Asialoorosomucoïd by Isolated Hepatocytes from Rats // *Eur. J. Biochem.* – **1982.** – V. 123. – №2. – P. 383-387.
28. Willoughby J. L. S., Chan A., Sehgal A., Butler J.S., Nair J.K., Racie T., Shulga-Morskaya S., Nguyen T., Qian K., Yucius K., Charisse K., Berkel T., Manoharan M., Rajeev K.G., Maier M.A., Jadhav V., Zimmermann T.S. Evaluation of GalNAc-siRNA Conjugate Activity in Pre-clinical Animal Models with Reduced Asialoglycoprotein Receptor Expression // *Mol. Ther.* – **2018.** – V. 26. – №1. – P. 105-114.
29. Collins J. C., Paietta E., Green R., Morell A.G. Stockert R.J. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 // *J. Biol. Chem.* – **1988.** – V. 263. – №23. – P. 11280-11283.
30. Mu H., Lin K.-X., Zhao H., Xing S., Li C., Liu F., Lu H.-Z., Zhang Z., Sun Y.-L., Yan X.-Y., Cai J.-Q., and Zhao X.-H. Identification of biomarkers for hepatocellular carcinoma by semiquantitative immunocytochemistry // *World J. Gastroenterol.* – **2014.** – V. 20. – №19. – P. 5826–5838.
31. Trere D., Fiume L., Giorgi L.B.D., Stefano G.D., Migaldi M., Derenzini M. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells // *Br. J. Cancer.* – **1999.** – V. 81. – №3. – P. 404–408.
32. Shi B., Abrams M., Sepp-Lorenzino L. Expression of asialoglycoprotein receptor 1 in human hepatocellular carcinoma // *J. Histochem. Cytochem.*, - **2013.** – V. 61. – №12. – P. 901-909.
33. Meier M., Bider M.D., Malashkevich V.N., Spiess M., Burkhard P. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor // *J. Mol. Biol.* – **2000.** – V.300. – P.857-865.

-
34. Kolatkar A.R., Leung A.K., Isecke R., Brossmer R., Drickamer K., Weis W. I. Mechanism of *N*-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain // *J. Biol. Chem.* – **1998**. – V. 273. – №31. – P. 19502-19508.
35. Arangoa M. A., Düzgüneş N., De Ilarduya C. T. Increased receptor-mediated gene delivery to the liver by protamine-enhanced-asialofetuin-lipoplexes // *Gene ther.* – **2003**. – V. 10. – №1. – P. 5–14.
36. T.D. McKee, M.E. DeRome, G.Y. Wu, M.A. Findeis, Preparation of asialoorosomucoid-polylysine conjugates // *Bioconjug. Chem.* – **1994**. – V. 5. – №4. – P. 306–311.
37. Joshi V.M., Devarajan P.V. Receptor-mediated hepatocyte-targeted delivery of primaquine phosphate nanocarboplex using a carbohydrate ligand // *Drug Deliv. Transl. Res.* – **2014**. – V. 4. – №4. – P. 353–364.
38. Cho H.A., Park I.-S., Kim T.-W., Oh Y.-K., Yang K.-S., Kim J.-S. Suppression of hepatitis B virus-derived human hepatocellular carcinoma by NF- κ B-inducing kinase-specific siRNA using liver-targeting liposomes // *Arch. Pharm. Res.* – **2009**. – V. 32. – №7. – P. 1077–1086.
39. Melisi D., Curcio A., Luongo E., Morelli E., Rimoli M.G. D-Galactose as a vector for prodrug design // *Curr. Top. Med. Chem.* – **2011**. – V. 11. – №18. – P. 2288-2298.
40. Ma J., Huang C., Yao X., Shi C., Sun L., Yuan L., Lei P., Zhu H., Liu H., Wu X., Ning Q., Zhou C., Shen G. Inhibition of hepatitis B virus and induction of hepatoma cell apoptosis by ASGPR-directed delivery of shRNAs // *PloS one.* – **2012**. – V. 7. – №10. – P. e46096.
41. Wang Z., Luo T., Sheng R., Li H., Sun J., Cao A.. Amphiphilic diblock terpolymer PMAgala-b-P (MAA-co-MACHol) s with attached galactose and cholesterol grafts and their intracellular pH-responsive doxorubicin delivery // *Biomacromolecules.* – **2015**. – V. 17. – №1. – P. 98–110.
42. Lee C., Lee C., Kim B., Lee S., Kim T.H., Kim J.O., Lee E.S., Oh K.T., Choi H.-G., Yoo S.D., Youn Y.S. Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma // *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* – **2017**. – V. 152. – P. 183–191.
43. Cavallaro G., Farra R., Craparo E.F., Sardo C., Porsio B., Giammona G., Perrone F., Grassi M., Pozzato G., Grassi G., Dapas B. Galactosylated polyaspartamide copolymers for siRNA targeted delivery to hepatocellular carcinoma cells // *Int. J. Pharm.* – **2017**. – V. 525. – №2. – P. 397–406.

-
44. Chen S., Tam Y.Y.C., Lin P.J.C., Leung A.K.K., Tam Y.K., Cullis P.R.. Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration // *J. Control. Release.* – **2014.** – V. 196. – P. 106–112.
45. Huang X., Leroux J. C, Castagner B. Well-defined multivalent ligands for hepatocytes targeting via asialoglycoprotein receptor // *Bioconjugate Chem.* – **2016.** – V. 28. – №2. – P. 283–295.
46. Tanaka J., Gleinich A.S., Zhang Q., Whitfield R., Kempe K., Haddleton D.M., Davis T.P., Perrier S., Mitchell D.A., Wilson P. Specific and differential binding of N-acetylgalactosamine glycopolymers to the human macrophage galactose lectin and asialoglycoprotein receptor // *Biomacromolecules.* – **2017.** – V. 18. – №5. – P. 1624-1633.
47. Stockert R. J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression // *Physiol. Rev.* – **1995.** – V. 75. – №3. – P. 591-609.
48. Lee Y. C., Townsend R.R., Hardy M.R., Lönngren J., Arnarp J., Haraldsson M. Lönn H. Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features // *J. Biol. Chem.* – **1983.** – V. 258. – №1. – P. 199-202.
49. Sliedregt L.A., Rensen P.C., Rump E.T., Santbrink P.J., Bijsterbosch M.K., Valentijn R.P., van der Marel G.A., van Boom J.H., van Berkel T.J. Biessen E.A.. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor // *J. Med. Chem.* – **1999.** – V. 42. – №4. – P. 609-618.
50. Manoharan M., Rajeev.K.G, Jayaprakash N.K., Mainer. M.. Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides. U.S. Patent No.8106022. 2012.
51. Nair J.K., Willoughby J.L., Chan A., Charisse K., Alam M.R., Wang Q., Hoekstra M., Kandasamy P., Kel'in A.V., Milstein S., Taneja N., O'Shea J., Shaikh S., Zhang L., van der Sluis R.J., Jung M.E., Akinc A., Hutabarat R., Kuchimanchi S., Fitzgerald K., Zimmermann T., van Berkel T.J., Maier M.A., Rajeev K.G., and Manoharan M.. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing // *J. Am. Chem. Soc.* – **2014.** – V. 136. – №49. – P. 16958-16961.
52. Valentijn A. R. P., van der Marel G.A., Sliedregt L.A.J.M., van Berkel T.J.C., Biessen E.A.L., van Boom J.H.. Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the asialoglycoprotein receptor // *Tetrahedron.* – **1997.** – V. 53. – P. 759-770.

-
53. Lee R. T., Lee Y. C. Preparation of cluster glycosides of N-acetylgalactosamine that have subnanomolar binding constants towards the mammalian hepatic Gal/GalNAc-specific receptor // *Glycoconj. J.* – **1987**. – V. 4. – P. 317-328.
54. Prakash T.P., Yu J., Migawa M.T., Kinberger G.A., Wan W.B., Østergaard M.E., Carty R.L., Vasquez G., Low A., Chappell A., Schmidt K., Aghajan M., Crosby J., Murray H.M., Booten S.L., Hsiao J., Soriano A., Machemer T., Cauntay P., Burel S.A., Murray S.F., Gaus H., Graham M.J., Swayze E.E., and Seth P.P. Comprehensive Structure–Activity Relationship of Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugated Antisense Oligonucleotides for Targeted Delivery to Hepatocytes // *J. Med. Chem.* – **2016**. – V. 59. – №6. – P. 2718-2733.
55. Rajeev K. G., Nair J.K., Jayaraman M., Charisse K., Taneja N., O'Shea J., Willoughby J.L.S., Yucius K., Nguyen T., Shulga-Morskaya S., Milstein S., Liebow A., Querbes W., Borodovsky A., Fitzgerald K., Maier M.A., Manoharan M. Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo // *Chembiochem.* – **2015**. – V. 16. – №6. – P. 903-908
56. Pujol A. M., Cuillel M., Jullien A.-S., Lebrun C., Cassio D., Mintz E., Gateau C., Delangle P. A Sulfur Tripod Glycoconjugate that Releases a High-Affinity Copper Chelator in Hepatocytes // *Angew. Chem.* – **2012**. – V. 124. – №30. – P. 7563-7566.
57. Pujol A. M., Cuillel M., Renaudet O., Lebrun C., Charbonnier P., Cassio D., Gateau C., Dumy P., Mintz E., and Delangle P. Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glycocyclopeptide // *J. Am. Chem. Soc.* – **2010**. – V. 133. – №2. – P. 286-296.
58. Monestier M., Charbonnier P., Gateau C., Cuillel M., Robert F., Lebrun C., Mintz E., Renaudet O., Delangle P. ASGPR-Mediated Uptake of Multivalent Glycoconjugates for Drug Delivery in Hepatocytes // *ChemBioChem.* – **2016**. – V. 17. – №7. – P. 590-594.
59. Iobst S. T., Drickamer K. Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors // *J. Biol. Chem.* – **1996**. – V. 271. – №12. – P. 6686-6693.
60. Wong T. C., Townsend R. R., Lee Y. C. Synthesis of D-galactosamine derivatives and binding studies using isolated rat hepatocytes // *Carbohydrate Res.* – **1987**. – V. 170. – №1. – P. 27-46.

61. Stokmaier D., Stokmaier D., Khorev O., Cutting B., Born R., Ricklin D., Ernst T.O.G., Böni F., Schwingruber K., Gentner M., Wittwer M., Spreafico M., Vedani A., Rabbani S., Schwardt O., Ernst B. Design, synthesis and evaluation of monovalent ligands for the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) // *Bioorg. Med. Chem.* – **2009**. – V. 17. – №20. – P. 7254-7264.
62. Mamidyala S. K., Dutta S., Chrnyk B.A., Préville C., Wang H., Withka J.M., McColl A., Subashi T.A., Hawrylik S.J., Griffor M.C., Kim S., Pfefferkorn J.A., Price D.A., Menhaji-Klotz E., Mascitti V., and Finn M.G. Glycomimetic ligands for the human asialoglycoprotein receptor // *J. Am. Chem. Soc.* – **2012**. – V. 134. – №4. – P. 1978-1981.
63. Sanhueza C.A., Baksh M.M., Thuma B., Roy M.D., Dutta S., Préville C., Chrnyk B.A., Beaumont K., Dullea R., Ammirati M., Liu S., Gebhard D., Finley J.E., Salatto C.T., King-Ahmad A., Stock I., Atkinson K., Reidich B., Lin W., Kumar R., Tu M., Menhaji-Klotz E., Price D.A., Liras S., Finn M.G., Mascitti V.. Efficient liver targeting by polyvalent display of a compact Ligand for the asialoglycoprotein receptor // *J. Am. Chem. Soc.* – **2017**. – V. 139. – №9. – P. 3528-3536.
64. Dutta R., Mahato R. I. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy // *Pharmacol. Ther.* – **2017**. – V. 173. – P. 106-117.
65. Kumar Y., Sharma P., Bhatt N., Hooda, K. Transarterial therapies for hepatocellular carcinoma: a comprehensive review with current updates and future directions // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – **2016**. – V. 17. – P. 473-478.
66. Lin C.-C., Lai C.-H., Chuang Y.-J., Tzou D.-L. M., Chang T.-C. Stepwise Orthogonal Click Chemistry toward Fabrication of Paclitaxel/Galactose Functionalized Fluorescent Nanoparticles for HepG2 cell Targeting and Delivery // *Bioconjug. Chem.* – **2013**. – V. 24. – P. 1698-1709.
67. Seymour L.W., Ferry D.R., Anderson D., Hesslewood S., Julyan P.J., Poyner R., Doran J., Young A.M., Burtles S., Kerr D.J.. Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin // *J. Clin. Oncol.* – **2002**. – V. 20. – №6. – P. 1668-1676.
68. Julyan P.J., Seymour L.W., Ferry D.R., Daryani S., Boivin C.M., Doran J., David M. Anderson D. Christodoulou C., Young A.M. Hesslewood S., Kerr D.J. Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine // *J. Control Release.* – **1999**. – V. 57. – P. 281-290.

-
69. Ma Y., Chen H., Su S., Wang T., Zhang C., Fida G., Cui S., Zhao J., Gu Y. Galactose as Broad Ligand for Multiple Tumor Imaging and Therapy // *J. Cancer.* – **2015.** – V. 6. – №7. – P. 658-670.
70. Sharma R.A., Eatock M.M., Twelves C.J., Brown G., McLelland H.R., Clayton K.T. O'Byrne K.J., Moyses C., Carmichael J., Steward W.P. Bioavailability study of oral and intravenous OGT 719, a novel nucleoside analogue with preferential activity in the liver // *Cancer Chem. Pharm.* – **2001.** – V. 48. – №3. – P. 197-201.
71. Mok T.S., Leung T.W., Brown G., Moyses C., Chan A.T., Yeo W., Wong H., Chak K., Johnson P. A phase I safety and pharmacokinetic study of OGT 719 in patients with liver cancer // *Acta Oncologica.* – **2004.** – V. 43. – №3. – P. 245-251.
72. MiáJeon H., HeeáLee M., SupáShin W., KookáKwon J., SeungáKim J. Camptothecin delivery into hepatoma cell line by galactose-appended fluorescent drug delivery system // *RSC Advances.* – **2014.** – V. 4. – №36. – P. 18744-18748.
73. Ohya Y., Nagatomi K., Ouchi T. Synthesis and cytotoxic activity of macromolecular prodrug of cisplatin using poly (ethylene glycol) with galactose residues or antennary galactose units // *Macromol. Bioscience.* – **2001.** – V. 1. – №8. – P. 355-363.
74. Rico L., Østergaard M. E., Bell M., Seth P.P., Hanessian S. Studies directed toward the asialoglycoprotein receptor mediated delivery of 5-fluoro-2'-deoxyuridine for hepatocellular carcinoma // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2018.** – V. 28. – P. 2652-2654.
75. Peng Y., Yu W., Li E., Kang J., Wang Y., Yang Q., Liu B., Zhang J., Li L., Wu J., Jiang J., Wang Q., Jiang J. Discovery of an Orally Active and Liver-Targeted Prodrug of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma // *J. Med. Chem.* – **2016.** – V. 59. – №8. – P. 3661-3670.
76. Schiff P.B. Fant J., Horwitz S.B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol // *Nature.* – **1979.** – V. 277. – P. 665-667.
77. Meng Z., Lv Q., Lu J., Yao H., Lv X., Jiang F., Lu A., Zhang G. Prodrug Strategies for Paclitaxel // *Int. J. Mol. Sci.* – **2016.** – V. 17. – №5. – P. 796-816.
78. Skwarczynski M., Hayashi Y., Kiso Y. Paclitaxel prodrugs: toward smarter delivery of anticancer agents // *J. Med. Chem.* – **2006.** – V. 49. – №25. – P. 7253-7269.

79. Fu Y., Li S., Zu Y., Yang G., Yang Z., Luo M., Jiang S., Wink M., Efferth T. Medicinal Chemistry of Paclitaxel and its Analogues // *Curr. Med. Chem.* – **2009**. – V. 16. – P. 3966-3985.
80. Datta A., Jayasinghe L.R., Georg G.I. 4-Deacetyltaxol and 10- Acetyl-4-deacetyltaxotere: synthesis and biological evaluation. // *J. Med. Chem.* – **1994**. – V. 37. – P. 4258-4260.
81. Neidigh K.A. Gharpure M.M. Rimoldi J.M. Kingston D.G.I. Synthesis and biological evaluation of 4-deacetylpaclitaxel. // *Tetrahedron Lett.* – **1994**. – V. 35. – P. 6839-6842.
82. Marder-Karsenti R., Dubois J., Bricard L., Guénard D., Guéritte-Voegelein F. Synthesis and biological evaluation of D-ringmodified taxanes: 5(20)-Azadocetaxel analogues. // *J. Org. Chem.* – **1997**. – V. 62. – P. 6631-6637.
83. Gunatilaka A.A.L., Ramdayal F.D., Sarragiotto M.H., Kingston D.G.I., Sackett D.L., Hamel E. Synthesis and biological evaluation of novel paclitaxel (Taxol) D-ring modified analogues. // *J. Org. Chem.* – **1999**. V. 64. – P. 2694-2703.
84. Gabetta B., Fuzzati N., Orsini P., Peterlongo F., Appendino G., Van der Velde D.G. Paclitaxel analogues from *Taxus x media* cv. *Hicksii*. // *J. Nat. Prod.* – **1999**. – V. 62. – P. 219-223.
85. Georg G.I., Cheruvallath Z.S., Samarium diiodide-mediated deoxygenation of Taxol: a one-step synthesis of 10-deacetoxytaxol. // *J. Org. Chem.* – **1994**. – V. 59. – P. 4015-4018.
86. Ge H., Vasandani, V., Huff J.K., Audus K.L., Himes R.H., Seelig A., Georg G.I. Synthesis and interactions of 7-deoxy-, 10- deacetoxy, and 10-deacetoxy-7-deoxypaclitaxel with NCI/ADRRES cancer cells and bovine brain microvessel endothelial cells. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2006**. – V. 16. – P. 433-436.
87. Deutsch H.M., Glinski J.A., Hernandez M., Haugwitz V.L., Narayanan M., Suffness L., Zalkow H. Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. // *J. Med. Chem.* – **1989**. – V. 32. – P. 788-792.
88. Magri N.F., Kingston D.G.I. Modified taxols. 4. Synthesis and biological activity of taxols modified in the side chain. // *J. Nat. Prod.* – **1988**. – V. 51. – P. 298-306.
89. Mikuni K., Nakanishi K., Hara K., Hara K., Iwatani W., Amano T., Nakamura K., Tsuchiya Y., Okumoto H., Mandai T. In vivo antitumor activity of novel water-soluble taxoids // *Biol. Pharm. Bull.* – **2008**. – V. 31. – №6. – P. 1155-1158.
90. de Bont D.B., Leenders R. G., Haisma H. J., van der Meulen-Muileman I., Scheeren H.W. Synthesis and biological activity of β -glucuronyl carbamate-based prodrugs of paclitaxel as potential candidates for ADEPT // *Bioorg. Med. Chem.* – **1997**. – V. 5. – №2. – P. 405-414.

91. Wang S., Placzek W.J., Stebbins J.L., Mitra S., Noberini R., Koolpe M., Zhang Z., Dahl R., Pasquale E.B., Pellicchia M. Novel targeted system to deliver chemotherapeutic drugs to EphA2-expressing cancer cells // *J. Med. Chem.* – **2012**. – V. 55. – №5. – P. 2427-2436.
92. Gibson J. D., Khanal B. P., Zubarev E. R. Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* – **2007**. – V. 129. – №37. – P. 11653-11661.
93. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides // *J. Org. Chem.* – **2002**. – V. 67. – №9. – P. 3057-3064.
94. Устинов А.В., Степанова И.А., Дубнякова В.В., Зацепин Т.С., Ножевникова Е.В., Коршун В. А. Модификация нуклеиновых кислот с помощью реакции [3 + 2] диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов // *Биоорган. Химия.* – **2010**. – V. 36. – №4. P. 437-481.
95. Маклакова С.Ю., Кучеров Ф.А., Петров Р.А., Гопко В.В., Шипулин Г.А., Зацепин Т.С., Белоглазкина Е.К., Зык Н.В., Мажуга А.Г., Котелянский В.Э. Новый подход к синтезу лигандов асиалогликопротеинового рецептора для направленной доставки олигонуклеотидов в гепатоциты // *Изв. АН. Сер. Хим.* – **2015**. – Т. 64. – №7. – С. 1655–1662.
96. Petrov R.A., Maklakova S.Yu., Ivanenkov Ya.A., Petrov S.A., Sergeeva O.V., Yamansarov E.Yu., Saltykova I.V., Kireev I.I., Alieva I.B., Deyneka E.V., Sofronova A.A., Aladinskaia A.V., Trofimenko A.V., Yamidanov R.S., Kovalev S.V., Kotelianski V.E., Zatsepin T.S., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. Synthesis and biological evaluation of novel mono- and bivalent ASGP-R-targeted drug-conjugates // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2018**. – V. 28. – № 3. – P. 382–387.
97. Huang Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – **2017**. – V. 6. – P. 116–132.
98. Dupraz A., Guy P., Dupuy C. Polyalkylation of Primary Polyols by 1,4-Addition to tert-Butyl Acrylate and Acrylonitrile // *Tetrahedron Lett.* – **1996**. – V. 37. – №8. – P. 1237-1240.
99. Crucho C.I.C., Correia-da-Silva P., Petrova K.T., Barros T. Recent progress in the field of glycoconjugates // *Carbohydr. Res.* – **2015**. – V. 402. – P. 124-132.
100. Majouga A.G., Ivanenkov Ya.A., Veselov M.S., Lopuhov A.V., Maklakova S.Yu., Beloglazkina E.K., Klyachko N.L., Sandulenko Yu.B., Galkina N.Y., Koteliansky V.E.

- Identification of novel Small-molecule ASGP-R ligands // *Curr. Drug Deliv.* – **2016.** – V. 13. – № 8. – P. 1303–1312.
101. Kaila N., Janz K., Huang A., Moretto A., DeBernardo S., Bedard P.W., Tam S., Clerin V., Keith J.C., Tsao D.H.H., Sushkova N., Shaw G.D., Camphausen R.T., Schaub R.G., Wang Q. 2-(4-Chlorobenzyl)-3-hydroxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [H] quinoline-4-carboxylic acid (PSI-697): identification of a clinical candidate from the quinoline salicylic acid series of P-selectin antagonists // *J. Med. Chem.* – **2007.** – V. 50. – №1. – P. 40-64.
102. Maddox J. What Remains to be Discovered: Mapping the Secrets of the Universe, the Origins of Life, and the Future of the Human Race. New York: Martin Kessler Books. 1998.
103. Huang A., Moretto A., Janz K., Lowe M., Bedard P.W., Tam S., Di L., Clerin V., Sushkova N., Tchernychev B., Tsao D.H.H., Keith J.C., Shaw G.D., Schaub R.G., Wang Q., Kaila N. Discovery of 2-[1-(4-Chlorophenyl) cyclopropyl]-3-hydroxy-8-(trifluoromethyl) quinoline-4-carboxylic acid (PSI-421), a P-selectin Inhibitor with improved pharmacokinetic properties and oral efficacy in models of vascular injury // *J. Med. Chem.* – **2010.** – V. 53. – №16. – P. 6003-6017.
104. Pfitzinger W. Chinolinderivate aus isatinsäure // *J. prakt. Chem.* – **1886.** – V. 33. – №1. – P. 100-100.
105. Shvekhgeimer M.G.A. The Pfitzinger Reaction // *Chem. Heterocycl. Compd.* – **2004.** – V. 40. – №3. – P. 257-294.
106. Plietker B. The RuO₄-Catalyzed Ketohydroxylation, Part II: A Regio-, Chemo-and Stereoselectivity Study // *Eur. J. Org. Chem.* – **2005.** – V. 2005. – №9. – P. 1919-1929.
107. Sato S., Takahashi R., Sodesawa T., Fukuda H., Sekine T., Tsukuda E. Synthesis of α -hydroxyketones from 1,2-diols over Cu-based catalyst // *Catal. Commun.* – **2005.** – V. 6. – P. 607-610.
108. Tsuji T. Acid-catalyzed oxidation of oxiranes with dimethyl sulfoxide giving α -hydroxy ketones // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – **1989.** – V. 62. – №2. – P. 645-647.
109. Vaismaa M. J. P., Leskinen M. V., Lajunen M. K. Microwave-Assisted One-Carbon Chain Extension in the Preparation of Terminal α -Hydroxy Ketones // *Synth. Commun.* – **2009.** – V. 39. – №11. – P. 2042-2052.
110. Kaila N., Janz K., DeBernardo S., Bedard P.W., Camphausen R.T., Tam S., Tsao D.H.H., Keith Jr. J.C., Nickerson-Nutter C., Shilling A., Young-Sciame R., Wang Q. Synthesis and

biological evaluation of quinoline salicylic acids as P-selectin antagonists // *J. Med. Chem.* – **2007**. – V. 50. – №1. – P. 21-39.

111. Беккер Г. и др. Органикум: Практикум по органической химии. М: Мир. 1979. 445с.

112. Wissner A. Tris-trimethylsilyloxyethylene: The conversion of carboxylic acid chlorides to hydroxymethylketones // *Tetrahedron Lett.* – **1978**. – V. 19. – №31. – P. 2749-2752.

113. Vaismaa M. J. P., Leskinen M. V., Lajunen M. K. Microwave-Assisted One-Carbon Chain Extension in the Preparation of Terminal α -Hydroxy Ketones // *Synth. Commun.* – **2009**. – V. 39. – №11. – P. 2042-2052.

114. Эльдерфилд Р. Гетероциклические соединения. – Рипол Классик. – Москва. – 2013. – Т. 3. – с.155.

115. Uddin M.K., Reignier S.G., Coulter T., Montalbetti C., Grånäs C., Butcher S, Krog-Jensen C., Felding J. Syntheses and antiproliferative evaluation of oxyphenisatin derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2007**. – V. 17. – №10. – P. 2854-2857.

116. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Yu., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse N-acetylgalactosamine clusters // *Bioconjugate Chemistry.* – **2017**. – V. 28. – №. 10. – P. 2599–2607.

117. Craig K., Abrams M., Amiji M. Recent preclinical and clinical advances in oligonucleotide conjugates // *Expert opinion on drug delivery.* – **2018**. – V. 15. – №6. – P. 629-640

118. Sulfo-Сyanine5 алкин // Lumiprobe <https://ru.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-alkyne> (дата обращения 28.10.2018)

119. Luo D., Cheng S.C.S., Xie H., Xie Y. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line // *Biochem. Cell Biol.* – **2000**. – V. 78. – №2. – P. 119-126.

120. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. М: МГУ. **2009**. 649-653 с.

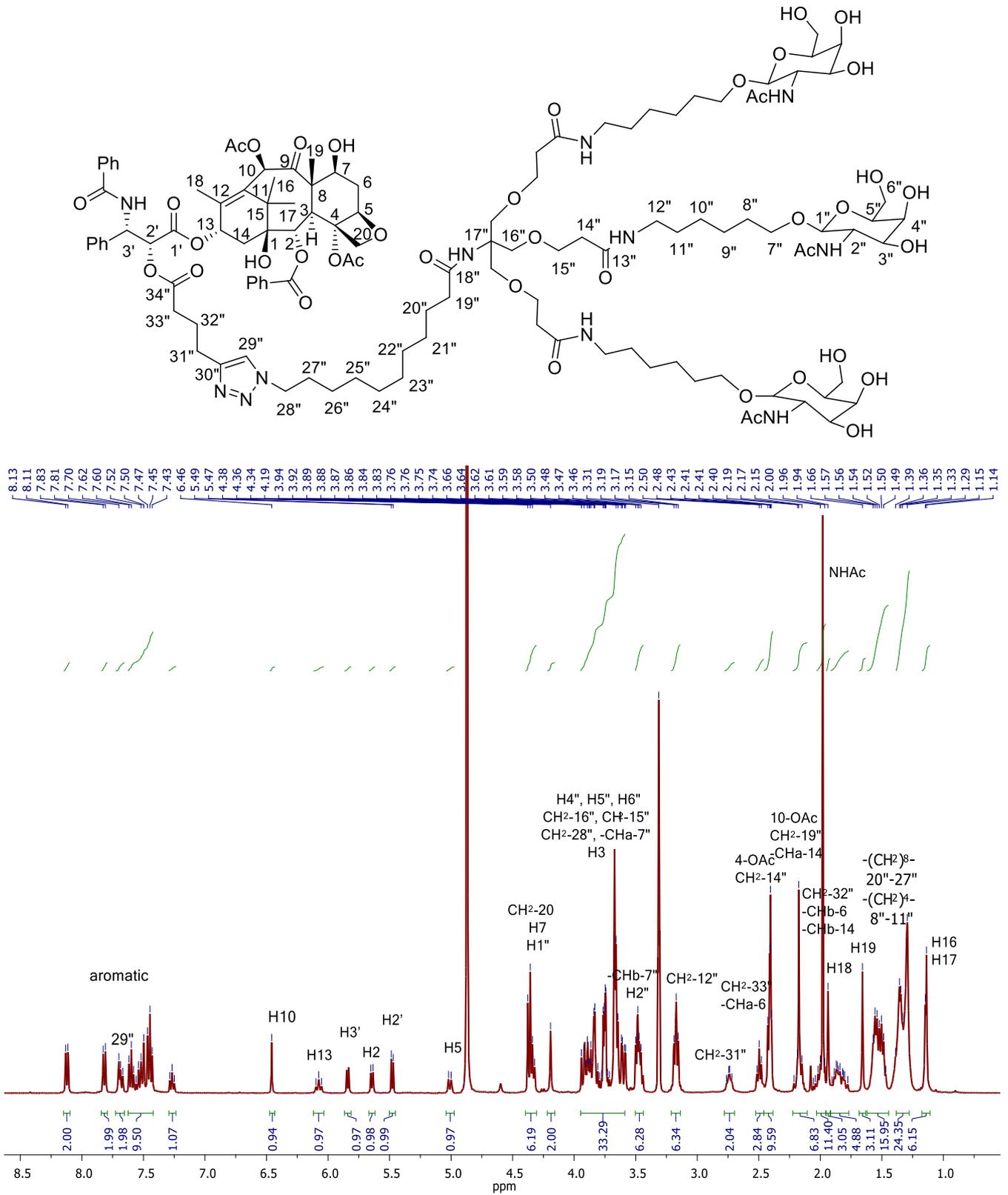
121. Cardona C.M., Gawley R.E. An Improved Synthesis of a Trifurcated Newkome-Type Monomer and Orthogonally Protected Two-Generation Dendrons // *J. Org. Chem.* – **2002**. – V. 67. – P. 1411-1413.

122. Chen Y., Zhang Q., Flach C., Mendelsohn R., Galoppini E., Reyes P.I., Yang K., Li R., Li G., Lu Y. Functionalization of MgZnO nanorod films and characterization by FTIR microscopic imaging // *Anal. Bioanal. Chem.* – **2017.** – V. 409. – №27. – P. 6379-6386.
123. Krapcho A.P., Kuell C.S. Mono-Protected Diamines. N-tert Butoxycarbonyl- α,ω -Alkanediamines from α,ω -Alkanediamines.// *Synth. Commun.* – **1990.** – V. 20. – №16. – P. 2559-2564.
124. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. М: МГУ. **2009.** с. 420
125. Wolfrom M. L., Bienvenido O. J. Chondroitin Sulfate Modifications. I. Carboxyl-reduced Chondroitin and Chondrosine.// *J. Am. Chem. Soc.* – **1960.** – V. 82. – №7. – P. 1673-1677.
126. Dowlut M., Hall D. G., Hindsgaul O. Investigation of nonspecific effects of different dyes in the screening of labeled carbohydrates against immobilized proteins // *J. Org. Chem.* – **2005.** – V. 70. – №24. – P. 9809-9813.
127. β -D-Glucosamine pentaacetate // Sigma Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g4533?lang=en®ion=RU> (дата обращения 01.05.2018).
128. Sakamuri C.W., Laxman E., et al. Патент WO 2015188197, **2015.**
129. Kretzschmar G., Stahl W. Large Scale Synthesis of Linker-Modified Sialyl LewisX, LewisX and N-Acetylactosamine // *Tetrahedron.* – **1998.** – V. 54. – P. 6341-6358.
130. Prakash T.P, Seth P.P. et al. Патент WO2015168618, **2015.**
131. Беккер Г. и др. Органикум: Практикум по органической химии. М: Мир. 1979. 445 с.
132. Dalla V., Catteau J. P. Chemocontrolled reduction of α -keto esters by hydrides: a possible solution for selective reduction of the ester function // *Tetrahedron.* – **1999.** – V. 55. – №21. – P. 6497-6510.
133. Beauchard A., Laborie H., Rouillard H., Lozach O., Ferandin Y., Le Guével R., Guguen-Guillouzo C., Meijer L., Besson T., Thiéry V. Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids // *Bioorg. Med. Chem.* – **2009.** – V. 17. – №17. – P. 6257-6263
134. Matheus M. E., Violante F. de A., Garden S. J., Pinto A. C., Fernandes P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line // *Europ. J. Pharmacol.* – **2007.** – V. 556. P. 200–206.
135. Lebreux F., Quiclet-Sire B., Zard S. Z. Radical Arylaminomethylation of Unactivated Alkenes // *Org. Lett.* – **2009.** – V. 11. – №13. – P. 2844–2847.

-
136. Flagothier J., Kaisin G., Mercier F., Thonon D., Teller N., Wouters J., Luxen A. Synthesis of two new alkyne-bearing linkers used for the preparation of siRNA for labeling by click chemistry with fluorine-18 // *Appl. Radiat. Isot.* – **2012**. – V. 70. – №8. – P. 1549-1557.
137. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. A convenient 'click chemistry' approach to perylene diimide–oligonucleotide conjugates // *Tetrahedron.* – **2008**. – V. 64. – №7. – P. 1467-1473.
138. Sulfo-Суanine5 алкин // Lumiprobe <https://ru.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-alkyne> (дата обращения 22.09.2018).
139. Chouhan G., James K. CuAAC macrocyclization: high intramolecular selectivity through the use of copper–tris (triazole) ligand complexes // *Org. Lett.* – **2011**. – V. 28. – №13. – P. 2754-2757.

7. Приложение

Приложение 1. Спектр ^1H ЯМР конъюгата **38** (CD_3OD).



Приложение 2. Спектр ^{13}C ЯМР конъюгата **38** (CD_3OD).