

СИНТЕЗ И ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТА АТОРВАСТАТИНА С ЛИГАНДОМ АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИНОВОГО РЕЦЕПТОРА РАЗВЕТВЛЕННОГО СТРОЕНИЯ С 3 ОСТАТКАМИ *N*-АЦЕТИЛ-*D*-ГАЛАКТОЗАМИНА

© 2023 г. С. Ю. Маклакова^{а, *}, М. П. Мажуга^а, А. В. Лопухов^а, К. Р. Гибадуллина^а,
Н. Л. Клячко^а, А. Г. Мажуга^{а, b}, Е. К. Белоглазкина^а

^а ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

^б ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»,
Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

*e-mail: MaklakovaSU@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022 г.

После доработки 10.04.2022 г.

Принята к публикации 13.04.2022 г.

Впервые получен конъюгат аторвастатина и лиганда асиалогликопротеинового рецептора с 3 остатками *N*-ацетилгалактозамина. Для синтезированного конъюгата измерена концентрация в насыщенном водном растворе, которая составила 6.1 ± 0.9 мМ, что почти в 60 раз превосходит данный показатель для немодифицированного аторвастатина. Продукты гидролиза полученного соединения проявили высокую ингибирующую способность в отношении целевого фермента редуктазы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А.

Ключевые слова: аторвастатин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин, направленный транспорт лекарственных препаратов, асиалогликопротеиновый рецептор

DOI: 10.31857/S0514749223020076, **EDN:** QJQFIG

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают ведущую позицию среди причин смертности и утраты трудоспособности населения в развитых странах мира. Наиболее действенный подход к профилактике и лечению ССЗ в настоящее время – борьба с основными факторами риска: гипертонией, курением, малоподвижным образом жизни и, особенно, гиперлипидемией. Основным класс лекарственных препаратов для лечения гиперлипидемии сегодня – статины – ингибиторы редуктазы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А (ГМГ-КоА-редуктазы), ключевого фермента синтеза эндогенного холестерина в печени. За несколько по-

следних десятилетий было показано достоверное влияние статинов на снижение общей смертности независимо от пола, возраста, исходного уровня холестерина [1]. Невзирая на положительный терапевтический эффект препаратов данного класса, нельзя не упомянуть о серьезных, хотя и достаточно редких побочных эффектах (миалгия, головная боль, боли в животе, бессонница и т.д.) [2, 3].

Точные причины проявления побочных эффектов остаются неустановленными, но существует мнение [4], что они связаны со способностью статинов неспецифически проникать и накапливаться в нецелевых типах клеток. Высказано предположение о том, что неселективное прохождение

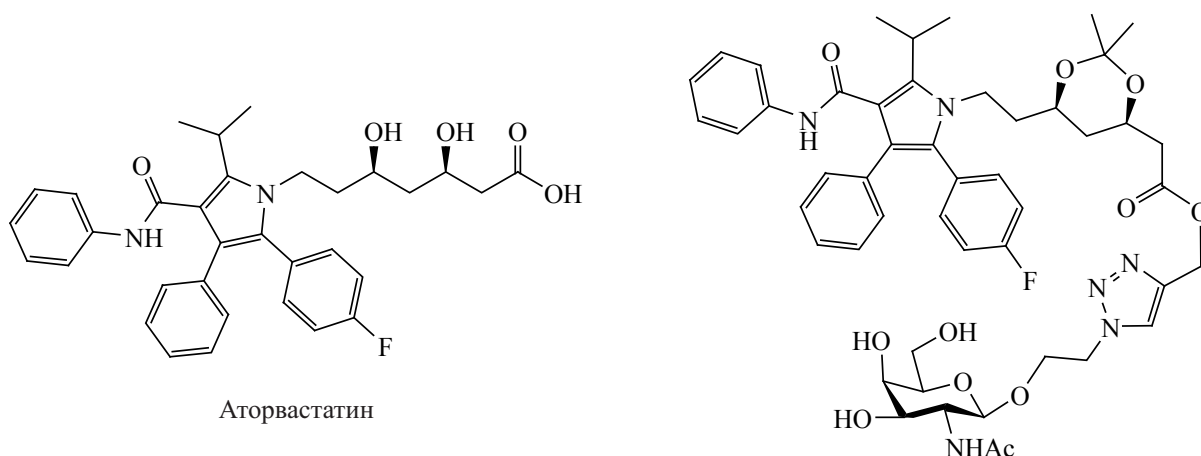


Рис. 1. Структуры аторвастатина и его конъюгата с *N*-ацетилгалактозамином

через клеточные мембраны связано с высокой липофильностью данного класса препаратов [5], что согласуется с тем фактом, что более водорастворимые статины (например, розувастатин) приводят к меньшим негативным последствиям для организма [3, 4]. Таким образом, одной из стратегий снижения вероятности развития побочных эффектов статинов может быть увеличение их гидрофильности и, как следствие, повышение гепатоселективности.

Аторвастатин (рис. 1) выступает наиболее часто назначаемым препаратом из класса статинов. Для аторвастатина характерны все недостатки, отмеченные выше, а также низкая биодоступность (12% при пероральном введении) и плохая растворимость в воде. Описано [6] производное аторвастатина (рис. 1), соединенное в результате медь(I)-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) с *N*-ацетилгалактозамином (GalNAc). Было показано, что данное пролекарство аторвастатина способно высвобождать действующее вещество в активной форме как в растворах, имитирующих физиологические условия, так и в живых клетках. Известно, что соединения, содержащие в своем составе терминальные остатки галактозы или *N*-ацетилгалактозамина, селективно и эффективно связываются с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR) – белком, в больших количествах представленным на поверхности гепатоцитов и минимально на внепеченочных типах клеток [7]. Биологическая роль ASGPR заключается в реализации рецептор-опосредованного эндцитоза десиазированных гликопротеинов и ряда других соединений, циркулирующих в кровотоке.

Таким образом, можно ожидать, что аторвастатин, модифицированный остатками GalNAc, проявит повышенную гепатоселективность благодаря своей способности связываться с ASGPR.

В то же время проведенные нами с помощью программы ChemDraw расчеты параметра $\log P$ (логарифм коэффициента распределения в двухфазной системе *n*-октанол–вода) свидетельствуют о том, что синтезированный конъюгат аторвастатина с *N*-ацетилгалактозамином [6] должен быть более липофильным, чем исходный аторвастатин, даже невзирая на то, что в его состав входит углеводный фрагмент. Расчетные значения $\log P$ составили 4.46 и 4.89 для аторвастатина и конъюгата, соответственно. Наличие в структуре молекулы аторвастатина гидрофобных ароматических и алифатических участков способствует неспецифическому связыванию с белками плазмы. Продемонстрировано [8], что в комплексе с альбумином аторвастатин оказывается окруженным большим количеством гидрофобных аминокислотных остатков (Trp-213, Tyr-340, Tyr-451, Ala-341, Val-342, Leu-454, Pro-446). Кроме того, было продемонстрировано неспецифическое связывание аторвастатина в фосфолипидном бислое мембраны клеток, что может приводить к накоплению препарата в нецелевых тканях и органах [9]. Таким образом, повышенная липофильность конъюгата может негативно повлиять на гепатоселективность и биодоступность соединения, привести к усиленному связыванию с белками крови. Ранее было показано, что лиганды ASGPR с 2 и более углеводными остатками имеют значительно более высокое

средство к рецептору благодаря кооперативному эффекту [10]. В связи с этим целью данного исследования стало совершенствование дизайна конъюгата аторвастатина и *N*-ацетилгалактозамина для получения препарата с высокой растворимостью в воде, способного селективно проникать в гепатоциты и после гидролиза оказывать требуемый биологический эффект.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности гепатоцитов асиалогликопротеиновый рецептор в основном представлен в виде тримера и состоит из 3 близко расположенных субъединиц, каждая из которых содержит углевод-распознающий домен, способный связывать фрагмент галактозы или *N*-ацетилгалактозамина. Благодаря этому особо высоким средством к ASGPR обладают соединения разветвленного строения с несколькими терминальными остатками данных углеводов [10]. Для синтеза целевого конъюгата нами был выбран один из таких разветвленных лигандов, который для последующего соединения с аторвастатином модифицировали азидной группой. Общая последовательность синтеза лиганда представлена на схеме 1. Амин **1** [11] ацилировали бромуксусной кислотой в присутствии EDC [*N*-этил-*N'*-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид], после чего проводили нуклеофильное замещение брома на азидную группу с последующим сольволизом *трет*-бутилового эфира **3** в муравьиной кислоте. Из соединения **4** под действием активирующих агентов получали NHS-эфир **4**, который вводили в реакцию с производным *N*-ацетилгалактозамина, полученным по методике [12]. Удаление ацильных групп проводили сольволизом в основной среде. В результате впервые было выделено в индивидуальном виде и охарактеризовано полным набором физико-химических методов анализа целевое соединение **7**.

Для соединения с азидом **7** посредством CuAAC аторвастатин модифицировали пропаргиловым эфиром и получали производное **9** с терминальной тройной связью (схема 2).

На последней стадии синтеза алкин **9** и азид **7** вводили в реакцию циклоприсоединения в присутствии йодида меди(I) и триэтиламина (схема 3). Целевой продукт выделяли с помощью препаративной обращенно-фазовой хроматографии.

Таким образом, нами был предложен способ синтеза первого конъюгата аторвастатина и лиганда асиалогликопротеинового рецептора с 3 остатками *N*-ацетилгалактозамина. Промежуточные соединения **2–7** и **9** получены в данной работе впервые.

Для определения растворимости конъюгата **10** в воде использовали спектрофотометрический метод. Для этого для соединения **10**, а также для немодифицированного аторвастатина (в виде кальциевой соли) строили градуировочные графики, отражающие зависимость оптической плотности растворов сравнения при 290 нм от их концентрации. Далее готовили насыщенные растворы обоих соединений и с помощью градуировочных графиков определяли концентрации веществ в них в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера. После проведения необходимых расчетов было определено, что растворимость кальциевой соли аторвастатина равна 0.11 ± 0.01 мМ (см. таблицу), а величина растворимости конъюгата составляла 6.1 ± 0.9 мМ, что почти в 60 раз больше.

Таким образом, объединение в ковалентный конъюгат аторвастатина и выбранного тривалентного лиганда ASGPR позволило значительно увеличить растворимость препарата в воде. Стоит ожидать, что такое повышение гидрофильности положительно скажется на селективности действия аторвастатина не только благодаря высокому средству конъюгата к асиалогликопротеиновому рецептору за счет введенного адресного фрагмента, но и из-за того, что соединение с такой молекулярной массой и балансом гидрофильности–гидрофобности будет довольно плохо преодолевать мембраны нецелевых клеток.

На заключительных этапах исследования было проведено измерение ингибирующей активности полученного конъюгата в отношении ГМГ-КоА редуктазы с помощью коммерчески доступного набора реактивов HMG-CoA Reductase Assay Kit (Merck). Интересующий нас фермент катализирует этап синтеза холестерина, при котором 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А переходит в мевалонат. Этот процесс сопровождается окислением 2 молекул NADPH в NADP⁺, благодаря чему каталитическую активность фермента можно измерить по интенсивности поглощения растворов

Схема 1. Условия синтеза разветвленного лиганда ASGPR с азидо группой

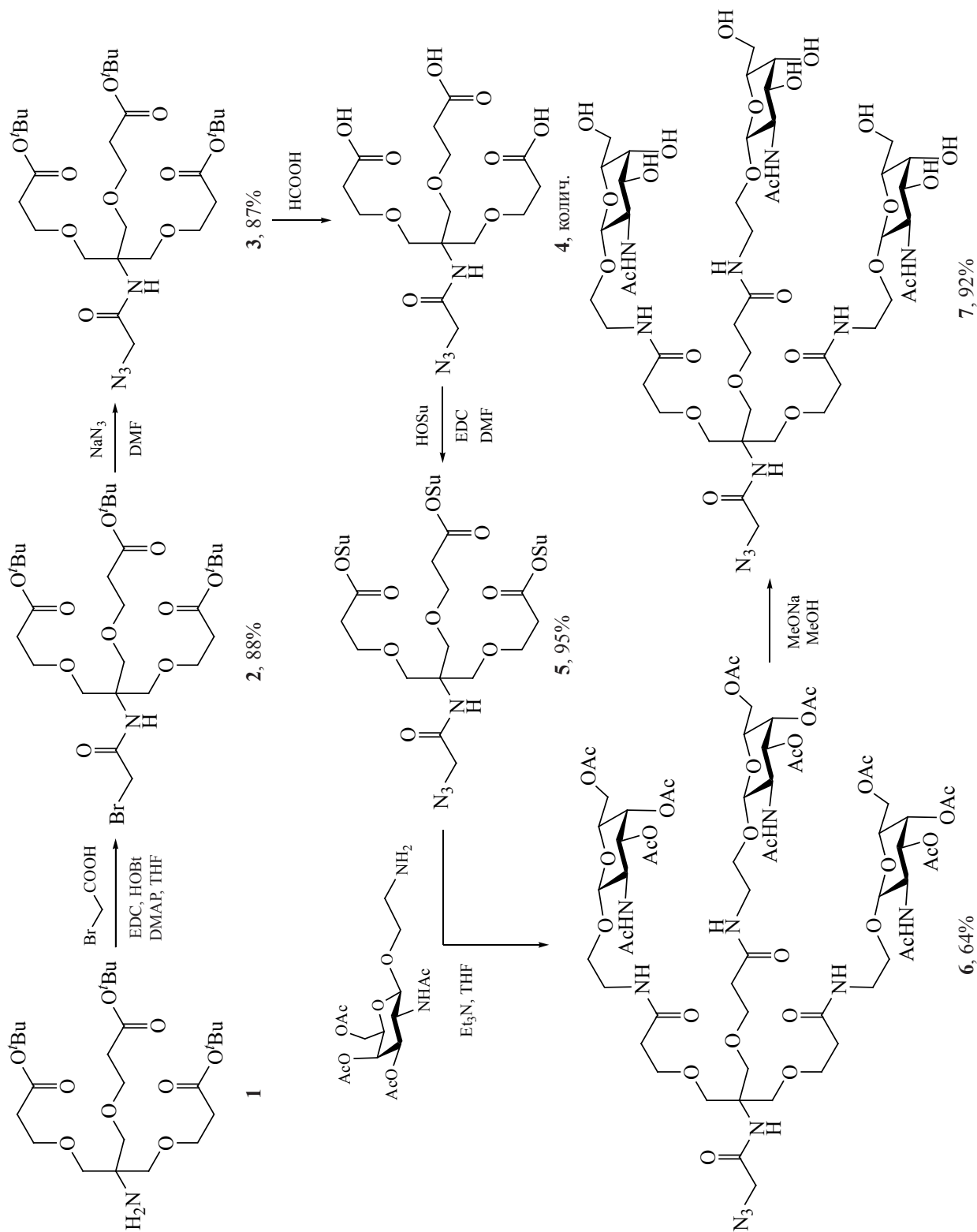


Схема 2. Синтез производного аторвастатина с терминальной тройной связью

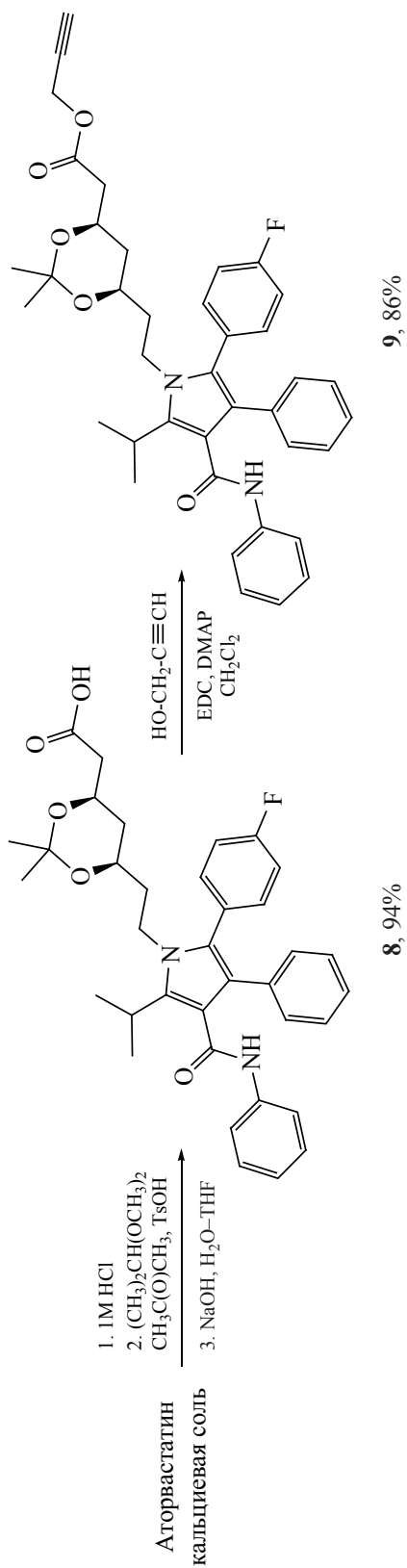
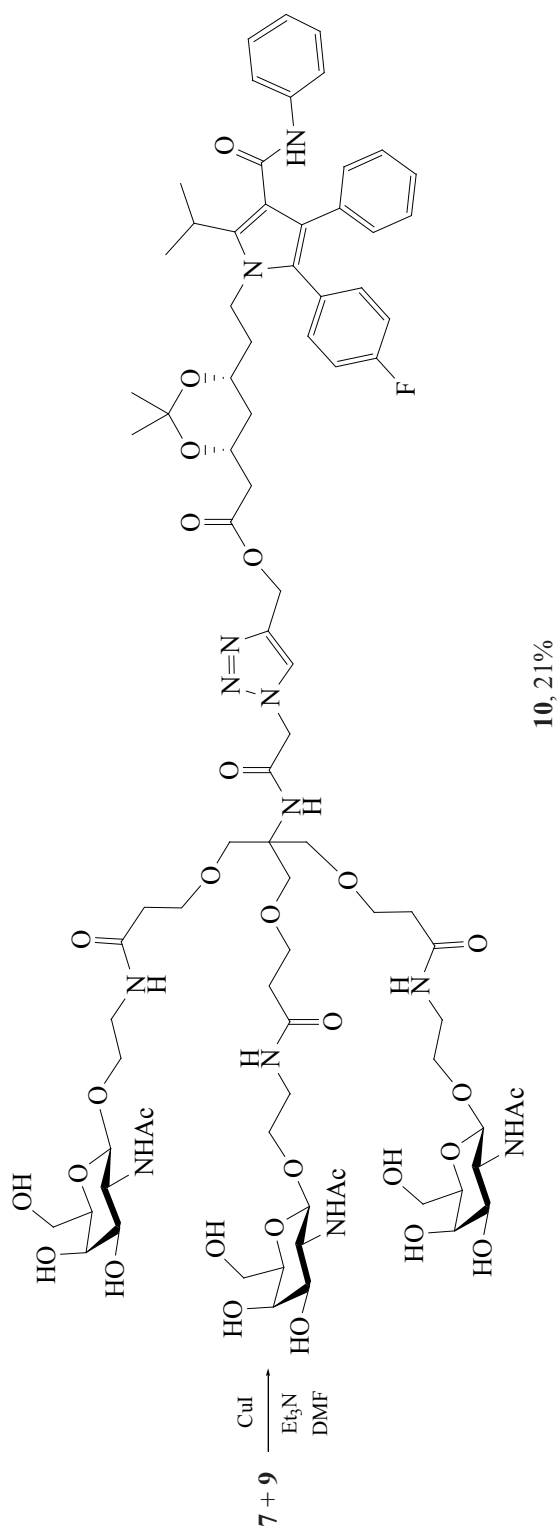


Схема 3. Синтез целевого конъюгата



Концентрация насыщенных водных растворов синтезированного конъюгата **10** и аторвастатина

Соединение	Коэффициент пропорциональности линейной функции ^a	Среднее значение интенсивности поглощения тест-растворов	Концентрация насыщенного раствора, мМ
Аторвастатин (кальциевая соль)	0.01174±0.00004	0.062	0.11±0.01
Конъюгат 10	0.0085±0.0002	0.256 ^b	6.1±0.9

^a $y = kx$, где y – интенсивность поглощения при 290 нм, x – концентрация растворов сравнения, мМ

^b в случае конъюгата **10** тест-раствор дополнительно разбавляли в 10 раз по сравнению с тест-раствором аторвастатина

на длине волны 340 нм (характерная длина волны поглощения NADP⁺). Чем значительнее изменение во времени интенсивности поглощения растворов, тем активнее фермент выполняет свою функцию. В контрольном эксперименте без добавления ингибиторов наблюдали превращение 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А в мевалонат и выработку NADP⁺ (рис. 2). Во втором контрольном эксперименте при добавлении правастатина (стати́н, рекомендованный производителем для использования в качестве эталонного ингибитора) окисление NADPH в NADP⁺ практически не происходило, активность ГМГ-КоА-редуктазы значительно снижалась.

Как правило [6, 13, 14], сложные эфиры статинов и другие их производные по карбоксильной группе теряют ингибирующую способность, поэтому исходный конъюгат **10** не должен оказы-

вать значительного влияния на работу ГМГ-КоА-редуктазы до тех пор, пока не произойдет расщепление сложноэфирной связи и высвобождение исходного аторвастатина. Этот результат и был получен нами при добавлении к смеси фермента и субстрата синтезированного конъюгата **10**: какого-либо статистически значимого влияния на активность фермента не наблюдали.

Молекулы с несколькими остатками *N*-ацетилгалактозамина демонстрируют высокое сродство к асиалогликопротеиновому рецептору с равновесной константой диссоциации лиганд-рецепторного комплекса порядка единиц нМ. Ранее была продемонстрирована интернализация соединений, модифицированных подобными мультивалентными лигандами, экспрессирующими ASGPR клетками культуры HepG2, причем влияние рецептор-опосредованного эндоцитоза было пока-

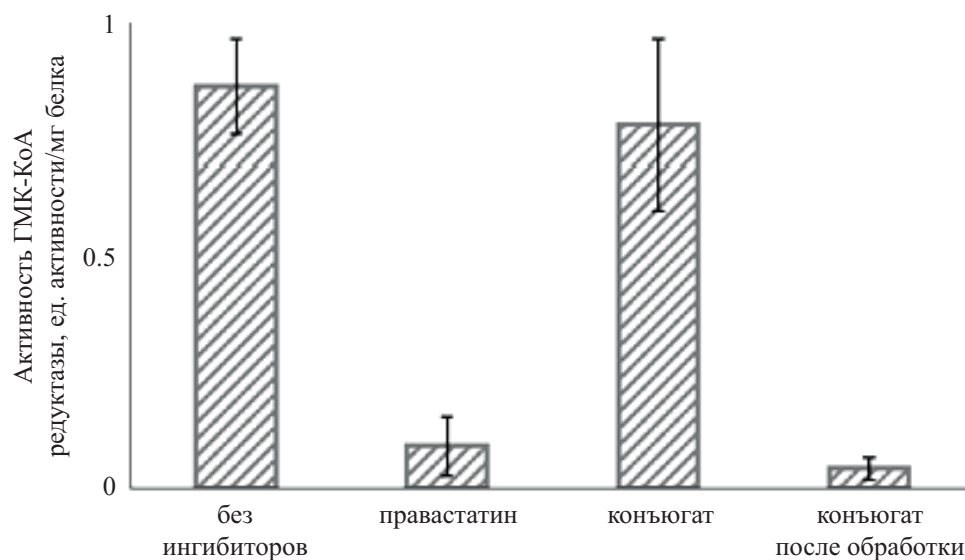


Рис. 2. Активность ГМГ-КоА-редуктазы: без добавления правастатина или конъюгата, при добавлении правастатина или раствора конъюгата без предварительного выдерживания в буферном растворе с pH 4.5 и после предварительного гидролиза

зано экспериментами с участием конкурирующих лигандов рецептора [15]. Известно, что вещества, направленный транспорт которых регулируется асиалогликопротеиновым рецептором, попадают в гепатоциты в результате образования эндосом [7, 10]. Среда в эндосомах слабокислая (рН 4.5–5.0), в них происходит разрушение комплекса лиганд–рецептор и первичное расщепление конъюгатов. При проведении эксперимента в условиях, имитирующих реальные процессы (после предварительной обработки конъюгата буферным раствором с рН 4.5), продукты гидролиза конъюгата **10** продемонстрировали значительное ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированный конъюгат **10** при гидролизе в условиях, близких к естественным, способен высвобождать аторвастатин в активной форме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H , ^{19}F и ^{13}C регистрировали на приборе Bruker DPX-300 с рабочими частотами 400 и 100 МГц. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре TripleTOF 5600+ (AB Sciex, Канада), оснащенный источником ионизации электрораспылением TurboIon Spray и жидкостным хроматографом LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония). Электронные спектры поглощения регистрировали на приборе HITACHI U-2900. Обращенно-фазовую хроматографию проводили на препаративном хроматографе puriFlash 4250 (Interchim, Франция) с применением картриджа PF-15C18HP-F0025 того же производителя. В работе использовали коммерческие реактивы («Merck», «Fluka®Analytical», «abc», «Carbosynth») без дополнительной очистки. Соединение **1** получали по методике [11], 1-*O*-(2'-аминоэтил)-2-ацетиамидо-2-дезоксигалактопиранозу – по методике [12].

***N*-Трис-{[2-(*трет*-бутоксикарбонил)этокси]метил}метиламид 2-бромэтановой кислоты (2).** К раствору бромуксусной кислоты (204 мг, 1.5 ммоль) в 4 мл ТГФ прибавляли EDC (206 мг, 1.1 ммоль), HOBT (145 мг, 1.1 ммоль) и DMAP (13 мг, 0.1 ммоль). Затем прибавляли амин **1** (500 мг, 1.0 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение суток.

Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в хлористом метиле и промывали 1 М HCl, насыщенным раствором NaCl, органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт очищали колоночной хроматографией (CH_2Cl_2 – CH_3OH , 100:1 по объему). Выход 550 мг (88%), прозрачное масло. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.46 с (27H), 2.46 т (6H, *J* 6.3 Гц), 3.66 т (6H, *J* 6.3 Гц), 3.71 с (6H), 3.81 с (2H), 6.87 уш.с (1H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 28.1, 29.6, 36.1, 60.1, 67.0, 68.8, 80.5, 165.6, 170.9. Масс-спектр, *m/z*: 626.2534 [*M* + *H*] $^+$. $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{BrNO}_{10}$. *M* + *H* 626.2516.

***N*-Трис-{[2-(*трет*-бутоксикарбонил)этокси]метил}метиламид 2-азидоуксусной кислоты (3).** К раствору соединения **2** (350 мг, 0.6 ммоль) в 4 мл ДМФА прибавляли азид натрия (100 мг, 1.7 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение суток. После этого реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали продукт этилацетатом. Органический слой промывали насыщенным раствором NaCl и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении. Выход 300 мг (87%), прозрачное масло. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.45 с (27H), 2.45 т (6H, *J* 6.3 Гц), 3.65 т (6H, *J* 6.3 Гц), 3.71 с (6H), 3.85 с (2H), 6.60 уш.с (1H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 28.1, 36.1, 52.6, 60.0, 67.0, 68.9, 80.5, 166.7, 170.9. Масс-спектр, *m/z*: 589.3443 [*M* + *H*] $^+$. $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_{10}$. *M* + *H* 589.3439.

***N*-Трис-{[2-(карбокситокси)метил]метиламид 2-азидоуксусной кислоты (4).** Соединение **3** (280 мг, 0.48 ммоль) перемешивали в течение 12 ч в 5 мл муравьиной кислоты. После этого муравьиную кислоту удаляли при пониженном давлении. Выход 200 мг (количественный), бесцветное масло. Спектр ЯМР ^1H (CD_3OD), δ , м.д.: 2.53 т (6H, *J* 6.1 Гц), 3.67–3.71 м (12H), 3.84 с (2H). Спектр ЯМР ^{13}C (CD_3OD), δ , м.д.: 35.9, 53.2, 61.8, 68.3, 70.0, 170.1, 175.8. Масс-спектр, *m/z*: 421.1565 [*M* + *H*] $^+$. $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_{10}$. *M* + *H* 421.1563.

Активированный эфир *N*-трис-{[2-(карбокситокси)метил]метиламид 2-азидоэтановой кислоты (5). Трикарбоновую кислоту **4** (50 мг, 0.12 ммоль) растворяли в 4 мл безводного ДМФА, прибавляли EDC (57 мг, 0.30 ммоль) и

N-гидроксисукцинимид (50 мг, 0.43 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь выливали в этилацетат, промывали органическую вытяжку NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl , сушили над Na_2SO_4 и удаляли растворитель при пониженном давлении. Выход 80 мг (95%), прозрачное масло. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 2.84–2.89 м (18H), 3.79–3.82 м (12H), 3.84 с (2H), 6.45 уш.с (1H). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 25.6, 32.0, 52.5, 60.4, 65.6, 68.6, 166.9, 167.2, 169.1. Масс-спектр, m/z : 712.2057 $[M + \text{H}]^+$. $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_{16}$. $M + \text{H}$ 712.2040.

***N*-(2-Азидэтанойл)амино-трис-[(1-(2-амидоэтил)-2-ацетидамо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- β -*D*-галактозамин)карбоксиэтоксиметил]метан (6)**. К раствору активированного эфира **5** (73 мг, 0.09 ммоль) в 4 мл ТГФ в атмосфере аргона прибавляли триэтиламин (54 мкл, 0.39 ммоль) и 1-*O*-(2'-аминоэтил)-2-ацетидамо-2-дезоксид-3,4,6-три-*O*-ацетил- β -*D*-галактопиранозу (132 мг, 0.33 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (CH_2Cl_2 – CH_3OH , 30:1 по объему). Выход 92 мг (64%), белые кристаллы. Спектр ЯМР ^1H (CD_3OD), δ , м.д.: 1.95 с (9H), 1.96 с (9H), 2.03 с (9H), 2.15 с (9H), 2.40–2.51 м (6H), 3.35–3.45 м (6H), 3.63–3.72 м (15H), 3.82–3.88 м (5H), 4.03–4.06 м (3H), 4.09–4.17 м (9H), 4.59 д (3H, J 8.5 Гц), 5.06 д.д (3H, J 11.2, 3.3 Гц), 5.35 д (3H, J 3.3 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CD_3OD), δ , м.д.: 20.7, 20.8, 20.9, 23.1, 37.5, 40.5, 51.6, 53.2, 61.5, 62.9, 68.3, 68.8, 69.5, 70.1, 72.0, 72.3, 103.0, 171.9, 172.2, 172.3, 173.7, 174.1, 174.2. Масс-спектр, m/z : 1537.6163 $[M + \text{H}]^+$. $\text{C}_{63}\text{H}_{97}\text{N}_{10}\text{O}_{34}$. $M + \text{H}$ 1537.6179.

***N*-(2-Азидэтанойл)амино-трис-[(1-(2-амидоэтил)-2-ацетидамо-2-дезоксид- β -*D*-галактозамин)карбоксиэтоксиметил]метан (7)**. Соединение **6** (70 мг, 0.04 ммоль) растворяли в 0.2 М растворе метилата натрия в метаноле (2 мл, 0.37 ммоль). Перемешивали в течение 3 ч, затем прибавляли Dowex 50W-X8 H^+ до тех пор, пока не получали значение рН 6.0, отфильтровывали ионообменную смолу, промывали метанолом. Удаляли растворитель при пониженном давлении. Выход 48 мг (92%), белый аморфный порошок. Спектр ЯМР ^1H (CD_3OD), δ , м.д.: 2.00 с (9H), 2.46

т (6H, J 6.0 Гц), 3.33–3.37 м (3H), 3.40–3.46 м (3H), 3.53 т (3H, J 6.0 Гц), 3.60 д.д (3H, J 10.3, 3.1 Гц), 3.65–3.72 м (15H), 3.74–3.80 м (6H), 3.82–3.87 м (8H), 3.93–3.98 м (3H), 4.40 д (3H, J 8.4 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CD_3OD), δ , м.д.: 23.3, 37.7, 40.9, 53.2, 54.3, 61.9, 62.7, 68.8, 69.3, 69.7, 70.0, 73.4, 76.9, 103.4, 170.0, 174.2, 174.4. Масс-спектр, m/z : 1159.5212 $[M + \text{H}]^+$. $\text{C}_{45}\text{H}_{79}\text{N}_{10}\text{O}_{25}$. $M + \text{H}$ 1159.5206.

2-[(4*R*,6*R*)-6-{2-[2-(4-Фторфенил)-5-изопропил-3-фенил-4-(фенилкарбамоил)-1*H*-пиррол-1-ил]этил}-2,2-диметил-1,3-диоксан-4-ил]уксусная кислота (8). Тригидрат кальциевой соли аторвастатина (1.0 г, 0.8 ммоль) перемешивали в течение 15 мин в 40 мл 1 М раствора HCl и экстрагировали аторвастатин в виде кислоты дихлорметаном (3 раза по 40 мл). Объединенные органические вытяжки сушили над Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в 10 мл ацетона, прибавляли к нему 2,2-диметоксипропан (2.5 мл, 20.0 ммоль) и моногидрат *para*-толуолсульфонокислоты (0.02 г, 0.1 ммоль) и перемешивали 24 ч. После этого в реакционную смесь прибавляли триэтиламин (0.075 мл, 0.5 ммоль) и удаляли растворитель при пониженном давлении. К остатку прибавляли 5 мл ТГФ и 1 мл 1 М раствора NaOH , перемешивали в течение ночи. На следующий день к полученной смеси приливали 1.2 мл 1 М раствора HCl и удаляли ТГФ при пониженном давлении. Для выделения продукта в индивидуальном виде проводили экстракцию в системе диэтиловый эфир–вода. Органическую фракцию сушили над Na_2SO_4 , растворитель удаляли при пониженном давлении. Выход 0.9 г (94%), белое кристаллическое вещество. Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м.д.: 0.87–0.95 м (1H), 1.18 с (3H), 1.31 с (3H), 1.37 д (6H, J 7.0 Гц), 1.36–1.42 м (1H), 1.50–1.65 м (2H), 2.26–2.28 м (2H), 3.22 квинтет (1H, J 7.0 Гц), 3.74–3.82 м (2H), 3.90–3.97 м (1H), 4.11–4.17 м (1H), 6.96–7.02 м (2H), 7.06–7.10 м (4H), 7.17–7.28 м (6H), 7.51 д (2H, J 8.1 Гц), 9.81 с (1H), 12.20 уш.с (1H). Спектр ЯМР ^1H соответствует литературным данным [16].

Проп-2-ин-1-ил-2-[(4*R*,6*R*)-6-{2-[2-(4-фторфенил)-5-изопропил-3-фенил-4-(фенилкарбамоил)-1*H*-пиррол-1-ил]этил}-2,2-диметил-1,3-диоксан-4-ил]ацетат (9). К раствору соединения **8** (600 мг, 1.0 ммоль) в 10 мл дихлорметана при-

бавляли EDC (383 мг, 2.0 ммоль), DMAP (60 мг, 0.5 ммоль) и пропаргиловый спирт (190 мкл, 3.2 ммоль). Перемешивали реакционную смесь в течение суток. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии (Hex–EtOAc, 1:1 по объему). Выход 545 мг (86%), белое кристаллическое соединение. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 0.91–1.00 м (1H), 1.16 с (3H), 1.31 с (3H), 1.36 д (6H, J 7.0 Гц), 1.36–1.41 м (1H), 1.51–1.62 м (2H), 2.36 д.д (1H, J 15.8, 7.0 Гц), 2.45–2.50 м (1H), 3.18–3.25 м (1H), 3.55 т (1H, J 2.5 Гц), 3.73–3.81 м (2H), 3.89–3.96 м (2H), 4.14–4.20 м (1H), 4.66 д.д (1H, J 15.8, 2.5 Гц), 4.71 д.д (1H, J 15.8, 2.5 Гц), 6.95–7.02 м (2H), 7.06–7.10 м (4H), 7.18–7.27 м (6H), 7.51 д (1H, J 7.7 Гц), 9.82 с (1H). Спектр ЯМР $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ (ДМСО- d_6), δ , м.д.: –114.1. Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 19.6, 22.1, 22.4, 25.6, 29.7, 35.1, 37.7, 40.3, 51.6, 65.3, 65.8, 77.6, 78.4, 98.1, 115.4 д ($^2J_{\text{CF}}$ 21.4 Гц), 117.4, 119.4, 120.6, 123.0, 125.4, 127.3, 127.7, 128.4, 128.3 д ($^4J_{\text{CF}}$ 2.9 Гц), 129.1, 133.4 д ($^3J_{\text{CF}}$ 8.1 Гц), 134.8, 135.9, 139.4, 161.7 д ($^1J_{\text{CF}}$ 245.1 Гц), 166.1, 169.6. Масс-спектр, m/z : 637.3072 [$M + \text{H}$] $^+$. $\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{FN}_2\text{O}_5$. $M + \text{H}$ 637.3074.

Конъюгат 10. К раствору азида **7** (50 мг, 0.04 ммоль) в 3 мл ДМФА прибавляли соединение **9** (24 мг, 0.04 ммоль). Полученную смесь дегазировали, после чего прибавляли йодид меди(I) (4 мг, 0.02 ммоль) и триэтиламин (8 мкл, 0.06 ммоль). Перемешивали реакционную смесь в течение 48 ч в атмосфере аргона, после чего прибавляли дигидрат динатриевой соли ЭДТА (7 мг, 0.02 ммоль) и продолжали перемешивание еще в течение 30 мин. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на препаративном хроматографе (подвижная фаза А – вода, В – ацетонитрил, градиент 95:5 \rightarrow 40:60, А:В по объему). Выход 14 мг (21%), белое кристаллическое вещество. Спектр ЯМР ^1H (CD_3OD), δ , м.д.: 0.93–1.02 м (1H), 1.23 с (3H), 1.34 с (3H), 1.35–1.39 м (1H), 1.36 д.д (6H, J 7.0, 2.1 Гц), 1.59–1.66 м (2H), 1.99 с (9H), 2.40–2.48 м (8H), 3.33–3.37 м (3H), 3.41–3.47 м (3H), 3.49–3.53 м (4H), 3.57–3.61 м (3H), 3.64–3.90 м (29H), 3.94–3.99 м (3H), 4.02–4.10 м (1H), 4.22–4.30 м (1H), 4.39 д (1H, J 8.4 Гц), 5.15–5.27 м (4H), 7.02–7.14 м (8H), 7.20–7.25 м (4H), 7.30 д (2H, J 7.7 Гц), 8.08 с (1H). Спектр ЯМР $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ (ДМСО- d_6), δ , м.д.: –114.1.

Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 19.6, 22.2, 22.4, 23.1, 25.6, 29.7, 35.8, 35.9, 37.8, 40.5, 51.9, 52.0, 60.2, 60.5, 63.1, 65.4, 65.8, 66.8, 67.4, 67.5, 68.1, 71.7, 72.5, 75.4, 98.2, 101.4, 115.4 д ($^2J_{\text{CF}}$ 21.0 Гц), 117.5, 119.4, 120.6, 125.4, 126.4, 127.3, 127.7, 128.5, 128.8 д ($^4J_{\text{CF}}$ 3.5 Гц), 129.1, 133.5 д ($^3J_{\text{CF}}$ 8.1 Гц), 134.3, 134.8, 135.9, 139.5, 141.4, 161.7 д ($^1J_{\text{CF}}$ 245.7 Гц), 166.1, 169.87, 169.90, 170.3, 170.4. Масс-спектр, m/z : 898.4168 [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$. $\text{C}_{84}\text{H}_{121}\text{FN}_{12}\text{O}_{30}$. $M + 2\text{H}$ 898.4142.

Растворимость в воде. Для построения градуировочной прямой готовили растворы конъюгата **10** и кальциевой соли аторвастатина в концентрации 1 мг/мл, из которых последовательным разбавлением в метаноле получали растворы следующих концентраций: 0.1, 0.05, 0.03, 0.02, 0.01 мг/мл. Регистрировали оптическую плотность полученных растворов на длине волны 290 нм. Рассчитанные коэффициенты пропорциональности линейной функции представлены в таблице. Далее определяли концентрацию веществ в их насыщенных растворах. Для этого конъюгат **10** или кальциевую соль аторвастатина, взятые в избытке, перемешивали в течение 15 мин в 1 мл воды. После этого нерастворившийся остаток отделяли центрифугированием, отбирали 50 мкл насыщенного водного раствора и прибавляли к 950 мкл метанола. В случае конъюгата **10** полученный таким образом раствор дополнительно разбавляли в 10 раз метанолом. Для тест-растворов измеряли оптическую плотность и рассчитывали исходные концентрации насыщенных растворов веществ по построенным градуировочным прямым.

Ингибирующая активность. Активность ГМГ-КоА-редуктазы измеряли с помощью набора реактивов HMG-CoA Reductase Assay Kit (Merck) в соответствии со стандартным протоколом, предложенным производителем. Раствор правастатина с концентрацией 0.1 мМ входил в состав набора реактивов, раствор конъюгата **10** с той же концентрацией готовили методом 100-кратного разбавления водой 0.01 М раствора конъюгата **10** в ДМСО. В случае эксперимента с предварительным гидролизом 100 мкл 0.01 М раствора конъюгата **10** в ДМСО разбавляли 900 мкл буферного раствора (0.1 М цитрата натрия + 0.2 М Na_2HPO_4 , pH 4.5)

и выдерживали данную смесь в течение 15 мин. Далее отбирали 100 мкл этой смеси и прибавляли 900 мкл воды, в результате получали 0.1 мМ раствор конъюгата **10**. Эксперимент проводили в 96-луночном планшете по 3 повтора для каждого образца. После добавления реагентов в порядке, рекомендованном производителем, регистрировали относительную оптическую плотность при 340 нм каждые 20 с до достижения 10 мин. Активность ГМГ-КоА-редуктазы рассчитывали по уравнению:

$$\text{Ед/мг} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{мин}_{\text{образец}} - \Delta A_{340}/\text{мин}_{\text{фон}}) \cdot TV}{12.44 \cdot V \cdot 0.6 \cdot LP}$$

где 12.44 – коэффициент экстинкции NADPH при 340 нм; TV – общий объем реакции, мл (в данном случае 0.2 мл); V – объем используемого в анализе раствора фермента, мл (в данном случае 0.012 мл); 0.6 – концентрация фермента, мг белка/мл; LP – длина светового пути, см (в данном случае 0.55 см); Ед/мг – активность фермента в единицах активности на мг белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получен конъюгат аторвастатина и лиганда асиалогликопротеинового рецептора с 3 остатками *N*-ацетилгалактозамина. Показано, что дополнение структуры аторвастатина выбранным тривалентным лигандом ASGPR приводит к значительному увеличению растворимости препарата в воде. Для синтезированного конъюгата измеренная концентрация насыщенного водного раствора составила 6.1 ± 0.9 мМ, что почти в 60 раз превосходит данный показатель для немодифицированного аторвастатина. Высокая гидрофильность и наличие адресного фрагмента позволяют с большой вероятностью предполагать, что полученный конъюгат будет выгодно отличаться от исходного статина своей селективностью в отношении паренхимных клеток печени, причем мультивалентность лиганда значительно увеличивает способность конъюгатов проникать в гепатоциты, как было продемонстрировано ранее. Кроме того, в экспериментах по ингибированию ГМГ-КоА-редуктазы установлено, что синтезированное соединение **10** способно высвобождать аторвастатин в активной форме.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Белоглазкину Андрею Александровичу, к.х.н. Вацуру Ивану

Михайловичу, к.х.н. Горбунову Александру Николаевичу, к.х.н. Петрову Ростиславу Александровичу, д.х.н. Ульяновскому Николаю Валерьевичу за проведение исследований физико-химических свойств полученных в работе соединений и помощь в интерпретации результатов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-00219).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Маклакова Светлана Юрьевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5290-9353>

Мажуга Мария Павловна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6979-1224>

Лопухов Антон Владимирович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3517-505X>

Гибадуллина Карина Ринатовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9432-3366>

Клячко Наталья Львовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9357-8236>

Мажуга Александр Георгиевич, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5184-5551>

Белоглазкина Елена Кимовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6796-8241>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний*. Ред. Е.И. Чазов, Ю.А. Карпов. М.: Литтгеппа. **2016**.
2. Vardanyan R., Hruby V. *Synthesis of Best-seller Drugs*. London–San Diego–Cambridge–Oxford: Academic Press. **2016**, 286–293.
3. Bratton L.D., Auerbach B., Choi C., Dillon L., Hanselman J.C., Larsen S.D., Lu G., Olsen K., Pfefferkorn J.A., Robertson A., Sekerke C., Trivedi B.K., Unangst P.C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5576–5589. doi 10.1016/j.bmc.2007.05.031
4. Rageh A.H., Atia N.N., Abdel-Rahman H.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *142*, 7–14. doi 10.1016/j.jpba.2017.04.037

- Roth B.D., Bocan T.M.A., Blankley C.J., Chucholowski A.W., Creger P.L., Creswell M.W., Ferguson E., Newton R.S., O'Brien P. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 463–466. doi 10.1021/jm00105a071
- Zhang Y., Zhang X., Zeng C., Li B., Zhang C., Li W., Hou X., Dong Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2187–2191. doi 10.1016/j.bmc.2019.04.019
- D'Souza A.A., Devarajan P.V. *J. Control. Rel.* **2015**, *203*, 126–139. doi 10.1016/j.jconrel.2015.02.022
- Wang Q., Huang C., Jiang M., Zhu Y., Wang J., Chen J., Shi J. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* **2016**, *156*, 155–163. doi 10.1016/j.saa.2015.12.003
- Galiullina L.F., Scheidt H.A., Huster D., Aganov A., Klochkov V. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2019**, *1861*, 584–593. doi 10.1016/j.bbmem.2018.12.013
- Huang X., Leroux J.-C., Castanger B. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 283–295. doi 10.1021/acs.bioconjchem.6b00651
- Cardona C.M., Gawley R.E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1411–1413. doi 10.1021/jo0161678
- Manoharan M., Rajeev K., Nair J., Maier M. Европ. заявка EP 3156077. **2022**.
- Vickers S., Duncan C.A., Chen I.W., Rosegay A., Duggan D.E. *Drug Metab. Dispos.* **1990**, *18*, 138–145.
- Vickers S., Duncan C.A., Vyas K.P., Kari P.H., Arison B., Prakash S.R., Ramjit H.G., Pitzenberger S.M., Stokker G., Duggan D.E. *Drug Metab. Dispos.* **1990**, *18*, 476–483.
- Petrov R.A., Mefedova S.R., Yamansarov E.Y., Maklakova S.Y., Grishin D.A., Lopatukhina E.V., Burenina O.Y., Lopukhov A.V., Kovalev S.V., Timchenko R.V., Ondar E.E., Ivanenkov Y.A., Evteev S.A., Vaneev A.N., Timoshenko R.V., Klyachko N.L., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. *Mol. Pharmaceutics.* **2021**, *18*, 461–468. doi 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980
- Mizoi K., Takahashi M., Haba M., Hosokawa M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 921–923. doi 10.1016/j.bmcl.2015.12.069

Synthesis and Inhibitory Activity of Atorvastatin Conjugate with a Branched Asialoglycoprotein Receptor Ligand with 3 *N*-Acetyl-D-galactosamine Residues

S. Yu. Maklakova^{a, *}, M. P. Mazhuga^a, A. V. Lopukhov^a, K. R. Gibadullina^a, N. L. Klyachko^a, A. G. Majouga^{a, b}, and E. K. Beloglazkina^a

^a Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia

^b Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl., 9, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: MaklakovaSU@yandex.ru

Received March 30, 2022; revised April 10, 2022; accepted April 13, 2022

The novel atorvastatin conjugate was synthesized in a multi-step procedure using branched *N*-acetylgalactosamine ligand for asialoglycoprotein receptor targeting. The molar solubility of the obtained conjugate was 6.1±0.9 mM, which is almost 60 times higher than that of unmodified atorvastatin. The hydrolysis products of the conjugate demonstrated effective inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase.

Keywords: atorvastatin, *N*-acetyl-D-galactosamine, targeted drug delivery, asialoglycoprotein receptor