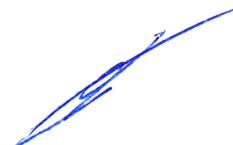


**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский химико-технологический университет  
имени Д. И. Менделеева»**

*На правах рукописи*



**Бейгуленко Дмитрий Владимирович**

**СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ ПАКЛИТАКСЕЛА С БИОТИНОМ И  
ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ САМОСОБИРАЮЩИХСЯ  
НАНОСТРУКТУР НА ИХ ОСНОВЕ**

1.4.16 – Медицинская химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание учёной степени**

**кандидата химических наук**

Москва 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1. Подходы к созданию систем адресной доставки паклитаксела.....	10
1.1.1. Паклитаксел: история открытия и получение .....	10
1.1.2. Механизм действия паклитаксела .....	13
1.1.3. Современные инъекционные лекарственные формы паклитаксела .....	14
1.1.4. Конъюгация как способ создания систем адресной доставки паклитаксела .....	16
1.2. Биотин как вектор для транспорта лекарственных веществ в опухоль .....	21
1.2.1. Абсорбция и распределение биотина .....	21
1.2.2. Роль биотина в клетке .....	22
1.2.3. Подходы к получению биотинилированных производных лекарственных веществ.....	23
1.3. Проблемы применения биотинилированных производных лекарственных веществ в клинической практике .....	27
1.4. Заключение по литературному обзору .....	29
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	30
2.1. Выявление принципиальной способности конъюгатов паклитаксела с биотином формировать самособирающиеся наночастицы.....	30
2.2. Оптимизация условий получения наночастиц на основе прямого конъюгата паклитаксела с биотином и оценка перспективности разработанного прототипа лекарственной формы .....	36
2.3. Оценка возможности включения коротких гидрофобных линкеров в состав конъюгатов паклитаксела с биотином .....	41
2.4. Синтез конъюгата со стимул-чувствительным линкером, получение наночастиц на его основе и оценка противоопухолевой активности .....	49
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	55
3.1. Материалы и реактивы.....	55
3.2. Общие методы.....	55
3.3. Синтетические методы.....	57
3.3.1. Синтез конъюгата <b>1</b> .....	57
3.3.2. Синтез конъюгата <b>2</b> .....	59
3.3.3. Синтез конъюгата <b>3</b> .....	68
3.3.4. Синтез конъюгата <b>4</b> .....	71

3.3.5. Синтез конъюгата 5.....	75
3.3.6. Синтез конъюгата 6.....	78
3.3.7. Синтез конъюгата 7.....	82
3.3.8. Синтез конъюгата 8.....	85
3.4. Изучение растворимости и липофильности .....	91
3.5. Получение наночастиц.....	92
3.6. Определение содержания конъюгата в образцах лиофилизата наночастиц и расчёт эффективности инкапсуляции .....	92
3.7. Оценка доступности биотина в составе наночастиц .....	93
3.8. Количественное определение поливинилового спирта в составе лиофилизата..	94
3.9. Оценка коллоидной стабильности наночастиц .....	96
3.10. Анализ гемолитической активности.....	96
3.11. Исследование цитотоксичности <i>in vitro</i> .....	97
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	103
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	117

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** В современной медицинской химии одними из приоритетных задач являются разработка и усовершенствование лекарственных веществ (ЛВ), предназначенных для борьбы с онкологическими заболеваниями. Так, паклитаксел (РТХ), являющийся ингибитором митоза и нашедший широкое применение в качестве химиотерапевтического агента, обладает высокой клинической эффективностью, однако его практическое применение ограничено токсическими эффектами (нейтропения, артралгия, мукозит, гепатотоксичность и др.) вследствие недостаточной избирательности по отношению к опухолевым клеткам [1]. Он также обладает низкой растворимостью в водных средах, поэтому с целью её повышения в состав существующих коммерческих форм РТХ и других таксанов вводят органические растворители и солюбилизаторы, которые способны вызывать нежелательные побочные эффекты, например, аллергические реакции [2, 3]. Конъюгация РТХ с гидрофильной молекулой, принимающей участие в метаболических процессах опухолевых клеток, может повысить селективность его действия. Биотин, являющийся водорастворимым витамином (В<sub>7</sub>/Н), принимает участие в глюконеогенезе, метаболизме аминокислот и биосинтезе жирных кислот, в связи с чем быстро пролиферирующие опухолевые клетки испытывают острую потребность в данном соединении [4, 5]. Как следствие, системы транспорта биотина гиперэкспрессированы в ряде опухолей человека (аденокарцинома молочной железы, лёгкого, толстой кишки, карцинома печени, шейки матки, яичников и др.) [6]. Эти особенности позволяют рассматривать биотин в качестве избирательного вектора, способного повысить селективность доставки РТХ в клетки злокачественных новообразований и, тем самым, привести к его более рациональному использованию в качестве химиотерапевтического агента. Помимо активного нацеливания на опухоль присоединение биотина к паклитакселу будет способствовать тому, что его конъюгат будет обладать способностью образовывать в воде самособирающиеся наночастицы (НЧ), что является перспективной лекарственной формой (ЛФ), потенциально лишённой необходимости применения в её составе различных солюбилизаторов и органических растворителей. Кроме того, наночастицы могут пассивно накапливаться в тканях злокачественного новообразования за счёт эффекта повышенной проницаемости и

удерживания (*англ.* enhanced permeability and retention, EPR), что дополнительно повышает шансы попадания терапевтического агента непосредственно в опухоль [7].

**Степень разработанности темы.** В мировой литературе описан подход к созданию адресных систем доставки ЛВ, предусматривающий их прямое присоединение к биотину. Получаемые таким образом конъюгаты способны эффективно накапливаться в опухолевых клетках, высвободить активное начало и, тем самым, приводить к их гибели. В частности, существуют примеры конъюгатов биотина с таксанами, представленные в литературе (Рисунок 1). Одним из недавних соединений данного типа является биотинилированное производное доцетаксела, которое продемонстрировало высокую противоопухолевую активность в исследованиях *in vivo* по сравнению с исходным таксаном [8]. Также описан конъюгат паклитаксела с биотином, содержащий линейный пептидный линкер [9]. Это соединение показало свою эффективность в стабилизации микротрубочек *in vitro*. Кроме того, известен ряд биотинилированных производных таксоида второго поколения SB-T-1214, содержащих редокс-чувствительный линкер и способных высвободить ЛВ в восстановительной среде цитозоля опухолевой клетки [10, 11]. Таким образом, конъюгаты таксанов и биотина обладают высоким потенциалом как перспективные химиотерапевтические средства. Тем не менее, авторами представленных работ [8–11] так и не была решена проблема малой растворимости таксанов и их конъюгатов с биотином. Однако даже если бы растворимость конъюгатов оказывалась высокой в водных средах, данные соединения могли бы выводиться через почки или накапливаться в печени, где происходит метаболизм биотина, а также подвергаться деградации в кровотоке. Более того, невозможным оказывалось бы пассивное накопление в опухоли таких конъюгатов за счёт EPR-эффекта. В связи с этим, перспективным выглядит создание стабильных самособирающихся коллоидных частиц на основе конъюгатов паклитаксела с биотином. Подобные наноструктуры, лишённые полимерного носителя, целиком будут представлены пролекарством химиотерапевтического агента. Такие НЧ были бы достаточно просты в получении, могли бы предохранять ЛВ от деградации и избирательно попадать в опухоль как за счёт пассивного, так и активного нацеливания.

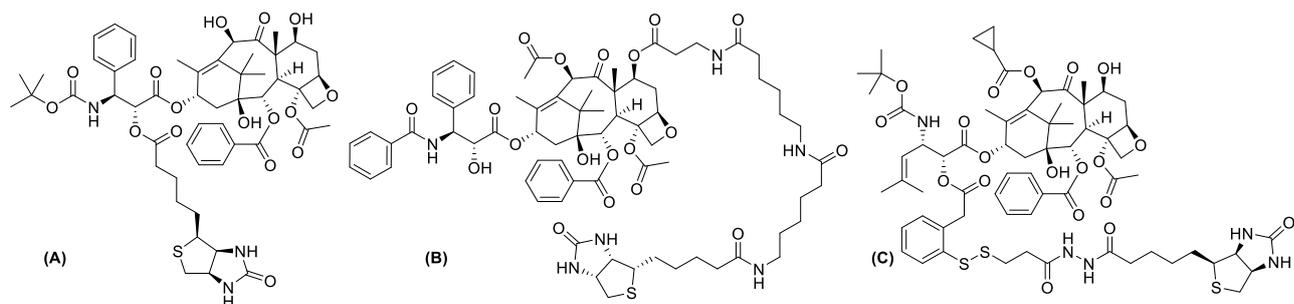


Рисунок 1 – Примеры ранее описанных конъюгатов биотина с доцетакселом (А), паклитакселом (В) и таксоидом второго поколения SB-T-1214 (С).

**Цель исследования** заключается в создании таргетированной системы доставки паклитаксела на основе коллоидно-стабильных наночастиц его конъюгата с биотином. Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Синтез новых конъюгатов паклитаксела с биотином, отличающихся длиной и типом линкера.
2. Выявление принципиальной способности конъюгатов паклитаксела с биотином формировать самособирающиеся наночастицы.
3. Оптимизация условий получения НЧ на основе конъюгата и оценка перспективности разработанного прототипа лекарственной формы.
4. Установление влияния природы линкера в составе конъюгатов на их возможность самоорганизации в водной среде, а также на ключевые характеристики получаемых на их основе НЧ.
5. Синтез конъюгата со стимул-чувствительным линкером, а также получение наночастиц на его основе.
6. Выбор наиболее перспективного типа конъюгата паклитаксела с биотином и сравнение с коммерческой лекарственной формой паклитаксела.

**Научная новизна.** Несмотря на активное развитие подходов к направленной доставке ЛВ, современные пути увеличения растворимости и селективности таксанов (в частности, паклитаксела), основанные на включении в состав наноразмерных полимерных (или иных) носителей и синтезе конъюгатов с макромолекулами (антитела, пептиды, аптамеры) имеют ряд недостатков, связанных с ограниченной биодоступностью, высокой стоимостью и сложностью производства, иммуногенностью (для антител) и ограниченной стабильностью в крови (макромолекулы могут подвергаться деградации в кровотоке) [12]. По сравнению с

получением макромолекулярных конъюгатов и полимерных НЧ, путь образования конъюгатов с биотином представляется более простой и экономически выгодной стратегией, сочетающей эффективную доставку через активно экспрессируемые в опухолевых клетках транспортёры биотина с потенциально низкой токсичностью, благодаря избирательному накоплению в опухоли вместе с отсутствием потенциальной ассоциированной с материалом-носителем токсичности. В рамках настоящего исследования были получены новые конъюгаты паклитаксела с биотином и продемонстрирована их принципиальная способность формировать самособирающиеся наночастицы. Впервые были получены коллоидно-стабильные наноразмерные структуры, образованные конъюгатами паклитаксела с биотином и оптимизирован способ их получения. Была впервые получена серия конъюгатов паклитаксела с биотином, различающихся длиной используемого линкера, исследована их способность формировать коллоидные структуры и свойства. Поскольку внедрение линкера не помешало конъюгатам с гидрофобным фрагментом образовывать НЧ в воде, то в дальнейшем впервые синтезирован конъюгат, содержащий тиоэфирный линкер, потенциально способный расщепляться под действием активных форм кислорода (АФК) и высвобождать РТХ внутри опухолевой клетки. В итоге разработан прототип лекарственной формы на основе представленного гибридного соединения.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в рамках исследования результаты обеспечат дальнейшее развитие систем адресной доставки ЛВ с использованием низкомолекулярных векторов для повышения эффективности химиотерапии и снижения побочных эффектов её применения. Разработанные в настоящей работе НЧ конъюгатов при сравнительной простоте получения могут послужить основой для дальнейшего создания новых лекарственных форм для химиотерапии онкологических заболеваний. Такие конъюгаты, ввиду своей потенциальной способности избирательно накапливаться в опухолях, клетки которых гиперэкспрессируют системы транспорта биотина, выделяются высокой избирательностью действия.

**Методология и методы исследования.** В диссертационном исследовании были использованы современные методы тонкого органического синтеза, большая часть из которых нацелена на формирование амидных и сложноэфирных связей. При очистке растворителей и выделении промежуточных и конечных веществ были использованы

классические методы, а именно перегонка при атмосферном и пониженном давлениях, экстракция, перекристаллизация, тритурация и нормально-фазовая колоночная хроматография (КХ). Аутентичность полученных соединений была подтверждена одномерной и двумерной гомо- и гетероядерной спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР) с ионизацией электрораспылением (ИЭР), спектроскопией в инфракрасной (ИК) области, а также высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографией. Наночастицы были получены способом наноосаждения, суть которого заключается в их образовании при медленном прибавлении раствора конъюгата в органическом растворителе, смешивающемся с водой, в водный раствор стабилизатора, предотвращающего агрегацию коллоидных структур. Для установления характеристик наноразмерных структур использованы следующие современные методы: динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС) — определение гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности (*англ.* polydispersity index, PDI) НЧ, электрофоретическое рассеивание света (ЭРС) — определение поверхностного  $\zeta$ -потенциала НЧ, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) — анализ морфологии наноразмерных структур, авидин-биотиновый (ГАБК-авидиновый, т.к. здесь применяется краситель 4'-гидроксиазобензол-2-карбоновая кислота (ГАБК)) — определение содержания доступного для взаимодействия с транспортёрами на поверхности клеток биотина в составе НЧ, спектрофотометрия — анализ содержания стабилизатора в составе лиофилизата НЧ. Для определения гемолитической активности наночастиц использован фотометрический тест, основанный на регистрации окисленных форм гемоглобина (гемихромов). Цитотоксическая активность НЧ конъюгатов ( $IC_{50}$ ) оценена с помощью стандартного колориметрического МТТ теста.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Синтез новых конъюгатов паклитаксела с биотином.
2. Установление принципиальной способности конъюгатов формировать в водных средах самособирающиеся наночастицы.
3. Оценка приемлемости включения в состав конъюгатов гидрофильных и гидрофобных линкеров.
4. Получение конъюгата паклитаксела с биотином со стимул-чувствительным тиоэфирным линкером.

5. Разработка и оценка возможности внутривенного введения прототипа инъекционной лекарственной формы на основе наночастиц конъюгата, содержащего стимул-чувствительный линкер.

6. Сравнение цитотоксичности разработанного прототипа лекарственной формы и известного коммерческого препарата на основе паклитаксела.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов достигнута применением современных физико-химических методов анализа как соединений, так и коллоидных структур, полученных на их основе. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего значения со среднеквадратическим отклонением (число повторений не менее трёх). Материалы диссертационной работы опубликованы в российских и иностранных научных журналах и представлены на XXX и XXXII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» и «Ломоносов-2025» (МГУ им. М. В. Ломоносова), а также на III, IV и V Школах молодых учёных с международным участием «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (РХТУ им. Д. И. Менделеева). Работа была непосредственно связана с выполнением грантов РФ (№ 25-73-00018 и № 23-25-00194) и государственного задания, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ (проекты FSSM-2025-0002 и FSSM-2022-0003).

**Личный вклад автора** состоит в разработке концепции диссертационного исследования, поиске и анализе литературы по тематике работы, разработке и осуществлении схем синтеза целевых соединений, пробоподготовке и интерпретации спектров ЯМР, МСВР (ИЭР), регистрации и анализе ИК спектров, анализе хроматограмм, полученных методами ВЭЖХ и ТСХ, получении коллоидных структур и определении их характеристик с помощью ДЛС, ЭРС, ГАБК-авидинового теста и спектрофотометрии.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Подходы к созданию систем адресной доставки паклитаксела

#### 1.1.1. Паклитаксел: история открытия и получение

Таксаны представляют собой класс природных алкалоидов, обладающих противоопухолевой активностью. Его основу составляют три соединения, а именно паклитаксел, доцетаксел и кабазитаксел (Рисунок 2). Одним из наиболее изученных представителей этой группы является паклитаксел (РТХ), который в настоящее время широко используется в терапии онкологических заболеваний [13–15].

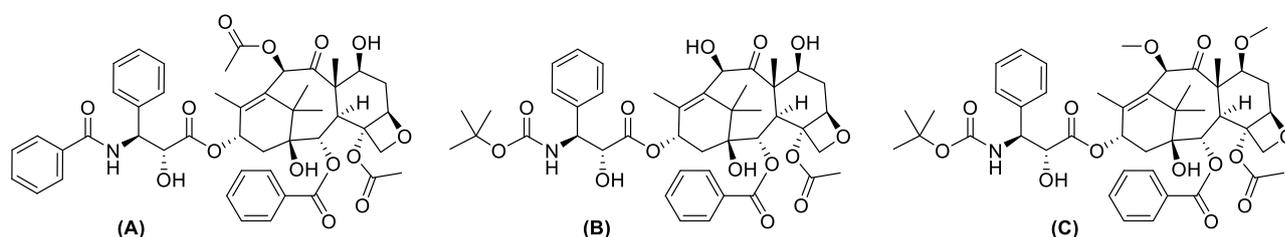
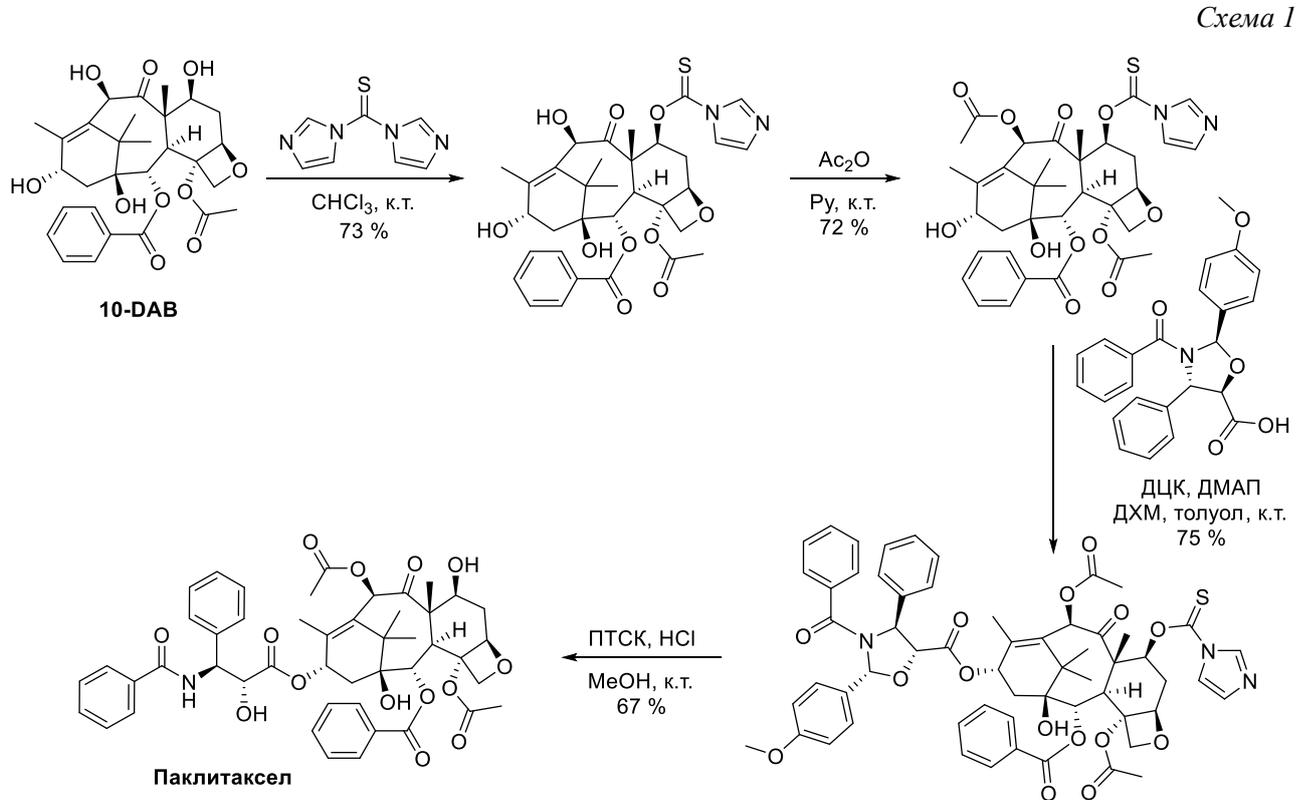


Рисунок 2 – Структурные формулы таксанов: паклитаксел (А), доцетаксел (В) и кабазитаксел (С).

В рамках программы Национального института рака США по поиску противоопухолевых средств в 1963 году было обнаружено, что сырой экстракт из коры тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia*) обладает цитотоксической активностью в отношении ряда линий опухолевых клеток. Дальнейшие исследования привели к выделению из этого экстракта паклитаксела в 1971 году. Однако, несмотря на высокую противоопухолевую активность данного соединения, его содержание в коре тиса оказалось крайне низким. Кроме того, тис является медленнорастущим деревом, а добыча коры для выделения паклитаксела наносила серьёзный ущерб окружающей среде [15, 16].

Необходимость решения экологических проблем, связанных с добычей паклитаксела из коры тиса, подтолкнула исследователей к разработке альтернативных способов получения данного ЛВ. В 1979 году был разработан полусинтетический метод производства РТХ из 10-деацетилбаккатина III (10-DAB) [17]. 10-DAB является природным предшественником паклитаксела и характеризуется более высоким содержанием в коре тиса по сравнению с целевым соединением. Использование бактериальных ферментов, таких как С-13 таксолаза и С-10 деацетилаза, позволяет эффективно преобразовать таксаны, присутствующие в хвое, ветвях и коре тиса, в

10-DAB. Последующие химические превращения позволяют получить паклитаксел из 10-DAB (Схема 1) [18]. Полусинтетический подход значительно снижает негативное воздействие на окружающую среду, поскольку он не требует массовой вырубке тисовых деревьев [19].



В 1993 году был описан *Taxomyces andreanae* — эндофитный гриб, обитающий на тисе, — в качестве потенциального природного источника паклитаксела [16]. Впоследствии эндофитные грибы других видов, такие как *Nodulisporium sylviforme*, *Metarhizium anisopliae*, *Alternaria taxi* и *Mucor rouxianus*, также рассматривались как возможные продуценты паклитаксела. Однако данные о способности этих грибов самостоятельно его синтезировать противоречивы. Некоторые исследования [20] ставят под сомнение возможность эндофитов продуцировать паклитаксел в значительных количествах. Помимо эндофитных грибов интерес представляют и бактерии, ассоциированные с тисом. В 1996 и 2000 годах были запатентованы методы выделения и культивирования эндофитных бактерий, способных продуцировать РТХ. Однако на данный момент этот подход находится на стадии исследования и требует дальнейшей проработки [20].

Одним из наиболее перспективных направлений получения паклитаксела является культивирование растительных клеток *in vitro*. Хотя культивирование клеток

*Taxus brevifolia* и позволяет получать паклитаксел, выход целевого продукта остаётся недостаточным для крупномасштабного производства даже при использовании стимуляторов биосинтеза, таких как метилжасмонат. В связи с трудностями генетической модификации клеток *Taxus* исследователи обратили внимание на другие растения-продуценты таксанов. Наиболее перспективным кандидатом на данный момент считается лещина обыкновенная (*Corylus avellana*) [21]. Содержание паклитаксела в лещине значительно ниже, чем в тисе, однако культивирование клеток лещины и их биотехнологическая модификация являются менее трудоёмкими процессами. Первоначально считалось, что наличие таксанов в лещине связано с присутствием эндофитных грибов. Однако дальнейшие эксперименты, проведённые в стерильных условиях, подтвердили способность клеток лещины самостоятельно продуцировать таксаны.

Последние исследования, направленные на оптимизацию производства паклитаксела в лещине, были проведены авторами публикации [22]. Они изучили влияние целых грибных элиситоров *Camarosporomyces flavigenus* (совместный клеточный экстракт и культуральный фильтрат) на выработку таксанов в культуре клеток *Corylus*. Данные элиситоры значительно повышали биосинтез и секрецию паклитаксела. Различные соотношения клеточных экстрактов и фильтратов тестировали с использованием 2,5, 5 и 10 % (об/об) количеств элиситоров соответственно — во всех случаях выявлен рост продукции паклитаксела. Однако выход полученного соединения оказался недостаточным, учитывая сложную подготовку и трудоёмкость работы с грибными элиситорами. Тем не менее, производство паклитаксела за счёт культуры растительных клеток *in vitro* остаётся актуальным вариантом, требующим дальнейшего изучения и расширения.

В 1992 году РТХ был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (*англ.* Food and drug administration, FDA) для лечения рака яичников и молочной железы с хорошими клиническими результатами [13, 23]. Несмотря на высокую противоопухолевую активность, разработка промышленного способа получения паклитаксела была довольно сложной. Одна из возникших проблем была связана с его низкой растворимостью в воде и с тем, что процесс выделения ЛВ из коры низкорослого и медленнорастущего дерева характеризовался крайне низким выходом [15]. Спрос на это соединение постоянно

возрастал, и в настоящее время оно считается одним из наиболее важных химиотерапевтических агентов, используемых в клинической практике для лечения рака яичников, молочной железы и лёгких, а также для лечения саркомы Капоши в сочетании с цисплатином [14].

### 1.1.2. Механизм действия паклитаксела

Паклитаксел — это противоопухолевое ЛВ, отличающееся от большинства цитостатических агентов своим механизмом действия. В отличие от других химиотерапевтических соединений, РТХ не взаимодействует напрямую с ядерными компонентами (ДНК и РНК) [15]. Его основная мишень — микротрубочки. РТХ не вызывает деполимеризацию микротрубочек, как это делают, например, производные колхицина [24]. Вместо этого он действует во время митотической фазы деления клетки, стимулируя полимеризацию белков тубулина и их сборку.

Микротрубочки — это динамические структуры, играющие важную роль в жизни эукариотических клеток. Они поддерживают форму клетки, транспортируют различные компоненты внутриклеточной среды, участвуют в клеточной сигнализации и формируют митотическое веретено во время деления клетки [16]. Структурно микротрубочки состоят из 13 продольно выравненных протофиламентов, каждый из которых, в свою очередь, образован гетеродимерами  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина. Микротрубочки имеют положительный (+) и отрицательный (–) концы, заканчивающиеся  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединицами тубулина соответственно.

Одной из главных особенностей микротрубочек является их способность к динамической нестабильности. Это означает, что они могут укорачиваться или удлиняться за счёт потери или добавления гетеродимеров  $\alpha/\beta$ -тубулина с концов микротрубочек — процесс, известный как "динамическая нестабильность" [24]. Она регулируется обменом гуанозинтрифосфата (ГТФ) и гуанозиндифосфата (ГДФ).  $\alpha$ -Субъединица тубулина необратимо связывается с ГТФ, что приводит к полимеризации микротрубочки, а  $\beta$ -субъединица тубулина может связываться с ГТФ или ГДФ, обуславливая полимеризацию или деполимеризацию микротрубочки соответственно. Положительный конец микротрубочки имеет более высокую динамическую активность, чем отрицательный. Благодаря этому митотические

микротрубочки постоянно полимеризуются на положительных концах и деполимеризуются на отрицательных.

Таксаны, включая РТХ, и другие микротубулостабилизирующие соединения способны связываться с  $\beta$ -субъединицей тубулина в просвете полимеризованных микротрубочек. Это приводит к подавлению микротубулярной динамики и стабилизации микротрубочек. В результате митоз прерывается, клетки накапливаются в фазе G<sub>2</sub>/M клеточного цикла, что препятствует их делению и, следовательно, пролиферации [25].

Воздействие микротубулостабилизирующих соединений на микротрубочки не только влияет на клеточный цикл, но и вызывает изменения в сигнальных путях, таких как апоптоз. Несмотря на видимые морфологические изменения, точный механизм клеточной гибели, вызываемой РТХ, до конца не изучен. Он зависит от концентрации ЛВ и времени его воздействия. Кроме того, РТХ может вызывать гибель клеток независимо от митоза. Он связывается с белком Bcl-2, регулирующим апоптоз, и индуцирует его фосфорилирование, что в результате сложного процесса также приводит к гибели клеток. Стоит отметить, что РТХ связывается с Bcl-2 хуже, чем с тубулином.

### **1.1.3. Современные инъекционные лекарственные формы паклитаксела**

Паклитаксел, как уже отмечалось ранее, является одним из наиболее широко используемых противоопухолевых ЛВ в клинической практике для лечения рака яичников, рака молочной железы, немелкоклеточного рака лёгких, саркомы Капоши, рака поджелудочной железы и рака желудка. Парентеральная лекарственная форма РТХ (Таксол®, 1992) в качестве основного солюбилизатора содержит полиэтиоксилированное касторовое масло, обладающее рядом нежелательных побочных эффектов, среди которых отмечаются аллергические реакции, жировая эмболия и неврологические осложнения [26, 27]. Использование РТХ в терапии онкологических заболеваний крайне ограничено из-за малой растворимости, быстрого выведения из крови, неспецифического распределения и токсичности, вызванной сорастворителем (Кремофор® EL).

Одним из подходов к созданию инъекционных форм таксанов с улучшенным профилем токсичности, в частности, РТХ является его включение в состав наночастиц

различной природы [28, 29]. Форма РТХ на основе альбумина — Nab™-паклитаксел (Абраксан®), — была одобрена FDA в 2005 году для лечения метастатического рака молочной железы (РМЖ). Абраксан® вызывал меньше аллергических реакций из-за отсутствия органических растворителей, а также более короткую продолжительность невропатии и более высокую эффективность по сравнению с традиционными ЛФ таксанов на основании клинических испытаний (КИ) [30].

Получение мицелл является известной стратегией солюбилизации труднорастворимых веществ, используемой при получении, например, лекарственных препаратов паклитаксела, использующихся в клинической практике: препараты Genexol-PM® (мицеллярная форма паклитаксела на основе блок-сополимера полиэтиленгликоля и полимолочной кислоты, Synviloq, Samyang Biopharmaceuticals, одобрена в Южной Корее в 2007 г.), Paclikal® (мицеллярная форма паклитаксела на основе натриевых солей метилового эфира ретиноил-*L*-цистеиновой кислоты, одобрена в России и Казахстане) [31]. Липосомальная форма паклитаксела Lipusu® продемонстрировала высокую эффективность при немелкоклеточном раке лёгких в качестве терапии первой линии и одобрена Государственным управлением по контролю за продуктами и лекарствами Китая в 2003 году [32]. Концентрат для инъекций паклитаксела в виде нанодисперсии — лекарственный препарат, разработанный компанией Sun Pharma Advanced Research Company (SPARC Ltd.), состоит из самоорганизующихся НЧ паклитаксела, стабилизированных полимерной и липидной смесью (поливинилпирролидон, сульфат холестерина, каприловая кислота) (одобрена в Индии) [33]. В настоящее время основными препаратами на рынке лекарственных форм РТХ являются Таксол®, Абраксан®, Lipusu®. Кроме того, на момент 2023 года 6 препаратов РТХ проходили клинические испытания [34]. Среди них формы на основе систем доставки — мицеллярная форма PEG-PASA (NK105, III фаза КИ), которая представляет собой полимерную мицеллярную наночастицу «ядро-оболочка», состоящую из гидрофильного полиэтиленгликоля и гидрофобного полиаспартата, с включенным паклитакселом [35]. Липосомальные формы EndoTAG-1 (катионные липосомы на основе DOPC и DOTAP) [36] и LEP-ETU (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, холестерин, тетрамиристоил кардиолипин, сукцинат *d*- $\alpha$ -токофероловой кислоты) [37] в КИ II фазы продемонстрировали лучшую переносимость, чем Таксол®. Помимо систем доставки на основе НЧ в КИ также изучаются формы на основе

конъюгатов паклитаксела с векторными молекулами или макромолекулами: конъюгат РТХ и пептидного вектора Ангиопеп-2 для доставки через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (ANG1005, II / III фазы КИ) [38], конъюгат РТХ и докозагексаеновой кислоты (Тахорprexin®, II/III фазы КИ) [39], конъюгат РТХ и поли-*L*-глутаминовой кислоты (СТ-2103, II/III фазы КИ) (ХУОТАХ™) [40].

#### 1.1.4. Конъюгация как способ создания систем адресной доставки паклитаксела

Модификация структуры РТХ является одним из перспективных направлений решения проблемы его плохой растворимости в воде и низкой селективности, серьёзно ограничивающей применение данного ЛВ. Базовая структура РТХ состоит из четырёх ненасыщенных циклов А–D, а также включает три ароматических цикла (Рисунок 3). Структурный и конформационный анализ показал, что модификации бензольного кольца у атома С-3' и оксетанового цикла D в структуре РТХ приводят к потере физиологической активности химиотерапевтического агента. Напротив, модификация спиртовых групп по положениям С-2' (в случае возможности гидролиза связи в организме) и С-7 не приводит к снижению активности ЛВ, поэтому вышеуказанные сайты считаются наиболее подходящими для структурной модификации [34].

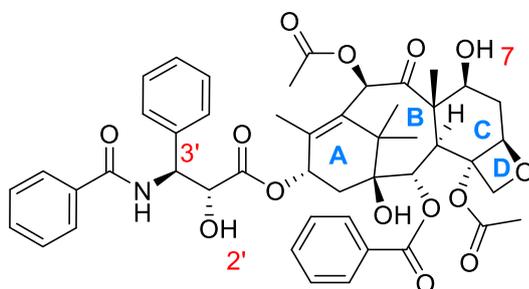


Рисунок 3 – Основные структурные элементы паклитаксела.

Гидроксильная функция РТХ в положении С-7 может быть использована для присоединения небольших групп без потери его физиологической активности. В частности, известно, что конъюгация РТХ с флуоресцентными красителями ксантенового ряда по С-7 спиртовой группе не препятствует его способности связываться с тубулином [41]. Такие соединения известны под названием «Flutax» и нашли применение для визуализации веретена деления (микротрубочек) (Рисунок 4). Производное паклитаксела, меченое биотином через длинный пептидный линкер по сайту С-7, в исследованиях *in vitro* аналогично предыдущему примеру не утрачивало своей способности связываться с тубулином [19]. В литературе также представлен

конъюгат паклитаксела с фолиевой кислотой и красителем «Синий Эванс» (FA-РТХ-ЕВ) [Shan L., 2018], который синтезировали в несколько этапов. Сначала присоединяли цистеин к спиртовой группе РТХ в положении С-7, после чего по свободной аминогруппе проводили конъюгацию с фолиевой кислотой, а по сульфгидрильной функции присоединяли производное красителя. Установлено, что благодаря наличию фолатных рецепторов на опухолевых клетках, конъюгат FA-РТХ-ЕВ обладал направленным действием и пролонгированным временем циркуляции препарата в организме, благодаря высокому сродству Синего Эванса к эндогенному сывороточному альбумину. При этом такая модификация РТХ по С-7 спиртовой группе не мешала ему проявлять цитостатический эффект.

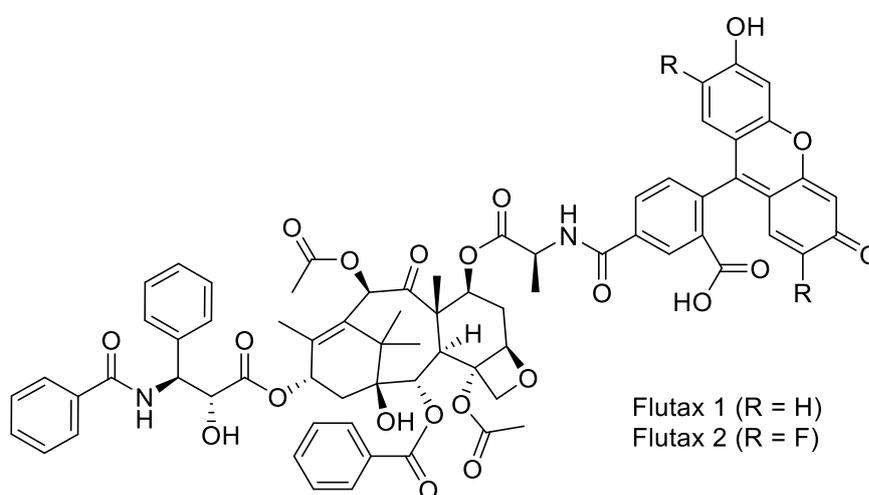


Рисунок 4 – Структурная формула Flutax.

Модификации спиртовой группы в положении С-2' является более широко используемой стратегией получения производных РТХ. Однако следует учитывать, что введение заместителей по представленному положению приводит к потере активности ЛВ *in vitro*, поскольку свободная гидроксильная группа необходима для связывания РТХ с тубулином [43, 44]. Поэтому конъюгаты, полученные модификацией РТХ по спиртовой группе в положении С-2', должны иметь возможность высвободить активное начало в опухолевой клетке, например, за счёт взаимодействия с определёнными ферментами или АФК [45]. Иными словами, физиологически активные конъюгаты РТХ с малыми молекулами и высокомолекулярными соединениями по данному сайту следует «проектировать» как пролекарства.

Системы адресной доставки паклитаксела могут быть получены посредством его присоединения к полимеру-носителю, который может быть как гидрофильным (водосовместимая форма), так и гидрофобным (для получения полимерных НЧ). При

этом во втором случае следует учитывать, что, когда молекулярная масса привитого высокомолекулярного соединения слишком велика, экранирование полимером гидролизуемой связи может затруднить контакт связывающего фрагмента (линкера) в составе конъюгата с ферментами, что приведёт к невозможности высвобождения РТХ из пролекарства. Подход к модификации РТХ гидрофильными полимерами в положении С-2' позволяет не только повысить его растворимость в воде, но и улучшить специфичность ЛВ, а также увеличить его период полувыведения. Так, в работе [46] был получен конъюгат паклитаксела с гиалуроновой кислотой, модифицированный N-ацетилцистеином, для улучшения как растворимости ЛВ, так и пероральной биодоступности, что удалось достигнуть благодаря адгезии муцина (белок на поверхности клеток пищеварительного тракта). Кроме того, за счёт сродства гиалуроновой кислоты к рецепторам CD44, которые высоко экспрессируются некоторыми опухолевыми клетками, например, РМЖ MCF-7, удавалось повысить избирательность действия химиотерапевтического агента. В работе [47] был получен конъюгат паклитаксела с докозагексаеновой кислотой (*англ.* docosahexaenoic acid, ДНА), которая не только оказывает синергическое противоопухолевое действие совместно с РТХ, но также может распознаваться рецепторами GPR40 и GPR120, которые высоко экспрессируются на поверхности опухолевых клеток. При этом объединяли аминокислоты полиамида РАМАМ с карбоксильной группой ДНА, а затем проводили реакцию РАМАМ с гидроксильной группой С-2' РТХ с образованием конъюгата. Тем не менее, до сих пор работа по такого рода модификации РТХ всё ещё находится в стадии активного развития.

Конъюгация таксанов с молекулой-вектором, способным направлять терапевтический агент непосредственно в опухоль, в частности, с антителами и пептидными векторами (в том числе аптамерами), также активно исследуется. Системы доставки на основе антител стали бурно развиваться в начале 21 века, на данный момент уже насчитываются несколько клинически одобренных препаратов на основе конъюгатов типа «ЛВ-антитело», используемых, как правило, для терапии гематологических онкопатологий (инотузумаб озогамидин, полатузумаб ведотин, моксетумомаб пасудотокс и др.) [48]. Тем не менее, основными проблемами препаратов, полученных загрузкой ЛВ в носитель или его присоединением к антителу, являются малое содержание противоопухолевого соединения в составе наночастицы

(по большей части масса НЧ представлена полимерным (или иной природы) носителем) или конъюгата (масса антитела существенно превышает массу присоединённых к нему молекул лекарственного вещества), а также дороговизна носителя и потенциальное нанесение вреда окружающей среде [49, 50]. Поэтому нельзя игнорировать такие ограничения, как высокая стоимость и неизбежная иммуногенность из-за их относительно больших структур. Более того, некоторые исследователи отмечают сложность присоединения таксанов, в частности, паклитаксела к антителам ввиду сильной гидрофобности данного ЛВ и, как следствие, коллоидной нестабильности конъюгатов и их высокой вероятности агрегации [51].

Конъюгаты пептидного аптамера с паклитакселом, полученные посредством их ковалентного соединения через линкер, представляют собой многообещающую альтернативу. По сравнению с конъюгатами антитело–паклитаксел, конъюгаты пептидный аптамер–паклитаксел обладают рядом преимуществ, включая меньший размер, более низкую иммуногенность, улучшенное проникновение в ткани и более простое получение [12]. Так, в *in vivo* исследованиях на мышах C57BL/6 с метастазами в лёгких В16-F10 показана способность конъюгата РТХ с А5G27 (небольшой пептид, который специфически связывается с CD44) значительно подавлять рост опухоли и метастазирование [52]. Среди аптамеров, описанных в литературе для создания конъюгатов с паклитакселом, можно выделить Ангиопеп-2 (связывается с рецептором липопротеинов низкой плотности LRP1) [38], пептиды, содержащие фрагмент состава «аргинин-глицин-аспарагиновая кислота» (RGD, проявляют высокое сродство к интегрину  $\alpha_v\beta_3$ ) [53], пептид NGR (нацелен на нейропилин-1, который высоко экспрессируется при раке яичников, молочной железы, простаты и поджелудочной железы) [54], тир-3-октреотид (нацелен на рецептор соматостатина типа 2, SSTR2) [55], а также лиганды, нацеленные на рецептор эпидермального фактора роста и трансферриновый рецептор. Тем не менее, терапевтическое использование пептидов сталкивается с трудностями из-за их метаболической нестабильности *in vivo* — они уязвимы к деградации различными протеолитическими ферментами из-за амидных связей в их последовательностях, что требует дополнительных стратегий их защиты от распада [12].

Малые молекулы также могут быть присоединены к паклитакселу для увеличения растворимости и селективности. Конъюгаты малых молекул с

лекарственными веществами обычно состоят из низкомолекулярных лигандов, цитотоксических молекул и линкеров. При этом типичные низкомолекулярные лиганды включают производные фолиевой кислоты, нацеленные на рецепторы фолата, аналоги соматостатина, нацеленные на его рецепторы, и некоторые ароматические сульфонамиды, нацеленные на карбоангидразу IX [56]. Например, конъюгат паклитаксела с  $\alpha$ -липоевой кислотой (витамин N, IDD-1040) показал лучшую эффективность, чем свободный паклитаксел [57]. Получение конъюгатов лекарственных веществ с витаминами, активно задействованными в метаболических процессах в опухолевых клетках и выступающими в роли векторов является одной из стратегий таргетной терапии [58]. К таким водорастворимым витаминам относятся витамины группы B: витамин B<sub>9</sub> (фолиевая кислота), витамин B<sub>12</sub> (цианокобаламин и другие его формы), витамин B<sub>7</sub> (биотин). Витамин-опосредованная направленная доставка ЛВ — это активно развивающаяся область. Привлекательность таких систем обусловлена их пониженной токсичностью, а также способностью эффективно проникать в опухолевые клетки благодаря тому, что при интенсивной пролиферации они активно потребляют витамины. Кроме того, витамин-опосредованная доставка минимизирует системную токсичность ЛВ, может обеспечивать его стабильность в кровотоке и направленную активность без существенного воздействия на нормальные клетки, что минимизирует побочные эффекты [58]. Подобные системы для доставки также разработаны для различных ЛВ, в том числе и для таксанов, и встречаются в научной литературе.

Среди водорастворимых витаминов перспективным выглядит применение в качестве вектора витамина B<sub>12</sub>, о чём подробно изложено в опубликованной ранее обзорной статье по данной тематике [59]. Однако кобаламины имеют достаточно сложную структуру, которую трудно избирательно модифицировать по определённым сайтам, позволяющим конъюгатам всё так же связываться с транспортными белками. Фолиевая кислота, как и рибофлавин, также имеют несколько реакционноспособных групп, поэтому синтез конъюгатов на их основе также сопряжён с определёнными трудностями. Биотин же выгодно отличается простотой химической структуры, что сделало его одним из наиболее доступных и нашедших широкое применение в получении таргетных систем доставки лекарственных веществ [60].

## 1.2. Биотин как вектор для транспорта лекарственных веществ в опухоль

### 1.2.1. Абсорбция и распределение биотина

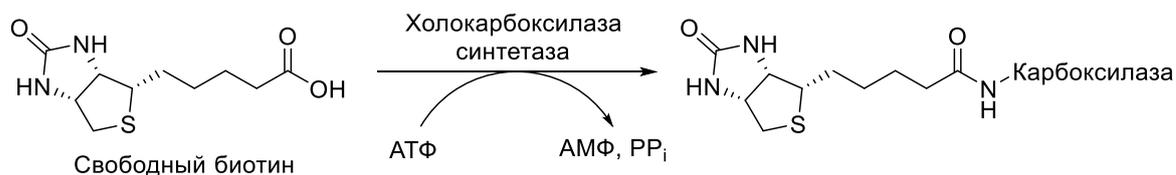
Биотин, известный также как витамин В<sub>7</sub> или Н, играет важную роль в поддержании жизнеспособности клеток. Поскольку биосинтез биотина не протекает в организме человека (как и других млекопитающих), то существует необходимость получать представленный витамин из внешних источников [61]. Биотином богаты продукты питания, как правило, животного происхождения. Наибольшее содержание данного соединения обнаружено в приготовленной куриной и говяжьей печени, яичном желтке и лососе, при этом из растительных источников можно отметить арахис, семена подсолнечника и миндаль [62]. В продуктах питания биотин, в основном, находится в связанном с белками виде. Ключевую роль здесь играет амидная связь, образованная между боковой цепью остатков лизина в макромолекулах и карбоксильной группой витамина, что не позволяет ему эффективно усваиваться организмом человека.

При попадании в желудочно-кишечный тракт белки, содержащие остатки биотина, сначала подвергаются воздействию протеолитических ферментов в желудке, что приводит к образованию биоцитина — аддукта биотина и аминокислоты *L*-лизин ( $\epsilon$ -биотиноил-*L*-лизин) (Схема 2) [61]. Это соединение, в свою очередь, разрушается под действием содержащейся в панкреатическом соке биотинидазы — фермента, способного расщеплять амидную связь в биоцитине и приводить к высвобождению биотина [61, 63, 64]. В таком виде витамин В<sub>7</sub> подвергается всасыванию в тонком кишечнике, при этом процесс носит натрий-зависимый характер. Нельзя не отметить также существенный вклад микрофлоры толстой кишки в биосинтез значительных количеств биотина. Как следствие, данная часть желудочно-кишечного тракта также принимает участие в абсорбции витамина В<sub>7</sub>. После всасывания биотин по большей части в свободном виде распределяется по кровотоку [65]. При нормальном физиологическом значении рН 7,4 биотин существует в форме аниона, поскольку его рК<sub>а</sub> составляет около 4,5. Иммуногистохимические исследования на курах и свиньях показали, что данное соединение обнаруживается во многих тканях обоих видов, включая печень, почки, поджелудочную железу, жировую ткань, надпочечники, яички, головной мозг, сосудистое сплетение, сердечные и скелетные мышцы, эпителий дыхательной и пищеварительной систем, кожу и лимфоидную ткань [66]. В биотине



через двухступенчатую, АТФ-зависимую реакцию, в ходе которой происходит ковалентное присоединение молекулы биотина к остаткам лизина в карбоксилазах, расположенным в высококонсервативном домене, общему для всех биотинзависимых карбоксилаз (Схема 3). Холокарбоксилаза синтетаза присутствует в различных клеточных компартментах, включая ядро, цитоплазму и митохондрии [71].

Схема 3



Функции биотинзависимых ферментов описаны в литературе [63]. Пируваткарбоксилаза участвует в превращении пирувата в оксалат в цикле трикарбоновых кислот. Дефицит данного фермента вызывает лактатцемию. Пропионил-КоА карбоксилаза играет роль в превращении метилмалонил-КоА в пропионил-КоА, который затем преобразуется в сукцинил-КоА и вступает в цикл трикарбоновых кислот. Недостаток данного фермента вызывает увеличение экскреции органических кислот, таких как 3-гидроксипропионовая кислота и 2-метиллимонная кислота.  $\beta$ -Метилкротонил-КоА карбоксилаза участвует в метаболизме лейцина, и дефицит этого фермента приводит к увеличению экскреции органических кислот, таких как 3-гидроксиизовалериановая кислота и 3-метилкротонилглицин. Ацетил-КоА карбоксилаза (АСС1 и АСС2) принимает участие в образовании малонил-КоА.

### 1.2.3. Подходы к получению биотинилированных производных лекарственных веществ

Биотин обладает значительным потенциалом как векторная молекула для противоопухолевой терапии благодаря его способности накапливаться в клетках, которые экспрессируют системы захвата биотина. Хотя для получения конъюгатов с биотином в основном используется его карбоксильная группа, необходимая для транспорта через SMVT транспортёр, ряд биотинилированных производных противоопухолевых агентов (таксоид [10], доксорубин [72], и гемцитабин [73]) показали значительно более высокую цитотоксичность в опухолевых клетках по сравнению с немодифицированными молекулами, что может указывать на вероятные альтернативные пути проникновения. Тем не менее, по сравнению с другими

витамиными рецепторами, такими как рецепторы фолиевой кислоты и рецепторы витамина В<sub>12</sub>, стратегии нацеливания на транспортёры биотина демонстрируют более высокую специфичность и более широкий потенциал в лечении агрессивных видов рака, включая рак яичников, толстой кишки, молочной железы, почки, лёгких и лейкемию [67]. Среди подходов к нацеливанию лекарственных веществ с помощью биотина можно выделить его присоединение непосредственно к химиотерапевтическому агенту, а также биотинилированные системы доставки (например, наночастицы, векторизованные биотином).

Присоединение биотина к ЛВ или наноразмерному носителю представляет собой отдельную задачу, подходы к решению которой достаточно разнообразны. Одним из наиболее распространённых способов введения биотина в состав наночастиц является использование карбодиимидного метода или метода активированных эфиров. Например, для введения биотина и паклитаксела в состав РАМАМ дендримеров, предназначенных для терапии рака лёгких, в работе [74], был использован карбодиимидный способ. Оба метода нашли широкое применение в пептидном синтезе, зарекомендовав себя, прежде всего, как надёжные и достаточно простые способы формирования амидных и сложноэфирных связей [75–79]. Стоит также отметить, что важно, чтобы молекулы биотина после конъюгации с носителями располагались на их поверхности, так как только в таком случае возможен как их рецептор-опосредованный эндоцитоз в результате взаимодействия биотина с транспортёрами на поверхности клеток-мишеней, так и дальнейшая модификация носителей авидином и его производными (для нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие на поверхности авидин-подобные белки) [80–84]. Кроме того, ввиду способности биотина преодолевать ГЭБ, он может служить вектором для систем доставки цитостатиков в головной мозг [85].

В мировой научной литературе представлены различные конъюгаты ЛВ с биотином. Недавно был получен новый конъюгат доцетаксела и биотина с использованием сложноэфирного линкера по положению 2' углерода в доцетакселе (Рисунок 1) [8]. Синтезированный конъюгат продемонстрировал высокую противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*. При концентрации 10 нМ конъюгат индуцировал усиленный апоптоз и остановку митоза клеток рака предстательной железы РС3-Luc, вызывая анеуплоидию и гибель клеток при более высоких

концентрациях. В экспериментах *in vivo* было показано, что использование конъюгата приводило к снижению объёма опухоли предстательной железы, имплантированной подопытным мышам, и уменьшению их смертности. При этом конъюгат оказался более эффективным по сравнению с контрольным препаратом (доцетаксел). Результаты показали, что данный конъюгат имеет большой потенциал в качестве нового препарата для терапии онкологических заболеваний. Также в литературе описан конъюгат паклитаксела с биотином, содержащий линейный пептидный спейсер [9]. Это соединение показало свою эффективность *in vitro*, продемонстрировав способность стабилизировать микротрубочки, что приводило к остановке клеточного цикла и, как следствие, к гибели клеток. Кроме того, сообщалось о ряде биотинилированных производных таксоида второго поколения (SB-T-1214), способных высвобождать лекарственное средство в восстановительной среде [10, 11].

При разработке конъюгатов важно предусматривать возможность его разрушения в опухолевой клетке с целью высвобождения исходного химиотерапевтического агента, поскольку зачастую только в свободной форме ЛВ может оказывать необходимое цитотоксическое действие. В соответствии с представленным принципом, авторами исследования [86] был разработан конъюгат противоопухолевого антибиотика доксорубицина с биотином. Представленное гибридное соединение в своей структуре содержало олигоэтиленгликолевый спейсер и гидразонный линкер, чувствительный к кислотности среды. Скорость разрушения данной связи варьировалась в зависимости от уровня pH: при нормальном физиологическом значении pH 7,4 гидразонная группа не подвергалась гидролизу, в то время как при pH 5,0, что соответствует кислотности эндосомальных компартментов опухолевых клеток, скорость высвобождения доксорубицина из гибридного соединения была максимальной. Поглощение таргетированного производного доксорубицина клетками колоректальных опухолей человека (клетки LS180 и HT-29) было выше по сравнению со свободным ЛВ. Исследования *in vivo* с использованием ксенографтной модели животных LS180 показали, что конъюгат обладает большей избирательностью действия по сравнению со свободным доксорубицином. Примечательно, что его биотинилированное производное обладало менее выраженными токсическими эффектами, о чём свидетельствуют незначительные

изменения массы тела, сниженный апоптоз кардиомиоцитов и отсутствие патологических изменений селезёнки.

Несмотря на простоту получения гидразонный линкер может разрушаться при циркуляции конъюгата в кровотоке. Поэтому при разработке гибридных молекул перспективным является применение более стабильных линкеров, например, дисульфидных. Так, в 2018 году для уменьшения побочных эффектов камптотецина было синтезировано его биотинилированное производное (Рисунок 5А) [87]. Для объединения химиотерапевтической и витаминной составляющих был использован линкер, содержащий в своей структуре дисульфидную связь, способную расщепляться под действием повышенных концентраций глутатиона в опухолевых клетках и высвобождать ЛВ. Эксперименты показали, что представленный конъюгат обладал высокой цитотоксичностью на клетках MGC803 (рак желудка) и эффективно высвобождал камптотетин в восстановительной среде. Примечательно, что у нормальных клеток поглощение его биотинилированного производного было значительно снижено. При этом наличие дисульфидной связи в составе линкера играло ключевую роль в цитотоксическом действии конъюгата, поскольку отсутствие данной стимул-чувствительной группы в структуре гибридного соединения понижало эффективность его применения. Другим примером, иллюстрирующим важность включения в состав конъюгатов стимул-чувствительных линкеров является биотинилированное производное колхицина [88]. Антипролиферативная активность конъюгата была оценена на клеточных линиях SGC-7901, A549 и HeLa (клетки аденокарциномы желудка SGC-7901, клетки аденокарциномы лёгких A549 и клетки рака шейки матки HeLa). Установлено, что биотинилированное производное колхицина проявляет биологическую активность, аналогичную активности исходного колхицина, что указывает на его высокую противоопухолевую эффективность. Показано, что представленный конъюгат может разрушаться в восстановительной среде, избирательно высвобождая колхицин, который и оказывает необходимое воздействие на опухолевые клетки. Эти результаты демонстрируют важность надлежащего дизайна биотинилированных производных ЛВ, и открывают многообещающие пути для разработки новых противоопухолевых препаратов.

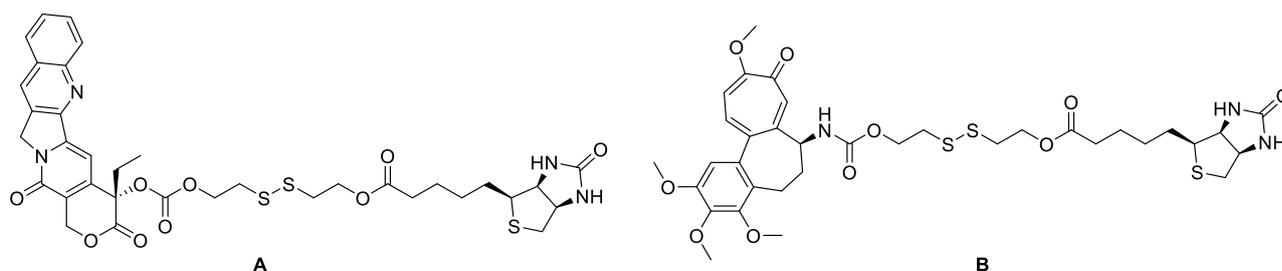


Рисунок 5 – Конъюгаты биотина с камптотецином (А) и колхицином (В), содержащие стимул-чувствительный дисульфидный линкер.

### 1.3. Проблемы применения биотинилированных производных лекарственных веществ в клинической практике

Биотин обладает большим потенциалом в системах адресной доставки ЛВ как вектор, однако клиническое применение таргетированных витамином В<sub>7</sub> препаратов по-прежнему сталкивается с многочисленными проблемами, о которых следует упомянуть. Основная проблема — неопределённость, связанная с дозой [67]. Исследования показали, что чрезмерное потребление человеческим организмом биотина (5–100 мг в день) может вызывать ошибки при проведении диагностических тестов. FDA установило пороговое значение помех от биотина на уровне 3510 нг/мл (14 367 нМ), что представляет собой серьёзную проблему для иммуноферментных платформ, основанных на биотин-стрептавидиновой технологии. FDA также обнаружило, что высокие концентрации биотина могут приводить к многочисленным побочным эффектам, включая летальный исход в тяжёлых случаях [89]. Кроме того, использование добавок биотина может значительно влиять на точность результатов клинических тестов. В некоторых случаях различия между результатами, полученными различными методами тестирования, могут достигать 315-кратного значения. У пациентов, получающих биотин в высоких дозах, может быть ошибочно диагностирована болезнь Грейвса, а результаты анализов функции щитовидной железы могут показывать ложные отклонения [90, 91].

Более сложной проблемой является неопределённость в отношении механизма интернализации биотинилированных препаратов. Исследования показали, что основной транспортёр биотина, SMVT, требует наличия свободной карбоксильной группы для правильного функционирования. Однако во время конъюгации биотина с ЛВ эта карбоксильная группа в структуре витамина часто оказывается модифицированной, что может существенно повлиять на эффективность транспорта конъюгата в опухолевые клетки. Кроме того, на абсорбцию и транспорт биотина

вливают и другие факторы. Некоторые вещества (например, липоевая и пантотеновая кислоты) могут значительно ингибировать зависимое от ионов натрия поглощение биотина, что ещё больше осложняет разработку биотинилированных лекарственных препаратов. Решение этих клинических проблем имеет решающее значение для развития использования биотина в системах адресной доставки ЛВ. Будущие исследования должны дополнительно уточнить механизмы действия биотинилированных конъюгатов, оптимизировать стратегии присоединения витамина В<sub>7</sub> к химиотерапевтическим молекулам и разработать более надёжные методы клинической диагностики.

Стоит отметить, что фармакокинетические характеристики биотинилированных конъюгатов весьма сложны. Во-первых, такие соединения должны транспортироваться через специфические транспортные системы, что может влиять на их биодоступность. Во-вторых, модификации молекулярной структуры биотина во время конъюгации с лекарственным средством могут влиять на его связывание с рецепторами. В разработке гибридных лекарственных средств в основном используется модель конъюгата типа «биотин-линкер-лекарственное средство», но выбор и конструкция линкера напрямую влияют на эффективность высвобождения ЛВ в месте локализации опухоли. Кроме того, стратегии двойного таргетинга (например, липосомы с двойным вектором на основе фолата и биотина) могут улучшить нацеливание на определённые типы опухолевых клеток, но они также приводят к усложнению конструкции и необходимости предъявления более жёстких требований к стабильности. С точки зрения безопасности, важно учитывать неспецифическое распределение биотинилированных конъюгатов в нормальных тканях, а также потенциальные проблемы иммуногенности. Решение этих проблем имеет решающее значение для повышения клинической эффективности препаратов, нацеленных при помощи биотина на злокачественные новообразования [92].

По состоянию на 2025 год противоопухолевые препараты на основе конъюгатов биотина с ЛВ ещё не прошли клинические испытания и не были выпущены на рынок, главным образом из-за отсутствия достаточных данных о безопасности и доказательств эффективности на больших выборках. Применение биотина в химиотерапии в основном ограничивалось экспериментами *in vitro* и моделями на животных, а механизмы его действия в опухолевых клетках не были полностью изучены или

подтверждены. Более того, стабильность и биодоступность биотина *in vivo* ограничены, что затрудняет эффективную доставку ЛВ и нацеливание на опухоль и создаёт определённые препятствия в разработке инновационных препаратов. В то же время, проблемы безопасности и токсичности являются существенными факторами, препятствующими развитию биотинилированных конъюгатов.

Применение биотина как вектора в системах адресной доставки ЛВ по-прежнему сталкивается с рядом проблем, включая развитие резистентности к конъюгированному химиотерапевтическому агенту, неопределённость в отношении оптимальной дозировки и режима дозирования, а также потенциальные побочные эффекты [67]. Для преодоления этих проблем будущие исследования должны быть сосредоточены на разработке новых конъюгатов биотина с химиотерапевтическими агентами, которые способны создавать повышенную концентрацию ЛВ в опухолевых тканях и одновременно снижать токсичность для нормальных тканей.

#### **1.4. Заключение по литературному обзору**

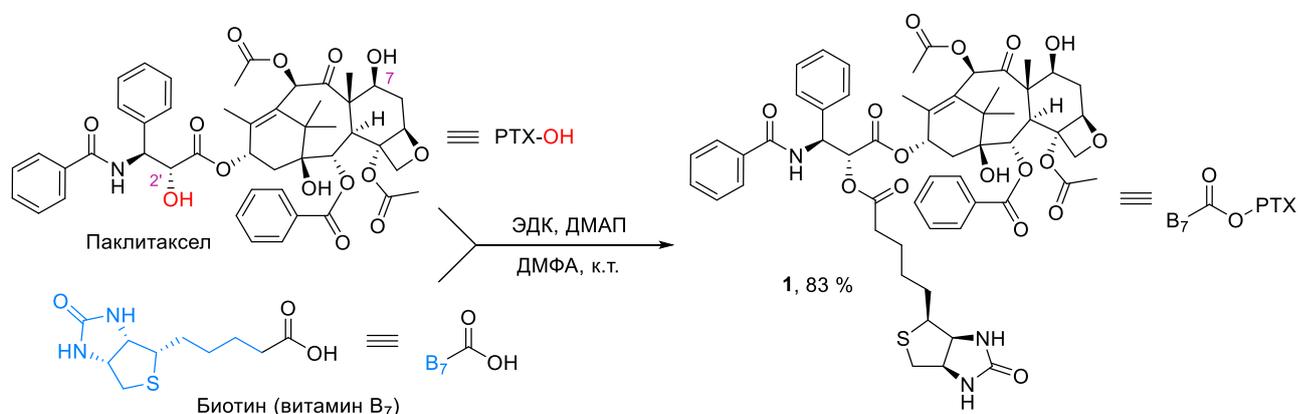
Конъюгаты паклитаксела и биотина обладают большим потенциалом в качестве перспективных химиотерапевтических средств. Однако вопрос о возможности создания водосовместимых форм на основе таких соединений остаётся открытым, поскольку для описанных выше веществ может потребоваться использование органических растворителей и солюбилизаторов. Многие из них, например, этанол и полиэтиоксилированное касторовое масло, часто используемые в коммерчески доступных лекарственных формах паклитаксела, могут оказывать токсическое действие и вызывать аллергические реакции [93–95]. В этом отношении разработка стабильной и водосовместимой ЛФ РТХ, позволяющей избежать использования представленных вспомогательных веществ в её составе, выглядит многообещающей. Настоящее исследование посвящено разработке коллоидно-стабильной лекарственной формы на основе наночастиц конъюгатов паклитаксела и биотина, различающихся по гидрофильности, длине и типу линкера, которые могут образовывать самоорганизующиеся наноструктуры в водной среде.

## ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 2.1. Выявление принципиальной способности конъюгатов паклитаксела с биотином формировать самособирающиеся наночастицы.

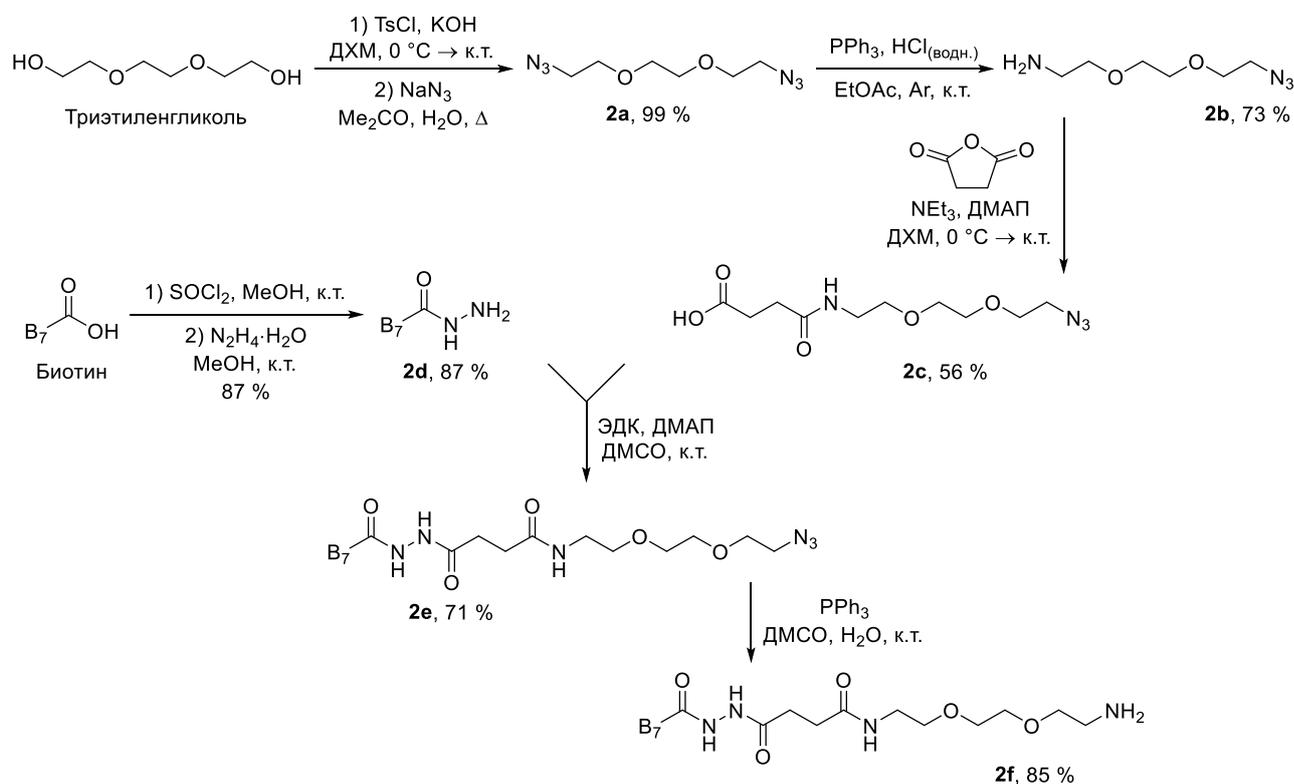
Для оценки принципиальной способности конъюгатов формировать в воде наночастицы первоначально было рассмотрено два подхода к получению гибридных соединений. Первый основан на прямой конъюгации биотина с паклитакселом с помощью образования сложноэфирной связи. Второй — на соединении двух молекул через гидрофильный линкер, который, как предполагалось, может облегчить формирование НЧ в водной среде за счёт улучшения амфифильности. Первый конъюгат (конъюгат **1**) был получен путём этерификации РТХ биотином в безводном N,N-диметилформамиде (ДМФА) с использованием гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК) и 4-диметиламинопиридина (ДМАП) в качестве катализатора (этерификация по Штеглиху) с выходом 83 % (Схема 4). Аутентичность полученного соединения (как и всех остальных конъюгатов, представленных далее в работе) была подтверждена одно- и двумерной спектроскопией ЯМР (спектры ЯМР всех конъюгатов представлены в приложении), МСВР, а также ВЭЖХ и ТСХ. Реакция протекала региоселективно по гидроксильной группе ЛВ в положении 2'. Это может быть обусловлено тем, что этерификация по С-7 спиртовой функции стерически затруднена благодаря наличию близкорасположенной метильной группы. Кроме того, такая избирательность ацилирования РТХ согласуется с его химическими свойствами, представленными в литературе [96–99].

Схема 4



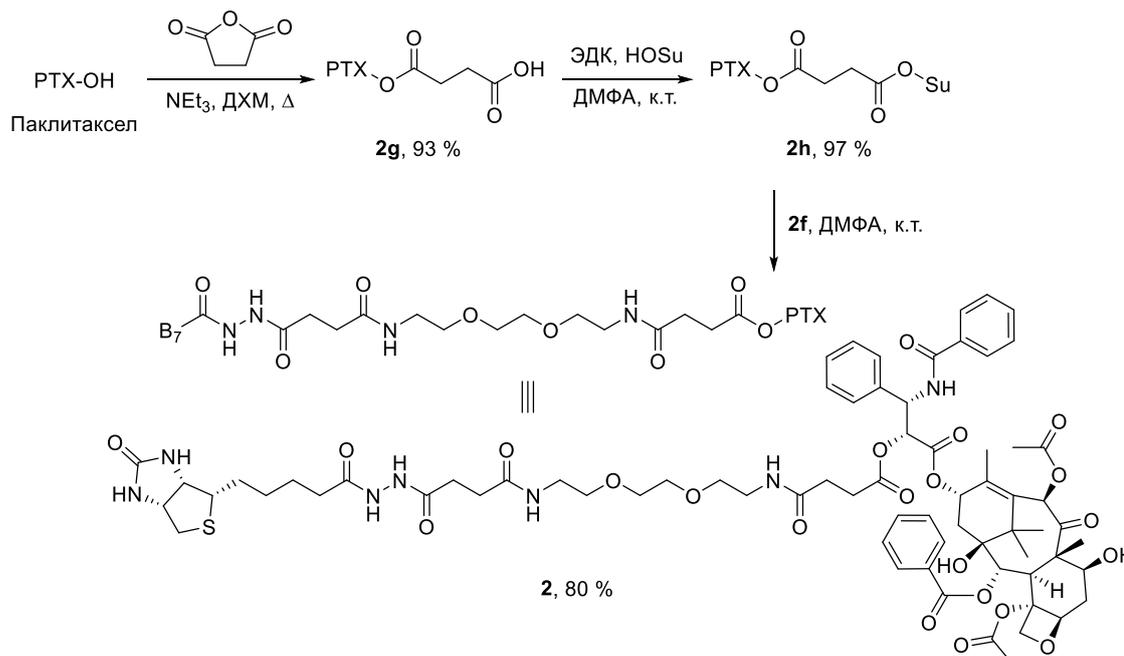
В качестве структурных элементов гидрофильного линкера второго конъюгата были выбраны триэтиленгликоль и янтарная кислота, нашедшие широкое применение в создании систем адресной доставки и различных гибридных соединений [100–102]. Синтез (Схема 5) начинали с тозилрования триэтиленгликоля в присутствии гидроксида калия в дихлорметане (ДХМ). Промежуточный *бис*-тозилат далее использовали для алкилирования азид-ионов в смеси воды и ацетона, что позволяло получать вещество **2a**. Затем его в смеси соляной кислоты и этилацетата обрабатывали эквивалентным количеством трифенилфосфина под аргоном, что позволяло избирательно восстанавливать одну из азидных групп. Полученное соединение **2b** ацилировали янтарным ангидридом в присутствии смеси оснований: триэтиламина и ДМАП, что приводило к интермедиату **2c**. Далее его в безводном диметилсульфоксиде (ДМСО) присоединяли карбодиимидным методом к гидразиду биотина **2d**, который в свою очередь был синтезирован путём этерификации биотина с последующим гидразинолизом сложного эфира. Затем концевую азидную группу соединения **2e** восстанавливали по реакции Штаудингера (с последующим гидролизом промежуточного иминофосфорана) в смеси воды и ДМСО, что приводило к производному биотина **2f** с незащищённой аминогруппой.

Схема 5



Параллельно паклитаксел региоселективно (по 2'-ОН группе) ацилировали янтарным ангидридом, что приводило к гемисукцинату **2g**, карбоксильную группу которого далее переводили в активированный эфир обработкой ЭДК и N-гидроксисукцинимидом (Схема 6). Полученным соединением **2h** затем ацилировали производное биотина **2f**, что приводило к конъюгату **2**, содержащему гидрофильный линкер, с высоким выходом 80 % в пересчёте на исходный паклитаксел.

Схема 6



Были исследованы липофильность (коэффициент распределения в системе *n*-октанол/вода (LogP)) РТХ и его конъюгатов, а также их растворимость в модельной среде (Таблица 1), которую готовили на основе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с добавлением 2 % (м/об) смеси полисорбат-80/этанол (4:1 м/м). Полисорбат-80 был введён в модельную среду для повышения растворимости паклитаксела и его конъюгатов в ФСБ, поскольку в противном случае концентрация исследуемых соединений в фильтрате оказывалась слишком низкой для надёжного определения методом ВЭЖХ. Этанол, в свою очередь, добавляли для снижения вязкости солюбилизатора. Кислотность среды была доведена до рН 5, так как известно, что РТХ подвергается деградации при нейтральных, щелочных и сильно кислых условиях [103]. Растворимость конъюгатов незначительно отличается (не более, чем в 4 раза) от растворимости паклитаксела (Таблица 1). Таким образом, присоединение биотина, а также гидрофильного линкера к молекуле ЛВ практически не влияет на его

растворимость в водной среде — данная величина по-прежнему остаётся очень низкой и явно недостаточной для создания ЛФ в виде раствора для инъекций (около 6 мМ). На основе значений LogP установлено, что прямое присоединение биотина к РТХ (конъюгат **1**) приводит к гидрофобизации гибридной молекулы, поскольку карбоксильная группа витаминного фрагмента, вносящая наибольший вклад в полярность биотина, блокируется. В то же время введение линкера на основе триэтиленгликоля и янтарной кислоты увеличивает гидрофильность конъюгата, так как в структуру соединения **2** вводится значительное количество доноров и акцепторов водородных связей.

Таблица 1 – Значения липофильности и растворимости полученных конъюгатов и паклитаксела в среде ФСБ (рН 5) + 2 % (об/об) полисорбат80/этанол 4:1 (м/м)

Вещество	Растворимость, мкМ	LogP
Паклитаксел	96,5 ± 8,7	4,95
Конъюгат <b>1</b>	23,4 ± 2,1	6,33
Конъюгат <b>2</b>	120,8 ± 4,7	3,59

Была исследована способность РТХ и его биотинилированных конъюгатов формировать самоорганизующиеся структуры в водной среде с использованием способа наноосаждения ввиду простоты и отсутствия необходимости использования дорогостоящего оборудования для гомогенизации (Таблица 2). Для этого раствор соответствующего конъюгата (или паклитаксела) в этаноле при интенсивном перемешивании прибавляли по каплям в воду или к водному раствору стабилизатора, в качестве которого были выбраны два типа поливинилового спирта (ПВС 9–10 кДа, ПВС 30–70 кДа) и блок-сополимеры полиэтилен- и полипропиленгликоля (Kolliphor P407, Kolliphor P188, Pluronic F127), поскольку они нетоксичны при инъекционном введении и практически не вызывают аллергических реакций [104, 105]. Кроме того, представленные полимеры отличаются низкой гемолитической активностью и хорошей биосовместимостью, что предопределило их широкое использование в биомедицинских целях [106, 107]. Обнаружено, что только конъюгат **1** был способен формировать самособирающиеся наночастицы в воде при наноосаждении, хотя при этом происходила частичная агрегация. Тем не менее, их оказалось возможным стабилизировать с помощью 1 % (м/об) водных растворов ПВС (9–10 кДа) или Kolliphor P188. В этом случае НЧ конъюгата **1** имели среднеобъёмный гидродинамический диаметр ( $d_v$ ) около 120–130 нм и низкий индекс полидисперсности (PDI) около 0,1. При

изучении возможности лиофилизации НЧ установлено, что только в случае низкомолекулярного ПВС (9–10 кДа) наноструктуры конъюгата **1** могут быть успешно лиофилизированы и повторно суспендированы с образованием стабильной дисперсной системы, тогда как при использовании Kolliphor P188 происходит агрегация НЧ даже с использованием криопротектора (маннит). Это можно объяснить большим количеством доноров водородных связей в структуре ПВС, что приводит к эффективной адсорбции полимера и удержанию молекул воды на поверхности НЧ, предотвращая их агрегацию. Паклитаксел также обладал способностью образовывать относительно стабильные субмикронные частицы в 1 % (м/об) растворе ПВС. В то же время конъюгат **2** вопреки ожиданиям не формировал в воде НЧ при наноосаждении и вместо этого наблюдали образование гелеподобной массы.

Таблица 2 – Параметры коллоидных структур, полученных наноосаждением, в зависимости от типа дисперсионной среды.

Тип среды		Паклитаксел	Конъюгат <b>1</b>	Конъюгат <b>2</b>	Без ЛВ
Вода	$d_v$ , нм	$375 \pm 49^{**}$	$140 \pm 4^*$	$447 \pm 101^{**}$	-
	PDI	$0,602 \pm 0,223^{**}$	$0,134 \pm 0,013^*$	$0,552 \pm 0,207^{**}$	-
1 % ПВС (9-10 кДа)	$d_v$ , нм	<b><math>358 \pm 94</math></b>	<b><math>127 \pm 1</math></b>	<b><math>409 \pm 96^{**}</math></b>	$335 \pm 32$
	PDI	<b><math>0,506 \pm 0,380</math></b>	<b><math>0,098 \pm 0,009</math></b>	<b><math>0,617 \pm 0,157^{**}</math></b>	$0,545 \pm 0,139$
1 % ПВС (30-70 кДа)	$d_v$ , нм	$839 \pm 36$	$200 \pm 12$	$409 \pm 96^{**}$	$235 \pm 196$
	PDI	$0,178 \pm 0,039$	$0,114 \pm 0,016$	$0,658 \pm 0,061^{**}$	$0,570 \pm 0,122$
1 % Kolliphor P 407	$d_v$ , нм	$1329 \pm 241^*$	$157 \pm 261$	$403 \pm 71^{**}$	$539 \pm 185$
	PDI	$0,511 \pm 0,135^*$	$0,941 \pm 0,070$	$0,648 \pm 0,141^{**}$	$0,699 \pm 0,058$
1 % Pluronic F-127	$d_v$ , нм	$936 \pm 124^*$	$241 \pm 30$	$337 \pm 84^{**}$	$414 \pm 6$
	PDI	$0,849 \pm 0,135^*$	>1,000	$0,739 \pm 0,094^{**}$	$0,504 \pm 0,338$
1 % Kolliphor P 188	$d_v$ , нм	$402 \pm 82^{**}$	$123 \pm 3$	$220 \pm 107^{**}$	$356 \pm 20$
	PDI	$0,613 \pm 0,057^{**}$	$0,086 \pm 0,013$	$0,868 \pm 0,132^{**}$	$0,714 \pm 0,077$

\* – частичная агрегация,

\*\* – полная агрегация.

Морфология НЧ конъюгата **1** (Рисунок 6А) и субмикронных частиц РТХ (Рисунок 6В), а также геля конъюгата **2** (Рисунок 6С) была проанализирована с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Во всех случаях было подтверждено образование аморфных коллоидных структур по отсутствию дифракционных колец. Установлено, что гель конъюгата **2** состоит из тонких волокон (Рисунок 6С), что, вероятно, связано с наличием гидрофильного линкера,

участвующего в формировании множества межмолекулярных водородных связей. В то же время, более гидрофобный конъюгат **1** в 1 % (м/об) растворе ПВС (9–10 кДа) формирует сферические НЧ (Рисунок 6А), а РТХ самоорганизуется в цилиндрические субмикронные структуры (Рисунок 6В). Это различие может быть связано с конформационными изменениями во фрагменте ЛВ при взаимодействии с витамином, что могло предопределить склонность коллоидных частиц РТХ к агрегации, что уже проявлялось на следующий день. Наночастицы конъюгата **1** остались стабильными в суспензии как минимум в течение 4 дней (Рисунок 7) и как минимум месяц в лиофилизате. Таким образом, введение гидрофильного линкера в состав конъюгата паклитаксела с биотином предотвращает способность гибридного соединения образовывать НЧ в водной среде. Как следствие конъюгат **1** оказался более подходящим для получения наноструктур. Для того, чтобы данные НЧ могли выступать в качестве прототипа лекарственной формы, он (т.е. прототип) должен иметь концентрацию ЛВ, сопоставимую с концентрациями в коммерчески доступных ЛФ, обладать коллоидной стабильностью, сохранять постоянные ключевые параметры при хранении и иметь низкую гемолитическую активность.

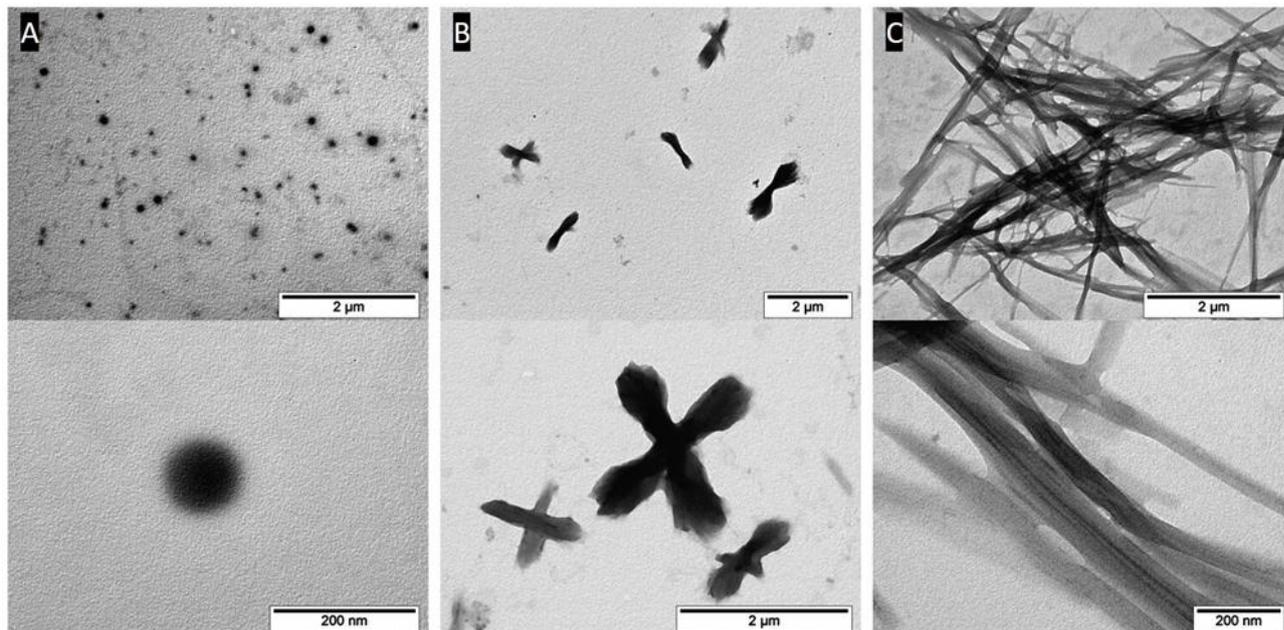


Рисунок 6 – Микрофотографии, полученные с помощью ПЭМ, коллоидных структур на основе конъюгата **1** (А), паклитаксела (В) и конъюгата **2** (С).

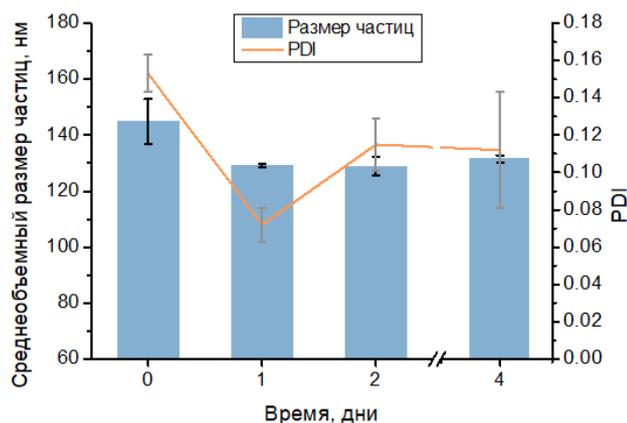


Рисунок 7 – Коллоидная стабильность водной суспензии наночастиц конъюгата **1** в течение 4 дней при комнатной температуре.

## 2.2. Оптимизация условий получения наночастиц на основе прямого конъюгата паклитаксела с биотином и оценка перспективности разработанного прототипа лекарственной формы

Для оценки ключевых характеристик разрабатываемого прототипа ЛФ необходимо было первоначально оптимизировать процесс получения НЧ конъюгата **1**. Для этого сначала варьировали концентрацию данного соединения в конечной суспензии при различном содержании ПВС, и отслеживали, как меняются параметры наноструктур (Рисунок 8А). Для того, чтобы им мог быть присущ EPR-эффект, а также воспроизводимость фармакокинетических и фармакодинамических параметров, следовало подобрать условия, при которых размер частиц оказывался бы меньше 200 нм, а PDI — не более 0,2 [108, 109]. Установлено, что максимально допустимая концентрация конъюгата **1** в суспензии составляет 2 мг/мл, а оптимальное содержание ПВС в суспензии лежит в диапазоне от 0,2 до 1 % (м/об). Для уточнения концентрации стабилизатора была приготовлена серия суспензий НЧ с различным его содержанием. Найдено, что минимальные значения размера и PDI наноструктур наблюдались при концентрации ПВС 0,8 % (м/об) (Рисунок 8В).

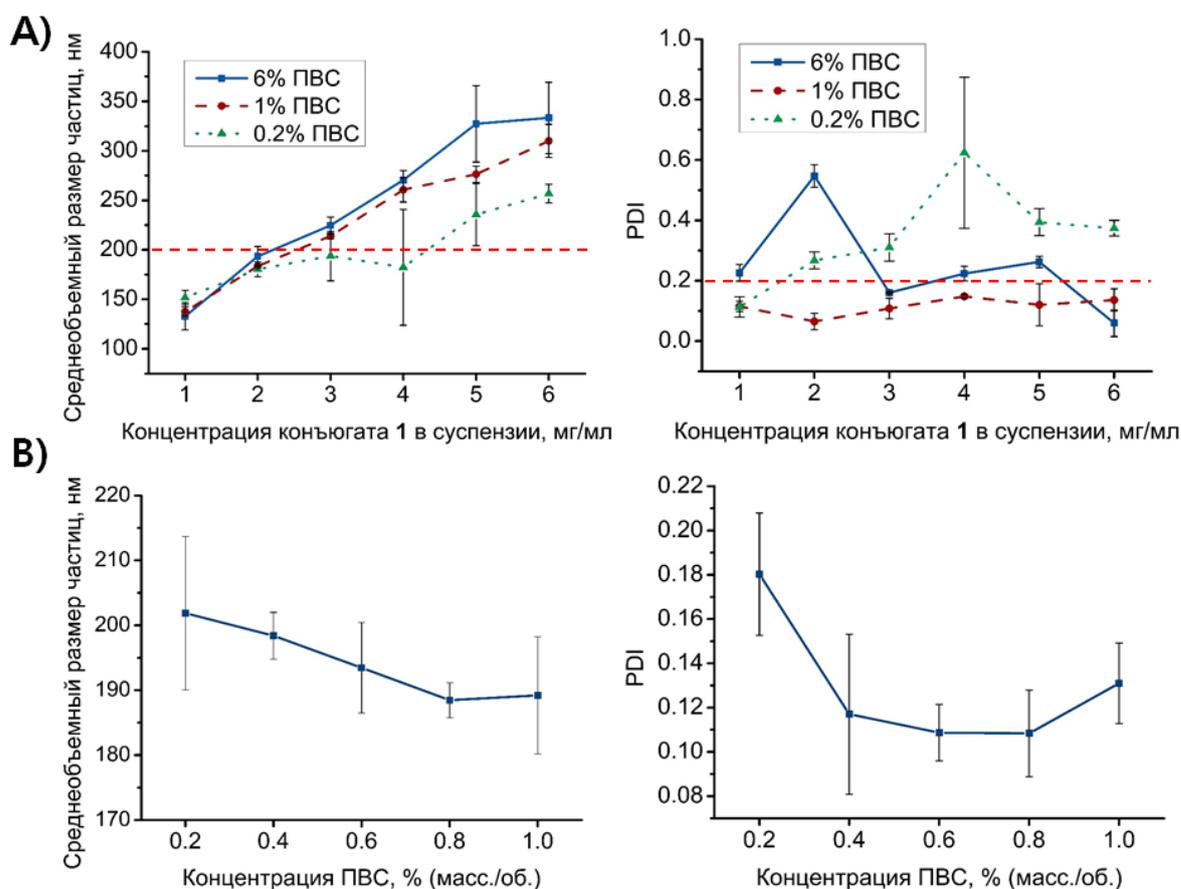


Рисунок 8 – Оптимизация процесса получения НЧ конъюгата 1 методом наноосаждения (пооянения см. в тексте).

В оптимальных условиях были получены три серии НЧ конъюгата 1. Во всех случаях наблюдалась воспроизводимость таких характеристик, как размер, PDI, эффективность инкапсуляции (отношение количества вещества, включившегося в НЧ, к общему его количеству, взятому для их получения) и содержание конъюгата, его примесей и ПВС во флаконе (Таблица 3). Стоит отметить, что почти весь биотин в составе наноструктур оказывался доступным для взаимодействия с модельным рецептором, в качестве которого был выбран авидин — белок, известный своим сильным средством к биотину [110]. Это указывает на то, что наличие короткого сложноэфирного линкера в структуре конъюгата, по-видимому, не препятствует его потенциальному взаимодействию с транспортными белками опухолевых клеток, ответственными за рецептор-опосредованный эндоцитоз. Кроме того, исследование морфологии НЧ с помощью ПЭМ (Рисунок 9) подтвердило образование сферических нанообъектов, окружённых отчётливой оболочкой из стабилизатора. По всей видимости, ПВС, благодаря наличию большого количества полярных гидроксильных групп в своей структуре, склонен к сорбции на поверхности НЧ в процессе их

формирования. Однако нельзя исключать, что какие-то звенья полимера могли интегрироваться в состав наноструктур при их нуклеации.

Таблица 3 – Характеристика НЧ конъюгата **1**, полученных в оптимальных условиях.

Параметр	Значение
Среднеобъёмный диаметр частиц, нм	$212 \pm 8$
PDI	$0,064 \pm 0,019$
Содержание конъюгата, мг во флаконе	$0,86 \pm 0,03$
Содержание родственных примесей, %	$1,03 \pm 0,47$
Содержание ПВС, мг во флаконе	$3,97 \pm 0,05$
Эффективность инкапсуляции, %	$79 \pm 2$
Доля доступного биотина, %	$97 \pm 3$

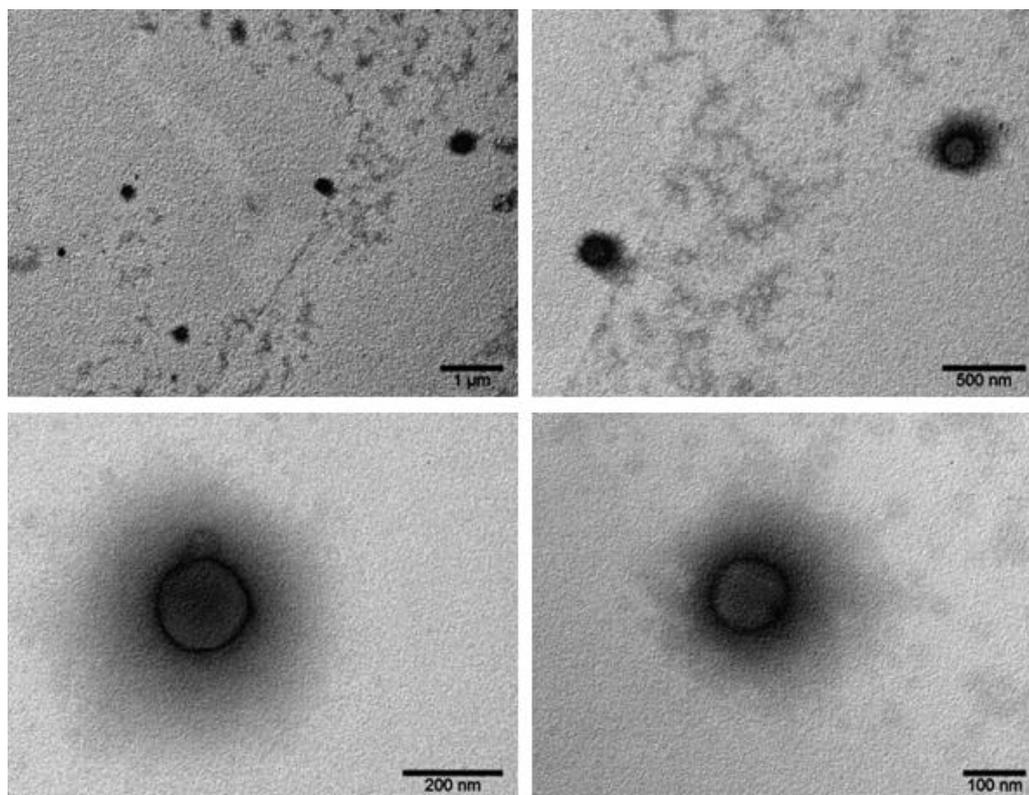


Рисунок 9 – Микрофотографии ПЭМ наночастиц конъюгата **1**, полученные наноосаждением в оптимизированных условиях.

Была оценена стабильность лиофилизата наночастиц в условиях ускоренного старения (Рисунок 10). Установлено, что прототип лекарственной формы несущественно меняет свои ключевые характеристики и, следовательно, потенциально стабилен при хранении при температуре 4 °С в течение как минимум двух лет.

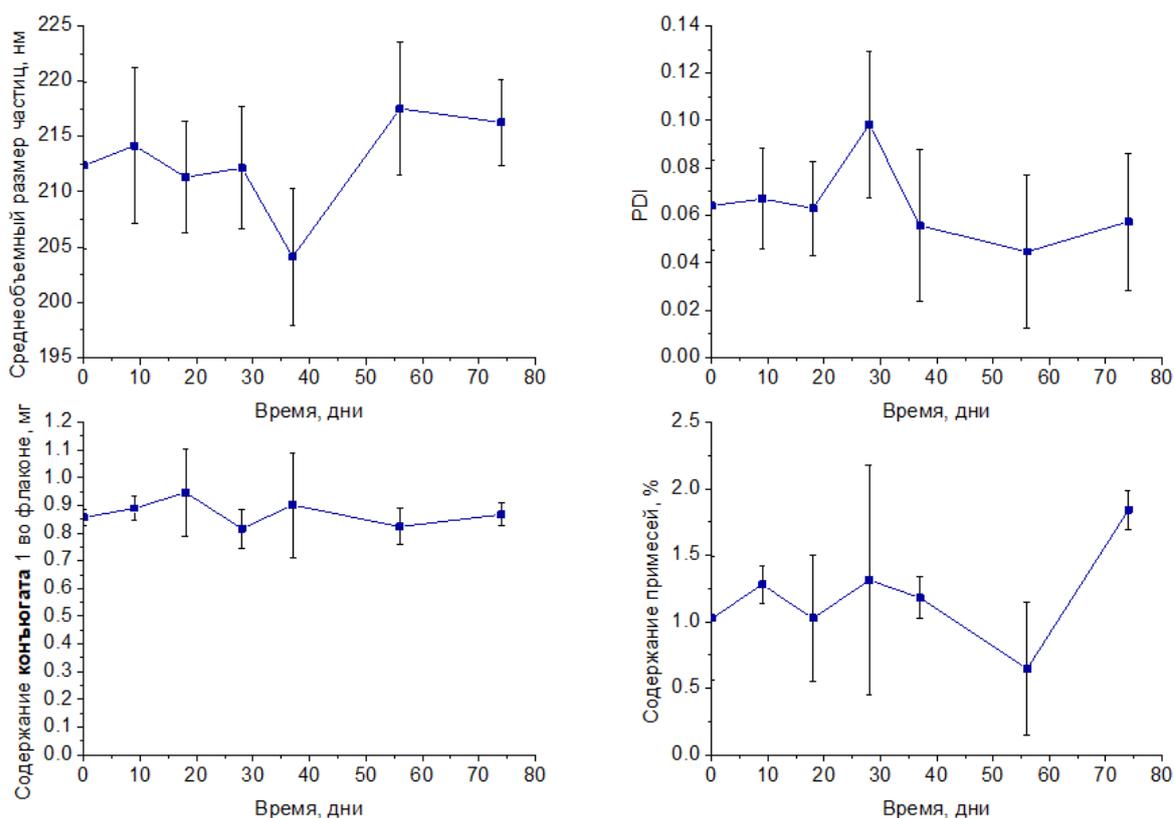


Рисунок 10 – Стабильность лиофилизата наночастиц конъюгата 1 при хранении в испытаниях ускоренной стабильности (температура 30 °С, влажность 65 %).

Наночастицы оказались достаточно стабильны в средах, содержащих белок и моделирующих культуральную среду и плазму крови (Рисунок 11), а именно в смесях ФСБ (рН 7,4) и фетальной бычьей сыворотки (ФБС). При этом не наблюдалась их агрегация или разрушение.

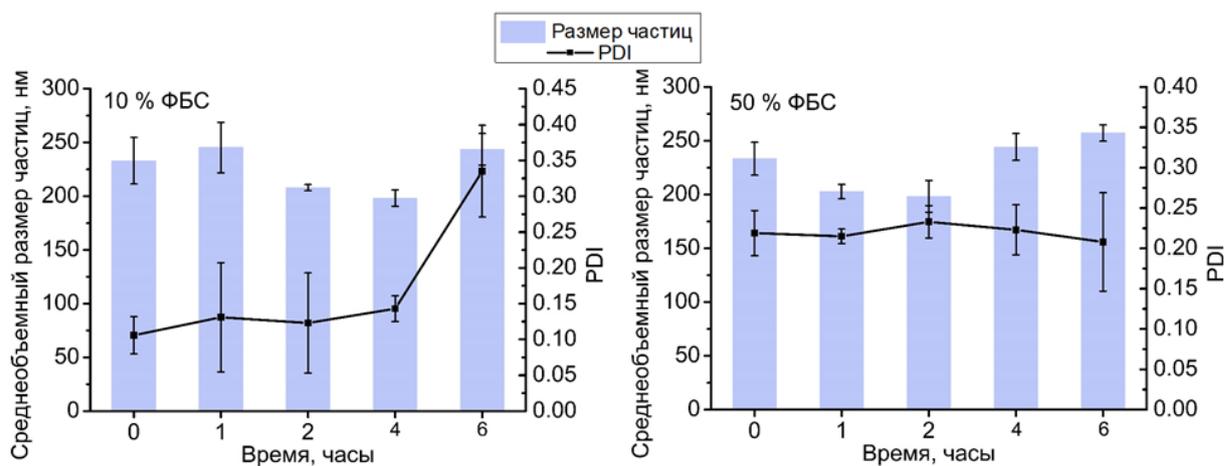


Рисунок 11 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата 1 в средах, моделирующих культуральную среду (слева) и плазму крови (справа).

При циркуляции в кровотоке прототип лекарственной формы не должен разрушать эритроциты, то есть должен обладать низкой гемолитической активностью. В настоящем исследовании она была оценена для НЧ конъюгата 1 и для коммерческой

ЛФ паклитаксела (Рисунок 12). Установлено, что при различных концентрациях препарата обе формы имели сопоставимые значения гемолитической активности, что указывает на возможность внутривенного введения полученных наноструктур.

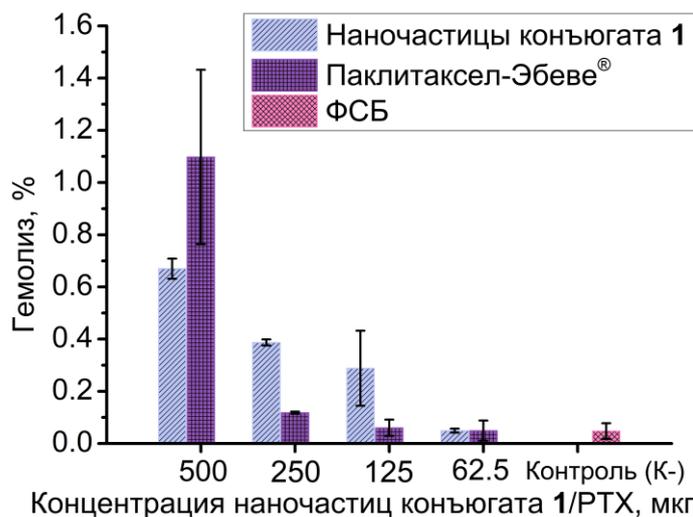


Рисунок 12 – Сравнительная гистограмма гемолитических активностей НЧ конъюгата 1 и коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®).

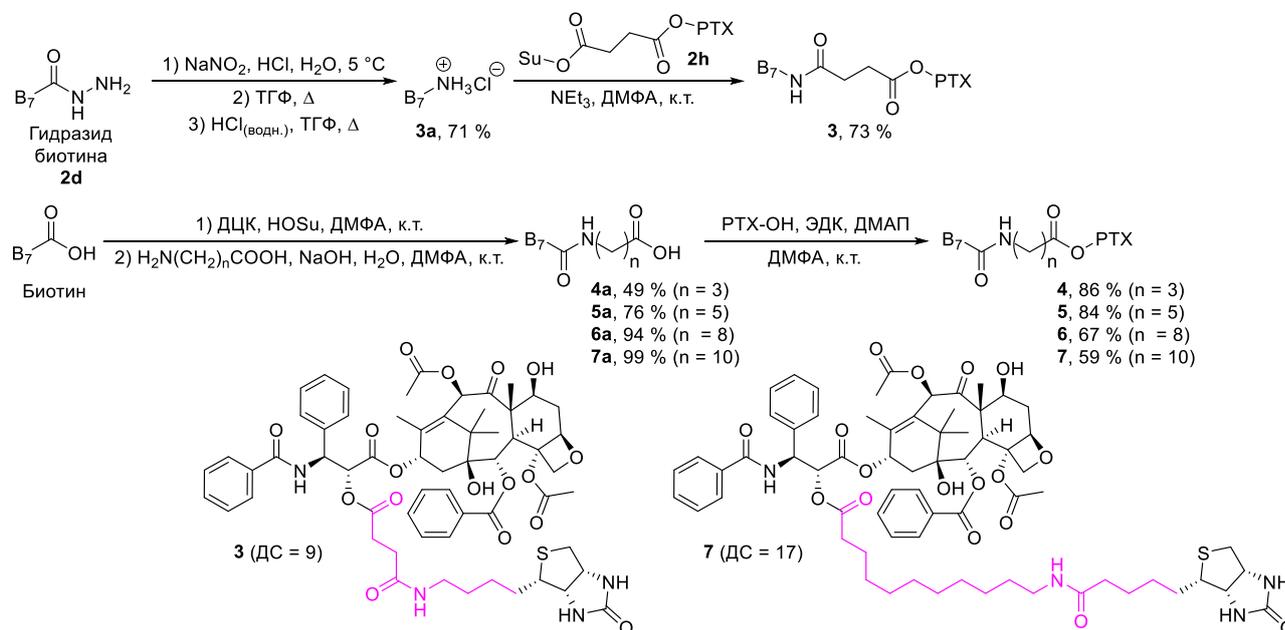
Однако, учитывая, что в конъюгате 1 биотин непосредственно присоединён к РТХ, возможность высвобождения химиотерапевтического агента из такого гибридного соединения оставалась неясной. Эту проблему можно было решить путём включения в структуру конъюгата стимул-чувствительного линкера, представляющего собой группу, связывающую ЛВ с вектором, способную расщепляться под воздействием определенного фактора внутри опухолевой клетки и приводить к высвобождению химиотерапевтического агента. Однако, конъюгат, содержащий такой линкер, мог потерять способность к самоорганизации в наночастицы в водной среде подобно конъюгату 2. Поэтому, прежде чем включать в состав гибридных молекул синтетически более сложные линкеры, содержащие стимул-чувствительные группы, необходимо было предварительно оценить влияние введения простых гидрофобных линкеров различной длины на возможность самоорганизации получаемых конъюгатов и характеристики соответствующих наноструктур. Если наличие даже короткого гидрофобного линкера не мешает гибриднему соединению формировать коллоидно-стабильные НЧ, то это даст возможность перейти к перспективным наноструктурам на основе конъюгатов, содержащих стимул-чувствительные линкеры.

### 2.3. Оценка возможности включения коротких гидрофобных линкеров в состав конъюгатов паклитаксела с биотином

Для получения серии конъюгатов были предварительно синтезированы аминокислотные производные биотина (Схема 7). Исходным соединением для конъюгата с коротким линкером выступил гидразид биотина **2d**. Его боковая цепь была укорочена с помощью перегруппировки Курциуса. Для этого вещество **2d** нитрозировали в кислой среде, что сопровождалось образованием ацилазида, который после нагревания превращён в соответствующий изоцианат. Далее его гидролизовали раствором HCl, что приводило к гидрохлориду норбиотинамина **3a**, который затем в присутствии триэтиламина ацилировали производным паклитаксела **2h**, в результате чего был получен конъюгат **3**, содержащий короткий линкер. Синтез других конъюгатов проводили с использованием биотинилированных аминокислот, полученных в два этапа. Для этого карбоксильную группу витамина сначала активировали с помощью N-гидроксисукцинимидом в присутствии N,N-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в качестве дегидратирующего агента. Полученный активированный эфир использовали для ацилирования натриевой соли соответствующей аминокислоты в водной среде. Осадок дициклогексилмочевины удаляли фильтрацией, а фильтрат подкисляли, что приводило к коагуляции соответствующей биотинилированной аминокислоты **4a–7a**. Затем её присоединяли к паклитакселу посредством DMAP-катализируемой этерификации в присутствии водорастворимого карбодиимида, получая соответствующий конъюгат **4–7**. Следует отметить, что присоединение длинноцепочечных биотинилированных аминокислот к паклитакселу требовало более длительного времени реакции и постепенного добавления ЭДК, предположительно из-за стерических препятствий, затрудняющих доступ карбоксильной группы производных витамина В<sub>7</sub> к спиртовой части ЛВ, поскольку более объёмная молекула может потребовать определённой ориентации в пространстве или конформационных изменений, что занимает больше времени по сравнению с меньшими молекулами. Выход конъюгата уменьшался с увеличением длины спейсера, что может быть связано с улучшенной сольватацией биотиновой части в воде за счёт её отделения от остатка РТХ и, как следствие, возможным повышением способности образующейся гибридной молекулы образовывать мицеллы. Последний факт и приводит к увеличению потерь на стадии экстракции. Напротив, выход биотинилированных аминокислот увеличивался с

увеличением числа метиленовых групп в линкере, вероятно, из-за повышения гидрофобности образующегося промежуточного соединения и его более эффективного осаждения в водной среде.

Схема 7



Перед изучением свойств конъюгатов был установлен ключевой параметр, ответственный за основные структурные различия между синтезированными гибридными соединениями, а именно длина спейсера (ДС). В настоящем исследовании ДС определена как число линейно связанных атомов в мостике между 2'-ОН-группой паклитаксела и тетрагидротиофеновым кольцом биотина (Схема 7). Например, конъюгат **3**, содержащий короткий линкер на основе янтарной кислоты, имеет значение ДС, равное 9 атомам, тогда как конъюгат **7**, с наибольшим расстоянием между витаминной и химиотерапевтической частями, имеет ДС, равную 17 атомам. Значения ДС для синтезированных биотинилированных производных паклитаксела приведены в таблице 4. Представленные данные указывают на то, что удлинение спейсера приводит к гидрофобизации конъюгата (более высокое значение LogP) за счёт увеличения числа метиленовых сегментов. Следовательно, растворимость исследуемых соединений снижается в модельной среде, имитирующей дисперсионную фазу, применяемую в ходе процесса получения НЧ. Исключением является конъюгат **1**, поскольку его липофильность и растворимость отклоняются от корреляции со значением ДС, что возможно связано с отсутствием гидрофильной амидной группы в составе спейсера.

Таблица 4 – Основные характеристики конъюгатов 1, 3–7.

Конъюгат	ДС, число атомов	LogP	Растворимость* (мкМ)
1	5	6,33	17,0 ± 0,3
3	6	5,47	22,9 ± 0,7
4	10	5,97	18,5 ± 0,9
5	12	6,99	8,5 ± 0,6
6	15	8,41	3,5 ± 0,2
7	17	8,92	1,3 ± 0,3

\* – измерена в смеси 0,8 % (м/об) водный ПВС/этанол 10:1 (об/об).

Методом наноосаждения был получен ряд наночастиц на основе конъюгатов 1, 3–7. Для этого раствор исследуемого соединения в этаноле медленно добавляли по каплям к 0,8 % (м/об) раствору ПВС (9-10 кДа) при интенсивном перемешивании. После полного прибавления раствора конъюгата в органическом растворителе к водной фазе конечное соотношение этанола к водному раствору стабилизатора составляло 1:10. Затем органический растворитель частично выпаривали, а остаточную суспензию фильтровали для удаления потенциально образовавшихся фракций микрочастиц и механических примесей. Фильтрат разливали по флаконам, лиофилизировали и использовали для дальнейших исследований.

После ресуспендирования лиофилизатов НЧ наблюдали образование опалесцирующих суспензий без видимых признаков агрегации. Были оценены ключевые характеристики наноструктур, включая гидродинамический диаметр, PDI и  $\zeta$ -потенциал, а также такой параметр процесса получения НЧ как эффективность инкапсуляции. Примечательно, что величина ДС в составе конъюгатов влияла на каждый параметр по-своему (Рисунок 13). С одной стороны, увеличение ДС сопровождалось постепенным понижением  $\zeta$ -потенциала наноструктур. Это, вероятно, можно объяснить отдалением гидрофильной биотиновой части от поверхности наночастиц, что может облегчать взаимодействие с противоионами и приводить к более отрицательному значению  $\zeta$ -потенциала, что, в свою очередь, способствует стабилизации нанообъектов и предотвращает их агрегацию. С другой стороны, увеличение ДС приводит к росту размера исследуемых нанообъектов, поскольку упаковка более крупных молекул создает большее стерическое препятствие и требует больше места при формировании НЧ. В то же время значение PDI НЧ изменяется неоднозначно, но постоянно остается ниже 0,2. Это указывает на то, что независимо от длины спейсера, наноструктуры, полученные из соответствующих конъюгатов, имеют узкое распределение по размерам и могут считаться монодисперсными [108, 111].

Кроме того, процесс получения НЧ сопровождается минимальными потерями конъюгатов, о чём свидетельствуют высокие значения эффективности инкапсуляции (близкие к 100 %), наблюдаемые во всех случаях.

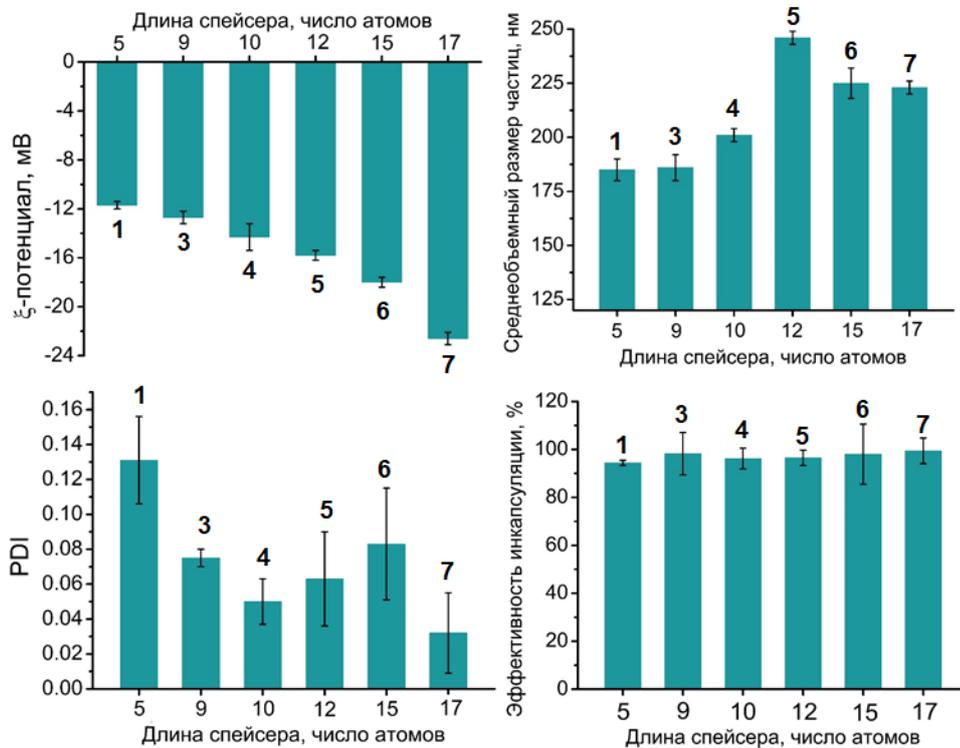


Рисунок 13 – Влияние длины спейсера в составе конъюгатов **1, 3–7** на основные характеристики получаемых на их основе наночастиц.

Морфология наноструктур была проанализирована с помощью ПЭМ (Рисунок 14). Было обнаружено, что конъюгаты **1, 3–7** образуют сферические наночастицы в водной среде. Поперечное сечение наноструктур выглядит почти ровным, без полостей, что указывает на внутреннюю однородность исследуемых нанообъектов. Некоторые микрофотографии наноструктур показывают отчётливую оболочку, которая, предположительно, образована молекулами ПВС, адсорбированными на поверхности НЧ и создающими гидрофильный слой, предотвращающий их агрегацию [112]. Наличие такого покрытия, по-видимому, приводит к экранированию ориентированных наружу фрагментов биотина, что потенциально может препятствовать их взаимодействию с рецепторами опухолевых клеток и, следовательно, ухудшать способность наноструктур попадать в поражённые злокачественными новообразованиями ткани за счёт активного нацеливания. Однако результаты ГАБК-авидинового теста (Таблица 5) показывают, что при инкубации наночастиц с комплексом ГАБК-авидин происходит вытеснение красителя (а именно, ГАБК) из комплекса с белком, аналогично случаю со свободным биотином. Это сопровождается

изменением спектра поглощения анализируемого раствора в видимой области. Следовательно, оболочка из ПВС не препятствует взаимодействию биотина в составе наночастиц с модельным рецептором авидином. Тем не менее, к этому выводу следует подходить с осторожностью, поскольку формирование комплекса авидина и биотина является одним из самых сильных нековалентных взаимодействий в природе, которое может быть на несколько порядков сильнее, чем взаимодействие витамина с его реальными рецепторами. Кроме того, в эксперименте авидин присутствовал в растворе, тогда как транспортёры биотина расположены на поверхности мембраны [60, 113, 114]. Учитывая это, авидину может быть легче проникнуть через оболочку и образовать комплекс с биотином по сравнению с истинными рецепторами на опухолевых клетках. Однако нельзя исключать, что при попадании в кровоток покрытие наноструктур может истончаться из-за разбавления и вероятного взаимодействия с белками плазмы [115], уменьшая стерические препятствия и делая биотин на поверхности доступным для рецепторов. Для прояснения этого сложного вопроса в дальнейших исследованиях необходимо провести детальное изучение судьбы оболочки наночастиц конъюгатов при циркуляции в кровотоке и их интернализации в опухолевые клетки.

Таблица 5 – Оценка доступности биотина в составе наночастиц конъюгатов 1, 3–7.

Тип НЧ	Доля доступного биотина в составе НЧ, %
1	97 ± 6
3	90 ± 4
4	88 ± 5
5	96 ± 8
6	74 ± 3
7	88 ± 7

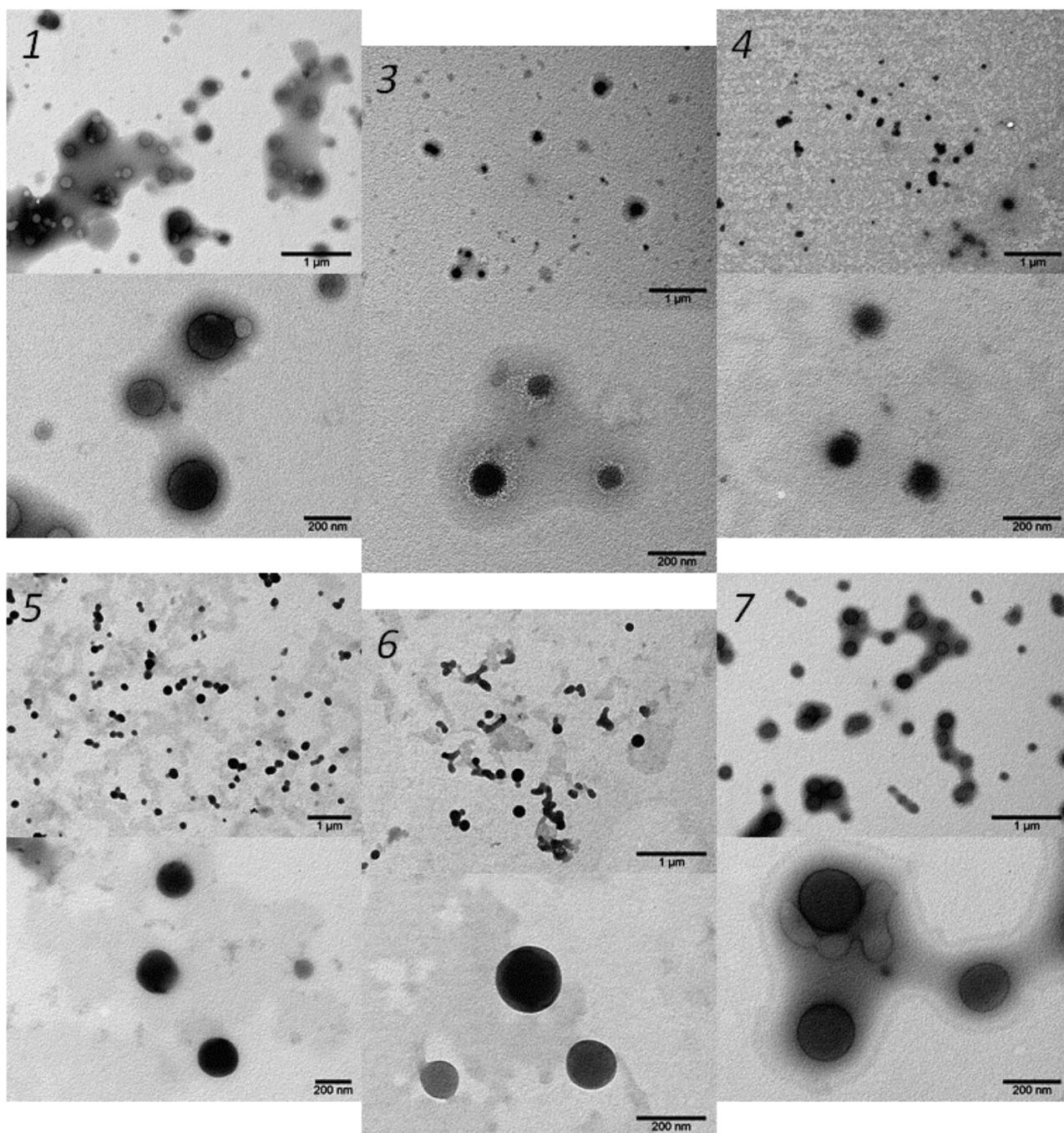


Рисунок 14 – ПЭМ изображения НЧ конъюгатов 1, 3–7.

Наночастицы конъюгатов продемонстрировали способность образовывать коллоидно-стабильные водные суспензии (Рисунок 15). Ключевые характеристики наноструктур, такие как размер и PDI, практически не изменялись при хранении при комнатной температуре и в холодильнике в течение как минимум 10 дней.

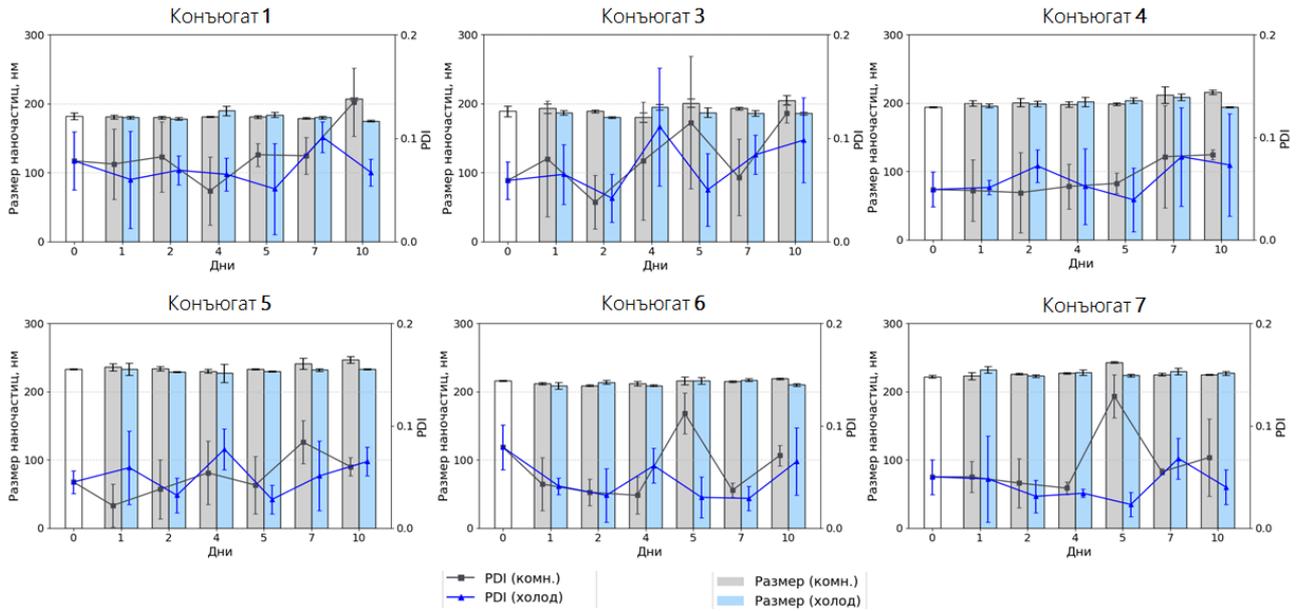


Рисунок 15 – Оценка коллоидной стабильности водных суспензий НЧ конъюгатов **1, 3–7** (1 мг/мл) при хранении при комнатной температуре (22 °С) и в холодильной камере (4 °С).

Известно, что при попадании в кровоток наночастицы подвержены воздействию белков плазмы, что может привести к разрушению наноструктур или образованию белкового покрытия на их поверхности [111, 116]. Это может привести к деградации наночастиц или их поглощению макрофагами. Поэтому следовало оценить стабильность изучаемых наноструктур в зависимости от типа спейсера в соответствующих конъюгатах **1, 3–7**, поскольку длинный линкер, действующий как якорь, может облегчать захват окружающих белков наночастицами. Эксперимент проводили в среде, имитирующей плазму крови, а именно в смеси ФБС и ФСБ (pH 7,4) в соотношении 1:1 (об/об). Было обнаружено, что размер наночастиц (Рисунок 16) либо оставался неизменным, либо незначительно увеличивался по сравнению с размером соответствующих наноструктур, измеренным в воде (Рисунок 13). В то же время индекс полидисперсности наночастиц (Рисунок 16) увеличивался при их введении в среду, содержащую белок, по сравнению с исходным значением этого параметра в воде (Рисунок 13). В совокупности это может указывать на то, что на начальной стадии инкубации происходит неоднородная адсорбция белков плазмы на поверхности наноструктур, приводящая к увеличению разброса значений гидродинамического диаметра нанообъектов коллоидной системы вокруг среднего значения и, как следствие, к повышению полидисперсности. Кроме того, в процессе инкубации НЧ в модельной среде не было обнаружено существенных изменений размера или PDI, что, вероятно, связано со стабилизацией белкового покрытия на поверхностях

наноструктур. Более того, не наблюдалось образования дополнительных фракций, обнаруживаемых с помощью анализатора размера частиц, что указывает на отсутствие разрушения НЧ и на их стабильность по отношению к компонентам крови.

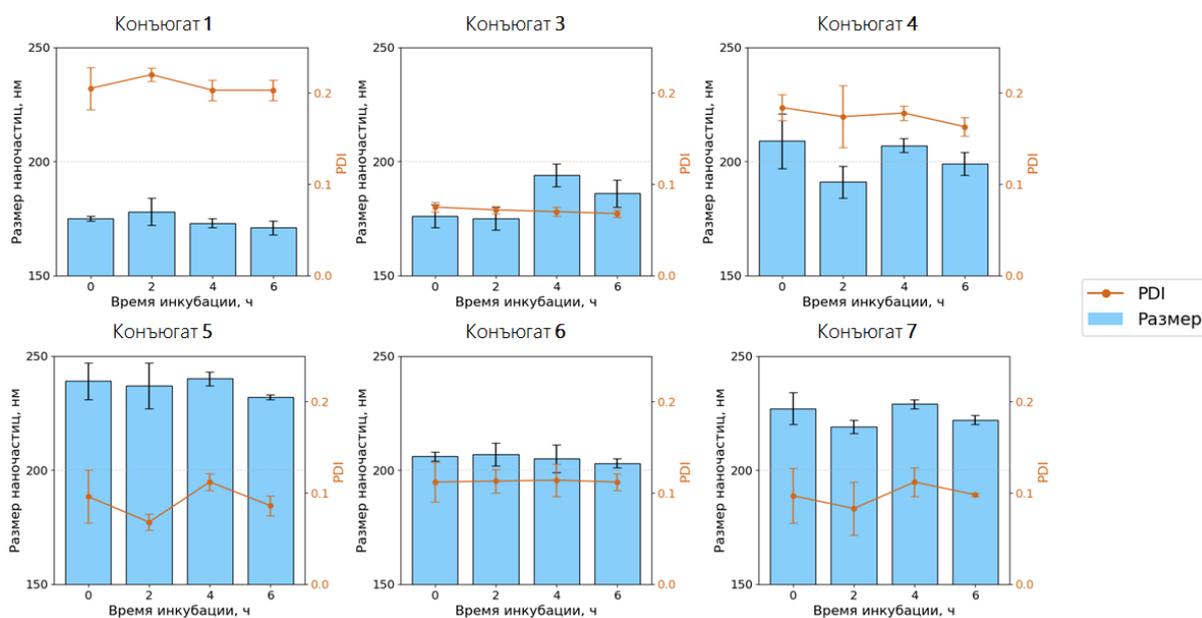


Рисунок 16 – Оценка коллоидной стабильности конъюгатов НЧ конъюгатов 1, 3–7 (1 мг/мл) в 50 % ФБС при 37 °С.

Помимо отсутствия значимого взаимодействия с белками плазмы, НЧ конъюгатов 1, 3–7 практически не оказывают воздействия на эритроциты, то есть не обладают выраженной гемолитической активностью. Полученные наноструктуры в диапазоне концентраций от 125 до 500 мкг/мл вызывали гемолиз красных клеток крови не более 1,5 %, что сопоставимо с коммерческой ЛФ РТХ (Рисунок 17). В совокупности это подтверждает целесообразность рассмотрения НЧ конъюгата паклитаксела с биотином, стабилизированных низкомолекулярным ПВС, в качестве перспективного инъекционного препарата для внутривенного введения. Включение гидрофобных спейсеров, содержащих до 17 линейно связанных атомов, в состав конъюгатов не влияет на возможность их самоорганизации в водной среде, а также на ключевые характеристики соответствующих наноструктур. Это открывает путь к разработке прототипа ЛФ на основе НЧ конъюгата, содержащего стимул-чувствительный линкер.

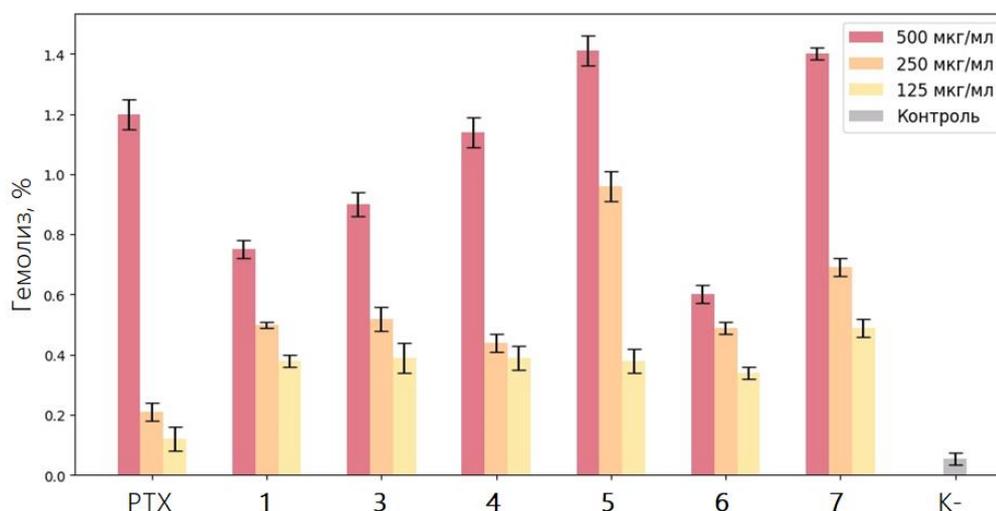
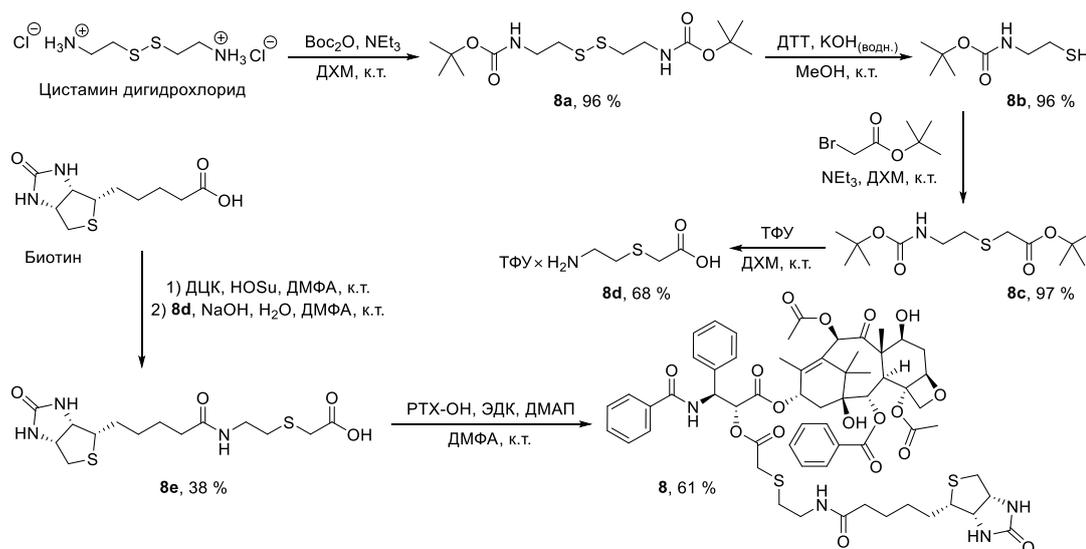


Рисунок 17 – Гемолитическая активность коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®), НЧ конъюгатов **1**, **3–7** и отрицательного контроля (К-, ФСБ) относительно положительного контроля (100 % гемолиза).

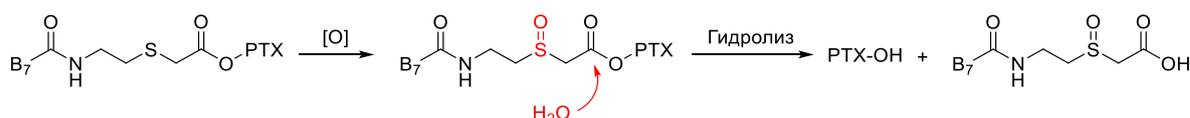
#### 2.4. Синтез конъюгата со стимул-чувствительным линкером, получение наночастиц на его основе и оценка противоопухолевой активности

В качестве стимул-чувствительного линкера, вводимого в состав конъюгата паклитаксела с биотином, была выбрана тиоэфирная группа, которая должна быть расположена вблизи сложноэфирной группы, связывающей паклитаксел с производным витамина. Примечательным такой линкер делает его простота, что предопределило его использование в создании систем адресной доставки ЛВ [117–119], а также тот факт, что его структура имеет минимальные отличия от аминокислотных линкеров, включение которых в состав конъюгатов паклитаксела с биотином, как было установлено выше, не препятствует их способности формировать коллоидно-стабильные НЧ. Синтез стимул-чувствительного линкера начинали с дигидрохлорида цистамина (Схема 8). На первой стадии его аминогруппы защищали *трет*-бутоксикарбонильной защитой, после чего дисульфидную связь в соединении **8a** восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), что приводило к производному цистамина **8b**. Его тиольную группу далее алкилировали *трет*-бутилбромацетатом с образованием соединения **8c**, защитные группы которого удаляли действием трифторуксусной кислоты (ТФУ), что приводило к соли аминокислоты **8d**. Затем карбоксильную группу биотина активировали и присоединяли к соединению **8d**. Производным биотина **8e** далее ацилировали паклитаксел, что приводило к конъюгату **8**, содержащему стимул-чувствительный линкер. По данным ВЭЖХ чистота выделенного конъюгата **8** составила более 95 %.



Известно, что органические сульфиды могут окисляться активными формами кислорода (АФК), выработка которых повышена в опухолевых клетках [117]. Предполагалось, что после рецептор-опосредованного эндоцитоза конъюгат **8** будет подвержен воздействию АФК, приводящему к окислению тиоэфирного линкера и появлению сильного электроакцептора вблизи сложноэфирной группы, связывающей паклитаксел с производным биотина (Схема 9). Это должно облегчать нуклеофильную атаку молекулы воды по карбонильной группе и приводить к последующему гидролизу сложноэфирной связи и высвобождению химиотерапевтического агента.

Схема 9



Было установлено, что конъюгат **8** обладал практически сопоставимой с паклитакселом цитотоксичностью на клетках карциномы поджелудочной железы (Таблица 6). В то же время активность конъюгата **8** оказывалась на порядок выше по сравнению с активностью конъюгата **5** с почти такой же длиной линкера, но без тиоэфирного линкера. Это свидетельствует о том, что данная группировка играет ключевую роль в высвобождении химиотерапевтического агента из гибридной молекулы. При этом цитотоксический эффект обусловлен именно попаданием конъюгата паклитаксела и биотина в опухолевую клетку, поскольку воздействие биотина или его эквимольной смеси с паклитакселом не возымело такого же эффекта.

Таблица 6 – Оценка цитотоксичности исследуемых веществ.

Вещество	Клеточная линия	
	PANC-1	MIA PaCa-2
	IC <sub>50</sub> , нМ	
Паклитаксел	59 ± 5	9 ± 1
Конъюгат <b>8</b>	62 ± 2	51 ± 3
Конъюгат <b>5</b>	682 ± 30	758 ± 2
Биотин	>1000	>1000
Паклитаксел + биотин*	774 ± 13	559 ± 47

\* – эквимольная смесь.

Для оптимизации получения НЧ на основе конъюгата **8** способом наноосаждения (Рисунок 18) сначала при его фиксированной концентрации (1 мг/мл) варьировали содержание ПВС в суспензии. Найдено, что минимальный размер частиц наблюдался при концентрации стабилизатора 0,4 % (м/о) при PDI менее 0,2. Дальнейшее увеличение концентрации конъюгата **8** в суспензии приводило к заметному росту размера наноструктур и PDI. Поэтому были выбраны следующие оптимальные условия для их получения, а именно концентрация конъюгата **8** в суспензии 1 мг/мл и концентрация ПВС 0,4 % (м/о). Было получено три серии наночастиц конъюгата **8** в оптимальных условиях. Во всех случаях наблюдалась воспроизводимость основных характеристик прототипа лекарственной формы (Таблица 7). Установлено, что конъюгат **8**, как и остальные подобные соединения, при наноосаждении в ПВС формирует сферические наночастицы с различной оболочкой из стабилизатора (Рисунок 19).

Таблица 7 – Характеристика НЧ конъюгата **8**, полученных в оптимальных условиях.

Параметр	Значение
Среднеобъёмный диаметр частиц, нм	176 ± 5
PDI	0,066 ± 0,041
ζ-потенциал, мВ	-15,9 ± 0,6
Содержание конъюгата, мг во флаконе	0,89 ± 0,03
Содержание ПВС, мг во флаконе	3,95 ± 0,05
Эффективность инкапсуляции, %	93 ± 4
Доля доступного биотина, %	84 ± 1

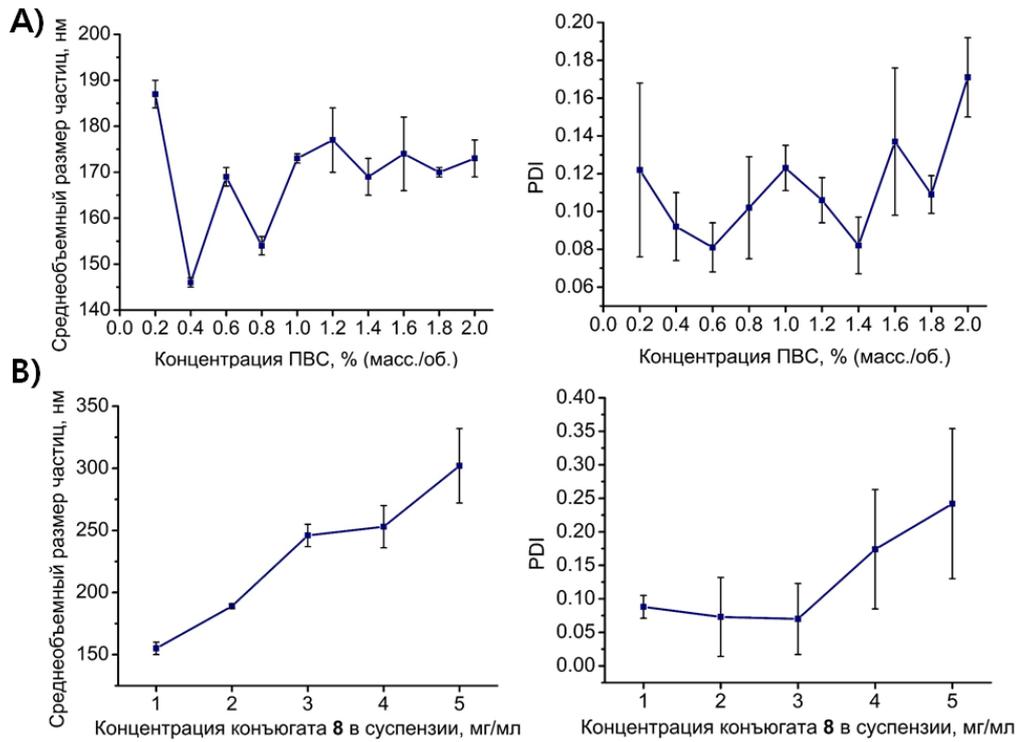


Рисунок 18 – Оптимизация процесса получения НЧ конъюгата **8** методом наноосаждения (пояснения см. в тексте).

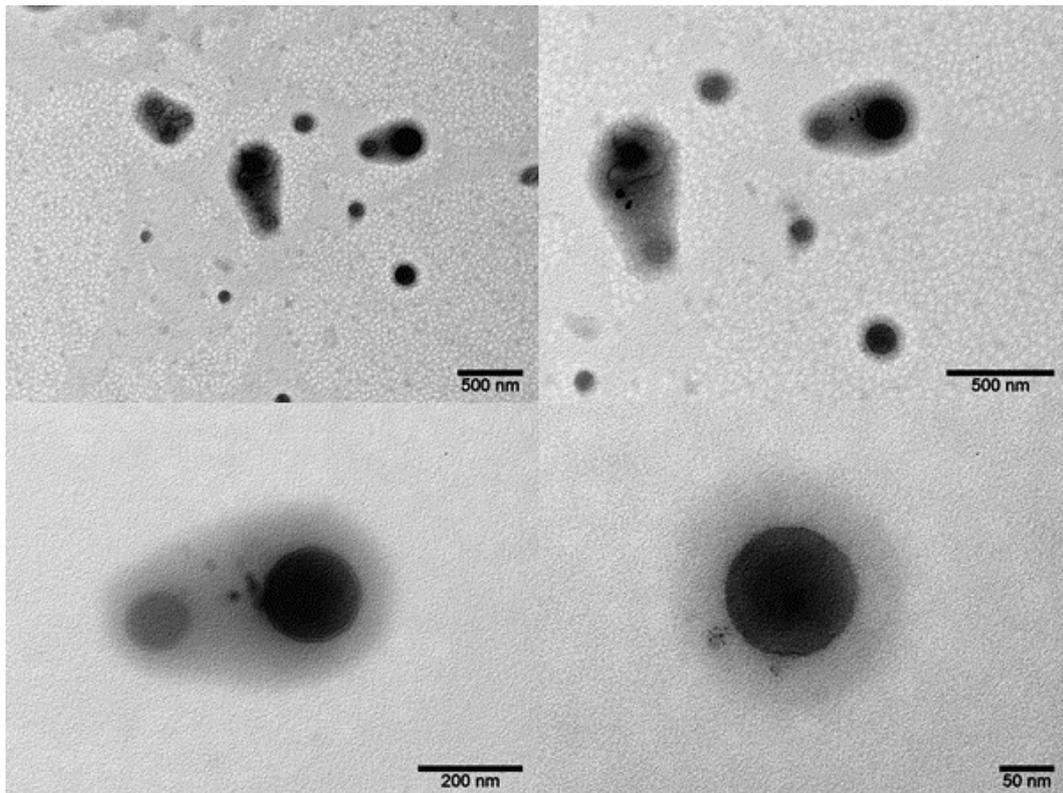


Рисунок 19 – Микрофотографии ПЭМ наночастиц конъюгата **8**, полученные наноосаждением в оптимизированных условиях.

Суспензии наноструктур оказались стабильны в воде и физрастворе при хранении как при комнатной температуре, так и в холодильной камере в течение как минимум восьми дней (Рисунок 20). Таким образом, НЧ обладают необходимой

коллоидной устойчивостью в среде, в которой их можно ресуспендировать перед внутривенным введением. При этом ресуспендирование лиофилизата в меньшем объеме физраствора вплоть до концентрации конъюгата 5 мг/мл, сопоставимой с концентрацией РТХ в его коммерческих лекарственных формах, не приводило к агрегации, а также существенному изменению размера и PDI. Указанные характеристики НЧ конъюгата **8** также практически не менялись в средах, содержащих белок, что свидетельствует об их потенциальной стабильности в культуральной среде (при дальнейшем изучении цитотоксичности) и плазме крови (Рисунок 21). Кроме того, наноструктуры при разных концентрациях в среднем обладали гемолитической активностью, сопоставимой с той, что характерна для коммерческой лекарственной формы паклитаксела (Рисунок 22). В совокупности, это делает допустимым как внутривенное введение таких НЧ, так и их циркуляцию в кровотоке, приводящую к накоплению в тканях злокачественного новообразования.

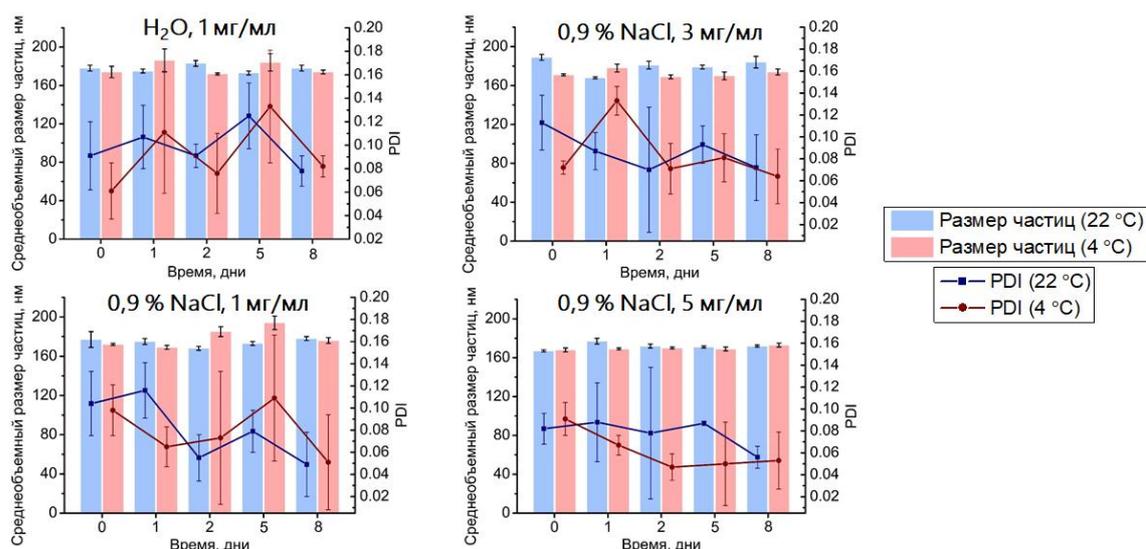


Рисунок 20 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата **8** в воде и физрастворе при различных его концентрациях в суспензии и температурных режимах.

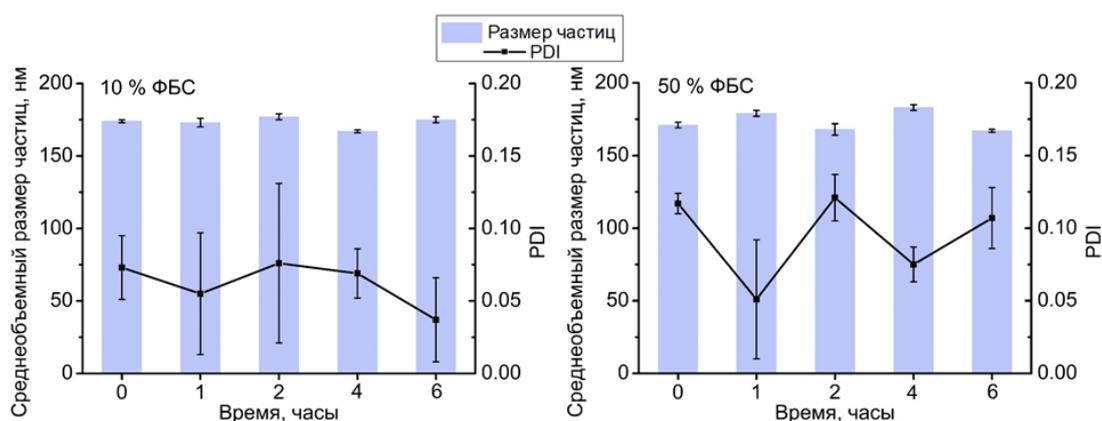


Рисунок 21 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата **8** в средах, моделирующих культуральную среду (слева) и плазму крови (справа).

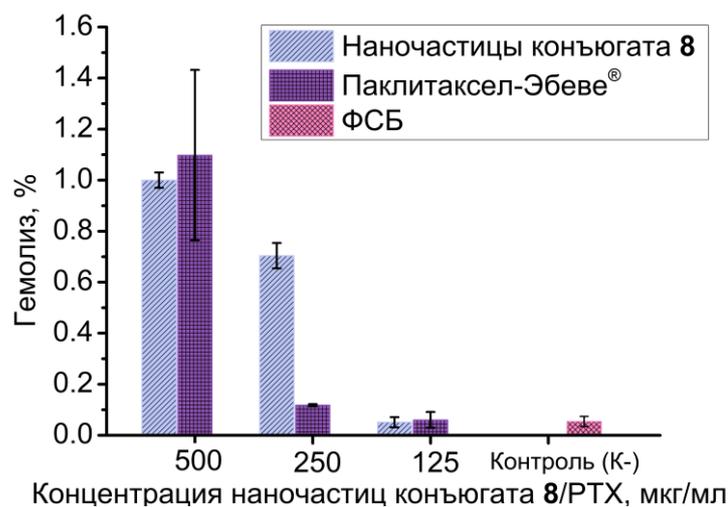


Рисунок 22 – Сравнительная гистограмма гемолитических активностей НЧ конъюгата 8 и коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®).

Установлено (Таблица 8), что цитотоксичность прототипа ЛФ на основе НЧ конъюгата 8 превышает на порядок цитотоксичность как НЧ конъюгата 5, так и Абраксана® — коммерческого химиотерапевтического препарата, представляющего собой комплекс паклитаксела и человеческого сывороточного альбумина, применяемого для лечения онкологических заболеваний, в частности поджелудочной железы [120]. Это свидетельствует о том, что НЧ конъюгата 8 являются многообещающим прототипом лекарственной формы, предназначенной для химиотерапии.

Таблица 8 – Оценка цитотоксичности Абраксана® и наночастиц конъюгатов 8 и 5.

Препарат	Клеточная линия	
	PANC-1	MIA PaCa-2
	<b>IC<sub>50</sub>, нМ</b>	
Абраксан®	460 ± 18	607 ± 52
НЧ конъюгата 8	56 ± 2	58 ± 4
НЧ конъюгата 5	576 ± 47	791 ± 33

## ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 3.1. Материалы и реактивы

Паклитаксел был приобретён у компании Fujian South Pharmaceutical Co., Ltd. (Китай). Биотин был предоставлен компанией Baoji Guokang Bio-Technology Co., Ltd. (Китай). N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 4-диметиламинопиридин (DMAP) и поливиниловый спирт (ПВС, 9-10 кДа) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Япония). Гидрохлорид N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI) был приобретён у компании Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Индия). Количественное определение биотина проводили с использованием 4'-гидроксиазобензол-2-карбоновой кислоты (ГАБК) (Thermo Fisher Scientific, США) и авидина (Merck, Германия). Фосфатно-солевой буфер готовили путём растворения таблеток (MP Biomedicals, LLC, Франция) в дистиллированной воде. Все остальные химические реактивы были приобретены у коммерческих поставщиков (Fujian South Pharmaceutical, Acros Organics, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific и Sisco Research Laboratories) и использованы без дополнительной очистки, если не указано иное. Сухой ДМФА был получен путём вакуумной перегонки над фосфорным ангидридом. Триэтиламин, ТГФ и ДХМ были предварительно очищены перегонкой над гидридом кальция.

Для препаративной нормально-фазовой колоночной хроматографии использовали силикагель УМС 60 (75 мкм). Аналитическую ТСХ проводили на пластинах Sorbfil с нормальной фазой (ТСХ-силикагель 5-17 мкм F254). Пятна на пластинах ТСХ визуализировали с помощью УФ-лампы при длине волны 254 нм или йодной камеры.

### 3.2. Общие методы

Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance 400, Bruker Avance 500 и Avance 600 (Bruker, Германия) при комнатной температуре (если не указано иное). Внутреннюю калибровку химических сдвигов ( $\delta$ ) проводили по сигналам остаточного ( $^1\text{H}$ ) или дейтерированного ( $^{13}\text{C}$ ) растворителя. Во всех случаях спектры ЯМР  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  измеряли в режиме JMODECHO; сигналы для ядер углерода, связанных с нечётным и чётным числом протонов, имели противоположную полярность. Отнесение сигналов

на одномерных спектрах ЯМР для конъюгатов основывалось на анализе двумерных спектров  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (HMQC) и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Масс-спектры высокого разрешения были получены на масс-спектрометре с ион-циклотронным резонансом и преобразованием Фурье Bruker MS ApexUltra (Bruker, Германия) с источником ионизации методом электрораспыления (ИЭР). Инфракрасные спектры были получены на фурье-преобразовательном инфракрасном спектрометре Thermo Fisher Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием безводного KBr в качестве матрицы образца. Исследования методом спектрофотометрии в УФ и видимой областях проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1900i (Япония) при комнатной температуре.

Анализ методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии выполняли на хроматографической системе «Миличром-А02» (EkoNova, Россия) в следующих условиях: колонка —  $120 \times 5$  мм ProntoSIL 120-5-C18, 5 мкм; длина волны детектирования — 230 нм; температура —  $35\text{ }^\circ\text{C}$ ; объём вводимой пробы — 2 мкл; подвижные фазы — А: вода, Б: ацетонитрил; скорость потока — 100 мкл/мин; профиль градиента представлен на хроматограммах в приложении. В случае конъюгата **8** аналитическая ВЭЖХ была проведена на хроматографической системе Shimadzu LC-2030C 3D Plus со следующими условиями измерения: колонка —  $250 \times 4,6$  мм C-18 Universal (Hawach Scientific Co., Ltd., Китай), 5 мкм; длина волны детектирования — 228 нм; температура —  $35\text{ }^\circ\text{C}$ ; объём вводимой пробы — 10 мкл; подвижные фазы — А: вода, Б: ацетонитрил; скорость потока — 100 мкл/мин; режим элюирования — изократический режим, 55 % фазы Б в течение 20 мин. Чистоту конъюгатов и долю примесей устанавливали способом нормировки площадей.

Определение характеристик НЧ методами ДЛС и ЭРС выполняли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при концентрации коллоидных структур приблизительно 20 мкг/мл в деионизированной дистиллированной воде. Морфология нанообъектов была исследована с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd., Япония). Для этого наночастицы разбавляли до концентрации приблизительно 0,1–0,5 мг/мл, наносили на медные сетки, покрытые формваром (0,5 % (м/об) раствор в хлороформе), высушивали, проведя предварительное контрастирование ацетатом уранила, и исследовали при ускоряющем напряжении 120 кВ.

### 3.3. Синтетические методы

#### 3.3.1. Синтез конъюгата 1

##### *Конъюгат 1*

Паклитаксел (256 мг, 0,3 ммоль) и ДМАП (37 мг, 0,3 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (3 мл). Затем к раствору последовательно добавляли биотин (81 мг, 0,33 ммоль) и ЭДК (69 мг, 0,36 ммоль) при интенсивном перемешивании при комнатной температуре. Спустя сутки реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл) и последовательно промывали 1 М HCl (50 мл), водой (3 × 50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл). Органический слой высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Остаток дополнительно очищали нормально-фазовой колоночной хроматографией (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → ацетон). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме, в результате чего получали конъюгат 1 в виде белого аморфного порошка (269 мг, 83 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,30 (ацетон).

ВЭЖХ C18 t<sub>R</sub> = 6,96 мин (чистота 99,7 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 8,15 (д; J = 7,0 Гц; 2H); 7,86 (д; J = 9,5 Гц; 1H); 7,78 (д; J = 7,2 Гц; 2H); 7,59 (т; J = 7,4 Гц; 1H); 7,49 (т; J = 7,8 Гц; 2H); 7,47 – 7,35 (м; 7H); 7,31 (т; J = 7,2 Гц; 1H); 6,30 (с; 1H); 6,25 – 6,17 (м; 2H); 6,00 (дд; J = 9,4; 3,7 Гц; 1H); 5,68 (д; J = 7,2 Гц; 1H); 5,49 (д; J = 3,8 Гц; 1H); 5,34 (с; 1H); 4,97 (дд; J = 9,6; 2,6 Гц; 1H); 4,47 – 4,39 (м; 1H); 4,30 (д; J = 8,4 Гц; 1H); 4,25 – 4,18 (м; 2H); 4,08 – 4,01 (м; 1H); 3,81 (д; J = 7,2 Гц; 1H); 2,99 (тд; J = 7,3; 4,5 Гц; 1H); 2,79 (дд; J = 12,9; 5,0 Гц; 1H); 2,64 (д; J = 4,3 Гц; 1H); 2,60 (д; J = 12,8 Гц; 1H); 2,54 (ддд; J = 8,2; 8,1; 3,2 Гц; 1H); 2,48 (с; 3H); 2,45 – 2,31 (м; 3H); 2,21 (с; 3H); 2,16 (дд; J = 15,0; 9,1 Гц; 1H); 2,11 (с; 1H); 1,98 (с; 2H); 1,94 (д; J = 1,4 Гц; 3H); 1,88 (ддд; J = 14,2; 11,1; 2,6 Гц; 1H); 1,68 (с; 3H); 1,65 – 1,49 (м; 4H); 1,39 – 1,29 (м; 2H); 1,23 (с; 3H); 1,14 (с; 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 204,0; 173,3; 171,4; 170,2; 169,2; 167,7; 167,1; 163,7; 142,7; 137,2; 134,0; 133,8; 133,0; 131,9; 130,4; 129,5; 129,1; 128,9; 128,7; 128,6; 127,5; 127,0; 84,6; 81,2; 79,2; 76,6; 75,8; 75,2; 74,4; 72,2; 61,9; 60,2; 58,6; 55,5; 53,0; 45,8; 43,4; 40,6; 35,8; 35,7; 33,2; 28,1; 28,0; 27,0; 24,9; 22,9; 22,4; 21,0; 15,0; 9,8.

МСВР (ИЭР) m/z [M+H]<sup>+</sup> расщ. C<sub>57</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>S 1080,4158; найдено 1080,4124.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **1** (Рисунок 23, Таблица 9).

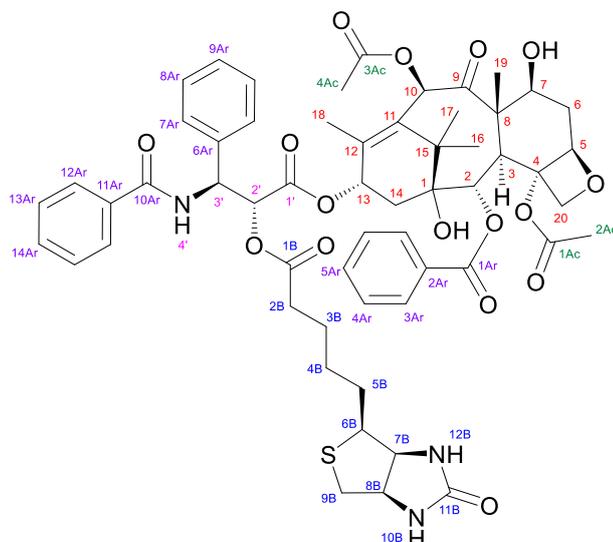


Рисунок 23 – Нумерационная схема конъюгата **1**.

Таблица 9 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата **1**.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	79,2
2	5,68	д	7,2	75,2
3	3,81	д	7,2	45,8
4	-	-	-	81,2
5	4,97	дд	9,6, 2,6	84,6
6	1,88 2,54	ddd ddd	14,2, 11,1, 2,6 8,2, 8,1, 3,2	35,8
7	4,43	м	-	72,2
8	-	-	-	58,6
9	-	-	-	204,0
10	6,30	с	-	74,4
11	-	-	-	133,0
12	-	-	-	142,7
13	6,22	м	-	72,2
14	2,16 2,37	дд м	15,0, 9,1 -	33,2
15	-	-	-	43,4
16	1,14	с	-	22,9
17	1,23	с	-	27,0
18	1,94	д	1,4	15,0
19	1,68	с	-	9,8
20	4,21 4,30	м д	- 8,4	76,6
1'	-	-	-	169,2
2'	5,49	д	3,8	74,4
3'	6,00	дд	9,4, 3,7	53,0
4'	7,86	д	9,5	-
1Ac	-	-	-	170,2
2Ac	2,48	с	-	22,4
3Ac	-	-	-	171,4
4Ac	2,21	с	-	21,0

1Ar	-	-	-	167,1
2Ar	-	-	-	134,0
3Ar	8,15	д	7,0	130,4
4Ar	7,49	т	7,8	128,7
5Ar	7,59	т	7,4	133,8
6Ar	-	-	-	137,2
7Ar	7,41	м	-	127,5
8Ar	7,41	м	-	129,1
9Ar	7,41	м	-	131,9
10Ar	-	-	-	167,7
11Ar	-	-	-	129,5
12Ar	7,78	д	7,2	127,0
13Ar	7,41	м	-	128,9
14Ar	7,31	т	7,2	128,6
1B	-	-	-	173,3
2B	2,37	м	-	35,7
3B	1,34	м	-	28,1
4B	1,57	м	-	28,0
5B	1,57	м	-	24,9
6B	2,99	тд	7,3, 4,5	55,5
7B	4,05	м	-	61,9
8B	4,21	м	-	60,2
9B	2,60 2,79	д дд	12,8 12,9, 5,0	40,6
10B	5,34	с	-	-
11B	-	-	-	163,7
12B	6,22	м	-	-

### 3.3.2. Синтез конъюгата 2

#### *1,2-Бис-(2-азидоэтокси)этан 2a*

Синтез *1,2-бис-(2-азидоэтокси)этана 2a* проводили на основе представленной в литературе методики с некоторыми модификациями [121].

К интенсивно перемешиваемому и охлаждённому до 0 °С раствору триэтиленгликоля (4,51 г, 30 ммоль) и TsCl (12,39 г, 65 ммоль) в сухом дихлорметане (50 мл) небольшими порциями добавляли тонкоизмельчённый КОН (9,88 г, 180 ммоль). Реакционную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч, после чего разбавляли водой (150 мл) и перемешивали до почти полного растворения неорганического остатка. Затем смесь переносили в делительную воронку и отделяли органический слой, водную фазу промывали дихлорметаном (2 × 50 мл). Объединённый экстракт сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Белый кристаллический остаток смешивали с ацетоном (50 мл) и раствором NaN<sub>3</sub> (7,80 г, 120 ммоль) в воде (30 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение суток, после чего реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Затем её упаривали

наполовину, и продукт экстрагировали в метил-*трет*-бутиловый эфир (МТБЭ) (4 × 25 мл). Объединённую органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме, получая 1,2-*бис*-(2-азидоэтокси)этан **2a** в виде прозрачной жидкости (5,95 г, 99 %).

TLC R<sub>f</sub> = 0,74 (гексан/EtOAc 1:1).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 3,64 – 3,59 (м; 4H); 3,58 (с; 4H); 3,39 (т; *J* = 5,0 Гц; 4H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 69,7; 69,3; 50,0.

Спектральные характеристики соединения **2a** согласуются с представленными в литературе данными [121, 122].

### 2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **2b**

2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **2b** был синтезирован в соответствии с методом, описанным ранее [123].

Через эмульсию 1,2-*бис*-(2-азидоэтокси)этана **2a** (5,01 г, 25 ммоль) в смеси этилацетата (75 мл) и 1 М раствора HCl (25 мл) в течение 10 мин пропускали аргон. Параллельно готовили раствор трифенилфосфина (6,82 г, 26 ммоль) в этилацетате (50 мл), который затем добавляли по каплям в течение часа к эмульсии при интенсивном перемешивании в инертной атмосфере. Реакционную смесь оставляли на 16 ч, затем разбавляли 4 М раствором HCl (30 мл) и переносили в делительную воронку. Органический слой отделяли, водную фазу промывали диэтиловым эфиром (10 × 20 мл), затем при охлаждении добавляли гранулы NaOH до pH 13 и экстрагировали в ДХМ (4 × 30 мл). Объединённый экстракт сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме, получая 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **2b** в виде желтоватой жидкости (3,18 г, 73 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,53 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 100:50:1).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 3,60 (т; *J* = 4,9 Гц; 2H); 3,58 – 3,50 (м; 4H); 3,42 – 3,34 (м; 4H); 2,64 (т; *J* = 5,8 Гц; 2H); 1,62 (с; 2H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 73,0; 69,7; 69,6; 69,3; 50,0; 41,3.

Спектральные характеристики **2b** согласуются с литературными данными [122, 123].

### 3-((2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропионовая кислота **2c**

К интенсивно перемешиваемому раствору 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-амин **2b** (1,91 г, 11 ммоль), ДМАП (0,12 г, 1 ммоль) и триэтиламина (1,39 мл, 10 ммоль) в

безводном дихлорметане (20 мл) осторожно небольшими порциями добавляли янтарный ангидрид (1,00 г, 10 ммоль) при охлаждении до 0 °С. Реакционную смесь затем доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Далее её разбавляли дихлорметаном (20 мл) и промывали 1 М раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в насыщенном растворе NaCl (2 × 30 мл) и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме, получая 3-((2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропановую кислоту **2c** в виде жёлтой вязкой жидкости (1,54 г, 56 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,60 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 100:10:1).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,04 (с; 1H); 7,88 (т; *J* = 5,6 Гц; 1H); 3,60 (т; *J* = 5,0 Гц; 2H); 3,58 – 3,50 (м; 4H); 3,39 (кв; *J* = 5,5 Гц; 4H); 3,18 (кв; *J* = 5,9 Гц; 2H); 2,40 (т; *J* = 7,2 Гц; 2H); 2,31 (т; *J* = 7,2 Гц; 2H),

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 173,9; 171,0; 69,6; 69,3; 69,2; 50,0; 38,6; 29,9; 29,1.

МСВР (ИЭР) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> расщ. C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 275,1350; найдено 275,1353.

Спектральные характеристики **2c** согласуются с литературными данными [124].

#### *Гидразид биотина 2d*

Биотин (1,95 г, 8,0 ммоль) суспендировали в метаноле (25 мл). Затем по каплям добавляли тионилхлорид (1,45 мл, 20 ммоль), что сопровождалось разогревом смеси. Реакционную массу перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре и упаривали под вакуумом. Кристаллический остаток трижды суспендировали в дихлорметане (10 мл) и упаривали для удаления остаточных количеств тионилхлорида. Затем остаток растворяли в метаноле (25 мл) при небольшом нагревании. К раствору по каплям добавляли гидразингидрат (80 %, 4,30 мл, 70 ммоль), что сопровождалось образованием гелеобразного осадка. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч, а затем упаривали. Остаток перекристаллизовывали из дистиллированной воды. Образовавшиеся кристаллы фильтровали, промывали холодной водой (15 мл) и этилацетатом (15 мл) и сушили при 50 °С. Гидразид биотина **2d** получали в виде белых кристаллов (1,80 г, 87 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,47 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 20:80:1).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 8,91 (с; 1H); 6,43 (с; 1H); 6,36 (с; 1H); 4,34 – 4,26 (м; 1H); 4,14 (с; 2H); 4,11 (д; *J* = 6,1 Гц; 1H); 3,09 (дт; *J* = 9,1; 5,5 Гц; 1H); 2,82 (дд; *J* = 12,4;

5,0 Гц; 1H); 2,59 (с; 1H); 2,00 (т;  $J = 7,4$  Гц; 2H); 1,63 – 1,58 (м; 1H); 1,54 – 1,40 (м; 3H); 1,39 – 1,24 (м; 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  171,5; 162,7; 61,0; 59,2; 55,4; 39,8; 33,2; 28,2; 28,0; 25,2.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$  259,1223; найдено 259,1226.

ИК (KBr):  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$  3304 (N–H<sub>амид</sub>), 3226 (N–H<sub>амин</sub>), 1689 (C=O).

Спектральные характеристики **2d** согласуются с литературными данными [125].

### *3-((2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропаноилгидразид биотина 2e*

К интенсивно перемешиваемой суспензии гидразида биотина **2d** (0,78 г, 3 ммоль) в растворе 3-((2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропановой кислоты **2c** (0,91 г, 3,3 ммоль) и ДМАП (0,37 г, 3 ммоль) в ДМСО (25 мл) добавляли ЭДК (0,69 г, 3,6 ммоль) небольшими порциями. Реакционную массу перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре, после чего её по каплям добавляли к этилацетату (220 мл) при интенсивном перемешивании. Суспензию выдерживали при 5 °С для полной коагуляции осадка, который затем отделяли и промывали дополнительным количеством холодного этилацетата (20 мл). Далее полученный осадок кипятили со смесью изопропилового спирта и этилацетата (1:1) (150 мл) в течение 1 часа, после чего суспензию охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Осадок промывали этилацетатом (20 мл) и сушили при 50 °С, что позволяло получать 3-((2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропаноилгидразид биотина **2e** в виде белого порошка (1,10 г, 71 %).

ТСХ  $R_f = 0,63$  (ДХМ/MeOH 1:1).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  9,70 (с; 1H); 9,66 (с; 1H); 7,90 (т;  $J = 5,6$  Гц; 1H); 6,42 (с; 1H); 6,36 (с; 1H); 4,30 (дд;  $J = 7,8$ ; 5,0 Гц; 1H); 4,13 (ддд;  $J = 7,6$ ; 4,4; 2,0 Гц; 1H); 3,60 (т;  $J = 4,7$  Гц; 2H); 3,58 – 3,49 (м; 4H); 3,39 (кв;  $J = 5,5$  Гц; 4H); 3,18 (кв;  $J = 5,9$  Гц; 2H); 3,09 (ддд;  $J = 8,5$ ; 6,3; 4,4 Гц; 1H); 2,82 (дд;  $J = 12,4$ ; 5,1 Гц; 1H); 2,58 (д;  $J = 12,4$  Гц; 1H); 2,54 (с; 1H); 2,33 (секстет;  $J = 1,9$  Гц; 3H); 2,10 (т;  $J = 7,6$  Гц; 2H); 1,66 – 1,41 (м; 4H); 1,40 – 1,25 (м; 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  171,1; 171,0; 170,4; 162,8; 69,6; 69,3; 69,1; 61,1; 59,2; 55,4; 50,0; 40,4; 38,6; 32,9; 30,3; 28,6; 28,1; 28,0; 25,1.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}$  515,2395; найдено 515,2408.

ИК (KBr):  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$  3271 (N–H), 2108 (–N<sub>3</sub>), 1695 (C=O).

*3-((2-(2-(2-Аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропаноилгидразид биотина **2f***

К интенсивно перемешиваемому раствору 3-((2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропаноилгидразида биотина **2e** (1,03 г, 2 ммоль) в ДМСО (15 мл) последовательно добавляли трифенилфосфин (0,66 г, 2,5 ммоль) и воду (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре, после чего при интенсивном перемешивании по каплям прибавляли в этилацетат (180 мл). Суспензию выдерживали при 5 °С для полной коагуляции осадка, который затем отделяли и промывали дополнительным количеством холодного этилацетата (20 мл). Затем собранный осадок кипятили с этилацетатом (80 мл) в течение 1 часа, после чего суспензию медленно охлаждали до 5 °С и фильтровали. Выделившийся осадок промывали холодным этилацетатом (10 мл) и высушивали при 50 °С, что позволяло получать белый порошок 3-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)пропаноилгидразида биотина **2f** (0,83 г, 85 %).

TLC:  $R_f = 0.15$  (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 7,93 (т;  $J = 5,7$  Гц; 1H); 6,43 (с; 1H); 6,37 (с; 1H); 4,31 (дд;  $J = 7,8; 5,0$  Гц; 1H); 4,13 (тт;  $J = 4,4; 2,0$  Гц; 1H); 3,50 (с; 4H); 3,38 (дт;  $J = 13,4; 5,9$  Гц; 4H); 3,18 (кв;  $J = 5,9$  Гц; 2H); 3,09 (ддд;  $J = 8,5; 6,2; 4,3$  Гц; 1H); 2,82 (дд;  $J = 12,4; 5,1$  Гц; 1H); 2,66 (т;  $J = 5,7$  Гц; 2H); 2,58 (д;  $J = 12,4$  Гц; 1H); 2,33 (секстет;  $J = 1,8$  Гц; 3H); 2,09 (т;  $J = 7,1$  Гц; 2H); 1,66 – 1,41 (м; 4H); 1,40 – 1,25 (м; 2H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 171,1; 171,0; 170,4; 162,8; 72,6; 69,6; 69,5; 69,1; 61,0; 59,2; 55,4; 41,2; 38,6; 32,9; 30,3; 28,6; 28,1; 28,0; 25,1.

МСВР (ИЭР)  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> рассч. C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S 489,2490; найдено 489,2485.

ИК (KBr):  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup> 3292 (N–H), 1703 (C=O).

*2'-Сукцинилпаклитаксел **2g***

Синтез 2'-сукцинилпаклитаксела **2g** проводили в соответствии с описанным ранее методом с некоторыми модификациями [126].

Паклитаксел (854 мг, 1 ммоль) и янтарный ангидрид (120 мг, 1,2 ммоль) растворяли в сухом ДХМ (20 мл). После этого к реакционной массе добавляли безводный NEt<sub>3</sub> (84 мкл, 0,6 ммоль), затем смесь кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч, после чего охлаждали до комнатной температуры и разбавляли ДХМ (40 мл). Полученный

раствор промывали 0,1 М НСl (80 мл). Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовали из смеси ацетон/вода (1:1), отфильтровывали, промывали холодной смесью ацетон/вода (1:1) и высушивали при 50 °С, получая 2'-сукцинилпаклитаксел **2g** в виде белых игольчатых кристаллов (887 мг, 93 %).

ВЭЖХ C18  $t_R = 6,93$  мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 8,12 (д;  $J = 7,8$  Гц; 2H); 7,74 (д;  $J = 7,6$  Гц; 2H); 7,60 (т;  $J = 7,4$  Гц; 1H); 7,49 (кв;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 7,44 – 7,30 (м; 7H); 7,15 (д;  $J = 9,5$  Гц; 1H); 6,29 (с; 1H); 6,24 (т;  $J = 9,3$  Гц; 1H); 5,98 (дд;  $J = 9,3; 3,4$  Гц; 1H); 5,68 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 5,51 (д;  $J = 3,4$  Гц; 1H); 4,96 (д;  $J = 9,6$  Гц; 1H); 4,42 (дд;  $J = 10,9; 6,6$  Гц; 1H); 4,29 (д;  $J = 8,5$  Гц; 1H); 4,19 (д;  $J = 8,4$  Гц; 1H); 3,80 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 2,69 – 2,45 (м; 6H); 2,42 (с; 3H); 2,36 (дд;  $J = 15,5; 9,2$  Гц; 1H); 2,19 (с; 3H); 1,90 (с; 3H); 1,66 (с; 3H); 1,21 (с; 3H); 1,12 (с; 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 203,9; 175,8; 171,4; 171,3; 170,0; 168,1; 167,9; 167,0; 142,7; 136,8; 133,8; 133,6; 133,0; 132,2; 130,4; 129,3; 129,2; 128,9; 128,8; 128,7; 127,3; 126,7; 84,6; 81,2; 79,0; 77,4; 76,6; 75,7; 75,2; 74,3; 72,2; 72,0; 58,6; 52,9; 45,7; 43,3; 35,7; 28,8; 28,6; 26,9; 22,8; 22,2; 20,9; 14,9; 9,7,

МСВР (ИЭР)  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> рассч. C<sub>51</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>17</sub> 954,3543; найдено 954,3544.

Спектральные характеристики **2g** согласуются с литературными данными [126].

#### *N*-Гидроксисукцинимидный эфир 2'-сукцинилпаклитаксела **2h**

2'-Сукцинилпаклитаксел **2g** (764 мг, 0,8 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (288 мг, 2,5 ммоль) растворяли в сухом ДМФА (10 мл). Затем тремя равными порциями с интервалом в 10 ч добавляли ЭДК (575 мг, 3 ммоль). После этого реакционную массу перемешивали при комнатной температуре ещё 20 ч, а затем разбавляли этилацетатом (120 мл). Органическую фазу последовательно промывали 0,1 М НСl (30 мл), водой (30 мл), 0,1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 мл) и водой (3 × 30 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме, что приводило к *N*-гидроксисукцинимидному эфиру 2'-сукцинилпаклитаксела **2h** в виде белого аморфного порошка (816 мг, 97 %).

ВЭЖХ C18  $t_R = 7,99$  мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 8,13 (д;  $J = 7,0$  Гц; 2H); 7,74 (д;  $J = 7,0$  Гц; 2H); 7,61 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 7,56 – 7,44 (м; 3H); 7,43 – 7,29 (м; 7H); 7,15 (д;  $J = 9,2$  Гц; 1H); 6,29 (с; 1H);

6,22 (тд;  $J = 9,1$ ; 1,7 Гц; 1H); 5,98 (дд;  $J = 9,2$ ; 3,8 Гц; 1H); 5,67 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 5,53 (д;  $J = 3,8$  Гц; 1H); 4,96 (дд;  $J = 9,6$ ; 2,4 Гц; 1H); 4,47 – 4,39 (м; 1H); 4,29 (д;  $J = 8,1$  Гц; 1H); 4,19 (д;  $J = 8,4$  Гц; 1H); 3,80 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 3,01 – 2,78 (м; 7H); 2,71 (с; 3H); 2,60 – 2,50 (м; 2H); 2,44 (с; 3H); 2,33 (дд;  $J = 15,4$ ; 9,5 Гц; 1H); 2,22 (с; 3H); 2,11 (дд;  $J = 15,3$ ; 9,1 Гц; 1H); 1,90 (д;  $J = 1,5$  Гц; 3H); 1,85 (д;  $J = 16,2$  Гц; 2H); 1,67 (с; 3H); 1,22 (с; 3H); 1,12 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  204,0; 171,4; 170,3; 170,0; 169,1; 168,0; 167,4; 167,1; 142,9; 136,9; 134,0; 133,8; 132,8; 132,0; 130,4; 129,4; 129,2; 128,9; 128,7; 128,6; 127,4; 126,9; 84,6; 81,1; 79,2; 77,4; 76,6; 75,7; 75,2; 74,8; 72,2; 72,1; 58,6; 53,0; 45,7; 43,3; 35,7; 35,6; 28,6; 26,9; 26,2; 25,6; 22,8; 22,2; 21,0; 15,0; 9,7.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{55}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{19}$  1051,3707; найдено 1051,3788.

Спектральные характеристики соединения **2h** согласуются с представленными в литературе данными [127, 128].

### *Конъюгат 2*

Производное паклитаксела **2h** (210 мг, 0,2 ммоль) растворяли в сухом ДМФА (4 мл). Затем добавляли соединение **2f** (137 мг, 0,28 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре. После этого добавляли ещё немного соединения **2f** (10 мг, 0,02 ммоль). На следующий день вязкую смесь по каплям прибавляли к МТБЭ (40 мл) при интенсивном перемешивании, что сопровождалось образованием белого осадка. Суспензию фильтровали и промывали МТБЭ (10 мл). Фильтрат дополнительно очищали методом нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон → ацетон/этанол (4:1)). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме до ~3 мл. Концентрат прибавляли по каплям к МТБЭ (40 мл) и отфильтровывали выпавший осадок, который высушивали при 50 °С, в результате чего получали конъюгат **2** в виде белого аморфного порошка (228 мг, 80 %).

ТСХ  $R_f = 0,26$  (ацетон/этанол (4:1)).

ВЭЖХ C18  $t_R = 4,20$  мин (чистота 99,2 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,24 (с; 2H); 8,11 (д;  $J = 7,0$  Гц; 2H); 7,85 (д;  $J = 8,5$  Гц; 1H); 7,82 (д;  $J = 7,2$  Гц; 2H); 7,61 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 7,51 (т;  $J = 7,7$  Гц; 2H); 7,48 – 7,42 (м; 3H); 7,42 – 7,34 (м; 4H); 7,27 (т;  $J = 7,2$  Гц; 2H); 7,09 (с; 1H); 6,69 (с; 1H); 6,31 (с; 1H); 6,13 (т;  $J = 8,6$  Гц; 1H); 5,89 (дд;  $J = 8,5$ ; 4,7 Гц; 1H); 5,72 (с; 1H); 5,66 (д;  $J = 6,9$  Гц; 1H);

5,42 (д;  $J = 4,6$  Гц; 1H); 4,95 (дд;  $J = 10,4; 2,0$  Гц; 1H); 4,47 – 4,34 (м; 2H); 4,27 (д;  $J = 8,5$  Гц; 2H); 4,17 (д;  $J = 8,5$  Гц; 1H); 3,77 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 3,62 – 3,51 (м; 4H); 3,51 – 3,41 (м; 4H); 3,40 – 3,24 (м; 4H); 3,11 – 3,03 (м; 1H); 2,88 – 2,83 (м; 1H); 2,76 – 2,63 (м; 3H); 2,58 – 2,44 (м; 7H); 2,40 (с; 3H); 2,32 – 2,21 (м; 5H); 2,19 (с; 3H); 2,03 (дд;  $J = 15,2; 8,3$  Гц; 1H); 1,89 (с; 3H); 1,87 – 1,81 (м; 1H); 1,66 (с; 3H); 1,62 – 1,52 (м; 2H); 1,49 – 1,32 (м; 2H); 1,19 (с; 3H); 1,13 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,9; 172,7; 172,6; 172,4; 171,9; 171,7; 171,1; 170,1; 168,7; 167,7; 167,0; 164,6; 142,3; 137,3; 134,0; 133,8; 133,0; 131,9; 130,3; 129,5; 129,1; 128,8; 128,6; 127,6; 127,2; 84,5; 81,2; 79,0; 76,5; 75,8; 75,1; 74,7; 71,9; 70,3; 70,0; 69,9; 69,8; 61,9; 60,3; 58,4; 55,8; 53,6; 46,0; 43,3; 40,6; 39,4; 39,4; 36,0; 35,5; 33,2; 31,5; 30,7; 29,6; 29,6; 28,0; 27,8; 26,8; 22,9; 22,1; 21,0; 14,9; 9,9.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{71}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{O}_{22}\text{S}$  1424,5854; найдено 1424,5862.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **2** (Рисунок 24, Таблица 10).

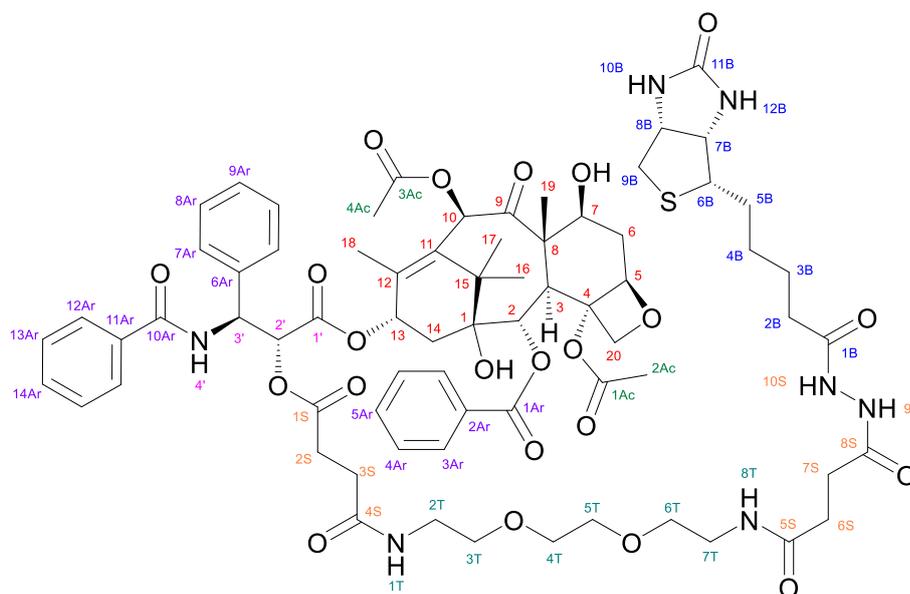


Рисунок 24 – Нумерационная схема конъюгата **2**.

Таблица 10 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата **2**.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	79,0
2	5,66	д	6,9	75,1
3	3,77	д	7,0	46,0
4	-	-	-	81,2
5	4,95	дд	10,4, 2,0	84,5
6	1,85	м	-	35,5
7	4,41	м	-	71,9

8	-	-	-	58,4
9	-	-	-	203,9
10	6,31	с	-	75,8
11	-	-	-	133,0
12	-	-	-	142,3
13	6,13	т	8,6	71,9
14	2,28 2,03	м дд	- 15,2, 8,3	33,2
15	-	-	-	43,3
16	1,13	с	-	22,1
17	1,19	с	-	26,8
18	1,89	с	-	14,9
19	1,66	с	-	9,9
20	4,17 4,27	д д	8,5 8,5	76,5
1'	-	-	-	168,7
2'	5,42	д	4,6	74,7
3'	5,89	дд	8,5, 4,7	53,6
4'	7,85	д	8,5	-
1Ac	-	-	-	170,1
2Ac	2,40	с	-	21,0
3Ac	-	-	-	171,1
4Ac	2,19	с	-	22,1
1Ar	-	-	-	167,0
2Ar	-	-	-	134,0
3Ar	8,11	д	7,0	130,3
4Ar	7,51	т	7,7	128,6
5Ar	7,61	т	7,5	133,8
6Ar	-	-	-	137,3
7Ar	7,38	м	-	127,5
8Ar	7,38	м	-	129,1
9Ar	7,27	т	7,2	131,9
10Ar	-	-	-	167,7
11Ar	-	-	-	129,5
12Ar	7,82	д	7,2	127,6
13Ar	7,45	м	-	127,2
14Ar	7,27	т	7,2	128,8
1S	-	-	-	172,7
2S	2,50	м	-	31,5
3S	2,70	м	-	29,6
4S	-	-	-	172,4
5S	-	-	-	172,6
6S	2,50	м	-	30,7
7S	2,50	м	-	29,6
8S	-	-	-	171,9
9S	9,24	с	-	-
10S	9,24	с	-	-
1T	7,45	с	-	-
2T	3,33	м	-	39,4
3T	3,46	м	-	70,0
4T	3,55	м	-	69,8
5T	3,55	м	-	69,9
6T	3,46	м	-	70,3
7T	3,33	м	-	39,4

8Т	7,09	с	-	-
1В	-	-	-	171,7
2В	2,28	м	-	36,0
3В	2,28	м	-	25,4
4В	1,41	м	-	27,8
5В	1,59	м	-	28,0
6В	3,07	м	-	55,8
7В	4,27	д	-	61,9
8В	4,41	м	-	60,3
9В	2,70	м	-	40,6
	2,85	м	-	
10В	5,72	с	-	-
11В	-	-	-	164,6
12В	6,69	с	-	-

### 3.3.3. Синтез конъюгата 3

#### *Гидрохлорид норбиотинамина 3a*

Гидразид биотина **2d** (2,07 г, 8 ммоль) растворяли в 1 М HCl (25 мл). Раствор NaNO<sub>2</sub> (1,10 г, 16 ммоль) в воде (16 мл) добавляли осторожно по каплям к раствору производного биотина, охлаждённому до 0 °С, следя за тем, чтобы температура не превышала 5 °С. После полного добавления реакцию массу разбавляли дихлорметаном (25 мл) и перемешивали в течение 10 мин, затем органический слой отделяли, а водный слой промывали дополнительным количеством ДХМ (3 × 25 мл). Объединённый экстракт промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (50 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали до объёма около 10 мл (Примечание: следует избегать кристаллизации ацилазида из-за его потенциальной взрывоопасности!). Затем остаток разбавляли безводным ТГФ (60 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа, после чего охлаждали до комнатной температуры. Затем реакцию смесь разбавляли 4 М водным раствором HCl (20 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение ночи, после чего растворитель упаривали. Остаток суспендировали в этаноле (20 мл) и тритурировали в смеси этилацетата (40 мл) и диэтилового эфира (40 мл). Образовавшийся осадок фильтровали, последовательно промывали этилацетатом (20 мл) и диэтиловым эфиром (10 мл) и сушили при 60 °С, получая гидрохлорид норбиотинамина **3a** в виде серого порошка (1,43 г, 71 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 8,09 (с; 3H); 6,51 (с; 1H); 6,44 (br с; 1H); 4,31 (дд; *J* = 7,8; 4,3 Гц; 1H); 4,14 (дд; *J* = 7,8; 4,4 Гц; 1H); 3,09 (тд; *J* = 7,2; 4,4 Гц; 1H); 2,82 (дд; *J* =

12,5; 5,0 Гц; 1H); 2,78 – 2,68 (м; 2H); 2,59 (д;  $J = 12,2$  Гц; 1H); 1,66 – 1,52 (м; 3H); 1,52 – 1,27 (м; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  162,8; 60,9; 59,3; 55,3; 39,9; 38,4; 27,9; 27,0; 25,4.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OS}$  216,1165; найдено 216,1175.

Спектральные характеристики **3a** согласуются с литературными данными [129].

### Конъюгат **3**

В раствор N-гидроксисукцинимидного эфира 2'-сукцинилпаклитаксела **2h** (171 мг, 0,2 ммоль) и  $\text{NEt}_3$  (35 мкл, 0,25 ммоль) в сухом ДМФА (2 мл) вносили гидрохлорид норбиотинамина **3a** (63 мг, 0,25 ммоль). Полученную суспензию интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Затем реакционную массу разбавляли этилацетатом (25 мл) и последовательно промывали 0,1 М  $\text{HCl}$  (20 мл), водой ( $3 \times 20$  мл) и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  (20 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток очищали с помощью нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля,  $3 \times 3$  см, ацетон/гексан (1:1)  $\rightarrow$  ацетон/гексан (5:1)). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, в результате чего получали конъюгат **3** в виде порошка кремового цвета (168 мг, 73 %).

ТСХ  $R_f = 0,31$  (ацетон/гексан (5:1)).

ВЭЖХ  $\text{C}_{18}$   $t_R = 4,88$  мин (чистота 99,4 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,20 (д;  $J = 8,9$  Гц; 1H); 8,09 (д;  $J = 7,6$  Гц; 2H); 7,87 (д;  $J = 7,6$  Гц; 2H); 7,62 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 7,53 (т;  $J = 7,7$  Гц; 2H); 7,50 – 7,41 (м; 4H); 7,40 – 7,32 (м; 5H); 7,19 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 6,67 (с; 1H); 6,47 (т;  $J = 6,1$  Гц; 1H); 6,27 (с; 1H); 6,04 (т;  $J = 9,0$  Гц; 1H); 5,84 (дд;  $J = 8,7$ ; 6,3 Гц; 1H); 5,61 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 5,47 (д;  $J = 6,3$  Гц; 1H); 5,34 (с; 1H); 4,92 (д;  $J = 11,4$  Гц; 1H); 4,44 – 4,34 (м; 2H); 4,27 – 4,19 (м; 2H); 4,15 (д;  $J = 8,4$  Гц; 1H); 3,73 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 3,11 (д;  $J = 6,4$  Гц; 1H); 3,07 – 2,99 (м; 1H); 2,95 – 2,81 (м; 4H); 2,73 – 2,55 (м; 4H); 2,54 – 2,41 (м; 4H); 2,38 (с; 3H); 2,18 (с; 3H); 2,15 (с; 3H); 2,08 (дд;  $J = 15,1$ ; 9,1 Гц; 1H); 1,92 – 1,84 (м; 1H); 1,84 (с; 3H); 1,83 – 1,66 (м; 1H); 1,64 (с; 3H); 1,57 – 1,19 (м; 8H); 1,17 (с; 3H); 1,10 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,9; 172,4; 171,8; 171,2; 170,3; 169,0; 167,5; 166,9; 164,1; 142,6; 137,3; 134,0; 133,8; 132,9; 131,7; 130,3; 129,4; 129,0; 128,8; 128,6; 127,6; 127,5; 84,5; 81,0; 79,0; 76,5; 75,7; 75,1; 74,8; 72,0; 71,7; 61,3; 60,2; 58,4; 55,8; 54,0; 45,7; 43,2; 40,7; 38,3; 35,8; 35,2; 30,7; 29,9; 29,7; 27,7; 26,8; 25,4; 22,8; 22,1; 21,0; 14,8; 9,7.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[M+H]^+$  расщ.  $C_{60}H_{71}N_4O_{17}S$  1151,4529; найдено 1151,4531.

Сигналы на спектрах  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **3** (Рисунок 25, Таблица 11).

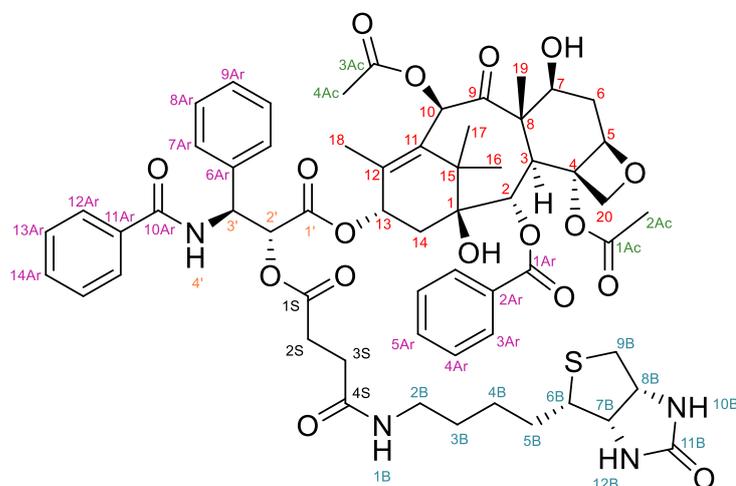


Рисунок 25 – Нумерационная схема конъюгата **3**.

Таблица 11 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР конъюгата **3**.

Положение атома	$\delta_H$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{HH}$ , Гц	$\delta_C$ , м.д.
1	-	-	-	79,0
2	5,61	д	7,0	76,5
3	3,73	д	7,0	45,7
4	-	-	-	81,0
5	4,92	д	11,4	84,5
6	1,92 – 1,84 2,73 – 2,55	м м	- -	35,8
7	4,44 – 4,34	м	-	72,0
8	-	-	-	58,4
9	-	-	-	203,9
10	6,27	с	-	75,7
11	-	-	-	132,9
12	-	-	-	142,6
13	6,04	т	9,0	71,7
14	1,83 – 1,66 2,08	м дд	- 15,1, 9,1	35,8
15	-	-	-	43,2
16	1,10	с	-	22,1
17	1,17	с	-	26,8
18	1,84	с	-	14,8
19	1,64	с	-	10,8
20	4,15 4,27 – 4,19	д м	8,4 -	76,5
1'	-	-	-	169,0
2'	5,47	д	6,3	75,1
3'	5,84	дд	8,7, 6,3	54,0
4'	8,20	-	-	-
1Ac	-	-	-	170,3
2Ac	2,38	с	-	22,8

3Ac	-	-	-	171,2
4Ac	2,18	с	-	21,0
1Ar	-	-	-	166,9
2Ar	-	-	-	134,0
3Ar	8,09	д	7,6	130,3
4Ar	7,53	т	7,7	129,0
5Ar	7,62	т	7,5	133,8
6Ar	-	-	-	137,3
7Ar	7,50 – 7,41	м	-	127,5
8Ar	7,40 – 7,32	м	-	130,3
9Ar	7,19	т	7,5	128,8
10Ar	-	-	-	167,5
11Ar	-	-	-	131,7
12Ar	7,87	д	7,6	128,6
13Ar	7,40 – 7,32	м	-	127,6
14Ar	7,50 – 7,41	м	-	128,6
1S	-	-	-	172,4
2S	2,73 – 2,55	м	-	29,9
3S	2,54 – 2,41	м	-	30,7
4S	-	-	-	171,8
1B	7,40 – 7,32	м	-	-
2B	2,07	м	-	35,8
3B	1,57 – 1,19	м	-	25,4
4B	1,57 – 1,19	м	-	27,7
5B	1,57 – 1,19	м	-	29,7
6B	3,07 – 2,99	м	-	55,8
7B	4,27 – 4,19	м	-	61,3
8B	4,44 – 4,34	м	-	60,2
9B	2,73 – 2,55 2,95 – 2,81	м м	- -	40,7
10B	5,34	с	-	-
11B	-	-	-	164,1
12B	6,67	с	-	-

### 3.3.4. Синтез конъюгата 4

#### *4-(N-((D)-биотиноил)амино)бутановая кислота 4a*

Биотин (488 мг, 2 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (253 мг, 2,2 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (8 мл), после чего при комнатной температуре добавляли раствор ДЦК (495 мг, 2,4 ммоль) в сухом ДМФА (2 мл). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем добавляли раствор 4-аминобутановой кислоты (309 мг, 3 ммоль) и NaOH (120 мг, 3 ммоль) в воде (2 мл) и перемешивали при комнатной температуре ещё в течение 20 ч. Затем реакционную смесь упаривали, а остаток диспергировали в воде (5 мл). Образовавшуюся суспензию фильтровали, а

осадок промывали дополнительным количеством воды (2 мл). Фильтрат разбавляли 4 М водным раствором HCl (5 мл) и оставляли охлаждаться при 5 °С в течение ночи. Образовавшийся осадок фильтровали, последовательно промывали водой (5 мл), смесью воды и этанола (1:1) (5 мл), этанолом (5 мл) и диэтиловым эфиром (5 мл), а затем высушивали в сушильном шкафу при 60 °С, что позволяло получать 4-(N-((D)-биотиноил)амино)бутановую кислоту **4a** в виде белого кристаллического порошка (323 мг, 49 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,00 (уш с; 1H); 7,78 (т; *J* = 5,7 Гц; 1H); 6,43 (с; 1H); 6,37 (уш с; 1H); 4,30 (дд; *J* = 8,2; 4,6 Гц; 1H); 4,13 (дд; *J* = 7,8; 4,4 Гц; 1H); 3,09 (ддд; *J* = 8,7; 6,2; 4,4 Гц; 1H); 3,02 (кв; *J* = 6,9 Гц; 2H); 2,82 (дд; *J* = 12,4; 5,1 Гц; 1H); 2,57 (д; *J* = 11,7 Гц; 1H); 2,20 (т; *J* = 7,5 Гц; 2H); 2,04 (т; *J* = 7,5 Гц; 2H); 1,60 (квинтет; *J* = 7,3 Гц; 3H); 1,56 – 1,40 (м; 3H); 1,38 – 1,21 (м; 2H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 174,2; 172,0; 162,8; 61,1; 59,2; 55,4; 39,9; 37,8; 35,2; 31,1; 28,2; 28,0; 25,3; 24,7.

МСВР (ИЭР) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> расщ. C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 330,1482; найдено 330,1482.

Спектральные характеристики соединения **4a** согласуются с представленными в литературе данными [130, 131].

#### *Конъюгат 4*

Паклитаксел (171 мг, 0,2 ммоль), ДМАП (24 мг, 0,2 ммоль) и 4-(N-((D)-биотиноил)амино)бутановую кислоту **4a** (79 мг, 0,22 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (2 мл). Затем к полученной суспензии добавляли ЭДК (46 мг, 0,24 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. После этого реакционную массу разбавляли этилацетатом (25 мл) и последовательно промывали 0,1 М HCl (20 мл), водой (3 × 20 мл) и насыщенным раствором NaCl (20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпарили. Остаток очистили с помощью нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → чистый ацетон). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, в результате чего получали конъюгат **4** в виде белого порошка (201 мг, 86 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,19 (ацетон).

ВЭЖХ C18 t<sub>R</sub> = 4,84 мин (чистота 97,8 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,14 (д;  $J = 9,0$  Гц; 1H); 8,11 (д;  $J = 7,5$  Гц; 2H); 7,81 (д;  $J = 7,8$  Гц; 2H); 7,60 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 7,50 (т;  $J = 7,7$  Гц; 2H); 7,45 (т;  $J = 7,0$  Гц; 2H); 7,42 – 7,30 (м; 4H); 7,25 (т;  $J = 7,8$  Гц; 1H); 6,41 – 6,32 (м; 2H); 6,29 (с; 1H); 6,14 (т;  $J = 8,9$  Гц; 1H); 5,95 (дд;  $J = 9,2$ ; 4,6 Гц; 1H); 5,65 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 5,48 (с; 1H); 5,43 (д;  $J = 4,7$  Гц; 1H); 4,94 (д;  $J = 11,3$  Гц; 1H); 4,44 – 4,37 (м; 1H); 4,37 – 4,31 (м; 1H); 4,27 (д;  $J = 8,5$  Гц; 1H); 4,21 – 4,12 (м; 2H); 3,77 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 3,31 – 3,13 (м; 2H); 3,02 (тд;  $J = 7,5$ ; 7,3 Гц; 1H); 2,92 (с; 1H); 2,86 – 2,77 (м; 1H); 2,62 (д;  $J = 12,5$  Гц; 1H); 2,57 – 2,46 (м; 1H); 2,42 (с; 3H); 2,42 – 2,31 (м; 3H); 2,28 – 2,20 (м; 1H); 2,18 (с; 3H); 2,10 – 1,98 (м; 3H); 1,90 (с; 3H); 1,89 – 1,68 (м; 3H); 1,65 (с; 3H); 1,60 – 1,47 (м; 4H); 1,36 – 1,29 (м; 2H); 1,18 (с; 3H); 1,11 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,9; 173,6; 172,6; 171,2; 170,1; 168,9; 167,8; 166,9; 164,0; 142,6; 137,2; 134,0; 133,7; 132,9; 131,8; 130,3; 129,5; 129,0; 128,8; 128,6; 128,5; 127,6; 127,2; 84,5; 81,1; 78,9; 76,5; 75,7; 75,1; 74,7; 72,0; 71,9; 61,9; 60,2; 58,4; 55,6; 53,4; 45,8; 43,3; 40,6; 38,2; 35,8; 35,7; 35,4; 31,0; 30,9; 28,0; 27,8; 26,8; 25,6; 24,8; 22,8; 22,2; 21,0; 14,9; 9,8.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{61}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{S}$  1165,4686; найдено 1165,4729.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата 4 (Рисунок 26, Таблица 12).

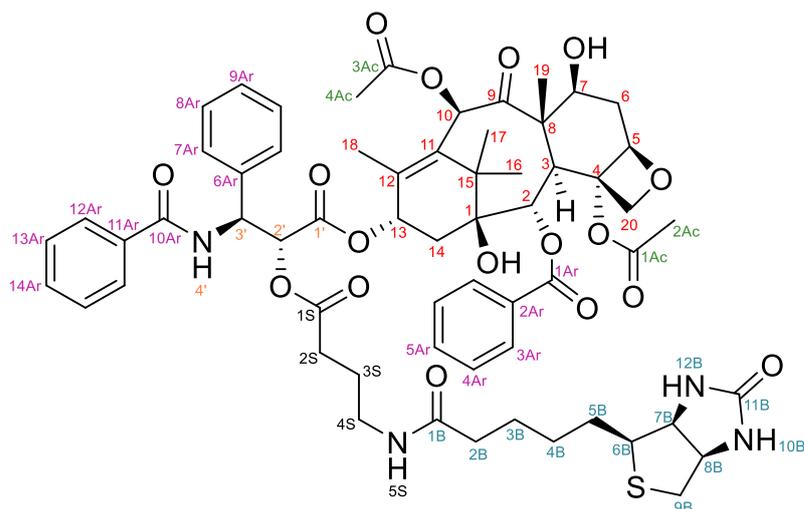


Рисунок 26 – Нумерационная схема конъюгата 4.

Таблица 12 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата 4.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	78,9
2	5,65	д	7,2	75,7
3	3,77	д	7,2	45,8
4	-	-	-	81,1

5	4,94	д	11,3	84,5
6	1,89 – 1,68	м	-	35,7
	2,57 – 2,46	м		
7	4,44 – 4,37	м	11,3	72,0
8	-	-	-	58,4
9	-	-	-	203,9
10	6,29	с	-	75,1
11	-	-	-	132,9
12	-	-	-	142,6
13	6,14	т	-	71,9
14	2,10 – 1,98	м	-	35,7
	2,25	дд		
15	-	-	-	43,3
16	1,11	с	-	22,8
17	1,18	с	-	26,8
18	1,90	с	-	14,9
19	1,65	с	-	9,8
20	4,21 – 4,12	м	-	77,2
	4,27	д		
1'	-	-	-	168,9
2'	5,43	д	4,7	75,1
3'	5,95	дд	4,6, 9,2	53,4
4'	8,14	д	-	-
1Ac	-	-	-	170,1
2Ac	2,42	с	-	24,3
3Ac	-	-	-	171,2
4Ac	2,18	с	-	21,4
1Ar	-	-	-	166,9
2Ar	-	-	-	134,0
3Ar	8,11	д	7,5	130,3
4Ar	7,50	т	7,7	129,0
5Ar	7,60	т	7,5	133,7
6Ar	-	-	-	137,2
7Ar	7,42 – 7,30	м	-	131,8
8Ar	7,42 – 7,30	м	-	127,2
9Ar	7,26	т	7,8	128,8
10Ar	-	-	-	167,8
11Ar	-	-	-	131,8
12Ar	7,81	д	7,8	128,6
13Ar	7,42 – 7,30	м	-	127,6
14Ar	7,45	т	7,0	128,5
1S	-	-	-	172,6
2S	2,42 – 2,31	м	-	30,9
3S	1,89 – 1,68	м	-	24,8
4S	3,31 – 3,13	м	-	38,2
5S	6,41 – 6,32	м	-	-
1B	-	-	-	173,6
2B	2,10 – 1,98	м	-	35,8
3B	2,10 – 1,98	м	-	25,6
	2,28 – 2,20	м		

4В	1,60 – 1,47	м	-	28,0
5В	1,60 – 1,47	м	-	27,8
6В	3,03	тд	7,5, 7,3	55,6
7В	4,21 – 4,12	м	-	61,9
8В	4,37 – 4,31	м	6,4	60,2
9В	2,62	д	12,5	40,6
	2,86 – 2,77	м	-	
10В	5,48	с	-	-
11В	-	-	-	164,0
12В	6,41 – 6,32	м	-	-

### 3.3.5. Синтез конъюгата 5

#### *6-(N-((D)-биотиноил)амино)гексановая кислота 5a*

Биотин (244 мг, 1 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (161 мг, 1,4 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (3 мл), после чего при комнатной температуре добавляли раствор ДЦК (289 мг, 1,4 ммоль) в сухом ДМФА (1 мл). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем добавляли раствор 6-аминогексановой кислоты (262 мг, 2 ммоль) и NaOH (100 мг, 2,5 ммоль) в воде (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре ещё 20 часов, а затем упаривали. Остаток суспендировали в 0,1 М NaOH (5 мл) и фильтровали. Фильтрат промывали водой (5 мл), после чего смешивали с 4 М водным раствором HCl (3 мл). Образовавшийся осадок фильтровали, последовательно промывали водой (5 мл), смесью воды и этанола (1:1) (5 мл), этанолом (5 мл) и диэтиловым эфиром (5 мл), а затем сушили в сушильном шкафу при 60 °С, получая 6-(N-((D)-биотиноил)амино)гексановую кислоту **5a** в виде белого порошка (272 мг, 76 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 11.98 (с, 1H), 7.73 (т, *J* = 5.6 Гц, 1H), 6.43 (с, 1H), 6.36 (с, 1H), 4.30 (дд, *J* = 7.9, 5.0 Гц, 1H), 4.12 (ддд, *J* = 6.3, 4.4, 1.8 Гц, 1H), 3.09 (ддд, *J* = 8.7, 6.2, 4.3 Гц, 1H), 3.00 (кв, *J* = 6.9 Гц, 2H), 2.82 (дд, *J* = 12.4, 5.1 Гц, 1H), 2.57 (д, *J* = 12.4 Гц, 1H), 2.18 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 2.03 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H), 1.61 (ддд, *J* = 15.9, 12.8, 6.0 Гц, 1H), 1.55 – 1.40 (м, 5H), 1.41 – 1.19 (м, 6H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 174,5; 171,8; 162,7; 61,1; 59,2; 55,5; 39,9; 38,2; 35,2; 33,6; 28,9; 28,2; 28,0; 26,0; 25,3; 24,2.

МСВР (ИЭР) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> рассч. C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 358,1795; найдено 358,1790.

Спектральные характеристики соединения **5a** согласуются с представленными в литературе данными [131, 132].

*Конъюгат 5*

Паклитаксел (171 мг, 0,2 ммоль), ДМАП (24 мг, 0,2 ммоль) и 6-(N-((D)-биотиноил)амино)гексановую кислоту **5a** (79 мг, 0,22 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (2 мл). Затем к полученной суспензии добавляли ЭДК (46 мг, 0,24 ммоль). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре и через 24 ч добавляли ещё одну порцию ЭДК (23 мг, 0,12 ммоль). Реакционную массу перемешивали ещё 20 ч при комнатной температуре, после чего разбавляли этилацетатом (25 мл) и последовательно промывали 0,1 М HCl (20 мл), водой (2 × 20 мл), 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (20 мл) и насыщенным раствором NaCl (20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали с помощью нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → чистый ацетон). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме, в результате чего получали конъюгат **5** в виде белого порошка (200 мг, 84 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,20 (ацетон).

ВЭЖХ C18 t<sub>R</sub> = 5,53 мин (чистота 99,5 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,12 (д; J = 7,0 Гц; 2H); 7,80 (д; J = 9,2 Гц; 1H); 7,76 (д; J = 7,0 Гц; 2H); 7,60 (т; J = 7,5 Гц; 1H); 7,50 (т; J = 7,7 Гц; 2H); 7,48 – 7,34 (м; 7H); 7,30 (т; J = 7,2 Гц; 1H); 6,30 (с; 1H); 6,22 – 6,14 (м; 2H); 6,11 (с; 1H); 5,95 (дд; J = 9,2; 4,1 Гц; 1H); 5,67 (д; J = 7,0 Гц; 1H); 5,46 (д; J = 4,1 Гц; 1H); 5,43 (с; 1H); 4,95 (дд; J = 9,6; 2,4 Гц; 1H); 4,42 (ддд; J = 6,7; 6,7; 3,2 Гц; 1H); 4,36 – 4,25 (м; 2H); 4,21 – 4,14 (м; 2H); 3,79 (д; J = 6,9 Гц; 1H); 3,22 – 3,05 (м; 2H); 3,04 (тд; J = 7,5; 4,5 Гц; 1H); 2,88 (д; J = 4,4 Гц; 1H); 2,78 (дд; J = 12,9; 5,0 Гц; 1H); 2,63 – 2,55 (м; 1H); 2,55 – 2,48 (м; 1H); 2,42 (с; 3H); 2,43 – 2,37 (м; 2H); 2,31 (дд; J = 15,4; 9,3 Гц; 1H); 2,19 (с; 3H); 2,08 (т; J = 7,3 Гц; 2H); 1,91 (с; 3H); 1,86 (ддд; J = 13,6; 11,0; 2,6 Гц; 1H); 1,67 (с; 3H); 1,64 – 1,47 (м; 6H); 1,42 (квинтет; J = 7,2 Гц; 2H); 1,38 – 1,26 (м; 4H); 1,21 (с; 3H); 1,13 (с; 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 203,9; 173,2; 173,0; 171,2; 170,0; 169,0; 167,6; 166,9; 163,8; 142,5; 137,2; 134,0; 133,7; 133,0; 131,9; 130,3; 129,5; 129,1; 128,8; 128,7; 128,6; 127,4; 127,1; 84,6; 81,1; 78,9; 76,5; 75,8; 75,1; 74,2; 72,1; 72,0; 61,9; 60,2; 58,5; 55,7; 53,3; 45,8; 43,3; 40,5; 39,0; 35,8; 35,8; 35,5; 33,7; 29,1; 28,1; 28,0; 26,9; 26,1; 25,5; 24,4; 22,8; 22,2; 21,0; 14,9; 9,8.

МСВР (ИЭР) m/z [M+H]<sup>+</sup> рассч. C<sub>63</sub>H<sub>77</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>S 1193,4999; найдено 1193,5010.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **5** (Рисунок 27, Таблица 13).

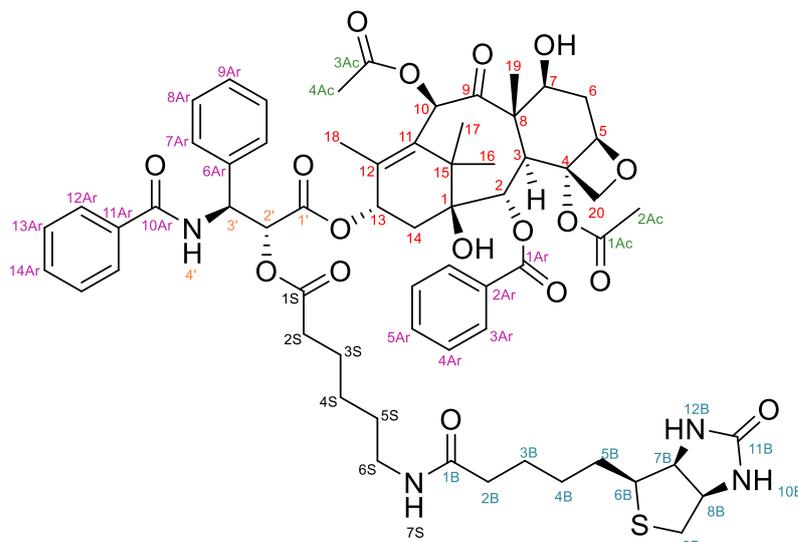


Рисунок 27 – Нумерационная схема конъюгата **5**.

Таблица 13 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата **5**.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	78,9
2	5,67	д	7,0	75,1
3	3,79	д	6,9	45,8
4	-	-	-	81,1
5	4,95	дд	9,6, 2,4	84,6
6	1,86 2,55 – 2,48	ддд м	13,6, 11,0, 2,6 -	35,8
7	4,42	ддд	6,7, 6,7, 3,2	72,1
8	-	-	-	58,5
9	-	-	-	203,9
10	6,30	с	-	75,8
11	-	-	-	133,0
12	-	-	-	142,5
13	6,22 – 6,14	м	-	72,0
14	2,15 – 2,11 2,31	м дд	- 15,4, 9,3	35,5
15	-	-	-	43,3
16	1,13	с	-	22,2
17	1,21	с	-	26,9
18	1,91	с	-	14,9
19	1,67	с	-	9,8
20	4,21 – 4,14 4,36 – 4,25	м м	- -	76,5
1'	-	-	-	169,0
2'	5,46	д	4,1	74,2
3'	5,96	дд	9,2, 4,1	53,3
4'	7,80	д	9,2	-
1Ac	-	-	-	170,0

2Ac	2,42	с	-	22,8
3Ac	-	-	-	171,2
4Ac	2,19	с	-	21,0
1Ar	-	-	-	166,9
2Ar	-	-	-	134,0
3Ar	8,12	д	7,0	130,3
4Ar	7,50	т	7,7	129,1
5Ar	7,60	т	7,5	133,7
6Ar	-	-	-	137,2
7Ar	7,48 – 7,34	м	-	131,9
8Ar	7,48 – 7,34	м	-	128,6
9Ar	7,30	т	7,2	128,8
10Ar	-	-	-	167,6
11Ar	-	-	-	129,5
12Ar	7,76	д	7,0	127,4
13Ar	7,48 – 7,34	м	-	128,7
14Ar	7,48 – 7,34	м	-	127,1
1S	-	-	-	169,0
2S	2,43 – 2,37	м	-	33,7
3S	1,64 – 1,47	м	-	29,1
4S	1,38 – 1,26	м	-	24,4
5S	1,42	квинтет	7,2	28,1
6S	3,13	м	-	39,0
7S	6,22 – 6,14	м	-	-
1B	-	-	-	173,2
2B	2,08	т	7,3	35,8
3B	1,38 – 1,26	м	-	25,5
4B	1,64 – 1,47	м	-	28,0
5B	1,64 – 1,47	м	-	26,1
6B	3,04	тд	7,4, 4,5	55,7
7B	4,21 – 4,14	м	-	61,9
8B	4,36 – 4,25	м	-	60,2
9B	2,63 – 2,55 2,78	м дд	- 12,9, 5,0	40,5
10B	5,43	с	-	-
11B	-	-	-	163,8
12B	6,11	с	-	-

### 3.3.6. Синтез конъюгата 6

#### *9-(N-((D)-биотиноил)амино)нонановая кислота 6a*

Биотин (244 мг, 1 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (150 мг, 1,3 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (3 мл), после чего к полученной смеси при комнатной температуре добавляли раствор ДЦК (268 мг, 1,3 ммоль) в сухом ДМФА (1 мл). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем вносили раствор 9-аминононановой кислоты (347 мг, 2 ммоль) и NaOH (100 мг, 2,5 ммоль) в воде (2 мл),

и реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч, после чего её непосредственно разбавляли 0,1 М раствором NaOH (10 мл). Образовавшуюся суспензию фильтровали, а осадок промывали водой (2 мл). Затем фильтрат разбавляли 4 М водным раствором HCl (5 мл). Образовавшийся осадок фильтровали и последовательно промывали водой (5 мл), смесью воды и этанола (1:1) (5 мл) и этанолом (5 мл). Гелеобразный осадок сушили на фильтре при комнатной температуре в течение суток, а затем — в сушильном шкафу при 60 °С, в результате чего получали 9-(N-((D)-биотиноил)амино)нонановую кислоту **6a** в виде белого порошка (376 мг, 94 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 11,87 (уш с; 1H); 7,72 (т; *J* = 5,7 Гц; 1H); 6,43 (уш с; 2H); 4,30 (дд; *J* = 7,8; 4,5 Гц; 1H); 4,12 (дд; *J* = 7,8; 4,5 Гц; 1H); 3,09 (тд; *J* = 6,9; 6,1 Гц; 1H); 3,00 (кв; *J* = 6,9 Гц; 2H); 2,81 (дд; *J* = 12,4; 5,1 Гц; 1H); 2,57 (д; *J* = 12,4 Гц; 1H); 2,18 (т; *J* = 7,4 Гц; 2H); 2,03 (т; *J* = 7,4 Гц; 2H); 1,66 – 1,56 (м; 1H); 1,55 – 1,40 (м; 5H); 1,40 – 1,32 (м; 2H); 1,32 – 1,19 (м; 11H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 174,5; 171,8; 162,7; 61,1; 59,2; 55,5; 39,9; 38,4; 35,2; 33,7; 29,2; 28,7; 28,7; 28,5; 28,2; 28,1; 26,4; 25,4; 24,5.

МСВР (ИЭР) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> рассч. C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 400,2265; найдено 400,2260.

### *Конъюгат 6*

Паклитаксел (171 мг, 0,2 ммоль), ДМАП (24 мг, 0,2 ммоль) и 9-(N-((D)-биотиноил)амино)нонановую кислоту **6a** (88 мг, 0,22 ммоль) суспендировали в ДМФА (2 мл). Затем к полученной суспензии добавляли ЭДК (38 мг, 0,2 ммоль). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем добавляли ещё одну порцию ЭДК (38 мг, 0,2 ммоль), и смесь перемешивали ещё 20 ч при комнатной температуре. После этого реакционную массу разбавляли этилацетатом (25 мл) и последовательно промывали 0,1 М HCl (20 мл), водой (20 мл), 0,1 М раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 мл) и насыщенным раствором NaCl (20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали с помощью нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → ацетон/этанол (20:1)). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали в вакууме, что приводило к конъюгатк **6** в виде белого порошка (167 мг, 67 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,35 (ацетон/этанол (20:1)).

ВЭЖХ C18  $t_R = 8,38$  мин (чистота 96,9 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,11 (д;  $J = 7,9$  Гц; 2H); 7,75 (д;  $J = 7,8$  Гц; 2H); 7,60 (т;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 7,57 – 7,44 (м; 4H); 7,44 – 7,33 (м; 6H); 7,29 (т;  $J = 6,9$  Гц; 1H); 6,30 (с; 1H); 6,18 (т;  $J = 9,2$  Гц; 1H); 6,10 – 6,04 (м; 2H); 5,92 (дд;  $J = 9,2$ ; 4,2 Гц; 1H); 5,66 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 5,55 (с; 1H); 5,48 (д;  $J = 4,3$  Гц; 1H); 4,95 (д;  $J = 10,2$  Гц; 1H); 4,45 – 4,33 (м; 2H); 4,28 (д;  $J = 8,5$  Гц; 1H); 4,22 – 4,16 (м; 2H); 3,79 (д;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 3,16 (дд;  $J = 6,9$ ; 6,8 Гц; 2H); 3,07 (кв;  $J = 7,3$  Гц; 1H); 2,92 (д;  $J = 4,8$  Гц; 1H); 2,82 (дд;  $J = 13,0$ ; 5,1 Гц; 1H); 2,67 – 2,59 (м; 1H); 2,57 – 2,47 (м; 1H); 2,43 (с; 3H); 2,42 – 2,21 (м; 5H); 2,19 (с; 3H); 2,17 – 2,04 (м; 4H); 1,91 (с; 3H); 1,89 – 1,81 (м; 1H); 1,66 (с; 3H); 1,64 – 1,50 (м; 6H); 1,45 – 1,31 (м; 4H); 1,31 – 1,15 (м; 12H); 1,12 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,9; 173,2; 173,1; 171,2; 170,0; 168,7; 167,5; 167,0; 163,8; 142,6; 137,2; 133,9; 133,7; 132,9; 131,9; 130,3; 129,4; 129,1; 128,8; 128,7; 128,5; 127,3; 127,0; 84,5; 81,1; 79,0; 76,5; 75,7; 75,2; 74,1; 72,1; 71,9; 61,8; 60,2; 58,5; 55,6; 53,3; 45,8; 43,3; 40,6; 39,5; 36,1; 35,8; 35,5; 33,7; 29,6; 29,3; 29,0; 29,0; 28,8; 28,2; 28,1; 26,7; 25,7; 24,7; 22,8; 22,1; 21,0; 14,9; 9,8.

МСВР (ИЭР)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  расщ.  $\text{C}_{66}\text{H}_{83}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{S}$  1235,5468; найдено 1235,5465.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **6** (Рисунок 28, Таблица 14).

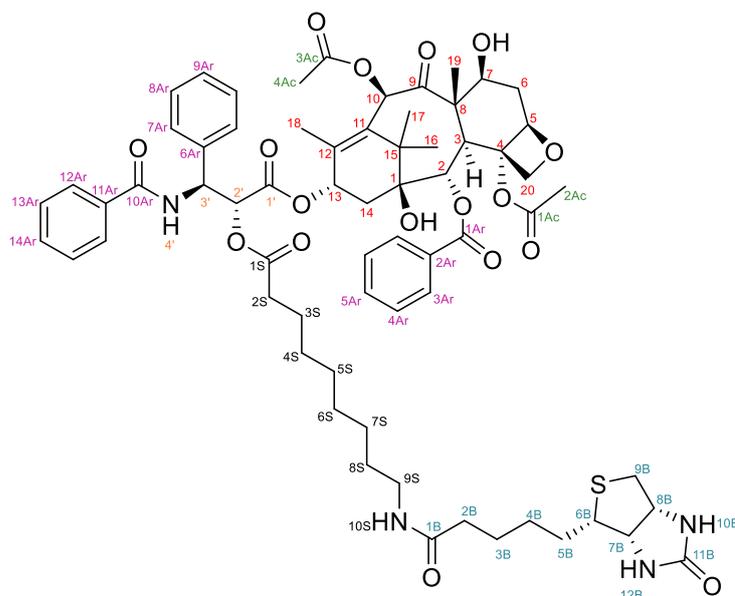


Рисунок 28 – Нумерационная схема конъюгата **6**.

Таблица 14 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата **6**.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	79,0
2	5,66	д	7,2	75,2

3	3,79	д	7,2	45,8
4	-	-	-	81,1
5	4,95	д	10,2	84,5
6	1,89 – 1,81	м	-	35,8
	2,57 – 2,47	м	-	
7	4,45 – 4,33	м	-	72,1
8	-	-	-	58,5
9	-	-	-	203,9
10	6,30	с	-	75,7
11	-	-	-	132,9
12	-	-	-	142,6
13	6,18	т	9,2	71,9
14	2,17 – 2,04	м	-	36,1
	2,42 – 2,21	м	-	
15	-	-	-	43,3
16	1,12	с	-	22,8
17	1,31 – 1,15	м	-	26,8
18	1,91	с	-	14,6
19	1,66	с	-	9,8
20	4,22 – 4,16	м	-	76,5
	4,28	д	8,5	
1'	-	-	-	168,7
2'	5,48	д	4,3	74,1
3'	5,92	дд	9,2, 4,2	53,3
4'	7,57 – 7,44	м	-	-
1Ac	-	-	-	170,0
2Ac	2,43	с	-	22,8
3Ac	-	-	-	171,2
4Ac	2,20	с	-	21,0
1Ar	-	-	-	167,0
2Ar	-	-	-	133,9
3Ar	8,11	д	7,9	130,3
4Ar	7,57 – 7,44	м	-	129,1
5Ar	7,60	т	7,5	133,7
6Ar	-	-	-	137,2
7Ar	7,44 – 7,33	м	-	131,9
8Ar	7,44 – 7,33	м	-	128,5
9Ar	7,29	т	6,9	128,8
10Ar	-	-	-	167,5
11Ar	-	-	-	129,4
12Ar	7,75	д	7,8	127,0
13Ar	7,44 – 7,33	м	-	128,7
14Ar	7,57 – 7,44	м	-	131,9
1S	-	-	-	173,1
2S	3,16	дд	6,9, 6,8	39,5
3S	1,64 – 1,50	м	-	29,6
4S	1,31 – 1,15	м	-	29,0
5S	1,31 – 1,15	м	-	29,0
6S	1,31 – 1,15	м	-	24,7
7S	2,17 – 2,04	м	-	28,8

8S	2,42 – 2,21	м	-	26,7
9S	2,42 – 2,21	м	-	33,7
10S	6,10 – 6,04	м	-	-
1B	-	-	-	173,2
2B	2,17 – 2,04	м	-	35,5
3B	2,42 – 2,21	м	-	25,7
4B	1,64 – 1,50	м	-	28,2
5B	1,64 – 1,50	м	-	28,1
6B	3,07	кв	7,3	55,6
7B	4,22 – 4,16	м	-	61,8
8B	4,45 – 4,33	м	-	60,2
9B	2,67 – 2,59	м	-	40,6
	2,82	дд	13,0, 5,1	
10B	5,55	с	-	-
11B	-	-	-	163,8
12B	6,15 – 6,10	м	-	-

### 3.3.7. Синтез конъюгата 7

#### *11-(N-((D)-биотиноил)амино)ундекановая кислота 7a*

Биотин (244 мг, 1 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (150 мг, 1,3 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (3 мл), после чего при комнатной температуре добавляли раствор ДЦК (268 мг, 1,3 ммоль) в сухом ДМФА (1 мл). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем добавляли раствор 11-аминоундекановой кислоты (403 мг, 2 ммоль) и NaOH (100 мг, 2,5 ммоль) в воде (3 мл), и реакционную смесь интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней, после чего её разбавляли 0,2 М раствором NaOH (10 мл). Суспензию фильтровали, а осадок промывали водой (5 мл). Затем фильтрат разбавляли 4 М водным раствором HCl (5 мл). Выпавший студенистый осадок фильтровали и последовательно промывали водой (5 мл), смесью воды и этанола (1:1) (5 мл) и этанолом (5 мл). Гелеобразный осадок после фильтрации сушили при комнатной температуре в течение суток, затем сушили в сушильном шкафу при 60 °С, что приводило к 11-(N-((D)-биотиноил)амино)ундекановой кислоте **7a** в виде белого порошка (423 мг, 99 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 353 К) δ 12,04 (уш с; 1H); 8,98 (с; 1H); 8,29 – 7,65 (м; 2H); 6,43 (с; 1H); 4,30 (с; 1H); 4,13 (с; 1H); 3,42 (с; 3H); 3,18 – 2,69 (м; 4H); 2,32 – 1,95 (м; 4H); 1,85 – 0,86 (м; 20H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 353 К) δ 174,5; 171,8; 162,8; 62,2; 61,1; 54,9; 39,9; 38,4; 36,3; 35,2; 33,7; 30,0; 29,2; 28,9; 28,8; 28,6; 28,2; 28,1; 26,5; 25,4; 24,5.

*Конъюгат 7*

Паклитаксел (171 мг, 0,2 ммоль), ДМАП (24 мг, 0,2 ммоль) и 11-(N-((D)-биотиноил)амино)ундекановую кислоту **7a** 103 мг (0,24 ммоль) суспендировали в сухом ДМФА (3 мл). К полученной суспензии каждые 20 часов в течение 3 дней при комнатной температуре добавляли три порции ЭДК (48 мг, 0,25 ммоль, т.е. всего 144 мг, 0,75 ммоль). Затем реакционную массу разбавляли этилацетатом (25 мл) и последовательно промывали 0,1 М HCl (20 мл), водой (20 мл), 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (20 мл) и насыщенным раствором NaCl (25 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали с помощью нормально-фазовой КХ (8 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → ацетон/этанол (20:1)). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали под вакуумом, что позволяло получать конъюгат **7** в виде белого порошка (148 мг, 59 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,23 (ацетон/этанол (20:1)).

ВЭЖХ C18 t<sub>R</sub> = 12,30 мин (чистота 99,0 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,10 (д; J = 7,7 Гц; 2H); 7,74 (д; J = 7,7 Гц; 2H); 7,59 (т; J = 7,4 Гц; 1H); 7,52 – 7,44 (м; 4H); 7,42 – 7,34 (м; 6H); 7,29 (т; J = 6,9 Гц; 1H); 6,29 (с; 1H); 6,18 (т; J = 8,9 Гц; 1H); 6,15 – 6,10 (м; 2H); 5,91 (дд; J = 9,1; 4,1 Гц; 1H); 5,67 – 5,63 (м; 2H); 5,48 (д; J = 4,1 Гц; 1H); 4,94 (дд; J = 9,5; 2,1 Гц; 1H); 4,43 – 4,35 (м; 2H); 4,27 (д; J = 8,5 Гц; 1H); 4,21 – 4,15 (м; 2H); 3,78 (д; J = 6,9 Гц; 1H); 3,15 (кв; J = 6,7 Гц; 2H); 3,07 (тд; J = 7,3; 4,3 Гц; 1H); 2,92 (д; J = 4,3 Гц; 1H); 2,82 (дд; J = 13,0; 4,8 Гц; 1H); 2,64 (д; J = 12,8 Гц; 1H); 2,58 – 2,47 (м; 1H); 2,42 (с; 3H); 2,41 – 2,33 (м; 4H); 2,28 (дд; J = 15,3; 9,3 Гц; 1H); 2,18 (с; 3H); 2,16 – 2,05 (м; 3H); 1,91 (с; 3H); 1,88 – 1,81 (м; 1H); 1,65 (с; 3H); 1,64 – 1,51 (м; 6H); 1,42 (квинтет; J = 6,9 Гц; 2H); 1,35 (квинтет; J = 7,7 Гц; 2H); 1,28 – 1,18 (м; 17H); 1,11 (с; 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (151 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 203,9; 173,1; 173,0; 171,1; 169,9; 168,6; 167,4; 166,9; 163,8; 142,5; 137,2; 133,9; 133,7; 133,0; 131,9; 130,3; 129,5; 129,0; 128,8; 128,7; 128,5; 127,3; 126,9; 84,5; 81,1; 79,0; 76,5; 75,7; 75,2; 74,1; 72,0; 71,9; 61,9; 60,2; 58,5; 55,6; 53,2; 45,8; 43,3; 40,5; 39,6; 36,1; 35,8; 35,6; 33,8; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,2; 28,9; 28,3; 28,1; 26,9; 26,8; 25,6; 24,7; 22,8; 22,1; 20,9; 14,8; 9,7.

Сигналы на спектрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **7** (Рисунок 29, Таблица 15).

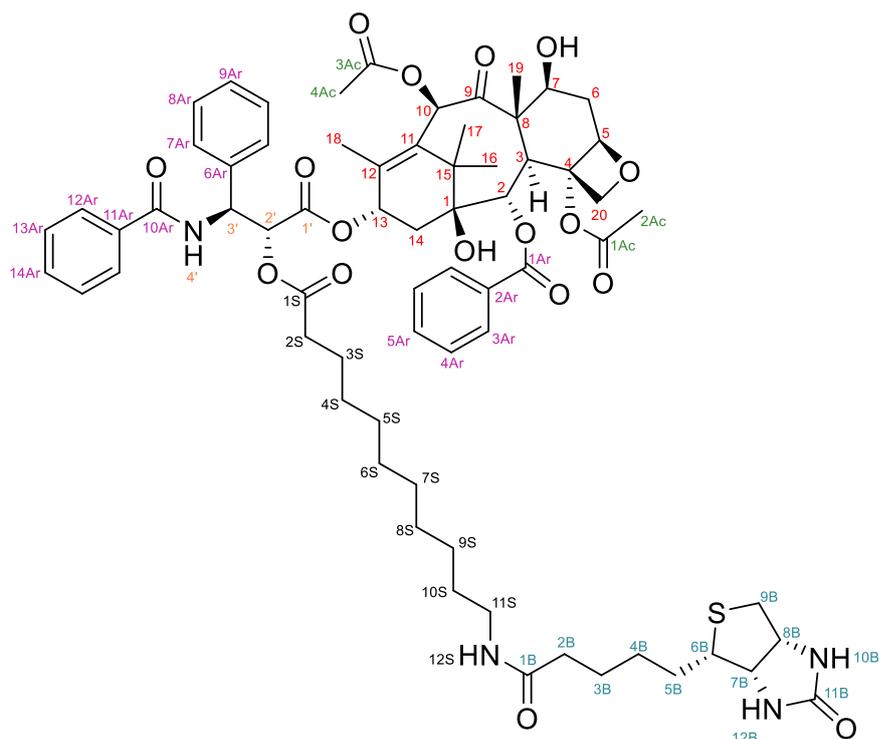


Рисунок 29 – Нумерационная схема конъюгата 7.

Таблица 15 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата 7.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	79,0
2	5,67 – 5,63	м	-	75,2
3	3,78	д	6,9	45,8
4	-	-	-	81,1
5	4,94	дд	9,5, 2,1	84,5
6	1,88 – 1,81	м	-	35,6
	2,58 – 2,47	м	-	
7	4,43 – 4,35	м	-	72,0
8	-	-	-	58,5
9	-	-	-	203,9
10	6,29	с	-	75,7
11	-	-	-	133,0
12	-	-	-	142,5
13	6,18	т	8,9	71,9
14	2,16 – 2,05	м	-	36,1
	2,28	дд	15,3, 9,3	
15	-	-	-	43,3
16	1,11	с	-	22,1
17	1,29 – 1,16	м	-	26,8
18	1,91	с	-	14,8
19	1,65	с	-	9,7
20	4,21 – 4,15	м	-	76,5
	4,27	д	8,5	
1'	-	-	-	168,6
2'	5,48	д	4,1	74,1
3'	5,91	дд	9,0, 4,1	53,2
4'	7,52 – 7,44	м	-	-

1Ac	-	-	-	169,9
2Ac	2,42	с	-	22,8
3Ac	-	-	-	171,1
4Ac	2,18	с	-	20,9
1Ar	-	-	-	166,9
2Ar	-	-	-	133,9
3Ar	8,10	д	7,7	130,3
4Ar	7,52 – 7,44	м	-	129,0
5Ar	7,59	т	7,4	133,7
6Ar	-	-	-	137,2
7Ar	7,42 – 7,34	м	-	131,9
8Ar	7,42 – 7,34	м	-	128,8
9Ar	7,29	т	6,9	128,5
10Ar	-	-	-	167,4
11Ar	-	-	-	129,5
12Ar	7,74	д	7,7	126,9
13Ar	7,42 – 7,34	м	-	128,7
14Ar	7,52 – 7,44	м	-	131,9
1S	-	-	-	173,0
2S	3,15	кв	6,7	39,6
3S	1,42	квинтет	6,9	26,9
4S	1,29 – 1,16	м	-	29,2
5S	1,64 – 1,51	м	-	29,2
6S	1,35	квинтет	7,7	24,7
7S	1,29 – 1,16	м	-	28,9
8S	1,29 – 1,16	м	-	29,3
9S	2,41 – 2,33	м	-	29,4
10S	1,29 – 1,16	м	-	29,6
11S	2,42 – 2,33	м	-	33,8
12S	6,15 – 6,10	м	-	-
1B	-	-	-	173,1
2B	2,16 – 2,05	м	-	35,8
3B	2,41 – 2,33	м	-	25,6
4B	1,64 – 1,51	м	-	28,3
5B	1,64 – 1,51	м	-	28,1
6B	3,07	тд	7,3, 4,3	55,6
7B	4,21 – 4,15	м	-	60,2
8B	4,43 – 4,35	м	-	61,9
9B	2,64 2,82	д дд	12,8 13,0, 4,8	40,5
10B	5,67 – 5,63	м	-	-
11B	-	-	-	163,8
12B	6,15 – 6,10	м	-	-

### 3.3.8. Синтез конъюгата 8

*N,N'*-Бис-(трет-бутоксикарбонил)цистамин 8a

Синтез соединения **8a** выполняли, руководствуясь описанным ранее подходом с некоторыми модификациями [133].

Дигидрохлорид цистамина (2,25 г, 10 ммоль) суспендировали в дихлорметане (60 мл), после чего добавляли  $\text{NEt}_3$  (2,92 мл, 21 ммоль). Затем к реакционной смеси при интенсивном перемешивании в течение 15 мин по каплям добавляли раствор ди-*трет*-бутилдикарбоната (4,58 г, 21 ммоль) в дихлорметане (40 мл). После этого смесь оставляли на 2 дня при комнатной температуре и промывали 0,02 М холодным раствором  $\text{HCl}$  ( $2 \times 100$  мл). Органический слой сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток суспендировали в гексане (25 мл), отфильтровывали, промывали дополнительным количеством гексана (25 мл), а затем сушили в сушильном шкафу при  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , что приводило к *N,N'*-бис-(*трет*-бутоксикарбонил)цистамину **8a** в виде белого кристаллического порошка (3,38 г, 96 %).

ТСХ  $R_f = 0,38$  (гексан/ $\text{EtOAc}$  (3:1)).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,04 (с; 2H); 3,44 (кв;  $J = 6,3$  Гц; 4H); 2,78 (т;  $J = 6,4$  Гц; 4H); 1,43 (с; 18H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,0; 79,7; 39,4; 38,6; 28,5.

Спектральные характеристики соединения **8a** согласуются с представленными в литературе данными [133, 134].

### *2*-(*трет*-бутоксикарбониламино)этанэтиол **8b**

Промежуточное соединение **8b** синтезировали на основании известных методов с модификациями [134, 135].

К раствору соединения **8a** (1,76 г, 5 ммоль) в метаноле (150 мл) добавляли 1 М водный раствор  $\text{KOH}$  (1 мл) и дитиотреитол (2,31 г, 15 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем упаривали под вакуумом. Остаток разбавляли 0,01 М раствором  $\text{HCl}$  (100 мл) и экстрагировали в ДХМ ( $3 \times 30$  мл). Объединённый экстракт промывали водой ( $2 \times 100$  мл) и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  ( $2 \times 100$  мл). Органический слой сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали, получая *2*-(*трет*-бутоксикарбониламино)этанэтиол **8b** в виде бесцветной маслянистой жидкости (1,70 г, 96 %).

ТСХ  $R_f = 0,75$  (гексан/ $\text{EtOAc}/\text{HCOOH}$  (100:100:1)).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,94 (с; 1H); 3,29 (кв;  $J = 6,4$  Гц; 2H); 2,63 (дт;  $J = 8,3$ ; 6,3 Гц; 2H); 1,43 (с; 9H); 1,34 (т;  $J = 8,5$  Гц; 1H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,9; 79,7; 43,7; 28,5; 25,2.

*Трет-бутил S-(2-(трет-бутоксикарбониламино)этил)тиоацетат 8c*

Триэтиламин (1,46 мл, 10,45 ммоль) и трет-бутилбромацетат (1,43 мл, 9,7 ммоль) добавляли по каплям к раствору соединения **8b** (1,68 г, 9,5 ммоль) в ДХМ (20 мл) при интенсивном перемешивании в течение 5 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем разбавляли ДХМ (30 мл) и последовательно промывали 0,01 М HCl ( $2 \times 50$  мл), водой (50 мл) и смесью насыщенных растворов NaCl (50 мл) и  $\text{NaHCO}_3$  (1 мл). Органический слой сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали под вакуумом, получая трет-бутил S-(2-(трет-бутоксикарбониламино)этил)тиоацетат **8c** в виде бесцветной маслянистой жидкости (2,69 г, 97 %).

ТСХ  $R_f = 0,56$  (гексан/EtOAc (3:1)).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,01 (с; 1H); 3,33 (кв;  $J = 6,2$  Гц; 2H); 3,13 (с; 2H); 2,75 (т;  $J = 6,3$  Гц; 2H); 1,46 (с; 9H); 1,43 (с; 9H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,8; 155,9; 82,0; 79,5; 39,3; 34,7; 33,1; 28,5; 28,1.

*Трифторацетат S-(2-аминоэтил)тиогликолевой кислоты 8d*

Раствор соединения **8c** (583 мг, 2 ммоль) в ДХМ (4 мл) разбавляли ТФУ (1,53 мл, 20 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего упаривали под вакуумом. Затем остаток дважды соупаривали с ДХМ ( $2 \times 4$  мл), в результате чего получали трифторацетат S-(2-аминоэтил)тиогликолевой кислоты **8d** в виде оранжевого масла (339 мг, 68 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,44 (с; 2H), 3,23 (т;  $J = 6,6$  Hz; 2H), 2,93 (т;  $J = 6,6$  Hz; 2H).

*S-(2-((D)-биотиноиламино)этил)тиогликолевая кислота 8e*

Биотин (244 мг, 1 ммоль) растворяли в сухом ДМФА (3 мл) при осторожном нагревании. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли в него N-гидроксисукцинимид (127 мг, 1,1 ммоль), после чего медленно прибавляли раствор

ДЦК (248 мг, 1,2 ммоль) в сухом ДМФА (2 мл). Реакционную массу перемешивали в течение ночи, а затем разбавляли водным раствором (3 мл) соединения **8d** (312 мг, 1,25 ммоль) и NaOH (100 мг, 2,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали ещё 24 часа, а затем упаривали. Остаток суспендировали в воде (3 мл) и отфильтровали, а осадок дополнительно промывали водой (5 мл). Объединённый фильтрат подкисляли 4 М HCl (1 мл) и оставляли на 1 час. Выпавший осадок фильтровали и последовательно промывали водой (5 мл), этанолом (5 мл) и диэтиловым эфиром (5 мл), а затем сушили в сушильном шкафу при 50 °С, что приводило к S-(2-((D)-биотиноиламино)этил)тиогликолевой кислоте **8e** в виде белого порошка (137 мг, 38 %). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,51 (с; 1H); 7,92 (т; *J* = 5,7 Гц; 1H); 6,43 (с; 1H); 6,36 (с; 1H); 4,30 (дд; *J* = 7,7; 4,2 Гц; 1H); 4,12 (дд; *J* = 7,9; 4,5 Гц; 1H); 3,25 (с; 2H); 3,22 (кв; *J* = 6,6 Гц; 2H); 3,09 (ддд; *J* = 8,5; 6,2; 4,3 Гц; 1H); 2,82 (дд; *J* = 12,4; 5,1 Гц; 1H); 2,62 (т; *J* = 7,0 Гц; 2H); 2,57 (д; *J* = 12,4 Гц; 1H); 2,05 (т; *J* = 7,5 Гц; 2H); 1,66 – 1,55 (м; 1H); 1,56 – 1,40 (м; 3H); 1,38 – 1,22 (м; 2H).

<sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 172,1; 171,5; 162,8; 61,1; 59,2; 55,4; 39,9; 37,8; 35,2; 33,0; 31,3; 28,2; 28,0; 25,3.

### Конъюгат **8**

К раствору паклитаксела (213 мг, 0,25 ммоль), производного биотина **8e** (101 мг, 0,28 ммоль) и ДМАП (31 мг, 0,25 ммоль) в сухом ДМФА (2,5 мл) при интенсивном перемешивании порциями добавляли ЭДК (58 мг, 0,3 ммоль), после чего реакционную массу оставляли перемешиваться в течение суток. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (30 мл) и промывали 0,1 М раствором HCl (30 мл), водой (2 × 30 мл), 0,1 М раствором NaHCO<sub>3</sub> (30 мл) и насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали с помощью нормально-фазовой КХ (10 г силикагеля, 3 × 3 см, ацетон/гексан (1:1) → ацетон). Собранные фракции, содержащие целевой продукт, упаривали под вакуумом, что приводило к конъюгату **8** в виде белого порошка (183 мг, 61 %).

ТСХ R<sub>f</sub> = 0,19 (ацетон).

ВЭЖХ C18 t<sub>R</sub> = 7,84 мин (чистота 95,1 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,11 (д; *J* = 7,2 Гц; 2H); 7,91 (д; *J* = 9,2 Гц; 1H); 7,80 (д; *J* = 7,2 Гц; 2H); 7,59 (т; *J* = 7,4 Гц; 1H); 7,50 (т; *J* = 7,7 Гц; 2H); 7,48 – 7,35 (м; 7H); 7,28 (т;

$J = 7,2$  Гц; 1H); 6,78 (т;  $J = 5,9$  Гц; 1H); 6,30 (с; 1H); 6,27 (с; 1H); 6,15 (т;  $J = 8,3$  Гц; 1H); 5,97 (дд;  $J = 9,1; 4,2$  Гц; 1H); 5,66 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 5,49 (д;  $J = 4,1$  Гц; 1H); 5,36 (с; 1H); 4,94 (дд;  $J = 9,5; 2,5$  Гц; 1H); 4,43 – 4,38 (м; 1H); 4,36 (дд;  $J = 8,9; 4,7$  Гц; 1H); 4,26 (д;  $J = 8,4$  Гц; 1H); 4,18 (д;  $J = 8,2$  Гц; 1H); 4,14 (дд;  $J = 8,2; 4,9$  Гц; 1H); 3,76 (д;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 3,43 – 3,35 (м; 1H); 3,33 (д;  $J = 14,6$  Гц; 1H); 3,29 – 3,20 (м; 2H); 3,07 (д;  $J = 4,3$  Гц; 1H); 2,95 (дд;  $J = 11,3; 5,6$  Гц; 1H); 2,85 (с; 1H); 2,79 (дд;  $J = 12,3; 4,9$  Гц; 1H); 2,69 (т;  $J = 5,6$  Гц; 2H); 2,61 (д;  $J = 12,4$  Гц; 1H); 2,56 – 2,46 (м; 1H); 2,38 (с; 3H); 2,28 – 2,24 (м; 1H); 2,20 (с; 3H); 2,15 (дд;  $J = 11,5; 5,4$  Гц; 1H); 2,01 (тд;  $J = 7,7; 2,8$  Гц; 2H); 1,90 (с; 3H); 1,84 (ддд;  $J = 13,7; 10,8; 2,4$  Гц; 1H); 1,66 (с; 3H); 1,48 (квт;  $J = 14,0; 6,5$  Гц; 2H); 1,42 – 1,21 (м; 4H); 1,18 (с; 3H); 1,12 (с; 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,9; 173,8; 171,2; 170,4; 170,0; 168,8; 168,1; 166,8; 164,0; 142,1; 136,8; 134,3; 133,6; 133,3; 132,0; 130,3; 129,6; 129,2; 128,7; 127,5; 127,1; 84,5; 81,2; 78,6; 76,5; 75,7; 75,0; 74,9; 72,4; 72,0; 62,0; 60,2; 58,4; 55,7; 53,2; 45,8; 43,4; 40,4; 38,0; 35,9; 35,3; 33,1; 32,9; 28,4; 28,0; 27,0; 25,6; 22,8; 22,1; 21,0; 14,9; 9,8.

Сигналы на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР согласуются со структурной формулой конъюгата **8** (Рисунок 30, Таблица 16).

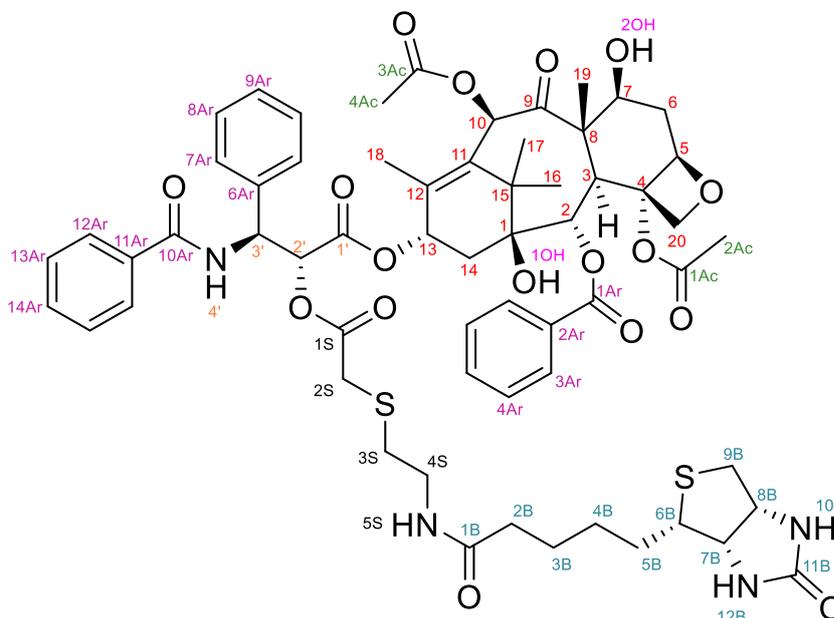


Рисунок 30 – Нумерационная схема конъюгата **8**.

Таблица 16 – Отнесение сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР конъюгата **8**.

Положение атома	$\delta_{\text{H}}$ , м.д.	Мультиплетность	$J_{\text{HH}}$ , Гц	$\delta_{\text{C}}$ , м.д.
1	-	-	-	78,6
2	5,66	д	7,0	75,0
3	3,76	д	7,0	45,8
4	-	-	-	81,2

5	4,94	ДД	9,5, 2,5	84,5
6	1,84 2,56 – 2,46	ДДД М	13,7, 10,8, 2,4	35,9
7	4,43 – 4,38	М	-	72,0
8	-	-	-	55,7
9	-	-	-	203,9
10	6,30	С	-	75,7
11	-	-	-	133,3
12	-	-	-	142,1
13	6,15	Т	8,3	72,4
14	2,28 – 2,24 2,15	М ДД	- 11,5, 5,4	35,3
15	-	-	-	43,4
16	1,12	С	-	22,1
17	1,18	С	-	27,0
18	1,90	С	-	14,9
19	1,66	С	-	9,8
20	4,18 4,26	Д Д	8,2 8,4	76,5
1'	-	-	-	168,8
2'	5,49	Д	4,1	74,9
3'	5,97	ДД	9,1, 4,2	53,2
4'	7,91	Д	9,2	-
1ОН	2,85	С	-	-
2ОН	3,07	Д	4,3	-
1Ас	-	-	-	170,0
2Ас	2,38	С	-	22,8
3Ас	-	-	-	171,2
4Ас	2,20	С	-	21,0
1Аr	-	-	-	166,8
2Аr	-	-	-	134,3
3Аr	8,11	Д	7,2	130,3
4Аr	7,50	Т	7,7	129,2
5Аr	7,59	Т	7,4	133,6
6Аr	-	-	-	136,8
7Аr	7,48 – 7,35	М	-	127,1
8Аr	7,48 – 7,35	М	-	132,0
9Аr	7,28	Т	7,2	128,7
10Аr	-	-	-	168,1
11Аr	-	-	-	132,0
12Аr	7,80	Д	7,2	127,5
13Аr	7,48 – 7,35	М	-	127,1
14Аr	7,48 – 7,35	М	-	128,7
1S	-	-	-	170,4
2S	3,33 3,29 – 3,20	Д М	14,6 -	33,1
3S	2,69	Т	5,6	32,9
4S	3,43 – 3,35 3,29 – 3,20	М М	- -	38,0
5S	6,78	Т	5,9	-
1B	-	-	-	173,8

2В	2,01	тд	7,7, 2,8	35,9
3В	1,48	квт	14,0, 6,5	25,6
4В	1,42 – 1,21	м	-	28,4
5В	1,42 – 1,21	м	-	28,0
6В	2,95	дд	11,3, 5,6	55,7
7В	4,14	дд	8,2, 4,9	62,0
8В	4,36	дд	8,9, 4,7	60,2
9В	2,79	дд	12,3, 4,9	40,4
	2,56 – 2,46	м	-	
10В	5,36	с	-	-
11В	-	-	-	164,0
12В	6,27	с	-	-

### 3.4. Изучение растворимости и липофильности

Растворимость конъюгатов **1**, **2** и паклитексела в модельной среде (в разделе 2.1) изучали с помощью ВЭЖХ (см. раздел 3.2). Образец исследуемого вещества (5 мг) суспендировали под воздействием ультразвука в 1 мл модельной среды и инкубировали в термощейкере Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Германия) при 37 °С на протяжении 2 часов. Затем суспензию фильтровали через шприцевой фильтр Chromafil Xtra PET-45/25 (Macherey-Nagel, Германия), и концентрацию соединения определяли по его стандартному раствору.

Определение растворимости конъюгатов **1**, **3-7** (в разделе 2.3) выполняли спектрофотометрическим методом. Приблизительно 2 мг соответствующего конъюгата суспендировали в 10 мл модельной среды (0,8 % ПВС/этанол 10:1) с помощью ультразвука в течение 10 мин, а затем помещали в термостатический шейкер на 2 ч при 150 об/мин и 37 °С. После этого суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин (центрифуга TAGLER CM-12-06, Россия) при центробежном ускорении  $2420 \times g$  и осторожно сливали. Аликвотную часть супернатанта объёмом 1 мл отбирали и разбавляли в мерной колбе вместимостью 5 мл этанолом. Содержание конъюгата в полученном растворе определяли на спектрофотометре UV-1900i (Shimadzu, Япония) при 230 нм с использованием калибровочных зависимостей.

Липофильность (значение LogP) исследуемых соединений оценивали *in silico* с использованием электронного ресурса «Molinspiration Cheminformatics» (<https://www.molinspiration.com>).

### 3.5. Получение наночастиц

Наночастицы были получены способом наноосаждения. В качестве иллюстрационного примера представлен подход к получению наноструктур на основе конъюгата **1** в оптимальных условиях после оптимизации (для раздела 2.2). Раствор конъюгата **1** объёмом 1 мл и концентрацией 20 мг/мл в этаноле добавляли по каплям в течение 2 минут при комнатной температуре и интенсивном перемешивании (600 об/мин) к 10 мл 0,8 % (м/об) раствора ПВС. Суспензию НЧ перемешивали в течение 5 минут, после чего органический растворитель частично упаривали на роторном испарителе при 40 °С (150 об/мин). Затем суспензию фильтровали через шприцевой фильтр (FILTSTAR Syringe Filter, стекловолокно 25 мм, 1 мкм, Hawach Scientific Co., Ltd., Китай) и разливали по 0,5 мл в стеклянные флаконы. Образцы замораживали при –40 °С и лиофилизировали в течение суток.

### 3.6. Определение содержания конъюгата в образцах лиофилизата наночастиц и расчёт эффективности инкапсуляции

Определение содержания конъюгатов **1** и **8** (в разделах 2.2 и 2.4) в образцах лиофилизата наночастиц проводили с помощью ВЭЖХ. Для этого содержимое флакона ресуспендировали в 1 мл воды под воздействием ультразвука. Затем аликвотную часть суспензии объёмом 0,5 мл переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл и разбавляли смесью ацетонитрил/вода в соотношении 1:1 (об/об) до метки. Концентрацию конъюгата в исследуемом растворе рассчитывали с помощью калибровочной прямой. Содержание конъюгата во флаконе рассчитывали по нижеприведённой формуле (Уравнение 1):

$$\text{Содержание (мг)} = \frac{c_{\text{кон}} V_{\text{к}} V_{\text{обр}}}{1000 V_{\text{ал}}} \quad (\text{ур. 1})$$

где  $c_{\text{кон}}$  — концентрация конъюгата, найденная в исследуемом растворе по калибровочной функции (мкг/мл);  $V_{\text{к}}$  — вместимость мерной колбы (5 мл);  $V_{\text{обр}}$  — объём образца (1 мл);  $V_{\text{ал}}$  — объём аликвоты (0,5 мл).

Содержание конъюгатов **1**, **3-7** (в разделе 2.3) в лиофилизированных образцах определяли спектрофотометрическим методом (способ добавок). Содержимое флакона суспендировали в 2 мл воды и разбавляли 2 мл этанола. Полученный раствор переносили в мерную колбу ёмкостью 10 мл и доводили до метки смесью этанола и

воды (1:1). Затем аликвотные части полученного раствора объёмом 1 мл переносили в три отдельные мерные колбы вместимостью 5 мл. В одну колбу добавляли 50 мкл стандартного раствора конъюгата (1 мг/мл) в смеси этанола и воды (1:1); в другую колбу добавляли 100 мкл того же стандартного раствора. Содержимое всех колб доводили до метки смесью растворителей и тщательно перемешивали. Поглощение полученных растворов измеряли при 230 нм, и для количественного анализа строили калибровочные графики (в трёх повторениях). Содержание конъюгата во флаконе рассчитывали следующим образом (Уравнение 2):

$$\text{Содержание (мг)} = \frac{c_{\text{кон}} V_{\text{к1}} V_{\text{к2}}}{1000 V_{\text{ал}}} \quad (\text{ур. 2})$$

где  $c_{\text{кон}}$  — концентрация конъюгата, найденная в исследуемом растворе по калибровочной функции (мкг/мл);  $V_{\text{к1}}$  и  $V_{\text{к2}}$  — вместимости мерных колб (5 и 10 мл);  $V_{\text{ал}}$  — объём аликвоты (1 мл).

Эффективность инкапсуляции, определяемая как количество конъюгата, включившееся в состав НЧ при их получении, рассчитывали по следующему уравнению (Уравнение 3):

$$\text{Эффективность инкапсуляции (\%)} = \frac{m \cdot N}{m_0} \cdot 100 \% \quad (\text{ур. 3})$$

где  $m$  — содержание конъюгата во флаконе (мг);  $N$  — количество флаконов с соответствующим конъюгатом;  $m_0$  — масса навески конъюгата, взятой для получения наночастиц (мг).

### 3.7. Оценка доступности биотина в составе наночастиц

Для оценки доли доступного для связывания с рецепторами на поверхности опухолевых клеток биотина в составе наночастиц (в разделах 2.2 и 2.3) был использован ГАБК-авидиновый тест [136–138]. Для проведения анализа были заранее приготовлены два раствора реагентов. Раствор (А) готовили путём растворения 12,1 мг ГАБК в 200 мкл 1 М водного раствора NaOH, который затем разбавляли водой в мерной колбе вместимостью 5 мл. Для приготовления раствора (Б) 5 мг авидина растворяли в мерной колбе ёмкостью 10 мл в 5 мл ФСБ (рН 7,1), после чего добавляли 300 мкл раствора ГАБК (А) и доводили объём до метки буфером. Раствор сравнения готовили путём разбавления 300 мкл раствора ГАБК (А) буфером до 10 мл. Также готовили стандартный 0,1 мМ водный раствор биотина. Для приготовления исследуемого

раствора содержимое флакона с лиофилизатом суспендировали и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объём до метки водой.

Фотометрическое детектирование проводили при фиксированной длине волны 503 нм. Базовая линия была установлена с использованием раствора, приготовленного путём смешивания 900 мкл раствора сравнения и 100 мкл воды (Рисунок 31, раствор 1). Затем 900 мкл раствора ГАБК-авидинового комплекса (Б) разбавляли 100 мкл воды (Рисунок 31, раствор 2), и измеряли поглощение относительно базовой линии. Далее 100 мкл 0,1 мМ раствора биотина разбавляли 900 мкл раствора (Б) и оставляли на 30 мин (Рисунок 31, раствор 3), после чего измеряли поглощение. Затем 100 мкл тестового раствора разбавляли 900 мкл раствора (Б) и оставляли на 30 мин (Рисунок 31, раствор 4), после чего также измеряли поглощение.



Рисунок 31 – Внешний вид измеренных растворов (пояснения приведены в тексте выше).

Доля биотина, потенциально доступного для взаимодействия с рецепторами, в образце лиофилизата наночастиц была рассчитана по формуле (Уравнение 4):

$$\text{Доля доступного биотина (\%)} = \frac{(A_0 - A_{\text{НЧ}})c_6V_{\text{к}}M}{1000(A_0 - A_6)m} \cdot 100 \% \quad (\text{ур. 4})$$

где  $A_0$  — поглощение раствора 2;  $A_6$  — поглощение раствора 3;  $A_{\text{НЧ}}$  — поглощение раствора 4;  $c_6$  — точная концентрация стандартного раствора биотина (0,1 мМ);  $V_{\text{к}}$  — вместимость мерной колбы, содержащей суспензию НЧ (10 мл);  $M$  — молярная масса конъюгата (г/моль);  $m$  — содержание конъюгата во флаконе (мг).

### 3.8. Количественное определение поливинилового спирта в составе лиофилизата

Количественный анализ ПВС в образцах лиофилизата НЧ (в разделах 2.2 и 2.4) проводили спектрофотометрическим методом согласно литературным данным [139,

140]. Для этого готовили исходный раствор ПВС (9-10 кДа) в воде с концентрацией 125 мг/л. Аликвотные части раствора переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл для приготовления серии калибровочных растворов полимера в диапазоне концентраций  $10 \div 50$  мг/л. Затем в каждую колбу последовательно добавляли 5 мл смеси этанол/вода (1:1), 7,5 мл водного раствора борной кислоты (40 мг/мл) и 1,5 мл водного раствора, содержащего йод (12,7 мг/мл) и йодид калия (25 мг/мл). Содержимое колб тщательно перемешивали и выдерживали в тёмном месте при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего доводили до метки водой и перемешивали. Для выбора оптимальной длины волны был измерен спектр поглощения (Рисунок 32) раствора ПВС концентрацией 50 мг/л относительно раствора сравнения, содержащего все реагенты кроме анализируемого полимера. Для стандартных растворов ПВС поглощение измеряли при 680 нм, что соответствовало максимуму экстинкции в видимой области спектра.

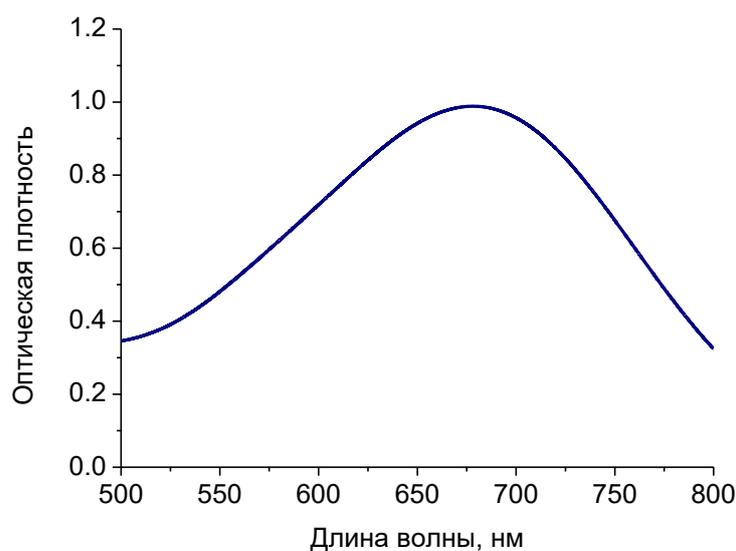


Рисунок 32 – Спектр поглощения окрашенного комплекса ПВС с йодом и борной кислотой.

Для определения содержания ПВС образец лиофилизата растворяли в 1 мл смеси этанол/вода (1:1) и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки той же смесью растворителей и перемешивали. Аликвотную часть объёмом 1 мл переносили в мерную колбу ёмкостью 25 мл и разбавляли 4 мл смеси этанол/вода (1:1), 7,5 мл водного раствора борной кислоты (40 мг/мл) и 1,5 мл водного раствора йода (12,7 мг/мл) и йодида калия (25 мг/мл), доводили до метки водой и перемешивали. Через 30 мин измеряли поглощение раствора при 680 нм, и содержание ПВС во флаконе с лиофилизатом рассчитывали по следующей формуле (Уравнение 5):

$$\text{Содержание ПВС (мг)} = \frac{c_{\text{ПВС}} V_{\text{к1}} V_{\text{к2}}}{1000 V_{\text{ал}}} \quad (\text{ур. 5})$$

где  $c_{\text{ПВС}}$  — концентрация ПВС в конечном растворе, найденная по калибровочной зависимости (мг/л);  $V_{\text{к1}}$  и  $V_{\text{к2}}$  — объёмы мерных колб (10 и 25 мл);  $V_{\text{ал}}$  — объём аликвоты (1 мл).

### 3.9. Оценка коллоидной стабильности наночастиц

Для оценки коллоидной стабильности (разделы 2.1–2.4) образец лиофилизата ресуспендировали в воде до концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в отсутствие света при 22 °С или 4 °С. Через заданные интервалы времени отбирали аликвотные части суспензий, разбавляли водой до концентрации конъюгата 20 мкг/мл, после чего измеряли среднеобъёмный размер частиц и индекс полидисперсности.

Стабильность наноструктур в средах, содержащих белок (разделы 2.2–2.4), оценивали следующим образом. Лиофилизат наночастиц ресуспендировали в 0,9 или 0,5 мл ФСБ (рН 7,4) и инкубировали при 37 °С в термошейкере ThermoMixer C (Eppendorf, Германия). После достижения температурного равновесия в среду добавляли 100 или 500 мкл ФБС (итоговый объём среды составлял примерно 1 мл) до её конечной концентрации 10 или 50 % (об/об) соответственно. Через установленные промежутки времени отбирали аликвоты, разбавляли водой и анализировали размер частиц и индекс полидисперсности.

### 3.10. Анализ гемолитической активности

Гемолитическую активность наночастиц (разделы 2.2–2.4) оценивали спектрофотометрически путём количественного определения высвобожденного гемоглобина из эритроцитов с использованием изменённой версии ранее установленного протокола [141]. Человеческую кровь собирали как минимум у трёх доноров, которые не принимали какие-либо лекарственные препараты в течение как минимум двух недель до сбора образцов. Венозную кровь отбирали в вакуумные пробирки КЗ-EDTA объёмом 9 мл и центрифугировали ( $900 \times g$ , 10 мин, 18 °С) с использованием центрифуги Hettich Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия). Затем эритроциты дважды промывали фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали до концентрации примерно  $4 \times 10^9$  клеток/мл, что соответствует нормальной физиологической концентрации эритроцитов. Исследуемые образцы НЧ

суспендировали в фосфатно-солевом буфере (0,15 М, рН 7,4) для достижения концентрации ЛВ 2,5 мг/мл, после чего проводили последовательные двукратные разведения. Аликвоты (200 мкл) каждого разведения смешивали с 800 мкл суспензии эритроцитов, в результате чего получали конечную концентрацию ЛВ в диапазоне от 62,5 до 500 мкг/мл. Эти смеси инкубировали при непрерывном перемешивании при 37 °С в течение 90 минут. Параллельно в тех же условиях проводили эксперимент с использованием эквивалентных концентраций ЛВ в Паклитакселе-Эбеве® в качестве препарата сравнения. После центрифугирования (900 × g, 5 мин, 18 °С) в супернатант добавляли 0,06 % (м/об) раствор додецилсульфата натрия для облегчения образования гемихрома. Количественное определение гемоглобина проводили путём измерения абсорбции при 540 нм с использованием микропланшетного ридера EnSpire (PerkinElmer, США). В качестве экспериментальных контролей использовали суспензии эритроцитов в фосфатно-солевом буфере (отрицательный контроль, 0 % гемолиза) и 1 % (м/об) растворе тритона X-100 (положительный контроль, 100 % гемолиза). Процент гемолиза рассчитывали как отношение абсорбции образца к абсорбции положительного контроля.

### 3.11. Исследование цитотоксичности *in vitro*

Исследование цитотоксичности проводили с помощью МТТ теста. Клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 (Кат. № CRL-1420, ATCC, США), PANC-1 (Кат. № CRL-1469, ATCC, США) сеяли в 96-луночный планшет (5×10<sup>3</sup> кл/лунка) и инкубировали 24 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Исследуемые образцы добавляли в различных концентрациях и инкубировали 48 часов. Далее в каждую лунку добавляли МТТ-реагент (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) (Sigma-Aldrich, США) (финальная концентрация в лунке 0,5 мг/мл) и инкубировали на протяжении 4 ч. Образовавшиеся кристаллы растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность спектрофотометрически при длине волны 595 нм и референсной длине волны 655 нм. Жизнеспособность клеток (в процентах) рассчитывали как отношение разности оптических плотностей образца и фона к разности оптических плотностей контроля и фона.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

При выполнении исследования были получены следующие результаты:

1. Получены новые типы конъюгатов паклитаксела с биотином.
2. Показана способность конъюгатов паклитаксела с биотином образовывать узкодисперсные наночастицы размером менее 200 нм в водных средах.
3. Оптимизирован способ получения НЧ конъюгатов **1** и **8** методом наноосаждения.
4. Разработан подход к получению конъюгата паклитаксела с биотином, содержащего стимул-чувствительный тиоэфирный линкер.
5. Установлено, что прототип лекарственной формы на основе конъюгата **8** со стимул-чувствительным линкером является перспективным химиотерапевтическим средством, цитотоксичность которого на клетках карциномы поджелудочной железы на порядок превышает цитотоксичность современного коммерчески доступного препарата «Абраксан®» на основе паклитаксела.

По представленной работе могут быть сделаны выводы:

1. Внедрение гидрофильного линкера, содержащего доноры и акцепторы водородных связей, в состав конъюгата паклитаксела с биотином препятствует способности гибридного соединения формировать коллоидно-стабильные наночастицы.
2. Наноструктуры с воспроизводимыми параметрами на основе конъюгатов паклитаксела с биотином могут быть получены методом наноосаждения.
3. Введение коротких гидрофобных линкеров в состав конъюгатов не оказывает существенного влияния на возможность получения на их основе самособирающихся наночастиц и на их ключевые характеристики, такие как коллоидная стабильность и гемолитическая активность.
4. Полученные наночастицы конъюгатов паклитаксела с биотином позволяют создать концентрацию химиотерапевтического агента в суспензии, сопоставимую с концентрацией паклитаксела в коммерчески доступных лекарственных формах, и являются приемлемыми для внутривенного введения.
5. Конъюгат паклитаксела с биотином, содержащий стимул-чувствительный тиоэфирный линкер, является перспективным пролекарством по сравнению с конъюгатом с нерасщепляемым аминокислотным линкером, благодаря повышенной

цитотоксичности, обусловленной потенциальным облегчением высвобождения химиотерапевтического агента внутри опухолевых клеток.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю, д.х.н., проф. Кочеткову К. А. за содействие в подготовке работы, действенную помощь и внимание. Автор благодарен д.х.н., проф. Перегудову А. С. за помощь в регистрации спектров ЯМР, к.х.н., заведующей кафедрой аналитической химии Стахановой С. В. за обучение измерению ИК спектров, к.х.н. Никитину А. А. за помощь в изучении морфологии наноструктур, Куковякиной Е. В. за проведение исследований биологической активности. Автор благодарен коллегам из НОЛ СДЛВ, лаборатории Нанофармацевтики, кафедры Химии и технологии биологически активных веществ РХТУ им. Д. И. Менделеева и лаборатории ГРЭОС ИНЭОС РАН за ценные советы и поддержку на всех этапах выполнения работы. Особую благодарность автор выражает Беляевой А. Ю., Казаковой Е. С., Жежер И. В. и Орлову В. О. за совместную работу по тематике диссертации и помощь, а также родным и близким за поддержку.

### **Список статей, опубликованных автором по теме диссертации**

1. D. V. Beigulenko, E. S. Kazakova, T. S. Kovshova, K. A. Kochetkov. Development and examination of self-assembled nanoformulation of biotinylated paclitaxel derivative // *Mendeleev Communications*. — 2026. — Vol. 36, no. 3. — <https://doi.org/10.71267/mencom.7913>.
2. D. V. Beigulenko, V. O. Orlov, E. S. Kazakova et al. Synthesis and self-assembly behavior investigation of paclitaxel-riboflavin conjugates for targeted drug delivery to tumor cells // *Nano-Structures & Nano-Objects*. — 2025. — Vol. 45. — 101588.
3. D. V. Beigulenko, A. Y. Belyaeva, E. S. Kazakova et al. Evaluation of self-assembling properties of paclitaxel-biotin conjugates // *Nano-Structures & Nano-Objects*. — 2024. — Vol. 40, no. 12. — 101375.
4. Д. В. Бейгуленко, Н. Ю. Шепета, К. А. Кочетков, С. Э. Гельперина. Витамин В12 как вектор для транспорта лекарственных веществ в опухоль // *Макрогетероциклы*. — 2022. — Т. 15, № 1. — С. 6–17.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АФК – активные формы кислорода
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАБК – 4'-гидроксиазобензол-2-карбоновая кислота
- ГДФ – гуанозиндифосфат
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние
- ДМАП – 4-диметиламинопиридин
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДМФА – N,N-диметилформамид
- ДС – длина спейсера
- ДТТ – дитиотреитол
- ДХМ – дихлорметан
- ДЦК – N,N-дициклогексилкарбодиимид
- ИЭР – ионизация электрораспылением
- КИ – клинические испытания
- к.т. – комнатная температура
- КХ – колоночная хроматография
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛФ – лекарственная форма
- МКТ-1 – монокарбоксилатный транспортёр-1
- МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
- МТБЭ – метил-*трет*-бутиловый эфир
- НЧ – наночастица
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПТСК – *пара*-толуолсульфо кислота
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- РМЖ – рак молочной железы
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ТФУ – трифторуксусная кислота

УФ – ультрафиолетовый

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДК – гидрохлорид N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида

ЭРС – электрофоретическое рассеяние света

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Ac – ацетил

Boc – *трет*-бутоксикарбонил

10-DAB – 10-деацетилбаккатин III (*англ.* 10-deacetylbaaccatin III)

DHA – докозагексаеновая кислота (*англ.* docosahexaenoic acid)

$d_v$  – среднеобъёмный гидродинамический диаметр

EPR-эффект – эффект повышенной проницаемости и удерживания (*англ.* enhanced permeability and retention)

Et – этил

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (*англ.* Food and drug administration)

Me – метил

PAMAM – полиамидоамин (*англ.* polyamidoamine)

PDI – индекс полидисперсности (*англ.* polydispersity index)

Ph – фенил

PTX – паклитаксел (*англ.* paclitaxel)

Pu – пиридин

SMVT – натрий-зависимый мультивитаминный транспортёр (*англ.* sodium-dependent multivitamin transporter)

Su – N-сукцинимидил

Ts – тозил

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. J.-I. Lai, Ta-C. Chao, C.-Yu Liu, et al. A systemic review of taxanes and their side effects in metastatic breast cancer // *Frontiers in Oncology*. — 2022. — Vol. 12. — 940239.
2. N. I. Marupudi, J. E. Han, K. W. Li, et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies // *Expert Opinion on Drug Safety*. — 2007. — Vol. 6, № 5. — P. 609–621.
3. J.-I. Lai, T.-C. Chao, C.-Y. Liu, et al. A systemic review of taxanes and their side effects in metastatic breast cancer // *Frontiers in Oncology*. — 2022. — Vol. 12. — 940239.
4. A. León-Del-Río. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. — 2019. — Vol. 42, no. 4. — P. 647–654.
5. R. Tripathi, A. Guglani, R. Ghorpade, B. Wang. Biotin conjugates in targeted drug delivery: is it mediated by a biotin transporter, a yet to be identified receptor, or (an)other unknown mechanism(s)? // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2023. — Vol. 38, no. 1. — 2276663.
6. W. X. Ren, J. Han, S. Uhm, et al. Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery // *Chemical Communications*. — 2015. — Vol. 51, no. 52. — P. 10403–10418.
7. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review // *Journal of Controlled Release*. — 2000. — Vol. 65, no. 1–2. — P. 271–284.
8. M. Rayan, S. Shadafny, A. Falah, et al. A novel docetaxel-biotin chemical conjugate for prostate cancer treatment // *Molecules*. — 2022. — Vol. 27, no. 3. — 961.
9. L. G. Lis, M. A. Smart, A. Luchniak, et al. Synthesis and biological evaluation of a biotinylated paclitaxel with an extra-long chain spacer arm // *ACS Medicinal chemistry letters*. — 2012. — Vol. 3, no. 9. — P. 745–748.
10. S. Chen, X. Zhao, J. Chen, et al. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release // *Bioconjugate chemistry*. — 2010. — Vol. 21, no. 5. — P. 979–987.
11. J. G. Vineberg, T. Wang, E. S. Zuniga, I. Ojima. Design, synthesis, and biological evaluation of theranostic vitamin–linker–Taxoid conjugates // *Journal of medicinal chemistry*. — 2015. — Vol. 58, no. 5. — P. 2406–2416.

12. X. Shen, Y. Ma, H. Luo, et al. Peptide aptamer–paclitaxel conjugates for tumor targeted therapy // *Pharmaceutics*. — 2024. — Vol. 17, no. 1. — 40.
13. W. P. McGuire, E. K. Rowinsky, N. B. Rosenshein, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms // *Annals of Internal Medicine*. — 1989. — Vol. 111, no. 4. — P. 273–279.
14. A. L. Risinger, S. L. Mooberry. Taccalonolides: Novel microtubule stabilizers with clinical potential // *Cancer Letters*. — 2010. — Vol. 291, no. 1. — P. 14–19.
15. M. S. Surapaneni, S. K. Das, N. G. Das. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges // *International Scholarly Research Notices*. — 2012. — Vol. 2012. — 623139.
16. R. P. Alves, R. P. Fernandes, J. O. Eloy, et al. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: A review // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. — 2018. — Vol. 48, no. 2. — P. 110–118.
17. J. Skubnik, V. Pavlickova, T. Ruml, S. Rimpelova. Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and Combination Therapy // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, no. 3. — 569.
18. Z. Hu, Li Li Ou, G. L. Zhang, Y. P. Yu. Regioselective protection of 10-deacetylbaccatin III and semi-synthesis of paclitaxel // *Chinese Chemical Letters*. — 2008. — Vol. 19, no. 2. — P. 130–132.
19. R. N. Patel. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis // *Annual Review of Microbiology*. — 1998. — Vol. 52. — P. 361–395.
20. U. Heinig, S. Scholz, S. Jennewein. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi // *Fungal Diversity*. — 2013. — Vol. 60. — P. 161–170.
21. L. Ottaggio, F. Bestoso, A. Armirotti, et al. Taxanes from Shells and Leaves of *Corylus avellana* // *Journal of Natural Products*. — 2008. — Vol. 71, no. 1. — P. 58–60.
22. M. Salehi, A. Moieni, N. Safaie, S. Farhadi. Whole fungal elicitors boost paclitaxel biosynthesis induction in *Corylus avellana* cell culture // *PLoS One*. — 2020. — Vol. 15, no. 7. — e0236191.
23. J. A. O’Shaughnessy, K. H. Cowan. Current status of paclitaxel in the treatment of breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment*. — 1995. — Vol. 33, no. 1. — P. 27–37.

24. R. Sanchez-Muñoz, E. Perez-Mata, L. Almagro, et al. A Novel Hydroxylation Step in the Taxane Biosynthetic Pathway: A New Approach to Paclitaxel Production by Synthetic Biology // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2020. — Vol. 8. — 410.
25. J. Gligorov, J. P. Lotz. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences // *The Oncologist*. — 2004. — Vol. 9, no. S2. — P. 3–8.
26. Z. Weiszár, J. Czúcz, C. Révész, et al. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20 // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2012. — Vol. 45, no. 4. — P. 492–498.
27. F. C. Campos, V. J. Victorino, M. C. Martins-Pinge, et al. Systemic toxicity induced by paclitaxel *in vivo* is associated with the solvent cremophor EL through oxidative stress-driven mechanisms // *Food and chemical toxicology*. — 2014. — Vol. 68. — P. 78–86.
28. N. Ying, S. Liu, M. Zhang, et al. Nano delivery system for paclitaxel: Recent advances in cancer theranostics // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2023. — Vol. 228. — 113419.
29. S. Wileński, A. Koper, P. Śledzińska, et al. Innovative strategies for effective paclitaxel delivery: Recent developments and prospects // *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. — 2024. — Vol. 30, no. 2. — P. 367–384.
30. F. He, J. Liu, X. Shen, et al. Adverse event profile for nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with solvent-based taxanes in solid-organ tumors: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials // *Annals of Pharmacotherapy*. — 2022. — Vol. 56, no. 8. — P. 898–909.
31. E. Bernabeu, M. Cagel, E. Lagomarsino, et al. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead // *International journal of pharmaceutics*. — 2017. — Vol. 526, no. 1–2. — P. 474–495.
32. L. Hu, G. Liang, W. Yuliang, et al. Assessing the effectiveness and safety of liposomal paclitaxel in combination with cisplatin as first-line chemotherapy for patients with advanced NSCLC with regional lymph-node metastasis: study protocol for a randomized controlled trial (PLC-GC trial) // *Trials*. — 2013. — Vol. 14. — 45.
33. W. W. Ma, M. Zhu, E. T. Lam, et al. A phase I pharmacokinetic and safety study of Paclitaxel Injection Concentrate for Nano-dispersion (PICN) alone and in combination with carboplatin in patients with advanced solid malignancies and biliary tract cancers // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. — 2021. — Vol. 87, no. 6. — P. 779–788.

34. W. Zhou, H. Hu, T. Wang. Study on Modification of Paclitaxel and Its Antitumor Preparation // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. — 2023. — Vol. 49, no. 2. — P. 288–297.
35. S. Emoto, H. Yamaguchi, J. Kishikawa, et al. Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK 105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination // *Cancer science*. — 2012. — Vol. 103, no. 7. — P. 1304–1310.
36. S. Strieth, M. E. Eichhorn, A. Werner, et al. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin // *Clinical cancer research*. — 2008. — Vol. 14, no. 14. — P. 4603–4611.
37. M. Slingerland, H.-J. Guchelaar, H. Rosing, et al. Bioequivalence of Liposome-Entrapped Paclitaxel Easy-To-Use (LEP-ETU) formulation and paclitaxel in polyethoxylated castor oil: a randomized, two-period crossover study in patients with advanced cancer // *Clinical therapeutics*. — 2013. — Vol. 35, no. 12. — P. 1946–1954.
38. A. Regina, M. Demeule, C. Ché, et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2 // *British journal of pharmacology*. — 2008. — Vol. 155, no. 2. — P. 185–197.
39. A. Y. Bedikian, R. C. DeConti, R. Conry, et al. Phase 3 study of docosahexaenoic acid–paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma // *Annals of Oncology*. — 2011. — Vol. 22, no. 4. — P. 787–793.
40. J. W. Singer, B. Baker, P. De Vries, et al. Poly-(L)-glutamic acid-paclitaxel (CT-2103) [XYOTAX™], a biodegradable polymeric drug conjugate: Characterization, preclinical pharmacology, and preliminary clinical data // *Polymer drugs in the clinical stage: advantages and prospects*. — 2003. — Vol. 519. — P. 81–99.
41. L. Arregui, C. Muñoz-Fontela, A. Guinea, S. Serrano. FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs // *European Journal of Protistology*. — 2003. — Vol. 39, no. 2. — P. 169–172.
42. L. Shan, X. Zhuo, F. Zhang, et al. A paclitaxel prodrug with bifunctional folate and albumin binding moieties for both passive and active targeted cancer therapy // *Theranostics*. — 2018. — Vol. 8, no. 7. — P. 2018–2030.

43. G. Moyna, H. J. Williams, A. I. Scott, et al. Conformational Studies of Paclitaxel Analogs Modified at the C-2' Position in Hydrophobic and Hydrophilic Solvent Systems // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 1997. — Vol. 40, no. 20. — P. 3305–3311.
44. S. Sharma, C. Lagisetti, B. Poliks, et al. Dissecting Paclitaxel–Microtubule Association: Quantitative Assessment of the 2'-OH Group // *Biochemistry*. — 2013. — Vol. 52, no. 13. — P. 2328–2336.
45. X. Lou, D. Zhang, H. Ling, et al. Pure redox-sensitive paclitaxel–maleimide prodrug nanoparticles: Endogenous albumin-induced size switching and improved antitumor efficiency // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. — 2021. — Vol. 11, no. 7. — P. 2048–2058.
46. X. Jin, S. Asghar, M. Zhang, et al. *N*-acetylcysteine modified hyaluronic acid-paclitaxel conjugate for efficient oral chemotherapy through mucosal bioadhesion ability // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2018. — Vol. 172. — P. 655–664.
47. T. Dichwalkar, S. Patel, S. Bapat, et al. Omega-3 fatty acid grafted PAMAM-Paclitaxel conjugate exhibits enhanced anticancer activity in upper gastrointestinal cancer cells // *Macromolecular Bioscience*. — 2017. — Vol. 17, no. 8. — 1600457.
48. Z. Fu, S. Li, S. Han, et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy // *Signal transduction and targeted therapy*. — 2022. — Vol. 7, no. 1. — 93.
49. W. H. De Jong, P. J. A. Borm. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards // *International Journal of Nanomedicine*. — 2008. — Vol. 3, no. 2. — P. 133–149.
50. A. Fortune, A. Aime, D. Raymond, S. Kumar. Nanotechnology in medicine: a double-edged sword for health outcomes // *Health Nanotechnology*. — 2025. — Vol. 1. — 9.
51. T. Shao, T. Chen, Y. Chen, et al. Construction of paclitaxel-based antibody–drug conjugates with a PEGylated linker to achieve superior therapeutic index // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2020. — Vol. 5, no. 1. — 132.
52. M. Zaiden, M. Rütter, L. Shpirt, et al. CD44-Targeted Polymer–Paclitaxel Conjugates to Control the Spread and Growth of Metastatic Tumors // *Molecular Pharmaceutics*. — 2018. — Vol. 15, no. 9. — P. 3690–3699.
53. G. Wang, Z. Wang, C. Li, et al. RGD peptide-modified, paclitaxel prodrug-based, dual-drugs loaded, and redox-sensitive lipid-polymer nanoparticles for the enhanced lung cancer therapy // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2018. — Vol. 106. — P. 275–284.

54. Y. Zhang, Y. Lu, Yu Zhang, et al. Tumor-targeting micelles based on linear–dendritic PEG–PTX8 conjugate for triple negative breast cancer therapy // *Molecular pharmaceutics*. — 2017. — Vol. 14, no. 10. — P. 3409–3421.
55. I. Banerjee, K. De, D. Mukherjee, et al. Paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles modified with Tyr-3-octreotide for enhanced anti-angiogenic and anti-glioma therapy // *Acta biomaterialia*. — 2016. — Vol. 38. — P. 69–81.
56. J. Zhang, F. Hu, O. Aras, et al. Small Molecule-Drug Conjugates: Opportunities for the Development of Targeted Anticancer Drugs // *ChemMedChem*. — 2024. — Vol. 19, no. 11. — e202300720.
57. M. Falah, M. Rayan, A. Rayan. A novel paclitaxel conjugate with higher efficiency and lower toxicity: A new drug candidate for cancer treatment // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20, no. 19. — 4965.
58. R. P. Bhole, S. Jadhav, Y. B. Zambare, et al. Vitamin-anticancer drug conjugates: a new era for cancer therapy // *Istanbul Journal of Pharmacy*. — 2020. — Vol. 50, no. 3. — P. 312–322.
59. Д. В. Бейгуленко, Н. Ю. Шепета, К. А. Кочетков, С. Э. Гельперина. Витамин В12 как вектор для транспорта лекарственных веществ в опухоль // *Макрогетероциклы*. — 2022. — Т. 15, № 1. — С. 6–17.
60. R. Tripathi, A. Guglani, R. Ghorpade, B. Wang. Biotin conjugates in targeted drug delivery: is it mediated by a biotin transporter, a yet to be identified receptor, or (an) other unknown mechanism (s)? // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2023. — Vol. 38, no. 1. — 2276663.
61. H. M. Said. Cellular Uptake of Biotin: Mechanisms and Regulation // *The Journal of Nutrition*. — 1999. — Vol. 129, no. 2. — P. 490S–493S.
62. C. G. Staggs, W. M. Sealey, B. J. McCabe, et al. Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding // *Journal of Food Composition and Analysis*. — 2004. — Vol. 17, no. 6. — P. 767–776.
63. H. M. Said. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects // *Subcellular Biochemistry*. — 2012. — Vol. 56. — P. 1–19.
64. B. Wolf, G. S. Heard, J. R. Secor McVoy, H. M. Raetz. Biotinidase Deficiency: The Possible Role of Biotinidase in the Processing of Dietary Protein-bound Biotin // *Organic Acidurias*. — 1984. — P. 121–122.

65. D. M. Mock, M. I. Malik. Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein // *The American Journal of Clinical Nutrition*. — 1992. — Vol. 56, no. 2. — P. 427–432.
66. K. M. Cooper, S. Kennedy, S. McConnell, et al. An immunohistochemical study of the distribution of biotin in tissues of pigs and chickens // *Research in Veterinary Science*. — 1997. — Vol. 63, no. 3. — P. 219–225.
67. C. Wang, Y. Xiu, Y. Zhang, et al. Recent advances in Biotin-based therapeutic agents for cancer therapy // *Nanoscale*. — 2025. — Vol. 17, no. 4. — P. 1812–1873.
68. M. Quick, L. Shi. The sodium/multivitamin transporter: a multipotent system with therapeutic implications // *Vitamins & Hormones*. — 2015. — Vol. 98. — P. 63–100.
69. R. L. Daberkow, B. R. White, R. A. Cederberg, et al. Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells // *The Journal of nutrition*. — 2003. — Vol. 133, no. 9. — P. 2703–2706.
70. R. J. McMahon. Biotin in metabolism and molecular biology // *Annual Review of Nutrition*. — 2002. — Vol. 22. — P. 221–239.
71. R. A. Gravel, M. A. Narang. Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. — 2005. — Vol. 16, no. 7. — P. 428–431.
72. S. Ibsen, E. Zahavy, W. Wrasdilo, et al. A novel doxorubicin prodrug with controllable photolysis activation for cancer chemotherapy // *Pharmaceutical research*. — 2010. — Vol. 27, no. 9. — P. 1848–1860.
73. S. Bhuniya, M. H. Lee, H. Mi Jeon, et al. A fluorescence off–on reporter for real time monitoring of gemcitabine delivery to the cancer cells // *Chemical Communications*. — 2013. Vol. 49, no. 64. — P. 7141–7143.
74. S. V. K. Rompicharla, P. Kumari, H. Bhatt, et al. Biotin functionalized PEGylated poly (amidoamine) dendrimer conjugate for active targeting of paclitaxel in cancer // *International journal of pharmaceutics*. — 2019. — Vol. 557. — P. 329–341.
75. S. R. Manne, O. Luna, G. A. Acosta, et al. Amide Formation: Choosing the Safer Carbodiimide in Combination with OxymaPure to Avoid HCN Release // *Organic Letters*. — 2021. — Vol. 23, no. 17. — P. 6900–6904.

76. H. Nzama, S. R. Manne, O. Marder, et al. Unveiling the quaternary carbodiimide symphony: harmonizing green chemistry in peptide synthesis // *Green Chemistry Letters and Reviews*. — 2024. — Vol. 17, no. 1. — 2392826.
77. M. Villabona, A. Marco, R. M. Sebastián, et al. Photoswitchable Active Esters for the Control of Amide Bond Formation with Light // *JACS Au*. — 2025. — Vol. 5, no. 10. — P. 5017–5026.
78. J.-S. Suppo, R. M. de Figueiredo, J.-M. Campagne. Dipeptide Syntheses via Activated  $\alpha$ -Aminoesters // *Organic Syntheses*. — 2015. — Vol. 92. — P. 296–308.
79. A. K. Ghosh, D. Shahabi. Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBt as the coupling reagents // *Tetrahedron Letters*. — 2021. — Vol. 63. — 152719.
80. T. Maldiney, M. U. Kaikkonen, J. Seguin, et al. *In vitro* targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles // *Bioconjugate Chemistry*. — 2012. — Vol. 23, no. 3. — P. 472–478.
81. G.-P. Li, H. Zhang, C.-Mo Zhu, et al. Avidin-biotin system pretargeting radioimmunoimaging and radioimmunotherapy and its application in mouse model of human colon carcinoma // *World Journal of Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 11, no. 40. — P. 6288–6294.
82. H. Sakahara, T. Saga. Avidin–biotin system for delivery of diagnostic agents // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 1999. — Vol. 37, no. 1–2. — P. 89–101.
83. V. I. J. Jallinoja, J. L. Houghton. Current Landscape in Clinical Pretargeted Radioimmunoimaging and Therapy // *Journal of Nuclear Medicine*. — 2021. — Vol. 62, no. 9. — P. 1200–1206.
84. Z. Guo, L. Zhu, W. Xu, et al. PD-L1 ImmunoPET on the basis of Avidin/Biotin pretargeted cancer imaging // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2023. — Vol. 673. — P. 23–28.
85. D. S. Pellosi, L. B. Paula, M. T. de Melo, A. C. Tedesco. Targeted and synergic glioblastoma treatment: multifunctional nanoparticles delivering verteporfin as adjuvant therapy for temozolomide chemotherapy // *Molecular Pharmaceutics*. — 2019. — Vol. 16, no. 3. — P. 1009–1024.

86. K. Chen, X. Cao, M. Li, et al. A TRAIL-Delivered Lipoprotein-Bioinspired Nanovector Engineering Stem Cell-Based Platform for Inhibition of Lung Metastasis of Melanoma // *Theranostics*. — 2019. — Vol. 9, no. 10. — P. 2984–2998.
87. Y. Liang, W. Huang, D. Zeng, et al. Cancer-targeted design of bioresponsive prodrug with enhanced cellular uptake to achieve precise cancer therapy // *Drug Delivery*. — 2018. — Vol. 25, no. 1. — P. 1350–1361.
88. C. Wang, Y. Zhang, Z. Wang, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of biotinylated colchicine derivatives as potential antitumor agents // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2022. — Vol. 37, no. 1. — P. 417–426.
89. K. Ghazal, M. L. Piketty. Comment on biotin-induced thyroid stimulating hormone aberrations in the setting of immunotherapy // *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. — 2021. — Vol. 27, no. 6. — P. 1562–1563.
90. I. Mrosewski, I. Neumann, R. Switkowski. Interference of High Dose Biotin Supplementation with Thyroid Parameters in Immunoassays Utilizing the Interaction between Streptavidin and Biotin: a Case Report and Review of Current Literature // *Clinical Laboratory*. — 2019. — Vol. 65. — 2893.
91. B. Mumma, D. Diercks, R. Twerenbold, et al. Clinical risk assessment of biotin interference with a high-sensitivity cardiac troponin T assay // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. — 2020. — Vol. 58, no. 11. — P. 1931–1940.
92. Y. Lee, S. Lee, S. Jon. Biotinylated Bilirubin Nanoparticles as a Tumor Microenvironment-Responsive Drug Delivery System for Targeted Cancer Therapy // *Advanced Science*. — 2018. — Vol. 5, no. 6. — 1800017.
93. Y.-W. Won, J.-H. Kang, J.H. Kwon, et al. A Multicenter, Prospective, Observational Study to Evaluate Ethanol-Induced Symptoms in Patients Receiving Docetaxel Chemotherapy // *Cancer Research and Treatment*. — 2023. — Vol. 55m no. 4. — P. 1096–1103.
94. T. Aomori, H. Makino, M. Sekizuka, et al. Effect of Ethanol in Paclitaxel Injections on the Ethanol Concentration in Exhaled Breath // *Drugs in R&D*. — 2012. — Vol. 12. — P. 165–170.
95. H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom. Cremophor EL the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation // *European Journal of Cancer*. — 2001. — Vol. 37, no. 13. — P. 1590–1598.

96. M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, et al. Synthetic Self-Localizing Ligands That Control the Spatial Location of Proteins in Living Cells // *Journal of the American Chemical Society*. — 2013. — Vol. 135, no. 34. — P. 12684–12689.
97. M. M. Lee, Z. Gao, B. R. Peterson. Synthesis of a Fluorescent Analogue of Paclitaxel That Selectively Binds Microtubules and Sensitively Detects Efflux by P-Glycoprotein // *Angewandte Chemie International Edition*. — 2017. — Vol. 56, no. 24. — P. 6927–6931.
98. Fr. Dosio, L. H. Reddy, A. Ferrero, et al. Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl–Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation // *Bioconjugate Chemistry*. — 2010. — Vol. 21, no. 7. — P. 1349–1361.
99. R. A. Petrov, S. Yu. Maklakova, Yan A. Ivanenkov, et al. Synthesis and biological evaluation of novel mono- and bivalent ASGP-R-targeted drug-conjugates // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2018. — Vol. 28, no. 3. — P. 382–387.
100. A. Y. Lin, J. P. M. Almeida, A. Bear, et al. Gold nanoparticle delivery of modified CpG stimulates macrophages and inhibits tumor growth for enhanced immunotherapy // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8, no. 5. — e63550.
101. A. Miranda, R. Lopez-Blanco, J. Lopes-Nunes, et al. Gallic acid–triethylene glycol aptadendrimers synthesis, biophysical characterization and cellular evaluation // *Pharmaceutics*. — 2022. — Vol. 14, no. 11. — 2456.
102. T. Ouchi, E. Yamabe, K. Hara, et al. Design of attachment type of drug delivery system by complex formation of avidin with biotinyl drug model and biotinyl saccharide // *Journal of Controlled Release*. — 2004. — Vol. 94, no. 2–3. — P. 281–291.
103. J. Tian, V. J. Stella. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions II: nonpimerization degradation under neutral to basic pH conditions // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2008. — Vol. 97, no. 8. — P. 3100–3108.
104. A. M. Bodratti, P. Alexandridis. Formulation of poloxamers for drug delivery // *Journal of Functional Biomaterials*. — 2018. — Vol. 9, no. 1. — 11.
105. M. Wang, J. Bai, K. Shao, et al. Poly(vinyl alcohol) hydrogels: the old and new functional materials // *International Journal of Polymer Science*. — 2021. — Vol. 2021. — 225426.
106. N. Bonelli, G. Poggi, D. Chelazzi, et al. Poly(vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone) hydrogels for the cleaning of art // *Journal of Colloid and Interface Science*. — 2019. — Vol. 536, no. 15. — P. 339–348.

107. Y. Chen, J. Li, J. Lu, et al. Synthesis and properties of Poly(vinyl alcohol) hydrogels with high strength and toughness // *Polymer Testing*. — 2022. — Vol. 108. — 107516.
108. M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems // *Pharmaceutics*. — 2018. — Vol. 10, no. 2. — 57.
109. M. Ikeda-Imafuku, L. L. Wang, D. Rodrigues, et al. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation // *Journal of Controlled Release*. — 2022. — Vol. 345, — P. 512–536.
110. H. P. Lesch, M. U. Kaikkonen, J. T. Pikkarainen, S. Ylä-Herttuala. Avidin-biotin technology in targeted therapy // *Expert Opinion on Drug Delivery*. — 2010. — Vol. 7, no. 5. — P. 551–564.
111. O. O. Maksimenko, J. Malinovskaya, E. Shipulo, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development // *International Journal of Pharmaceutics*. — 2019. — Vol. 572. — 118733.
112. J. Li, Yu. Hou, H. Wu, et al. A poly (vinyl alcohol) coated core-shell nanoparticle with a tunable surface for pH and glutathione dual-responsive drug delivery // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2025. — Vol. 247. — 114421.
113. G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan. Preliminary studies on the selective accumulation of vitamin-targeted polymers within tumors // *Journal of Drug Targeting*. — 2011. — Vol. 19, no. 2. — P. 133–139.
114. H. Li, G. Bruce, N. Childerhouse, et al. Biotin receptor-mediated intracellular delivery of synthetic polypeptide-protein complexes // *Journal of Controlled Release*. — 2023. — Vol. 357. — P. 333–341.
115. H. Takeuchi, H. Kojima, H. Yamamoto, Y. Kawashima. Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats // *Journal of Controlled Release*. — 2001. — Vol. 75, no. 1–2. — P. 83–91.
116. E. Gerasimovich, I. Kriukova, V. V. Shishkov, et al. Interaction of Serum and Plasma Proteins with Polyelectrolyte Microparticles with Core/Shell and Shell-Only Structures // *ACS Omega*. — 2024. — Vol. 9, no. 27. — P. 29739–29750.
117. A. G. Abdelfattah, S. Bansal, J. A. Quaye, et al. Thioether Oxidation Chemistry in Reactive Oxygen Species (ROS)-Sensitive Trigger Design: A Kinetic Analysis // *Organic Letters*. — 2025. — Vol. 27, no. 12. — P. 3071–3076.

118. M. Criado-Gonzalez, D. Mecerreyes. Thioether-based ROS responsive polymers for biomedical applications // *Journal of Materials Chemistry B*. — 2022. — Vol. 10, no. 37. — P. 7206–7221.
119. Y.-S. Kim, S. Kim, H. C. Kang, M. S. Shim. ROS-responsive thioether-based nanocarriers for efficient pro-oxidant cancer therapy // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. — 2019. — Vol. 75. — P. 238–245.
120. R. De Luca, L. Blasi, Ma. Alù, et al. Clinical efficacy of nab-paclitaxel in patients with metastatic pancreatic cancer // *Drug Design, Development and Therapy*. — 2018. — Vol. 12. — P. 1769–1775.
121. A. El Khoury, P. M. Seidler, D. S. Eisenberg, P. G. Harran. Catalytic Synthesis of PEGylated EGCG Conjugates that Disaggregate Alzheimer's Tau // *Synthesis*. — 2021. — Vol. 53, no. 22. — P. 4263–4271.
122. E. Klein, S. DeBonis, B. Thiede, et al. New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2007. — Vol. 15, no. 19. — P. 6474–6488.
123. L. Ma, C. Tu, P. Le, et al. Multidentate Polymer Coatings for Compact and Homogeneous Quantum Dots with Efficient Bioconjugation // *Journal of the American Chemical Society*. — 2016. — Vol. 138, no. 10. — P. 3382–3394.
124. K. El-Boubbou, D. C. Zhu, C. Vasileiou, et al. Magnetic Glyco-Nanoparticles: A Tool To Detect, Differentiate, and Unlock the Glyco-Codes of Cancer via Magnetic Resonance Imaging // *Journal of the American Chemical Society*. — 2010. — Vol. 132, no. 12. — P. 4490–4499.
125. R. Safavi-Sohi, S. Maghari, M. Raoufi, et al. Bypassing Protein Corona Issue on Active Targeting: Zwitterionic Coatings Dictate Specific Interactions of Targeting Moieties and Cell Receptors // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2016. — Vol. 8, no. 35. — P. 22808–22818.
126. D.-Z. Liu, S. Sinchaikul, P. V. G. Reddy, et al. Synthesis of 2'-paclitaxel methyl 2-glucopyranosyl succinate for specific targeted delivery to cancer cells // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2007. — Vol. 17, no. 3. — P. 617–620.
127. J. Li, Y. Gao, Yi Kuang, et al. Dephosphorylation of d-Peptide Derivatives to Form Biofunctional, Supramolecular Nanofibers/Hydrogels and Their Potential Applications for

Intracellular Imaging and Intratumoral Chemotherapy // *Journal of the American Chemical Society*. — 2013. — Vol. 135, no. 26. — P. 9907–9914.

128. S. Kanwal, M. Naveed, A. Arshad, et al. Reduction-Sensitive Dextran–Paclitaxel Polymer–Drug Conjugate: Synthesis, Self-Assembly into Nanoparticles, and In Vitro Anticancer Efficacy // *Bioconjugate Chemistry*. — 2021. — Vol. 32, no. 12. — P. 2516–2529.

129. R. C. Brewster, G. C. Gavins, B. Günthardt, et al. Chloromethyl-triazole: a new motif for site-selective pseudo-acylation of proteins // *Chemical Communications*. — 2016. — Vol. 52, no. 82. — P. 12230–12232.

130. M. Skander, N. Humbert, J. Collot, et al. Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium–Diphosphine Complexes // *Journal of the American Chemical Society*. — 2004. — Vol. 126, no. 44. — P. 14411–14418.

131. D.-m. Tian, J. Qiao, Yu-zh. Bao, et al. Design and synthesis of biotinylated cardiac glycosides for probing Nur77 protein inducing pathway // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2019. — Vol. 29, no. 5. — P. 707–712.

132. Y. Sheng, Y. Chen, Zh. Zeng, et al. Identification of Pyruvate Carboxylase as the Cellular Target of Natural Bibenzyls with Potent Anticancer Activity against Hepatocellular Carcinoma via Metabolic Reprogramming // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2022. — Vol. 65, no. 1. — P. 460–484.

133. F. Ishikawa, R. W. Haushalter, M. D. Burkart. Dehydratase-Specific Probes for Fatty Acid and Polyketide Synthases // *Journal of the American Chemical Society*. — 2012. — Vol. 134, no. 2. — P. 769–772.

134. H. G. McGhee, R. Totani, O. Plekan, et al. Core and valence photoelectron spectroscopy of a series of substituted disulfides // *The Journal of Chemical Physics*. — 2024. — Vol. 161, no. 13. — 134303.

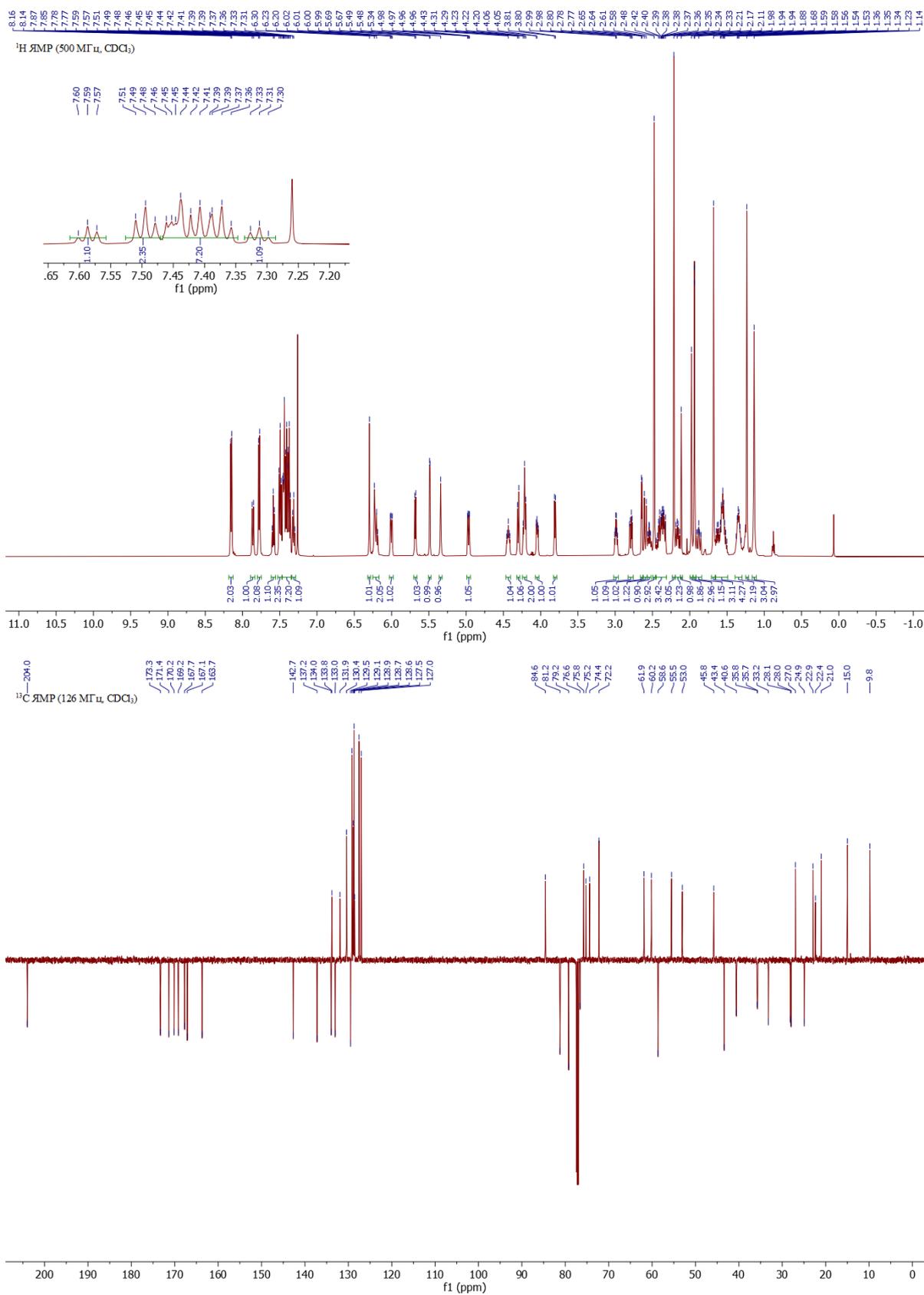
135. Y. Wang, D. Liu, Q. Zheng, et al. Disulfide Bond Bridge Insertion Turns Hydrophobic Anticancer Prodrugs into Self-Assembled Nanomedicines // *Nano Letters*. — 2014. — Vol. 14, no. 10. — P. 5577–5583.

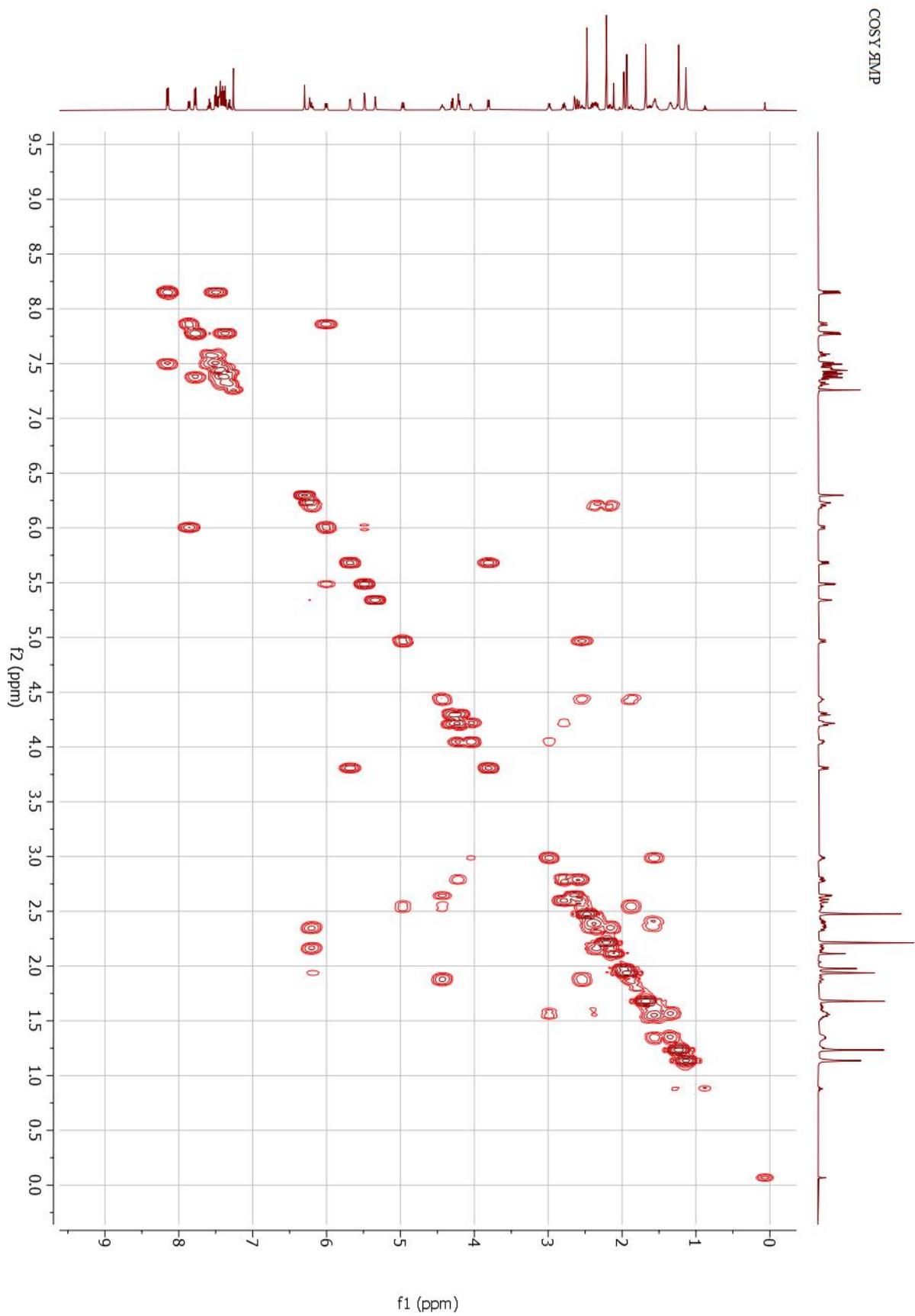
136. A. C. P. da Silva, C. F. de Freitas, C. A. E. F. Cardinali, et al. Biotin-functionalized silica nanoparticles loaded with Erythrosine B as selective photodynamic treatment for Glioblastoma Multiforme // *Journal of Molecular Liquids*. — 2022. — Vol. 345. — 117898.

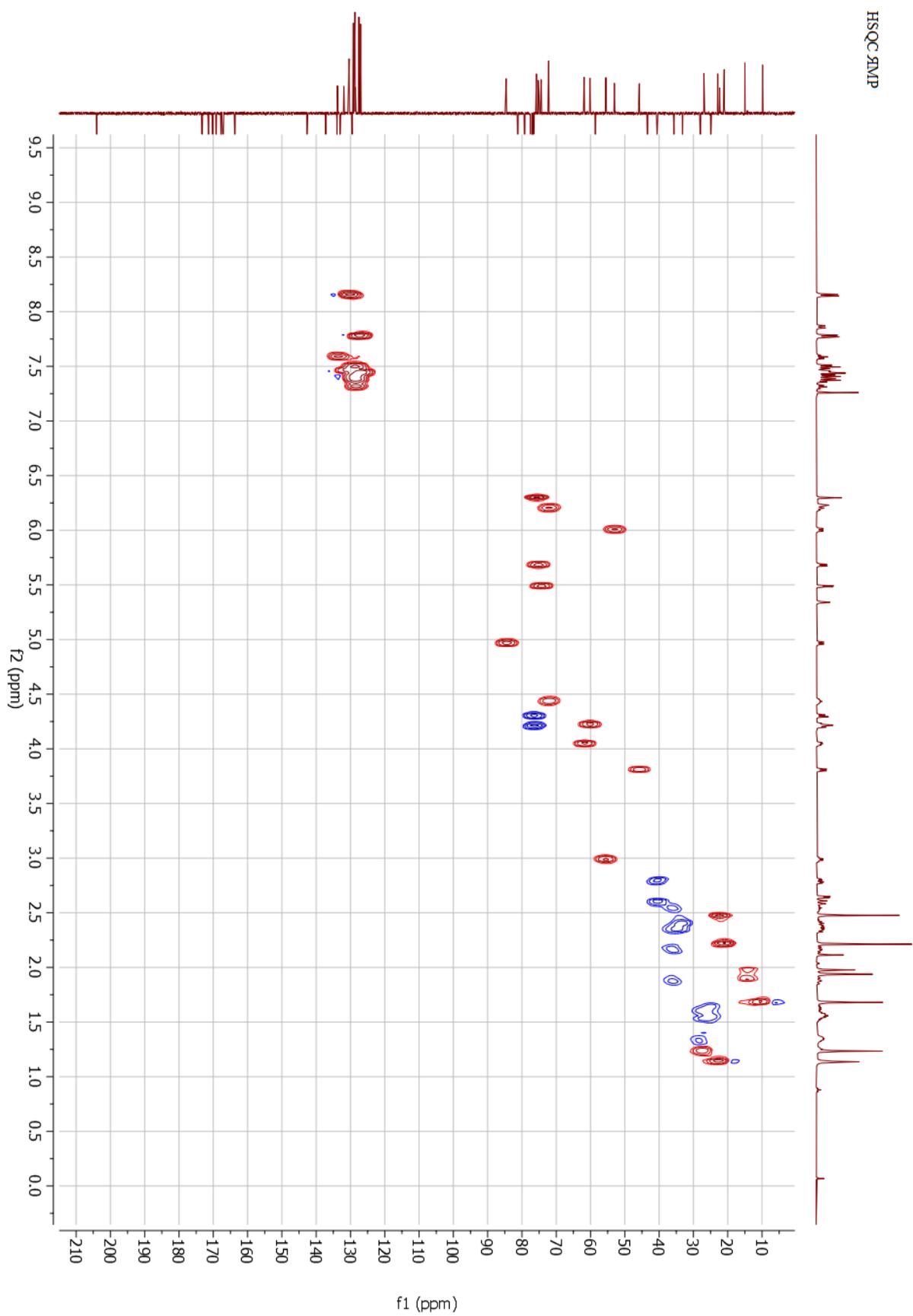
137. J. Garcia, Y. Zhang, H. Taylor, et al. Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors // *Nanoscale*. — 2011. — Vol. 3, no. 9. — 3721–3730.
138. K. Qi, Q. Ma, E. E. Remsen, et al. Determination of the Bioavailability of Biotin Conjugated onto Shell Cross-Linked (SCK) Nanoparticles // *Journal of the American Chemical Society*. — 2004. — Vol. 126, no. 21. — P. 6599–6607.
139. D. P. Joshi, Y. L. Lan-Chun-Fung, J. G. Pritchard. Determination of poly(vinyl alcohol) via its complex with boric acid and iodine // *Analytica Chimica Acta*. — 1979. — Vol. 104, no. 1. — P. 153–160.
140. L. Procházková, Y. Rodríguez-Muñoz, J. Procházka, J. Wanner. Simple spectrophotometric method for determination of polyvinylalcohol in different types of wastewater // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. — 2014. — Vol. 94, no. 4. — P. 399–410.
141. M. M. Antonova, S. Sh. Karshieva, A. A. Nikitin, et al. Colloidal formulations of etoposide based on self-assembling oleyl-hyaluronan-based structures: Optimization of technology and in vitro analysis // *Nano-Structures & Nano-Objects*. — 2025. — Vol. 41. — 101443.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

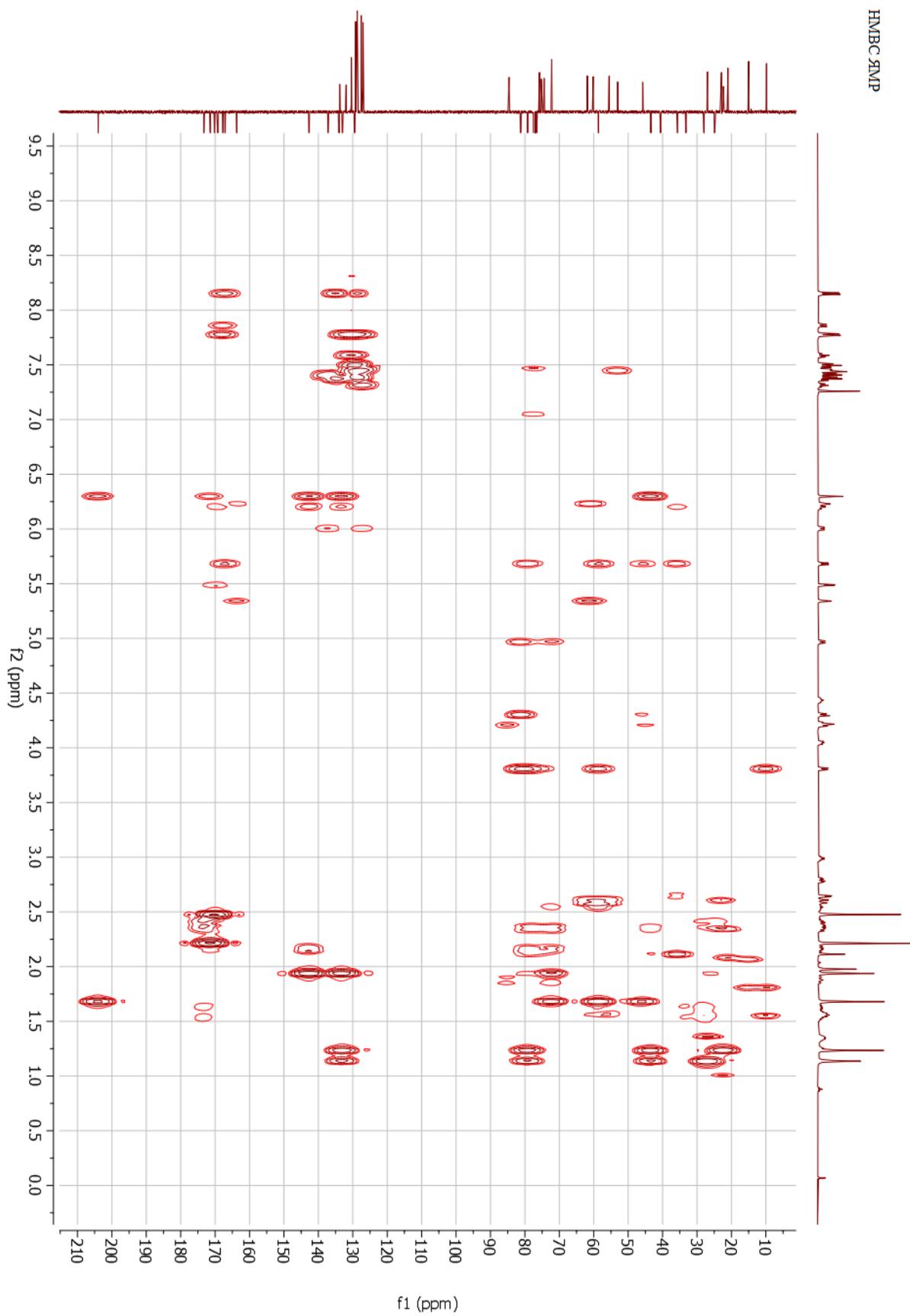
## Конъюгат 1



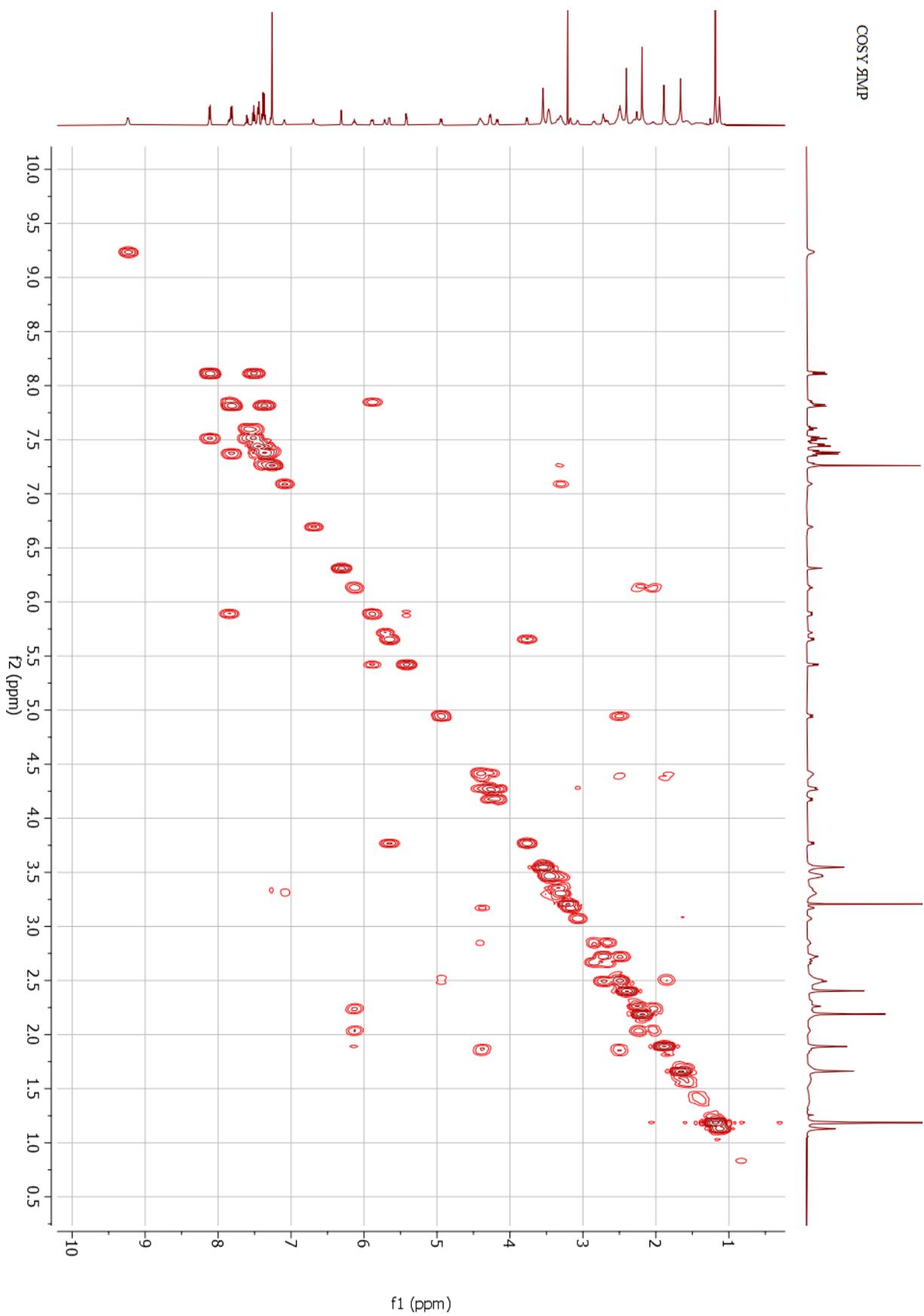


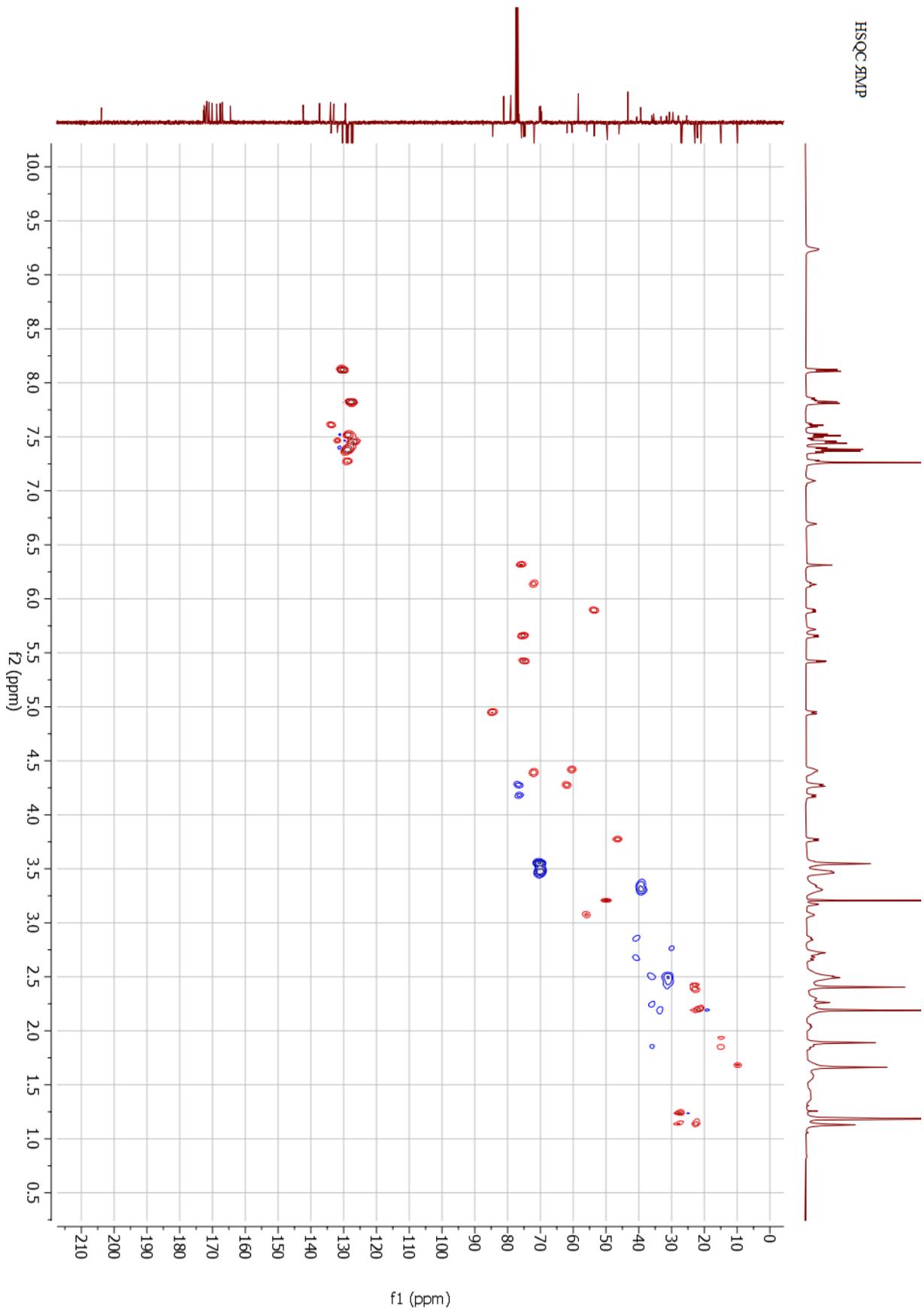


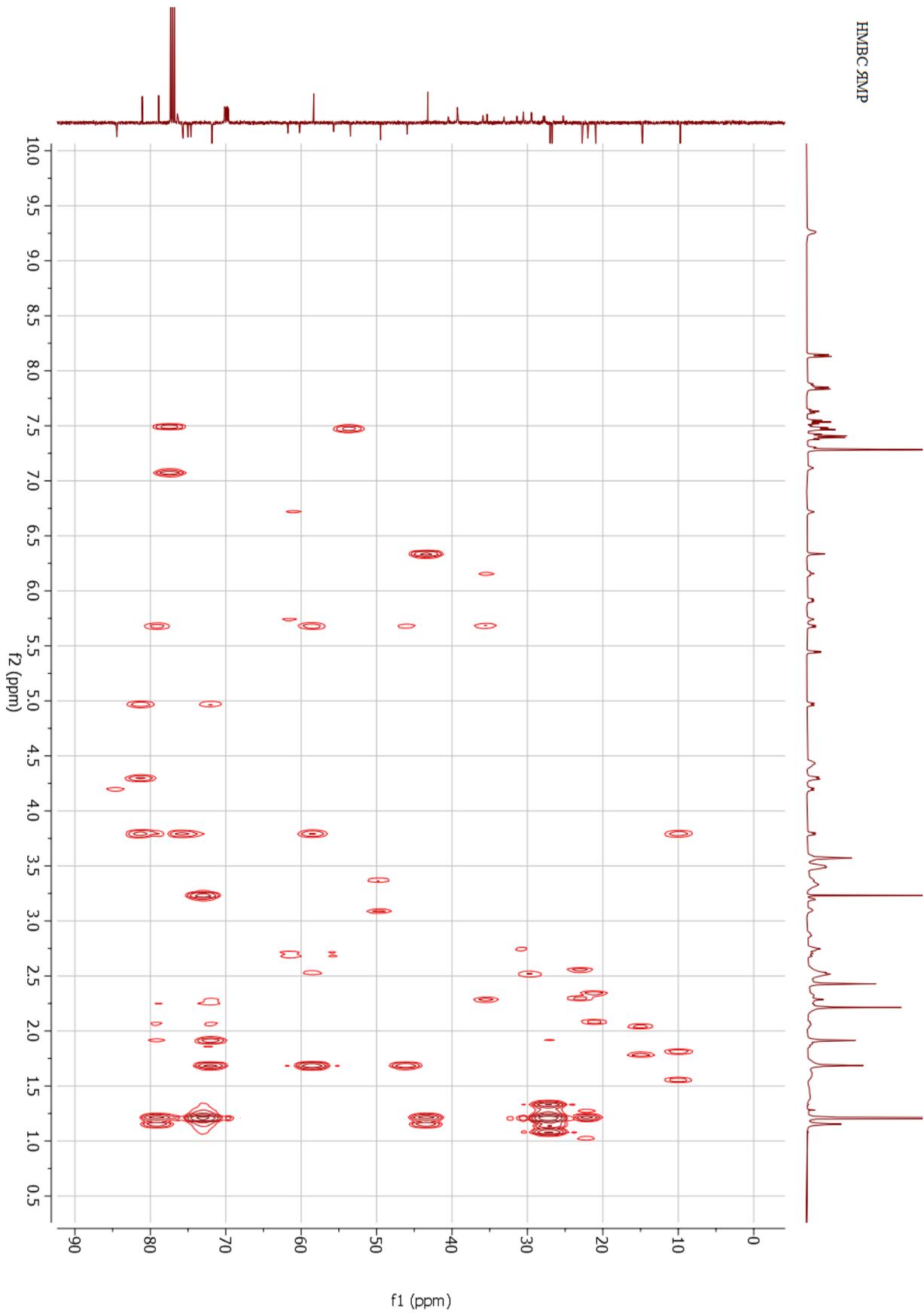
HMBC 2MMP



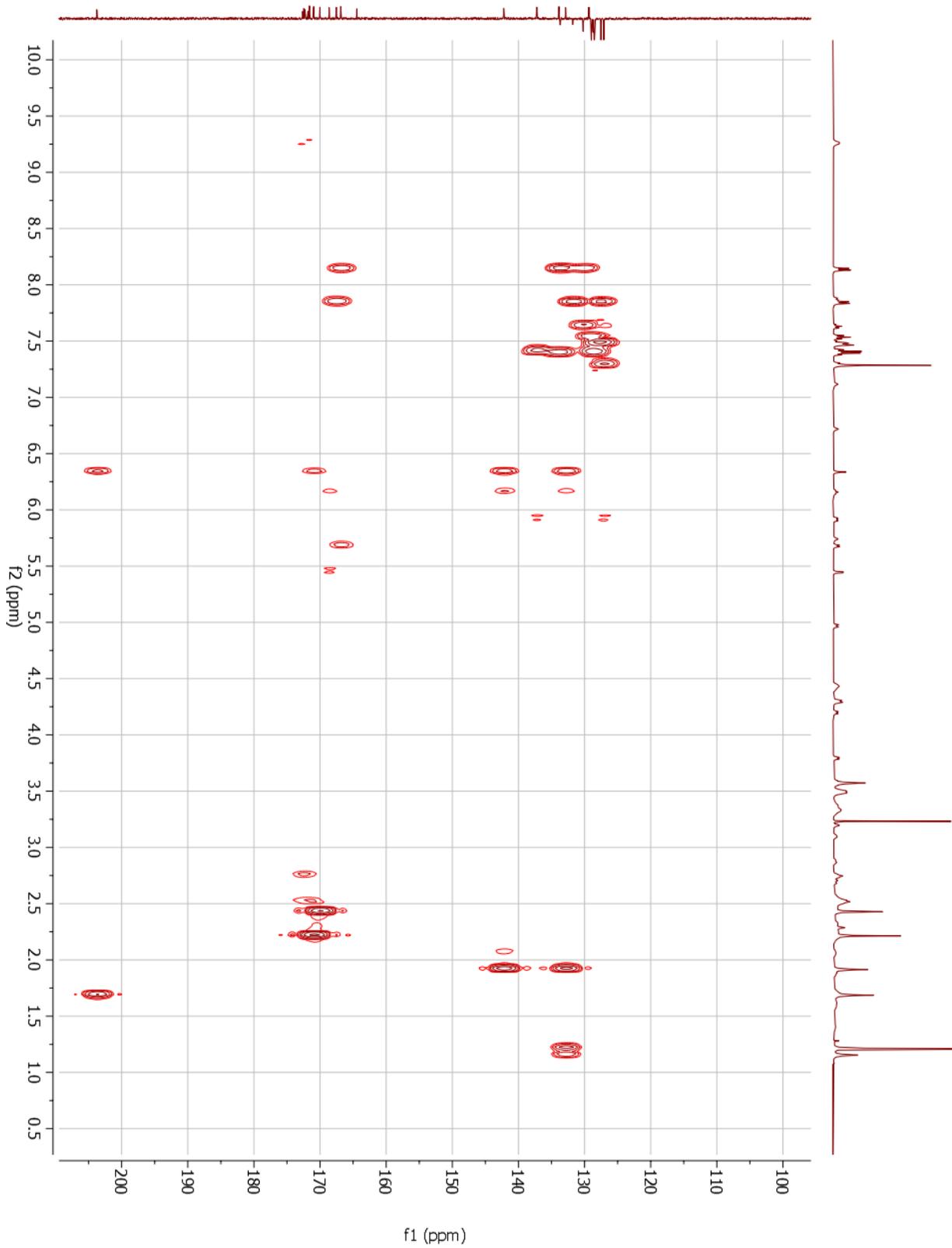




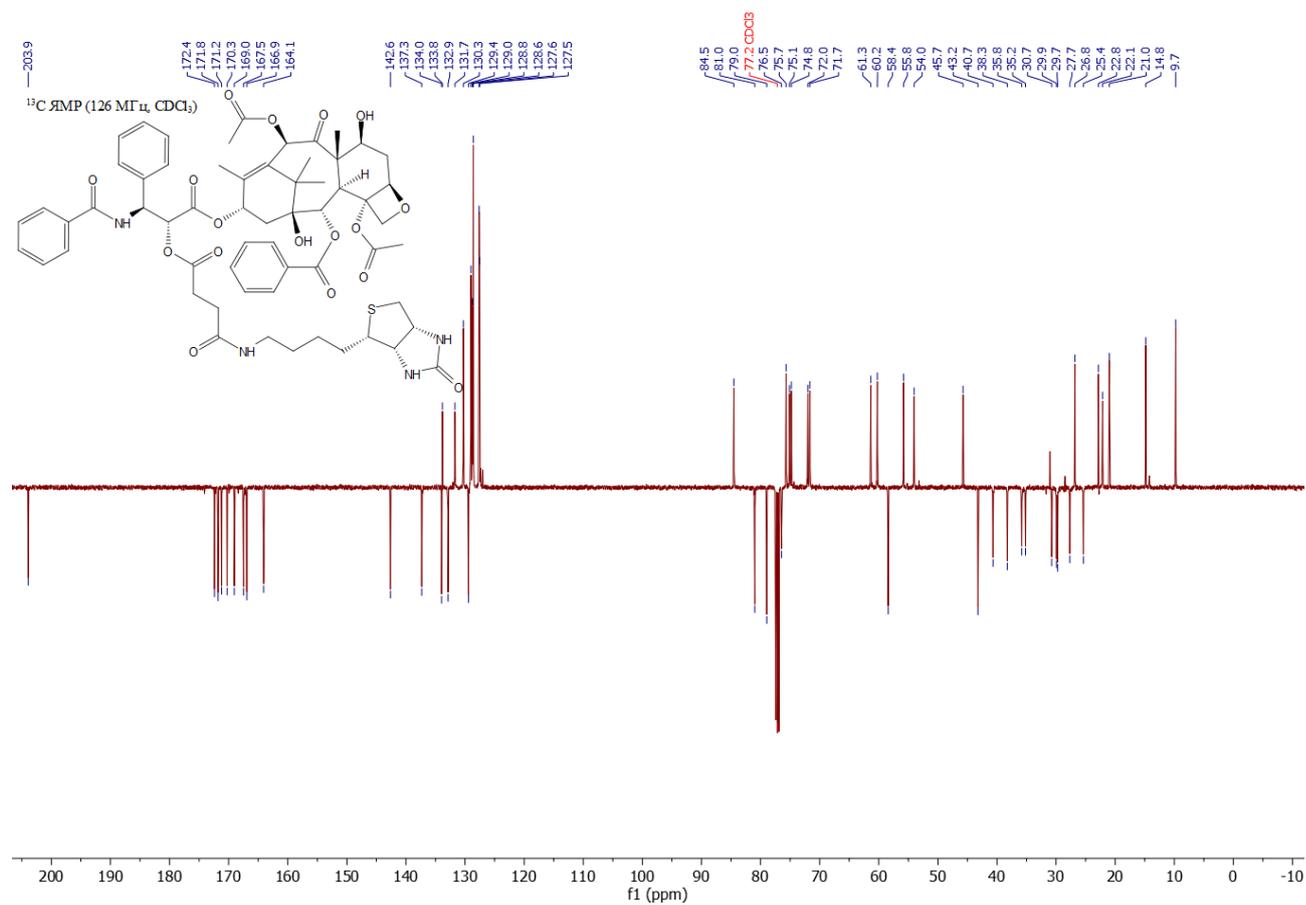
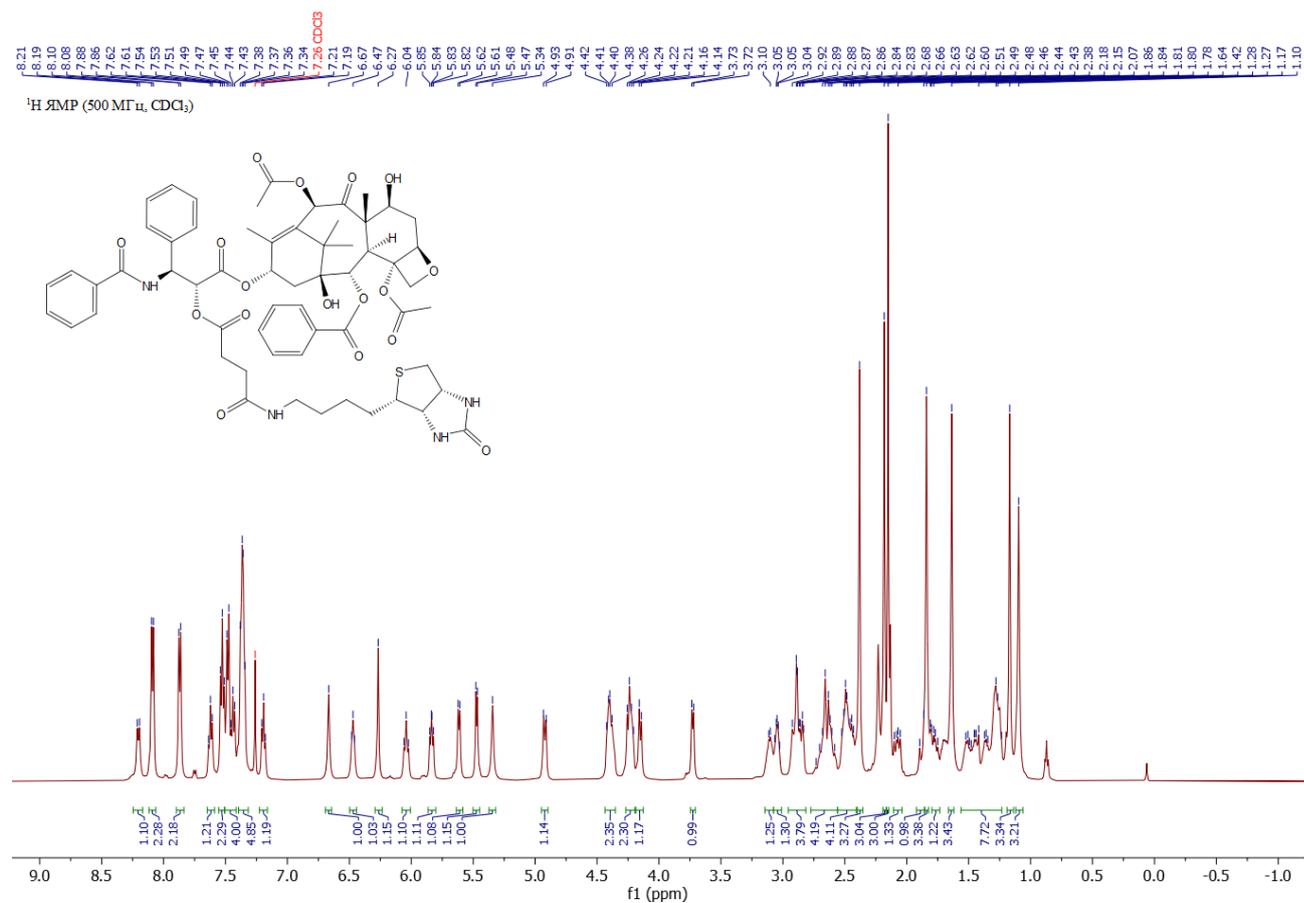


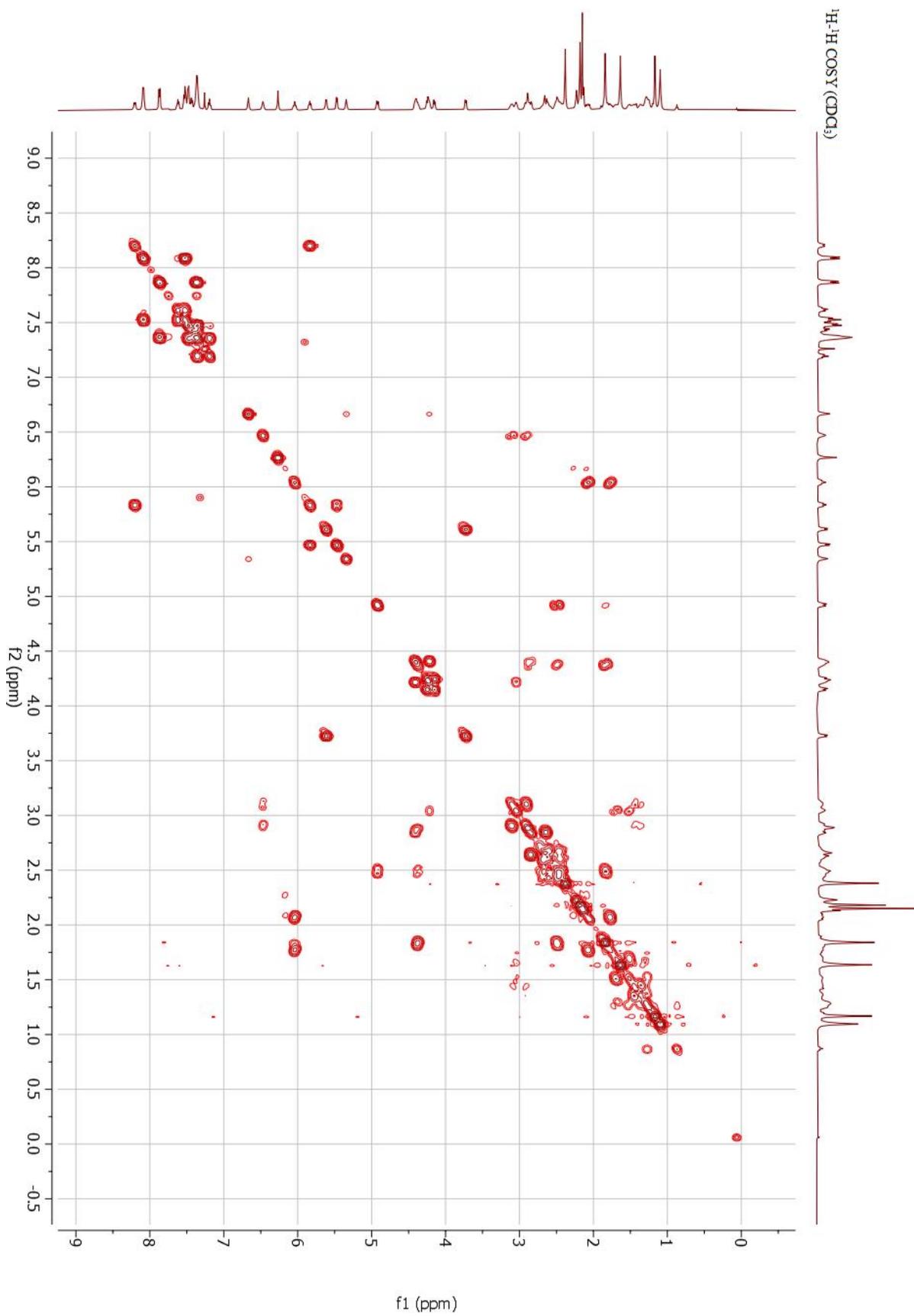


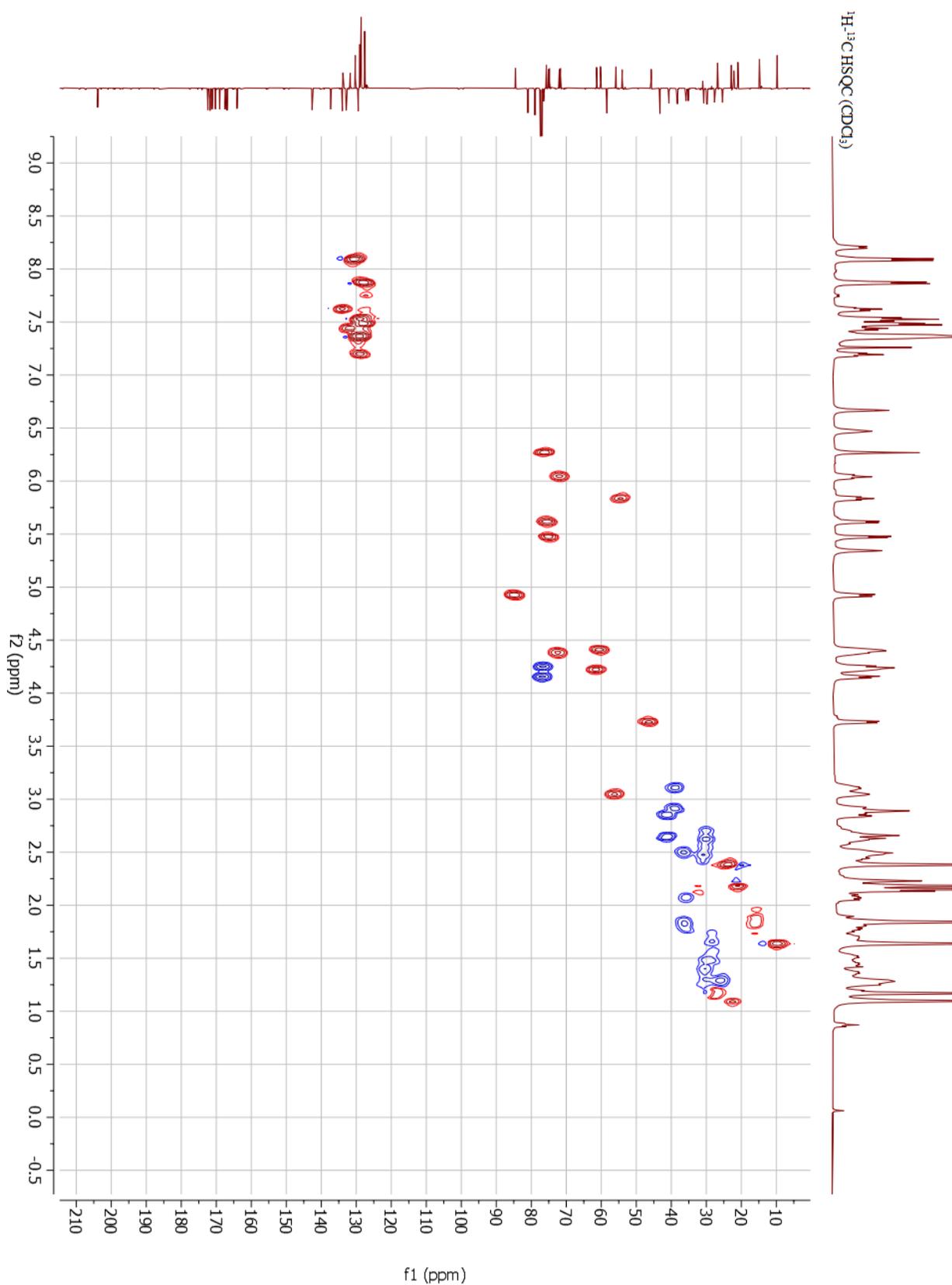
HMBC 2MP

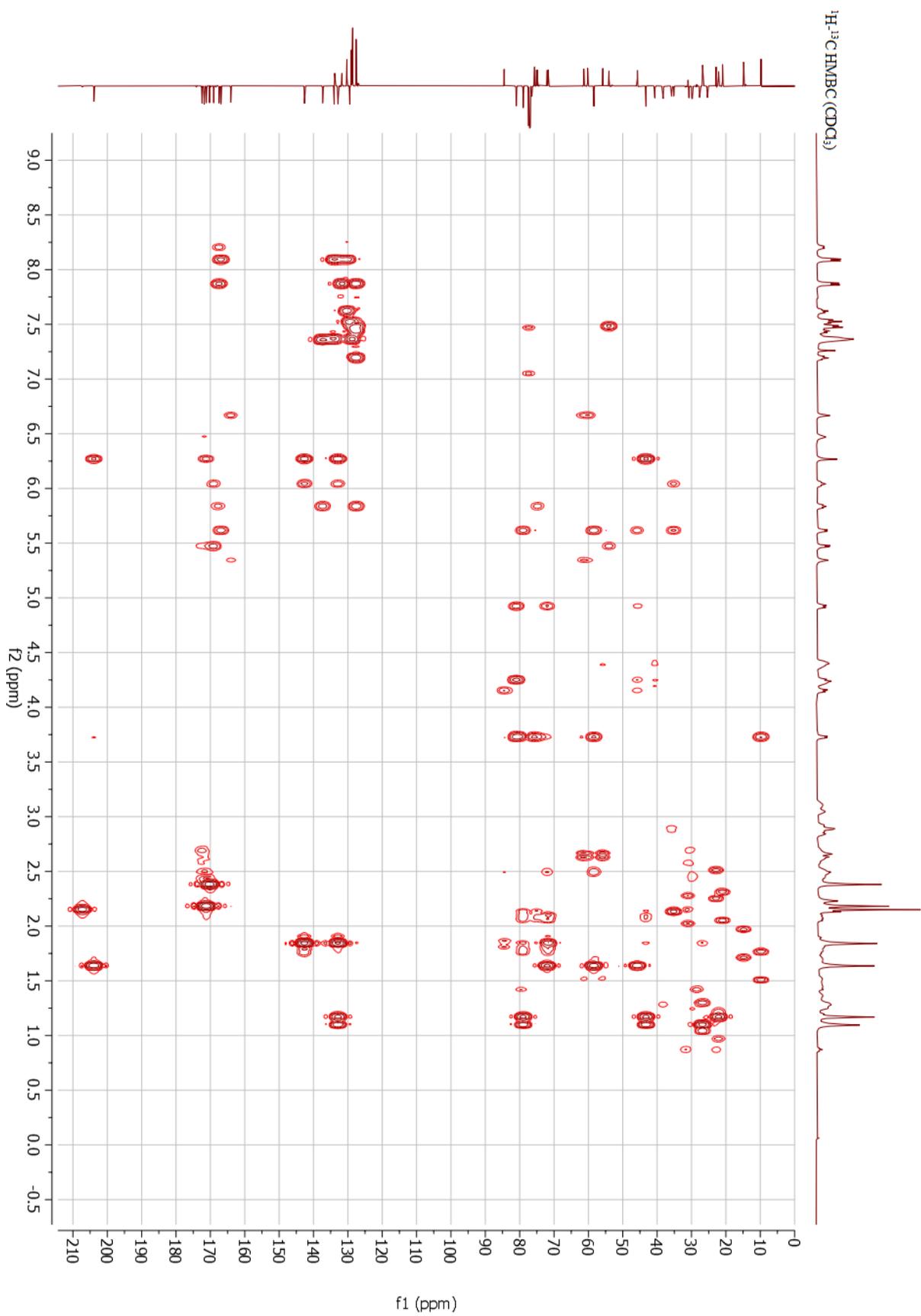


## Конъюгат 3

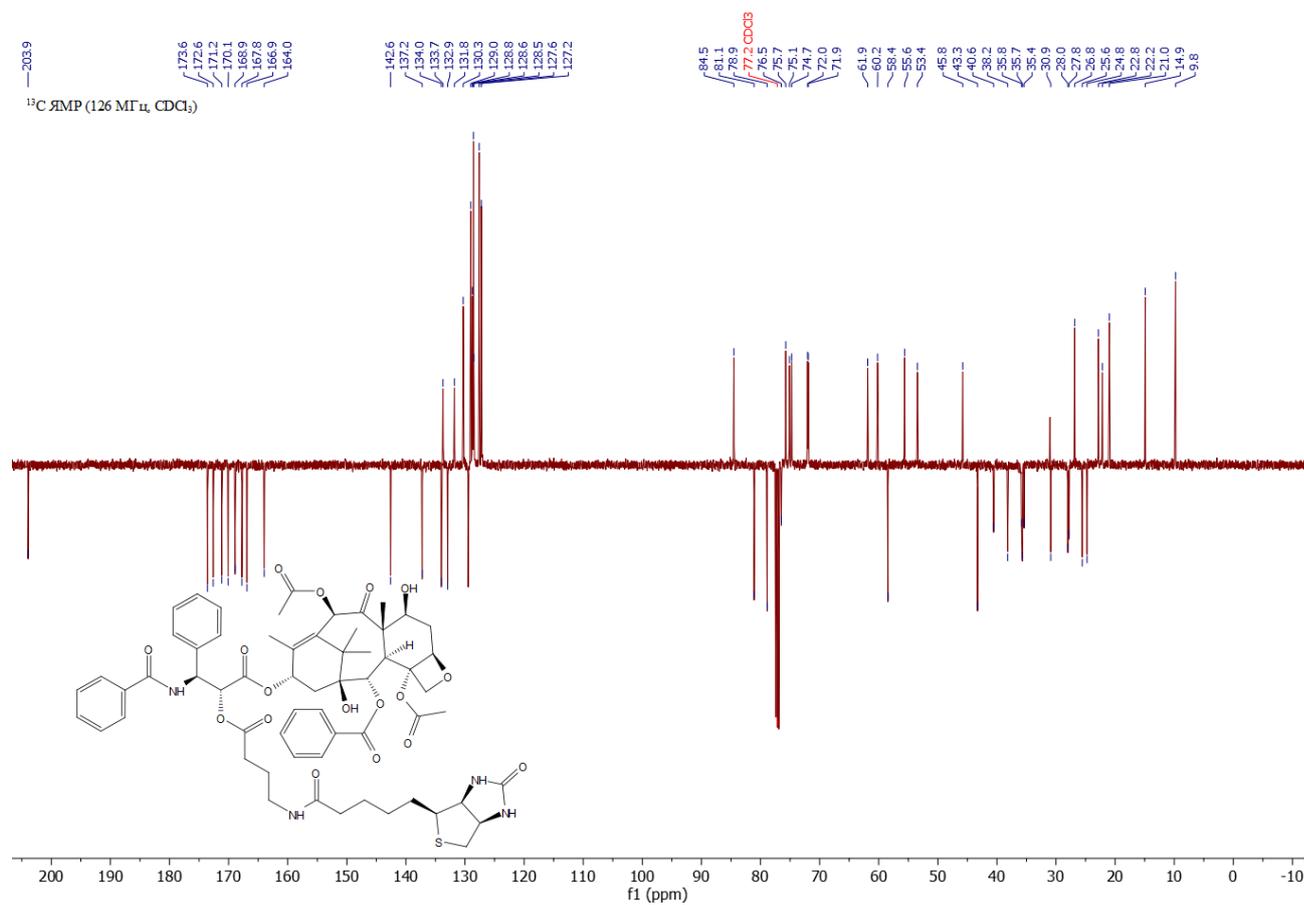
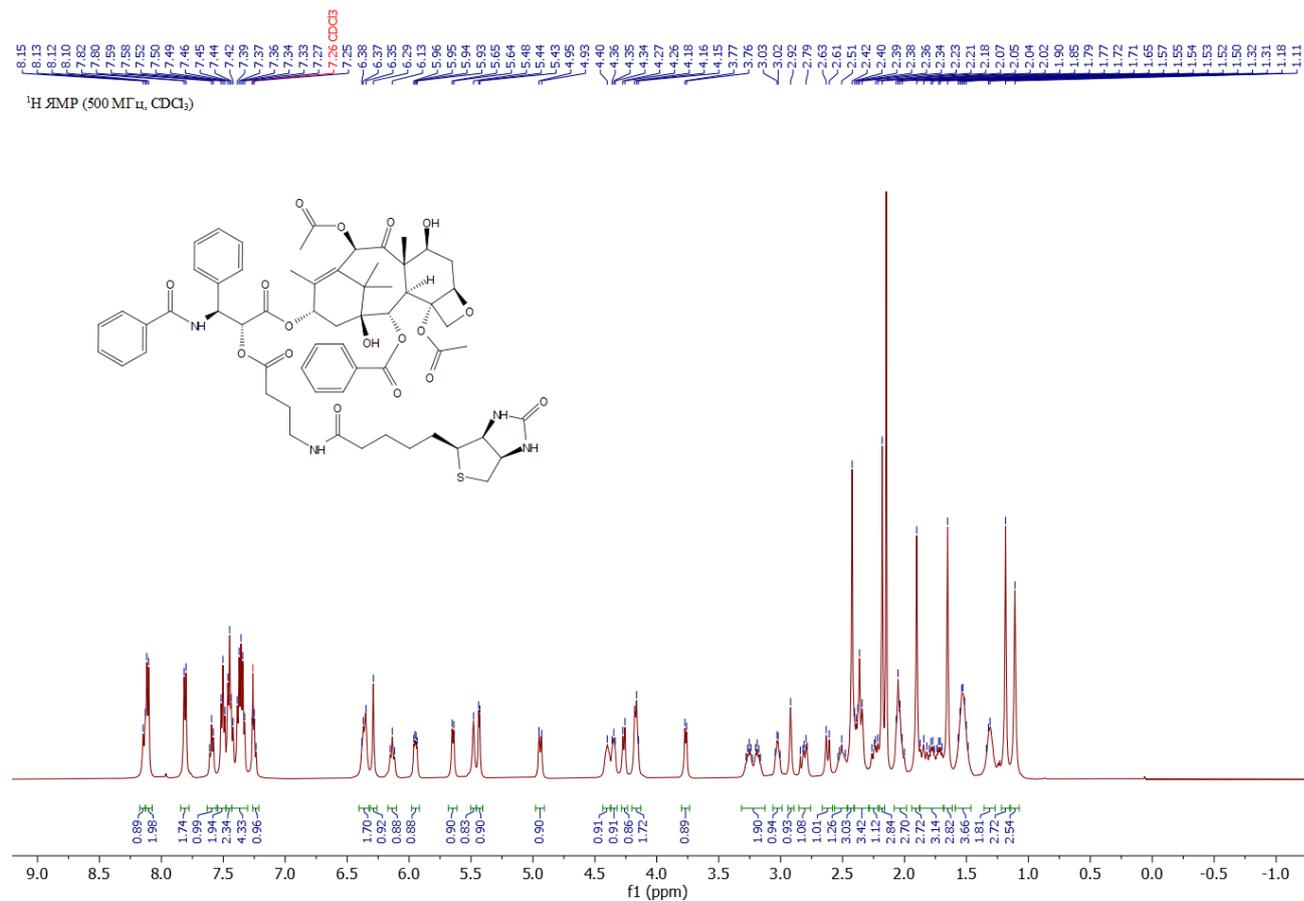


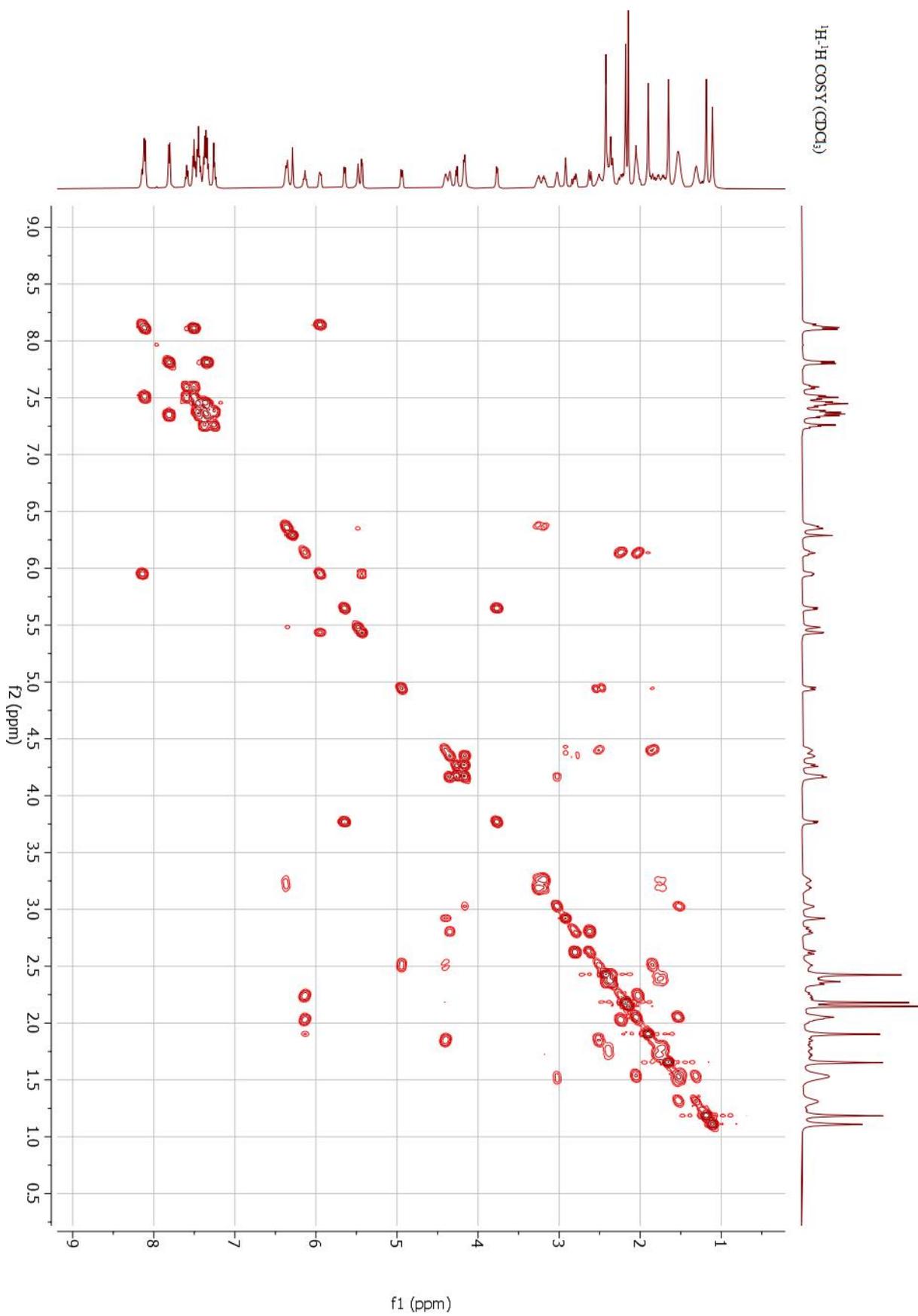


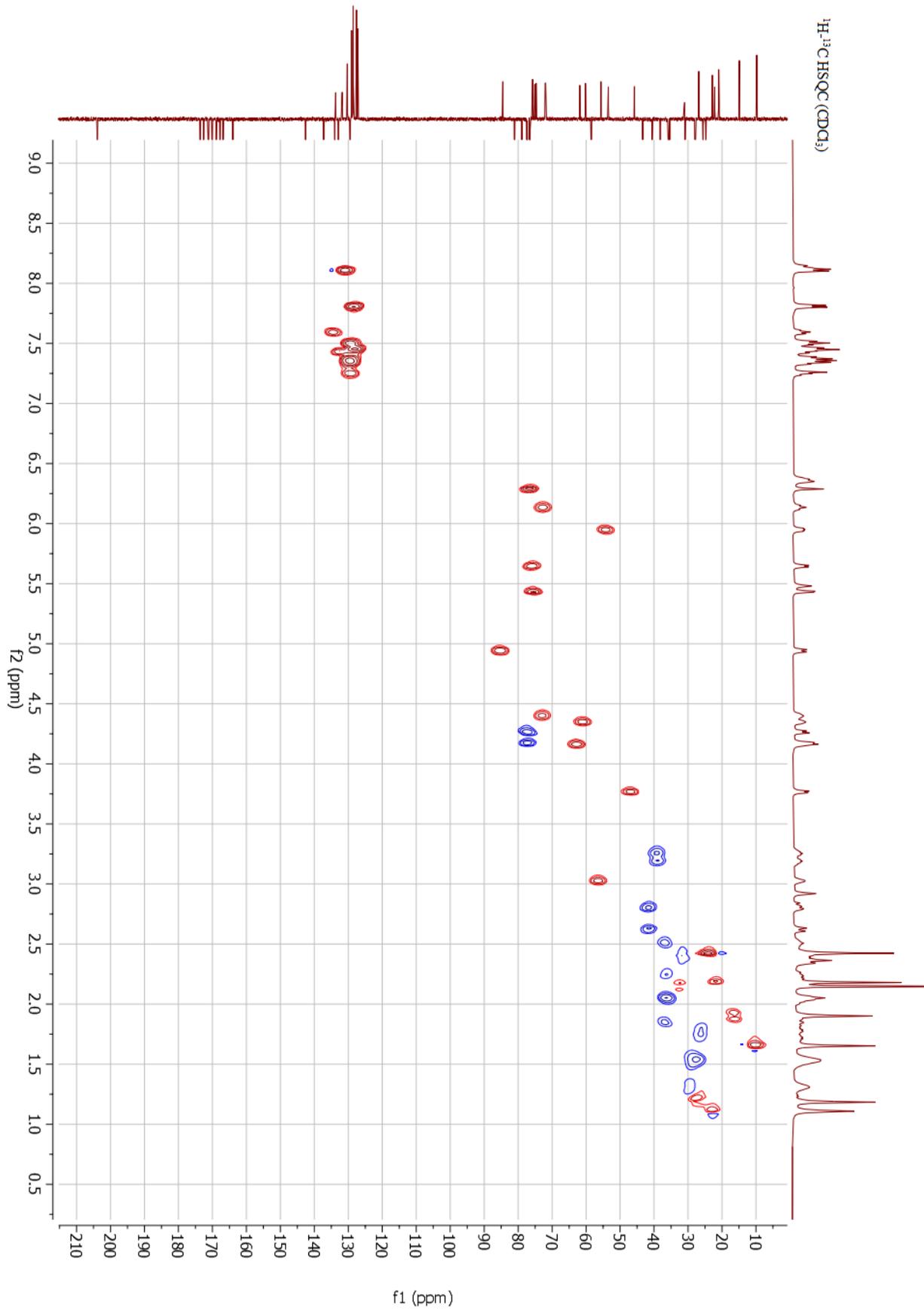


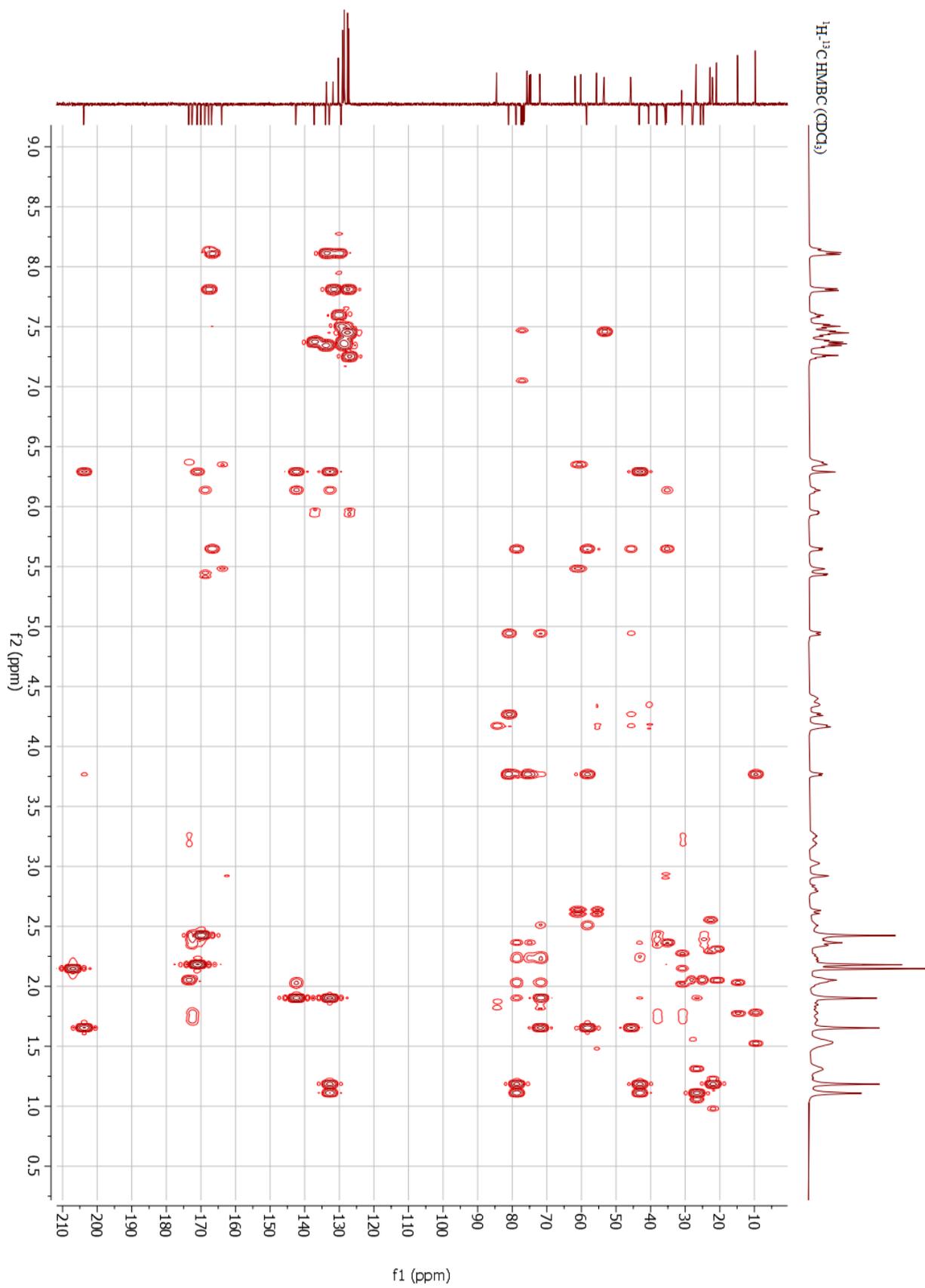


## Конъюгат 4









## Конъюгат 5

