

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Успенская Анастасия Алексеевна

**Синтез и оптимизация структуры линкера лигандов
простатического специфического мембранного антигена и
получение конъюгатов на их основе**

1.4.3 – Органическая химия

1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2022

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

Научные руководители

Мачулкин Алексей Эдуардович

кандидат химических наук

Мажуга Александр Георгиевич

доктор химических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты

Кочетков Константин Александрович

доктор химических наук, доцент, институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 128 лаборатория гомолитических реакций элементоорганических соединений, отдела элементоорганических соединений, заведующий лабораторией

Бурилов Александр Романович

доктор химических наук, профессор, обособленное структурное подразделение ФГБУН "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр РАН", лаборатория элементоорганического синтеза им. А.Н. Пудовика, института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, заведующий лабораторией, главный научный сотрудник

Подругина Татьяна Александровна

кандидат химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета, доцент

Защита состоится «27» апреля 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.1 (МГУ.02.01) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГПС-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.
E-mail: maloshitskaya@org.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/437394077/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат химических наук

О.А. Малошицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Онкологические заболевания - одна из ведущих социальных проблем современного мира. Сегодня рак предстательной железы является второй ведущей причиной смертности от рака среди мужчин. Для лечения и диагностики рака простаты широко используется адресная доставка лекарств и/или диагностических агентов. Суть такого метода заключается в использовании избирательно связывающихся с простатическим специфическим мембранным антигеном лигандов на основе мочевины.

Простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) – обладает высокой экспрессией в клетках рака предстательной железы, что делает его перспективным маркером для селективной доставки лекарственных или диагностических препаратов. Одним из наиболее популярных классов вектор-молекул к данному белку стали низкомолекулярные лиганды на основе мочевины.

Конъюгат представляет собой макромолекулу, состоящую из нескольких частей, выполняющих различные функции. Чтобы связать эти части воедино можно использовать как просто алифатические цепочки, так и более сложные структуры – линкеры. Линкер оказывает значительное влияние на биологическую активность таких конъюгатов. Он выполняет большое количество функций, и его модификация является одним из ключевых методов создания наилучшего фармакологического профиля.

Поиск структур, положительно влияющих на аффинность лигандов, поможет существенно улучшить биологическую активность получаемых конъюгатов. Исследования, проводимые в данной работе, позволят установить точное влияние каждого линкерного фрагмента на свойства лигандов, что в будущем несомненно упростит задачу выбора векторной структуры под тот или иной терапевтический/диагностический агент и позволит быстро «собирать» высокоэффективные конъюгаты. Получение новых конъюгатов также является важной задачей для диагностики и лечения пациентов с помощью химиотерапии.

Степень разработанности темы. Селективная адресная доставка терапевтических и диагностических молекул является одним из передовых методов борьбы с раком предстательной железы. На основе низкомолекулярных ингибиторов мочевины создано большое количество конъюгатов, некоторые из которых уже прошли клинические испытания и одобрены к применению FDA. Например, ^{68}Ga PSMA-11 в 2020 году и ^{18}F -DCFPyL в 2021 году. Большое внимание уделяется модификациям вектор-молекул и линкерам, что позволяет получить более эффективные конъюгаты. Однако, в настоящий момент практически отсутствуют систематические исследования, в котором бы рассматривалась зависимость аффинности лигандов от строения дипептидного фрагмента в

линкере, который доказано влияет на эффективность всей молекулы. В особенности это касается структур, представленных вектор-молекулой мочевины DCL, связанной с биологически активной молекулой через линкер из алифатической цепочки на основе гексановой кислоты и дипептидной цепочки на основе фенилаланина и тирозина.

Целью работы является оптимизация структуры линкера лигандов ПСМА и получение на их основе диагностических и терапевтических конъюгатов ПСМА.

Задачами работы были: (1) синтез и оптимизация дипептидных линкеров на основе фенилаланина и тирозина с/без заместителей различной конфигурации методами жидкофазного синтеза; (2) получение на их основе вектор-молекул ПСМА на основе мочевины DCL; (3) оптимизация получения вектор-молекул с заданной структурой линкера на основе фенилаланина и тирозина методами твердофазного синтеза; (4) исследование аффинности полученных лигандов к ПСМА путем анализа ингибирования реакции расщепления N-ацетил-аспартил-глутамата; (5) получение диагностических конъюгатов на основе наиболее эффективных лигандов с флуоресцентными метками (Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5); (6) получение терапевтического конъюгата на основе наиболее эффективного лиганда с лекарственным препаратом монометил ауристатин Е; (7) исследование селективности конъюгатов по отношению к опухолевым тканям (для диагностических) *in vitro* и *in vivo* и цитотоксичность *in vitro* (для терапевтического).

Предметом исследования являются методы получения дипептидных линкеров для дальнейшего синтеза низкомолекулярных молекул на основе мочевины DCL. Исследование зависимости аффинности лигандов, селективно связывающихся с простатическим специфическим мембранным антигеном, от строения дипептидного фрагмента.

Научная новизна работы состоит в: 1) получении ранее не описанных серий лигандов ПСМА с дипептидными линкерами различной структуры; 2) оптимизация методики получения таких лигандов методами жидкофазного и твердофазного синтеза 3) определение аффинности полученных лигандов к ПСМА-положительной клеточной линии LNCaP; 4) получение ранее не описанных диагностических конъюгатов с флуоресцентными метками (Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5); 5) получение ранее не описанного терапевтического конъюгата на основе монометил ауристатина Е; 6) исследование селективности конъюгатов по отношению к опухолевым клеткам рака предстательной железы и их биораспределения (для диагностических) и цитотоксичности (для терапевтического).

Теоретическая и практическая значимость. 1) Оптимизированы методики получения дипептидных последовательностей для введения в структуру лигандов ПСМА; 2) представлены методики получения вектор-молекулы на основе мочевины с дипептидным

линкером на основе фенилаланина и тирозина методами твердофазного синтеза; 3) разработана методика получения флуоресцентных конъюгатов на основе лигандов ПСМА с дипептидными линкерами; 4) проведены биологические испытания *in vitro* и *in vivo* для флуоресцентных диагностических конъюгатов, а также испытания *in vitro* для терапевтического конъюгата.

Методология диссертационного исследования. Методологическая часть исследования состояла в разработке и оптимизации методов синтеза дипептидных цепочек заданной конфигурации с последующим синтезом лигандов ПСМА на их основе. Целевые соединения были получены с использованием реакций жидкофазного и твердофазного пептидного синтеза. Конъюгирование с биологически активными молекулами проводили с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Очистка полученных соединений проводилась методами колоночной хроматографии, flash-хроматографии, перекристаллизации, экстракции. Структура, состав и чистота полученных соединений определялись методами ТСХ, спектроскопии ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, ВЭЖХ-МС.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Могут быть получены новые линкеры на основе производных фенилаланина и тирозина заданной конфигурации, на основе которых будут синтезированы новые лиганды ПСМА;
- 2) Возможна оптимизация существующего жидкофазного синтеза лигандов ПСМА на основе мочевины DCL с использованием полученной серии линкеров;
- 3) Лиганды ПСМА с заданной структуры и конфигурации могут быть получены методом твердофазного синтеза;
- 4) Новые диагностические конъюгаты с флуоресцентными метками Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5 и новый терапевтический конъюгат с лекарственным препаратом монометил ауристатин Е могут быть синтезированы на основе полученных лигандов;
- 5) Результаты биологических испытаний *in vitro* и *in vivo* с целью позволяют установить влияние линкера на биологическую активность относительно простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) как в структуре лигандов, так и в структуре конъюгатов.

Личный вклад автора состоял в постановке и проведении и оптимизации синтетических экспериментов, перед которыми проводился поиск соответствующей литературы. Автор проводила очистку промежуточных и целевых соединений, а также интерпретацию результатов их физико-химических анализов. Помимо этого, автор принимала участие в интерпретации полученных биологических испытаний, подготовке

материалов к публикации, представляла ключевые результаты исследований на конференциях. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад соискателя был основополагающим.

Публикации. По материалам работы опубликованы 7 печатных работы: 3 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных диссертационным советом МГУ для публикации результатов научно-квалификационных работ, и 4 тезиса доклада на российских и международных научных конференциях.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде докладов на следующих конференциях: Кост-2021. Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений (Сочи, Россия, 12-16 октября **2021**); Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения» (WSOC-2020) (Красновидово, Россия, **2020**); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 10-27 ноября **2020**); The Fifth International Scientific Conference Advances in synthesis and complexing (Москва, Россия, 22-26 апреля **2019**).

Структура и объем работы. Работа состоит из пяти разделов: введения, обзора литературы на тему «Синтез и оптимизация структуры линкера лигандов простатического специфического мембранного антигена и получение конъюгатов на их основе», обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 207 страницах текста и включает 58 рисунков, 25 схем, 7 таблиц и список цитируемой литературы из 180 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Адресная доставка противоопухолевых конъюгатов является одним из передовых методов лечения и диагностики рака предстательной железы. Простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) является известным белковым маркером данного заболевания. Наиболее распространенными ингибиторами данного белка-мишени являются лиганды на основе модифицированных мочевины. В рамках данной работы было произведено варьирование дипептидной структуры линкерного фрагмента между вектор-молекулой мочевины и биологически активной молекулой с целью установить влияние данной части структуры на биологическую активность конъюгатов ПСМА.

1. Получение исходной вектор-молекулы на основе мочевины DCL¹

Для того чтобы установить влияние структуры линкера на аффинность всего лиганда, структура вектор-молекулы была зафиксирована и не варьировалась. Синтез исходной вектор-молекулы представлен на **схеме 1**.

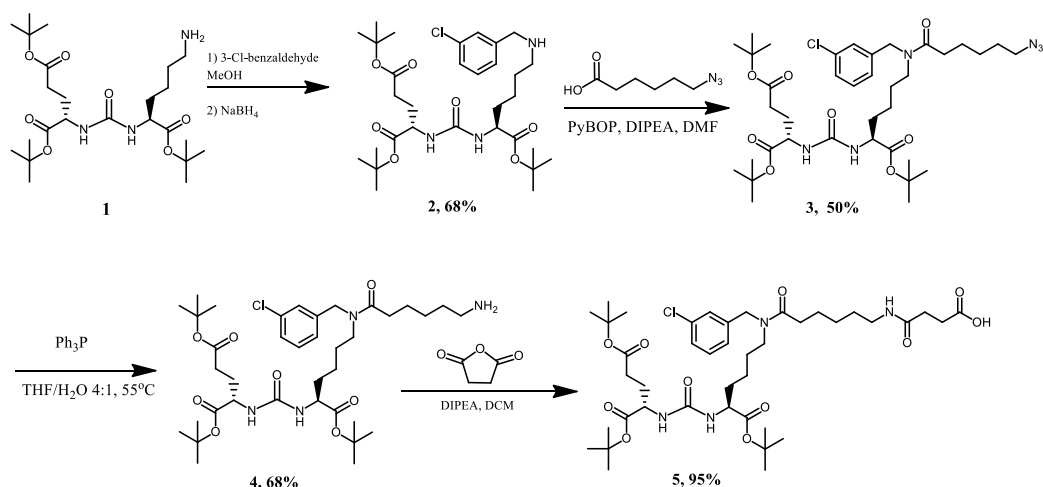


Схема 1. Синтез основного вектора, селективно связывающего с ПСМА

1.2. Синтез дипептидных цепочек методами жидкофазного синтеза

Синтез дипептидных фрагментов начинали с исходной открытой аминокислоты. В проводимых синтезах была выбрана *Boc*-защита, так как снятие этой группы происходит на последней стадии синтеза в кислой среде (**Схема 2**).

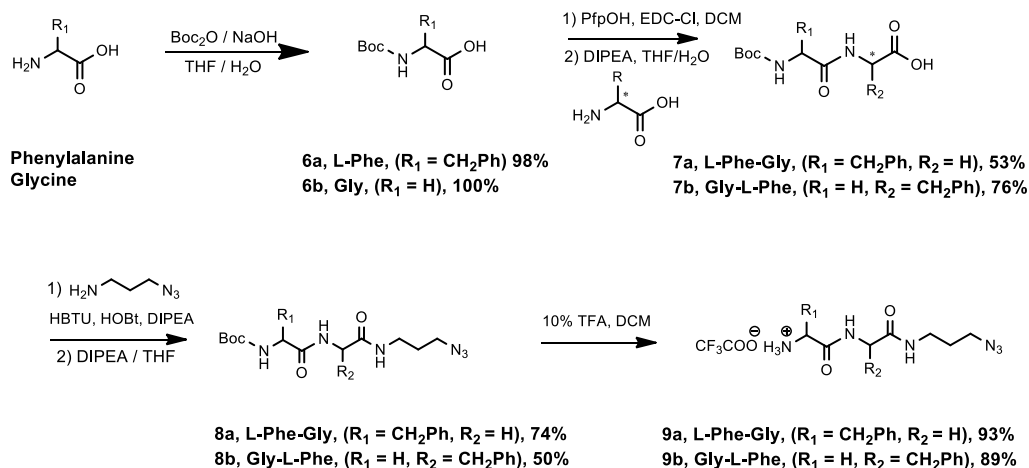


Схема 2. Синтез дипептидной цепочки Phe/Gly

На втором этапе нами был осуществлен синтез дипептида L-Phe-Gly (или Gly-L-Phe). Далее проводилось получение активированного эфира пентафторфенола. Данный

¹ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: дипломная работа «Изучение влияния конфигурации дипептидного линкера на соотношение структура-активность лигандов простатического специфического мембранного антигена и синтез диагностических конъюгатов на их основе» Научные руководители: Успенская Анастасия Алексеевна, Белоглазкина Елена Кимовна Автор: Нименко Екатерина Алексеевна (Специалист)

интермедиат отличается высокой реакционной способностью по отношению к аминогруппе и хорошей устойчивостью. Последующим его взаимодействием со свободной аминокислотой в присутствии третичного основания DIPEA был синтезирован дипептид.

Особенностью и преимуществом выбранного синтеза является отсутствие необходимости в колоночной хроматографии. Продукт **7** был выделен с помощью последовательного многократного пересаживания. В итоге было получено соединение, достаточно чистое для использования на следующей стадии синтеза.

На третьем этапе повторно был осуществлен процесс активации карбоксильной группы соединения **7** с помощью активирующих агентов HOBt и HBTU с последующим взаимодействием с азидопропиламином в течение 24 часов при комнатной температуре в диметилформамиде. Снятие Boc-защиты проводили действием 10% раствора трифторуксусной кислоты дихлорметане. Аналогичным образом был произведен синтез дипептидных цепочек с фенилаланином в N-концевом положении. (**Схема 3**).

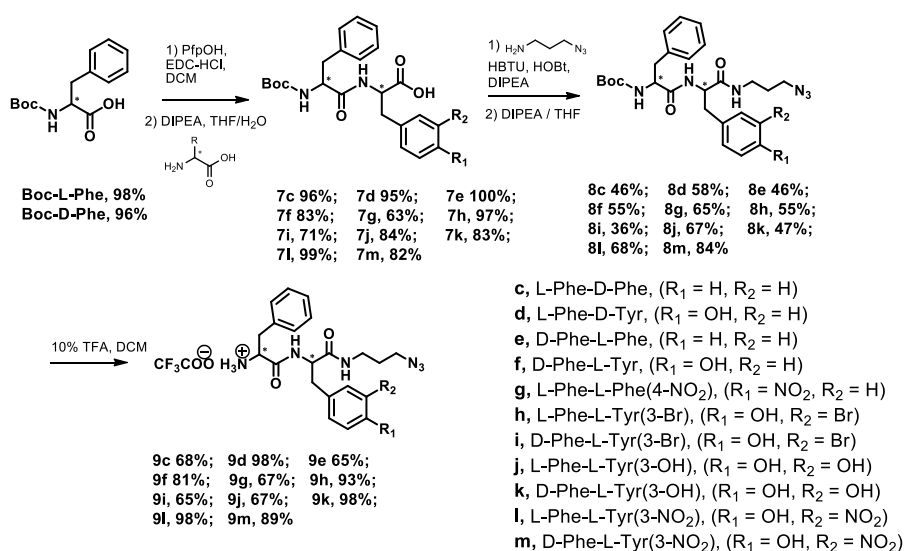


Схема 3. Синтез замещенных дипептидных цепочек Phe/Tyr

1.3. Синтез лигандов ПСМА на основе вектор-молекулы DCL

1.3.1. Пептидный синтез на жидкой фазе

В основе синтетического пути синтеза лигандов из полученных дипептидов лежит реакция создания пептидной связи, повсеместно используемая в органическом синтезе. Модифицированную вектор-молекулу и полученные дипептиды **9a – 9b** вводились в реакцию с активирующими реагентами HBTU/HOBt и основанием DIPEA (**Схема 4**).

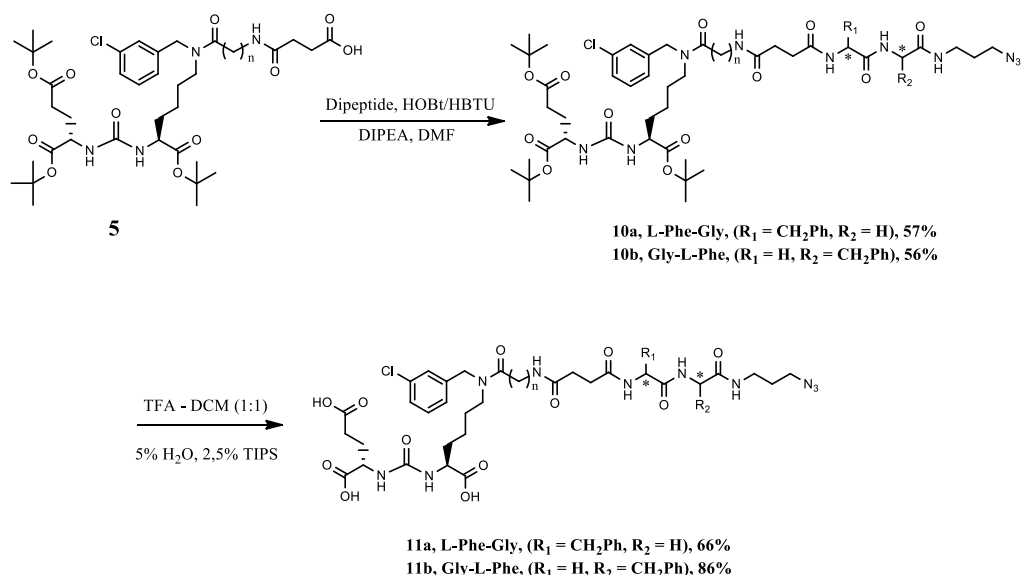


Схема 4. Получение лигандов на основе полученных дипептидов Phe/Gly

После того как полученные дипептидные цепочки **9c** - **9m** были охарактеризованы основными физико-химическими методами анализа ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ЯМР-спектроскопия, ВЭЖХ-МС), на их основе аналогично методу, описанному выше, была получена новая серия из 11 лигандов, представленных на **схеме 5**.

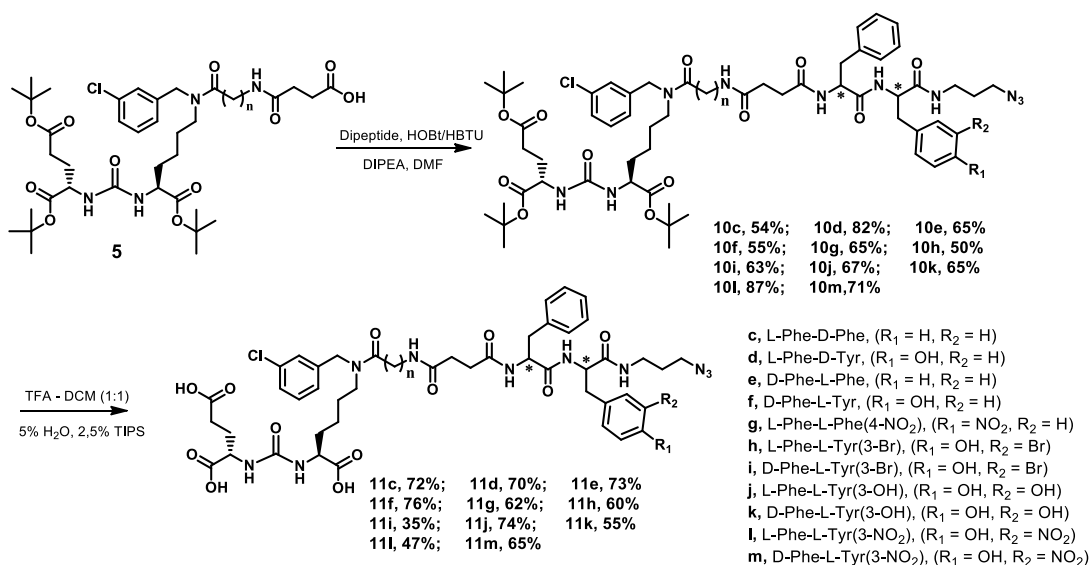


Схема 5. Получение лигандов на основе полученных дипептидов Phe/Tyr

Для связывания с ПСМА у полученных лигандов необходимо наличие свободных карбоксильных групп. В реакции удаления *трет*-бутильных защит очень важным оказался подбор оптимального времени, за которое происходило бы удаление всех защитных групп в молекуле. Удаление *трет*-бутильных защит проводили в смеси 46.25% ТФА, 46.25% DCM, 5% воды и 2.5% TIPS. Концентрация трифторуксусной кислоты в 46% была обусловлена наличием аминокислотных последовательностей с несколькими хиральными центрами.

Оптимизация заключалась в установлении оптимальной продолжительности реакции, при которой количество примесей в реакционной смеси было бы минимальным. Реакционную смесь отбирали на дальнейшую обработку через 2, 3, 4, 5, 6 и 24 часа, и исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с целью установления количества побочных продуктов реакции. Наилучшие результаты были достигнуты при проведении реакции в течении 3 часов, количество целевого вещества в реакционной смеси составляет 79% в положительных ионах (**Рисунок 1**). При дальнейшей выдержке количество примесей увеличивается, что говорит о деградации целевого продукта. Установлено, что один из побочных продуктов имеет молекулярную массу 1031 (молекулярная масса продукта 1049), что может соответствовать либо побочной реакции со стороны глутаминовой кислоты с образованием ангидрида **11d - I**, либо побочной реакции со стороны мочевины с образованием двух типов гидантоинов **11d - II** и **11d - III** (**Рисунок 2**).

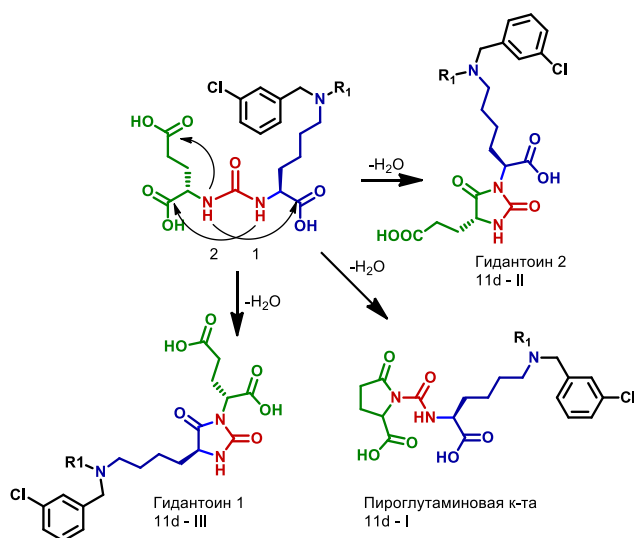


Рисунок 2. Структура целевого и побочных продуктов реакции удаления трет-бутильных защит

По истечении суток в реакционной смеси осталось только 50% целевого продукта, при регистрации масс-спектра в положительных ионах. Таким образом установлено, что оптимальное время проведения реакции составляет 3 часа. Выделение целевого продукта проводилось путем очистки методом обращенно-фазовой хроматографии.

На **рисунке 3** представлен фрагмент ^1H -ЯМР-спектров соединений **11l** и **11m**. Структуры полученных соединений идентичны, за исключением конфигурации фрагмента фенилаланина. Хорошо видно

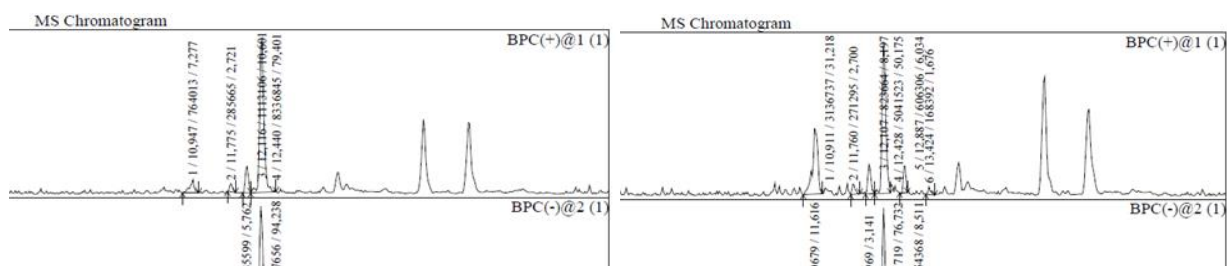


Рисунок 1. ВЭЖХ-МС оптимизации реакции удаления трет-бутильных защитных групп а) ВЭЖХ реакционной смеси через 3 часа после начала реакции б) ВЭЖХ реакционной смеси через 24 часа после начала реакции

различие химических сдвигов для амидов F5, Y6, X3 и X8, которое доказывает отсутствие рацемизации в полученных соединениях.

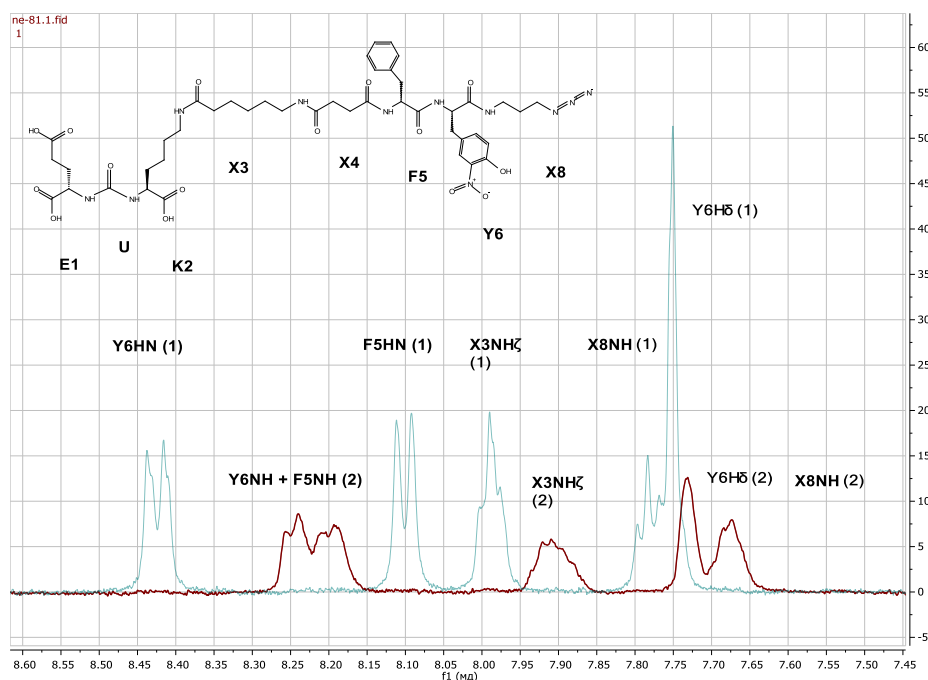


Рисунок 3. А – обозначения структурных фрагментов для лигандов **11l** (L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)) и **11m** (D-Phe-L-Tyr(3-NO₂)). Б – фрагменты ¹H ЯМР спектров для соединений **11l** (красный (2)) и **11m** (синий (1)).

1.3.2. Пептидный синтез на твердой фазе

При попытках введения аминокислоты тирозина с N-конца дипептидной последовательности методами жидкофазного синтеза, был обнаружен ряд сложностей. Во-первых, плохая растворимость тирозина в апротонных растворителях, которая привела к значительному снижению выхода на стадии постановки *Вос*-защитной группы. Во-вторых, на последующей стадии получения дипептидов возникли сложности из-за возрастающего количества побочных реакций, обусловленных гидроксильной группой в пара-положении тирозина. В результате выход реакции в данном методе опустился ниже 20%, что не дает возможности использовать метод в дальнейшем. Вариант с предварительной защитой гидроксильной группы тирозина предполагает увеличение количества стадий и усложнение очистки получаемых соединений.

В результате было принято решение перейти на твердофазные методы синтеза. В данной работе в качестве твердофазного носителя была выбрана 2-хлортритильная смола в хлоридной форме (2-СТС). Слабокислые условия позволяют сохранить *трет*-бутильные защитные группы, присутствующие в структуре как вектор-молекулы, так и в структуре линкера. Была получена серия на основе дипептидов как смешанной, так и одинаковой конфигурации аминокислотных фрагментов.

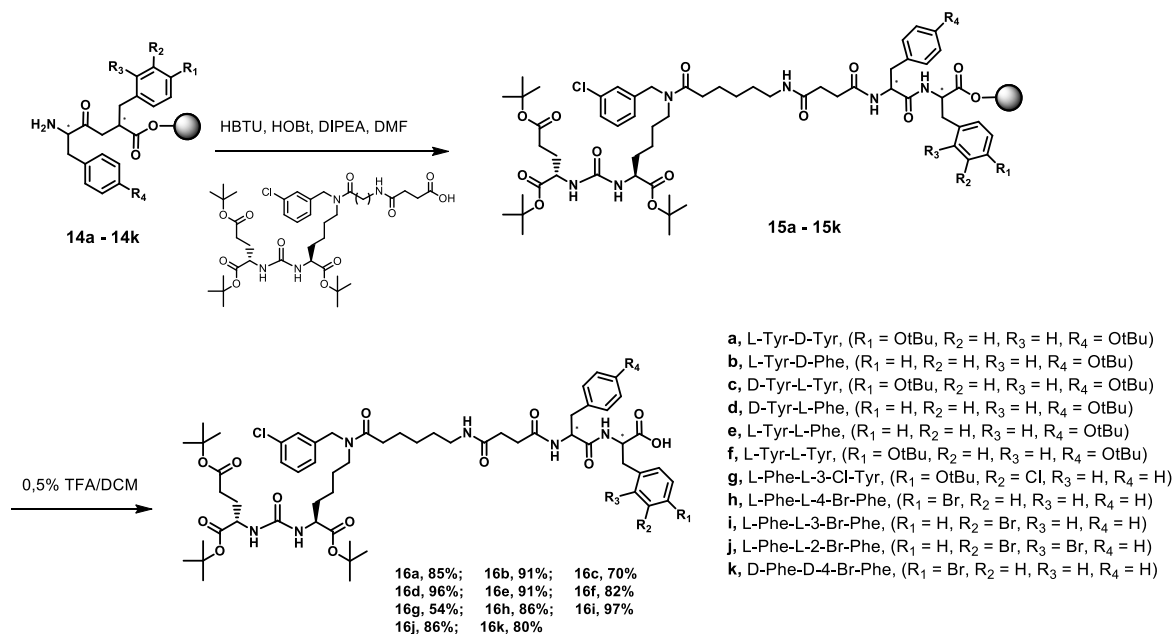
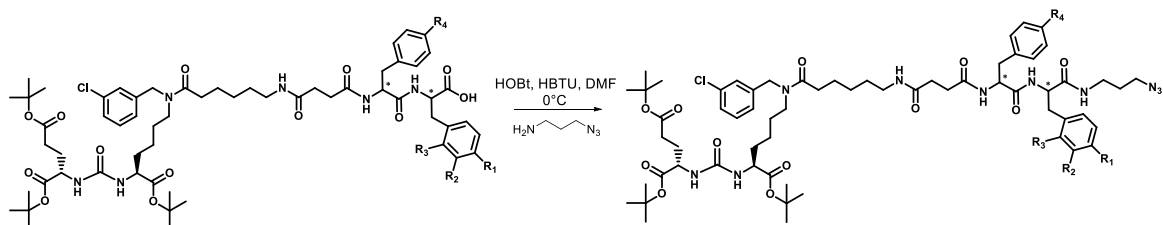


Схема 6. Получение дипептидных цепочек Tyr/Phe методами твердофазного синтеза

На первом этапе проводят активацию смолы, после которой производят присоединение первого аминокислотного остатка (фенилаланина или тирозина) к активированной смоле. Удаление *Fmoc*-защитной группы проводят в 20% растворе 4-метилпиперидина. Нарастивание цепи проводят путем создания пептидной связи между аминогруппой остатка на смоле и карбоксильной группой следующей *Fmoc*-аминокислоты (Схема 6).

К готовой дипептидной цепочке после снятия *Fmoc*-защиты присоединяют модифицированную вектор-молекулу мочевины, путем создания пептидной связи, аналогично как на предыдущем этапе с использованием активированных эфиров HOBT и HBTU. После снятия со смолы для очистки соединений проводилась колоночная обращенно-фазовая хроматография.

Так как для азид-алкинового циклоприсоединения необходимо наличие свободной азидной группы в структуре лиганда, то следующим этапом синтеза является реакция с 3-аминопропилазидом. С целью избежать рацемизации и максимально снизить количество побочных продуктов важно учитывать порядок смешения реагентов. К раствору лиганда в диметилформамиде последовательно добавляют аминопиперазид, HOBT, HBTU и DIPEA. Реакция проводится без преактивации и при пониженной температуре (0 °C). Удаление *tert*-бутильных защитных групп проводилось в оптимизированных выше условиях (Схема 7).



16a, L-Tyr-D-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16b, L-Tyr-D-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16c, D-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16d, D-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16e, L-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16f, L-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
16g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
16h, L-Phe-L-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
16i, L-Phe-L-3-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
16j, L-Phe-L-2-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{Br}$, $R_4 = \text{H}$)
16k, D-Phe-D-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)

17a, L-Tyr-D-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **95%**
17b, L-Tyr-D-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **78%**
17c, D-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **83%**
17d, D-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **64%**
17e, L-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **78%**
17f, L-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$), **77%**
17g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$), **54%**
17h, L-Phe-L-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$), **72%**
17i, L-Phe-L-3-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$), **98%**
17j, L-Phe-L-2-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{Br}$, $R_4 = \text{H}$), **91%**
17k, D-Phe-D-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$), **43%**

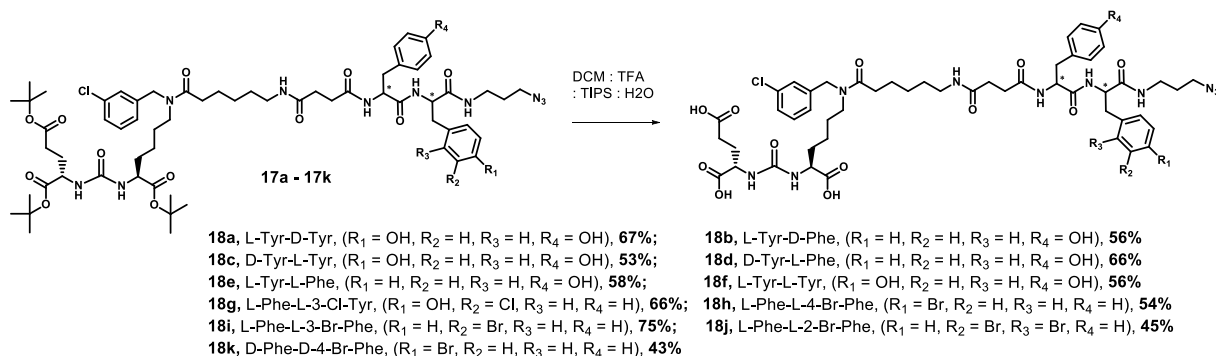


Схема 7. Получение конечных соединений серии Туг/Пхе

1.4. Исследование аффинности лигандов ПСМА *in vitro*²

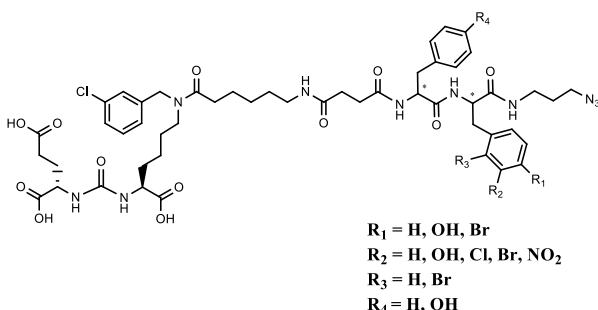


Схема 8. Общая структура лигандов.

ПСМА (Простатический специфический мембранный антиген, глутамат карбоксипептидаза II) катализирует гидролиз пептидного нейротрансмиттера N-ацетил-L-аспатил-L-глутамата (NAAG) до глутамата (также нейротрансмиттер) и N-ацетил-L-аспартата (NAA).

Аффинность синтезированных векторов с линкером коррелирует с эффективностью ингибирования ПСМА. В исследованиях был использован протокол оценки количества, отщепляемого глутамата в грубом клеточном экстракте, основанный на каскадном ферментативном усилении сигнала от глутамата. Была исследована серия новых лигандов (Таблица 1) путем ингибирования реакции расщепления NAAG (Схема 8).

² Данная часть работы выполнена совместно с лабораторией химии нуклеопротеидов кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (к.х.н., с.н.с. Скворцов Д.А.)

Таблица 1. Результаты биологических испытаний *in vitro* на клеточной линии LNCaP

№	Структура линкера	IC ₅₀ ± SD, нМ	K _i ± SD, нМ
<i>Лиганды сравнения</i>			
-	DCL	546 ± 388	56,4 ± 40,1
-	ZJ-43	11,0 ± 2,6	1,14 ± 0,27
-	2-PMPA	80,4 ± 23,6	8,29 ± 2,44
<i>Серия лигандов Gly/Phe</i>			
11a	L-Phe-Gly	114 ± 48	11,75 ± 3,95
11b	Gly-L-Phe	38 ± 10	3,89 ± 1,03
<i>Серия лигандов Phe-Tyr(Phe)</i>			
I	L-Phe-L-Tyr	9,3 ± 3,0	0,96 ± 0,32
II	D-Phe-D-Phe	226,0 ± 97,0	23,33 ± 9,97
III	L-Phe-L-Phe	55,0 ± 33,0	5,64 ± 3,43
11c	L-Phe-D-Phe	36,0 ± 10,0	3,73 ± 1,05
11d	L-Phe-D-Tyr	152,0 ± 53,0	15,66 ± 5,51
11e	D-Phe-L-Phe	70,0 ± 32,0	7,22 ± 3,25
11f	D-Phe-L-Tyr	193,0 ± 96,0	19,91 ± 9,85
IV	D-Phe-D-Tyr	26,7 ± 14,2	2,75 ± 1,47
<i>Серия лигандов Tyr-Tyr(Phe)</i>			
18a	L-Tyr-D-Tyr	99,0 ± 53,0	10,26 ± 5,44
18b	L-Tyr-D-Phe	54,0 ± 16,0	6,00 ± 2,00
18c	D-Tyr-L-Tyr	41,0 ± 14,0	4,20 ± 1,40
18d	D-Tyr-L-Phe	102,0 ± 36,0	10,55 ± 3,67
18e	L-Tyr-L-Phe	2,6 ± 0,8	0,27 ± 0,08
18f	L-Tyr-L-Tyr	2,10 ± 1,24	0,22 ± 0,13
<i>Серия лигандов с замещенными Phe/Tyr – нитро группа</i>			
11g	L-Phe-L-Phe(4-NO ₂)	132,0 ± 32,0	13,59 ± 3,31
11l	L-Phe-L-Tyr(3-NO ₂)	1,5 ± 0,9	0,16 ± 0,09
11m	D-Phe-L-Tyr(3-NO ₂)	1,6 ± 1,1	0,17 ± 0,11
<i>Серия лигандов с замещенными Phe/Tyr – бром группа</i>			
V	D-Phe-D-Tyr(3-Br)	80,0 ± 50,0	8,27 ± 5,18
11h	L-Phe-L-Tyr(3-Br)	196,0 ± 102,0	20,17 ± 10,49
11i	D-Phe-L-Tyr(3-Br)	4,9 ± 2,6	0,50 ± 0,27
18h	L-Phe-L-Phe(4-Br)	1,9 ± 0,8	0,19 ± 0,09
18i	L-Phe-L-Phe(3-Br)	3,1 ± 0,9	0,32 ± 0,10
18j	L-Phe-L-Phe(2-Br)	4,6 ± 1,3	0,47 ± 0,13
18k	D-Phe-D-Phe(4-Br)	12,2 ± 2,08	1,25 ± 0,21
<i>Серия лигандов с замещенными Phe/Tyr – хлор и гидроксильная группы</i>			
11j	L-Phe-L-Tyr(3-OH)	892 ± 368	91,98 ± 37,97
11k	D-Phe-L-Tyr(3-OH)	17,3 ± 3,3	1,78 ± 0,34
18g	L-Phe-L-Tyr(3-Cl)	3,6 ± 0,9	0,37 ± 0,09

В данной таблице также приведены данные лигандов, полученных ранее (в таблице выделены серым цветом и обозначены римскими цифрами I-V). В их структуре вектор-молекула также представлена мочевиной DCL с мета-хлорзамещенным ароматическим

фрагментом при атоме лизина. На **схеме 9** представлены лиганды сравнения: DCL, ZJ-43, 2-PMPA.

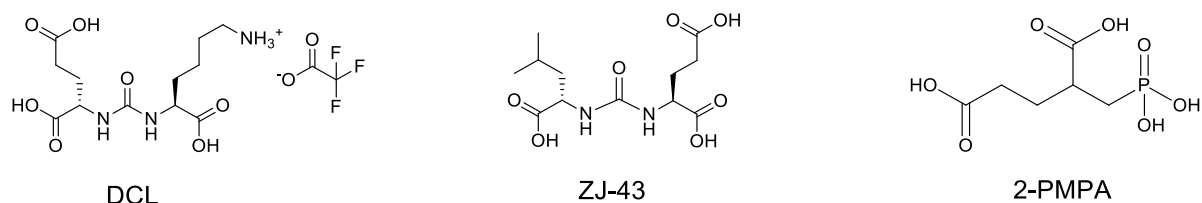


Схема 9. Структура лигандов сравнения

Серия лигандов Gly/Phe. Согласно полученным данным, можно сделать вывод о том, что наличие ароматического фрагмента в терминальном положении критично и сильно влияет на аффинность лиганда **L-Phe-Gly** (114 ± 48 нМ). Отсутствие ароматического фрагмента в положении, ближнем к вектор-молекуле в целом также негативно сказывается на аффинности, но не столь выражено **Gly-L-Phe** (38 ± 10 нМ). Таким образом, можно сделать вывод о том, что наибольшее влияние оказывает С-концевая аминокислота.

Серия лигандов Phe-Tyr(Phe). Наилучшие результаты показывают лиганды с несмешанной структурой, в частности наивысшую аффинность показывает дипептидная цепочка **L-Phe-L-Tyr** ($9,3 \pm 3,0$ нМ). Дипептидные цепочки смешанной структуры уступают, но позволяют сделать вывод о том, что фенилаланин в L-конфигурации оказывает благоприятное влияние на аффинность. Так наивысшие показатели принадлежат лигандам, содержащим как правило L-фенилаланин в первом положении (относительно вектор-молекулы): **L-Phe-L-Tyr** ($9,3 \pm 3,0$ нМ), **L-Phe-L-Phe** ($55,0 \pm 33,0$ нМ), **L-Phe-D-Phe** ($36,0 \pm 10,0$ нМ). В паре **L-Phe-L-Tyr**, **L-Phe-L-Phe** мы видим, что введение заместителя в ароматическое кольцо второй аминокислоты значительно повышает сродство (более чем в 5 раз) к ПСМА.

Серия лигандов Tyr-Tyr(Phe). Из данного блока лигандов испытания *in vitro* первым прошел лиганд с дипептидной цепочкой **D-Tyr-L-Phe**. Значение IC_{50} равное $102,0 \pm 36,0$ нМ показывает, что в данном случае введение тирозина в первое положение дипептидной цепочки значительно не снижает активность, но и не дает возможности говорить о наномолярных концентрациях. Однако, полученные в дальнейшем лиганды показали значения IC_{50} ниже 100 нм. Ведущим из них стал лиганд **L-Tyr-L-Tyr** ($2,10 \pm 1,24$ нМ), что хорошо вписывается в вышеописанную закономерность с лигандами **L-Phe-L-Tyr** ($9,3 \pm 3,0$ нМ), **L-Phe-L-Phe** ($55,0 \pm 33,0$ нМ). Мы видим, что с введением заместителей в ароматические кольца аминокислот возрастает аффинность (**Схема 3.19**).

Серия лигандов с замещенными Phe/Tyr. Замещенный ароматический фрагмент в данных структурах находится в С-конце. Введение второй ОН группы в структуру тирозина сказывается крайне негативно и практически делает молекулу неактивной. Однако

результат для соединений **D-Phe-D-Tyr(3-Br)** ($80,0 \pm 50,0$ нМ); **L-Phe-L-Tyr(3-Br)** ($196,0 \pm 102,0$ нМ) повторно подтверждает, что конфигурация оказывает сильное влияние на аффинность. Наилучшие результаты показали два конъюгата **L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)** ($1,5 \pm 0,9$ нМ) и **D-Phe-L-Tyr(3-NO₂)** ($1,6 \pm 1,1$ нМ), содержащие нитрогруппу в 3 положении тирозина второй аминокислоты в дипептидной последовательности. Заметим, что в случае **L-Phe-L-Phe(4-NO₂)** ($132,0 \pm 32,0$ нМ) такого хорошего результата не наблюдается, что позволяет сделать вывод о том, что в четвертом положении ароматического кольца наиболее благоприятно ставить гидроксильную группу, а нитрогруппа в этом случае уже является слишком объемной. Также стоит отметить, что введение брома и хлора в аминокислоту в С-конец позволило достичь наномолярных значений аффинности.

Таким образом, была получена новая тройка лигандов-лидеров с аффинностью меньше 3 нМ. Можно сделать вывод, что N-концевом положении предпочтительнее вводить фенилаланин или тирозин в L-конфигурации. Заместители при ароматических фрагментах также могут оказывать значительное влияние, однако оно неразрывно связано и с конфигурацией аминокислотного остатка. Для дальнейшего конъюгирования с терапевтическим препаратом монометил ауристатином Е был выбран лиганд **11l**. Для конъюгирования с флуоресцентными метками были взяты **11l**, **18f** и полученный ранее **I**.

1.5. Моделирование связывания лигандов ПСМА³

Для большинства лигандов, показавших высокую аффинность было проведено исследование связывания в активном центре ПСМА путем моделирования. В качестве примера типичного расположения лиганда на **рисунке 4** показано моделирование связывания лиганда-лидера **11l** ($1,5 \pm 0,9$ нМ). Гибкий линкер обеспечивает оптимальное размещение фрагментов структуры лиганда в соответствующих подкарманах, что формирует высокоаффинное взаимодействие лиганд-белок.

В то же время, сам линкер участвует в нескольких дополнительных межмолекулярных контактах, включая водородную связь с Arg511 (со стороны дипептидной цепочки) и «водный мостик» - водородная связь фрагмента линкера с Arg534 через молекулу воды (рядом с вектор-молекулой). Ароматические кольца дипептидной структуры линкера располагаются в небольших подкарманах на противоположном конце воронкообразного туннеля. Первое (N-конец) из них образует π -катионное взаимодействие с Lys514. Оба стереоизомера в этом положении сохраняют это взаимодействие, и ни один из них не дает значительного преимущества в оцененной энергии связывания.

³ Исследование выполнено *Insilicomedicine* (к.б.н. Иваненков Я.А.) и ФФМ МГУ (Евтеев С.А.)

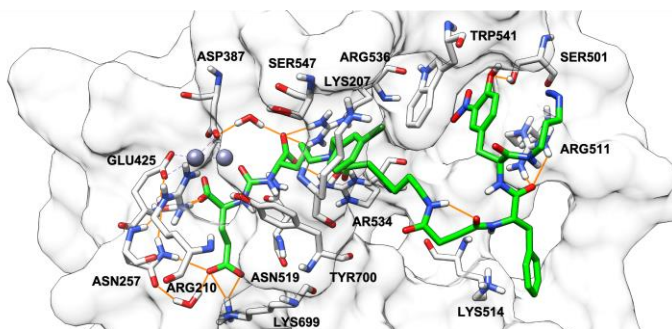


Рисунок 4. Моделирование связывания лиганда **111** L-Phe-L-Tyr(3-NO₂). Структура лиганда показана зеленым цветом. Остатки центра связывания, которые образуют водородные связи, стэкинг или π-катионные взаимодействия играют более важную роль. В случае D-изомера геометрия линкера препятствует оптимальному связыванию, что приводит к снижению энергии связывания. Так, **18e** (L-Tyr-L-Phe) демонстрирует более высокие показатели докинга (-14,0), чем **18b** (L-Tyr-D-Phe) (-13,2). Полученные результаты согласуются с исследованием аффинности серии лигандов Gly-Phe, согласно которым большее влияние на аффинность оказывает именно второе ароматическое кольцо (С-конец).

1.6. Синтез диагностических и терапевтических конъюгатов

1.6.1. Синтез диагностических конъюгатов с флуоресцентными красителями.

Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I) обладает большим рядом преимуществ такими как: высокая селективность затрагиваемых групп, простота в реализации, хорошие выходы реакций. На основании ранее разработанного конъюгата с дипептидной цепочкой L-Phe-L-Tyr и показывающего высокий показатель аффинности была получена серия флуоресцентных конъюгатов Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5 (Схема 10).

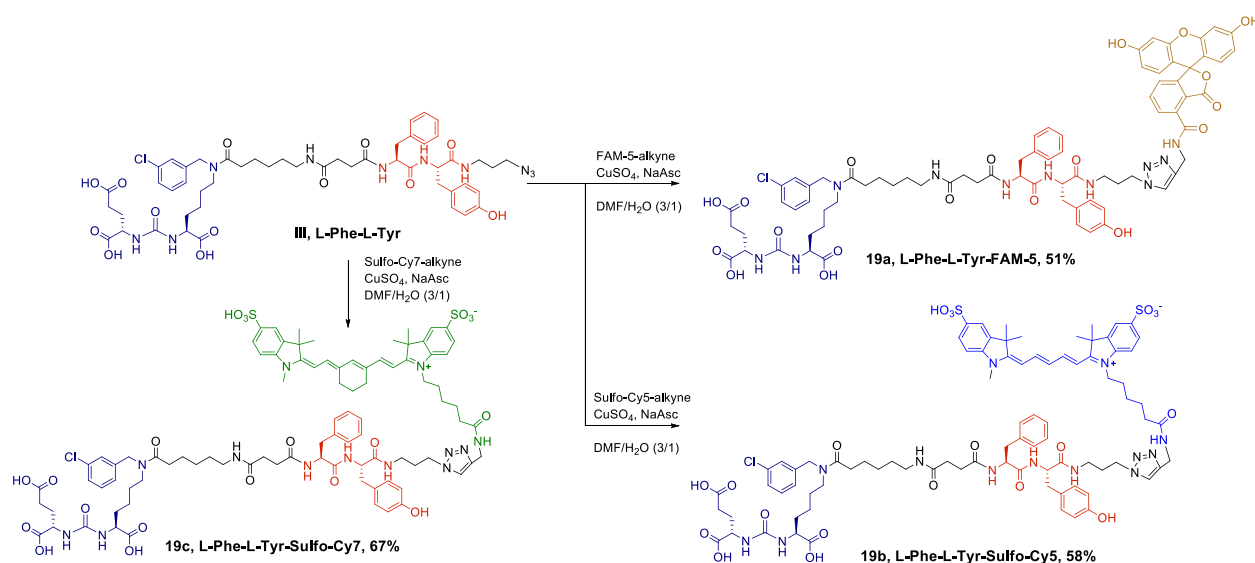


Схема 10. Схема синтеза конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5

Также была получена серия флуоресцентных конъюгатов с лигандами **11l** и **18f** и меткой Sulfo-Cy5. Были взяты ранее оптимизированные условия реакций. В качестве растворителей были взяты диметилформамид и вода в соотношении (3 : 1), для генерирования одновалентной меди был взят пентагидрат сульфата меди (II) и аскорбат натрия в качестве восстановителя (**Схема 11**).

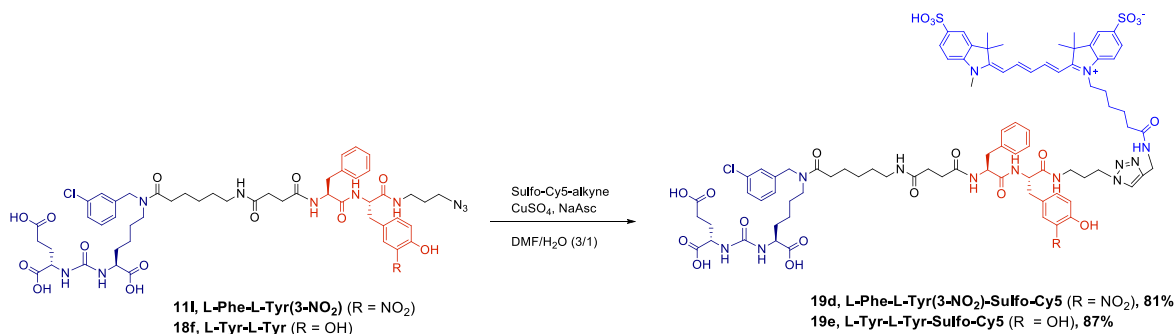


Схема 11. Структуры конъюгатов с Sulfo-Cy5

Структуры полученных соединений подтверждались основными методами физико-химического анализа: ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия высокого разрешения.

1.6.2. Синтез терапевтического конъюгата с монометил ауристатином Е

Для синтеза терапевтического конъюгата была выбрана реакция [1,3]-диполярного циклоприсоединения азидо-группы лиганда и терминальной алкина в структуре модифицированного ветодина. Модифицированный гекс-5-иновой кислотой MMAE был ранее получен в лаборатории и был взят в качестве готового реактива (**Схема 12**).

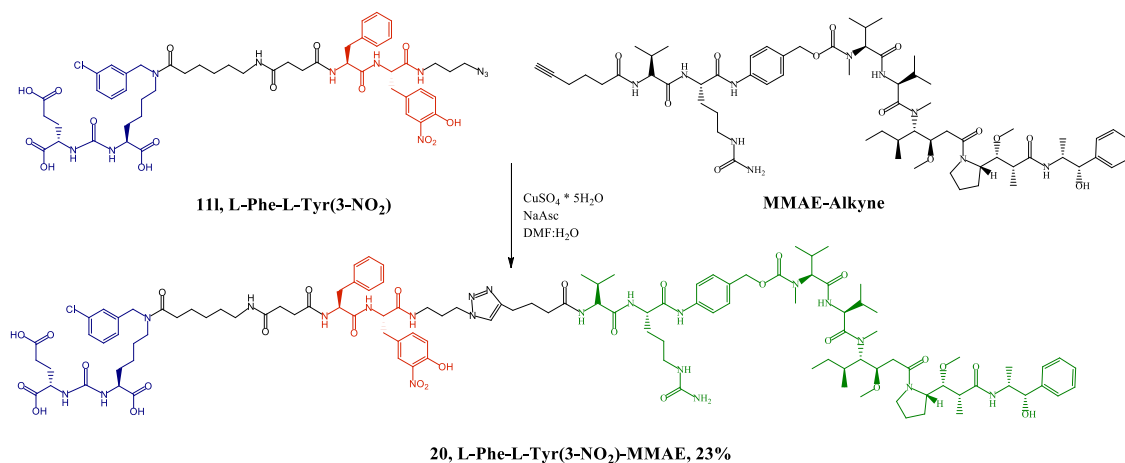


Схема 12. Схема синтеза терапевтического конъюгата с MMAE

1.7 Биологические испытания конъюгатов ПСМА

In vitro результаты исследования методом цитофлуометрии⁴

Доля конъюгата **19a** результаты были следующими: для клеточной линии LNCaP 83,8% клеток несли флуоресцентный сигнал, 22Rv1 были окрашены на 14,4%, наименьшее количество флуоресцентного сигнала несли клетки PC-3 – 7,6%. Для того, чтобы подтвердить, что низкое накопление конъюгата на клеточной линии 22Rv1 связано с низкой экспрессией ПСМА в самих клетках, был проведен эксперимент по методике «блокирования». Для этого клеточную линии предварительно инкубировали в течении часа с лигандом **I (L-Phe-L-Tyr)**, на основе которого были получены конъюгаты, но без флуоресцентной метки, с целью связать активные центры ПСМА. В результате накопление в клеточных линиях снизилось, особенно это заметно на ПСМА-положительной линии, с высокой экспрессией – LNCaP (**Рисунок 5**). Таким образом подтверждается, что окрашивание клеток происходит за счет связывания конъюгатов с ПСМА.

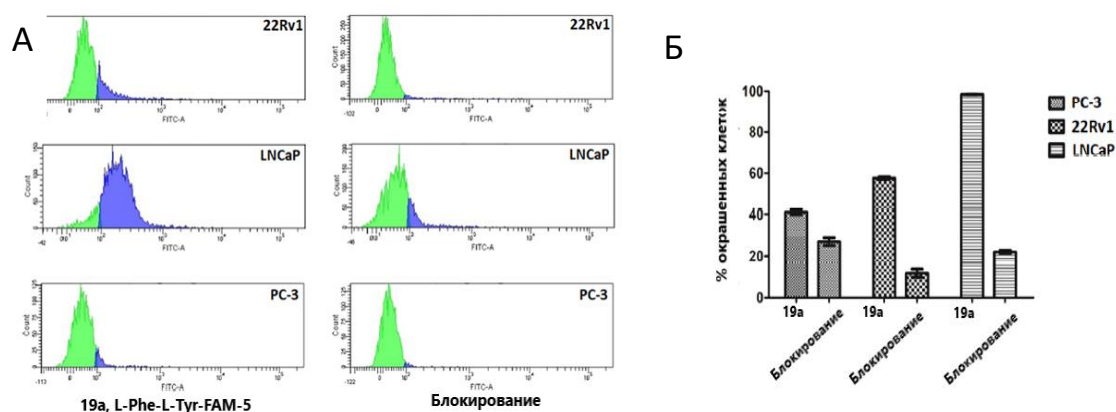


Рисунок 5. А- Гистограмма сигнала FAM-5 на клетках 22Rv1, LNCaP и PC-3 после обработки 4 мкМ конъюгатом **19a**. Синим цветом выделены окрашенные клетки, зеленым – неокрашенные. Б – Диаграмма окрашивания клеток конъюгатом PSMA-FAM-5. Блокирование - результат окрашивания **19a** после 1 ч предварительной инкубации с 100× молярным избытком лиганда **I (L-Phe-L-Tyr)**.

⁴ Биологические исследования выполнены в лаборатории «Биомедицинских наноматериалов» МИСиС, к.х.н., доц. Абакумовым М. А.

Аналогичная корреляция наблюдается в случае конъюгата **19b** (Рисунок 6). Наибольшее накопление флуоресцентного сигнала SulfoCy5 было характерно для клеточной линии LNCaP (98,4% окрашенных клеток).

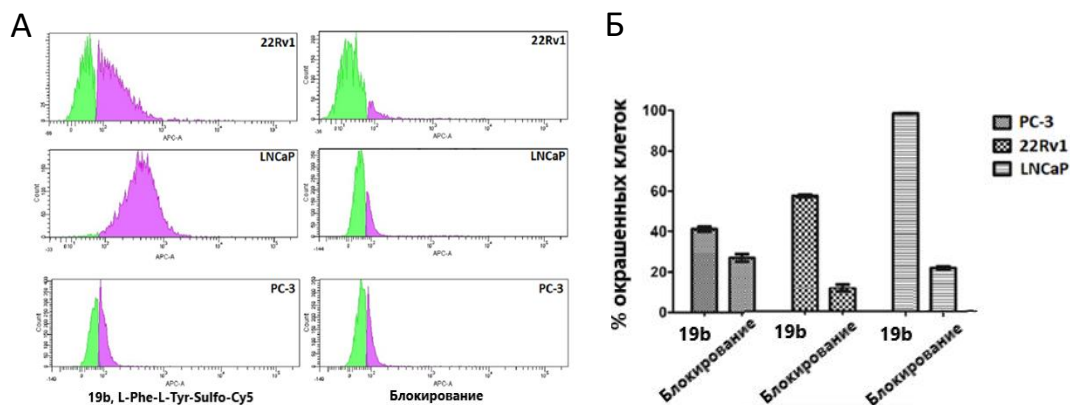


Рисунок 6. А- Гистограмма сигнала Sulfo-Cy5 на клетках 22Rv1, LNCaP и PC-3 после обработки 4 мкМ конъюгатом **19b**. Синим цветом выделены окрашенные клетки, зеленым – неокрашенные. В – Диаграмма окрашивания клеток конъюгатом **19b**. Блокирование - результат окрашивания PSMA-Sulfo-Cy5 после 1 ч предварительной инкубации с 100× молярным избытком лиганда (L-Phe-L-Tyr).

Для клеточных линий 22Rv1 и PC-3 процент окрашенных клеток составил 57,5% и 41,1% соответственно. Частичная блокада PSMA с помощью лиганда **I** привела к 4,1-кратному снижению накопления **19b** клетками LNCaP, обладающих наивысшей экспрессией ПСМА. Заметное снижение накопления также наблюдалось и для клеточной линии 22Rv1, для клеточной линии с наименьшей экспрессией ПСМА PC-3 значительного снижения флуоресцентного сигнала не наблюдалось.

Оба конъюгата **19a** и **19b** обладают значительным сродством к ПСМА-экспрессирующим клеткам. Для **19b** показатели аффинности были лучше, в сравнении с конъюгатом **19a**. Полученные конъюгаты могут быть хорошими визуализирующими агентами *in vitro*. Способность к визуализации конъюгата **19b** проверялась при низких концентрациях при температуре +4 °С, в условиях при которых не происходит рецептор-опосредованный эндоцитоз. В таких условиях произошло значительное снижение неспецифического окрашивания клеток PC-3. Инкубация клеток с выбранной оптимальной концентрацией 100 нМ PSMA-SulfoCy5 показала окрашивание 97,9% клеток LNCaP и только 2,8% клеток PC-3.

Результаты исследования флуоресцентных конъюгатов Sulfo-Cy5 методом проточной цитофлуориметрии

В ходе эксперимента клеточные линии были обработаны растворами конъюгатов **19b**, **19d**, **19e** различной концентрации (4 нМ, 40 нМ, 150 нМ), а после определена доля окрашенных клеток. Полученные данные представлены на рисунке 7.

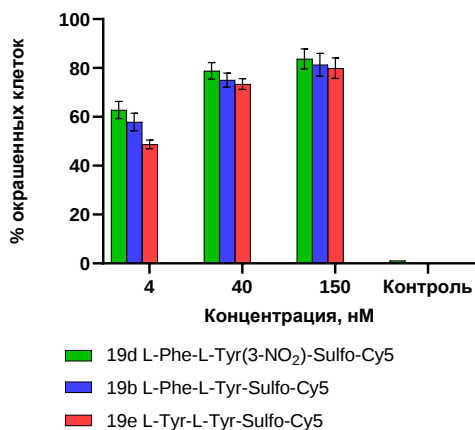


Рисунок 7. Результаты исследования визуализации клеточных линий LNCaP конъюгатами **19b**, **19d** – **19e**. Контроль – автофлуоресценция клеточных линий LNCaP

В результате для всех конъюгатов наблюдалось увеличение доли окрашенных клеток при увеличении концентрации исследуемого соединения. Также стоит отметить корреляцию аффинности исходных лигандов и доли окрашенных клеток: так наибольшую долю окрашенных клеток при всех концентрациях показал конъюгат **19d**. При самой низкой концентрации (4 нМ) доля окрашенных клеток конъюгатом **19d** оказалась равной 63% против 58% для конъюгата **19a** и 48% для конъюгата **19e**. В соответствии с

проведенными исследованиями было показано, что соединение **19d** является эффективным диагностическим конъюгатом.

***In vivo* испытания конъюгатов.**

Для визуализации накопления флуоресцентного сигнала полученных конъюгатов *in vivo* была выбрана модель ксенотрансплантата 22Rv1. Чтобы ответить на вопрос о специфичности поглощения исследуемым животным также была привита ПСМА-непоглощающая опухоль PC-3. Результаты количественного анализа поглощения опухолью сигнала для конъюгата PSMA-SulfoCy5 представлены **рисунке 8**.

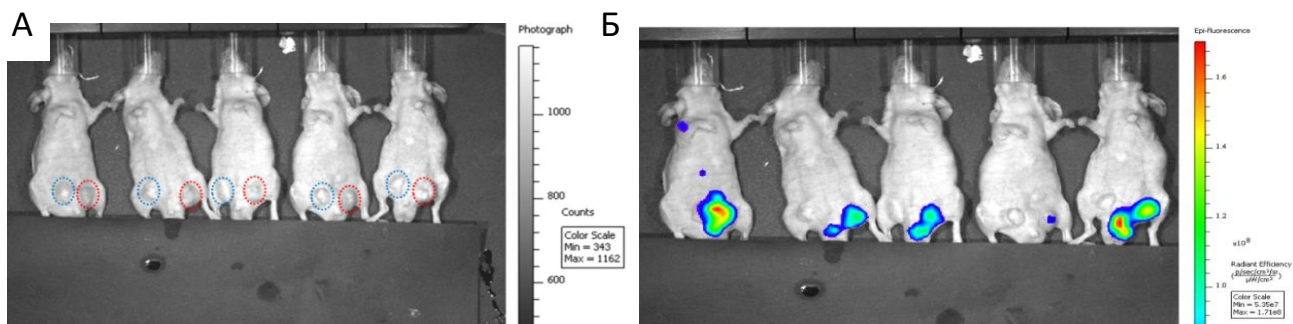


Рисунок 8. Поглощение ксенотрансплантатом 22Rv1 конъюгата PSMA-SulfoCy5 при однократной дозе 1Т (250 нмоль/кг): (А) визуализация *in vivo* через 24 ч после инъекции; (В) фотография мышей; красным пунктиром выделены 22Rv1 (PSMA+), синим - PC-3 (PSMA-).

Поглощение наблюдалось только в тканях, экспрессирующие ПСМА, в частности в ксенотрансплантатах 22Rv1. В этой области увеличение интенсивности сигнала происходило более чем в 2 раза.

Для конъюгата PSMA-SulfoCy7 в целом были получены аналогичные результаты (Рисунок 9). Уровень сигнала *in vivo* между опухолями PC-3 и 22Rv1 различался в два раза и был более отличимым на фоне других тканей. Это можно объяснить более низким уровнем флуоресценции тканей в ближней ИК-области спектра, где наблюдается флуоресценция красителя Sulfo-Cy7.

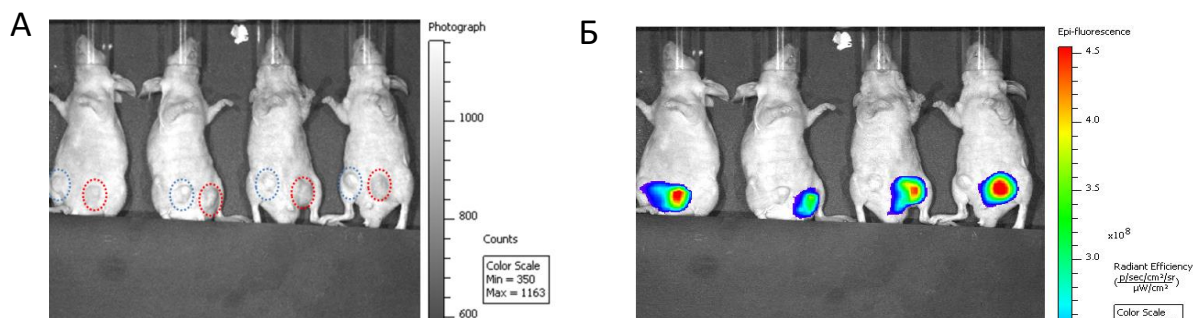


Рисунок 9. Поглощение ксенотрансплантатом 22Rv1 конъюгата **19с** при однократной дозе 1Т (250 нмоль/кг): (А) визуализация *in vivo* через 24 ч после инъекции; (С) фотография мышей; красным пунктиром выделены 22Rv1 (PSMA+), синим - PC-3 (PSMA-).

Следует отметить, что при исследовании *in vitro* была доказана зависимость интенсивности сигнала от экспрессии ПСМА той или иной клеточной линией. Так как клеточная линия 22Rv1 обладает значительно более низкой экспрессией ПСМА в сравнении с LNCaP, ожидается что в случае высоко экспрессирующих опухолей можно будет добиться лучшей визуализации.

***In vitro* испытания конъюгата с монометил ауристатином E⁵**

Биологические испытания полученных конъюгатов *in vitro* проводились на клеточных линиях: 22Rv1 (ПСМА +), LNCaP (ПСМА ++) и PC-3 (ПСМА -) методом МТС-теста. Результаты полученных исследований приведены ниже на **рисунке 3.10**. В качестве конъюгата сравнения был взят ранее полученный конъюгат с монометил ауристатином E **L-Phe-L-Tyr-MMAE**. Исходя из полученных данных мы видим, что конъюгат **20** обладает цитотоксичностью относительно ПСМА-положительных клеточных линий, уменьшая высокотоксическое действие немодифицированного монометил ауристатина E.

Также можно наблюдать повышенную цитотоксичность конъюгата на ПСМА-положительных клеточных линиях 22Rv1 и LNCaP, в сравнении с ПСМА-отрицательной клеточной линией PC-3. Если сравнивать с конъюгатом сравнения на основе L-Phe-L-Tyr, на клеточной линии PC-3 (ПСМА-) можно видеть сопоставимые значения цитотоксичности. Для конъюгата **L-Phe-L-Tyr-MMAE** значение CC_{50} составляет $625 \pm 66,8$ нМ, а для конъюгата **20** $657 \pm 105,7$ нМ.

⁵ Биологические исследования выполнены в лаборатории «Биомедицинских наноматериалов» МИСиС, к.б.н., н.с. Гараниной А.С.

Также сопоставимые результаты можно наблюдать на клеточной линии 22Rv1, которая является слабоэкспрессирующей ПСМА ($67,27 \pm 10,45$ нМ для **L-Phe-L-Tyr-MMAE** и $103,1 \pm 11,6$ для **20**). Однако, на сильноэкспрессирующей линии LNCaP, можно видеть, что цитотоксичность нового конъюгата **20** превосходит конъюгат сравнения в 2 раза ($30,67 \pm 3,31$ нМ для **L-Phe-L-Tyr-MMAE** и $17,74 \pm 1,58$ для **20**, что является хорошим показателем и говорит о хорошей селективности препарата.

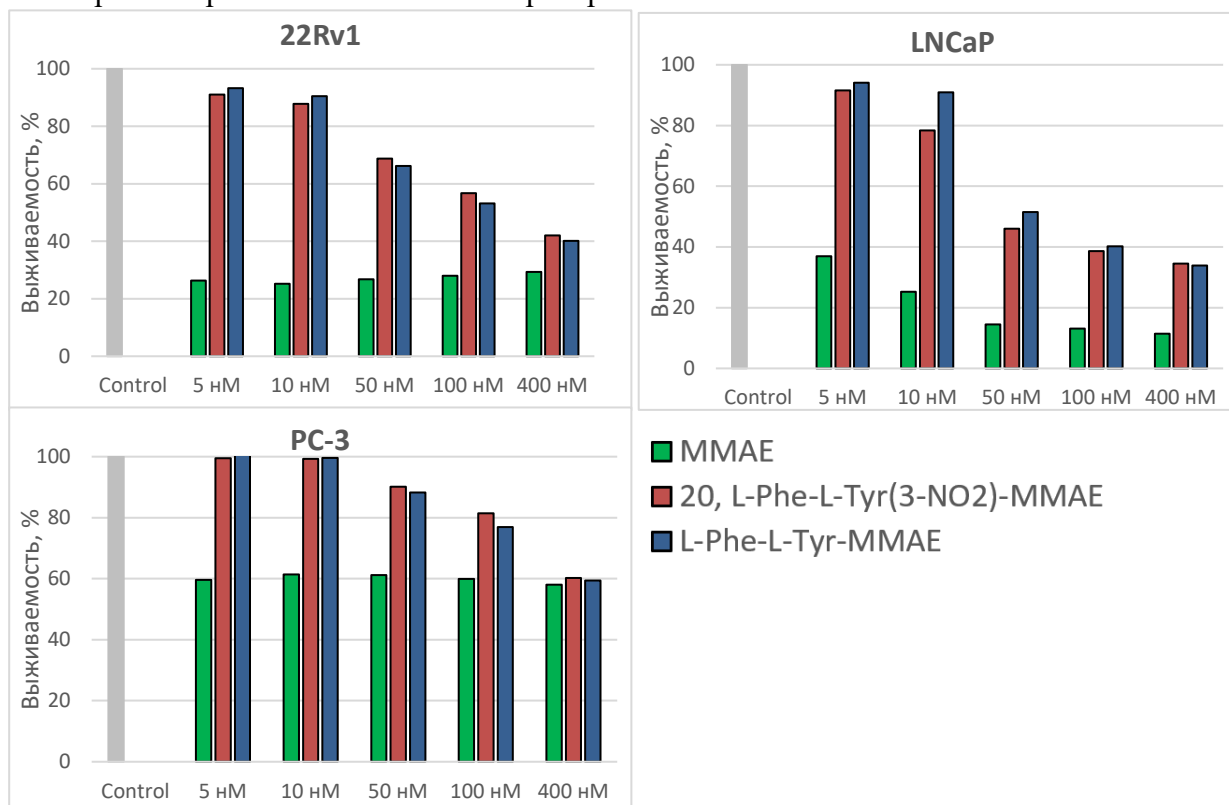


Рисунок 3.10. Результаты биологических исследований *in vitro* конъюгатов **20** L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-MMAE и L-Phe-L-Tyr-MMAE с на клеточных линиях 22Rv1, LNCaP и PC-3

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы методики получения дипептидных линкеров на основе производных фенилаланина и тирозина с/без заместителей с заданной конфигурацией методами жидкофазного синтеза, модифицированных для дальнейшего введения в структуру лигандов ПСМА
2. Предложены методы синтеза для 13 ранее не описанных лигандов на основе вектор-молекулы мочевины DCL методами жидкофазного синтеза.
3. Предложен синтетический подход к получению лигандов ПСМА с заданной структурой и конфигурацией линкера методами твердофазного синтеза. Получена серия из 11 ранее не описанных лигандов на основе вектор-молекулы мочевины DCL.
4. Предложены методы синтеза к ранее не описанным конъюгатам с флуоресцентными метками Sulfo-Cy5-алкин, Sulfo-Cy7-алкин, FAM-5-алкин и лекарственным препаратом

монометил ауристатин Е -алкин путем реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Синтезирована серия из 6 ранее не описанных конъюгатов.

5. Все новые лиганды ПСМА прошли биологические испытания *in vitro*. В результате установлены наиболее предпочтительные с точки зрения аффинности структуры дипептидного фрагмента. На основе эффективных лигандов получена серия конъюгатов, также продемонстрировавшая высокую специфичность на *in vitro* и *in vivo* моделях.

Основные результаты работы изложены в публикациях:

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

1. **Uspenskaya A. A.**, Nimenko E. A., Machulkin A. E., Beloglazkina E. K., and Majouga A. G. The importance of linkers in the structure of psma ligands. *Current Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 30. – P. 268-298. Impact Factor 2020 = **4.53**, Q1.
2. **Uspenskaya A. A.**, Machulkin A. E., Nimenko E. A., Shafikov R. R., Petrov S. A., Skvortsov D. A., Beloglazkina E. K., and Majouga A. G. Influence of dipeptide linker configuration on the activity of psma ligands. *Mendeleev Communications*. – 2020. – V. 30. – P. 756–759. Impact Factor 2020 = **1.78**, Q2.
3. Machulkin A. E., Shafikov R. R., **Uspenskaya A. A.**, Petrov S. A., Ber A. P., Skvortsov D. A., Nimenko E. A., Zyk N. U., Smirnova G. B., Pokrovsky V. S., Abakumov M. A., Saltykova I. V., Akhmirov R. T., Garanina A. S., Polshakov V. I., Saveliev O. Y., Ivanenkov Y. A., Aladinskaya A. V., Finko A. V., Yamansarov E. U., Krasnovskaya O. O., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Dontsova O. A., Beloglazkina E. K., Zyk N. V., Khazanova E. S., and Majouga A. G. Synthesis and biological evaluation of psma ligands with aromatic residues and fluorescent conjugates based on them. *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 64. – № 8. – P. 4532–4552. (основополагающий вклад в синтетическую часть) Impact Factor 2020 = **7.45**, Q1.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

4. **Успенская А.А.**, Мачулкин А.Э., Шафиков Р.Р., Петров Станислав Александрович, Скворцов Д.А., Нищенко Е.А., Зык Н.Ю., Абакумов М.А., Польшаков В.И., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Белоглазкина Е.К., Хазанова Е.С., Мажуга А.Г. Синтез конъюгатов на основе лигандов ПСМА с цианиновыми флуоресцентными красителями // *Кост-2021. Всероссийский конгресс по химии гетероциклических соединений*, г. Сочи, Россия, 12-16 октября 2021, с. 147
5. **Успенская А.А.**, Мачулкин А.Э., Петров С.А., Бер А.П., Нищенко Е.А., Зык Н.Ю., Скворцов Д.А., Шафиков Р.Р., Салтыкова И.В., Ерофеев А.С., Горелкин П.В. Синтез и биологические испытания конъюгатов ПСМА с диагностическими и терапевтическими агентами // *Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения» (WSOC-2020)*, Краснови́дово, Россия, 17-20 января 2020, с. 91
6. **Uspenskaya A.A.**, Machulkin A.E., Saltykova I.V., Skvortsov D.A., Shafikov R.R., Majouga A.G. Synthesis of antimitotic drug conjugates based on PSMA // *The Fifth International Scientific Conference ADVANCES IN SYNTHESIS AND COMPLEXING*, Москва, Россия, 22-26 апреля 2019, стр. 270
7. **Uspenskaya, A. A.**, Machulkin, A. E., Mazhuga, A. G., and Beloglazkina, E. K. Conjugates of prostate-specific membrane antigen ligands with antitumor drugs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – V. 53. - № 4. – P. 288-297.