

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители

к.х.н. Мачулкин А.Э.

д.х.н., профессор РАН Мажуга А.Г.

Москва – 2022

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы. Важность линкера в структуре ПСМА лигандов.....	8
2.1. Простатический специфический мембранный антиген как белок-мишень при лечении и диагностики рака предстательной железы.....	8
2.2. Лиганды простатического специфического мембранного антигена	10
2.3. Линкеры в структуре ПСМА лигандов	12
2.3.1. Классификация конъюгатов в зависимости от типа линкера	12
2.3.2. Расщепляемые линкеры.....	14
2.3.3. Влияние длины линкера	20
2.3.4. Введение ароматических фрагментов	27
2.3.5. Введение замещенных ароматических фрагментов	41
2.4. Конъюгаты ПСМА для диагностики рака предстательной железы	44
2.4.1. Конъюгаты с радионуклидными метками	45
2.4.2. Конъюгаты с флуоресцентными красителями	48
2.5. Конъюгаты ПСМА лечения рака предстательной железы.....	53
2.5.1. Конъюгаты с цитотоксическими агентами.....	54
2.5.2. Конъюгаты с антимитотическими агентами	55
3. Обсуждение результатов	59
3.1. Получение исходной вектор-молекулы на основе мочевины DCL.....	60
3.2. Синтез дипептидных цепочек методами жидкофазного синтеза	61
3.2.1. Синтез дипептидных цепочек на основе глицина, фенилалнина и тирозина	61
3.2.2. Синтез дипептидных цепочек на основе фенилалнина и тирозина с заместителями в ароматическом кольце.....	64
3.3. Синтез лигандов ПСМА на основе вектор-молекулы DCL	65
3.3.1. Пептидный синтез на жидкой фазе	65
3.3.2. Пептидный синтез на твердой фазе.....	72
3.4. Исследование аффинности лигандов ПСМА <i>in vitro</i>	77
3.5. Моделирование связывания лигандов ПСМА.....	83
3.6. Синтез диагностических и терапевтических конъюгатов	85
3.6.1. Синтез диагностических конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5.....	85
3.6.2. Синтез терапевтического конъюгата с монометил ауристатином E.....	87
3.7. Физико-химические свойства флуоресцентных конъюгатов.....	88
3.8. Биологические испытания конъюгатов ПСМА	90

3.8.1. <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5	90
3.8.2. <i>In vitro</i> испытания конъюгата с монометил ауристатином E.....	98
4. Экспериментальная часть.....	102
4.1. Общие сведения.....	102
4.2. Синтез.....	104
4.2.1. Синтез модифицированного вектор-молекулы мочевины DCL.....	104
4.2.2. Общая методика синтеза Вос-защищенных аминокислот.....	108
4.2.3. Общая методика синтеза дипептидных цепочек	110
4.2.4. Модификация дипептидных цепочек аминопиперазидом.....	117
4.2.5. Получение солей трифторацетата дипептидных цепочек.....	125
4.2.6. Получение лигандов на основе мочевины DCL.....	132
4.2.7. Получение лигандов твердофазным методом синтеза	141
4.2.8. Модификация лигандов аминопиперазидом.....	152
4.2.9. Получение лигандов, аффинных к ПСМА	160
4.2.9. Синтез флуоресцентных конъюгатов.....	182
4.2.10. Синтез конъюгата с монометил ауристатном E	189
4.3. Биологические исследования <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	190
4.3.1. <i>In vitro</i> исследование аффинности лигандов	190
4.3.2. Моделирование связывания лигандов ПСМА	191
4.3.3. <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> конъюгатов с флуоресцентными красителями.....	192
4.3.4. <i>In vitro</i> испытания конъюгата с монометил ауристатином E.....	194
5. Выводы.....	196
6. Список литературы	197

1. Введение

Актуальность работы. 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 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 доказанно

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).

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**); XI International Conference on Chemistry for Young Scientists “Mendeleev 2019” (Санкт-Петербург, Россия, 9-13 сентября **2019**); The Fifth International Scientific Conference Advances in synthesis and complexing (Москва, Россия, 22-26 апреля **2019**).

Объем и структура научно-квалификационной работы аспиранта. Научно-квалификационная работа аспиранта состоит из пяти разделов: введения, обзора литературы на тему «Низкомолекулярные двойные диагностические и терапевтические конъюгаты для направленной доставки к простатическому специфическому мембранному антигену (ПСМА)», обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 207 страницах текста и включает 58 рисунков, 25 схем, 7 таблиц и список цитируемой литературы из 180 наименований.

2. Обзор литературы. Важность линкера в структуре ПСМА лигандов¹

2.1. Простатический специфический мембранный антиген как белок-мишень при лечении и диагностики рака предстательной железы

Онкологические заболевания являются одной из ведущих социальных проблем современного мира. На сегодняшний день рак предстательной железы занял второе место по смертности от рака среди мужчин¹. Лечение рака предстательной железы наиболее часто включает в себя оперативное вмешательство, лучевую терапию, гормональную терапию, химиотерапию. Каждый из этих методов обладает достаточным количеством серьезных недостатков^{2,3}. Важной задачей является снизить количество побочных эффектов и повысить эффективность диагностики и лечения. Решить поставленную задачу может относительно новый способ модификации лекарственных препаратов, а именно адресная доставка диагностических и терапевтических агентов в клетки рака предстательной железы. Подобное решение позволяет улучшить качество жизни пациентов, увеличить дозы вводимых препаратов, тем самым повышая воздействие на опухолевые ткани.

Перспективным белковым маркером для диагностики и лечения рака предстательной железы является простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) (**Рисунок 2.1**). Данный белок обозначают как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II) или N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase)), если речь идет о здоровых клетках. В опухолевых клетках предстательной железы, а также солидных сосудистых опухолях, его экспрессия значительно повышается по сравнению со здоровыми⁴ тканями, что делает его перспективным в качестве мишени для адресной доставки. Сосудистая система опухолевой ткани или метастазов характеризуется рядом особенностей, отличающих ее от здоровой системы кровообращения. Кровеносные сосуды, окружающие и питающие опухоль, имеют патологическую структуру, аномальный диаметр и слепые концы. Стенки таких сосудов извилисты, гиперпроницаемы и имеют аномальные выпуклости⁵. Кроме того, в таких сосудах в случае рака предстательной железы экспрессия ПСМА также значительно повышена как в первичной опухоли, так и в случае метастазов⁶. Экспрессия ПСМА также повышена в сосудистой системе опухолей и при других видах рака (таких как глиобластома, рак печени, рак яичников)⁷⁻⁹, она значительно выше при метастазах в лимфатические узлы и в отдаленных метастазах¹⁰. На сегодняшний день получены и разрабатываются многочисленные конъюгаты, направленные на ПСМА, некоторые из которых уже проходят клинические испытания. А ⁶⁸Ga-

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: A. A. Uspenskaya, E. A. Nimenko, A. E. Machulkin, E. K. Beloglazkina, and A. G. Majouga. The importance of linkers in the structure of psma ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 28, 2021.

PSMA-11, [^{177}Lu]-PSMA-617 и [^{18}F]-DCFPyL уже были одобрены FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами) и находят применение в клинической практике.

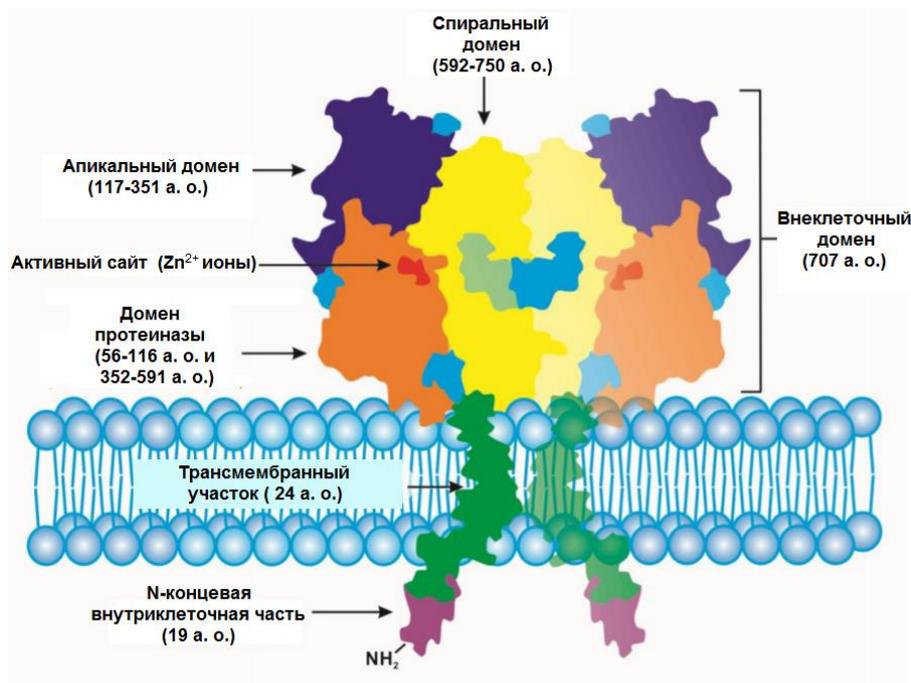


Рисунок 2.1. Схематическое представление трансмембранного белка PSMA / GCPII (гомодимер)¹¹.

Смертность больных раком предстательной железы все чаще связывают не с первичной опухолью, а с сопутствующим метастатическим заболеванием. Таким образом, метастазы напрямую влияют на прогноз и клинический исход заболевания. Поэтому их диагностика и подходы к лечению играют важную роль в течении заболевания. В настоящее время существуют подходы к диагностике (например, [^{68}Ga]-PSMA-11) и лечению (например, [^{177}Lu]-PSMA-617) метастазов рака простаты с использованием конъюгатов PSMA^{12,13}.

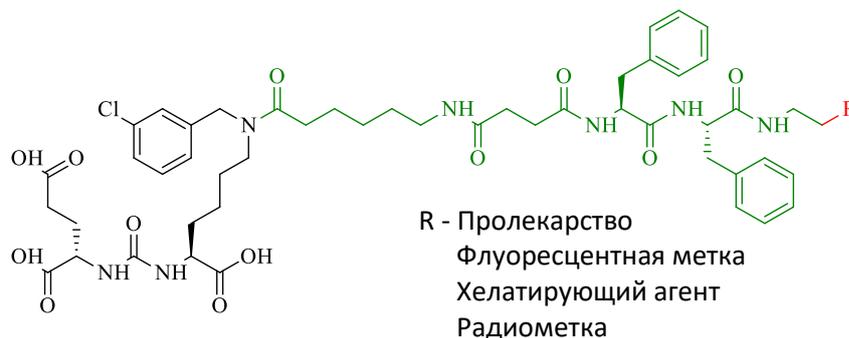


Рисунок 2.2. Общая структура PSMA-конъюгата на основе мочевины (черный) с линкером (зеленый). Биологически активная молекула (пролекарство, флуоресцентная метка, хелатирующий агент) выделена красным цветом.

Конъюгат представляет собой сложную молекулу, в которой объединено несколько структурных фрагментов, выполняющих определенные задачи: 1) молекула доставщик - вектор, направленный на определенную белковую мишень; 2) линкер – обеспечивает целостность всей молекулы; 3) доставляемая молекула - пролекарство, флуоресцентная метка, хелатирующий агент и др. (**Рисунок 2.2**). Большую роль играют не только функциональные части конъюгата, но и линкер. С постепенной наработкой таких конъюгатов ПСМА, ученые пришли к выводу, что линкер оказывает порой принципиальное влияние на всю биологическую активность разрабатываемых соединений^{14,15}.

В литературном обзоре будут обсуждаться конъюгаты, направленные против рака предстательной железы, с мочевиной в качестве векторной молекулы. Такой выбор обусловлен тем, что лиганды на основе мочевины исторически были разработаны позже и имеют ряд преимуществ в отличие от других ингибиторов ПСМА на основе фосфиновых кислот и тиолов, которые имели ряд серьезных недостатков. Например, ингибиторы на основе тиолов демонстрировали низкую селективность. Из-за этого их терапевтическая доза для человека была очень высокой (>750 мг), что вызывало опасения по поводу реакции со стороны иммунной системы¹⁶. Векторные молекулы на основе фосфиновых кислот ингибировали ПСМА в диапазоне средних нМ. Кроме того, липофильность этих соединений была недостаточно высокой для улучшения фармакологического профиля. Хотя глутаматные производные этих соединений показали хорошие результаты, исследования этих классов соединений послужили основой для разработки лигандов на основе мочевины. Цель данного обзора - обобщить структуры линкеров, использованных в синтезе этих соединений, и выявить общие закономерности в их применении.

2.2 Лиганды простатического специфического мембранного антигена

ПСМА относится к мембранным гликопротеинам II типа. В его молекуле выделяются три структурных домена: короткая N-концевая внутриклеточная часть (19 а.о.), гидрофобный трансмембранный участок (24 а.о.) и внеклеточный домен из (707 а.о.)^{17,11}. Было открыто, что ПСМА высоко гомологичен с таким ферментом как нейрокарбоксидипептидаза (пептидаза N-ацетилированных дипептидов), который катализирует реакцию расщепления N-ацетиласпартилглутамата (NAAG) с высвобождением N-ацетиласпартила (NAA) и глутаминовой кислоты (Glu)¹⁸.

Как уже упоминалось выше, существует большое разнообразие лигандов ПСМА, связанное с историческим развитием ингибиторов этой группы. Исследователи начали разработку аналогов переходного состояния, но столкнулись с различными проблемами, связанными как с селективностью, так и с проблемами в фармакологическом профиле,

описанными выше. Опираясь на информацию, накопленную об ингибиторах ПСМА предыдущего поколения, в ходе дальнейших разработок наиболее используемыми стали аналоги субстрата.

В настоящее время существует два основных класса ингибиторов ПСМА: лиганды - аналоги субстрата и лиганды - аналоги переходного состояния. Аналогами переходного состояния являются фосфиновые кислоты, среди которых наиболее известна 2-РМРА¹⁹, и тиолы (например, 2-МРРА)²⁰. Наибольшее количество конъюгатов для селективной доставки лекарств в клетки рака простаты было получено с помощью ингибиторов ПСМА на основе мочевины. Первые ингибиторы данного класса были получены Козиковски в 2000 году путем замены фосфонатного фрагмента на мочевины²¹.

В настоящее время наибольшее внимание исследователей привлекают две основные структуры лигандов ПСМА – аналогов субстрата: **DUPA** и **DCL**¹⁶, ввиду простоты модификации либо по карбоксильной группе глутаминовой кислоты, либо по аминогруппе лизина (**Рисунок 2.3**).

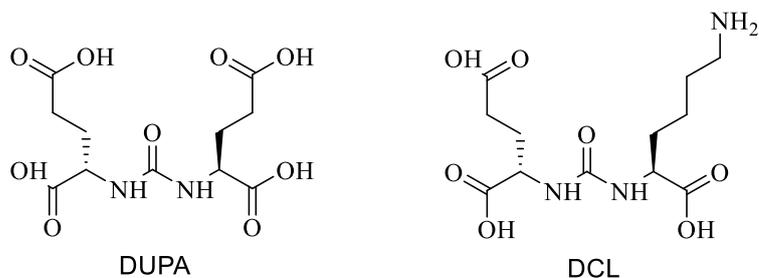


Рисунок 2.3. Строение ПСМА-векторных структур на основе мочевины **DUPA** и **DCL**.

Исследователи, проанализировав связывание ингибиторов на основе мочевины, установили, что кислородный атом мочевины в DUPA способен непосредственно координироваться с атомом цинка в активном центре ПСМА²². Помимо DUPA был получен другой лиганд - аналог субстрата на основе мочевины – соединение, имеющее в своем составе фрагменты лизина и глутаминовой кислоты, соединенные между собой фрагментом мочевины DCL²³.

Эффективность соединений на основе мочевины также была продемонстрирована на различных моделях неврологических заболеваний животных (например, диабетической полинейропатии)^{24,25}. Кроме того, радиоактивно меченые производные мочевины, такие как [¹²⁵I]-DCIT, [¹⁸F]-DCFBC, [¹²⁵I]-DCIBzL (**Рисунок 2.4**), были успешно использованы для визуализации *in vivo* в экспериментальных моделях рака предстательной железы, а также для идентификации GСРII *in vitro* у грызунов и в клетках человеческого мозга^{26,27}.

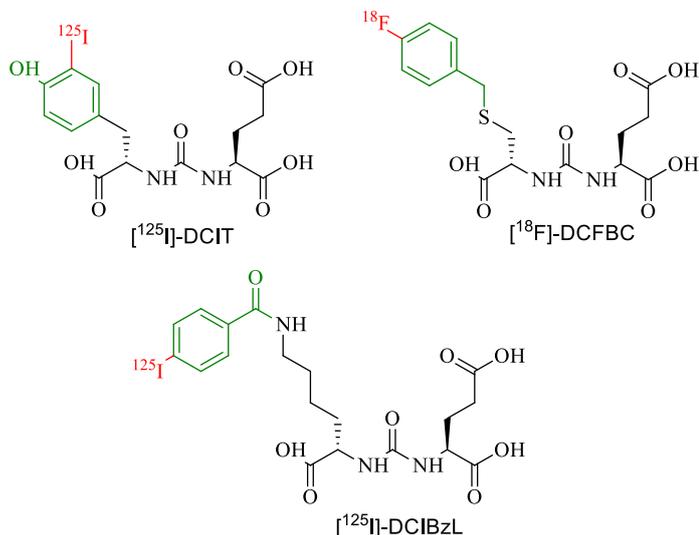


Рисунок 2.4. Структуры диагностических конъюгатов $[^{125}\text{I}]\text{-DCIT}$, $[^{18}\text{F}]\text{-DCFBC}$, $[^{125}\text{I}]\text{-DCIBzL}$ на основе мочевины (черный). Линкер на основе бензильного фрагмента (зеленый), радиоактивная метка $^{125}\text{I}/^{18}\text{F}$ (красный).

В структурах с DCL подробно изучалось влияние введения дополнительных структурных фрагментов к аминогруппе лизина. Было установлено, что для лучшего связывания с гидрофобным карманом в активном центре ПСМА эффективно введение в молекулу одного бензильного фрагмента. Кроме того, было установлено влияние заместителя в ароматической системе и его положения в составе самого бензильного фрагмента²⁸.

2.3 Линкеры в структуре ПСМА лигандов

2.3.1. Классификация конъюгатов в зависимости от типа линкера

Для получения терапевтических конъюгатов молекулу ингибитора связывают через линкер с молекулой лекарственного препарата. Для этого необходима предварительная подготовка (модификация) как самого лиганда, так и действующего вещества.

Большую роль в структуре конъюгата играет линкер, который выполняет 2 основные функции. Первая это соединение в одну молекулу несколько структур, выполняющих различные функции: вектор, который селективно связывается с белком-мишенью и агент, который может быть лекарственным препаратом, флуоресцентной или радиометкой для диагностики. Молекула конъюгата может содержать одну вектор-молекулу с терапевтическим или диагностическим агентом - моноконъюгат. Однако, линкер может быть разветвлённым и позволить создавать конъюгаты с несколькими терапевтическими и/или диагностическими агентами – бимодальные конъюгаты²⁹ (**Рисунок 2.5a**). Молекула-агент в конъюгате может быть одна и связывается с несколькими вектор-молекулами одной природы - монобивалентные конъюгаты³⁰ (**Рисунок 2.5б**). Третий случай - когда вектор-молекулы

направленные на разные белки-мишени в клетке связаны с одним действующим веществом-гетеробивалентные конъюгаты³¹ (Рисунок 2.5в).

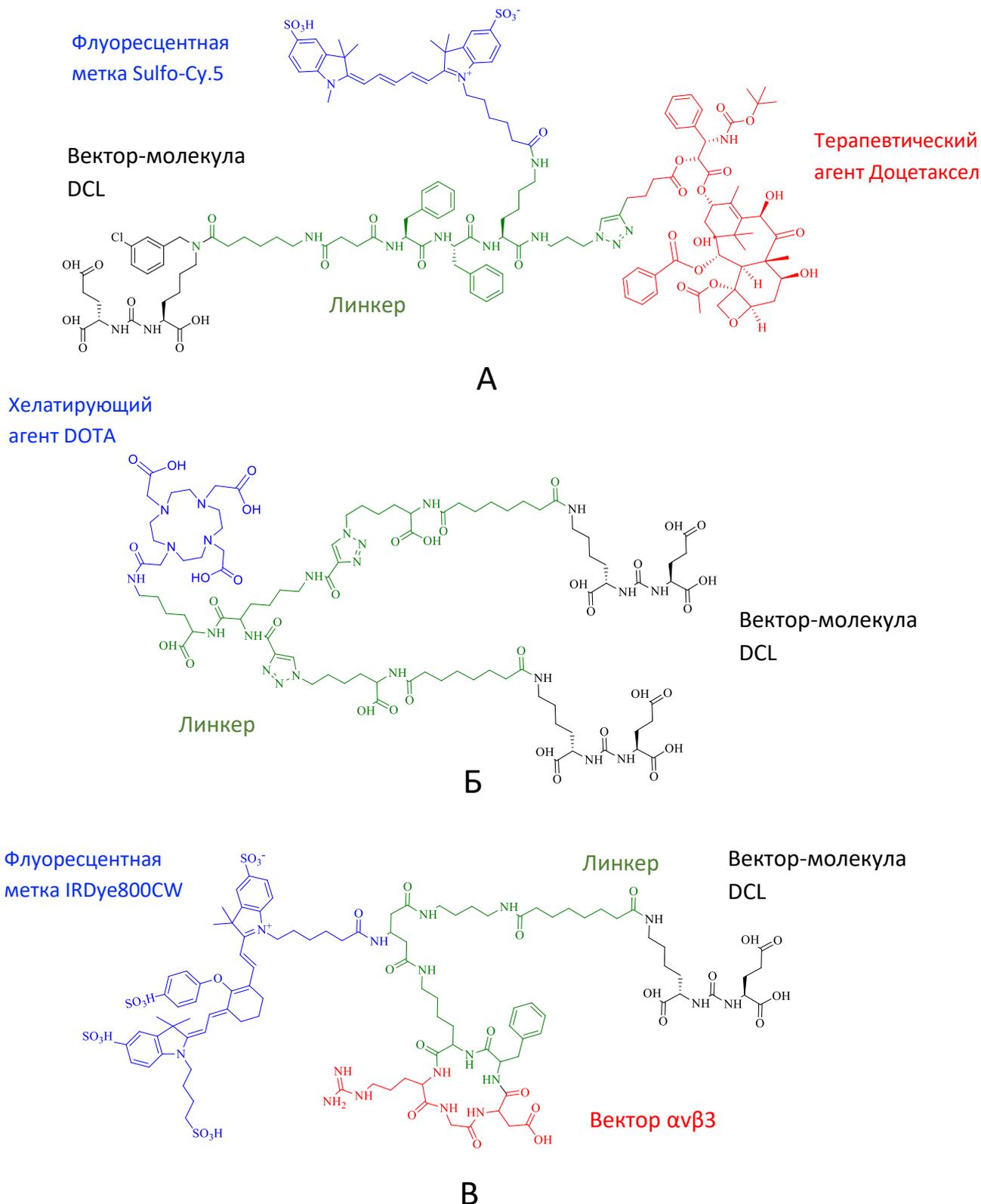


Рисунок 2.5. Примеры конъюгатов, содержащих разветвленные линкеры: а) бимодальный: вектор-молекула DCL (черный), конъюгированная с доцетакселом (красный) и флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5 (синий), б) бивалентный конъюгат: две векторные

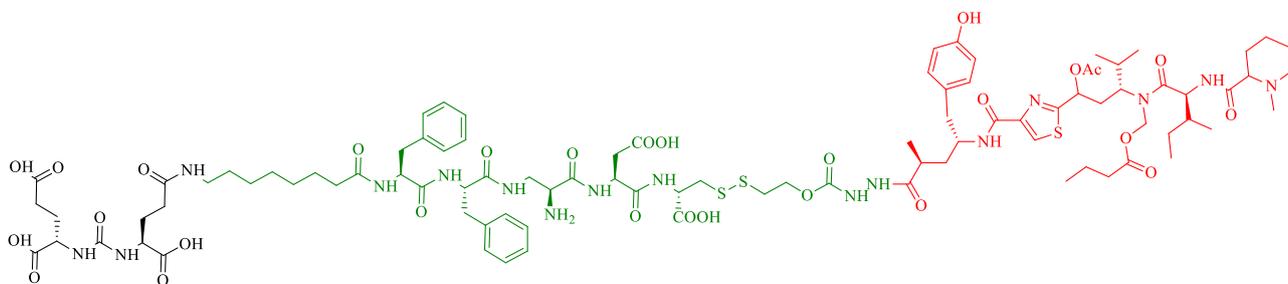
молекулы DCL (черный), конъюгированные с хелатирующим агентом DOTA (синий), в гетеробивалентный конъюгат: молекула вектора DCL (черный) и вектор $\alpha\beta 3$, направленный на интегрины (красный), конъюгированные с флуоресцентной меткой IRDye800CW (синий). Линкерные структуры выделены зеленым цветом.

Второй задачей линкера в конъюгатах ПСМА является повышение аффинности с активным центром ПСМА, за счет взаимодействия с воронкообразным туннелем, ведущему к активному центру белка. Зависимость связывания лиганда с активным центром белка-мишени тесно зависит от нескольких параметров линкера таких как длина, строение введенных в его структуру заместителей, конфигурация хиральных центров и др. В данной работе главный акцент будет сделан на развитии и влиянии линкеров в терапевтических и диагностических моноконъюгатах ПСМА на основе производных мочевины в качестве вектор-молекулы.

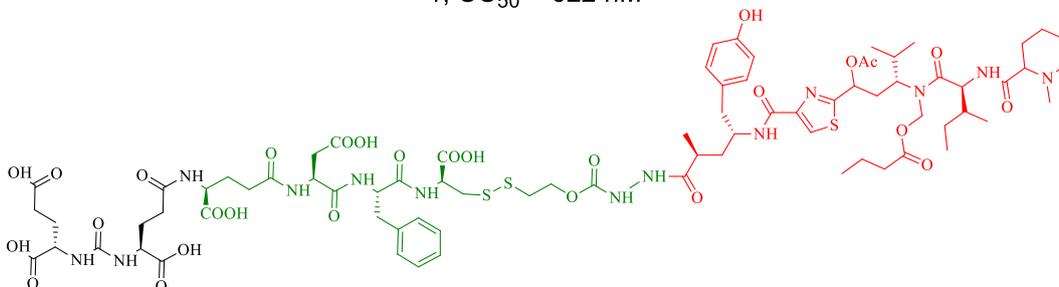
2.3.2. Расщепляемые линкеры

Расщепляемые линкеры помимо двух описанных выше основных функций дополнительно выполняют функцию по высвобождению биологически активного вещества в клетке. Очень важным моментом здесь является устойчивость в различных средах. Именно этот принцип лежит в основе использования данных линкеров: он должен разрушаться только в целевых клетках, если он не стабилен в условиях *in vivo* (например, в кровотоке) теряется весь смысл адресной доставки препарата. Ниже мы рассмотрим несколько основных классов расщепляемых линкеров и принцип их работы.

Одними из распространенных расщепляемых линкеров в 00-ых годах являлись линкеры, содержащие в своей структуре дисульфидные мостики. Дисульфиды устойчивы в кровотоке, что позволяет доставить конъюгат до опухолевых клеток при введении инъекций. При попадании в цитозоль клетки происходит расщепление дисульфидного фрагмента с участием глутатиона (GHS) или в некоторых случаях других клеточных тиоловых кофакторов³². Дополнительно повысить устойчивость дисульфидного фрагмента можно введением дополнительных функциональных групп рядом с местом расщепления линкера.



1, $CC_{50} = 6 \pm 2$ nM



2, $CC_{50} = 5 \pm 2$ nM

Рисунок 2.6. Структуры конъюгатов на основе мочевины DURA (черный) с дисульфидными линкерами (зеленый) и терапевтическим препаратом тубулизином В (красный)

В статье Куларатне была получена серия моноконъюгатов, содержащих дисульфидные фрагменты, которые необходимы для высвобождения действующего вещества³³. Лиганды мочевины DURA конъюгировались с такими препаратами как тубулизин В, камптотецин и дезацетилвинбластин, предварительно модифицированными дисульфидными фрагментами^{34,35}. Среди них способность вызывать регрессию опухоли показали конъюгаты с использованием тубулизина В, представленные на **рисунке 2.6**. Значение цитотоксичности CC_{50} на клеточной линии LNCaP для них составляет 6 ± 2 nM для конъюгата **1** и 5 ± 2 nM для конъюгата **2**. Отметим, что в этих линкерах используются пептидные фрагменты, введение которых в структуру линкеров позже мы рассмотрим подробнее в разделе 2.3.4. Введение данных цепочек улучшает селективность и аффинность за счет супрамолекулярных взаимодействий в активном центре ПСМА.

Расщепление дисульфидного мостика в клетке может происходить несколькими путями (**Рисунок 2.7**). Начинается расщепление с дисульфидного обмена между глутатионом и связью S-S. После депротонирования линкер окисляется либо сразу до этиленсульфида и углекислого газа (путь В), либо сначала образуется 1,3-оксатиолан-2-он, который разлагается на те же продукты (путь А). В ходе исследования механизмов расщепления установлено, что второй способ через циклизацию в 1,3-оксатиолан-2-он предпочтительнее^{36,37}. Если структура конъюгата предусматривает расщепление сложноэфирной связи (под действием более кислой среды опухолевой ткани), то дисульфидный линкер может разложиться до

этилендисульфида без выделения углекислого газа (путь А). Или не разложиться вовсе, и уйти из структуры конъюгата в виде производного дисульфанилэтанола (путь В).³⁸

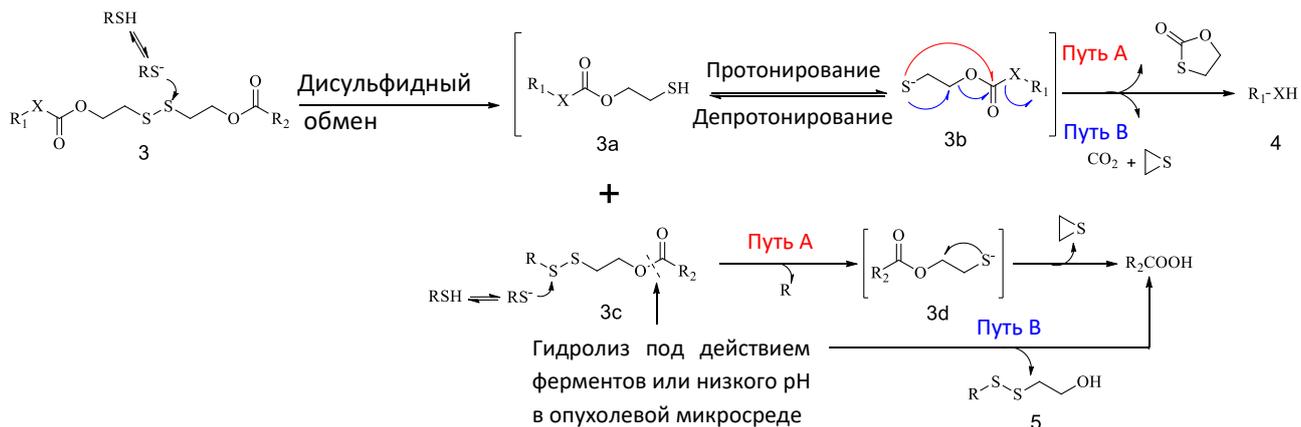


Рисунок 2.7. Расщепление дисульфидного линкера и высвобождение лекарственного препарата (Drug) под действием глутатиона (GSH)

Дисульфидные линкеры очень стабильны в кровотоке, однако, эта стабильность может обернуться и недостатком, так как расщепление в целевой клетке в лизосомах может проходить не полностью, что снижает эффективность, и порой требует усложнения структуры другими способами высвобождения препарата, как это описано выше. Также отмечаются технологические ограничения при синтезе подобных соединений, например, такие соединения довольно сложны в очистке, легко окисляются и склонны к побочным реакциям.³⁹

Аналогами дисульфидных линкеров можно считать расщепляемые линкеры на основе гидразонов. Например, на **рисунке 2.8** представлен моноконъюгат на основе мочевины DCL с лекарственным препаратом доксорубицин. Модификация проводилась по кето-группе доксорубицина с образованием гидразона⁴⁰.

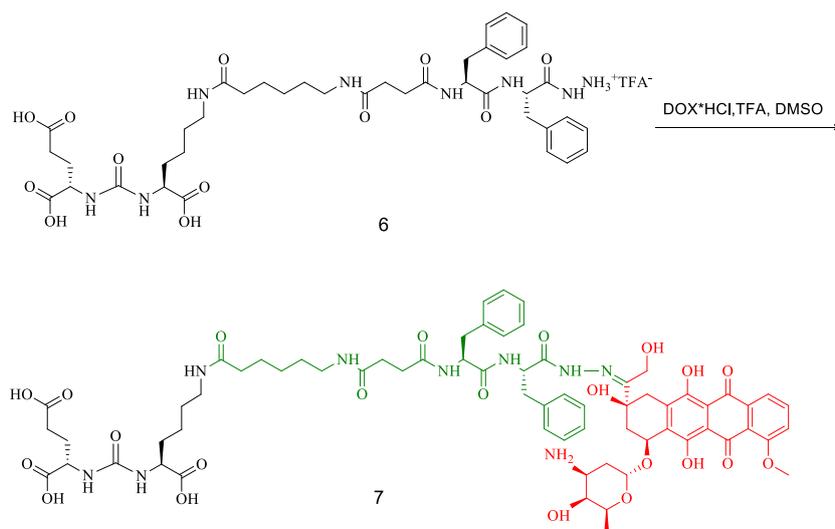


Рисунок 2.8. Структура конъюгата на основе мочевины DCL с гидразоновым линкером и терапевтическим агентом доксорубицин

Гидразоновые линкеры полностью гидролизуются при $\text{pH} = 5$, что хорошо для активации терапевтического агента после проникновения в раковую клетку, так как внутриклеточное расщепление макромолекул происходит в лизосомах, в которых поддерживается кислая среда⁴¹. Период полураспада у такого линкера в кислой среде короткий и составляет от 75 минут до 3-6 часов⁴². В условиях *in vivo*, он увеличивается и может достигать до 24 - 48 часов⁴³. Недостатком же является то, что такой линкер обладает недостаточной стабильностью *in vivo*, что может повлечь высвобождение препарата вне целевых клеток и вызвать побочные эффекты. Стоит обратить внимание, что в структуре линкера также присутствует дипептидный фрагмент L-Phe-L-Phe, роль которого сводится к улучшению аффинности к активному центру ПСМА.

Следующий класс линкеров это катепсин В расщепляемые линкеры. Катепсин В является известным онкомаркером многих видов раковых заболеваний. Доказано, что его экспрессия значительно повышается в лизосомах, цитоплазме и всей поверхности раковой клетки.^{44,45} Разработка катепсин В направленных линкеров началась еще в начале нулевых годов для адресной доставки на основе антител. С целью выяснить наиболее подходящее соотношение структура-активность было получено несколько серий катепсин-расщепляемых линкеров на основе фенилаланина, валина, лизина, цитруллина и других аминокислот⁴⁶.

Наилучшие результаты по расщеплению показали дипептидные цепочки фенилаланил-лизин и валил-цитруллин. В приведенной работе для доставки конъюгатов на основе антител в качестве фрагмента, связывающего антитело с пролекарством используется фрагмент малеимида. Дипептидная цепочка (Phe-Lys в соединении **8** или Val-Cit в соединении **9**) расщепляется катепсином В внутри клетки путем разрыва пептидной связи (между цитруллином и фрагментом РАВС), тем самым высвобождая препарат (**Рисунок 2.9**). Фрагмент п-аминобензилкарбоната (РАВС) необходим, так как установлено, что в его отсутствие гидролиза и высвобождения препарата практически не происходит. По всей видимости его наличие необходимо для того, чтобы стерически освободить расщепляемую катепсином В пептидную связь.

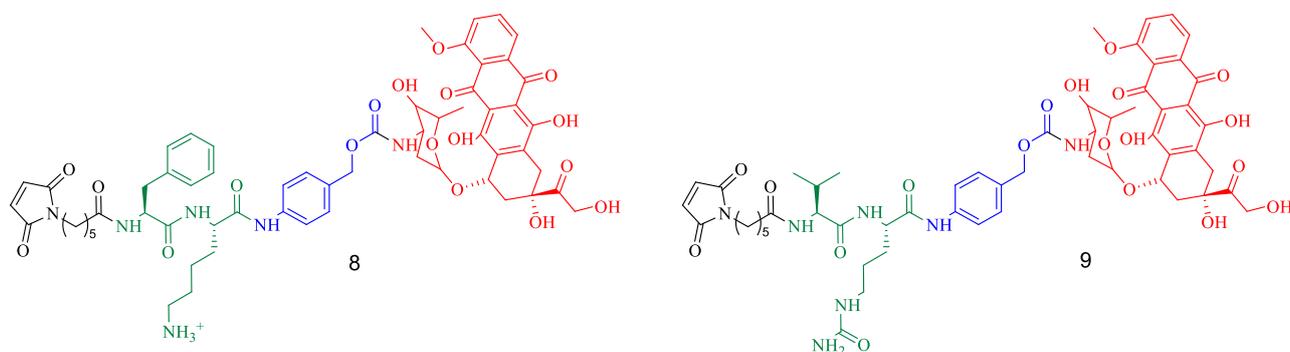


Рисунок 2.9. Структуры конъюгатов с расщепляемым катепсином В дипептидным линкером: 8 - фенилаланин-лизин, 9 – валил-цитруллин. Черным обозначен малеимидокапроил (МС), зеленым – линкер, синим самоотщепляющийся фрагмент линкера РАВС, красным – DOX.

Рассмотрим подробно механизм расщепления линкера под действием катепсина В на примере линкера фенилаланил-лизин **10**. На первой стадии происходит ферментативное расщепление пептидной связи (между цитруллином и фрагментом РАВС).⁴⁷ Фрагмент п-аминобензилкарбоната (РАВС) **10.b** самопроизвольно отщепляется, образуя (4-аминофенил) метанол **11**, происходит высвобождение доксорубина **DOX** с выделением углекислого газа (**Рисунок 2.10**).

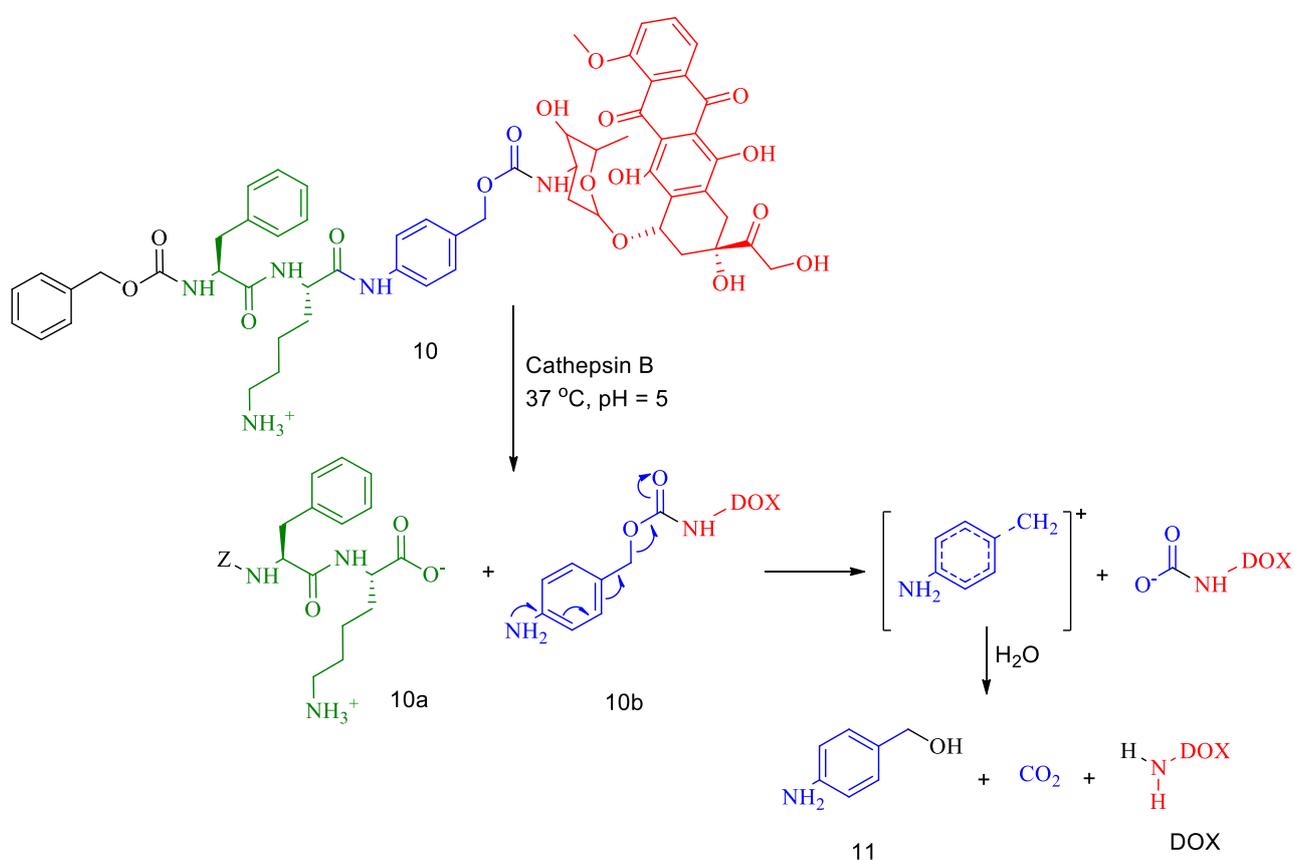


Рисунок 2.10. Схема расщепления конъюгата доксорубина (DOX) с дипептидным линкером. Зелёным обозначена бензилоксикарбонильная защитная группа, чёрным – линкер фенилаланил-лизин, синим – самоотщепляющийся фрагмент РАВС, красным – доксорубин.

Линкеры с дипептидной цепочкой валил-цитруллина более устойчивы по сравнению со своим аналогом со структурой фенилаланил-лизин. Получаемые на основе данных фрагментов конъюгаты обладают высокой физиологической устойчивостью, и быстро гидролизуются в присутствии лизосомных экстрактов и катепсина В человека. Помимо этого,

Val показывает лучшее связывание с катепсином в активном центре. Сравнение с не модифицированным лекарственным препаратом доксорубин показало, что оба конъюгата показали сопоставимую активность *in vitro* (0,15 мкМ для фенилаланил-лизинового линкера и 0,4 мкМ для валил-цитруллинового линкера) по отношению к клеточным линиям L2987 (против 0,2 мкМ). Однако, наибольшее распространение получил валил-цитруллиновый линкер.

Линкер Val-Cit широко используется с таким антимиотическим препаратом как монометил ауристатин Е. Их совокупная структура имеет название ведотин. На основе данного сочетания создано огромное количество конъюгатов для адресной доставки к различным типам опухолей, однако, до последнего времени подавляющее число этих конъюгатов были созданы под доставку на основе антител^{48,49,50}. Тем не менее, есть работы где структура ведотина была использована при создании гетеровалентного конъюгата **12** для адресной доставки в клетки рака предстательной железы на основе низкомолекулярного ингибитора мочевины DCL⁵¹ (**Рисунок 2.11**).

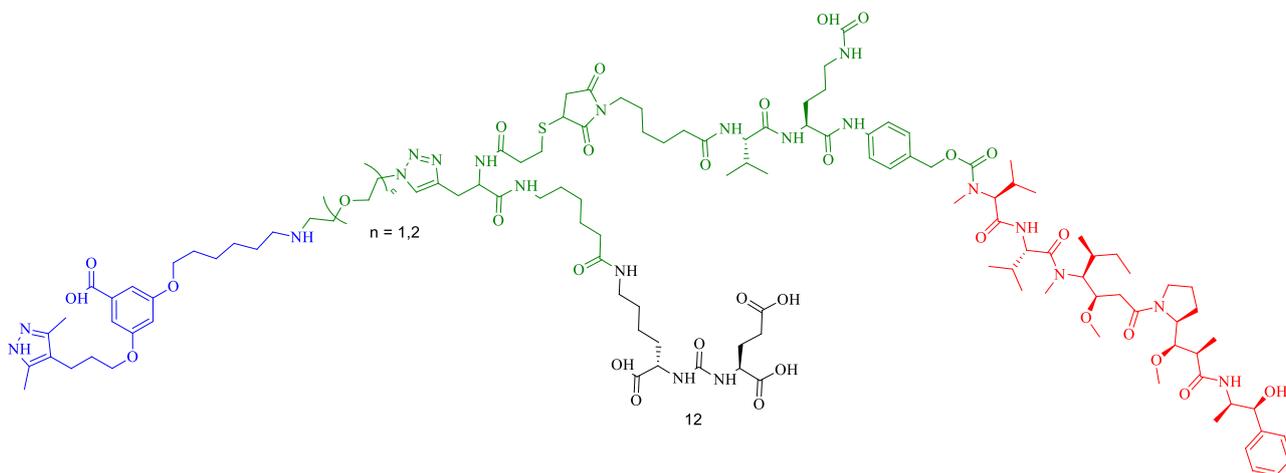


Рисунок 2.11. Структура гетеровалентного конъюгата с монометил ауристатином Е: лиганд TTR 2 (синий), лиганд на основе мочевины DCL (черный), терапевтический агент MMAE (красный) и линкерная система (зеленый)

С целью повысить показатели *in vivo* и улучшить гидрофильность (так как само активное вещество обладает гидрофобными свойствами) в структуру был введен лиганд селективно связывающийся с трансиретином. Помимо этого, за счет наличия TTR2 удалось увеличить вдвое период полувыведения конъюгата, за счет обратимого связывания с циркулирующим эндогенным трансиретином, что увеличивает эффективность препарата. Структура линкера включает в себя фрагмент расщепляемого катепсином В валил-цитруллина со стороны MMAE, в то время как лиганд трансиретина присоединен через

полиэтиленгликолевый фрагмент. Ведотин введен в структуру через малеимидовый фрагмент, а со стороны лиганда ПСМА удлинение цепочки проводилось реакцией ацилирования. Таким образом, была существенно снижена токсичность и повышена безопасность при использовании монометил ауристатина E.

2.3.3. Влияние длины линкера

Изначально разработанные конъюгаты (как правило диагностические с радиометкой ^{18}F) на основе мочевины не имели в своей структуре выраженной линкерной части или не имели ее вообще⁵².

Одним из первых диагностических конъюгатов на основе мочевины в начале нулевых был конъюгат ^{11}C -DCMC содержащий радиоактивный ^{11}C при атоме серы фрагмента цистеина. Связывание с активным центром ПСМА происходит за счет производного мочевины. Так как радиоактивная метка ^{11}C очень маленькая, она не оказывает никакого влияния на процесс связывания и присоединена непосредственно к вектор-молекуле.⁵³ Второй радиоактивный конъюгат представляет собой производное мочевины DUPA с введенным ^{125}I -замещенным фрагментом тирозина со стороны одного из глутаминовых остатков. Его эффективность ^{125}I -DCIT в несколько раз выше, чем у углеродного аналога (**Рисунок 2.12**).

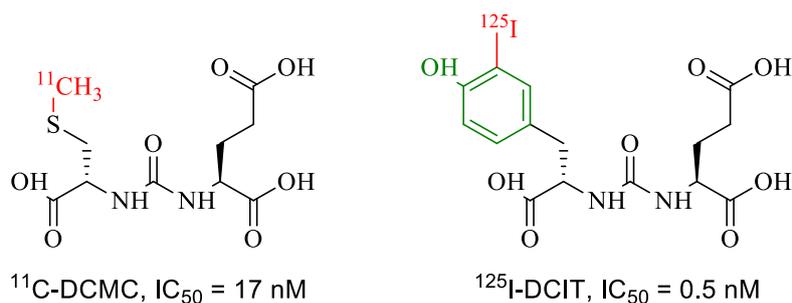


Рисунок 2.12. Структура диагностических конъюгатов ^{11}C -DCMC и ^{125}I -DCIT и их биологическая активность. Лиганд на основе мочевины выделен черным цветом, линкер – зеленым, радиометка - красным.

Почему модификации линкеров мочевины и введение линкеров проводят со стороны боковой цепи аминокислоты, образующей мочевины? Ответ лежит в строении активного центра ПСМА. Центр, с которым взаимодействует лиганд условно можно поделить на 2 кармана (**Рисунок 2.13**). Каждый карман состоит из двух субкарманов: один представляет собой расположенный на поверхности субкарман с высоко положительно заряженным фармакофором, а другой - скрытый субкарман гидрофобного нефармакофора.⁵⁴

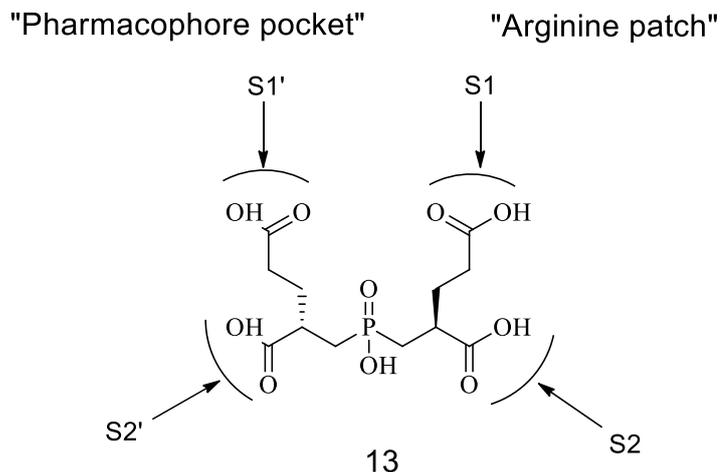


Рисунок 2.13. Соотнесение карбоксильных остатков лиганда ПСМА с субкарманами активного центра ПСМА

Козиковски наглядно показал, что введение заместителей в области S1' и S1 может положительно сказываться на биологической активности лигандов, в то время как любые изменения со стороны субкарманов S2' и S2 абсолютно неприемлемы и приводят к полной потере аффинности к активному центру ПСМА.⁵⁵ Также в данной работе было отмечено, что введение в структуру ароматического заместителя в S1' область лучше сказывается на IC₅₀ лигандов, чем введение метильных фрагментов. Это объясняет почему лиганд ¹¹C-DCMC уступает ¹²⁵I-DCIT. Таким образом, введение диагностических агентов и линкеров без нарушения взаимодействия лиганда с активным центром возможно только со стороны боковой цепи аминокислотного фрагмента, образующего мочевиный остаток.

В зависимости от типа исходной мочевины (DUPA или DCL) модификации могут проводиться либо по карбоксильной группе боковой цепи глутаминовой кислоты, либо по аминогруппе боковой цепи лизина. Ниже представлены 2 радионуклидных конъюгата с ¹²³I и ¹³¹I, для которых была выбрана модификация мочевины DCL. Как и для ¹²⁵I-DCIT, введение радиометки проводилось через ароматические фрагменты. (Рисунок 2.14) путем ацилирования (MIP-1072) или введения еще одного фрагмента мочевины (MIP-1095).

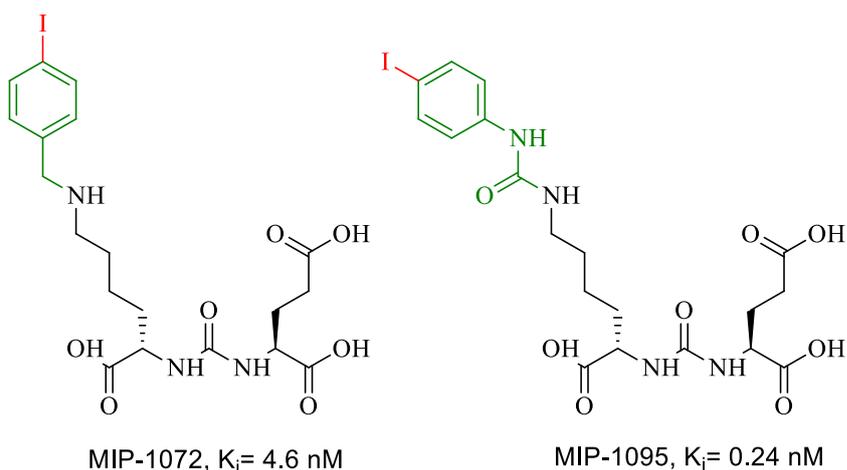


Рисунок 2.14. Структура диагностических конъюгатов MIP-1072 и MIP-1095. Лиганд на основе мочевины выделен черным цветом, линкер – зеленым, радиометка - красным.

Одним из радиомеченных конъюгатов дошедших до клинических испытаний является [^{18}F]-DCFBC. Введение фтор-метки обусловлено рядом преимуществ: меньшая радиоактивность, что уменьшает нагрузку на пациента, больший период полураспада ($T_{1/2}$ для ^{11}C составляет 20 минут, в то время как для $T_{1/2}$ для ^{18}F 110 минут), а также удобство в структурном дизайне. Ниже представленный конъюгат получается реакцией 1-(бромметил)-4- ^{18}F -бензола **15** и SH группой фрагмента цистеина соединения **14** в основных условиях.⁵⁶

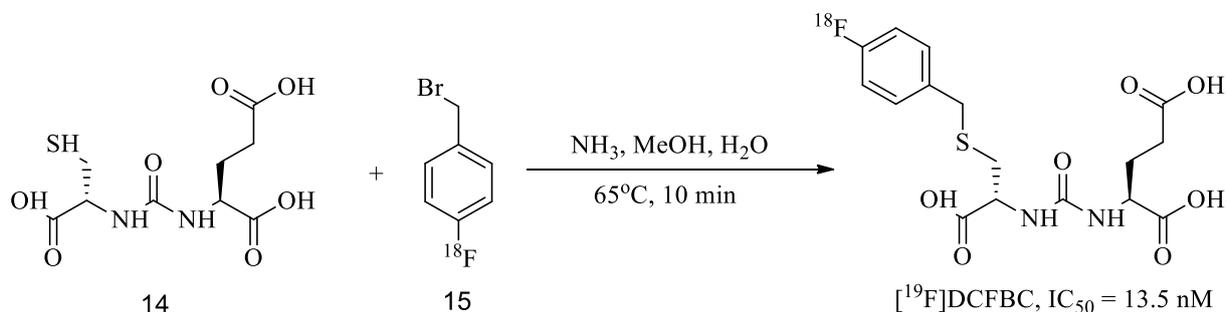


Рисунок 2.15. Синтез конъюгата [^{18}F]-DCFBC.

Испытания *in vitro*, которые заключались в ингибировании расщепления N-ацетил-аспартил глутамата, показали результат в $\text{IC}_{50} = 13,5$ нМ. В то время данный результат можно было назвать очень хорошим, ввиду того, что лиганды ПСМА на основе мочевины только разрабатывались и главным образом их сравнивали с ингибиторами на основе фосфинатов или тиолов (класс аналогов переходного состояния)¹⁵.

Подобный способ введения радиоактивного фтора был использован относительно недавно при разработке и исследованиях новых классов лигандов ПСМА⁵⁷. Разберем более подробно синтез на данном примере. ^{18}F -бензальдегид **16.a** получали из нитро-бензальдегида

16 при помощи Kryptofix2.2.2 (краун-эфир фазового переноса, для облегчения нуклеофильного замещения) в мягких щелочных условиях.⁵⁸ Присоединение альдегидов к аминогруппе лизина можно проводить разными способами, например ацилированием через восстановительное аминирование. Однако, в данной работе авторы осуществили синтез пептидной связи между данными фрагментами, предварительно получив NHS-эфир ¹⁸F-меченого бензальдегида **16.b**, который впоследствии легко вступает в реакцию с аминогруппой в присутствии DIPEA.

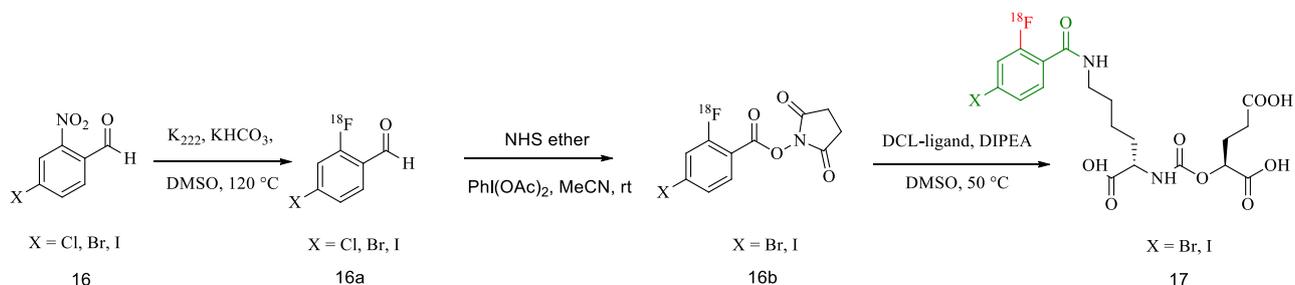


Рисунок 2.16 Синтез диагностического конъюгата **17** с ¹⁸F-меткой

Интересный способ сочетания алифатических линкеров использовал Коммиди при создании двойного диагностического конъюгата. Флуоресцентные метки Су3.18 и «фторная ловушка» присоединены к вектор-молекуле последовательно, через короткие алифатические фрагменты⁵⁹.

В первых терапевтических конъюгатах, можно наблюдать применение коротких алифатических линкеров⁶⁰. Введение линкера начиналось со стороны аминогруппы ароматического кольца в структуре вектор-молекулы на основе мочевины, путем реакции нуклеофильного присоединения глутарового ангидрида. Чтобы активировать свободную карбоксильную группу для сочетания с доксорубицином, соединение **18** обрабатывали 4-нитрофенилхлорформиатом в присутствии триэтиламина с получением смешанного ангидрида **19**. После взаимодействия с доксорубицином, аллиловые защиты с полученного пролекарства снимались Pd(PPh₃)₄ в морфолине.

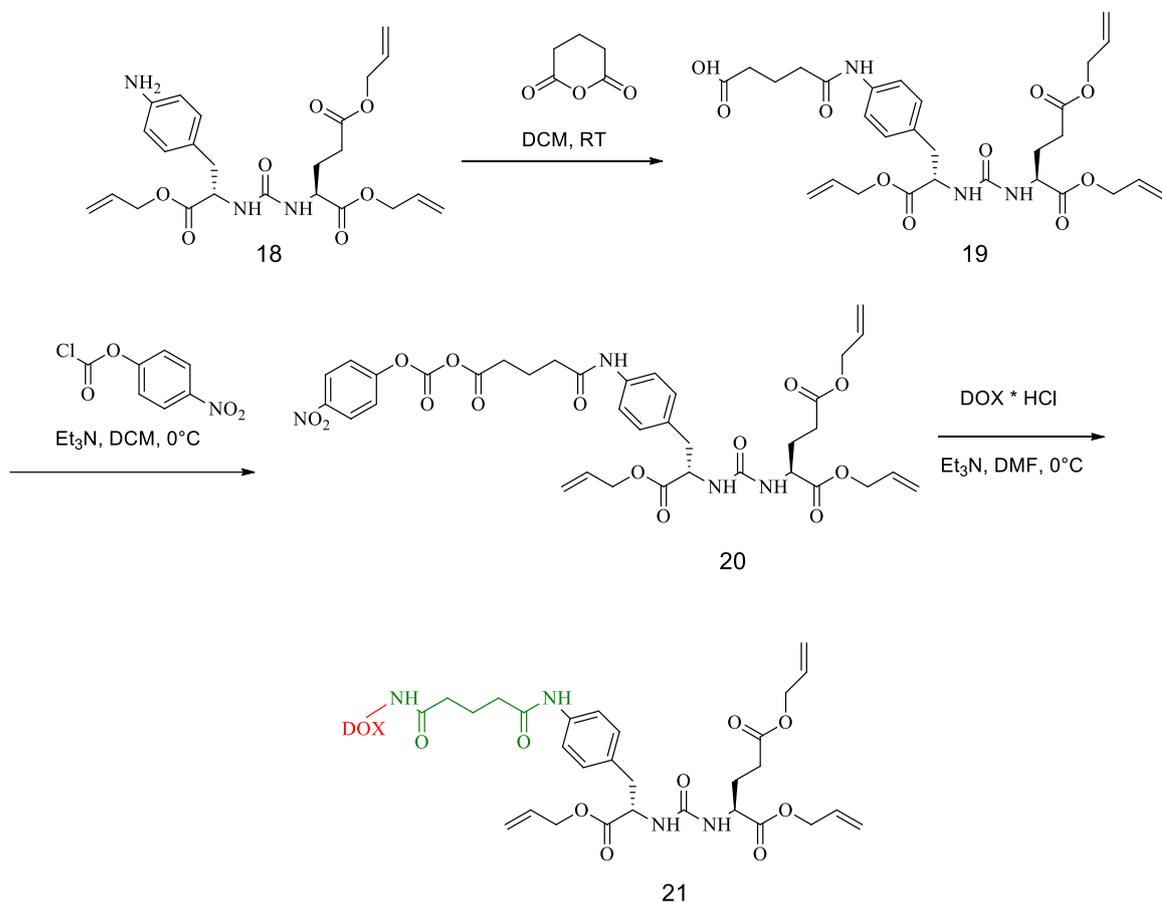


Рисунок 2.17 Синтез конъюгата на основе мочевины (черный) с линкером на основе глутарового ангидрида (зеленый) с доксорубицином (красный)

Высвобождение лекарственного препарата проходит за счет расщепления амидной связи амидазами (**Рисунок 2.18**). Функция линкера здесь не только задает определенное расстояние между функциональными частями конъюгата, но и обеспечивает высвобождение лекарственного препарата. При сравнении цитотоксичности конъюгата **21** *in vitro* на клеточных линиях С4-2 (ПСМА-положительная) и РС-3 (ПСМА-отрицательная) с не модифицированным доксорубицином было показано, что доксорубицин превосходит конъюгат по цитотоксичности (32 нМ на клетках С4-2, 223 нМ на клетках РС-3). С другой стороны, полученный конъюгат проявлял селективность связывания с ПСМА ($IC_{50} = 40,8$ нМ), что является неплохим показателем и говорило о необходимости дальнейшего изучения и модификации подобных соединений.

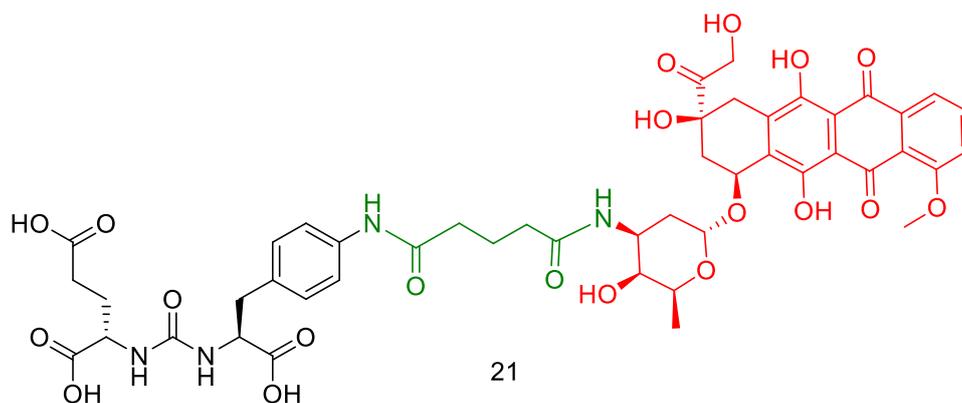


Рисунок 2.18. Конъюгат **21** на основе ингибитора мочевины (черный) и модифицированного по аминогруппе доцетаксела (красный). В качестве линкера использована глутаровая кислота (зеленый).

Другой пример короткого алифатического линкера можно увидеть на примере конъюгата ПСМА с хелатирующими агентами HBED-CC и DOTA, где в качестве линкера использована 6-аминогексановая кислота, которую ввели по хорошо отработанному протоколу пептидного синтеза с использованием активирующего агента HBTU. Хелатор HBED-CC конъюгируется с линкером путем реакции активированного эфира тетрафторфенола и свободной аминогруппой лиганда, хелатор DOTA-трис-tert-бутиловый эфир конъюгируется через HBTU⁶¹.

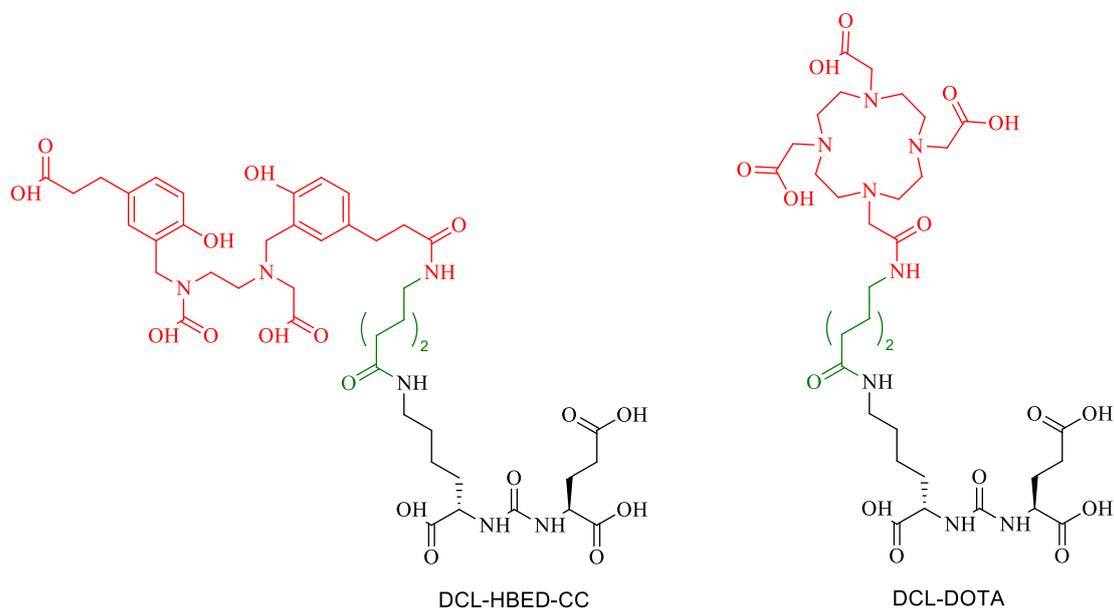


Рисунок 2.19. Структуры конъюгатов на основе мочевины DCL с алифатическим линкером на основе лизина и хелатирующими агентами HBED-CC и DOTA.

Конъюгат HBED-CC-PSMA на испытаниях *in vivo* показал себя лучше как по накоплению в опухолевых клетках, так и по некоторым фармакокинетическим параметрам.

Это может быть связано с тем, что благодаря своей структуре, содержащий ароматические фрагменты HBED-CC способен взаимодействовать с гидрофобным связывающим карманом, усиливая свое сродство к ПСМА. Поглощение опухолью составило $7,70 \pm 1,45\%$ ID/г на ксенографте LNCaP и $1,30 \pm 0,12\%$ ID/г на ксенографте PC-3. Комплекс DOTA [^{68}Ga] показал другое поведение, поглощение опухолью LNCaP было в 2,6 раз меньшим, нежели с хелатором HBED-CC, в то время как поглощение линией PC-3 составляет $0,60 \pm 0,06\%$ ID / г.

Введение в структуру лигандов длинных линкеров на основе алифатических цепочек (таких как ПЭГ) имеет начало с 2010-ых годов. Обусловлено это тем, что согласно структуре ПСМА, к активному центру белка ведет постепенно сужающийся тоннель, обладающий двумя гидрофобными карманами на внутренней поверхности⁶². В активном центре присутствуют два иона цинка, с которыми может координироваться карбонильная группа в составе структуры вектор-молекулы. Поэтому если молекула-вектор и стерически большая молекула-агент будут находиться на небольшом расстоянии друг от друга, ингибитор не сможет попасть в активный центр ПСМА. Алифатические линкеры в данном случае выполняют роль «моста», который придает конъюгату своеобразную «гибкость», которая дает возможность лиганду мочевины попасть внутрь сайта связывания и при этом не возникает стерических затруднений со стороны биологически активного агента^{63,64}. На **рисунке 2.20** представлена серия лигандов ПСМА на основе мочевины DCL для создания флуоресцентных конъюгатов с такими метками как 800CW, ICG, Cy7 и Cy5.5. С каждой меткой было синтезировано по 3 конъюгата соответственно. Введение линкера на основе ПЭГ проводили методом классического пептидного синтеза с использованием активированных эфиров бензотриазолов (в данном случае был использован TBTU). Алифатический линкер содержащий в структуре лизин был получен через NHS-эфир гексановой кислоты лиганда⁶⁵.

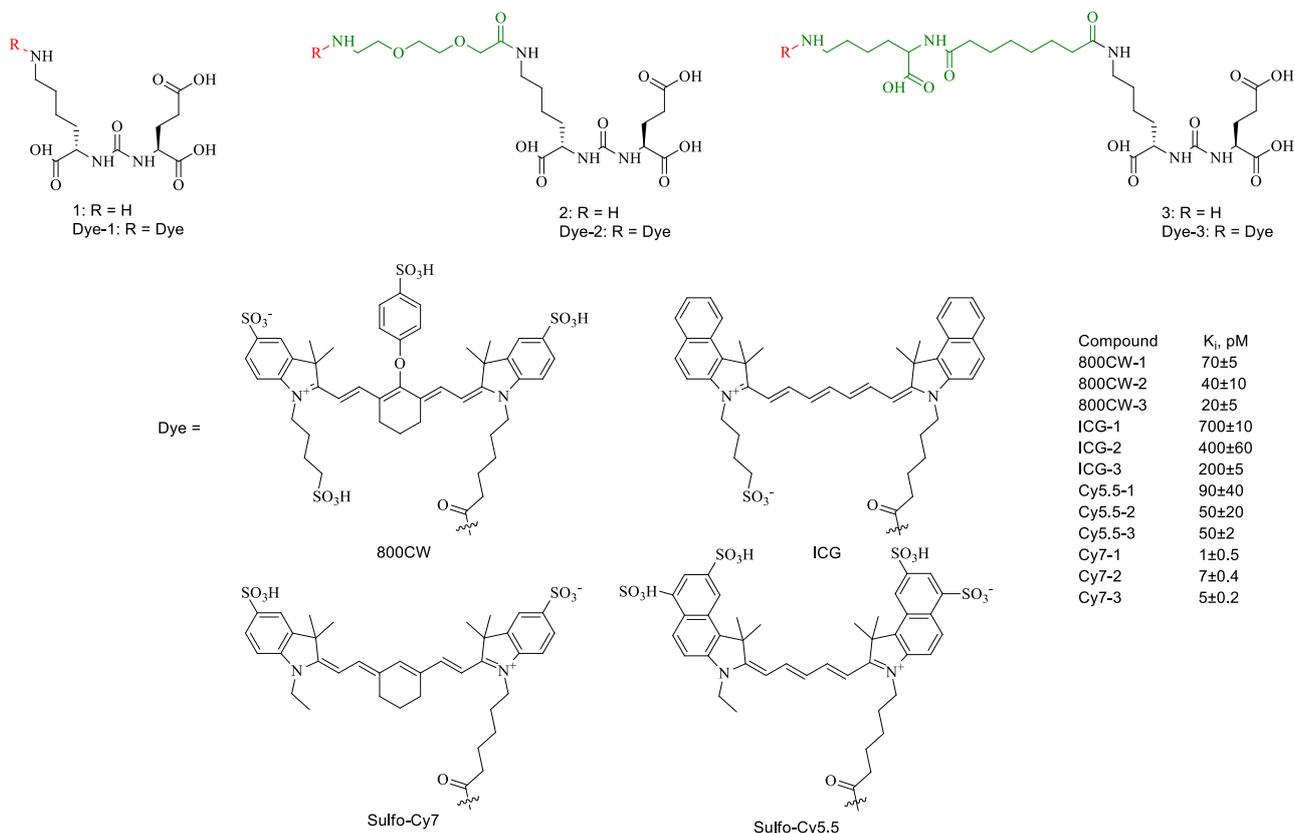


Рисунок 2.20. Структуры диагностических конъюгатов с различной длиной алифатических линкеров.

Результаты биологических испытаний подтверждают, что полное отсутствие расстояния между функциональными частями конъюгата не дает вектор-молекуле полностью провзаимодействовать с мишенью. Это хорошо видно по значениям констант ингибирования. Для соединений с лигандом без линкера K_i выше практически для всех флуоресцентных меток по сравнению с модифицированными аналогами. Например, для 800CW-1 константа ингибирования составляет 70 ± 5 pM, в то время как для 800CW-2 и 800CW-3 значения составили 40 ± 10 pM и 20 ± 5 pM соответственно. Аналогично и для меток ICG и Sulfo-Cy5.5 (ICG-1 700 ± 10 pM, ICG-2 400 ± 60 pM, ICG-3 200 ± 5 pM; Cy5.5-1 90 ± 40 pM, Cy5.5-2 50 ± 20 pM, Cy5.5-3 50 ± 2 pM). Конъюгаты с Sulfo-Cy7 демонстрируют высокую аффинность независимо от линкера (Cy7-1 1 ± 0.5 pM; Cy7-2 7 ± 0.4 pM; Cy7-3 5 ± 0.2 pM), однако, это может быть связано с тем что Cy7 имеет более маленький размер, относительно других меток.

2.3.4 Введение ароматических фрагментов

Было доказано, что длина линкерной структуры имеет принципиально важное значение для эффективности конъюгата. Как показано выше, слишком короткий линкер мог не обеспечить попадания ингибитора в активный центр ПСМА. Но и при слишком длинном

линкере возникает другая проблема. Несмотря на то, что происходит связывание вектор-молекулы с активным центром ПСМА, проникновение конъюгата в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза может быть затруднено настолько, что такие конъюгаты могут стать полностью неактивными в отношении целевых клеток. Это хорошо видно на примере нескольких работ, где активность конъюгатов напрямую зависела от длины линкера.

Постепенно становилось понятно, что простого разведения на определенное расстояние функциональных частей конъюгата недостаточно, и в структуру алифатических фрагментов могут быть введены дополнительные функциональные группы. В 2010-ом году Andrew X. Zhang в своей работе устанавливает корреляцию аффинности лигандов от длины линкера, а также доказывает наличие «арен-связывающего фрагмента» в активном центре ПСМА. Были синтезированы бивалентные конъюгаты на основе вектор-молекулы мочевины DCL **22** и антител ARM-Ps⁶⁶, которые также ингибируют ПСМА. Авторами было отмечено, что введение в структуру ароматического фрагмента DNP (динитрофенил) и триазольного кольца значительно усиливают биологическую активность получаемых конъюгатов. Увеличение количества нитрогрупп внутри бензольного кольца способствовало лучшей цитотоксичности конъюгата (**Рисунок 2.21**). Согласно полученным данным триазольное кольцо взаимодействует с «входными воротами» в непосредственной близости активного центра, а фрагмент DNP попадает в «арен-связывающую область», образованную индольной группой Trp541 и гуанидиновой группой Arg511, которые удерживают DNP-кольцо.

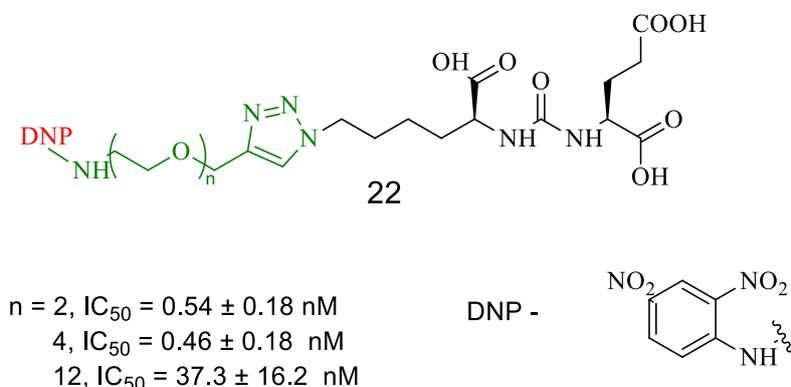


Рисунок 2.21. Структура лиганда на основе DCL (черный) с линкером на основе ПЭГ (зеленый)

Наилучший результат аффинности достигается при $n = 4$: IC_{50} составляет $30,2 \pm 14,4$ нМ, при уменьшении длины результат ухудшается ($n = 2$; $IC_{50} = 40,8 \pm 9,4$ нМ), а при увеличении длины линкера в 3 раза аффинность падает на порядок ($n = 12$; $IC_{50} = 165,2 \pm 58,9$ нМ). Таким образом, важно, чтобы активное вещество находилось как можно ближе к поверхности клетки и белка-мишени, при условии связывания активного центра с вектором⁶⁷.

Так как дальнейшие разработки показали, что наличие заместителей в структуре линкера играет существенную роль, длину линкера попытались варьировать не только за счет алифатического фрагмента, но и длиной пептидной цепочки²². Так, линкер, где длина достигалась за счет введения аминокислотных остатков NH-Phe-Glu-Ala-Phe-Phe-CO показал значительно худшую активность ($IC_{50} = 102$ нМ) по сравнению с линкером, структура которого не была перегружена NH-(CH₂)₈-Phe-Phe-CO ($IC_{50} = 13,8 \pm 3,9$ нМ). Однако, слишком короткий линкер NH-Glu-Phe-CO негативно сказывается на аффинности ($IC_{50} = 60$ нМ). Конъюгат, содержащий в своей структуре линкер NH-PEG₆-Phe-CO, также показал слабую аффинность к клеткам мишени, вероятно, из-за отсутствия остатков фенилаланина вблизи активного центра, которые в противном случае заняли бы его гидрофобные карманы.

Важность длины линкера отмечается и доказывается и в других работах, посвящённых исследованию активного центра ПСМА, но в которых разработка основана на лигандах аналогах переходного состояния (например, ингибиторы на основе фосфора)^{68,69,70}. Структура активного центра ПСМА дает возможность модификации не только вектор-молекулы с целью лучшего связывания, но и дает широкую возможность для модификации структуры линкера⁷¹.

В 2013 году были разработаны лиганды на основе мочевины, где к S-концу цистеина был включен сукцинимидный фрагмент, который считается хорошим аналогом ароматическим фрагментам (**Рисунок 2.22**)⁷². Сборку линкера лиганда полностью проводили через NHS-эфиры, начиная с 3-йод-бензальдегида.

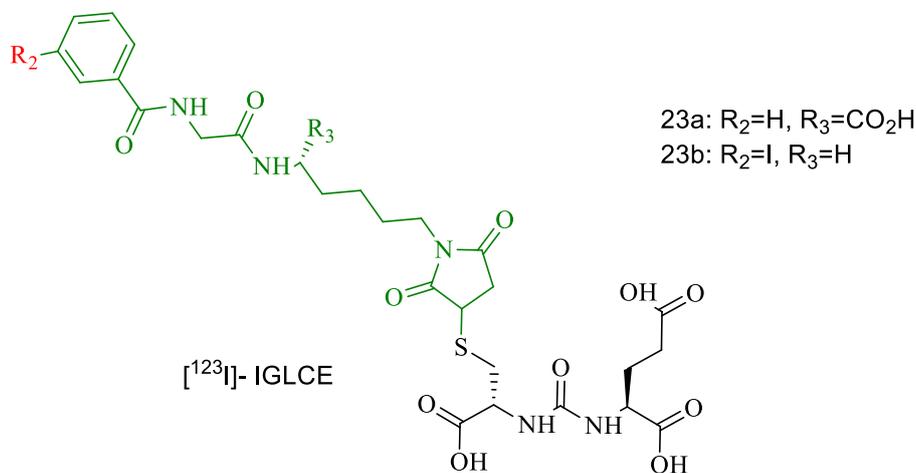


Рисунок 2.22. Структура диагностического лиганда [¹²³I]-IGLCE. Лиганд на основе мочевины выделен черным цветом, линкер зеленым, радиометка ¹²³I красным.

После проведенных испытаний *in vivo* на мышях с ксенографтами клеточных культур LNCaP и PC-3 был выделен самый перспективный из полученных лигандов [¹²³I]-IGLCE. Установлено, что он специфически накапливается в PSMA-положительных тканях LNCaP с пиковым поглощением 9,5% ID/г через 3 ч после инъекции, в то время как на PSMA-

отрицательных линиях РС-3 наблюдалось низкое поглощение (0,94% ID / г через 30 минут). Кроме этого, было проведено испытание с предварительным введением ингибитора ПСМА 2-РМРА, после которого ингибирование на линиях LNCaP значительно снизилось до 0,55%, что подтверждает взаимодействие лиганда с белком-мишенью.

Другим из способов введения ароматической системы в структуру линкера это использование тирозинового фрагмента⁷³. Сочленение с хелатирующим агентом происходит за счет образования пептидной связи, а конъюгирование с вектор-молекулой происходит за счет образования эфирной связи между вектор-молекулой и гидроксогруппой тирозина (**Рисунок 2.23**).

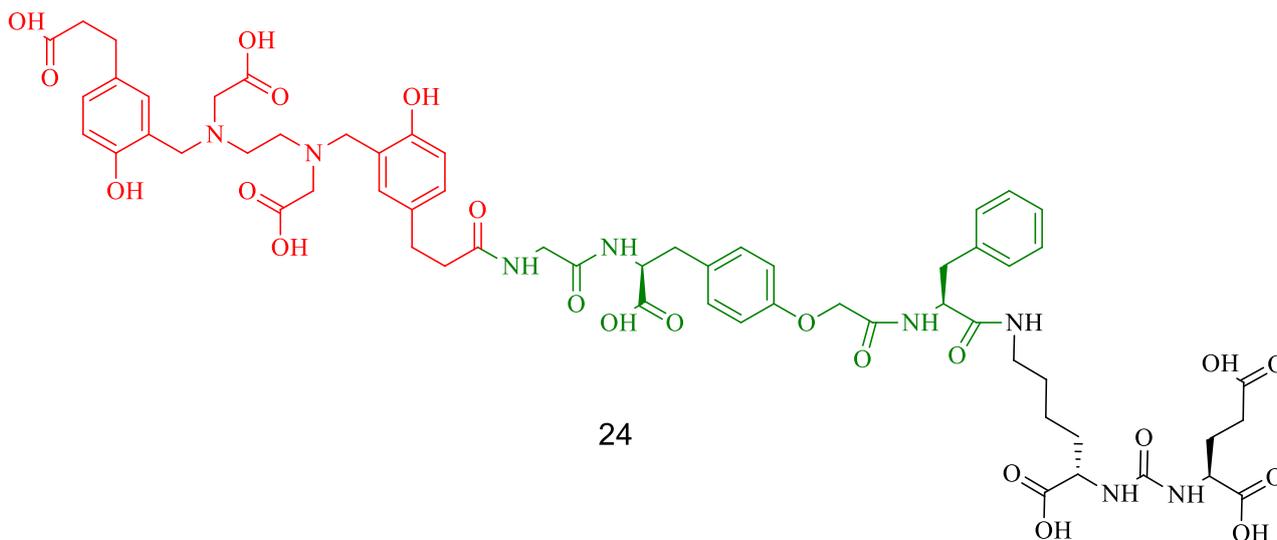


Рисунок 2.23. Структура конъюгата на основе мочевины DCL (черный) с тирозиновым линкером (зеленый) и хелатирующим агентом HBED-CC (красный)

Синтез линкера начинали с трет-бутил-защищенного тирозина с 2-(((бензилокси) карбонил) амино) уксусной кислоты **24a**. Полученный фенол **24b** конденсировали с избыточным количеством метилбромацетата, после чего метиловую группу эфира **24c** селективно удаляли щелочным гидролизом (**Рисунок 2.24**). Далее идет образование пептидной связи между вектор-молекулой DCL и карбоксильной группой модифицированного тирозина **24d**. Для получения целевого амина, Cbz защита **24e** снималась стандартной процедурой гидролиза в атмосфере водорода над Pd/C⁷⁴.

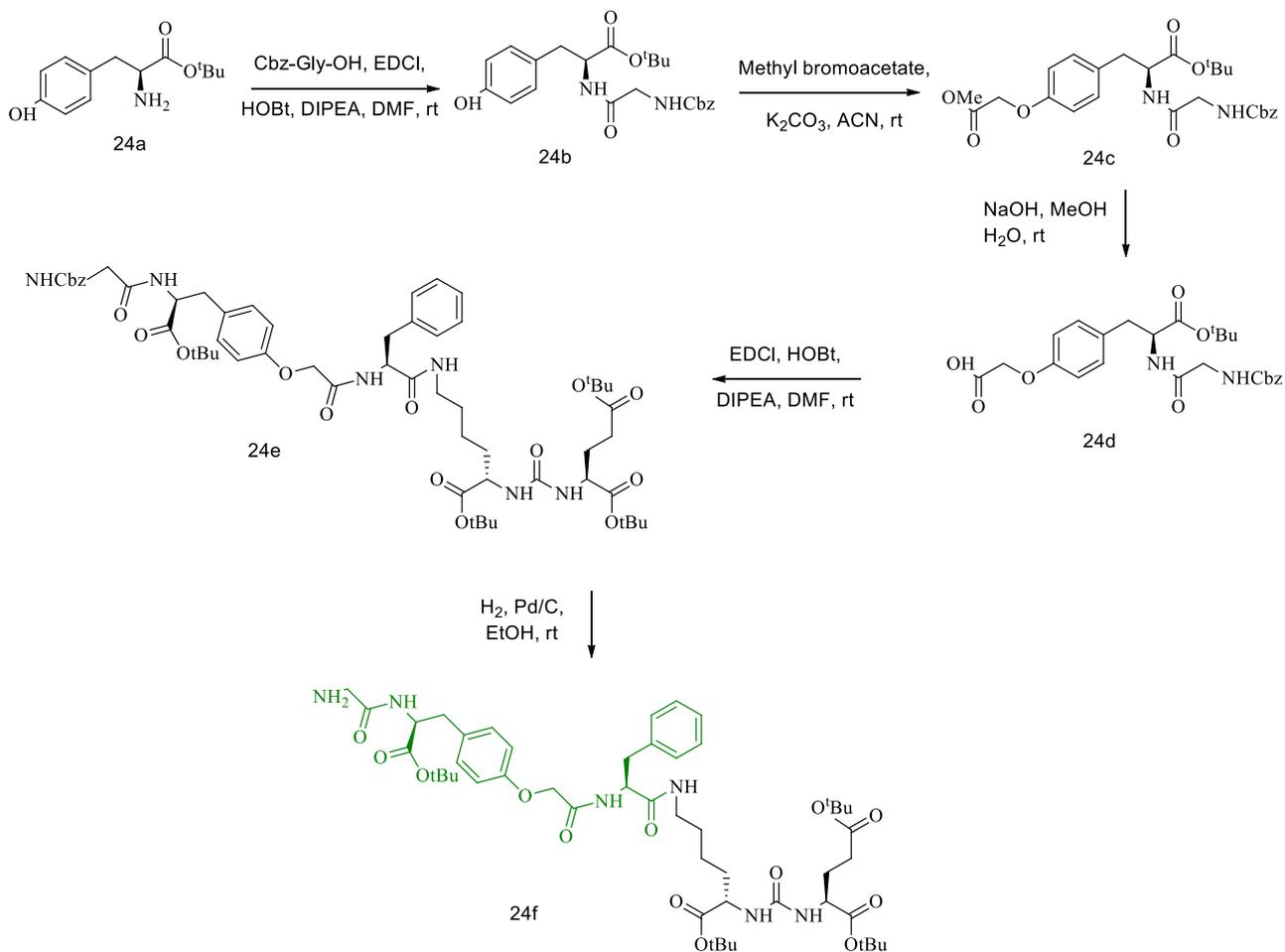


Рисунок 2.24. Синтез тирозинового линкера конъюгата $[^{68}\text{Ga}]\text{-21}$. Линкер на основе тирозина выделен зеленым.

Исследование биораспределения на мышях с ксенографтом LNCaP показало высокое и специфическое для ПСМА поглощение опухолью $[^{68}\text{Ga}]\text{-24}$ ($11,02 \pm 1,47\% \text{ ID} / \text{ г}$) через 1 час после инъекции. У мышей с ксенографтом PC-3 выявлено низкое поглощение опухолью ($0,96 \pm 0,16\% \text{ ID} / \text{ г}$) через 1 час после введения. Накопление конъюгата другими тканями были несущественным, за исключением селезенки и почек, что ожидаемо, поскольку ПСМА также экспрессируется в тканях этих органов у мышей.

Основываясь на вышеописанных результатах, в дальнейших работах линкер на основе тирозина использован для получения новых конъюгатов и был модифицирован L-глутаминовой кислотой⁷⁵. Данной модификацией авторы намерены добиться улучшения фармакокинетических свойств, снизив липофильность лигандов (**Рисунок 2.25**). Помимо этого, был получен лиганд, линкер которого включает в себя фрагмент только глутаминовой кислоты.

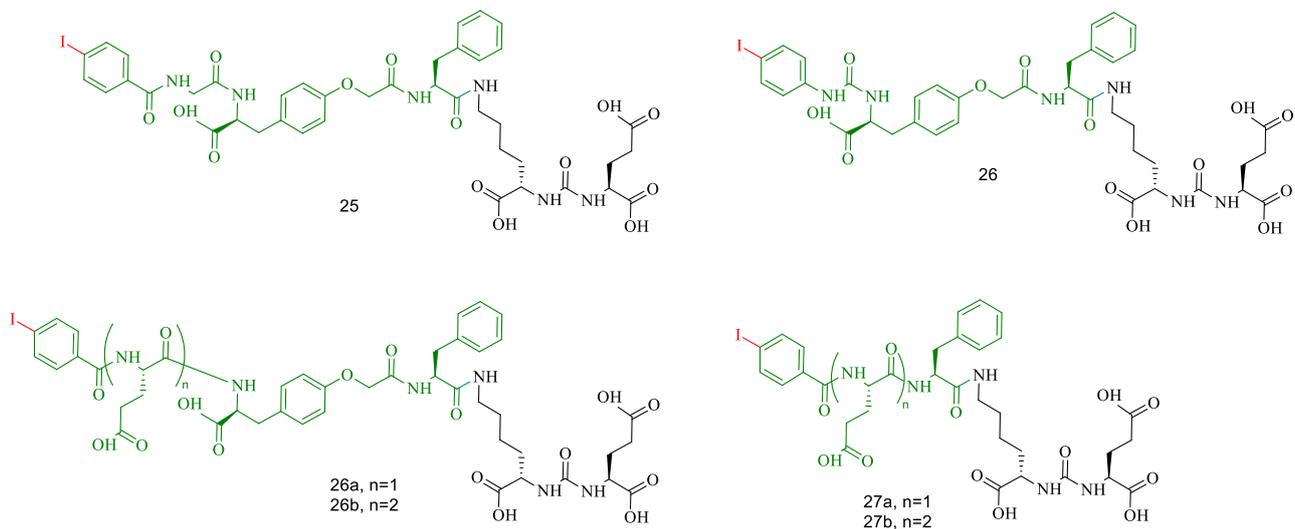


Рисунок 2.25. Структура конъюгатов на основе мочевины DCL (черный) с модифицированным линкером на основе глутаминовой кислоты и тирозина (зеленый) для радиометки ^{125}I (красный).

В *in vitro* испытаниях все соединения показали наномолярные значения IC_{50} (1.33 – 13.00 нМ). *In vivo* испытания на ксенографтных моделях продемонстрировали, что наибольшее накопление в опухолевых клетках PC-3-PIP (ПСМА экспрессирующие), селезенке и почках мышей происходит у конъюгатов ^{125}I **26a/26b** и ^{125}I **27a/27b**, содержащих один или два фрагмента глутаминовой кислоты. Примечательно, что наилучшие результаты по исследованию биораспределения показал конъюгат на основе лиганда **27b**, где тирозиновый фрагмент в линкере был полностью заменен на глутаминовую кислоту. В дальнейшем данная научная группа планирует исследовать влияние глутаминовой кислоты в структуре линкера более подробно. Например, интерес представляет изучение влияния конфигурации и количества подобных фрагментов на биологическую активность.

Из всего многообразия вводимых фрагментов можно выделить несколько, которые показали благоприятное влияние на аффинность и используются на сегодняшний день как устоявшиеся структуры. Например, диагностический конъюгат на основе хелатора DOTA и вектор-молекулы мочевины **PSMA-617**, который является разработкой немецких ученых⁷⁶. В структуру линкера данного конъюгата входит фрагмент нафталина в боковой цепи и 4-(аминометил)циклогесанкарбоксамид (**Рисунок 2.26**).

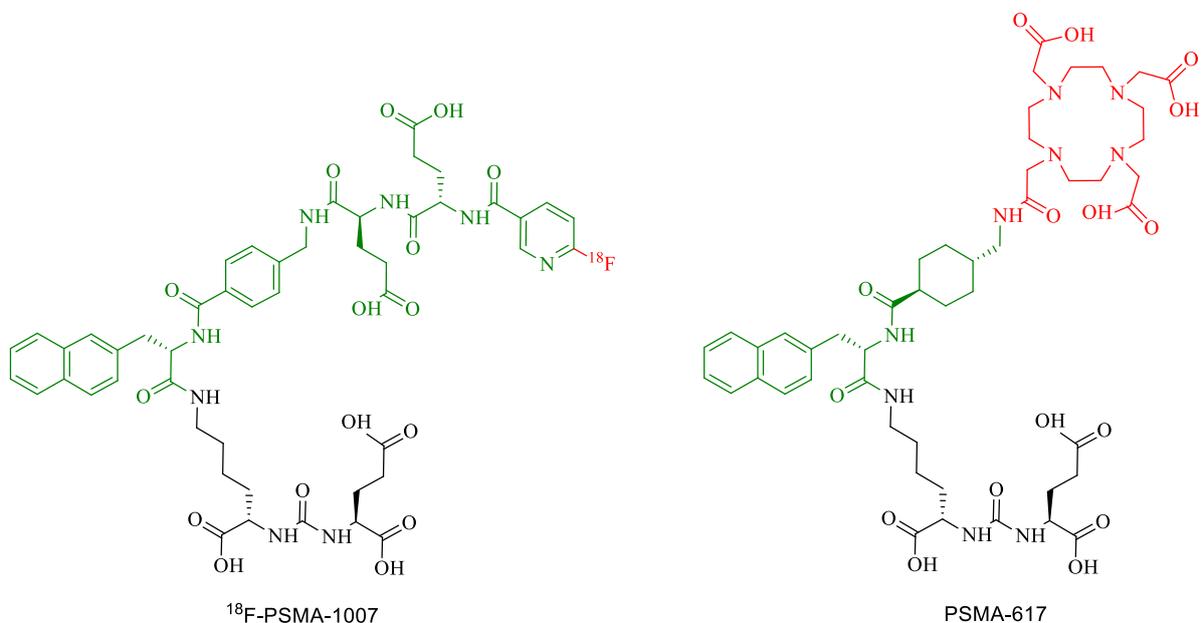


Рисунок 2.26. Структуры диагностических конъюгатов на основе мочевины DCL и хелатирующего агента DOTA - PSMA-617, и с радиометкой ^{18}F - PSMA-1007

Получение конъюгата **PSMA-617** проводилось с использованием твердофазных методов синтеза на 2-СТС (2-хлортритилхлоридной) смоле по стандартным протоколам^{77,78}. Сборку целевой молекулы начинали с фрагмента лизина, защищенного по аминогруппе боковой цепи аллиловым эфиром и Fmoc-защитой по α -аминогруппе **28** (Рисунок 2.27). Далее в структуру вводится *трет*-бутил защищенная глутаминовая кислота, образуя вектор-молекулу мочевины DCL **28b**. Аллиловый эфир удаляется $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$ в метиле с морфолином, освобождая аминогруппу боковой цепи лизина для введения линкера. Далее проводится наращивание пептидной цепочки линкера Fmoc-3-(2-нафталин)-L-аланиновой кислотой **28d** и Fmoc-транексамовой кислотой **28e**. Перед конъюгированием с хелатором DOTA полученный лиганд снимается со смолы трифторуксусной кислотой.

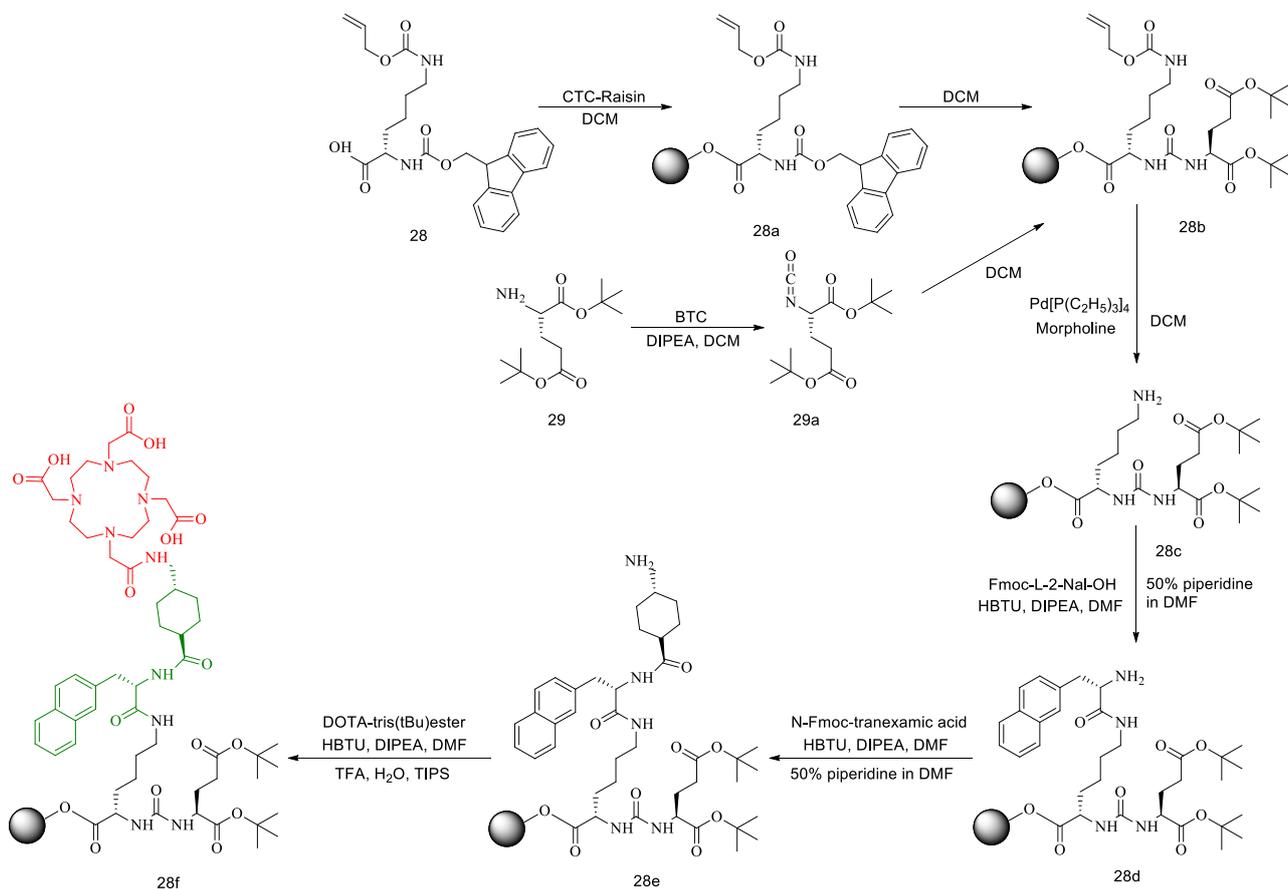


Рисунок 2.27. Твердофазный синтез конъюгата PSMA-617. Лиганд на основе мочевины выделен черным цветом, линкер – зеленым, хелатирующий агент DOTA – красным.

PSMA-617 показал наномолярное сродство на клетках LNCaP ($K_i = 2,34 \pm 2,94$ нМ). Кроме того, активность ингибирования для радиомеченного конъюгата не показала существенной разницы ($K_i = 6,40 \pm 1,02$ нМ для комплекса ^{nat}Ga ; $K_i = 6,91 \pm 1,32$ нМ – комплекса ^{nat}Lu). Данный комплекс также прошел ряд клинических испытаний^{79,80}. Позднее циклогексановый фрагмент транексамовой кислоты был заменен на фрагмент 4-(аминометил)бензойной кислоты - PSMA-1007⁸¹. Синтез проводился аналогично PSMA-617 методом твердофазного синтеза на смоле 2-СТС. По результатам *in vitro* на клеточной линии LNCaP PSMA-1007 также обладает наномолярным ингибированием ($K_i = 6,7 \pm 1,7$ нМ). Целью замены была попытка улучшить биораспределение препарата, а также улучшить его выведение из организма, однако результаты показали, что заметным превосходством PSMA-1007 перед своим аналогом не обладает. Это впрочем не означает, что данный лиганд не является перспективным и не может быть использован в диагностике и визуализации рака предстательной железы⁸¹.

Весьма необычный подход можно наблюдать в конъюгатах, где в качестве линкера была взята нуклеотидная последовательности из трех аденозинов⁸². Обуславливается это тем,

что авторы пытались создать как можно более отрицательно заряженный линкер, при этом необходимо было учесть минимальную оптимальную длину. Так как ПСМА отвечает за каталитическую реакцию расщепления N-ацетиласпартилглутамата, который содержит C-концевой фрагмент глутаминовой кислоты, его активный центр восприимчив к отрицательно заряженным группам. Конъюгат RBI1033 демонстрирует аффинность к PSMA в 10 раз бóльшую, чем его не модифицированный мочевиный аналог ZJ-24 (53.9 нМ) и составляет 4.78 нМ. Модифицированный пропиламином аденозинфосфат вводили в структуру лиганда ПСМА через гетеробифункциональный линкер SMCC (N-сукцинимидил 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate).⁸³ Данный линкер является широко используемым реагентом в конъюгировании и представляет собой структуру, содержащую NHS-эфир для легкого создания пептидной связи с аминами и maleимидовую группу для взаимодействия с тиолами (Рисунок 2.28). Циклогексановое кольцо является связующим звеном между функциональными частями реагента, а также обеспечивает стабильность maleимидной группы^{84,85}.

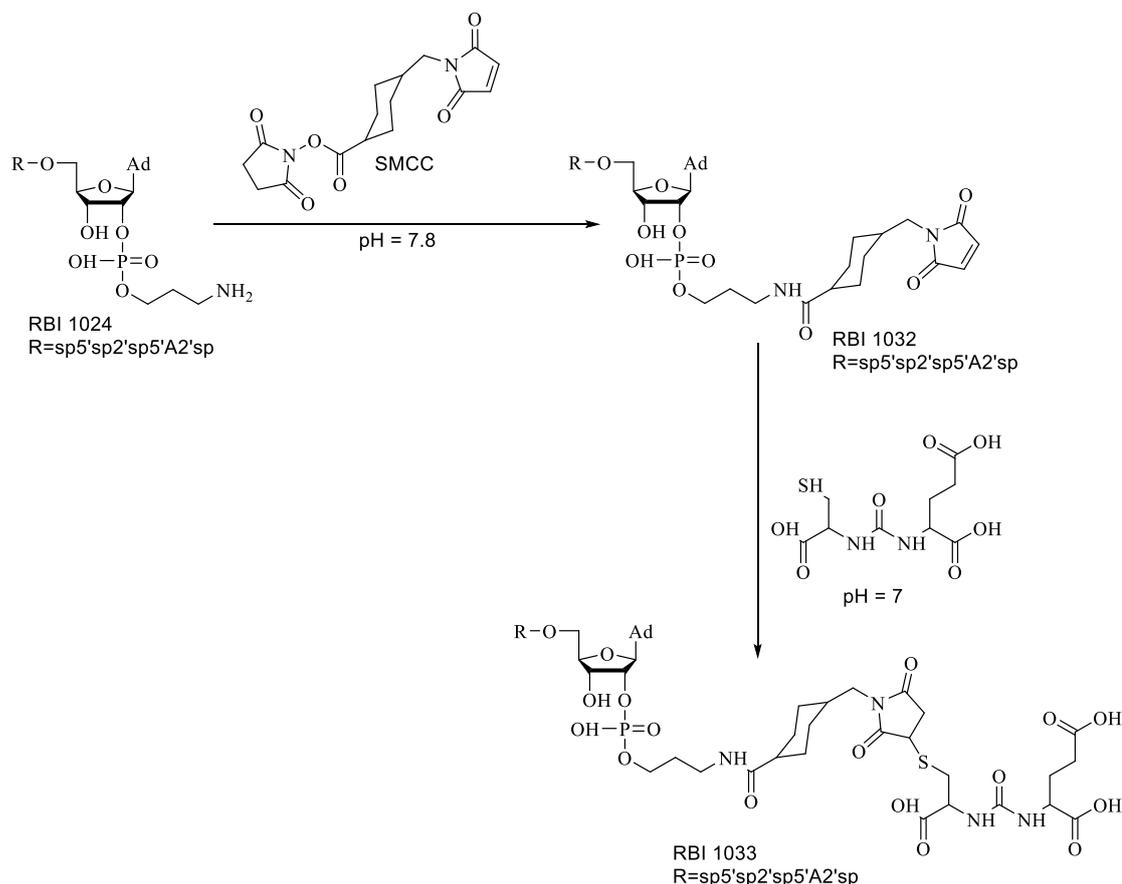


Рисунок 2.28. Синтез лиганда на основе мочевины RBI1033 с помощью линкера SMCC.

Несмотря на «громоздкую» структуру, хорошие результаты RBI1033 подтолкнули на создание новых соединений с довольно массивными отрицательно заряженными линкерами. Например, последовательности из трех фрагментов глутаминовой кислоты, трех фрагментов

тирозина, а также различных комбинаций данных аминокислотных остатков (**Рисунок 2.29**). Синтез пептидных цепочек проводили с помощью твердофазного пептидного синтеза на смоле Wang, конъюгирование с лигандом (Cys-CO-Glu) осуществляли через вышеописанный линкер SMCC.

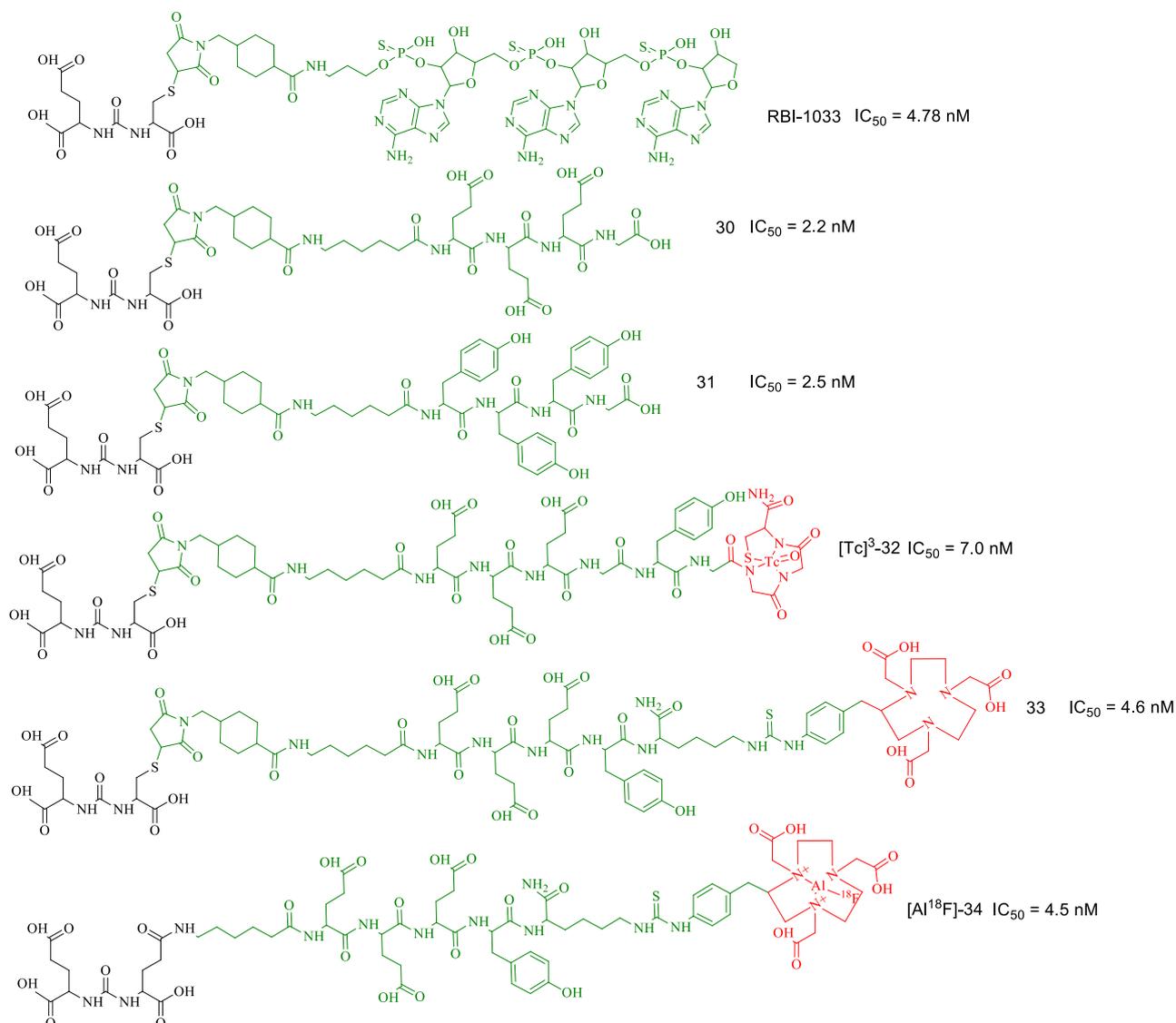


Рисунок 2.29. Структуры конъюгатов на основе мочевины DURA (черный) с линкерами на основе глутаминовой кислоты и тирозина (зеленый) с хелатирующим агентом NOTA (красный).

В результате была получена серия из 5 конъюгатов с хелатирующим агентом NOTA, которые показали сопоставимые значения аффинности (**Рисунок 2.29**). С точки зрения фармакокинетики, наилучшие результаты показал лиганд [Al¹⁸F]-34 (4.58 ± 0.55 %ID/g). Однако, он уступает по накоплению ранее разработанным лигандам: [¹⁸F] DCFPyL (39.4 ± 5.4 %ID/g) и ¹²³I-MIP-1072 ($10 \pm 0,6$ %ID/g)^{86,87}. Авторы связывают это с тем, что из-за улучшения выведения конъюгата почками, часть его не успевает провзаимодействовать с опухолью, а

сразу выводится из организма. Тем не менее, было еще раз продемонстрировано, что введение отрицательно заряженных фрагментов, может быть осуществлено не только без ущерба для биологической активности, но и представляет интерес для дальнейших разработок в данном направлении.

Серия конъюгатов на основе ингибитора мочевины DCL с различной структурой линкеров представлена в работе Банерджи: в одном случае в структуру была введена пептидная цепочка на основе фенилаланина **35**, в другом введен фрагмент тиомочевины **36** (Рисунок 2.30)⁸⁸.

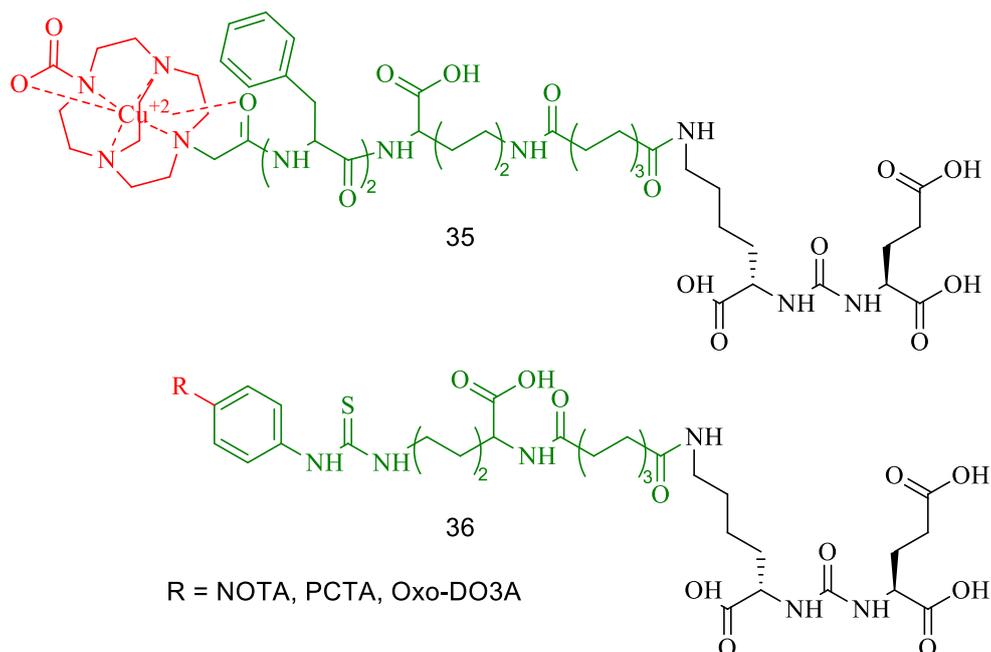


Рисунок 2.30. Структуры конъюгатов на основе мочевины DCL с линкером: а) на основе фенилаланина б) на основе тиомочевины. В качестве хелатирующих агентов выступают а) DOTA б) R = NOTA, PCTA, Oxo-DO3A.

Линкер Phe-Phe-Lys соединения **35** получали твердофазным методом, начиная с остатка лизина, с последующим наращиванием фенилаланиновых остатков. Далее проводилось образование пептидной связи между линкером и хелатирующим агентом СВ-TE2A с помощью активированных эфиров HOBt и HBTU. Конъюгирование с модифицированным лигандом мочевины DCL проводили через модифицированный NHS-эфир вектор-молекулы³⁰. Фрагмент тиомочевины в соединениях получали за счет взаимодействия группы фенилизотионата молекулы хелаторов (NOTA-Bn-SCN, PCTA-Bn-SCN, Oxo-DO3A-Bn-SCN) с аминогруппой линкера вектор-молекулы DCL (Рисунок 2.31).

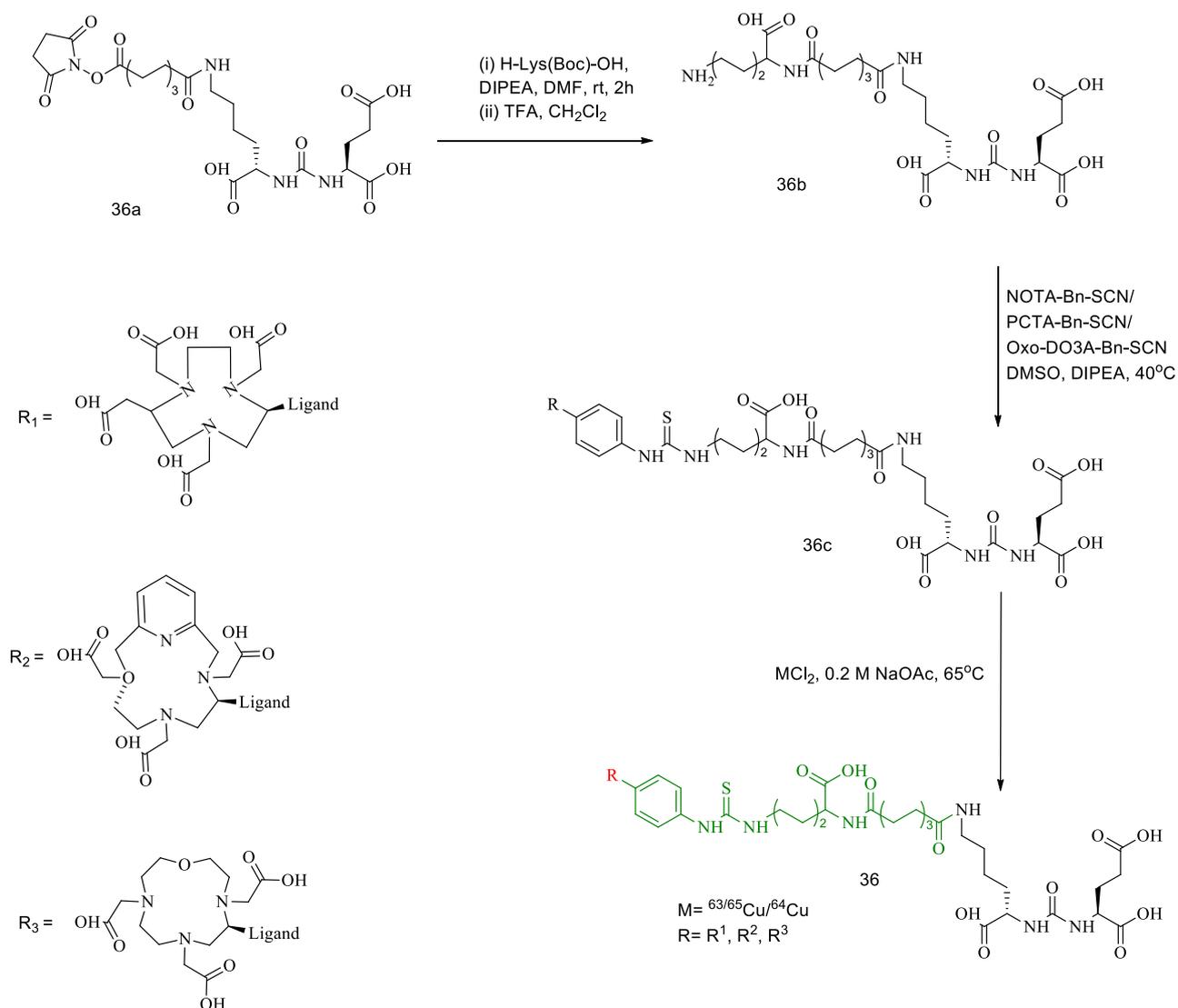


Рисунок 2.31. Синтез конъюгатов на основе мочевины DCL (черный) с линкером с фрагментом тиомочевины (зеленый).

Конъюгаты **36** (Рисунок 2.30) имели меньшие показатели (для всех констант связывания $K_i > 5$ нМ) по сравнению с образцом **35**, который, в свою очередь, имел хорошие параметры связывания с целью ($K_i = 0.19$ нМ без ^{63/65}Cu и 3.98 нМ с ^{63/65}Cu). Данное соединений также продемонстрировало лучшее биораспределение с быстрым клиренсом из нормальных тканей. Благодаря тому, что в системе менялся только линкер, можно смело заявить, что успех заключался в хорошо подобранных полипептидных цепочках линкера. За счет повышения в своей структуре количества фенилаланиновых фрагментов повышались аффинность и эффективность препарата.

Дипептидная цепочка фенилаланил-фенилаланин нашла широкое применение при создании диагностических конъюгатов, в том числе на основе ингибиторов мочевины^{64,61,89,90}.

В ранних работах стереохимия не упоминается вообще и никак не отображена на структурах⁸⁹, в более поздних авторы указывают выбранную конфигурацию остатков фенилаланина^{90,91}. Введение фрагмента обуславливается гидрофобностью туннеля, ведущему к активному центру.

Следующим этапом развития линкеров в структуре лигандов ПСМА на основе мочевины можно отметить решение использовать в линкере алифатические и дипептидные фрагменты одновременно. Одной из целей данного решения является подобрать длину алифатической части так, чтобы введенный за ней дипептидный фрагмент наиболее удачно попал в гидрофобные части туннеля активного центра ПСМА. Как уже было отмечено выше, перегрузка линкера пептидными фрагментами приводит к значительному ухудшению селективности, поэтому алифатическая цепочка вблизи вектор-молекулы становится необходимой. В рассмотренном ниже соединении вектор-молекула представлена модифицированной тиомочевиной. Структура линкера содержит алифатический фрагмент за которым следует дипептидная цепочка фенилаланил-фенилаланин (**Рисунок 2.32**)⁹². Константы связывания полученного соединения K_d на клеточной линии LNCaP составляет 162 нМ, а для линии 22Rv1 164 нМ. В присутствии ингибитора 2-РМРА аффинность соединения значительно ниже, что подтверждает селективное связывание конъюгата с ПСМА.

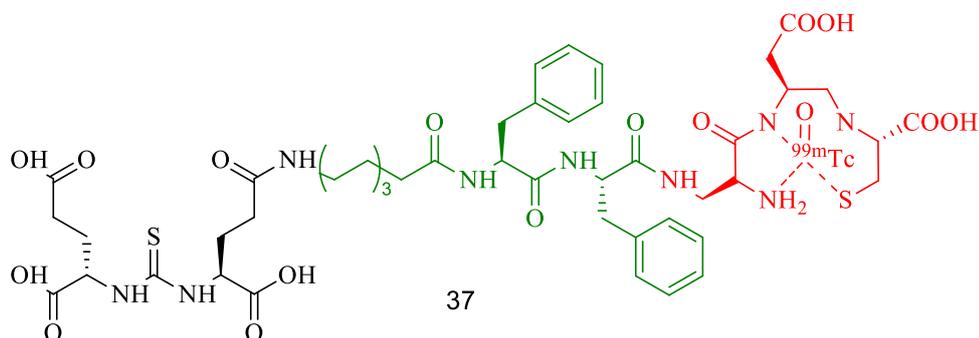


Рисунок 2.32. Структура конъюгата на основе тиомочевины (черный) с линкером, содержащим алифатический фрагмент и дипептидную цепочку фенилаланил-фенилаланин (зеленый).

Такой же подход можно видеть в работе Куларатне. Оптимальное связывание было обнаружено для линкера содержащий два остатка фенилаланина. Отличие от предыдущей работы заключается в том, что в качестве вектор-молекулы используется мочевиная DCL, а не тиомочевина (**Рисунок 2.33**)²². Константа связывания K_d на клеточной линии LNCaP составляет 13.8 нМ, что значительно лучше и доказывает, что кислород в структуре мочевины лучше координируется в активном центре ПСМА, нежели атом серы.

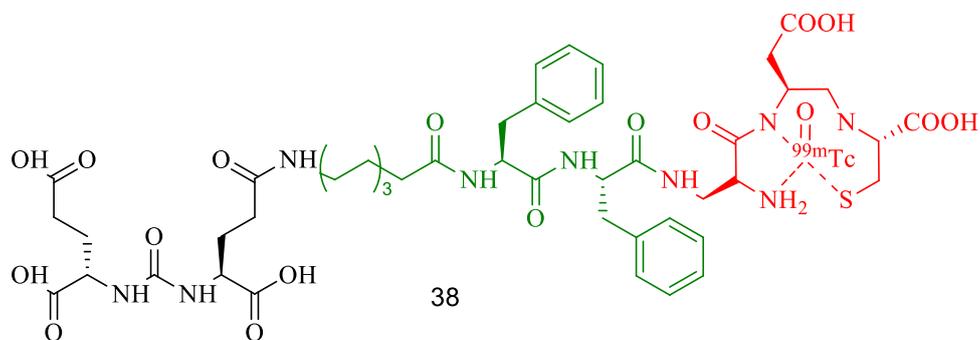


Рисунок 2.33. Структура диагностического конъюгата на основе мочевины DURA с линкером содержащим дипептидную цепочку фенилаланил-фенилаланин.

В следующей работе, которая уже была рассмотрена выше, Куларатне также использовал дипептидную цепочку фенилаланил-фенилаланин в структуре линкера³³. Синтез лиганда проводился твердофазным методом, дипептидная цепочка линкера с С-конца была расширена: для улучшения растворимости в воде, в структуру было добавлено несколько кислотных групп. Однако, стоит отметить, что для оптимального связывания, были использованы аминокислоты, не содержащие ароматические фрагменты, чтобы не сделать структуру слишком громоздкой.

На то что конфигурация хиральных центров аминокислотных остатков может оказывать влияние на фармакокинетические свойства получаемых конъюгатов, обратила внимание научная группа Weineisen. В ее работе были получены лиганды с пептидной последовательностью L-Phe-L-Phe-L-Lys и D-Phe-D-Phe-D-Lys (**Рисунок 2.34**). Синтез дипептидных цепочек традиционно осуществлялся твердофазным синтезом на смоле, формирование пептидной связи между линкером и лигандом проводили через NHS-эфир.

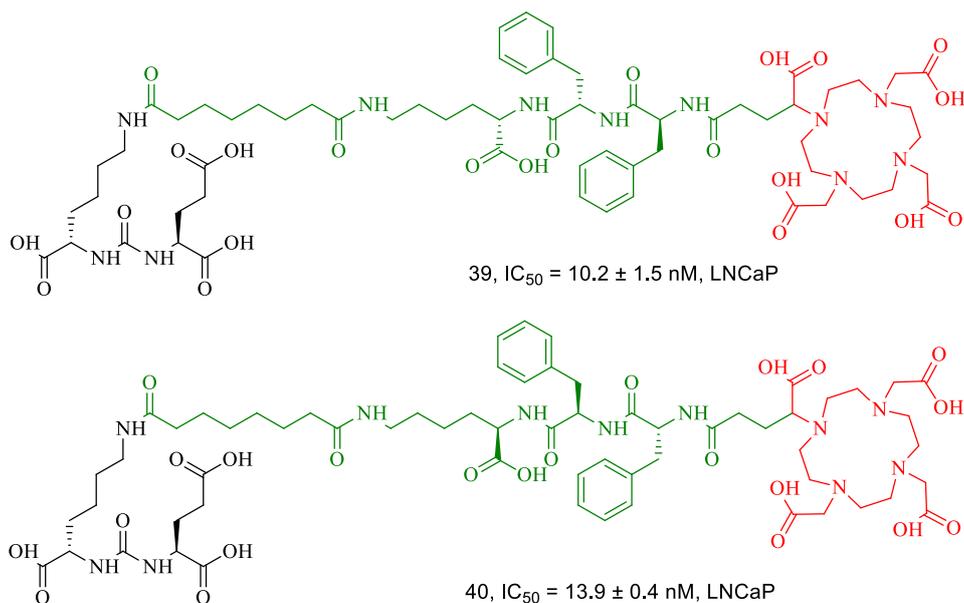


Рисунок 2.34. Структура конъюгатов на основе мочевины DCL с пептидными линкерами различной конфигурации и хелатором DOTA.

Испытания *in vitro* конъюгатов **39** и **40** на клеточной линии LNCaP показали незначительные отличия $IC_{50} = 10.2 \pm 1.5$ нМ и $IC_{50} = 13.9 \pm 0.4$ нМ соответственно. Однако, опираясь на ранее полученные данные, линкеры, содержащие L-аминокислотную последовательность в дипептидной цепочке, были не стабильны и подвергались протеолитическому разложению⁹³. Чтобы решить эту проблему, было предложено сменить конфигурацию хиральных центров, так как природные аминокислоты имеют L-конфигурацию, D-аминокислотная последовательность должна хуже подвергаться протеолизу и быть более стабильной. Как и ожидалось, наибольшую стабильность в кровотоке и лучшее биораспределение показал лиганд с D-аминокислотной последовательностью.

2.3.5 Введение замещенных ароматических фрагментов

Результаты моделирования и исследований показали, что большую эффективность могут принести не только дипептидная цепочка фенилаланил-фенилаланин, но и ее модифицированные аналоги с введенными в ароматическое кольцо такими заместителями как -OH, -Br, -I, -NO₂⁹⁴. Потенциал таких модифицированных линкеров использовали для получения диагностических конъюгатов с хелатирующим агентом DOTA (Рисунок 2.35).⁹⁵ Опираясь на ранее полученные результаты, для синтеза нового линкера была выбрана последовательность из D-аминокислот, где вместо одного из фенилаланинов был взят 3-йод-тирозин.

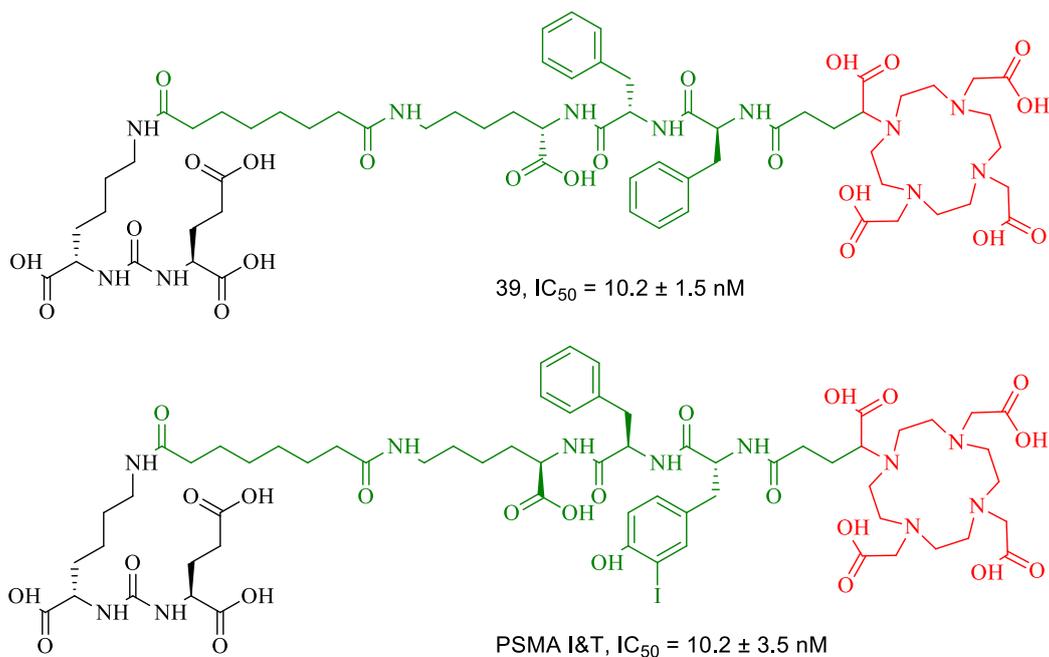


Рисунок 2.35. Структуры конъюгатов на основе мочевины DCL (черный), с пептидным линкером (зеленый) и хелатирующим агентом DOTA (красный).

Результаты биологических испытаний показывают, что введение в тирозин такого заместителя как йод, положительно сказывается на сродстве лиганда к ПСМА ($IC_{50} = 10.2 \pm 3.5$ нМ). Сам лиганд PSMA I&T нашел применение в диагностике рака предстательной железы и проходит клинические испытания, которые показали высокое накопление препарата не только в предстательной железе, но и в его метастазах⁹⁶.

Был разработан аналог PSMA I&T, где последовательность 3-йод-D-Тир-D-Phe- в блоке линкера была заменена на D-Тир-D-2-Nal с целью усилить взаимодействие пептидного линкера с удаленным участком сайта связывания (**Рисунок 2.36**).⁹⁷ Предпочтение, как и в предшествующих аналогах было отдано D-аминокислотам.

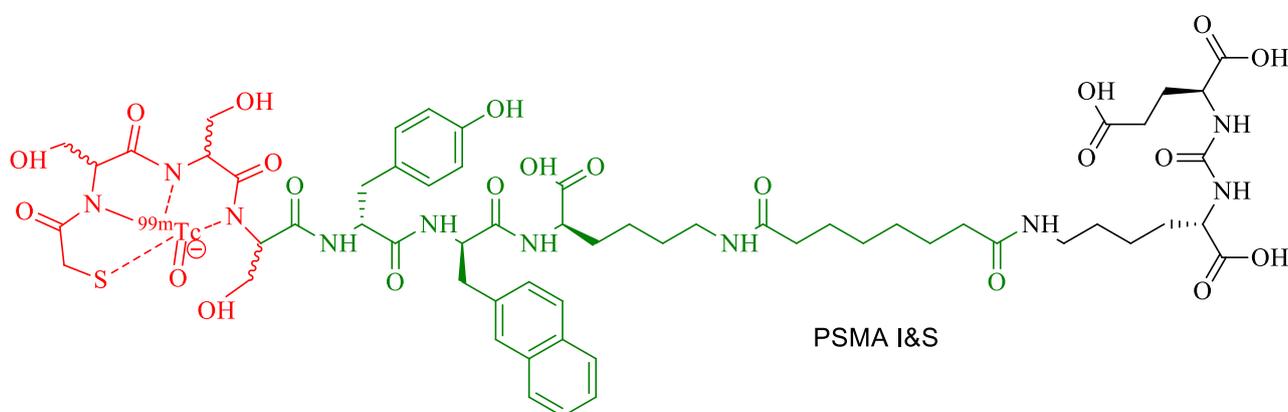


Рисунок 2.36. Структура конъюгата на основе мочевины DCL (черный), пептидным линкером (зеленый), содержащим фрагмент нафталина и хелатирующим агентом MAS₃ (красный).

Клинические испытания показали, что связывание с белками плазмы данного конъюгата ^{99m}Tc-PSMA-I&S более высокое, чем для ¹¹¹In-PSMA-I&T и составляет 94% (против 83%). Данные биораспределения для показывают, что ^{99m}Tc-PSMA-I&S дает в семь раз более высокую концентрацию в крови в течение 1 часа.

Вирцем было проведено исследование различных заместителей (гетероароматические заместители, галогеновые производные тирозина, 4-нитрофенилаланин и другие) в пептидном линкере (**Рисунок 2.37**)^{98,99}.

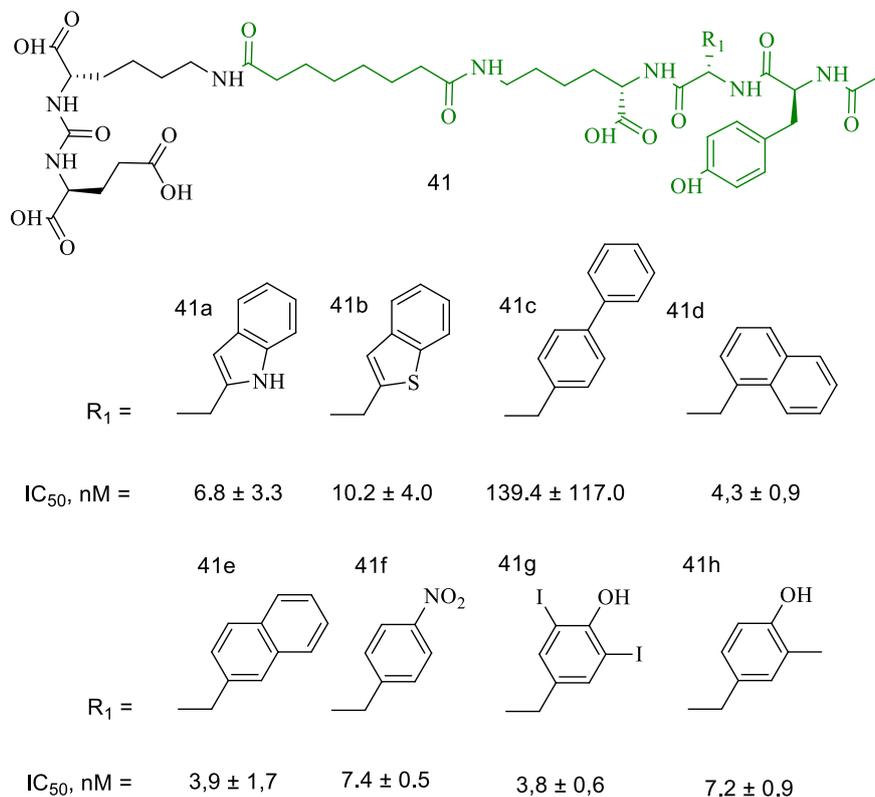


Рисунок 2.37. Структуры конъюгатов на основе мочевины DCL, с различными аминокислотными остатками в пептидной цепочке линкера.

Громоздкий заместитель бифенилаланин в ингибиторе ПСМА **41c** показал самую низкую аффинность ($IC_{50}(\mathbf{41c}) = 139.4 \pm 117.0$) в этой серии, скорее всего, из-за стерического отталкивания в глубокой амфипатической воронке, ведущей к активному центру PSMA. Лиганды содержащие в структуре линкера аминокислоты йод-тирозина **41a**, **41b**, **41f**, **41h** и обладающие лучшей стерической структурой, показали хорошие результаты в связывании с целью, IC_{50} составило от 7 до 10 нМ. Что касается **41d**, **41e**, **41g**, то они продемонстрировали наномолярные показатели аффинности к PSMA ($IC_{50}(\mathbf{41d}) = 4,3 \pm 0,9$; $IC_{50}(\mathbf{41f}) = 3,9 \pm 1,7$; $IC_{50}(\mathbf{41g}) = 3,8 \pm 0,6$) благодаря своим оптимальным размерам ароматических структур и содержанием в них электроноакцепторных заместителей. Помимо выбора оптимального «звена» необходимо еще учесть и его синтез, который может быть сложным и давать низкие выходы, таковым является дийодтирозиновый линкер **41g**.

Примечательно, что это одно из немногих исследований, где проводилось масштабное варьирование непосредственно в одном месте в структуре лиганда. Вектор-молекула во всех случаях представляла собой мочевины DCL, длина и структура остальной части линкера оставались неизменными. В другой подобной работе было проанализировано влияние конфигурации йодированного тирозина и остальных аминокислотных остатков в структуре

линкера¹⁰⁰. Согласно полученным результатам, наименьшую стабильность показал линкер, полностью содержащий аминокислоты L-конфигурации.

С целью продемонстрировать возможность дополнительных модификаций лиганда PSMA-I&T в поисках наилучшего фармакологического профиля был получен лиганд, содержащий два йод-замещенных тирозиновых фрагмента в линкере – PSMA I&F (Рисунок 2.38)¹⁰¹.

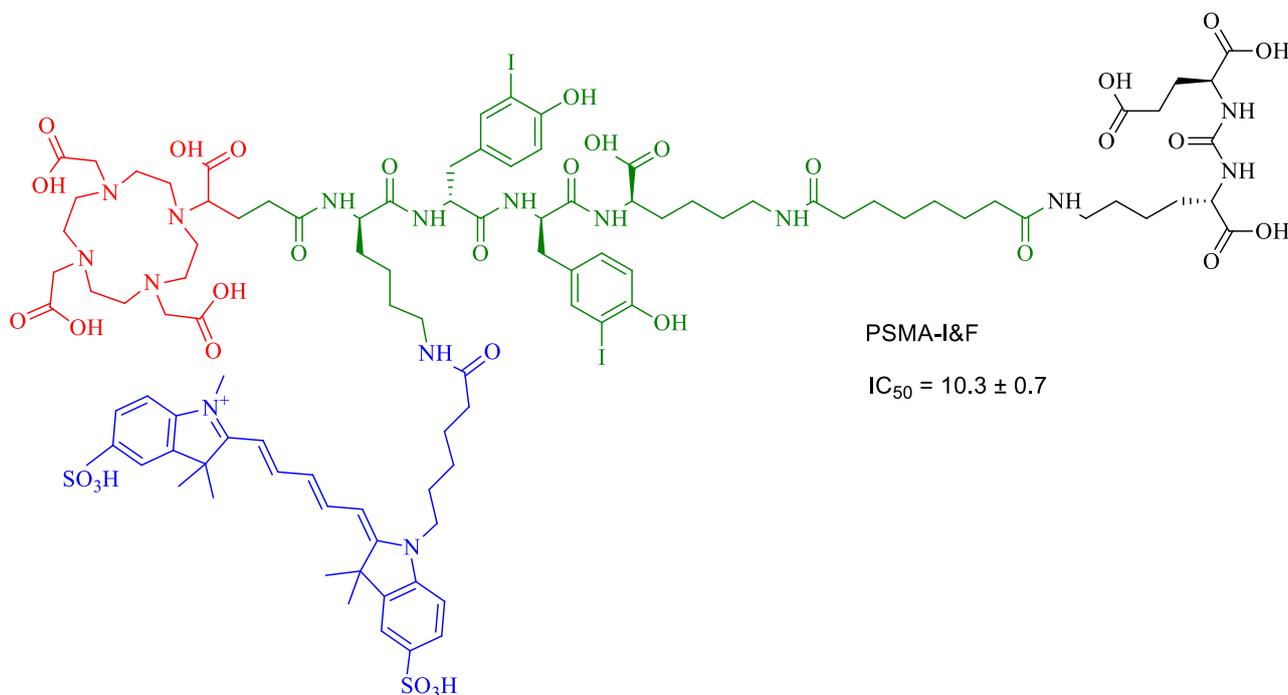


Рисунок 2.38. Структура конъюгата PSMA-I&F на основе мочевины DCL (черный) с хелатирующим агентом DOTA (красный) и флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5 (синий).

Стандартное испытание *in vitro* на клеточной линии LNCaP показало практически идентичные значения IC_{50} для PSMA-I&T и PSMA-I&F: 10.2 ± 3.5 нМ и 10.3 ± 0.7 нМ соответственно. ⁶⁸Ga- и ¹⁷⁷Lu- меченые аналоги показывали аналогичные результаты, не теряя эффективности, что является хорошим показателем, так как для некоторых соединений введение метки сильно ухудшает значения аффинности. Со стороны фармакокинетических параметров PSMA-I&F показал более медленное выведение из организма нежели PSMA-I&T, помимо этого наблюдалось достаточно заметное накопление конъюгата в почках. Впрочем, PSMA-I&F селективно накапливается в ксенотрансплантатах LNCaP и в целом показал целесообразность создания модифицированных аналогов PSMA-I&T.

2.4. Конъюгаты ПСМА для диагностики рака предстательной железы

Как уже отмечалось выше, конъюгат представляет собой макромолекулу, в структуре которой объединены молекулы с различной функциональной нагрузкой. Доставляемая молекула может представлять собой хелатирующий агент, для создания конъюгатов с

различными радиометками (для ПЭТ/КТ, ПЭТ/МРТ, ОФЭКТ диагностики¹⁰²⁻¹⁰⁴), флуоресцентную метку (для интраоперационной визуализации¹⁰⁵), или терапевтический агент (для устранения опухолевых тканей^{106,107}).

2.4.1. Конъюгаты с радионуклидными метками

На данный момент существует 2 основных способа диагностики онкологических заболеваний с помощью радионуклидных препаратов: однофотонная эмиссионная компьютерная томография и позитронно-эмиссионная томография. Как правило, данные методы сопряжены с компьютерной томографией¹⁰⁸. Главным отличием этих методов друг от друга это детектируемые сигналы. Первый метод основан на γ -излучающих радионуклидах: ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, и др.^{109,110}, второй на радионуклидах, излучающих позитроны: ^{18}F , ^{11}C , ^{68}Ga и др.¹¹¹ Конъюгаты ПСМА на основе мочевины существуют для обоих методов, многие из них проходят клинические испытания.

Компания Novartis провела III фазу клинических испытаний [^{177}Lu]-PSMA-617 и уже получила одобрение FDA^{112,113}. Оценивалась эффективность и безопасность [^{177}Lu]-PSMA-617 у пациентов с распространенным ПСМА-положительным метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы. К настоящему времени получены и разрабатываются другие ПСМА-направленные конъюгаты, некоторые из которых также проходят клинические испытания. Например, ^{68}Ga -PSMA-11, который представляет собой конъюгат с хелатирующим агентом для визуализации рака простаты с помощью ПЭТ/КТ или ПЭТ/МРТ, был широко изучен на различных группах пациентов¹¹⁴⁻¹¹⁶. Недавно он был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA)¹¹⁷. Кроме того, конъюгаты $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PSMA-I&S (NCT04857502), [^{111}In]PSMA-I&T (NCT04300673), ^{18}F -PSMA-1007 (NCT04644822), ^{18}F -PSMA-11 (NCT0391131) и ^{68}Ga -PSMA-I&T в настоящее время проходят клинические испытания⁹⁵. Также недавно был одобрен FDA Pilarify [^{18}F]-DCFPyL¹¹⁸.

Имя конъюгата	Стадия испытания	Линкер	Тип мочевины	Хелатор/Диагностический агент	(NCT)
[^{68}Ga]-PSMA-11	Фаза II Фаза III Одобрен FDA	Алифатический	DCL	Хелатор HBED-CC	NCT03803475
[^{18}F]-PSMA-11	Фаза III	Алифатический	DCL	Хелатор HBED-CC	NCT03911310

Имя конъюгата	Стадия испытания	Линкер	Тип мочевины	Хелатор/Диагностический агент	(NCT)
[⁶⁸ Ga]-PSMA-617	Фаза II	Нафталин в боковой цепи и 4-(аминометил)-циклогексанкарбоксамид	DCL	Хелатор DOTA	NCT03604757
[¹⁷⁷ Lu]-PSMA-617	Фаза III Одобрено FDA	Нафталин в боковой цепи и 4-(аминометил)-циклогексанкарбоксамид	DCL	Хелатор DOTA	NCT03511664
[²⁵⁵ Ac]-PSMA-617	Фаза I	Нафталин в боковой цепи и 4-(аминометил)-циклогексанкарбоксамид	DCL	Хелатор DOTA	NCT04597411
[¹⁸ F]-PSMA-1007	Фаза II Фаза III	Нафталин в боковой цепи и 4-(аминометил)-циклогексанкарбоксамид	DCL	Радиомерка ¹⁸ F	NCT04644822
[¹⁷⁷ Lu]-PSMA-I&T	Фаза I Фаза II	Алифатический с полипептидной цепочкой Lys-D-Phe-D-Tyr(3-I)	DCL	Хелатор DOTA	NCT04886986
[¹¹¹ In]-PSMA-I&T	Фаза I Фаза II	Алифатический с полипептидной цепочкой Lys-D-Phe-D-Tyr(3-I)	DCL	Хелатор DOTA	NCT04300673
[^{99m} Tc]-PSMA-I&S	Ранняя фаза I	Алифатический с полипептидной цепочкой D-Tyr-D-2-Nal	DCL	Хелатор DOTA	NCT04857502
[¹²³ I]-MIP-1072	Фаза I	Бензильный фрагмент	DCL	Радиомерка ¹²³ I	NCT00712829
[¹²³ I]-MIP-1095	Фаза I	Фрагмент мочевины	DCL	Радиомерка ¹²³ I	NCT00712829
[¹⁸ F]-DCFPyL	Фаза III Одобрено FDA	Пиримидин	DCL	Радиомерка ¹⁸ F	NCT04390880
[¹⁸ F]-DCFBC	Фаза I Фаза II	Бензильный фрагмент	Glu(O)Cys	Радиомерка ¹⁸ F	NCT01815515

Таблица 2.1. Конъюгаты ПСМА на основе мочевины, находящиеся в стадии клинических испытаний.

Как можно видеть из представленной **таблицы 2.1**, большинство дошедших до клинических испытаний конъюгатов были синтезированы на основе мочевины DCL. Это может быть связано с удобством модификации аминогруппы лизина.

Структура и получение некоторых конъюгатов для ПЭТ/КТ визуализации, таких как [^{18}F]-DCFBC, ^{125}I -DCIT, ^{11}C -DCMC и др. уже были рассмотрены. Маленький размер, вводимых радиометок позволял создавать низкомолекулярные лиганды без дополнительной модификации структуры вектор-молекулы. В дальнейшем, с введением хелаторов, позволяющих вводить объемные радионуклиды, были получены конъюгаты модифицированные линкерами со специально подобранной структурой и свойствами.

На основе ранее рассмотренного лиганда PSMA-I&T был получен конъюгат с хелатирующим агентом DOTA и ^{111}In в качестве радионуклида.¹¹⁹ Хорошие результаты на ПСМА-положительной клеточной линии LNCaP ($\text{IC}_{50} = 7.5 \pm 1.5$ нМ) позволили перейти данному конъюгату на испытания *in vivo*. Было проведено исследование накопления данного препарата в опухоли по отношению к крови, почкам, мышечной ткани и кишечнику.

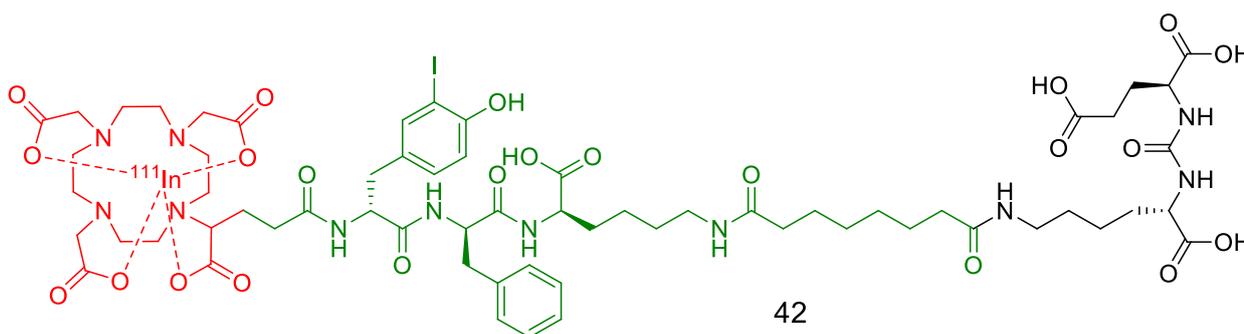


Рисунок 2.39. Структура конъюгата PSMA-I&T на основе лиганда DCL (черный), содержащего радионуклид ^{111}In (красный).

^{111}In -PSMA-I&T показывает высокую избирательность накопления в опухолевых клетках. Соотношение сигнала опухоль/здоровая ткань составляет: 53 ± 8 (для кишечника), 43 ± 6 (для мышечной ткани) и т.д. Такая селективность дает возможность диагностировать субсантиметровые новообразования, что сильно расширяет возможности интраоперационной хирургии¹²⁰.

Однако, радиоконъюгаты могут применяться не только для диагностики онкологического заболевания, но и для его лечения. Большое количество таких конъюгатов получено на основе лиганда PSMA-617. В 2016-ом году был получен и применен в клинических испытаниях конъюгат ^{255}Ac -PSMA-617, терапевтическое действие которого основано на α -распаде изотопа актиния ^{255}Ac .¹²¹ Данный препарат был применен на пациентах

с метастатическим раком предстательной железы в последней стадии для которых были исчерпаны традиционные методы лечения. После двух месяцев лечения уровень ПСА (простатический специфический антиген) пациентов падал на порядки (например, с более чем 3000 нг/мл до 0,26 нг/мл). Терапия на основе α -распада является многообещающей, так как может нарушать резистентность к лечению на основе β -распада (проблема, с которой сталкивается конъюгат $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$)¹²². К недостаткам $^{255}\text{Ac-PSMA-617}$ можно отнести труднодоступность в получении радионуклида ^{255}Ac , а также попадание в организм продуктов его распада. Тем не менее, авторы статьи воодушевлены полученными результатами и проводят дальнейшие исследования, показывающие хорошие результаты¹²³.

Также в последнее время при лечении рака предстательной железы начинают использовать радионуклиды тербия: ^{161}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb и др. Отличительной особенностью тербия является то, что его можно использовать, как для лечения РПЖ, так и для его визуализации. Здесь также, как и в вышеописанном случае ^{255}Ac , применение нашел PSMA-617. $^{161}\text{Tb-PSMA-617}$ был значительно эффективнее по отношению к клеточной линии PC-3 PIP (PSMA экспрессирующая) по сравнению с $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$. Средняя поглощенная энергия опухолевых клеток (МТТ-анализ) была в 3,2 – 4,2 раза выше у радионуклида тербия¹²⁴.

Таким образом мы видим большое разнообразие радиоконъюгатов селективно направленных на рак предстательной железы, причем большое количество из них дошло до клинических испытаний, показывая весьма перспективные результаты. В большинстве из них применяются лиганды на основе мочевины, модифицированные линкерами различной сложности. В частности широко применяются подробно разобранные лиганды PSMA-617 и PSMA I&T¹²⁵.

2.4.2. Конъюгаты с флуоресцентными красителями

Одним из главных недостатков радиофармпрепаратов являются проблемы, связанные с получением, хранением и временем жизни радионуклидов, а также с продуктами их распада. Альтернативным методом интраоперационной визуализации злокачественных новообразований стало использование флуоресцентных красителей¹²⁶. Преимуществами данных препаратов являются: длительность хранения, скорость обнаружения, отсутствие радиоактивности, низкая дозировка.¹²⁷ Оптимальными длинами волн испускания и поглощения являются интервалы от 650 до 900 нм и от 1000 до 1350 нм. Это связано с тем, что при создания диагностических конъюгатов на основе флуоресцентных красителей необходимо попадать в окна прозрачности биологических тканей, чтобы избежать влияния автофлуоресценции органов и тканей.¹²⁸

Модификация лиганда под тот или иной флуоресцентный краситель также как и в случае радионуклидов сильно зависит от размера метки. Если метка достаточно компактна и не становится препятствием для проникновения лиганда в туннель активного центра ПСМА, то можно обойтись без длинного линкера со сложной структурой, а присоединить метку непосредственно к вектор-молекуле. К тому же в таком случае, становится возможным применение флуоресцентных красителей, чувствительных к своему молекулярному окружению (молекулярные роторы)^{129,130} и способных активироваться, взаимодействуя с остатками, которые выстилают входную воронку ПСМА¹³¹. Такой пример мы можем видеть в недавней работе Zhang, где в качестве лиганда была взята мочевиная DCL, а в качестве действующих агентов взяты метки ODAF-436, ODAF-490 и Glu-490 (**Рисунок 2.40**)¹³².

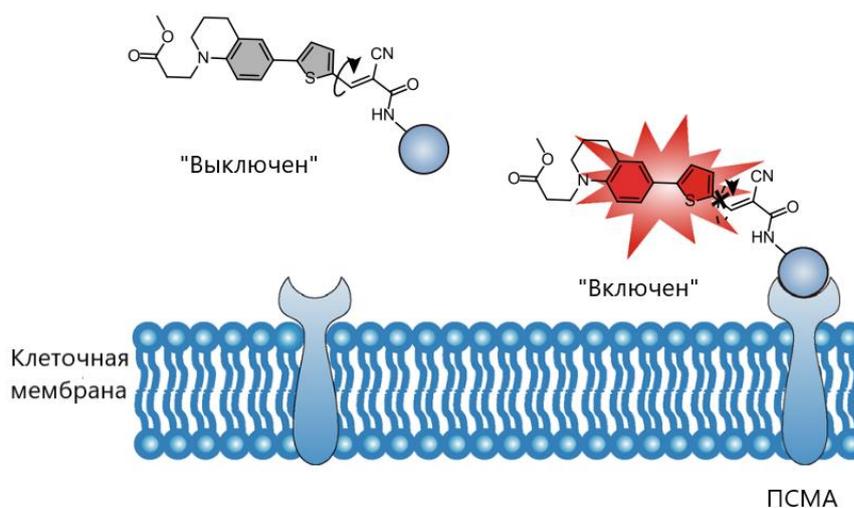


Рисунок 2.40. Схема работы молекулярных роторов при взаимодействии с ПСМА¹³²

Главным преимуществом таких конъюгатов является то, что флуоресценция активируется только после связывания с белком-мишенью, и это дает очень высокую контрастность визуализации. Помимо этого, соединения показывают, очень высокую аффинность (63-118 пМ) на клеточных линиях LNCaP и 22Rv1. Однако, на данный момент имеются сложности в фармакологическом профиле *in vivo*, где основное накопление происходило в почках или печени. На данный момент ведутся исследования по решению данной проблемы.

Как и в случае с хелаторами, при использовании массивных и объемных красителей возникает необходимость развести вектор-молекулу и биологически активное вещество, на расстояние позволяющее связаться лиганду с активным центром ПСМА.

Одни из первых флуоресцентных конъюгатов со сложной структурой линкера были получены в 2005 году. Однако, в качестве вектор-молекулы были взяты аналоги переходного состояния.¹³³ В дальнейшем, когда были хорошо изучены низкомолекулярные ингибиторы на

основе мочевины, были получены конъюгаты с метками IRDye800 и Cy5.5 (**Рисунок 2.41**). В основу лиганда легла мочевиная DUPA, которую модифицировали циклогексиновым фрагментом, с последующим введением трипептидной цепочки.¹⁰⁵

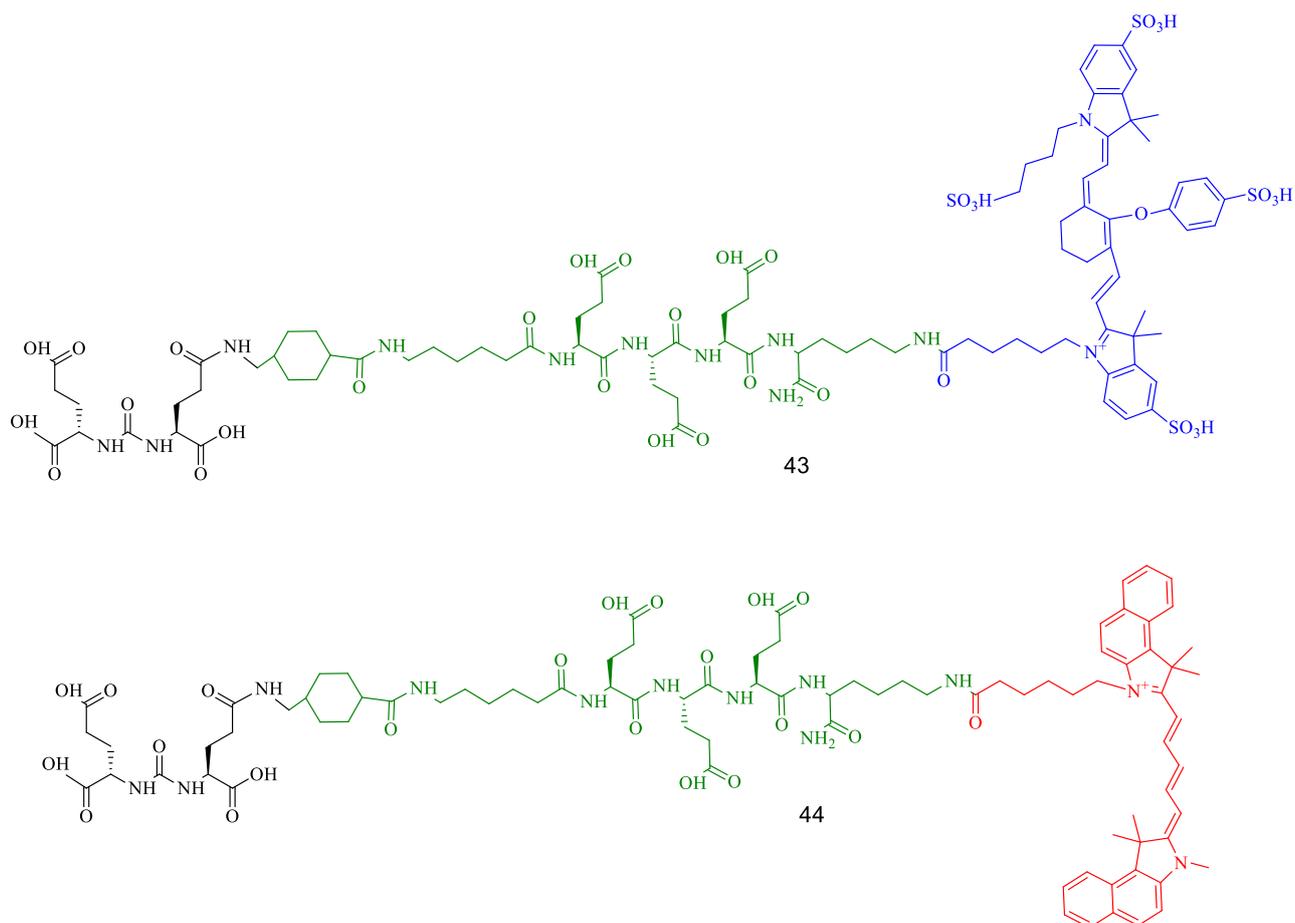


Рисунок 2.41 Структуры конъюгатов на основе вектор-молекулы DUPA (черный) и флуоресцентными красителями IRDye800 (голубой) и Cy5.5 (красный)

Лучшую аффинность показал конъюгат **43** с флуоресцентной меткой IRDye800, у которого значение IC_{50} составило 1.53 ± 0.14 нМ. Однако и конъюгат **44** с меткой Cy5.5 показал высокую аффинность ($IC_{50} = 2.07 \pm 0.13$ нМ). Это показывает, что лиганд с трипептидным линкером хорошо связывается с активным центром ПСМА и полученные конъюгаты могут быть взяты на испытания *in vivo*. Исследования проводились на мышах с привитыми ксенографтами ПСМА положительных (PC-3-PIP) и отрицательных (PC-3-FLU) линий. Подробно изучались печень, почки, опухоли, сердце и мочевого пузыря. Как конъюгат **43**, так и конъюгат **44** показали отличную селективность связывания с ПСМА-положительными опухолями PC-3-PIP с более чем 10-кратной разницей накопления между опухолями PC-3-PIP и PC-3-FLU. Из-за разницы в полярности (IRDye800 содержит на 3 отрицательно заряженные сульфатные группы больше, чем Cy5.5) препараты имеют разный фармакокинетический профиль. Максимальная концентрация в опухоли PC-3-PIP конъюгата **43** достигается через 4

часа после введения, в то время для конъюгата **44** через 24 часа. Выведение конъюгатов происходит через почки. Конъюгат **43** с флуоресцентной меткой IRdye800 довольно быстро вымывался из опухоли за 24-120 часов. В отличие от этого, конъюгат **44** с флуоресцентной меткой Cy5.5 остается связанным с опухолью довольно продолжительное время и практически не изменяется в течении 5 дней после введения. Подтверждение высокой аффинности проводили экспериментом с введением конъюгатов и 100 кратной дозы высокоаффинного конъюгата ПСМА ZJ-MCC-Ahx-YYYG⁸². В результате, в обоих случаях практически не наблюдалось визуализации опухолевых тканей, а основное накопление флуоресцентных меток происходило в мочевом пузыре мышей.

Другим из примечательных конъюгатов можно выделить соединение OTL78 на основе мочевины DUPA и красителя S0456¹³⁴. Рассмотрим синтез данного конъюгата (**Рисунок 2.42**). На первом этапе получали Cbz- и tBu-защищённый дипептид **45b**, в последствии с которого удалялась Cbz-защита путем гидрогенолиза. Далее проводилось ацилирование аминогруппы CbzNH-(PEG)₂-COOH, где в качестве активирующего агента был использован HATU **45c**. Далее проводилось получение лиганда с вектором DUPA, с дальнейшим снятием *tert*-бутильных защит с помощью трифторуксусной кислоты. Конъюгирование с красителем S0456 проводили в щелочной среде **45**.

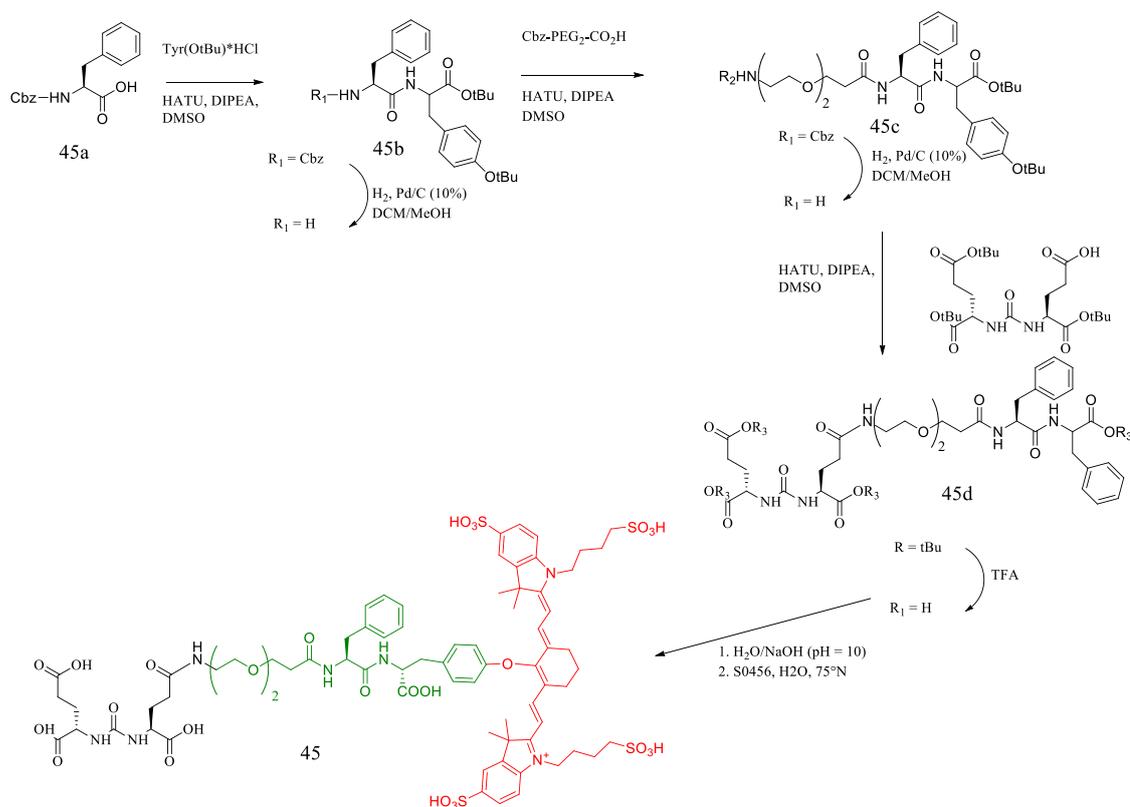


Рисунок 2.42. Синтез конъюгата OTL78

OTL78 показал наномолярную аффинность к ПСМА *in vitro* на клеточной линии 22Rv1 ($K_d = 4.7$ нМ). Испытания *in vivo* показали шестикратно большее накопление на ПСМА-положительной клеточной линии 22Rv1, в сравнении с ПСМА-отрицательными линиями (РС-3 и А549). Период выведения также составил более 48 часов, что делает его пригодным для интраоперационной визуализации.

Как уже рассматривалось в предыдущих главах, большой интерес и хорошие результаты продемонстрировали лиганды, в структуре линкеров которых были включены дипептидные цепочки на основе фенилаланина и его производных (Рисунок 2.43). На основе такого лиганда была получена серия диагностических конъюгатов на основе лиганда мочевины DUPA и меток DyLight680, IR800CW и Alexa Fluor 647¹³⁵.

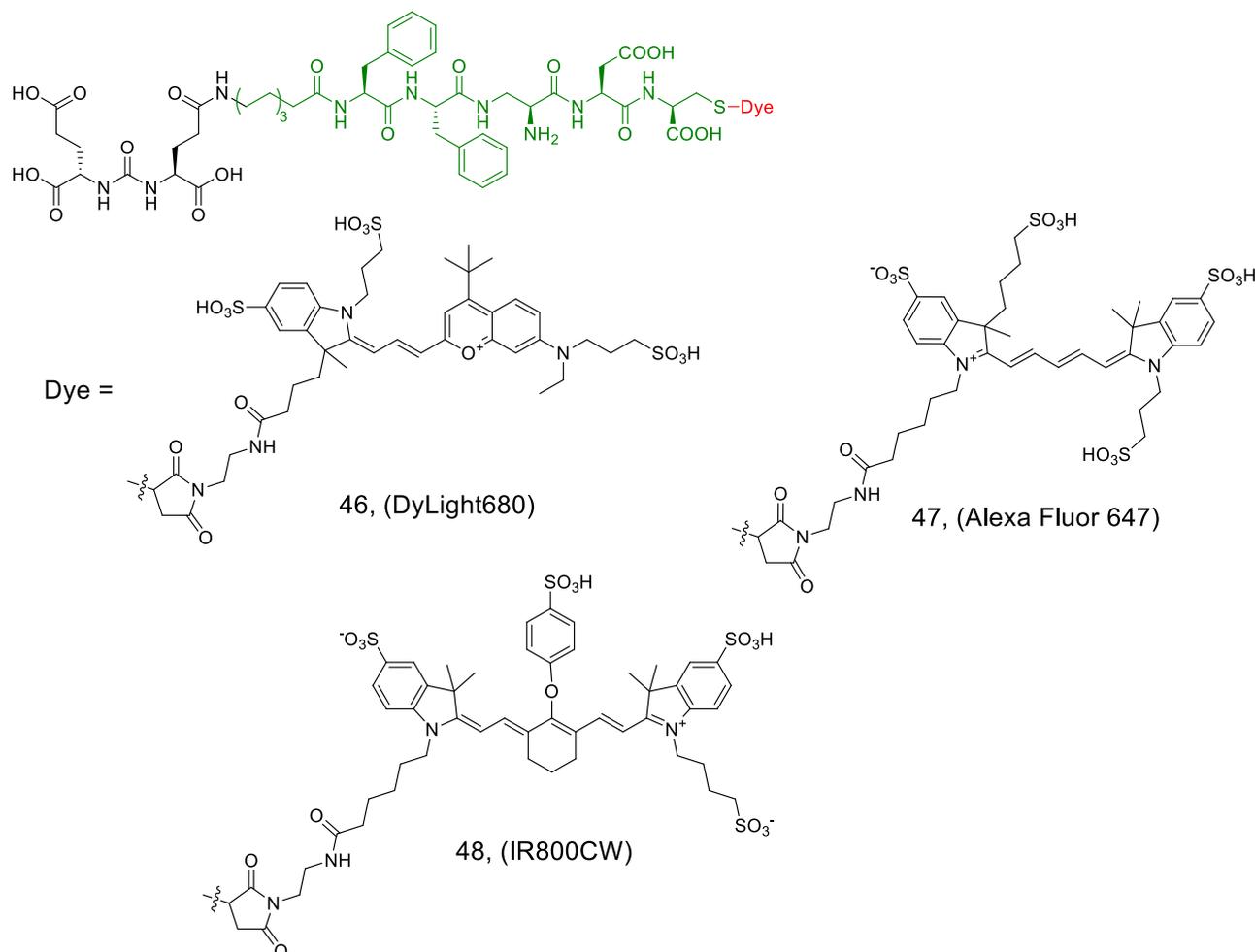


Рисунок 2.43. Структура конъюгатов на основе вектор-фрагмента DUPA и красителей DyLight680, Alexa Fluor 647 и IR800CW

Соединение DyLight680 показало аффинность $K_i = 33$ нМ, Alexa Fluor - 4.5 нМ, IR800CW - 12 нМ. Также были проведены испытания *in vivo*, которые показали возможность визуализации метастазов до 50 мкм с помощью камер высокого разрешения.

Итак, конъюгаты с флуоресцентными красителями представляют собой большой пласт диагностических препаратов для визуализации рака предстательной железы и его метастазов. Они обладают преимуществами относительно радиофармацевтических препаратов, незатруднительны в синтетическом плане и являются перспективной альтернативой конъюгатам с радионуклидами.

2.5. Конъюгаты ПСМА лечения рака предстательной железы

Химиотерапия является важнейшим и одним из основных инструментов лечения онкологических заболеваний наряду с хирургическим вмешательством и радиотерапией. Цель химиотерапии устранить злокачественное новообразование из организма путем нарушения его процессов деления (повреждение ДНК, нарушение процессов митоза, ингибирование репарации ДНК). Тем самым вызывается апоптоз или некроз клеток и уменьшение/удаление опухолевой ткани¹³⁶. Так как лекарственные препараты против рака, по сути являются клеточными ядами, то применение химиотерапии всегда сопровождается выраженными побочными эффектами: нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, выпадение волос, сухость слизистых и др.¹³⁷ Связано это в первую очередь с тем, что у не модифицированных препаратов очень низкая селективность к опухолевым тканям. Снизить побочные эффекты, повысить эффективность проводимого лечения и качество жизни самих пациентов можно, создавая селективные конъюгаты на основе вектор-молекул. Для лечения рака предстательной железы созданы терапевтические конъюгаты на основе мочевины DUPA и DCL, которые будут рассмотрены в этой главе.

Отличием терапевтических конъюгатов от диагностических является то, что при их создании следует обращать внимание не только насколько эффективно будет связываться вектор с ПСМА, но и как именно будет высвобождаться лекарственный препарат. Радионуклиды, связанные с хелатором дают излучение вне зависимости от того расщепился доставленный конъюгат или нет. То же самое относится и к флуоресцентным меткам, модификация которых практически не сказывается на их фотохимических свойствах. Однако, модификация многих лекарственных препаратов может привести к дезактивации, что хорошо и снижает воздействие на здоровые ткани. Но в таком случае, необходимым становится введение расщепляемого линкера, который позволит получить не модифицированный препарат непосредственно в раковой клетке.

Существует два основных класса противоопухолевых препаратов по механизму действия: те, что вызывают некроз клетки – цитотоксические препараты; и те, что вызывают ее апоптоз – антимитотические препараты.

2.5.1. Конъюгаты с цитотоксическими агентами

Одним из распространенных классов цитотоксических препаратов являются координационные соединения платины¹³⁸. На основе мочевины DCL был получен конъюгат с гетероциклическим карбеновым комплексом Pt(II) с азотсодержащими лигандами¹³⁹. Очень важно сохранить геометрию платинового комплекса, для этого в структуру вводится пара-замещенный бензальдегид. Для высвобождения препарата на его основе вводятся линкеры, представляющие собой гидразоны и оксимы. Данные группы обладают большей устойчивостью в кровотоке и дают широкие возможности для модификаций. Представленный на **рисунке 2.44** конъюгат прошел испытания *in vitro* и показал среднюю аффинность к клеточной линии РС-3 РРР.

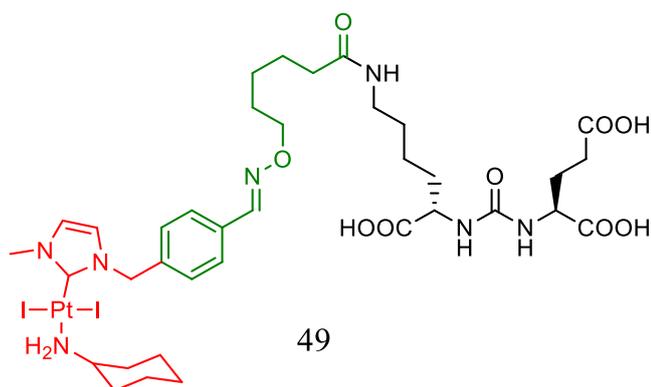


Рисунок 2.44. Структура конъюгата на основе мочевины DCL (черный) с цитотоксическим препаратом из группы платины (красный).

Из недостатков лекарственных препаратов платины можно выделить дороговизну, связанную как с исходными реагентами исходниками, так и со сложностями во время синтеза и очистки получаемых соединений.

Цитотоксические белки Гранзим В и РЕ35 также применялись для создания противоопухолевых конъюгатов против рака предстательной железы¹⁴⁰. Действие данных белков основано как на активации иммунного ответа и атаку Т-лимфоцитами, так и приводит к нарушению основных процессов жизнедеятельности клетки^{141,142}.

В основу конъюгатов легли векторы DCL, модифицированные алифатическими цепочками полиэтиленгликоля. Для конъюгирования с белками был введен фрагмент малеимида, с которым далее образовывалась сульфидная связь (**Рисунок 2.45**).

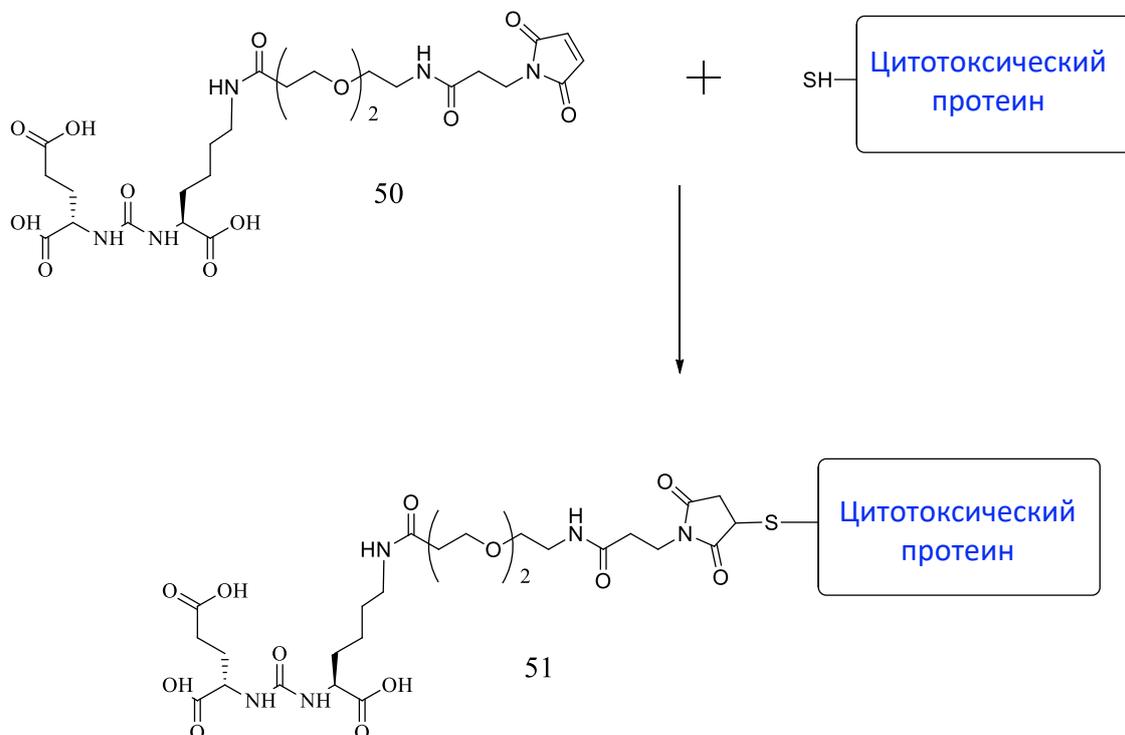


Рисунок 2.45. Конъюгат на основе мочевины DCL с цитотоксическими протеинами

По результатам испытаний *in vitro* на клеточной линии PC-3 PIP, конъюгаты показали хорошие значения аффинности. Для ПСМА-Гранзим В IC_{50} составило 58.7 нМ (для конъюгата сравнения ZI43 оно составляет 1.94 нМ). Более хорошая картина получена для конъюгата ПСМА-PE35, значение IC_{50} достигло 0.9 нМ (для не модифицированного белка 24.9 нМ). Еще лучший результат виден на клеточной линии LNCaP – 0.2 нМ.

Однако, цитотоксические препараты довольно сложны для получения и использования. Помимо этого, сами по себе препараты обладают большой токсичностью, и в случае проблем с высвобождением *in vivo* могут сильно навредить здоровым тканям.

2.5.2. Конъюгаты с антимитотическими агентами

Антимитотические препараты направлены на нарушения процессов митоза клетки. Это может достигаться различными путями, в том числе путем стабилизации микротрубочек или их дестабилизации¹⁴³. Это приводит к невозможности сборки или разборке веретена деления, что вызывает клеточный апоптоз.

Механизм действия препаратов группы антрациклинов заключается во взаимодействии с ДНК, что подавляет ее дальнейшую репликацию. В предыдущей главе уже был рассмотрен конъюгат с доксорубицином на основе алифатического линкера⁶⁰. Позднее, с разработкой линкеров на основе фенилаланина, был получен конъюгат с дипептидной цепочкой Phe-Phe с этим же препаратом⁴⁰.

Препараты ауристатиновой группы ингибируют полимеризацию тубулина, что впоследствии приводит к нарушению образования веретена деления и вызывает гибель клеток¹⁴⁴. Рассмотрим конъюгат на основе мочевины DCL с алифатическим линкером на основе субериновой кислоты¹⁴⁵. В данной статье авторы доказывают необходимость введения в структуру конъюгатов линкеров, обеспечивающих расщепление и высвобождение монометил ауристатина E (Рисунок 2.46).

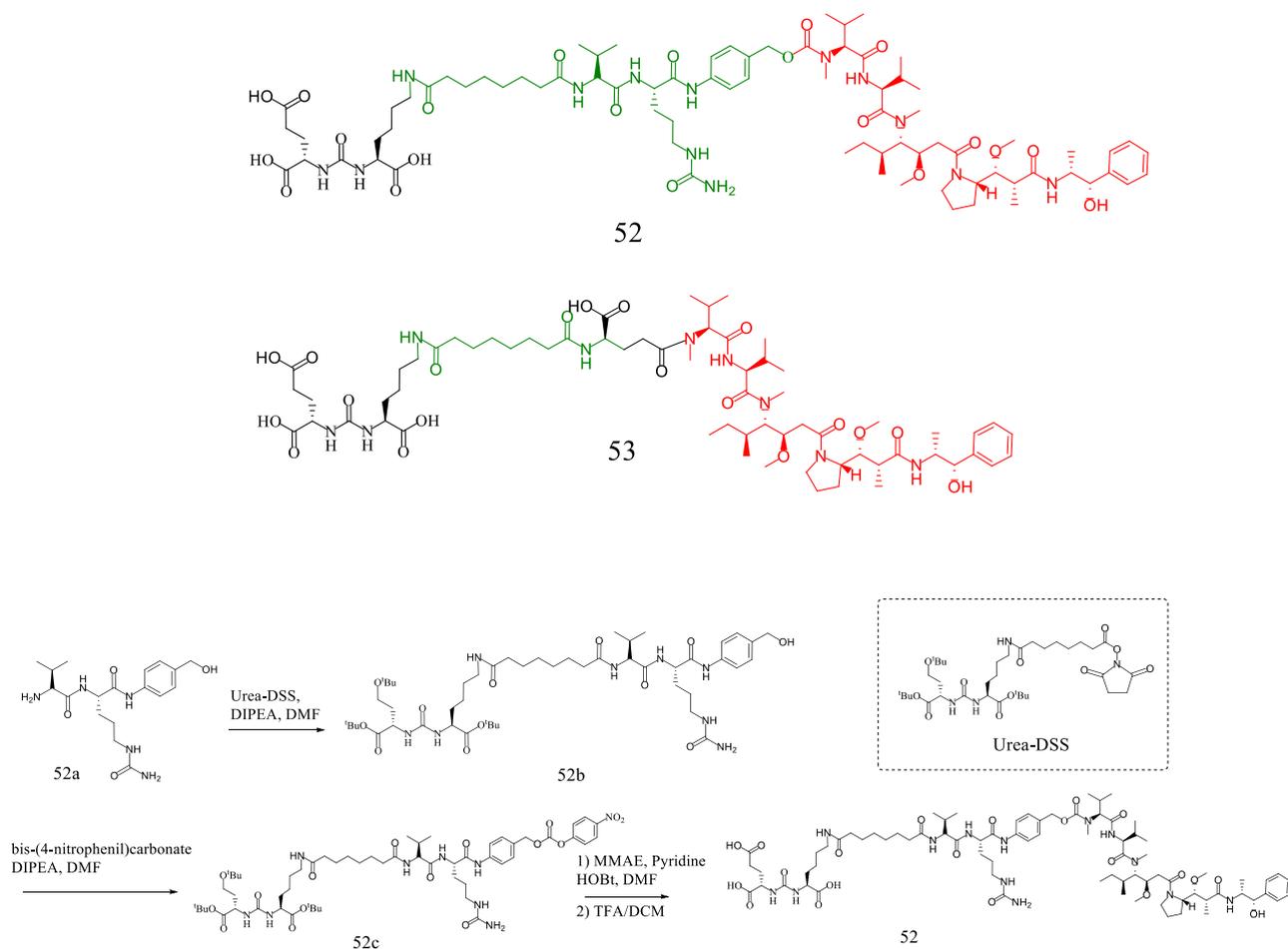


Рисунок 2.46. Структура и синтез конъюгата с монометил ауристатином E на основе мочевины DCL.

Синтез проводили начиная с NHS-эфира субериновой кислоты, которой был модифицирован вектор мочевины DCL. К данному соединению вводили дипептидный фрагмент валил-цитруллина в присутствии DIPEA. Далее в структуру вводится фрагмент п-аминобензилкарбоната (ПАВС), реакцией с бис(4-нитрофенил) карбонатом. Конъюгирование с монометил ауристатином E проводят реакцией образования пептидной связи с активированным эфиром HOBt. Так как для связывания с активным центром ПСМА необходимы открытые карбоксильные группы, снятие трет-бутильных групп проводили трифторуксусной кислотой в метиле.

Конъюгат был протестирован *in vitro* и показал следующие результаты: для 3,9 нМ и 151,1 нМ для PSMA + PC3 PIP и PSMA - PC3 Flu клеток, соответственно; что хорошо показывает селективность препарата. Относительно высокая токсичность на ПСМА отрицательной линии связана с высвобождением некоторого количества ММАЕ, что вызывает неселективную гибель клеток. Конъюгат **53** (без расщепляемого линкера) показывает значения 4,8 мкМ и 5,8 мкМ для PSMA + PC3 PIP и PSMA- PC3 соответственно, что указывает на отсутствие селективности связанной с экспрессией ПСМА. Испытания *in vivo* показали, что модифицированный катепсин В расщепляемым линкером конъюгат обладает выраженной селективностью к ПСМА-положительным ксенографтам PC3-PIP.

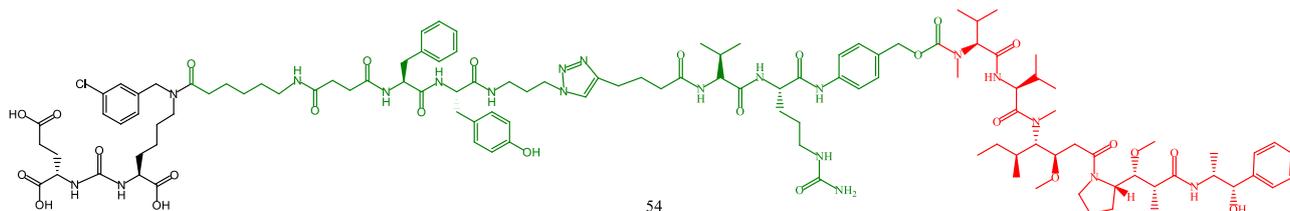


Рисунок 2.47. Структура терапевтического конъюгата с монометил ауристатином Е (красный) на основе мочевины DCL (черный) и линкером, содержащим дипептидную цепочку L-Phe-L-Тур (зеленый).

На **рисунке 2.47** представлен конъюгат со сложным линкером, который состоит из катепсин В расщепляемой части на основе валин-цитруллина и части, содержащей дипептидную цепочку L-Phe-L-Тур, которая отвечает за повышение аффинности¹⁴⁶.

Существуют и другие группы лекарственных препаратов, подходящие для конъюгирования с вектор-молекулами на основе мочевины: группа таксанов, тубулизин В, энзалутамид и др.

Таким образом в литературном обзоре представлен анализ влияния структуры линкера на соотношение структура-активность на аффинность лигандов, селективно связывающихся с простатическим специфическим мембранным антигеном (ПСМА). Подробно изучены основные критерии выбора линкера в зависимости от типа и назначения конъюгата. Большую роль при выборе линкера играют свойства как вектор-молекулы, так и доставляемого биологически активного агента. Так, маленькие по размеру радиометки не требуют сложных структур линкера, и могут введены через короткие алифатические, циклогексановые, бензильные и другие фрагменты.

Массивные структуры диагностических красителей, хелаторов, лекарственных препаратов требуют определенного расстояния от них до вектора, чтобы последний мог беспрепятственно проникнуть в воронкообразный активный центр белка-мишени. При этом появляется возможность вводить в структуру таких линкеров фрагменты, повышающие

аффинность вектора к белку. Наиболее себя зарекомендовали полипептидные цепочки, в том числе дипептидные цепочки на основе фенилаланина и тирозина и их замещенных производных.

Существует огромное количество примеров синтеза данных соединений. Можно видеть тенденцию, что со временем с жидкофазных методов синтеза большое количество ученых перешло на твердофазные методы синтеза. Несомненно, данные методы позволяют упростить синтетическую схему и ускорить время получения заявленных соединений. При конъюгировании стоит учитывать, что помимо подготовки самого лиганда с линкером, иногда может потребоваться модификация доставляемой молекулы. Особенно это актуально для лекарственных препаратов, где помимо стабильности конъюгата в кровотоке, необходимо учитывать способ высвобождения лекарственного препарата в целевой клетке.

Рассмотрены конъюгаты с радионуклидными метками: [^{68}Ga]-PSMA-11, [^{18}F]-PSMA-11, [^{177}Lu]-PSMA-617, [^{18}F]-DCFPyL и др., которые на данный момент проходят клинические испытания, а некоторые уже получили одобрение FDA; конъюгаты с флуоресцентными красителями, призванные снизить количество побочных эффектов, получаемых от облучения радионуклидами. Терапевтические конъюгаты, приведенные в обзоре, представляют собой примеры использования расщепляемых линкеров и их значение для фармакологических свойств всей молекулы.

Таким образом можно заключить, что получение лигандов ПСМА диагностических и терапевтических конъюгатов на их основе является хорошо развиваемым и перспективным направлением лечения рака предстательной железы методом химиотерапии на основе адресной доставки. Создание новых препаратов является важной задачей, направленной на улучшение фармакологического профиля и снижения побочных эффектов.

3. Обсуждение результатов²

В рамках данной работы был проведен синтез серии лигандов селективных к простатическому специфическому мембранному антигену ПСМА. Проведено варьирование дипептидной цепочки в линкере с целью установить влияние положения ароматического кольца, конфигурации аминокислотного остатка и наличия заместителей в ароматических кольцах фенилаланина и/или тирозина на аффинность лиганда (Схема 3.1).

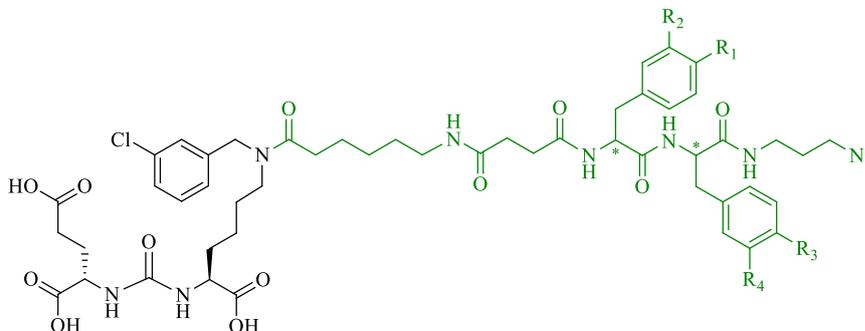


Схема 3.1. Общая структура получаемых лигандов ПСМА на основе мочевины DCL

По результатам испытаний *in vitro* были отобраны лиганды с наилучшими показателями аффинности. На их основе были синтезированы диагностические конъюгаты с флуоресцентным красителем Sulfo-Cy5. По результатам цитофлуориметрии для данных конъюгатов был выбран лиганд, который лег в основу терапевтического конъюгата с монометил ауристатином Е (ММАЕ). Помимо этого, на основе ранее синтезированного лиганда с хорошей аффинностью были получены конъюгаты с Sulfo-Cy7, Sulfo-Cy5 и FAM-5.

Для получения целевых соединений в работе последовательно решались следующие задачи:

- 1) Получение ПСМА-вектора с мета-хлорзамещенным фрагментом при атоме лизина (Раздел 3.1. Схема 3.3)
- 2) Синтез дипептидных цепочек на основе глицина, фенилаланина, тирозина методами жидкофазного и твердофазного синтеза (Раздел 3.2 Схема 3.4 и Схема 3.12)
- 3) Синтез лигандов ПСМА на основе полученных дипептидных цепочек (Раздел 3.3 Схема 3.10 и Схема 3.15)
- 4) Исследование *in vitro* полученных лигандов и установление закономерностей о влиянии линкера на аффинность (Раздел 3.4 Таблица 3.1)

² 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: Нищенко Екатерина Алексеевна (Специалист)

- 5) Получение диагностических конъюгатов с флуоресцентными красителями путем [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения и исследование их физико-химических свойств, а также исследования серии конъюгатов *in vivo* (Раздел 3.5 Схема 3.22 – 3.23)
- 6) Получение терапевтического конъюгата с антимитотическим препаратом монOMETИЛ ауристатином E (ММАЕ) и исследование его цитотоксичности (Раздел 3.5 Схема 3.24)

3.1. Получение исходной вектор-молекулы на основе мочевины DCL

В качестве вектор-молекулы была взята трет-бутилзащищенная мочевина DCL, модифицированная мета-хлор замещенным фрагментом при атоме азота лизина, а также с введенным алифатическим фрагментом 6-аминогексановой кислоты (Схема 3.2).

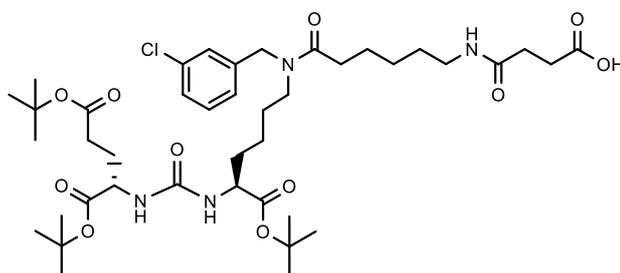


Схема 3.2. Структура вектор-молекулы ПСМА, взятой за основу серии лигандов

Для того чтобы установить влияние структуры линкера на аффинность всего лиганда, структура вектор-молекулы была зафиксирована и не варьировалась. Синтез фрагмента вектор-молекулы на основе мочевины проводился по ранее отработанным методикам и включает в себя четыре стадии⁹⁴ (Схема 3.3).

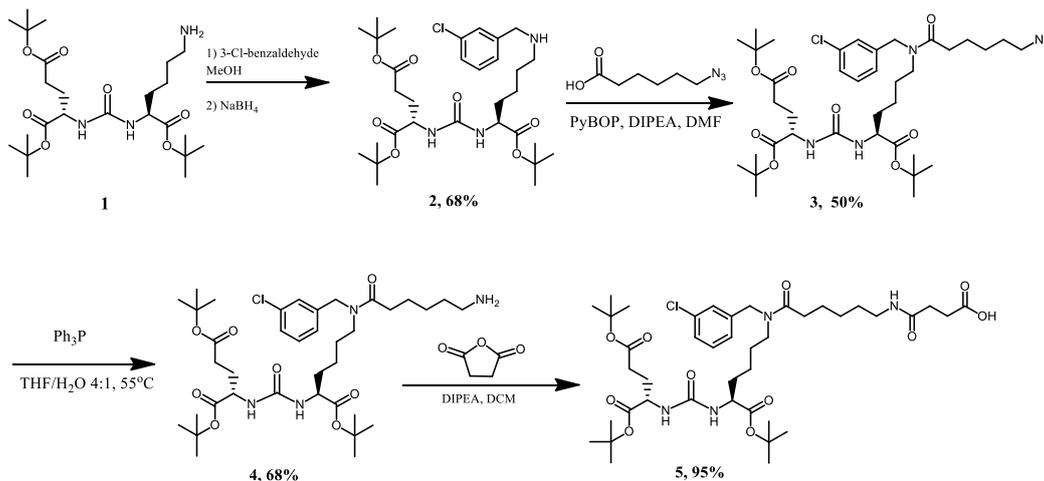


Схема 3.3. Синтез основного вектора, селективно связывающего с ПСМА

3.2. Синтез дипептидных цепочек методами жидкофазного синтеза³

3.2.1. Синтез дипептидных цепочек на основе глицина, фенилаланина и тирозина

Модифицированные линкеры и получаемые на их основе лиганды можно разделить на блоки, основываясь на свойствах их структуры. В первый блок линкеров и лигандов, полученных на данном этапе работы можно выделить линкеры, полученные на основе глицина и фенилаланина. Целью данных цепочек было выяснить влияние положения ароматического фрагмента в структуре линкера на биологическую активность лиганда. Для этого один из ароматических фрагментов в дипептидной цепочке был замещен на глицин (либо в положении, ближнем к вектор-молекуле, либо в терминальном) (Схема 3.4).

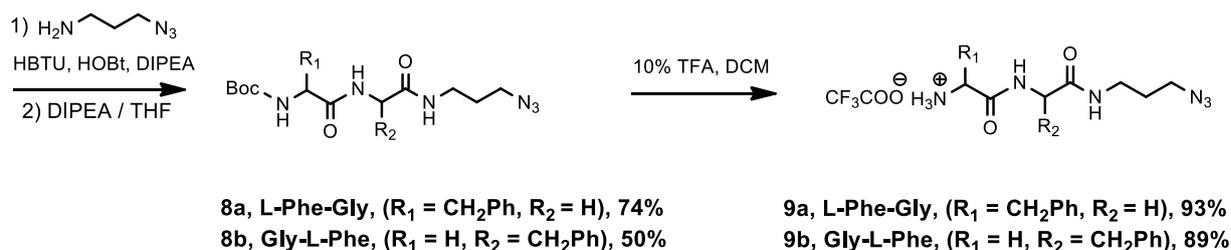
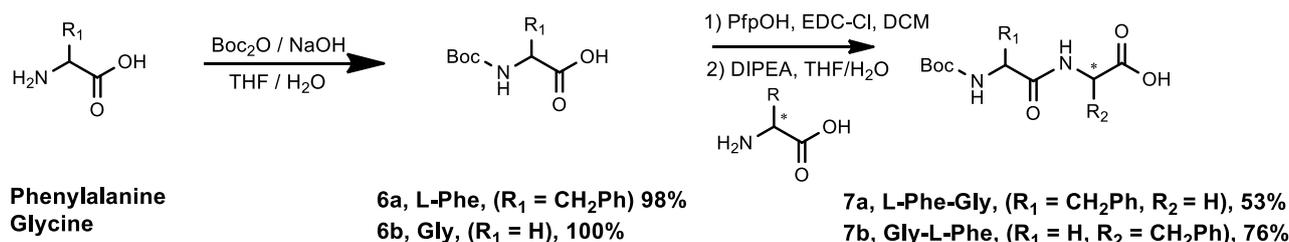


Схема 3.4. Синтез дипептидной цепочки Phe/Gly

Существует множество методик постановки защитных групп в аминокислотах, но разработанный Фишером и Курциусом метод образования пептидной связи не нашел широкого применения из-за отсутствия селективно отщепляемых защитных групп¹⁴⁷. В современной химии пептидов применяются две основные защитные группы для аминогруппы – *Boc* и *Fmoc*¹⁴⁸.

В проводимых нами синтезах была выбрана *Boc*-защита, так как снятие этой группы происходит на последней стадии синтеза в кислой среде¹⁴⁹. В то же время, *Fmoc*-защитная группа снимается в присутствии сильного основания, например пиперидина, что в нашем

³ 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: A. Uspenskaya, Alexey E. Machulkin, Ekaterina A. Nimenko, Radik R. Shafikov, Stanislav A. Petrov, Dmitry A. Skvortsov, Elena K. Beloglazkina, and Alexander G. Majouga. Influence of dipeptide linker configuration on the activity of psmA ligands. *Mendeleev Communications*, 30:756–759, 2020.

случае может привести к побочным продуктам переаминирования амидных групп в целевом соединении и затруднить выделение чистого продукта¹⁵⁰.

На первом этапе синтеза этого линкера нами была осуществлена постановка Вос-защиты на атом азота L-фенилаланина (или глицина). Реакцию проводили классическим взаимодействием аминокислоты с ди-*трет*-бутилдикарбонатом (Вос₂О) в щелочном растворе тетрагидрофурана и воды с последующим выделением продукта реакции экстракцией этилацетатом, после предварительной нейтрализации раствора 1М раствором НСl. Проведение колоночной хроматографии на данной стадии не требуется. Структура данных соединений подтверждена ¹Н ЯМР-спектроскопией.

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что одним из наиболее эффективных методов получения короткоцепочечных пептидов является RPPS (rapid repetitive solution phase synthesis) – быстрый повторяющийся синтез в фазе раствора¹⁵¹. Данный подход заключается в использовании активированных эфиров карбоновых кислот, селективно образующих амидную связь. В качестве активаторов используются такие реагенты, как N-гидроксисукцинимид NHS, разнообразные галогенированные производные фенола (например, пентафторфенол PfpOH) и другие.

На втором этапе нами был осуществлен синтез дипептида L-Phe-Gly (или Gly-L-Phe). С этой целью первоначально с использованием системы реагентов EDC-HCl (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимил гидрохлорид) и PfpOH был получен промежуточный активированный эфир фенилаланина. Данный интермедиат отличается высокой реакционной способностью по отношению к аминогруппе и устойчивостью к стандартным процедурам органического синтеза. Последующим его взаимодействием со свободной аминокислотой в присутствии третичного основания DIPEA был синтезирован дипептид Вос-L-Phe-Gly (и Вос-Gly-L-Phe) (Схема 3.5).

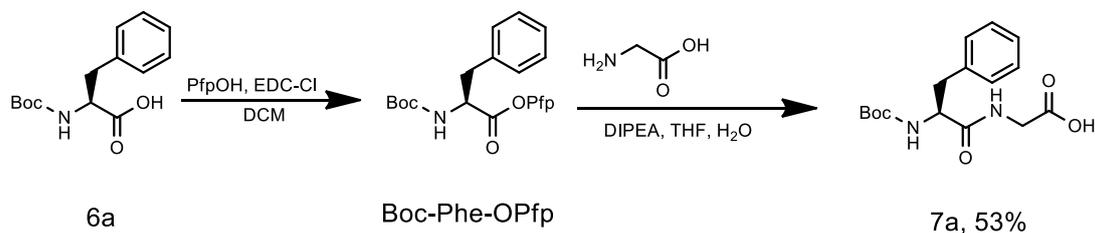


Схема 3.5. Синтез дипептидной цепочки Вос-L-Phe-Gly с помощью реакции образования активированного эфира пентафторфенола

Особенностью и преимуществом выбранного синтеза является отсутствие необходимости в колоночной хроматографии. Продукт **7** был выделен с помощью последовательного многократного переосаждения реакционной смеси в гексане и диэтиловом

эфире с использованием УЗИ-диспергирования. 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 НОВт и НВТУ с последующим взаимодействием с азидопропиламином в течение 24 часов при комнатной температуре в диметилформамиде. По окончании реакции проводили удаление растворителя при пониженном давлении, далее сырую реакционную массу растворяли в дихлорметане, и промывали несколько раз водой. Далее дихлорметан упаривали и реакционную смесь очищали методом нормально-фазовой колоночной хроматографии с использованием хроматографа PuriFlash 4250, в результате был получен промежуточный азидо-дипептид.

Снятие *Voc*-защиты проводили действием 10% раствора трифторуксусной кислоты в безводном дихлорметане. ТСХ-контроль протекания реакции показал, что полное снятие защиты при комнатной температуре происходит за 3-4 часа. Контроль реакции проводили методом тонкослойной хроматографии в элюенте дихлорметан : метанол (90% : 10%).

Структура подтверждена ¹H ЯМР-спектроскопией. На снятие *Voc*-защиты указывает исчезновение синглета на 1.29 ppm, отвечающего за 9 протонов данной *tert*-бутоксикарбонильной группы.

Таким образом, был осуществлен синтез серии из двух дипептидных линкеров: L-Phe-Gly и Gly-L-Phe, который был далее использован для получения высокоспецифичных ПСМА-векторов. Примененные методы синтеза характеризуются высокими выходами и несложностью выделения целевых продуктов.

Второй блок пептидов включал в себя дипептидные цепочки на основе фенилаланина и тирозина смешанной конфигурации. На участке ближнем к вектор-молекуле ПСМА был введен фенилаланин L или D конфигурации, варьирование C-концевой аминокислоты осуществлялось за счет использования аминокислот фенилаланина и тирозина L или D конфигурации. Синтез проводился аналогично дипептидным цепочкам фенилаланин/глицин из первого блока. Выходы представлены на **схеме 3.6**.

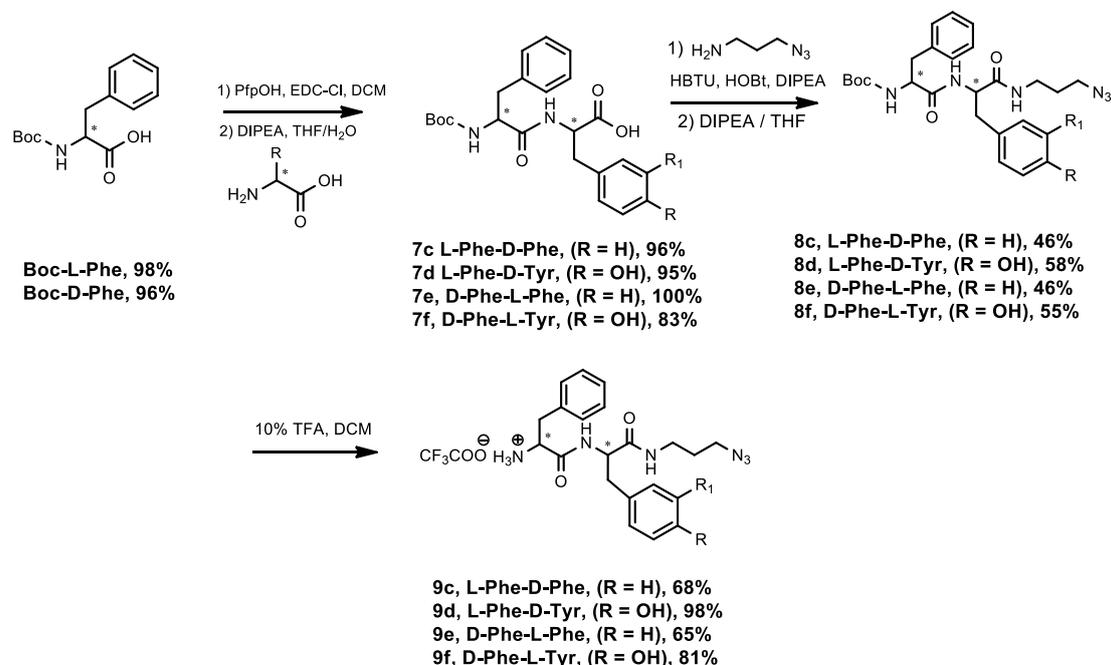


Схема 3.6. Синтез дипептидных цепочек **Phe – Phe (Tyr)**

3.2.2. Синтез дипептидных цепочек на основе фенилаланина и тирозина с заместителями в ароматическом кольце

Замещенный ароматический фрагмент в дипептидной цепочке вводился во второе положение. Жидкофазными методами синтеза было получено 7 таких лигандов: с L-3-нитро-фенилаланином, L-3-бром-тирозином и L-3-гидрокси-тирозином (L-DOPA) и L-3-нитро-тирозином. Также новые лиганды с замещенными дипептидными цепочками планируется получать методами твердофазного синтеза (Раздел 3.3.2).

Введение нитрогруппы в четвертое положение фенилаланина проводили в растворе 85% серной кислоты, к раствору добавляли смесь концентрированных азотной и серной кислот при пониженной температуре (8-10 °C). По окончании реакции раствор подщелачивали 40% раствором NaOH до pH = 2-3. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой до нейтрального значения pH (Схема 3.7).

Введение атома брома в третье положение тирозина проводили следующим образом. Раствор HBr (конц.) в ледяной уксусной кислоте (33%) добавляли к суспензии L-тирозина также в ледяной уксусной кислоте. Далее при интенсивном перемешивании медленно прикапывали бром. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Осадок фильтровали и промывали ледяной уксусной кислотой и Et₂O (Схема 3.7).

Аминокислоты L-3-гидрокси-тирозин (L-DOPA), L-3-нитро-тирозин были взяты в виде готовых реагентов.

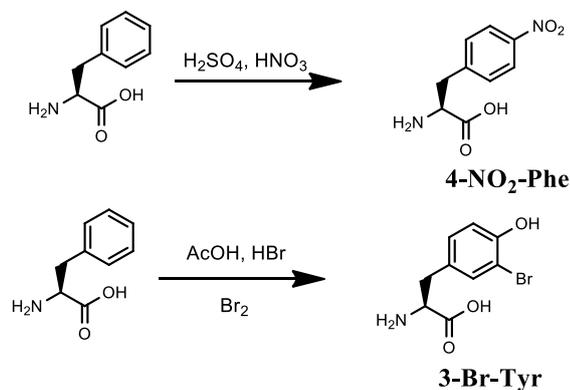


Схема 3.7. Синтез замещенных фенилаланина и тирозина.

Дальнейшую сборку линкеров проводили аналогично первым двум вышеописанным блокам дипептидных цепочек (**Схема 3.8**).

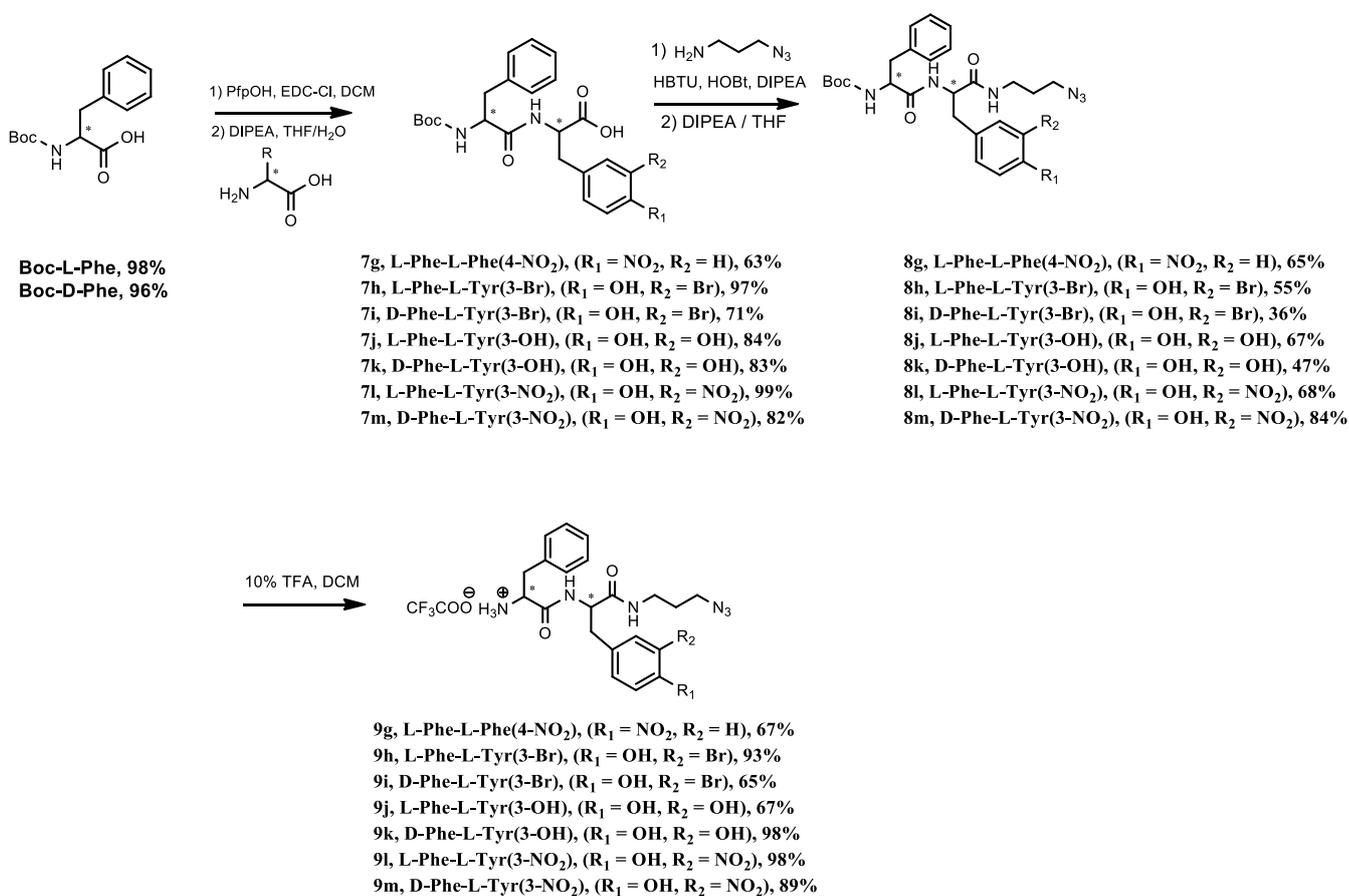


Схема 3.8. Синтез замещенных дипептидных цепочек Phe/Tyr

3.3. Синтез лигандов ПСМА на основе вектор-молекулы DCL

3.3.1. Пептидный синтез на жидкой фазе

В основе синтетического пути синтеза лигандов из полученных дипептидов лежит реакция создания пептидной связи, повсеместно используемая в органическом синтезе. В

качестве катализаторов используются реактивы, приводящие к образованию активированных эфиров, которые с легкостью реагируют с аминокислотами. Основными классами активирующих реагентов являются фосфониевые соли (BOP, PyBOP, PyBOP и др.), урониевые соли (HBTU, NATU, TBTU и др.), карбодиимиды (DCC, EDC, DIC)¹⁵². HOBt (Бензотриазол-1-ол) - реагент препятствующий рацемизации продукта в ходе реакции, поэтому он используется вместе с HBTU¹⁵³. В качестве ненуклеофильного основания, депротонирующего кислоту взят диизопропилэтиламин (DIPEA).

Модифицированную вектор-молекулу и полученные дипептиды **9a** – **9b** вводились в реакцию с активирующими реагентами HBTU/HOBt и основанием DIPEA (Схема 3.9).

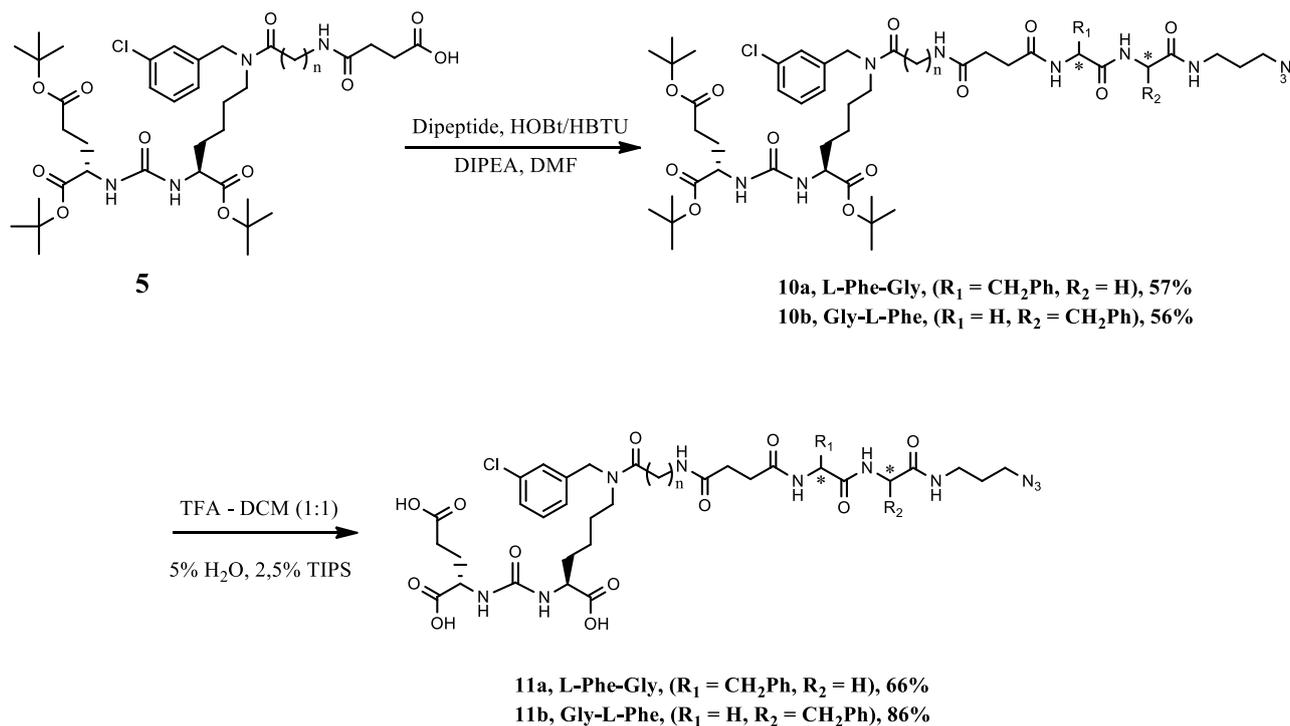
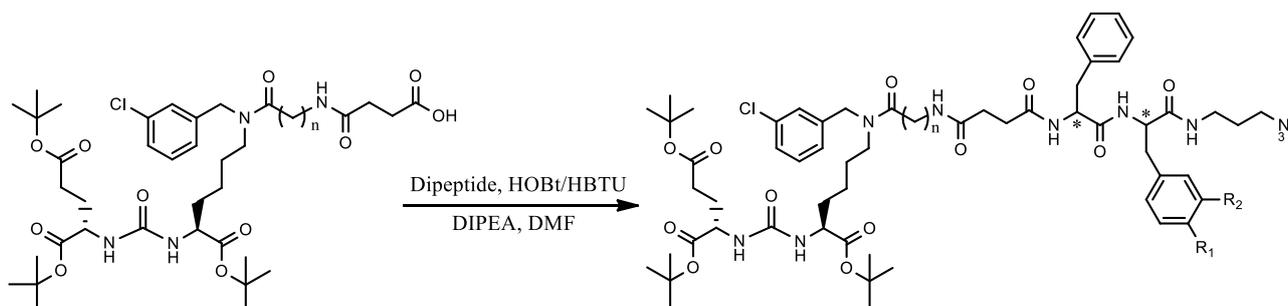


Схема 3.9. Получение лигандов на основе полученных дипептидов Phe/Gly

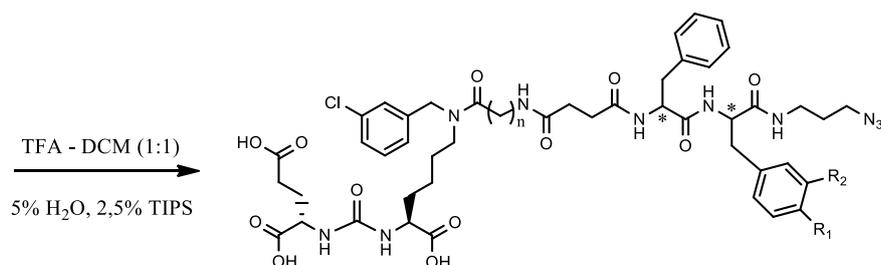
Для связывания с ПСМА у полученных лигандов необходимо наличие свободных карбоксильных групп²². Превращение *tert*-бутиловых эфиров в карбоновые кислоты осуществлялось в следующем растворе: 46,25% TFA, 46,25% DCM, 5% воды и 2,5% TIPS. Выбор данных условий подробно описан ниже.

После того как полученные дипептидные цепочки **9c** - **9m** были охарактеризованы основными физико-химическими методами анализа (¹H/¹³C ЯМР-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография), на их основе аналогично методу описанному выше была получена новая серия из 11 лигандов, представленных на **схеме 3.10**.



5

- 10c, L-Phe-D-Phe, ($R_1 = H, R_2 = H$), 54%
 10d, L-Phe-D-Tyr, ($R_1 = OH, R_2 = H$), 82%
 10e, D-Phe-L-Phe, ($R_1 = H, R_2 = H$), 65%
 10f, D-Phe-L-Tyr, ($R_1 = OH, R_2 = H$), 55%
 10g, L-Phe-L-Phe(4-NO₂), ($R_1 = NO_2, R_2 = H$), 65%
 10h, L-Phe-L-Tyr(3-Br), ($R_1 = OH, R_2 = Br$), 50%
 10i, D-Phe-L-Tyr(3-Br), ($R_1 = OH, R_2 = Br$), 63%
 10j, L-Phe-L-Tyr(3-OH), ($R_1 = OH, R_2 = OH$), 67%
 10k, D-Phe-L-Tyr(3-OH), ($R_1 = OH, R_2 = OH$), 65%
 10l, L-Phe-L-Tyr(3-NO₂), ($R_1 = OH, R_2 = NO_2$), 87%
 10m, D-Phe-L-Tyr(3-NO₂), ($R_1 = OH, R_2 = NO_2$), 71%



- 11c, L-Phe-D-Phe, ($R_1 = H, R_2 = H$), 72%
 11d, L-Phe-D-Tyr, ($R_1 = OH, R_2 = H$), 70%
 11e, D-Phe-L-Phe, ($R_1 = H, R_2 = H$), 73%
 11f, D-Phe-L-Tyr, ($R_1 = OH, R_2 = H$), 76%
 11g, L-Phe-L-Phe(4-NO₂), ($R_1 = NO_2, R_2 = H$), 62%
 11h, L-Phe-L-Tyr(3-Br), ($R_1 = OH, R_2 = Br$), 60%
 11i, D-Phe-L-Tyr(3-Br), ($R_1 = OH, R_2 = Br$), 35%
 11j, L-Phe-L-Tyr(3-OH), ($R_1 = OH, R_2 = OH$), 74%
 11k, D-Phe-L-Tyr(3-OH), ($R_1 = OH, R_2 = OH$), 55%
 11l, L-Phe-L-Tyr(3-NO₂), ($R_1 = OH, R_2 = NO_2$), 47%
 11m, D-Phe-L-Tyr(3-NO₂), ($R_1 = OH, R_2 = NO_2$), 65%

Схема 3.10. Получение лигандов на основе полученных дипептидов Phe/Тур

В реакции удаления *трет*-бутильных защит очень важным оказался подбор оптимального времени, за которое происходило бы удаление всех защитных групп в молекуле. На данном этапе была проведена оптимизация методики. Удаление *трет*-бутильных защит проводили в смеси 46.25% TFA, 46.25% DCM, 5% воды и 2.5% TIPS. Подобные реакционные смеси часто используются для данной реакции в пептидном синтезе, для удаления трет-бутильных защитных групп, поскольку наличие триизопропилсилана выступает в роли

катионного поглотителя и защищает боковые цепи пептидных цепочек от побочных реакций.^{154,155} Как правило это смесь в соотношении, где доля трифторуксусной кислоты достигает 80-95% процентов, 5-10% отводится на растворитель, который может представлять собой фенол, воду, дихлорметан или их смесь, 0,5-2,5% отводится на триизопропилсилан. Однако, в случае чувствительных к кислым условиям соединений, а аминокислотные последовательности с несколькими хиральными центрами являются таковыми, рекомендуется снизить содержание трифторуксусной кислоты до 45-50%¹⁵⁶. Таким образом, была выбрана следующая система для удаления *трет*-бутильных защитных групп: 46.25% TFA, 46.25% DCM, 5% воды и 2.5% TIPS.

Оптимизация методики, заключалась в установлении оптимальной продолжительности реакции, при которой количество примесей в реакционной смеси было бы минимальным, что в свою очередь облегчает этап очистки и увеличивает выход реакции. 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. По результатам ВЭЖХ-МС наилучшие результаты были достигнуты при проведении реакции в течении 3 часов, количество целевого вещества в реакционной смеси составляет 79% в положительных и 94% в отрицательных ионах (Схема 3.12). 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 ангидрида¹⁵⁷ **11d - I**, либо побочной реакции со стороны мочевины с образованием двух типов гидантоинов¹⁵⁸ **11d - II** и **11d - III** (Рисунок 3.1).

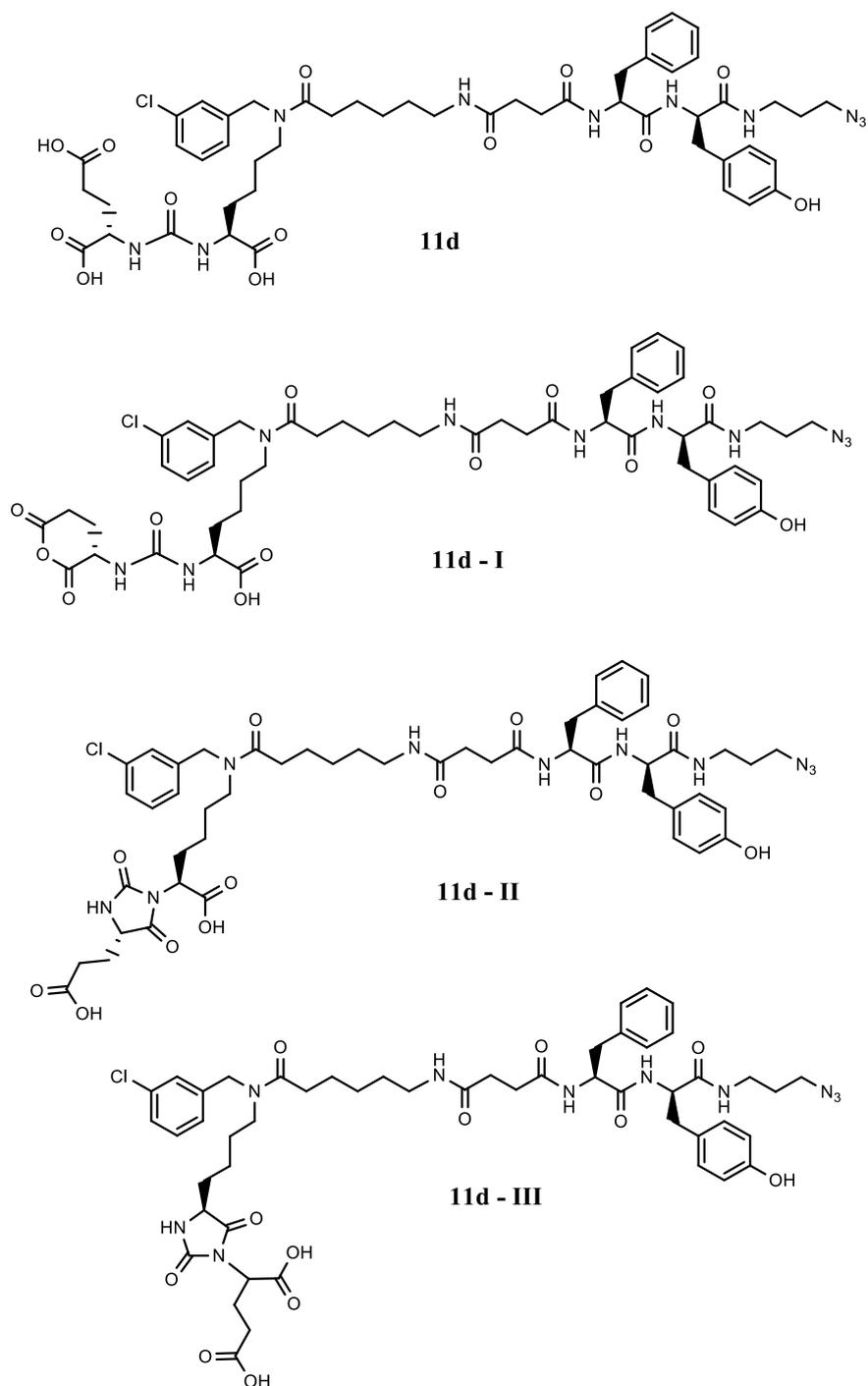
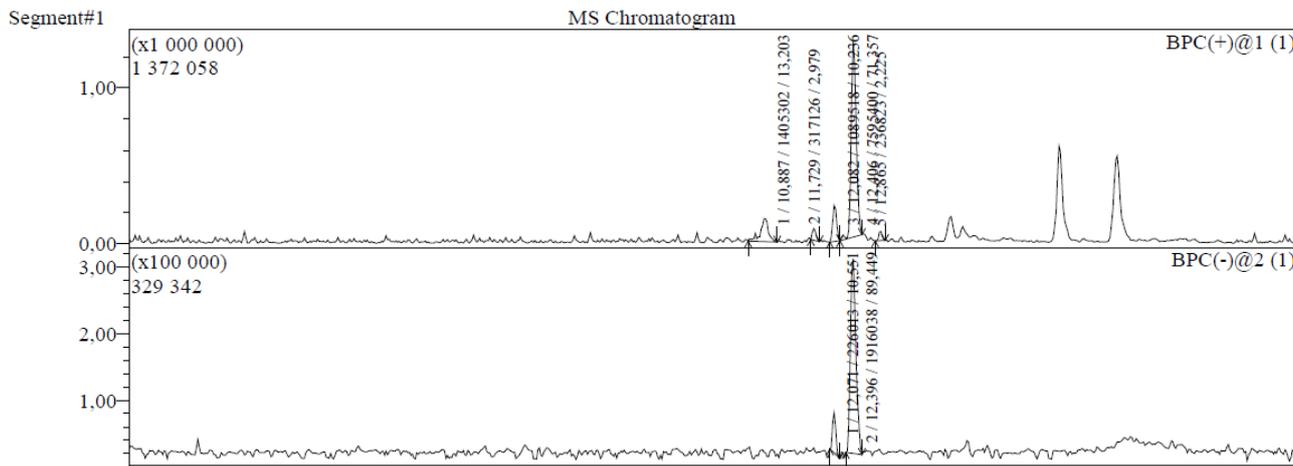
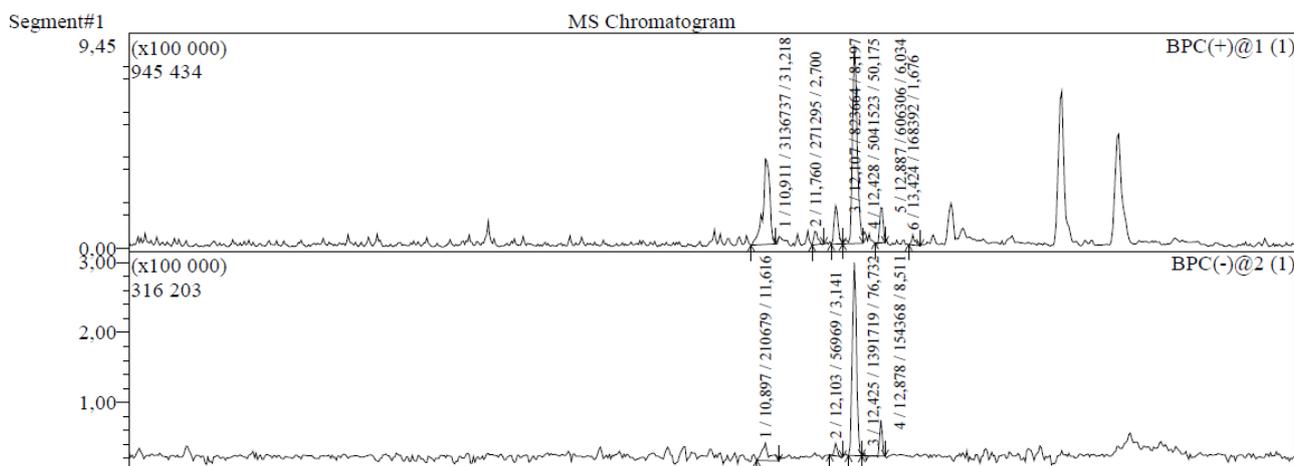


Схема 3.11. Структура целевого и побочных продуктов реакции удаления трет-бутильных защит

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.



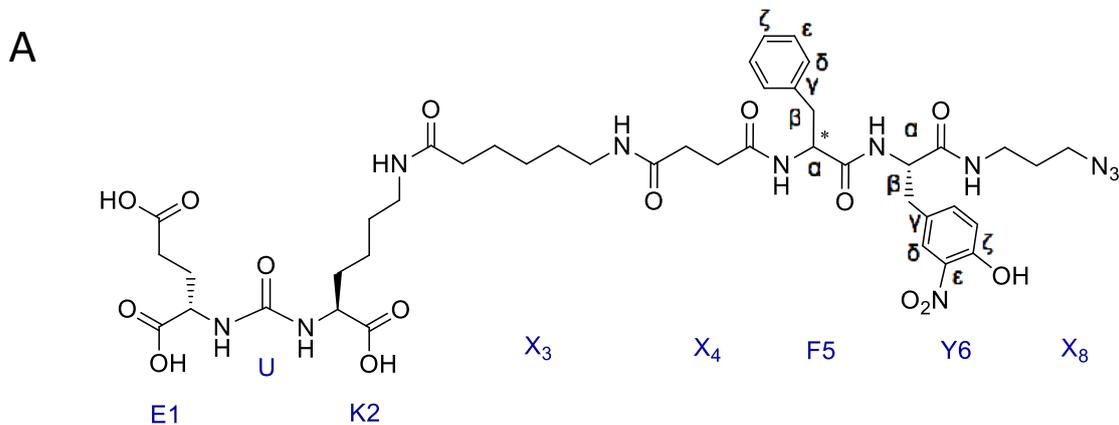
г) ВЭЖХ реакционной смеси через 6 часа после начала реакции



д) ВЭЖХ реакционной смеси через 24 часа после начала реакции

Рисунок 3.1. ВЭЖХ-МС оптимизации реакции удаления трет-бутильных защитных групп

На **рисунке 3.2** представлен фрагмент ^1H -ЯМР-спектров соединений **11l** (**L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**) и **11m** (**D-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**). Структуры полученных соединений идентичны, за исключением конфигурации фрагмента фенилаланина. Хорошо видно различие химических сдвигов для амидов F5, Y6, X3 и X8, которое доказывает отсутствие рацемизации в полученных соединениях.



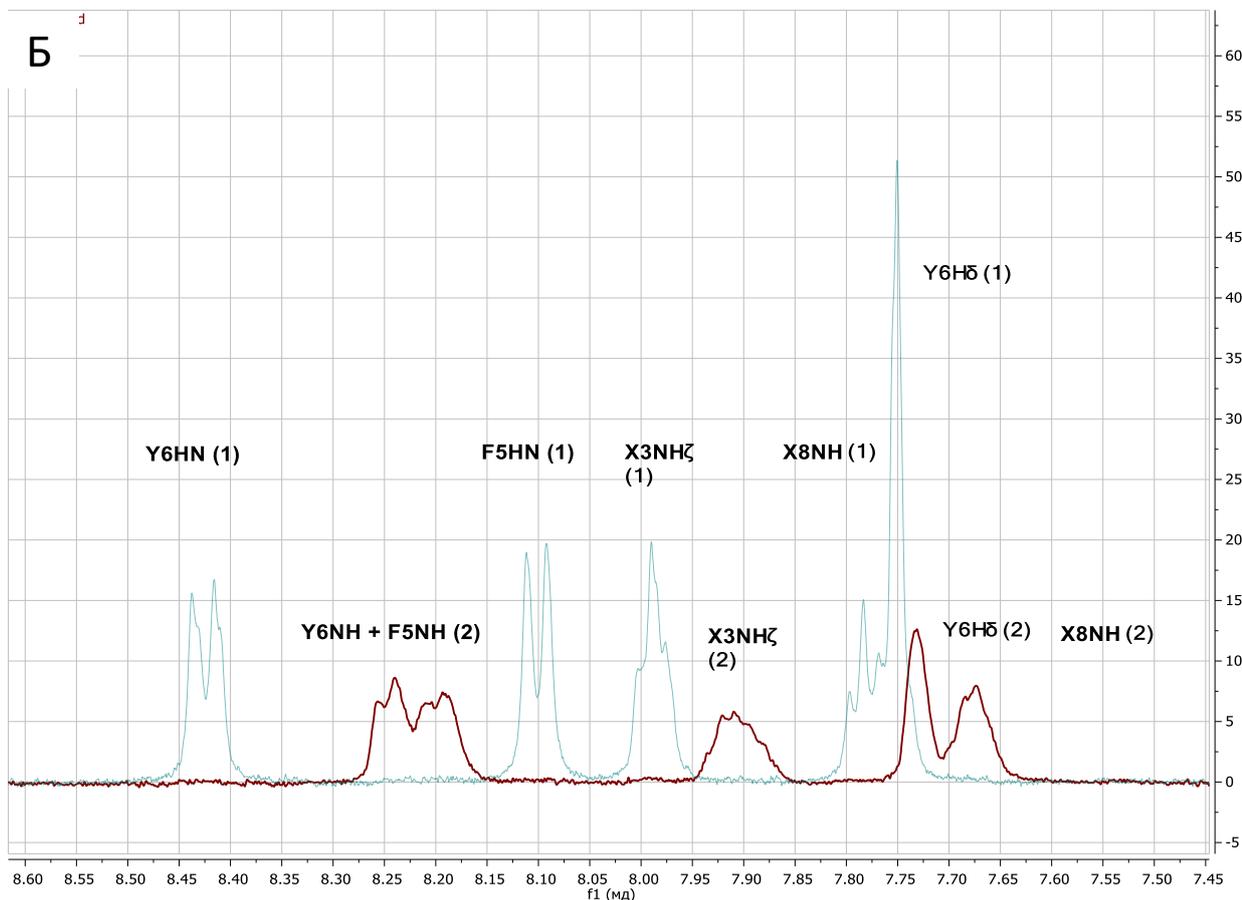


Рисунок 3.2. А – обозначения структурных фрагментов для лигандов **11l** (**L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**) и **11m** (**D-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**). Б – фрагменты 1H ЯМР спектров для соединений **11l** (красный (2)) и **11m** (синий (1)).

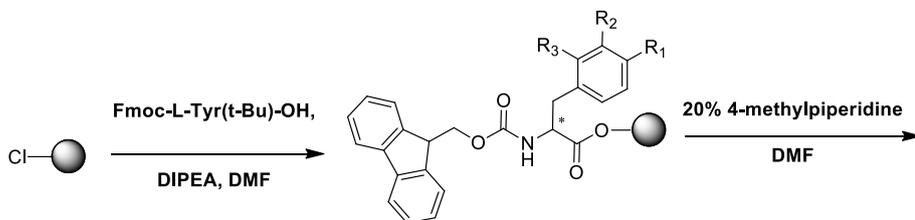
3.3.2. Пептидный синтез на твердой фазе

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. Обусловлено это тем, что в структуре тирозина в побочные реакции вступает гидроксильная группа в пара-положении. В результате выход реакции в данном методе опустился ниже 20%, что является крайне неудовлетворительным и не дает возможности использовать его в дальнейшем. Вариант с предварительной защитой гидроксильной группы тирозина предполагает увеличение количества стадий и усложнение очистки получаемых соединений.

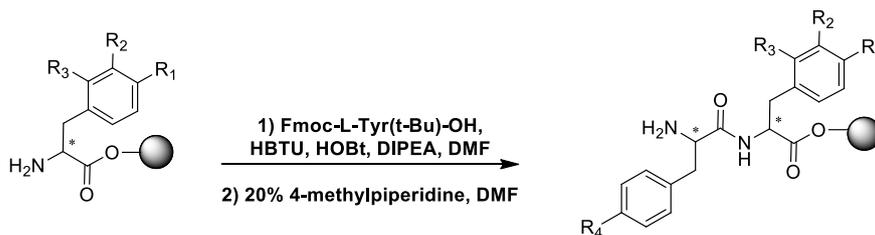
В результате было принято решение применить другой подход получения необходимых дипептидных цепочек, а именно перейти на твердофазные методы синтеза.

Такой подход удобен в исполнении и обладает рядом преимуществ такими как высокая селективность проводимых реакций, отсутствие рацемизации (при правильном выборе твердофазного носителя), быстрота протекания реакций, позволяющая осуществить «сборку» необходимой структуры в течении небольшого времени (вплоть до нескольких часов)¹⁵⁹. Твердофазный синтез пептидов начинают с С-конца, постепенно наращивая цепочку, за счет образования пептидных связей¹⁶⁰.

В данной работе в качестве твердофазного носителя была выбрана 2-хлортритильная смола в хлоридной форме (2-СТС). Данный тип смолы для пептидного синтеза очень удобен в применении так как препятствует рацемизации С-концевых аминокислотных остатков, и предполагает возможность использования широкого разнообразия боковых цепочек. Также важно отметить условия снятия полученных цепочек со смолы^{161,162}. Слабокислые условия (0.5% раствор трифторуксусной кислоты в дихлорметане) позволяют сохранить *tert*-бутильные защитные группы, присутствующие в структуре как вектор-молекулы, так и в структуре линкера. В данной серии были получены дипептидные цепочки как смешанной, так и одинаковой конфигурации аминокислотных фрагментов, с целью сравнить влияние введения тирозина в первое положение относительно мочевины.



- 12a, Fmoc-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 12b, Fmoc-D-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 12c, Fmoc-L-3-Cl-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$)
 12d, Fmoc-L-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 12e, Fmoc-L-3-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$)
 12f, Fmoc-L-2-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{Br}$)
 12g, Fmoc-D-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)

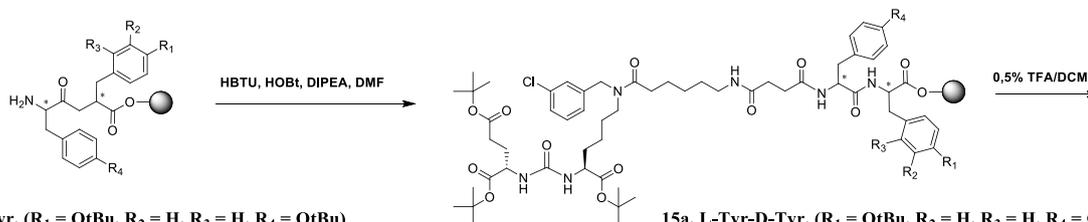


- 13a, L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 13b, D-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 13c, L-3-Cl-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$)
 13d, L-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)
 13e, L-3-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$)
 13f, L-2-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{Br}$)
 13g, D-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$)

- 14a, L-Tyr-D-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14b, L-Tyr-D-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14c, D-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14d, D-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14e, L-Tyr-L-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14f, L-Tyr-L-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OtBu}$)
 14g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, ($R_1 = \text{OtBu}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
 14h, L-Phe-L-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
 14i, L-Phe-L-3-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)
 14j, L-Phe-L-2-Br-Phe, ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{Br}$, $R_4 = \text{H}$)
 14k, D-Phe-D-4-Br-Phe, ($R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$)

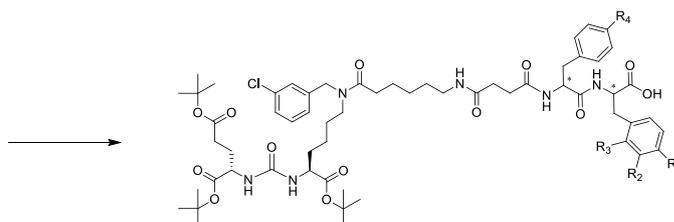
Схема 3.12. Получение дипептидных цепочек Tyr/Phe методами твердофазного синтеза

Для синтеза были взяты *Fmoc*-защищенные аминокислотные остатки фенилаланина и тирозина различных конфигураций. Снятие *Fmoc*-защиты протекает в основных условиях, что соответствует типу выбранной смолы. На первом этапе проводят активацию смолы в течение 4 часов при 40°C 5% раствором SOCl_2 в дихлорметане с добавлением каталитического количества диметилформаида. Далее производят присоединение первого аминокислотного остатка (фенилаланина или тирозина) к активированной смоле. Снятие *Fmoc*-защитной группы проводят в 20% растворе 4-метилпиперидина. Нарращивание цепи проводят путем создания пептидной связи между аминогруппой остатка на смоле и карбоксильной группой следующего *Fmoc*-защищенного аминокислотного фрагмента (Схема 3.12).



- 14a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 14g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H)
 14h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)
 14i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H)
 14j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H)
 14k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)

- 15a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 15g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H)
 15h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)
 15i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H)
 15j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H)
 15k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)

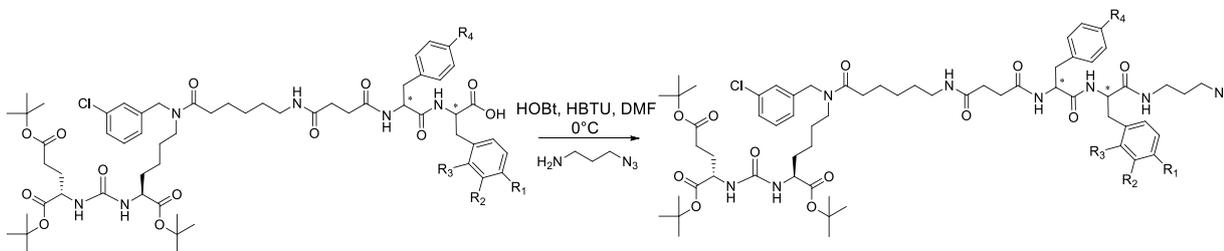


- 16a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 85%
 16b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 91%
 16c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 70%
 16d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 96%
 16e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 91%
 16f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 82%
 16g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H), 54%
 16h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 86%
 16i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H), 97%
 16j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H), 86%
 16k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 80%

Схема 3.13. Синтез целевых лигандов методами твердофазного синтеза

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. Снятие со смолы проводят в 0.5 % растворе трифторуксусной кислоты в дихлорметане в течении 15 минут, *tert*-бутильные защитные группы вектор-молекулы и фрагмента тирозина в боковой цепи линкера при этом не затрагиваются. После снятия со смолы для очистки соединений проводилась колоночная обращенно-фазовая хроматография (Схема 3.13).

Так как для азид-алкинового циклоприсоединения необходимо наличие свободной азидной группы в структуре лиганда, то следующим этапом синтеза является реакция с 3-аминопропилазидом (Схема 3.14). С целью избежать рацемизации и максимально снизить количество побочных продуктов важно учитывать порядок смешения реагентов. К раствору лиганда в диметилформамиде последовательно добавляют аминопропилазид, HOBT, HBTU и DIPEA. Реакция проводится без преактивации и при пониженной температуре (0 °C). На этой стадии также требуется очистка соединений обращенно-фазовой хроматографией¹⁶³.

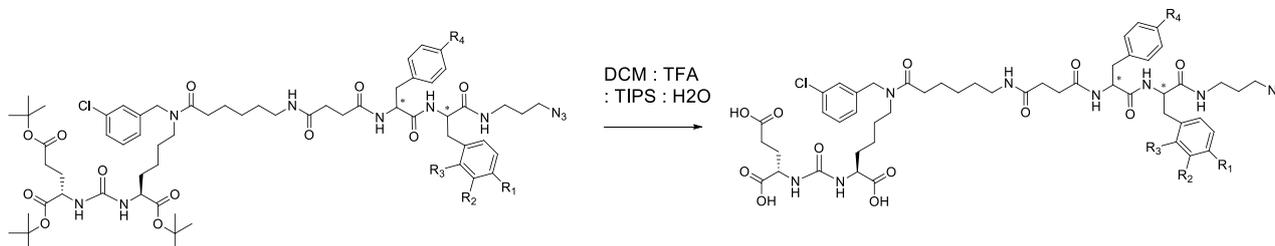


16a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 16g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H)
 16h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)
 16i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H)
 16j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H)
 16k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)

17a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 95%
 17b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 78%
 17c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 83%
 17d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 64%
 17e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 78%
 17f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu), 77%
 17g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H), 54%
 17h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 72%
 17i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H), 98%
 17j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H), 91%
 17k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 43%

Схема 3.14. Присоединение аминопропилазида

Финальное удаление *tert*-бутильных защитных групп проводилось так же, как было описано выше с использованием смеси 46.25% TFA, 46.25% DCM, 5% воды и 2.5% TIPS, в методах жидкофазного синтеза лигандов (Схема 3.15). Очистку проводили обращенно-фазовой хроматографией, элюент: ацетонитрил – вода. Полученные соединения **18a** – **18k** на всех стадиях были охарактеризованы основными методами физико-химического анализа: ¹H, ¹³C ЯМР, ВЭЖХ-МС, HRMS.



17a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OtBu)
 17g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OtBu, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H)
 17h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)
 17i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H)
 17j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H)
 17k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H)

18a, L-Tyr-D-Tyr, (R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 67%
 18b, L-Tyr-D-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 56%
 18c, D-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 53%
 18d, D-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 66%
 18e, L-Tyr-L-Phe, (R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 58%
 18f, L-Tyr-L-Tyr, (R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH), 56%
 18g, L-Phe-L-3-Cl-Tyr, (R₁ = OH, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H), 66%
 18h, L-Phe-L-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 54%
 18i, L-Phe-L-3-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H, R₄ = H), 75%
 18j, L-Phe-L-2-Br-Phe, (R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = Br, R₄ = H), 45%
 18k, D-Phe-D-4-Br-Phe, (R₁ = Br, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H), 43%

Схема 3.15. Получение конечных соединений серии Tyr/Phe

Также в связи с тем, что полученные соединения обладают 4-мя хиральными центрами, была измерена дополнительная характеристика, а именно оптические углы вращения. Это позволит стандартизировать полученные лиганды, что важно в случае дальнейшей наработки тех или иных конечных соединений.

3.4. Исследование аффинности лигандов ПСМА *in vitro*⁴

ПСМА (Простатический специфический мембранный антиген, глутамат карбоксипептидаза II) — это Zn-зависимый металлофермент, который катализирует гидролиз пептидного нейротрансмиттера N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата (NAAG) до глутамата (также нейротрансмиттер) и N-ацетил-L-аспартата (NAA) (Схема 3.16).

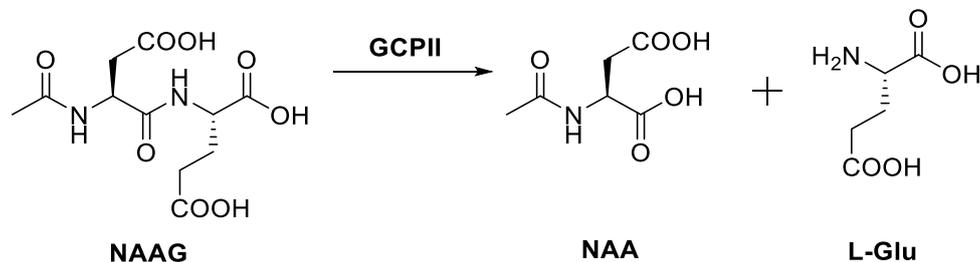


Схема 3.16. Расщепление N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата под действием ПСМА

Ингибирование ПСМА происходит в результате связывания с селективными лигандами. Таким образом, 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 с флуоресцентной детекцией. Этот протокол требует достаточно высокого содержания ПСМА в клетках.

Проанализировав несколько клеточных линий доступных в нашей лаборатории методом проточной цитофлуориметрии (опухолевые линии простаты LNCaP и PC-3, линия рака молочной железы MCF7, линия почки эмбриона HEK293T), и в соответствии с литературными данными, было установлено, что наибольший уровень ПСМА оказался в клеточной линии LNCaP, которая была взята для дальнейшей работы^{164,165}. Контрольный анализ проводился на синтезированном нами аналоге препарата DCL трифторацетате. Контроль специфичности детектируемого сигнала проводился по ПСМА-негативной клеточной линии PC-3, в которой детектировался только эндогенный глутамат. PC3 – ПСМА-отрицательная линия аденокарциномы человека, являются адгерентными эпителиальными клетками¹⁶⁶.

⁴ 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.)

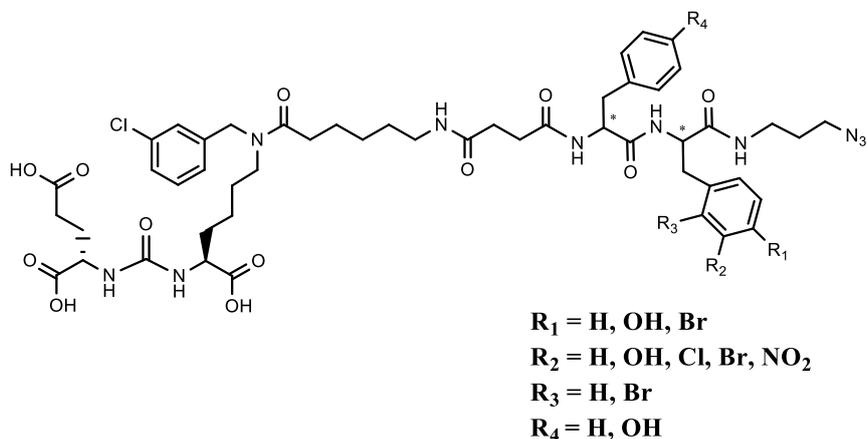


Схема 3.17. Общая структура лигандов.

Анализ ингибирования лигандами ПСМА проводился по нерadioактивному протоколу с детекцией высвобождаемого в ходе реакции глутамата. Экстракт клеток линии LNCaP (10 μL) смешивался с 2 μL препарата соответствующего разведения. Для первичного тестирования использовалась серия разведений препаратов 2 нМ-100 мкМ с шагом разведения 3-5 раз. К полученной смеси добавлялся 1 μL 100 мкМ раствора NAAG. Смесь инкубировалась 2 часа при 37°C. После инкубации смесь разводилась вдвое реакционным буфером (13 μL) из набора Amplex Red Glutamic Acid Kit (Molecular Probes Inc., Eugene) и добавлялась многокомпонентная реакционная смесь для детекции глутамата, приготовленная в соответствии с протоколом производителя (26 μL). Проводилась инкубация 1 час при 37°C. Флуоресценция резорурфина, полученного в результате сопряженных реакций глутамат-детектирующего набора детектировалась на планшетном мультидетекторе VICTORX5 (Perkin Elmer Inc.) при длине возбуждения 555 нм и детекции при 580 нм. В качестве контроля эндогенного уровня глутамата в каждом эксперименте ставился контроль с заменой раствора NAAG на воду. Каждый препарат тестировался в 3 биологических репликах, каждая по две технических реплики.

Таким образом, была исследована серия новых лигандов (**Схема 3.17**) путем ингибирования реакции расщепления N-аспартил-ацетилглутамата на клеточной линии LNCaP. Результаты представлены в **таблице 3.1**. Данный эксперимент был проведен повторно и дополнен более актуальными значениями аффинности.

Таблица 3.1. Результаты биологических испытаний *in vitro* на клеточной линии LNCaP, путем ингибирования реакции расщепления N-аспартил-ацетилглутамата

№	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	38 ± 10	3,89 ± 1,03
11b	Gly-L-Phe	114 ± 48	11,75 ± 3,95
<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)⁹⁴. В их структуре вектор-молекула также представлена мочевиной DCL с мета-хлорзамещенным ароматическим

фрагментом при атоме лизина. На **схеме 3.18** представлены лиганды сравнения: DCL, ZJ-43, 2-PMPA.

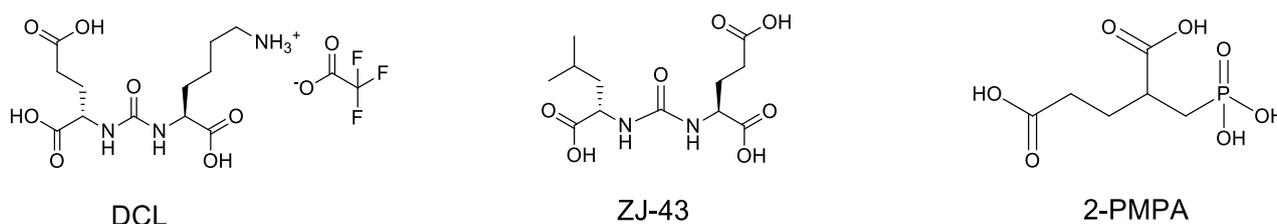


Схема 3.18. Структура лигандов сравнения

Серия лигандов Gly/Phe

Согласно полученным данным, можно сделать вывод о том, что наличие ароматического фрагмента в С-концевом 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 количество и положение ароматических фрагментов в структуре линкера оказывает существенную роль на биологическую активность, поэтому наличие именно дипептидных ароматических фрагментов является обязательным, для сохранения высокой аффинности к ПСМА.

Серия лигандов Phe-Tyr (Phe)

В данном блоке лигандов 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).

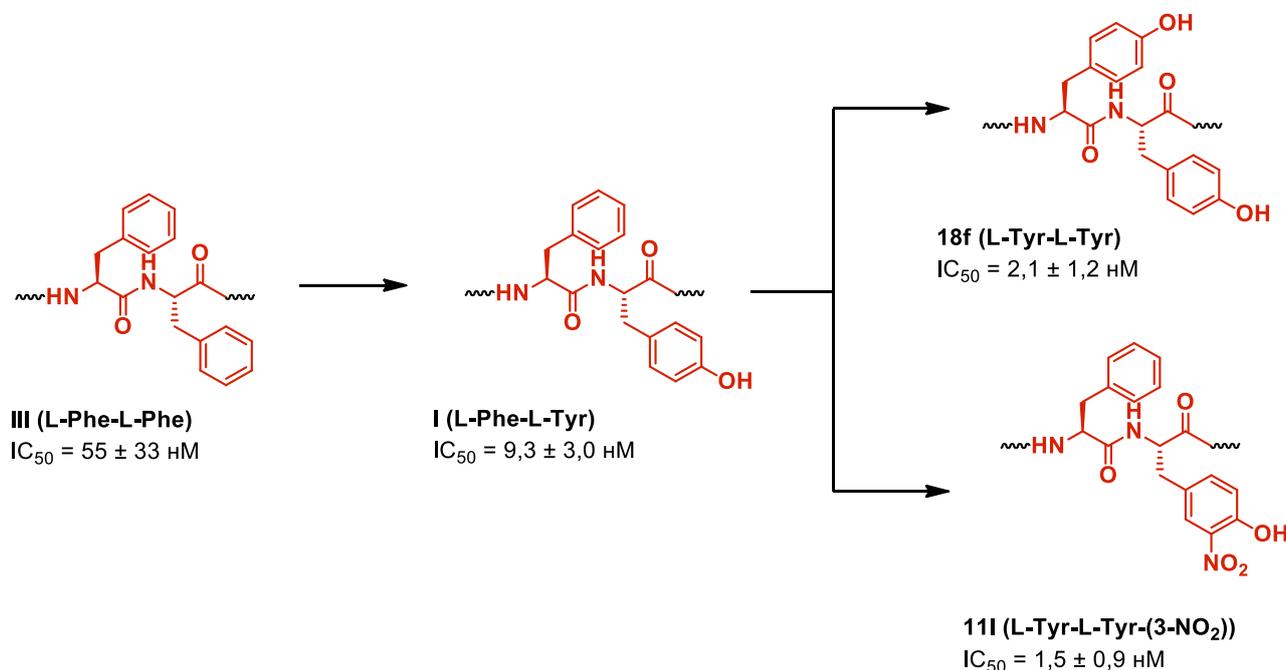


Схема 3.19. Динамика аффинности полученных лигандов

Серия лигандов с замещенными Phe/Tyr

Получены данные о влиянии введения в структуру линкера замещенных фрагментов фенилаланина и тирозина. Замещенный ароматический фрагмент в данных структурах находится в терминальном положении. Введение второй 3-гидроксильной 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 во

втором положении дипептидной цепочки позволило достичь единиц наномолярных значений аффинности.

Таким образом, в рамках проведенной работы была получена новая тройка лигандов-лидеров с аффинностью меньше 3 нМ (Схема 3.20).

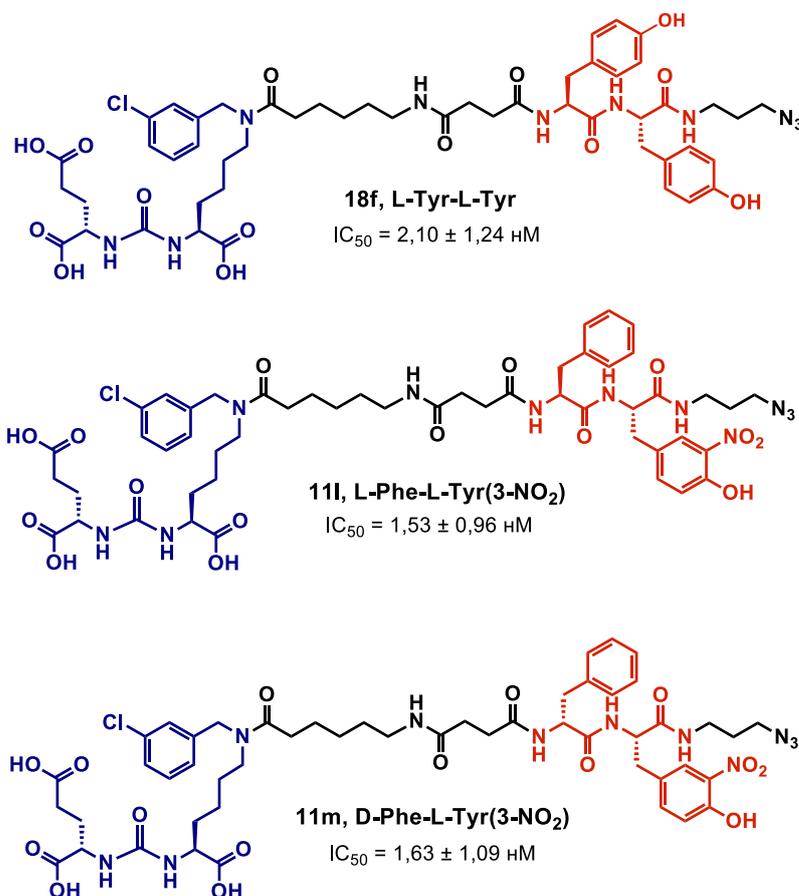


Схема 3.20. Тройка лигандов-лидеров, полученных в рамках выполнения работы

Можно сделать вывод, что в первом положении относительно вектор-молекулы предпочтительнее вводить в структуру линкера фенилаланин или тирозин в L-конфигурации. Заместители при ароматических фрагментах в структуре линкера также могут оказывать значительное влияние, однако оно неразрывно связано и с конфигурацией аминокислотного остатка. Даже в лучшей паре **L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)** и **D-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**, наилучший результат принадлежит конфигурации LL.

Для дальнейшего конъюгирования с терапевтическим препаратом монометил ауристатином E был выбран конъюгат **L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)** ($1,5 \pm 0,9$ нМ). Для конъюгирования с флуоресцентными метками были взяты **L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)** ($1,5 \pm 0,9$ нМ), **L-Tyr-L-Tyr** ($2,10 \pm 1,24$ нМ) и полученный ранее **L-Phe-L-Tyr** ($9,3 \pm 3,0$ нМ).

3.5. Моделирование связывания лигандов ПСМА⁵

Для большинства лигандов, показавших высокую аффинность было проведено исследование связывания в активном центре ПСМА путем моделирования.

Все анализируемые структуры, показали значения, сопоставимые с эталонным соединением PSMA-617. Во всех структурах фрагмент вектор-молекула хорошо взаимодействует с активным центром ПСМА: образуется сеть водородных связей с Arg210, Asn257, Arg534, Arg536 и Lys699. Также обеспечивается прочная координационная связь с атомом цинка через карбамидный кислород DCL. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами более ранних исследований¹⁶⁷. В качестве примера типичного расположения лиганда на **рисунке 3.3** показано моделирование связывания лиганда-лидера **11l** L-Phe-L-Tyr(3-NO₂) (1,5 ± 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).

Таблица 3.2. Оценочная энергия связывания для серии лигандов ПСМА

Лиганд	Оценочная энергия связывания	Лиганд	Оценочная энергия связывания
2xeg	-13.7	18e (L-Tyr-L-Phe)	-14.0
11b Gly-L-Phe	-14.1	18f (L-Tyr-L-Tyr)	-14.9
11i (D-Phe-L-Tyr(3-Br))	-13.7	18g (L-Phe-L-Tyr(3-Cl))	-14.5
11k (D-Phe-L-Tyr(3-OH))	-13.6	18h (L-Phe-L-Phe(4-Br))	-14.1
11l (L-Phe-L-Tyr(2-NO ₂))	-13.8	18j (L-Phe-L-Phe(2-Br))	-15.4
11m (D-Phe-L-Tyr(2-NO ₂))	-13.6	18i (L-Phe-L-Phe(3-Br))	-15.1
18a (L-Tyr-D-Tyr)	-12.6	18k (D-Phe-D-Phe(4-Br))	-12.3
18b (L-Tyr-D-Phe)	-13.2	PSMA-617	-13.2
18c (D-Tyr-L-Tyr)	-13.5		

⁵ Исследование выполнено *In silico*medicine (к.б.н. Иваненков Я.А.) и ФФМ МГУ (Евтеев С.А.)

Ароматическое кольцо при атоме лизина вектор-молекулы мочевины занимает часть гидрофобного кармана в непосредственной близости активного центра ПСМА и образует гидрофобные контакты с Tyr700, Lys207 и Ser547 (**Рисунок 3.3**). Два других кольца (из 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. Второе кольцо (С-конец) образует планарный стэкинг с Trp541 и π -катионное взаимодействие с Arg511. Введение в структуру данного кольца полярных заместителей (т.е. гидроксила, нитрогруппы) представляется целесообразным из-за образования прямых контактов или водных мостиков с остатками Glu542, Ser501 и Asp465. Для этого заместителя стереоспецифичность играет более важную роль. В случае D-изомера в этом положении геометрия линкера препятствует оптимальному связыванию с целевой полостью, что приводит к снижению энергии связывания. Например, **18e** (L-Tyr-L-Phe) демонстрирует более высокие показатели докинга (-14,0), чем **18b** (L-Tyr-D-Phe) (-13,2) (**Таблица 3.2**). Следует отметить, что эти наблюдения согласуются с экспериментально полученными значениями аффинности: для **18e** $2,6 \pm 0,8$ нМ и **18b** $54,0 \pm 16,0$ нМ. Полученные результаты также согласуются с результатами исследования аффинности серии лигандов Gly-Phe, согласно которым большее влияние на аффинность оказывает именно второе ароматическое кольцо (С-конец).

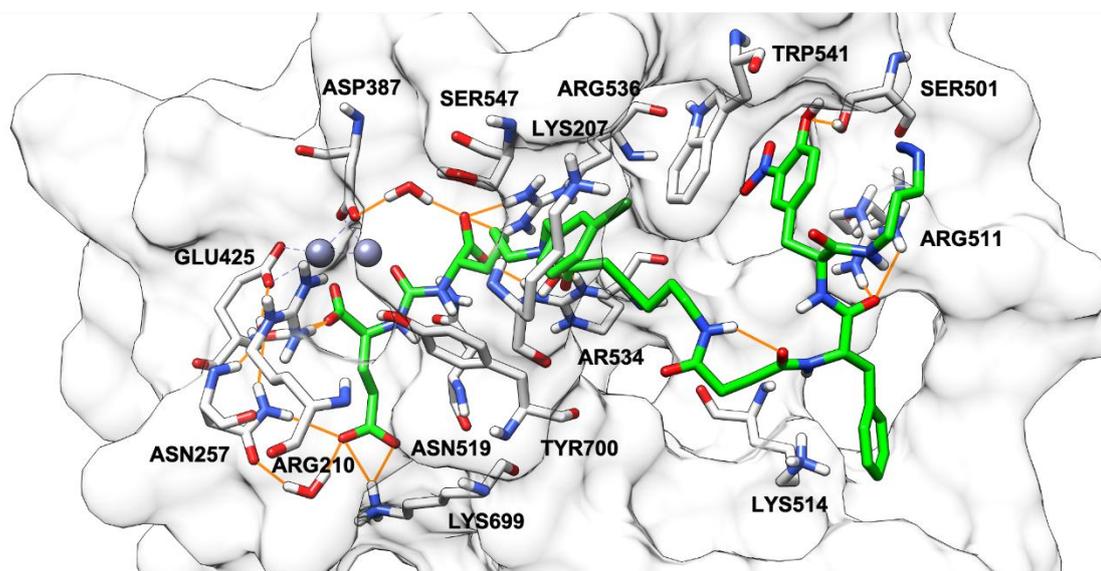


Рисунок 3.3. Моделирование связывания лиганда **11l** L-Phe-L-Tyr(3-NO₂). Структура лиганда показана зеленым цветом. Остатки центра связывания, которые образуют водородные связи, стэкинг или π -катионные взаимодействия показаны белым цветом и обозначены типом и номером остатка. Водородные связи и «водные мостики» выделены оранжевым цветом.

3.6. Синтез диагностических и терапевтических конъюгатов

3.6.1. Синтез диагностических конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5⁶

Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I) обладает большим рядом преимуществ такими как: высокая селективность затрагиваемых групп, простота в реализации, хорошие выходы реакций (Схема 3.21).^{168,169}

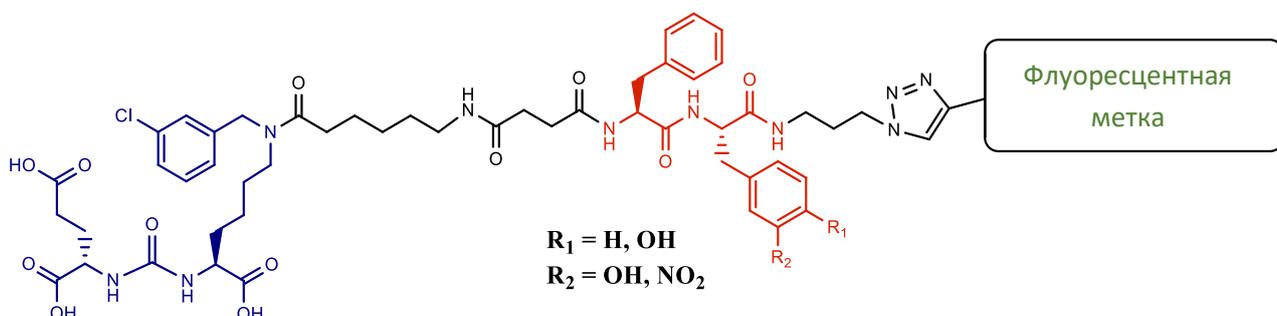


Схема 3.21. Общая схема структуры флуоресцентных конъюгатов

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 3.22)¹⁷⁰.

⁶ 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: А. Е. Machulkin, R. R. Shafikov, А. А. Uspenskaya, S. A. Petrov, А. Р. Ber, D. А. Skvortsov, Е. А. Nimenko, N. U. Zyk, G. B. Smirnova, V. S. Pokrovsky, M. A. Abakumov, I. V. Saltykova, R. T. Akhmirov, А. S. Garanina, V. I. Polshakov, O. Y. Saveliev, Y. A. Ivanenkov, А. V. Aladinskaya, А. V. Finko, E. U. Yamansarov, O. O. Krasnovskaya, А. S. Erofeev, P. V. Gorelkin, O. A. Dontsova, E. K. Beloglazkina, N. V. Zyk, E. S. Khazanova, and A. G. Majouga. Synthesis and biological evaluation of psma ligands with aromatic residues and fluorescent conjugates based on them. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(8):4532–4552, 2021. (основополагающий вклад в синтетическую часть)

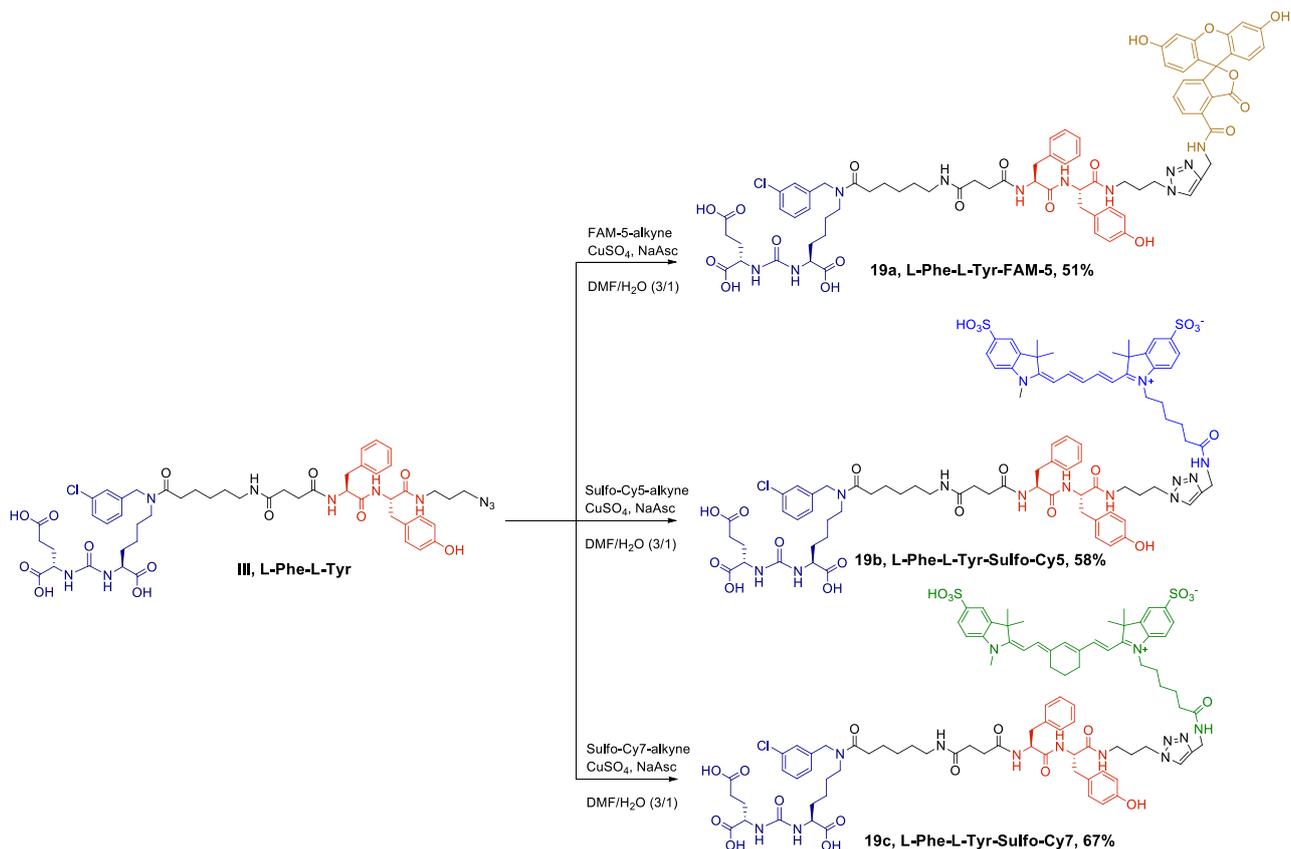


Схема 3.22. Схема синтеза конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5

Также была получена серия флуоресцентных конъюгатов с лигандами **11i** и **18f** и меткой Sulfo-Cy5. Были взяты ранее оптимизированные условия реакций.¹⁷⁰ 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 3.23**).

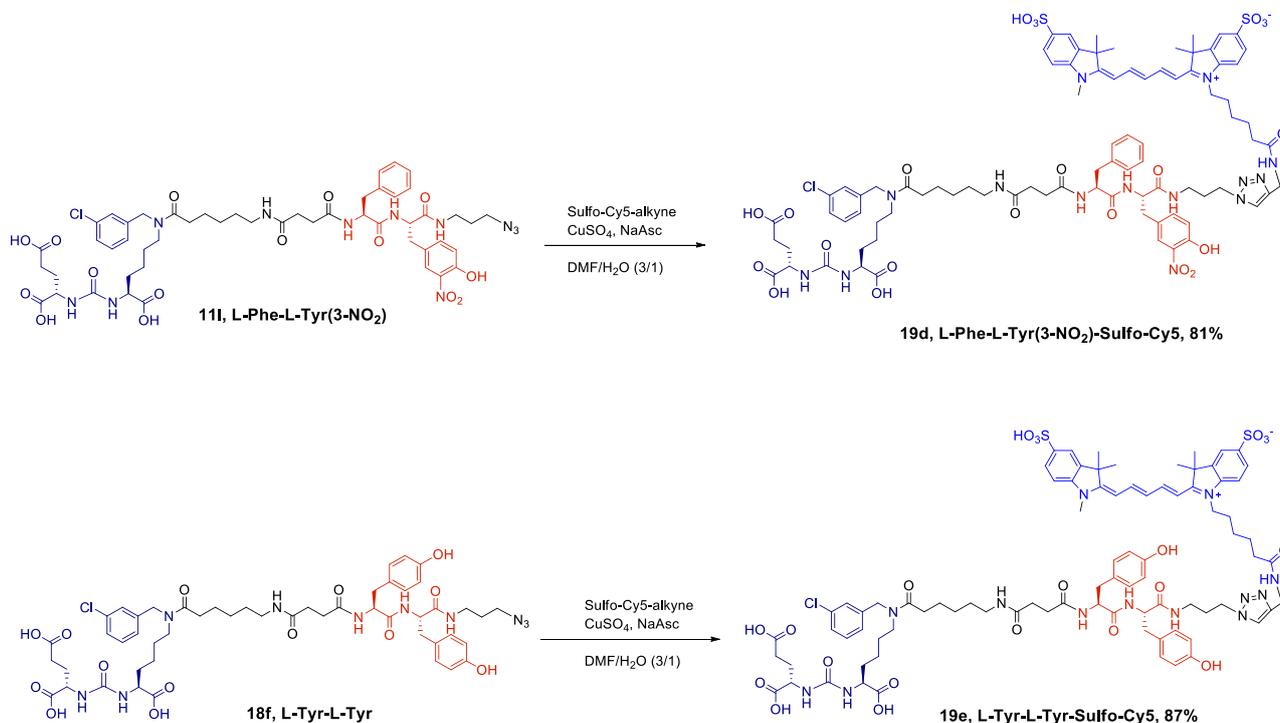


Схема 3.23. Структуры конъюгатов с Sulfo-Cy5

Очистку проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии обращенно-фазовым методом. Структуры полученных соединений подтверждались основными методами физико-химического анализа: ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия высокого разрешения.

3.6.2. Синтез терапевтического конъюгата с монометил ауристатином E

Для синтеза диагностических конъюгатов была выбрана реакция [1,3]-диполярного циклоприсоединения азидо-группы лиганда и терминальной алкина в структуре модифицированного ветоидина. Ведотин представляет собой модифицированный монометил ауристатин E (ММАЕ) с катепсин В расщепляемым линкером, представляющим собой пептидную последовательность валил-цитруллина. Данное сочетание нашло широкое применение в терапевтических конъюгатах с ММАЕ.¹⁷¹ Модифицированный гекс-5-иновой кислотой ММАЕ был ранее получен в лаборатории и был взят в качестве готового реактива (Схема 3.24).

Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I) обладает большим рядом преимуществ такими как: высокая селективность затрагиваемых групп, простота в реализации реакции, хорошие выходы реакций.^{168,169}

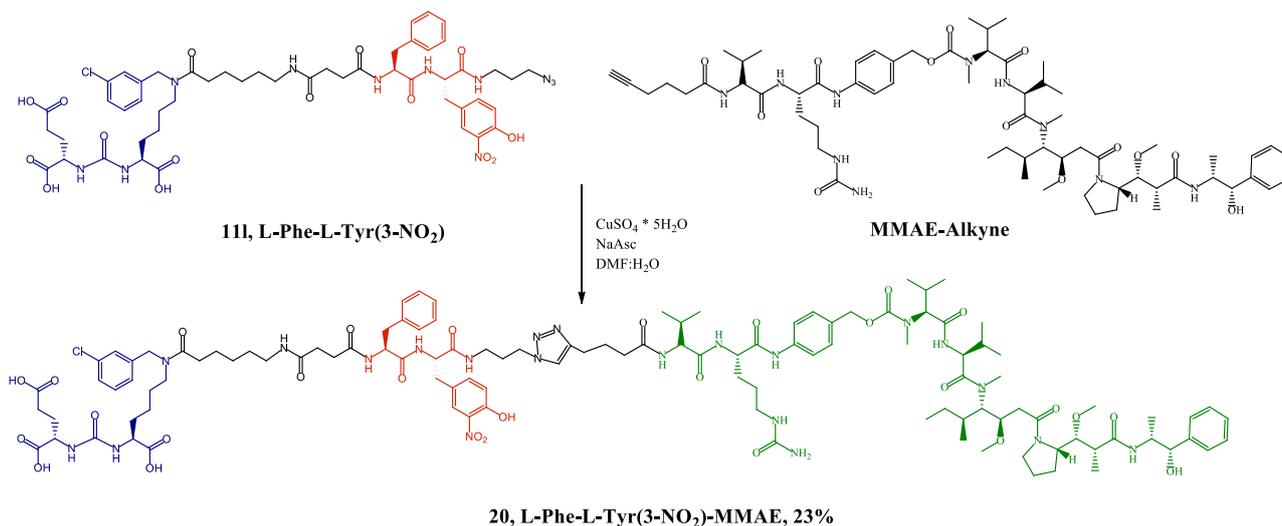


Схема 3.24. Схема синтеза терапевтического конъюгата с монометил ауристатином E и лигандом **18f** (L-Phe-L-Tyr(3-NO₂))

3.7. Физико-химические свойства флуоресцентных конъюгатов

Исследование растворимости полученных конъюгатов

Методом УФ-спектрофотометрии для серии конъюгатов была установлена липофильность с помощью системы н-октанол – вода. Первоначально были получены корреляционные зависимости оптического поглощения от концентрации раствора. После этого исследовались насыщенные растворы конъюгатов с целью определения растворимости¹⁷². Результаты представлены в **таблице 3.3**.

Таблица 3.3. Растворимость соединений **19c – 19e** в воде (pH=6.4)

№	Структура конъюгата	Растворимость в воде, мкМ	Растворимость в воде, мг/мл
19b	L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy.5	4019,3	6,9
19d	L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-Sulfo-Cy.5	1005,7	1,8
19e	L-Tyr-L-Tyr-Sulfo-Cy.5	194,5	0,34
19c	L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy.7	310,0	0,56

Рассматривая серию конъюгатов с флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5, можно сделать вывод о том, что структура линкера, а именно заместители в ароматическом кольце фенилаланина и тирозина оказывают значительное влияние на свойства растворимости. Наименьшую растворимость показал конъюгат **19e** с дипептидной цепочкой L-Tyr-L-Tyr, более чем в 20 раз меньшую в сравнении с **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy.5**. Введение же нитрогруппы в структуру тирозина также снижает растворимость, однако в меньшей степени.

Для конъюгата **L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy.7** наблюдается большее значение липофильности, которое связано с наличием в структуре метки Sulfo-Cy7 гидрофобного алифатического фрагмента.

Изучение оптических свойств конъюгатов

Длину волны максимумов флуоресценции и поглощения определяли методом спектрофотометрии. Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi U2900, а спектры флуоресценции проводили на спектрофотометре Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Результаты представлены в **таблице 3.4**.

Таблица 3.4. Результаты определения длин волн максимумов поглощения и флуоресценции соединений с флуоресцентной меткой Sulfo-Cy5.

№	Соединение	Максимум флуоресценции, нм	Максимум поглощения, нм	Стоксов сдвиг, нм
19b	L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy.5	665	648	17
19d	L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-Sulfo-Cy.5	667	648	19
19e	L-Tyr-L-Tyr-Sulfo-Cy.5	664	648	16
-	Sulfo-Cy5	663	646	17

Стоксов сдвиг (разница максимумов длин волн флуоресценции и поглощения) является одной из основных характеристик флуоресцентных конъюгатов для интраоперационной визуализации¹³⁴. Было установлено, что конъюгирование флуоресцентной метки Sulfo-Cy5 с модифицированными линкерами вектор-молекул ПСМА незначительно сказывается на его спектральных характеристиках, таких как максимумы поглощения, флуоресценции, Стоксов сдвиг. Наибольшее значение Стоксового сдвига – 19 нм, было показано на лиганде, содержащего нитро-тирозин в структуре линкера **19d**.

3.8. Биологические испытания конъюгатов ПСМА

3.8.1. *In vitro* и *in vivo* конъюгатов с флуоресцентными красителями Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 и FAM-5⁷

In vitro результаты исследования методом цитофлуориметрии

Исследование проводили методом проточной цитофлуориметрии на трех клеточных линиях 22Rv1 (ПСМА-положительная, с низкой экспрессией), LNCaP (ПСМА-положительная, с высокой экспрессией) и PC-3 (ПСМА-отрицательная). Цель такого исследования – определить способность полученных конъюгатов PSMA-Sulfo-Cy5 и PSMA-FAM-5 окрашивать клетки рака предстательной железы в зависимости от количества простатического специфического антигена на поверхности клетки.

Доля конъюгата **19a (L-Phe-L-Tyr-FAM-5)** 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 линию 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 3.4**). Таким образом подтверждается, что окрашивание клеток происходит за счет связывания конъюгатов с ПСМА.

⁷ Биологические исследования выполнены в лаборатории «Биомедицинских наноматериалов» МИСиС, к.х.н., доц. Абакумовым М. А.

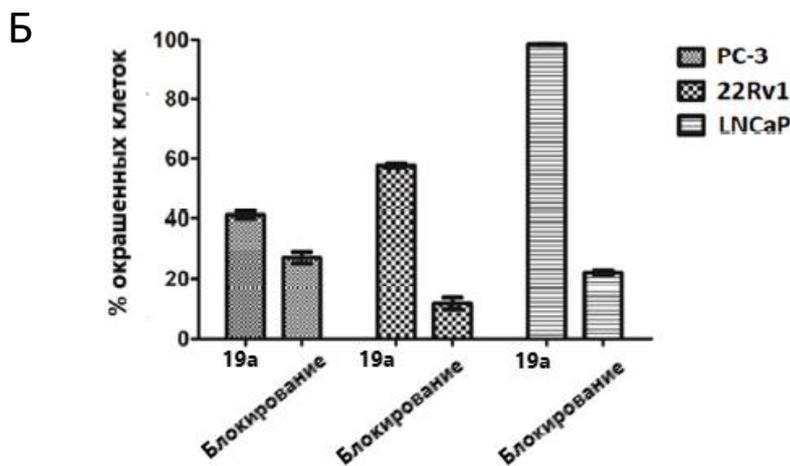
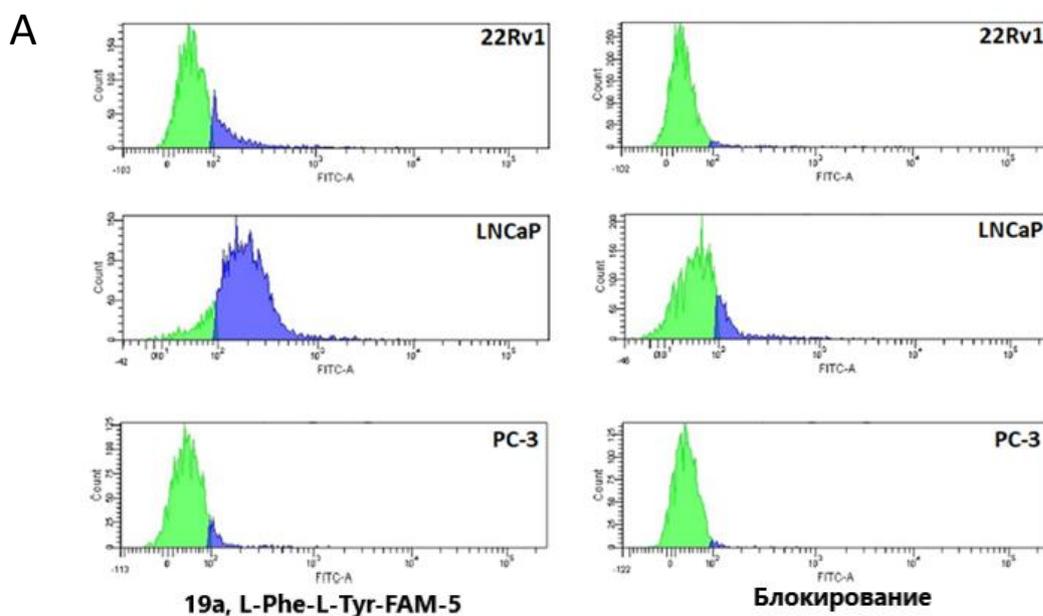


Рисунок 3.4. А- Гистограмма сигнала FAM-5 на клетках 22Rv1, LNCaP и PC-3 после обработки 4 мкМ конъюгатом **19a** (L-Phe-L-Tyr-FAM-5). Синим цветом выделены окрашенные клетки, зеленым – неокрашенные. Б – Диаграмма окрашивания клеток конъюгатом PSMA-FAM-5. Блокирование - результат окрашивания **19a** (L-Phe-L-Tyr-FAM-5) после 1 ч предварительной инкубации с 100× молярным избытком лиганда **I** (L-Phe-L-Tyr).

Аналогичная корреляция наблюдается в случае конъюгата **19b** (L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5) (**Рисунок 3.5**). Наибольшее накопление флуоресцентного сигнала SulfoCy5 было характерно для клеточной линии LNCaP (98,4% окрашенных клеток). Для клеточных линий 22Rv1 и PC-3 процент окрашенных клеток составил 57,5% и 41,1% соответственно. Частичная блокада PSMA с помощью лиганда **I** (L-Phe-L-Tyr) привела к 4,1-кратному снижению накопления **19b** (L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5) 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.

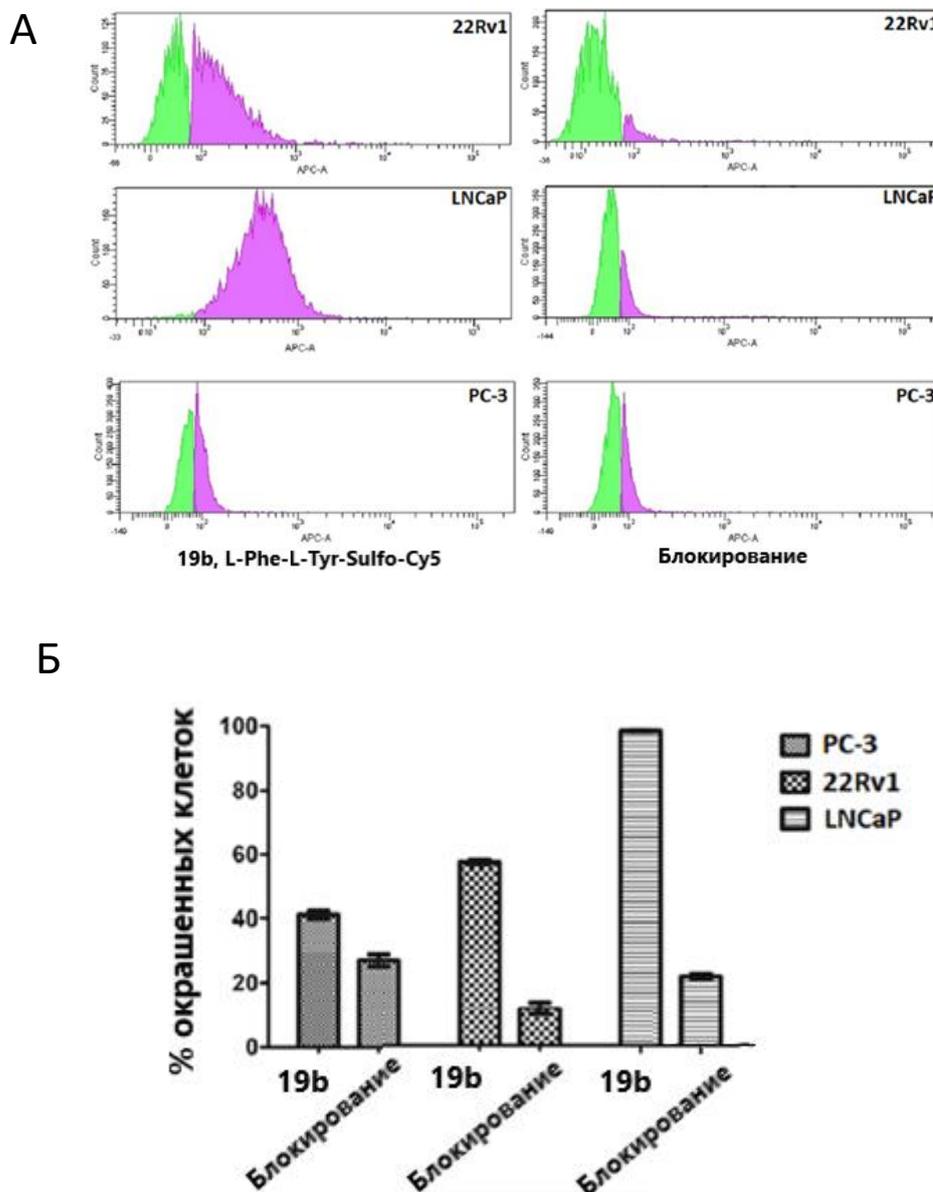


Рисунок 3.5. А- Гистограмма сигнала Sulfo-Cy5 на клетках 22Rv1, LNCaP и PC-3 после обработки 4 мкМ конъюгатом **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5**. Синим цветом выделены окрашенные клетки, зеленым – неокрашенные. В – Диаграмма окрашивания клеток конъюгатом **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5**. Блокирование - результат окрашивания PSMA-Sulfo-Cy5 после 1 ч предварительной инкубации с 100× молярным избытком лиганда (**L-Phe-L-Tyr**).

Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что оба конъюгата **19a (L-Phe-L-Tyr-FAM-5)** и **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** обладают значительным сродством к ПСМА-

экспрессирующим клеткам. Для **19b** показатели аффинности были лучше, в сравнении с конъюгатом **19a**. Однако, и на ПСМА-неэкспрессирующих клетках РС-3 можно наблюдать неспецифическое сродство этого конъюгата. Полученные конъюгаты могут быть хорошими визуализирующими агентами *in vitro*. Благодаря своим спектральным характеристикам (λ_{\max} FAM-5 = 490 нм и λ_{\max} SulfoCy5 = 646 нм) PSMA-SulfoCy5 имеет большой потенциал при использовании в качестве визуализирующего агента. Обусловлено это ограничениями, возникающими из-за прозрачностей тканей для видимого света. SulfoCy5 имеет максимум поглощения при 646 нм, и расположен на краю окна NIR-I (650-950 нм)¹⁷³.

Способность к визуализации конъюгата **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** 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 РС-3. Инкубация клеток с выбранной оптимальной концентрацией 100 нМ PSMA-SulfoCy5 показала окрашивание 97,9% клеток LNCaP и только 2,8% клеток РС-3 (**Рисунок 3.6**).

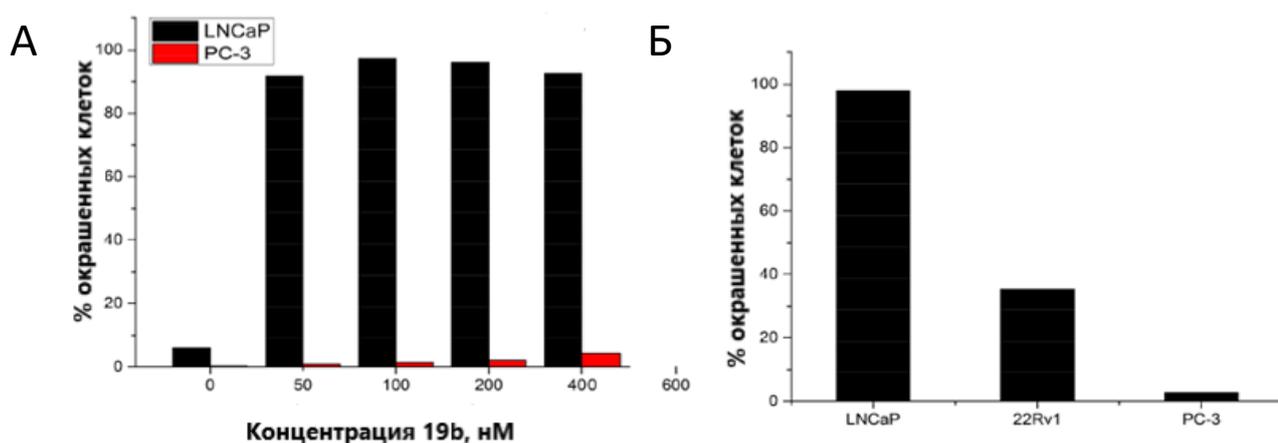


Рисунок 3.6. А - Зависимость окрашивания клеток LNCaP и РС-3 с **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** от концентрации; В - Клетки LNCaP, 22Rv1 и РС-3, окрашенные **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** при концентрации 100 нМ.

Полученные конъюгаты не были токсичны по отношению к клеточным линиям LNCaP и РС-3, за исключением конъюгата **19c L-Phe-L-Tyr-SulfoCy7**, значения цитотоксичности которого составили 12,2 мкМ и 18,7 мкМ, соответственно (**Таблица 3.5**).

Таблица 3.5. Цитотоксичность конъюгатов **19b - 19c**, лиганда **18f** и не модифицированных флуоресцентных меток Sulfo-Cy5 и Sulfo-Cy7

№	Структура	CC ₅₀ , μM	
		LNCaP	PC-3
18f	L-Phe-L-Tyr	>100	>100
19b	L-Phe-L-Tyr-SulfoCy5	>100	>100
19c	L-Phe-L-Tyr-SulfoCy7	12.2±8.1	18.7±4.5
-	SulfoCy5	>100	>100
-	SulfoCy7	>100	>100

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 3.7**.

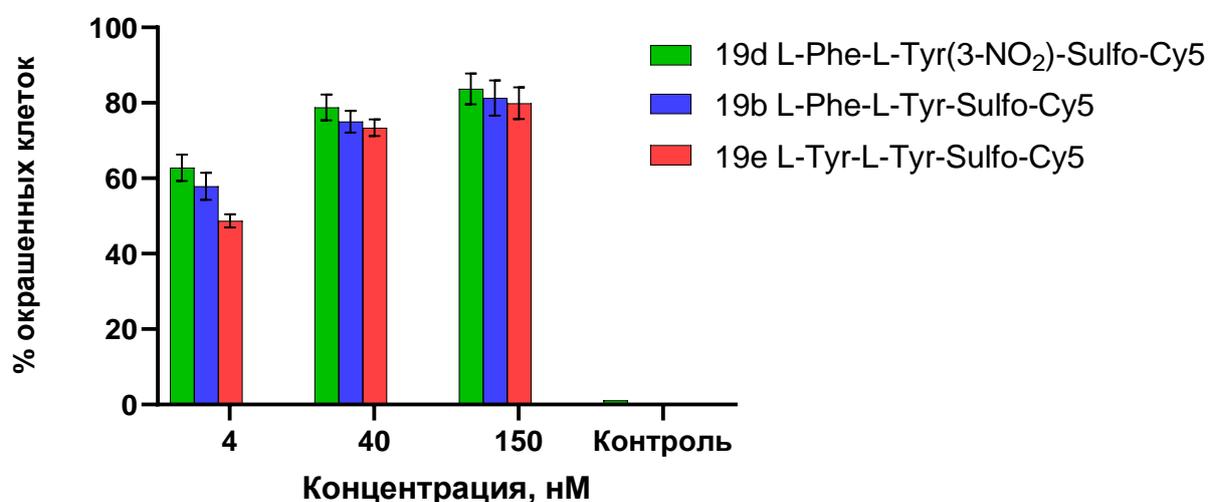


Рисунок 3.7. Результаты исследования визуализации клеточных линий LNCaP конъюгатами **19b**, **19d** – **19e**, из растворов различных концентрации (4 нМ, 40 нМ, 150 нМ). Контроль – автофлуоресценция клеточных линий LNCaP

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 L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-Sulfo-Cy5**, синтезированный на основе наиболее аффинного лиганда **11l L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)**. При самой низкой концентрации (40 нМ) доля окрашенных клеток конъюгатом **19d** оказалась равной 77% против 58% для конъюгата **19a L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** и 51% для конъюгата **19e L-Tyr-L-Tyr-Sulfo-Cy5**.

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 РС-3. Результаты количественного анализа поглощения опухолями сигнала для конъюгата PSMA-SulfoCy5 представлены **рисунке 3.8**.

В течении первого часа после введения препарата достоверных отличий между поглощением ПСМА-положительной и ПСМА-отрицательной опухолями не наблюдалось. Значительная разница стала наблюдаться по истечению 24 часов. Так как после введения большая часть конъюгата находилась в кровотоке, в первые часы наблюдается увеличение фонового, который постепенно снижался по мере накопления в тканях и выведения из организма почками с мочой. Таким образом за 24 часа из организма выводится весь неспецифически связанный конъюгат. Поглощение наблюдалось только в тканях, экспрессирующие ПСМА, в частности в ксенотрансплантатах 22Rv1. В этой области увеличение интенсивности сигнала происходило более чем в 2 раза (**Рисунок 3.8 А и Б**)

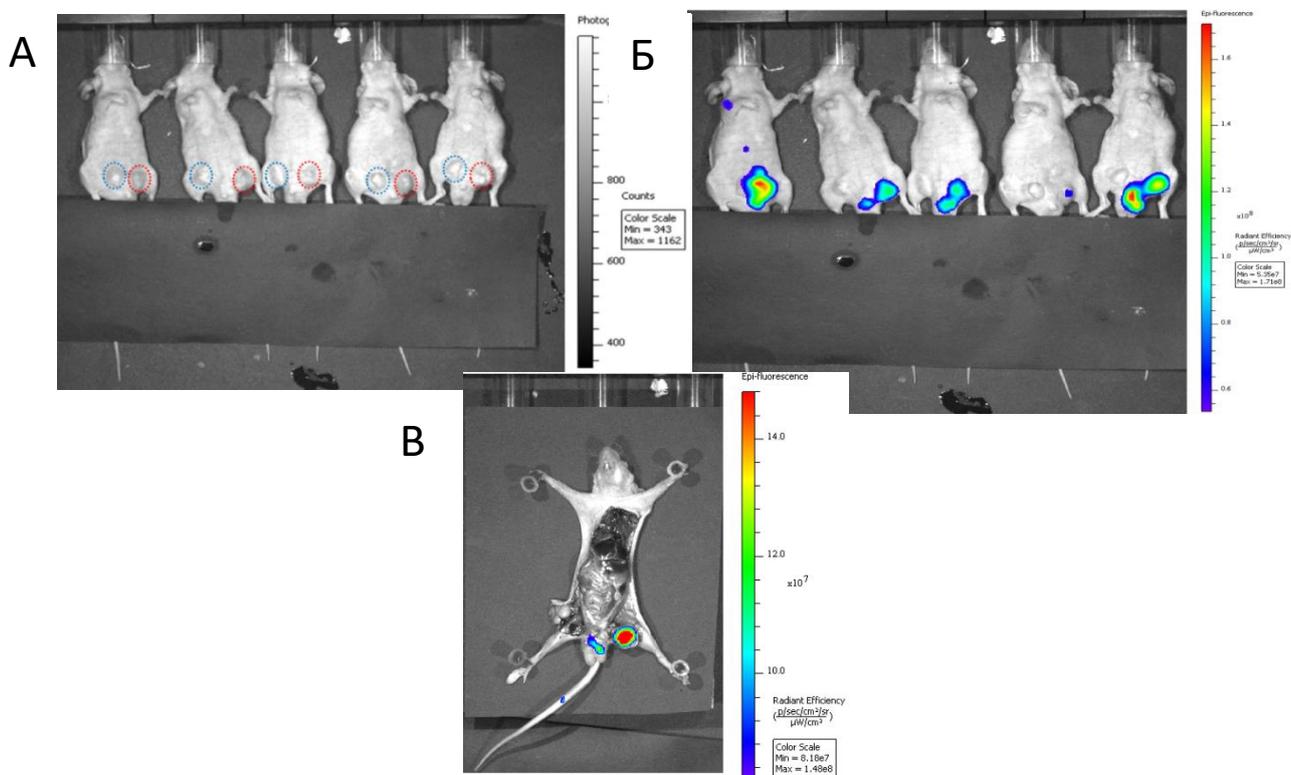


Рисунок 3.8. Поглощение ксенотрансплантатом 22Rv1 конъюгата PSMA-SulfoCy5 при однократной дозе 1T (250 нмоль/кг): (А) визуализация *in vivo* через 24 ч после

инъекции; (Б) *ex vivo* визуализация через 24 ч после инъекции; (В) фотография мышей; красным пунктиром выделены 22Rv1 (PSMA+), синим - PC-3 (PSMA-).

Так как кожа и ткани активно поглощают свет, что приводит к ослаблению сигнала было решено провести исследование *ex vivo* (Рисунок 3.8 В). Такие условия приближены к условиям интраоперационной диагностике при эксплоративной хирургии. Анализ поглощения *ex vivo* показал еще большую разницу в накоплении сигнала. Среднее поглощение конъюгата в опухолях 22Rv1 было в 14 ± 2 раза выше, чем в опухолях PC-3.

Для конъюгата PSMA-SulfoCy7 в целом были получены аналогичные результаты. Как и в случае PSMA-SulfoCy5, достоверная разница в накоплении стала наблюдаться через 24 часа после введения препарата (Рисунок 3.9). 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.

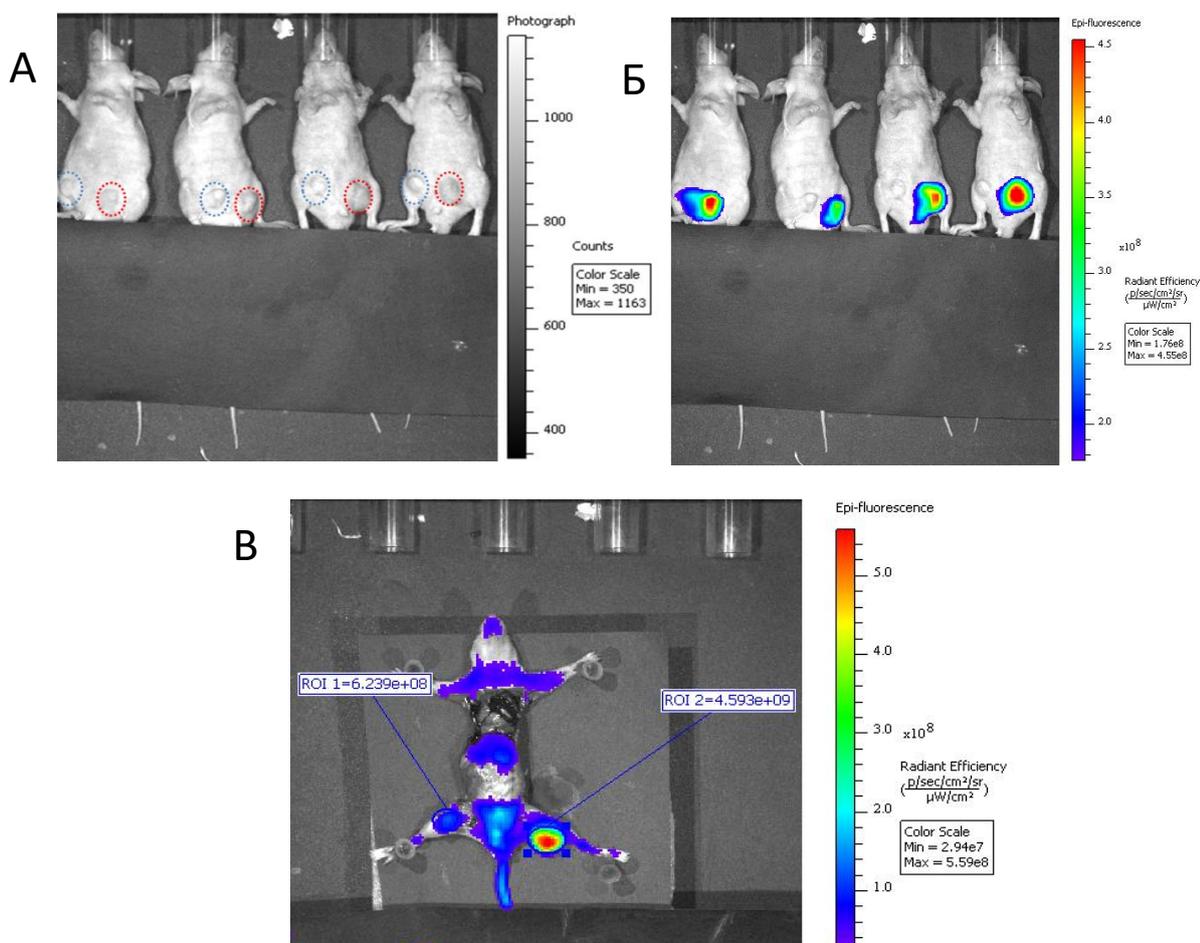


Рисунок 3.9. Поглощение ксенотрансплантатом 22Rv1 конъюгата 19c L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7 при однократной дозе 1Т (250 нмоль/кг): (А) визуализация *in vivo* через 24 ч после

инъекции; (В) *ex vivo* визуализация через 24 ч после инъекции; (С) фотография мышей; красным пунктиром выделены 22Rv1 (PSMA+), синим - PC-3 (PSMA-).

Накопление сигнала в ксенотрансплантатах 22Rv1 при исследовании *ex vivo* было в 5 раз выше, чем в ксенотрансплантатах PC-3. Уровень сигнала **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** и **19c L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7** через 24 часа после инъекции был сопоставим и составил $1,5 \times 10^9$ и $1,9 \times 10^9$ (ф/с)/(мкВт/см²) соответственно. 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.

Кроме того, стоит отметить, что в сравнении с недавно опубликованными работами была продемонстрирована хорошая визуализация на клеточной линии 22Rv1 с обоими конъюгатами при значительно меньшей дозе введения – 5 нмоль в 100 мкл (для конъюгата OTL7819 доза введения составляет 10 нмоль в 100 мкл)¹³⁴.

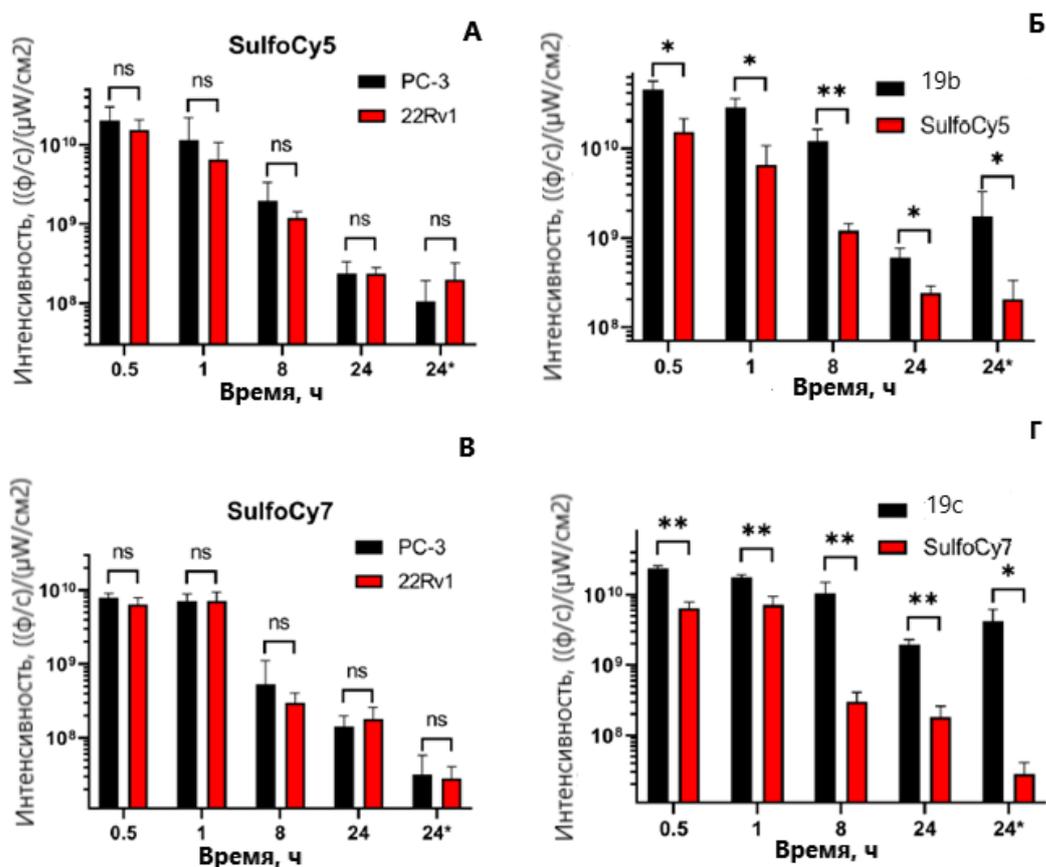


Рисунок 3.10. (А) Гистограмма зависимости поглощения опухолью не модифицированного красителя Sulfo-Cy5-алкина от времени; 24* - уровень флуоресценции после исследования *ex vivo*. (Б) Гистограмма зависимости поглощения опухолью конъюгата

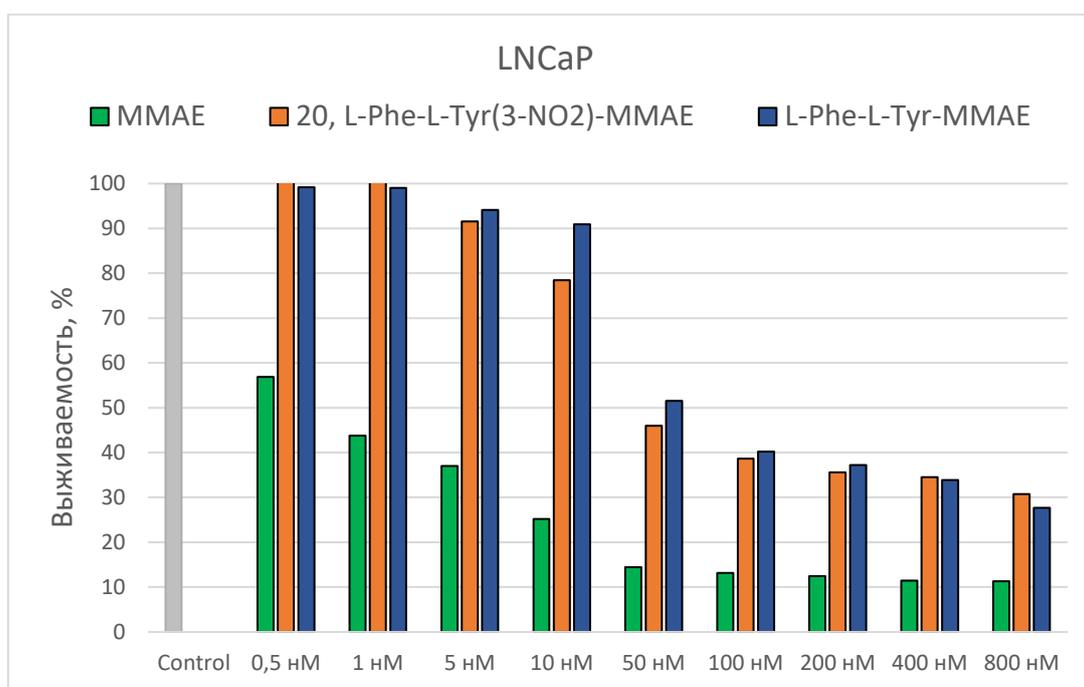
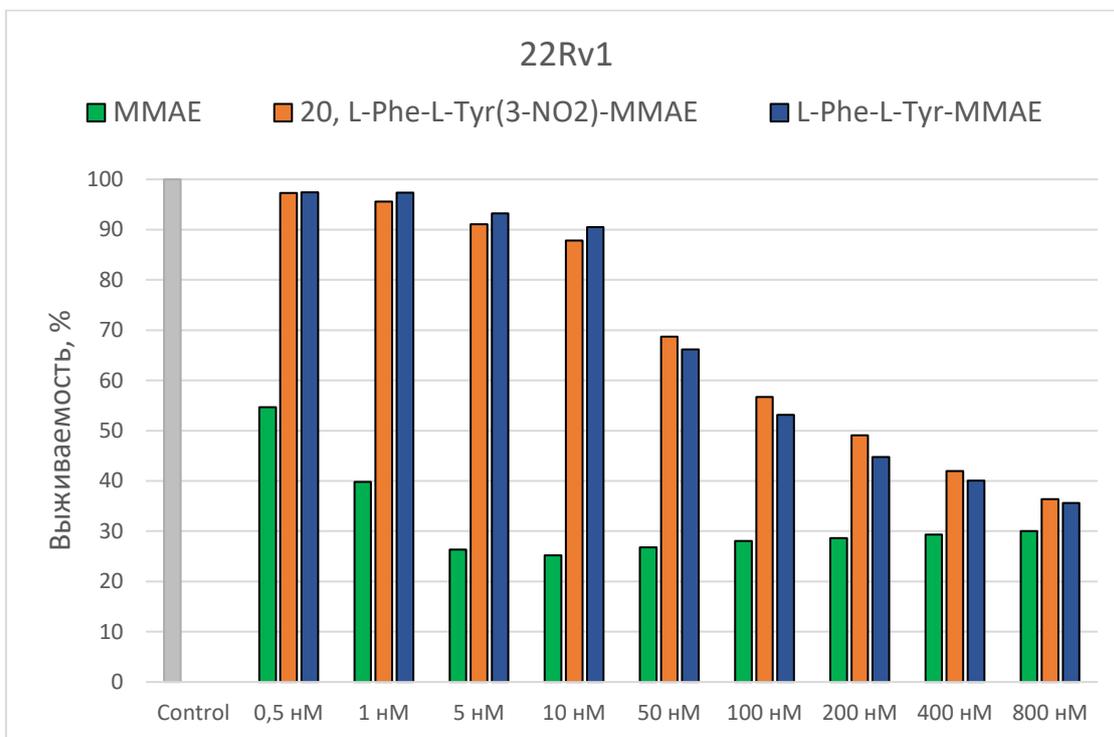
19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5 по сравнению с немодифицированным красителем Sulfo-Cy5 от времени. 24* - уровень флуоресценции после исследования *ex vivo*. (В) Гистограмма зависимости поглощения опухолью 22Rv1 не модифицированного красителя Sulfo-Cy7-алкина от времени; 24* - уровень флуоресценции после исследования *ex vivo*. (Г) Гистограмма зависимости поглощения опухолью 22Rv1 конъюгата **19c L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7** по сравнению с не модифицированным красителем Sulfo-Cy7 от времени. 24* - уровень флуоресценции после исследования *ex vivo*. Результаты представлены как среднее \pm SD (тест Манна-Уитни, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns - не существенно).

Было изучено распределение не модифицированных красителей Sulfo-Cy5 и Sulfo-Cy7 и их распределение в структуре конъюгатов (**Рисунок 3.10**). В случае свободных красителей снижение сигнала как в опухолях, так и во всем организме происходило значительно быстрее, что можно объяснить различиями в фармакокинетике и более быстрым выведением из организма. Помимо этого, ни *in vivo*, ни *ex vivo* не было обнаружено существенной разницы в накоплении между ксенотрансплантатами 22Rv1 и PC-3 даже по истечении 24 часов. Напротив, в структуре конъюгатов **19b L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5** и **19c L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7** наблюдается достоверное различие в накоплении на клеточной культуре 22Rv1, которое хорошо видно как на *in vitro* испытаниях, так и на *ex vivo*.

3.8.2. *In vitro* испытания конъюгата с монометил ауристатином E⁸

Биологические испытания полученных конъюгатов *in vitro* проводились на трех клеточных линиях: 22Rv1 (PCMA +), LNCaP (PCMA +) и PC-3 (PCMA -) методом проточной цитофлуориметрии. Результаты полученных исследований приведены ниже на **рисунке 3.11**.

⁸ Биологические исследования выполнены в лаборатории «Биомедицинских наноматериалов» МИСиС, к.б.н., н.с. Гараниной А.С.



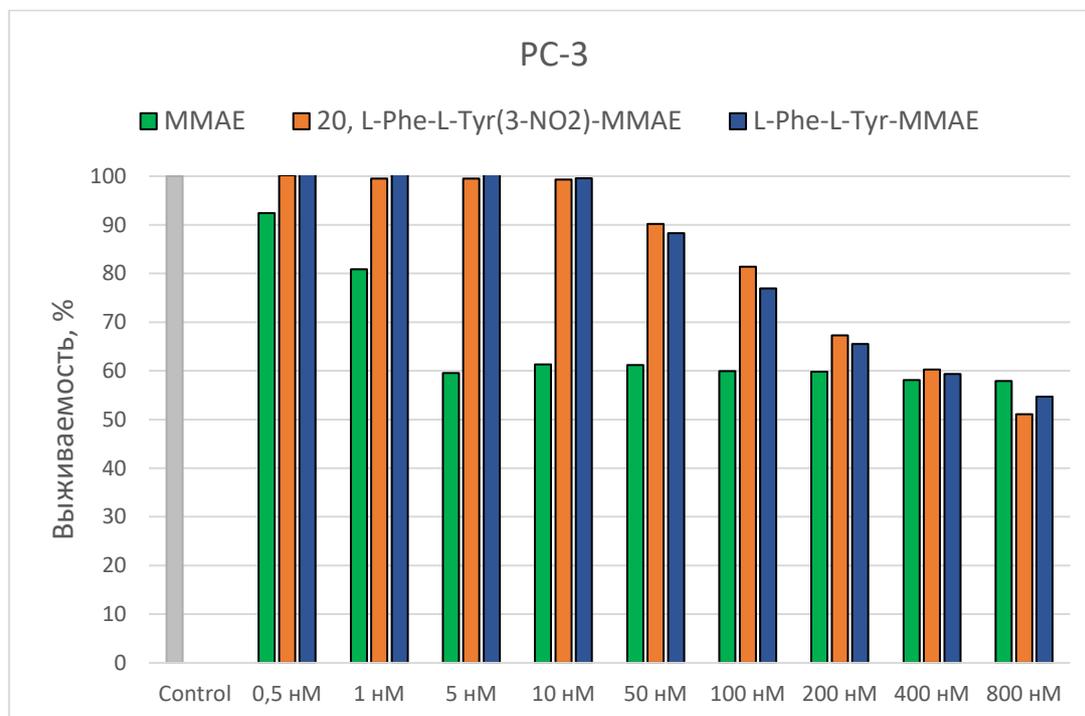


Рисунок 3.11. Результаты биологических исследований *in vitro* конъюгатов **20 L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-MMAE** и **L-Phe-L-Tyr-MMAE** с на клеточных линиях 22Rv1, LNCaP и PC-3.

В качестве конъюгата сравнения был взят ранее полученный в лаборатории терапевтический конъюгат с монометил ауристатином E **L-Phe-L-Tyr-MMAE** (Схема 3.25). Исходя из полученных данных мы видим, что конъюгат **20 L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-MMAE** обладает цитотоксичностью относительно ПСМА-положительных клеточных линий, уменьшая высокотоксическое действие не модифицированного монометил ауристатина E.

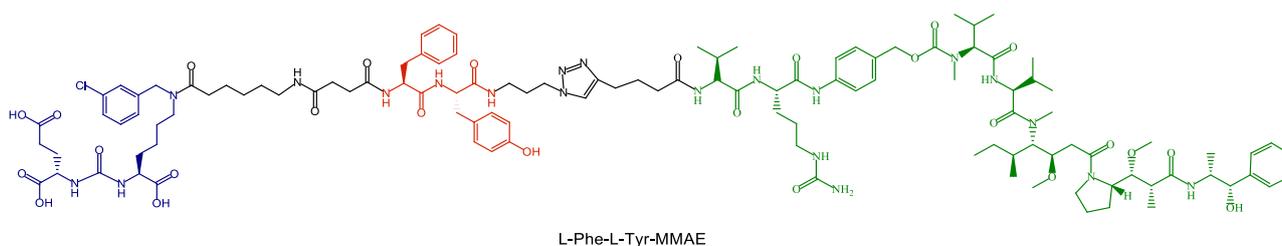


Схема 3.25. Структура терапевтического конъюгата сравнения с монометил ауристатином E (**L-Phe-L-Tyr**)

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 неэкспрессирующая) 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 L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-MMAE** $657 \pm 105,7$ нМ. 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 L-Phe-L-Tyr(3-NO₂)-MMAE**), что является хорошим показателем и говорит о хорошей селективности препарата.

4. Экспериментальная часть

Условные обозначения

DCL - N-[N-[(S)-1,3-дикарбоксипропил]карбомоил]-(S)-L-лизин

DMCO - диметилсульфоксид

DCM(ДХМ) - дихлорметан

TEA - триэтиламин

Cbz - бензилоксикарбонил

MeOH – метанол

EtOAc – этилацетат

Et₂O (ДЭК) - диэтиловый эфир

MeCN – ацетонитрил

RuBOP - бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат

DIPEA - диизопропилэтиламин

Ph₃P - трифенилфосфин

ТГФ - тетрагидрофуран

HBTU - 3-[Бис(диметиламино)метилиумил]-3Н-бензотриазол-1-оксид гексафторфосфат

НОВТ - гидроксibenзотриазол

DMFA - диметилформамид

Fmoc - 9 - флуоренилметоксикарбонил

2-СТС - 2-хлортритильная смола

TFA - трифторуксусная кислота

TIPS - триизопропилсилан

HPLC (ВЭЖХ) – высокоэффективная жидкостная хроматография

LCMS (ВЭЖХ-МС) - высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия;

ТСХ - тонкослойная хроматография

4.1. Общие сведения

Все использованные растворители очищали в соответствии с процедурами, описанными в ¹⁷⁴. Все исходные соединения являются коммерчески доступными реагентами (Sigma-Aldrich, Fluka®Analytical, abcr, Carbosynth, Lumiprobe) и использовались без дополнительной очистки. Спектры ¹H ЯМР записывали на спектрометре Bruker Avance при 400 МГц, с использованием CDCl₃, DMCO-d₆, D₂O в качестве растворителей. Химические сдвиги приведены в единицах δ с точностью до 0.01 ppm, а константы спин-спинового взаимодействия указаны с точностью до 0.1 Гц с использованием остаточного растворителя в качестве внутреннего стандарта. Спектры ЯМР ¹³C записывали на спектрометре Bruker Avance при 100.6 МГц, с использованием DMCO-d₆ и D₂O в качестве растворителей. Химические сдвиги приведены в единицах δ с точностью до 0,1 ppm с использованием остаточного растворителя в качестве внутреннего стандарта. Спектры ¹H ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы ACSLabs (10.0).

Спектры ^1H ЯМР для соединения **19c** записывали на спектрометре Bruker AVANCE при 600 МГц, 298 К в DMSD- d_6 . Отнесение сигналов ^1H , ^{15}N и ^{13}C при естественном содержании было получено с использованием набора 2D-экспериментов DQF-COSY, TOCSY, ROESY, ^{13}C - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HMBC и ^{15}N - ^1H HSQC. Время выдержки для экспериментов TOCSY и ROESY составляло 80 и 320 мс соответственно. Химические сдвиги ^1H измеряли с помощью TMS в качестве внутреннего стандарта, а химические сдвиги ^{13}C определяли косвенно, используя метод γ -соотношений.¹⁷⁵ Спектры обрабатывали с помощью NMRPipe¹⁷⁶ с использованием стандартного протокола, который включает функцию Лоренца-Гаусса, прямое-обратное линейное предсказание и полиномиальную коррекцию базовой линии. Спектры ^1D ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы Mnova (Mestrelab Research, Испания).

Для анализа образцов использовали систему Shimadzu Prominence LC-20 с хроматографической колонкой Phenomenex Luna 3 мкм C18 90A (150 x 4.6 мм) с колоночным термостатом при 40°C и коллектором фракций, соединенным с одноквадрольным масс-спектрометром Shimadzu LCMS-2020 с двойным источником ионизации (DUIS-ESI-APSI, ИРЭП-ХИАД). Подвижные фазы: А - 0.1% муравьиная кислота в воде, В - 9 мМ формиат аммония в воде, Д - ацетонитрил. Параметры аналитической жидкостной хроматографии: скорость потока - 1 мл/мин (градиент: 0 - 0.5 мин - 5% Д, 0.5 - 9.5 мин – от 5% до 90% Д, 9.5 - 12 мин - 90% Д, 12 - 14.5 мин – от 90% до 5% Д) с опциональным УФ детектированием для некоторых соединений. Параметры масс-спектрометра: скорость потока газа-осушителя 15.0 л/мин, газа-распылителя 1.5 л/мин, температура 250°C, температура нагревательного блока 400°C, напряжение на интерфейсе - 3.5 кВ, напряжение коронного разряда - 3.5 кВ. Регистрация положительно заряженных (диапазон масс 250 - 2000 Да, в некоторых случаях 155 - 2000 Да) и отрицательно заряженных ионов (диапазон масс 90 - 2000 да) проводилась одновременно. Для очистки использовали такие же хроматографические параметры. Градиент подбирался отдельно для каждого соединения. Фракционирование основывалось на УФ детектировании. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре TripleTOF 5600+ (AB Sciex, Канада), оснащенным источником ионизации электрораспылением TurboIon Spray и жидкостным хроматографом LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония). Введение образцов осуществляли по 0.2 мкл образца в поток 0.3 мл/мин метанола без хроматографического разделения напрямую в источник ионов. Напряжение при распылении ± 5.5 кВ, температура капилляра 300°C. Максимальное время ввода 250 мс, усреднение по 9 спектрам, диапазон масс 100 - 3000 Да. Для внутренней

калибровки использовали сигналы ДМСО и диизооктилфталата (m/z 157.03515 и 413.26623) в положительной моде и сигнал додецилсульфата (m/z 265.14790) в отрицательной моде.

Препаративное хроматографическое разделение веществ проводили на хроматографе INTERCHIM puriFlash 430. Выпаривание растворителя осуществляли с использованием роторного испарителя, при пониженном давлении при температуре бани 20-50°C; колоночную флэш-хроматографию осуществляли, используя Merck силикагель 60 (230-400 меш ASTM).

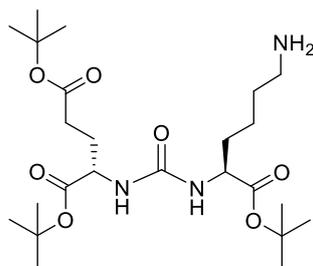
Оптические углы вращения измеряли на автоматическом высокоскоростном поляриметре A.KRUSS Optronic P8000.

За ходом реакции следили с помощью тонкослойной хроматографии на фиксированном слое силикагеля (пластины для ТСХ с предварительно нанесенным силикагелем 60 F254 Merck).

4.2. Синтез

4.2.1. Синтез модифицированного вектор-молекулы мочевины DCL

Синтез (S)-ди-трет-бутил-2-(3-((S)-6-амино-1-(трет-бутокси)-1-оксогексан-2-ил)уреидо)пентандиоата (1)



Гидрохлорид ди-трет-бутилового эфира L-глутаминовой кислоты (25 г, 84.5 ммоль) растворили в ДХМ (дихлорметан) (350 мл) и добавили триэтиламин (35 г, 277.25 ммоль). Полученную смесь охладили до -78°C. Далее в реакционную по каплям добавлялся раствор трифосгена (8.5 г, 28.75 ммоль) в 100 мл CH_2Cl_2 . После добавления раствора трифосгена температуру реакции довели до комнатной. После раствор перемешивали 30 минут. Затем в систему H-Lys-(Z)-Ot-Bu (19 г, 50.75 ммоль) и триэтиламин (7 мл, 50.75 ммоль) в 150 мл дихлорметана и оставили при перемешивании на 24 часа. После этого реакционную смесь разбавили 500 мл ДХМ, и промыли водой (2×2500 мл). Объединенные органические фракции высушили над сульфатом натрия. Растворитель удалили при пониженном давлении. Дальнейшую очистку полученной фракции проводили методом колоночной хроматографии с элюентом этилацетат : гексан (Puriflash 50μ 300g, от 0 до 100% этилацетата в течение 40 минут). В результате была получена мочевина DCL-Cbz в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом.

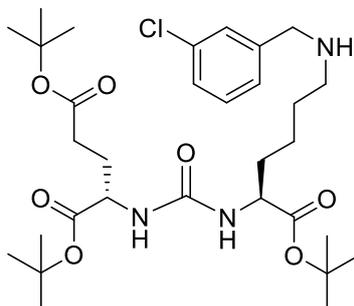
Полученную мочевины (41.5 г, 66.75 ммоль) растворили в 100 мл метанола. К полученному раствору добавили палладий на активированном угле (4.15 г, 10% от массы). Реакцию проводили в атмосфере водорода. Реакционную смесь перемешивали 24 часа. Раствор отфильтровали на пористом фильтре с подложкой Kieselgur (2 см). Далее растворитель был удален при пониженном давлении. В результате было получено соединение **2** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 95% (30 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , м.д.): 5.46 – 5.52 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.17 – 4.43 (м, 2H, CH), 2.15 – 2.41 (м, 4H, CH_2), 1.91 – 2.14 (м, 2H, CH_2), 1.66 – 1.89 (м, 3H, CH_2), 1.50-1.55 (м, 5H, CH_2), 1.42 – 1.46 (м, 27H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , м.д.): 172.61 (C(O)), 172.49 (C(O)), 172.39 (C(O)), 157.04 (NHC(O)NH), 81.93 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81.55 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80.43 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 53.38 (CH), 52.92 (CH), 41.23 (CH_2NH_2), 32.51 (CH_2), 31.59 (CH_2), 28.28 (CH_2), 28.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.98 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.96 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.25 (CH_2).

ESI-HRMS для $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_7$: m/z рассчитано $[\text{M}+\text{H}^+]$: 488.3330, найдено: 488.3340; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 510.3150, найдено: 510.3150.

Синтез ди-*трет*-бутил 2-(3-(1-(*трет*-бутоксид)-6-((3-хлоробензил)амино)-1-оксогексан-2-ил)уреидо)пентандиоата (2**)**



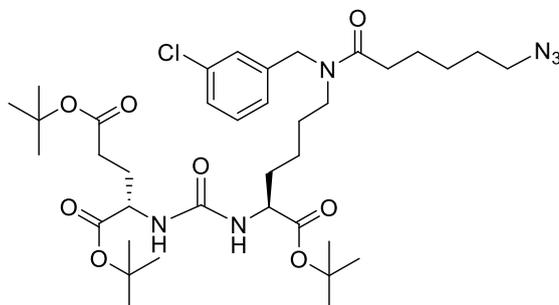
Соединение **1** (19.7 г, 40.425 ммоль) растворили в 500 мл метанола и добавили 3-хлорбензальдегид (5.68 г, 40.425 ммоль). Реакцию проводили в атмосфере аргона. Полученную смесь перемешивали в течение 16 часов. Далее в реакционную смесь добавили боргидрид натрия (2.29 г, 60.637 ммоль) и оставили при перемешивании в течение 1.5 часов. Далее при пониженном давлении удалили 2/3 растворителя и добавили 180 мл 1М NaOH. Далее проводили экстракцию хлористым метиленом, а после полученную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия. Дальнейшую очистку проводили с помощью колоночной хроматографии с элюентом ДХМ/MeOH (Puriflash 50 μ 300g от 0 до 15% MeOH в течение 60 минут, от 15% до 100% за 45 минут). Получили 19,17 мг (78%) продукта **7** в виде бесцветного маслянистого вещества.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.41 (с, 1H, Ar), 7.25-7.32 (м, 3H, Ar), 5.840 (д, 1H, $J=8.1$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})$), 5.28 (д, 1H, $J=7.5$ Hz, $\text{C}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})$), 4.33 (м, 2H, CH), 3.89 (с, 2H, CH_2Ar), 2.63-2.80 (м, 2H, CH_2), 2.23-2.40 (м, 2H, CH_2), 2.02-2.10 (м, 1H, CH_2), 1.67 -1.88 (м, 2H, CH_2), 1.55-1.68 (м, 3H, CH_2), 1.40-1.50 (м, 28H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.40-1.26 (м, 2H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (90 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 172.7 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 172.4 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 172.3 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 157.33($\text{NHC}(\text{O})\text{NH}$), 134.5 (Ar), 130.0 (Ar), 129.4 (Ar), 128.4 (Ar), 127.4 (Ar), 81.9 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 81.5 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 80.4 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 53.2 (CH), 52.8 (CH), 51.5 (CH_2), 47.2 (CH_2), 32.0 (CH_2), 31.6 (CH_2), 28.5 (CH_2), 28.4 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 28.1 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 28.0 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 27.4 (CH_2), 22.4 (CH_2).

ESI-HRMS для $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_7$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 612.3410, найдено: 612.3417.

Синтез (S)-ди-*трет*-бутил-2-(3-((S)-6-(6-азидо-N-(3-хлорбензил)гексанамидо)-1-(*трет*-бутокси)-1-оксогесан-2-ил)уреидо)пентадионата (3)



Соединение **2** (19,17 г, 31.357 ммоль), DIPEA (11 мл, 62.714 ммоль), 6-азидогексановую кислоту (7,38 г, 47.0,35 ммоль) и PyBOP (19.58 г; 37.628 ммоль) растворили в 250 мл DMF. Реакцию проводили атмосфере аргона. Смесь оставили при перемешивании в течение 24 часов. Далее растворитель был удален при пониженном давлении. Сухой остаток растворили в хлористом метиле (500 мл) и дважды промыли 500 мл воды. Продукт выделялся с помощью метода колоночной хроматографии в системе этилацетат : гексан (Puriflash 50 μ 300g от 5 до 100% этилацетата в течение 60 минут). В результате было получено соединение **3** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 90% (21,115 г).

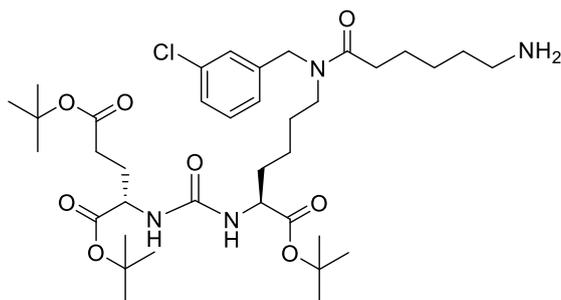
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.30-7.28 (м, 1H, Ar), 7.22 (д, 2H, Ar), 7.14 (д, 1H, Ar), 5.19 (уш.с, 1H, $\text{C}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})$), 4.55-4.50 (м, 2H, NCH_2Ar), 4.33 (м, 2H, CH), 3.30-3.25 (м, 4H, CH_2), 2.39-2.36 (м, 3H, CH_2), 2.33-2.29 (м, 3H, CH_2), 1.68-1.60 (м, 14H, CH_2), 1.46-1.43 (м, 27H, CH_3), 1.40-1.24 (м, 5H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173.63 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 173.05 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 172.81 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{OCH}_3$), 172.72 ($\underline{\text{C}}(\text{O})$), 172.55 ($\underline{\text{C}}(\text{O})$), 172.48 ($\underline{\text{C}}(\text{O})$), 172.42 ($\underline{\text{C}}(\text{O})$), 157.29 ($\text{NH}(\text{C}(\text{O})\text{NH})$), 156.02 ($\text{NH}(\text{C}(\text{O})\text{NH})$), 135.36 (Ar), 134.77 (Ar), 130.62 (Ar), 132.18 (Ar), 128.22 (Ar), 128.20 (Ar), 127.79 (Ar), 126.64 (Ar), 126.42 (Ar), 124.58 (Ar), 82.48 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 82.39

(C(CH₃)₃), 82.17 (C(CH₃)₃), 81.89 (C(CH₃)₃), 80.96 (C(CH₃)₃), 80.81 (C(CH₃)₃), 60.78 (CH), 53.80 (CH), 53.50 (CH), 53.42 (CH), 53.41 (CH₂), 51.65 (CH₂), 50.91 (CH₂), 48.25 (CH₂), 47.54 (CH₂), 33.52 (CH₂), 33.36 (CH₂), 33.08 (CH₂), 32.26 (CH₂), 31.98 (CH₂), 31.94 (CH₂), 29.17 (CH₂), 29.08 (CH₂), 28.97 (CH₂), 28.76 (CH₂), 28.60 (CH₂), 28.46 (C(CH₃)₃), 28.40 (C(CH₃)₃), 28.38 (C(CH₃)₃), 27.03 (CH₂), 26.93 (CH₂), 26.92 (CH₂), 22.86 (CH₂), 22.77 (CH₂), 21.44 (CH₂).

ESI-MS для C₃₇H₅₉ClN₆O₈: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 751.35, найдено: 751.40.

Синтез (S)-ди-трет-бутил-2-(3-((S)-6-(6-амино-N-(3-хлорбензил)гексанамидо)-1-(трет-бутокси)-1-оксогесан-2-ил)уреидо)пентадионата (4)



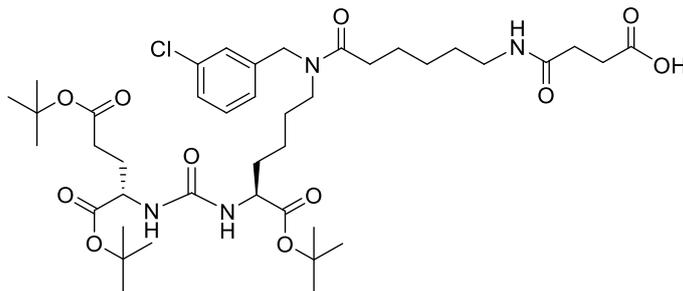
Соединение **3** (21,15 г, 28.18 ммоль) и PPh₃ (14,78 г, 56.36 ммоль) растворили в 200 мл смеси ТГФ/вода (5:1). Полученный раствор перемешивали в течение 6 часов при температуре 50 °С. Далее растворитель удалили при пониженном давлении, а продукт выделяли с помощью метода колоночной хроматографии (Puriflash 50μ 300g, система: 1% раствор ТЕА (триэтиламин) в ДХМ : MeOH, 8% MeOH в течение 40 минут, далее от 8% до 100% MeOH за 20 минут, промывка MeOH в течение 10 минут). В результате было получено соединение **4** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 80% (16,453 г).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.25-7.29 (м, 1H, Ar), 7.18-7.23 (д, 2H, Ar), 7.13 (м, 1H, Ar), 5.68 (уш. с, 1H, NHC(O)NH), 5.49 (уш.с, 1H, 1H, NHC(O)NH), 4.58-4.48 (м, 2H, CH₂Ar), 4.31 (м, 2H, CH), 3.46-3.17 (м, 2H, CH₂) 2.76-2.73 (м, 2H, CH₂), 2.64-2.59 (м, 6H, CH₂), 2.31 (уш. с, 1H, CH₂), 1.71 (м, 8H, CH₂), 1.43-1.42 (м, 27H, CH₃), 1.10-1.06 (м, 10H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (100 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173.61 (C(O)OCH₃), 173.03 (C(O)OCH₃), 172.49 (C(O)OCH₃), 172.36 (C(O)), 157.05(NHC(O)NH), 156.83 (NHC(O)NH), 139.20 (Ar), 130.21 (Ar), 129.80 (Ar), 127.86 (Ar), 127.86 (Ar), 127.77 (Ar), 127.40 (Ar), 126.31 (Ar), 126.05 (Ar), 124,28 (Ar), 82.02 (C(CH₃)₃), 81.77 (C(CH₃)₃), 81.49 (C(CH₃)₃), 80.60 (C(CH₃)₃), 80.49 (C(CH₃)₃), 53.39 (CH), 53.17 (CH), 53.02 (CH), 52.85 (CH), 50.49 (CH₂Ar), 47.70 (CH₂), 47.05 (CH₂), 46.22 (CH₂), 45.56 (CH₂), 41.93 (CH₂), 41.81 (CH₂), 33.07 (CH₂), 33.03 (CH₂), 32.98 (CH₂), 32.93 (CH₂), 32.07 (CH₂), 31.90 (CH₂), 31.67 (CH₂), 31.38 (CH₂), 28.51 (CH₂), 28.26 (CH₂), 28.08 (C(CH₃)₃), 28.03 (C(CH₃)₃), 28.00 (C(CH₃)₃), 26.70 (CH₂), 26.55 (CH₂), 25.09 (CH₂), 24.87 (CH₂), 22.41 (CH₂), 22.32 (CH₂).

ESI-HRMS для $C_{37}H_{60}ClN_4O_8$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 725.4251, найдено: 725.4249.

Синтез (7S, 11S) -7,11-бис (трет-бутоксикарбонил) -16- (3-хлорбензил) -2,2-диметил-4,9,17,24-тетраоксо-3-окса-8,10,16 , 23-тетраазагептакозан-27-овая кислота (5)



К раствору соединения **4** (16,45 г, 22,68 ммоль) в 400 мл ДХМ добавили янтарный ангидрид (2,38 г, 23,81 ммоль) и DIPEA (7,9 мл, 45,46 ммоль). Смесь перемешивали сутки. Далее добавили 5 мл метанола и перемешивали 30 минут. После растворитель удалили при пониженном давлении, а образовавшийся остаток растворили в 1000 мл ДХМ. Раствор промыли трижды 500 мл 0,1 М раствора HCl. Органическую фракцию высушили над Na_2SO_4 и упарили. В результате было получено соединение **5** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 88% (16,33 г).

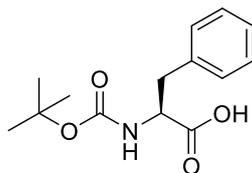
Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ , м.д.): 12.05 (уш.с., 1 H, COOH), 7.73 - 7.84 (м, 1 H, NHC(O)), 7.26 - 7.42 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.25 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.18 (м, 1 H, Ar), 6.20 - 6.35 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.55 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.47 (с, 1 H, NCH_2Ar), 3.88 - 4.06 (м, 2 H, CH_2), 3.12 - 3.25 (м, 2 H, CH_2), 2.91 - 3.05 (м, 2 H, CH_2), 2.32 - 2.44 (м, 3 H, CH_2), 2.10 - 2.32 (м, 4 H, CH_2), 1.81 - 1.89 (м, 1 H, CH_2), 1.55 - 1.70 (м, 2 H, CH_2), 1.41 - 1.55 (м, 5 H, CH_2), 1.33 - 1.41 (м, 29 H, $CH_3 + CH_2$), 1.13 - 1.33 (м, 3 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (100 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 173.91 (COOH), 172.20 ($C(O)OCH_3$), 172.14 ($C(O)OCH_3$), 171.92 (C(O)), 171.44 ($C(O)OCH_3$), 170.71 (C(O)), 157.14 (NHC(O)NH), 141.19 (Ar), 133.06 (Ar), 130.61 (Ar), 130.25 (Ar), 127.21 (Ar), 126.86 (Ar), 126.06 (Ar), 80.57 ($C(CH_3)_3$), 80.40 ($C(CH_3)_3$), 79.76 ($C(CH_3)_3$), 52.86 (CH), 52.17 (CH), 38.46 (CH_2), 31.93 (CH_2), 31.80 (CH_2), 30.91 (CH_2), 30.05 (CH_2), 29.25 (CH_3), 29.12 (CH_3), 29.03 (CH_3), 27.74 (CH_2), 27.65 (CH_2), 27.62 (CH_2), 26.21 (CH_2), 24.74 (CH_2), 24.61 (CH_2).

4.2.2. Общая методика синтеза Вос-защищенных аминокислот

К суспензии аминокислоты (1 экв.) в смеси диоксан / вода (1:1) добавили Woc_2O (1,2 экв.) и NaOH (1 экв.). Смесь оставили при перемешивании на сутки. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Затем в водный остаток добавляли 1М раствор соляной кислоты до pH = 3 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором NaCl, сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Затем повторно переупаривали с дихлорметаном.

Синтез (S)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропановая кислоты (6a)



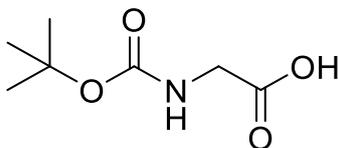
Из L-фенилаланина (25 г, 151,34 ммоль), 500 мл смеси диоксан / вода (1:1), Voc_2O (40 г, 183,27 ммоль), NaOH (6 г, 150,01 ммоль) было получено соединение **6a** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 99% (39 г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 7.22-7.30 (м., 3H, Ar), 7.16-7.23 (м., 2H, Ar), 7.07 (д., $J=8.31$ Гц, 1H, NHCO), 4.05 (м., 1H, CH), 2.97-3.03 (м., 1H, CH_2), 2.76-2.84 (м., 1H, CH_2), 1.30 (с., 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (90 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 155.39 (C(O)NH), 135.85 (Ar), 132.11 (Ar), 130.65 (Ar), 129.40 (Ar), 128.60 (Ar), 127.11 (Ar), 80.31 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 54.27 (CH), 37.79 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 35.4 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 32.43 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 28.29 (CH_3).

ESI-MS для $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: m/z рассчитано для $[\text{M-H}]^-$: 264.13, найдено: 264.00; m/z рассчитано для $[\text{2M-H}]^-$: 529.26, найдено: 529.15.

Синтез 2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) уксусной кислоты (6b)

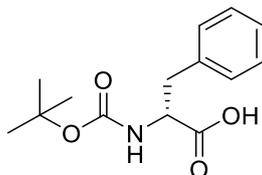


Из глицина (1 г, 13,32 ммоль), 50 мл смеси диоксан / вода (1:1), Voc_2O (3,5 г, 15,98 ммоль), NaOH (533 мг, 13,32 ммоль) было получено соединение **6b** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 99% (2.58г).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 10.54 (уш.с., 1H, COOH), 6.82 (м, 1H, C(O)NH), 3.95 (д, $J=4.64$ Hz, 1H, CH_2) 3.89 (д, $J=3.73$ Hz, 1H, CH_2) 1.44 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 174.37 (COOH), 155.60 (CO(NH)), 80.01 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 42.94 (CH_2), 27.86 (CH_3).

Синтез (R)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропановой кислоты (6c)



Из D-фенилаланина (1,5 г, 9,07 ммоль), 500 мл смеси диоксан / вода (1:1), Vos_2O (2,4 г, 10,89 ммоль), NaOH (363 мг, 9,07 ммоль) было получено соединение **6с** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 96% (2,3 г).

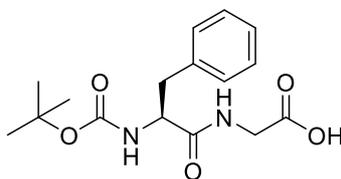
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.28 - 7.36 (м, 2 H, Ar), 7.15 - 7.26 (м, 3 H, Ar), 4.58 - 4.67 (м, 1 H, CH), 3.15 - 3.25 (м, 1 H, CH_2), 3.05 - 3.14 (м, 1 H, CH_2), 1.23 - 1.48 (м, 9 H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (90 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 176.44 (COOH), 155.49 (C(O)NH), 129.37 (Ar), 129.35 (Ar), 128.57 (Ar), 127.07 (Ar), 77.31 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 54.23 (CH), 37.75 (CH_2), 28.26 (CH_3), 27.96 (CH_3), 27.95 (CH_3).

4.2.3. Общая методика синтеза дипептидных цепочек

К раствору Вос-аминокислоты (1 экв.) в 50 мл дихлорметана добавили $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (1.12 экв), пентафторфенол (1.12 экв) и перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем в реакционную смесь добавляли силикагель (10 кратный избыток относительно массы Вос-аминокислоты) и полученную суспензию хроматографировали на колонке с последовательными слоями Kieselgur и силикагеля (элюент – дихлорметан). Промежуточное соединение выделяли высаживанием в смеси петролейный эфир/хлороформ (1:1) при пониженной температуре. Полученное вещество далее растворяли в 60 мл смеси ТГФ – вода (5:1) и добавляли при перемешивании аминокислоту (2 экв). К полученному раствору прикапывали DIPEA (2 экв) и перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре. По окончании реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Водный остаток подкисляли 1М раствором HCl до $\text{pH} = 2$ и экстрагировали этилацетатом (3*50 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором NaCl , сушили над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Полученное вещество было растворено в минимальном объеме диэтилового эфира и высажено равным объемом петролейного эфира.

Синтез терт-бутил (S)-1-((2-амино-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (**7a**)

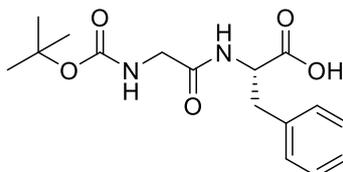


Из соединения **6a** (766 мг, 2,89 ммоль), пентафторфенола (638 мг, 3,47 ммоль), $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (665 мг, 3,47 ммоль), глицина (435 мг, 5,79 ммоль), DIPEA (749 мкл, 5,79 ммоль) было получено соединение **7a** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 53% (477 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 12.58 (уш. с., 1H, COOH), 8.21 - 8.32 (м, 1 H, NHC(O)), 7.21 - 7.32 (м, 5 H, Ar), 6.92 (д., $J = 8.8$ Hz, 1H, C(O)NH), 4.12 - 4.23 (м, 1H, CH), 3.67 - 3.87 (м, 2H, CH_2), 2.91 - 3.03 (м, 1H, CH_2), 2.63 - 2.76 (м, 1H, CH_2), 1.27 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 171.24 (NHC(O)), 155.27 (NHC(O)O), 146.32 (Ar), 138.43 (Ar), 138.32 (Ar), 129.23 (Ar), 128.01 (Ar), 126.15 (Ar), 77.99 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 68.99 (CH), 28.16 (CH_3), 27.41 (CH_3).

Спектры (S) -2- (2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) ацетида) -3- фенилпропановой кислоты (7b)

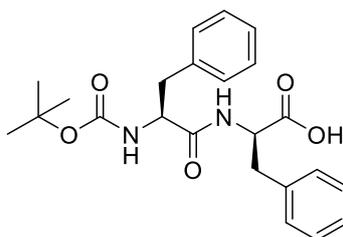


Из соединения **6b** (622 мг, 3,55 ммоль), пентафторфенола (786 мг, 4,27 ммоль), EDC*HCl (819 мг, 4,27 ммоль), L-фенилаланина (1175 мг, 7,11 ммоль), DIPEA (1219 мкл, 7,11 ммоль) было получено соединение **7b** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 76% (870 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.28 (уш.с., 1 H, Ar), 7.19 - 7.26 (м, 2 H, Ar), 7.15 (м, 2 H, Ar), 6.81 (с, 1 H, NHC(O)), 4.86 (уш.с, 1 H, CH), 3.89 (д, $J=16.87$ Hz, 1 H, CH_2) 3.69 (д, $J=17.00$ Hz, 1 H, CH_2), 3.13 - 3.26 (м, 1 H, CH_2), 3.09 (уш.с., 1 H, CH_2), 1.43 (с, 9 H, CH_3).

ESI-MS для $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 323.16, найдено: 323.20, рассчитано для $[2\text{M}+\text{Na}]^+$: 667.29, найдено 667.20.

Синтез (R) -2 - ((S) -2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) -3-фенилпропанамидо) -3- фенилпропановой кислоты (7c)



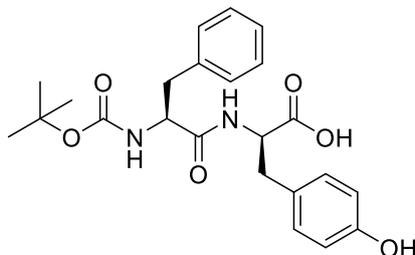
Из соединения **6a** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (534 мг, 2,78 ммоль), D-фенилаланина (766 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64ммоль) было получено соединение **7c** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 96% (1134 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMCO-d_6 , δ , м.д.): 8.29 (д, $J=8.01$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.18 - 7.26 (м, 7 H, Ar), 7.10 - 7.15 (м, 3 H, Ar), 6.72 (д, $J = 8.74$ Hz, 1 H, NHC(O)), 4.42 - 4.52 (м, 1H, CH), 4.10 - 4.21 (м, 1H, CH), 3.01 - 3.13 (м, 1 H, CH_2), 2.79 - 2.90 (м, 1 H, CH_2), 2.62 - 2.70 (м, 1 H, CH_2), 1.30 - 1.36 (м, 1 H, CH_2), 1.20 - 1.29 (с, 9H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172.89 (COOH), 171.50 (C(O)NH), 155.10 (OC(O)NH), 138.14 (Ar), 138.14 (Ar), 137.43 (Ar), 137.20 (Ar), 129.29 (Ar), 129.21 (Ar), 128.17 (Ar), 127.92 (Ar), 126.51 (Ar), 126.10 (Ar), 77.93 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 55.37 (CH), 53.31 (CH), 28.15 (CH₃).

ESI-MS: для $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 413.49, найдено: 413.15.

Синтез (R) -2 - ((S) -2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) -3-фенилпропанамидо) -3- (4-гидроксифенил) пропановой кислоты (7d)



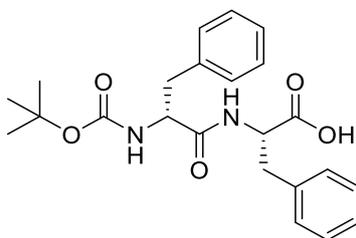
Из соединения **7a** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (533 мг, 2,78 ммоль), D-тирозина (839 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64 ммоль) было получено соединение **7d** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 95% (1286 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.19 (уш.с., 1 H, OH), 8.20 (д., $J=8.19$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.17 - 7.30 (м, 3 H, Ar), 7.08 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 6.99 (д., $J=8.25$ Hz, 2 H, Ar), 6.74 (д., $J=8.74$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.62 (д., $J=8.31$ Hz, 2 H, Ar), 4.35 - 4.40 (м, 1 H, CH), 4.14 - 4.20 (м, 1 H, CH), 2.91 - 2.96 (м, 1 H, CH₂), 2.60 - 2.83 (м, 2 H, CH₂), 1.20 - 1.35 (м, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172.45 (COOH), 170.86 (C(O)NH), 155.43 (OC(O)NH), 154.54 (C(OH)), 137.61 (Ar), 129.65 (Ar), 128.67 (Ar), 128.55 (Ar), 127.60 (Ar), 127.37 (Ar), 126.79 (Ar), 125.54 (Ar), 114.39 (Ar), 77.38 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 54.84 (CH), 53.05 (CH), 27.58 (CH₃).

ESI-MS : для $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 428.48, найдено: 429.10.

Синтез (S) -2 - ((R) -2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) -3-фенилпропанамидо) -3-фенилпропановой кислоты (7e)



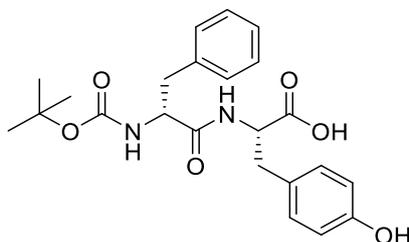
Из соединения **6c** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (534 мг, 2,78 ммоль), L-фенилаланина (766 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64 ммоль) было получено соединение **7e** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 99% (1140 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.29 (м, 2 Н, Ar), 7.19 - 7.25 (м, 4Н, Ar), 7.17 (д, $J=6.72$ Hz, 2 Н, Ar), 6.93 (м, 2 Н, Ar), 6.78 (д, $J=6.11$ Hz, 1 Н, NHC(O)), 5.32 (д, $J=8.38$ Hz 1 Н, NHC(O)), 4.85 (м, 1 Н, CH), 4.64 (м, 1 Н, CH), 2.93 - 3.07 (м, 2 Н, CH_2), 2.87 (м, 1 Н, CH_2), 1.40 - 1.48 (м, 1 Н, CH_2), 1.35 (уш.с., 9 Н, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (90 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 135.83 (Ar), 129.00 (Ar), 128.20 (Ar), 128.03 (Ar), 126.62 (Ar), 54.87 (CH), 52.50 (CH), 38.82 (CH_2), 37.25 (CH_2), 27.76 (CH_3).

ESI-MS для $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 413.21, найдено: 413.15; m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{Na}]^+$: 847.39, найдено: 847.25.

Синтез (S) -2 - ((R) -2 - ((*трет*-бутоксикарбонил) амино) -3-фенилпропанамидо) -3- (4-гидроксифенил) пропановой кислоты (7f)



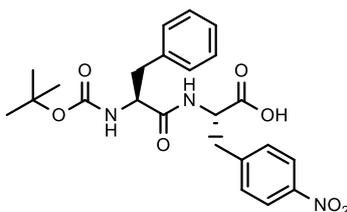
Из соединения **6с** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (533 мг, 2,78 ммоль), L-тирозина (839 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64ммоль) было получено соединение **7f** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 83% (1301 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8.19 (д, $J=8.38$ Hz, 1 Н, C(O)NH), 7.08 - 7.30 (м, 5 Н, Ar), 6.99 (д, $J=8.31$ Hz, 2 Н, Ar), 6.73 (д, $J=8.86$ Hz, 1 Н, C(O)NH), 6.62 (д, $J=8.38$ Hz, 2 Н, Ar), 4.33 - 4.44 (м, 1 Н, CH), 4.05 - 4.22 (м, 1 Н, CH), 2.90 - 2.98 (м, 1 Н, CH_2), 2.70 - 2.77 (м, 2 Н, CH_2), 1.29 - 1.33 (м, 1 Н, CH_2), 1.20 - 1.29 (с, 9 Н, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 173.01 ($\text{C(O)C(CH}_3)_3$), 168.42 (C(O)NH), 155.99 (OC(O)NH), 155.10 (C(OH)), 138.18 (Ar), 130.22 (Ar), 129.23 (Ar), 127.93 (Ar), 127.35 (Ar), 126.10 (Ar), 114.95 (Ar), 114.94 (Ar), 77.93 ($\text{C(CH}_3)_3$), 55.40 (CH), 53.61 (CH), 36.34 (CH_2), 28.14 (CH_3).

ESI-MS: для $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 428.48, найдено: 429.15.

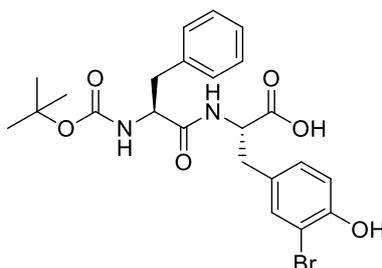
(S)-2-((S)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)-3-(4-нитрофенил)пропановой кислоты (7g).



Из соединения **7a** (360 мг, 1,36 ммоль), пентафторфенола (586 мг, 1,36 ммоль), EDC*HCl (312 мг, 1,63 ммоль), L-3-нитротирозина (614 мг, 2,72 ммоль), DIPEA (400 мкл, 3,207 ммоль) было получено соединение **7g** в виде желтого порошка с выходом 63% (390 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.11 (д, 1 H, d, J=7.70 Hz, (NHС(O))), 7.51 (м, 7 H, Ar), 7.22 (м, 18 H, br. s.), 6.84 (м, 3 H, Ar), 4.53 (м, 4 H, CH), 4.12 (м, 3 H, CH), 3.24 (м, 5 H, CH₂), 3.06 (м, 5 H, CH₂), 2.86 (м, 4 H, CH₂), 2.65 (м, 4 H, CH₂), 1.24 (с, 11 H, CH₂+CH₃), 1.08 (м, 5 H, CH₂).

Синтез (S)-3-(3-бromo-4-гидроксифенил)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)пропановой кислоты (7h)



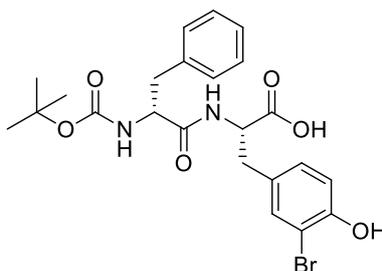
Из соединения **7a** (620 мг, 2,34 ммоль), пентафторфенола (517 мг, 2,81 ммоль), EDC*HCl (537 мг, 2,81 ммоль), L-3-бромтирозина (1210 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (800 мкл, 4,64 ммоль) было получено соединение **7h** в виде белого порошка с выходом 97% (1141 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.10 (уш.с., 1 H, OH), 7.99 (д, J=7.52 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.28 - 7.35 (м, 1 H, Ar), 7.23 - 7.28 (м, 1 H, Ar), 7.12 - 7.23 (м, 3 H, Ar), 7.01 - 7.03 (м, 1 H, Ar), 6.91 (м, J=8.74 Hz, 1 H, Ar), 6.84 (д, J=8.25 Hz, 1 H, NHС(O)), 4.31 - 4.40 (м, 1 H, CH), 4.06 - 4.17 (м, 1 H, CH), 2.94 - 2.99 (м, 1 H, CH₂), 2.77 - 2.92 (м, 2 H, CH₂), 2.63 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 1.17 - 1.34 (м, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 153.08 (C(OH)), 133.78 (Ar), 129.92 (Ar), 129.55 (Ar), 128.41 (Ar), 126.56 (Ar), 116.49 (C(Br)), 78.50 (C(CH₃)), 53.88 (CH), 37.94 (CH₂), 35.94 (CH₂), 28.53 (CH₃).

ESI-MS для C₂₃H₂₇BrN₂O₆: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 507.38, найдено: 507.00.

(S)-3-(3-бromo-4-гидроксифенил)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)пропановой кислоты

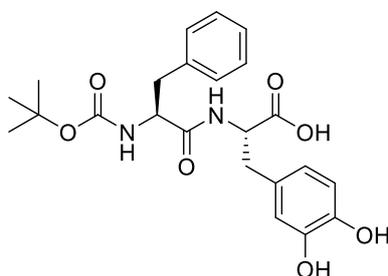


Из соединения **7a** (306 мг, 1,15 ммоль), пентафторфенола (497 мг, 1,15 ммоль), EDC*HCl (246 мг, 1,28 ммоль), L-3-бромтирозина (370 мг, 1,27 ммоль), DIPEA (400 мкл, 2,32 ммоль) было получено соединение **8i** в виде белого порошка с выходом 71% (415 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 12.83 (уш.с., 1 H, COOH), 10.02 (уш.с., 1 H, OH), 8.30 (д, *J*=8.25 Hz, 1 H, (NHС(O))), 7.34 (д, *J*=1.71 Hz, 1 H, (Ar)), 7.18 - 7.25 (м, 3 H, (Ar)), 7.11 - 7.18 (м, 3 H, (Ar)), 7.00 (дд, *J*=8.19, 1.83 Hz, 1 H, (Ar)), 6.81 (д, *J*=8.25 Hz, 1 H, (Ar)), 6.72 (д, *J*=8.80 Hz, 1 H, (NHС(O))), 4.39 (м, 1 H, CH), 4.17 (м, 1 H, CH), 2.92 - 3.00 (м, 1 H, CH₂), 2.65 - 2.78 (м, 2 H, CH₂), 1.26 (с, 10 H, CH₂+CH₃).

ESI-MS для C₂₃H₂₇N₂BrO₆: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 507.38, найдено: 507.1849.

Синтез (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо) -3- (3,4-дигидроксифенил) пропановой кислоты (7j)

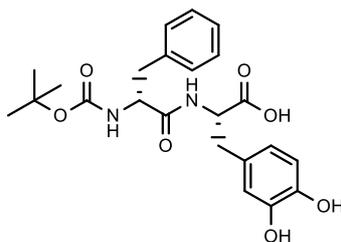


Из соединения **6a** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (534 мг, 2,78 ммоль), L-дигидроксифенилаланина (824 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64ммоль) было получено соединение **7j** в виде белого порошка с выходом 84% (862 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 12.69 (уш.с., 1 H, COOH), 8.74 (уш.с., 2 H, OH), 8.00 (д, *J*=7.76 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.19 - 7.25 (м, 3 H, Ar), 7.17 - 7.19 (м, 2 H, Ar), 6.87 (д, *J*=8.86 Hz, 1 H, NHС(O)), 6.56 - 6.64 (м, 2 H, Ar), 6.46 - 6.48 (м, 1 H, Ar), 4.30 - 4.38 (м, 1 H, CH), 4.10 - 4.17 (м, 1 H, CH), 2.93-2.94 (м, 1H, CH₂), 2.84-2.85 (д, *J*=5.62 Hz, 1 H, CH₂), 2.75-2.77 (м, 1H, CH₂), 2.71-2.73 (м, 1H, CH₂), 1.26 (с, 9 H, CH₃).

ESI-MS для C₂₃H₂₈N₂O₇: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 445.20, найдено: 445.20; *m/z* рассчитано для [2M+Na]⁺ 911.37, найдено: 911.35.

Синтез (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо) -3- (3,4-дигидроксифенил) пропановой кислоты (7k)

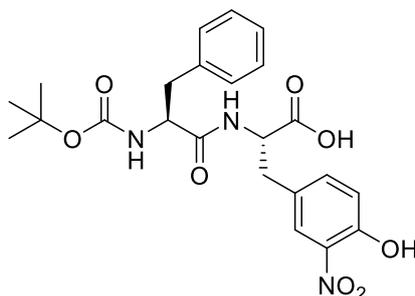


Из соединения **6с** (615 мг, 2,32 ммоль), пентафторфенола (512 мг, 2,78 ммоль), EDC*HCl (534 мг, 2,78 ммоль), L-дигидроксифенилаланина (824 мг, 4,64 ммоль), DIPEA (793 мкл, 4,64 ммоль) было получено соединение **7к** в виде белого порошка с выходом 83% (862 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.) 12.76 (с, 1H, COOH), 8.73 (д, 1 H, NH), 8.22 (д, *J* = 8.13 Hz, 1 H, NH), 7.20 – 7.11 (м, 5 H, Ar), 6.69 (д, *J* = 8.74 Гц, 1 H, Ar), 6.58 (д, *J*=7.95 Гц, 1 H, Ar), 6.46 (д, 1 H, Ar), 6.27 - 6.25 (м, 1H, ArOH), 4.38 (м, *J* = 8.31 Гц, 1 H, CH), 4.19 (м, 1 H, CH), 2.89 – 2.75 (м, 2 H, CH₂), 2.69 – 2.48 (м, 2 H, CH₂), 1.30 (с, 9 H, –C(CH₃)₃).

ESI-LCMS: *m/z* рассчитано для C₂₃H₂₈N₂O₇ [M+H⁺]: 444.47, найдено: 445.20.

Синтез (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)-3-(4-гидрокси-3-(нитроокси)фенил)пропановой кислоты (7l)

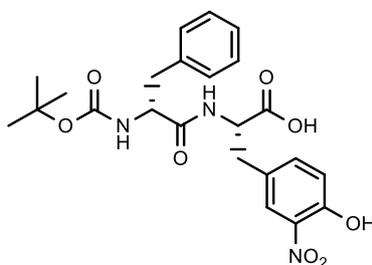


Из соединения **7а** (2190 мг, 8,30 ммоль), пентафторфенола (1530 мг, 8,30 ммоль), EDC*HCl (1910 мг, 9,96 ммоль), L-3-нитротирозина (1490 мг, 7,56 ммоль), DIPEA (1370 мкл, 7,56 ммоль) было получено соединение **7l** в виде желтого порошка с выходом 86% (2320 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 12.54 (уш.с., 1H, COOH), 10.81 (уш.с., 1 H, OH), 8.07 (д, *J*=7.89 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.75 (с, 1 H, Ar), 7.41 (м, 1 H, Ar), 7.21 - 7.27 (м, 2 H, Ar), 7.13 - 7.21 (м, 3 H, Ar), 7.03 (д, *J*=8.50 Hz, 1 H, Ar), 6.85 (д, *J*=8.68 Hz, 1 H, NHC(O)), 4.45 (м, 1 H, CH), 4.11 (м, 1 H, CH), 3.07 (м, 1 H, CH₂), 2.88 - 2.94 (м, 1 H, CH₂), 2.82 - 2.88 (м, 1 H, CH₂), 2.64 (м, 1 H, CH₂), 1.25 (с, 9 H, CH₃).

ESI-MS для C₂₃H₂₇N₃O₈: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 474.18, найдено: 474.15.

Синтез (S)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)-3-(4-гидрокси-3-(нитроокси)фенил)пропановой кислоты (7m)



Из соединения **7c** (360 мг, 1,36 ммоль), пентафторфенола (586 мг, 1,36 ммоль), EDC*HCl (312 мг, 1,63 ммоль), L-3-нитротирозина (614 мг, 2,72 ммоль), DIPEA (400 мкл, 3,207 ммоль) было получено соединение **7m** в виде желтого порошка с выходом 82% (600 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 12.78 (уш.с., 1H, COOH), 10.79 (уш.с., 1H, OH), 8.30 (с, 1H, NHС(O)), 7.75 (с, 1H, Ar), 7.39 (с, 1H, Ar), 7.10 - 7.23 (м, 5H, Ar), 7.02 (д, 1H, d, J=8.44 Hz, Ar), 6.72 (с, 1H, NHС(O)), 4.46 (м, 1H, CH), 4.15 (м, 1H, CH), 3.05 (м, 1H, CH₂), 2.85 (д, 1H, d, J=9.66 Hz, CH₂), 2.70 (м, 1H, CH₂), 1.25 (с, 10H, CH₂+CH₃).

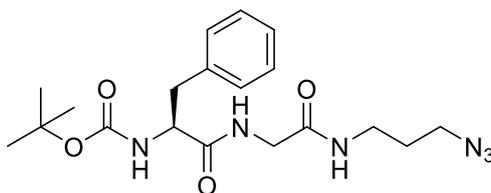
Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 172.63 (C(O)C(CH₃)), 171.58 (C(O)NH), 155.13 (OC(O)NH), 150.95 (C(OH)) 136.41 (Ar), 136.14 (Ar), 129.16 (Ar), 127.89 (Ar), 126.12 (Ar), 125.61 (Ar), 119.11 (Ar), 118.98 (Ar), 77.94 (C(CH₃)), 55.35 (CH), 53.04 (CH), 28.19 (CH₃), 28.12 (CH₃), 28.08 (CH₃).

ESI-HRMS для C₂₃H₂₇N₃O₈: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 474.1871, найдено: 474.1849.

4.2.4. Модификация дипептидных цепочек аминопропилазидом

Вос-дипептид **7a-7m** (1 экв) растворили в 20 мл ДМФА. К раствору добавили HBTU (1.2 экв), HOBT (1.2 экв) и DIPEA (2 экв). Затем в реакционную смесь добавили 3-азидо-1-пропанамин (1.5 экв). Реакционная смесь перемешивалась в течение 24 часов, после чего растворитель удалили при пониженном давлении. Очистка вещества производилась с помощью метода колоночной хроматографии (Puriflash 15μ, 25g, F0025, элюент этилацетат/петролейный эфир, этилацетат от 5% до 40% в течение 6 минут, от 40% до 60 в течении 15 минут, от 60% до 100% в течении 6 минут, 100% в течении 3 минут). Растворитель удалили при пониженном давлении.

Синтез (S)-tert-бутил (1-((2-((3-азидопропил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8a)



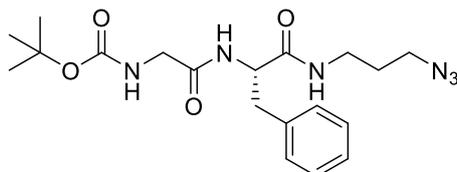
Из соединения **7a** (477 мг, 1,48 ммоль), HBTU (676 мг, 1,78 ммоль), HOBT (240 мг, 1,78 ммоль), DIPEA (279 мкл, 1,62 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамин (237 мг, 2,37 ммоль) было получено соединение **8a** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 74% (443 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.): 8.14 - 8.27 (м, 1H, NHС(O)), 7.73 (т, J=6.60 Hz, 1H, NHС(O)), 7.21 - 7.29 (м, 4H, Ar), 7.13 - 7.21 (м, 1H, Ar), 7.02 - 7.10 (м, 1H, NHС(O)), 4.05 - 4.19 (м, 1H, CH), 3.56 - 3.76 (м, 2H, CH₂), 3.04 - 3.20 (м, 2H, CH₂), 2.93 - 3.04 (м, 1H, CH₂), 2.69 - 2.79 (м, 1H, CH₂), 1.58 - 1.69 (м, 2H, CH₂), 1.23 - 1.33 (м, 9H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 172.05 (C(O)), 168.73 (C(O)), 155.55 (OC(O)), 129.25(Ar), 129.23(Ar), 129.23(Ar), 128.08(Ar), 128.07 (Ar), 78.24 (C(CH₃)₃), 55.96 (CH), 48.29 (CH₂N₃), 42.20 (CH₂), 40.16 (CH₂), 40.15 (CH₂), 38.28 (CH₂), 35.85 (CH₂), 28.42 (CH₃), 28.15 (CH₃).

ESI-MS для C₁₉H₂₈N₆O₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 405.22, найдено: 405.15, рассчитано для [2M+Na]⁺: 831.34, найдено: 831.30.

Синтез (S) -трет-бутил (2 - ((1 - ((3-азидопропил) амино) -1-оксо-3-фенилпропан-2-ил) амино) -2-оксоэтил) карбамата (8b)



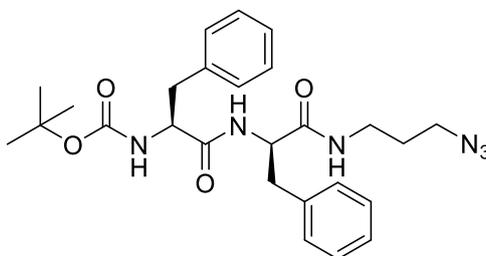
Из соединения **7b** (830 мг, 2,58 ммоль), НВТУ (1174 мг, 3,10 ммоль), НОВТ (418 мг, 3,10 ммоль), DIPEA (486 мкл, 2,84 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (388 мг, 3,87 ммоль) было получено соединение **8b** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 69% (725 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 7.99 (д, $J=7.39$ Hz, 2 H, NHС(O)), 7.22 - 7.26 (м, 2 H, Ar), 7.16 - 7.19 (м, 3 H, Ar), 6.94 (т, $J=5.90$ Hz, 1 H, NHС(O)), 4.38 - 4.43 (м, 1 H, CH), 3.52 (д, $J=6.02$ Hz, 1 H, CH₂), 3.45 (д, $J=5.94$ Hz, 1 H, CH₂), 3.18 (т, $J=6.81$ Hz, 2 H, CH₂), 3.05 - 3.15 (м, 1 H, CH₂), 2.96 - 3.05 (м, 1 H, CH₂), 2.90 (д, $J=5.86$ Hz, 1 H, CH₂), 2.81 (д, $J=8.38$ Hz, 1 H, CH₂), 1.48 - 1.59 (м, 2 H, CH₂), 1.36 (с, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 170.70 (C(O)), 169.06 (C(O)), 137.65 (Ar), 129.18 (Ar), 128.11 (Ar), 126.34 (Ar), 78.13 (C(CH₃)₃), 54.01 (CH), 48.19(CH₂N₃), 35.78 (CH₂), 28.20 (CH₃).

ESI-MS для C₁₉H₂₈N₆O₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 405.22, найдено: 405.15, рассчитано для [2M+Na]⁺: 831.42, найдено: 831.25

Синтез трет-бутил ((S)-1-(((R)-1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8с)



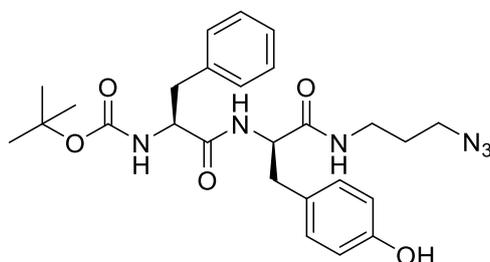
Из соединения **7с** (1134 мг, 2,75 ммоль), НВТУ (1251 мг, 3,29 ммоль), НОВт (445 мг, 3,29 ммоль), DIPEA (521 мкл, 3,03 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (412 мг, 4,12 ммоль) было получено соединение **8с** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 46% (609 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.26 - 8.38 (м, 1 H, NHC(O)), 7.91 - 8.04 (м, 1 H, NHC(O)), 7.20 - 7.27 (м, 6 H, Ar), 7.11 - 7.18 (м, 4 H, Ar), 6.82 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 4.39 - 4.51 (м, 1 H, CH), 4.08 - 4.17 (м, 1 H, CH), 3.22 - 3.28 (м, 1 H, CH₂), 3.15 - 3.19 (м, 1 H, CH₂), 3.09 - 3.12 (м, 1 H, CH₂), 2.90 - 3.03 (м, 2 H, CH₂), 2.78 - 2.87 (м, 2 H, CH₂), 2.62 - 2.65 (м, 1 H, CH₂), 1.46 - 1.63 (м, 2 H, CH₂), 1.23 - 1.32 (м, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.48 (C(O)), 170.80 (C(O)), 155.36 (OC(O)), 129.25 (Ar), 129.23 (Ar), 129.18 (Ar), 128.10 (Ar), 128.08 (Ar), 128.02 (Ar), 127.94 (Ar), 126.36 (Ar), 126.14 (Ar), 78.18 (C(CH₃)₃), 55.73 (CH), 53.96 (CH), 48.21 (CH₂N₃), 42.89 (CH₂), 40.42 (CH₂), 40.15 (CH₂), 28.27 (CH₃), 28.22 (CH₃), 28.14 (CH₃).

ESI-MS для C₂₆H₃₄N₆O₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 494.26, найдено: 495.20, рассчитано для [2M+Na]⁺ 1011.42, найдено: 1011.40, рассчитано для [M+Na]⁺: 516.25, найдено: 516.20.

Синтез **терт-бутил ((S)-1-((R)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8d)**

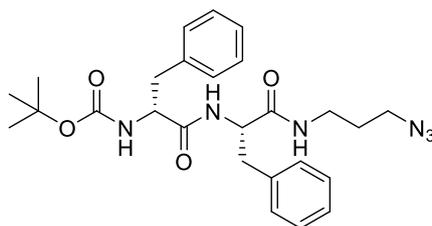


Из соединения **7d** (1196 мг, 2,79 ммоль), НВТУ (1270 мг, 3,35 ммоль), НОВт (452 мг, 3,35 ммоль), DIPEA (528 мкл, 3,07 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (419 мг, 4,18 ммоль) было получено соединение **8d** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 58% (362 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.15 (с, 1 H, OH), 8.23 (д, $J=8.50$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.94 (т, $J=5.26$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.18 - 7.32 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.18 (м, 3 H, Ar), 6.98 (д, $J=8.19$ Hz, 2 H, Ar), 6.81 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.61 (д, $J=8.31$ Hz, 2 H, Ar), 4.32 - 4.38 (м, 1 H, CH), 4.10 - 4.17 (м, 1 H, CH), 3.26 (т, $J=6.72$ Hz, 2 H, CH₂), 3.04 - 3.14 (м, 2 H, CH₂), 2.82 - 2.86 (м, 2 H, CH₂), 2.56 - 2.73 (м, 2 H, CH₂), 1.51 - 1.64 (м, 2 H, CH₂), 1.28 (с, 9 H, CH₃).

ESI-MS для C₂₆H₃₄N₆O₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 511.26, найдено: 511.20, рассчитано для [2M+Na]⁺ 1043.50, найдено: 1043.30, рассчитано для [M+Na]⁺: 533.24, найдено: 533.15.

Синтез **трет-бутил ((R)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбаминовой кислоты (8e)**

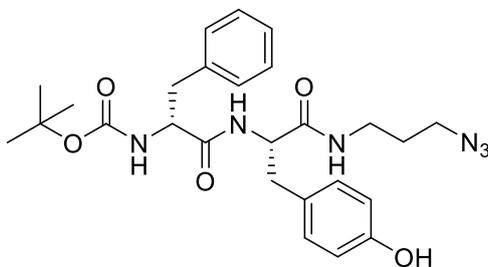


Из соединения **7e** (1258 мг, 3,05 ммоль), НВТУ (1388 мг, 3,66 ммоль), НОВТ (495 мг, 3,66 ммоль), DIPEA (574 мкл, 6,10 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (458 мг, 4,57 ммоль) было получено соединение **8e** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 46% (696 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.33 (д, *J*=8.45 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.95 - 8.03 (м, 1 H, NHС(O)), 7.20 - 7.28 (м, 4 H, Ar), 7.16 - 7.18 (м, 4 H, Ar), 7.11 - 7.14 (м, 2 H, Ar), 6.81-6.83 (д, *J*=8.1 Hz, 1H, NHС(O)), 4.45 (м, 1 H, CH), 4.12 (м, 1 H, CH) 3.24 (т, *J*=6.81 Hz, 2 H, CH₂), 3.17 (т, *J*=6.85 Hz, 1 H, CH₂), 3.08-3.13 (м, 2H, CH₂), 2.87 - 3.02 (м, 2 H, CH₂), 2.79 - 2.87 (м, 1 H, CH₂), 2.64 (м, 1 H, CH₂), 1.48 - 1.65 (м, 1 H, CH₂), 1.28 (с, 9 H, CH₃).

ESI-MS для C₂₆H₃₄N₆O₄: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 495.27, найдено: 495.20; *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 517.25, найдено: 517.20, *m/z* рассчитано для [2M+Na]⁺: 1011.52, найдено 1011.40.

Синтез трет-бутил ((R)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (**8f**)



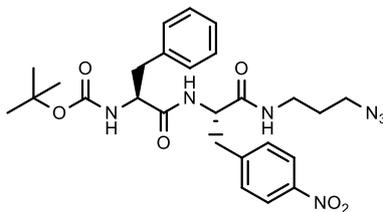
Из соединения **7f** (1300 мг, 3,03 ммоль), НВТУ (1380 мг, 3,64 ммоль), НОВТ (492 мг, 3,64 ммоль), DIPEA (462 мкл, 3,33 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (455 мг, 4,55 ммоль) было получено соединение **8f** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 55% (707 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 9.12 - 9.20 (м, 1 H, OH), 8.23 (д, *J*=8.50 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.94 (т, *J*=5.26 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.18 - 7.23 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.18 (м, 3 H, Ar), 6.98 (д, *J*=8.19 Hz, 2 H, Ar), 6.81 (д, *J*=8.07 Hz, 1 H, NHС(O)), 6.61 (м, *J*=8.31 Hz, 2 H, Ar), 4.30 - 4.39 (м, 1 H, CH), 4.10 - 4.16 (м, 1 H, CH), 3.26 (т, *J*=6.72 Hz, 2 H, CH₂), 3.19 - 3.22 (м, 1 H, CH₂), 3.06 - 3.16 (м, 1 H, CH₂), 2.94 - 3.06 (м, 1 H, CH₂), 2.74 - 2.88 (м, 1 H, CH₂), 2.57 - 2.74 (м, 1 H, CH₂), 2.51 - 2.57 (м, 1 H, CH₂), 1.50 - 1.68 (м, 2 H, CH₂), 1.25 - 1.37 (м, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 155.86 (OC(O)), 130.16 (Ar), 129.25 (Ar), 127.96 (Ar), 114.85 (Ar), 78.10(C(CH₃)), 55.74 (CH), 48.23 (CH₂N₃), 28.30 (CH₃), 28.14 (CH₃).

ESI-MS для C₂₆H₃₄N₆O₅: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 511.26, найдено: 511.20, рассчитано для [2M+Na]⁺: 1043.50, найдено: 1043.30, рассчитано для [M+Na]⁺: 533.24, найдено: 533.20.

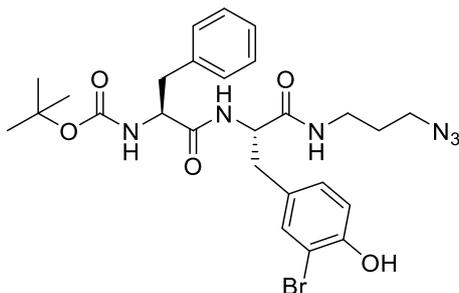
Синтез трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-нитрофенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамат (**8g**)



Из соединения **7g** (375 мг, 0.826 ммоль), НВТУ (469 мг, 1,239 ммоль), НОВТ (167 мг, 1,239 ммоль), DIPEA (361 мкл, 1,652 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (2200 мг, 7,84 ммоль) было получено соединение **8g** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 65% (290 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.09 (д, $J=8.44$ Hz, 2 H, NH), 8.05 (д, $J=8.31$ Hz, 2 H, NH), 7.28 - 7.35 (м, 5 H, Ar), 7.19 - 7.28 (м, 5 H, Ar), 7.17 (т, $J=5.81$ Hz, 4 H, Ar), 7.05 (д, $J=7.70$ Hz, 2 H, Ar), 6.99 - 6.97 (м, 1 H, Ar), 4.23 - 4.31 (м, 1 H, CH), 4.07 - 4.04 (м, 1 H, CH), 3.11 - 3.09 (м, 1 H, CH_2), 2.99 - 3.07 (м, 3 H, CH_2), 1.62 - 1.75 (м, 3 H, CH_2), 1.35 - 1.41 (м, 11 H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$).

Синтез терт-бутил ((2S)-1-((1-((3-азидопропил)амино)-3-(3-бромо-4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8h)



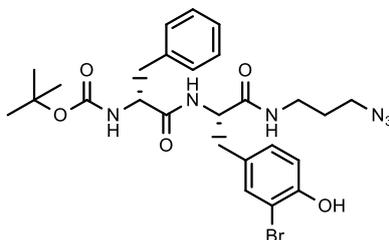
Из соединения **7h** (1141 мг, 2,33 ммоль), НВТУ (1060 мг, 2,80 ммоль), НОВТ (428 мг, 2,80 ммоль), DIPEA (400 мкл, 2,56 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (350 мг, 3,49 ммоль) было получено соединение **8h** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 55% (738 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 9.91 - 9.99 (м, 1 H, OH), 8.27 (д, $J=8.22$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.92 - 8.05 (м, 1 H, NHC(O)), 7.29 - 7.32 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.23 (м, 5 H, Ar), 6.97 (д, $J=8.22$ Hz, 1 H, Ar), 6.89 (д, $J=8.80$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.72 - 6.85 (м, 2 H, Ar), 4.25 - 4.45 (м, 1 H, CH), 4.02 - 4.15 (м, 1 H, CH), 3.19 - 3.28 (м, 2 H, CH_2), 3.05 - 3.13 (м, 1 H, CH_2), 2.93 - 3.05 (м, 1 H, CH_2), 2.74 - 2.88 (м, 2 H, CH_2), 2.56 - 2.73 (м, 2 H, CH_2), 1.51 - 1.62 (м, 2 H, CH_2), 1.13 - 1.32 (м, 9 H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 152.99 (C(OH)), 138.60 (Ar), 138.43 (Ar), 133.77 (Ar), 129.99 (Ar), 129.90 (Ar), 129.65 (Ar), 129.52 (Ar), 128.41 (Ar), 128.30 (Ar), 126.57 (Ar), 126.51 (Ar), 116.37 (C(Br)), 78.48 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$), 60.18 (CH), 57.60 (CH), 48.66 (CH_2N_3), 40.58 (CH_2), 40.37 (CH_2), 40.16 (CH_2), 30.15 (CH_2), 28.53 (CH_3).

ESI-MS для $C_{26}H_{33}BrN_6O_5$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 589.49, найдено: 589.10, рассчитано для $[2M+H]^+$: 1179.98, найдено: 1179.15.

Синтез трет-бутил ((R)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3-бromo-4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8i)

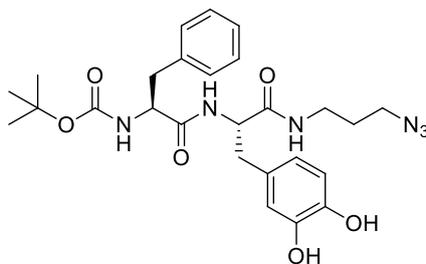


Из соединения **7i** (356 мг, 0,701 ммоль), НВТУ (319 мг, 0,842 ммоль), НОВТ (114 мг, 0,42 ммоль), DIPEA (240 мкл, 1,45 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (105 мг, 1,05 ммоль) было получено соединение **8i** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 36% (151 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.99 (с, 1 H, OH), 8.32 (д, $J=8.55$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.98 (т, $J=5.56$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.34 (с, 1 H, Ar), 7.20 (т, $J=6.96$ Hz, 3 H, Ar), 7.10 - 7.17 (м, 3 H, Ar), 6.99 (д, $J=9.65$ Hz, 1 H, Ar), 6.79 (д, $J=8.28$ Hz, 2 H, Ar), 4.32 - 4.39 (м, 1 H, CH), 4.09 - 4.17 (м, 1 H, CH), 3.29 (т, $J=6.71$ Hz, 3 H, CH_2), 3.06 - 3.14 (м, 2 H, CH_2), 2.85 (дд, $J=13.73, 4.63$ Hz, 1 H, CH_2), 2.59 - 2.75 (м, 3 H, CH_2), 2.50 - 2.57 (м, 1 H, CH_2), 1.57 - 1.66 (м, 2 H, CH_2), 1.28 (с, 9 H, CH_3), 1.22 (с, 1 H, CH_2), 1.17 (с, 2 H, CH_2).

ESI-MS для $C_{26}H_{33}BrN_6O_5$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 589.49, найдено: 591.10.

Синтез трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамат (8j)

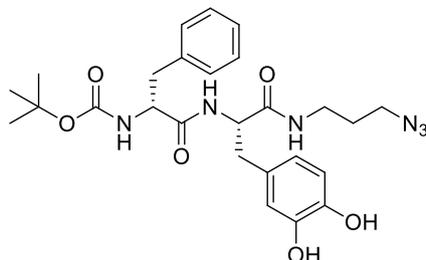


Из соединения **7j** (840 мг, 1,89 ммоль), НВТУ (717 мг, 1,89 ммоль), НОВТ (255 мг, 1,89 ммоль), DIPEA (356 мкл, 2,08 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (284 мг, 2,83 ммоль) было получено соединение **8j** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 67% (665 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.70 (с, 2 H, OH), 8.19 (д, $J=8.38$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.90 (с, 1 H, (NHC(O))), 7.08 - 7.23 (м, 6 H, Ar), 6.76 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, Ar), 6.54 - 6.61 (м, 2 H, Ar), 6.44 (дд, $J=7.98, 1.50$ Hz, 1 H, Ar), 4.31 (м, 1 H, CH), 4.13 (м, 1 H, CH), 3.26 (т, $J=6.72$ Hz, 2 H, CH_2), 3.09 (д, $J=6.54$ Hz, 2 H, CH_2), 2.69 - 2.81 (м, 2 H, CH_2), 2.56 (м, 2 H, CH_2), 1.60 (т, $J=6.76$ Hz, 2 H, CH_2), 1.28 (с, 9 H, CH_3)

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.41 (C(O)), 171.06 (C(O)), 155.37 (OC(O)), 144.91 (C(OH)), 138.02 (Ar), 129.27 (Ar), 128.47 (Ar), 127.95 (Ar), 126.15 (Ar), 120.00 (Ar), 116.57 (Ar), 115.11 (Ar), 78.21 (C(CH $_3$)), 55.67 (CH), 54.43 (CH), 48.23 (CH $_2\text{N}_3$), 40.04 (CH $_2$), 38.79 (CH $_2$), 38.27 (CH $_2$), 37.29 (CH $_2$), 37.25 (CH $_2$), 35.87 (CH $_2$), 28.26 (CH $_3$), 28.12 (CH $_3$).

Синтез *трет*-бутил ((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбаминовой кислоты (8k)



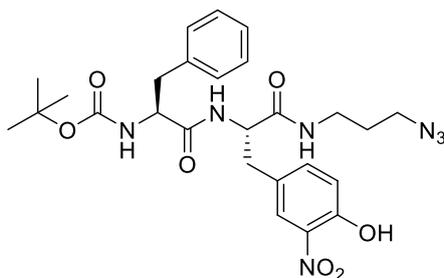
Из соединения **7k** (2320 мг, 5,23 ммоль), НВТУ (2380 мг, 6,28 ммоль), НОВТ (710 мг, 5,23 ммоль), DIPEA (1370 мкл, 7,84 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (2200 мг, 7,84 ммоль) было получено соединение **8k** в виде бесцветного маслянистого вещества с выходом 47% (1300 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.67 (д, $J=8.93$ Hz, 2 H, OH), 7.90 - 7.97 (м, 1 H, NH(C(O))), 7.87 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NH(C(O))), 7.19 - 7.27 (м, 2 H, Ar), 7.16 (м, 3 H, Ar), 6.91 (д, $J=8.50$ Hz, 1 H, NH(C(O))), 6.54 - 6.62 (м, 2 H, Ar), 6.40 - 6.48 (м, 1 H, Ar), 4.31 (м, 1 H, CH), 4.09 (м, 1 H, CH), 3.18 - 3.25 (м, 2 H, CH $_2$), 2.96 - 3.13 (м, 2 H, CH $_2$), 2.82 - 2.91 (м, 1 H, CH $_2$), 2.70 - 2.78 (м, 1 H, CH $_2$), 2.65 (м, 2 H, CH $_2$), 1.50 - 1.60 (м, 2 H, CH $_2$), 1.28 (с, 9 H, CH $_3$).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.15 (C(O)), 170.84 (C(O)), 155.19 (OC(O)), 144.89 (Ar), 143.80 (Ar), 138.08 (Ar), 129.19 (Ar), 128.14 (Ar), 128.01 (Ar), 126.16 (Ar), 119.98 (Ar), 116.69 (Ar), 115.19 (Ar), 78.22 (C(CH $_3$)), 56.00 (CH), 54.37 (CH), 38.28 (CH $_2$), 37.51(CH $_2$), 35.73 (CH $_2$), 28.27 (CH $_3$), 28.12 (CH $_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_6$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 527.26, найдено: 527.25; m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 1053.51, найдено: 1053.55.

Синтез *трет*-бутил ((S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8l)



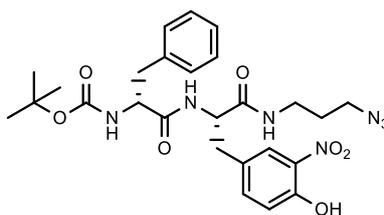
Из соединения **7l** (730 мг, 1,54 ммоль), НВТУ (701 мг, 1,85 ммоль), НОВТ (250 мг, 1,85 ммоль), DIPEA (290 мкл, 1,69 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (232 мг, 2,31 ммоль) было получено соединение **8l** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 68% (581 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.81 (с, 1 H, OH), 8.02 - 8.07 (м, 1 H, NHС(O)), 7.98 (д, J=8.19 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.74 (с, 1 H, Ar), 7.37 - 7.39 (м, 1 H, Ar), 7.20 - 7.24 (м, 2 H, Ar), 7.14 - 7.17 (м, 3 H, Ar), 7.02 (д, J=8.50 Hz, 1 H, Ar), 6.91 (д, J=8.44 Hz, 1 H, NHС(O)), 4.42 (м, 1 H, CH), 4.06 (м, 1 H, CH), 3.24 (т, J=6.82 Hz, 2 H, CH₂), 3.06 - 3.17 (м, 1 H, CH₂), 2.88 - 2.97 (м, 2 H, CH₂), 2.75 - 2.85 (м, 2 H, CH₂), 2.60-2.66 (м, 1 H, CH₂), 1.57 (м, 2 H, CH₂), 1.26 (с, 9 H, CH₃).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 171.44 (C(O)), 170.42 (C(O)), 155.19 (OC(O)), 150.99 (C(OH)), 137.98 (Ar), 136.58 (Ar), 136.05 (Ar), 129.09 (Ar), 128.70 (Ar), 128.05 (Ar), 126.24 (Ar), 125.56 (Ar), 118.89 (Ar), 78.30 (C(CH₃)), 56.00 (CH), 53.64 (CH), 48.20 (CH₂N₃), 38.79 (CH₂), 37.42 (CH₂), 35.83 (CH₂), 28.24 (CH₃), 28.08 (CH₃).

ESI-MS для C₂₆H₃₃N₇O₇: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 556,24, найдено: 556.20.

Синтез терт-бутил ((R)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)карбамата (8m)



Из соединения **7m** (575 мг, 1,24 ммоль), НВТУ (689 мг, 1,82 ммоль), НОВТ (245 мг, 1,37 ммоль), DIPEA (290 мкл, 1,69 ммоль) и 3-азидо-1-пропанамина (181 мг, 1,37 ммоль) было получено соединение **8m** в виде желтого маслянистого вещества с выходом 84% (600 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.77 (с, 1 H, OH), 8.36 (д, 1 H, J=8.56 Hz, (NHС(O))), 8.02 (с, 1 H, (NHС(O))), 7.75 (д, 1 H, J=1.96 Hz, Ar), 7.36 (дд, 1 H, J=8.56, 2.02 Hz, Ar), 7.09 - 7.24 (м, 6 H, Ar), 7.00 (д, 1 H, J=8.56 Hz, Ar), 6.85 (д, 1 H, J=8.07 Hz, Ar), 4.37 - 4.47 (м, 1 H, CH), 4.07 - 4.15 (м, 1 H, CH), 3.25 - 3.31 (м, 2 H, CH₂), 3.08 - 3.15 (м, 2 H, CH₂), 2.90 - 2.98 (м, 1 H, CH₂), 2.68 - 2.74 (м, 2 H, CH₂), 1.62 (м, 2 H, J=6.74, 3.21 Hz, CH₂), 1.23 - 1.30 (с, 9 H, CH₃).

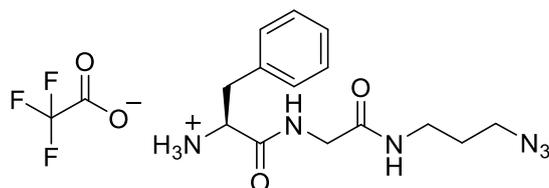
Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 171.59 (C(O)), 170.58 (C(O)), 155.40 (OC(O)), 150.93 (C(OH)), 137.99 (Ar), 136.49 (Ar), 136.06 (Ar), 129.18 (Ar), 129.03 (Ar), 127.90 (Ar), 126.16 (Ar), 126.15 (Ar), 125.50 (Ar), 78.14 (C(CH₃)), 55.74 (CH), 48.23 (CH₂N₃), 40.12 (CH₂), 38.87 (CH₂), 38.28 (CH₂), 37.33 (CH₂), 36.46 (CH₂), 35.90 (CH₂), 28.29 (CH₃), 28.12 (CH₃), 27.74 (CH₃).

ESI-MS для $C_{26}H_{33}N_7O_7$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 555,59, найдено: 556.25.

4.2.5. Получение солей трифторацетата дипептидных цепочек

К соединениям **8a-8m** прикапывали 10% раствор трифторуксусной кислоты в дихлорметане и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 3 часов до полного исчезновения исходного вещества. Контроль осуществлялся методом ТСХ (элюент: 10% MeOH в ДХМ). По окончании реакции растворитель удаляли при пониженном давлении, а полученное вещество дважды переупаривали с дихлорметаном. Продукт выделяли ресуспензированием в диэтиловом эфире.

Синтез (S)-1-((2-((3-азидопропил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9a)



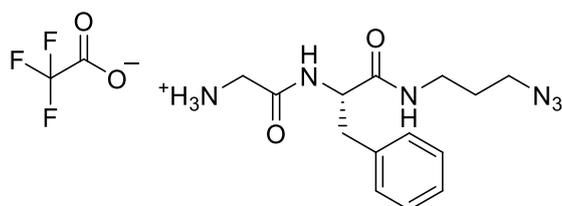
Из соединения **8a** (350 мг, 0,86 ммоль) и 12 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9a** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 93% (364 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.75 (т, $J=5.44$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.12 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.99 (т, $J=5.69$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.30 - 7.36 (м, 2 H, Ar), 7.24 - 7.30 (м, 3 H, Ar), 4.03 - 4.10 (м, 1 H, CH), 3.67 - 3.81 (м, 2 H, CH_2), 3.34 (т, $J=6.79$ Hz, 2 H, CH_2), 3.06 - 3.17 (м, 3 H, CH_2), 2.90 - 2.95 (м, 1 H, CH_2), 1.61 - 1.68 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 167.80 (C(O)), 167.47 ($F_3CC(O)$), 134.37 (Ar), 128.99 (Ar), 128.04 (Ar), 126.67 (Ar), 108.94 (Ar), 52.86 (CH_2), 47.74 (CH_2N_3), 36.48 (CH_2), 35.34 (CH_2), 27.84 ($CH_2CH_2N_3$).

ESI-MS для $C_{14}H_{20}N_6O_2$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 305.17, найдено: 305.15; m/z рассчитано для $[2M+H]^+$: 609.34, найдено: 609.25.

Синтез (S)-2-((1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтанаминий 2,2,2-трифторацетата (9b)



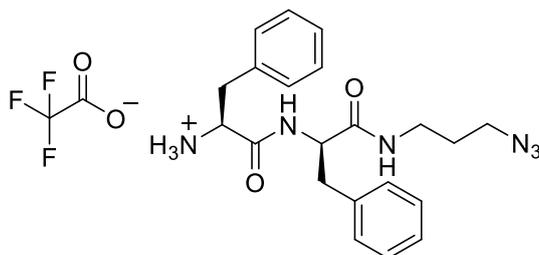
Из соединения **8b** (489 мг, 1,21 ммоль) и 17 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9b** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 89% (450 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.73 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, NHС(O)), 8.20 (t, $J=5.59$ Hz, 1 H, NHС(O)), 7.98 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.25 – 7.31 (м, 2 H, Ar), 7.16 – 7.24 (м, 3 H, Ar), 4.45 - 4.53 (м, 1 H, CH), 3.51 - 3.61 (м, 2 H, CH_2), 3.19 (т, $J=6.82$ Hz, 2 H, CH_2), 3.08 - 3.16 (м, 1 H, CH_2), 2.99 - 3.05 (м, 1 H, CH_2), 2.95 (дд, $J=13.75$, 5.93 Hz, 1 H, CH_2), 2.77 (дд, $J=13.54$, 8.77 Hz, 1 H, CH_2), 1.48 - 1.61 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 170.39 (C(O)), 165.66 ($\text{F}_3\text{C}\underline{\text{C}}(\text{O})$), 137.40 (Ar), 129.19 (Ar), 128.20 (Ar), 126.50 (Ar), 54.38 (CH), 48.20 (CH_2N_3), 38.12 (CH_2), 35.80 (CH_2), 28.21 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 305.35, найдено: 305.15, рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 609.34, найдено 609.25.

Синтез (S)-1-((R)-1-((3-азидопропил) амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9c)



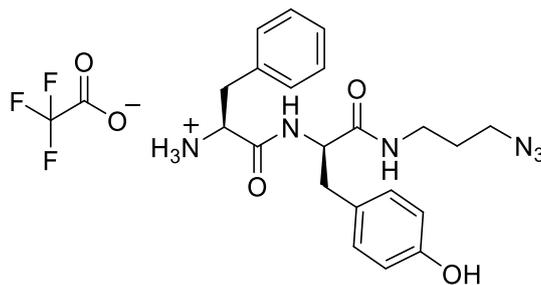
Из соединения **8c** (563 мг, 1,14 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9c** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 68% (394 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.83 – 8.90 (м, 1 H, NHС(O)), 8.24 (т, $J=5.67$ Hz, 1 H, NHС(O)), 8.07 (br. s., 3 H, NH_3^+), 7.22 - 7.28 (м, 3 H, Ar), 7.14 - 7.22 (м, 6 H, Ar), 6.92 - 6.98 (м, 1 H, Ar), 4.41 - 4.54 (м, 1 H, CH), 3.95 – 4.08 (м, 1 H, CH), 3.21 (т, $J=6.85$ Hz, 1 H, CH_2), 3.11 - 3.17 (м, 1 H, CH_2), 3.02 - 3.10 (м, 1 H, CH_2), 2.96 - 3.02 (м, 1 H, CH_2), 2.85 - 2.96 (м, 2 H, CH_2), 2.76 - 2.85 (м, 1 H, CH_2), 2.59 – 2.69 (м, 1 H, CH_2), 1.46 - 1.60 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 170.79 (C(O)), 170.46 (C(O)), 168.06 ($\text{F}_3\text{C}\underline{\text{C}}(\text{O})$), 137.83 (Ar), 135.14 (Ar), 130.01 (Ar), 129.93 (Ar), 129.61 (Ar), 128.86 (Ar), 128.61 (Ar), 128.56 (Ar), 127.47 (Ar), 126.89 (Ar), 54.91 (CH), 53.54 (CH), 48.62 (CH_2N_3), 38.62 (CH_2), 37.26 (CH_2), 36.22 (CH_2), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 395.22, найдено: 395.15; m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 789.44, найдено: 789.30.

Синтез (S)-1-((R)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9d)



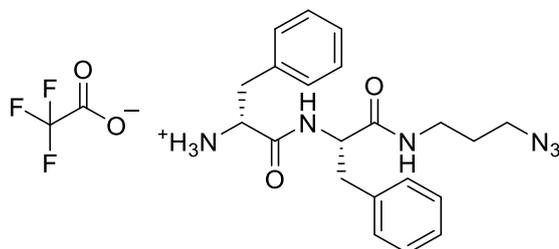
Из соединения **8d** (401 мг, 0,79 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **9d** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 98% (406 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.22 (уш.с., 1 H, OH), 8.82 (д, $J=8.56$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.22 (т, $J=5.41$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.03 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.19 - 7.26 (м, 4 H, Ar), 6.96 - 7.02 (м, 3 H, Ar), 6.60 - 6.67 (м, 2 H, Ar), 4.37 - 4.49 (м, 1 H, CH), 3.99 - 4.05 (м, 1 H, CH), 3.20 - 3.29 (м, 2 H, CH_2), 3.08 - 3.20 (м, 1 H, CH_2), 2.96 - 3.08 (м, 1 H, CH_2), 2.82 - 2.95 (м, 1 H, CH_2), 2.72 - 2.82 (м, 1 H, CH_2), 2.61 - 2.72 (м, 1 H, CH_2), 2.53 - 2.59 (м, 1 H, CH_2), 1.51 - 1.63 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 170.63 (C(O)), 167.56 ($\text{F}_3\text{CC(O)}$), 156.10 (C(OH)), 134.70 (Ar), 130.23 (Ar), 130.11 (Ar), 129.58 (Ar), 128.47 (Ar), 127.35 (Ar), 127.11 (Ar), 114.94 (Ar), 54.53 (CH), 53.28 (CH), 48.23 (CH_2N_3), 37.58 (CH_2), 36.96 (CH_2), 35.80 (CH_2), 28.26 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 411.21, найдено: 411.20; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 433.19, найдено: 433.15, m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 821.42, найдено: 821.35.

Синтез (R)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9e)



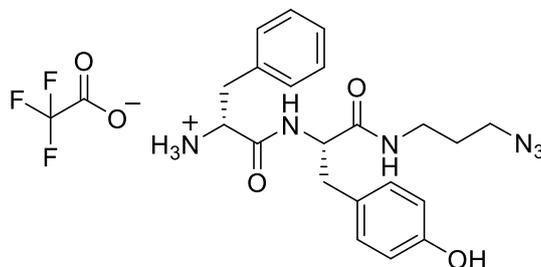
Из соединения **8e** (651 мг, 1,27 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **9e** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 65% (451 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.85 (м, 1 H, $\text{NH}(\text{O})$), 8.06 (уш.с, 3 H, NH_3^+), 7.26 - 7.31 (м, 2 H, Ar), 7.20-7.24 (м, 5 H, Ar), 7.18-7.16 (м, 2 H, Ar), 6.97 - 7.01 (м, 1 H, Ar), 4.45 - 4.58 (м, 1 H, CH), 4.03 (уш.с, 1H, CH), 3.23 (т, $J=6.79$ Hz, 1 H, CH_2), 3.12 - 3.19 (м, 1H, CH_2), 3.01 - 3.12 (м, 2H, CH_2), 2.87 - 3.01 (м, 2H, CH_2), 2.83 (дд, $J=14.98, 5.62$ Hz, 1 H, CH_2), 2.59 - 2.72 (м, 1H, CH_2), 1.49 - 1.62 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 170.49 ($\text{C}(\text{O})$), 170.12 ($\text{C}(\text{O})$), 167.63 ($\text{F}_3\text{CC}(\text{O})$), 137.33 (Ar), 134.57 (Ar), 129.59 (Ar), 129.51 (Ar), 129.31 (Ar), 129.21 (Ar), 128.49 (Ar), 128.26 (Ar), 127.16 (Ar), 126.62 (Ar), 54.48 (CH), 53.27(CH), 48.18 (CH_2N_3), 38.25 (CH_2), 36.89 (CH_2), 35.82 (CH_2), 28.19 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 395.22, найдено: 395.15, : m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 789.43, найдено: 789.30.

Синтез (R)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9f)



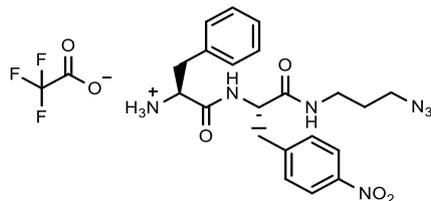
Из соединения **8f** (707 мг, 1,38 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9f** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 81% (591 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.25 (с, 1 H, OH), 8.74 - 8.92 (м, 1 H, $\text{NH}(\text{O})$), 8.20 - 8.29 (м, 1 H, $\text{NH}(\text{O})$), 8.08 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.19 - 7.30 (м, 3 H, Ar), 6.92 - 7.07 (м, 4 H, Ar), 6.58 - 6.70 (м, 2 H, Ar), 4.36 - 4.48 (м, 1 H, CH), 4.00 - 4.11 (м, 1 H, CH), 3.20 - 3.29 (м, 2 H, CH_2), 3.08 - 3.20 (м, 1 H, CH_2), 2.98 - 3.08 (м, 1H, CH_2), 2.76 - 2.92 (м, 2 H, CH_2), 2.65 - 2.70 (м, 1 H, CH_2), 2.51 - 2.63 (м, 1 H, CH_2), 1.51 - 1.64 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 171.02 ($\text{C}(\text{O})$), 167.92 ($\text{F}_3\text{CC}(\text{O})$), 156.46 ($\text{C}(\text{OH})$), 135.05 (Ar), 130.60 (Ar), 129.95 (Ar), 128.87 (Ar), 115.32 (Ar), 48.61 (CH_2N_3), 36.20 (CH_2), 28.64 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 411.21, найдено: 411.20; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 433.19, найдено: 433.20, m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 821.42, найдено: 821.35.

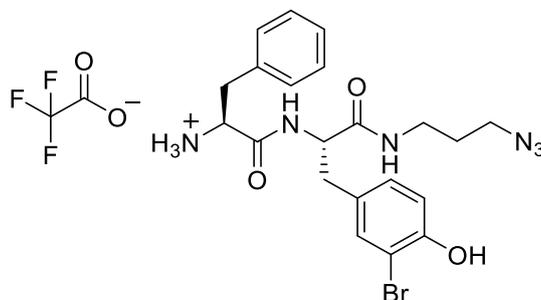
Синтез (S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-нитрофенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетат (9g)



Из соединения **8g** (283 мг, 0,525 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **9g** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 65% (195 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.97 (д, 2 H, $J=8.44$ Hz, NH), 8.90 (д, 2 H, $J=8.19$ Hz, NH), 8.31 (м, 2 H, Ar), 8.22 (м, 2 H, Ar), 8.15 (м, 7 H, Ar), 8.09 (м, 1 H, Ar), 7.48 (м, 6 H, Ar), 6.95 - 7.07 (м, 4 H, Ar), 4.50 - 4.67 (м, 1 H, CH), 4.03 (м, 1 H, CH), 3.16 - 3.29 (м, 4 H, CH_2), 2.99 - 3.16 (м, 4 H, CH_2), 2.82 - 2.99 (м, 8 H, CH_2), 1.58 (м, 8 H, CH_3).

Синтез (S)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3-бромо-4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9h)



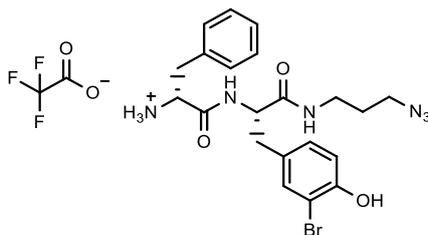
Из соединения **8h** (737 мг, 1,25 ммоль) и 15 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **9h** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 93% (704 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.14 (с, 1 H, OH), 8.88 (д, $J=8.56$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.80 (д, $J=8.13$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.27 (т, $J=5.56$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.16 (т, $J=5.50$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.01 - 8.08 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.23 - 7.39 (м, 5 H, Ar), 6.93 - 7.07 (м, 2 H, Ar), 6.82 - 6.86 (м, 1 H, Ar), 4.36 - 4.50 (м, 1 H, CH), 4.01 (уш.с., 1 H, CH), 3.19 - 3.33 (м, 2 H, CH_2), 2.97 - 3.19 (м, 2 H, CH_2), 2.90 - 2.95 (м, 1 H, CH_2), 2.76 - 2.87 (м, 1 H, CH_2), 2.61 - 2.76 (м, 1 H, CH_2), 2.52 - 2.60 (м, 1 H, CH_2), 1.48 - 1.67 (м, 2 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 169.91 (C(O)), 169.54 (C(O)), 167.21($\text{F}_3\text{CC(O)}$), 152.20 (C(OH)), 134.12 (Ar), 132.83 (Ar), 129.06 (Ar), 128.99 (Ar), 128.76 (Ar), 127.95 (Ar), 126.61 (Ar), 115.51 (Ar), 108.42 (C(Br)), 54.07 (CH), 52.73 (CH), 47.67 (CH_2N_3), 27.74 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrN}_6\text{O}_3$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 489.12, найдено: 489.10; m/z рассчитано для $[\text{2M}+\text{H}]^+$: 979.25, найдено: 979.10.

Синтез (R)-1-((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3-бromo-4-гидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9i)

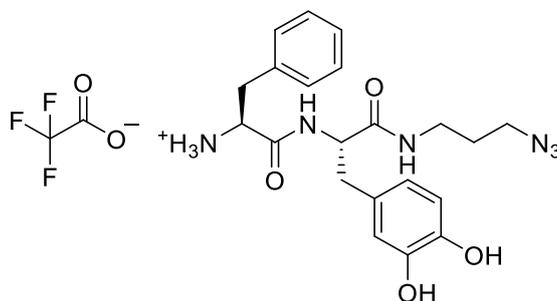


Из соединения **8i** (314 мг, 0,39 ммоль) и 15 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9i** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 65% (154 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.06 (с, 1 H, OH), 8.86 (д, *J*=8.55 Hz, 1 H, NHC(O)), 8.26 (т, *J*=5.59 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.97 (уш.с., 3 H, NH₃⁺), 7.39 - 7.37 (м, 1 H, Ar), 7.16 - 7.28 (м, 3 H, Ar), 6.91 - 7.04 (м, 3 H, Ar), 6.82 (д, *J*=8.22 Hz, 1 H, Ar), 4.40 - 4.52 (м, 1 H, CH), 3.93 - 4.07 (м, 1 H, CH), 3.28 (т, *J*=6.69 Hz, 2 H, CH₂), 3.10 - 3.22 (м, 1 H, CH₂), 3.06 (д, *J*=6.14 Hz, 1 H, CH₂), 2.87 - 3.00 (м, 1 H, CH₂), 2.73 - 2.87 (м, 1 H, CH₂), 2.52 - 2.73 (м, 3 H, CH₂), 1.56 - 1.68 (м, 2 H, CH₂).

ESI-HRMS для C₂₁H₂₅BrN₆O₃: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 489.1252, найдено: 489.1244.

Синтез (S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата (9j)



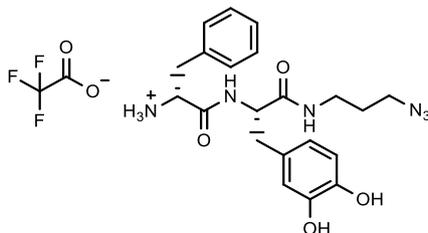
Из соединения **8j** (648 мг, 1,27 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9j** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 76% (510 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.77 (д, *J*=8.07 Hz, 2 H, NHC(O)), 8.10 - 8.16 (м, 1 H, NHC(O)), 8.08 (уш.с, 3 H, NH₃⁺), 7.19 - 7.32 (м, 5 H, Ar), 6.60 - 6.62 (м, 2 H, Ar), 6.44 - 6.47 (м, 1 H, Ar), 4.33 - 4.41 (м, 1 H, CH), 4.00 (м, 1 H, CH), 3.18 - 3.25 (м, 2 H, CH₂), 3.06 - 3.14 (м, 2 H, CH₂), 2.99 - 3.06 (м, 1 H, CH₂), 2.92 (дд, *J*=14.00, 7.83 Hz, 1 H, CH₂), 2.71 - 2.79 (м, 1 H, CH₂), 2.60 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 1.52-1.60 (м, 2 H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 170.62 (C(O)), 167.59 ($\text{F}_3\text{CC(O)}$), 144.76 (C(OH)), 143.74 (C(OH)), 134.28 (Ar), 129.51 (Ar), 128.59 (Ar), 127.90 (Ar), 127.32 (Ar), 120.07 (Ar), 116.54 (Ar), 54.96 (CH), 53.21 (CH), 48.09 (CH_2N_3), 35.84 (CH_2), 28.05 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 427.21, найдено: 427.20; m/z рассчитано для $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 853.41, найдено: 853.40.

Синтез (R)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-амино 2,2,2-трифторацетата

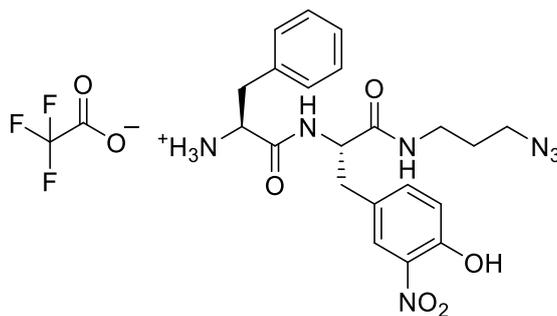


Из соединения **9g** (395 мг, 0,75 ммоль) и 20 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **10g** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 98% (421 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.79 (с, 1 H, d, $J=8.62$ Hz, OH), 8.22 (м, 1 H, Ar), 7.99 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.18 - 7.29 (м, 3 H, Ar), 6.99 (м, 2 H, Ar), 6.55 - 6.65 (м, 2 H, Ar), 6.46 (м, 1 H, Ar), 4.43 (м, 1 H, CH), 4.01 (м, 1 H, CH), 3.27 (м, 2 H, CH_2), 3.09 - 3.20 (м, 1 H, CH_2), 3.02 (м, 1 H, CH_2), 2.84 - 2.94 (м, 1 H, CH_2), 2.70 - 2.82 (м, 1 H, CH_2), 1.59 (м, 2 H, CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 427.2102, найдено: 427.4763.

Синтез (S)-1-(((S)-1-((3-азидопропил)амино)-3-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-1-оксопропан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-аминия 2,2,2-трифторацетата (9l)



Из соединения **8l** (550 мг, 0,99 ммоль) и 18 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метилене было получено соединение **9l** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 98% (552 мг).

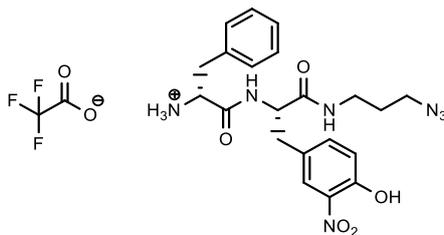
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.98 (с., 1 H, OH), 8.84 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.19 (т, $J=5.69$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.09 (уш.с., 3 H, NH_3^+), 7.75 (д, $J=2.14$ Hz, 1 H, Ar), 7.38 (дд, $J=8.56, 2.20$ Hz, 1 H, Ar), 7.26 - 7.33 (м, 3 H, Ar), 7.21 - 7.25 (м, 2 H, Ar), 7.03 - 7.08

(м, 1 H, Ar), 4.38 - 4.55 (м, 1 H, CH), 4.02 (уш.с., 1 H, CH), 3.23 (т, $J=6.82$ Hz, 2 H, CH₂), 3.02 - 3.15 (м, 3 H, CH₂), 2.89-2.96 (м, 2 H, CH₂), 2.77 - 2.85 (м, 1 H, CH₂), 1.46 - 1.68 (м, 2 H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 169.87 (C(O)), 167.78 (F₃CC(O)), 151.07 (C(OH)), 136.30 (Ar), 134.67 (Ar), 129.60 (Ar), 128.51 (Ar), 128.33 (Ar), 125.42 (Ar), 119.01 (Ar), 54.21 (CH), 53.09 (CH), 48.17 (CH₂N₃), 35.79 (CH₂), 28.27 (CH₂CH₂N₃).

ESI-MS для C₂₁H₂₅N₇O₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 456.20, найдено: 456.25

Синтез (R) -1 - ((S) -1 - ((3-азидопропил) амино) -3- (4-гидрокси-3-нитрофенил) -1-оксопропан-2-ил) амино) -1-оксо- 3-фенилпропан-2-аминия 2,2,2-трифторацетата (9m)



Из соединения **8m** (584 мг, 1,05 ммоль) и 18 мл 10% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле было получено соединение **9m** в виде бесцветного аморфного вещества с выходом 89% (537 мг).

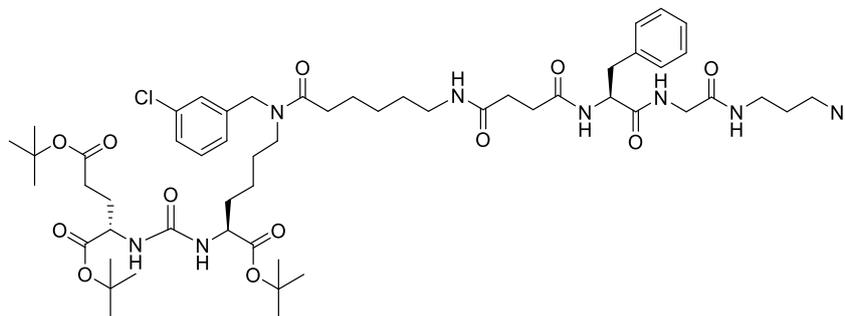
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.93 (с, 1 H, OH), 8.92 (д, 1 H, d, $J=8.62$ Hz, NHC(O)), 8.29 (м, 1 H, t, $J=5.62$ Hz, NHC(O)), 8.03 (с, 3 H, NH₃⁺), 7.77 (м, 1 H, d, $J=2.02$ Hz, Ar), 7.37 (дд, 1 H, dd, $J=8.53, 2.05$ Hz, Ar), 7.17 - 7.27 (м, 3 H, Ar), 6.97 - 7.07 (м, 3 H, Ar), 4.44 - 4.57 (м, 1 H, CH), 4.02 (м, 1 H, CH), 3.28 (м, 2 H, t, $J=6.79$ Hz, CH₂), 3.11 - 3.22 (м, 1 H, CH₂), 2.97 - 3.11 (м, 1 H, CH₂), 2.82 - 2.97 (м, 2 H, CH₂), 2.60 - 2.75 (м, 2 H, CH₂), 1.60 (м, 2 H, $J=9.61, 6.84$ Hz, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 170.79 (C(O)), 170.18 (C(O)), 167.79 (F₃CC(O)), 151.09 (C(OH)), 142.06 (Ar), 136.46 (Ar), 136.36 (Ar), 136.26 (Ar), 134.67 (Ar), 129.45 (Ar), 129.04 (Ar), 128.53 (Ar), 128.44 (Ar), 127.16 (Ar), 126.84 (Ar), 118.99 (Ar), 53.99 (CH), 53.30 (CH), 48.23 (CH₂N₃), 40.15 (CH₂), 37.01 (CH₂), 35.85 (CH₂), 28.27 (CH₂CH₂N₃).

4.2.6. Получение лигандов на основе мочевины DCL

Соединение **5** (1 экв.), НОВt (1.5 экв.), НВТУ (1.5 экв.) и DIPEA (2 экв.) растворили в ДМФА. Оставили преактивировать в атмосфере аргона на 2 часа, после чего добавили соответствующий дипептид **9a – 9m** (1.2 экв.), содержащий фрагмент 3-азидо-1-пропанамина. Смесь перемешивали 24 ч. Далее удалили растворитель при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью метода колоночной хроматографии (Puriflash 50μ, элюент: петролейный эфир/этилацетат => этилацетат/метанол, от 5% EtOAc до 100% EtOAc в течение 20 минут).

Синтез три-tert-бутил (3S,7S,25S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10a)

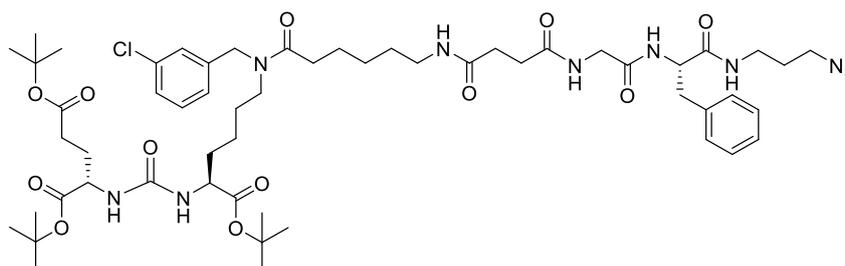


Из соединения **5** (270 мг, 0,358 ммоль), НОВт (66 мг, 0,537 ммоль), НВТУ (185 мг, 0,537 ммоль) и DIPEA (115 мкл, 0,716 ммоль) и соединения **9a** (180 мг, 0,430 ммоль) было получено соединение **10a** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 57% (228 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.98 - 8.08 (м, 1 H, NHC(O)), 7.37 - 7.48 (м, 1 H, NHC(O)), 7.28 - 7.32 (м, 1 H, Ar), 7.19 - 7.26 (м, 4 H, Ar), 7.12 - 7.16 (м, 1 H, Ar), 7.02 - 7.08 (м, 1 H, Ar), 4.59 - 4.67 (м, 1 H, CH), 4.49 - 4.54 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.26 - 4.37 (м, 2 H, CH), 3.88 - 3.97 (м, 1 H, CH), 3.23 - 3.39 (м, 7 H, CH_2), 3.15 - 3.21 (м, 1 H, CH_2), 3.01 - 3.11 (м, 1 H, CH_2), 2.60 - 2.82 (м, 4 H, CH_2), 2.41 (т, $J=6.93$ Hz, 1 H, CH_2), 2.27 - 2.37 (м, 3 H, CH_2), 2.02 - 2.04 (м, 3 H, CH_2), 1.71 - 1.91 (м, 4 H, CH_2), 1.64 - 1.71 (м, 2 H, CH_2), 1.48 - 1.64 (м, 5 H, CH_2), 1.37 - 1.48 (м, 27 H, CH_3), 1.29 - 1.36 (м, 3 H, CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{55}\text{H}_{83}\text{ClN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1111.59, найдено: 1111.40.

Синтез (3S, 7S, 28S) -три-tert-бутил 33-азидо-28-бензил-12- (3-хлорбензил) - 5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19, 24,27,30-гепта азатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (11b)



Из соединения **5** (240 мг, 0,290 ммоль), НОВт (60 мг, 0,436 ммоль), НВТУ (166 мг, 0,436 ммоль) и DIPEA (99 мкл, 0,581 ммоль) и соединения **9b** (146 мг, 0,350 ммоль) было получено соединение **10b** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 56% (180 мг).

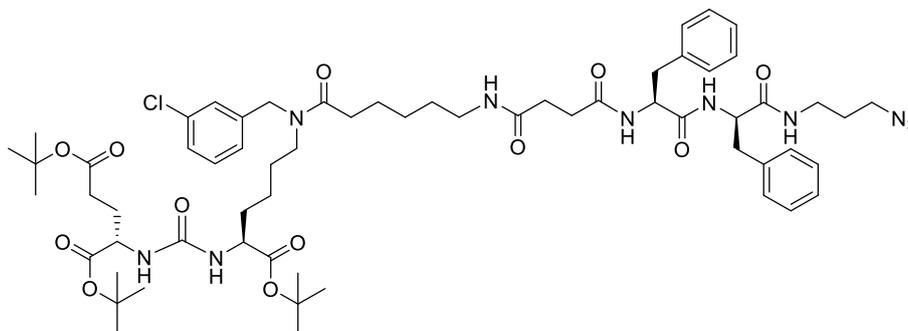
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.82 (д., $J=8.0$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.76 (д., $J=8.0$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.28 - 7.32 (м, 1 H, Ar), 7.20 - 7.26 (м, 5 H, Ar), 7.15 - 7.20 (м, 1 H, Ar), 6.99 - 7.15 (м, 2 H, Ar), 4.70 (м, 1 H, CH), 4.48 - 4.55 (м, 1 H, NCH_2Ar), 4.30 - 4.38 (м, 1 H,

NCH_2Ar), 3.86 - 3.82 (м, 1 H, CH), 3.26 - 3.43 (м, 3 H, CH_2), 3.13 - 3.26 (м, 4 H, CH_2), 3.06 (дд, $J=13.59, 8.79$ Hz, 1 H, CH_2), 2.37 - 2.46 (м, 1 H, CH_2), 2.33 (м, 2 H, CH_2), 1.81 - 1.91 (м, 1 H, CH_2), 1.65 - 1.78 (м, 3 H, CH_2), 1.50 - 1.65 (м, 5 H, CH_2), 1.44 (с., 27 H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173.21 (C(O)), 172.37 (C(O)), 171.42 (C(O)), 168.91 (C(O)), 157.21 (NHC(O)NH), 129.83 (Ar), 129.19 (Ar), 128.40 (Ar), 127.86 (Ar), 127.70 (Ar), 127.42 (Ar), 126.67 (Ar), 126.34 (Ar), 125.89 (Ar), 124.32 (Ar), 81.85 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 55.09 (CH), 53.47 (CH), 53.24 (CH), 48.86 (CH_2), 45.80 (CH_2), 43.67 (CH_2), 39.62 (CH_2), 38.63 (CH_2), 36.78 (CH_2), 32.82 (CH_2), 32.48 (CH_2), 31.69 (CH_2), 31.65 (CH_2), 31.17 (CH_2), 30.77 (CH_2), 28.45 (CH_2), 28.14 (CH_2), 28.05 (CH_3), 26.24 (CH_2), 24.47 (CH_2), 22.44 (CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{55}\text{H}_{83}\text{ClN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1111.59, найдено: 1111.40; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1133.58, найдено: 1133.35.

Синтез три-tert-бутил (3S,7S,25S,28R)-33-азидо-25,28-дibenзил-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (11c)



Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **9c** (184 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10c** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 50% (160 мг).

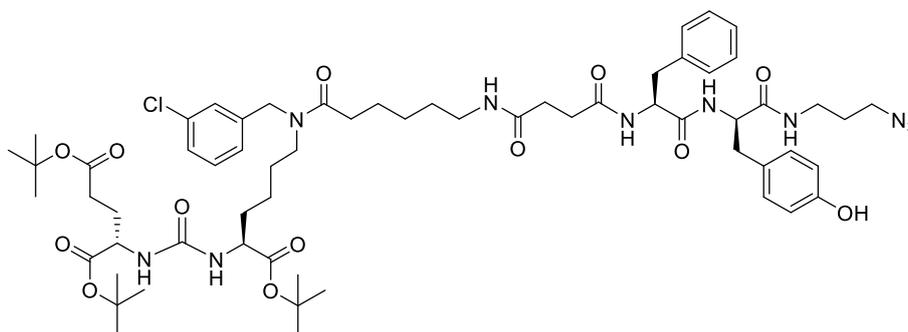
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.89 – 7.95 (м, 1 H, NHC(O)), 7.69 – 7.75 (м, 1 H, NHC(O)), 7.34 - 7.46 (м, 1 H, NHC(O)), 7.11 - 7.29 (м, 9 H, Ar), 6.97 - 7.11 (м, 5 H, Ar), 5.80 - 6.06 (м, 2 H, NHC(O)), 4.66 - 4.79 (м, 1 H, CH), 4.55 - 4.65 (м, 1 H, CH), 4.41 - 4.54 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.24 - 4.40 (м, 2 H, CH), 3.04 - 3.34 (м, 8 H, CH_2), 2.81 - 3.04 (м, 3 H, CH_2), 2.57 - 2.77 (м, 1 H, CH_2), 2.40 - 2.56 (м, 2 H, CH_2), 2.16 - 2.40 (м, 5 H, CH_2), 1.99 - 2.09 (м, 2 H, CH_2), 1.77 - 1.87 (м, 1 H, CH_2), 1.63 - 1.77 (м, 3 H, CH_2H), 1.53 - 1.63 (м, 4 H, CH_2), 1.46 - 1.53 (м, 3 H, CH_2), 1.36 - 1.46 (м, 27 H, CH_3), 1.25 - 1.36 (м, 4 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 173.43 (C(O)), 173.05 (C(O)), 172.98 (C(O)), 172.76 (C(O)), 172.53 (C(O)), 172.44 (C(O)), 172.37 (C(O)), 171.34 (s C(O)), 171.19 (C(O)), 170.95 (C(O)), 157.25 (NHC(O)NH), 139.93 (Ar), 139.89 (Ar), 139.00 (Ar), 136.89 (Ar), 136.74 (Ar), 134.87 (Ar), 134.33 (Ar), 130.22 (Ar), 129.81 (Ar), 129.32 (Ar), 129.14 (Ar), 128.94 (Ar), 128.65

(Ar), 128.39 (Ar), 127.76 (Ar), 127.37 (Ar), 126.86 (Ar), 126.49 (Ar), 126.25 (Ar), 125.87 (Ar), 124.26 (Ar), 81.98 (C(CH₃)₃), 81.87 (C(CH₃)₃), 81.78 (C(CH₃)₃), 81.50 (C(CH₃)₃), 80.53 (C(CH₃)₃), 60.37 (CH), 54.42 (CH), 53.27 (CH), 53.01 (CH), 52.72 (CH), 48.70 (CH₂), 47.75 (CH₂), 47.06 (CH₂), 45.63 (CH₂), 39.30 (CH₂), 38.59 (CH₂), 37.73 (CH₂), 36.63 (CH₂), 33.16 (CH₂), 32.73 (CH₂), 32.51 (CH₂), 31.66 (CH₂), 28.75 (CH₂), 28.61 (CH₂), 28.49 (CH₂), 28.38 (CH₂), 28.07 (CH₂), 28.03 (CH₂), 27.97 (CH₂), 26.39 (CH₂), 26.26 (CH₂), 26.14 (CH₂), 24.60 (CH₂), 22.34 (CH₂), 21.02 (CH₂).

ESI-MS для C₆₂H₈₉ClN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1201.90, найдено: 1201.70.

Синтез три-tert-бутил (3S,7S,25S,28R)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10d)

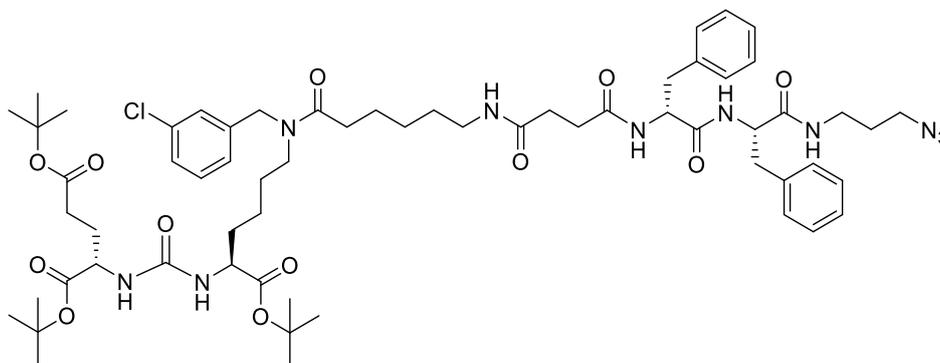


Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **10d** (190 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **11d** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 82% (302 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.58 - 7.75 (м, 1 H, Ar), 7.40 - 7.58 (м, 1 H, Ar), 7.09 - 7.26 (м, 7 H, Ar), 7.01 - 7.07 (м, 1 H, Ar), 6.84 - 6.96 (м, 1 H, Ar), 6.68 - 6.81 (м, 2 H, Ar), 4.65 - 4.75 (м, 1 H, CH), 4.49 (уш.с., 2 H, NCH₂Ar), 4.29 - 4.37 (м, 2 H, CH), 3.16 - 3.33 (м, 8 H, CH₂), 2.92 - 3.05 (м, 2 H, CH₂), 2.83 - 2.92 (м, 1 H, CH₂), 2.44 - 2.64 (м, 3 H, CH₂), 2.21 - 2.43 (м, 5 H, CH₂), 1.78 - 1.95 (м, 1 H, CH₂), 1.48 - 1.78 (м, 10 H, CH₂), 1.39 - 1.48 (м, 29 H, CH₃ + CH₂), 1.29 - 1.37 (м, 4 H, CH₂).

ESI-MS для C₆₂H₈₉ClN₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺ 1217.63, найдено: 1217.60.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -три-tert-бутил 33-азидо-25,28-добензил-12-(3-хлорбензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6, 12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан -1,3,7-трикарбоксилата (10e)

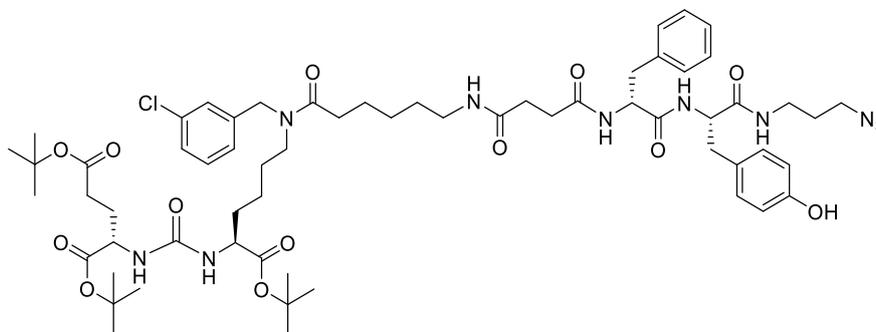


Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **9e** (184 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10e** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 62% (226 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.14 - 7.25 (м, 9 H, Ar), 7.05 - 7.14 (м, 4 H, Ar), 6.98 - 7.05 (м, 1 H, Ar), 4.66 - 4.69 (м, 1 H, CH), 4.48 - 4.55 (м, 3 H, CH + NCH_2Ar), 4.26 - 4.31 (м, 2 H, CH), 3.25 - 3.42 (м, 4 H, CH_2), 3.09 - 3.25 (м, 6 H, CH_2), 2.91 - 3.09 (м, 4 H, CH_2), 2.62 - 2.78 (м, 3 H, CH_2), 2.49 - 2.61 (м, 1 H, CH_2), 2.32 - 2.40 (м, 5 H, CH_2), 1.84 - 1.93 (м, 2 H, CH_2), 1.63 - 1.71 (м, 4 H, CH_2), 1.49 - 1.61 (м, 5 H, CH_3 + CH_2), 1.27 - 1.49 (м, 26 H, CH_3 + CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{62}\text{H}_{89}\text{ClN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1201.64, найдено: 1201.60.

Синтез три-tert-бутил (3S,7S,25R,28S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилат (10f)



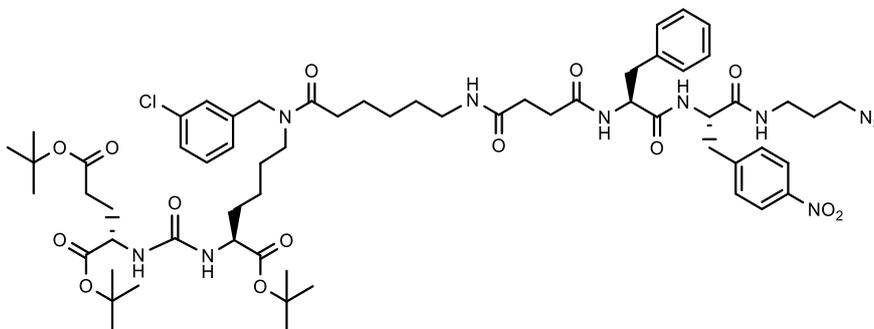
Из соединения **5** (265 мг, 0,321 ммоль), НОВт (65 мг, 0,481 ммоль), НВТУ (182 мг, 0,481 ммоль) и DIPEA (110 мкл, 0,642 ммоль) и соединения **9f** (190 мг, 0,385 ммоль) было получено соединение **10f** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 55% (200 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.50 - 7.62 (м, 1 H, NHC(O)), 7.33 - 7.45 (м, 1 H, NHC(O)), 7.19 - 7.26 (м, 4 H, Ar), 7.10 - 7.19 (м, 3 H, Ar), 7.00 - 7.09 (м, 1 H, Ar), 6.88 - 6.97 (м, 2 H, Ar), 6.69 - 6.79 (м, 2 H, Ar), 5.76 - 5.86 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.65 - 4.71 (м, 1 H, CH), 4.49 - 4.51 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.28 - 4.40 (м, 2 H, CH), 3.29 - 3.40 (м, 2 H, CH_2), 3.10 - 3.25 (м, 7 H, CH_2), 2.98 - 3.01 (м, 1 H, CH_2), 2.90 - 2.93 (м, 1 H, CH_2), 2.85 - 2.88 (м, 1 H, CH_2), 2.47 - 2.61

(м, 3 H, CH₂), 2.26 - 2.40 (м, 4 H, CH₂), 1.80 – 1.89 (м, 1 H, CH₂), 1.49 - 1.75 (м, 10 H, CH₂), 1.38 - 1.46 (м, 28 H, CH₃ + CH₂), 1.26 - 1.38 (м, 5 H, CH₂).

ESI-MS для C₆₂H₈₉ClN₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1217.63, найдено: 1217.60.

Спектры три-tert-бутил (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-нитробензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10g)



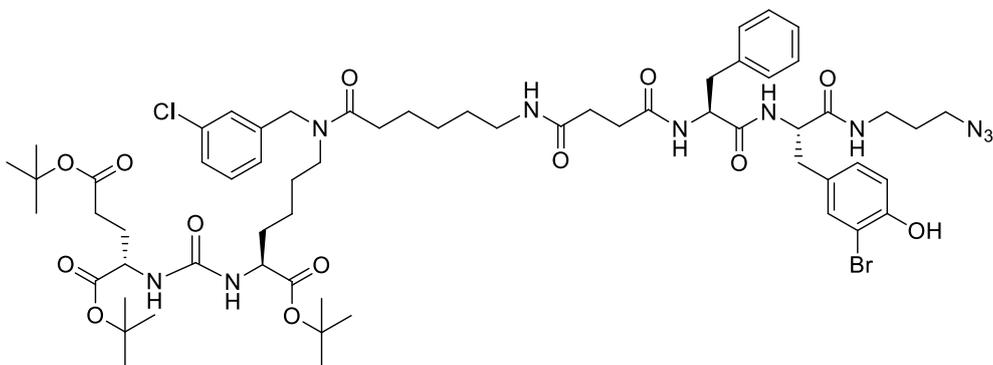
Из соединения **5** (215 мг, 0,259 ммоль), НОВt (53 мг, 0,389 ммоль), НВТУ (148 мг, 0,389 ммоль) и DIPEA (89 мкл, 0,519 ммоль) и соединения **9g** (190 мг, 0,385 ммоль) было получено соединение **10g** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 65% (214 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.08 - 8.15 (м, 1 H, NHC(O)), 8.02 - 8.08 (м, 1 H, NHC(O)), 7.39 - 7.49 (м, 1 H, NHC(O)), 7.28 - 7.38 (м, 3 H, Ar), 7.23 – 7.21 (м, 1 H, Ar), 7.19 – 7.16 (м, 2 H, Ar), 7.15 - 7.05 (м, 1 H, Ar), 6.97 - 7.06 (м, 1 H, Ar), 4.69 (д, J=3.73 Hz, 1 H, CH), 4.47 - 4.57 (м, 1 H, CH), 4.28 - 4.38 (м, 1 H, CH), 3.46 - 3.58 (м, 1 H, CH₂), 3.12 - 3.33 (м, 5 H, CH₂), 2.30 - 2.41 (м, 3 H, CH₂), 2.26 (д, J=5.93 Hz, 2 H, CH₂), 2.00 - 2.14 (м, 3 H, CH₂), 1.52 - 1.77 (м, 9 H, CH₂), 1.40 (д, J=3.42 Hz, 3 H, CH₂), 1.33 (д, J=6.60 Hz, 6 H, CH₂), 1.20 - 1.30 (м, 27 H, CH₃), 1.06 - 0.99 (м, 5 H, CH₂).

ESI-MS для C₆₂H₈₈ClN₁₁O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1246.46, найдено: 1245.50.

ESI-HRMS для C₆₂H₈₈ClN₁₁O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1246.6229, найдено: 1246.6229.

Синтез три-tert-бутил (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(3-бромо-4-гидроксибензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (11i)

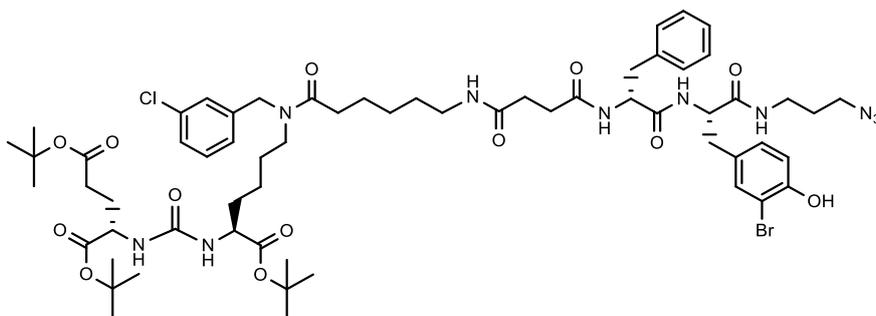


Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **9h** (229 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10h** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 50% (160 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.53 – 7.62 (м, 1 H, NHC(O)), 7.45 – 7.49 (м, 1 H, NHC(O)), 7.17 - 7.26 (м, 5 H, Ar), 7.11 - 7.15 (м, 3 H, Ar), 6.86 - 7.09 (м, 3 H, Ar), 5.60 – 6.01 (м, 1 H, NHC(O)), 4.54 - 4.73 (м, 2 H, CH), 4.49 (с, 2 H, NCH_2Ar), 4.27 - 4.39 (м, 2 H, CH), 3.21 - 3.36 (м, 6 H, CH_2), 3.00 - 3.21 (м, 3 H, CH_2), 2.53 - 2.74 (м, 3 H, CH_2), 2.23 - 2.53 (м, 5 H, CH_2H), 2.01 - 2.12 (м, 2 H, CH_2), 1.80 - 1.91 (м, 1 H, CH_2), 1.49 - 1.69 (м, 7 H, CH_2), 1.37 - 1.49 (м, 30 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.21 - 1.36 (м, 5 H, CH_2).

ESI-HRMS для $\text{C}_{62}\text{H}_{88}\text{BrClN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1320.5310, найдено: 1320.5361.

Синтез (3S,7S,25R,28S)-три-*трет*-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(3-бром-4-гидроксibenзил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилат (**10i**)

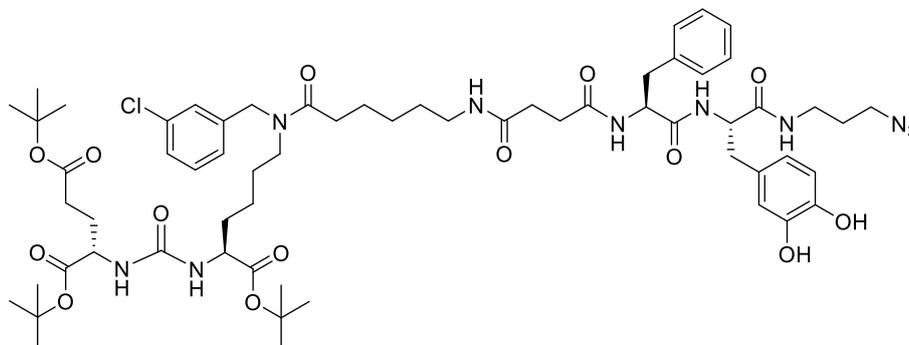


Из соединения **5** (171 мг, 0,207 ммоль), НОВт (42 мг, 0,311 ммоль), НВТУ (117 мг, 0,311 ммоль) и DIPEA (71 мкл, 0,414 ммоль) и соединения **9i** (150 мг, 0,249 ммоль) было получено соединение **10i** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 63% (200 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, Хлороформ- d_3 , δ , м.д.): 7.19 - 7.26 (м, 2 H, Ar), 7.16 (м, 3 H, Ar), 6.91 (м, 2 H, Ar), 4.49 (м, 2 H, CH), 4.36 (м, 2 H, CH), 3.24 (м, 6 H, CH_2), 2.32 (м, 6 H, CH_2), 2.00 - 2.16 (м, 4 H, CH_2), 1.62 (м, 26 H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 1.26 (м, 5 H, CH_2).

ESI-HRMS для $C_{62}H_{88}ClBrN_{10}O_{13}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 1295.5477, найдено: 1295.5523.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -три-трет-бутил 33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (3,4-дигидроксибензил) -5,13,20,23,26 , 29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гепта- азатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10j)

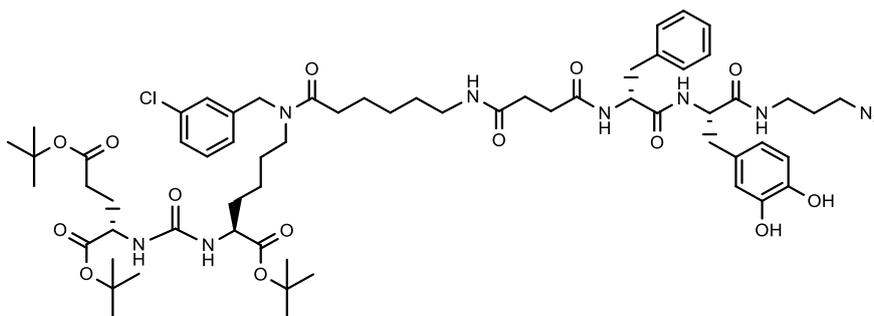


Из соединения **5** (300 мг, 0,363 ммоль), НОВт (74 мг, 0,545 ммоль), НВТУ (207 мг, 0,545 ммоль) и DIPEA (124 мкл, 0,727 ммоль) и соединения **9j** (236 мг, 0,436 ммоль) было получено соединение **10j** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 67% (306 мг).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.72 (с, 1 H, OH), 8.68 (с, 1 H, OH), 8.31 (д, $J=6.97$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.07 (д, $J=8.13$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.94 (м, 1 H, Ar), 7.55 (м, 1 H, NHC(O)), 7.28 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.24 (м, 7 H, Ar), 6.58 - 6.63 (м, 2 H, Ar), 6.46 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.27 - 6.32 (м, 1 H, NHC(O)), 6.25 (д, $J=8.74$ Hz, 1 H, NHC(O)), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.27 (м, 2 H, CH), 3.97- 4.04 (м, 1 H, CH), 3.95 – 3.93 (м, 1 H, CH), 3.21 - 3.27 (м, 2 H, CH₂), 3.17 (д, $J=6.85$ Hz, 2 H, CH₂), 3.05 (дд, $J=11.43, 5.99$ Hz, 2 H, CH₂), 3.00 (м, 2 H, CH₂), 2.93 (м, 1 H, CH₂), 2.89 (м, 1 H, CH₂), 2.85 (м, 1 H, CH₂), 2.33 (м, 3 H, CH₂), 2.12 - 2.28 (м, 5 H, CH₂), 1.57 – 1.59 (м, 4 H, CH), 1.44 – 1.48 (м, 5 H, CH₂), 1.36 (с, 27 H, CH₃), 1.22 – 1.30 (м, 4 H, CH₂).

ESI-MS для $C_{62}H_{89}ClN_{10}O_{14}$: m/z рассчитано для $[M+H]^+$: 1233.63, найдено: 1233.65.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -три-трет-бутил 33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (3,4-дигидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гепта- азатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10k)

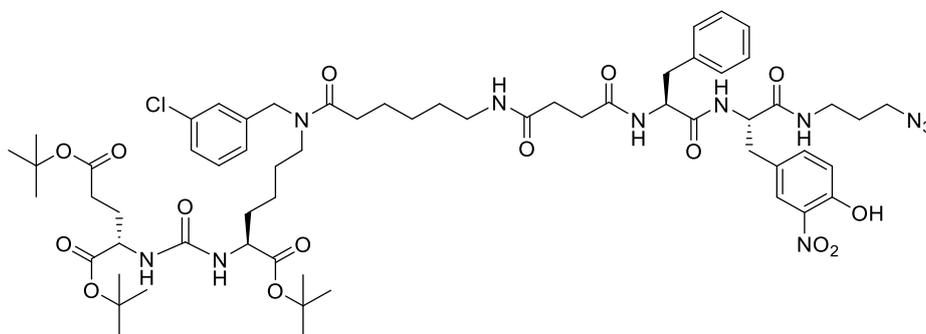


Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (61 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,605 ммоль) и соединения **9k** (196 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10k** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 65% (240 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.18 - 7.25 (м, 3 H, Ar), 7.11 - 7.18 (м, 3 H, Ar), 6.48 (м, 1 H, Ar), 5.71 (м, 1 H, NHС(O)NH), 4.51 (м, 3 H, CH), 4.35 (м, 2 H, CH), 3.25 (м, 5 H, CH₂), 3.12 (м, 3 H, CH₂), 3.03 (м, 1 H, CH₂), 2.52 (м, 2 H, CH₂), 2.31 (м, 6 H, CH₂), 1.73 (м, 4 H, CH₂), 1.59 (м, 5 H, CH₂), 1.40 - 1.47 (м, 28 H, CH₃ + CH₂), 1.29 (м, 4 H, CH₂).

ESI-HRMS для C₆₂H₈₉ClN₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1233.6321, найдено: 1233.6360.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -три-трет-бутил 33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) - 28- (4-гидрокси-3-нитробензил) -5,13,20,23 , 26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10l)

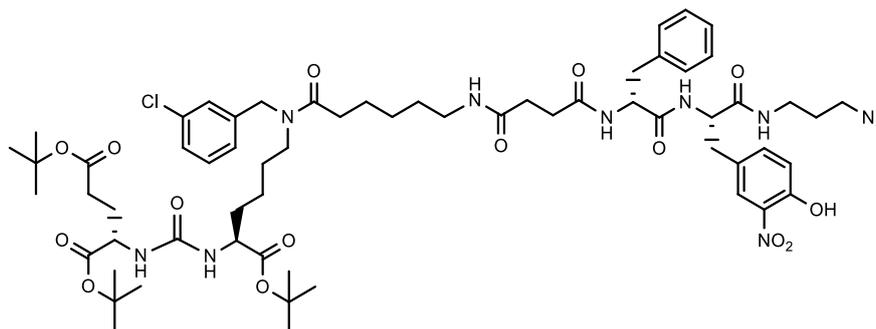


Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВт (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **9l** (177 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10l** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 87% (333 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.78 (с., 1 H, OH), 8.24 (д., J=7.3 Hz, 1 H, NHС(O)), 8.19 (д., J=8.3 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.89 – 7.94 (м, 1 H, NHС(O)), 7.73 (уш.с., 1 H, Ar), 7.67 (м, 1 H, NHС(O)), 7.38 (д, J=3.18 Hz, 1 H, Ar), 7.26 - 7.36 (м, 2 H, Ar), 7.18 - 7.25 (м, 3 H, Ar), 7.15 (д, J=5.38 Hz, 4 H, Ar), 7.03 (д, J=8.50 Hz, 1 H, Ar), 6.28 – 6.30 (м, 1 H, NHС(O)NH), 6.25 (д., J=8.4 Hz, 1 H, NHС(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.35 – 4.36 (м, 1 H, CH), 4.28 – 4.33 (м, 1 H, CH), 3.99 – 4.04 (м, 1 H, CH), 3.94 – 3.97 (м, 1 H, CH), 3.22 - 3.29 (м, 2 H, CH₂), 3.15 – 3.20 (м, 2 H, CH₂), 3.02 - 3.12 (м, 3 H, CH₂), 2.95 - 3.01 (м, 3 H, CH₂), 2.85 – 2.91 (м, 3 H, CH₂), 2.66 – 2.69 (м, 2 H, CH₂), 2.27 - 2.38 (м, 3 H, CH₂), 2.11 - 2.27 (м, 5 H, CH₂), 1.82 – 1.88 (м, 1 H, CH₂), 1.57 – 1.67 (м, 4 H, CH₂), 1.45 (м, 5 H, CH₂), 1.31 - 1.41 (м, 27 H, CH₃), 1.21 – 1.30 (м, 4 H, CH₂).

ESI-HRMS для C₆₂H₈₈ClN₁₁O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1262.6244, найдено: 1262.6278.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -три-трет-бутил 33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (4-гидрокси-3-нитробензил) -5,13,20,23 , 26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (10m)



Из соединения **5** (250 мг, 0,303 ммоль), НОВt (62 мг, 0,454 ммоль), НВТУ (172 мг, 0,454 ммоль) и DIPEA (105 мкл, 0,606 ммоль) и соединения **9m** (177 мг, 0,363 ммоль) было получено соединение **10m** в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 71% (273 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 10.75 (с, 1 H, OH), 8.42 (с, 1 H, NHC(O)), 8.10 (с, 1 H, NHC(O)), 7.99 (с, 1 H, NHC(O)), 7.71 - 7.83 (м, 2 H, Ar), 7.26 - 7.39 (м, 3 H, Ar), 7.22 (м, 1 H, Ar), 7.06 - 7.19 (м, 6 H, Ar), 6.99 (д, 1 H, d, J=8.50 Hz, Ar), 6.22 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.35 (м, 2 H, CH), 3.29 (м, 2 H, t, J=6.82 Hz, CH₂), 3.16 (м, 4 H, CH₂), 2.95 (м, 3 H, CH₂), 2.33 (м, 1 H, CH₂), 2.13 - 2.27 (м, 7 H, CH₂), 1.36 (м, 29 H, CH₂ + CH₃).

ESI-HRMS для C₆₂H₈₈ClN₁₁O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1262.6278, найдено: 1262.6244.

4.2.7. Получение лигандов твердофазным методом синтеза

1) Активация смолы

2-хлортритил-хлоридная смола (2-СТС) (100-200 mesh, емкость 1,2 -1,4 ммоль/г, 250 мг) перемешивалась в 2,5 мл хлористого метилена в течении 10 минут. После этого к раствору добавлялось 65 мкл хлористого тионила и через 3-4 минуты каталитическое количество ДМФА. Раствор перемешивался в течении 4 часов при температуре 40 °С. После активации смолу промывали 3 раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА, затем 3 раза по одной минуте 2,5 мл хлористого метилена.

2) Присоединение первого аминокислотного остатка

Активированная смола перемешивалась в 2,5 мл ДМФА в течение 5 минут. После этого была добавлена первая Fmoc-защищенная аминокислота (2 экв. относительно верхней границы емкости смолы) и DIPEA (10 экв). Далее реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. По окончании реакции излишки растворителя удалялись из реактора, а полученная смесь промывалась три раза по 5 минут 2,5 мл метанола, три раза по 1 минуте

2,5 мл хлористого метилена, три раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА и два раза по 1 минуте 2,5 мл хлористого метилена.

3) Снятие Fmoc-защитной группы

Смолу промывали два раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА. После этого было добавлено 2,5 мл 20% раствора 4-метилпиперидина в ДМФА. Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут. Затем растворитель удаляли, а полученную смесь промывали два раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА и три раза по 1 минуте 2,5 мл хлористого метилена. Данную процедуру повторяли дважды.

4) Присоединение второго аминокислотного остатка

Смолу промыли два раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА. Затем добавили 2,5 мл ДМФА, Fmoc-защищенную аминокислоту (2 экв.), HOBT (0.5 экв.), HBTU (2 экв.) и DIPEA (3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, после чего растворитель удалялся, а смолу промывали три раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА и три раза по 1 минуте 2,5 мл хлористого метилена. Далее проводили снятие Fmoc-защитной группы аналогично как описано в пункте 3 данной методики.

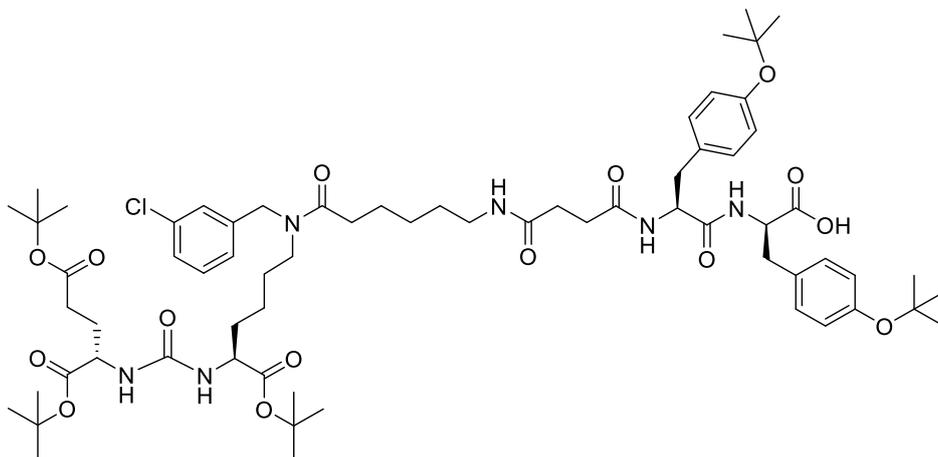
5) Присоединение соединения **6**

Смолу промыли два раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА. Затем добавили 2,5 мл ДМФА, соединение **6** (1.3 экв.), HOBT (0.5 экв.), HBTU (2 экв.) и DIPEA (3 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, после чего растворитель удалялся, а смолу промывали три раза по 1 минуте 2,5 мл ДМФА и три раза по 1 минуте 2,5 мл хлористого метилена.

6) Снятие фрагмента лиганда со смолы

Смолу промыли два раза по 1 минуте 2,5 мл хлористого метилена. После этого было добавлено 2,5 мл 0,5% раствора трифторуксусной кислоты в ДХМ. Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут. Процедуру повторяли дважды. Полученный фильтрат упарили на роторном испарителе и несколько раз переупарили из хлористого метилена. Соединение далее очищали методом обращеннофазовой колоночной хроматографии с элюентом ацетонитрил : вода (Interchim Puriflash, C18-HP, 15 μ , 25g, от 10% ацетонитрила до 100% ацетонитрила за 20 минут, скорость потока – 20 мл/мин). Расчет выхода конечного соединения проводили исходя из максимальной емкости смолы.

Синтез (2R, 5S, 23S, 27S) -2,5-бис (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32-диметил -4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овой кислоты (16a)

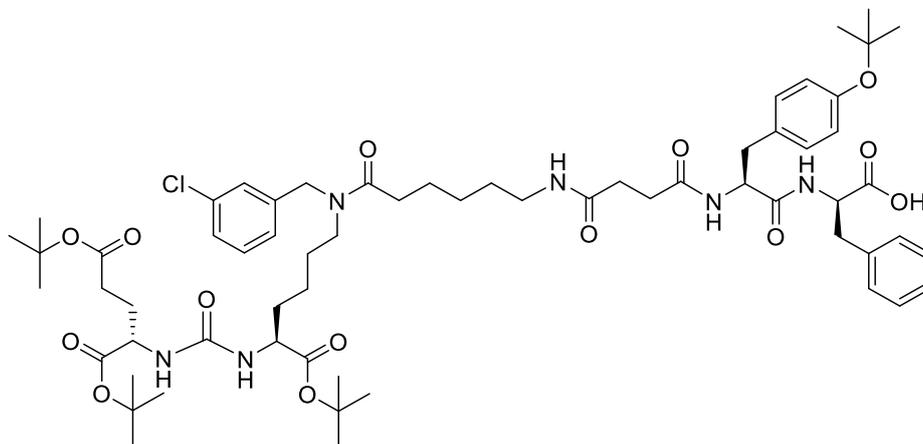


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-O^tBu-D-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-L-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16a** в виде желтоватого масла с выходом 85 % (376 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.78 (уш.с., 1 H, COOH), 8.38 (д, *J*=8.31 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.97 (д, *J*=8.07 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.70 - 7.79 (м, 1 H, NHС(O)), 7.26 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.21 - 7.24 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.16 (м, 3 H, Ar), 6.97 (д, *J*=7.70 Hz, 2 H, Ar), 6.82 (д, *J*=8.19 Hz, 2 H, Ar), 6.77 (д, *J*=7.52 Hz, 2 H, Ar), 6.22 - 6.33 (м, 2 H, NHС(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.39 - 4.45 (м, 2 H, CH), 3.89 - 4.06 (м, 2 H, CH), 3.12 - 3.23 (м, 2 H, CH₂), 2.98 - 3.06 (м, 1 H, CH₂), 2.89 - 2.98 (м, 2 H, CH₂), 2.77 (дд, *J*=13.33, 10.27 Hz, 1 H, CH₂), 2.58 (д, *J*=10.88 Hz, 1 H, CH₂), 2.30 - 2.42 (м, 2 H, CH₂), 2.09 - 2.27 (м, 7 H, CH₂), 1.79 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.62 - 1.67 (м, 1 H, CH₂), 1.53 - 1.57 (м, 1 H, CH₂), 1.46 - 1.52 (м, 3 H, CH₂), 1.40 - 1.45 (м, 2 H, CH₂), 1.33 - 1.38 (м, 30 H, CH₃ + CH₂), 1.20 - 1.23 (м, 11 H, CH₃ + CH₂), 1.16 - 1.19 (м, 10 H, CH₃ + CH₂).

ESI-MS для C₆₇H₉₉ClN₆O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1263.69, найдено: 1263.70.

Синтез (2R, 5S, 23S, 27S) -2-бензил-5- (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овой кислоты (16b)

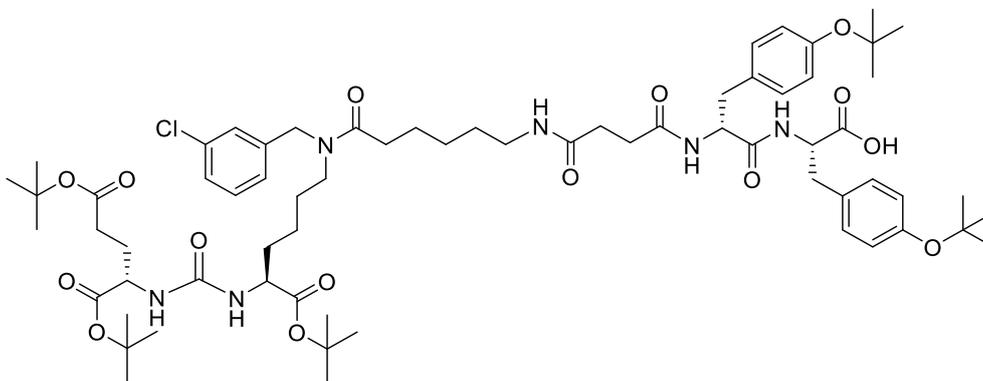


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-D-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-L-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16b** в виде желтоватого масла с выходом 74 % (308 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.78 (уш.с., 1 H, COOH), 8.36 (д, *J*=7.64 Hz, 1 H, NHC(O)), 8.00 (д, *J*=7.40 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.69 - 7.79 (м, 1 H, NHC(O)), 7.36 – 7.40 (м, 1 H, Ar), 7.28 - 7.34 (м, 1 H, Ar), 7.23 - 7.28 (м, 1 H, Ar), 7.17 - 7.23 (м, 4 H, Ar), 7.08 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 6.98 (д, *J*=8.07 Hz, 2 H, Ar), 6.77 (д, *J*=8.13 Hz, 2 H, Ar), 6.20 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.40 – 4.44 (м, 2 H, CH), 3.89 - 4.05 (м, 2 H, CH), 3.11 - 3.23 (м, 2 H, CH₂), 2.89 - 3.07 (м, 2 H, CH₂), 2.83 (дд, *J*=12.99, 9.81 Hz, 1 H, CH₂), 2.67 (д, *J*=13.02 Hz, 1 H, CH₂), 2.38 - 2.44 (м, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.36 (м, 1 H, CH₂), 2.09 - 2.28 (м, 7 H, CH₂), 1.79 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.60 - 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.53 – 1.59 (м, 1 H, CH₂), 1.45 - 1.53 (м, 3 H, CH₂), 1.39 - 1.45 (м, 2 H, CH₂), 1.37 (с, 29 H, CH₃ + CH₂), 1.24 - 1.30 (м, 2 H, CH₂), 1.22 (с, 12 H, CH₃ + CH₂).

ESI-MS для C₆₃H₉₁ClN₆O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1191.64, найдено: 1191.65.

Синтез (2S, 5R, 23S, 27S) -2,5-бис (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32-диметил -4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота (16c)

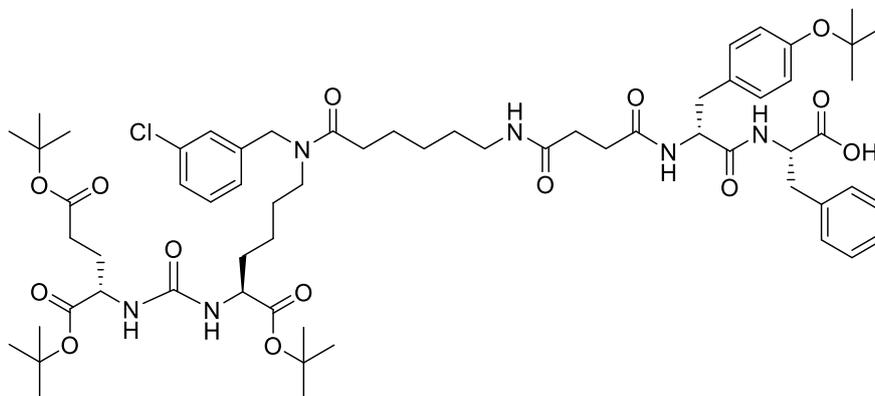


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-O^tBu-L-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-D-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **6**, было получено соединение **16c** в виде желтоватого масла с выходом 70 % (310 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.77 (уш.с., 1 H, COOH), 8.37 (д, *J*=8.38 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.97 (д, *J*=8.62 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.68 - 7.78 (м, 1 H, NHС(O)), 7.26 - 7.40 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.23 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.16 (м, 3 H, Ar), 6.96 – 6.98 (м, 2 H, Ar), 6.82 (д, *J*=8.31 Hz, 2 H, Ar), 6.77 (д, *J*=8.01 Hz, 2 H, Ar), 6.20 - 6.33 (м, 2 H, NHС(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.39 - 4.45 (м, 2 H, CH), 3.92 - 4.05 (м, 2 H, CH), 3.11 - 3.25 (м, 2 H, CH₂), 2.89 - 3.06 (м, 3 H, CH₂), 2.77 (дд, *J*=13.57, 10.27 Hz, 1 H, CH₂), 2.59 (д, *J*=10.58 Hz, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.42 (м, 2 H, CH₂), 2.08 - 2.28 (м, 7 H, CH₂), 1.80 – 1.87 (м, 1 H, CH₂), 1.60 - 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.54 – 1.59 (м, 1 H, CH₂), 1.41 – 1.52 (м, 4 H, CH₂), 1.29 - 1.41 (м, 29 H, CH₃ + CH₂), 1.19 - 1.29 (м, 13 H, CH₃ + CH₂), 1.10 - 1.19 (м, 10 H, CH₃ + CH₂).

ESI-MS для C₆₇H₉₉ClN₆O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1263.69, найдено: 1263.70.

Синтез (2S, 5R, 23S, 27S) -2-бензил-5- (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овой кислоты (16d)



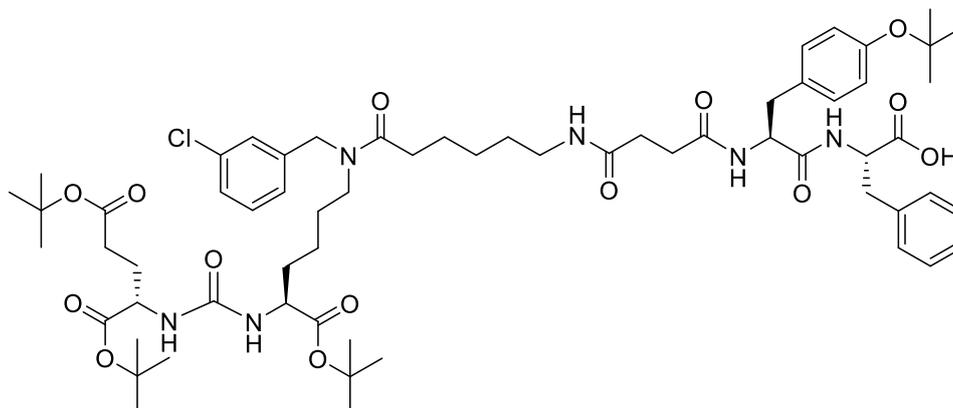
Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-D-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16d** в виде желтоватого масла с выходом 96 % (400 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.79 (уш.с., 1 H, COOH), 8.36 (д, *J*=7.95 Hz, 1 H, NHС(O)), 8.00 (д, *J*=8.86 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.71 - 7.79 (м, 1 H, NHС(O)), 7.27 - 7.43 (м, 2 H, Ar), 7.17 - 7.26 (м, 5 H, Ar), 7.09 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 6.98 (д, *J*=8.38 Hz, 2 H, Ar), 6.78 (д, *J*=8.38 Hz, 2 H, Ar), 6.22 - 6.32 (м, 2 H, NHС(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.38 - 4.43 (м, 2 H, CH), 3.88 - 4.06 (м, 2 H, CH), 3.11 - 3.24 (м, 2 H, CH₂), 2.88 - 3.08 (м, 3 H, CH₂), 2.83 (дд, *J*=13.24, 9.14 Hz, 1 H, CH₂), 2.68 (д, *J*=10.64 Hz, 1 H, CH₂), 2.37 - 2.46 (м, 1 H, CH₂), 2.26 - 2.35 (м, 1 H, CH₂), 2.07 - 2.26 (м, 7 H, CH₂), 1.79 - 1.91 (м, 1 H, CH₂), 1.61 - 1.70 (м, 2 H, CH₂), 1.53 - 1.59 (м, 1 H, CH₂), 1.40 - 1.53 (м, 5 H, CH₂), 1.34 - 1.39 (м, 27 H, CH₃), 1.27 - 1.29 (м, 2 H, CH₂), 1.20 - 1.24 (м, 12 H, CH₃ + CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172.89 (C(O)), 171.93 (C(O)), 171.11 (C(O)), 161.93 (C(O)), 153.29 (C(O)), 137.56 (Ar), 129.64 (Ar), 129.28 (Ar), 128.16 (Ar), 123.24 (Ar), 80.59 (C(CH₃)), 79.78 (C(CH₃)), 53.74 (CH), 53.41 (CH), 28.56 (CH₃), 27.75 (CH₃), 27.66 (CH₂).

ESI-MS для C₆₃H₉₁ClN₆O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1191.64, найдено: 1191.65.

Синтез(2S, 5S, 23S, 27S) -2-бензил-5- (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота (16e)



Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-

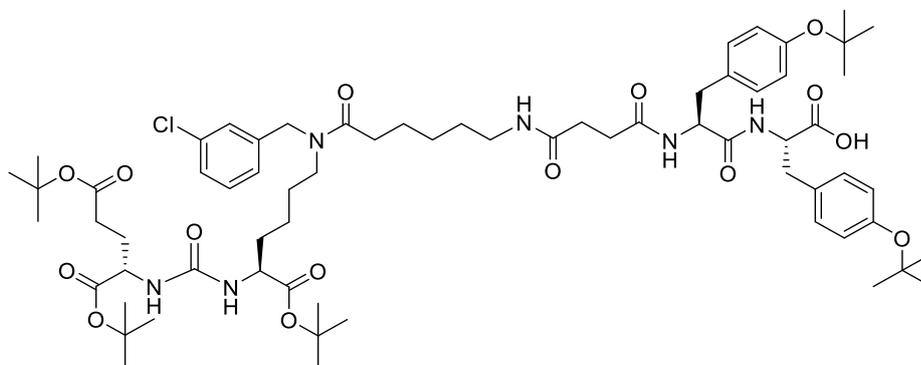
L-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), НВТУ (261 мг, 0,700 ммоль), НОВт (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), НВТУ (261 мг, 0,700 ммоль), НОВт (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16e** в виде желтоватого масла с выходом 91 % (380 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.43 (д, *J*=7.82 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.36 (д, *J*=7.27 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.20 - 7.25 (м, 3 H, Ar), 7.12 - 7.20 (м, 4 H, Ar), 7.07 - 7.12 (м, 1 H, Ar), 7.02 (д, *J*=8.38 Hz, 2 H, Ar), 6.85 (д, *J*=8.01 Hz, 2 H, Ar), 6.68 (т, *J*=8.07 Hz, 1 H, NHС(O)), 5.83 (д, *J*=8.01 Hz, 1 H, NHС(O)), 5.75 (д, *J*=7.95 Hz, 1 H, NHС(O)), 5.65 (дд, *J*=14.43, 8.19 Hz, 1 H, NHС(O)), 4.71 - 4.82 (м, 1 H, CH), 4.63 - 4.71 (м, 1 H, CH), 4.44 - 4.59 (м, 2 H, NCH₂Ar), 4.33 - 4.35 (м, 1 H, CH), 4.26 - 4.27 (м, 1 H, CH), 3.34 - 3.35 (м, 1 H, CH₂), 3.21 - 3.32 (м, 2 H, CH₂), 3.18 (т, *J*=7.61 Hz, 1 H, CH₂), 2.99 - 3.12 (м, 3 H, CH₂), 2.85 (д.т., *J*=14.53, 7.50 Hz, 1 H, CH₂), 2.49 - 2.61 (м, 1 H, CH₂), 2.25 - 2.44 (м, 6 H, CH₂), 2.00 - 2.11 (м, 1 H, CH₂), 1.82 - 1.87 (м, 1 H, CH₂), 1.73 - 1.76 (м, 1 H, CH₂), 1.48 - 1.66 (м, 5 H, CH₂), 1.39 - 1.48 (м, 30 H, CH₃ + CH₂), 1.33 - 1.38 (м, 2 H, CH₂), 1.31 (м, 11 H, CH₃ + CH₂).

ESI-HRMS для C₆₃H₉₁ClN₆O₁₄: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1191.6355, найдено:

1191.6369, *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1213.6174, найдено: 1213.6237.

Синтез (2S, 5S, 23S, 27S) -2,5-бис (4- (трет-бутокси) бензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32-диметил -4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овой кислоты (16f)

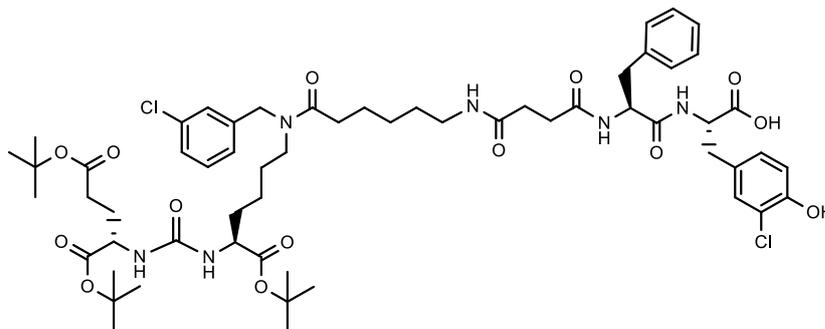


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 - 0,350 ммоль), Fmoc-O^tBu-D-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-L-тирозина (322 мг, 0,700 ммоль), НВТУ (261 мг, 0,700 ммоль), НОВт (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), НВТУ (261 мг, 0,700 ммоль), НОВт (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено 216 мг соединения **16f** в виде желтоватого масла с выходом 82 % (370 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.41 (д, $J=7.89$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.30 - 7.36 (м, 1 H, NHC(O)), 7.20 - 7.25 (м, 1 H, Ar), 7.18 (с, 1 H, Ar), 7.13 (с, 1 H, Ar), 7.06 - 7.11 (м, 2 H, Ar), 7.04 (д, $J=8.62$ Hz, 3 H, Ar), 6.87 (д.д., $J=8.38$, 1.71 Hz, 4 H, Ar), 6.64 - 6.71 (м, 1 H, NHC(O)), 6.54 - 6.60 (м, 1 H, NHC(O)), 5.73 (д.д., $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 5.62 (д.д., $J=13.24$, 8.04 Hz, 1 H, NHC(O)), 4.67 - 4.76 (м, 1 H, CH), 4.59 - 4.67 (м, 1 H, CH), 4.52 (д.д., $J=13.51$, 6.72 Hz, 2 H, NCH_2Ar), 4.29 - 4.38 (м, 2 H, CH), 3.32 - 3.41 (м, 1 H, CH_2), 3.14 - 3.32 (м, 3 H, CH_2), 2.97 - 3.13 (м, 3 H, CH_2), 2.79 - 2.88 (м, 1 H, CH_2), 2.50 - 2.63 (м, 1 H, CH_2), 2.25 - 2.44 (м, 6 H, CH_2), 2.02 - 2.11 (м, 1 H, CH_2), 1.79 - 1.92 (м, 1 H, CH_2), 1.69 - 1.78 (м, 1 H, CH_2), 1.49 - 1.69 (м, 6 H, CH_2), 1.40 - 1.49 (м, 29 H, CH_2), 1.34 - 1.40 (м, 2 H, CH_2), 1.31 (д, $J=1.34$ Hz, 20 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$).

ESI-HRMS для $\text{C}_{67}\text{H}_{99}\text{ClN}_6\text{O}_{15}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1263.6930, найдено: 1263.6944, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1285.6749, найдено: 1285.6767.

Синтез (2S, 5S, 23S, 27S) -5-бензил-2-(4- (трет-бутоксигруппа)3-хлорбензил) -23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) -18- (3-хлорбензил) -32,32-диметил -4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овой кислоты (16g)



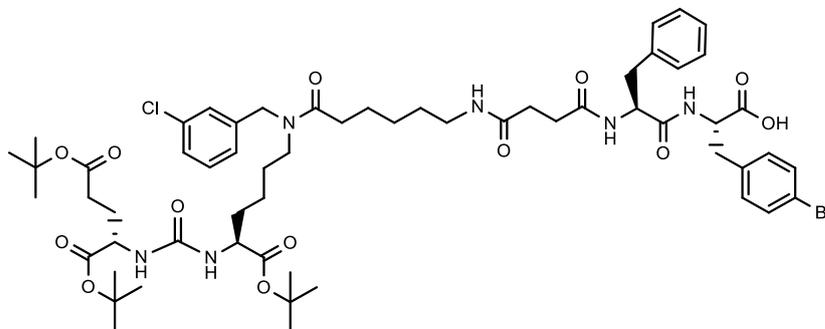
Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-O^tBu-L-3-хлор-тирозина (306 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16g** в виде желтоватого масла с выходом 54 % (145 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12.70 (уш. с., 1 H, COOH), 9.97 (с, 1H, OH), 8.22 (д, $J=7.40$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.05 (д, $J=8.31$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.70 - 7.77 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.24 (м, 8 H, Ar), 6.98 (д, $J=8.01$ Hz, 1 H, Ar), 6.84 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.20 - 6.33 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (м, 1 H, NCH_2Ar), 4.47 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.27 - 4.36 (м, 1 H, CH), 3.96 - 4.06 (м, 1 H, CH), 3.92 (м, 1 H, CH), 3.12 - 3.23 (м, 2 H, CH_2), 2.91 - 3.01 (м, 4 H, CH_2), 2.79 - 2.87 (м, 1 H, CH_2), 2.61 - 2.69 (м, 1 H, CH_2), 2.34 (м, 1 H, CH_2), 2.17 -

2.27 (м, 4 H, CH₂), 2.14 (м, 2 H, CH₂), 1.81 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.55 - 1.69 (м, 2 H, CH₂), 1.41 - 1.55 (м, 5 H, CH₂), 1.37 (с, 26 H, CH₃ + CH₂), 1.14 - 1.30 (м, 5 H, CH₂).

ESI-MS для C₅₉H₈₂Cl₂N₆O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1169.52, найдено: 1169.50.

Синтез (2S,5S,23S,27S)-5-бензил-2-(4-бромбензил)- 23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) - 18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота (16h)

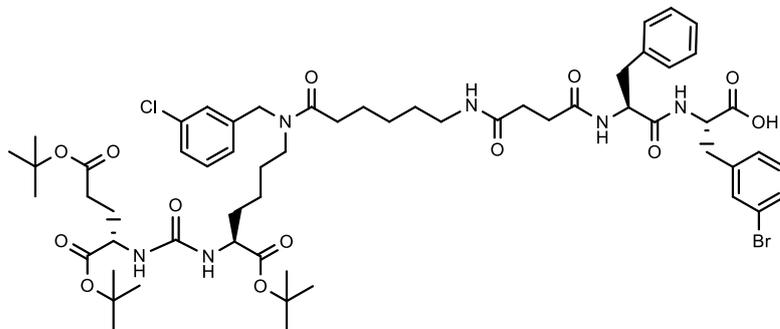


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-L-4-Br-фенилаланина (326 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16h** в виде желтоватого масла с выходом 86 % (310 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.60 (д, J=7.82 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.48 (д, J=6.60 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.31 - 7.37 (м, 2 H, Ar), 7.31 (д, 1 H, Ar), 7.28 - 7.30 (м, 1 H, Ar), 7.22 - 7.26 (м, 4 H, Ar), 7.12 - 7.19 (м, 3 H, Ar), 6.99 - 7.10 (м, 3 H, Ar), 4.76 (м, 1 H, CH), 4.70 (м, 1 H, CH), 4.40 - 4.57 (м, 2 H, NCH₂Ar), 4.32 (м, 1 H, CH), 3.34 (м, 1 H, CH₂), 3.16 - 3.26 (м, 3 H, CH₂), 3.00 - 3.12 (м, 4 H, CH₂), 2.69 (м, 1 H, CH₂), 2.49 - 2.58 (м, 1 H, CH₂), 2.37 - 2.47 (м, 2 H, CH₂), 2.23 - 2.37 (м, 3 H, CH₂), 1.84 - 1.74 (м, 1 H, CH₂), 1.59 (м, 4 H, CH₂), 1.40 - 1.47 (м, 31 H, CH₃ + CH₂), 1.27-1.24 (м, 8 H, CH₂), 1.17 - 1.25 (м, 2 H, CH₂).

ESI-MS для C₅₉H₈₂BrClN₆O₁₃: Br m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1199.48, найдено: 1199.45.

Синтез (2S,5S,23S,27S)-5-бензил-2-(3-бромбензил)- 23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) - 18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота (16i)

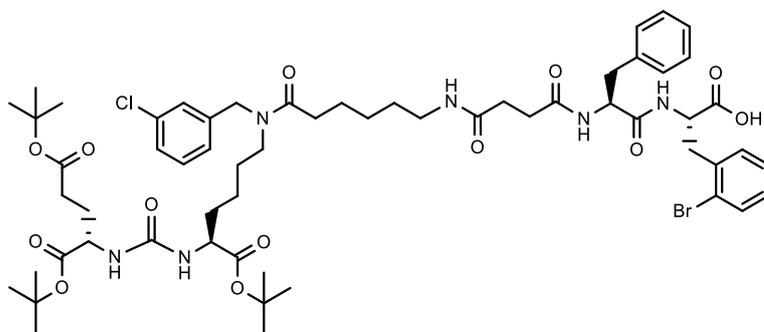


Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-L-3-Br-фенилаланина (287 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **5**, было получено соединение **16i** в виде желтоватого масла с выходом 97 % (417 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.72 (уш. с., 1 H, COOH), 8.40 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.02 (д, $J=8.62$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.73 - 7.81 (м, 1 H, Ar), 7.57 (д, $J=7.95$ Hz, 1 H, Ar), 7.38 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.35 (м, 4 H, Ar), 7.09 - 7.24 (м, 8 H, Ar), 6.20 - 6.34 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.39 - 4.57 (м, 4 H, NCH_2Ar), 4.03 (м, 1 H, CH), 3.94 (м, 1 H, CH), 3.25 (м, 1 H, CH_2), 3.13 - 3.22 (м, 2 H, CH_2), 2.91 - 3.05 (м, 4 H, CH_2), 2.58 - 2.67 (м, 1 H, CH_2), 2.33 (м, 1 H, CH_2), 2.10 - 2.25 (м, 6 H, CH_2), 1.80 - 1.90 (м, 1 H, CH_2), 1.66 - 1.57 (м, 1 H, CH_2), 1.52 (м, 2 H, CH_2), 1.45 (м, 3 H, CH_2), 1.37 (с, 27H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.28 (м, 2 H, CH_2), 1.21 (м, 2 H, CH_2), 1.15 (м, 1 H, CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{59}\text{H}_{82}\text{BrCl}_2\text{N}_6\text{O}_{14}$: Br m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1199.48, найдено: 1199.42.

Синтез (2S,5S,23S,27S)-5-бензил-2-(2-бромбензил)- 23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) - 18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота



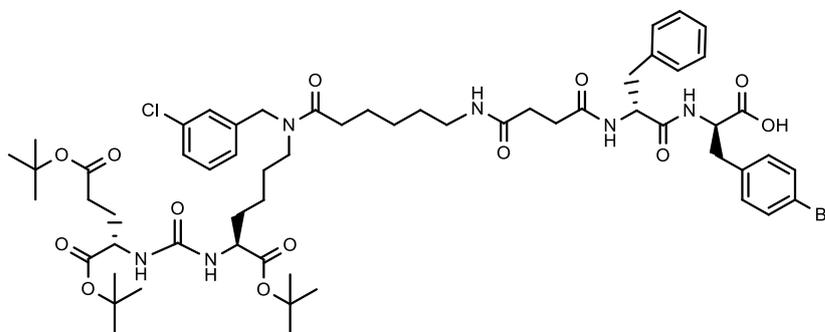
Из 2-СТС смолы (250 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-L-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-L-2-

Br-фенилаланина (287 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **5** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **6**, было получено соединение **13d** в виде желтоватого масла с выходом 86 % (382 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.77 (уш. с., 1 H, COOH), 8.29 (д, $J=7.89$ Hz, 1 H, NHС(O)), 8.05 (д, $J=8.68$ Hz, 1 H, NHС(O)), 7.72 - 7.79 (м, 1 H, Ar), 7.43 – 7.42 (м, 1 H, Ar), 7.35 - 7.41 (м, 1 H, Ar), 7.26 - 7.34 (м, 2 H, Ar), 7.21 (д, $J=7.15$ Hz, 7 H, Ar), 7.09 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 6.22 - 6.31 (м, 2 H, NHС(O)NH), 4.54 (м, 1 H, CH), 4.47 (м, 2 H, CH), 4.37 - 4.44 (м, 1 H, CH), 4.02 (д, $J=5.62$ Hz, 1 H, CH), 3.92 (м., 1 H, CH), 3.13 - 3.23 (м, 2 H, CH₂), 3.07 (м, $J=13.48$, 5.29 Hz, 1 H, CH₂), 2.90 - 3.01 (м, 4 H, CH₂), 2.61 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 2.34 (т, $J=7.24$ Hz, 1 H, CH₂), 2.12 - 2.28 (м, 7 H, CH₂), 2.06 (м, 1 H, CH₂), 1.79 - 1.91 (м, 1 H, CH₂), 1.57 - 1.71 (м, 1 H, CH₂), 1.47 (м, 5 H, CH₂), 1.37 (с, 29 H, CH₃ + CH₂), 1.27 (м, $J=7.58$ Hz, 2 H, CH₂), 1.21 - 1.15 (м, 1 H, CH₂).

ESI-MS для C₅₉H₈₂BrCl₂N₆O₁₄: Br m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1199.48, найдено: 1199.42.

Синтез (2R,5R,23S,27S)-5-бензил-2-(4-бромбензил)- 23,27-бис (трет-бутоксикарбонил) - 18- (3-хлорбензил) -32,32- диметил-4,7,10,17,25,30-гексаоксо-31-окса-3,6,11,18,24,26-гексаазатриаконтан-1-овая кислота



Из 2-СТС смолы (345 мг, 0,300 – 0, 350 ммоль), Fmoc-D-4-Br-фенилаланина (271 мг, 0,700 ммоль), DIPEA (600 мкл, 3,500 ммоль) для присоединения первой аминокислоты, Fmoc-D-фенилаланина (287 мг, 0,700 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения второй аминокислоты и соединения **6** (375 г, 0,455 ммоль), HBTU (261 мг, 0,700 ммоль), HOBT (24 мг, 0,175 ммоль) и DIPEA (180 мкл, 1,050 ммоль) для присоединения соединения **6**, было получено соединение **13d** в виде желтоватого масла с выходом 97% (350 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.29 (д, $J=7.21$ Hz, 1 H, NHС(O)), 8.18 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHС(O)), 7.90 - 7.98 (м, 1 H, NHС(O)), 7.55 - 7.66 (м, 1 H, Ar), 7.45 (д, $J=8.01$

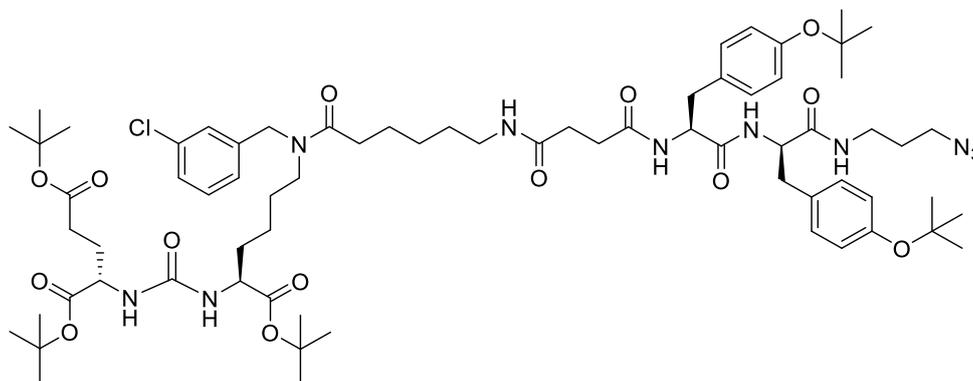
Hz, 2 H, Ar), 7.35 - 7.40 (м, 1 H, Ar), 7.27 - 7.34 (м, 2 H, Ar), 7.18 - 7.25 (м, 4 H, Ar), 7.05 - 7.18 (м, 6 H, Ar), 6.21 - 6.33 (м, 2 H, NHC(O)), 4.54 (с, 1 H, CH), 4.46 (с, 1 H, CH), 4.33 - 4.40 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.28 (д, $J=4.40$ Hz, 1 H, NCH₂Ar), 3.82 - 4.05 (м, 2 H, CH₂), 3.11 - 3.27 (м, 4 H, CH₂), 2.81 - 3.11 (м, 8 H, CH₂), 2.61 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 2.09 - 2.38 (м, 9 H, CH₂), 1.80 - 1.89 (м, 1 H, CH₂), 1.67 - 1.64 (м, 1 H, CH₂), 1.58 (д, $J=6.97$ Hz, 3 H, CH₂), 1.50 (д, $J=15.34$ Hz, 4 H, CH₂), 1.41 (д, $J=7.15$ Hz, 2 H, CH₂), 1.36 (д, $J=2.45$ Hz, 28 H CH₂ + CH₂), 1.30 - 1.27 (м, 1 H, CH₂), 1.20 - 1.24 (м, 3 H, CH₂), 1.16 - 1.12 (м, 1 H, CH₂).

ESI-MS для C₅₉H₈₂BrCl₂N₆O₁₄: Br m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1199.48, найдено: 1199.40.

4.2.8. Модификация лигандов аминопропилазидом

К раствору фрагмента лиганда (1 экв.), снятого со смолы, растворенного в ДМФА, охлажденного до 0°C, был добавлен 3-азидопропиламин (1.5 экв.), НОВт (1.2 экв.), НВТУ (1.2 экв.) и DIPEA (1.5 экв.). Полученную смесь выдерживали сутки. По окончании реакции растворитель удаляли при пониженном давлении, а остаток растворяли в хлористом метиле и трижды промывали водой. Далее органическую фракцию упаривали, а продукт выделяли с помощью обращеннофазовой колоночной хроматографии, элюент вода : ацетонитрил (Puriflash C18-HP, 15μ, 20g, элюент: система ацетонитрил-вода: от 10% ацетонитрила до 100% за 20 минут).

Синтез (3S, 7S, 25S, 28R) -три-трет-бутил 33-азидо-25,28-бис (4- (трет-бутокси) бензил) -12- (3-хлорбензил) -5,13,20,23, 26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилат (17a)



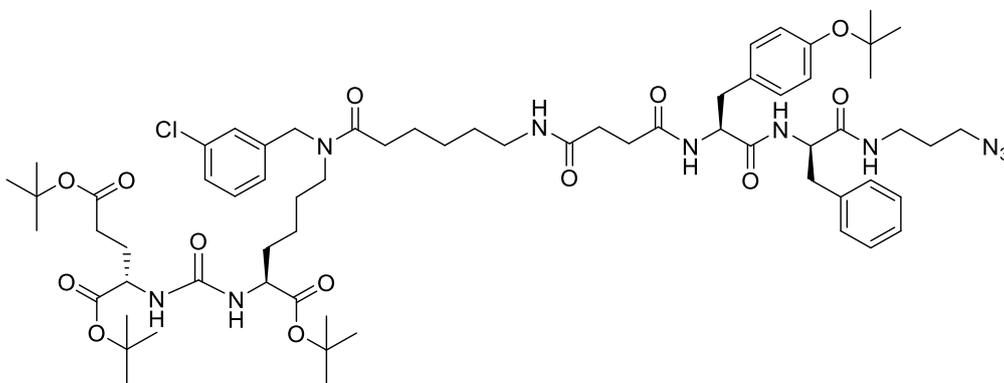
Из соединения **16a** (183 мг, 0,145 ммоль), 3-азидопропиламина (21 мг, 0,217 ммоль), НОВт (23 мг, 0,174 ммоль), НВТУ (66 мг, 0,174 ммоль) и DIPEA (37 мкл, 0,217 ммоль) было получено соединение **17a** в виде желтоватого масла с выходом 95% (186 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.36 (д, $J=8.38$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.05 (д, $J=7.76$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.96 (т, $J=5.59$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.72 - 7.80 (м, 1 H, NHC(O)), 7.26 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.23 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.15 (м, 3 H, Ar), 6.98 (д, $J=8.01$ Hz, 2 H, Ar),

6.78 (д, $J=8.19$ Hz, 2 H, Ar), 6.82 (д, $J=8.31$ Hz, 2 H, Ar), 6.78 (д, $J=8.2$ Hz, 2 H, Ar), 6.21 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.31 - 4.43 (м, 2 H, CH), 3.89 - 4.07 (м, 2 H, CH), 3.27 (т, $J=6.79$ Hz, 2 H, CH₂), 3.14 - 3.19 (м, 2 H, CH₂), 3.02 - 3.09 (м, 1 H, CH₂), 2.96 - 2.98 (м, 1 H, CH₂), 2.91 - 2.93 (м, 2 H, CH₂), 2.65 - 2.73 (м, 1 H, CH₂), 2.58 - 2.65 (м, 1 H, CH₂), 2.30 - 2.36 (м, 1 H, CH₂), 2.20 - 2.24 (м, 3 H, CH₂), 2.12 - 2.20 (м, 4 H, CH₂), 1.79 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.56 - 1.69 (м, 4 H, CH₂), 1.44 - 1.52 (м, 4 H, CH₂), 1.40 - 1.45 (м, 2 H, CH₂), 1.33 - 1.39 (м, 28 H, CH₃ + CH₂), 1.13 - 1.30 (м, 23 H, CH₃ + CH₂).

ESI-HRMS для C₇₀H₁₀₅ClN₁₀O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1345.7573, найдено: 1345.7594, m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1367.7392, найдено: 1367.7422.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28R) -три-трет-бутил 33-азидо-28-бензил-25- (4- (трет-бутокси) бензил) -12- (3-хлорбензил) -5,13,20, 23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17b)

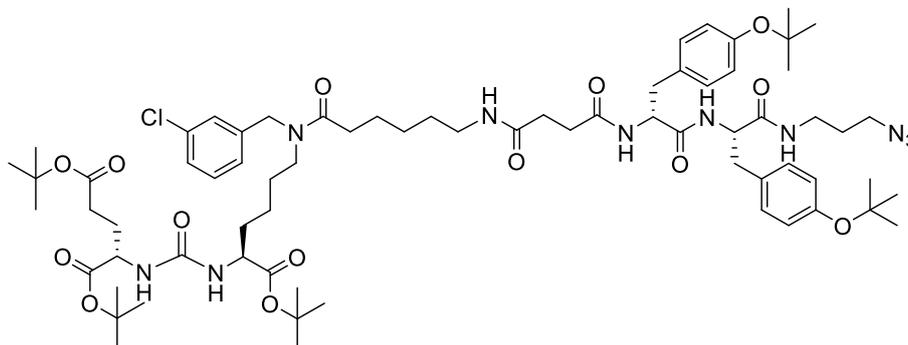


Из соединения **16b** (120 мг, 0,099 ммоль), 3-азидопропиламина (15 мг, 0,149 ммоль), НОВt (16 мг, 0,119 ммоль), НВТУ (45 мг, 0,119 ммоль) и DIPEA (26 мкл, 0,149 ммоль) было получено соединение **17b** в виде желтоватого масла с выходом 95% (121 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 7.18 - 7.26 (м, 4 H, Ar), 7.15 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 7.03 - 7.12 (м, 4 H, Ar), 6.97 - 7.03 (м, 2 H, Ar), 6.86 - 6.90 (м, 1 H, Ar), 6.73 (м, 1 H, NHC(O)), 6.57 (м, 1 H, NHC(O)), 5.98 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 5.74 - 5.88 (м, 1 H, NHC(O)), 4.62 - 4.70 (м, 1 H, CH), 4.44 - 4.55 (м, 2 H, NCH₂Ar), 4.35 - 4.44 (м, 1 H, CH), 4.28 - 4.35 (с, 1 H, CH), 4.25 - 4.29 (м, 1 H, CH), 3.69 - 3.76 (м, 1 H, CH₂), 3.51 - 3.57 (м, 1 H, CH₂), 3.29 - 3.40 (м, 2 H, CH₂), 3.20 - 3.29 (м, 1 H, CH₂), 3.10 - 3.20 (м, 4 H, CH₂), 2.97 - 3.10 (м, 2 H, CH₂), 2.93 - 2.97 (м, 1 H, CH₂), 2.84 - 2.93 (м, 1 H, CH₂), 2.41 - 2.54 (м, 3 H, CH₂), 2.32 - 2.41 (м, 2 H, CH₂), 2.21 - 2.32 (м, 2 H, CH₂), 1.97 - 2.12 (м, 2 H, CH₂), 1.78 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.69 - 1.78 (м, 1 H), 1.63 - 1.69 (м, 3 H), 1.55 - 1.63 (м, 2 H), 1.47 - 1.55 (м, 3 H), 1.39 - 1.47 (м, 27 H, CH₂), 1.33 - 1.39 (м, 1 H, CH₂), 1.28 - 1.33 (м, 12 H, CH₂).

ESI-HRMS для C₆₆H₉₇ClN₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1273.6998, найдено: 1273.7041, m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1295.6817, найдено: 1295.6870.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -три-*трет*-бутил 33-азидо-25,28-бис (4- (*трет*-бутокси) бензил) -12- (3-хлорбензил) -5,13,20,23, 26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17с)



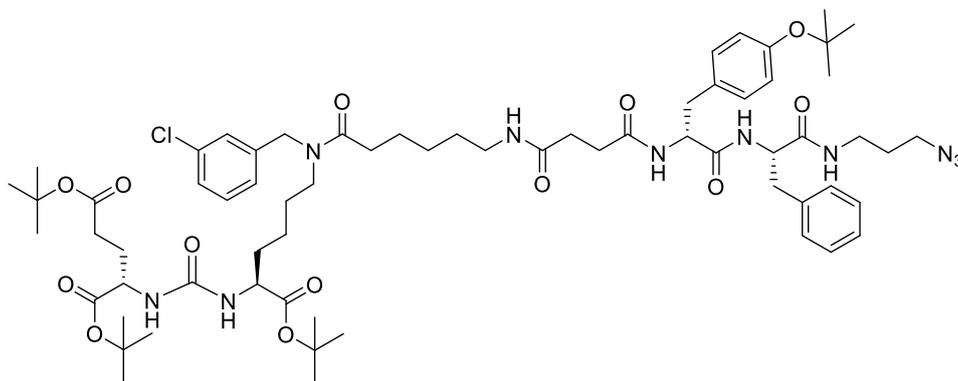
Из соединения **16с** (200 мг, 0,162 ммоль), 3-азидопропиламина (24 мг, 0,243 ммоль), НОВt (26 мг, 0,195 ммоль), НВТУ (74 мг, 0,195 ммоль) и DIPEA (42 мкл, 0,243 ммоль) было получено соединение **17с** в виде желтоватого масла с выходом 83% (181 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.27 (д, $J=6.65$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.00 (д, $J=8.22$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.88 (м., 1 H, NHC(O)), 7.70 (д, $J=14.48$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.22 - 7.38 (м, 2 H, Ar), 7.18 - 7.20 (м, 1 H, Ar), 7.04 - 7.14 (м, 3 H, Ar), 6.97 (д, $J=8.22$ Hz, 2 H, Ar), 6.79 (д, $J=8.61$ Hz, 2 H, Ar), 6.76 (д, $J=8.22$ Hz, 2 H, Ar), 6.17 - 6.28 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.52 (с, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ar}$), 4.45 (с, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ar}$), 4.28 - 4.41 (м, 2 H, CH), 3.88 - 4.05 (м, 2 H, CH), 3.08 - 3.19 (м, 4 H, CH_2), 3.01 - 3.07 (м, 2 H, CH_2), 2.86 - 3.01 (м, 4 H, CH_2), 2.57 - 2.72 (м, 3 H, CH_2), 2.31 (т, $J=7.24$ Hz, 2 H, CH_2), 2.08 - 2.25 (м, 8 H, CH_2), 1.77 - 1.89 (м, 2 H, CH_2), 1.53 - 1.69 (м, 5 H, CH_2), 1.40 - 1.53 (м, 6 H, CH_2), 1.35 (с, 27 H, CH_3), 1.21 (с, 9 H, CH_3), 1.17 (с, 9 H, CH_3).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172.26 (C(O)), 172.12 (C(O)), 171.49 (C(O)), 153.76 (NHC(O)NH), 132.98 (Ar), 132.47 (Ar), 130.60 (Ar), 130.06 (Ar), 130.01 (Ar), 127.60 (Ar), 125.37 (Ar), 123.78 (Ar), 123.59 (Ar), 54.74 (CH), 54.61 (CH), 48.71 (CH_2), 39.59 (CH_2), 39.38 (CH_2), 28.99 (CH_2), 28.65 (CH_2), 28.17 (CH_2), 28.07 (CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{70}\text{H}_{105}\text{ClN}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1345.76, найдено: 1345.75.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -три-*трет*-бутил 33-азидо-28-бензил-25- (4- (*трет*-бутокси) бензил) -12- (3-хлорбензил) -5,13,20, 23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазаттриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17d)



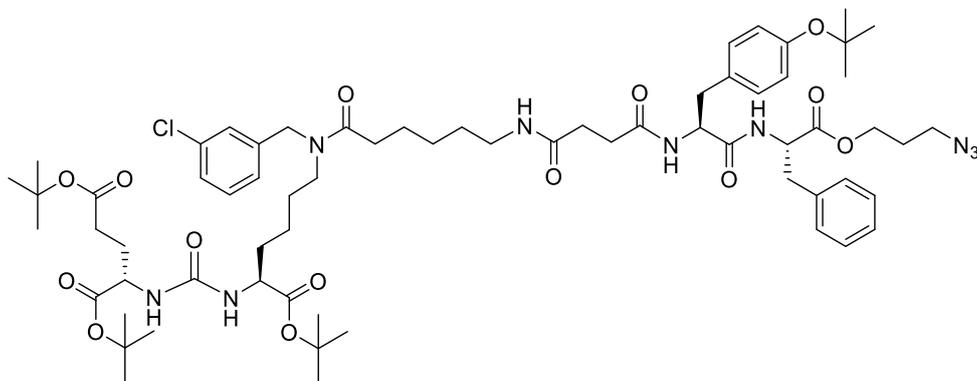
Из соединения **16d** (128 мг, 0,107 ммоль), 3-азидопропиламина (16 мг, 0,161 ммоль), НОВt (19 мг, 0,128 ммоль), НВТУ (48 мг, 0,128 ммоль) и DIPEA (27 мкл, 0,161 ммоль) было получено соединение **17d** в виде желтоватого масла с выходом 64% (87 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.35 (д, *J*=8.50 Hz, 1 H, NHC(O)), 8.09 (д, *J*=7.70 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.94 (т, *J*=5.23 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.74 - 7.82 (м, 1 H, NHC(O)), 7.33 - 7.40 (м, 1 H, Ar), 7.28 - 7.34 (м, 1 H, Ar), 7.17 - 7.28 (м, 5 H, Ar), 7.09 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 6.99 (д, *J*=8.44 Hz, 2 H, Ar), 6.78 (д, *J*=8.31 Hz, 2 H, Ar), 6.22 - 6.33 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.28 - 4.44 (м, 2 H, CH), 4.01 - 4.04 (м, 1 H, CH), 3.89 - 3.98 (м, 1 H, CH), 3.23 (т, *J*=6.82 Hz, 2 H, CH₂), 3.16 (т, *J*=7.46 Hz, 2 H, CH₂), 3.10 - 3.13 (м, 1 H, CH₂), 3.02 - 3.08 (м, 1 H, CH₂), 2.97 - 2.98 (м, 1 H, CH₂), 2.90 - 2.96 (м, 1 H, CH₂), 2.72 - 2.78 (м, 1 H, CH₂), 2.66 - 2.70 (м, 1 H, CH₂), 2.33 (т, *J*=7.34 Hz, 1 H, CH₂), 2.14 - 2.27 (м, 6 H, CH₂), 1.79 - 1.88 (м, 1 H, CH₂), 1.63 - 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.55 - 1.62 (м, 3 H, CH₂), 1.46 - 1.52 (м, 3 H, CH₂), 1.40 - 1.45 (м, 1 H, CH₂), 1.30 - 1.40 (м, 29 H, CH₃), 1.23 (с, 9 H, CH₃), 1.14 - 1.18 (м, 2 H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 172.29 (C(O)), 172.20 (C(O)), 171.21 (C(O)), 153.72 (NHC(O)NH), 138.35 (Ar), 130.02 (Ar), 129.58 (Ar), 128.45 (Ar), 123.64 (Ar), 80.17 (C(CH₃)), 48.62 (CH₂), 28.96 (CH₂), 28.59 (CH₂), 28.14 (CH₂), 28.05 (CH₂), 28.03 (CH₂).

ESI-HRMS для C₆₆H₉₇ClN₁₀O₁₃: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1273.6998, найдено: 1273.7029, *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1295.6817, найдено: 1295.6872.

Синтез (2S, 5S, 23S, 27S) -2- (3-азидопропил) 23,27,29-три-*трет*-бутил 5- (4- (*трет*-бутокси) бензил) -18- (3-хлорбензил) -4, 7,10,17,25-пентаоксо-1-фенил-3,6,11,18,24,26-гексаазанонакозан-2,23,27,29-тетракарбоксилата (17e)

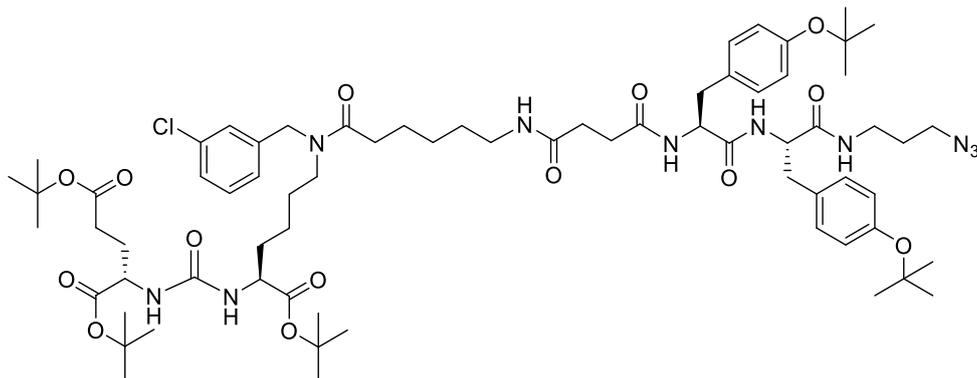


Из соединения **16e** (178 мг, 0,149 ммоль), 3-азидопропиламина (22 мг, 0,224 ммоль), НОВt (23 мг, 0,179 ммоль), НВТУ (68 мг, 0,179 ммоль) и DIPEA (38 мкл, 0,224 ммоль) было получено соединение **17e** в виде желтоватого масла с выходом 78% (144 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.83 (д, $J=6.05$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.18 - 7.26 (м, 3 H, Ar), 7.11 - 7.16 (м, 1 H, Ar), 7.04 - 7.10 (м, 1 H, Ar), 7.01 - 7.03 (м, 1 H, Ar), 6.91 - 6.99 (м, 3 H, Ar), 6.83 (д, $J=8.31$ Hz, 2 H, Ar), 4.66 - 4.75 (м, 1 H, CH), 4.43 - 4.56 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.31 - 4.39 (м, 2 H, CH), 4.25 - 4.31 (м, 1 H, CH), 3.27 - 3.41 (м, 4 H, CH_2), 3.10 - 3.27 (м, 5 H, CH_2), 2.95 - 3.07 (м, 2 H, CH_2), 2.66 - 2.84 (м, 2 H, CH_2), 2.48 - 2.56 (м, 1 H, CH_2), 2.23 - 2.45 (м, 5 H, CH_2), 2.02 - 2.13 (м, 1 H, CH_2), 1.80 - 1.91 (м, 1 H, CH_2), 1.66 - 1.80 (м, 4 H, CH_2), 1.47 - 1.66 (м, 4 H, CH_2), 1.33 - 1.47 (м, 31 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.22 - 1.33 (м, 11 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$).

ESI-HRMS для $\text{C}_{66}\text{H}_{97}\text{ClN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1273.6998, найдено: 1273.7039, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1295.6817, найдено: 1295.6874.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -три-трет-бутил 33-азидо-25,28-бис (4- (трет-бутокси) бензил) - 12- (3-хлорбензил) -5,13,20,23 , 26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17f)



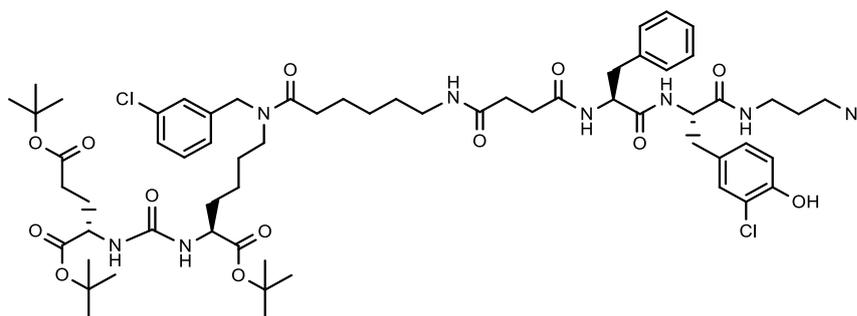
Из соединения **16f** (160 мг, 0,126 ммоль), 3-азидопропиламина (19 мг, 0,190 ммоль), НОВt (21 мг, 0,152 ммоль), НВТУ (58 мг, 0,152 ммоль) и DIPEA (32 мкл, 0,189 ммоль) было получено соединение **17f** в виде желтоватого масла с выходом 77% (130 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 7.80 (т, $J=9.41$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.20 - 7.25 (м, 1 H, Ar), 7.18 (д, $J=8.50$ Hz, 2 H, Ar), 7.05 - 7.15 (м, 2 H, Ar), 7.03 (д, $J=6.72$ Hz, 1 H, Ar), 6.98

(д, $J=8.13$ Hz, 2 H, Ar), 6.91 (д.д., $J=8.34, 1.25$ Hz, 2 H, Ar), 6.84 - 6.89 (м, 2 H, Ar), 4.61 - 4.70 (м, 1 H, CH), 4.47 - 4.57 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.43 - 4.47 (м, 1 H, CH), 4.30 - 4.39 (м, 2 H, CH), 3.25 - 3.40 (м, 6 H, CH_2), 3.14 - 3.25 (м, 4 H, CH_2), 2.92 - 3.10 (м, 2 H, CH_2), 2.64 - 2.73 (м, 2 H, CH_2), 2.43 - 2.60 (м, 2 H, CH_2), 2.28 - 2.43 (м, 5 H, CH_2), 2.01 - 2.12 (м, 1 H, CH_2), 1.82 - 1.92 (м, 1 H, CH_2), 1.66 - 1.80 (м, 4 H, CH_2), 1.48 - 1.66 (м, 4 H, CH_2), 1.40 - 1.48 (м, 28 H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 1.34 - 1.40 (м, 2 H, CH_2), 1.24 - 1.34 (м, 20 H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$).

ESI-HRMS для $\text{C}_{70}\text{H}_{105}\text{ClN}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1345.7573, найдено: 1345.7580, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1367.7392, найдено: 1367.7420.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-три-трет-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(4-гидрокси-3-хлорбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7- трикарбоксилата (17g)



Из соединения **16f** (76 мг, 0,064 ммоль), 3-азидопропиламина (10 мг, 0,097 ммоль), НОВт (10 мг, 0,077 ммоль), НВТУ (30 мг, 0,077 ммоль) и DIPEA (17 мкл, 0,097 ммоль) было получено соединение **17f** в виде желтоватого масла с выходом 94% (80 мг).

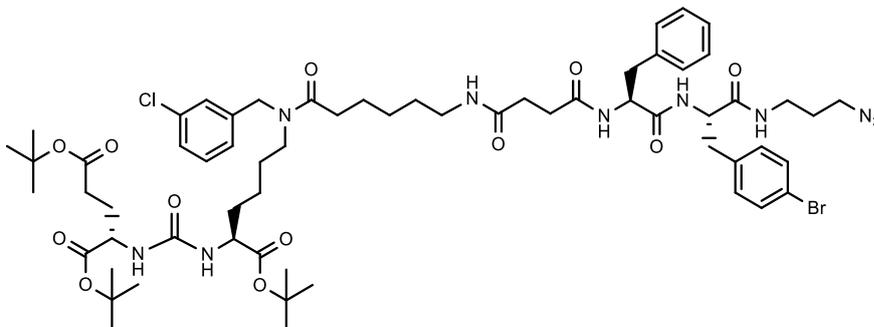
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.94 (с, 1 H, OH), 8.29 (д, $J=7.40$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.13 (д, $J=8.44$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.91 (м, 1 H, NHC(O)), 7.59 - 7.64 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.35 (м, 2 H, Ar), 7.22 (д, $J=4.59$ Hz, 3 H, Ar), 7.10 - 7.18 (м, 5 H, Ar), 6.94 - 7.00 (м, 1 H, Ar), 6.85 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, NHC(O)), 6.22 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.47 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.25 - 4.34 (м, 2 H, CH), 3.88 - 4.06 (м, 2 H, CH), 3.22 - 3.28 (м, 2 H, CH_2), 3.13 - 3.22 (м, 2 H, CH_2), 2.87 - 3.12 (м, 6 H, CH_2), 2.71 - 2.81 (м, 1 H, CH_2), 2.67 (м, 1 H, CH_2), 2.26 - 2.38 (м, 4 H, CH_2), 2.12 - 2.25 (м, 4 H, CH_2), 1.80 - 1.92 (м, 1 H, CH_2), 1.54 - 1.70 (м, 4 H, CH_2), 1.41 - 1.54 (м, 5 H, CH_2), 1.34 - 1.40 (м, 29 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.13 - 1.33 (м, 5 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 172.71 (C(O)), 172.24 (C(O)), 172.20 (C(O)), 172.11 (C(O)), 171.92 (C(O)), 171.53 (C(O)), 171.45 (OC(O)), 171.11 (OC(O)), 157.13 (NHC(O)NH), 151.54 (C(OtBu)), 133.06 (Ar), 130.25 (Ar), 130.19 (Ar), 129.72 (Ar), 129.04 (Ar), 128.62 (Ar), 128.07 (Ar), 127.19 (Ar), 126.86 (Ar), 126.31 (Ar), 126.26 (Ar), 126.05 (Ar), 119.20 (Ar), 116.37 (Ar), 54.96 (CH), 54.47 (CH), 52.86 (CH), 52.19 (CH), 49.60 (CH_2), 48.17 (CH_2), 47.10 (CH_2), 46.79 (CH_2), 36.94 (CH_2), 35.97 (CH_2), 35.86 (CH_2), 31.93 (CH_2), 31.80 (CH_2), 30.91 (CH_2).

30.69 (CH₂), 30.58 (CH₂), 29.05 (CH₂), 28.95 (CH₂), 28.21 (CH₂), 27.75 (CH₂), 27.66 (s, 1 C), 27.64 (CH₃), 26.30 (CH₃), 24.73 (CH₃), 24.60 (CH₃), 22.26 (CH₃), 1.20 (CH₃).

ESI-MS для C₅₉H₈₂Cl₂N₆O₁₄: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1252.3273, найдено: 1252.6042.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-три-*трет*-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(4-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30- гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17h)

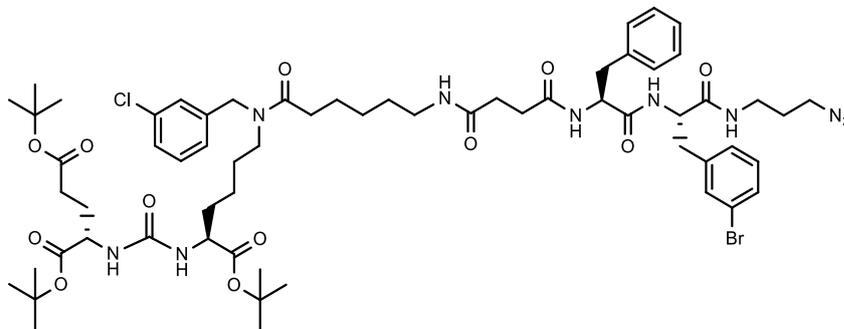


Из соединения **16h** (306 мг, 0,255 ммоль), 3-азидопропиламина (38 мг, 0,383 ммоль), НОВt (42 мг, 0,306 ммоль), НВТУ (116 мг, 0,152 ммоль) и DIPEA (66 мкл, 0,383 ммоль) было получено соединение **17h** в виде желтоватого масла с выходом 72% (235 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 8.29 (д, J=7.34 Hz, 1 H), 8.18 (д, J=8.50 Hz, 1 H), 7.89 - 7.96 (м, 1 H, Ar), 7.57 - 7.64 (м, 1 H, Ar), 7.45 (д, J=8.19 Hz, 2 H, Ar), 7.26 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.25 (м, 9 H, Ar), 6.20 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.47 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.36 - 4.33 (м, 1 H, CH), 4.29 - 4.27 (м, 1 H, CH), 4.03 (м, 1 H, CH), 3.93 (д, J=5.62 Hz, 1 H, CH), 3.11 - 3.28 (м, 4 H, CH₂), 3.01 (м, 5 H, CH₂), 2.90 (м, 2 H, CH₂), 2.58 - 2.70 (м, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.42 (м, 3 H, CH₂), 2.16 - 2.28 (м, 4 H, CH₂), 1.80 - 1.90 (м, 1 H, CH₂), 1.67 (м, 1 H, CH₂), 1.58 - 1.59 (м, J=3.91 Hz, 4 H, CH₂), 1.44 (м, 4 H, CH₂), 1.32 - 1.41 (м, 28 H, CH₃ + CH₂), 1.19 - 1.28 (м, 3 H, CH₂), 1.12 - 1.19 (м, 1 H, CH₂).

ESI-MS для C₅₉H₈₂BrClN₆O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1281.55, найдено: 1281.50.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-три-*трет*-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(3-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30- гептаазатритриаконтан-1,3,7- трикарбоксилата (17i)

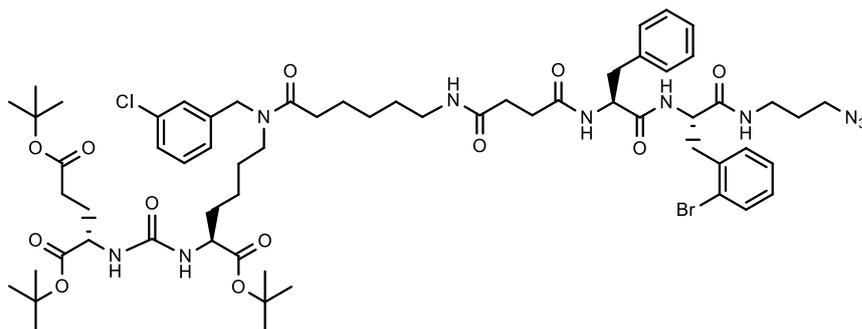


Из соединения **16i** (400 мг, 0,350 ммоль), 3-азидопропиламина (53 мг, 0,525 ммоль), НОВt (57 мг, 0,420 ммоль), НВТУ (159 мг, 0,420 ммоль) и DIPEA (90 мкл, 0,383 ммоль) было получено соединение **17i** в виде желтоватого масла с выходом 98% (417 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.41 (д, $J=6.54$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.30 (д, $J=8.19$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.97 - 8.07 (м, 1 H, Ar), 7.58 (д, $J=8.01$ Hz, 1 H, Ar), 7.34 - 7.46 (м, 1 H, Ar), 7.26 - 7.34 (м, 4 H, Ar), 7.22 - 7.20 (м, 3 H, Ar), 7.09 - 7.19 (м, 5 H, Ar), 6.20 - 6.33 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.48 - 4.58 (м, 2 H, NCH_2Ar), 4.46 (м, 1 H, NCH_2Ar), 4.18 - 4.27 (м, 1 H, CH), 3.96 - 4.05 (м, 1 H, CH), 3.95 - 3.92 (м, 1 H, CH), 3.21 - 3.30 (м, 2 H, CH), 3.12 - 3.21 (м, 2 H, CH_2), 3.08 - 3.06 (м, 3 H, CH_2), 2.95 - 3.04 (м, 2 H, CH_2), 2.93 - 2.88 (м, 1 H, CH_2), 2.63 (т, $J=12.20$ Hz, 1 H, CH_2), 2.25 - 2.43 (м, 4 H, CH_2), 2.11 - 2.25 (м, 4 H, CH_2), 1.80 - 1.90 (м, 1 H, CH_2), 1.67 (м, 1 H, CH_2), 1.54 - 1.64 (м, 3 H, CH_2), 1.41 - 1.54 (м, 5 H, CH_2), 1.36 (с, 29 H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2$), 1.14 - 1.31 (м, 5 H, CH_2).

ESI-MS для $\text{C}_{62}\text{H}_{88}\text{ClBrN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1281.55, найдено: 1281.50.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-три-трет-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(2-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата (17j)



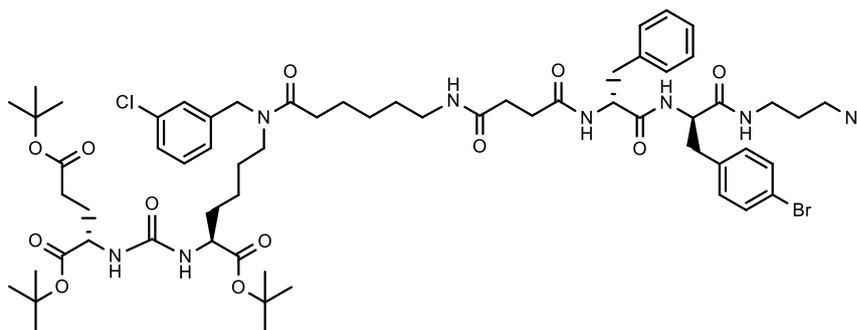
Из соединения **16j** (367 мг, 0,320 ммоль), 3-азидопропиламина (48 мг, 0,480 ммоль), НОВt (52 мг, 0,385 ммоль), НВТУ (146 мг, 0,385 ммоль) и DIPEA (83 мкл, 0,480 ммоль) было получено соединение **17j** в виде желтоватого масла с выходом 91% (373 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.30 (д, $J=3.73$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.21 (д, $J=7.52$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.89 - 7.98 (м, 1 H, Ar), 7.61 - 7.68 (м, 1 H, Ar), 7.40 (д, $J=10.82$ Hz, 2 H, Ar), 7.30 (д, $J=17.06$ Hz, 2 H, Ar), 7.22 (м, 5 H, Ar), 7.15 (м, 4 H, Ar), 6.30 - 6.23 (м, 2 H,

NHC(O)NH), 4.55 – 4.53 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.48 – 4.46 (м, 1 H, NCH₂Ar), 4.34 - 4.42 (м, 1 H, CH), 4.30 - 4.28 (м, 1 H, CH), 4.01 - 3.93 (м, 1 H, CH), 3.24 – 3.23 (м, 3 H, CH₂), 3.17 – 3.15 (м, 2 H, CH₂), 3.08 – 2.98 (м, 5 H, CH₂), 2.91 – 2.88 (м, 2 H, CH₂), 2.66 (т, $J=11.92$ Hz, 1 H, CH₂), 2.32 (м, 4 H, CH₂), 2.21 (м, 5 H, CH₂), 1.79 - 1.91 (м, 1 H, CH₂), 1.64 (м, 1 H, CH₂), 1.58 (м, 3 H, CH₂), 1.52 (м, 2 H, CH₂), 1.46 (м, 3 H, CH₂), 1.36 (с, 29 H, CH₃ + CH₂), 1.28 (м, 2 H, CH₂), 1.11 - 1.24 (м, 3 H, CH₂).

ESI-MS для C₆₂H₈₈ClBrN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1280.77, найдено: 1280.55.

Синтез (3S,7S,25R,28R)-три-трет-бутил-33-азидо-25-бензил-28-(4-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоксилата



Из соединения **13f** (320 мг, 0,288 ммоль), 3-азидопропиламина (43 мг, 0,432 ммоль), НОВt (47 мг, 0,347 ммоль), НВТУ (131 мг, 0,347 ммоль) и DIPEA (74 мкл, 0,432 ммоль) было получено соединение **14f** в виде желтоватого масла с выходом 43% (157 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.29 (д, $J=7.21$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.18 (д, $J=8.07$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.90 - 7.98 (м, 1 H, Ar), 7.55 - 7.66 (м, 1 H, Ar), 7.45 (д, $J=8.01$ Hz, 2 H, Ar), 7.35 - 7.40 (м, 1 H, Ar), 7.27 - 7.34 (м, 2 H, Ar), 7.18 - 7.25 (м, 4 H, Ar), 7.05 - 7.18 (м, 6 H, Ar), 6.21 - 6.33 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.33 - 4.40 (м, 1 H, CH), 4.28 – 4.26 (м, 1 H, CH), 3.82 - 4.05 (м, 2 H, CH), 3.11 - 3.27 (м, 4 H, CH₂), 2.81 - 3.11 (м, 8 H, CH₂), 2.61 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 2.09 - 2.38 (м, 9 H, CH₂), 1.80 - 1.89 (м, 1 H, CH₂), 1.67 (м, 1 H, CH₂), 1.59 – 1.56 (д, $J=6.97$ Hz, 3 H, CH₂), 1.50 - 1.41 (м, 2 H, CH₂), 1.36 (с, 28 H, CH₃ + CH₂), 1.30 (м, 1 H, CH₂), 1.22 (м, 3 H, CH₂), 1.16 (м, 1 H, CH₂).

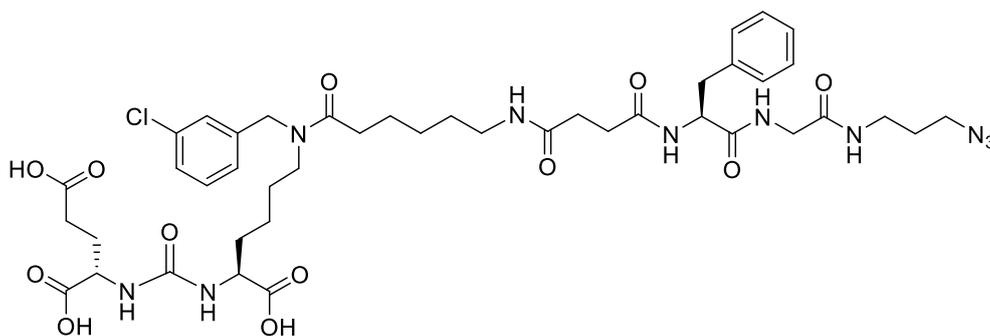
ESI-HRMS для C₆₂H₈₈ClBrN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1279.5527, найдено: 1279.5544.

4.2.9. Получение лигандов, аффинных к ПСМА

В раствор трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) растворили tBu-лиганд **11a-11i**, **14a-14f** (1 экв.) и перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Растворитель удалили при пониженном давлении. Полученное вещество переупарили 3 раза из ДХМ. К полученному маслянистому осадку добавили

диэтиловый эфир, в результате чего выделился белый аморфный продукт. Диэтиловый эфир декантировали, процедуру повторили еще 2 раза. Далее продукт очищали с помощью метода обращеннофазовой колоночной хроматографии, в качестве элюента использовались 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде : ацетонитрил (Puriflash C18-HP, 15μ, 20g, элюент: система ацетонитрил-0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде: от 10% ацетонитрила до 100% за 20 минут).

Синтез (3S,7S,25S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11a)



Из соединения **10a** (200 мг, 0,180 ммоль) и 10 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11a** в виде белого порошка с выходом 66% (111 мг).

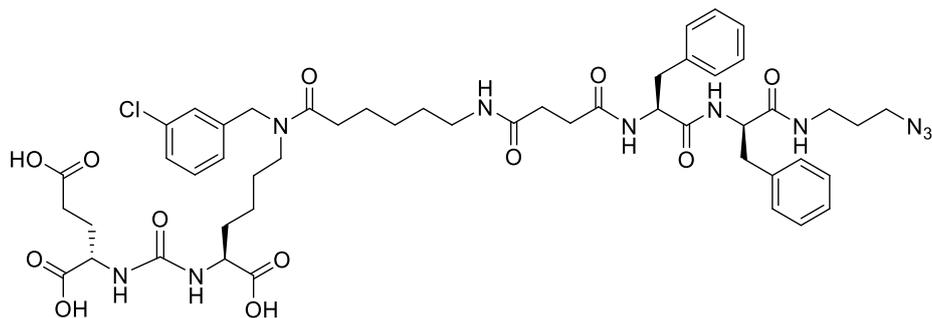
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.29 - 8.32 (м, 2 H, NHC(O)), 7.80 - 7.83 (м, 1 H, NHC(O)), 7.59 - 7.61 (м, 1 H, NHC(O)), 7.27 - 7.36 (м, 2 H, Ar), 7.20 - 7.27 (м, 5 H, Ar), 7.10 - 7.20 (м, 2 H, Ar), 6.30 (дд, *J*=15.65, 8.07 Hz, 2 H, NHC(O)NH), 4.55 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.34 (м, 1 H, CH), 3.99 - 4.12 (м, 2 H, CH), 3.59 - 3.65 (м, 2 H, CH₂), 3.28 - 3.37 (м, 2 H, CH₂), 3.15 - 3.17 (м, 2 H, CH₂), 3.04 - 3.14 (м, 3 H, CH₂), 2.90 - 3.04 (м, 3 H, CH₂), 2.72 - 2.30 (м, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.37 (м, 2 H, CH₂), 2.15 - 2.29 (м, 6 H, CH₂), 1.89 - 1.90 (м, 2 H, CH₂), 1.55 - 1.74 (м, 4 H, CH₂), 1.39 - 1.55 (м, 5 H, CH₂), 1.31 - 1.39 (м, 2 H, CH₂), 1.12 - 1.31 (м, 6 H, CH₂).

Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174.20 (C(O)), 173.81 (C(O)), 172.49 (C(O)), 172.29 (C(O)), 171.68 (C(O)), 171.38 (C(O)), 168.78 (C(O)), 157.32 (NHC(O)NH), 138.10 (Ar), 133.05 (Ar), 130.28 (Ar), 129.09 (Ar), 128.16 (Ar), 127.16 (Ar), 126.33 (Ar), 126.07 (Ar), 54.84 (CH), 51.65 (CH), 48.26 (CH₂), 42.29 (CH₂), 36.79 (CH₂), 35.86 (CH₂), 30.66 (CH₂), 30.53 (CH₂), 29.89 (CH₂), 29.03 (CH₂), 28.27 (CH₂), 27.50 (CH₂), 26.20 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 12,0 мин.

ESI-HRMS: для C₄₃H₅₉ClN₁₀O₁₂: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 943.4075, найдено: 943.4062.

Синтез (3S,7S,25S,28R)-33-азидо-25,28-дибензил-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11c)



Из соединения **10c** (200 мг, 0,166 ммоль) и 10 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11c** в виде белого порошка с выходом 54% (93 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 8.28 - 8.41 (м, 1 H, NHC(O)), 8.09 – 8.13 (м, 1 H, NHC(O)) 7.91 - 7.99 (м, 1 H, NHC(O)), 7.77 – 7.81 (м, 1 H, NHC(O)), 7.56 – 7.61 (м, 1 H, NHC(O)), 7.34 – 7.39 (м, 1 H, Ar), 7.24 - 7.33 (м, 2 H, Ar), 7.18 - 7.24 (м, 6 H, Ar), 7.11 - 7.18 (м, 4 H, Ar), 7.04 - 7.11 (м, 1 H, Ar), 6.25 - 6.35 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.45 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.33 - 4.43 (м, 1 H, CH), 4.26- -4.30 (м, 1 H, CH), 3.95 - 4.12 (м, 2 H, CH), 3.10 - 3.27 (м, 5 H, CH_2), 2.86 - 3.10 (м, 5 H, CH_2), 2.69 - 2.81 (м, 2 H, CH_2), 2.52 - 2.63 (м, 2 H, CH_2), 2.28 - 2.37 (м, 2 H, CH_2), 2.13 - 2.26 (м, 5 H, CH_2), 1.82 - 1.93 (м, 1 H, CH_2), 1.66 - 1.76 (м, 1 H, CH_2), 1.53 - 1.64 (м, 3 H, CH_2), 1.41 - 1.53 (м, 6 H, CH_2), 1.12 - 1.34 (м, 4 H, CH_2).

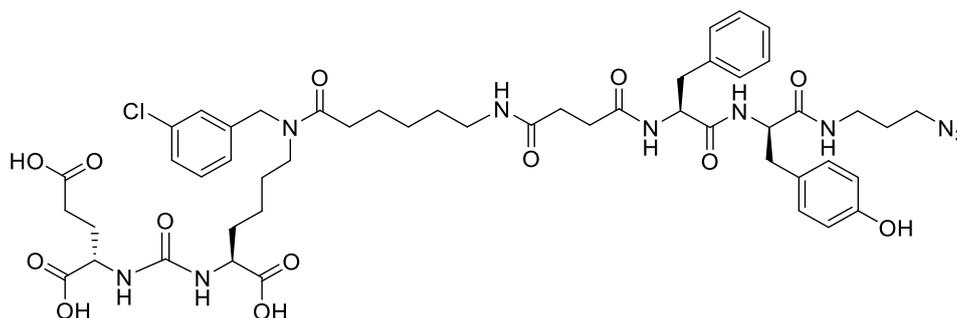
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 174.54 (C(O)), 174.24 (C(O)), 173.85 (C(O)), 172.20 (C(O)), 171.90 (C(O)), 171.62 (C(O)), 171.23 (C(O)), 170.92 (C(O)), 157.28 (NHC(O)NH), 141.22 (Ar), 140.82 (Ar), 137.99 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 130.62 (Ar), 130.26 (Ar), 129.20 (Ar), 129.14 (Ar), 129.03 (Ar), 128.20 (Ar), 128.10 (Ar), 128.00 (Ar), 127.18 (Ar), 126.85 (Ar), 126.28 (Ar), 126.08 (Ar), 124.97 (Ar), 54.34 (CH), 52.17 (CH), 51.74 (CH), 48.21 (CH_2), 47.15 (CH_2), 46.88 (CH_2), 40.11 (CH_2), 39.90 (CH_2), 39.69 (CH_2), 39.48 (CH_2), 39.27 (CH_2), 39.07 (CH_2), 38.86 (CH_2), 38.54 (CH_2), 37.56 (CH_2), 37.17 (CH_2), 35.87 (CH_2), 31.86 (CH_2), 31.80 (CH_2), 30.69 (CH_2), 30.07 (CH_2), 28.19 (CH_2), 28.14 (CH_2), 27.80 (CH_2), 27.68 (CH_2), 26.23 (CH_2), 24.72 (CH_2).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 12,8$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{ClN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1071.4104, найдено: 1071.4244.

Угол вращения: -13° ($l = 1$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S,7S,25S,28R)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11d)



Из соединения **10d** (210 мг, 0,172 ммоль) и 12 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11d** в виде белого порошка с выходом 70% (127 мг).

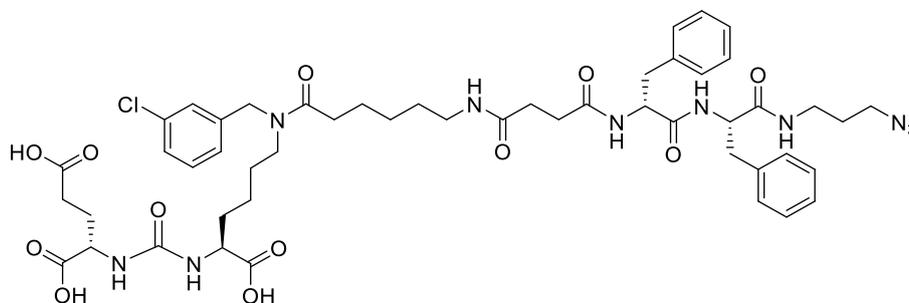
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.29 – 8.32 (м, 1 H, NHC(O)), 8.09 – 8.15 (м, 1 H, NHC(O)), 7.91-8.04 (м, 1 H, NHC(O)), 7.77 – 7.82 (м, 1 H, NHC(O)), 7.26 - 7.40 (м, 2 H, Ar), 7.17 - 7.24 (м, 3 H, Ar), 7.11 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 7.05 - 7.11 (м, 2 H, Ar), 6.97 – 6.99 (м, 2 H, Ar), 6.61 (д, $J=8.21$ Hz, 2 H, Ar), 6.30 – 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.53 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.45 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.32 – 4.34 (м, 1 H, CH), 4.28 – 4.30 (м, 1 H, CH), 4.03 – 4.06 (м, 2 H, CH), 2.92 – 2.99 (м, 4 H, CH_2), 2.76 – 2.87 (м, 2 H, CH_2), 2.53 – 2.64 (м, 2 H, CH_2), 2.32 – 2.34 (м, 1 H, CH_2), 2.10 - 2.27 (м, 6 H, CH_2), 1.71 - 1.85 (м, 2 H, CH_2), 1.55 - 1.67 (м, 3 H, CH_2), 1.30 - 1.48 (м, 6 H, CH_2), 1.12 - 1.29 (м, 5 H, CH_2).

ВЭЖХ-МС: чистота 98%, $t_R = 12,2$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{ClN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1049.4494, найдено: 1049.4459.

Угол вращения: -3° ($l = 1$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -33-азидо-25,28-добензил-12- (3-хлорбензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19, 24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11e)



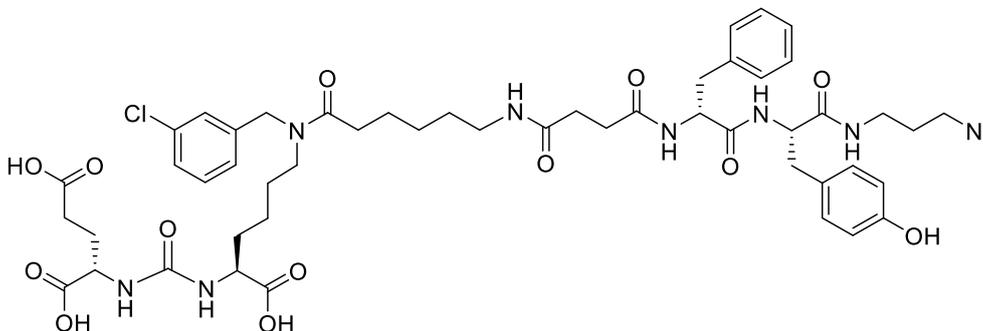
Из соединения **11e** (220 мг, 0,183 ммоль) и 12 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **12e** в виде белого порошка с выходом 73% (147 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.37 - 8.48 (м, 1 H, NHC(O)), 7.91 - 8.02 (м, 1 H, NHC(O)), 7.78 - 7.84 (м, 1 H, NHC(O)), 7.56 - 7.66 (м, 1 H, NHC(O)), 7.31 - 7.41 (м, 1 H, Ar), 7.26 - 7.30 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.27 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.23 (м, 6 H, Ar), 7.17 - 7.17 (м, 3 H, Ar), 7.07 - 7.09 (м, 1 H, Ar), 6.24 - 6.42 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.32 - 4.43 (м, 1 H, CH), 4.25 - 4.28 (м, 1 H, CH), 3.95 - 4.09 (м, 2 H, CH), 3.18 - 3.27 (м, 4 H, CH₂), 3.11 - 3.18 (м, 2 H, CH₂), 3.01 - 3.11 (м, 2 H, CH₂), 2.96 - 2.95 (м, 1 H, CH₂), 2.86 - 2.93 (м, 1 H, CH₂), 2.70 - 2.81 (м, 1 H, CH₂), 2.54 - 2.69 (м, 1 H, CH₂), 2.30-2.34 (м, 2 H, CH₂), 2.14 - 2.28 (м, 5 H, CH₂), 1.77 - 1.87 (м, 1 H, CH₂), 1.72 - 1.74 (м, 1 H, CH₂), 1.54 - 1.67 (м, 3 H, CH₂), 1.45 - 1.54 (м, 3 H, CH₂), 1.33 - 1.45 (м, 3 H, CH₂), 1.15 - 1.22 (м, 4 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 12,8$ мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1033.4545, найдено: 1033.4538.

Синтез (3S,7S,25R,28S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритритриакоктан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11f)



Из соединения **10f** (183 мг, 0,150 ммоль) и 9 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11f** в виде белого порошка с выходом 76% (120 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 9.16 (уш.с., 1 H, OH), 8.25 - 8.33 (м, 1 H, NHC(O)), 8.06 - 8.12 (м, 1 H, NHC(O)), 7.87 - 7.94 (м, 1 H, NHC(O)), 7.73 - 7.83 (м, 1 H, NHC(O)), 7.25 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.17 - 7.24 (м, 3 H, Ar), 7.11 - 7.17 (м, 2 H, Ar), 7.06 - 7.11 (м, 2 H, Ar), 6.98 (дд, $J=8.44$, 1.65 Hz, 2 H, Ar), 6.58 - 6.64 (м, 2 H, Ar), 6.25 - 6.34 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.33 - 4.40 (м, 1 H, CH), 4.25 - 4.33 (м, 1 H, CH), 3.96 - 4.13 (м, 2 H, CH), 3.02 - 3.23 (м, 4 H, CH₂), 2.90 - 3.02 (м, 2 H, CH₂), 2.72 - 2.89 (м, 3 H, CH₂), 2.55 - 2.69 (м, 2 H, CH₂), 2.29 - 2.36 (м, 2 H, CH₂), 2.16 - 2.28 (м, 6 H, CH₂), 1.83 - 1.95 (м, 1 H,

CH₂), 1.66 - 1.76 (м, 1 H, CH₂), 1.55 - 1.66 (м, 3 H, CH₂), 1.31 - 1.54 (м, 6 H, CH₂), 1.11 - 1.30 (м, 5 H, CH₂).

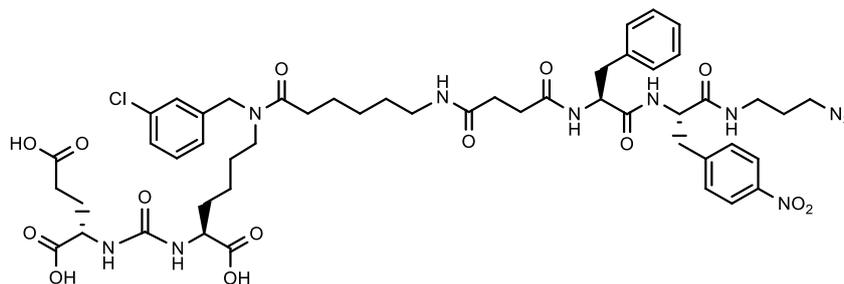
Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174.53 (C(O)), 174.24 (C(O)), 173.84 (C(O)), 172.23 (C(O)), 171.87 (C(O)), 171.23 (C(O)), 171.11 (C(O)), 171.02 (C(O)), 157.30 (NHC(O)NH), 155.81 (Ar), 141.20 (Ar), 140.81 (Ar), 138.01 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 130.62 (Ar), 130.27 (Ar), 130.12 (Ar), 129.16 (Ar), 128.01 (Ar), 127.18 (Ar), 126.85 (Ar), 126.28 (Ar), 126.19 (Ar), 126.07 (Ar), 124.97 (Ar), 114.86 (Ar), 54.69 (CH), 54.33 (CH), 52.16 (CH), 51.72 (CH), 48.23 (CH₂), 38.54 (CH₂), 37.19 (CH₂), 36.81 (CH₂), 35.86 (CH₂), 31.86 (CH₂), 31.78 (CH₂), 30.71 (CH₂), 30.61 (CH₂), 30.03 (CH₂), 29.08 (CH₂), 28.96 (CH₂), 28.21 (CH₂), 27.79 (CH₂), 27.64 (CH₂), 26.23 (CH₂), 24.73 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, t_R = 12,1 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1049.4494, найдено: 1049.4468, m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1071.4313, найдено: 1071.4294.

Угол вращения: -17° (l = 1 см, c = 1 г/дм)

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-нитробензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (**11g**)



Из соединения **10g** (146 мг, 0,178 ммоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11g** в виде белого порошка с выходом 62% (118 мг).

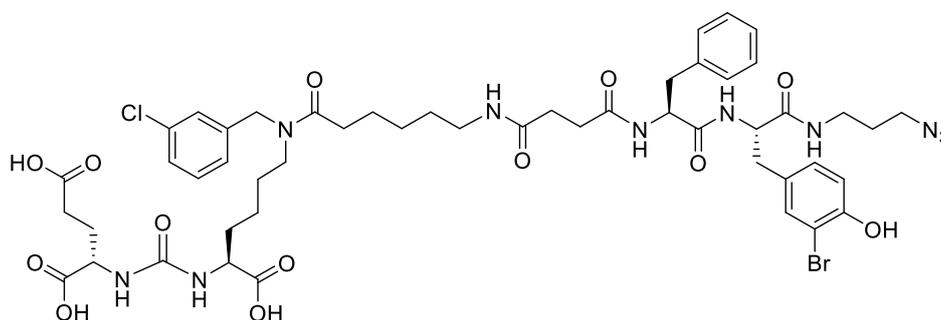
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.31 (уш. с., 1 H, COOH), 8.46 (д, J=8.68 Hz, 1 H, NHC(O)), 8.22 - 8.34 (м, 1 H, NHC(O)), 8.06 - 8.20 (м, 3 H, NHC(O)), 7.97 - 8.06 (м, 1 H, Ar), 7.81 - 7.79 (м, 1 H, Ar), 7.41 - 7.52 (м, 2 H, Ar), 7.25 - 7.34 (м, 2 H, Ar), 7.17 - 7.23 (м, 2 H, Ar), 7.08 - 7.17 (м, 3 H, Ar), 7.06 (д, J=7.64 Hz, 1 H, Ar), 6.24 - 6.36 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.53 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 2 H, NCH₂Ar), 4.34 - 4.28 (м, 1 H, CH), 3.97 - 4.12 (м, 2 H, CH), 3.17 (д, J=9.29 Hz, 5 H, CH₂), 3.08 (д, J=15.22 Hz, 4 H, CH₂), 2.83 - 3.02 (м, 5 H, CH₂), 2.32 (д, J=6.36 Hz, 2 H, CH₂), 2.13 - 2.30 (м, 6 H, CH₂), 1.85 - 1.98 (м, 1 H, CH₂), 1.73 - 1.69 (м, 1 H, CH₂), 1.62 - 1.59 (м, 3 H, CH₂), 1.35 - 1.53 (м, 6 H, CH₂), 1.29 - 1.24 - 1.19 (м, 1 H, CH₂), 1.10 - 1.18 (м, 2 H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.53 (C(O)), 174.20 (C(O)), 173.78 (C(O)), 172.18 (C(O)), 171.14 (C(O)), 157.28 (NHC(O)), 146.44 (Ar), 146.20 (Ar), 137.82 (Ar), 133.04 (Ar), 130.52 (Ar), 129.08 (Ar), 129.03 (Ar), 127.98 (Ar), 127.18 (Ar), 123.19 (Ar), 51.64 (CH), 48.23 (CH), 37.12 (CH₂), 35.96 (CH₂), 31.80 (CH₂), 29.90 (CH₂), 29.10 (CH₂), 29.01 (CH₂), 28.19 (CH₂), 27.54 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 97%, $t_R = 12,4$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{ClN}_{11}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1078.4395, найдено: 1078.4352; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1100.4215, найдено: 1100.4200.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(3-бromo-4-гидроксибензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (**11h**)



Из соединения **10h** (150 мг, 0,116 ммоль) и 9 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11h** в виде белого порошка с выходом 60% (72 мг).

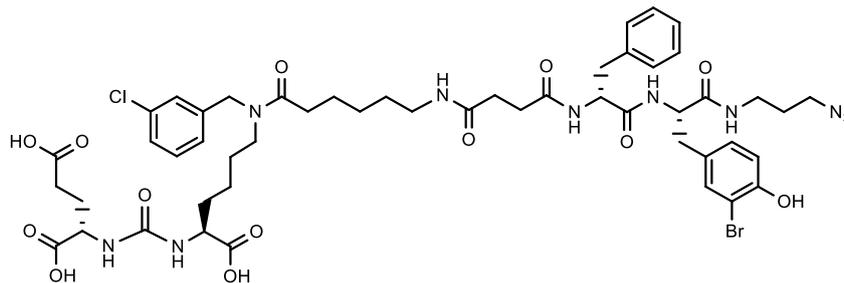
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 8.36 - 8.40 (м, 1 H, NHC(O)), 8.04 - 8.13 (м, 1 H, NHC(O)), 7.92 - 7.98 (м, 1 H, NHC(O)), 7.75 - 7.79 (м, 1 H, NHC(O)), 7.27 - 7.38 (м, 3 H, Ar), 7.18 - 7.24 (м, 3 H, Ar), 7.13 - 7.17 (м, 3 H, Ar), 7.06 - 7.11 (м, 1 H, Ar), 6.99 - 7.01 (м, 1 H, Ar), 6.74 - 6.88 (м, 1 H, Ar), 6.28 - 6.32 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.37 - 4.40 (м, 1 H, CH), 4.28 - 4.32 (м, 1 H, CH), 3.98 - 4.06 (м, 2 H, CH), 3.06 - 3.08 (м, 2 H, CH₂), 2.92 - 2.98 (м, 3 H, CH₂), 2.77 - 2.88 (м, 3 H, CH₂), 2.59 - 2.66 (м, 2 H, CH₂), 2.28 - 2.38 (м, 2 H, CH₂), 2.12 - 2.28 (м, 6 H, CH₂), 1.76 - 1.94 (м, 1 H, CH₂), 1.54 - 1.76 (м, 4 H, CH₂), 1.36 - 1.49 (м, 7 H, CH₂), 1.22 - 1.24 (м, 5 H, CH₂), 1.10-1.12 (м, 1 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 97%, $t_R = 12,5$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{BrClN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1127.3599, найдено: 1127.3569.

Угол вращения: -13° ($l = 1$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S,7S,25R,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(3-бром-4-гидроксибензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11i)



Из соединения **10i** (140 мг, 0,108 ммоль) и 10 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11i** в виде желтого порошка с выходом 35% (35 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.42 (уш. с., 3 H, COOH), 10.00 (с, 1 H, OH), 8.38 (д, $J=8.50$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.06 (д, $J=7.89$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.97 (м, 1 H, NHC(O)), 7.72 - 7.80 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.41 (м, 3 H, Ar), 7.19 - 7.13 (м, 5 H, Ar), 7.08 (д, $J=7.21$ Hz, 2 H, Ar), 7.00 (д, $J=8.56$ Hz, 1 H, Ar), 6.80 (д, $J=8.25$ Hz, 1 H, Ar), 6.24 - 6.35 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.35 - 4.43 (м, 1 H, CH), 4.27 - 4.35 (м, 1 H, CH), 3.98 - 4.12 (м, 2 H, CH), 3.20 - 3.12 (м, 3 H, CH₂), 3.10 - 3.07 (м, 1 H, CH₂), 3.07 (д, $J=4.83$ Hz, 1 H, CH₂), 2.90 - 3.02 (м, 2 H, CH₂), 2.88 - 2.83 (м, 1 H, CH₂), 2.79 - 2.76 (м, 1 H, CH₂), 2.66 - 2.64 (м, 1 H, CH₂), 2.59 - 2.56 (м, 1 H, CH₂), 2.34 (т, $J=7.43$ Hz, 1 H, CH₂), 1.86 - 1.95 (м, 1 H, CH₂), 1.67 - 1.78 (м, 1 H, CH₂), 1.58 - 1.67 (м, 3 H, CH₂), 1.31 - 1.56 (м, 6 H, CH₂), 1.20 - 1.31 (м, 4 H, CH₂), 1.15 (м, 1 H, CH₂).

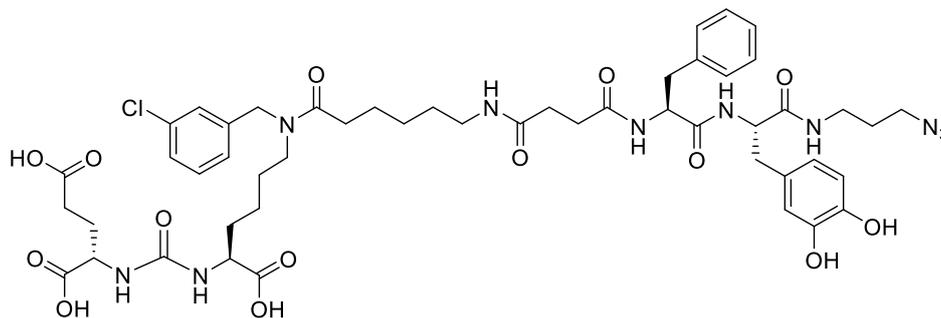
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.53 (C(O)), 174.49 (C(O)), 174.20 (C(O)), 173.77 (C(O)), 172.19 (C(O)), 171.76 (C(O)), 171.17 (C(O)), 171.07 (C(O)), 170.89 (C(O)), 157.28 (NHC(O)), 152.53 (Ar), 141.23 (Ar), 137.96 (Ar), 133.33 (Ar), 133.05 (Ar), 130.26 (Ar), 130.13 (Ar), 129.50 (Ar), 129.18 (Ar), 127.95 (Ar), 127.19 (Ar), 126.08 (Ar), 115.93 (Ar), 108.86 (Ar), 54.41 (CH), 54.24 (CH), 52.14 (CH), 51.66 (CH), 48.25 (CH₂), 35.89 (CH₂), 31.87 (CH₂), 31.79 (CH₂), 30.70 (CH₂), 30.66 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.11 (CH₂), 28.99 (CH₂), 28.25 (CH₂), 27.79 (CH₂), 27.54 (CH₂), 26.76 (CH₂), 26.24 (CH₂), 26.16 (CH₂), 24.74 (CH₂), 24.59 (CH₂), 22.49 (CH₂), 22.33 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 97%, $t_R = 12,5$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{ClBrN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1127.3599, найдено: 1127.3644.

Угол вращения: $-0,8^\circ$ ($l = 10$ см, $c = 1$ г/дм)

Спектры (3S, 7S, 25S, 28S) -33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (3,4-дигидроксибензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо- 4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11j)



Из соединения **10j** (258 мг, 0,209 ммоль) и 12 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11j** в виде белого порошка с выходом 74% (158 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.31 - 8.38 (м, 1 H, NHC(O)), 8.05 - 8.12 (м, 1 H, NHC(O)), 7.89 - 7.98 (м, 1 H, NHC(O)), 7.53 - 7.54 (м, 1 H, NHC(O)), 7.25 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.21 (м, 3 H, Ar), 7.05 - 7.18 (м, 4 H, Ar), 6.60 (д, *J*=7.15 Hz, 2 H, Ar), 6.46 (д, *J*=7.95 Hz, 1 H, Ar), 6.24 - 6.36 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.53 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.45 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.25 - 4.27 (м, 2 H, CH), 3.99 - 4.09 (м, 2 H, CH), 3.21 - 3.26 (м, 2 H, CH₂), 3.16 - 3.19 (м, 1 H, CH₂) 3.05 - 3.07 (м, 2 H, CH₂), 2.99 - 3.03 (м, 2 H, CH₂), 2.91 - 2.96 (м, 1H, CH₂), 2.84 - 2.90 (м, 1 H, CH₂), 2.59 - 2.76 (м, 3 H, CH₂), 2.28 - 2.39 (м, 3 H, CH₂), 2.13 - 2.28 (м, 5 H, CH₂), 1.83 - 1.94 (м, 1 H, CH₂), 1.67 - 1.72 (м, 1 H, CH₂), 1.55 - 1.63 (м, 3 H, CH₂), 1.44 - 1.55 (м, 4 H, CH₂), 1.36 - 1.41 (м, 3 H, CH₂), 1.17 - 1.31 (м, 4 H, CH₂).

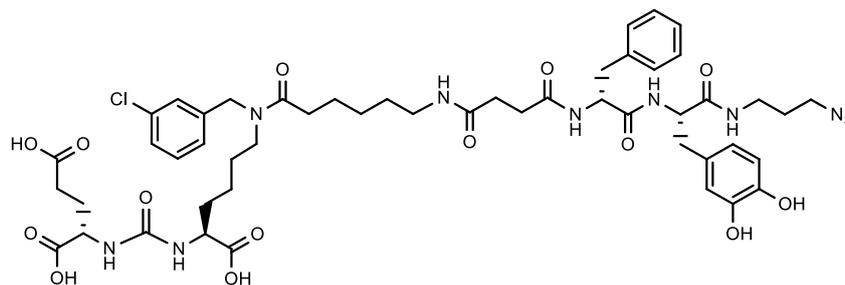
Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174.59 (C(O)), 174.29 (C(O)), 173.91 (C(O)), 172.98 (C(O)), 172.26 (C(O)), 171.65 (C(O)), 171.10 (C(O)), 171.03 (C(O)), 157.32 (NHC(O)NH), 144.97 (Ar), 143.75 (Ar), 141.18 (Ar), 140.78 (Ar), 137.98 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 130.63 (Ar), 130.27 (Ar), 129.05 (Ar), 128.78 (Ar), 128.10 (Ar), 127.16 (Ar), 126.85 (Ar), 124.97 (Ar), 119.75 (Ar), 116.39 (Ar), 115.30 (Ar), 55.16 (CH), 54.89 (CH), 52.22 (CH), 51.79 (CH), 48.15 (CH₂), 35.86 (CH₂), 32.29 (CH₂), 31.86 (CH₂), 31.79 (CH₂), 30.63 (CH₂), 30.50 (CH₂), 30.08 (CH₂), 29.00 (CH₂), 28.90 (CH₂), 28.15 (CH₂), 27.79 (CH₂), 27.69 (CH₂), 26.24 (CH₂), 24.71 (CH₂), 24.58 (CH₂), 22.49 (CH₂), 22.33 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 12,0 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₄: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1065.4443, найдено: 1065.4493; *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1087.4262, найдено: 1087.4321.

Угол вращения: -7° (*l* = 1 см, *c* = 1 г/дм)

Синтез (3S,7S,25R,28S)-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(3,4-дигидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11k)



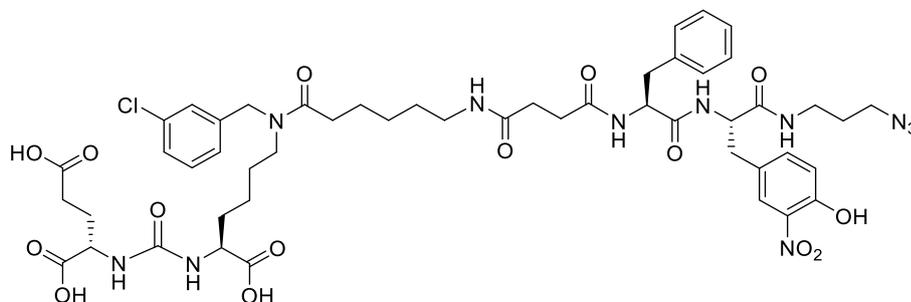
Из соединения **10k** (175 мг, 0,225 ммоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11k** в виде белого порошка с выходом 55% (70 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.52 (уш. с., 2 H, COOH), 9.35 (с., 1 H, OH), 8.36 (д, *J*=7.85 Hz, 1 H, NH), 8.16 (д, *J*=9.05 Hz, 1 H, NH), 7.91 (д, *J*=3.07 Hz, 1 H, Ar), 7.74 - 7.82 (м, 1 H, Ar), 7.25 - 7.35 (м, 2 H, Ar), 7.16 - 7.24 (м, 4 H, Ar), 7.13 (т, *J*=7.74 Hz, 4 H, Ar), 6.72 - 6.71 (м, 1 H, NHC(O)), 6.31 - 6.29 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.27 - 4.40 (м, 2 H, CH), 3.96 - 4.13 (м, 2 H, CH), 3.14 - 3.22 (м, 3 H, CH₂), 3.11 (м, 1 H, CH₂), 3.06 (м, 1 H, CH₂), 2.62 - 2.70 (м, 2 H, CH₂), 2.57 (м, 1 H, CH₂), 2.34 (д, *J*=14.59 Hz, 2 H, CH₂), 2.16 - 2.27 (м, 7 H, CH₂), 1.90 - 1.88 (м, 1 H, CH₂), 1.71 - 1.68 (м, 1 H, CH₂), 1.62 - 1.59 (м, 4 H, CH₂), 1.49 - 1.43 (м, 3 H, CH₂), 1.42 - 1.33 (м, 3 H, CH₂), 1.33 - 1.29 (м, 2 H, CH₂), 1.27 (м, 4 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 12,3 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₄: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1065.4443, найдено: 1065.4478.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (4-гидрокси-3-нитробензил) -5,13,20,23,26,29- гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (11l)



Из соединения **10I** (306 мг, 0,198 ммоль) и 10 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11I** в виде желтого порошка с выходом 47% (126 мг).

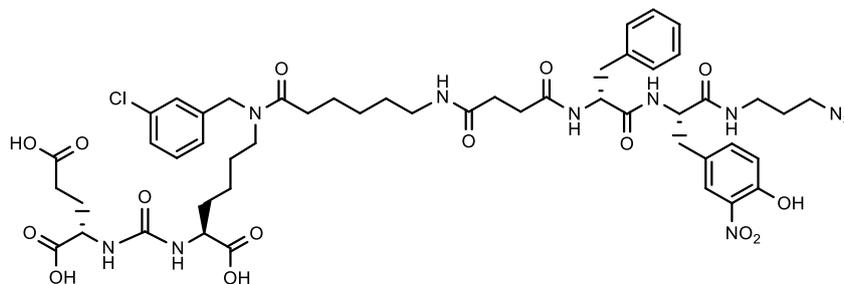
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.49 (уш.с., 3 H, COOH), 10.75 (уш.с, 1 H, OH), 8.43 (д, $J=8.80$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.10 (д, $J=7.83$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.96 - 8.02 (м, 1 H, NHC(O)), 7.72 - 7.77 (м, 1 H, NHC(O)), 7.32 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.25 - 7.32 (м, 1 H, Ar), 7.18 - 7.25 (м, 1 H, Ar), 7.11 - 7.18 (м, 4 H, Ar), 7.04 - 7.11 (м, 3 H, Ar), 7.00 (д, $J=8.50$ Hz, 1 H, Ar), 6.25 - 6.35 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.32 - 4.42 (м, 2 H, CH), 3.98 - 4.13 (м, 2 H, CH), 3.29 (т, $J=6.69$ Hz, 2 H, CH₂), 3.13 - 3.23 (м, 3 H, CH₂), 3.03 - 3.13 (м, 2 H, CH₂), 2.89 - 3.02 (м, 3 H, CH₂), 2.68 - 2.80 (м, 2 H, CH₂), 2.52 - 2.60 (м, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.38 (м, 2 H, CH₂), 2.13 - 2.29 (м, 6 H, CH₂), 1.85 - 1.96 (м, 1 H, CH₂), 1.66 - 1.76 (м, 1 H, CH₂), 1.56 - 1.66 (м, 3 H, CH₂), 1.46 - 1.56 (м, 3 H, CH₂), 1.39 - 1.46 (м, 2 H, CH₂), 1.31 - 1.39 (м, 1 H, CH₂), 1.16 - 1.31 (м, 4 H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.53 (C(O)), 174.50 (C(O)), 174.21 (C(O)), 173.77 (C(O)), 172.16 (C(O)), 171.80 (C(O)), 171.17 (C(O)), 170.64 (C(O)), 157.27 (NHC(O)), 150.90 (Ar), 141.24 (Ar), 140.84 (Ar), 137.88 (Ar), 136.45 (Ar), 136.08 (Ar), 133.40 (Ar), 133.04 (Ar), 130.25 (Ar), 129.10 (Ar), 127.92 (Ar), 127.20 (Ar), 126.84 (Ar), 126.16 (Ar), 126.09 (Ar), 125.45 (Ar), 118.90 (Ar), 54.28 (CH), 54.04 (CH), 51.65 (CH), 48.25 (CH₂), 38.53 (CH₂), 37.35 (CH₂), 36.27 (CH₂), 35.91 (CH₂), 31.87 (CH₂), 31.79 (CH₂), 30.68 (CH₂), 30.62 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.12 (CH₂), 28.23 (CH₂), 27.80 (CH₂), 27.55 (CH₂), 26.25 (CH₂), 26.16 (CH₂), 24.74 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 3,9$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{ClN}_{11}\text{O}_{15}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1094.4345, найдено: 1094.4349; m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1116.4164, найдено: 1116.4183.

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -33-азидо-25-бензил-12- (3-хлорбензил) -28- (4-гидрокси-3-нитробензил) -5,13,20,23,26,29- гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7- трикарбоновой кислоты (11m)



Из соединения **10m** (250 мг, 0,198 ммоль) и 10 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **11m** в виде желтого порошка с выходом 65% (142 мг).

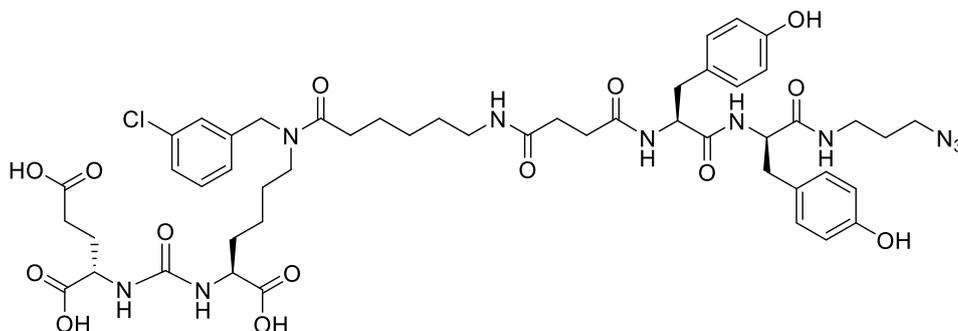
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.47 (уш. с., 3 H, COOH), 10.75 (с, 1 H, OH), 8.43 (д, $J=8.80$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.10 (д, $J=7.83$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.99 – 7.95 (м, 1 H, NHC(O)), 7.72 - 7.80 (м, 2 H, NHC(O)), 7.25 - 7.38 (м, 3 H, Ar), 7.19 - 7.24 (м, 1 H, Ar), 7.09 - 7.19 (м, 4 H, Ar), 7.08 (д, $J=7.15$ Hz, 2 H, Ar), 7.00 (д, $J=8.50$ Hz, 1 H, Ar), 6.24 - 6.35 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.38 (д, $J=8.01$ Hz, 2 H, CH), 4.08 (м, 1 H, CH), 3.98 - 4.05 (м, 1 H, CH), 3.29 (т, $J=6.69$ Hz, 3 H, CH₂), 3.18 – 3.15 (м, 3 H, CH₂), 3.04 - 3.13 (м, 2 H, CH₂), 2.90 - 3.02 (м, 3 H, CH₂), 2.67 - 2.78 (м, 2 H, CH₂), 2.58 – 2.54 (м, 1 H, CH₂), 2.34 (т, $J=7.21$ Hz, 2 H, CH₂), 2.14 - 2.26 (м, 6 H, CH₂), 1.77 - 1.94 (м, 1 H, CH₂), 1.72 – 1.68 (м, 1 H, CH₂), 1.57 - 1.66 (м, 3 H, CH₂), 1.43 - 1.57 (м, 4 H, CH₂), 1.41 – 1.36 (м, 2 H, CH₂), 1.19 - 1.33 (м, 4 H, CH₂), 1.15 (м, 1 H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.50 (C(O)), 174.21 (C(O)), 173.77 (C(O)), 172.16 (C(O)), 171.80 (C(O)), 171.17 (C(O)), 170.64 (C(O)), 157.27 (NHC(O)), 150.90 (Ar), 141.24 (Ar), 140.84 (Ar), 137.88 (Ar), 136.45 (Ar), 136.08 (Ar), 133.40 (Ar), 133.04 (Ar), 130.25 (Ar), 129.22 (Ar), 129.10 (Ar), 127.92 (Ar), 127.20 (Ar), 127.13 (Ar), 126.84 (Ar), 126.30 (Ar), 126.16 (Ar), 126.09 (Ar), 125.45 (Ar), 118.90 (Ar), 54.28 (CH), 54.04 (CH), 51.65 (CH), 48.25 (CH₂), 35.91 (CH₂), 31.87 (CH₂), 31.79 (CH₂), 30.68 (CH₂), 30.62 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.12 (CH₂), 28.99 (CH₂), 28.23 (CH₂), 27.80 (CH₂), 27.55 (CH₂), 26.25 (CH₂), 26.16 (CH₂), 24.74 (CH₂), 22.34 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 3,9$ мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₄ClN₁₁O₁₅: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1094.4345, найдено: 1094.4342; m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1116.4164, найдено: 1116.4159.

Синтез (3S, 7S, 25S, 28R) -33-азидо-12- (3-хлорбензил) -25,28-бис (4-гидроксибензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18a)



Из соединения **17a** (185 мг, 0,137 ммоль) и 9 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18a** в виде белого порошка с выходом 67% (98 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.45 (br.s., 3H, COOH), 9.16 (уш.с., 2 H, OH), 8.23 (д.д., $J=8.31, 3.61$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.01 (д, $J=7.70$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.85 - 7.92 (м, 1 H, NHC(O)), 7.73 - 7.84 (м, 1 H, NHC(O)), 7.26 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.24 (м, 1 H, Ar), 7.08 - 7.19 (м, 1 H, Ar), 6.98 (д, $J=8.38$ Hz, 2 H, Ar), 6.87 (д, $J=8.38$ Hz, 2 H, Ar), 6.54 - 6.65 (м, 4 H, Ar), 6.25 - 6.37 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.21 - 4.33 (м, 2 H, CH_2), 3.97 - 4.13 (м, 2 H, CH_2), 3.04 - 3.22 (м, 5 H, CH_2), 2.89 - 3.02 (м, 2 H, CH_2), 2.84 (д.д., $J=13.66, 4.74$ Hz, 1 H, CH_2), 2.59 - 2.68 (м, 1 H, CH_2), 2.44 - 2.46 (м, 1 H, CH_2), 2.29 - 2.38 (м, 1 H, CH_2), 2.12 - 2.29 (м, 6 H, CH_2), 1.83 - 1.96 (м, 1 H, CH_2), 1.64 - 1.77 (м, 1 H, CH_2), 1.56 - 1.63 (м, 3 H, CH_2), 1.31 - 1.54 (м, 5 H, CH_2), 1.16 - 1.31 (м, 5 H, CH_2).

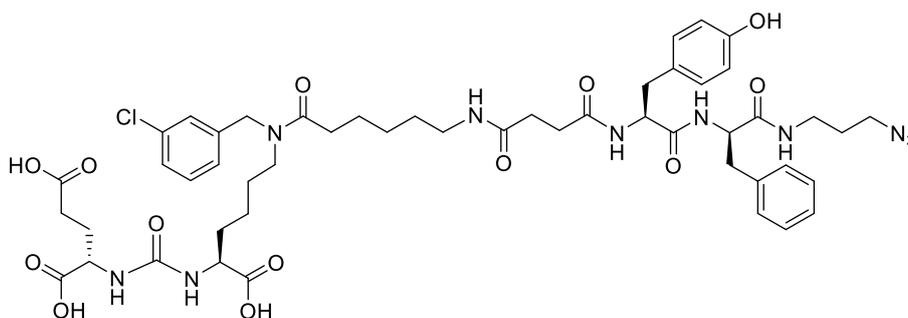
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.50 (C(O)), 174.21 (C(O)), 173.80 (C(O)), 172.22 (C(O)), 171.82 (C(O)), 171.23 (C(O)), 171.16 (C(O)), 171.09 (C(O)), 157.30 (NHC(O)NH), 155.80 (C(OH)), 155.69 (C(OH)), 141.21 (Ar), 140.82 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 130.63 (Ar), 130.27 (Ar), 130.12 (Ar), 130.09 (Ar), 128.08 (Ar), 128.03 (Ar), 127.18 (Ar), 126.85 (Ar C), 126.29 (Ar), 126.07 (Ar), 124.98 (Ar), 114.85 (Ar), 114.81 (Ar), 54.71 (CH), 54.63 (CH), 52.26 (CH), 52.14 (CH), 51.67 (CH), 48.23 (CH_2), 47.16 (CH_2), 46.88 (CH_2), 45.31 (CH_2), 38.55 (CH_2), 36.77 (CH_2), 36.42 (CH_2), 35.86 (CH_2), 31.87 (CH_2), 31.78 (CH_2), 30.73 (CH_2), 30.65 (CH_2), 29.94 (CH_2), 29.10 (CH_2), 28.98 (CH_2), 28.20 (CH_2), 27.78 (CH_2), 27.56 (CH_2), 26.24 (CH_2), 26.16 (CH_2), 24.74 (CH_2), 24.59 (CH_2), 22.49 (CH_2), 22.33 (CH_2).

ВЭЖХ-МС: чистота 97%, $t_R = 11,6$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{ClN}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1065.4443, найдено: 1065.4467, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1087.4262, найдено: 1087.4293.

Угол вращения: 2° ($l = 1$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25S, 28R) -33-азидо-28-бензил-12- (3-хлорбензил) -25- (4-гидроксибензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4, 6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18b)



Из соединения **17b** (121 мг, 0,095 ммоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18b** в виде белого порошка с выходом 56% (56 мг).

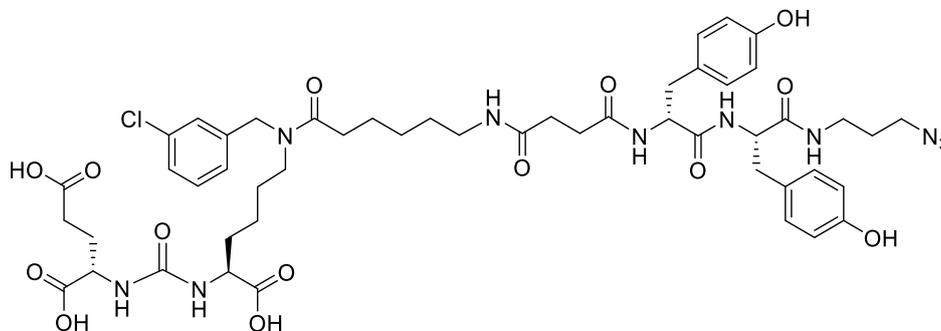
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.45 (уш.с., 3 H, COOH), 9.13 (уш.с., 1 H, OH), 8.31 - 8.35 (м, 1 H, NHC(O)), 8.03 (д, *J*=6.80 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.89 - 7.96 (м, 1 H, NHC(O)), 7.74 - 7.83 (м, 1 H, NHC(O)), 7.25 - 7.40 (м, 2 H, Ar), 7.09 - 7.25 (м, 7 H, Ar), 6.85 (д, *J*=7.62 Hz, 2 H, Ar), 6.57 (д, *J*=7.67 Hz, 2 H, Ar), 6.25 - 6.36 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.35 - 4.39 (м, 1 H, CH), 4.21 - 4.30 (м, 1 H, CH), 3.98 - 4.12 (м, 2 H, CH), 3.20 - 3.27 (м, 2 H, CH₂), 3.09 - 3.19 (м, 3 H, CH₂), 3.02 - 3.08 (м, 1 H, CH₂), 2.89 - 2.99 (м, 3 H, CH₂), 2.69 - 2.82 (м, 1 H, CH₂), 2.58 - 2.68 (м, 1 H, CH₂), 2.29 - 2.39 (м, 2 H, CH₂), 2.13 - 2.27 (м, 6 H, CH₂), 1.85 - 1.96 (м, 1 H, CH₂), 1.70 (br. s., 1 H), 1.54 - 1.76 (м, 4 H, CH₂), 1.31 - 1.49 (м, 7 H, CH₂), 1.10 - 1.31 (м, 5 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 12.2 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₃: *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1071.4313, найдено: 1071.4349.

Угол вращения: 6° (*l* = 10 см, *c* = 1 г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -33-азидо-12- (3-хлорбензил) -25,28-бис (4-гидроксibenзил) - 5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18c)



Из соединения **17c** (181 мг, 0,134 ммоль) и 8 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18c** в виде белого порошка с выходом 53% (76 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.45 (уш.с., 3 H, COOH), 9.14 (уш.с., 2 H, OH), 8.22 - 8.27 (м, 1 H, NHC(O)), 7.98 - 8.05 (м, 1 H, NHC(O)), 7.85 - 7.92 (м, 1 H, NHC(O)), 7.73 - 7.84 (м, 1 H, NHC(O)), 7.25 - 7.35 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.24 (м, 1 H, Ar), 7.09 - 7.17 (м, 1 H, Ar), 6.97 (д, *J*=6.96 Hz, 2 H, Ar), 6.87 (д, *J*=7.24 Hz, 2 H, Ar), 6.55 - 6.64 (м, 4 H, Ar), 6.26 - 6.34 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.23 - 4.32 (м, 2 H, CH), 3.98 - 4.11 (м, 2 H, CH), 3.22 - 3.28 (м, 2 H, CH₂), 3.12 - 3.22 (м, 2 H, CH₂), 3.03 - 3.11 (м, 2 H, CH₂),

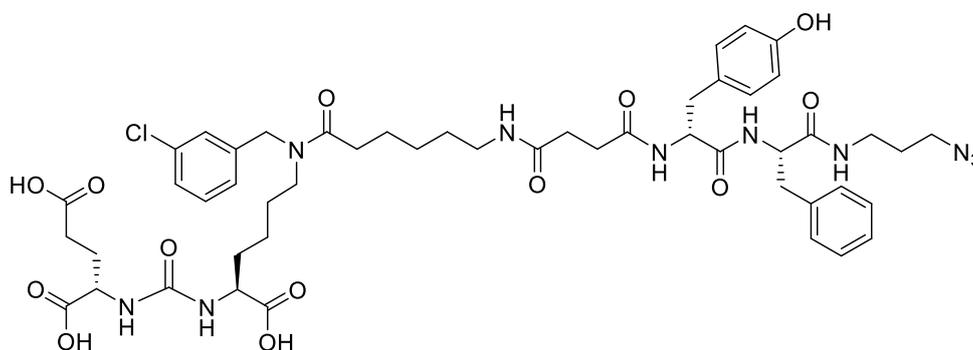
2.89 – 3.02 (м, 3 H, CH₂), 2.79 – 2.87 (м, 1 H, CH₂), 2.60 – 2.69 (м, 2 H, CH₂), 2.30 – 2.37 (м, 1 H, CH₂), 2.16 – 2.27 (м, 7 H, CH₂), 1.85 – 1.94 (м, 1 H, CH₂), 1.64 – 1.76 (м, 1 H, CH₂), 1.55 – 1.62 (м, 3 H, CH₂), 1.44 – 1.54 (м, 3 H, CH₂), 1.39 – 1.43 (м, 2 H, CH₂), 1.32 – 1.38 (м, 2 H, CH₂), 1.10 – 1.29 (м, 5 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 11.7 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₄: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1065.4443, найдено: 1065.4487, *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1087.4262, найдено: 1087.4310.

Угол вращения: -0,2° (*l* = 10 см, *c* = 1 г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25R, 28S) -33-азидо-28-бензил-12- (3-хлорбензил) -25- (4-гидроксибензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4, 6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18d)



Из соединения **17d** (140 мг, 0,110 ммоль) и 8 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18d** в виде белого порошка с выходом 66% (76 мг).

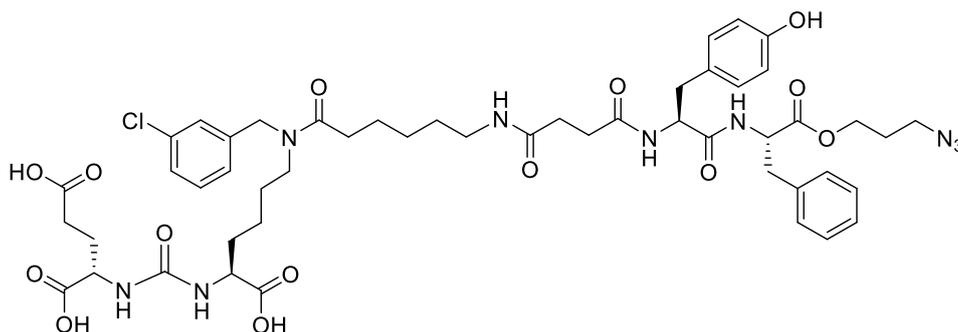
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 9.08 (уш.с., 1 H, OH), 8.27 (д.д., *J*=8.47, 3.85 Hz, 1 H, NHС(O)), 7.96 - 8.02 (м, 1 H, NHС(O)), 7.85 - 7.92 (м, 1 H, NHС(O)), 7.71 - 7.79 (м, 1 H, NHС(O)), 7.31 - 7.38 (м, 1 H, Ar), 7.21 - 7.31 (м, 2 H, Ar), 7.06 - 7.21 (м, 5 H, Ar), 6.83 (д., *J*=8.38 Hz, 2 H, Ar), 6.55 (м, *J*=8.38 Hz, 2 H, Ar), 6.22 - 6.33 (м, 2 H, NHС(O)NH), 4.51 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.44 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.31 - 4.39 (м, 1 H, CH), 4.18 - 4.27 (м, 1 H, CH), 3.96 - 4.10 (м, 2 H, CH), 3.22 (т, *J*=6.93 Hz, 2 H, CH₂), 3.10 - 3.16 (м, 2 H, CH₂), 2.98 - 3.07 (м, 2 H, CH₂), 2.86 - 2.98 (м, 3 H, CH₂), 2.73 (д.д., *J*=13.69, 9.58 Hz, 1 H, CH₂), 2.60 (д.д., *J*=14.03, 4.45 Hz, 1 H, CH₂), 2.40 - 2.44 (м, 1 H, CH₂), 2.31 (т., *J*=7.27 Hz, 1 H, CH₂), 2.12 - 2.25 (м, 5 H, CH₂), 2.02 - 2.05 (м, 2 H, CH₂), 1.82 - 1.93 (м, 1 H, CH₂), 1.62 - 1.74 (м, 1 H, CH₂), 1.55 - 1.59 (м, 2 H, CH₂), 1.47 - 1.50 (м, 3 H, CH₂), 1.29 - 1.43 (м, 3 H, CH₂), 1.13 - 1.29 (м, 5 H, CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 12,2 мин.

ESI-HRMS: для C₅₀H₆₅ClN₁₀O₁₃: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1149.4494, найдено: 1149.4471, *m/z* рассчитано для [M+Na]⁺: 1071.4313, найдено: 1071.4293.

Угол вращения: -0,2° (*l* = 10 см, *c* = 1 г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -33-азидо-28-бензил-12- (3-хлорбензил) -25- (4-гидроксибензил) -5,13,20,23,26,29-гексаоксо-30- окса-4,6,12,19,24,27-гексаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18e)



Из соединения **17e** (123 мг, 0,096 ммоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18e** в виде белого порошка с выходом 58% (59 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.43 (с, 3 H, COOH), 9.16 (с, 1 H, OH), 8.22 – 8.28 (м, 1 H, NHC(O)), 8.10 – 8.18 (м, 1 H, NHC(O)), 7.90 – 8.02 (м, 1 H, NHC(O)), 7.50 – 7.58 (м, 1 H, NHC(O)), 7.25 – 7.38 (м, 3 H, Ar), 7.06 - 7.24 (м, 6 H, Ar), 6.93 (д, $J=7.67$ Hz, 2 H, Ar), 6.58 (д, $J=6.96$ Hz, 2 H, Ar), 6.24 – 6.36 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.45 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.32 – 4.40 (м, 1 H, CH), 4.13 – 4.21 (м, 1 H, CH), 3.97 – 4.12 (м, 2 H, CH), 3.11 – 3.27 (м, 5 H, CH₂), 2.95 - 3.10 (м, 5 H, CH₂), 2.84 – 2.93 (м, 1 H, CH₂) 2.72 – 2.81 (м, 1 H, CH₂), 2.27 – 2.41 (м, 4 H, CH₂), 2.10 – 2.26 (м, 4 H, CH₂), 1.84 – 1.96 (м, 1 H, CH₂), 1.54 – 1.75 (м, 4 H, CH₂), 1.34 – 1.52 (м, 7 H, CH₂), 1.10 – 1.33 (м, 5 H, CH₂).

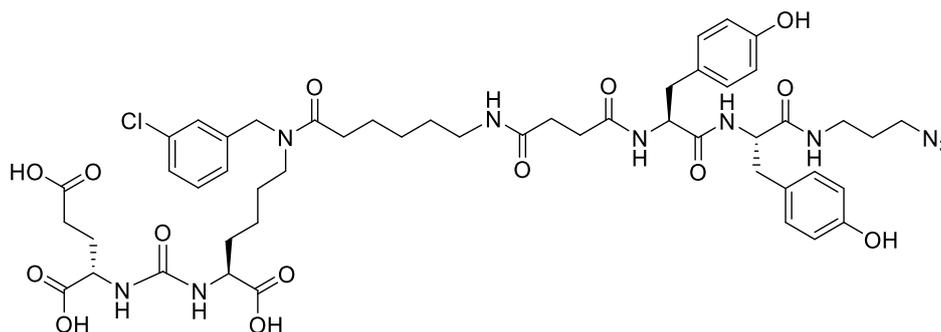
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.51 (C(O)), 174.20 (C(O)), 173.85 (C(O)), 173.15 (C(O)), 172.36 (C(O)), 171.80 (C(O)), 171.35 (C(O)C), 170.86 (C(O)), 157.37 (NHC(O)NH), 155.69 (C(OH)), 141.10 (Ar), 138.02 (Ar), 133.41 (Ar), 133.06 (Ar), 130.63 (Ar), 130.28 (Ar), 129.95 (Ar), 128.99 (Ar), 128.21 (Ar), 127.95 (Ar), 127.12 (Ar), 126.87 (Ar), 126.36 (Ar), 126.23 (Ar), 126.04 (Ar), 124.95 (Ar), 114.91 (Ar), 55.57 (CH), 54.48 (CH), 51.66 (CH), 48.11 (CH), 39.92 (CH₂), 39.72 (CH₂), 39.51 (CH₂), 39.30 (CH₂), 39.09 (CH₂), 38.88 (CH₂), 38.67 (CH₂), 35.90 (CH₂), 31.70 (CH₂), 30.60 (CH₂), 30.48 (CH₂), 29.88 (CH₂), 28.97 (CH₂), 28.07 (CH₂), 27.47 (CH₂), 26.23 (CH₂), 24.70 (CH₂).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 12.2$ мин.

ESI-HRMS: для для $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{ClN}_{10}\text{O}_{13}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1049.4494, найдено: 1049.4524, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1071.4313, найдено: 1071.4360.

Угол вращения: -11° ($l = 10$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S, 7S, 25S, 28S) -33-азидо-12- (3-хлорбензил) -25,28-бис (4-гидроксибензил) - 5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18f)



Из соединения **17f** (103 мг, 0,076 ммоль) и 4 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18f** в виде белого порошка с выходом 56% (45 мг).

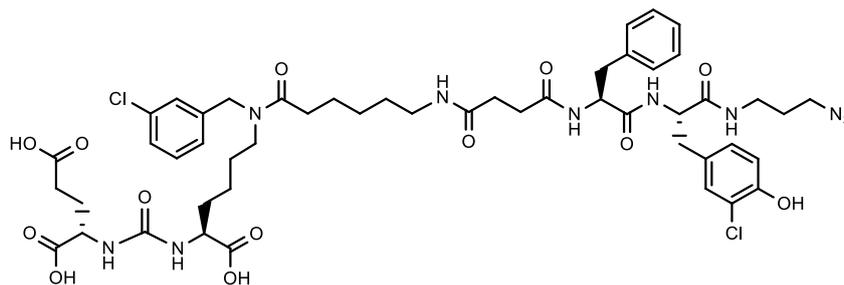
Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.51 (уш.с., 3 H, COOH), 9.19 (уш.с., 2 H, OH), 8.25 (д., $J=7.28$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.07 (д., $J=8.62$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.89 - 7.99 (м, 1 H, NHC(O)), 7.47 - 7.56 (м, 1 H, NHC(O)), 7.26 - 7.41 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.24 (м, 1 H, Ar), 7.09 - 7.17 (м, 1 H, Ar), 6.91 - 7.04 (м, 4 H, Ar), 6.59 (д., $J=8.38$ Hz, 2 H, Ar), 6.64 (д., $J=8.31$ Hz, 2 H, Ar), 6.24 - 6.37 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.22 - 4.31 (м, 1 H, CH), 4.13 - 4.22 (м, 1 H, CH), 3.98 - 4.13 (м, 2 H, CH), 3.12 - 3.26 (м, 4 H, CH_2), 2.88 - 3.10 (м, 5 H, CH_2), 2.71 - 2.83 (м, 2 H, CH_2), 2.28 - 2.40 (м, 4 H, CH_2), 2.11 - 2.28 (м, 5 H, CH_2), 1.85 - 1.95 (м, 1 H, CH_2), 1.65 - 1.75 (м, 1 H, CH_2), 1.53 - 1.65 (м, 3 H, CH_2), 1.46 - 1.53 (м, 3 H, CH_2), 1.33 - 1.46 (м, 3 H, CH_2), 1.11 - 1.33 (м, 5 H, CH_2).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.52 (C(O)), 174.22 (C(O)), 173.79 (C(O)), 172.81 (C(O)), 172.15 (C(O)), 171.58 (C(O)), 171.20 (C(O)), 170.88 (C(O)), 157.28 (NHC(O)NH), 155.81 (C(OH)), 155.75 (C(OH)), 141.23 (Ar), 140.83 (Ar), 133.39 (Ar), 133.04 (Ar), 130.62 (Ar), 130.26 (Ar), 129.97 (Ar), 128.11 (Ar), 128.05 (Ar), 127.19 (Ar), 126.85 (Ar), 126.30 (Ar), 126.08 (Ar), 124.97 (Ar), 114.95 (Ar), 114.87 (Ar), 55.45 (CH), 54.77 (CH), 52.13 (CH), 51.63 (CH), 48.14 (CH_2), 47.14 (CH_2), 46.86 (CH_2), 36.10 (CH_2), 35.82 (CH_2), 31.79 (CH_2), 30.65 (CH_2), 30.53 (CH_2), 29.90 (CH_2), 29.06 (CH_2), 28.95 (CH_2), 28.16 (CH_2), 27.79 (CH_2), 27.53 (CH_2), 26.76 (CH_2), 26.29 (CH_2), 24.72 (CH_2), 24.59 (CH_2), 22.34 (CH_2).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 11,6$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{ClN}_{10}\text{O}_{14}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1065.4443, найдено: 1065.4493, m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1087.4262, найдено: 1087.4320.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(3-хлор-4-гидроксibenзил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18g)



Из соединения **17g** (80 мг, 61,14 мкмоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18g** в виде белого порошка с выходом 66% (48 мг).

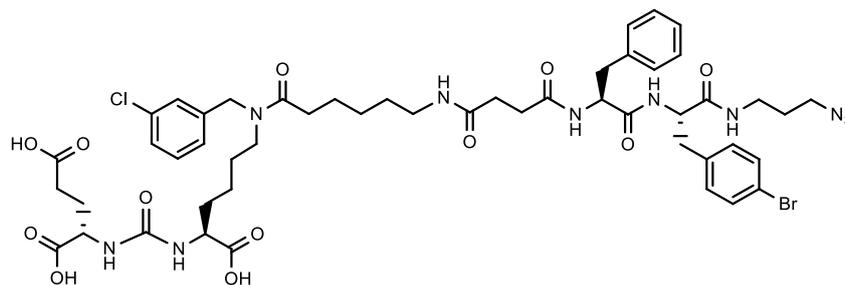
Спектр ^1H : 12.46 (уш.с., 2 H, COOH), 9.96 (с, 1 H, OH), 8.29 (д, $J=7.40$ Hz, 1 H, NH), 8.14 (д, $J=8.31$ Hz, 1 H, NH), 7.88 - 7.96 (м, 1 H, NH), 7.63 (д, $J=5.69$ Hz, 1 H, Ph), 7.26 - 7.40 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.25 (м, 3 H, Ar), 7.16 (д, $J=3.67$ Hz, 5 H, Ar), 6.95 - 6.99 (м, 1 H, Ar), 6.85 (д, $J=8.19$ Hz, 1 H, Ar), 6.26 - 6.35 (м, 2 H, C(O)NH(urea)), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.30 (м, 2 H, CH), 3.99 - 4.11 (м, 2 H, CH), 3.22 - 3.28 (м, 3 H, CH₂), 3.16 (м, 2 H, CH₂), 2.97 - 3.11 (м, 4 H, CH₂), 2.86 - 2.97 (м, 3 H, CH₂), 2.78 (д, $J=13.69$ Hz, 1 H, CH₂), 2.68 (д, $J=13.51$ Hz, 1 H, CH₂), 2.33 (д, $J=9.60$ Hz, 4 H, CH₂), 2.15 - 2.27 (м, 5 H, CH₂), 1.90 (д, $J=5.26$ Hz, 1 H, CH₂), 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.59 (м, 3 H, CH₂), 1.50 (д, $J=7.64$ Hz, 3 H, CH₂), 1.34 - 1.46 (м, 3 H, CH₂), 1.19 - 1.32 (м, 4 H, CH₂), 1.15 (м, 1 H, CH₂).

Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 174.54 (C(O)), 174.50 (C(O)), 174.21 (C(O)), 173.78 (C(O)), 172.69 (C(O)), 172.16 (C(O)), 171.53 (C(O)), 171.12 (C(O)), 170.62 (C(O)), 157.28 (NHC(O)NH), 151.53 (C(OH)), 141.23 (Ar), 137.95 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 130.61 (Ar), 130.25 (Ar), 130.19 (Ar), 129.72 (Ar), 129.04 (Ar), 128.65 (Ar), 128.08 (Ar), 127.19 (Ar), 126.85 (Ar), 126.30 (Ar), 126.27 (Ar), 126.08 (Ar), 124.97 (Ar), 119.19 (Ar), 116.37 (Ar), 54.92 (CH), 54.47 (CH), 51.65 (CH), 48.16 (CH), 36.95 (CH₂), 35.99 (CH₂), 35.86 (CH₂), 32.29 (CH₂), 31.87 (CH₂), 31.80 (CH₂), 30.69 (CH₂), 30.58 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.06 (CH₂), 28.94 (CH₂), 28.20 (CH₂), 27.80 (CH₂), 27.54 (CH₂), 26.28 (CH₂), 26.21 (CH₂), 24.73 (CH₂), 24.59 (CH₂), 22.51 (CH₂), 22.34 (CH₂).

ВЭЖХ: 100% в положительных ионах.

HRMS (ESI): для C₅₀H₆₄Cl₂N₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+H]⁺: 1085.4075, найдено 1085.4095; для C₅₀H₆₄Cl₂N₁₀O₁₃: m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1105.3928, найдено 1105.3923.

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(4-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18h)



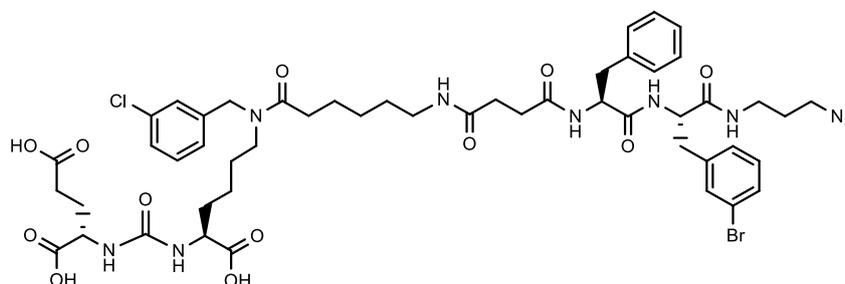
Из соединения **17h** (235 мг, 18,38 мкмоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18h** в виде белого порошка с выходом 54% (112 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 12.50 (уш. с., 2 H, COOH), 8.29 (д, $J=7.03$ Hz, 1 H, NH), 8.19 (д, $J=8.44$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.94 (т, $J=4.77$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.61 (д, $J=4.83$ Hz, 1 H, Ar), 7.45 (д, $J=7.76$ Hz, 2 H, Ar), 7.28 - 7.37 (м, 2 H, Ar), 7.17 - 7.24 (м, 4 H, Ar), 7.16 - 7.14 (м, $J=2.81$ Hz, 4 H, Ar), 6.25 - 6.34 (м, 2 H, NHC(O)NH), 4.46 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.36 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.30 (м, 1 H, CH), 4.04 - 4.11 (м, 1 H, CH), 3.25 (д, $J=18.28$ Hz, 5 H, CH), 3.17 (д, $J=11.37$ Hz, 2 H, CH_2), 3.08 (м, 2 H, CH_2), 3.01 (м, 3 H, CH_2), 2.91 (д, $J=17.42$ Hz, 3 H, CH_2), 2.25 - 2.37 (м, 4 H, CH_2), 2.11 - 2.25 (м, 4 H, CH_2), 1.84 - 1.95 (м, 1 H, CH_2), 1.64 - 1.74 (м, 1 H, CH_2), 1.59 (м, 3 H, CH_2), 1.50 (м, 4 H, CH_2), 1.38 (м, 3 H, CH_2), 1.28 (м, 2 H, CH_2), 1.22 (м, 2 H, CH_2), 1.17 (м, 1 H, CH_2).

HRMS (ESI): для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{ClBrN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1135.3449, найдено: 1135.3408.

Угол вращения: $-5,8^\circ$ ($l = 10$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(3-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18i)



Из соединения **17i** (388 мг, 32,36 мкмоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18i** в виде белого порошка с выходом 75% (56 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.44 (уш.с., 1 H, COOH), 8.30 (д, $J=7.21$ Hz, 1 H, NHC(O)), 8.22 (д, $J=8.44$ Hz, 1 H, NHC(O)), 7.94 (д, 1 H, NHC(O)), 7.66 (д, $J=5.62$ Hz, 1 H, Ar), 7.40 (д, $J=17.30$ Hz, 2 H, Ar), 7.26 - 7.37 (м, 2 H, Ar), 7.19 - 7.25 (м, 5 H, Ar), 7.15 (д, $J=3.24$ Hz, 4 H, Ar), 6.31 (дд, $J=15.89, 8.01$ Hz, 2 H, NHC(O)NH), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.38 (д, $J=5.69$ Hz, 1 H, CH), 4.28 (м, 1 H, CH), 4.08 (м, 1 H, CH), 4.03 (м, 1 H, CH), 3.21 - 3.28 (м, 3 H, CH₂), 3.16 (м, 3 H, CH₂), 3.07 (д, $J=11.74$ Hz, 3 H, CH₂), 3.00 (м, 2 H, CH₂), 2.90 (м, 2 H, CH₂), 2.63 - 2.71 (м, 1 H, CH₂), 2.33 (д, $J=8.31$ Hz, 4 H, CH₂), 2.12 - 2.27 (м, 5 H, CH₂), 1.91 (д, $J=6.97$ Hz, 1 H, CH₂), 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.59 (м, 3 H, CH₂), 1.51 (м, 7 H, CH₂), 1.22 (м, 5 H, CH₂).

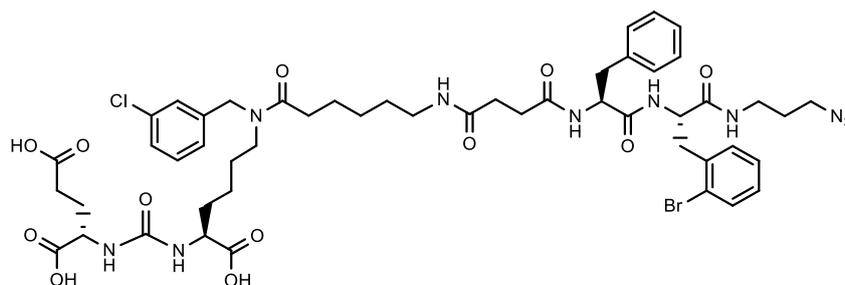
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.50 (C(O)), 174.20 (C(O)), 173.77 (C(O)), 173.31 (C(O)), 172.13 (C(O)), 171.76 (C(O)), 171.18 (C(O)), 170.35 (C(O)), 157.28 (NHC(O)NH), 141.23 (Ar), 140.83 (Ar), 137.99 (Ar), 137.21 (Ar), 133.41 (Ar), 133.05 (Ar), 132.54 (Ar), 131.05 (Ar), 131.00 (Ar), 130.25 (Ar), 128.98 (Ar), 128.58 (Ar), 128.14 (Ar), 127.55 (Ar), 127.20 (Ar), 127.14 (Ar), 126.85 (Ar), 126.32 (Ar), 126.28 (Ar), 126.09 (Ar), 124.96 (Ar), 124.24 (Ar), 55.37 (CH), 52.25 (CH), 52.14 (CH), 51.65 (CH), 48.18 (CH₂), 36.94 (CH₂), 36.64 (CH₂), 36.02 (CH₂), 32.29 (CH₂), 31.88 (CH₂), 31.80 (CH₂), 30.61 (CH₂), 30.46 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.05 (CH₂), 28.95 (CH₂), 28.12 (CH₂), 27.81 (CH₂), 27.55 (CH₂), 26.31 (CH₂), 26.24 (CH₂), 24.73 (CH₂), 24.58 (CH₂), 22.35 (CH₂).

ВЭЖХ: 100% в положительных ионах. $t_R = 12,6$ мин.

HRMS (ESI): для $\text{C}_{50}\text{H}_{64}\text{ClBrN}_{10}\text{O}_{12}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1133,3474, найдено 1133,3497.

Угол вращения: $-10,5^\circ$ ($l = 10$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S,7S,25S,28S)-33-азидо-25-бензил-28-(2-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18j)



Из соединения **17j** (352 мг, 27,48 мкмоль) и 5 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18j** в виде белого порошка с выходом 45% (139 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.44 (уш.с., 1 H, COOH), 8.30 (д, $J=7.21$ Hz, 1 H, NH), 8.22 (д, $J=8.44$ Hz, 1 H, NH), 7.94 (уш.с., 1 H, NH), 7.66 (д, $J=5.62$ Hz, 1 H, Ph), 7.40 (д, $J=17.30$ Hz, 2 H, Ph), 7.26 - 7.37 (м, 2 H, Ph), 7.19 - 7.25 (м, 5 H, Ph), 7.15 (д, $J=3.24$ Hz, 4 H, Ph), 6.31 (дд, $J=15.89$, 8.01 Hz, 2 H, C(O)NH(urea)), 4.54 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.38 (д, $J=5.69$ Hz, 1 H, CH), 4.28 (с, 1 H, CH), 4.08 (с, 1 H, CH), 4.03 (с, 1 H, CH), 3.21 - 3.28 (м, 3 H, CH₂), 3.16 (м, 3 H, CH₂), 3.07 (д, $J=11.74$ Hz, 3 H, CH₂), 3.00 (м, 2 H, CH₂), 2.90 (м, 2 H, CH₂), 2.63 - 2.71 (м, 1 H, CH₂), 2.33 (д, $J=8.31$ Hz, 4 H, CH₂), 2.12 - 2.27 (м, 5 H, CH₂), 1.91 (д, $J=6.97$ Hz, 1 H, CH₂), 1.70 (м, 1 H, CH₂), 1.59 (м, 3 H, CH₂), 1.51 (м, 7 H, CH₂), 1.22 (м, 5 H, CH₂).

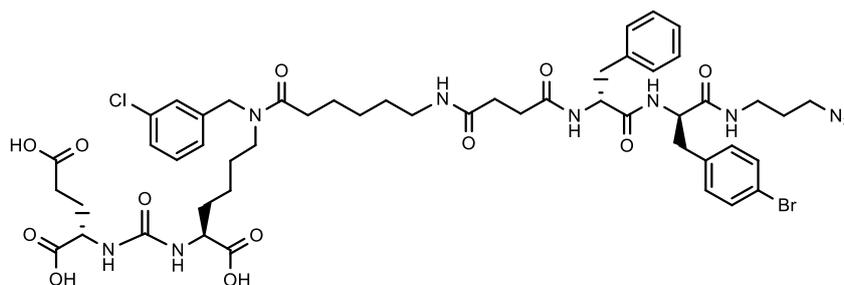
Спектр ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 174.50 (C(O)), 174.20 (C(O)), 173.78 (C(O)), 172.76 (C(O)), 172.15 (C(O)), 171.56 (C(O)), 171.20 (C(O)), 170.41 (C(O)), 157.28 (NHC(O)NH), 141.23 (Ar), 140.92 (Ar), 140.83 (Ar), 137.93 (Ar), 133.40 (Ar), 133.05 (Ar), 131.72 (Ar), 130.61 (Ar), 130.33 (Ar), 130.25 (Ar), 129.29 (Ar), 129.03 (Ar), 128.23 (Ar), 128.21 (Ar), 128.09 (Ar), 127.19 (Ar), 127.14 (Ar), 126.85 (Ar), 126.29 (Ar), 126.09 (Ar), 124.97 (Ar), 121.52 (Ar), 54.96 (CH), 54.07 (CH), 52.25 (CH), 52.13 (CH), 51.65 (CH), 47.15 (CH₂), 46.86 (CH₂), 36.94 (CH₂), 36.66 (CH₂), 35.89 (CH₂), 31.87 (CH₂), 31.80 (CH₂), 30.68 (CH₂), 30.55 (CH₂), 29.91 (CH₂), 29.06 (CH₂), 28.95 (CH₂), 28.19 (CH₂), 27.80 (CH₂), 27.55 (CH₂), 26.29 (CH₂), 26.22 (CH₂), 24.73 (CH₂), 24.59 (CH₂), 22.51 (CH₂), 22.34 (CH₂).

ВЭЖХ: 100% в положительных ионах, $t_R = 13,0$ мин.

HRMS (ESI): для C₅₀H₆₄ClBrN₁₀O₁₂: m/z рассчитано для [M+Na]⁺: 1133,3474, найдено 1133,3486.

Угол вращения: -12° ($l = 10$ см, $c = 1$ г/дм)

Синтез (3S,7S,25R,28R)-33-азидо-25-бензил-28-(4-бромбензил)-12-(3-хлорбензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (18k)



Из соединения **17k** (157 мг, 0,141 ммоль) и 9 мл смеси трифторуксусной кислоты, ДХМ, дистиллированной воды и триизопропилсилана (46.25 : 46.25 : 5 : 2.5) было получено соединение **18k** в виде белого порошка с выходом 43% (59 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 12.59 (уш. с., 3 H, COOH), 8.31 - 8.41 (м, 1 H, NHC(O)), 7.92 - 7.98 (м, 1 H, NHC(O)), 7.24 - 7.40 (м, 3 H, Ar), 7.13 - 7.24 (м, 8 H, Ar), 7.09 - 7.07 (м, 1 H, Ar), 6.33 - 6.29 (м, *J*=8.28 Hz, 2 H, Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH₂Ar), 4.37 (с, 1 H, NCH₂Ar), 3.97 - 4.10 (м, 2 H, CH₂), 3.12 - 3.23 (м, 6 H, CH₂), 3.06 - 3.03 (м, 2 H, CH₂), 2.99 - 2.95 (м, 4 H, CH₂), 2.75 (д, *J*=13.08 Hz, 1 H, CH₂), 2.32 (д, *J*=5.14 Hz, 1 H, CH₂), 2.21 - 2.16 (м, 4 H, CH₂), 1.87 - 1.85 (м, 1 H, CH₂), 1.71 (д, *J*=10.09 Hz, 1 H, CH₂), 1.60 - 1.55 (м, 2 H, CH₂), 1.49 - 1.43 (м, 5 H, CH₂), 1.22 (м, 4 H, CH₂).

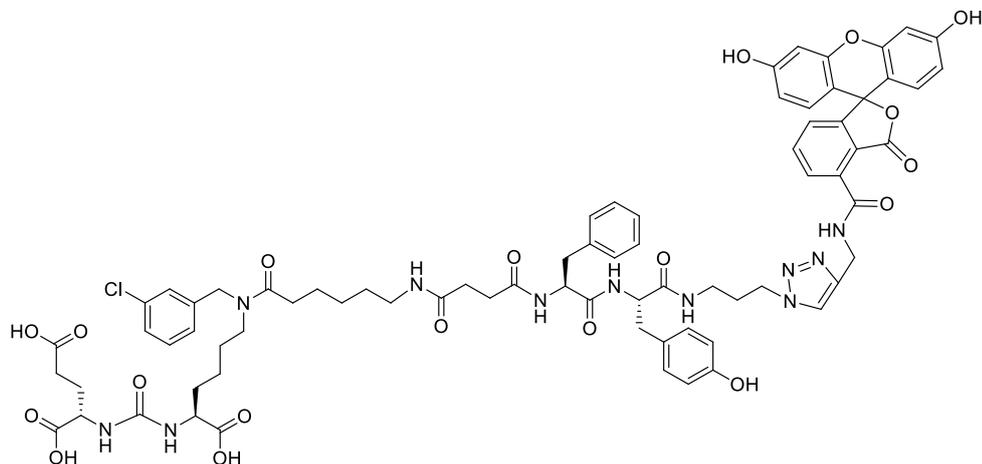
HRMS (ESI): для C₅₀H₆₄ClBrN₁₀O₁₂: *m/z* рассчитано для [M+H]⁺: 1111.3698, найдено 1111.3674.

Угол вращения: -18,5° (l = 10 см, c = 1 г/дм)

4.2.9. Синтез флуоресцентных конъюгатов

Флуоресцентный краситель Sulfo-Cy5-alkyne (1 экв.) и соответствующие соединения **11** или **18f**, или **I** (1.05 экв.) были растворены в смеси ДМФА/Н₂O (3:1). Реакцию проводили в атмосфере аргона. Далее к раствору был добавлен CuSO₄*5H₂O (0.4 экв.) и аскорбат натрия (1.2 экв.). Смесь перемешивали в течение 24 часов. После в систему добавили ЭДТА (0.8 экв.) и перемешивали 3 часа. Реакционную смесь фильтровали от ЭДТА и удаляли при пониженном давлении растворитель. Целевое соединение выделяли методом обращеннофазовой колоночной хроматографии (Puriflash C18-HP, 15μ, 20g, элюент: ацетонитрил / 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде: от 10% ацетонитрила до 100% за 12 минут, 100% ацетонитрила 5 минут).

Синтез (3S,7S,25S,28S)-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-33-(4-((3',6'-дигилрокси-3-оксо-3H-спиро[изобензофуран-1,9'-ксантен]-4-илкарбоксамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазаттриаконтан -1,3,7- трикарбоновой кислоты (19a)



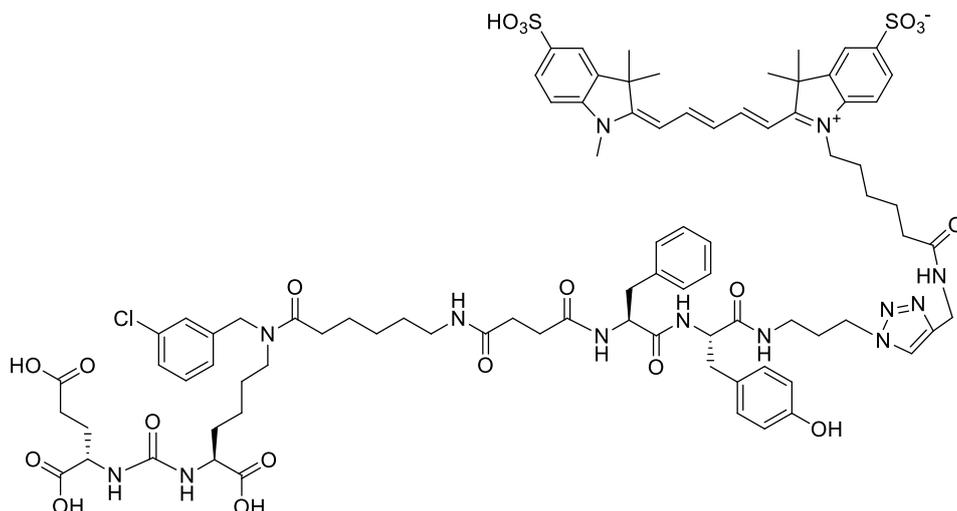
Из соединения **I** (100 мг, 0.095 ммоль), FAM-5-alkyne (37 мг, 0.091 ммоль), $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (9 мг, 0.036 ммоль), NaAsc (22 мг, 0.109 ммоль) и ЭДТА (47 мг, 0.073 ммоль) получили соединение **19a** в виде желтого аморфного порошка с выходом 51% (71 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$, δ , м.д.): 12.44 (уш.с, 3H), 10.17 (с, 1H), 9.38 (с, 1H), 8.48 (с, 1H), 8.30–8.24 (м, 2H), 8.10–8.02 (м, 3H), 7.77–7.65 (м, 2H), 7.65–7.64 (м, 2H), 7.35–7.30 (м, 5H), 7.18–7.15 (м, 3H), 6.67–6.54 (м, 5H), 6.31–6.29 (м, 2H), 4.55–4.45 (м, 4H), 4.28 (с, 3H), 4.07–4.05 (м, 3H), 3.17–3.16 (м, 3H), 3.00–2.98 (м, 6H), 2.70–2.65 (м, 3H), 2.23–2.19 (м, 8H), 1.91–1.88 (м, 3H), 1.49–1.10 (м, 11H).

ВЭЖХ-МС: чистота 99,9%, $t_R = 12,0$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{74}\text{H}_{80}\text{ClN}_{11}\text{O}_{19}$: m/z рассчитано для $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: 729.7576, найдено: 729.7586.

Синтез 1- (6 - (((1 - ((3S, 7S, 25S, 28S) -25-бензил-1,3,7-трикарбокситриазолин-12- (3-хлорбензил) -28-(4-гидроксибензил) -5 , 13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтан-33-ил) -1H-1,2,3-триазол-4-ил) метил) амино) -6-оксогексил) -3,3-диметил-2 - ((1E, 3E, 5E) -5- (1,3,3-триметил-5-сульфоиндолин-2-илиден) пента-1,3-диен-1-ил) -3H-индол-1-ил)-5-сульфоната (**19b**)



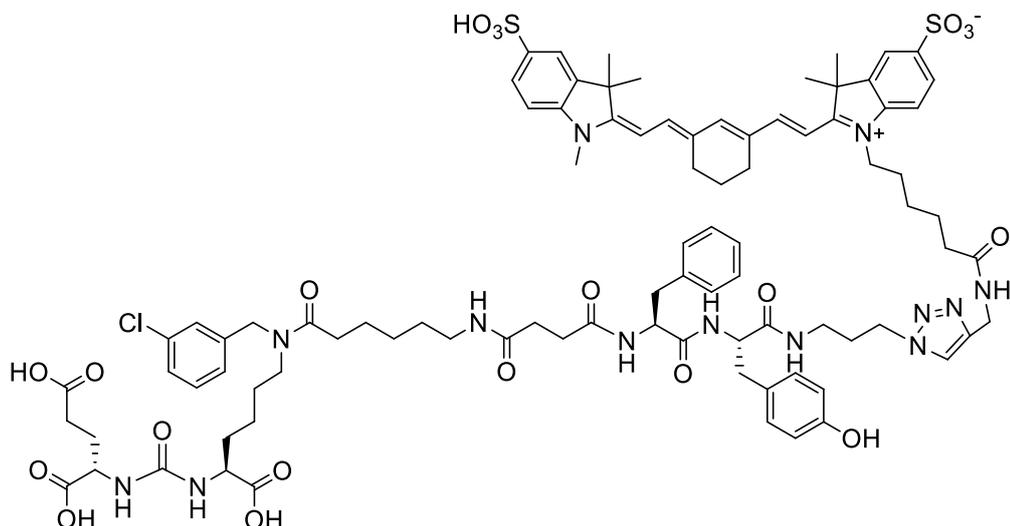
Из соединения **I** (100 мг, 0.095 ммоль), Sulfo-Cy5-alkyne (66 мг, 0.091 ммоль), $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (9 мг, 0.036 ммоль), NaAsc (22 мг, 0.109 ммоль) и ЭДТА (47 мг, 0.073 ммоль) получили соединение **19b** в виде темно-синего аморфного порошка с выходом 77% (121 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$, δ , м.д.): 8.30 (т., $J=12.72$ Hz, 2 H), 7.85 (с., 1 H), 7.76 (с., 2 H), 7.63 (д., $J=7.21$ Hz, 2 H), 7.22 - 7.35 (м, 4 H), 7.08 - 7.21 (м, 5 H), 6.93 - 7.07 (м, 3 H), 6.49 - 6.69 (м, 3 H), 6.25 (т., $J=13.14$ Hz, 2 H), 4.39 - 4.57 (м, 2 H), 4.16 - 4.36 (м, 6 H), 3.95 - 4.11 (м, 4 H), 3.54 (с., 4 H), 3.10 - 3.20 (м., 2 H), 2.81 - 3.08 (м, 6 H), 2.74 - 2.76 (м, 1 H), 2.55 - 2.70 (м, 2 H), 2.27 - 2.33 (м, 2 H), 2.11 - 2.25 (м, 5 H), 2.03 - 2.05 (м, 3 H), 1.85 - 1.97 (м, 3 H), 1.64 (с, 15 H), 1.06 - 1.55 (м, 15 H).

ВЭЖХ-МС: чистота 96%, $t_R = 5.1$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{85}\text{H}_{106}\text{ClN}_{13}\text{O}_{20}\text{S}_2$: m/z рассчитано для $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: 862.8320, найдено: 862.8331.

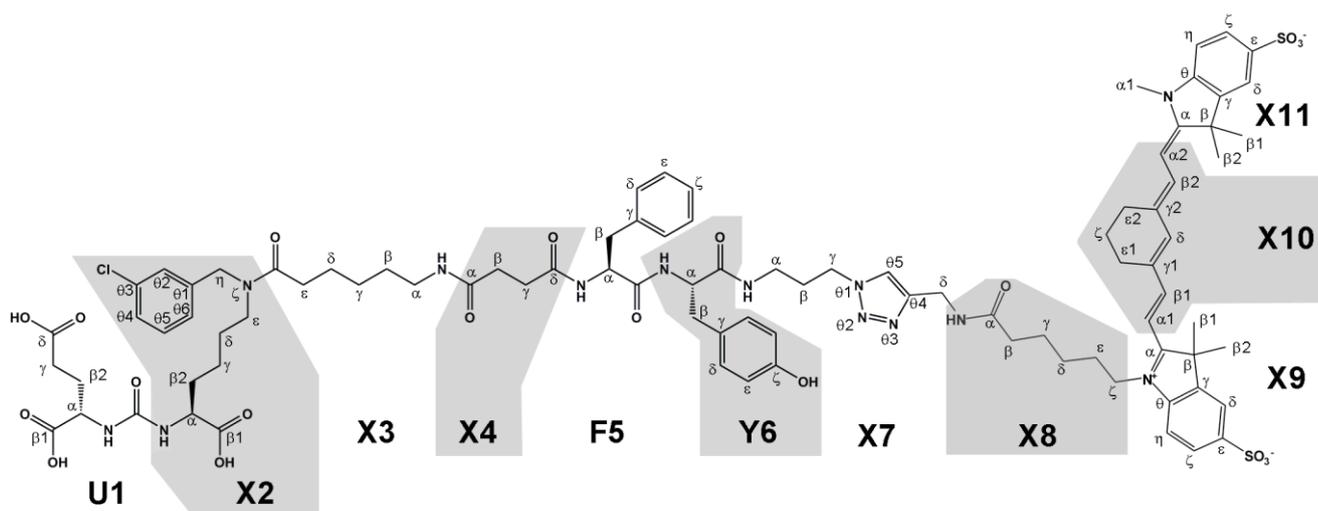
Синтез 1- (6- (((1- ((3S, 7S, 25S, 28S)-25-бензил-1,3,7-трикарбоксо-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-33-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)-6-оксагексил)-3,3-диметил-2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(1,3,3-триметил-5-сульфоиндонил-2-илиден)этилиден)циклогекс-1-ен-1-ил)винил)-3H-индол-1-иум-5-сульфоната (**19c**)



Из соединения **I** (100 мг, 0.095 ммоль), Sulfo-Cy5-alkyne (67 мг, 0.091 ммоль), $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (9 мг, 0.036 ммоль), NaAsc (22 мг, 0.109 ммоль) и ЭДТА (47 мг, 0.073 ммоль) получили соединение **19c** в виде темно-зеленого аморфного порошка с выходом 58% (99 мг).

ВЭЖХ-МС: чистота 99.9%, $t_R = 12.0$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{90}\text{H}_{112}\text{ClN}_{13}\text{O}_{20}\text{S}_2$: m/z рассчитано для $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$: 895.8555, найдено: 895.8561.



Структура **L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7** и используемые обозначения функциональных фрагментов.

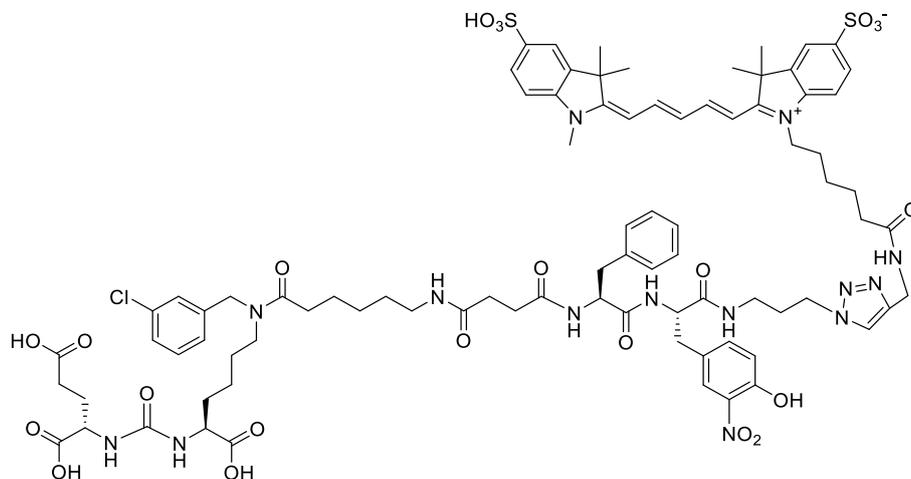
Фрагмент	Химический сдвиг, м.д.																	
	¹⁵ N	¹³ CO	¹³ Cα	¹³ Cβ	¹³ Cγ	¹³ Cδ	¹³ Cε	¹³ Cζ	¹³ Cη	¹ HN	¹ Ha	¹ Hβ	¹ Hγ	¹ Hδ	¹ Hε	¹ Hζ	¹ Hη	Другое
U1	84.4	157.3	51.8	27.7	30.1	173.7	-	-	-	6.32	4.10	1.91	2.24	-	-	-	-	¹³ Cβ1 174.2
												1.62						
X2	85.1		52.3	31.9	22.5	28.0	47.0	-	47.3	6.28	4.06	1.62	1.24	1.48	3.20	-	4.46	¹³ Cβ1 174.4; ¹³ Cθ1 141.3; ¹³ Cθ2 127.3; ¹³ Cθ3 133.1; ¹³ Cθ4 127.0; ¹³ Cθ5 130.4; ¹³ Cθ6 126.2; ¹ Hθ2 7.22; ¹ Hθ4 7.26; ¹ Hθ5 7.31; ¹ Hθ6 7.14;
												1.51			3.17			
X2A	85.1		52.4	32.0	22.7	26.9	45.4	-	49.7	6.28	4.02	1.60	1.21	1.42	3.20	-	4.53	¹³ Cβ1 174.5; ¹³ Cθ1 140.8; ¹³ Cθ2 126.4; ¹³ Cθ3 133.4; ¹³ Cθ4 127.3; ¹³ Cθ5 130.8; ¹³ Cθ6 125.1; ¹ Hθ2 7.20; ¹ Hθ4 7.31; ¹ Hθ5 7.37; ¹ Hθ6 7.11;
												1.49			3.17			
X3	115.7	172.2	38.7	29.3	26.4	24.9	32.0	-	-	7.74	2.98	1.36	1.26	1.50	2.33	-	-	
X3A	115.6	172.2	38.6	29.1	26.4	24.7	32.4	-	-	7.70	2.93	1.28	1.16	1.43	2.20	-	-	
X4	-	-	171.5	30.8	30.8	171.9	-	-	-	-	-	2.19	2.23	-	-	-	-	
X4A	-	-	171.4	30.8	30.8	172.7	-	-	-	-	-	2.20	2.29	-	-	-	-	
F5	118.4	171.1	54.4	37.4	138.1	129.3	128.1	126.3	-	8.04	4.37	2.80	-	7.09	7.19	7.18	-	
												2.61						
F5A	119.6	171.1	54.9	36.9	138.1	129.2	128.1	126.2	-	8.22	4.32	2.92	-	7.15	7.16	7.18	-	
												2.68						
Y6	116.0	171.3	54.9	36.9	128.1	130.2	115.1	155.9	-	8.22	4.32	2.87	-	6.98	6.61	-	-	

												2.67						
Y6A	114.2	171.0	54.9	36.5	128.1	130.2	115.1	155.9	-	8.03	4.30	2.92	-	7.01	6.64	-	-	
												2.79						
X7	110.7	-	36.0	29.9	47.1	34.3	-	-	-	7.92	3.07	1.90	4.26	4.25	-	-	-	¹⁵ N1 246.9; ¹⁵ N2 359.6; ¹⁵ N3 348.7; ¹³ C04 144.8; ¹³ C02 123.0; ¹ H01 7.87
												3.02						
X7A	110.4	-	35.9	29.9	47.0	34.3	-	-	-	7.62	3.04	1.88	4.24	4.25	-	-	-	¹⁵ N1 246.9; ¹⁵ N2 359.6; ¹⁵ N3 348.7; ¹³ C04 144.8; ¹³ C02 123.0; ¹ H01 7.87
												3.00						
X8	114.4	-	171.9	35.1	24.9	25.9	26.6	43.5	-	8.20	-	2.08	1.56	1.34	1.69	4.08	-	
X9	154.1	-	170.7	48.7	140.3	119.9	144.9	126.3	110.0	-	-	-	-	7.75	-	7.63	7.24	¹³ Cβ1,2 27.2; ¹³ C0 142.4; ¹ Hβ1,2 1.64
X10	-	-	100.0	147.8	132.1	155.3	23.6	21.2	-	-	6.13	7.66	-	-	2.49	1.80	-	
			100.7	147.7	132.1		23.5				6.14	7.69			2.49			
X11	145.6	-	171.9	48.7	140.3	119.9	145.2	126.3	110.0	-	-	-	-	7.75	-	7.64	7.28	¹³ Ca1 31.4; ¹³ Cβ1,2 27.3; ¹³ C0 143.0; ¹ Ha1 3.59; ¹ Hβ1,2 1.65

9

⁹ Исследования выполнены на факультете фундаментальной медицины в лаборатории «Магнитной томографии и спектроскопии» МГУ, д.х.н., в. н. с. Польшаковым В. И.

Синтез 1- (6 - (((1 - ((3S, 7S, 25S, 28S) -25-бензил-1,3,7-трикарбокситриаконтан-33-ил) -1H-1,2,3-триазол-4-ил) метил) амино) -6-оксогексил) -3,3-диметил-2 - ((1E, 3E, 5E) -5- (1,3,3-триметил-5-сульфоиндолин-2-илиден) пента- 1,3-диен-1-ил) -3H-индол-1-ил-5-сульфоната (19d)



Из соединения **111** (60 мг, 0,055 ммоль), Sulfo-Cy5-alkyne (37,5 мг, 0,052 ммоль), CuSO₄*H₂O (5,5 мг, 0,022 ммоль), NaAsc (13 мг, 0,066 ммоль) и ЭДТА (18 мг, 0,045 ммоль) получили соединение **19d** в виде темно-синего аморфного порошка с выходом 80% (78 мг).

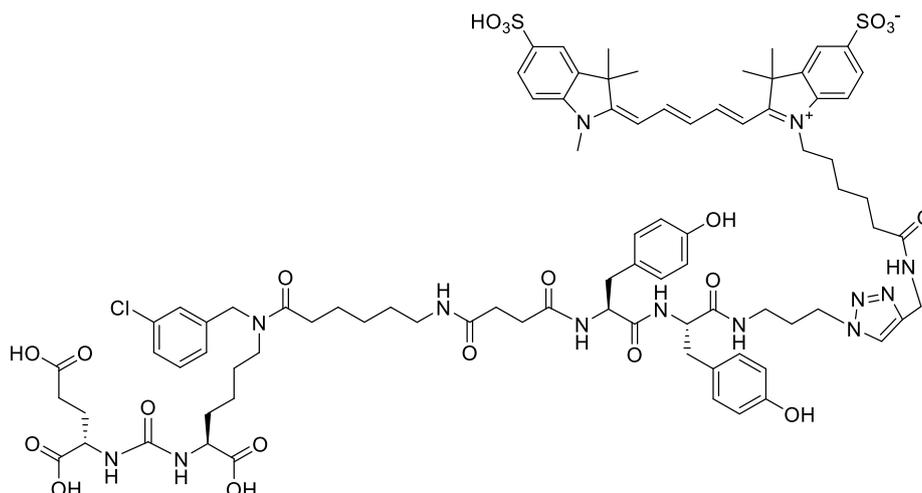
Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.22 - 8.40 (м, 3 H), 8.17 - 8.19 (м, 1 H), 8.01 (д, J=8.11 Hz, 1 H), 7.92 (м, 1 H), 7.87 (с, 1 H), 7.78 - 7.83 (м, 2 H), 7.58 - 7.72 (м, 3 H), 7.45 - 7.58 (м, 1 H), 7.09 - 7.34 (м, 12 H), 6.54 (т, J=12.41 Hz, 1 H), 6.20 - 6.38 (м, 3 H), 4.88 (с., 1 H), 4.73 (с., 1 H), 4.38 (д., J=5.81 Hz, 1 H), 4.30 (с., 1 H), 4.22 - 4.24 (м., 4 H), 4.00 - 4.06 (м., 4 H), 3.15 - 3.23 (м., 3 H), 2.90 - 3.01 (м., 4 H), 2.88 - 2.91 (м, 3 H), 2.56 - 2.69 (м, 1 H), 2.38 - 2.40 (м, 1 H), 2.26 - 2.36 (м, 2 H), 2.19 - 2.25 (м, 3 H), 2.10 - 2.17 (м, 1 H), 2.01 - 2.09 (м, 2 H), 1.80 - 1.86 (м, 3 H), 1.67 (с, 14 H), 1.49 - 1.55 (м, 6 H), 1.27 - 1.44 (м, 5 H), 1.12 - 1.23 (м, 4 H).

ВЭЖХ-МС: чистота 99%, t_R = 4,7 мин.

ESI-MS: для C₈₅H₁₀₅ClN₁₄O₂₂S₂: m/z рассчитано для [M-2H]⁻ 885.3256, найдено: 885.3260.

Синтез 3,3-диметил-1- (6-оксо-6 - (((1 - ((3S, 7S, 25S, 28S) -1,3,7-трикарбокситриаконтан-33-ил) -1H-1,2,3-триазол-4-ил) метил) амино) гексил) -2 - ((1E, 3E, 5E) -5- (1,3,3-триметил-5-сульфоиндолин-2-илиден) пента- 1,3-диен-1-ил) -3H-индол-1-ил-5-сульфоната (19d)

3E, 5E) -5- (1,3,3-триметил-5-сульфоиндолин-2-илиден) пента-1,3- диен-1-ил) -3H-индол-1-иум-5-сульфоната (19e)



Из соединения **18f** (34 мг, 0,032 ммоль), Sulfo-Cy5-alkyne (22 мг, 0,0304 ммоль), CuSO₄*H₂O (3 мг, 0,012 ммоль), NaAsc (7.2 мг, 0,036 ммоль) и ЭДТА (9 мг, 0,024 ммоль) получили соединение **19e** в виде темно-синего аморфного порошка с выходом 87% (47 мг).

Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 8.21 - 8.42 (м, 3 H), 8.05 (д, *J*=7.87 Hz, 1 H), 7.76 - 7.97 (м, 3 H), 7.63 (д, *J*=7.38 Hz, 2 H), 7.18 - 7.41 (м, 3 H), 6.90 - 7.17 (м, 3 H), 6.53 - 6.70 (м, 3 H), 6.18 - 6.41 (м, 2 H), 4.39 - 4.59 (м, 3 H), 4.24 (д, *J*=4.99 Hz, 6 H), 4.01 - 4.10 (м, 5 H), 3.10 - 3.18 (м, 1 H), 2.87 - 3.09 (м, 3 H), 2.76 - 2.81 (м, 1 H), 2.13 - 2.40 (м, 4 H), 2.02 - 2.12 (м, 1 H), 1.79 - 1.96 (м, 2 H), 1.55 - 1.69 (м, 10 H), 1.06 - 1.58 (м, 11 H).

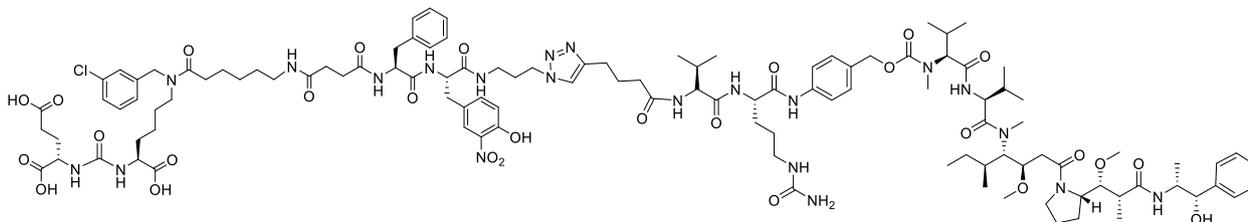
Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 174.50, 174.21, 173.78, 172.82, 172.19, 171.94, 171.57, 171.28, 171.05, 157.30, 155.80, 155.73, 154.24, 145.23, 144.99, 144.80, 142.77, 142.10, 141.22, 140.47, 133.04, 130.26, 129.97, 128.08, 128.02, 127.19, 126.07, 122.97, 119.88, 114.97, 114.87, 110.11, 103.68, 52.16, 51.66, 48.90, 46.89, 36.20, 34.93, 34.14, 31.76, 30.67, 29.91, 29.75, 29.05, 27.51, 27.12, 26.93, 26.28, 25.75, 24.85.

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, *t_R* = 13,4 мин.

ESI-HRMS: для C₈₅H₁₀₆ClN₁₃O₂₁S₂: *m/z* рассчитано для [M-2H]²⁻ 870.8325, найдено: 870.8305.

4.2.10. Синтез конъюгата с монометил ауристатмом E

(3S,7S,25S,28S)-25-бензил-33-(4-(4-(((R)-1-(((S)-1-(((4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R) -3-(((1S,2R) -1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксапропил)пирролидин-1-ил)-2-оксаэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триокса-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенил)амино)-1-окса-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксабутан-2-ил)-амино)-4-оксабутил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидрокси-3-нитробензил)-5,13,20,23,26,29-гексаокса-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоновой кислоты (20)



В смеси 10 мл диметилформаида и 3,5 мл деионизованной воды растворили модифицированный монометилауристин (60 мг, 0,049 ммоль), а также соединения **11** (57 мг, 0,052 ммоль). К полученному раствору прибавили $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 мг, 0,019 ммоль) и NaAsc (12 мг, 0,059 ммоль). Реакцию проводили в инертной атмосфере аргона, перемешивали раствор в течение 24 ч при комнатной температуре. После окончания реакции, добавили ЭДТА (15 мг, 0,0375 ммоль) и перемешивали 2 часа. Растворители упарили при пониженном давлении. Дальнейшую очистку проводили с помощью препаративной обращенно-фазовой хроматографии (градиент от 10/90 до 100/0 ацетонитрил/вода, в течение 20 минут, хроматографическая колонка Puriflash-C18-HP, 12 г, 15 мкм). Получили продукт **20** в виде белого аморфного вещества с выходом 37% (35 мг).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.) 10.77 (с, 1 H, OH), 9.99 (с, 1 H, OH), 8.18 - 8.37 (м, 1 H, NH), 8.15 (д, $J=5.93$ Hz, 1 H, NH), 8.09 (м, 1 H, NH), 7.87 (т, $J=9.71$ Hz, 1 H, Ar), 7.81 (с, 1 H, Ar), 7.75 (м, 1 H, Ar), 7.63 (д, $J=7.68$ Hz, 1 H, Ar), 7.56 (м., 1 H, Ar), 7.39 (д, $J=10.71$ Hz, 1 H, Ar), 7.28 (м., 3 H, Ar), 7.11 - 7.23 (м, 3 H, Ar), 7.02 (д, $J=8.88$ Hz, 1 H, Ar), 6.26 - 6.36 (м, 1 H, NHC(O)NH), 5.98 (с, 1 H, NHC(O)NH_2), 5.42 (с, 1H, NH_2) 5.03 (м, 1 H, $\text{CH}_2\text{C(O)O}$), 4.54 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.46 (с, 1 H, NCH_2Ar), 4.32 - 4.42 (м, 2 H, CH), 4.18 - 4.27 (м, 2 H, CH), 3.92 - 4.12 (м, 1 H, CH), 3.14 - 3.24 (м, 4 H, CH_2), 3.10 (м, 1 H, CH_2), 2.98 (д, $J=14.72$ Hz, 3 H, CH_2), 2.80 - 2.89 (м, 2 H, CH_2), 2.61 - 2.70 (м, 1 H, CH_2), 2.57 (т, $J=7.38$ Hz, 1 H, CH_2), 2.30 - 2.39 (м, 1 H, CH_2), 2.16 - 2.28 (м, 3 H, CH_2), 1.87 (м, 1 H, CH_2), 1.79 (м, 1 H, CH_2), 1.63 - 1.74 (м, 1 H, CH_2), 1.49 (м, 3 H, CH_3), 1.22 (м, 2 H, CH_3), 0.95 - 1.05 (м, 2 H, CH_2), 0.80 (м, 6 H, CH_3), 0.75 (м, 4 H, CH_2).

ВЭЖХ-МС: чистота 100%, $t_R = 7,6$ мин.

ESI-HRMS: для $\text{C}_{114}\text{H}_{164}\text{ClN}_{21}\text{O}_{28}$: m/z рассчитано для $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2309,16705, найдено: 2309,1781.

4.3. Биологические исследования *in vitro* / *in vivo*

4.3.1. *In vitro* исследование аффинности лигандов

LNCaP – андроген-чувствительная клеточная линия аденокарциномы человека, являются адгертными эпителиальными клетками, растут в виде агрегатов и одиночных клеток. ПСМА-положительные.

Клетки линии LNCaP культивировались в среде RPMI с 10% FBS (Gibco), 1xGlutamax (Gibco) и 1x смесью пенициллин-стрептомицин (Gibco). Для суспендирования клеток с 25 см² флакона убирали культуральную среду, промывали клетки буфером PBS и инкубировали 5 минут с 0,25% трипсином (1 мл). Трипсин инактивировали полной культуральной средой (2 мл), промывали PBS, переносили 10⁶ клеток в пробирку и добавляли 500 мкл лизирующего буфера (0,5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1x Proteinase Inhibition cocktail). Суспензию инкубировали 30 минут во льду и обрабатывали ультразвуком (7 раз по 7 секунд с интервалами 20-30 секунд) во льду во избежание перегрева. Центрифугировали 10 мин 1000g на 4°C и надосадочный раствор использовали в дальнейшем анализе.

Анализ ингибирования препаратами ПСМА проводился по нерадиоактивному протоколу с детекцией высвобождаемого в ходе реакции глутамата. Экстракт клеток линии LNCaP (10 µL) смешивался с 2 µL препарата соответствующего разведения. Для первичного тестирования использовалась серия разведений препаратов 2 нМ-100 мкМ с шагом разведения 3-5 раз. К полученной смеси добавлялся 1 µL 100 µМ раствора NAAG. Полученная смесь инкубировалась 2 часа при 37°C. После инкубации смесь разводилась вдвое реакционным буфером (13 µL) из набора Amplex Red Glutamic Acid Kit (Molecular Probes Inc., Eugene) и добавлялась многокомпонентная реакционная смесь для детекции глутамата, приготовленная в соответствии с протоколом производителя (26 µL). Рабочий раствор Amplex Red: 5 мкл Amplex® Red reagent stock solution, 1,25 мкл HRP stock solution, 8 мкл L-глутамат оксидазы, 2,5 мкл L-глутамат–пируват трансминаза, 0,5 мкл L-аланина, 483 мкл 1X реакционного буфера. Проводилась инкубация 1 час при 37°C. Флуоресценция резорурфина, полученного в результате сопряженных реакций глутаматдетектирующего набора детектировалась на планшетном мультidetекторе VICTORX5 (Perkin Elmer Inc.) при длине возбуждения 555 нм и детекции при 580 нм. В качестве контроля эндогенного уровня глутамата с заменой раствора NAAG на воду.

4.3.2. Моделирование связывания лигандов ПСМА

Моделирование связывания для ряда лигандов из новой серии проводили в программе Schrodinger Suite 2021-2 с использованием комплекса лиганд-белок 2XEG из базы PDB¹⁷⁷. Для выявления конкурирующих молекул воды были использованы несколько других записей из базы в PDB (2XEF, 2XEI, 4X3R, 3BI1, 5O5R, 5O5T, 5O5U, 6HKZ, 7BFZ). Минимизация энергии с силовым полем OPLS3 и предварительная обработка были выполнены с помощью Protein Preparation Wizard⁶⁶. Дополнительным условием была задана обязательная точка связывания в аминокгруппе боковой цепи лизина Lys699. Модель была проверена повторным моделированием эталонного соединения. Затем исследуемые структуры были оценены *in*

silico с использованием разработанной 3D модели. Моделирование проводили в программе Glide (Schrodinger Suite 2021-2)¹⁷⁸. Для анализа сохранялось до 50 позиций связывания. Лучшие из них были отобраны для визуального контроля и расчета оценочной энергии связывания.

Подготовка лигандов

Лиганды были подготовлены с использованием стандартных настроек программы LigPrep (Schrodinger Suite 2021-2).

Процедура моделирования

Моделирование связывания лигандов с ПСМА проводили с помощью Glide (Schrodinger Suite 2021-2)¹⁷⁹.

Количество позиций для начальной фазы моделирования и количество позиций для минимизации энергии было увеличено до 5000 и 50 соответственно. Кроме того, конформационная выборка была увеличена в 2 раза, а для всех predetermined функциональных групп была задана смещенная выборка торсионов. Для экспертного анализа было записано до 50 позиций связывания. После этого, позиции были отобраны на основе визуального анализа, а также рассчитанной оценочной энергии связывания.

Визуализация

Результаты докинга анализировали с помощью программного обеспечения UCSF Chimera версии 1.13.1¹⁸⁰.

4.3.3. *In vitro* и *in vivo* конъюгатов с флуоресцентными красителями

Проточная цитофлуориметрия

Клетки (LNCaP, 22Rv1 и PC-3) высевали в 12-луночный планшет (2×10^5 клеток на лунку в 800 мкл среды RPMI) и инкубировали в стандартных условиях в течение ночи. Затем клетки промывали средой RPMI, содержащей 1% фетальной бычьей сыворотки. Далее смесь из 720 мкл среды RPMI (1% FBS), содержащей 80 мкл анализируемого конъюгата в концентрации 40 мкМ (раствор ДМСО) добавляли в каждую лунку для достижения конечной концентрации 4 мкМ в лунке. Инкубацию проводили в стандартных условиях культуры в течение 30 мин. Контрольные образцы включали клетки, которые инкубировали со средой RPMI (1% FBS) с эквивалентным содержанием ДМСО в течение 30 минут. После инкубации клетки трижды промывали средой RPMI (1% FBS). Затем клетки трипсинизировали, а инактивация трипсина проводилась с помощью PBS, содержащего 10% FBS. Клетки центрифугировали, дважды промывали в PBS (10% FBS) и ресуспендировали в 500 мкл PBS. Затем проводилась исследование методом проточной цитометрии (Becton Dickinson FACSAria I). Для клеточной линии проводилось 3 итерации. Эксперимент также проводили с

частичным блокированием ПСМА (добавление избытка анализируемого лиганда), так и с использованием только с немодифицированного флуоресцентного красителя. Эксперименты с блокированием рецептора ПСМА проводились с избытком лиганда **I**. Для этого к клеткам добавляли 720 мкл среды RPMI среды (1% FBS), содержащей 400 мкМ (100-кратный избыток) немодифицированного флуоресцентной меткой лиганда; инкубацию проводили в стандартных условиях культивирования в течение 1 часа. Эксперимент по проточной цитометрии при пониженной температуре инкубации проводили аналогичным образом. Собранные клетки промывали PBS, диссоциировали с помощью 1× трипсина-ЭДТА (Gibco) и трижды промывали раствором PBS, содержащим 5% BSA. В общей сложности 4×10^5 клеток окрашивались **19b** L-Phe-L-Tyr-SulfoCy5, в одной из выбранных концентрациях (0, 50, 100, 200 или 400 нМ) в 5% растворе PBS, содержащем BSA при перемешивании при +4 °С в течение 1 ч. Клетки промывали три раза 5% раствором PBS, содержащим BSA, и суспендировали в растворе PBS. Проточная цитометрия проводилась на приборе MACSQuant, и анализ проводили с помощью программного обеспечения FlowJo.

Исследование цитотоксичности конъюгатов

Цитотоксичность конъюгатов проверяли с помощью МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтиазол-4-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) с некоторыми модификациями. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5000 клеток/140 мкл/лунку для LNCaP и 2500 клеток/140 мкл/лунку для PC-3) и инкубировали в CO₂-инкубаторе. На следующий день в клетки добавляли конъюгаты с концентрацией от 45 нМ до 100 мкМ. На пятый день добавляли 14 мкл раствора МТТ (исходная концентрация 0,5 г/л) и инкубировали клетки в CO₂-инкубаторе в темноте в течение 3-4 ч. Среда была удалена, а кристаллы формазана, образованные клетками, растворяли в 100 мкл ДМСО с последующим встряхиванием в течение 15 мин. Абсорбцию считывали при 590 нм на приборе VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Расчет CC50 проводили в программе GraphPad Prism.

Ксенотрансплантаты опухолей человека на мышинных моделях.

Все процедуры на животных проводились в строгом соответствии с Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях (EST 123) Страсбург, 1986 год. Самцы 6-8 недельного возраста породы Balb/c nude были приобретены у Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н. Н. Блохина. Мыши содержались в свободной от патогенов среде с контролем освещенности и влажности, пищу и воду получали *ad libitum*. Исследуемым мышам подкожно вводили в правый и левый бок раствор с 1×10^7 клетками 22Rv1 или PC-3 в 0,2 мл среды RPMI-1640 дополненной 0,2 мл матрицы Corning Matrigel (Corning, NY, USA) в общем

объеме 400 мкл. Как только средний объем опухоли достиг $\sim 100 \text{ мм}^3$ (22-й день), мышей случайным образом разделили на четыре группы: конъюгат **19b** (L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5, 5 мышей) и конъюгат **19c** (L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7, 4 мыши; Sulfo-Cy5-алкин, 5 мышей; Sulfo-Cy7-алкин, 5 мышей). Каждое тестируемое соединение вводилось в однократной дозе 250 нмоль/кг (0,449 мг/кг; доза 1Т). Все процедуры с животными были рассмотрены и одобрены комитетом по уходу и использованию животных Национальный медицинским исследовательским центром онкологии имени Н. Н. Блохина.

Исследование эффективности визуализации ксенотрансплантантов.

Конъюгаты **19b** и **19c**, а также немодифицированные Sulfo-Cy5-алкин и Sulfo-Cy7-алкин растворили в ДМСО (10 мкмоль/мл). Перед инъекцией раствор разбавляли физраствором до концентрации 50 нмоль/мл. Объем инъекции рассчитывался индивидуально для каждого животного пропорционально весу мыши (100 мкл инъекции на 20 г массы тела). Однократная инъекция (доза 1Т) составляла 250 нмоль/кг (0,449 мг/кг). Инъекция осуществлялась в хвостовую вену. Дальнейшая флуоресценция исследовалась с помощью визуализационной системы IVIS Spectrum CT со следующими фильтрами возбуждения/эмиссии: 605/660, 605/680, 605/700, 640/680, 640/700, 640/720, 640/740, 675/720, 675/740, 675/760 и 675/780 для **19b** L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy5 и 675/720, 675/740, 675/760, 675/780, 675/800, 710/760, 710/780, 710/800, 710/820, 710/840, 745/800, 745/820 и 745/840 для PSMA-SulfoCy7. Флуоресценцию исследовали через 30 мин, 1 ч, 8 ч и 24 ч после инъекции. Через 24 часа животных подвергали эвтаназии. Брюшину надрезали и исследовали на КТ IVIS Spectrum со следующими фильтрами возбуждения/эмиссии: 605/660, 605/680, 605/700, 640/680, 640/700, 640/720, 640/740, 675/720, 675/740, 675/760 и 675/780. Полученные изображения далее обрабатывались в программе Living Image 4.5 для спектрального разделения специфических каналов и каналов аутофлуоресценции. Исследование статистической значимости проводили с помощью теста Манна-Уитни с использованием программы GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

4.3.4. *In vitro* испытания конъюгата с монометил ауристатином E

Проведение тестов на цитотоксичность

При рутинном ведении клетки линии LNCaP (ПСМА-положительные), 22Rv1 (ПСМА-положительные), PC-3 (ПСМА-отрицательные), культивировали в среде RPMI без фенолового красного с 10% FBS (Gibco), 1xGlutamax (Gibco), 1 × смесью пенициллин-стрептомицин (Gibco), 1× смесью витаминов для RPMI среды. Клетки культивировали в матрасиках T25 в CO₂ инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C до достижения 80% конфлюэнтного монослоя.

Проведение МТТ-теста (3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил тетразолиум бромид - тест) был проведено в соответствии с методикой, опубликованной в статье Ferrari с соавторами. Через 24 часа после посева клеток к ним добавлялись химические препараты, разведенные в соответствующей культуральной среде. Для каждой концентрации препарата использовали три технических реплики. Далее клетки инкубировались 72 часа с препаратами при 37°C и 5%CO₂. Затем к клеткам прибавлялся МТТ до 0,5 г/л (использовался 10х кратный раствор в стандартном буфере PBS) и клетки инкубировались еще 2 часа. После инкубации среда отбиралась и осадок растворялся в 140 мкл ДМСО (ООО «Фармамед», Россия) в течении 15 минут при перемешивании на орбитальном шейкере (60 об/мин). Измеряли оптическую плотность каждой лунки при длине волны 565 нм. Каждый эксперимент проводился в трех репликах. Данные обрабатывали с помощью ПО —GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), строя зависимости доза-ответ и определяя СС₅₀.

5. Заключение

На основании работы можно сделать следующие выводы:

1. Оптимизированы методики получения дипептидных линкеров на основе производных фенилаланина и тирозина с/без заместителей с заднной 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 E -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.

6. Список литературы

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590
2. Barry MJ. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *Clin Pract.* 2001;344(18):1373-1377. doi:10.1097/PAT.0b013e32834915fc
3. Silberstein JL, Pal SK, Lewis B, Sartor O. Current clinical challenges in prostate cancer. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):122-136. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.03
4. Chekhonin V, Girkov Y. Prostatic specific membrane antigen and its role in prostate cancer diagnosis. *Quest Med Chem.* 2002;48:31-72.
5. Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(1):63-74. doi:10.1016/j.ctrv.2010.05.001
6. Jiao D, Li Y, Yang F, et al. Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated vasculature predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10(5):1-7. doi:10.14309/ctg.0000000000000041
7. Chen W, Lee Z, Awadallah A, Zhou L, Xin W. Peritumoral/vascular expression of PSMA as a diagnostic marker in hepatic lesions. *Diagn Pathol.* 2020;15(1):1-7. doi:10.1186/s13000-020-00982-4
8. Wernicke AG, Kim S, Liu H, Bander NH, Pirog EC. Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in the Neovasculature of Gynecologic Malignancies: Implications for PSMA-targeted Therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(4):271-276. doi:10.1097/PAI.0000000000000297
9. Mahzouni P, Shavakhi M. Prostate-Specific Membrane Antigen Expression in Neovasculature of Glioblastoma Multiforme. *Adv Biomed Res.* 2019;8(1):18. doi:10.4103/abr.abr_209_18
10. Queisser A, Hagedorn SA, Braun M, Vogel W, Duensing S, Perner S. Comparison of different prostatic markers in lymph node and distant metastases of prostate cancer. *Mod Pathol.* 2015;28(1):138-145. doi:10.1038/modpathol.2014.77
11. Evans JC, Malhotra M, Cryan JF, O'Driscoll CM. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *Br J Pharmacol.* 2016;173(21):3041-3079. doi:10.1111/bph.13576
12. Ahmadzadehfar H, Azgomi K, Hauser S, et al. 68Ga-PSMA-11 PET as a gatekeeper for the treatment of metastatic prostate cancer with 223Ra: Proof of concept. *J Nucl Med.* 2017;58(3):438-444. doi:10.2967/jnumed.116.178533
13. Choy CJ, Ling X, Geruntho JJ, et al. 177Lu-labeled phosphoramidate-based PSMA inhibitors: The effect of an albumin binder on biodistribution and therapeutic efficacy in prostate tumor-bearing mice. *Theranostics.* 2017;7(7):1928-1939. doi:10.7150/thno.18719
14. Pastorino S, Riondato M, Uccelli L, et al. Toward the Discovery and Development of PSMA Targeted Inhibitors for Nuclear Medicine Applications. *Curr Radiopharm.* 2019;13(1):63-79. doi:10.2174/1874471012666190729151540
15. Machulkin AE, Ivanenkov YA, Aladinskaya A V., et al. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. *J Drug Target.* 2016;24(8):679-693. doi:10.3109/1061186X.2016.1154564
16. Barinka C, Rojas C, Slusher B, Pomper M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Curr Med Chem.* 2012;19(6):856-870. doi:10.2174/092986712799034888
17. Ghosh A, Heston WDW. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004;91(3):528-539. doi:10.1002/jcb.10661
18. Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, et al. Prostate-specific Membrane Antigen: A Novel Folate Hydrolase in Human Prostatic Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9):1445-

- 1451.
19. Jackson PF, Cole DC, Slusher BS, et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated α -linked acidic dipeptidase. *J Med Chem.* 1996;39(2):619-622. doi:10.1021/jm950801q
 20. Kozela E, Wrobel M, Kos T, et al. 2-MPPA, a selective glutamate carboxypeptidase II inhibitor, attenuates morphine tolerance but not dependence in C57/Bl mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;183(3):275-284. doi:10.1007/s00213-005-0182-5
 21. Kozikowski AP, Nan F, Conti P, et al. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) [1]. *J Med Chem.* 2001;44(3):298-301. doi:10.1021/jm000406m
 22. Kularatne SA, Zhou Z, Yang J, Post CB, Low PS. Design, synthesis, and preclinical evaluation of prostate-specific membrane antigen targeted ^{99m}Tc -radioimaging agents. *Mol Pharm.* 2009;6(3):790-800. doi:10.1021/mp9000712
 23. Hillier SM, Maresca KP, Femia FJ, et al. Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. *Cancer Res.* 2009;69(17):6932-6940. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1682
 24. Zhang W, Slusher B, Murakawa Y, et al. GCPII (NAALADase) inhibition prevents long-term diabetic neuropathy in type 1 diabetic BB/Wor rats. *J Neurol Sci.* 2002;194(1):21-28. doi:10.1016/S0022-510X(01)00670-0
 25. Jackson P, Slusher B. Design of NAALADase Inhibitors A Novel Neuroprotective Strategy. *Curr Med Chem.* 2001;8(8):949-957. doi:10.2174/0929867013372797
 26. Barinka C, Byun Y, Dusich CL, et al. Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: Structural characterization. *J Med Chem.* 2008;51(24):7737-7743. doi:10.1021/jm800765e
 27. Guilarte TR, Hammoud DA, McGlothan JL, et al. Dysregulation of glutamate carboxypeptidase II in psychiatric disease. *Schizophr Res.* 2008;99(1-3):324-332. doi:10.1016/j.schres.2007.11.013
 28. Tykvart J, Schimer J, Bařinková J, et al. Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCPII) inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery. *Bioorganic Med Chem.* 2014;22(15):4099-4108. doi:10.1016/j.bmc.2014.05.061
 29. Petrov SA, Machulkin AE, Uspenskaya AA, et al. Polypeptide-Based Molecular Platform and Its Docetaxel/Sulfo-Cy5-Containing Conjugate for Targeted Delivery to Prostate Specific Membrane Antigen. *Molecules.* 2020;25(24):5784.
 30. Banerjee SR, Pullambhatla M, Shallal H, Lisok A, Mease RC, Pomper MG. A modular strategy to prepare multivalent inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Oncotarget.* 2011;2(12):1244-1253. doi:10.18632/oncotarget.415
 31. Shallal HM, Minn I, Banerjee SR, Lisok A, Mease RC, Pomper MG. Heterobivalent agents targeting PSMA and integrin- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. *Bioconjug Chem.* 2014;25(2):393-405. doi:10.1021/bc4005377
 32. Zhang D, Fourie-O'Donohue A, Dragovich PS, et al. Catalytic cleavage of disulfide bonds in small molecules and linkers of antibody-drug conjugates. *Drug Metab Dispos.* 2019;47(10):1156-1163. doi:10.1124/dmd.118.086132
 33. Kularatne SA, Venkatesh C, Santhapuram HKR, et al. Synthesis and biological analysis of prostate-specific membrane antigen-targeted anticancer prodrugs. *J Med Chem.* 2010;53(21):7767-7777. doi:10.1021/jm100729b
 34. Vlahov IR, Wang Y, Kleindl PJ, Leamon CP. Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part II: Folic acid conjugates of tubulysins and their hydrazides. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2008;18(16):4558-4561. doi:10.1016/j.bmcl.2008.07.041
 35. Henne WA, Doorneweerd DD, Hilgenbrink AR, Kularatne SA, Low PS. Synthesis and

- activity of a folate peptide camptothecin prodrug. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2006;16(20):5350-5355. doi:10.1016/j.bmcl.2006.07.076
36. Pillow TH, Sadowsky JD, Zhang D, et al. Decoupling stability and release in disulfide bonds with antibody-small molecule conjugates. *Chem Sci*. 2016;8(1):366-370. doi:10.1039/c6sc01831a
 37. Jain AK, Gund MG, Desai DC, et al. Mutual prodrugs containing bio-cleavable and drug releasable disulfide linkers. *Bioorg Chem*. 2013;49:40-48. doi:10.1016/j.bioorg.2013.06.007
 38. Wang Q, Guan J, Wan J, Li Z. Disulfide based prodrugs for cancer therapy. *RSC Adv*. 2020;10(41):24397-24409. doi:10.1039/d0ra04155f
 39. Barrett JC, Acar H, Mellas MJ, Tirrell M V. Peptides in immunoengineering. In: *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier Ltd; 2018:287-326. doi:10.1016/B978-0-08-100736-5.00011-9
 40. Ivanenkov YA, Machulkin AE, Garanina AS, et al. Synthesis and biological evaluation of Doxorubicin-containing conjugate targeting PSMA. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2019;29(10):1246-1255. doi:10.1016/j.bmcl.2019.01.040
 41. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis MR, Keith Roberts JDW. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New; 1994.
 42. Alas M, Saghaeidehkordi A, Kaur K. Peptide-Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy. *J Med Chem*. 2021;64(1):216-232. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01530
 43. Kitson SL, Quinn DJ, Moody TS, Speed D, Watters W, Rozzell D. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) – Biotherapeutic bullets. *Chem Today*. 2013;31(4):30-36.
 44. Ruan H, Hao S, Young P, Zhang H. Targeting cathepsin B for cancer therapies. *Horizons Cancer Res*. 2015;56:23-39.
 45. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics - Clin Appl*. 2014;8(5-6):427-437. doi:10.1002/prca.201300105
 46. Dubowchik GM, Firestone RA, Padilla L, et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug Chem*. 2002;13(4):855-869. doi:10.1021/bc025536j
 47. Carl PL, Chakravarty PK, Katzenellenbogen JA. A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design. *J Med Chem*. 1981;24(5):479-480. doi:10.1021/jm00137a001
 48. Wang S, Zhou R, Sun F, Li R, Wang M, Wu M. The two novel DLL4-targeting antibody-drug conjugates MvM03 and MGD03 show potent anti-tumour activity in breast cancer xenograft models. *Cancer Lett*. 2017;409:125-136. doi:10.1016/j.canlet.2017.09.004
 49. Bargh JD, Spring DR, Isidro-Ilobet A, Parker JS. Cleavable linkers in antibody–drug conjugates. *Chem Soc Rev*. 2019;48:4361-4374. doi:10.1039/c8cs00676h
 50. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2003;21(7):778-784. doi:10.1038/nbt832
 51. Pal A, Albusairi W, Liu F, et al. Hydrophilic Small Molecules That Harness Transthyretin to Enhance the Safety and Efficacy of Targeted Chemotherapeutic Agents. *Mol Pharm*. 2019;16:3237-3252. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00432
 52. Mease RC, Dusich CL, Foss CA, et al. N-[N-[(S)-1,3-dicarboxypropyl]carbamoyl]-4-[18F]fluorobenzyl-L- cysteine, [18F]DCFBC: A new Imaging probe for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):3036-3043. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1517
 53. Foss CA, Mease RC, Fan H, et al. Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: In vivo imaging in experimental models of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(11):4022-4028. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2690
 54. Rong SB, Zhang J, Neale JH, Wroblewski JT, Wang S, Kozikowski AP. Molecular modeling of the interactions of glutamate carboxypeptidase II with its potent NAAG-based inhibitors. *J Med Chem*. 2002;45(19):4140-4152. doi:10.1021/jm010561g

55. Kozikowski AP, Zhang J, Nan F, et al. Synthesis of Urea-Based Inhibitors as Active Site Probes of Glutamate Carboxypeptidase II: Efficacy as Analgesic Agents. *J Med Chem.* 2004;47(7):1729-1738. doi:10.1021/jm0306226
56. Chen Y, Foss CA, Byun Y, et al. Radiohalogenated Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) -Based Ureas as Imaging Agents for Prostate Cancer. 2008;51:7933-7943.
57. Yang X, Mease RC, Pullambhatla M, et al. Fluorobenzoyllysinepentanedioic Acid Carbamates: New Scaffolds for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *J Med Chem.* 2016;59(1):206-218. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01268
58. Scott PJH, Kilbourn MR. Determination of residual Kryptofix 2.2.2 levels in [18F]-labeled radiopharmaceuticals for human use. *Appl Radiat Isot.* 2007;65(12):1359-1362. doi:10.1016/j.apradiso.2007.04.020
59. Kommididi H, Guo H, Nurili F, Vedvyas Y, Jin MM, Ting R. 18F-Positron Emitting/Trimethine Cyanine-Fluorescent Contrast for Image-Guided Prostate Cancer Management. *J Med Chem.* 2018;61:4256-4262. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00240
60. Jayaprakash S, Wang X, Heston WD, Kozikowski AP. Design and Synthesis of a PSMA Inhibitor–Doxorubicin Conjugate for Targeted Prostate Cancer Therapy. *ChemMedChem.* 2006;1:299-302. doi:10.1002/cmdc.200500044
61. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem.* 2012;23(4):688-697. doi:10.1021/bc200279b
62. Mesters JR, Barinka C, Li W, et al. Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *EMBO J.* 2006;25(6):1375-1384. doi:10.1038/sj.emboj.7600969
63. Chen Y, Pullambhatla M, Banerjee. SR, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Low Molecular Weight Fluorescent Imaging Agents for the Prostate-Specific Membrane Antigen Ying. *Bioconjug Chem.* 2012;23(12):2377-2385. doi:10.1021/bc3003919
64. Ray Banerjee S, Pullambhatla M, Foss CA, et al. Effect of chelators on the pharmacokinetics of 99mTc-labeled imaging agents for the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J Med Chem.* 2013;56(15):6108-6121. doi:10.1021/jm400823w
65. Chen Y, Dhara S, Banerjee SR, et al. A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):624-629. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.017
66. Zhang AX, Murelli RP, Barinka C, et al. A Remote Arene-Binding Site on Prostate Specific Membrane Antigen Revealed by Antibody-Recruiting Small Molecules. *J AM CHEM SOC.* 2010;132:12711-12716. doi:10.1021/ja104591m
67. Kularatne SA, Zhou Z, Yang J, Post CB, Low PS. articles Design , Synthesis , and Preclinical Evaluation of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Tc-Radioimaging Agents. 2009;6(3):790-800.
68. Nedrow-byers JR, Moore AL, Ganguly T, et al. PSMA-Targeted SPECTAgents:Mode of Binding Effecton InVitroPerformance. *Prostate.* 2012;73(4):355-362. doi:10.1002/pros.22575
69. Dannoos S, Ganguly T, Cahaya H, et al. Structure-Activity Relationship of 18F-Labeled Phosphoramidate Peptidomimetic Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted Inhibitor Analogues for PET Imaging of Prostate Cancer. *J Med Chem.* 2016;59(12):5684-5694. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01850
70. Liu T, Nedrow-Byers JR, Hopkins MR, Berkman CE. Spacer length effects on in vitro imaging and surface accessibility of fluorescent inhibitors of prostate specific membrane antigen. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2011;21(23):7013-7016. doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.115
71. Davis MI, Bennett MJ, Thomas LM, Bjorkman PJ. Crystal structure of prostate-specific

- membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):5981-5986. doi:10.1073/pnas.0502101102
72. Harada N, Kimura H, Ono M, Saji H. Preparation of Asymmetric Urea Derivatives that Target Prostate-Specific Membrane Antigen for SPECT Imaging Preparation of Asymmetric Urea Derivatives that Target Prostate-Specific Membrane Antigen for SPECT Imaging. *J Med Chem*. 2013;56(20):7890-7901. doi:10.1021/jm400895s
 73. Green MA, Hutchins GD, Bahler CD, et al. [68Ga]Ga-P16-093 as a PSMA-Targeted PET Radiopharmaceutical for Detection of Cancer: Initial Evaluation and Comparison with [68Ga]Ga-PSMA-11 in Prostate Cancer Patients Presenting with Biochemical Recurrence. *Mol Imaging Biol*. 2020;22(3):752-763. doi:10.1007/s11307-019-01421-7
 74. Zha Z, Ploessl K, Choi SR, Wu Z, Zhu L, Kung HF. Synthesis and evaluation of a novel urea-based 68 Ga-complex for imaging PSMA binding in tumor. *Nucl Med Biol*. 2018;59:36-47. doi:10.1016/j.nucmedbio.2017.12.007
 75. Yao X, Zha Z, Ploessl K, et al. Synthesis and evaluation of novel radioiodinated PSMA targeting ligands for potential radiotherapy of prostate cancer. *Bioorganic Med Chem*. 2020;28(5):115319. doi:10.1016/j.bmc.2020.115319
 76. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med*. 2015;56(6):914-920. doi:10.2967/jnumed.114.147413
 77. Palomo JM. Solid-phase peptide synthesis: An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv*. 2014;4(62):32658-32672. doi:10.1039/c4ra02458c
 78. Coin I, Beyermann M, Bienert M. Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3247-3256. doi:10.1038/nprot.2007.454
 79. Wüstemann T, Bauder-wüst U, Schäfer M, et al. Design of Internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based Radiotherapeutics. *Theranostics*. 2016;6(8):1085-1095. doi:10.7150/thno.13448
 80. Kratochwil C, Giesel FL, Stefanova M, et al. PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with Lu-177 labeled PSMA-617. *J Nucl Med*. 2016;57(8):1170-1176. doi:10.2967/jnumed.115.171397
 81. Giesel FL, Hadaschik B, Cardinale J, Radtke J, Vinsensia M. F-18 labelled PSMA-1007 : biodistribution , radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016;44:678-688. doi:10.1007/s00259-016-3573-4
 82. Huang SS, Wang X, Zhang Y, Doke A, Difilippo FP, Heston WD. Improving the biodistribution of PSMA-targeting tracers with a highly negatively charged linker. *Prostate*. 2014;74(7):702-713. doi:10.1002/pros.22789
 83. Cramer H, Okicki JR, Rho T, Wang X, Silverman RH, Heston WDW. 2-5A ligands - A new concept for the treatment of prostate cancer. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2007;26(10-12):1471-1477. doi:10.1080/15257770701542652
 84. Yoshitake S, Yamada Y, Ishikawa E, Masseyeff R. Conjugation of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* and Rabbit Antibodies Using N-Hydroxysuccinimide Ester of N-(4-Carboxycyclohexylmethyl)-Maleimide. *Eur J Biochem*. 1979;101(2):395-399. doi:10.1111/j.1432-1033.1979.tb19731.x
 85. Koniev O, Wagner A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chem Soc Rev*. 2015;44(15):5495-5551. doi:10.1039/c5cs00048c
 86. Hillier SM, Kern AM, Maresca KP, et al. 123I-MIP-1072, a small-molecule inhibitor of prostate-specific membrane antigen, is effective at monitoring tumor response to taxane therapy. *J Nucl Med*. 2011;52(7):1087-1093. doi:10.2967/jnumed.110.086751

87. Chen Y, Pullambhatla M, Foss CA, et al. 2-(3-(1-carboxy-5-[(6-[¹⁸F]fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]-pentyl)-ureido)-pentanedioic acid, [¹⁸F]DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7645-7653. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1357
88. Banerjee SR, Pullambhatla M, Foss CA, et al. Cu-Labeled Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen for PET Imaging of Prostate Cancer. *J Med Chem.* 2014;57:2657-2669.
89. Malik N, Machulla HJ, Solbach C, Winter G, Reske SN, Zlatopolskiy B. Radiosynthesis of a new PSMA targeting ligand ([¹⁸F]FPy-DUPA-Pep). *Appl Radiat Isot.* 2011;69(7):1014-1018. doi:10.1016/j.apradiso.2011.03.041
90. Sengupta S, Krishnan MA, Pandit A, Dudhe P, Sharma R, Chelvam V. Tyrosine-based asymmetric urea ligand for prostate carcinoma: Tuning biological efficacy through in silico studies. *Bioorg Chem.* 2019;91:103154. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103154
91. Sengupta S, Krishnan MA, Dudhe P, et al. Novel solid-phase strategy for the synthesis of ligand-targeted fluorescent-labelled chelating peptide conjugates as a theranostic tool for cancer. *Beilstein J Org Chem.* 2018;14:2665-2679. doi:10.3762/bjoc.14.244
92. Philip Stewart LowVankatesh ChelvamYoungsoon Kim. Psma binding ligand-linker conjugates and methods for using. Published online 2011.
93. Baur B, Solbach C, Andreolli E, Winter G, Reske SN. Synthesis, Radiolabelling and In Vitro Characterization of the Gallium-68-, Yttrium-90- and Lutetium-177-Labelled PSMA Ligand, CHX-A''-DTPA-DUPA-Pep. *Pharm.* 2014;7(5):517-529. doi:10.3390/ph7050517
94. Machulkin AE, Uspenskaya AA, Ber AP, et al. Peptide agent comprising a urea derivative based PSMA-binding ligand, a method for preparing the same, and use for producing a conjugate with a drug and diagnostic agent. Published online 2019.
95. Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, et al. Ga- and Lu-labeled PSMA I & T : Optimization of a PSMA targeted theranostic concept and first proof of concept human studies. *J Nucl Med.* 2015;56(8):1169-1176. doi:10.2967/jnumed.115.158550
96. Okamoto S, Thieme A, Allmann J, et al. Radiation dosimetry for ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T in metastatic castration-resistant prostate cancer: Absorbed dose in normal organs and tumor lesions. *J Nucl Med.* 2017;58(3):445-450. doi:10.2967/jnumed.116.178483
97. Robu S, Schottelius M, Eiber M, Maurer T, Gschwend J, Wester HJ. Preclinical evaluation and first patient application of Tc - PSMA - I & S for SPECT imaging and radioguided surgery in prostate cancer. 2017;58(2):235-242. doi:10.2967/jnumed.116.178939
98. Wirtz M. Development of biomarkers for molecular imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. Published online 2015.
99. Wirtz M, Schmidt A, Schottelius M, et al. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity. *EJNMMI Res.* 2018;8(1):84.
100. Schmidt A. Structural modifications of PSMA ligands to optimize their pharmacokinetics. Published online 2017.
101. Schottelius M, Wurzer A, Wissmiller K, et al. Synthesis and preclinical characterization of the PSMA-targeted hybrid tracer PSMA-I&F for nuclear and fluorescence imaging of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2019;60(1):71-78. doi:10.2967/jnumed.118.212720
102. Rauscher I, Eiber M, Jilg CA, Gschwend JE, Maurer T. „PSMA-radioguided surgery“ beim lokal begrenzten Prostatakarzinomrezidiv: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Urologe.* 2017;56(1):18-23. doi:10.1007/s00120-016-0275-2
103. Matushita CS, da Silva AMM, Schuck PN, et al. ⁶⁸Ga-Prostate-specific membrane antigen (psma) positron emission tomography (pet) in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int Braz J Urol.* 2021;47(4):705-729. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2019.0817
104. Fakiri M El, Geis NM, Ayada N, Eder M, Eder AC. PSMA-targeting radiopharmaceuticals for prostate cancer therapy: Recent developments and future perspectives. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):1-30. doi:10.3390/cancers13163967
105. Wang X, Huang SS, Heston WDW, Guo H, Wang BC, Basilion JP. Development of targeted

- near-infrared imaging agents for prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(11):2595-2606. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0422
106. Petrov SA, Zyk NY, Machulkin AE, Beloglazkina EK, Majouga AG. PSMA-targeted low-molecular double conjugates for diagnostics and therapy. *Eur J Med Chem.* 2021;225:113752. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113752
 107. Gopolakrishnan, Wang J, Shan L, et al. Small Molecule-Based Prodrug Targeting Prostate Specific Membrane Antigen for the Treatment of Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(3):1-21.
 108. Biomedical E, Committee I, Dynamic E, et al. *Mathematics and Physics of Emerging Biomedical Imaging.*; 1996. doi:10.17226/5066
 109. Müller C, Fischer E, Behe M, et al. Future prospects for SPECT imaging using the radiolanthanide terbium-155 - production and preclinical evaluation in tumor-bearing mice. *Nucl Med Biol.* 2014;41(S):58-65. doi:10.1016/j.nucmedbio.2013.11.002
 110. Xu B, Shokeen M, Sudlow GP, et al. Utilizing the Multiradionuclide Resolving Power of SPECT and Dual Radiolabeled Single Molecules to Assess Treatment Response of Tumors. *Mol Imaging Biol.* 2015;17(5):671-679. doi:10.1007/s11307-015-0842-8
 111. Pimlott SL, Sutherland A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):149-162. doi:10.1039/b922628c
 112. Novartis. Novartis announces positive result of phase III study with radioligand therapy ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 in patients with advanced prostate cancer. Published 2021. <https://s3-adacap-product.s3.eu-west-1.amazonaws.com/wp-content/uploads/2021/03/23132605/Novartis-Media-Release-VISION-FIR-Positive-SCENARIO-March-2021-vFINAL-v2.pdf>
 113. Novartis. FDA grants Priority Review for investigational targeted radioligand therapy ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). Published 2021. <https://www.novartis.com/news/fda-grants-priority-review-investigational-targeted-radioligand-therapy-177lu-psma-617-patients-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer-mcrpc>
 114. Meißner S, Janssen JC, Prasad V, et al. Potential of asphericity as a novel diagnostic parameter in the evaluation of patients with ⁶⁸Ga-PSMA-HBED-CC PET-positive prostate cancer lesions. *EJNMMI Res.* 2017;7:1-12. doi:10.1186/s13550-017-0333-9
 115. Fendler WP, Ferdinandus J, Czernin J, et al. Impact of ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET on the Management of Recurrent Prostate Cancer in a Prospective Single-Arm Clinical Trial. *J Nucl Med.* 2020;61(12):1793-1799. doi:10.2967/jnumed.120.242180
 116. Calais J, Czernin J, Fendler WP, Elashoff D, Nickols NG. Randomized phase III trial of ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT molecular imaging for prostate cancer salvage radiotherapy planning [PSMA-SRT]. *BMC Cancer.* 2019;19(1):18. doi:10.1200/jco.2019.37.7_suppl.tps136
 117. FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer. News release. FDA. Published 2020. Accessed December 1, 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-psma-targeted-pet-imaging-drug-men-prostate-cancer>
 118. Lantheus Holdings I. Lantheus Receives U.S. FDA Approval of PYLARIFY® (piflufolostat F 18) Injection, the First and Only Commercially Available PSMA PET Imaging Agent for Prostate Cancer. Published 2021. Accessed May 27, 2021. <https://bwnews.pr/3p2wCKD>
 119. Schottelius M, Wirtz M, Eiber M, Maurer T, Wester HJ. [¹¹¹In]PSMA-I&T: expanding the spectrum of PSMA-I&T applications towards SPECT and radioguided surgery. *EJNMMI Res.* 2015;5(1):1-5. doi:10.1186/s13550-015-0147-6
 120. Maurer T, Weirich G, Schottelius M, et al. Prostate-specific Membrane Antigen-radioguided Surgery for Metastatic Lymph Nodes in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2015;68(3):530-534. doi:10.1016/j.eururo.2015.04.034

121. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, et al. ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA-targeted α-radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Nucl Med*. 2016;57(12):1941-1944. doi:10.2967/jnumed.116.178673
122. Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kürpig S, et al. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(11):12477-12488. doi:10.18632/oncotarget.7245
123. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Rathke H, et al. Targeted α-therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with ²²⁵Ac-PSMA-617: Dosimetry estimate and empiric dose finding. *J Nucl Med*. 2017;58(10):1624-1631. doi:10.2967/jnumed.117.191395
124. Müller C, Umbricht CA, Gracheva N, et al. Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(9):1919-1930. doi:10.1007/s00259-019-04345-0
125. Juzeniene A, Stenberg VY, Bruland ØS, Larsen RH. Preclinical and clinical status of psma-targeted alpha therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):1-25. doi:10.3390/cancers13040779
126. Jones AD, Wilton JC. Can intra-operative fluorescence play a significant role in hepatobiliary surgery? *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(9):1622-1627. doi:10.1016/j.ejso.2017.02.015
127. Fei X, Gu Y. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. *Prog Nat Sci*. 2009;19(1):1-7. doi:10.1016/j.pnsc.2008.06.004
128. Hemmer E, Benayas A, Légaré F, Vetrone F. Exploiting the biological windows: Current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horizons*. 2016;1(3):168-184. doi:10.1039/c5nh00073d
129. Ye S, Zhang H, Fei J, et al. A General Strategy to Control Viscosity Sensitivity of Molecular Rotor-Based Fluorophores. *Angew Chemie - Int Ed*. 2021;60(3):1339-1346. doi:10.1002/anie.202011108
130. Karimi A, Börner R, Mata G, Luedtke NW. A Highly Fluorescent Nucleobase Molecular Rotor. *J Am Chem Soc*. 2020;142(34):14422-14426. doi:10.1021/jacs.0c05180
131. Kopka K, Benešová M, Bařinka C, Haberkorn U, Babich J. Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: Lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J Nucl Med*. 2017;58:17S-26S. doi:10.2967/jnumed.116.186775
132. Zhang J, Rakhimbekova A, Duan X, et al. A prostate-specific membrane antigen activated molecular rotor for real-time fluorescence imaging. *Nat Commun*. Published online 2021:1-11. doi:10.1038/s41467-021-25746-6
133. Humblet V, Lapidus R, Williams LR, et al. High-affinity near-infrared fluorescent small-molecule contrast agents for in vivo imaging of prostate-specific membrane antigen. *Mol Imaging*. 2005;4(4):448-462. doi:10.2310/7290.2005.05163
134. Kularatne SA, Thomas M, Myers CH, et al. Evaluation of novel prostate-specific membrane antigen-targeted near-infrared imaging agent for fluorescence-guided surgery of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(1):177-187. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0803
135. Kelderhouse LE, Chelvam V, Wayua C, et al. Development of tumor-targeted near infrared probes for fluorescence guided surgery. *Bioconjug Chem*. 2013;24(6):1075-1080. doi:10.1021/bc400131a
136. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002;108(2):153-164. doi:10.1016/S0092-8674(02)00625-6
137. Altun İ, Sonkaya A. The most common side effects experienced by patients were receiving first cycle of chemotherapy. *Iran J Public Health*. 2018;47(8):1218-1219.
138. Brabec V, Hrabina O, Kasparkova J. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coord Chem Rev*. 2017;351(April):2-31. doi:10.1016/j.ccr.2017.04.013
139. Borré E, Dahm G, Guichard G, Bellemin-Laponnaz S. Post-functionalization of platinum-

- NHC complexes by oxime ligation for ligand targeted therapy. *New J Chem.* 2016;40(4):3164-3171. doi:10.1039/c5nj03104d
140. Rogers OC, Rosen DM, Antony L, et al. Targeted delivery of cytotoxic proteins to prostate cancer via conjugation to small molecule urea-based PSMA inhibitors. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-13. doi:10.1038/s41598-021-94534-5
 141. Adrain C, Duriez PJ, Brumatti G, Delivani P, Martin SJ. The cytotoxic lymphocyte protease, Granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem.* 2006;281(12):8118-8125. doi:10.1074/jbc.M509361200
 142. Theuer CP, Kreitman RJ, FitzGerald DJ, Pastan I. Immunotoxins Made with a Recombinant Form of Pseudomonas Exotoxin A That Do Not Require Proteolysis for Activity. *Cancer Res.* 1993;53(2):340-347.
 143. Van Vuuren RJ, Visagie MH, Theron AE, Joubert AM. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(6):1101-1112. doi:10.1007/s00280-015-2903-8
 144. Uspenskaya AA, Machulkin A, Mazhuga AG, Beloglazkina EK. Conjugates of Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands with Antitumor Drugs. *Pharm Chem J.* 2019;53(4):288-297. doi:10.1007/s11094-019-01994-1
 145. Boinapally S, Ahn HH, Cheng B, et al. A prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeted prodrug with a favorable in vivo toxicity profile. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-10. doi:10.1038/s41598-021-86551-1
 146. Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Khazanova E.S., Rybalov A.A., Pchelintsev S.O., Petrov S.A., Ber A.P., Zyk N.Yu, Ivanenkov Y.A., Skvortsov D.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Beloglazkina E.K., Mazhuga A.G. Machulkin A.E., Uspenskaya A.A., Khazanova E.S., MAG. Conjugate monomethyl auristatin E to obtain a composition for treatment of prostate cancer. Published online 2021.
 147. East JE, Carter KM, Kennedy PC, et al. Development of a phosphatase-resistant, l-tyrosine derived LPA1/LPA3 dual antagonist. *Medchemcomm.* 2011;2(4):325-330. doi:10.1039/c0md00273a
 148. Yamada K, Hashizume D, Shimizu T, Ohki S, Yokoyama S. A solid-state ¹⁷O NMR, X-ray, and quantum chemical study of N- α -Fmoc-protected amino acids. *J Mol Struct.* 2008;888(1-3):187-196. doi:10.1016/j.molstruc.2007.11.059
 149. Lundt BF, Johansen NL, Vølund A, Markussen J. REMOVAL OF t-BUTYL AND t-BUTOXYCARBONYL PROTECTING GROUPS WITH TRIFLUOROACETIC ACID: Mechanisms, Biproduct Formation and Evaluation of Scavengers. *Int J Pept Protein Res.* 1978;12(5):258-268. doi:10.1111/j.1399-3011.1978.tb02896.x
 150. Fields GB. Methods for Removing the Fmoc Group for Removing the Fmoc Group. 2014;35(June). doi:10.1385/0-89603-273-6
 151. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005;61(46):10827-10852. doi:10.1016/j.tet.2005.08.031
 152. Han SY, Kim YA. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron.* 2004;60(11):2447-2467. doi:10.1016/j.tet.2004.01.020
 153. Lygo B, Pelletier G. *1-Hydroxybenzotriazole*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013. doi:10.1002/047084289x.rh052.pub2
 154. Pearson DA, Blanchette M, Baker M Lou, Guindon CA. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1989;30(21):2739-2742. doi:10.1016/S0040-4039(00)99113-5
 155. Howl J. *Peptide Synthesis and Applications.*; 2005.
 156. Cleavage, Deprotection, and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis. *Appl Biosyst.* Published online 1998:1-12. doi:10.1038/srep37122
 157. Benoiton NL. *Chemistry of Peptide Synthesis.*; 2006.
 158. Konnert L, Lamaty F, Martinez J, Colacino E. Recent Advances in the Synthesis of

- Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chem Rev.* 2017;117(23):13757-13809. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00067
159. Guillier F, Orain D, Bradley M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem Rev.* 2000;100(6):2091-2157. doi:10.1021/cr980040+
 160. El-Faham A, Albericio F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev.* 2011;111(11):6557-6602. doi:10.1021/cr100048w
 161. Chatzi O, Barlos K, Gatos D, Stavropoulos G. 2-Chlorotrityl chloride resin: Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int J Pept Protein Res.* 1991;37(6):513-520. doi:10.1111/j.1399-3011.1991.tb00769.x
 162. Fujiwara Y, Akaji K, Yoshiaki K. Racemization-Free Synthesis of C-Terminal Cysteine-Peptide Using 2-Chlorotrityl Resin. *Chem Pharm Bull.* 1994;42(3):724-726. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
 163. Petrov SA, Machulkin AE, Uspenskaya AA, et al. Polypeptide-based molecular platform for targeted delivery of bimodal agents to PSMA receptor and its Docetaxel/Sulfo-Cy5-containing conjugate. *Molecules.* 2020;25(24):1-21.
 164. Chu TM, Murphy GP, Kawinski E, Mirand EA. Lncap model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983;43(4):1809-1818.
 165. Jemaa A Ben, Sallami S, Céraline J, Oueslati R. A novel regulation of PSMA and PSA expression by Q640X AR in 22Rv1 and LNCap prostate cancer cells. *Cell Biol Int.* 2013;37(5):464-470. doi:10.1002/cbin.10055
 166. Tai S, Sun Y, Squires JM, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate.* 2011;71(15):1668-1679. doi:10.1002/pros.21383
 167. Machulkin AE, Skvortsov DA, Ivanenkov YA, et al. Synthesis and biological evaluation of PSMA-targeting paclitaxel conjugates. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2019;29(16):2229-2235. doi:10.1016/j.bmcl.2019.06.035
 168. Tang W, Becker ML. “click” reactions: A versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates. *Chem Soc Rev.* 2014;43(20):7013-7039. doi:10.1039/c4cs00139g
 169. Ciuk AK, Lindhorst TK. Synthesis of carbohydrate-scaffolded thymine glycoconjugates to organize multivalency. *Beilstein J Org Chem.* 2015;11:668-674. doi:10.3762/bjoc.11.75
 170. Machulkin A, Uspenskaya A, Ber A, et al. Peptide agent comprising a urea derivative based PSMA-binding ligand, a method for preparing the same, and use for producing a conjugate with a drug and diagnostic agent. Published online 2019:RF patent 2697519.
 171. Senter PD, Sievers EL. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7):631-637. doi:10.1038/nbt.2289
 172. Liu Y, Bolen DW. The Peptide Backbone Plays a Dominant Role in Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes. *Biochemistry.* 1995;34(39):12884-12891. doi:10.1021/bi00039a051
 173. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging: Progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging. *Nat Biotechnol.* 2001;19(4):316-317. doi:10.1038/86684
 174. Tietze L. F. ET. *Preparative Organic Chemistry (in Rus)*. Mir, Moscow, Russia.; 1999.
 175. Wishart DS, Bigam CG, Yao J, et al. ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR.* 1995;6:135-140. doi:10.1007/bf00211777
 176. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR.* 1995;6(3):277-293. doi:10.1007/BF00197809
 177. Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

178. LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
179. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 2004;47(7):1739-1749. doi:10.1021/jm0306430
180. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084