

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт органического синтеза им. И.Я. Пастовского
Уральского отделения Российской академии наук
(ИОС УРО РАН)

На правах рукописи



ВАХРУШЕВ Александр Викторович

Синтез производных RGD-пептида и их конъюгатов – потенциальных средств диагностики и
терапии опухолей

1.4.3. Органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
кандидат химических наук
Дёмин Александр Михайлович;
доктор химических наук, профессор
Краснов Виктор Павлович

Екатеринбург 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1 Методы синтеза RGD-пептидов и их конденсация с функциональными соединениями или наночастицами (обзор литературы)	8
1.1 Семейство RGD-пептидов	8
1.2 Основные подходы к синтезу производных RGD-пептидов.....	9
1.3 Конъюгаты RGD-пептидов с флуоресцентными метками	12
1.4 Конъюгаты RGD-пептидов с соединениями бора.....	14
1.5 Конъюгаты RGD-пептидов с наночастицами	18
1.5.1 Методы синтеза МНЧ Fe ₃ O ₄	18
1.5.2 Методы модификации поверхности МНЧ	20
1.5.3 МНЧ как платформа адресной доставки препаратов.....	22
Глава 2 Обсуждение результатов	27
2.1 Синтез линкерсодержащих производных RGD-пептида.....	27
2.2 Синтез производных RGD-пептида, содержащих флуоресцентные красители.....	30
2.3 Синтез производных RGD-пептида, содержащих карбораны	33
2.4 Синтез материалов на основе МНЧ, в том числе модифицированных RGD-пептидом, для применения в терапии и диагностике онкологических заболеваний.....	36
2.4.1 Конъюгация производного RGD-пептида с APS-модифицированными МНЧ	36
2.4.2 Разработка метода нанесения SiO ₂ /APS-покрытия на МНЧ	40
2.4.3 Исследование сорбции Dox на МНЧ с покрытием на основе SiO ₂ и SiO ₂ /APS	44
2.4.4 Синтез МНЧ с PEG-покрытием и исследование сорбции на них Dox.....	49
2.4.5 Синтез МНЧ с SiO ₂ /PEG-покрытием, содержащих производные RGD-пептида	59
2.5 Исследование биологической активности синтезированных материалов.....	66
2.5.1 Оценка цитотоксичности материалов на основе карборанов	66
2.5.2 Оценка противоопухолевой активности материалов, загруженных Dox	67
2.5.3 Оценка эффективности материалов на основе МНЧ для терапии опухолей в опытах <i>in vivo</i>	71
2.5.4 Оценка цитотоксичности МНЧ, содержащих RGD-пептид.....	74
2.5.5 Оценка специфического связывания МНЧ, содержащих RGD-пептид, с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$	77
Глава 3 Экспериментальная часть.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
Список сокращений.....	119
Список литературы.....	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Поиск средств для лечения и диагностики опухолевых заболеваний является одной из наиболее актуальных задач современной органической химии. В настоящее время в конструкциях лекарственных препаратов для таргетной терапии опухолей используют молекулярные векторы – антитела, нуклеотиды, пептиды, углеводы и др., обеспечивающие их адресную доставку и удержание в опухоли. Механизм накопления основан на взаимодействии данных молекул с рецепторными белками, экспрессированными на поверхности опухолевых клеток.

Семейство пептидов, содержащих в структуре аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp (RGD), в настоящее время рассматривается как одно из наиболее перспективных для использования в качестве молекулярных векторов при разработке препаратов для диагностики и лечения опухолевых заболеваний. Пептиды, содержащие RGD мотив способны селективно связываться с белками интегринами. Среди всего разнообразия RGD-распознающих интегринов можно выделить основные: $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, которые сверхэкспрессируются на поверхности опухолевых клеток. Пептиды RGD семейства используются при разработке диагностических и терапевтических препаратов как самостоятельные биоактивные молекулы (например циклический пептид Cilengitide (*c*(RGDf-N(Me)K), находящийся на третьей фазе клинических испытаний в качестве препарата для лечения глиобластомы), так и в качестве вектора в составе сложных молекул и композитов, которые могут содержать изотопные, флуоресцентные или магнитоконтрастные метки, цитостатические препараты или препараты для фотодинамической терапии и др.

Синтез RGD-пептидов – многостадийный процесс с использованием регио- и стереоселективных методов. Отдельной задачей является разработка методов региоселективной конъюгации производных RGD-пептида с разнообразными по химической природе биомолекулами, ксенобиотиками или наночастицами, содержащими различные функциональные группы. Ввиду разнообразия и сложности получения конъюгируемых объектов, актуальной задачей является разработка методов получения материалов на основе RGD-пептида, потенциальных средств терапии и диагностики онкологических заболеваний.

Целью диссертационной работы являлась разработка методов синтеза производных RGD-пептида и их конъюгатов с флуоресцентными красителями, карборанами или магнитными наночастицами (МНЧ) для создания потенциальных средств диагностики и терапии опухолей.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка методов синтеза избирательно защищенных производных пептидов RGD-семейства;
2. Разработка методов синтеза конъюгатов RGD-пептида с флуоресцентными красителями и карборанами (потенциальными средствами для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) опухолей);
3. Разработка подходов к синтезу наноматериалов на основе МНЧ, в том числе модифицированных RGD-пептидом, а также иммобилизация на МНЧ противоопухолевого препарата доксорубицина;
4. Изучение противоопухолевой активности полученных соединений и материалов.

Научная новизна. Разработан подход к синтезу новых избирательно защищенных производных трипептида RGD и тетрапептидов GRGD (Gly-Arg-Gly-Asp) и KRGD (Lys-Arg-Gly-Asp), в том числе, содержащих в качестве линкера, соединяющего пептид и функциональную молекулу/наночастицу, фрагмент глутаровой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG). Для оптимизации синтеза пептидов проведен сравнительный анализ эффективности использования ряда конденсирующих агентов в реакциях образования пептидной связи и эффективности использования различных защитных групп, а также изучены побочные реакции.

Синтезированы новые конъюгаты производных RGD-пептида с флуоресцентными красителями: цианиновыми красителями (Cyanine5.5, Cyanine5), флуоресцеином и 6-метил-2-оксо-4-фенил-1,2-дигидропиридином. Впервые синтезирован ряд конъюгатов глутарилсодержащего RGD-пептида с 1-замещенными 3-амино-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборанами и KRGD-пептида, содержащего два карборановых ядра в виде 1-ацетил-1,2-дикарба-*клозо*-додекаборана или 1-ацетил-1,2-дикарба-*нидо*-ундекаборана.

Разработаны методы синтеза конъюгатов RGD-пептида с МНЧ на основе Fe₃O₄. Проведена оптимизация нанесения покрытия на основе диоксида кремния на МНЧ и разработаны подходы к иммобилизации противоопухолевого препарата доксорубицина (Dox) на полученные МНЧ. Изучено влияние модифицированного SiO₂-покрытия на сорбцию Dox. Впервые продемонстрировано, что наличие на поверхности наноматериалов стабилизатора PMDA повышает уровень иммобилизации Dox благодаря специфичному связыванию. Предложен оригинальный подход к ковалентной иммобилизации на поверхности МНЧ молекул PEG с различными концевыми функциональными группами за счет модификации SiO₂-покрытия 3-аминопропилсиланом или 3-сукцинилпропилсиланом.

Оценена цитотоксичность (МТТ-тест) синтезированных материалов на культурах нормальных и опухолевых клеток. Показано, что *нидо*-карборансодержащие производные не проявили выраженный цитотоксический эффект в отличие от *клозо*-производных и, благодаря

хорошей растворимости *нидо*-карборансодержащих производных в водных средах, они являются лучшими кандидатами для разработки на их основе лекарственных препаратов для БНЗТ. Оценена эффективность синтезированных материалов на основе МНЧ в качестве платформы доставки Dox на модели комбинированной терапии с магнитной гипертермией в опытах *in vivo*. Продемонстрирована специфичность связывания МНЧ, содержащих RGD-пептид, с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$.

Теоретическая и практическая значимость работы. Так как гуанидиновая группа Arg и β -карбоксыльная группа Asp участвуют в связывании с молекулярными мишенями, нами предложен оригинальный способ синтеза избирательно защищенных производных RGD-пептида, в которых гуанидиновая группа Arg и β -карбоксыльная группа Asp защищены, а для связывания с молекулами используется свободная функциональная группа пептида (α -аминогруппа Arg, Gly, Lys или ϵ -аминогруппа Lys). В дальнейшем, после синтеза конъюгатов с функциональными молекулами или МНЧ защитные группы Arg и Asp могут быть удалены методами пептидной химии. Такой подход позволил получить новые конъюгаты с рядом флуоресцентных красителей, *нидо*- и *клозо*-карборанами, а также с МНЧ на основе Fe_3O_4 .

Разработан метод нанесения на МНЧ покрытия на основе SiO_2 , в том числе с использованием PMDA и алкоксисиланов, изучены процессы сорбции Dox на МНЧ с SiO_2 -оболочкой (в том числе модифицированной) и особенности его десорбции, изучен цитотоксический эффект в опытах *in vitro*. Для материалов на основе МНЧ Fe_3O_4 с PEG-покрытием и загруженных Dox продемонстрированы терапевтический эффект (в том числе, за счет локальной магнитной гипертермии в экспериментах *in vitro* и *in vivo*), возможность торможения процессов метастазирования и повышение выживаемости животных.

Практическая значимость заключается в разработке метода синтеза новых конъюгатов с RGD-пептидом, а также в получении новых наноматериалов – потенциальных средств терапии и диагностики опухолей.

Методология и методы исследования. В работе использован комплекс современных методов органической химии и физико-химических методов анализа. Для характеристики полученных соединений применялись следующие методы: 1H , ^{13}C , ^{11}B ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия, поляриметрия, элементный анализ, рентгено-флуоресцентный анализ, метод динамического и электрофоретического рассеяния света, просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, вибрационная магнитометрия, рН-метрия.

Степень достоверности результатов. Анализ полученных соединений осуществлялся на поверенном и сертифицированном оборудовании ЦКП «Спектроскопия и анализ органических соединений» ИОС УрО РАН. Определение физико-химических параметров нанообъектов проведено на оборудовании ИФМ УрО РАН (г. Екатеринбург) и УЦКП «Современные нанотехнологии» ИЕНиМ, УрФУ (г. Екатеринбург). Изучение биологической активности проводилось в ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск), ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург), НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва).

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод синтеза избирательно защищенных производных RGD-пептида, имеющих свободные амино- или карбоксильные группы для дальнейшей конденсации с другими функциональными молекулами (в частности, с флуоресцентными красителями и карборанами).
2. Методы синтеза конъюгатов производных RGD-пептида с молекулами различных флуоресцентных красителей.
3. Методы синтеза конъюгатов производных RGD-пептида с *клозо*-додекаборанами и *нидо*-ундекаборанами.
4. Методы синтеза наноматериалов на основе МНЧ, модифицированных RGD-пептидом.
5. Разработка методов сорбции противоопухолевого препарата Dox на МНЧ и его последующей десорбции.
6. Результаты изучения биологической активности полученных материалов (результаты оценки цитотоксичности синтезированных соединений и наноконъюгатов; результаты изучения специфичного связывания МНЧ, модифицированных RGD-пептидом, с клетками опухолевых линий; результаты оценки эффективности материалов на основе МНЧ для терапии опухолей).

Апробация результатов. Материалы работы представлены на 8 российских конференциях с международным участием (Екатеринбург MOSM 2017, 2018, 2020, 2022, 2024; Екатеринбург MedChem 2019, 2021; Екатеринбург OrgChemBioTech 2020) и на 4 российских (Москва, Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии 2018; Екатеринбург ФТИ 2020; Екатеринбург Рутений 2021, 2022).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект 21-73-10073) и Министерства науки и высшего образования РФ (проекты АААА-А18-118020290101-1, АААА-А19-119012490007-8, 124020500023-9, АААА-А18-118020290161-5, АААА-А19-119011790130-3, 124020500044-4, 124020200038-6), а также в рамках выполнения Научного проекта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2020-777.

Публикации. Материалы работы представлены в 10 статьях, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными библиографическими базами данных, а также в 12 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Личный вклад автора состоял в сборе, систематизации, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, выполнении анализа полученных данных, написании научных статей и представлении полученных результатов на научных конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Настоящая работа состоит из введения, трёх глав (литературный обзор (глава 1), обсуждение результатов (глава 2), экспериментальная часть (глава 3)), заключения, списка сокращений и списка литературы (234 наименования), изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 49 рисунков, 33 схемы, 13 таблиц.

Благодарность. Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность коллективу ИОС УрО РАН, в частности, сотрудникам лаборатории асимметрического синтеза: научному руководителю, с.н.с., к.х.н. А.М. Дёмину, научному консультанту, зав. лаб., д.х.н., проф. В.П. Краснову за помощь в проведении исследований и подготовке работы, в.н.с., д.х.н. Д.А. Груздеву и в.н.с., д.х.н. Г.Л. Левит за консультирование и помощь в написании работы; с.н.с., к.х.н. А.А. Тумашову за проведение ВЭЖХ-анализа; с.н.с., к.х.н. И.Н. Ганебных за регистрацию масс-спектров; сотрудникам лаборатории спектральных методов исследования (зав. лаб., к.х.н. М.И. Кодесс) за регистрацию ЯМР-спектров, в том числе н.с., к.х.н. М.С. Валовой за проведение анализа спектроскопическими методами; м.н.с. К.А. Чистякову за проведение РФА; группе элементного анализа (рук. н.с. И.В. Щур). Автор также благодарит коллег из других организаций: к.б.н. А.Г. Першину, Л.В. Ефимову, А.А. Сёмчину (СибГМУ, г. Томск), к.фарм.н. М.А. Барышникову (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, г. Москва), В.А. Поздину (ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург) за проведение биологических исследований; к.ф.-м.н. М.А. Уймина, А.С. Минина, А.В. Бьзова (ИФМ УрО РАН, г. Екатеринбург), а также к.ф.-м.н. Д.К. Кузнецова и д.ф.-м.н. проф. В.Я. Шур (УрФУ, г. Екатеринбург) за исследование образцов МНЧ комплексом физических методов; к.х.н. доц. А.Л. Шацаускаса и д.х.н. проф. А.С. Фисюка (ОмГТУ, г. Омск), к.х.н. В.А. Ольшевскую (ИНЭОС РАН, г. Москва) за предоставление исходных соединений.

Глава 1 Методы синтеза RGD-пептидов и их конденсация с функциональными соединениями или наночастицами (обзор литературы)

Создание средств лечения и диагностики онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных задач современной органической химии. В настоящее время в конструкциях лекарственных препаратов для таргетной терапии опухолей используют молекулярные векторы – антитела, пептиды, олигонуклеотиды, олигосахариды и др., обеспечивающие их адресную доставку и удержание в опухоли. Широкое использование пептидных векторных молекул связано с рядом их преимуществ в сравнении с использованием других векторов: легкость химического синтеза, меньший молекулярный размер, более низкая иммуногенность и способность проникать через клеточные мембраны путем рецептор-опосредованной интернализации [1, 2].

1.1 Семейство RGD-пептидов

Семейство RGD-пептидов, содержащих в структуре аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp (RGD), в настоящее время рассматривается как одно из перспективных для использования в качестве молекулярных векторов при разработке препаратов для диагностики и лечения опухолевых заболеваний. Впервые RGD-пептид был упомянут в 1984 [3], а первый обзор, посвященный его свойствам, опубликован в 1996 [4].

Пептидная последовательность RGD, обеспечивающая клеточное распознавание и клеточную адгезию, была впервые обнаружена в фибронектине. Опубликованное открытие, что только три аминокислоты в очень большом белке формируют сайт распознавания и связывания для клеток, первоначально было воспринято с некоторым скептицизмом. Однако вскоре наблюдение было подтверждено в отношении фибронектина и затем в отношении других белков. Как и предсказывалось в статье о RGD 1984 года, оказалось, что последовательность RGD является сайтом связывания многих других адгезивных белков [5-10]. К наиболее известным RGD содержащим гликопротеинам внеклеточного матрикса относятся такие молекулы адгезии как фибронектин, витронектин, ламинин, остеопонтин, фактор фон-Виллебранда [11].

Последующее открытие интегринов – клеточных поверхностных рецепторов, которые распознают RGD-последовательность на различных белках – привлекло к пептидам семейства RGD значительное внимание в исследованиях клеточной адгезии как векторной молекуле. Среди всего разнообразия RGD-распознающих интегринов можно выделить основные: $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_v\beta_1$ [12] (рисунок 1.1).

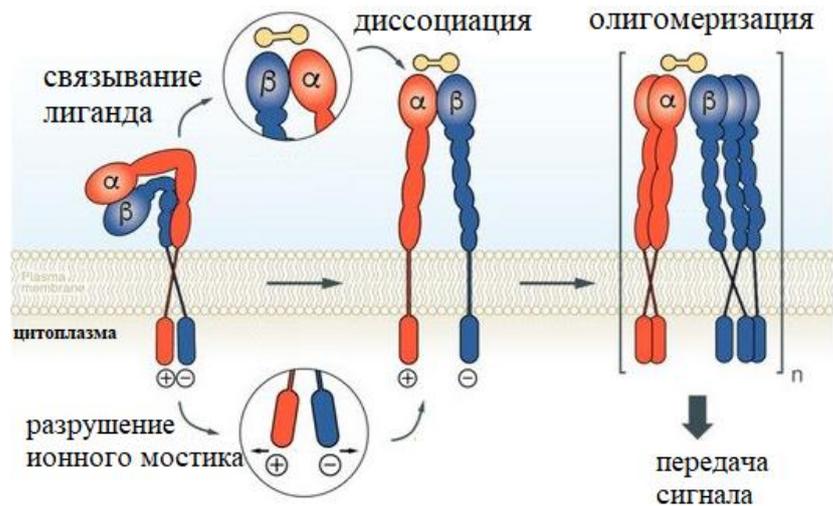


Рисунок 1.1 – Взаимодействие RGD-пептида с сайтом связывания [13].

Низкомолекулярные соединения с RGD-мотивом, эффективно связывающиеся с интегринными, но не способные выполнять функции высокомолекулярных гликопротеинов, получили название «дизинтегрины». Дизинтегрины вызывают энкойкиз – вариант апоптоза, связанный с потерей клеточно-матриксного взаимодействия. Для адгезионных клеток взаимодействие с межклеточным матриксом является необходимым условием выживания [14]. Неадгезионные клетки представлены циркулирующими клетками и форменными элементами: лейкоцитами, тромбоцитами, метастатическими клетками. Взаимодействие с матриксом не влияет на выживаемость неадгезионных клеток, но является необходимым условием для выполнения их функций. Этим обуславливаются противосвертывающий, противоопухолевый и противометастатический эффекты производных RGD-пептида [15, 16]. В качестве препарата в настоящее время клинические испытания проходит только один представитель семейства RGD-пептидов Cilengitide (*c*(RGDf-N(Me)K), используемый для лечения глиобластомы [17].

Производные RGD-пептида используются не только как самостоятельные лекарственные препараты, но и нашли широкое применение в качестве молекулярных векторов, способных доставлять функциональные молекулы и наночастицы в опухолевые ткани, на поверхности клеток которых сверхэкспрессированы интегринные $\alpha\nu\beta_3$ и $\alpha\nu\beta_5$ [18].

1.2 Основные подходы к синтезу производных RGD-пептидов

При разработке препаратов для диагностики и лечения опухолевых заболеваний используют как линейные, так и циклические производные (*c*(RGDfK), *c*(RGDfC) и др.) RGD-пептида, которые синтезируют твердофазным методом или в растворе. Твердофазный синтез чаще всего выполняют по Fmoc-стратегии, начиная с C-конца (L-Asp) [19, 20], но возможен и обратный синтез с N-конца (L-Arg) [21] (схема 1.1).

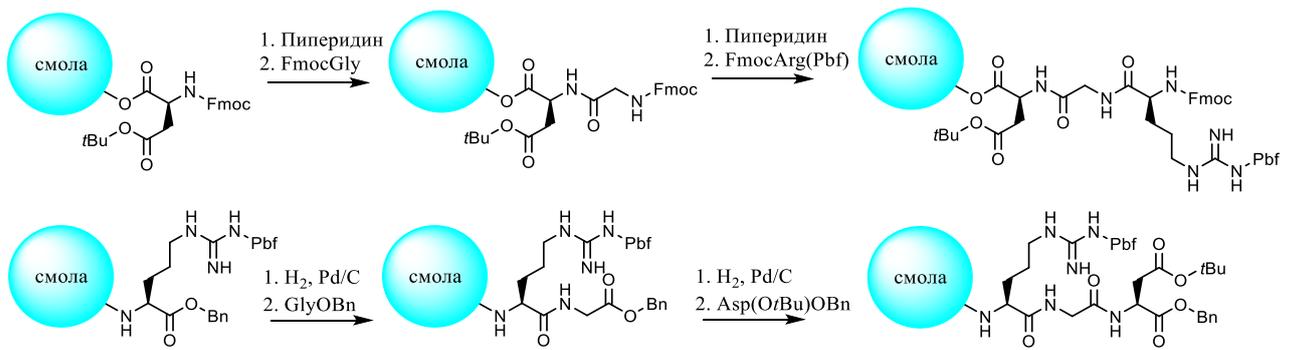


Схема 1.1

Синтез линейных производных пептида RGD в растворе осуществляют с помощью как Fmoc-, так и Boc-стратегии. При этом синтез начинают с C-защищенных производных L-Asp (C-конца) [22-24] или с N-защищенных производных L-Arg (N-конца) [19, 25] (схема 1.2).

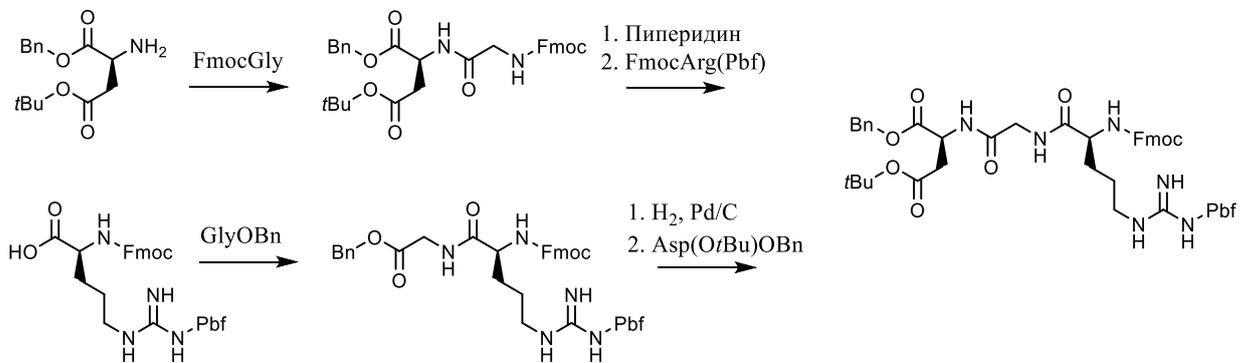


Схема 1.2

При этом в ходе синтеза фармакофорные группы не должны быть связаны через гуанидиновую группу Arg и β -карбоксыльную группу Asp, которые участвуют в связывании с молекулярными мишенями [26]. Для ковалентного связывания циклических пептидов с функциональными молекулами (или поверхностью наночастиц) используют ϵ -аминогруппу L-Lys RGDfK-фрагмента [27, 28] или тиольную группу L-Cys RGDfC-фрагмента [29, 30]. Линейный трипептид RGD модифицируют по α -аминогруппе L-Arg [22]. В случае более длинных линейных пептидов наиболее часто задействуют ϵ -аминогруппу L-Lys [31-33]. При этом присоединение могут проводить либо напрямую [31], либо посредством линкера (производные полиэтиленгликоля [32, 34], трипептидов (GGG, DDD, SSS) [20] или малеимидных кросс-линкеров [35, 36], ϵ -аминокапроновой [19], глутаровой или адипиновой кислот [24, 37]) (рисунок 1.2).

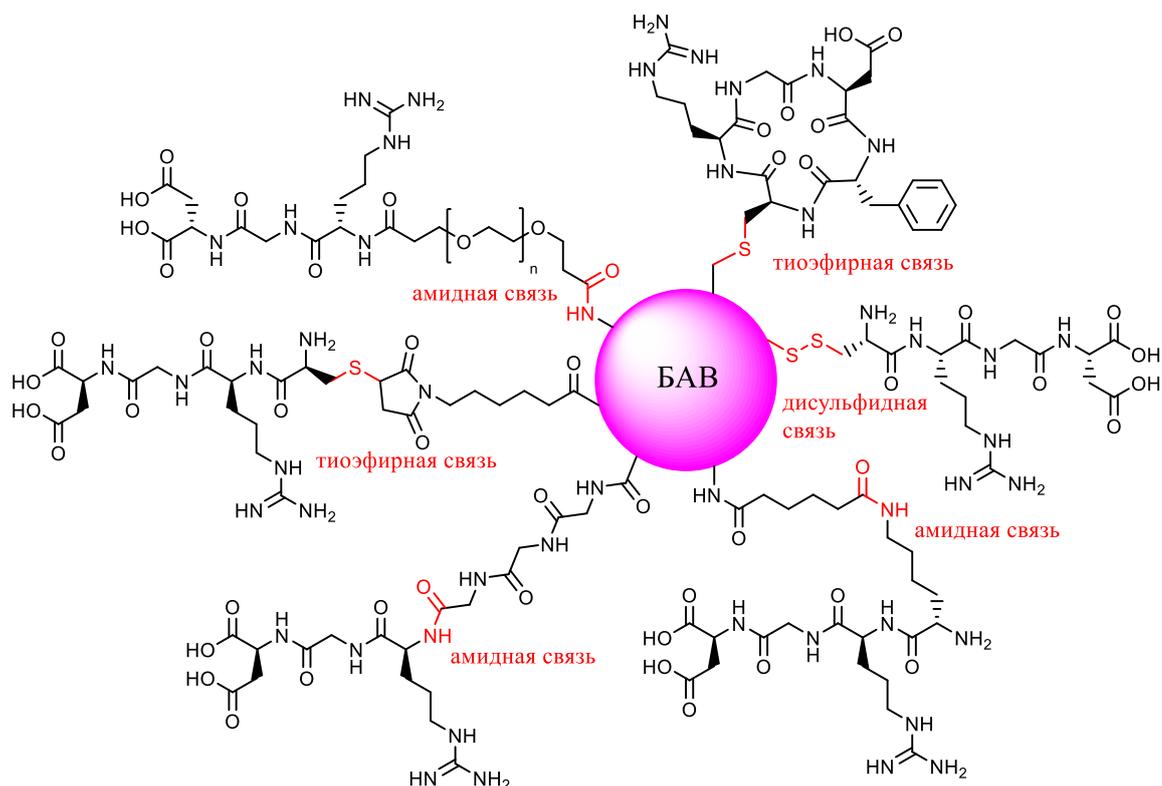


Рисунок 1.2 – Примеры ковалентного связывания препаратов с производными RGD-пептида.

Так как синтез необходимо проводить региоселективно, а в пептидах присутствует несколько конкурирующих групп, то для всех боковых групп, реагирование которых нежелательно, вводят защиту. Защитные группы подбирают таким образом, чтобы на последнем этапе удалить их в одну или две стадии [38-42] (схема 1.3).

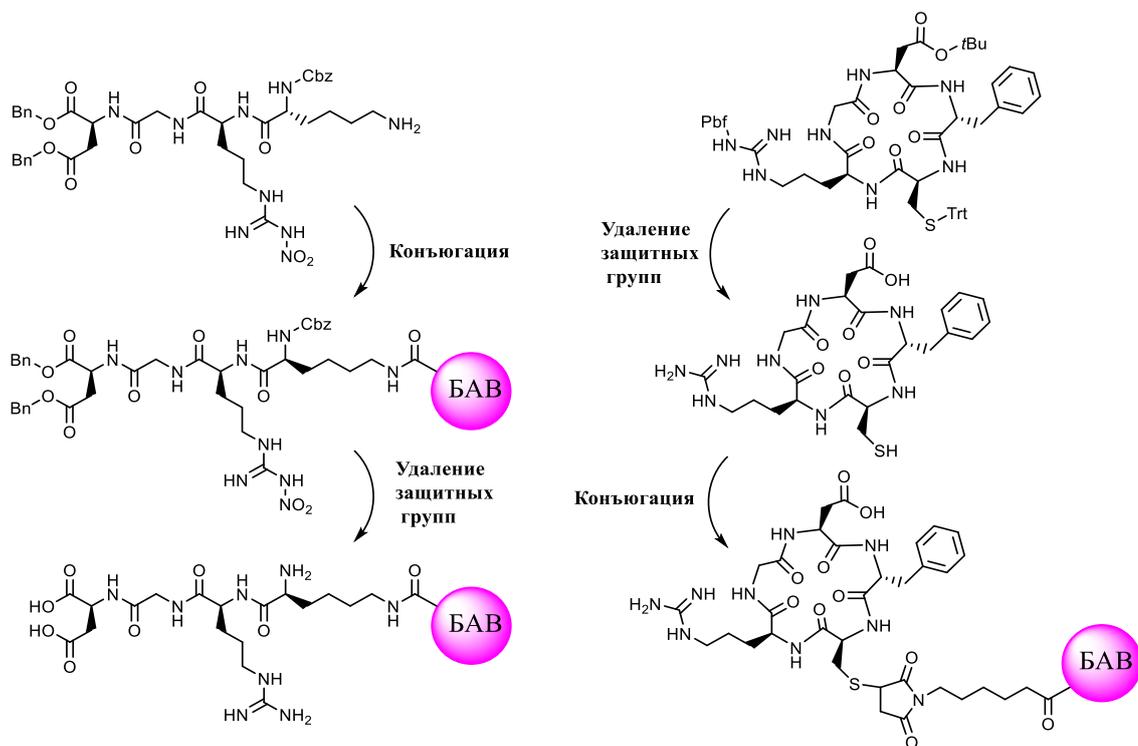


Схема 1.3

1.3 Конъюгаты RGD-пептидов с флуоресцентными метками

Используя свойство опухолевых клеток сверхэкспрессировать на своей поверхности интегрин $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$, можно добиться селективного накопления производных RGD-пептида в опухолевых тканях [43]. Исследуются производные, содержащие изотопные [44-46], флуоресцентные [47-49] или магнитоконтрастные метки [50-53], цитостатические препараты [54, 55] или препараты для фотодинамической терапии [56, 31]. Таким образом производные RGD-пептида могут служить удобной синтетической платформой для создания новых препаратов диагностики и таргетной терапии опухолевых заболеваний.

Примером функциональных молекул, широко используемых в биомедицинских исследованиях и конъюгируемых с RGD-пептидом, являются флуоресцентные красители: цианиновые, нафталимидные, пиреновые, флуоренильные, хинолиновые и др. [57-66] (рисунок 1.3).

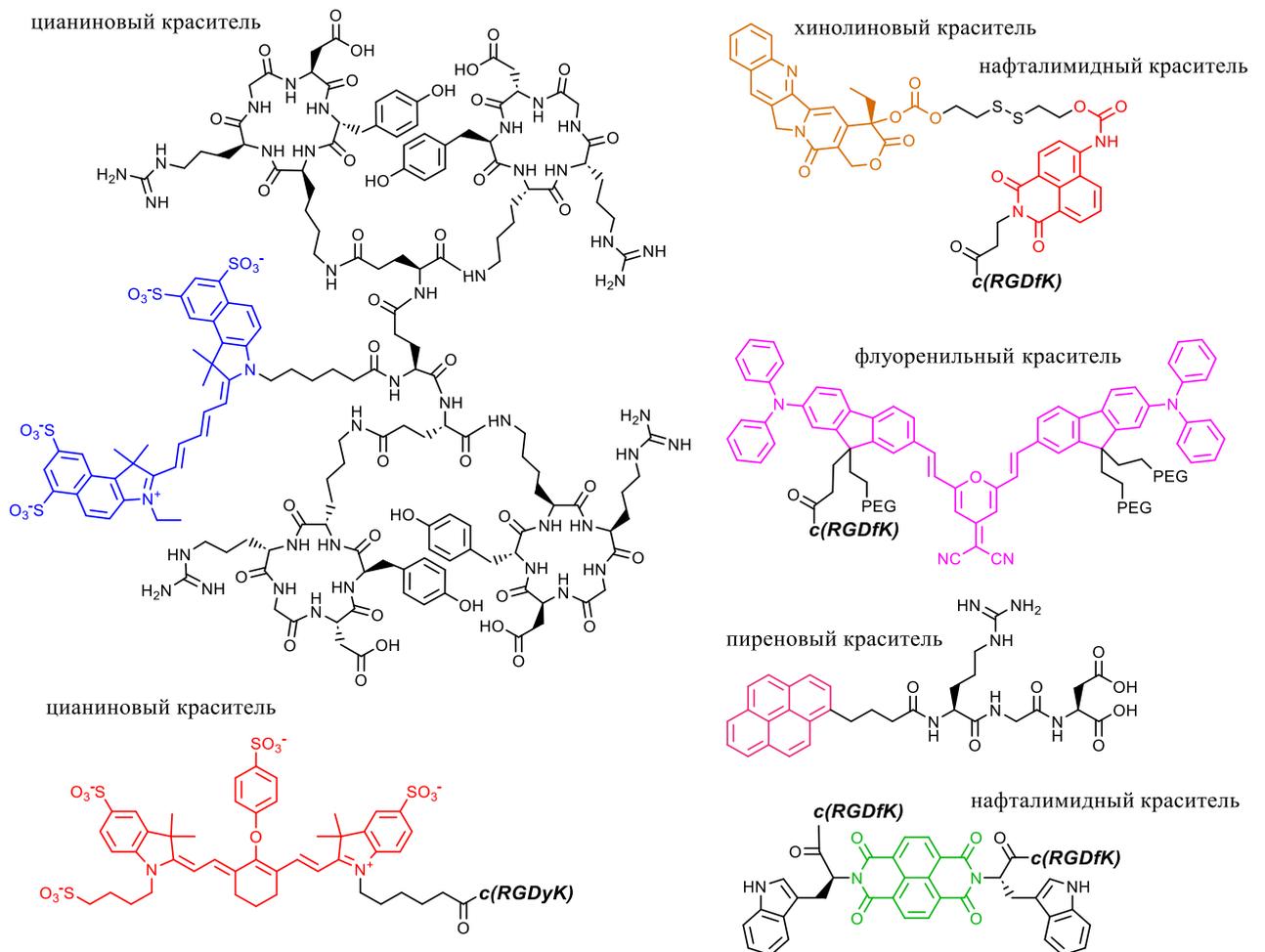


Рисунок 1.3 – Примеры конъюгатов RGD-пептида с флуоресцентными красителями.

Достижения в области биофотоники и химической биологии позволили значительно продвинуться в понимании клеточной активности и клеточных функций, а также диагностики заболеваний и их происхождения на субклеточном уровне [67-70]. Для подобных исследований требуются эффективные материалы, которые позволяют детектировать

химические и биохимические реакции с помощью оптических сигналов [71-73]. В этом отношении многообещающей является стратегия флуоресцентного мечения с использованием оптических агентов [74-76]. Флуоресцентные материалы могут излучать свет после возбуждения за счет поглощения энергии от внешнего источника [76]. Широкий диапазон излучения флуоресцентных материалов делает их удобными для применения в качестве меток [77-79]. В целом, методы мечения, основанные на флуоресценции, благодаря их высокой чувствительности, разрешению и специфичности являются удобными инструментами для обнаружения и анализа сложных биологических и материальных систем, основанных на взаимодействиях света и вещества [80].

Для достижения высокого выхода флуоресценции, метки должны быть яркими и фотостабильными. Кроме того, желательны свойства, такие как химическая инертность, биосовместимость, низкая фотодеградация и низкая цитотоксичность, для широкого применения в биофотонике [81]. Флуоресцентные красители экономически выгодны благодаря их относительно невысокой стоимости, высокой чувствительности, яркости и широкого спектра рабочих длин волн [82]. Однако многие из применяемых красителей имеют ограничения в применении из-за их выраженной фотодеградации, химической нестабильности, ограниченной растворимости в водной среде, несовместимости с исследуемыми химическими и биологическими системами [83].

Применение флуоресцентных красителей в основном представляет интерес для молекулярного мечения в диагностике, флуоресцентной хирургии, гистологии и клеточных технологиях (рисунки 1.4 и 1.5) [84-86].

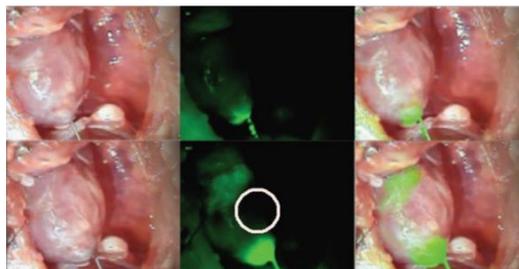


Рисунок 1.4 – Доклиническая хирургия под визуальным контролем локализации сосудистой сети в сердце крысы [87].

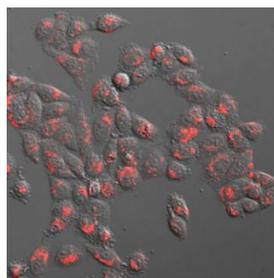


Рисунок 1.5 – Мечение клеток HeLa набором для маркировки LuminiCell Tracker 670-Cell [88].

Введение векторной молекулы в виде RGD-пептида позволит достичь специфического накопления и удержания флуоресцентного производного на поверхности опухолевых клеток, экспрессирующих интегрины $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ [66]. При подборе оптимальной флуоресцентной метки под конкретные биологические задачи, можно добиться нацеливания такого конъюгата на опухолевые клетки и их визуализации.

1.4 Конъюгаты RGD-пептидов с соединениями бора

Еще одним примером функциональных молекул, которые используются для конъюгации с производными RGD-пептида, являются соединения бора, потенциальные агенты для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) [89-93], принцип которой основан на свойстве изотопа ^{10}B с высокой эффективностью захватывать тепловые нейтроны, образуя возбужденное ядро изотопа $^{11}\text{B}^*$, которое сразу распадается на два стабильных ядра: α -частицу (^4He) и ядро лития (^7Li) (рисунок 1.6).

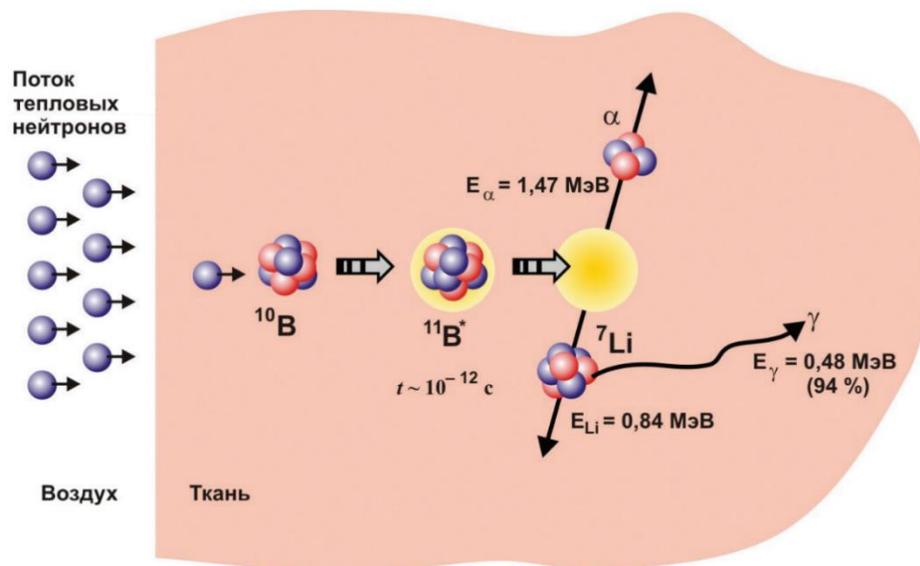


Рисунок 1.6 – Физический принцип БНЗТ [94].

Если эта реакция происходит в ткани, обе частицы эффективно разрушают клетки благодаря их свойству высокой линейной передачи энергии. Из-за небольшого пробега обеих частиц в ткани (около 5–9 мкм), повреждение клеток остается почти полностью ограниченным теми клетками, которые содержат атомы ^{10}B . Соседние клеточные элементы, не содержащие бора, не будут повреждены. Следовательно, если ^{10}B будет селективно накоплен опухолевыми клетками, возможно целевое разрушение злокачественных клеток при сохранении здоровых тканей [95]. Таким образом, идея БНЗТ состоит в том, чтобы обеспечить терапевтический эффект за счет разрушения исключительно опухолевых тканей. Для выполнения этого принципа требуется соединение, которое избирательно, с достаточно высокими концентрациями, накапливает ^{10}B в опухолевых клетках или близко к ним и не токсично для здоровых клеток.

высокой химической стабильностью, а для их образования применяют различные методы активации карбоксильной группы, например с использованием конденсирующих агентов [89] (схема 1.4), или через образование хлорангидридов [111] (схема 1.5), или с использованием метода смешанных ангидридов [112] (схема 1.6).

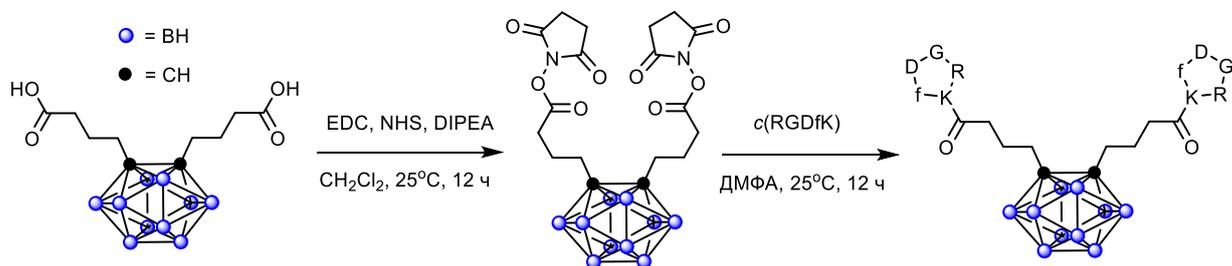


Схема 1.4

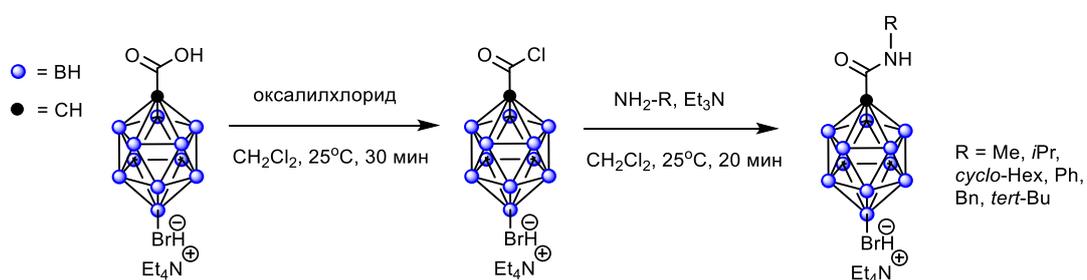


Схема 1.5

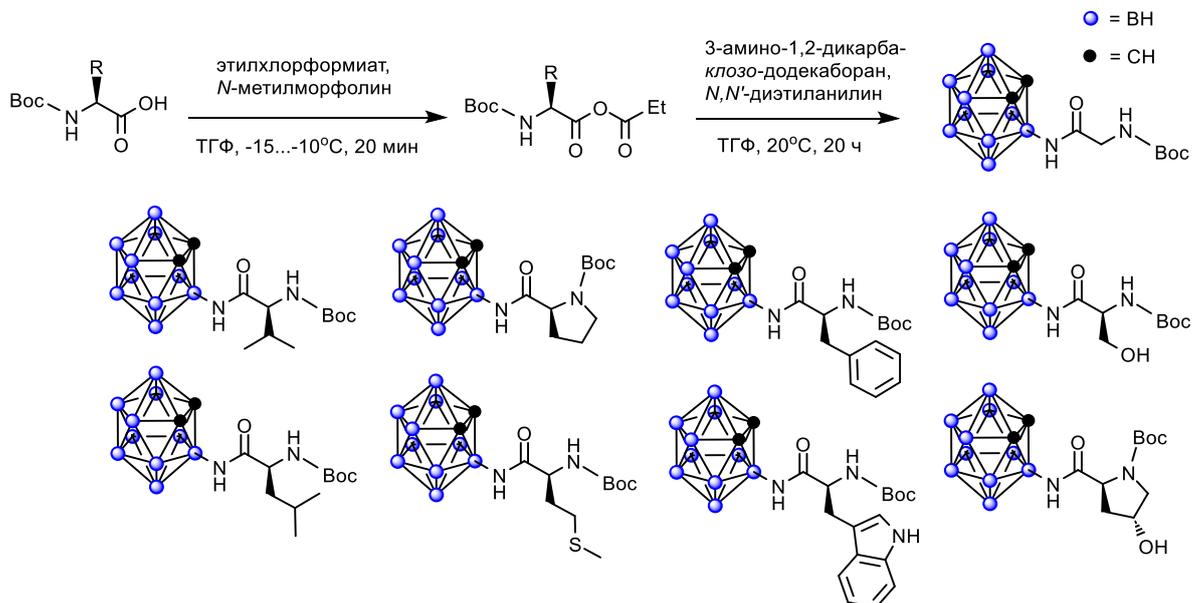


Схема 1.6

Также для конъюгирования карборанов с другими молекулами используют реакцию присоединения с образованием тиоэфирной связи. Тиоэфиры, как и амиды, обладают относительно высокой химической стабильностью, однако в ходе реакции возможно образование побочных продуктов, таких как дисульфиды и сульфоксиды. Чаще всего используется метод образования тиоэфирной связи взаимодействием малеимидной и меркаптогруппы [89] (схема 1.7).

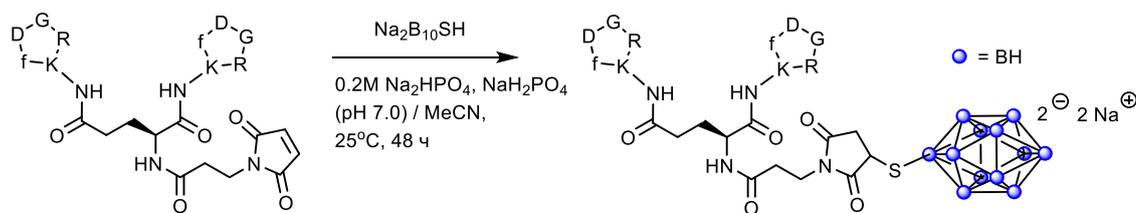


Схема 1.7

Реже используется метод образования тиозфирной связи конденсацией галогеналканов и тиолов [113] (схема 1.8).

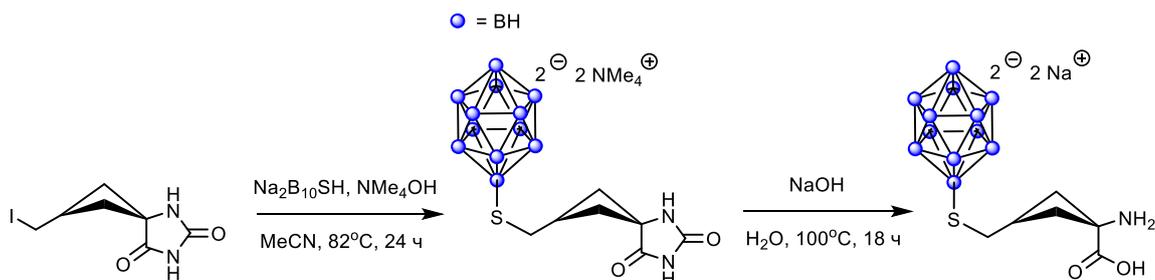


Схема 1.8

Для конъюгации карборанов используют и дисульфидную связь, образующуюся в результате замещения других дисульфидов [114] (схема 1.9), однако несимметричные дисульфиды нестабильны и чувствительны к действию восстановителей.

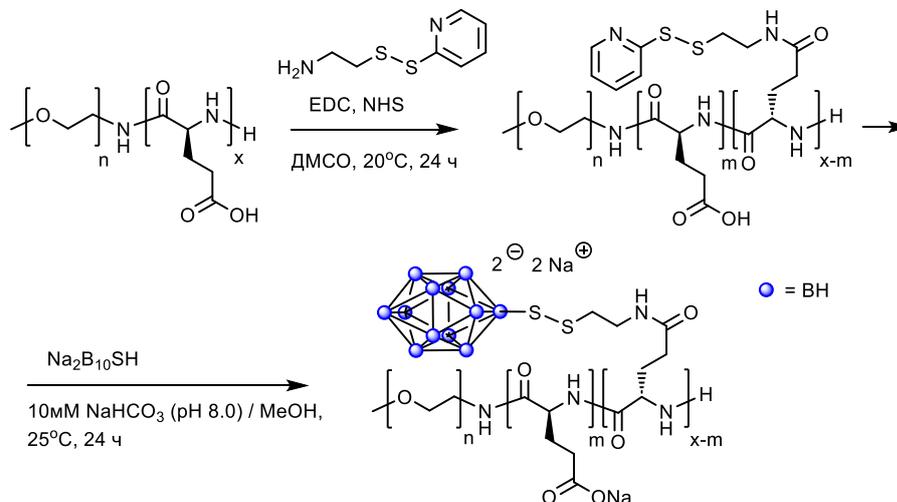


Схема 1.9

Также часто используется реакция азид-алкинового циклоприсоединения с образованием 1,2,3-триазольного цикла (с различными вариантами катализа) благодаря ее высокой скорости протекания с высокими выходами, слабого влияния заместителей и других функциональных групп, а также совместимости с широким спектром растворителей. В работе [115] использован метод Cu-катализируемой циклизации (схема 1.10).

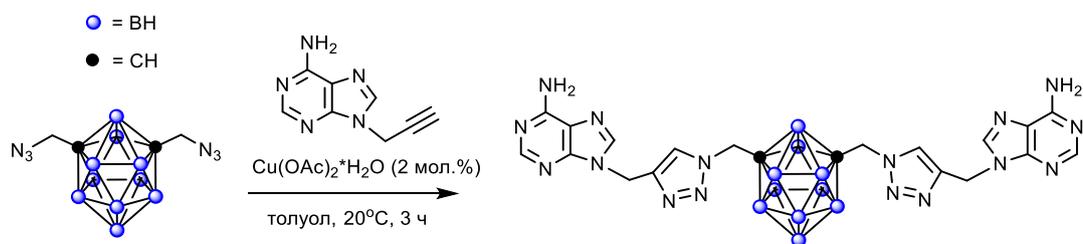


Схема 1.10

В синтезе борсодержащих производных используют и другие типы реакций присоединения с образованием углерод-углеродных связей [116, 117], простых, сложных и тиоэфиров [97], оксимов [118], карбаматов [119], азометинов [120], гидразонов [121], уреидов [97] и др., но такие работы встречаются гораздо реже.

1.5 Конъюгаты RGD-пептидов с наночастицами

Другим примером функциональных меток, которые можно ковалентно связать с RGD-пептидом, могут служить магнитные наночастицы с модифицированной поверхностью [122-125].

МНЧ часто служат основой для создания препаратов для диагностики и терапии опухолевых заболеваний [126-129] благодаря наличию у них высоких значений удельной намагниченности, низкой токсичности и хорошей биосовместимости [130]. Так, МНЧ на основе Fe, оксидов железа $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ и Fe_3O_4 , ферритов Co, Zn и др. способны выступать в качестве эффективных T₂- и T₁-контрастных агентов при проведении магнито-резонансных исследований [131, 132], применяться в терапии опухолевых заболеваний (методы магнитной гипертермии [133, 134]), в качестве магнитоуправляемой системы доставки препаратов [135], а также для магнитного мечения клеток [136, 137]. Эффективность магнитных материалов может быть существенно повышена при использовании их конъюгатов с векторными молекулами – антителами, пептидами, олигонуклеотидами, олигосахаридами, фолиевой кислотой и др., которые обеспечивают их адресную доставку и удержание в опухоли [138-141].

1.5.1 Методы синтеза МНЧ Fe₃O₄

Существует несколько способов синтеза МНЧ на основе Fe₃O₄ (рисунок 1.8).

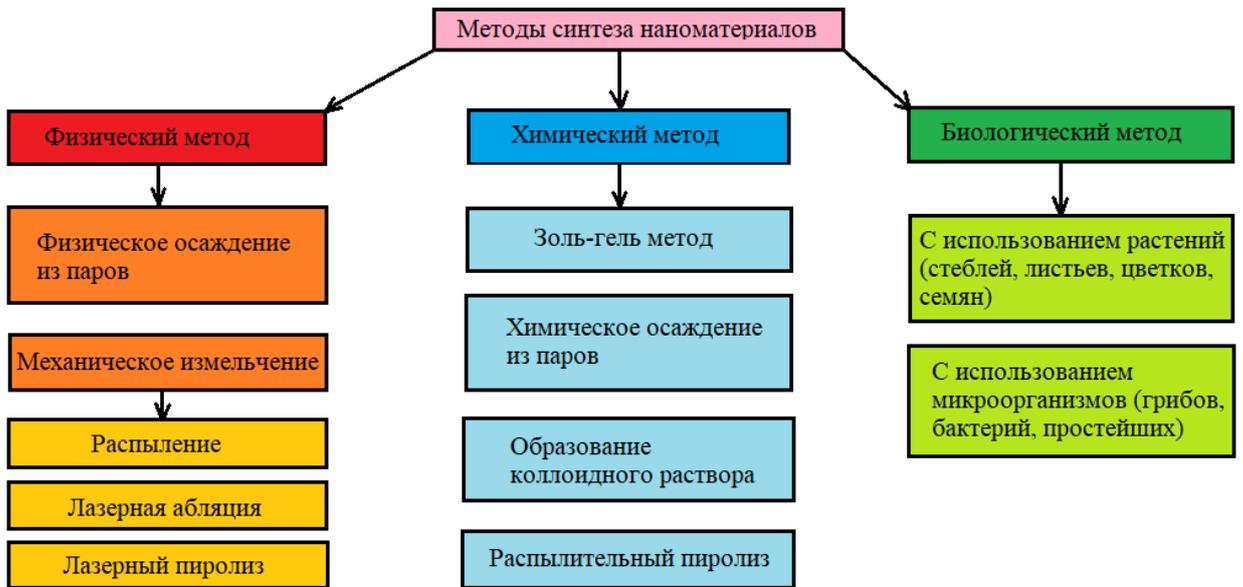


Рисунок 1.8 – Методы синтеза МНЧ Fe_3O_4 [142].

Методы химического синтеза наиболее просты и удобны, позволяют контролировать различные свойства МНЧ в процессе приготовления, включая форму, размер, кристалличность, коллоидную стабильность, морфологию и магнитные свойства, путем установки различных факторов, таких как наличие стабилизирующего поверхностно-активного вещества, присутствие и концентрация реагентов, pH реакционного раствора, температура, время и т.д. На рисунке 1.9 представлены примеры изображений ПЭМ МНЧ Fe_3O_4 , синтезированных различными химическими методами и имеющими различную морфологию [143].

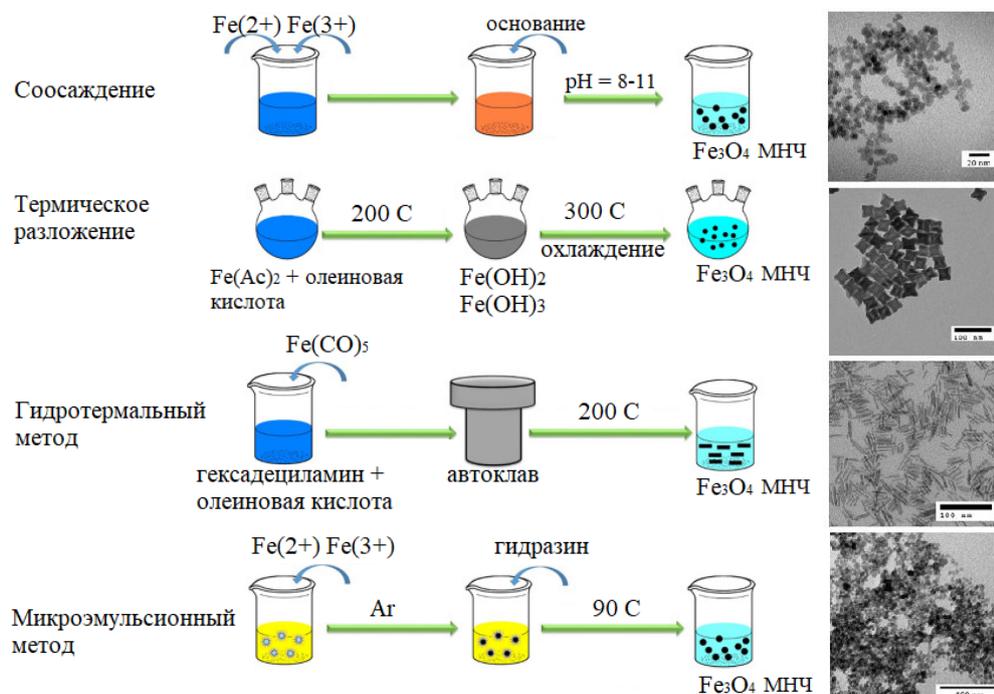


Рисунок 1.9 – Химические методы синтеза МНЧ Fe_3O_4 : соосаждение, термическое разложение, гидротермальный, микроэмульсионный и их изображения ПЭМ [143].

Около 90% МНЧ получают с помощью химических процессов, только 8% с помощью физических методов и 2% с помощью биологических методов, которые включают синтез, опосредованный растениями и микроорганизмами [142].

1.5.2 Методы модификации поверхности МНЧ

Из-за собственной намагниченности, большой поверхностной энергии и высокой доли нескомпенсированных атомов, МНЧ Fe_3O_4 склонны к агрегации. Также они способны окисляться кислородом воздуха в процессе приготовления и хранения. Для предотвращения процессов агрегации и окисления на поверхность МНЧ наносят покрытия с использованием физических или химических методов [143]. Обычно используются следующие методы: модификация низко- и высокомолекулярными неорганическими молекулами, построение нанокompозитных структур [144]. Примеры методов модификации поверхности МНЧ представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Методы модификации поверхности МНЧ.

Тип модификации	Материалы	Преимущества
Неорганический низкомолекулярный	Au, Co, Ni и другие металлы	Модификация SiO_2 и другими оксидами может экранировать взаимодействие между МНЧ, предотвращая их агрегацию и облегчая дальнейшую функционализацию поверхности. В то же время они обладают хорошей биосовместимостью, гидрофильностью и стабильностью. Инкапсуляция позволяет синтезировать композитные частицы со структурой ядро-оболочка, придавая МНЧ полезные физические свойства.
Неорганический высокомолекулярный	C, SiO_2 и другие оксиды	
Органический низкомолекулярный	Спирты, карбоновые, фосфо- и сульфокислоты, конденсирующиеся производные Si, липофильные вещества	Введение стабилизаторов различной природы позволяет получать амфифильные МНЧ. Модификация ПАВ помогает контролировать размер и форму наночастиц, а также изменять поверхностные свойства и свойства коллоидов. Модификация силановыми агентами позволяет вводить реакционноспособные группы на поверхность наночастиц и обеспечивает возможность их дальнейшей функционализации.
	Олеат Na, декстрины, аминокислоты	
Органический высокомолекулярный	Углеводы, пептиды и др. природные полимеры	Природные биомолекулы обладают хорошей биоразлагаемостью и биосовместимостью, значительно улучшая фармакокинетику МНЧ и придавая им биологическую активность. Модификация синтетическими полимерами легко проводится и может придать материалу
	Синтетические полимеры	

		множество различных свойств для удовлетворения конкретных требований.
Нанокompозитный	Построение core-shell, shell-core, диффузных и сэндвичных структур	Построение сложных композитных структур позволяет изменять и комбинировать свойства предыдущих методов, увеличивать сорбционную емкость материалов

Наночастицы, полученные по типу ядро-оболочка обладают рядом преимуществ над другими структурами. Оболочка позволяет экранировать взаимодействие между МНЧ, снижая их агломерацию, защищает ядро от действия реагентов и от окисления кислородом воздуха. Относительно других материалов, структура ядро-оболочка проста в получении (one-step метод) и обладает лучшими гидродинамическими характеристиками [145].

Самым распространенным и удобным является нанесение SiO_2 покрытия на ядро МНЧ путем гидролиза тетраалкоксисиланов в водно-органических средах [146] (схема 1.11). Помимо удобства нанесения, оболочка SiO_2 обладает биосовместимостью, гидрофильностью и высокой химической стабильностью. Также на поверхность оболочки к Si-OH группам могут быть ковалентно присоединены или нековалентно сорбированы функциональные молекулы и лекарственные препараты [147].

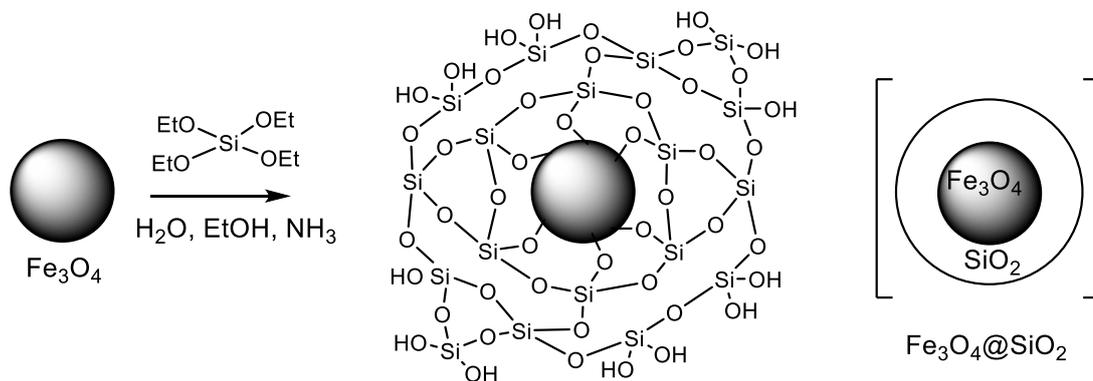


Схема 1.11

Ввиду относительной химической инертности поверхностных Si-OH групп, возникает необходимость дополнительной модификации поверхности МНЧ, покрытых SiO_2 , для дальнейшего ковалентного присоединения к ним функциональных агентов. Наиболее интересным методом представляется поверхностная модификация производными алкоксисиланов [148]. Такая модификация не сильно увеличивает размер нанообъекта, конденсация на поверхности идет ковалентно, сохраняется биосовместимость, гидрофильность, стабильность, а также магнитные свойства частиц. После модификации алкоксисиланы образуют сшитый силоксановый слой с функциональными группами, покрывающий поверхность наночастиц (схема 1.12). Впоследствии, за счет взаимодействия с поверхностными реакционноспособными группами: альдегидной, акрилатной, изоцианатной,

тиольной, гидроксильной, карбосильной, циано-, аминогруппой (рисунок 1.10), МНЧ могут быть легко конъюгированы с функциональными молекулами [149, 150].

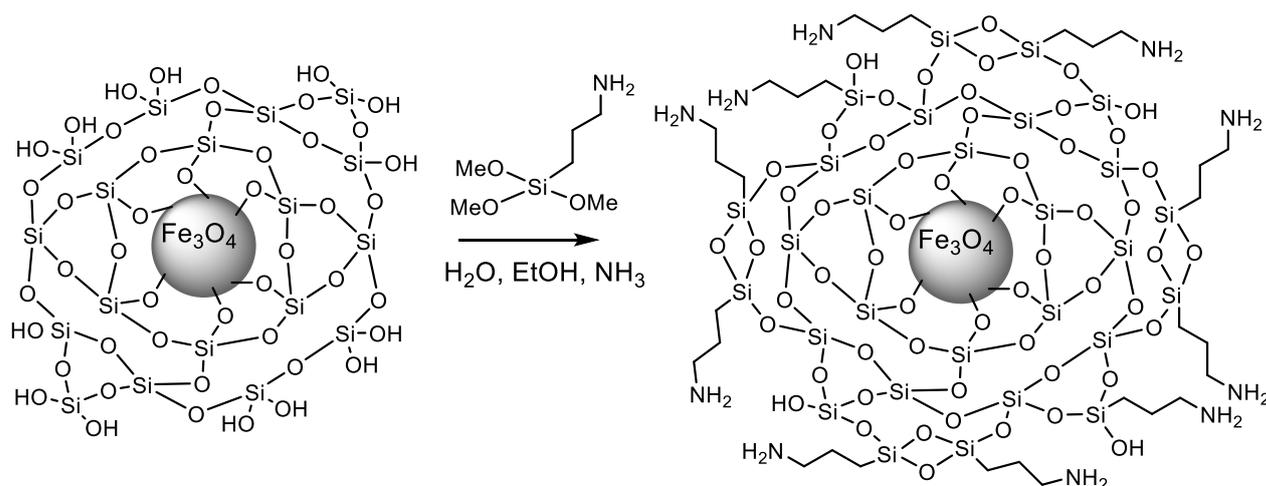


Схема 1.12

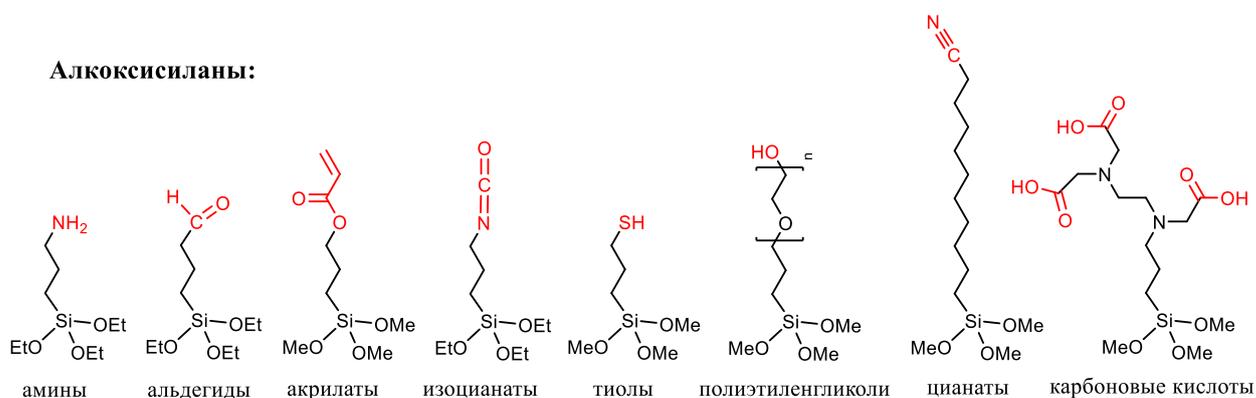


Рисунок 1.10 – Примеры алкоксисиланов, используемых для модификации поверхности МНЧ.

1.5.3 МНЧ как платформа адресной доставки препаратов

Развитая пористая поверхность силиконов может служить платформой для сорбции различных биологически активных соединений, таких как противоопухолевые препараты: доксорубин [151-154], гентамицин [155, 156], паклитаксел [157, 158], камптотецин [152], эпирубин [159] и др. Имобилизация препаратов в наноматериалах может быть проведена нековалентно (за счет Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных связей и электростатических взаимодействий) или ковалентно. Нанесение вторичной оболочки позволяет инкапсулировать сорбированный препарат и предотвратить его преждевременное высвобождение. Ковалентное закрепление осуществляется путем образования ковалентных связей между поверхностными функциональными группами МНЧ и иммобилизуемым соединением [160] (рисунок 1.11).

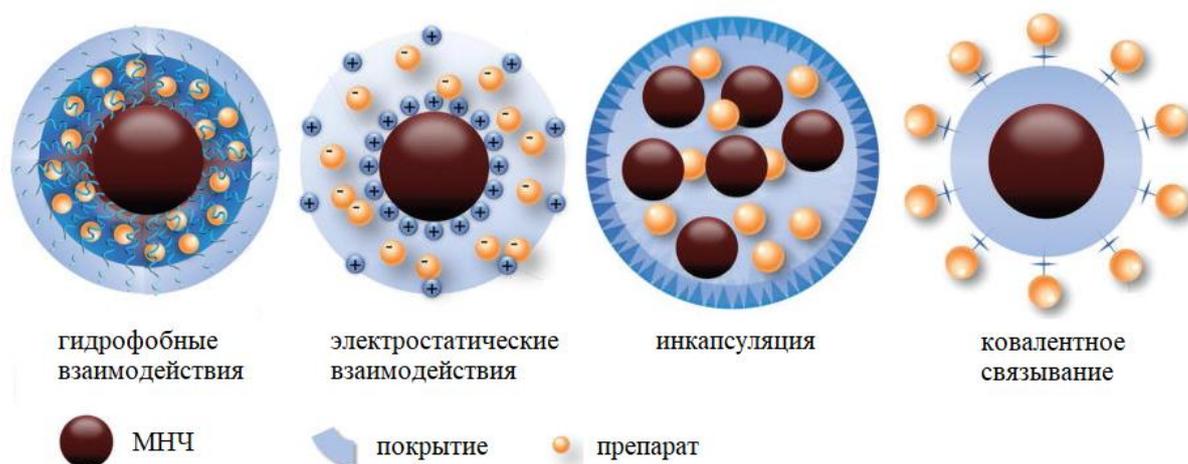
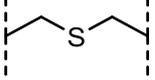
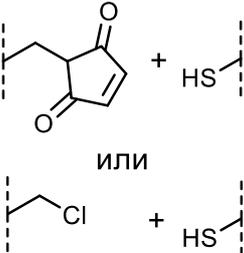
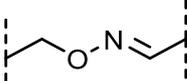
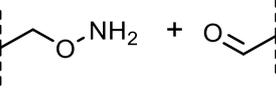
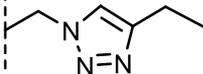
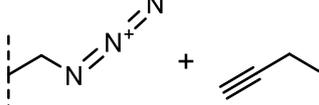


Рисунок 1.11 – Механизмы удерживания препаратов в модифицированных МНЧ [160].

Существует множество типов ковалентного связывания молекулярного вектора или препарата с платформой, отличающихся по природе образуемой связи, условиям проведения реакции и обратимости присоединения [161, 162]. В таблице 1.2 приведены наиболее часто используемые варианты иммобилизации.

Таблица 1.2 – Методы ковалентного связывания препаратов на поверхности наноматериалов.

Образуемые соединения	Используемые группы препарата и платформы	Особенности
Сложные эфиры [163-165] 		Низкий выход продукта, связь лабильна в биологических условиях.
Гидразоны [166-169] 		Связь разрушается при pH < 5.
Карбаматы [170-173] 		Связь разрушается под действием кислот и восстановителей. В клетках – под воздействием редуктаз и глутатиона.
Дисульфиды [174-176] 		Связь разрушается под действием восстановителей. Несимметричные дисульфиды нестабильны.
Амиды [172, 177-179] 		Связь трудно разрушается.

Тиоэфиры [180] 		Нет высвобождения препарата, образуются побочные продукты дисульфида и сульфоксидов.
Оксимы [166, 181-183] 		Высокий выход продукта, нет высвобождения препарата.
Триазолы [184] 		Высокий выход продукта, нет высвобождения препарата.

Наноконпозиты, нагруженные биоактивными соединениями, могут выступать в роли платформы адресной доставки лекарственного препарата с контролируемым высвобождением. Адресная доставка осуществляется с помощью введения векторов – соединений природного (олигонуклеотиды, пептиды (в частности семейства RGD (рисунок 1.12), олигосахариды, антитела и др.) или синтетического происхождения, способных специфически связываться с молекулярной мишенью (рецептором). При системном введении, за счет аффинности происходит селективное связывание и накопление материалов, имеющих в своем составе молекулу вектора, в тканях, содержащих доступную мишень. Такой подход позволяет увеличить концентрацию препарата в активном центре, снизить получаемую дозу и тем самым улучшить терапевтический индекс [185-187].

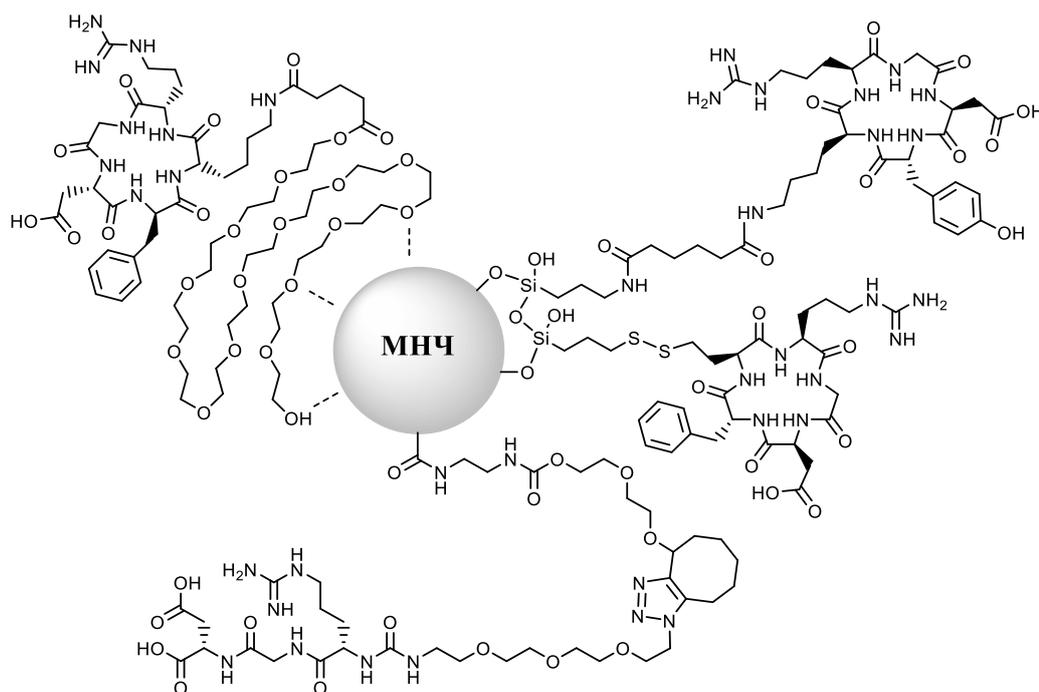


Рисунок 1.12 – Примеры закрепления на МНЧ производных RGD-пептида.

Для ковалентного закрепления пептидных векторов на наночастицах наиболее часто используют карбоксильную и аминогруппу с образованием амидов [24, 188] (схема 1.13) или аминогруппу с образованием оксимов [184] (схема 1.14).

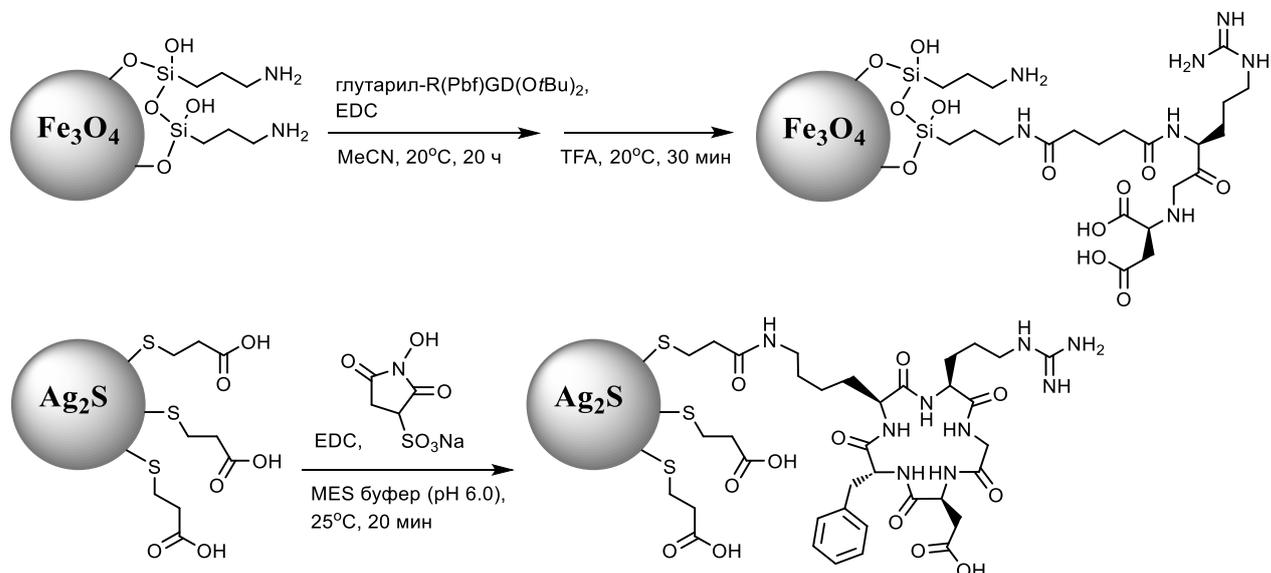


Схема 1.13

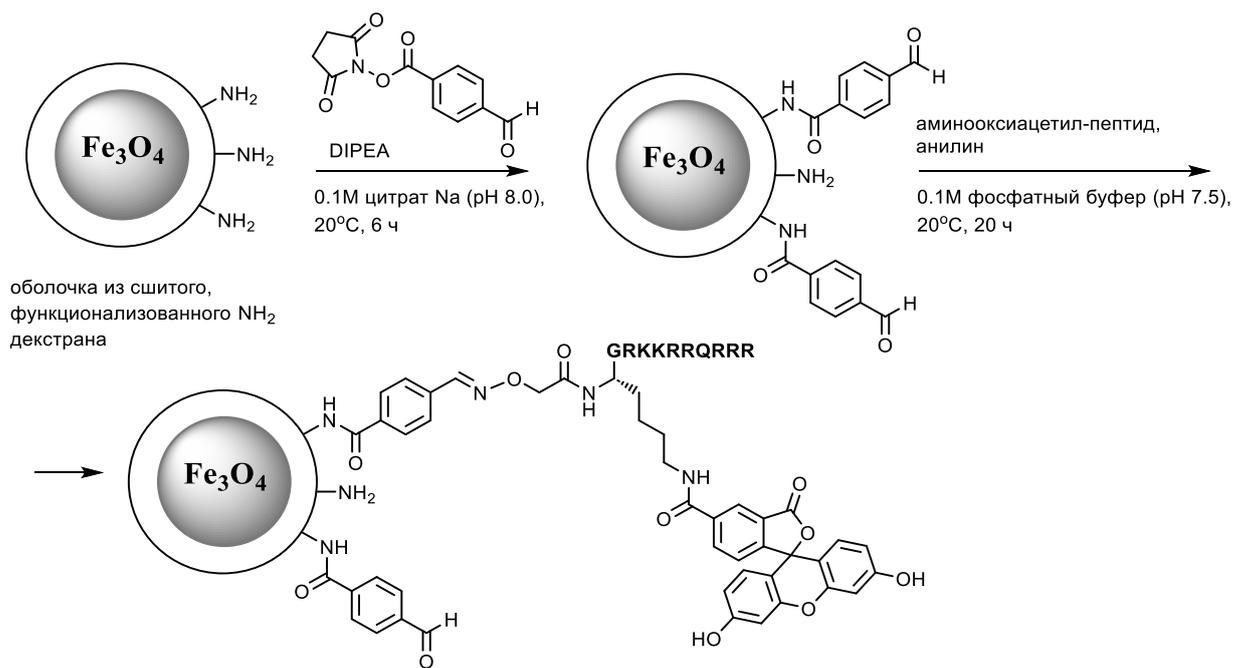


Схема 1.14

Связывание пептидов также проводят через меркаптогруппу с образованием тиоэфиров [189] (схема 1.15).

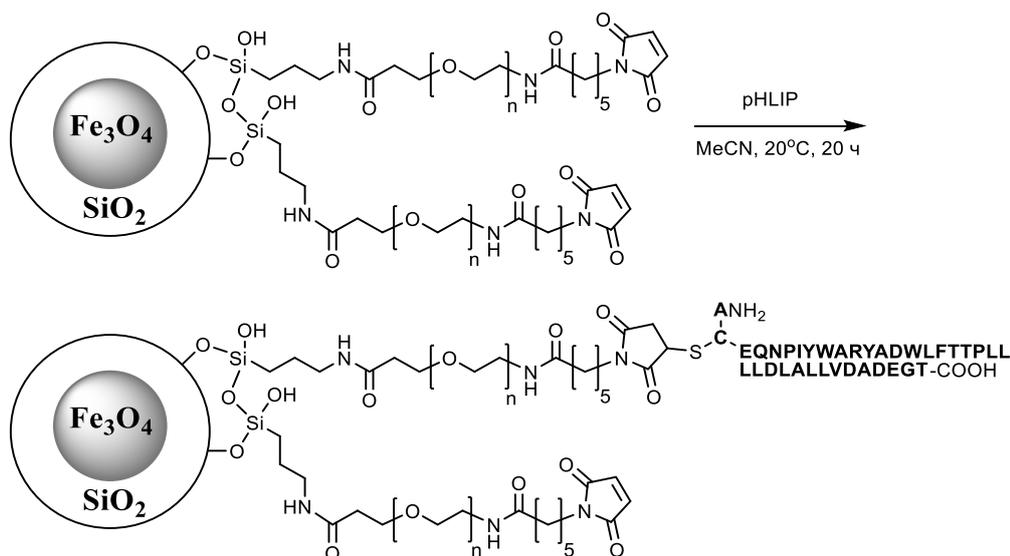


Схема 1.15

Используя различные конструкции нанокомпозитов, можно контролировать высвобождение загруженных соединений в ответ на внешние условия: pH, редокс-потенциал, температура, присутствие ферментов (воздействие гидролаз и редуказ в клетках), фотостимуляция (фотодинамическая терапия), акустическая стимуляция (воздействие ультразвуком), магнитное поле (магнитная гипертермия и магнитное удерживание) и др. [190-193].

Изменяя размер и форму наночастиц [194], а также модифицируя их поверхность [195-197], можно снизить опсонизацию и тем самым уменьшить захват и выведение нанокомпозитов из кровяного русла системой макрофагов [198, 199]. Что в результате приводит к уменьшению неспецифического захвата тканями, несодержащими молекулы-мишени, и к увеличению периода элиминации нанокомпозитов из организма [160].

Таким образом, в настоящее время проводится большое количество исследований, направленных на получение производных RGD-пептида, как потенциальных средств терапии и диагностики онкологических заболеваний. Однако, серьезной проблемой использования полученных соединений являются ограничения их применения из-за химической нестабильности или нестабильности в биологических средах, ограниченной водорастворимости, несовместимости с исследуемыми химическими и биологическими системами и др. Поэтому получение производных RGD-пептида и разработка методов их конъюгации с функциональными молекулами или МНЧ является актуальной задачей.

Глава 2 Обсуждение результатов

2.1 Синтез линкерсодержащих производных RGD-пептида

Для получения целевых пептидов были использованы методы классического пептидного синтеза в растворе. Синтез пептидов начинали с *C*-конца, исходя из алкиловых эфиров Asp путем последовательного присоединения *N*-защищенных производных Gly и Arg (схема 2.1) [37, 200]. Для сохранения специфичности связывания полученных пептидов с поверхностными рецепторами опухолевых клеток необходимо, чтобы после конъюгации их с функциональными молекулами или наночастицами гуанидиновая группа Arg и β -карбоксыльная группа Asp остались свободными [26]. Поэтому защита этих групп подбиралась так, чтобы они не были задействованы в ходе синтеза. При этом были использованы три подхода к защите боковых функциональных групп, отличающиеся по методу деблокирования конечных соединений. Для предотвращения стерического взаимодействия молекулярного вектора и конъюгируемого с ним объекта, вводили линкер (спэйсер), который пространственно отдаляет функциональные части конъюгата. При этом сам линкер является менее объемным фрагментом и дополнительно упрощает синтетическую задачу соединения вектора с рассматриваемыми объектами [201].

Синтез дипептидов **1–5** (схема 2.1) осуществляли с использованием коммерчески доступных защищенных аминокислот или синтезированных самостоятельно по известным методикам [202-204].

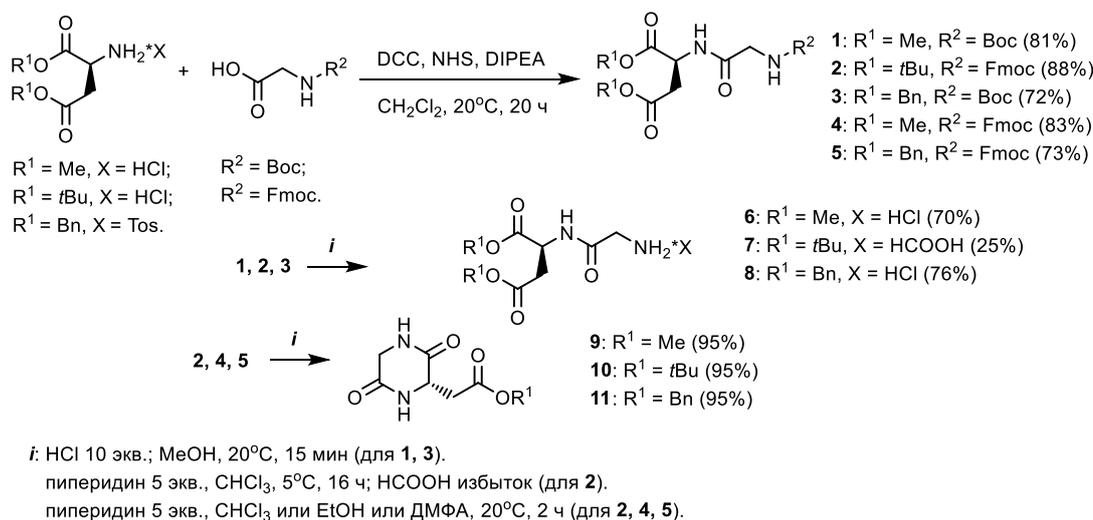


Схема 2.1

Удаление Fmoc-группы дипептидов **2, 4, 5** пиперидином сопровождалось образованием побочных продуктов 2,5-дикетопиперазинов **9–11** (схема 2.1). По всей видимости, протекание реакции определяется образованием свободной аминогруппы глицина, которая благодаря своей высокой нуклеофильности атакует карбонильный атом α -сложноэфирной группы

аспарагиновой кислоты. Циклизация проходила почти полностью (95%) и необратимо, выпадал осадок.

Для метиловых и бензиловых эфиров проблему образования 2,5-дикетопиперазинов удалось обойти, заменив защиту аминогруппы глицина с Fmoc на Boc, удаляемую ацидолизом. Соединения **6** и **8** выделялись в виде гидрохлоридов, которым циклизация не свойственна. В случае использования *трет*-бутиловых эфиров, такой подход невозможен из-за их гидролиза в условиях удаления Boc-защиты. Однако для соединения **2** оптимизация условий удаления Fmoc-группы (снижение температуры с 20 до 5 °С и увеличение времени реакции с 2 до 16 ч) всё же позволила выделить целевой продукт **7** в виде формиата с выходом 25%.

Для синтеза трипептидов **14–16** дипептиды **6–8** конденсировали с защищенными производными Arg **12**, **13**. Затем удаляли защиту α -аминогруппы Arg пиперидином (для **14**, **15**) или соляной кислотой (для **16**) и вводили линкер (глутаровую кислоту) путем конденсации трипептидов **17–19** с глутаровым ангидридом (схема 2.2).

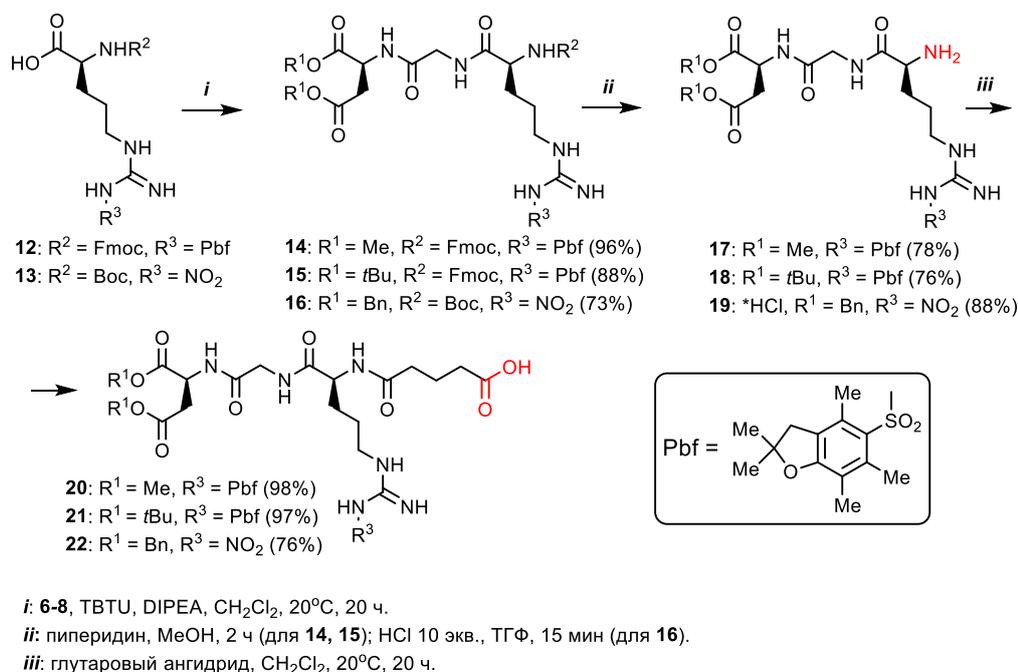


Схема 2.2

На стадиях синтеза дипептида Boc-Gly-Asp-(OMe)₂ (**1**) и трипептида Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-Asp-(OMe)₂ (**14**) был проведен сравнительный анализ конденсирующих реагентов ряда карбодиимидов и ураниевых солей (таблица 2.1). Наиболее эффективными оказались агенты ураниевой природы (TBTU и HBTU).

Таблица 2.1 – Оптимизация синтеза синтеза дипептида **1** и трипептида **14**.

Конденсирующий агент	Дипептид 1 (схема 2.1)		Трипептид 14 (схема 2.1)	
	Выход ¹ , %	Чистота ² , %	Выход ¹ , %	Чистота ² , %
EDC	52	99,8	27	91,4
CMC	15	96,9	9	93,6
DCC	49	93,6	-	-
PyBOP	71	94,2	89	95,4
HBTU	-	-	94	97
TBTU	81	99,1	96	96,5

¹ после очистки флеш-хроматографией; ² по данным ВЭЖХ (Agilent 1100, колонка Kromasil 100-5-C18, подвижная фаза: 70% MeCN – 30% H₂O).

Для синтеза тетрапептидов **25**, **26** трипептид **17** со свободной α-аминогруппой Arg конденсировали либо с Fmoc-Gly-OH (**23**), либо с Fmoc-Lys(Boc)-OH (**24**) [200]. Затем удаляли Fmoc-защиту α-аминогрупп пиперидином и вводили линкер (глутаровую кислоту) путем конденсации тетрапептидов **27**, **28** с глутаровым ангидридом (схема 2.3).

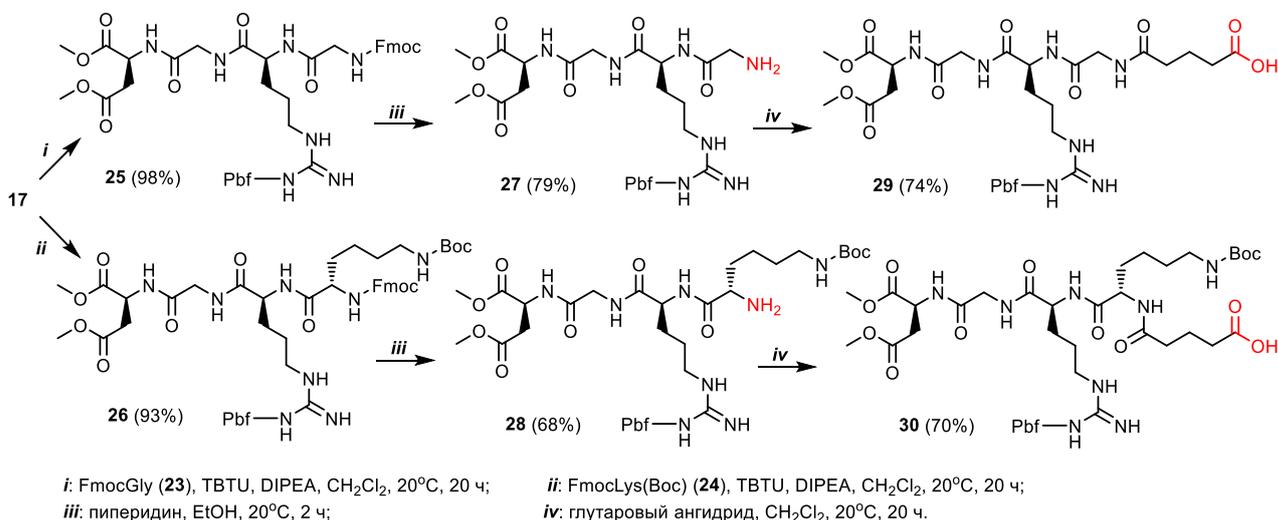


Схема 2.3

В результате разработаны методы получения избирательно защищенных трипептидов **17–19** и тетрапептидов **27** и **28** (имеющих в своем составе свободную аминогруппу, позволяющую проводить конденсацию с карбоксильными группами других молекул), а также новых производных, содержащих линкер – глутаровую кислоту (**20–22**, **29**, **30**) (карбоксильную группу которых можно использовать для конъюгации с другими молекулами, имеющими аминогруппу). Защитные группы боковых цепей аминокислот могут быть удалены на последней стадии. Так, в целевых соединениях *трет*-бутиловые эфиры Asp и Pbf-защита гуанидиновой группы Arg могут быть удалены ацидолизом; бензиловые эфиры Asp и нитрогруппа в Arg – гидрогенолизом; метиловые эфиры Asp и Pbf-защита гуанидиновой группы Arg могут быть удалены последовательно щелочным гидролизом и ацидолизом. Это позволяет проводить конъюгацию данных пептидов с другими биологически активными или

функциональными молекулами, а также наноматериалами региоселективно и без потери специфичности их связывания с опухолевыми клетками.

2.2 Синтез производных RGD-пептида, содержащих флуоресцентные красители

С целью получения новых материалов, которые могли бы быть использованы для специфического окрашивания опухолевых клеток или тканей, нами разработан метод синтеза новых конъюгатов RGD-пептида (в том числе содержащих PEG) с молекулами различных флуоресцентных красителей как использующихся в биологической практике Cyanine5.5, FITC, так и нового производного пиридиныона.

Соединения **17-22**, **27-30** могут быть напрямую конденсированы с молекулами флуоресцентных красителей. Для конденсации использовали флуоресцентные красители, молекулы которых содержали свободные карбоксильные (**31**) или активированные группы (**32** и **33**) (рисунок 2.1).

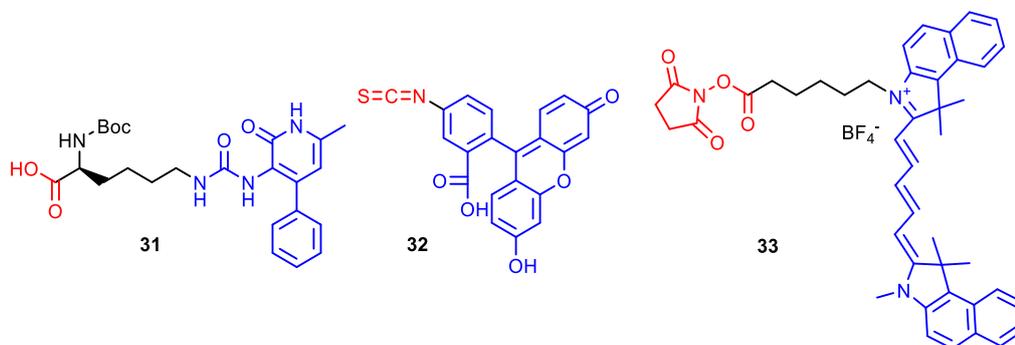


Рисунок 2.1 – Используемые в работе флуоресцентные красители.

В работе был использован новый флуоресцентный краситель **31**, синтезированный в Омском государственном университете под руководством д.х.н. проф. Фисюка А.С. Конъюгат **34** получали конденсацией пептида **18** и производного **31** с использованием конденсирующего агента TBTU. Конъюгат **35** получали конденсацией пептида **18** с изотиоцианатом флуоресцеина **32**. Защитные группы соединений **34** и **35** удаляли в 95% TFA в течение 4 ч при комнатной температуре. Деблокированные соединения **36** и **37** выделяли в виде трифторацетатов (схема 2.4).

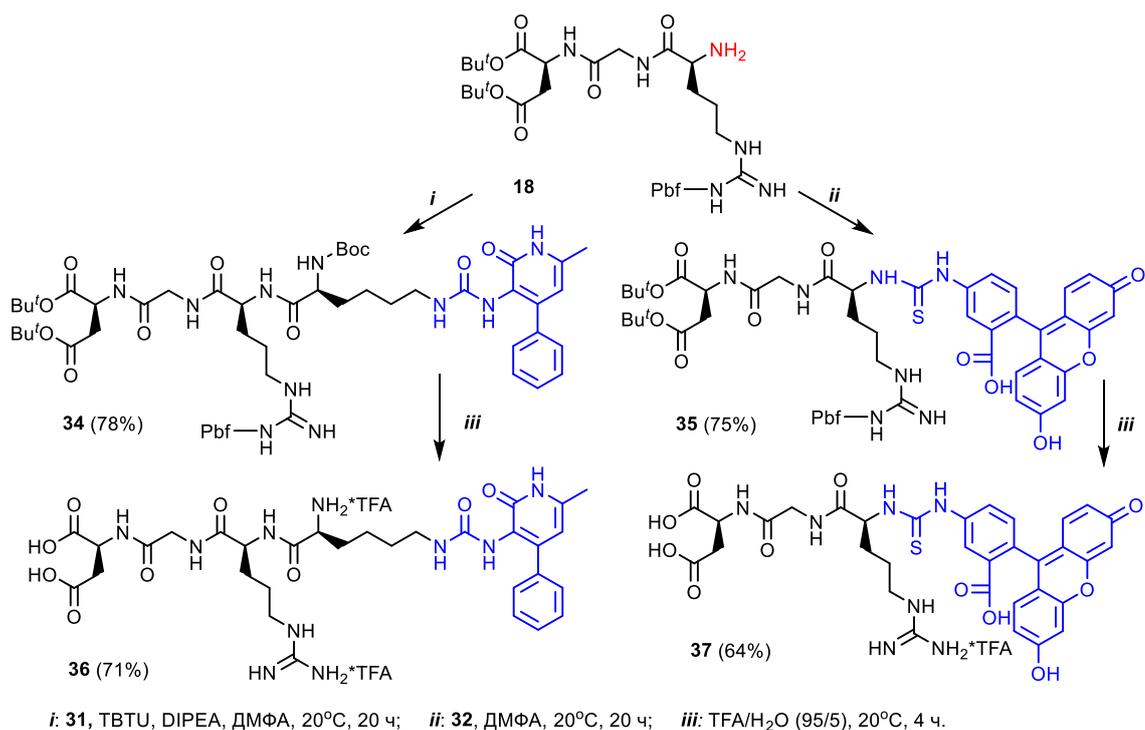


Схема 2.4

Для конъюгата пептида с цианиновым красителем **33** такой синтетический подход оказался неприменим. При конденсации пептида **17** с сукцинимидным эфиром цианинового красителя **33**, получали конъюгат **38**. Щелочной гидролиз метиловых эфиров проводили в среде H₂O/EtOH и получали конъюгат **39**. Однако, далее при удалении Pbf-группы в стандартных условиях с использованием 95% TFA происходило разложение соединения **39** и выделить целевой продукт **40** не удалось (схема 2.5). Кроме того, цианиновый краситель снижал гидрофильность соединений, что могло бы усложнить проведение биологических исследований.

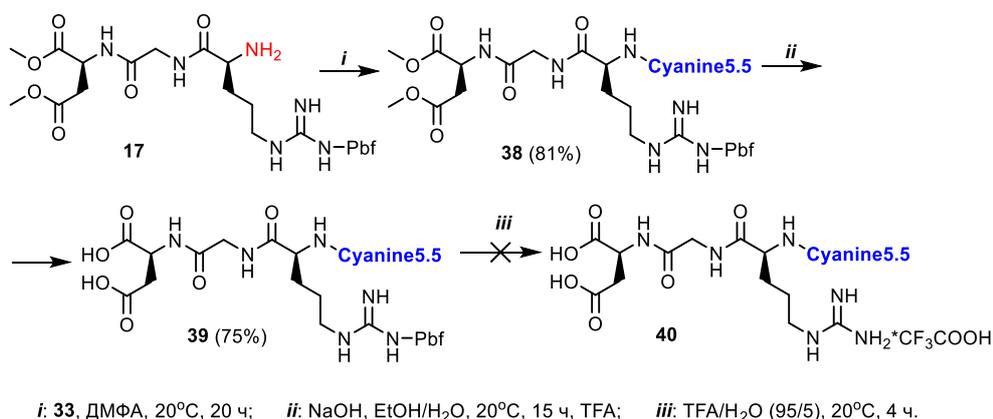
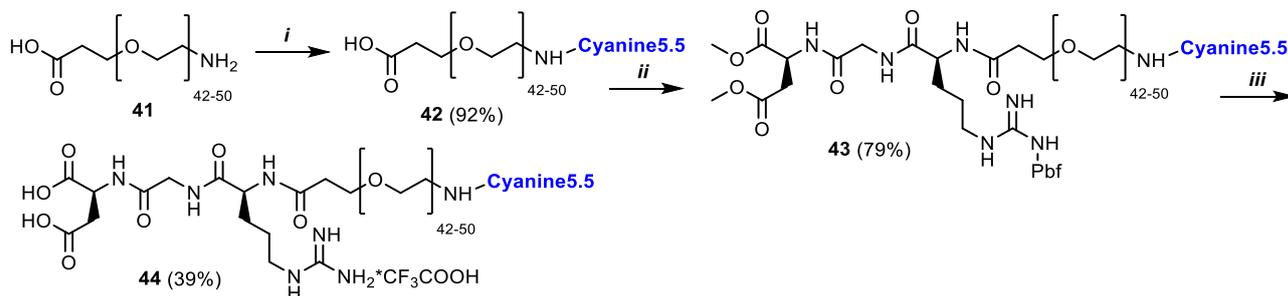


Схема 2.5

Для увеличения кислотостабильности и водорастворимости целевого соединения был разработан подход к синтезу PEG-содержащего конъюгата **43** пептида **17** и Cyanine5.5 с использованием молекулы бифункционального PEG ($M = 2000$ Да) в качестве линкера. Сначала проводили конденсацию PEG **41** с цианиновым красителем **33**, а затем с пептидом **17**.

Деблокирование карбоксильных групп Asp и удаление Pbf-защиты гуанидиновой группы проводили в стандартных условиях без потери флуоресцентных свойств целевого соединения (схема 2.6). Синтезированный конъюгат оказался легкорастворимым в воде [205].



i: 33, ДМФА, 20°C, 20 ч; *ii*: 17, TBUTU, DIPEA, ДМФА, 20°C, 20 ч; *iii*: 1. NaOH, EtOH/H₂O, 20°C, 15 ч; 2. TFA/H₂O (95/5), 20°C, 4 ч.

Схема 2.6

Производное PEG 41 состояло не из одной молекулы, а из гомологического ряда с разным количеством звеньев (n) в цепи со средней молекулярной массой $M = 2000$ Да. Поэтому масс-спектры продуктов представляли собой набор пиков соответствующих гомологов с разным массовым соотношением и были представлены в основном в виде двух- и трехзарядных молекулярных ионов при положительной ионизации методом электрораспыления (ESI-POS). Основное распределение было в диапазоне от $n = 42$ до $n = 50$, остальные гомологи имели массовую долю менее 50% от основного пика ($n = 46$) по данным масс-спектрометрии и не учитывались нами при описании спектров. На рисунке 2.2 для примера приведен масс-спектр соединения 42.

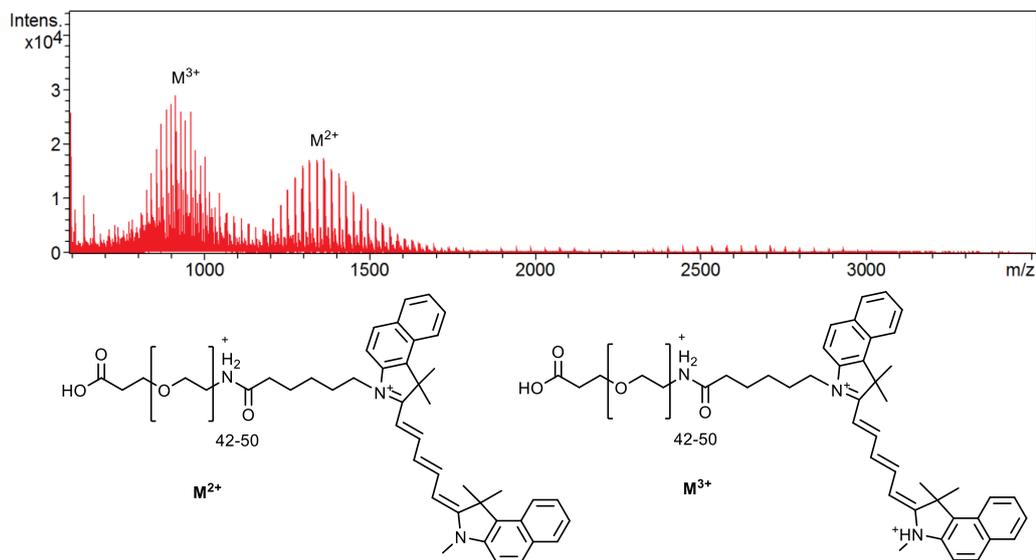


Рисунок 2.2 – Масс-спектр соединения 42.

Спектры поглощения и испускания полученных соединений соответствовали спектрам поглощения и испускания исходных красителей, что говорит о сохранении их флуоресцентных свойств (рисунок 2.3).

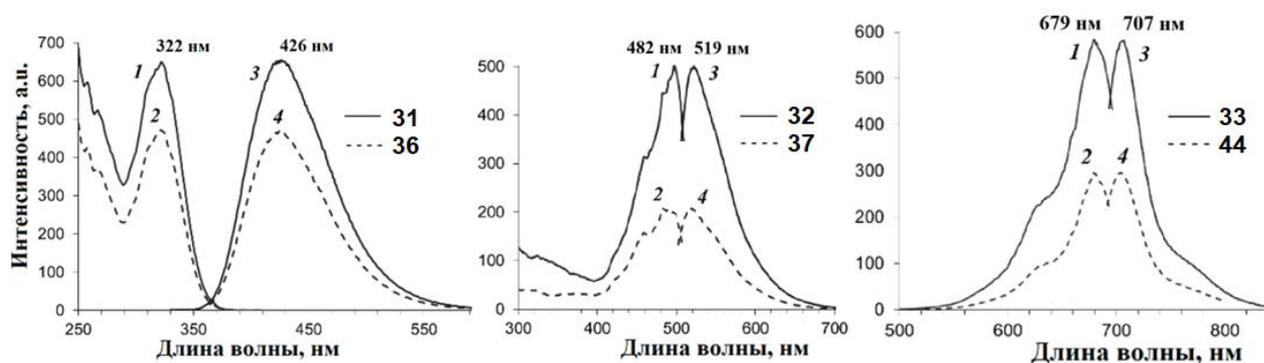
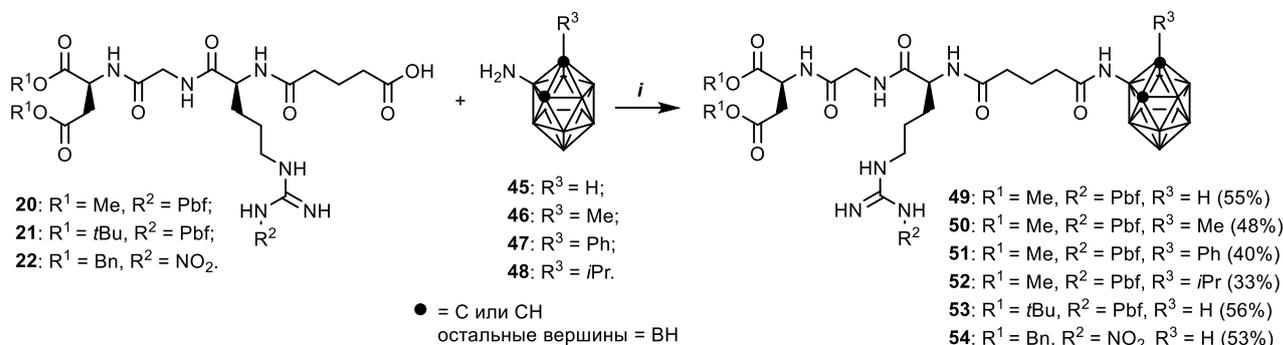


Рисунок 2.3 – Спектры флуоресценции ((1) спектры поглощения и (2) спектры испускания) исходных красителей **31–33** и их конъюгатов **36, 37, 44**.

Таким образом, разработан подход к получению конъюгатов производных RGD-пептида с молекулами различных флуоресцентных красителей. Полученные соединения **36, 37, 44** растворимы в воде, обладают флуоресцентными свойствами, сходными со свойствами исходных красителей, и могут рассматриваться как потенциальные агенты для избирательного мечения опухолевых клеток.

2.3 Синтез производных RGD-пептида, содержащих карбораны

С целью получения материалов, представляющих интерес в качестве агентов для БНЗТ опухолей, разработан подход к получению конъюгатов производных RGD-пептида с рядом 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клозо-додекаборанов – молекул с большим содержанием атомов бора. Так, проведен синтез конъюгатов **49–54** на основе производных RGD-пептида **20–22**, содержащих в составе линкер (глутаровую кислоту), и карборанов **45–47** [206]. Синтез проводили методом смешанных ангидридов с использованием этилхлорформиата (схема 2.7). Выходы целевого продукта уменьшались в ряду карборанов от **45** к **48**, что свидетельствует о влиянии заместителя в первом положении карборанового ядра на реакционную способность аминогруппы (ее нуклеофильность) в реакциях конденсации с пептидами.



i: этилхлорформиат, NMM, CH₂Cl₂, -5°C, 2 ч и затем 20°C, 18 ч

Схема 2.7

С целью найти оптимальный синтетический подход к получению конъюгатов производных RGD-пептида и карборанов со свободными функциональными группами на

примере соединений **49**, **53**, **54**, не содержащих заместителей в первом положении карборанового ядра, было проведено деблокирование карбоксильных групп Asp и гуанидиновой группы Arg. Одновременное деблокирование карбоксильных и гуанидиновой групп соединения **53** ацидолизом и соединения **54** гидрогенолизом позволило получить целевой продукт **55** и **56** соответственно (по данным ЯМР), но полностью очистить их не удалось (схема 2.8).

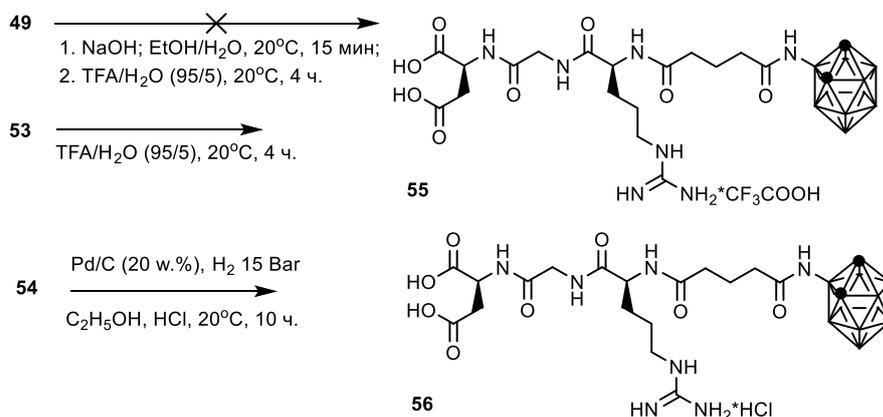


Схема 2.8

При обработке сильными основаниями соединений, содержащих *клозо*-карбораны, могут образовываться продукты деборирования в виде *нидо*-карборанов. При щелочном гидролизе метиловых эфиров Asp подобных процессов не протекало, что было подтверждено данными ¹H ЯМР по отсутствию в спектрах сигнала при δ -2,5...-3 м.д., характерного для мостикового протона В-Н-В *нидо*-карборанов (схема 2.9). Однако в условиях щелочного гидролиза происходило разложение пептидной части молекулы и продукт **55** из соединения **49** получить не удалось.

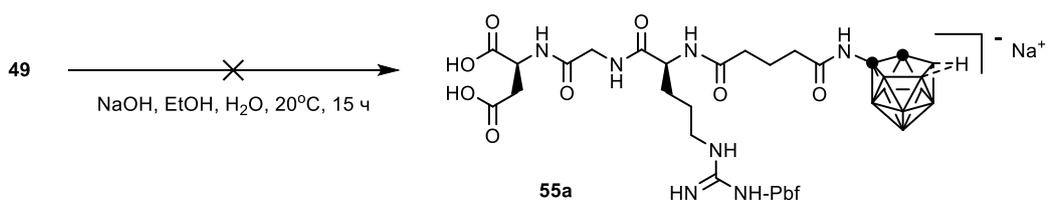


Схема 2.9

С целью получить соединения, содержащих большее количество атомов бора и потенциально более эффективных для БНЗТ, нами были получены ди-карборановые производные KRGD-пептида путем конденсации ди-карборанового производного Lys **57** [207], с трипептидами **17-19**, имеющими разные типы защиты функциональных групп (схема 2.10) [208].

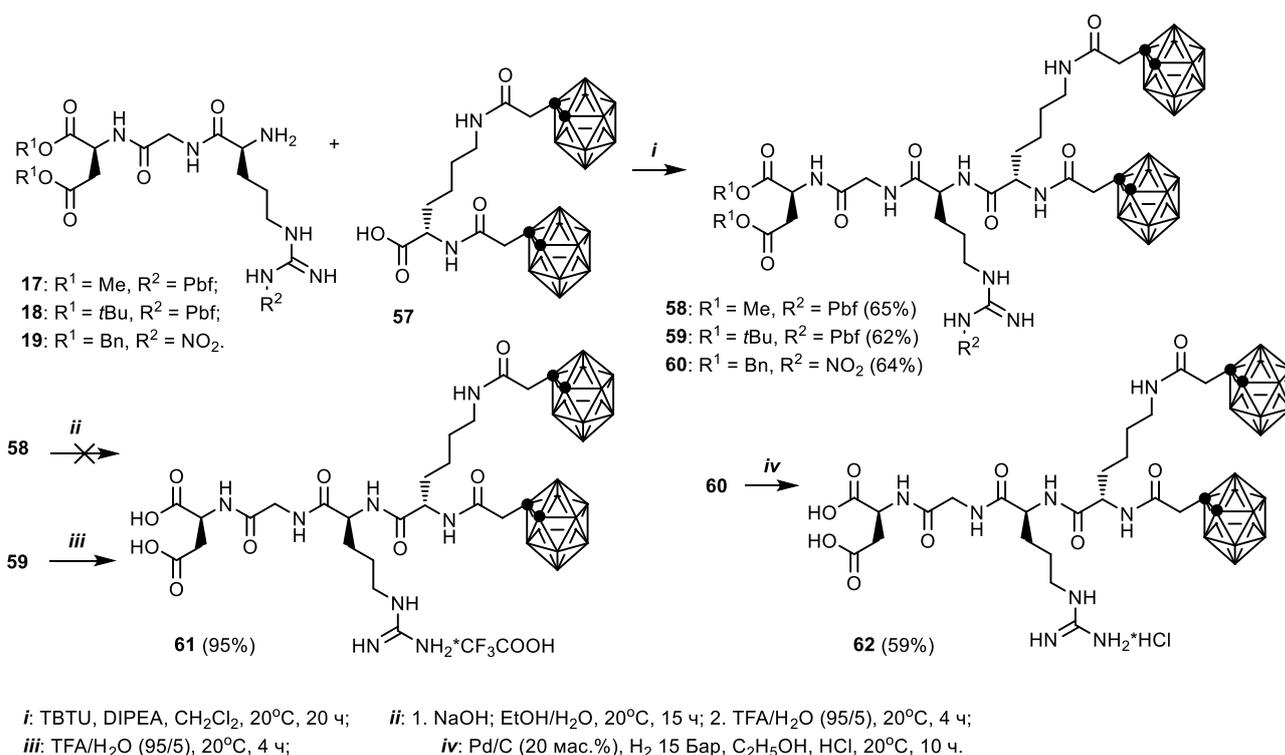


Схема 2.10

При удалении защитных групп соединений **58–60** наибольший выход (95%) достигнут для целевого продукта **61**, полученного в результате одновременного деблокирования карбоксильных групп Asp и гуанидиновой группы Arg ацидолизом. При удалении защитных групп соединения **58** в условиях щелочного гидролиза аналогично схеме 2.8 протекал процесс разложения пептидной части молекулы, поэтому получить из него продукт **61** не удалось.

Из-за высокой липофильности *клозо*-карборанов водорастворимость соединений **61** и **62** составляла всего 0,1 мг/мл. Чтобы увеличить гидрофильность, необходимую для проведения биологических испытаний, была проведена реакция деборирования соединения **61** (схема 2.11) [208].

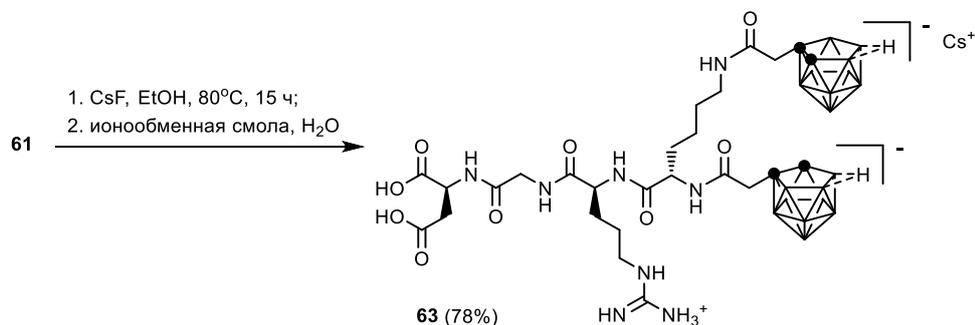


Схема 2.11

При кипячении в этаноле с фторидом цезия, происходит деборирование – элиминация одной из вершин (атома В) икосаэдра. В результате карборановое ядро переходит из закрытой *клозо*-формы в открытую *нидо*-форму, имеющую делокализованный отрицательный заряд и склонность к солеобразованию с положительно заряженными ионами. Ионы Cs⁺ заменили на

ионы H^+ на кислой ионнообменной смоле для уменьшения токсичности полученного соединения, однако ионы Cs^+ даже при многократной обработке связались с катионитом не полностью и присутствовали в соединении **63** в количестве 1 ион Cs^+ на 1 молекулу пептида. Подход позволил получить гидрофильное соединение **63** с растворимостью в воде 5 мг/мл. Так как относительно C–C связи в карборановом ядре могут элиминироваться различные атомы B, возникала планарная хиральность и соединение **63** выделено в виде смеси диастереомеров.

Таким образом разработан подход к синтезу новых карборансодержащих RGD-пептидов, содержащих одно (**55**, **56**) или два (**61–63**) карборановых ядра. Наиболее высокий общий выход (по всем стадиям синтеза, начиная с дипептида) показан для Вос-стратегии с защитой боковых групп, удаляемой гидрогенолизом (~13% для **56** и для **62**), затем для Fmoc-стратегии с защитой боковых групп удаляемой ацидолизом (~6% для **55** и ~9% для **61**). Соединение **63** легко растворимо в воде и может оказаться эффективным агентом для БНЗТ опухолей, экспрессирующих интегрин $\alpha v \beta_3$ и $\alpha v \beta_5$.

2.4 Синтез материалов на основе МНЧ, в том числе модифицированных RGD-пептидом, для применения в терапии и диагностике онкологических заболеваний

2.4.1 Конъюгация производного RGD-пептида с APS-модифицированными МНЧ

Известно, что производные RGD-пептида используются в качестве векторных молекул в дизайне магнитоконтрастных препаратов для проведения МРТ-исследований онкологических заболеваний. С целью получения наноконъюгатов производных RGD-пептида и МНЧ нами проведен синтез наночастиц **64** на основе Fe_3O_4 методом соосаждения из раствора солей Fe^{2+} и Fe^{3+} [136, 146]. Для ковалентного присоединения к ним RGD-пептида, проведена химическая модификация поверхности МНЧ 3-аминопропилтриметоксисиланом (APTMS) в водно-спиртовой среде по аналогии с ранее разработанными методиками [209]. В водных условиях алкоксисиланы гидролизуются до силоксанов, которые склонны к реакции конденсации с более электронодонорными соединениями, чем алкокси-группы – с Si–OH соседних силоксанов и с поверхностными гидроксигруппами МНЧ Fe–OH, образуя при этом связи Si–O–Si и Si–O–Fe соответственно [210]. В результате, были получены МНЧ **65**, содержащие на поверхности аминогруппы, которые далее конденсировали с защищенным GRGD-пептидом **29** через линкер в виде глутаровой кислоты. Затем удаляли Pbf-защиту (схема 2.12) [211].

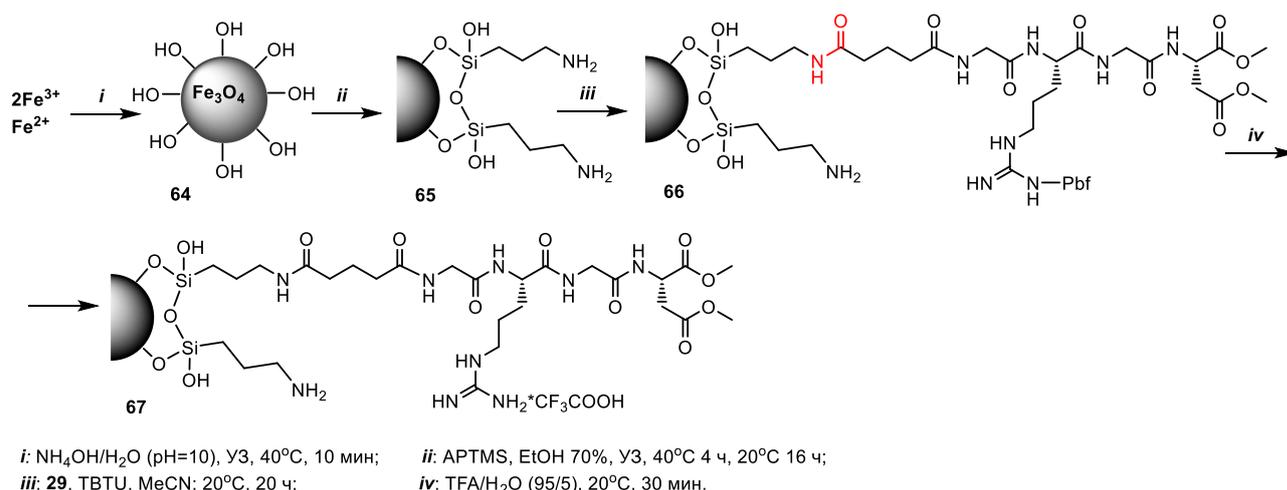


Схема 2.12

Удаление метиловых эфиров Asp не проводили, так как их гидролиз в стандартных условиях (действием NaOH в водной среде) может привести к повреждению силоксановой оболочки. Тем не менее при проведении экспериментов по определению биологической активности *in vivo* это не должно помешать, так как сложные эфиры метилового спирта легко гидролизуются с различных субстратов под воздействием карбоксилаз в кровяном русле [1].

Диаметр МНЧ **67** по данным ПЭМ составил 11 нм (рисунок 2.4а,б). Электронограмма полученных МНЧ **67** соответствует электронограмме магнетита и свидетельствует о том, что фазовое состояние шпинели Fe_3O_4 не изменялось в ходе модификации (рисунок 2.4в), гидродинамический диаметр (D_h) по данным динамического рассеяния света (ДРС) составил 123 нм.

Удельная намагниченность насыщения (M_s) исходных и конечных МНЧ составила 70 и 64 $\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{кг}$ соответственно (рисунок 2.4з). Значения коэрцитивной силы обоих образцов близки к нулю.

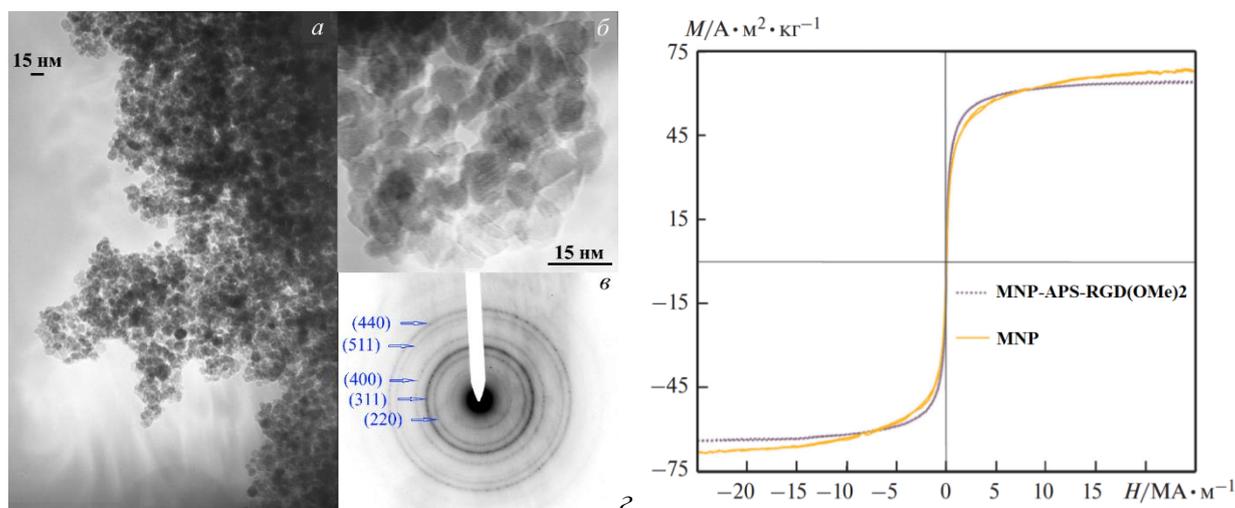


Рисунок 2.4 – Изображения ПЭМ (а, б) и электронограмма (в) МНЧ **67**. Кривые намагниченности исходных (**64**) и конечных (**67**) МНЧ (г).

Небольшое уменьшение удельной намагнитченности модифицированных образцов связано с наличием в их составе немагнитного органического покрытия (~10%). Можно сделать вывод, что в ходе химических реакций и при непродолжительном хранении образцов деструкция ядра или его изменение не происходят.

Наличие фрагмента RGD-пептида подтверждали данными ИК-спектроскопии и ЭА [211, 212]. ИК-спектры пептидсодержащих МНЧ содержали полосы поглощения, характерные для исходного пептида: 1738–1741 см^{-1} (валентные колебания (C=O) (COOMe)); 1641–1643 см^{-1} (валентные колебания (C=O) (амид 1)); 1538–1541 см^{-1} (деформационные колебания (NH, N–C=O) (амид 2), (NH–C(NH)–NH)); 1426, 1375 см^{-1} (валентные колебания (C–N)). Полосы в ИК-спектрах исходного пептида и МНЧ с защищенным пептидом, которые можно отнести к колебаниям C–O–C Rbf-группы (валентные колебания 1222 см^{-1} , 1090 см^{-1}), отсутствуют в спектре МНЧ с деблокированным Arg после обработки TFA, что свидетельствует об удалении этой защитной группы. Кроме того, в ИК-спектре появляется сильная полоса при 1196 см^{-1} и менее выраженные полосы в области 1135, 1090 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям C–O в молекулах TFA и, вероятно, протонированной гуанидиновой группы (NH–C(NH)–NH³⁺) Arg. В спектрах модифицированных МНЧ присутствуют широкие полосы в области 980–990 см^{-1} (валентные колебания (Si–O)) и 540–550 см^{-1} (валентные колебания (Fe–O)); относящиеся к материалу покрытия (SiO₂) и ядра соответственно (рисунок 2.5).

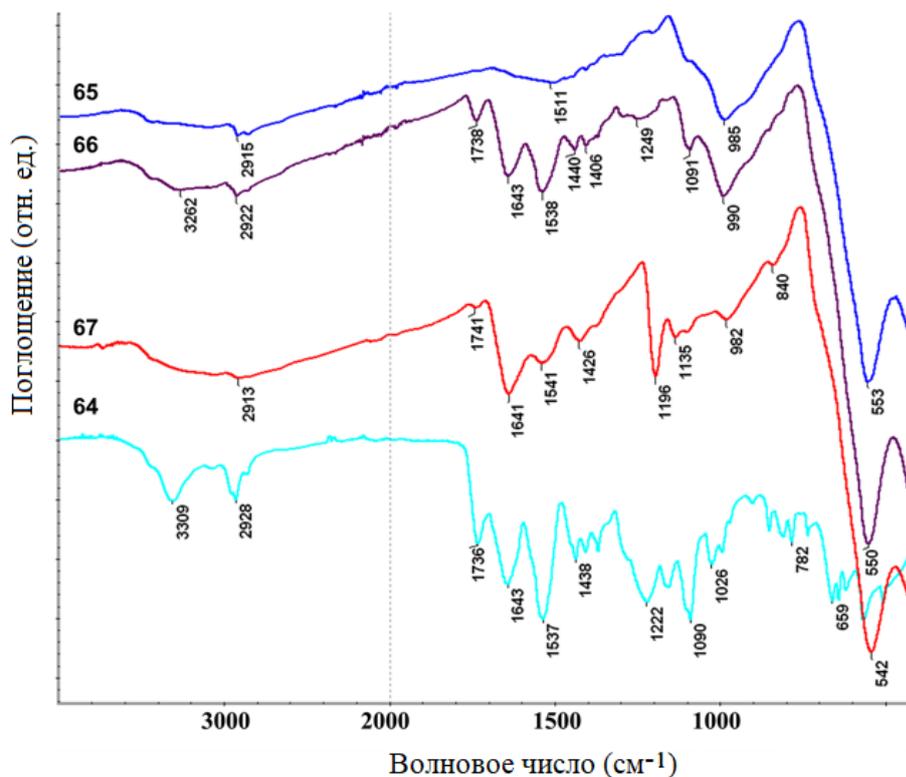


Рисунок 2.5 – ИК-спектры APS-модифицированных МНЧ **65** (1), МНЧ с иммобилизованным пептидом **66** (2), МНЧ после обработки TFA **67** (3), исходного пептида **64** (4).

Количество остатков аминпропилсилана на поверхности наночастиц определяли по данным элементного анализа исходя из процентного содержания С в образце по формулам:

$$c = \frac{\omega_1}{\omega_2 \times M}, \quad (2.1)$$

где c – количество APS-фрагментов на поверхности частиц **65**, моль в 1 г МНЧ;

ω_1 – мас. % С в образце МНЧ **65**;

ω_2 – мас. % С в APS-фрагменте (26,85 %);

M – молярная масса APS-фрагмента (134,19 г/моль).

В результате количество аминогрупп на поверхности МНЧ **65** по данным элементного анализа составило 0,738 ммоль/г МНЧ.

Количество остатков GRGD-пептида на поверхности МНЧ **66** и **67** рассчитывали аналогичным образом по формуле (2):

$$c = \frac{\omega_1 - \omega_2}{\omega_3 \times M}, \quad (2.2)$$

где c – количество фрагментов GRGD на поверхности частиц, моль в 1 г МНЧ;

ω_1 – мас. % С в МНЧ **66** или **67**;

ω_2 – мас. % С в МНЧ **65**;

ω_3 – мас. % С во фрагменте GlyArg(Pbf)GlyAsp(OMe)₂ (52,23%) или

GlyArg(TFA)GlyAsp(OMe)₂ (42,92 %);

M – молярная масса фрагмента GlyArg(Pbf)GlyAsp(OMe)₂ (780,87 г/моль) или GlyArg(TFA)GlyAsp(OMe)₂ (642,57 г/моль).

Для МНЧ **66** и **67**, модифицированных пептидом, содержание фрагмента тетрапептида GRGD составило 62 и 19 мкмоль/г МНЧ соответственно. Таким образом, показано, что в ходе иммобилизации участвует порядка 8,4% аминогрупп.

В результате разработан подход к получению конъюгатов производных RGD-пептида с МНЧ на основе Fe₃O₄, имеющих APS-покрытие. В частности, исследован процесс ковалентной иммобилизации пептида **29**, содержащего остаток глутаровой кислоты в качестве линкера. На основе полученных данных ЭА проведена количественная оценка органических компонентов на каждой стадии модификации МНЧ. Синтезированный наноконъюгат МНЧ и пептида **67** содержал в своем составе 19 мкмоль производного RGD-пептида в расчете на 1 г наночастиц. Результаты могут быть использованы в дальнейшем для дизайна материалов на основе МНЧ и векторных пептидов для МРТ-диагностики опухолевых заболеваний.

2.4.2 Разработка метода нанесения SiO₂/APS-покрытия на МНЧ

С целью получения магнитных наноматериалов, которые можно рассматривать как платформу для иммобилизации биологически активных молекул, изучен процесс нанесения на МНЧ SiO₂-покрытия и дальнейшей его функционализации APS.

Известно, что ПАВ (в частности, карбоновые, фосфоновые, сульфоновые кислоты и др.) позволяют получать устойчивые водные коллоидные растворы МНЧ [213], что в свою очередь положительно сказывается на нанесение на них SiO₂-покрытия: можно избежать образования химически связанных агломератов частиц (несколько МНЧ в матрице SiO₂); контролировать толщину покрытия, создавать пористые покрытия. Покрытие наночастиц оболочкой SiO₂ может предохранять магнитное ядро от разрушения в физиологических условиях, придавать агрегативную стабильность МНЧ и позволять загружать их биологически активными веществами.

Поэтому для сравнения были использованы как нестабилизированные МНЧ **64**, так и МНЧ **68**, стабилизированные PMIDA, которые были получены в соответствии со схемой 2.13 по аналогии с работами [189, 214]. МНЧ **64** и **68** покрывали SiO₂-оболочкой с использованием TMOС, взятого в 1,5; 3,0; 5,0 кратном мольном избытке в расчете на МНЧ, и получали частицы **69-74**. Далее осуществляли APS-функционализацию по аналогии с [209] (схема 2.13) и получали МНЧ **75-80**, содержащие на поверхности аминогруппы.

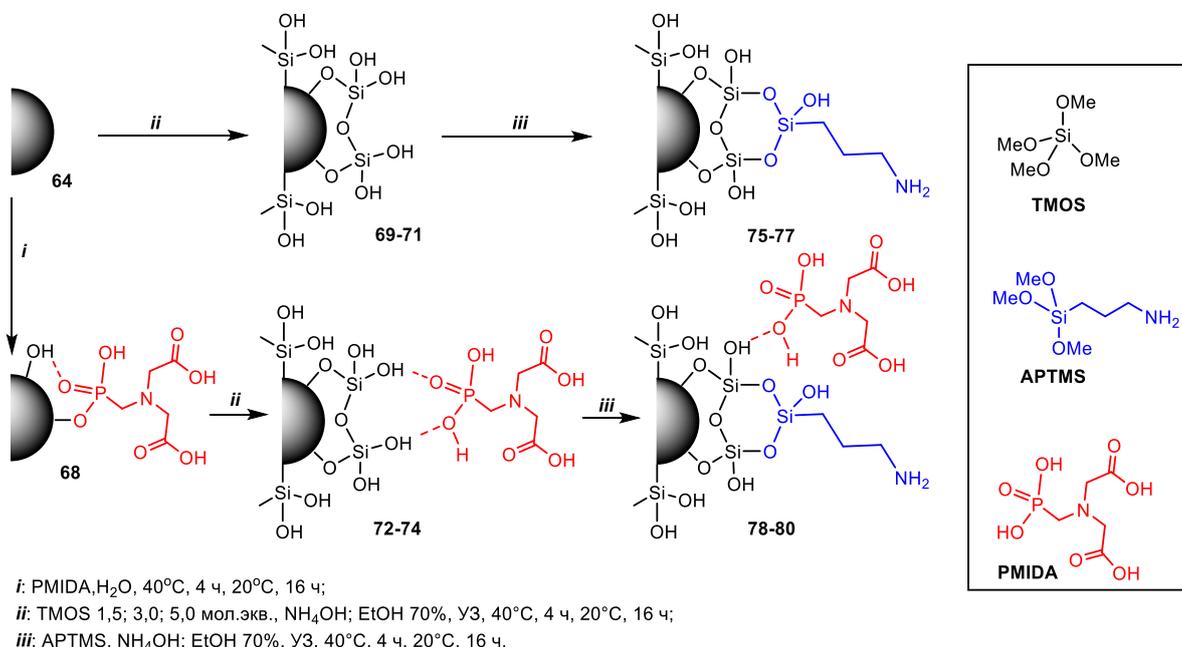


Схема 2.13

В ИК спектрах МНЧ **69-80** в дополнение к полосам поглощения в области 550 см⁻¹, соответствующим ядрам Fe₃O₄ (валентные колебания Fe–O), появляются полосы поглощения в области 1300–750 см⁻¹ (относящиеся к валентным колебаниям Si–O–Si (~1070 см⁻¹ и ~789 см⁻¹) и Si–OH (~950 см⁻¹). С увеличением используемого в реакции количества TMOС

наблюдалось увеличение доли SiO_2 (увеличивается число Si-OH групп), о чем свидетельствует увеличение интенсивности полосы поглощения в области $977\text{--}949\text{ см}^{-1}$ в сравнении с интенсивностью полос колебаний Fe-O связей. Для МНЧ **78-80**, стабилизированных PMIDA, интенсивность полос колебаний Si-O связей была выше интенсивности соответствующих полос для образцов **75-77**, что свидетельствует о формировании более толстого SiO_2 -покрытия. Также наблюдалось уменьшение интенсивности полос поглощения при $1436\text{--}1402\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания COO^- PMIDA), что свидетельствует о вымывании части PMIDA в ходе синтеза и обработки. Стоит отметить их сдвиг относительно полос 1417 и 1375 см^{-1} в спектре исходных МНЧ **68**, что можно объяснить тем, что карбоксильные группы PMIDA связаны с поверхностными Fe-OH или Si-OH . Полосы, относящиеся к валентным колебаниям COO^- и PO_3^{2-} , были наложены на полосы, связанные с колебаниями кристаллизационной воды (1615 см^{-1}) и Si-O-Si (1070 см^{-1}) (рисунок 2.6).

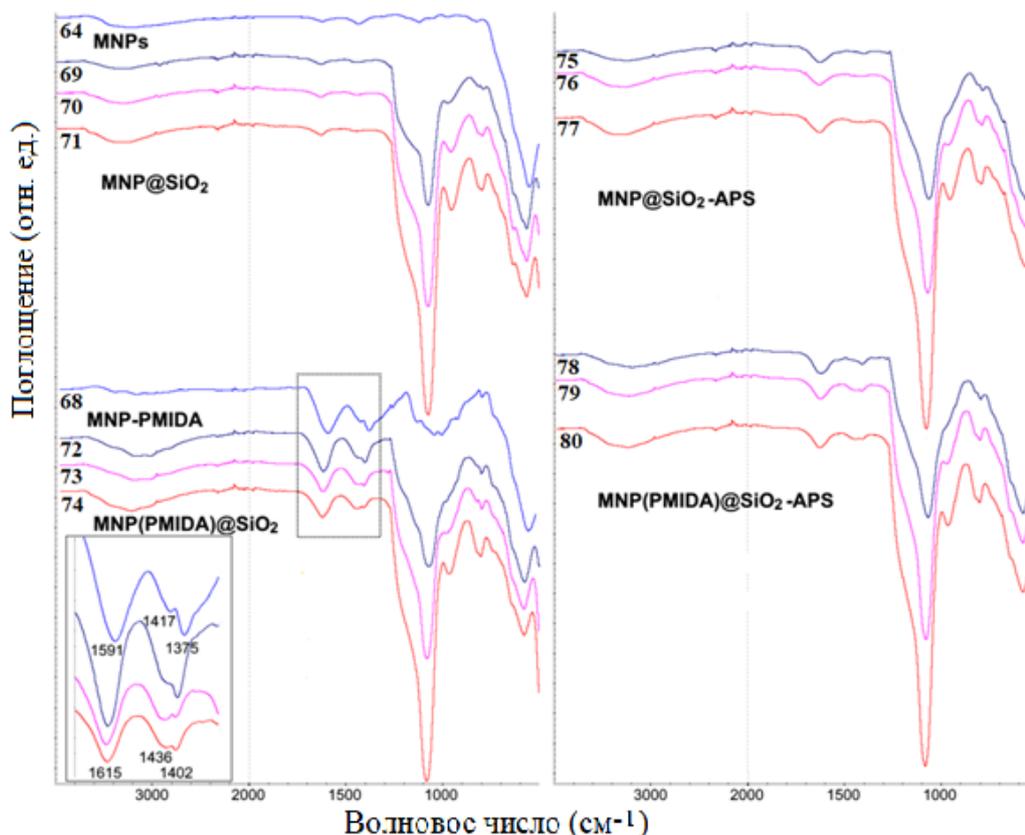


Рисунок 2.6 – ИК спектры МНЧ с SiO_2/APS -покрытием.

Использование большего количества TMOs приводит к увеличению содержания фазы SiO_2 в образцах, согласно данным РФА. Основываясь на данных РФА и ИК-спектроскопии, показано, что силанизация МНЧ в присутствии PMIDA, позволяла получить МНЧ с большим содержанием SiO_2 в сравнении с силанизацией без стабилизатора. Намагниченность модифицированных МНЧ, в сравнении с исходными МНЧ **64**, уменьшалась с увеличением доли немагнитной фазы (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Физико-химические характеристики МНЧ **64, 68–80**.

МНЧ	Компоненты			Относительное содержание элементов ¹			ЭА С	Соотношение неорганических компонентов SiO ₂ /Fe ₃ O ₄ ²	Концентрация органических компонентов		Ms, А м ² /кг
	PMIDA (экв.)	TMOS	APTMS	Fe	Si	P			C _{APS} ³	C _{PMIDA} ⁴	
64	-	0	-	100	0	0	0	-	0	0	74
68	+	0	-	94,34	0	5,66	5,85	-	0	0,97	61
69	-	1,5	-	77,12	22,88	0	0	31/69	0	0	51
70	-	3,0	-	64,08	35,92	0	0	46/54	0	0	39
71	-	5,0	-	50,78	49,22	0	0	60/40	0	0	26
72	+	1,5	-	71,32	24,87	3,80	1,72	35/65	0	0,63	40
73	+	3,0	-	57,13	39,93	2,94	1,18	52/48	0	0,49	28
74	+	5,0	-	46,38	51,74	1,87	1,00	63/37	0	0,31	21
75	-	1,5	+	74,65	25,35	0	3,49	34/66	0,48	0	49
76	-	3,0	+	63,46	36,54	0	2,71	47/53	0,32	0	38
77	-	5,0	+	50,34	49,66	0	1,80	60/40	0,28	0	27
78	+	1,5	+	68,82	29,69	1,49	4,31	40/60	0,66	0,26	37
79	+	3,0	+	57,27	41,50	1,23	2,63	47/53	0,33	0,21	28
80	+	5,0	+	45,70	53,29	1,01	2,03	64/36	0,34	0,17	21

¹ Данные РФА, ² рассчитано из данных РФА по аналогии с [215], ³ рассчитано из данных ЭА по аналогии с [209], ⁴ рассчитано из данных РФА,

Для APS-модифицированных МНЧ **75–80** проведено измерение удельной поверхности ($S_{уд}$) методом ВЕТ. Показано, что SiO₂-покрытие, в случае использования PMIDA-модифицированных МНЧ, имеет более высокую $S_{уд}$ в сравнении с покрытием МНЧ, полученным без стабилизаторов. Был измерен гидродинамический диаметр частиц и их распределение по размерам методом ДРС, показано, что использование PMIDA для стабилизации исходных МНЧ позволяет получать более устойчивые водные коллоидные растворы модифицированных наночастиц, МНЧ **78–80** имели лучшие гидродинамические характеристики (D_h и PdI) по сравнению с нестабилизированными МНЧ **75–77**. Размеры частиц в сериях МНЧ **75–77** и **78–80**, полученных с использованием мольных избытков 1,5-3,0-5,0 TMOS закономерно возрастали (таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Площадь удельной поверхности и гидродинамический диаметр МНЧ **75–80**.

МНЧ	$S_{уд}$, м ² /г	D_h , нм (PdI)
75	101	265 (0,24)
76	122	325 (0,26)
77	95	326 (0,25)
78	61	137 (0,12)
79	110	151 (0,13)
80	239	289 (0,36)

По данным СЭМ физический диаметр исходных МНЧ **64** составлял 9 нм. Диаметр МНЧ **78-80**, полученных из PMIDA-стабилизированных наночастиц, по данным СЭМ увеличился до 15, 18, 29 нм соответственно (рисунок 2.7). Исходя из этого можно рассчитать, что толщина SiO₂-оболочки для МНЧ **78-80** составляла 3, 4,5, 10 нм.

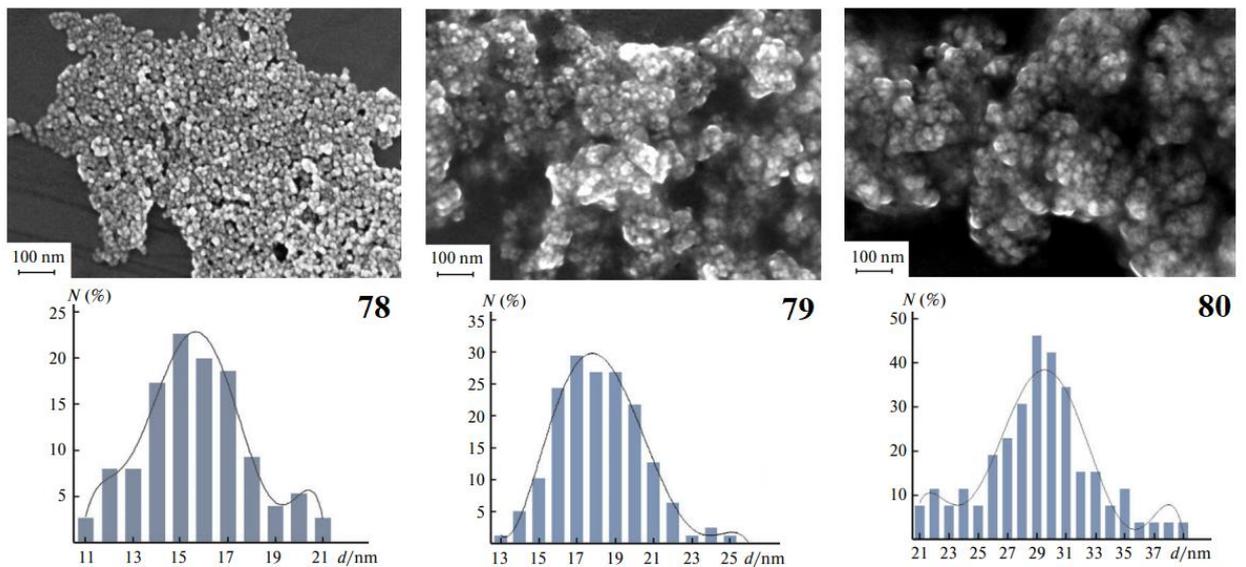


Рисунок 2.7 – Изображения СЭМ и гистограммы распределения по размерам МНЧ 78–80.

Также, наночастицы, полученные с применением PMIDA, были менее склонны к образованию агломератов (рисунок 2.8), вероятно, благодаря их более высокой стабильности в водной среде. Согласно данным, полученным из электронограмм, фаза ядер синтезированных материалов соответствует фазе магнетита.

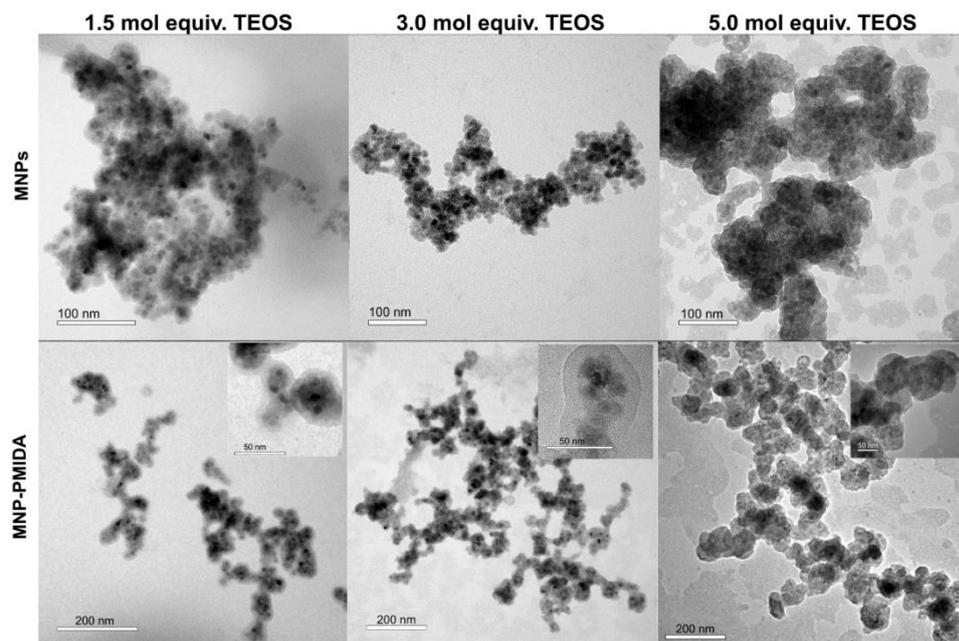


Рисунок 2.8 – Изображения ПЭМ МНЧ 69-74.

Использование PMIDA для стабилизации исходных МНЧ позволяет получать более устойчивые водные коллоидные растворы модифицированных наночастиц. МНЧ 78-80, стабилизированные PMIDA имели лучшие гидродинамические характеристики (D_h и PdI) по сравнению с нестабилизированными МНЧ 75-77, которые во всех случаях имели $D_h > 200$ нм, что нежелательно для использования в экспериментах *in vivo*, поскольку это может привести к быстрому их выведению из кровеносного русла макрофагальной системой [216].

В результате, разработан метод нанесения на МНЧ SiO₂-покрытия и функционализации его APS, изучено влияние PMIDA и различных количеств TMOS на свойства покрытия получаемых МНЧ. Продемонстрировано, что использование PMIDA позволяет улучшить стабильность водных коллоидных растворов, увеличить толщину покрытия SiO₂ и удельную поверхность модифицированных МНЧ по сравнению с покрытием, получаемым без использования ПАВ.

Синтезированные МНЧ, имеющие SiO₂-покрытие, можно рассматривать как платформу для иммобилизации векторных молекул или противоопухолевых препаратов, что интересно при создании материалов для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

2.4.3 Исследование сорбции Dox на МНЧ с покрытием на основе SiO₂ и SiO₂/APS

МНЧ **69-80**, имеющие SiO₂/APS-покрытие, можно рассматривать как платформу для иммобилизации биологически активных молекул, например, противоопухолевых лекарственных средств. В литературе есть примеры создания материалов на основе МНЧ, покрытых SiO₂ и используемых для доставки противоопухолевого препарата доксорубицина (Dox) в опухолевые ткани [217-219].

С целью изучения особенностей сорбции Dox на МНЧ, покрытые SiO₂ с различными функциональными группами (Si-OH, PO₃H₂, COOH, NH₂) на поверхности, а также исследования возможности получения потенциальных материалов для терапии и диагностики онкологических заболеваний нами была проведена сорбция Dox на МНЧ **69-80**.

Сорбцию проводили при комнатной температуре при перемешивании водного коллоидного раствора МНЧ с водным раствором Dox. МНЧ и Dox брали в массовом соотношении 1:1. Наночастицы, загруженные препаратом, выделяли центрифугированием, В результате получали МНЧ **81-92** (схема 2.14) [220-222].

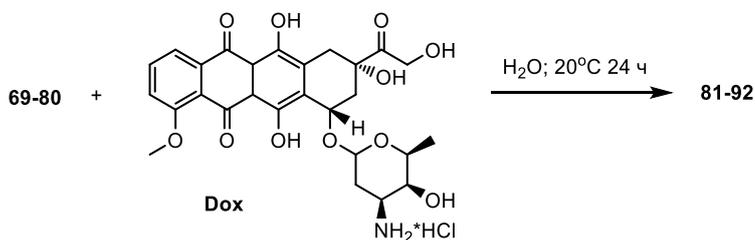


Схема 2.14

На рисунке 2.9 приведены возможные варианты связывания молекул Dox с функциональными группами на поверхности МНЧ: SiO₂ (SiO₂...Dox), SiO₂-APS (SiO₂-APS...Dox) и SiO₂-PMIDA (SiO₂-PMIDA...Dox salt). Оценка эффективности связывания молекулы Dox с поверхностными группами МНЧ проведена к.х.н. Королёвой М.А. (ИОС УрО РАН) в рамках теории функционала электронной плотности (DFT). Малый кластер SiO₂ имитировал покрытие МНЧ [223]. Энергию связывания (E_b) Dox в указанные комплексы

рассчитывали на уровне теории B3LYP-D3-gCP/def2-SVP в воде с использованием программы ORCA 4,0,1 [224]. Наименьшая E_b комплекса $\text{SiO}_2\text{-PMIDA}\dots\text{Dox}$ свидетельствует о самом сильном связывании Dox с поверхностью МНЧ, в которых присутствуют SiO_2 и PMIDA фрагменты. Координация Dox в данном кластере происходит за счет образования: ионной связи между аминогруппами Dox и фосфоновой группой PMIDA, двух водородных связей между C(8)-O(H) и C(8)-COCH₂-O(H) молекулы Dox и свободной OH-группой PMIDA, а также водородной связи между OH в пиранозильной группе Dox и Si-OH [221, 222].

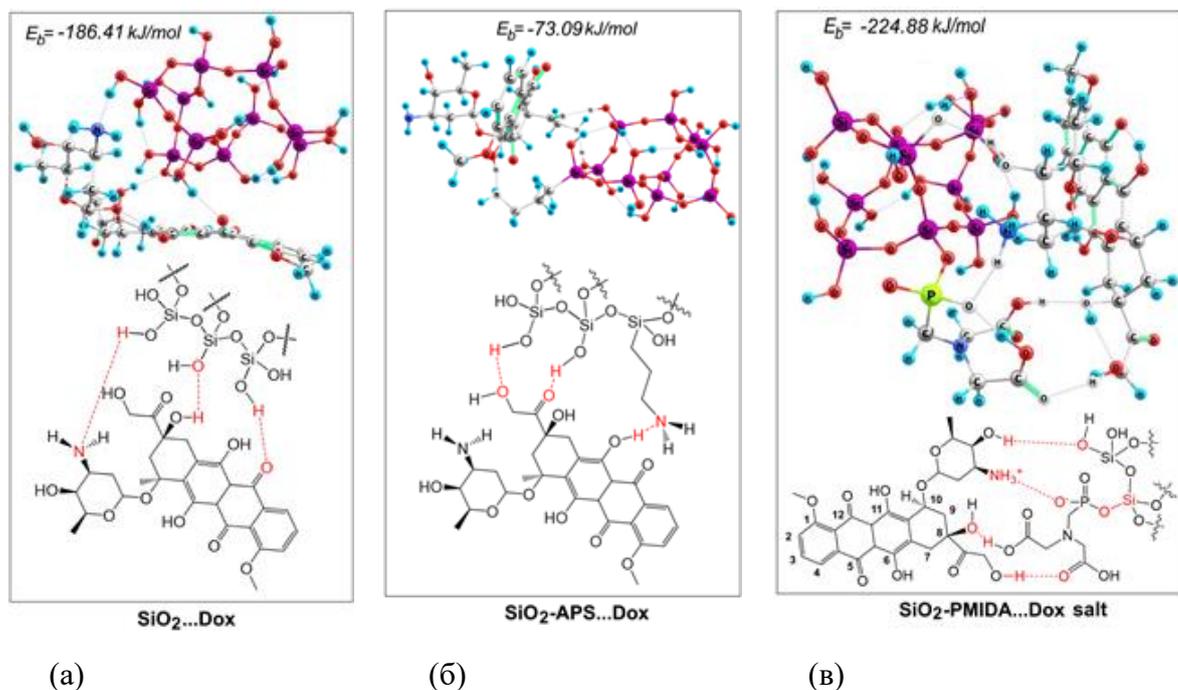


Рисунок 2.9 – Изображения комплексов Dox с кластерами: (а) SiO_2 , (б) $\text{SiO}_2\text{-APS}$ и (в) $\text{SiO}_2\text{-PMIDA}$.

Иммобилизацию Dox качественно подтверждали данными CHN элементного анализа и ИК спектроскопии. Можно выделить наиболее характеристичные полосы поглощения для Dox при 1720 см^{-1} (валентные колебания C=O боковой цепи), 1617 см^{-1} (валентные колебания C=O из антраценового фрагмента), 1580 см^{-1} (деформационные колебания NH) и группу полос при $1470, 1446, 1413\text{ см}^{-1}$ (деформационные колебания C-H). Эти полосы поглощения были более выражены для PMIDA-стабилизированных МНЧ и менее выражены для APS-модифицированных МНЧ. В спектрах присутствовали полосы в области 1070 и 570 см^{-1} , относящиеся к колебаниям Si-O покрытия, и Fe-O ядра соответственно (рисунок 2.10).

Нековалентная иммобилизация Dox обусловлена электростатическими и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями, $\pi\text{-}\pi$ стэкингом антрациклинового фрагмента. Эффективность и количество загрузки препарата на материалы определяется многими факторами, такими как морфология наночастиц, пористость поверхности, уровень заряда и присутствие функциональных групп, а также условиями загрузки: pH-среды,

температурой, соотношением компонентов, эффективностью массообмена и др. Молекула Dox ($pK_a = 8.2$) положительно заряжена в водных растворах с нейтральным pH, поэтому она преимущественно сорбируется на материалы, несущие отрицательный заряд [222]. Этим можно объяснить то, что с МНЧ, содержащими PMIDA, сорбция шла более эффективно благодаря отрицательному заряду COOH и PO₃H₂ групп стабилизатора и Si-OH групп оболочки. APS фрагмент препятствовал сорбции из-за положительного заряда аминогруппы (pK_a (APS) = 10).

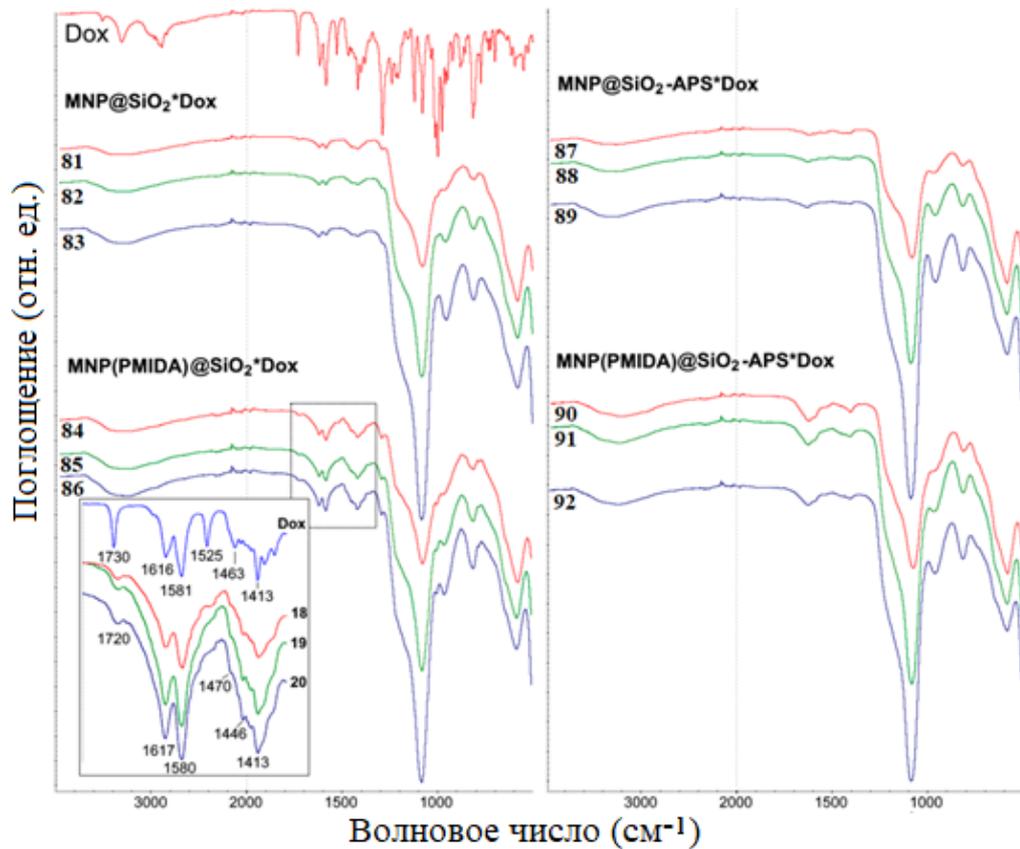


Рисунок 2.10 – ИК спектры МНЧ 69–80, загруженных Dox

Количество иммобилизованного Dox определяли косвенно как разницу концентраций Dox в исходном растворе и в фугатах, выделенных после проведения сорбции [222]. Концентрацию Dox в водных растворах определяли методами ВЭЖХ, флуориметрии и УФ-спектрофотометрии. Наиболее точным оказался метод УФ-спектрофотометрии (определение поглощения в максимуме поглощения при 480 нм) (рисунок 2.11). Прямое определение препарата в нанокompозитах затруднено в связи с тем, что у Dox сильно изменяются оптические свойства при взаимодействии с другими материалами из-за электростатических взаимодействий с переносом заряда и образования молекулярных агрегатов.

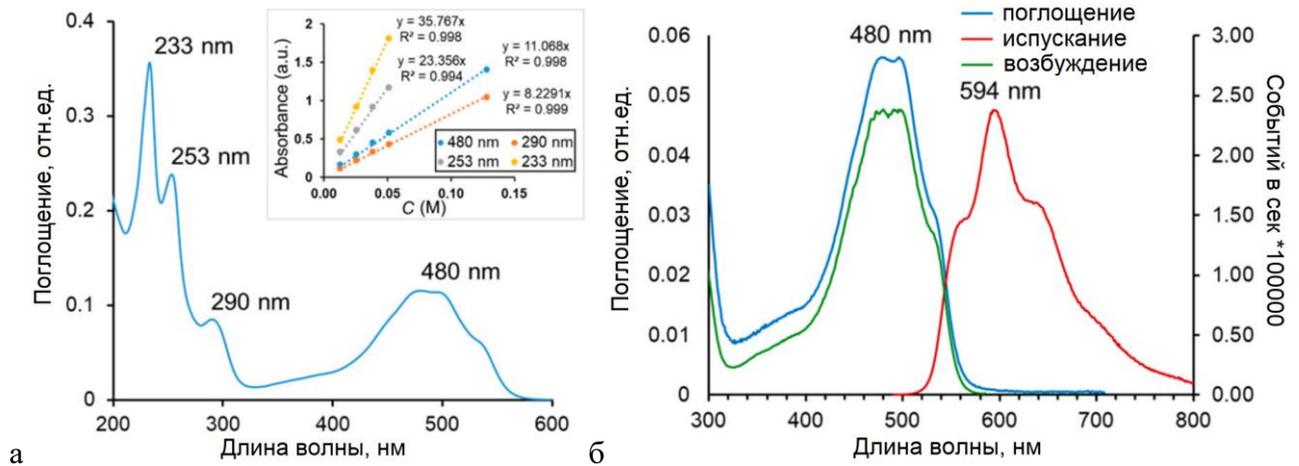


Рисунок 2.11 – УФ спектр (а) и спектры флуоресценции (б) Dox.

Для МНЧ, загруженных Dox, рассчитывали два параметра: эффективность загрузки LE (load efficiency) и уровень загрузки LC (load content) по формулам (2.3) и (2.4):

$$LE (\%) = \frac{(m_{Dox\ load} - m_{Dox}) * 100\%}{m_{Dox\ load}}, \quad (2.3)$$

$$LC (\%) = \frac{(m_{Dox\ load} - m_{Dox}) * 100\%}{m_{nanocomposite}}, \quad (2.4)$$

где $m_{Dox\ load}$ (мг) – это масса Dox, загруженного в реакцию,

m_{Dox} (мг) – это масса Dox, определенная в супернатанте,

$m_{nanocomposite}$ (мг) – это масса нанокомпозита, загруженного Dox.

Значения LC и LE росли с увеличением площади удельной поверхности и доли SiO₂ в образцах. Также продемонстрированы лучшие показатели LC и LE для PMIDA-стабилизированных МНЧ. APS-модифицированные МНЧ, наоборот, показали меньшую сорбционную емкость (рисунок 2.12а).

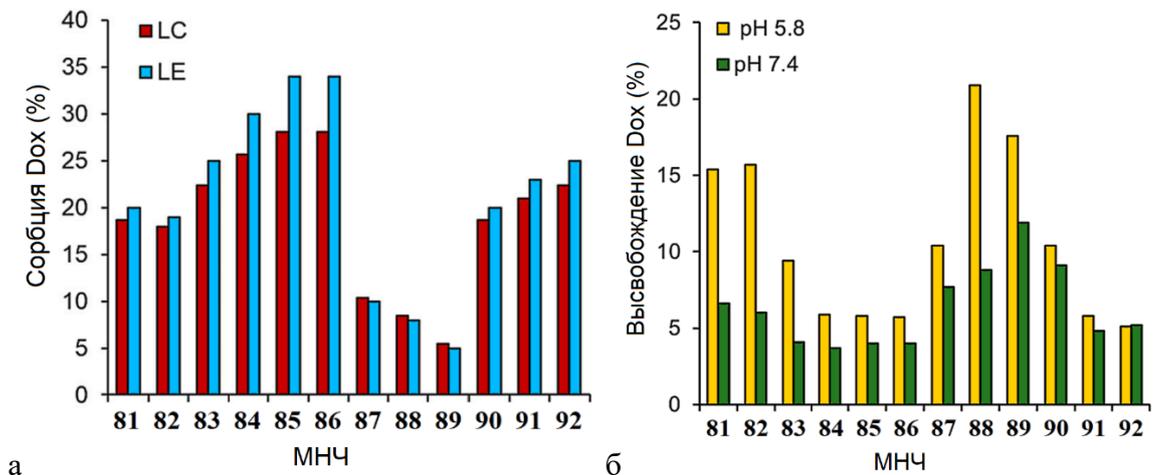


Рисунок 2.12 – Данные по (а) сорбции и (б) десорбции для МНЧ 81–92.

Был исследован процесс десорбции Dox с МНЧ 81–92. Для этого их коллоидные растворы в фосфатных буферных растворах с pH 5,8 и 7,4 выдерживали в течение 24 ч при 37°C, после чего МНЧ осаждали центрифугированием, а в полученных фугатах определяли

количество Dox. В результате продемонстрирована рН-зависимая десорбция Dox с синтезированных материалов (рисунок 2.12б), которая протонированием силанольных групп и гидрофобизацией SiO₂-поверхности в средах с пониженным рН. Одновременно происходит протонирование аминогрупп Dox (рКа = 8,2) и разрушение нековалентных связей с поверхностными атомами носителя. Присутствие на поверхности МНЧ молекул APS способствует процессу десорбции (например, МНЧ **85** и **86**). Наличие же на поверхности МНЧ молекул РМІДА понижает эффективность десорбции.

Интересно отметить, что Dox оказал некоторое стабилизирующее действие на загруженные им МНЧ, уменьшив размеры (D_h) и сузив распределение по размеру (PdI) (рисунок 2.13а).

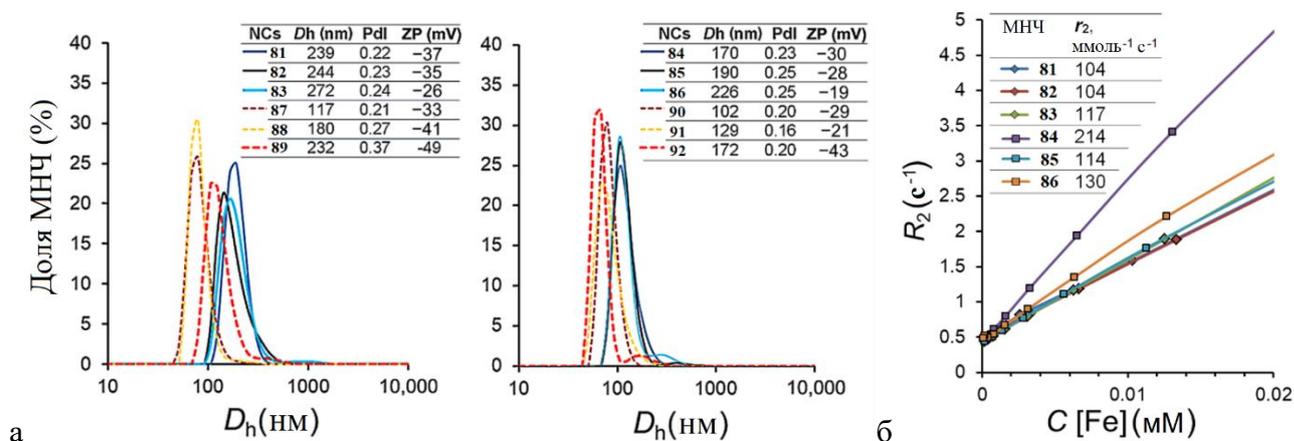


Рисунок 2.13 – Гидродинамические характеристики для МНЧ **81–92** (а) и кривые релаксивности r_2 для МНЧ **81–86**.

Дополнительно для коллоидных растворов МНЧ с SiO₂-оболочкой **81–86**, обладающих большей стабильностью в сравнении с аминированными аналогами и имеющих высокий уровень загрузки Dox, нами был измерен коэффициент релаксивности r_2 (рисунок 2.13б). Исследованные МНЧ обладали r_2 , сопоставимыми с ранее одобренными FDA коммерческими препаратами: Sinerem® ($D_h \sim 50$ нм, r_2 60 1/ммоль с), Feridex® ($D_h \sim 200$ нм, r_2 107 1/ммоль с); Resovist® ($D_h \sim 60$ нм, r_2 190 1/ммоль с) [225]. Среди исследованных нами материалов МНЧ **84** обладали в два раза большей величиной r_2 , сравнимой с параметрами ранее синтезированных МНЧ, использованных в качестве агентов, усиливающих контраст в МРТ [141, 189, 226]. Это свидетельствует о потенциальной возможности в будущем оценивать методом МРТ биораспределение и накопление полученных в работе МНЧ при проведении экспериментов *in vivo*.

В результате, продемонстрирована возможность иммобилизации противоопухолевого препарата Dox на МНЧ, имеющие функционализированное SiO₂-покрытие. Разработан метод сорбции Dox и метод его количественного определения косвенным методом. Показано, что наращивание более толстой и развитой оболочки SiO₂, а также использование стабилизатора

PMIDA увеличивает сорбционную емкость материала, а APS-модификация поверхности – уменьшает. Наилучшие показатели сорбции продемонстрированы для МНЧ **88** и **89** (LC 28%), синтезированные с 3- и 5- мольным избытком TEOS, использованием PMIDA, без APS-модификации. Показано, что энергия связывания Dox с функциональными группами на поверхности МНЧ хорошо согласуются с экспериментальными данными по сорбции Dox на соответствующих МНЧ. Также найдено, что сам Dox обладает стабилизирующими свойствами и улучшает гидродинамические характеристики нанокомпозитов. Полученные данные могут быть использованы для разработки материалов для адресной доставки противоопухолевых препаратов.

2.4.4 Синтез МНЧ с PEG-покрытием и исследование сорбции на них Dox

Функционализация МНЧ молекулами PEG – распространенный метод, позволяющий увеличить стабильность водного коллоидного раствора, уменьшить гидродинамический диаметр и снизить уровень опсонизации наночастиц (тем самым придать им stealth-эффект, то есть уменьшить распознавание и захват клетками макрофагальной системы). Оценена возможность PEG-модификации SiO₂-покрытия, содержащее как аминогруппы (МНЧ, модифицированные APS), так и карбоксильные группы (МНЧ, модифицированные SPS), с целью получения на их основе материалов, пригодных для использования в терапии и диагностике онкологических заболеваний.

2.4.4.1 Конъюгация PEG с МНЧ с использованием 3-аминопропилсилана

Для получения частиц данного типа, МНЧ **75**, имеющие на поверхности аминогруппы, модифицировали молекулами PEG **93**, имеющими активированную карбоксильную группу, способную конденсироваться с первичной аминогруппой APS. Используя различные массовые соотношения PEG(**93**) : МНЧ(**75**) (1:2, 1:10, 1:50), мы получили наноконъюгаты **94а-в** соответственно (схема 2.15).

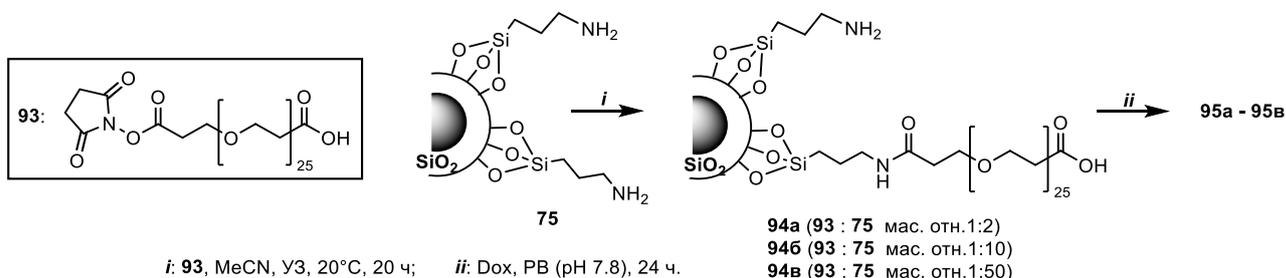


Схема 2.15

Продемонстрировано, что МНЧ, полученные с использованием больших количеств PEG, обладали лучшими параметрами (таблица 2.4). Как оказалось, традиционный метод сорбции (сорбция Dox в воде или в PBS (pH = 7,4) при комнатной температуре), применяемый

в большинстве работ, не позволил нам достичь удовлетворительных результатов. Поэтому нами в ходе работы проведена сорбция в фосфатном буферном растворе с $\text{pH} = 7,8$ при нагревании до $50\text{ }^\circ\text{C}$ с последующим охлаждением до комнатной температуры. Эффективность сорбции (по параметрам LE и LC) оценивали по аналогии с методом, описанным в разделе 2.4.3 (таблица 2.4). В результате оптимизации методики удалось достичь высоких показателей LC и LE, превосходящих показатели, указанные в ряде работ [227-229].

Таблица 2.4 – Гидродинамические характеристики синтезированных МНЧ и данные о сорбции на них Dox.

МНЧ	Данные ДРС			МНЧ	Данные ДРС			Сорбция	
	D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV		D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV	LE, %	LC, %
94a	91	0,20	-16,6	95a	173	0,21	+4,9	84,3	45,7
94б	139	0,27	+4,5	95б	126	0,22	+17,2	80,7	44,6
94в	118	0,32	+28,9	95в	160	0,31	+27,5	75,4	43,0

Таким образом, синтез наночастиц с использованием соотношения PEG(**93**):МНЧ(**75**) = 1:10 для дальнейшей их загрузки Dox как по эффективности сорбции, так и по гидродинамическим характеристикам кажется предпочтительным, поэтому для дальнейших *in vitro* и *in vivo* исследований были наработаны МНЧ **95б**.

На рисунке 2.14 для примера представлены изображения ПЭМ МНЧ **94б** и **95б**, средние размеры которых составляли 12,7 нм и 12,4 нм соответственно. В соответствии с данными, полученными из электронограмм, фаза ядер синтезированных материалов соответствует фазе магнетита.

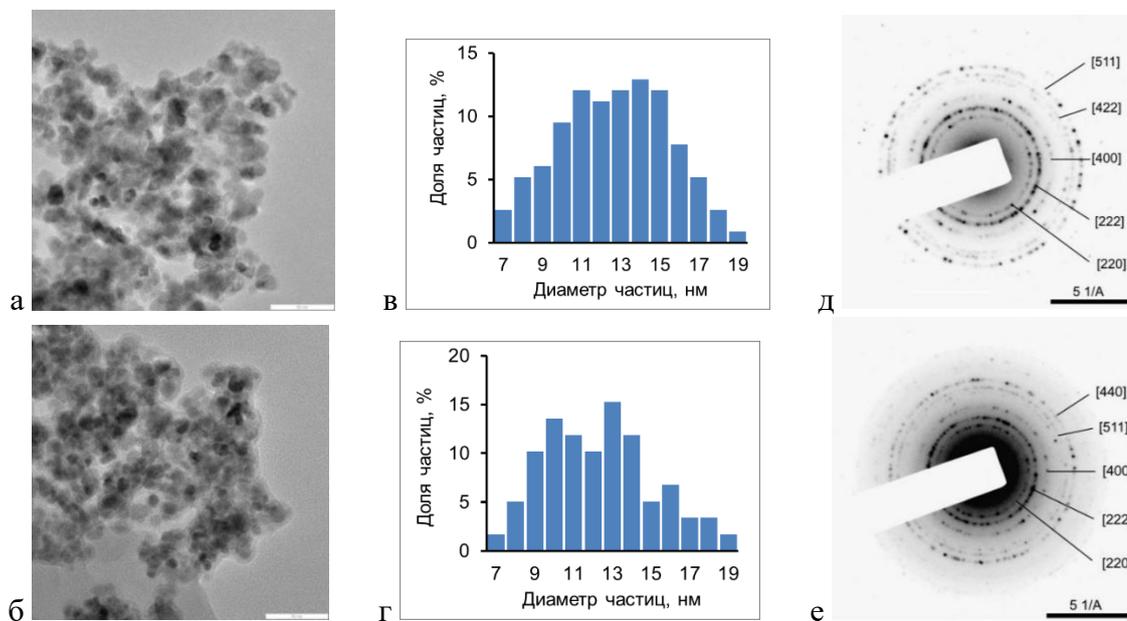


Рисунок 2.14 – Изображения ПЭМ МНЧ (а) **94б** и (б) **95б** и их распределение по размерам ((в) и (г) соответственно), а также электронограммы МНЧ (д) **94б** и (е) **95б** (в скобках приведены кристаллографические индексы плоскостей, соответствующих Fe_3O_4).

Данные ИК спектроскопии (рисунок 2.15) подтверждают наличие в полученных МНЧ ядра на основе оксида железа (полоса колебаний связи Fe–O в области 620 и 575 см^{-1}) и оболочки на основе оксида кремния (широкая полоса в области 1076–1092 см^{-1} и 955–980 см^{-1} , относящихся к колебаниям связи Si–O и Si–OH), в этой же области находятся и полосы поглощения, характерные для PEG (валентные асимметричные и симметричные колебания C–O–C). Дополнительно можно отметить наличие полос 1644 и 1535 см^{-1} , которые могут относиться к полосам Амид I и Амид II, соответствующих амидной связи, образованной между карбоксильной группой PEG и аминогруппой APS на поверхности наночастиц. В результате иммобилизации Dox в ИК спектрах МНЧ **956** можно наблюдать смещение характерных для Dox полос поглощения продуктов модификации: 1728 и 1615 см^{-1} (валентные колебания C=O), 1578 см^{-1} (деформационные колебания N–H), что подтверждает иммобилизацию Dox на МНЧ.

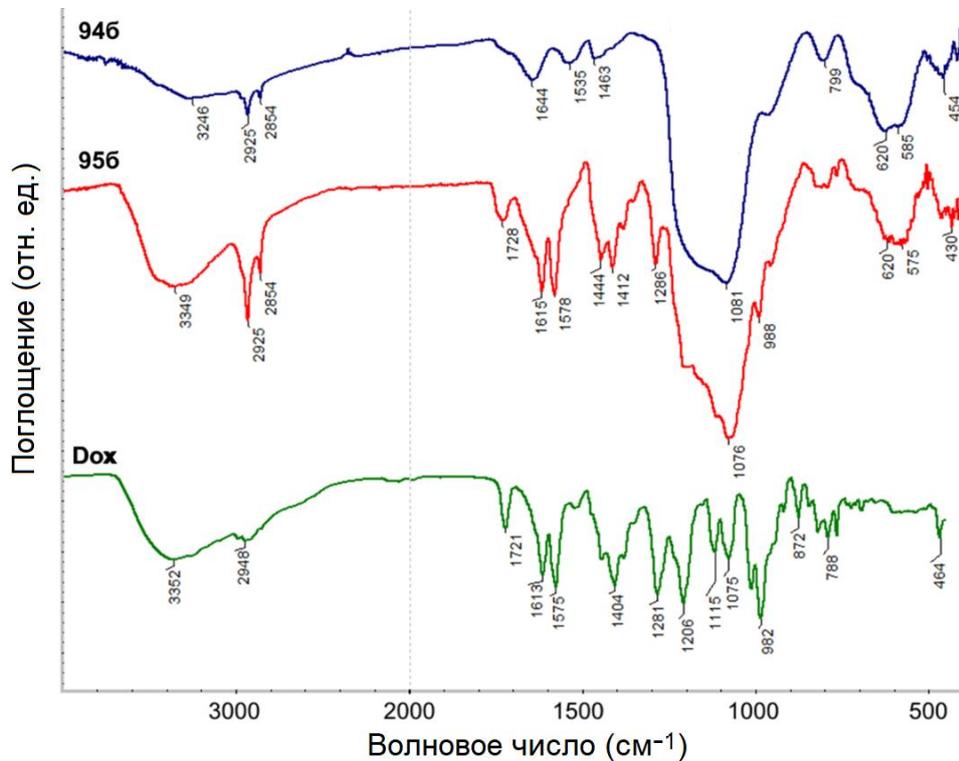


Рисунок 2.15 – ИК спектры МНЧ **946** и **956** и Dox.

Из полученных для МНЧ **946** и **956** данных РФА об относительном содержании Fe и Si в синтезированных материалах (таблица 2.5) по формулам (2.5) и (2.6) можно рассчитать соотношение $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{SiO}_2$, а по данным элементного анализа (по формуле 2.7) – количество PEG и Dox в наноконъюгате,

$$\omega_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = \frac{\omega'_{\text{Fe}} / \omega''_{\text{Fe}}}{\omega'_{\text{Fe}} / \omega''_{\text{Fe}} + \omega'_{\text{Si}} / \omega''_{\text{Si}}} \quad (2.5)$$

$$\omega_{\text{SiO}_2} = \frac{\omega'_{\text{Si}} / \omega''_{\text{Si}}}{\omega'_{\text{Fe}} / \omega''_{\text{Fe}} + \omega'_{\text{Si}} / \omega''_{\text{Si}}} \quad (2.6)$$

где ω – мас. % соответствующего компонента (Fe_3O_4 или SiO_2) в пробе;

ω' – мас. % соответствующего элемента (Fe или Si) в пробе, определяемый методом РФА;

ω'' – мас. % Fe и Si в Fe_3O_4 или SiO_2 соответственно ($\omega''_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 72,37\%$, $\omega''_{\text{SiO}_2} = 46,75\%$).

$$c = \frac{\omega_1 - \omega_2}{\omega_3 \times M}, \quad (2.7)$$

где c – количество фрагментов PEG или Dox на поверхности частиц, моль в 1 г МНЧ **946** или **956**;

ω_1 – мас. % C в МНЧ **946** или **956**, определенное в результате элементного анализа;

ω_2 – мас. % C в сходных для МНЧ **946** или **956** за вычетом масс, % C в **75** и **946** соответственно;

ω_3 – мас. % C в PEG (53,9%) или Dox (59,45%) для МНЧ **946** или **956** соответственно;

M – молярная масса PEG (1203,41 г/моль) или Dox (545,54 г/моль) для МНЧ **946** или **956** соответственно.

Таблица 2.5 – Состав синтезированных МНЧ

МНЧ	Данные РФА		Данные элементного анализа			$\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{SiO}_2^1$	Количество органических компонентов (ммоль/г) ²
	Fe (%)	Si (%)	C (%)	H (%)	N (%)		
946	75,67	24,33	4,85	1,14	0,61	67 : 33	0,05 (PEG)
956	78,46	21,54	16,49	1,99	0,87	70 : 30	0,36 (Dox)

¹ Рассчитано на основе данных РФА; ² рассчитано на основе данных элементного анализа.

Удельная намагниченность насыщения для синтезированных МНЧ **946** и **956** составила 50 и 39 А·м²/кг соответственно (рисунок 2.16а).

Для полученных МНЧ **946** и **956** с использованием генератора переменного высокочастотного магнитного поля TOR ULTRA H ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) были измерены скорости разогревания в переменном магнитном поле и рассчитаны значения SAR и ILP, которые позволяют оценить возможность достижения эффекта магнитной гипертермии. Динамику нагрева наблюдали в течение 600 с, для расчета SAR использовали данные, полученные в течение первых 60 с нагрева (рисунок 2.16б). Показано, что МНЧ **75**, **946** и **956** имели сопоставимые значения SAR – 48, 62 Вт/г [Fe], и ILP – 0,45, 0,58 нН м²/кг соответственно.

Значения ILP данных материалов превышали значения для известных препаратов, например, Feridex® (0,16 нН м²/кг) или Resovist® (0,21 нН м²/кг) и были сопоставимы с ILP препарата NanoTherm® (0,738–0,985 нН м²/кг) – одного из одобренных FDA для клинического использования препаратов для гипертермии опухолей [230]. Препарат Resovist® также был одобрен FDA, но для применения в МРТ в качестве контрастного агента. В работе [231] продемонстрировано, что он может быть использован в качестве средства доставки лекарственных препаратов с AMF-опосредованным высвобождением.

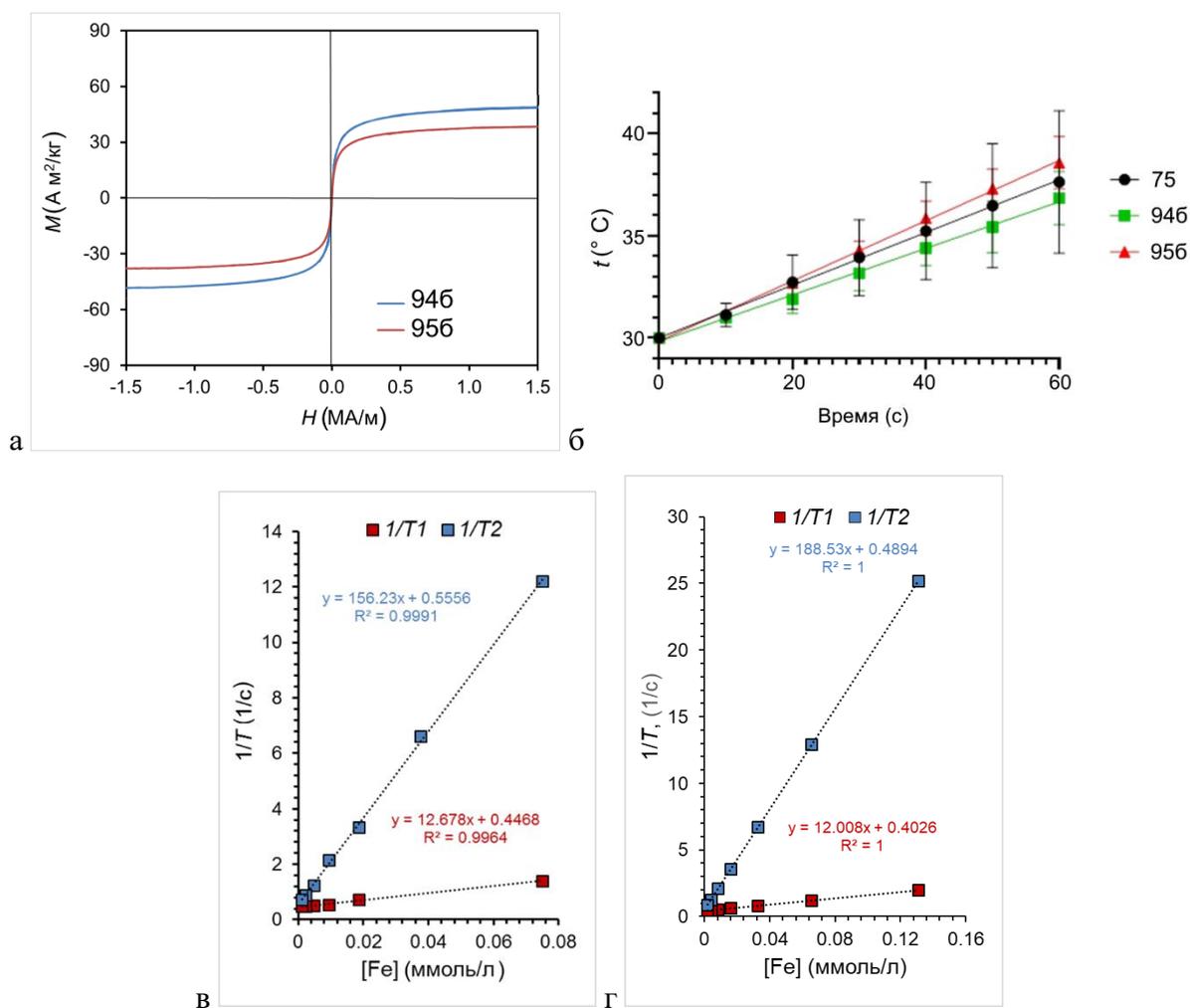


Рисунок 2.16 – (а) Кривые намагниченности для наночастиц МНЧ **946** и **956**. (б) Начальный линейный участок кривых нагрева водных суспензий МНЧ **75**, **946**, **956** с концентрацией 10 мг[Fe]/мл при частоте переменного магнитного поля 230 кГц и магнитной индукции 21,5 кА/м (данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3$). Зависимость скорости релаксации для МНЧ (в) **946** и (г) **956** от концентрации наночастиц (пересчитанной на концентрацию [Fe], ммоль/л) в водных коллоидных растворах.

Таким образом, продемонстрировано, что синтезированный наноконъюгат **956** может быть использован для гипертермии и как средство доставки лекарственных препаратов по аналогии с работами [215, 232].

Известно, что эффективность магнитоcontrastных материалов, которые применяются для усиления контраста при проведении МРТ (в T_1 или T_2 -взвешенном режиме), оценивается по величине релаксивностей r_1 и r_2 . Чем выше значение релаксивности, тем более эффективно контрастный агент влияет на время релаксации (T), сокращая его. Для МНЧ **946** и **956** была измерена релаксивность r_2 и r_1 (рисунки 2.16в,г). Дох-содержащие частицы имели более низкую релаксивность ($r_2 = 90$ 1/с mM; $r_2/r_1 = 11,6$) по сравнению с исходными наночастицами ($r_2 = 156$ 1/с mM; $r_2/r_1 = 12,3$), что, вероятно, можно объяснить большей долей органической

фазы в наноконъюгате и, соответственно, более низкой намагниченностью насыщения. Тем не менее, продемонстрировано, что оба материала обладали достаточно высокой, для возможности проведения МРТ исследований, релаксивностью, сопоставимой с известными МРТ-контрастными препаратами. Так, например, известные одобренные FDA T_2 -контрастные агенты имели следующие параметры: Feridex – $r_2 = 98$ 1/с mM, $r_2/r_1 = 4,1$; Resovist – $r_2 = 151$ 1/с mM, $r_2/r_1 = 17,4$; Ferumoxtran-10 – $r_2 = 60$ 1/с mM, $r_2/r_1 = 6,0$ [130]. Ранее возможность использования наноматериалов на основе данных наночастиц для усиления контраста в МРТ в опытах *in vivo* была нами продемонстрирована в работах [141, 189, 226].

Таким образом, получен и охарактеризован физико-химическими методами новый наноконъюгат на основе магнитных наночастиц, покрытых SiO₂-оболочкой, ковалентно модифицированной PEG, и содержащий сорбированный на поверхности противоопухолевый препарат Dox. Высокие значения SAR и ILP позволяют говорить о возможности проявления наноконъюгатом эффекта гипертермии в переменном магнитном поле, а наличие у водных коллоидных растворов наноконъюгата высоких значений релаксивности r_2 в сочетании с ранее показанной возможностью МРТ визуализации наночастиц на основе этих же ядер Fe₃O₄, позволит проводить прижизненную визуализацию распределения и оценивать накопление МНЧ в тканях опухоли, что увеличит эффективность применения данного материала в опытах *in vivo*.

2.4.4.2 Конъюгация PEG с МНЧ с использованием 3-сукцинилпропилсилана

Для получения частиц второго типа, алкоксисилан **96** (TESPSA) предварительно конденсировали в безводных условиях с PEG **41**, имеющим первичную аминогруппу. Промежуточный продукт **97** использовали без выделения в реакции силанизации для модификации поверхности МНЧ **69** (схема 2.16) [215].

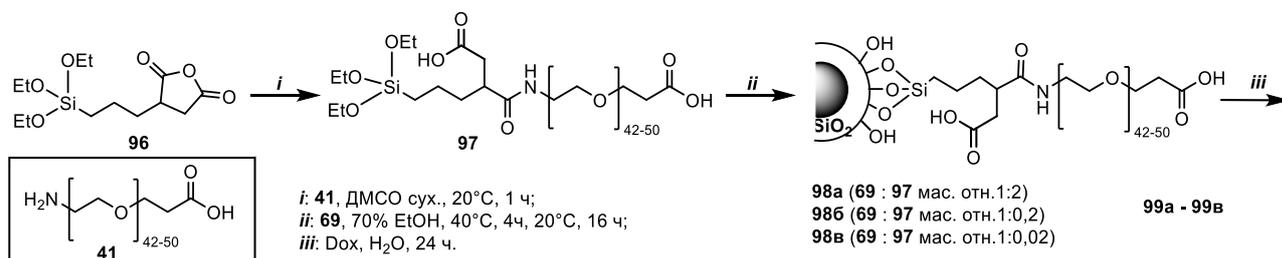


Схема 2.16

При этом нами была проведена оптимизация реакции конденсации TESPSA и PEG. Для этого к раствору TESPSA в сухом ДМСО-*d*₆ добавляли производное PEG в мольном соотношении 1:1. О ходе реакции судили по данным ¹H ЯМР спектроскопии (рисунок 2.17).

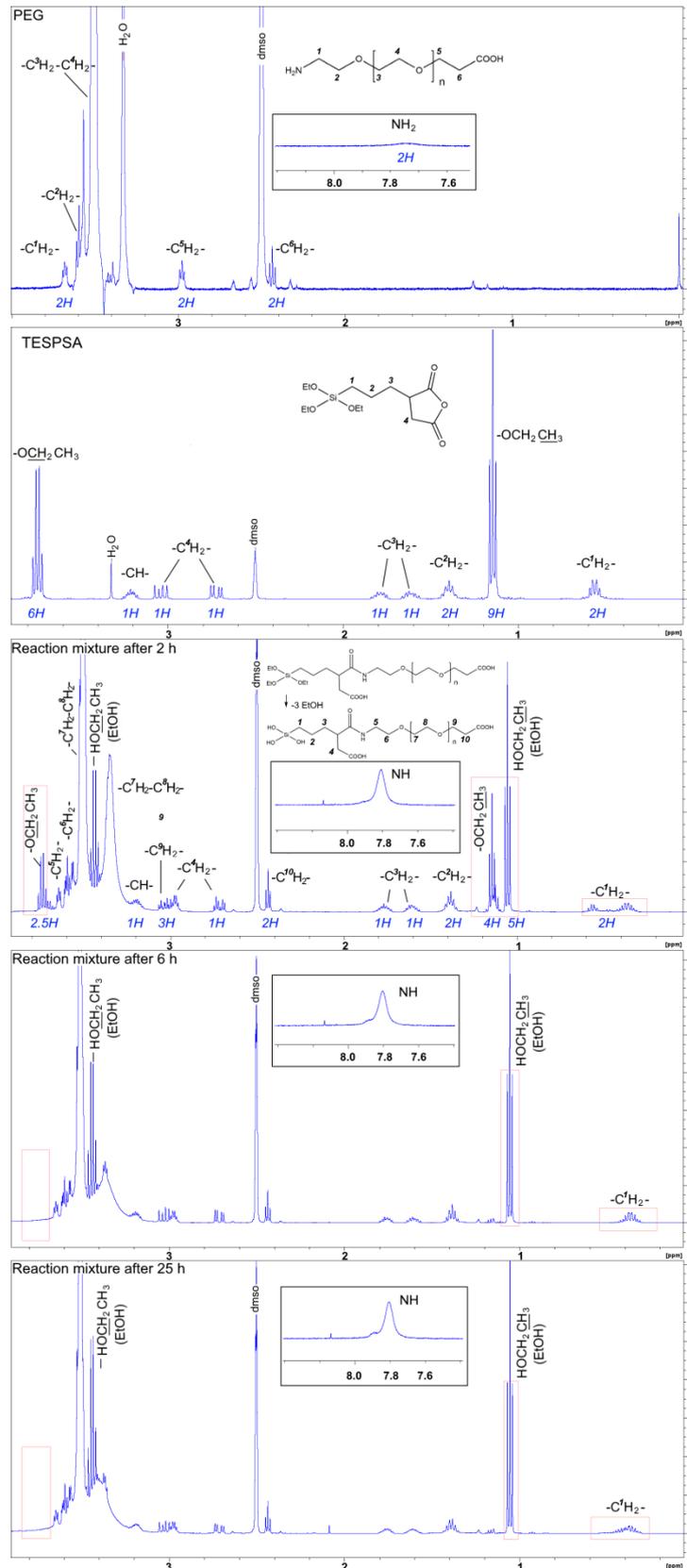


Рисунок 2.17 – Фрагменты спектров ^1H ЯМР (4,0–0,0 м.д.) исходных PEG и TESPSA, а также реакционной смеси после их смешивания в ДМСО- d_6 через 2, 6 и 25 ч (на вставках — фрагменты спектров ^1H ЯМР при $\delta = 8$ м.д.). Красными цветом выделены области, соответствующие сигналам, характеризующим степень гидролиза этоксисилановых групп.

Интенсивность сигнала в области $\delta = 7,8$ м.д. (относящегося к амидному протону) возрастала с течением времени [189]. Установлено, что образование конъюгата **97** завершается менее, чем за 2 ч. Одновременно происходит и гидролиз этоксисилильных групп, обусловленный присутствием следов воды в ДМСО-*d*₆, которая при увеличении времени выдержки будет приводить к полному гидролизу и снижению эффективности связывания силана с поверхностью МНЧ. Поэтому в ходе исследования данного процесса методом ¹H ЯМР спектроскопии нами была проведена оценка скорости гидролиза алкоксисилановых групп по уменьшению интенсивности сигналов СН₃СН₂О- (3,74 м.д.), СН₃СН₂О- (1,40 м.д.) и ≡Si-CH₂-групп (0,56 м.д.) [189] (рисунок 2.17). Через 2 ч в реакционной массе оставалось только 44% этоксисилановых групп. Поэтому для модификации наночастиц растворы ТЕСPSA и РЕГ смешивали в сухом ДМСО и через 1 ч, без выделения конъюгата **97**, добавляли к суспензии МНЧ **69** и перемешивали еще 20 ч.

Для оптимизации реакции модификации МНЧ РЕГ и получения наночастиц с оптимальными гидродинамическими и сорбционными свойствами проводили синтез с использованием различных массовых соотношений МНЧ(**69**):конъюгат(**97**) 1:2, 1:0,2, 1:0,02 (схема 2.16) и получали МНЧ **98а–98в** соответственно. Связывание конъюгата **97** с поверхностью МНЧ происходило за счет образования Si–O–Si связи. Иммунизацию РЕГ доказывали данными ЭА, РФА (таблица 2.6) и ИК-спектроскопии по полосам поглощения при 1640 см⁻¹ (валентные колебания C=O (COOH группы РЕГ и сукцината)), 1585 см⁻¹ (деформационные колебания N–H) и группа полос при 1447, 1416, 1381 см⁻¹ (деформационные колебания C–H) (рисунок 2.18).

Таблица 2.6 – Состав синтезированных МНЧ.

МНЧ	Данные РФА		Данные элементного анализа	Fe ₃ O ₄ :SiO ₂ ¹
	Fe (%)	Si (%)	C (%)	
98а	77,69	22,31	1,99	69 : 31
98б	78,81	21,19	1,30	71 : 29
98в	79,01	20,99	0,98	71 : 29

¹ рассчитано по данным РФА по уравнениям (2.5), (2.6)

Далее проводили иммобилизацию противоопухолевого препарата Dox на МНЧ **98а–98в** (схема 2.16). В ИК спектрах (рисунок 2.18) синтезированных МНЧ **99а–99в** присутствовали выраженные полосы поглощения, характерные для Dox: 1725, 1640 см⁻¹ (C=O), 1585 см⁻¹ (N–H), группа полос 1447–1381 см⁻¹ (C–H).

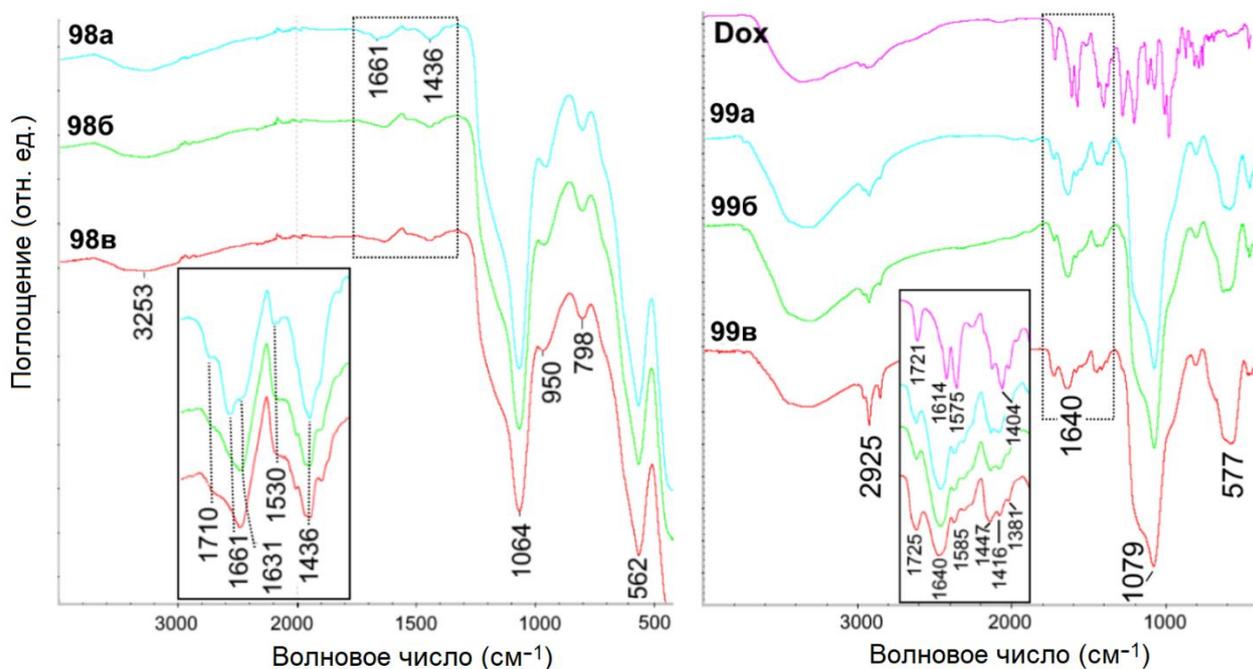


Рисунок 2.18 – ИК спектры МНЧ **98а–98в**, **99а–99в** и **Dox·HCl**.

Эффективность сорбции (по параметрам LE и LC) оценивали по аналогии с методом, описанным в разделе 2.4.3 (таблица 2.7). Синтезированные МНЧ **98а–98в** и **99а–99в** имели хорошие гидродинамические характеристики (таблица 2.7). Интересно отметить, что если исходные МНЧ **98а–98в** имели схожие характеристики, то после сорбции наилучшими были МНЧ **99а** и **99б**.

Таблица 2.7 – Гидродинамические характеристики МНЧ **98а-в**, **99а-в** и данные о сорбции на них Dox.

МНЧ	Данные ДРС			МНЧ	Данные ДРС			Сорбция	
	D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV		D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV	LE, %	LC, %
98а	139	0,09	-16,6	99а	174	0,17	+4,9	19,3	16,2
98б	139	0,12	+4,5	99б	150	0,12	+17,2	17,1	14,6
98в	139	0,14	+28,9	99в	236	0,21	+27,5	15,4	13,3

В результате оптимальными как по уровню загрузки, так и по гидродинамическим характеристикам оказались МНЧ **98а**, **99а**, которые и были наработаны, для дальнейших биологических исследований.

На рисунках 2.19а,б для примера представлены изображения ПЭМ МНЧ **98а** и **99а**. Наночастицы в результате иммобилизации Dox не претерпевали значительных изменений в форме и размерах: МНЧ **99а** имели средний диаметр 13 нм (рисунок 2.19г). Данные электронограмм подтверждали наличие у полученных МНЧ **98а** и **99а** структуры магнетита (JCPDS CardNo (79-0417)) (рисунки 2.19д,е).

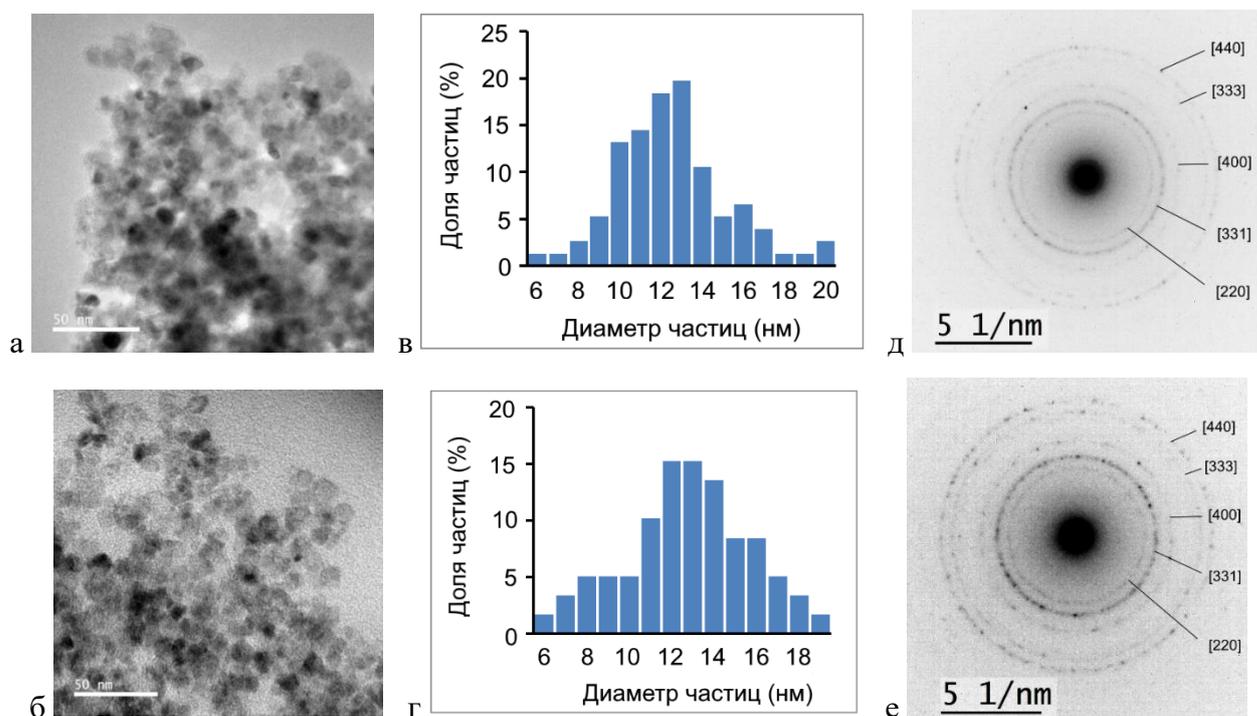


Рисунок 2.19 – Изображения ПЭМ МНЧ (а) **98а** и (б) **99а** и их распределение по размерам (в) и (г) соответственно), а также электронограммы МНЧ (д) **98а** и (е) **99а**.

Удельная намагниченность насыщения для синтезированных МНЧ **98б** и **99б** составила 53 и 48 $\text{A} \cdot \text{m}^2/\text{кг}$ соответственно (рисунок 2.20а). Для МНЧ **99а** с использованием генератора переменного высокочастотного магнитного поля TOR ULTRA H ($H = 0,27 \text{ кЭ}$, $f = 230 \text{ кГц}$) была измерена скорость разогревания в переменном магнитном поле и рассчитаны значения SAR и ILP. Динамику нагрева наблюдали в течение 600 с (за которые образец разогревался до 45°C), для расчета SAR использовали данные, полученные в течение первых 45 с нагрева (рисунок 2.20б). Показано, что МНЧ **99а** имели значения SAR – 11,4 Вт/г [Fe] и ILP – 0,11 нН $\text{м}^2/\text{кг}$.

Известно, что опухолевые ткани имеют закисленную среду (с $\text{pH} < 7$), кроме того, при попадании внутрь клетки по эндоцитозному механизму МНЧ оказываются в лизосомах, среда которых является еще более кислой ($\text{pH} \sim 4,5$). Поэтому в рамках работы было изучено выделение Dox в средах с $\text{pH} = 5,8$ и $7,4$ в том числе с использованием переменного магнитного поля (непрерывное воздействие в течение 1 ч). Количество выделившегося Dox определяли методом флуоресцентной спектрометрии ($\lambda_{\text{ex}}=480 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ нм}$). Продемонстрировано, что при $\text{pH} = 5,8$ выделение было наибольшим, при этом использование магнитного поля усиливало десорбцию Dox (рисунок 2.20в). Уровень десорбции был сопоставим с количеством Dox, выделившегося при непрерывном перемешивании в течение 24 ч при комнатной температуре (рисунок 2.20в).

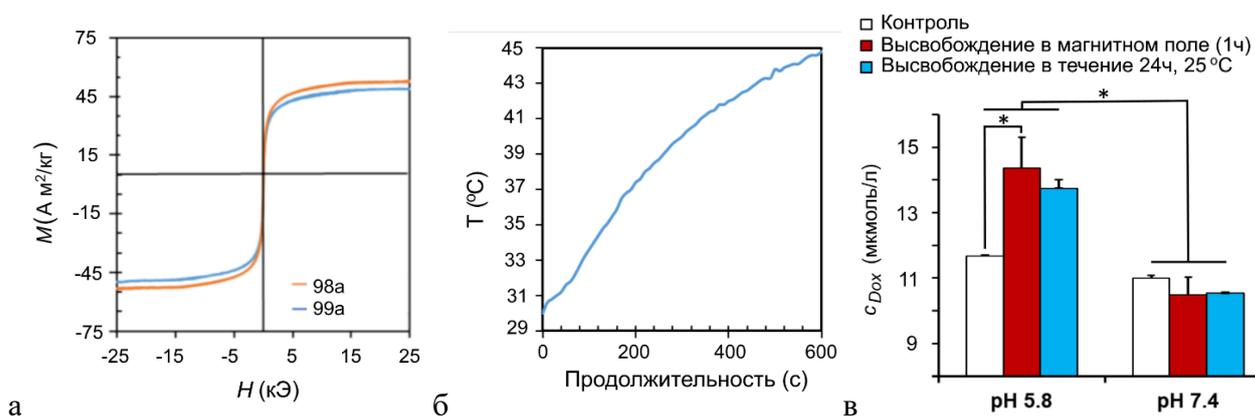


Рисунок 2.20 – (а) Кривые магнитометрии МНЧ **98а** и **99а**, (б) кривая нагрева для МНЧ **99а** и (в) высвобождение Dox из в средах с различным рН под воздействием (и без) переменного магнитного поля ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц, 1 ч), * – достоверность отличий. Контроль – высвобождение Dox из МНЧ **99а** в течение 1 ч в отсутствии воздействия магнитного поля.

Таким образом, получен и охарактеризован физико-химическими методами новый наноконъюгат на основе магнитных наночастиц, покрытых SiO₂-оболочкой, ковалентно модифицированной PEG, и содержащий сорбированный на поверхности противоопухолевый препарат Dox. Продемонстрирована рН-опосредованная десорбция и возможность его высвобождения под действием переменного магнитного поля, что определяет возможность использования данного материала в качестве средства доставки Dox с эффективным магнитоопосредованным высвобождением противоопухолевого препарата.

2.4.5 Синтез МНЧ с SiO₂/PEG-покрытием, содержащих производные RGD-пептида

С использованием МНЧ **78** нами был получен наноконъюгат **105**, содержащий ядро на основе МНЧ Fe₃O₄, SiO₂/APS-оболочку с флуоресцентной меткой Cyanine5 (для визуализации накопления МНЧ в клетках оптическими методами) и имеющих PEG-покрытие с ковалентно связанным циклическим пептидом *c*(RGDfC) (схема 2.17). Для этого часть аминокрупп МНЧ **78** конденсировали с активированным эфиром цианинового красителя Cyanine5 **100**, взятого в количестве 0,75 мас.% по отношению к МНЧ. Далее наносили PEG-покрытие путем конденсации аминокрупп APS-фрагментов с активированным эфиром PEG **102**. Ковалентно закрепленный PEG содержал на свободном конце молекулы малеимидную группу, способную реагировать с тиолами, образуя тиоэфиры. Для связывания с PEG была использована SH-группа L-Cys, входящего в состав коммерчески доступного циклического пептида *c*(RGDfC) **104** (схема 2.17) [234].

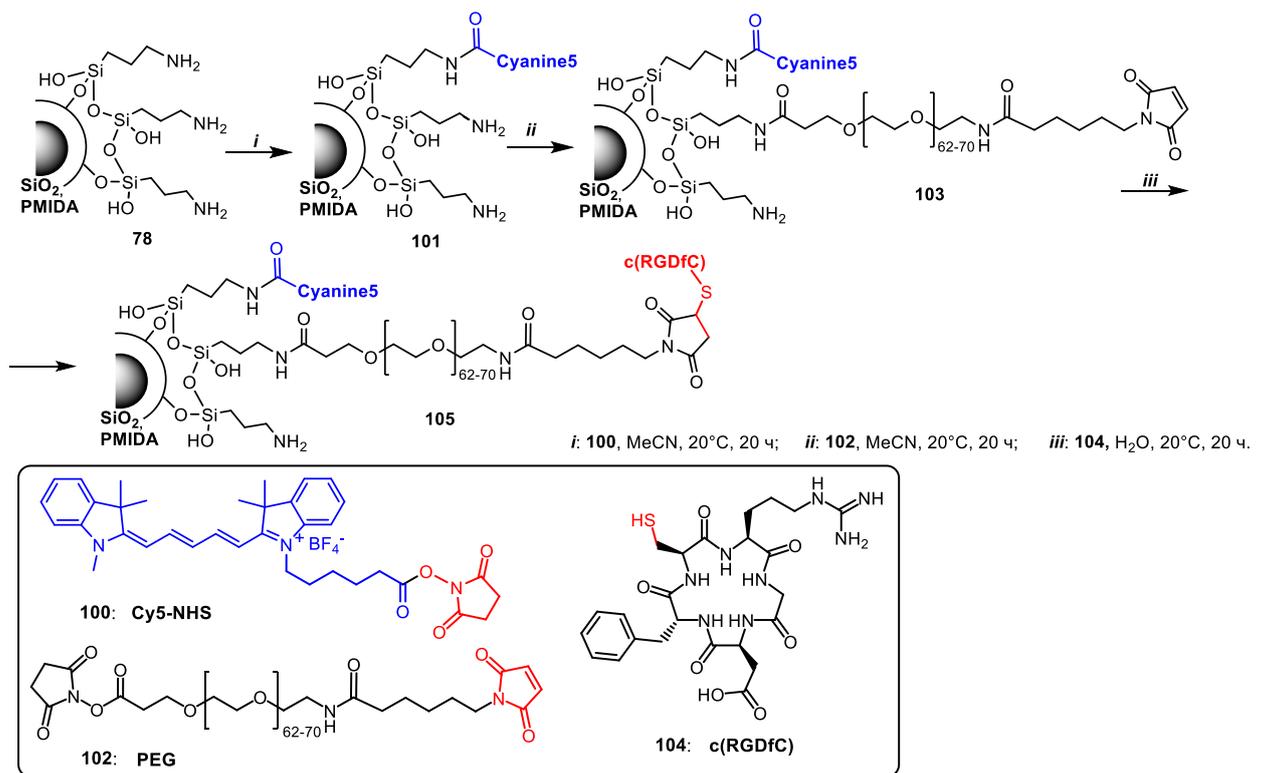


Схема 2.17

Наличие каждого компонента подтверждали данными ИК-спектроскопии (рисунок 2.21) и ЭА.

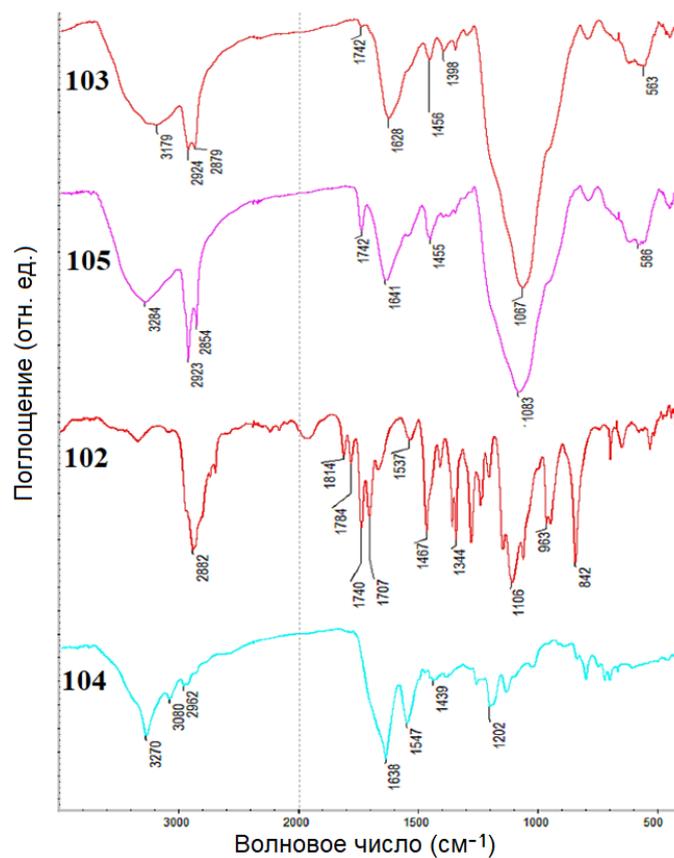


Рисунок 2.21 – ИК спектры синтезированных МНЧ **103** и **105**, а также исходных PEG **102** и c(RGDfC) **104**.

Наличие PEG подтверждали по полосам поглощения, связанных с валентными колебаниями C=O, входящих в состав малеимидного фрагмента, и амидных групп в области 1742, 1628 и 1544 см^{-1} , а также по полосам, характерным для валентных колебаний C–H (CH_2) в области 2879–2924 см^{-1} (полосы деформационных колебаний C–H (CH_2) в области 1456 и 1398 см^{-1} выражены слабо). Наличие фрагмента c(RGDfC) подтверждали по набору полос поглощения амидных групп 1641 см^{-1} и 1540 см^{-1} , а также CH_2 (полосы деформационных колебаний 1455 см^{-1}), характерных для данного пептида (рисунок 2.21).

По данным ЭА (по мас. содержанию C) рассчитывали содержание PEG и c(RGDfC) в синтезированных образцах по аналогии с методикой, описанной в разделе 2.4.4.1. В результате содержание PEG и пептида достигало 36 и 20 мкмоль в расчете на 1 г МНЧ **105** соответственно (таблица 2.8).

Таблица 2.8 – Состав синтезированных МНЧ

МНЧ	Данные элементного анализа			Количество органических компонентов (ммоль/г) ¹
	С (%)	Н (%)	Н (%)	
103	11,71	2,44	1,43	0,036 (PEG)
105	8,02	1,87	1,07	0,020 (c(RGDfC))

¹ Рассчитано на основе данных элементного анализа.

Спектры поглощения и испускания (λ_{ex} 644 нм, λ_{em} 660 нм) МНЧ **105** соответствовали спектрам Cyanine5 (рисунок 2.22), что говорит о сохранении структуры и свойств флуоресцентной метки в составе наноконъюгата, и может позволить наблюдать их распределение в опытах *in vitro* оптическими методами (например, проточный цитометр с флуориметрическим датчиком или конфокальный микроскоп).

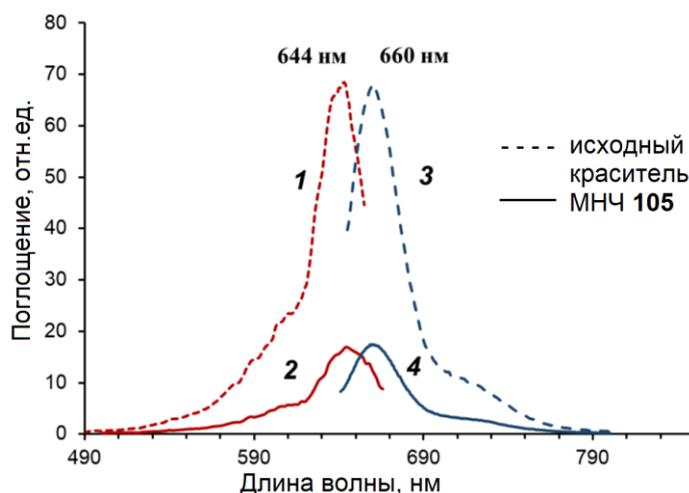


Рисунок 2.22 – Спектры возбуждения (1, 2) и испускания (3, 4) исходного флуоресцентного красителя Cyanine5 и МНЧ **105** соответственно.

Синтезированные наноконъюгаты имели гидродинамический диаметр менее 200 нм (таблица 2.9), что делает их потенциально пригодными не только для *in vitro*, но и для *in vivo* экспериментов.

Таблица 2.9 – Гидродинамические характеристики МНЧ **103**, **105**.

МНЧ	Данные ДРС		
	D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV
103	166	0,06	-12,8
105	128	0,21	-8,7

Средний диаметр синтезированных наноконъюгатов составил 22–26 нм (средний размер ядра – 9 нм) (рисунки 2.23а,б), структура магнетита подтверждена данными электронограмм (рисунки 2.23в,г). Для синтезированного наноконъюгата **105** релаксивность r_2 ($189 \text{ ммоль}^{-1}\text{с}^{-1}$) (рисунок 2.23д) оказалась выше $100 \text{ ммоль}^{-1}\text{с}^{-1}$ – значений, свойственных большинству коммерчески доступных препаратов [130].

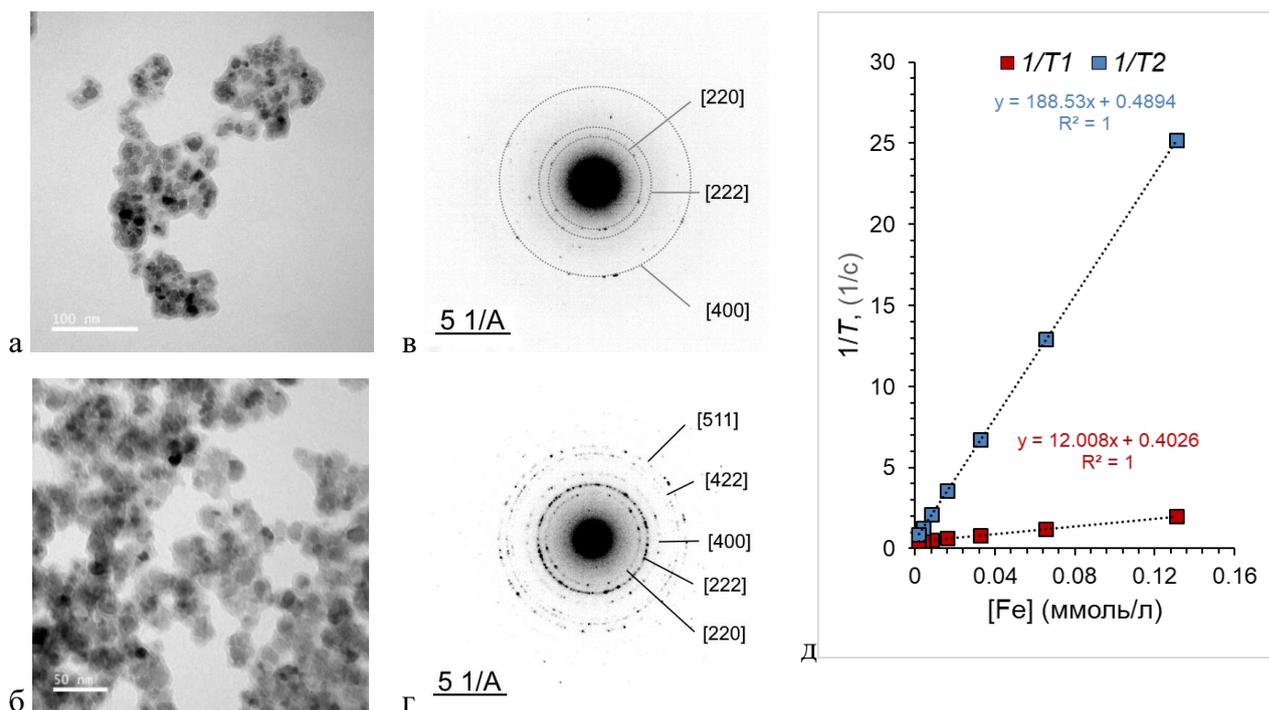


Рисунок 2.23 – Изображения ПЭМ МНЧ (а) **103** и (б) **105**, их электронограммы (в) и (г) соответственно; (д) зависимость скорости релаксации для МНЧ **105** от концентрации наночастиц (пересчитанной на концентрацию $[Fe]$, ммоль/л) в водных коллоидных растворах.

Используя этот же подход, были получены наноконъюгаты **111**, **112** на основе Fe_3O_4 (стабилизированные PMIDA и без использования стабилизатора), имеющие SiO_2 /APS-оболочку, модифицированную конъюгатом PEG с векторным пептидом RGD, и содержащие флуоресцентную метку (Cyanine5). Для этого защищенный RGD-пептид **18** со свободной α -аминогруппой Arg конденсировали с активированным эфиром PEG **93** (схема 2.18). Далее его конденсировали с поверхностными аминогруппами APS-фрагментов МНЧ **75** и **78** в соотношении МНЧ:конъюгат = 1:5. Защитные группы пептида МНЧ **107** и **108** удаляли ацидолизом и получали МНЧ **109** и **110** (схема 2.18).

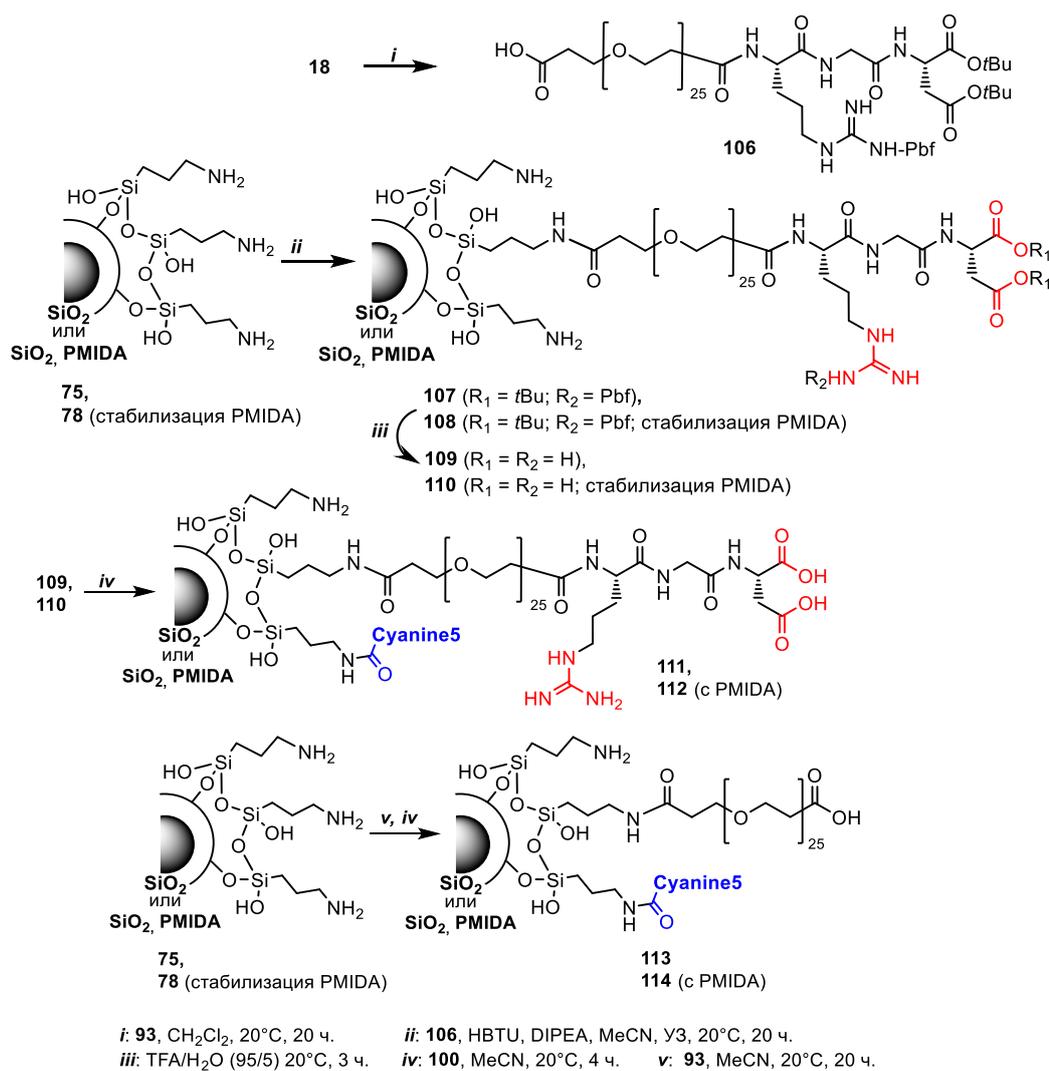


Схема 2.18

Наличие каждого присоединяемого фрагмента оценивали аналогично предыдущему подходу по ИК спектрам (рисунки 2.24а-в), а также по данным РФА и ЭА (таблица 2.10).

Так, в ИК-спектрах МНЧ **107** (рисунок 2.24а) и **108** (рисунок 2.24б), помимо широких полос в области 560 см^{-1} (Fe–O) и 1070 см^{-1} (Si–O), относящихся к сигналам ядра и покрытия соответственно, присутствовали полосы поглощения: $COOtBu$ ($C=O$, валентные колебания $\sim 1730\text{ см}^{-1}$), амидных групп ($1624\text{--}1636\text{ см}^{-1}$ (Амид I) и $1533\text{--}1548\text{ см}^{-1}$ (Амид II)), а также CH_2 (валентные колебания $\sim 2930\text{ см}^{-1}$ и деформационные колебания $1350\text{--}1460\text{ см}^{-1}$), характерных для данного пептида [212] и PEG (рисунок 2.24г). В спектрах МНЧ **109** (рисунок 2.24а) и **110** (рисунок 2.24б) полосы в области $\sim 1730\text{ см}^{-1}$ ($COOtBu$) исчезают, но появляются дополнительные полосы в области 1670 см^{-1} (COOH), что может свидетельствовать о деблокировании карбоксильных групп Asp.

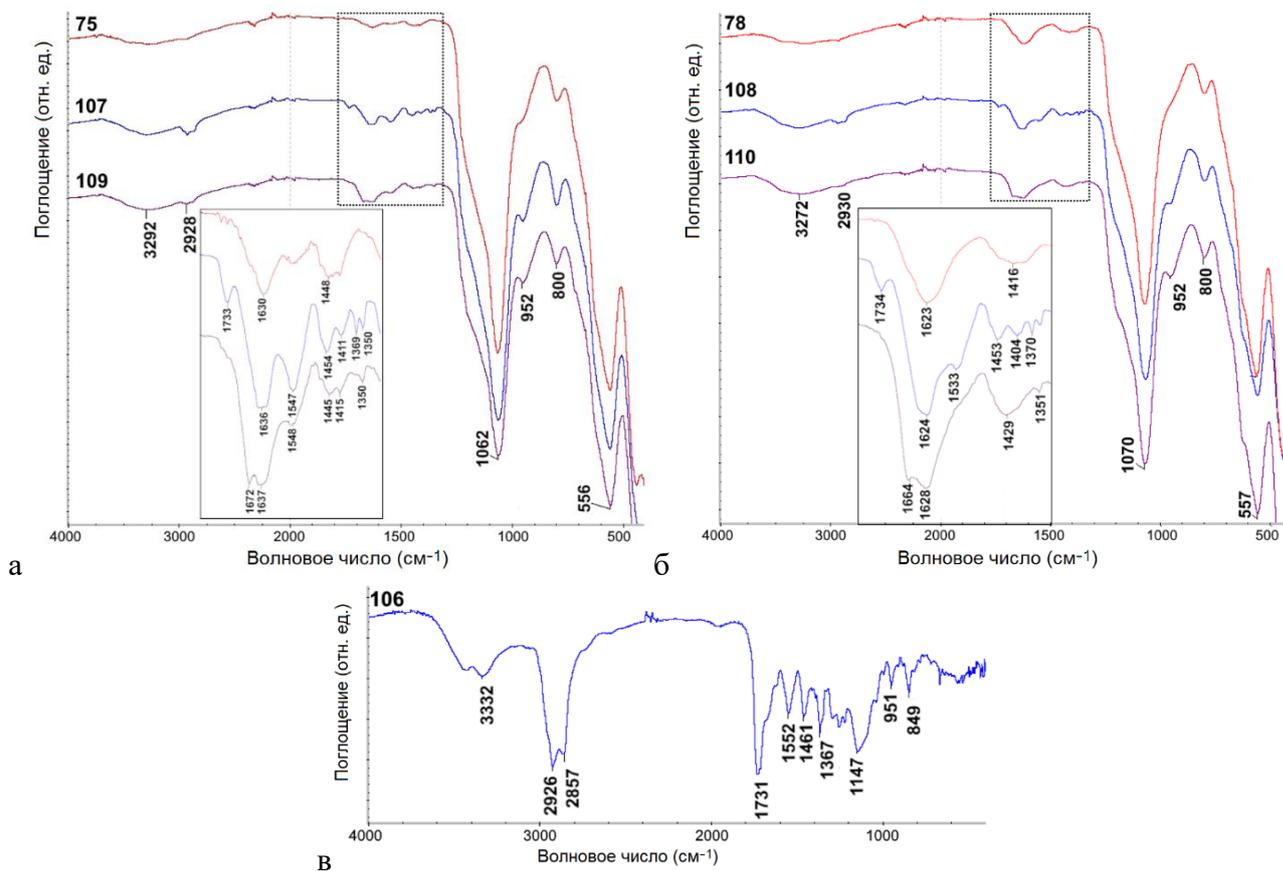


Рисунок 2.24 – ИК спектры МНЧ 107–110, а также конъюгата 106.

Таблица 2.10 – Состав синтезированных МНЧ

МНЧ	Данные РФА			Данные элементного анализа			$\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{SiO}_2^1$
	Fe (%)	Si (%)	P (%)	C (%)	H (%)	N (%)	
107	74,74	25,06	0	3,04	0,70	0,64	66 : 34
108	74,06	24,86	0,65	3,91	0,95	0,75	66 : 34
109	76,17	23,60	0	3,37	0,59	0,55	68 : 32
110	75,12	24,02	0,60	3,83	0,72	0,63	67 : 33

¹ рассчитано по данным РФА по уравнениям (2.5), (2.6)

По данным элементного анализа в образцах, полученных на основе МНЧ без стабилизации (МНЧ **107**) и PMIDA-стабилизированных МНЧ (МНЧ **108**), содержание конъюгата PEG и RGD-пептида достигало 16 и 11 мкмоль на 1 г МНЧ соответственно (при расчете по мас.% содержанию С по аналогии с методикой раздела 2.4.4.1.). Коллоидные растворы МНЧ **110** (полученные с использованием PMIDA) имели несколько лучшие гидродинамические характеристики, чем растворы МНЧ **109**, что подчеркивает стабилизирующую роль молекул PMIDA (таблица 2.11).

Таблица 2.11 – Гидродинамические характеристики синтезированных МНЧ

МНЧ	Данные ДРС		
	D_h , nm	PdI	Z^{av} , mV
109	124	0,28	-13,5
110	103	0,23	-30,9

Средний диаметр ядра наноконъюгатов составил 9 нм, а толщина оболочки 4–7 нм (рисунки 2.25а,б), структура магнетита подтверждена данными электронограмм (рисунки 2.25в,г). Релаксивность r_2 для синтезированных МНЧ **109** и **110** составила 204 и 200 ммоль⁻¹с⁻¹ соответственно (т.е. выше 100 ммоль⁻¹с⁻¹ – значений, свойственных большинству коммерчески доступных препаратов [130]).

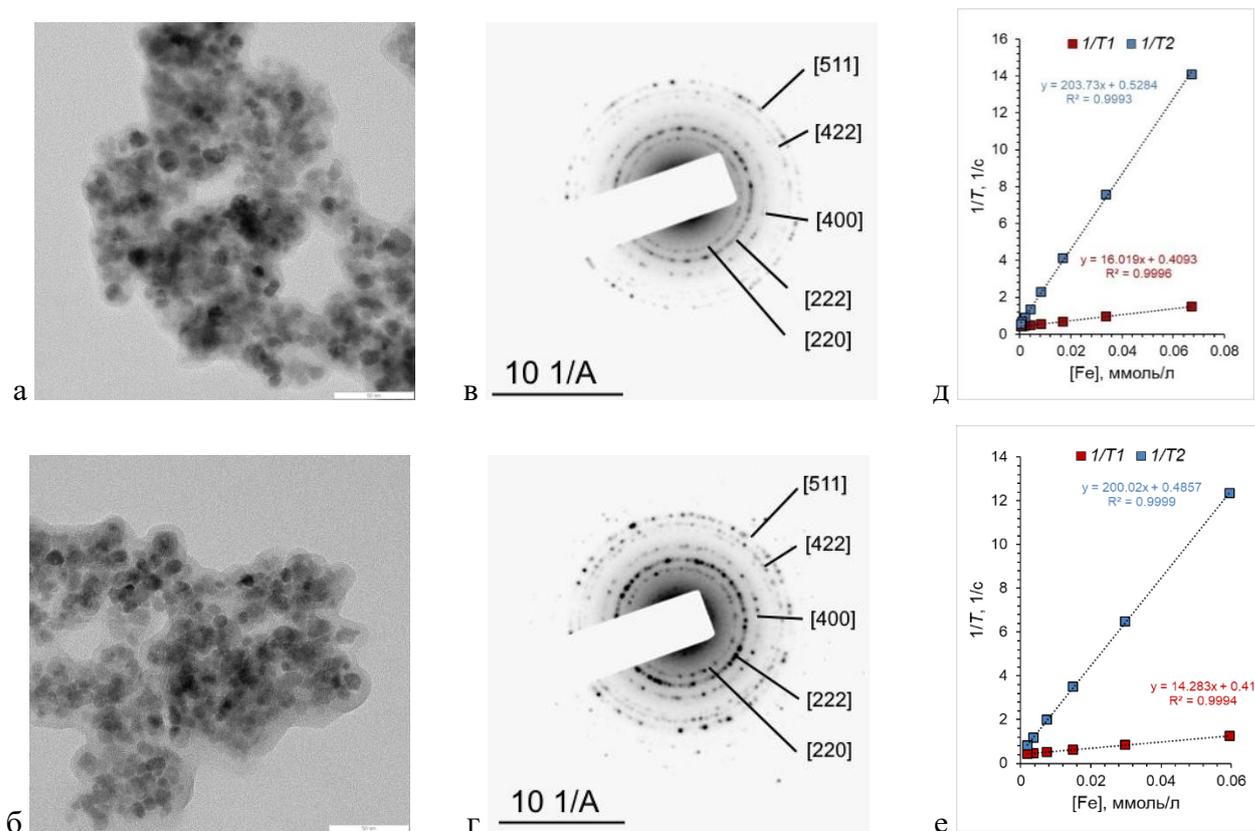


Рисунок 2.25 – Изображения ПЭМ МНЧ (а) **109** и (б) **110**, их электронограммы (в) и (г) соответственно, а также зависимость скорости релаксации для МНЧ (д) **109** и (е) **110** от концентрации наночастиц (пересчитанной на концентрацию [Fe], ммоль/л) в водных коллоидных растворах.

Чтобы избежать деструкции цианинового красителя в сильноокислых условиях, как это произошло в случае соединения **40**, флуоресцентную метку вводили на последнем этапе путем конденсации свободных аминогрупп APS с активированным эфиром Cyanine5-NHS **100** (схема 2.18). Для проведения биологических экспериментов также были синтезированы PEG-модифицированные МНЧ **113** и **114** (на основе МНЧ и PMIDA-модифицированных МНЧ соответственно), меченные Cyanine5 аналогичного строения, но не содержащие фрагмента

RGD (схема 2.18). Спектры испускания полученных наноконъюгатов **111–114** соответствовали спектрам красителя Cyanine5 (рисунок 2.26).

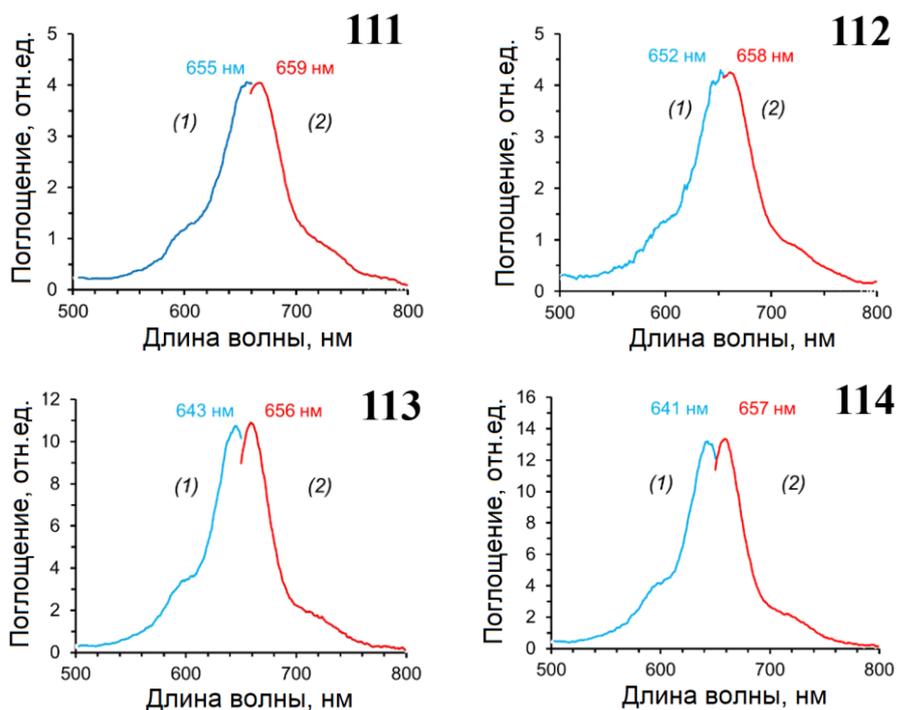


Рисунок 2.26 – Спектры возбуждения (1) и испускания (2) МНЧ **111–114**.

В результате был разработан подход к получению МНЧ с SiO₂/PEG-покрытием, содержащих векторный RGD-пептид и флуоресцентную метку (Cyanine5). Продемонстрировано, что образцы, полученные на основе PMIDA-стабилизированных МНЧ, содержат большее количество пептида, а также имеют лучшие гидродинамические характеристики, чем образцы, полученные на основе нестабилизированных МНЧ. Флуоресцентная метка в составе МНЧ позволяет визуализировать их связывание и накопление в клетках оптическими методами, а благодаря магнитному ядру, МНЧ обладают высоким коэффициентом релаксивности (r_2), позволяющем визуализировать их в тканях методом МРТ. Синтезированные наноконъюгаты могут оказаться эффективны в диагностике и адресной терапии онкологических заболеваний.

2.5 Исследование биологической активности синтезированных материалов

2.5.1 Оценка цитотоксичности материалов на основе карборанов

Оценку цитотоксичности (МТТ-тест) соединений **61–63**, содержащих ядра *клозо*- (**61**, **62**) или *нидо*- (**63**) карборанов, в отношении клеток нормальной ткани WI-38 и клеток опухолевых тканей человека A549, SK-BR-3, SNU-1, Jurkat проводили в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва) под руководством к.фарм.н. М.А. Барышниковой [208].

Инкубацию клеточных культур с исследуемыми соединениями проводили без облучения медленными нейтронами, что необходимо для реализации эффекта БНЗТ. Поэтому для конъюгатов KRGD-пептида с карборанами **61–63** в данном эксперименте проявление неизбирательной цитотоксичности как на клетки нормальной ткани, так и на клетки опухолевой ткани, является нежелательным эффектом. Производные *клозо*-карборана **61** и **62** проявили выраженный цитотоксический эффект в концентрации $\geq 0,1$ мМ. Производное *нидо*-карборана **63**, не проявило цитотоксического эффекта в исследуемом концентрационном диапазоне (рисунок 2.27).

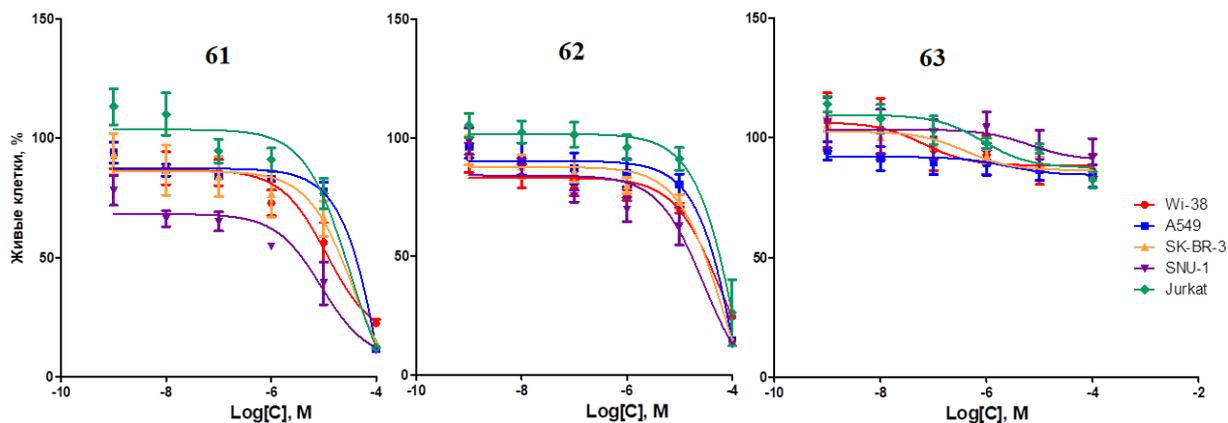


Рисунок 2.27 – Выживаемость клеток после 72 ч инкубации с соединениями **61–63**.

Таким образом, показано, что производное *нидо*-карборана не проявило выраженного цитотоксического эффекта в отличие от *клозо*-производных. С учетом хорошей растворимости производного *нидо*-карборана в воде, оно является подходящим кандидатом для разработки на его основе лекарственных препаратов для БНЗТ.

2.5.2 Оценка противоопухолевой активности материалов, загруженных Dox

2.5.2.1 Оценка цитотоксичности материалов на основе МНЧ с SiO₂/APS-покрытием, загруженных Dox

Оценку цитотоксичности (МТТ-тест) МНЧ **81–92** (раздел 2.4.3), загруженных Dox, и исходных для них МНЧ **69–80** (раздел 2.4.2) в отношении клеток НЕК-293 проводили Поздина В.А. и Минин А.С. на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург) [222]. Исходные МНЧ **69–80** не проявили выраженной цитотоксичности (рисунок 2.28а), тогда как МНЧ **81–92**, загруженные Dox, показали дозозависимую цитотоксичность в диапазоне концентраций от 0,1 мг/мл до 0,005 мг/мл. Наибольший эффект оказали МНЧ с оболочкой SiO₂, синтезированные с использованием РМДА, эффект которых был близок к цитотоксичности исходного Dox (рисунок 2.28б).

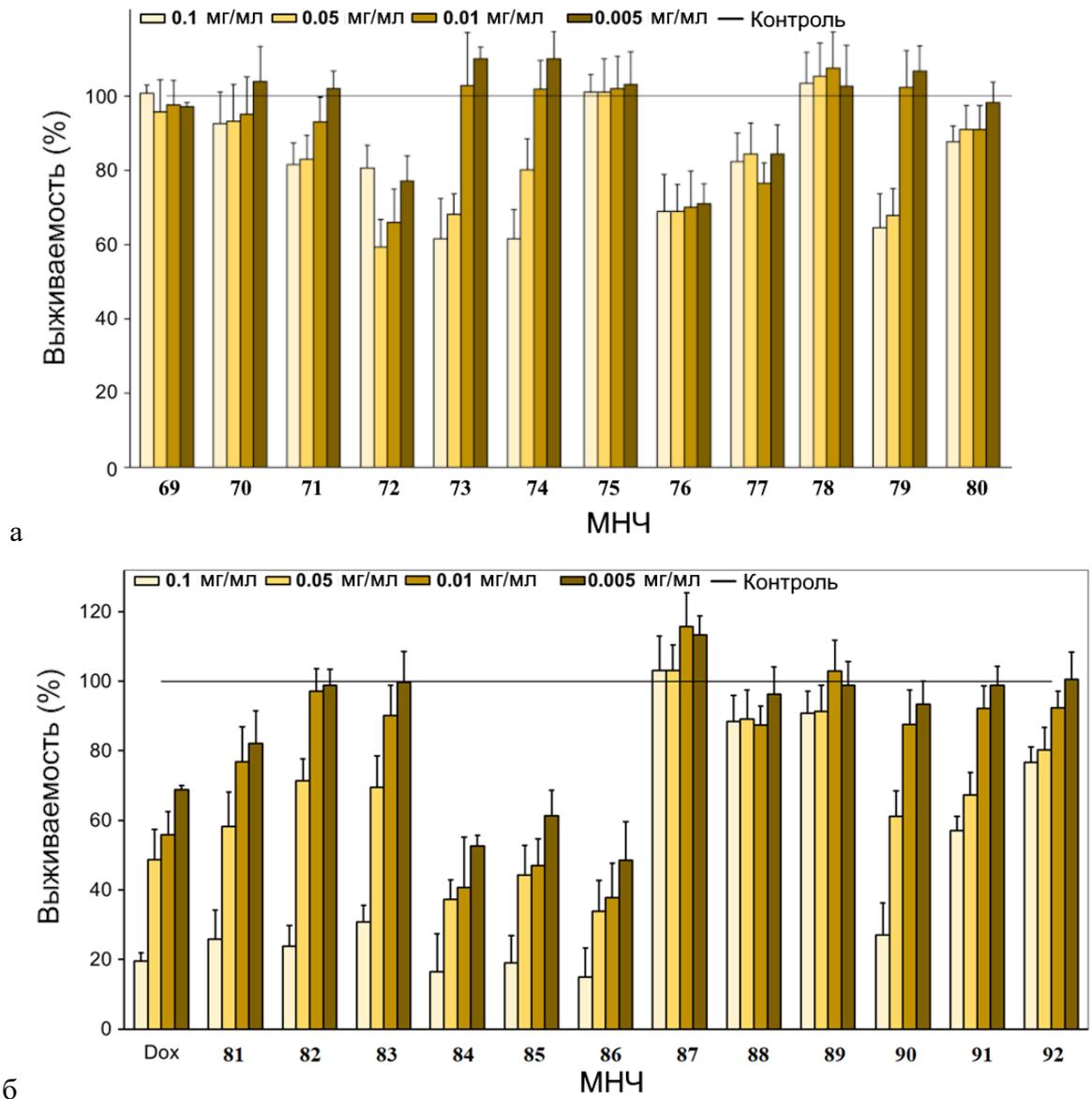


Рисунок 2.28 – Выживаемость клеток HEK-293 после 48 ч инкубации с (а) МНЧ **69–80** и (б) МНЧ **81–92**, загруженными Dox.

С помощью конфокальной микроскопии мы подтвердили процесс десорбции и накопления Dox внутри клеток HEK-293 на примере МНЧ **86**. Для лучшей визуализации клеток, их ядра были окрашены Hoechst 33342 (синий) (рисунок 2.29а). МНЧ **86** имели слабую флуоресценцию. Однако, после инкубации клеток с МНЧ **86**, мы наблюдали дополнительное окрашивание клеток за счет высвобождения Dox (красный) из материала (рисунок 2.29б). Чтобы получить детализованное изображение в конфокальной микроскопии, использовали длину волны возбуждения 405 нм (для контрастирования ядер, окрашенных Hoechst) и 561 нм (для контрастирования Dox) (рисунок 2.29).

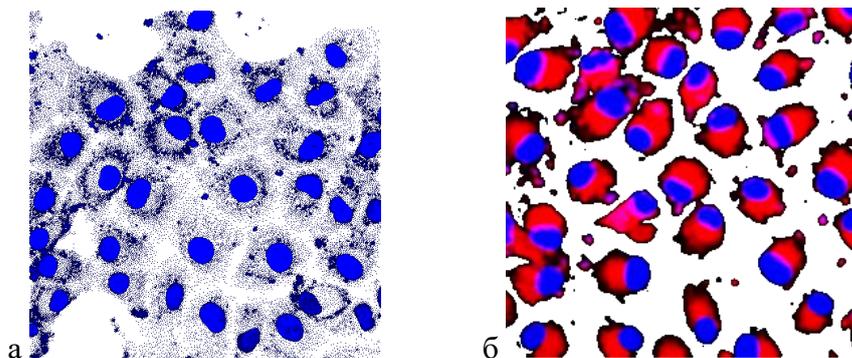


Рисунок 2.29 – Изображения конфокальной микроскопии (а) исходных клеток НЕК-293, окрашенных Ноеchst, и (б) клеток после 24 ч инкубации с МНЧ 86.

Продемонстрировано, что материалы, содержащие Dox, полученные на основе МНЧ, стабилизированные PMIDA и имеющие SiO₂-покрытие, проявили наибольший цитотоксический эффект, обусловленный высвобождением Dox в клетках после их инкубации с МНЧ, и могут выступать в роли потенциальных средств доставки данного препарата.

2.5.2.2 Оценка цитотоксичности материалов на основе МНЧ с PEG-покрытием, загруженных Dox

Оценку цитотоксичности МНЧ 946, 956, 98а, 99а, содержащих покрытие PEG проводили в Сибирском государственном медицинском университете Минздрава России (г. Томск) под руководством к.б.н. А.Г. Першиной [215].

Цитотоксичность МНЧ 956, загруженных Dox, и исходных для них МНЧ 946, оценивали в отношении фибробластов (BJ-5ta) и опухолевых клеточных линий человека (4Т1, MDA-MB231). Продемонстрировано, что МНЧ 956 проявили дозозависимый токсический эффект на все типы клеток в тестируемом диапазоне концентраций, при этом цитотоксичность в отношении фибробластов была заметно менее выражена (рисунок 2.30). МНЧ 946, не содержащие Dox, токсический эффект не проявили (рисунок 2.30).

Цитотоксичность МНЧ 99а, загруженных Dox, и исходных для них МНЧ 98а оценивали в отношении опухолевых клеточных линий человека и мыши: MDA-MB231, HepG2, 4Т1, СТ26, В16. МНЧ 99а проявили дозозависимый токсический эффект на всех типах клеток в исследуемом концентрационном диапазоне, при концентрации МНЧ от 20,9 мкг[Fe]/мл, который был сопоставим с цитотоксичностью раствора Dox в концентрации 1 мкМ (582 мкг/мл) (рисунок 2.31).

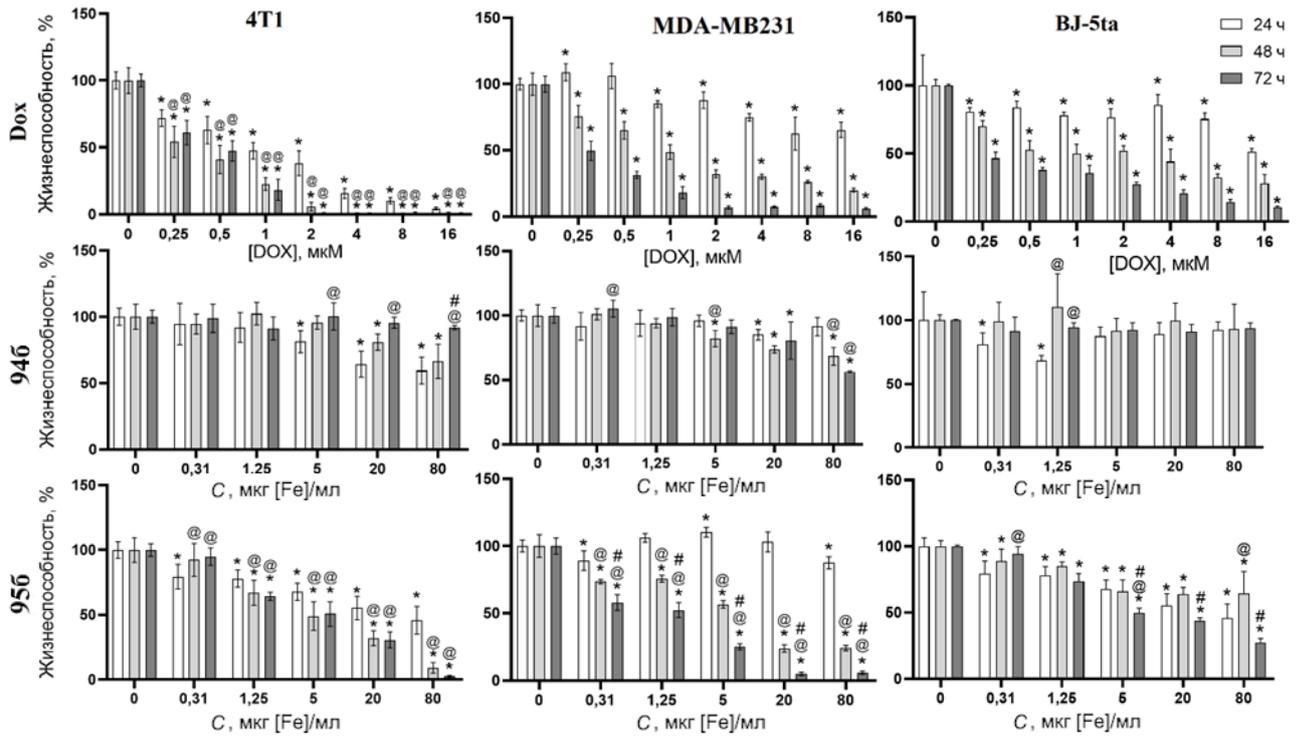


Рисунок 2.30 – Выживаемость клеток линий 4Т1, MDA-MB231, BJ-5ta после 24, 48, 72 ч инкубации с МНЧ 946 и 956. Данные представлены как $M \pm SD$. * – достоверность отличий от контроля.

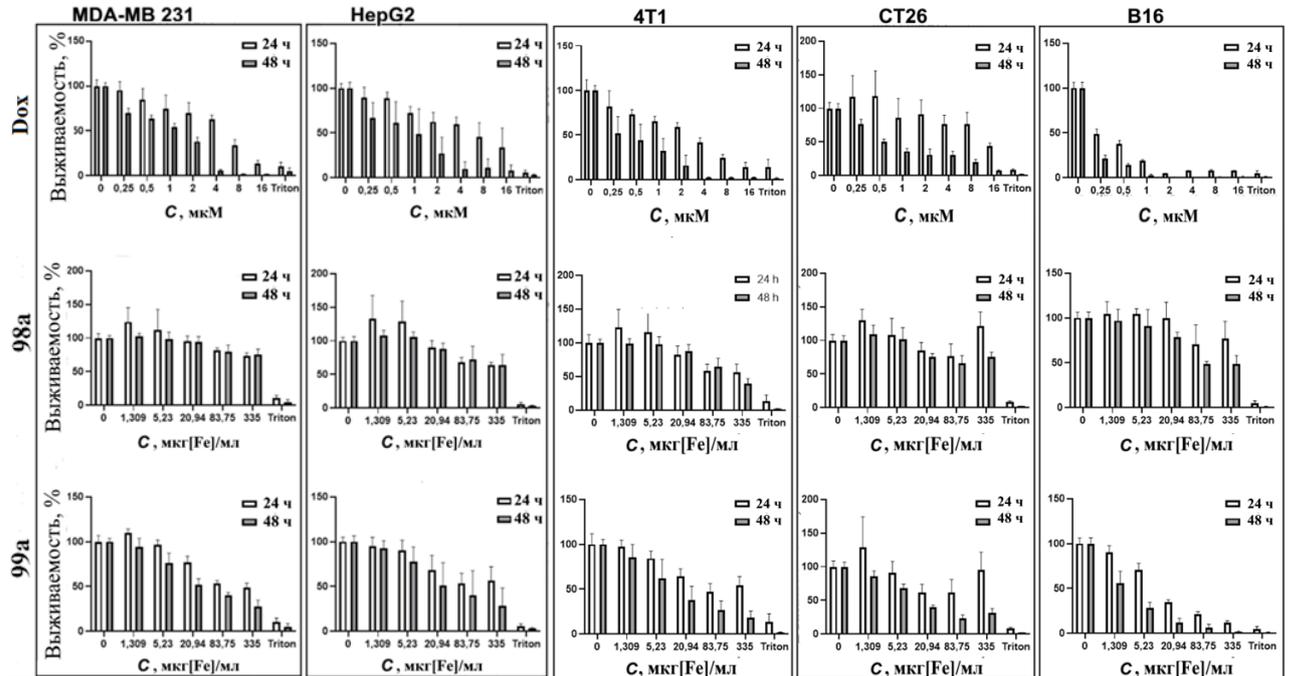


Рисунок 2.31 – Выживаемость клеток MDA-MB231, HepG2, 4Т1, СТ26, В16 после 24 и 48 ч инкубации с МНЧ 98а и 99а.

Поскольку в разделе 2.4.4.2 было продемонстрировано увеличение эффективности выделения Dox под действием переменного магнитного поля, на примере МНЧ 99а дополнительно был изучен цитотоксичный эффект в отношении клеток линии 4Т1 с использованием с использованием генератора переменного магнитного поля TOR Ultra NT с

теми же параметрами: $H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц, 1 ч. Было продемонстрировано усиление гибели клеток в 2,5 раза при воздействии переменного магнитного поля в присутствии МНЧ **99a**, нагруженных Dox, в сравнении с исходными для них МНЧ **98a**, не содержащими Dox (рисунок 2.32).

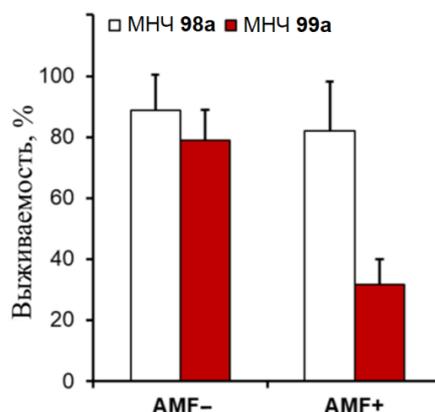


Рисунок 2.32 – Жизнеспособность клеток линии 4T1 в зависимости от инкубации с МНЧ **98a** (исходных) и **99a** (нагруженных Dox) без (AMF-) и при наложении переменного магнитного поля (AMF+).

Продемонстрирована выраженная биологическая активность наноматериалов, содержащих в своем составе Dox. Отсутствие выраженной токсичности исходных МНЧ и наличие, сопоставимой с активностью нагруженного препарата, цитотоксичности Dox-содержащих МНЧ позволяет судить об эффективном высвобождении препарата из состава наноконструкций. Показана возможность более эффективного выделения Dox из синтезированных материалов под действием переменного магнитного поля, что в опытах *in vitro* приводит к усилению цитотоксического эффекта. Полученные материалы можно рассматривать в качестве потенциальных средств доставки Dox.

2.5.3 Оценка эффективности материалов на основе МНЧ для терапии опухолей в опытах *in vivo*

В СибГМУ (г. Томск) в экспериментах *in vivo* проведена оценка противоопухолевой активности МНЧ **956** в отношении опухоли 4T1 у мышей линии BALB/c при внутривенном и внутриопухолевом способе введения препарата. Для оценки терапевтической эффективности применения наночастиц в сочетании с воздействием переменного магнитного поля (TOR Ultra NT, $H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) измеряли объем и массу опухоли, рассчитывали индекс ТРО, проводили анализ выживаемости.

При внутривенном введении, животным вводили 200 мкл суспензии МНЧ **946** или **956** с концентрацией 1 мг/мл. С животными, взятыми в качестве группы контроля, не проводили никаких манипуляций. Через 24 ч после введения МНЧ, животных размещали в кроватке прибора – генератора переменного магнитного поля и проводили воздействие AMF

($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) в течение 1 ч. После этого наблюдали за изменением размера опухоли у животных разных тестовых групп. Через 24 ч после первого воздействия переменным магнитным полем животным снова вводили внутривенно суспензию того же состава, объема, концентрации и через 24 ч после введения проводили воздействие переменным магнитным полем в течение 1 ч.

Согласно данным гистологического анализа, через 24 ч после однократного внутривенного введения МНЧ 956 в опухоли мышей обнаруживали единичные Перлс-позитивные клетки по периферии зоны некроза, что свидетельствует о слабом накоплении наночастиц в опухоли после внутривенного введения. На основании данных расчета индекса торможения роста опухоли ТРО, установлено, что двукратное внутривенное введение МНЧ 956 с последующим воздействием переменного магнитного поля ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) в течение 1 ч через 24 ч после введения МНЧ не оказывает противоопухолевого действия в отношении опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c. Различия по размеру и массе извлеченных из животных опухолей 4Т1 в интактной и экспериментальных группах не были статистически значимыми.

Выживаемость в интактной группе и группе с двукратным внутривенным введением МНЧ 956 и воздействием АМФ ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) через 24 ч после каждого введения в течение 1 ч, к 21 суткам эксперимента снижалась и составляла 83% и 80% соответственно. Можно заключить, что МНЧ 956 не обладали токсическим эффектом в отношении опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c в методе комбинированной терапии (магнитной гипертермии и высвобождении цитотоксического препарата) при одно- и двукратном внутривенном введении.

При однократном внутривенном введении МНЧ 956 (100 мкл суспензии МНЧ, 3 мг/мл) и экспозиции животных в переменном магнитном поле ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) в течение 1 ч через 24 и 48 ч после введения наночастиц наблюдали небольшое замедление скорости роста опухолевого узла (рисунок 2.33).

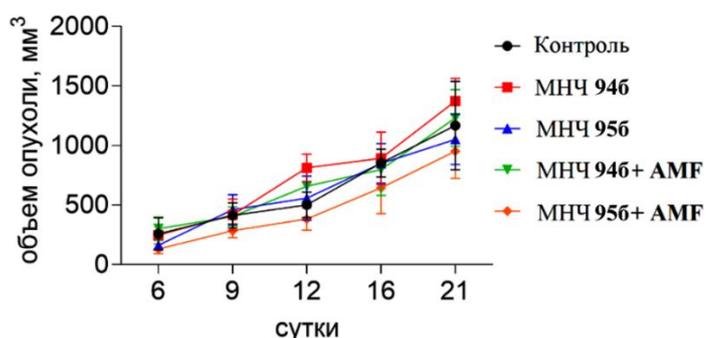


Рисунок 2.33 – Размер опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c после внутривенного введения МНЧ 946 и 956, в том числе, с последующим воздействием переменного магнитного поля (+АМФ). Контроль – группа интактных животных.

Индекс ТРО на 21 сутки в экспериментальных группах МНЧ **956** и МНЧ **956**+AMF составил 12% и 20% соответственно. Использование в МНЧ **946**, не загруженных Dox, по аналогичной схеме, значимого замедления роста опухоли, по сравнению с контролем, не показало (рисунок 2.33).

При трехкратном внутриопухолевом введении МНЧ 956 (50 мкл суспензии МНЧ 3 мг/мл) на 5-е сутки после трансплантации опухоли и на 11-е, 17-е сутки (по 100 мкл суспензии МНЧ 3 мг/мл) и экспозиции животных в переменном магнитном поле ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) в течение 1 ч через 24 и 48 ч после введения наночастиц, выявляли единичные метастазы в легких. Тогда как у групп животных, которые проходили аналогичную терапию доксорубицином или у животных интактной группы были обнаружены многочисленные метастазы в легких, сливающиеся между собой, а также единичные метастазы в брюшной полости.

Согласно данным гистологического анализа, при окраске по Перлсу, накопление Fe отмечали в опухолях в центральных и периферических областях, а также в зонах некроза опухоли. В опухолях интактной группы накопления Fe не наблюдали.

Схема трехкратного внутриопухолевого введения МНЧ **956** увеличивала выживаемость мышей (до 100 % на 31-е сутки) по сравнению с группами животных, которые проходили терапию доксорубицином или с интактной группой. Кривые Каплана-Мейера для всех исследуемых групп, показывающие процент выживших животных в зависимости от времени, представлены на рисунке 2.34.

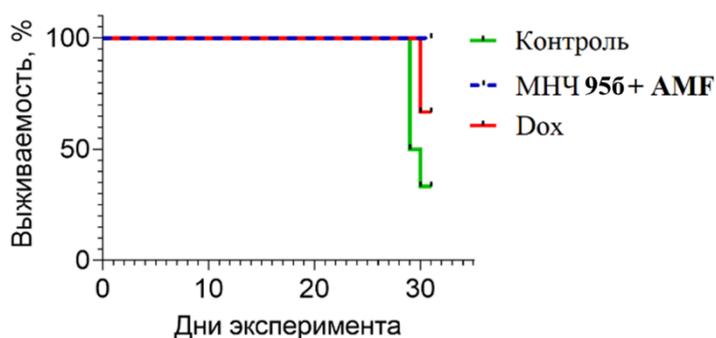


Рисунок 2.34 – Влияние терапии на выживаемость животных. Кривые выживаемости Каплана-Мейера.

В результате установлено, что схема с трехкратным внутриопухолевым введением МНЧ **956** в сочетании с последующей экспозицией в AFM ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) в течение 1 ч через 24 и 48 ч после каждого введения, приводит к уменьшению количества метастазов в легких и, как следствие, увеличивает выживаемость животных.

Согласно данным биохимического анализа плазмы крови экспериментальных животных, прошедших вышеописанную терапию как с внутривенным введением, так и с внутриопухолевым введением МНЧ **956** или **946**, отклонений основных биохимических

показателей, используемых в качестве маркеров повреждения печени и почек (АЛТ, АСТ, креатинина) не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что исследованные МНЧ не обладали токсическим эффектом на печень и почки.

Установлено, что после внутривенного введения МНЧ в дозе 0,2 мг наблюдается слабое накопление наночастиц в опухоли 4Т1 через 24 ч после введения. После внутриопухолевого введения 0,3 и 0,15 мг МНЧ наблюдали выраженное концентрирование наночастиц в ткани опухоли. Продемонстрировано, что внутриопухолевое введение МНЧ **956** в дозе 0,3 мг в опухоль с последующим воздействием переменного магнитного поля оказывает слабую противоопухолевую активность (индекс ТРО – до 20%) в отношении опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c, тормозит процессы метастазирования в легкие и брюшную полость, а также увеличивает выживаемость мышей (до 100 %) по сравнению с группой животных, которые проходили терапию доксорубицином или с интактной группой. Полученные материалы могут быть использованы для разработки материалов комбинированной терапии магнитной гипертермии и фармакотерапии цитостатическими препаратами в лечении онкологических заболеваний.

2.5.4 Оценка цитотоксичности МНЧ, содержащих RGD-пептид

Для МНЧ **111–114** была исследована цитотоксичность (МТТ-тест) на нормальной клеточной линии НЕК293 и опухолевых линиях 4Т1 и MDA-MB231 (рисунок 2.35). Цитотоксичность определяли для четырех типов МНЧ: синтезированных с использованием стабилизатора РMIDA (МНЧ **112, 114**) и без (МНЧ **111, 113**), содержащих RGD (МНЧ **111, 112**) и без (МНЧ **113, 114**) (см. раздел 2.4.5.2.). Количество жизнеспособных клеток определяли на автоматическом анализаторе с флуоресцентным детектором. Наименее восприимчивая к действию всех типов МНЧ оказалась линия MDA-MB231. В целом, исследуемые МНЧ понижали выживаемость клеток, причем в большинстве случаев спустя 48 ч инкубации цитотоксический эффект усиливался (доля жизнеспособных клеток составляла около 50% от исходного количества). МНЧ **112** имели наименьший цитотоксический эффект по сравнению с остальными типами МНЧ.

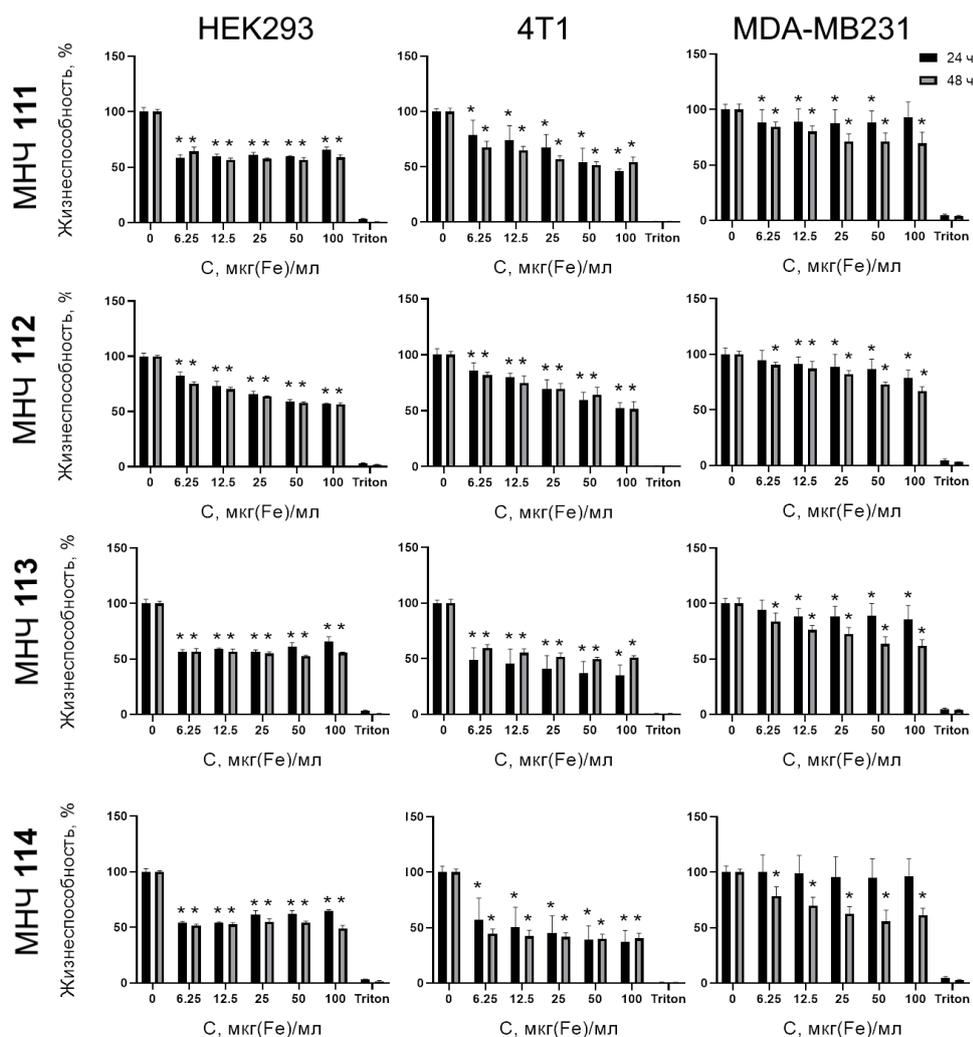


Рисунок 2.35 – Выживаемость клеток HEK293, 4Т1 и MDA-MB231 после 24 и 48 ч инкубации с МНЧ 111–114 соответственно. Данные представлены как $M \pm SD$. * – достоверность отличий от контроля.

Продемонстрирован захват МНЧ 111 и 112 клетками линий 4Т1 и MDA-MB231 (рисунок 2.36а). Для этого клетки линий 4Т1 и MDA-MB231 (по 50 тыс. клеток) инкубировали с МНЧ (5 мкг/мл) в полной питательной среде (DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 10% FBS, 1% Glutamax, 1% PenStrep) в течение 24 ч при 37 °С.

Количественно захват клетками линий MDA-MB231 МНЧ 111 и 112 оценивали на проточном цитометре Cytotflex (Beckman Coulter). Для этого клетки инкубировали с МНЧ в полной питательной среде (DMEM/F12 (Gibco) с добавлением 10% FBS, 1% Glutamax, 1% PenStrep) 4 ч при 37 °С, после чего проводили анализ (рисунок 2.36б). Показано, что при инкубации в указанных условиях 50 тыс. клеток с 0,625 мкг МНЧ (концентрация МНЧ в клеточной среде 1,25 мкг/мл) более 99,5% клеток были позитивны по Су5 во всех образцах.

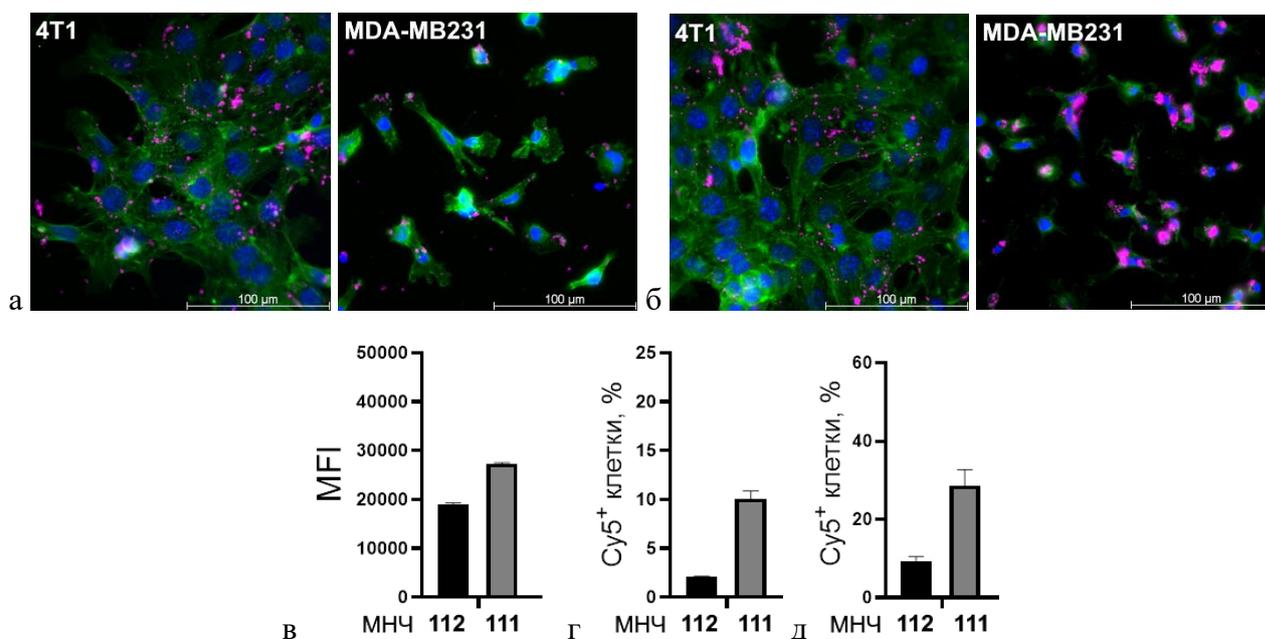


Рисунок 2.36 – Изображения клеток линий 4T1 и MDA-MB231 после инкубации с МНЧ (а) **111** и (б) **112**, полученные на флуоресцентном микроскопе (цитоскелет окрашен Alexa Fluor 488, ядра клеток окрашены Hoechst 33342). Эффективность поглощения наночастиц МНЧ **111** и **112** клетками линии MDA-MB231 (в) при инкубации в полной питательной среде при 37°C 4 часа (по оси ОУ приведена интенсивность флуоресценции, поскольку количество Cu5+ клеток было ~100%), (г) полной питательной среде при 4°C 1 ч на льду + 4 ч при 37°C, (д) DMEM/F12 при 4°C 1 ч на льду + 4 ч при 37°C (на рисунках (г) и (д) по оси ОУ приведен % Cu5+ клеток).

Для оценки поглощения МНЧ за счет специфического связывания RGD с рецепторами на поверхности, для подавления неспецифического эндоцитоза МНЧ клетками, проводили аналогичный эксперимент, но с предварительной инкубацией клеточной среды и МНЧ в течение 1 ч при 4°C, отмывкой несвязанных МНЧ PBS и последующей инкубацией в теплой питательной среде (в полной питательной среде и среде без добавления 10% FBS) 4 ч при 37°C. В результате продемонстрировано, что процент клеток, содержащих МНЧ **111** и **112**, значительно падал. Причем что в присутствии сыворотки эффективность связывания МНЧ с клетками при 4°C снижалась до 70%, что, вероятно, можно объяснить образованием белковой короны, мешающей взаимодействию наночастиц с поверхностью клетки.

Таким образом, продемонстрирована возможность поглощения RGD-модифицированных МНЧ клетками на примере клеток линии MDA-MB231 и возможность оценки их количества детектирования флуориметрическим методом. Показано, что накопление МНЧ в клетках главным образом протекает за счет неспецифического эндоцитоза.

2.5.5 Оценка специфичного связывания МНЧ, содержащих RGD-пептид, с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$

На базе СибГМУ (г. Томск) под руководством к.б.н. А.Г. Першиной проведено исследование специфичного связывания МНЧ **105**, содержащих RGD-пептид, а также МНЧ **103** аналогичного состава, но не содержащих RGD-пептид, с клетками линии MDA-MB-231 и геномно-модифицированной линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$ (основной мишени RGD-пептида).

Для этого в образцы, содержащие среду с 50 тыс. клеток, вносили 50 мкл суспензии МНЧ с концентрациями 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 мкг/мл и инкубировали 60 мин при 37°C. После этого образцы промывали от несвязанных МНЧ и анализировали на проточном цитометре Cytoflex Beckman Coulter (рисунок 2.37).

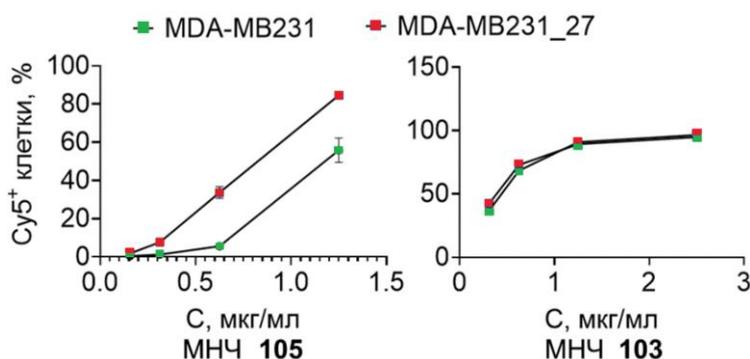


Рисунок 2.37 – Оценка поглощения МНЧ **105** и **103** клетками линий MDA-MB-231 и MDA-MB-231_27.

Исходя из полученных результатов, представленных на рисунке 2.37, можно заключить, что МНЧ **105**, содержащие RGD-пептид, более эффективно, по сравнению с МНЧ **103**, захватывались клетками линии MDA-MB-231_27, с повышенной экспрессией интегрина $\alpha_v\beta_3$. После инкубации клеток линии MDA-MB231_27 с наночастицами в концентрации 1,25 мкг/мл доля Cy5-положительных клеток была равна $84,6 \pm 1,5$ %, тогда как для исходной линии MDA-MB231 данный показатель составлял $55,9 \pm 6,4$ % ($p < 0,05$).

Таким образом, продемонстрировано, что разработанная конструкция наноконъюгата, включающего в свой состав магнитное ядро на основе Fe_3O_4 и покрытие на основе SiO_2/PEG , модифицированное RGD-пептидом, может оказаться эффективной платформой для адресной доставки препаратов в опухолевые ткани, экспрессирующие интегрин $\alpha_v\beta_3$.

Глава 3 Экспериментальная часть.

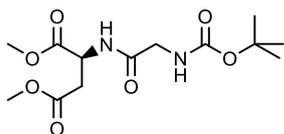
Диметиловый и ди-*трет*-бутиловый эфиры L-аспаргиновой кислоты гидрохлориды, дибензиловый эфир L-аспаргиновой кислоты тозилат, *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)глицин, синтезированны по известным методикам [202-204]. Флуоресцентный краситель **31** предоставлен ОмГТУ (г. Омск), исходные карборановые соединения **45-48** получены от ИНЭОС РАН (г. Москва). Остальные реагенты коммерчески доступны.

Для тонкослойной хроматографии использовали ТСХ-пластины Sorbfil (ООО «Имид», Россия), соединения проявляли в УФ свете, парами йода, 0,1% раствором *o*-толидина в уксусной кислоте после насыщения парами хлора или 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Для колоночной флеш-хроматографии использовали силикагель Silica gel 40 (0,023–0,040 мм) («Alfa Aesar», Великобритания). Температуры плавления определяли на приборе «Stuart SMP3» («Barloworld Scientific», Великобритания).

Спектры ЯМР ^1H , ^{11}B и ^{13}C зарегистрированы на приборах «Bruker DRX-400» (Германия) (400, 160, 100 МГц соответственно) или «Bruker Avance 500» (Германия) (500, 193, 125 МГц соответственно). В качестве внутренних стандартов использовали тетраметилсилан и гексафторбензол. Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer Model 341» (выражено в (град×мл)/(г×дм), концентрация раствора – в г/100 мл). Элементный анализ выполняли на автоматическом CHN-анализаторе Perkin Elmer PE 2400, серия II (США). Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы после хроматографического разделения на приборе Bruker maXis impact HD (Германия) в режиме положительной ионизации методом электрораспыления (ESI) или ионизации при атмосферном давлении (APCI). Спектры флуоресценции зарегистрированы на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian», США). УФ-спектры зарегистрированы на УФ-спектрофотометре UV 2401 PC («Shimadzu», Япония). ВЭЖХ-анализ в обращенно-фазовом варианте выполняли на хроматографе Agilent 1100 (США), тип неподвижной фазы и состав подвижной фазы приведены в методиках, скорость элюирования 0,8 мл/мин, термостатирование при 35 °С.

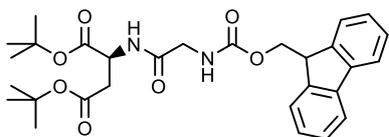
ПЭМ выполняли на просвечивающем электронном микроскопе Philips CM30 (FEI, Нидерланды), СЭМ – на сканирующем электронном микроскопе Merlin («Carl Zeiss», Германия). ИК-спектры регистрировали на инфракрасном Фурье-спектрометре Nicolet 6700 («Thermo Electron Corporation», США) с приставкой НПВО Smart Orbit с алмазным кристаллом, а также на спектрометре Spectrum Two («Perkin Elmer», США) с приставкой с алмазным кристаллом или диффузного отражения. Намагниченность насыщения (M_s) и коэрцитивную силу (H_c) определяли с помощью вибромагнитометра в магнитных полях до 2.2 МА/м. Площадь удельной поверхности ($S_{уд}$) определяли методом BET на приборе SorbiPrep

(«МЕТА», Россия). Гидродинамическое и электрофоретическое рассеяние света наночастицами определяли методом ДРС на анализаторе Photocor Compact-Z («Photocor», Россия) или Malvern Zetasizer Nano ZS instrument («Malvern Instruments», Великобритания). SAR и ILP рассчитывали из данных, полученных в опытах с использованием генератора переменного магнитного поля TOR UltraHT («TOR», Россия). Рентгенофлуоресцентный анализ выполняли на энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном спектрометре EDX-7000 («Shimadzu», Япония). Релаксацию водных коллоидных растворов МНЧ определяли на релаксометре («ECOTEK Corporation», Хьюстон, США).



Диметиловый эфир (*N*-*tert*-бутилоксикарбонил)-глицил-L-аспаргиновой кислоты (1). К раствору 433,1 мг (2,47 ммоль) BocGly, 488,1 мг (2,47 ммоль) Asp(OMe)₂·HCl, 509,6 мг (2,47 ммоль)

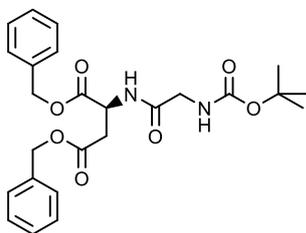
DCC, 142,1 мг (1,23 ммоль) NHS в 20 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 860 мкл (4,94 ммоль) DIPEA, реакцию массу перемешивали 20 ч при +20 °С. Отфильтровывали осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (бензол–этилацетат, от 100:0 до 40:60). Получали 639,7 мг (81%) бесцветного масла. ТСХ (бензол–этилацетат 1:1): $R_f = 0,57$ (проявление нингидрином). $[\alpha]_D^{20} +45,1^\circ$ (c 1,0; CHCl₃). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 1:1; детектирование при 220 нм): $\tau = 4,68$ мин. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,25 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 6,98 (т, $J = 6,1$ Гц, 1H (NH Gly)); 4,67 (дт, $J = 6,9, 7,1$ Гц, 1H (H₂ Asp)); 3,63 (с, 3H (OMe Asp)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,54 (д, $J = 6,1$ Гц, 2H (H₂ Gly)); 2,80 (дд, $J = 6,1, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,7, 16,5$ Гц, 1H (H₃-B Asp)); 1,38 (с, 9H (OtBu Gly)). Найдено, %: С 49,09; Н 7,11; N 8,66. Вычислено, %: С 49,05; Н 6,97; N 8,80. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₁₃H₂₃N₂O₇ [M+H]⁺: 319,1500; найдено: 319,1508.



Ди-*tert*-бутиловый эфир (*N*-флуоренилметокси-карбонил)-глицил-L-аспаргиновой кислоты (2). К раствору 804 мг (3,28 ммоль) Asp(OtBu)₂, 974,4 мг (3,28 ммоль) FmocGly,

676,7 мг (3,28 ммоль) DCC, 188,7 мг (1,64 ммоль) NHS в 10 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 1140 мкл (6,56 ммоль) DIPEA, реакцию массу перемешивали 20 ч при +20 °С. Отфильтровывали осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (бензол–этилацетат от 80:20 до 40:60). Получали 1515,2 мг (88%) белого порошка, т.пл. 59 °С. ТСХ (бензол–этилацетат 1:1): $R_f = 0,73$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +22,3^\circ$ (c 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 254 нм): $\tau = 15,0$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,47 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)); 7,89 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,72 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,59 (т, $J = 6,2$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,41 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar

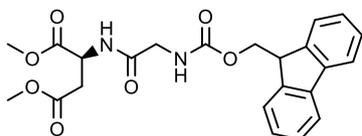
Fmoc)); 4,77 (дт, $J = 6,2, 6,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,30-4,20 (м, 3H (CH, CH₂ Fmoc)); 3,65 (д, $J = 5,3$ Гц, 2H (H2 Gly)); 2,91 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,80 (дд, $J = 6,9, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 1,42 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,41 (с, 9H (OtBu Asp)). Найдено, %: С 66,46; Н 6,99; N 5,24. Вычислено, %: С 66,40; Н 6,92; N 5,34. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₂₉H₃₇N₂O₇ [M+H]⁺: 525,2596; найдено: 525,2590.



Дибензиловый эфир (*N*-трет-бутилоксикарбонил)-

глицил-L-аспаргиновой кислоты (3). К раствору 209,6 мг (0,669 ммоль) Asp(OBn)₂, 117,1 мг (0,669 ммоль) BocGly, 138 мг (0,669 ммоль) DCC, 38,5 мг (0,334 ммоль) NHS в 10 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 235 мкл (1,338 ммоль) DIPEA, реакцию массу

перемешивали 20 ч при +20 °С. Отфильтровывали осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (бензол–этилацетат, от 80:20 до 40:60). Получали 226,6 мг (72%) белого порошка, т.пл. 56 °С. ТСХ (бензол–этилацетат 1:1): $R_f = 0,6$ (проявление нингидрином). $[\alpha]_D^{20} +9,9^\circ$ (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 3:2; детектирование при 220 нм): $\tau = 22,36$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСO-*d*₆), δ (м.д.): 8,35 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)), 7,37–7,31 (м, 10H (2OBn Asp)), 6,99 (т, $J = 6,1$ Гц, 1H (NH Gly)), 5,09 (с, 2H (OBn Asp)), 5,07 (с, 2H (OBn Asp)), 4,77 (дт, $J = 6,9, 7,1$ Гц, 1H (H2 Asp)), 3,56 (д, $J = 5,9$ Гц, 2H (H2 Gly)), 2,90 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,80 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)), 1,38 (с, 9H (3Me Boc)). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСO-*d*₆): 28,13 (с, 3C (Boc Gly)), 35,82 (с, 1C (C3 Asp)), 42,95 (с, 1C (C2 Gly)), 48,47 (с, 1C (C2 Asp)), 65,85 (с, 1C (OBn Asp)), 66,25 (с, 1C (OBn Asp)), 78,02 (с, 1C (Boc Gly)), 127,63 (с, 2C (OBn Asp)), 127,88 (с, 2C (OBn Asp)), 127,96 (с, 1C (OBn Asp)), 128,01 (с, 1C (OBn Asp)), 128,35 (с, 2C (OBn Asp)), 128,36 (с, 2C (OBn Asp)), 135,65 (с, 1C (OBn Asp)), 135,75 (с, 1C (OBn Asp)), 155,71 (с, 1C (CO Boc)), 169,42 (с, 1C (CO Gly)), 169,79 (с, 1C (CO Asp)), 170,33 (с, 1C (CO Asp)). Найдено, %: С, 63,89; Н, 6,47; N, 5,99. Вычислено, %: С, 63,82; Н, 6,43; N, 5,95. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₂₅H₃₁N₂O₇ [M+H]⁺: 471,2126; найдено: 471,2127.

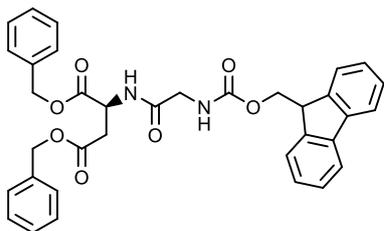


Диметиловый эфир (*N*-флуоренилметоксикарбонил)-

глицил-L-аспаргиновой кислоты (4). К раствору 332 мг (1,68 ммоль) Asp(OMe)₂·HCl, 499,5 мг (1,68 ммоль) FmocGly, 346,6 мг (1,68 ммоль) DCC, 96,7 мг (0,84 ммоль) NHS в 10 мл сухого CH₂Cl₂

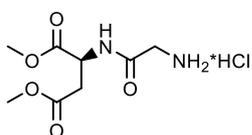
добавляли 585 мкл (3,36 ммоль) DIPEA, реакцию массу перемешивали 20 ч при +20 °С. Отфильтровывали осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (бензол–этилацетат, от 80:20 до 40:60). Получали 614,1 мг (83%) белого порошка, т.пл. 127 °С. ТСХ (бензол–этилацетат 1:1): $R_f = 0,6$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +31,1^\circ$ (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода 7:3;

детектирование при 220, 254 нм): $\tau = 14,92$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,49 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)), 7,89 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 7,72 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 7,61 (т, $J = 6,2$ Гц, 1H (NH Gly)), 7,41 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 7,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 4,75 (дт, $J = 6,2, 6,2$ Гц, 1H (H₂ Asp)), 4,30-4,20 (м, 3H (CH, CH₂ Fmoc)), 3,63 (с, 3H (OMe Asp)), 3,61 (с, 3H (OMe Asp)), 3,54 (д, $J = 6,1$ Гц, 2H (H₂ Gly)), 2,91 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)), 2,80 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H₃-B Asp)). Найдено, %: С, 62,82; Н, 5,55; N, 6,31. Вычислено, %: С, 62,72; Н, 5,49; N, 6,36. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 441,1657; найдено: 441,1669.



Дибензиловый эфир (*N*-флуоренилметоксикарбонил)-глицил-L-аспаргиновой кислоты (5).

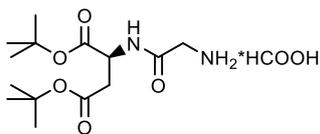
К раствору 268,8 мг (0,858 ммоль) Asp(OBn)₂, 255,1 мг (0,858 ммоль) FmocGly, 177,1 мг (0,858 ммоль) DCC, 49,4 мг (0,429 ммоль) NHS в 10 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 300 мкл (1,716 ммоль) DIPEA, реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С. Отфильтровывали осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (бензол–этилацетат, от 80:20 до 40:60). Получали 371,2 мг (73%) белого порошка, т.пл. 118 °С. ТСХ (бензол–этилацетат 1:1): $R_f = 0,66$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +15,4^\circ$ (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 254 нм): $\tau = 15,05$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,48 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)), 7,90 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 7,73 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)), 7,59 (т, $J = 6,2$ Гц, 1H (NH Gly)), 7,44-7,26 (м, 14H (OBn Asp, Ar Fmoc)), 5,09 (с, 2H (OBn Asp)), 5,07 (с, 2H (OBn Asp)), 4,77 (дт, $J = 6,2, 6,2$ Гц, 1H (H₂ Asp)), 4,29-4,21 (м, 3H (CH, CH₂ Fmoc)), 3,64 (д, $J = 5,3$ Гц, 2H (H₂ Gly)), 2,91 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)), 2,80 (дд, $J = 6,9, 16,6$ Гц, 1H (H₃-B Asp)). Найдено, %: С, 70,99; Н, 5,49; N, 4,78. Вычислено, %: С, 70,93; Н, 5,44; N, 4,73. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 593,2283; найдено: 593,2286.



Диметилый эфир глицил-L-аспаргиновой кислоты

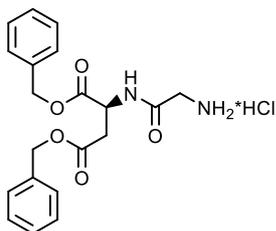
гидрохлорид (6). К раствору 752,5 мг (2,36 ммоль) соединения **1** в 10 мл CH₃OH добавляли 2 мл (23 ммоль) конц. HCl, реакционную массу перемешивали 15 мин при +20 °С, затем упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 50:50). Получали 403,1 мг (67%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,5$ (проявление нингидрином). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; элюент А – 0,1% трифторуксусная кислота; элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 0% до 50% в течение 20 мин; детектирование при 220 нм): $\tau = 17,59$ мин. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,91 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,03 (с, 3H (NH₃⁺ Gly)); 4,73 (дт, $J = 6,8, 6,8$ Гц, 1H (H₂ Asp)); 3,65 (с, 3H (OMe Asp)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,61 (д, $J = 5,2$ Гц, 2H (H₂

Gly)); 2,84 (дд, $J = 5,5, 16,7$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,79 (дд, $J = 6,7, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_6H_{15}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 219,0976; найдено: 219,0974.



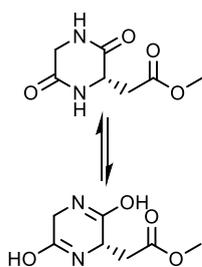
Ди-*tert*-бутиловый эфир глицил-L-аспаргиновой кислоты формиат (7). Раствор 669,2 мг (1,276 ммоль) соединения **2** в 5 мл $CHCl_3$ охлаждали до 0 °С, добавляли 630 мкл (6,38 ммоль)

пиперидина и перемешивали 4 ч. Затем добавляли 700 мкл $HCOOH$ до нейтральной реакции и упаривали реакционную массу на роторном испарителе. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:10 до 60:40). Получали 102,2 мг (23%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,67$ (проявление нингидрином). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; элюент А – 0,1% трифторуксусная кислота; элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 0% до 50% в течение 20 мин; детектирование при 220 нм): $\tau = 17,97$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 8,72 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,44-7,23 (уш с, 3H (NH_3^+ Gly)); 4,54 (дт, $J = 6,7, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 3,52-3,48 (уш с, 2H (H2 Gly)); 2,67 (дд, $J = 4,9, 15,9$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,61 (дд, $J = 5,8, 15,7$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 1,41 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,40 (с, 9H (OtBu Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{14}H_{26}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 303,1915; найдено: 303,1928.



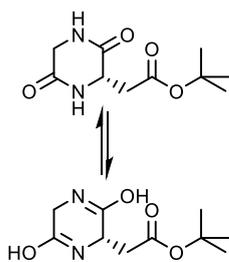
Дибензиловый эфир глицил-L-аспаргиновой кислоты гидрохлорид (8). К раствору 773,4 мг (1,64 ммоль) соединения **3** в 10 мл сухого ТГФ, добавляли 1,75 мл (16,4 ммоль) конц. HCl , перемешивали 15 мин при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 50:50).

Получали 510,4 мг (76%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,7$ (проявление нингидрином). $[\alpha]_D^{20} +5,9^\circ$ (с 1,0, $CHCl_3$). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода–уксусная кислота 60:39,5:0,5; детектирование при 220 нм): $\tau = 4,15$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ (м.д.): 8,98 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H (NH Asp)), 8,0-7,42 (уш с, 3H (NH_3^+ Gly)), 7,38–7,31 (м, 10H (OBn Asp)), 5,11 (с, 2H (OBn Asp)), 5,09 (с, 2H (OBn Asp)), 4,82 (дт, $J = 6,3, 6,4$ Гц, 1H (H2 Asp)), 3,51 (с, 2H (H2 Gly)), 2,93 (дд, $J = 6,0, 16,9$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,88 (дд, $J = 6,8, 16,9$ Гц, 1H (H3-B Asp)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, $DMCO-d_6$): 36,46 (с, 1C, (C3 Asp)), 44,54 (с, 1C, (C2 Gly)), 50,70 (с, 1C, (C2 Asp)), 65,74 (с, 2C, (OBn Asp)), 127,97 (с, 4C, (OBn Asp)), 128,03 (с, 2C, (OBn Asp)), 128,41 (с, 4C, (OBn Asp)), 135,91 (с, 2C, (OBn Asp)), 165,87 (с, 1C, (CO Gly)), 167,03 (с, 1C, (CO Asp)), 169,90 (с, 1C, (CO Asp)). Найдено, %: C, 58,89; H, 5,78; N, 6,76. Вычислено, %: C, 59,04; H, 5,70; N, 6,89. МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{20}H_{23}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 371,1602; найдено: 371,1604.



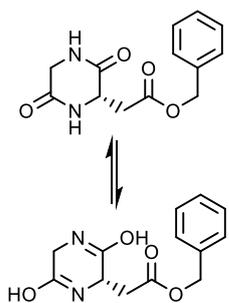
Метилловый эфир 2-(3,6-дикетопиперазин-2-ил)ацетата (9).

раствору 623,5 мг (1,417 ммоль) соединения **4** в 10 мл EtOH, добавляли 700 мкл (7,083 ммоль) пиперидина, реакцию перемешивали 2 ч при +20 °С. Отфильтровывали белый осадок, промывали этанолом, сушили. Получали 250,4 мг (95%) белого порошка, т.пл. 201 °С. ТСХ (этанол): $R_f = 0,7$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220 нм): $\tau = 20,56$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,17 (с, 0,5H (ОН Asp лактим)), 8,07 (с, 0,5H (ОН Gly лактим)), 7,84 (д, $J = 7,3$ Гц, 0,5H (NH Asp лактам)), 7,67 (д, $J = 7,3$ Гц, 0,5H (NH Gly лактам)), 4,18 (дт, $J = 3,3, 2,9$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактам)), 4,09 (т, $J = 8,1$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактим)), 3,78 (д, $J = 17,0$ Гц, 1H (H2-A Gly)), 3,68 (д, $J = 16,6$ Гц, 1H (H2-B Gly)), 3,61 (с, 3H (OMe Asp)), 2,90 (дд, $J = 4,7, 16,5$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,79 (дд, $J = 5,1, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)). Найдено, %: С, 44,85; Н, 5,64; N, 14,81. Вычислено, %: С, 45,16; Н, 5,41; N, 15,05. МСВР (APSI-POS) вычислено для $C_7H_{10}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 187,0714; найдено: 187,0717.



трет-Бутиловый эфир 2-(3,6-дикетопиперазин-2-ил)ацетата (10).

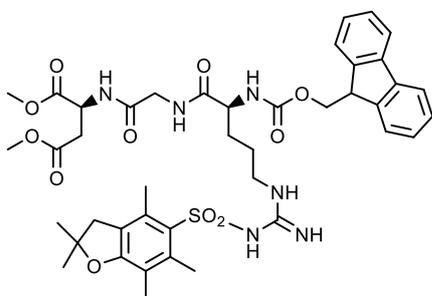
К раствору 311,2 мг (0,594 ммоль) соединения **2** в 10 мл EtOH, добавляли 295 мкл (2,968 ммоль) пиперидина, реакцию перемешивали 2 ч при +20 °С. Отфильтровывали белый осадок, промывали этанолом, сушили. Получали 135,4 мг (95%) белого порошка, т.пл. 185 °С. ТСХ (этанол): $R_f = 0,7$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220 нм): $\tau = 20,87$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,17 (с, 0,5H (ОН Asp лактим)), 8,07 (с, 0,5H (ОН Gly лактим)), 7,84 (д, $J = 7,3$ Гц, 0,5H (NH Asp лактам)), 7,66 (д, $J = 7,3$ Гц, 0,5H (NH Gly лактам)), 4,19 (дт, $J = 3,2, 3,0$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактам)), 4,09 (т, $J = 8,0$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактим)), 3,78 (д, $J = 17,9$ Гц, 1H (H2-A Gly)), 3,68 (д, $J = 17,8$ Гц, 1H (H2-B Gly)), 2,90 (дд, $J = 5,0, 16,9$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,79 (дд, $J = 5,4, 16,9$ Гц, 1H (H3-B Asp)), 1,40 (с, 9H (OtBu Asp)). МСВР (APSI-POS) вычислено для $C_{10}H_{17}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 229,1183; найдено: 229,1189.



Бензиловый эфир 2-(3,6-дикетопиперазин-2-ил)ацетата (13).

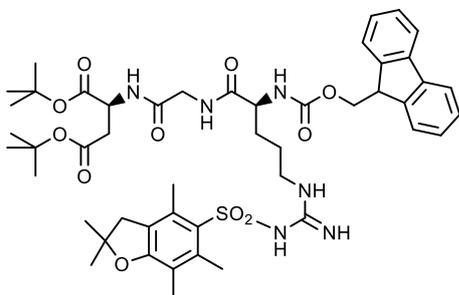
раствору 623,5 мг (1,417 ммоль) соединения **5** в 10 мл EtOH добавляли 700 мкл (7,083 ммоль) пиперидина, реакцию перемешивали 2 ч при +20 °С. Отфильтровывали белый осадок, промывали этанолом, сушили. Получали 250,4 мг (95%) белого порошка, т.пл. 179 °С. ТСХ (этанол): $R_f = 0,7$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220 нм): $\tau = 20,91$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,18 (с, 0,5H (ОН Asp лактим)), 8,08 (с, 0,5H (ОН Gly лактим)), 7,85 (д, $J = 7,4$ Гц,

0,5H (NH Asp лактам)), 7,67 (д, $J = 7,4$ Гц, 0,5H (NH Gly лактам)), 7,4-7,28 (м, 5H (OBn Asp)), 5,11 (с, 2H (с, 2H (OBn Asp))), 4,19 (дт, $J = 3,2, 2,5$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактам)), 4,10 (т, $J = 8,1$ Гц, 0,5H (H2 Asp лактим)), 3,79 (д, $J = 17,5$ Гц, 1H (H2-A Gly)), 3,69 (д, $J = 17,4$ Гц, 1H (H2-B Gly)), 2,88 (дд, $J = 4,8, 16,9$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,77 (дд, $J = 5,3, 16,9$ Гц, 1H (H3-B Asp)). МСВР (APSI-POS) вычислено для $C_{13}H_{15}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 263,1027; найдено: 263,1026.



Диметиловый эфир L-(N^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил-N^α-флуоренилметоксикарбонил)-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (14). К раствору 205,6 мг (0,807 ммоль) соединения **6**, 523,8 мг (0,807 ммоль) соединения **12**, 259,2 мг (0,807 ммоль) НВТУ в 20 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли 422 мкл (2,42 ммоль)

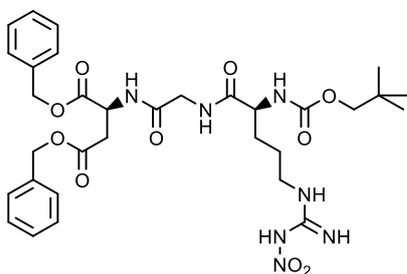
DIPEA, перемешивали 20 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 85:15). Получали 657,9 мг (96%) белого порошка, т.пл. 100–102 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 20:1): $R_f = 0,44$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +8,0^\circ$ (с 1,01, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 7,41$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,30 (д, $J = 10,0$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,26 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,03 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,89 (д, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,71 (д, $J = 7,2$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,41 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,33 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,05-6,55 (уш с, 2H (N^ωH Arg)); 6,55-6,22 (уш с, 1H (N^ωH Arg)); 4,67 (дт, $J = 6,9, 7,1$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,32–4,20 (м, 3H (CH, CH₂ Fmoc)); 3,97 (дт, $J = 7,3, 7,0$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,73 (д, $J = 5,7$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,57 (с, 3H (OMe Asp)); 3,03 (дт, $J = 6,4, 6,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,94 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,78 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,69 (дд, $J = 6,9, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70–1,30 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,39 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{42}H_{53}N_6O_{11}S$ $[M+H]^+$: 849,3488; найдено: 849,3479.



Ди-*tert*-бутиловый эфир L-(N^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил-N^α-флуоренилметоксикарбонил)-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (15). К раствору 102,2 мг (0,293 ммоль) соединения **7**, 190,3 мг (0,293 ммоль) соединения **12**, 94,2 мг (0,293 ммоль) ТВТУ в 5 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли

155 мкл (0,88 ммоль) DIPEA, реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, затем упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 95:5 до 85:15). Получали 240,5 мг (88%) белого порошка, т.пл. 89–91 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): $R_f = 0,73$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +8,1^\circ$ (с 1,0, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18;

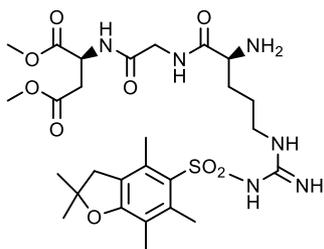
ацетонитрил–вода 4:1; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 10,2$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,25 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,20 (т, $J = 5,9$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,89 (д, $J = 7,6$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,72 (т, $J = 7,8$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,57 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,41 (т, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,00–6,54 (уш с, 2H (N^oH Arg)); 6,54–6,20 (уш с, 1H (N^oH Arg)); 4,67 (дт, $J = 6,9, 7,1$ Гц, 1H (H₂ Asp)); 4,32–4,20 (м, 3H (CH, CH₂ Fmoc)); 3,97 (дт, $J = 7,3, 7,0$ Гц, 1H (H₂ Arg)); 3,73 (д, $J = 5,7$ Гц, 2H (H₂ Gly)); 3,03 (дт, $J = 6,4, 6,3$ Гц, 2H (H₅ Arg)); 2,94 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,78 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,69 (дд, $J = 6,9, 16,5$ Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,72–1,63 (м, 2H (H₃ Arg)); 1,58–1,45 (м, 2H (H₄ Arg)); 1,46 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,43 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,42 (с, 9H (OtBu Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₄₈H₆₅N₆O₁₁S [M+H]⁺: 933,4427; найдено: 933,4429.



Дибензиловый эфир L-(N^o-нитро-N^o-трет-бутилокси-карбонил)-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (16). К раствору 642,7 мг (1,58 ммоль) соединения **8**, 526,7 мг (1,58 ммоль) соединения **13**, 507,3 мг (1,58 ммоль) ТВТУ в 25 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 825 мкл (4,74 ммоль) DIPEA, реакцию массу перемешивали 20 ч при +20 °С,

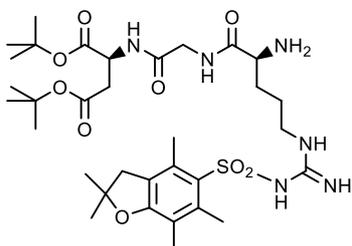
затем упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 95:5 до 85:15). Получали 936 мг (88%) белого порошка, т.пл. 99–102 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,5$ (проявление *o*-толидином в парах Cl₂). $[\alpha]_D^{20} +4,0^\circ$ (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 9:1; детектирование при 220 нм): $\tau = 4,2$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,54–8,44 (уш с, 1H (N^oH Arg)), 8,42 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)), 8,07 (т, $J = 5,4$ Гц, 1H (NH Gly)), 7,95–7,55 (уш с, 2H (N^oH Arg)), 7,39–7,30 (м, 10H (2OBn Asp)), 6,96 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Asp)), 5,09 (с, 2H (OBn Asp)), 5,07 (с, 2H (OBn Asp)), 4,76 (дт, $J = 7,1, 7,3$ Гц, 1H (H₂ Asp)), 3,93 (дт, $J = 6,8, 6,3$ Гц, 1H (H₂ Arg)), 3,74 (ддд, $J = 7,7, 18,9, 24,6$ Гц, 2H (H₂ Gly)), 3,12 (дт, $J = 5,5, 5,4$ Гц, 2H (H₅ Arg)), 2,90 (дд, $J = 6,4, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)), 2,79 (дд, $J = 6,8, 16,5$ Гц, 1H (H₃-B Asp)), 1,71–1,59 (м, 2H (H₃ Arg)), 1,59–1,43 (м, 2H (H₄ Arg)), 1,37 (с, 9H (3Me Boc)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆): 24,64 (с, 1C (C₄ Arg)), 28,17 (с, 3C (Boc Arg)), 29,09 (с, 1C (C₃ Arg)), 35,82 (с, 1C (C₃ Asp)), 40,27 (с, 1C (C₅ Arg)), 41,60 (с, 1C (C₂ Gly)), 48,56 (с, 1C (C₂ Asp)), 53,87 (с, 1C (C₂ Arg)), 65,91 (с, 1C (OBn Asp)), 66,31 (с, 1C (OBn Asp)), 78,18 (с, 1C (Boc Arg)), 127,68 (с, 2C (OBn Asp)), 127,93 (с, 2C (OBn Asp)), 128,01 (с, 1C (OBn Asp)), 128,05 (с, 1C (OBn Asp)), 128,40 (с, 4C (OBn Asp)), 135,66 (с, 1C (OBn Asp)), 135,79 (с, 1C (OBn Asp)), 155,42 (с, 1C (CO Boc)), 159,33 (с, 1C (C₆ Arg)), 168,80 (с, 1C (CO Gly)), 169,73 (с, 1C (CO Asp)), 170,27 (с, 1C (CO Asp)), 172,17 (с, 1C (CO Arg)). Найдено, %: С, 55,07; Н, 6,26; N,

14,77. Вычислено, %: С, 55,43; Н, 6,15; N, 14,60, МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{32}H_{44}N_7O_{10}$ $[M+H]^+$: 686,3145; найдено: 686,3146.



Диметиловый эфир (N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидро-бензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (17). К раствору 562 мг (0,662 ммоль) соединения **14** в 10 мл CH_3OH , добавляли 327 мкл (3,31 ммоль) пиперидина, реакцию перемешивали 2 ч при $+20\text{ }^{\circ}C$, затем упаривали.

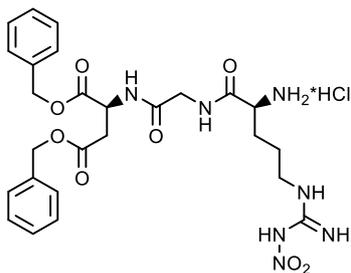
Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:10 до 40:60). Получали 322,3 мг (78%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,58$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +16,1^{\circ}$ (с 1,02, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; метанол–вода–трифторуксусная кислота 70:29,9:0,1; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 5,06$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 8,39 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,24–8,12 (уш с, 1H (NH Gly)); 7,24–6,55 (уш с, 2H ($N^{\omega}H$ Arg)); 6,55–6,22 (уш с, 1H ($N^{\omega}H$ Arg)); 4,67 (дт, $J = 6,9, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 3,74 (д, $J = 5,8$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,18 (м, 1H (H2 Arg)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 5,9$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,97 (с, 2H (CH_2 Pbf)); 2,81 (дд, $J = 6,1, 16,5$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,9, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,01 (с, 3H (Me Pbf)); 1,64–1,27 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{27}H_{43}N_6O_9S$ $[M+H]^+$: 627,2807; найдено: 627,2817.



Ди-*tert*-бутиловый эфир (N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (18). К раствору 240,5 мг соединения **15** (0,258 ммоль) в 3 мл $CHCl_3$ добавляли 130 мкл (1,3 ммоль) пиперидина, реакцию перемешивали 2 ч при $+20\text{ }^{\circ}C$, затем упаривали.

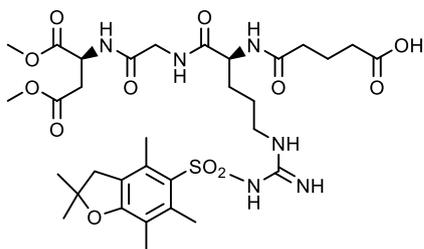
Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:10 до 60:40). Получали 139,6 мг (70%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,58$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +17,2^{\circ}$ (с 1,0, $CHCl_3$). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); элюент А – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке, элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 10% до 90% в течение 30 мин; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 25,64$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 8–28–8,24 (уш с, 1H (NH Gly)); 8,24 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 7,12–6,60 (уш с, 2H ($N^{\omega}H$ Arg)); 6,52–6,27 (уш с, 1H ($N^{\omega}H$ Arg)); 4,50 (дт, $J = 7,0, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 3,75 (ддд, $J = 4,5, 19,2, 23,7$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,18 (м, 1H (H2 Arg)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 5,9$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH_2 Pbf)); 2,64 (дд, $J = 4,9, 15,3$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,55 (дд, $J = 3,7, 8,8$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,01 (с, 3H (Me Pbf)); 1,72–1,36 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,39 (с,

9H (OtBu Asp)); 1,38 (с, 9H (OtBu Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{33}H_{55}N_6O_9S$ $[M+H]^+$: 711,3746; найдено: 711,3749.



Дибензиловый эфир (N^{ω} -нитро)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты гидрохлорид (19). К раствору 1236,8 мг (1,84 ммоль) соединения **16** в 20 мл сухого ТГФ добавляли 930 мкл (3,68 ммоль) конц. HCl, реакционную массу перемешивали 10 мин при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:10 до 60:40). Получали 987 мг (88%)

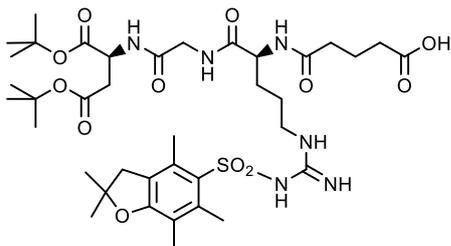
бесцветного масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,28$ (проявление нингидрином). $[\alpha]_D^{20} +17,6^\circ$ (с 1,0, $CHCl_3$). 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 8,66-8,50 (уш с, 3H (NH_3^+ Arg)), 8,61 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)), 8,28-7,62 (м, 3H ($N^{\omega}H$ Arg)), 7,34 (м, 11H (2OBn Asp, NH Gly)), 5,10 (с, 2H (OBn Asp)), 5,08 (с, 2H (OBn Asp)), 4,78 (дт, $J = 7,0, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)), 3,82 (д, $J = 4,5$ Гц, 2H (H2 Gly)), 3,64 (м, 1H (H2 Arg)), 3,23-3,09 (м, 2H (H5 Arg)), 2,92 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,81 (дд, $J = 7,0, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)), 1,74–1,65 (м, 2H (H3 Arg)), 1,64–1,50 (м, 2H (H4 Arg)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, $DMCO-d_6$): 24,45 (с, 1C (C4 Arg)), 31,08 (с, 1C (C3 Arg)), 35,76 (с, 1C (C3 Asp)), 40,34 (с, 1C (C5 Arg)), 41,49 (с, 1C (C2 Gly)), 48,51 (с, 1C (C2 Asp)), 53,65 (с, 1C (C2 Arg)), 65,86 (с, 1C (OBn Asp)), 66,28 (с, 1C (OBn Asp)), 127,65 (с, 2C (OBn Asp)), 127,89 (с, 2C (OBn Asp)), 127,99 (с, 1C (OBn Asp)), 128,01 (с, 1C (OBn Asp)), 128,36 (с, 4C (OBn Asp)), 135,62 (с, 1C (OBn Asp)), 135,75 (с, 1C (OBn Asp)), 159,25 (с, 1C (C6 Arg)), 168,77 (с, 1C (CO Gly)), 169,74 (с, 1C (CO Asp)), 170,27 (с, 1C (CO Asp)), 173,92 (с, 1C (CO Arg)). Найдено, %: C, 49,61; H, 5,54; Cl, 8,24; N, 15,64. Вычислено для $C_{26}H_{33}N_7O_8 \times 1,5HCl$, %: C, 49,86; H, 5,55; Cl, 8,49; N, 15,66; O, 20,44. МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{26}H_{34}N_7O_8$ $[M+H]^+$: 572,2464; найдено: 572,2462.



Диметиловый эфир N -карбоксибутаноил-(N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (20). К раствору 606,6 мг (0,968 ммоль) соединения **17** в 10 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли 110,5 мг (0,968 ммоль) глутарового

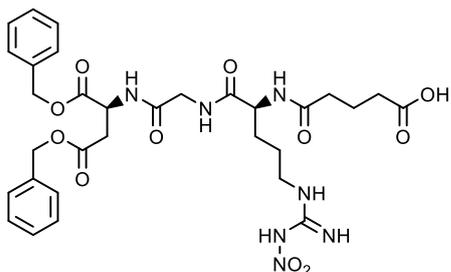
ангидрида, реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:0 до 30:70). Получали 699,8 мг (98%) белого порошка, т.пл. 99–104 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,7$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +10,2^\circ$ (с 1,01, MeOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–уксусная кислота 55:44,5:0,5; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 10,95$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 8,30-8,18 (м, 2H (NH Asp, NH Gly)); 8,05 (д, $J = 7,3$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,21-6,57 (уш с, 2H ($N^{\omega}H$ Arg)); 6,57-6,20 (уш с, 1H ($N^{\omega}H$ Arg)); 4,66 (дт, $J = 7,0, 7,1$ Гц, 1H (H2 Asp));

4,16 (дт, $J = 7,0, 6,7$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,71 (ддд, $J = 5,9, 16,8, 29,9$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 6,3, 6,2$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,79 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,20 (т, $J = 7,5$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,16 (т, $J = 7,5$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,01 (с, 3H (Me Pbf)); 1,74-1,66 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,65–1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,51-1,42 (м, 2H (H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). Найдено, %: С, 57,22; Н, 6,05; N, 10,34; S, 3,47. Вычислено для C₄₄H₅₅N₇O₁₂S×H₂O, %: С, 57,19; Н, 6,22; N, 10,61; S, 3,47. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₃₂H₄₉N₆O₁₂S [M+H]⁺: 741,3124; найдено: 741,3135.



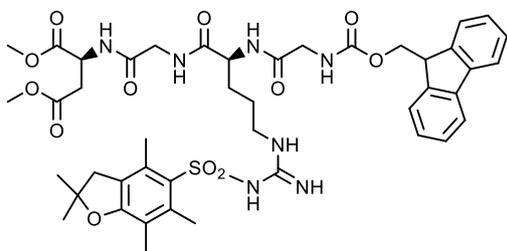
Ди-*tert*-бутиловый эфир *N*-карбоксивуваноил-(*N*^о-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (21). К раствору 128,6 мг (0,181 ммоль) соединения **18** в 5 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 20,6 мг

(0,181 ммоль) глутарового ангидрида, реакцию перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:0 до 30:70). Получали 144,5 мг (97%) белого порошка, т.пл. 98–103 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,75$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +10,3^\circ$ (с 1,03, MeOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–уксусная кислота 55:44,5:0,5; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 11,05$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆), δ (м.д.): 8,24 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,10 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,06 (д, $J = 7,3$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,13-6,74 (уш с, 2H (N^оH Arg)); 6,59-6,31 (уш с, 1H (N^оH Arg)); 4,49 (дт, $J = 6,9, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,17 (дт, $J = 7,1, 6,8$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,70 (ддд, $J = 6,4, 17,1, 30,4$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,02 (дт, $J = 6,4, 6,4$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,64 (дд, $J = 6,3, 16,4$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,55 (дд, $J = 6,6, 16,2$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,20 (т, $J = 7,5$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,16 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,01 (с, 3H (Me Pbf)); 1,75–1,68 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,66–1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,51–1,33 (м, 2H (H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,39 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,38 (с, 9H (OtBu Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₃₈H₆₁N₆O₁₂S [M+H]⁺: 825,4063; найдено: 825,4073.



Дибензиловый эфир *N*-карбоксивуваноил-(*N*^о-нитро)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (22). К раствору 936 мг (1,54 ммоль) соединения **19** в 10 мл сухого CH₂Cl₂ добавляли 175,6 мг (1,54 ммоль) глутарового ангидрида и 535 мкл (3,08 ммоль) DIPEA. Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 90:0 до 30:70). Получали 798,2 мг

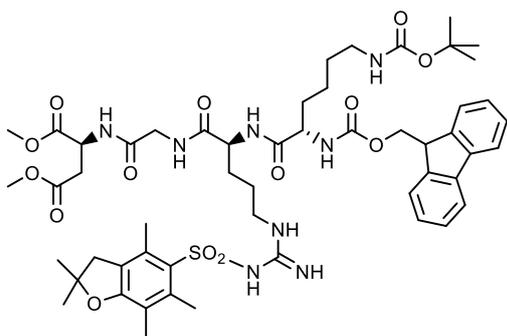
(76%) белого порошка, т.пл. 103–108 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,5$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). $[\alpha]_D^{20} -1,7^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода–уксусная кислота 40:59,5:0,5; детектирование при 220 нм): $\tau = 6,55$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 12,11–11,95 (уш с, 1H (COOH)), 8,56–8,43 (уш с, 1H (N^oH Arg)), 8,38 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)), 8,24 (т, $J = 5,7$ Гц, 1H (NH Gly)), 8,06 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H (NH Arg)), 8,02–7,58 (м, 2H (N^oH Arg)), 7,39–7,29 (м, 10H (2OBn Asp)), 5,09 (с, 2H (OBn Asp)), 5,07 (с, 2H (OBn Asp)), 4,76 (дт, $J = 7,0, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)), 4,21 (дт, $J = 7,0, 6,6$ Гц, 1H (H2 Arg)), 3,73 (ddd, $J = 5,7, 16,7, 22,0$ Гц, 2H (H2 Gly)), 3,19–3,08 (м, 2H (H5 Arg)), 2,90 (дд, $J = 6,3, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)), 2,80 (дд, $J = 6,9, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)), 2,21–2,14 (м, 4H (H2, H4 глутарил)), 1,73–1,66 (м, 4H (H3 глутарил, H3 Arg)), 1,56–1,47 (м, 2H (H4 Arg)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*6): 20,55 (с, 1C (C3 глутарил)), 24,66 (с, 1C (C4 Arg)), 28,89 (с, 1C (C3 Arg)), 33,05 (с, 1C (C4 глутарил)), 34,17 (с, 1C (C2 глутарил)), 35,76 (с, 1C (C3 Asp)), 40,20 (с, 1C (C5 Arg)), 41,63 (с, 1C (C2 Gly)), 48,53 (с, 1C (C2 Asp)), 52,41 (с, 1C (C2 Arg)), 65,89 (с, 1C (OBn Asp)), 66,29 (с, 1C (OBn Asp)), 127,67 (с, 2C (OBn Asp)), 127,90 (с, 2C (OBn Asp)), 128,00 (с, 1C (OBn Asp)), 128,03 (с, 1C (OBn Asp)), 128,40 (с, 4C (OBn Asp)), 135,68 (с, 1C (OBn Asp)), 135,80 (с, 1C (OBn Asp)), 159,27 (с, 1C (C6 Arg)), 168,84 (с, 1C (CO Gly)), 169,73 (с, 1C (CO Asp)), 170,30 (с, 1C (CO Asp)), 171,96 (с, 1C (CO глутарил)), 172,13 (с, 1C (CO Arg)), 174,19 (с, 1C (COOH)). Найдено, %: С, 54,14; Н, 5,65; N, 14,25. Вычислено, %: С, 54,30; Н, 5,73; N, 14,30; O, 25,67. МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{31}H_{40}N_7O_{11}$ $[M+H]^+$: 686,2781; найдено: 686,2783.



Диметиловый эфир *N*-флуоренилметокси-карбонилглицил-(N^o -2,2,4,6,7-пентаметилдигидро-бензофуран-5-сульфонил)-*L*-аргинил-глицил-*L*-аспарагиновой кислоты (25). К раствору 0,480 г (0,766 ммоль) соединения **17** и 0,228 г (0,766 ммоль)

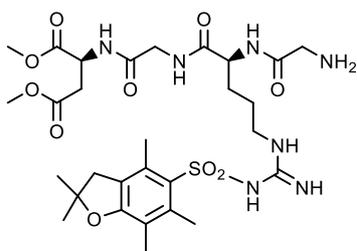
соединения **23** в 25 мл CH_2Cl_2 добавляли 267 мкл (1,532 ммоль) DIPEA и 0,246 г (0,766 ммоль) TBTU. Реакционную массу перемешивали 20 ч при 20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 85:15). Получали 0,698 г (98%) желтоватого порошка, т.пл. 123–125 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 7:1): $R_f = 0,75$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} -2,1^\circ$ (с 1,54, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; элюент А – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке, элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 10% до 90% в течение 30 мин; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 26,39$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,30 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,25 (т, $J = 11,4$ Гц, 1H (NH Gly-1)); 8,03 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,89 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,70 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,48 (т, $J = 6,0$ Гц, 1H (NH Gly-2)); 7,41 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,00, 6,65, 6,35 (уш с, 3H (N^oH Arg)); 4,65 (дт, $J = 14,1, 14,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,30 (м,

3H (CH, CH₂ Fmoc)); 4,22 (дт, $J = 14,1, 15,6$ Гц, 1H (H₂ Arg)); 3,72 (дд, $J = 5,0$, 2H (H₂ Gly-1)); 3,66 (д, $J = 6,1$ Гц, 2H (H₂ Gly-2)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,59 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 11,9, 12,3$ Гц, 2H (H₅ Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,78 (дд, $J = 6,1, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,7, 16,4$ Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70-1,60 (м, 2H (H₃ Arg)); 1,50-1,40 (м, 2H (H₄ Arg)); 1,39 (с, 6H (2Me Pbf)). Найдено, %: С, 57,22; Н, 6,05; N, 10,34; S, 3,47. Вычислено, %: С, 57,19; Н, 6,22; N, 10,61; S, 3,47. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₄₄H₅₆N₇O₁₂S [M+H]⁺: 906,3703; найдено: 906,3708.



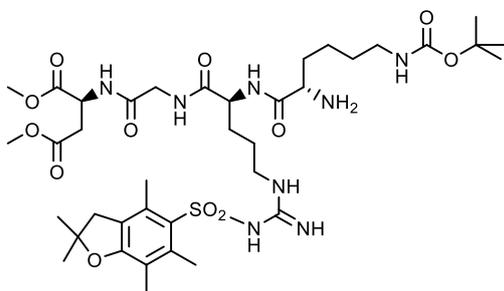
Диметилловый эфир N^ε-флуоренилметокси-карбонил-N^α-трет-бутилоксикарбонил-L-лизил-(N^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидро-бензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (26). К раствору 0,445 г (0,710 ммоль) соединения **17** и 0,333 г (0,710 ммоль) соединения **24** в 25 мл CH₂Cl₂ добавляли 272 мкл (1,56 ммоль) DIPEA и

0,251 г (0,781 ммоль) TBUTU. Реакционную массу перемешивали 20 ч при 20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 85:15). Получали 0,681 г (93%) желтоватого порошка, т.пл. 103–106 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 7:1): R_f = 0,8 (проявление в УФ свете). [α]_D²⁰ –4,1° (с 2,9, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; элюент А – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке, элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 10% до 90% в течение 30 мин; детектирование при 220, 260 нм): τ = 27,51 мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,32 (д, $J = 5,2$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,21 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,85 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,68 (д, $J = 7,5$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,40 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 7,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (Ar Fmoc)); 6,90 (д, $J = 8,4$ Гц, (N^εH Lys)); 6,85 (д, $J = 6,7$ Гц, 2H (N^εH Lys)); 6,79, 6,65, 6,35 (уш с, 3H (N^ωH Arg)); 4,65 (дт, $J = 6,7$ Гц, 11,4, 1H (H₂ (Asp))); 4,28 (м, 3H (Ar Fmoc)); 4,20 (дт, $J = 7,0, 13,9$ Гц, 1H (H₂ (Arg))); 3,87 (м, 1H (H₂ (Lys))); 3,72 (д, $J = 5,72$ Гц, 2H (H₂ (Gly))); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,58 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (д,т, $J = 12,3, 5,5$ Гц, 2H (H₅ Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ (Pbf))); 2,92-2,94 (м, 2H (H₆ Lys)); 2,78 (дд, $J = 6,3, 16,6$ Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,41 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70-1,60 (м, 2H (H₃ Arg)); 1,50-1,40 (м, 8H (H₄ Arg, H₃ Lys, H₄ Lys, H₅ Lys)); 1,40 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,35 (с, 9H (3Me Boc)). Найдено, %: С, 58,90; Н, 6,77; N, 10,79; S, 2,93. Вычислено, %: С, 58,90; Н, 6,75; N, 10,37; S, 2,97. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₅₃H₇₃N₈O₁₄S [M+H]⁺: 1077,4962; найдено: 1077,4971.



Диметиловый эфир глицил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметил-дигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (27). К раствору 0.539 г (0,595 ммоль) соединения **19** в 5 мл EtOH добавляли 294 мкл (2,98 ммоль) пиперидина. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 20 °С,

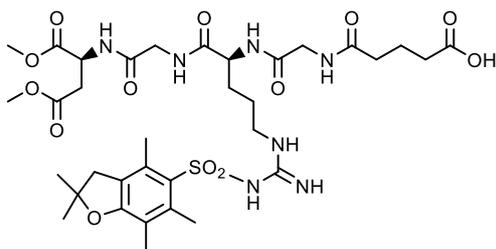
упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 95:5 до 20:80). Получали 321 мг (79%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,4$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} +4,5^\circ$ (c 1,67, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ; 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке – ацетонитрил 35:65; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 12,04$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,36 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,30 (уш с, 1H (NH Gly-1)); 8,25 (т, $J = 11,4$ Гц, 1H (NH Gly-2)); 8,03 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,90, 6,78, 6,42 (уш с, 3H (N^ωH Arg)); 4,66 (дт, $J = 7,0, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,10 (дт, $J = 4,8, 4,9$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,72 (ддд, $J = 5,9, 16,8, 35,4$ Гц, 2H (H2 Gly-2)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,59 (с, 3H (OMe Asp)); 3,44 (м, 2H (H2 Gly-1)); 3,02 (дт, $J = 6,4, 6,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,78 (дд, $J = 6,0, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,6, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70-1,60 (м, 2H (H3 Arg)); 1,50-1,40 (м, 2H (H4 Arg)); 1,39 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₂₉H₄₆N₇O₁₀S [M+H]⁺: 684,3022; найдено: 684,3022.



Диметиловый эфир *N*^ω-трет-бутилокси-карбонил-L-лизил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметил-дигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (28). Получали аналогично соединению **27**. Очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 95:5 до 20:80).

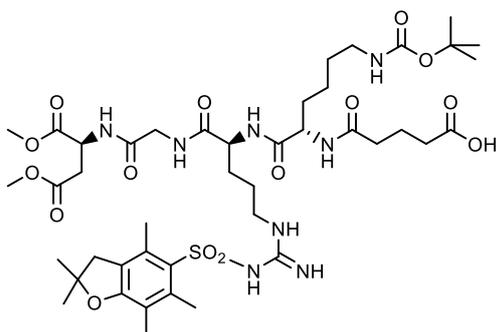
Получали 198 мг (68%) желтоватого масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,4$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} -6,6^\circ$ (c 0,45, MeOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ; 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке – ацетонитрил 35:65; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 13,1$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,32 (д, $J = 5,2$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,21 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,85 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 6,9 (т, $J = 8,4$ Гц, 1H (N^εH Lys)); 6,85 (д, $J = 7,7$ Гц, 2H (N^εH Lys)); 6,79, 6,65, 6,35, (уш с, 3H (NH Arg)); 4,65 (дт, $J = 6,7, 11,4$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,20 (дт, $J = 7,0$ Гц, 13,9, 1H (H2 Arg)); 3,87 (м, 1H (H2 Lys)); 3,72 (д, $J = 5,7$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,58 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 5,5, 12,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,92-2,94 (м, 2H (H6 Lys)); 2,78 (дд, $J = 6,3, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,41 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70-1,60 (м, 10H (H3 Arg, H4 Arg, H3 Lys, H4 Lys, H5 Lys)); 1,40 (с, 6H

(2Me Pbf)); 1,35 (с, 9H (3Me Boc)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{38}H_{63}N_8O_{12}S$ $[M+H]^+$: 855,4281; найдено: 855,4275.



Диметилловый эфир *N*-карбоксибутаноил-глицил-(*N*^ω2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-*L*-аргинил-глицил-*L*-аспарагиновой кислоты (29). К раствору 0,115 г (0,168 ммоль) соединения **21** в 3 мл $CHCl_3$ добавляли 0,119 г (0,168

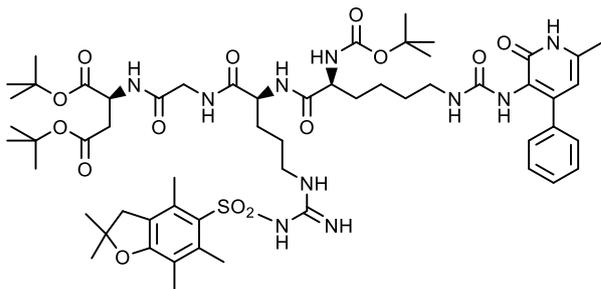
ммоль) глутарового ангидрида. Реакционную массу перемешивали 16 ч при 20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 0:100). Получали 99 мг (74%) белого порошка, т.пл. 98–100 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,33$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} -1,5^\circ$ (с 3,22, MeOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–уксусная кислота 55:44,5:0,5; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 10,84$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 11,70 (уш с, 1H (COOH)); 8,28 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,24 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H (NH Gly-1)); 8,04 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,02 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H, (NH Gly-2)); 7,05, 6,67, 6,39 (уш с, 3H (*N*^ωH Arg)); 4,66 (дт, $J = 6,8, 13,6$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,23 (дт, $J = 7,7, 13,2$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,71 (м, 4H, (H2 Gly-1, H2 Gly-2)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,57 (с, 3H (OMe Asp)); 3,03 (дт, $J = 11,9, 12,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,79 (дд, $J = 7,0, 16,7$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,2, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,40 (с, 3H (Me Pbf)); 2,20 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,16 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,60-1,40 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). Найдено, %: С, 51,05; Н, 6,31; N, 12,04; S, 3,99. Вычислено, %: С, 51,18; Н, 6,44; N, 12,29; S, 4,02. МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{34}H_{52}N_7O_{13}S$ $[M+H]^+$: 798,3339; найдено: 798,3333.



Диметилловый эфир *N*^ε-карбоксибутаноил-*N*^α-трет-бутилоксикарбонил-*L*-лизил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-*L*-аргинил-глицил-*L*-аспарагиновой кислоты (30).

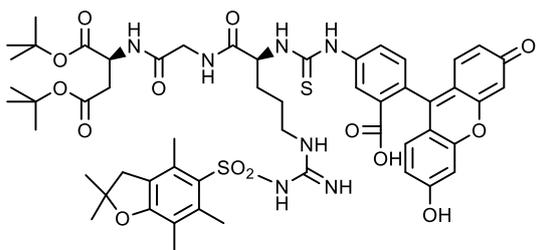
Получали аналогично соединению **29**. Очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 0:100). Получали 155,2 мг (70%) белого порошка, т.пл. 97–99 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,35$ (проявление в УФ свете). $[\alpha]_D^{20} -3,1^\circ$ (с 0,25, MeOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–уксусная кислота 55:44,5:0,5; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 11,69$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$), δ (м.д.): 11,70 (уш с, 1H (COOH)); 8,27 (д, $J = 5,2, 1H$ (NH Asp)); 8,25 (т, $J = 5,4, 1H$ (NH Gly)); 7,85 (д, $J = 7,7, 1H$ (NH Arg)); 7,75 (т, $J = 6,1, 1H$, (*N*^εH Lys)); 6,85 (д, $J = 7,7, 1H$, (*N*^αH Lys)); 7,10, 6,68,

6,40 (уш с, 3H (N^oH Arg)); 4,65 (дт, $J = 7,5, 13,3$, 1H (H2 Asp)); 4,20 (дт, $J = 7,0, 13,9$, 1H (H2 Arg)); 3,87 (м, 1H (H2 Lys)); 3,72 (д, $J = 4,9$, 2H (H2 Gly)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,58 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 11,6$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,92 (м, 2H (H6 Lys)); 2,78 (дд, $J = 6,3, 16,6$, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,41 (с, 3H (Me Pbf)); 2,20 (т, $J = 7,4$ Гц 2H, (H4 глутарил)); 2,16 (т, $J = 7,6$ Гц 2H, (H2 глутарил)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70 (м, 2H, (H3 глутарил)); 1,60-1,40 (м, 10H, H3 Arg, H4 Arg, H3 Lys, H4 Lys, H5 Lys)); 1,35 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,32 (с, 9H (3Me Boc)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₄₃H₆₉N₈O₁₅S [M+H]⁺: 969,4598; найдено: 969,4599.



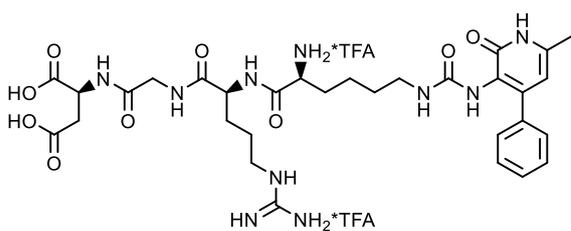
Ди-*tert*-бутиловый эфир *N*^o-*tert*-бутилметоксикарбонил-(*N*^ε-((6-метил-2-оксо-4-фенил-1,2-дигидропиридин-3-ил)-карбамоил))-L-лизил-(*N*^o-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (34). К

раствору 168,5 мг (0,237 ммоль) соединения **18**, 112 мг (0,237 ммоль) соединения **31**, 76,1 мг (0,237 ммоль) ТВТУ в 10 мл сухого ДМФА добавляли 83 мкл (0,474 ммоль) DIPEA. Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 216,3 мг (78%) желтого порошка. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): $R_f = 0,53$ (проявление в УФ свете). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); элюент А – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке, элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 10% до 90% в течение 30 мин; детектирование при 220, 254, 320 нм): $\tau = 28,71$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,21 (т, $J = 5,5$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,16 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H (NH Asp)); 7,96 (с, 0,5H (ОН пиридин)); 7,81 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,69 (с, 0,5H (NH пиридин)); 7,42–7,28 (м, 5H (фенил)); 7,05 (с, 1H (CH пиридин)); 6,87 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Lys)); 6,74-6,57 (уш с, 1H (N^oH Arg)); 6,51-6,27 (уш с, 2H (N^oH Arg)); 6,14 (т, $J = 5,5$ Гц, 1H (N^εH Lys)); 5,98 (с, 1H (N³H Pyridine)); 4,49 (дт, $J = 7,0, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,26 (дт, $J = 6,4, 6,2$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,85 (дт, $J = 7,2, 6,5$ Гц, 1H (H2 Lys)); 3,72 (ддд, $J = 6,3, 17,5, 24,4$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,01 (дт, $J = 5,8, 5,7$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H), 2,64 (дд, $J = 6,2, 16,3$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,84 (м, 2H (H6 Lys)); 2,54 (дд, $J = 6,1, 16,2$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,18 (с, 2H (Me пиридин)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,69–1,20 (м, 10H (H3 Arg, H3 Lys, H5 Lys, H4 Arg, H4 Lys)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,38 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,37 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,36 (с, 9H (Boc Lys)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₅₇H₈₅N₁₀O₁₄S [M+H]⁺: 1165,5962; найдено: 1165,5960.



Ди-*трет*-бутиловый эфир 3',6'-дигидро-киспири[изобензофуран-1(3Н),9'-[9Н]ксантен]-3-он-5-аминотиокарбонил-(N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (35). К

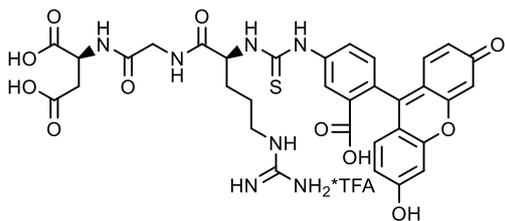
раствору 97,2 мг (0,137 ммоль) соединения **18** в 1 мл сухого ДМФА добавляли 53,2 мг (0,137 ммоль) соединения **32**. Реакционную массу перемешивали 2 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол–уксусная кислота, от 100:0:0 до 80:20:0,02). Получали 113,6 мг (75%) оранжевого порошка. ТСХ (хлороформ–этанол–уксусная кислота 7:1:0,01): $R_f = 0,42$ (проявление в УФ свете). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); элюент А – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке, элюент Б – ацетонитрил; градиент элюента Б от 10% до 90% в течение 30 мин; детектирование при 220, 254, 490 нм): $\tau = 16,87$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 10,21 (с, 1H (COOH)); 10,12 (с, 1H (ОН флуоресцеин)); 8,54 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,45 (с, 1H (NH флуоресцеин)); 8,20 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,16 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H (NH Arg)); 6,68 (с, 1H (CH флуоресцеин)); 6,67 (с, 2H (2CH флуоресцеин)); 6,61–6,54 (м, 6H (6CH флуоресцеин)); 6,52, 6,38 (уш с, 3H (N^{ω} H Arg)); 4,98 (дт, $J = 5,9, 6,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,51 (дт, $J = 7,0, 7,2$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,78 (д, $J = 5,0$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,07 (дт, $J = 6,5, 6,5$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf), 2,65 (дд, $J = 6,1, 16,7$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,55 (дд, $J = 6,2, 15,7$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 1,98 (с, 3H (Me Pbf)); 1,51–1,45 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,40 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,38 (с, 18H (2OtBu Asp)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{54}\text{H}_{66}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1100,4104; найдено: 1100,4116.



(N^{ϵ} -((6-Метил-2-оксо-4-фенил-1,2-дигидропиридин-3-ил)карбамоил))-L-лизил-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты дитрифторацетат (36). Раствор 107 мг (92 мкмоль) соединения **34** в 3 мл 95% ТФА

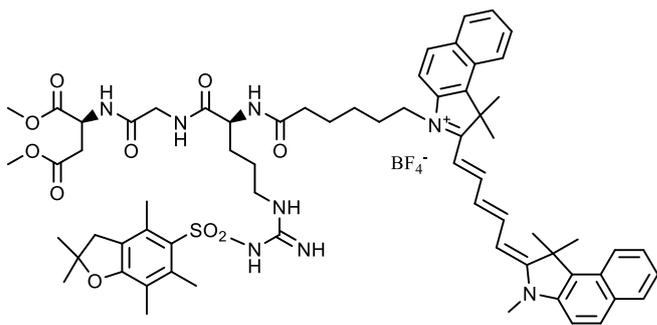
перемешивали 4 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток растворили в 5 мл воды, промыли хлороформом 3×5 мл. Водный раствор снова упаривали. Получали 61,2 мг (71%) желтого порошка. ТСХ (этанол–вода 1:1): $R_f = 0,18$ (проявление в УФ свете). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); 90% 0,1% трифторуксусная кислота – 10% ацетонитрил элюент А; 90% ацетонитрил – 10% 0,1% трифторуксусная кислота элюент Б; градиент элюента Б от 0% до 100% в течение 30 мин; детектирование при 220, 254, 320 нм): $\tau = 9,31$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 11,80 (с, 2H (2COOH Asp)); 8,62 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,31 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,17-8,04 (уш с, 3H (NH₃⁺ Lys), 8,01 (с, 0,5H (ОН пиридин)); 7,75 (с,

0,5H (NH пиридин)); 7,64 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,39 (м, 5H (фенил)); 7,13 (с, 1H (CH пиридин)); 7,53-6,74 (уш с, 4H ($N^{\ominus}H_4^+$ Arg)); 6,19 (т, $J = 4,7$ Гц, 1H ($N^{\epsilon}H$ Lys)); 6,03 (с, 1H (N^3H пиридин)); 4,58 (дт, $J = 6,8, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,37 (дт, $J = 7,0, 6,8$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,85 (дд, $J = 5,8, 16,9$ Гц, 1H (H2-A Gly)); 3,80 (м, 1H (H2 Lys)); 3,75 (дд, $J = 5,6, 16,9$ Гц, 1H (H2-B Gly)); 3,13 (дт, $J = 6,3, 6,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,89 (м, 2H (H6 Lys)); 2,71 (дд, $J = 5,9, 16,5$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,63 (дд, $J = 6,8, 16,7$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,22 (с, 3H (Me пиридин)); 1,78-1,50 (м, 6H (H3 Arg, H3 Lys, H5 Lys)); 1,37-1,22 (м, 4H (H4 Arg, H4 Lys)), 1H ЯМР (500 МГц, D_2O), δ (м,д.): 7,49-7,43 (м, 5H (фенил)); 6,45 (с, 1H (CH пиридин)); 4,74 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,37 (т, $J = 7,1$ Гц, 1H (H2 Arg)); 4,01 (т, $J = 6,6$ Гц, 1H (H2 Lys)); 3,95 (д, $J = 3,0$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,21 (т, $J = 6,9$ Гц, 2H (H6 Lys)); 2,98 (дт, $J = 5,7, 5,5$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,93 (дд, $J = 2,4, 5,8$ Гц, 2H (H3-B Asp)); 2,38 (с, 3H (Me пиридин)); 1,90-1,74 (м, 4H (H3 Arg, H3 Lys)); 1,71-1,63 (м, 2H (H5 Lys)); 1,36-1,26 (м, 4H (H4 Arg, H4 Lys)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{31}H_{45}N_{10}O_9$ $[M+H]^+$: 701,3366; найдено: 701,3365.



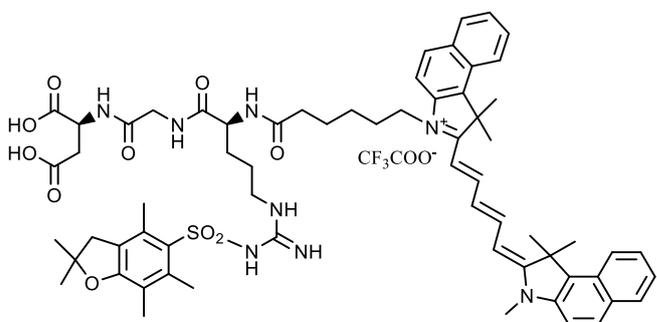
3',6'-Дигидроксиспиро-[изобензофуран-1(3H),9'-[9H]ксантен]-3-он-5-амино-тиокарбонил-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновая кислота трифторацетат (37). Раствор 99,6 мг (90 мкмоль) соединения **35** в 3 мл 95% TFA перемешивали 4 ч при

+20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ-этанол, от 100:0 до 0:100; этанол-вода, от 100:0 до 50:50). Получали 49,4 мг (64%) оранжевого порошка. ТСХ (этанол-вода 3:1): $R_f = 0,75$ (проявление в УФ свете). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил-вода-уксусная кислота 40:59,5:0,5; детектирование при 220, 254, 490 нм): $\tau = 4,05$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м,д.): 10,94-10,72 (уш с, 1H (COOH)); 10,40-10,09 (уш с, 3H (2COOH Asp)); 10,27 (с, 1H (ОН флуоресцеин)); 7,99 (с, 1H (NH флуоресцеин)); 7,86-7,76 (м, 2H (NH Asp, NH Gly)); 7,74 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,57-6,87 (м, 5H ($N^{\ominus}H^+$ Arg)); 6,73 (с, 2H (CH флуоресцеин)); 6,70 (с, 1H (CH флуоресцеин)); 6,64-6,53 (м, 6H (CH флуоресцеин)); 4,50 (дт, $J = 4,0, 3,4$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,16 (дт, $J = 6,9, 7,0$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,44 (ддд, $J = 6,8, 6,8, 12,1$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,18 (дт, $J = 6,3, 6,3$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,54 (м, 2H (H3-B Asp)); 1,95-1,75 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{33}H_{34}N_7O_{11}S$ $[M+H]^+$: 736,2032; найдено: 736,2036.



Диметилловый эфир (2,5-диоксопирролидин-1-ил)-6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметилбензо-[e]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]бензо[e]индол-3-ил]гексаноат-(N^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой

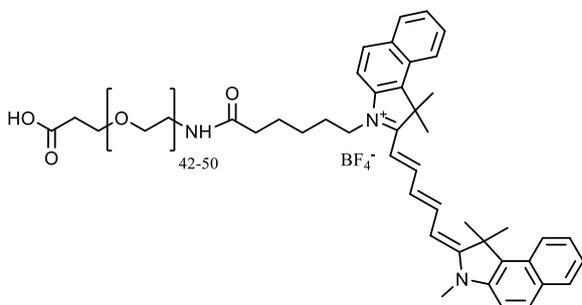
кислоты тетрафтороборат (38). К раствору 26,4 мг (0,034 ммоль) соединения **17** в 2 мл сухого ДМФА добавляли 21,6 мг (0,034 ммоль) соединения **33**. Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 70:30). Получали 44 мг (81%) синего порошка. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,79$. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,45 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 8,32–8,24 (м, 4H, (бензо[e]индол Суанине, NH Asp, NH Gly)); 8,11–8,04 (м, 5H, (бензо[e]индол Суанине, NH Arg)); 7,74 (т, $J = 8,4$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 7,68 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 7,52 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 7,51 (т, $J = 7,7$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,62 (т, $J = 12,4$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,37 (д, $J = 13,9$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,33 (д, $J = 13,9$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,7–6,3 (уш с, 3H (N^ωH Arg)); 4,65 (дт, $J = 6,8, 7,5$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,29–4,17 (м, 3H (H2 Arg, H2 гексаноат Суанине)); 3,73 (с, 3H (NMe Суанине)); 3,70 (ддд, $J = 6,8, 6,8, 13,1$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,58 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 6,1$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,93 (с, 2H (Me Pbf)); 2,78 (дд, $J = 6,2, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,70 (дд, $J = 6,7, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,46 (с, 3H (Me Pbf)); 2,41 (с, 3H (Me Pbf)); 2,14 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H6 гексаноат Суанине)); 1,98 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 1,97 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,96 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,75 (м, 2H (H5 гексаноат Суанине)); 1,70–1,35 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,58 (м, 2H (H3 гексаноат Суанине)); 1,41 (м, 2H (H4 гексаноат Суанине)); 1,38 (с, 6H (2Me Pbf)). MСВР (ESI-POS) вычислено для C₆₇H₈₃N₈O₁₀S [M]⁺: 1191,5948; найдено: 1191,5950.



(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)-6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметилбензо[e]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]бензо[e]индол-3-ил]гексаноат-(N^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновая кислота

трифторацетат (39). К раствору 34,1 мг (0,027 ммоль) соединения **38** в 3 мл EtOH добавляли раствор 10,8 мг (0,27 ммоль) NaOH в 3 мл H₂O, реакционную массу перемешивали 15 мин при

+20 °С. Затем останавливали реакцию добавлением ТФА. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 30:70). Получали 24,9 мг (75%) синего масла. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,47$. ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; метанол – 0,01 М раствор ацетата аммония в 0,04 % водном аммиаке 8:2; детектирование при 220, 254, 680 нм): $\tau = 10,8$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 12,30-11,70 (уш с, 2H (2COOH Asp)); 8,45 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 8,34–8,24 (м, 4H, (бензо[е]индол Суanine, NH Asp, NH Gly)); 8,13–8,04 (м, 5H, (бензо[е]индол Суanine, NH Arg)); 7,74 (т, $J = 8,4$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 7,68 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 7,52 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 7,51 (т, $J = 7,7$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,62 (т, $J = 12,4$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,37 (д, $J = 13,9$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,33 (д, $J = 13,9$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,7–6,3 (уш с, 3H (N^oH Arg)); 4,66 (дт, $J = 6,9, 7,5$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,30–4,17 (м, 3H (H2 Arg, H6 гексаноат Суanine)); 3,73 (с, 3H (NMe Суanine)); 3,70 (ддд, $J = 6,8, 6,9, 13,0$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 6,1$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,93 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,47 (д, $J = 3,8$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,41 (д, $J = 3,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,36 (с, 3H (Me Pbf)); 2,15 (с, 3H (Me Pbf)); 1,98 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H2 гексаноат Суanine)); 1,97 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 1,96 (с, 6H (2Me Суanine)); 1,91 (с, 6H (2Me Суanine)); 1,75 (м, 2H (H5 гексаноат Суanine)); 1,70–1,35 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,58 (м, 2H (H3 гексаноат Суanine)); 1,42 (м, 2H (H4 гексаноат Суanine)); 1,38 (с, 6H (2Me Pbf)), MCBP (ESI-POS) вычислено для C₆₅H₇₉N₈O₁₀S [M]⁺: 1163,5635; найдено: 1163,5636.



(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)-6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметилбензо[е]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]бензо[е]индол-3-ил]гексаноат-*O*-(2-аминоэтил)-*O'*-(2-карбоксиил)полиэтиленгликоль тетрафтороборат (42). К раствору 53 мг (0,026

ммоль) соединения **37** в 1 мл сухого ДМФА добавляли 19,1 мг (0,026 ммоль) соединения **41**. Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 30:70). Получали 64,4 мг (92%) синего масла. ТСХ (хлороформ–этанол 1:1): $R_f = 0,5$. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 11,18-10,38 (уш с, 1H (COOH)); 8,46 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 8,26 (дд, $J = 2,6, 8,4$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 8,08 (м, 4H (бензо[е]индол Суanine)); 7,83 (т, $J = 5,5$ Гц, 1H (NH PEG)); 7,76 (д, $J = 8,9$ Гц, 1H (бензо[е]индол Суanine)); 7,73 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H (бензо[е]индол Суanine)); 7,68 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (бензо[е]индол Суanine)); 7,52 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 7,51 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,62 (т, $J = 12,3$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суanine)); 6,37 (д, $J = 13,6$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден

Суанине)); 6,33 (д, $J = 14,0$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 4,22 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H (H6 гексаноат Суанине)); 3,64 (т, $J = 4,7$ Гц, 2H (CH₂CO PEG)); 3,74 (с, 3H (NMe Суанине)); 3,57-3,43 (м, 180H (PEG)); 3,15 (дт, $J = 5,8, 5,8$ Гц, 2H (CH₂N PEG)); 2,07 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H2 гексаноат Суанине)); 1,97 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,96 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,74 (м, 2H (H5 гексаноат Суанине)); 1,56 (м, 2H (H3 гексаноат Суанине)); 1,38 (м, 2H (H4 гексаноат Суанине)).

МСВР (ESI-POS) вычислено для гомологов (C₂H₄O)_n:

$n = 42$, C₁₂₉H₂₂₁N₃O₄₆ [M+H]²⁺: 1274,7534; найдено: 1274,7506,

$n = 42$, C₁₂₉H₂₂₂N₃O₄₆ [M+2H]³⁺: 850,1714; найдено: 850,11698,

$n = 43$, C₁₃₁H₂₂₅N₃O₄₇ [M+H]²⁺: 1296,7665; найдено: 1296,7651,

$n = 43$, C₁₃₁H₂₂₆N₃O₄₇ [M+2H]³⁺: 864,8468; найдено: 864,8450,

$n = 44$, C₁₃₃H₂₂₉N₃O₄₈ [M+H]²⁺: 1318,7797; найдено: 1318,7790,

$n = 44$, C₁₃₃H₂₃₀N₃O₄₈ [M+2H]³⁺: 879,5222; найдено: 879,5208,

$n = 45$, C₁₃₅H₂₃₃N₃O₄₉ [M+H]²⁺: 1340,7928; найдено: 1340,7913,

$n = 45$, C₁₃₅H₂₃₄N₃O₄₉ [M+2H]³⁺: 894,1976; найдено: 894,1972,

$n = 46$, C₁₃₇H₂₃₇N₃O₅₀ [M+H]²⁺: 1362,8059; найдено: 1362,8047,

$n = 46$, C₁₃₇H₂₃₈N₃O₅₀ [M+2H]³⁺: 908,8730; найдено: 908,8715,

$n = 47$, C₁₃₉H₂₄₁N₃O₅₁ [M+H]²⁺: 1384,8190; найдено: 1384,8166,

$n = 47$, C₁₃₉H₂₄₂N₃O₅₁ [M+2H]³⁺: 923,5484; найдено: 923,5459,

$n = 48$, C₁₄₁H₂₄₅N₃O₅₂ [M+H]²⁺: 1406,8321; найдено: 1406,8300,

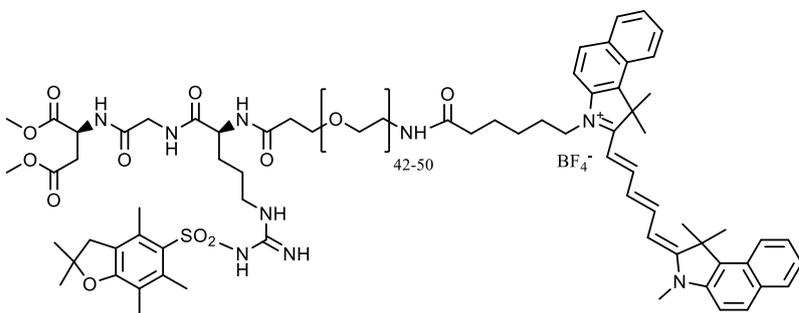
$n = 48$, C₁₄₁H₂₄₆N₃O₅₂ [M+2H]³⁺: 938,2238; найдено: 938,2217,

$n = 49$, C₁₄₃H₂₄₉N₃O₅₃ [M+H]²⁺: 1428,8452; найдено: 1428,8433,

$n = 49$, C₁₄₃H₂₅₀N₃O₅₃ [M+2H]³⁺: 952,8992; найдено: 952,8964,

$n = 50$, C₁₄₅H₂₅₃N₃O₅₄ [M+H]²⁺: 1450,8583; найдено: 1450,8553,

$n = 50$, C₁₄₅H₂₅₄N₃O₅₄ [M+2H]³⁺: 967,5746; найдено: 967,5712.



Диметилловый эфир (2,5-диоксопирролидин-1-ил)6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметилбензо[е]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]бензо[е]индол-3-ил]гексаноат-*O*-(2-амино-

этил)-*O'*-(2-карбоксиэтил)полиэтиленгликоль-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-*L*-аргинил-глицил-*L*-аспарагиновой кислоты тетрафтороборат (43). К раствору 79,1 мг (23 мкмоль) соединения 42, 10,6 мг (0,033 ммоль) ТВТУ и 18,8 мг (0,03 ммоль) пептида 17 в 2 мл сухого ДМФА добавляли 15 мкл (0,089 ммоль) DIPEA. Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С в темноте, упаривали. Остаток

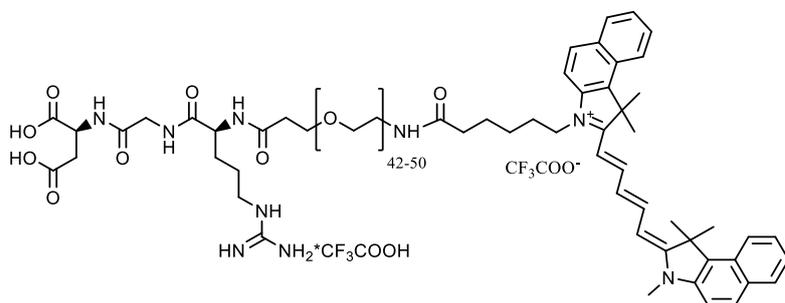
очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 75:25). Получали 79 мг (79%) синего масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,53$. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 8,46 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H (бензо[e]индол Cyanine)); 8,26 (дд, $J = 2,0, 8,3$ Гц, 2H (бензо[e]индол Cyanine)); 8,07 (м, 5H (бензо[e]индол Cyanine, NH Asp)); 7,96 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,84 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH PEG)); 7,76 (д, $J = 8,9$ Гц, 1H (бензо[e]индол Cyanine)); 7,73 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H (бензо[e]индол Cyanine)); 7,68 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (бензо[e]индол Cyanine)); 7,516 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Cyanine)); 7,514 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Cyanine)); 7,39 (т, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Gly)); 7,05–6,88 (уш с, 1H (N^{H} Arg)); 6,63 (т, $J = 12,3$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Cyanine)); 6,58–6,42 (уш с, 2H (N^{H} Arg)); 6,37 (д, $J = 14,1$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Cyanine)); 6,33 (д, $J = 13,8$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Cyanine)); 4,66 (дт, $J = 6,8, 7,5$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,24 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H (H2 гексаноат Cyanine)); 4,08 (дт, $J = 7,7, 5,6$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,78 (д, $J = 5,0$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,73 (с, 3H (NMe Cyanine)); 3,64 (т, $J = 4,7$ Гц, 2H (CH_2CO PEG)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,61 (с, 3H (OMe Asp)); 3,55–3,42 (м, 180H (PEG)); 3,15 (дт, $J = 5,8, 5,8$ Гц, 2H (CH_2N PEG)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 6,1$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH_2 Pbf)); 2,80 (дд, $J = 6,2, 16,5$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,7, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,07 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H6 гексаноат Cyanine)); 2,01 (с, 2H (CH_2 Pbf)); 1,97 (с, 6H (2Me Cyanine)); 1,96 (с, 6H (2Me Cyanine)); 1,73 (м, 2H (H5 гексаноат Cyanine)); 1,66 (м, 2H (H3 гексаноат Cyanine)); 1,56 (м, 2H (H4 гексаноат Cyanine)); 1,51–1,45 (м, 4H (H3 Arg, H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для гомологов ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$) $_n$:

- $n = 42, \text{C}_{156}\text{H}_{261}\text{N}_9\text{O}_{54}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1578,8849; \text{найдено}: 1578,8813,$
- $n = 42, \text{C}_{156}\text{H}_{262}\text{N}_9\text{O}_{54}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1052,9257; \text{найдено}: 1052,9237,$
- $n = 43, \text{C}_{158}\text{H}_{265}\text{N}_9\text{O}_{55}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1600,8980; \text{найдено}: 1600,8945,$
- $n = 43, \text{C}_{158}\text{H}_{266}\text{N}_9\text{O}_{55}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1067,6011; \text{найдено}: 1067,5980,$
- $n = 44, \text{C}_{160}\text{H}_{269}\text{N}_9\text{O}_{56}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1622,9111; \text{найдено}: 1622,9089,$
- $n = 44, \text{C}_{160}\text{H}_{270}\text{N}_9\text{O}_{56}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1082,2765; \text{найдено}: 1082,2728,$
- $n = 45, \text{C}_{162}\text{H}_{273}\text{N}_9\text{O}_{57}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1644,9242; \text{найдено}: 1644,9217,$
- $n = 45, \text{C}_{162}\text{H}_{274}\text{N}_9\text{O}_{57}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1096,9519; \text{найдено}: 1096,9501,$
- $n = 46, \text{C}_{164}\text{H}_{277}\text{N}_9\text{O}_{58}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1666,9373; \text{найдено}: 1666,9342,$
- $n = 46, \text{C}_{164}\text{H}_{278}\text{N}_9\text{O}_{58}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1111,6273; \text{найдено}: 1111,6234,$
- $n = 47, \text{C}_{166}\text{H}_{281}\text{N}_9\text{O}_{59}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1688,9504; \text{найдено}: 1688,9485,$
- $n = 47, \text{C}_{166}\text{H}_{282}\text{N}_9\text{O}_{59}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1126,3027; \text{найдено}: 1126,3003,$
- $n = 48, \text{C}_{168}\text{H}_{285}\text{N}_9\text{O}_{60}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1710,9635; \text{найдено}: 1710,9604,$
- $n = 48, \text{C}_{168}\text{H}_{286}\text{N}_9\text{O}_{60}\text{S} [\text{M}+2\text{H}]^{3+}: 1140,9781; \text{найдено}: 1140,9765,$
- $n = 49, \text{C}_{170}\text{H}_{289}\text{N}_9\text{O}_{61}\text{S} [\text{M}+\text{H}]^{2+}: 1732,9766; \text{найдено}: 1732,9730,$

$n = 49$, $C_{170}H_{290}N_9O_{61}S$ $[M+2H]^{3+}$: 1155,6535; найдено: 1155,6511,

$n = 50$, $C_{172}H_{293}N_9O_{62}S$ $[M+H]^{2+}$: 1754,9897; найдено: 1754,9856,

$n = 50$, $C_{172}H_{294}N_9O_{62}S$ $[M+2H]^{3+}$: 1170,3289; найдено: 1170,3244.



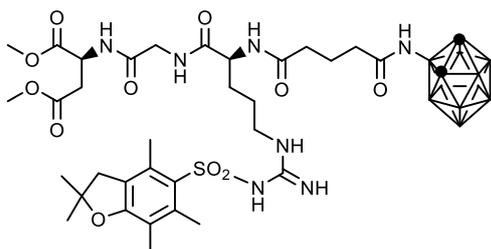
(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)-6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметил-бензо[e]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]-бензо[e]индол-3-ил]гексаноат-O-(2-аминоэтил)-O'-(2-карбоксиил)поли-этиленгликоль-L-

аргинил-глицил-L-аспарагиновая кислота дитрифторацетат (44). К раствору 35,7 мг (0,0105 ммоль) соединения **43** в 2 мл EtOH добавляли раствор 4,2 мг (0,105 ммоль) NaOH в 3 мл H₂O, перемешивали 15 мин при +20 °С. Затем останавливали реакцию добавлением TFA до нейтральной реакции и упаривали. Далее без промежуточного выделения растворяли в 2 мл TFA–H₂O 95:5 и выдерживали 4 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (этанол–вода, от 100:0 до 50:50). Получали 13,3 мг (39%) синего масла. ТСХ (хлороформ–этанол 3:1): $R_f = 0,53$. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 12,30–11,70 (уш с, 2H (2COOH Asp)); 8,46 (т, $J = 13,1$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 8,26 (дд, $J = 2,0, 8,3$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 8,07 (м, 5H (бензо[e]индол Суанине, NH Asp)); 7,96 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,84 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH PEG)); 7,76 (д, $J = 8,9$ Гц, 1H (бензо[e]индол Суанине)); 7,73 (д, $J = 9,0$ Гц, 1H (бензо[e]индол Суанине)); 7,68 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (бензо[e]индол Суанине)); 7,57–6,87 (м, 5H (N^oH Arg)); 7,516 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 7,514 (т, $J = 7,5$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 7,39 (т, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Gly)); 6,63 (т, $J = 12,3$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,37 (д, $J = 14,1$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 6,33 (д, $J = 13,8$ Гц, 1H (пента-2,4-диенилиден Суанине)); 4,66 (дт, $J = 6,8, 7,5$ Гц, 1H (H₂ Asp)); 4,24 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H (H₆ гексаноат Суанине)); 4,08 (дт, $J = 7,7, 5,6$ Гц, 1H (H₂ Arg)); 3,78 (д, $J = 5,0$ Гц, 2H (H₂ Gly)); 3,73 (с, 3H (NMe Суанине)); 3,64 (т, $J = 4,7$ Гц, 2H (CH₂CO PEG)); 3,55–3,42 (м, 180H (PEG)); 3,15 (дт, $J = 5,8, 5,8$ Гц, 2H (CH₂N PEG)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 6,1$ Гц, 2H (H₅ Arg)); 2,80 (дд, $J = 6,2, 16,5$ Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,7, 16,6$ Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,07 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H₂ гексаноат Суанине)); 2,01 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 1,97 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,96 (с, 6H (2Me Суанине)); 1,73 (м, 2H (H₅ гексаноат Суанине)); 1,66 (м, 2H (H₃ гексаноат Суанине)); 1,56 (м, 2H (H₄ гексаноат Суанине)); 1,51–1,45 (м, 4H (H₃ Arg, H₄ Arg)). MCBP (ESI-POS) вычислено для гомологов (C₂H₄O)_n:

$n = 42$, $C_{141}H_{241}N_9O_{51}S$ $[M+H]^{2+}$: 1438,8282; найдено: 1438,8242,

$n = 42$, $C_{141}H_{242}N_9O_{51}S$ $[M+2H]^{3+}$: 959,5546; найдено: 959,5517,

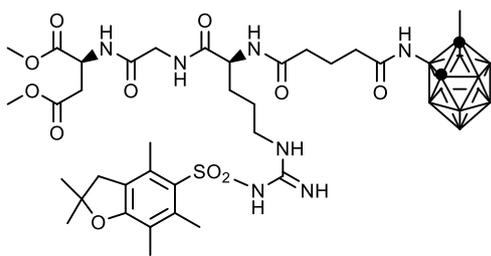
$n = 43, C_{143}H_{245}N_9O_{52}S [M+H]^{2+}: 1460,8413; \text{ найдено: } 1460,8388,$
 $n = 43, C_{143}H_{246}N_9O_{52}S [M+2H]^{3+}: 974,2300; \text{ найдено: } 974,2256,$
 $n = 44, C_{145}H_{249}N_9O_{53}S [M+H]^{2+}: 1482,8544; \text{ найдено: } 1482,8512,$
 $n = 44, C_{145}H_{250}N_9O_{53}S [M+2H]^{3+}: 988,9054; \text{ найдено: } 988,9026,$
 $n = 45, C_{147}H_{253}N_9O_{54}S [M+H]^{2+}: 1504,8675; \text{ найдено: } 1504,8633,$
 $n = 45, C_{147}H_{254}N_9O_{54}S [M+2H]^{3+}: 1003,5808; \text{ найдено: } 1003,5765,$
 $n = 46, C_{149}H_{257}N_9O_{55}S [M+H]^{2+}: 1526,8806; \text{ найдено: } 1526,8767,$
 $n = 46, C_{149}H_{258}N_9O_{55}S [M+2H]^{3+}: 1018,2562; \text{ найдено: } 1018,2525,$
 $n = 47, C_{151}H_{261}N_9O_{56}S [M+H]^{2+}: 1548,8937; \text{ найдено: } 1548,8914,$
 $n = 47, C_{151}H_{262}N_9O_{56}S [M+2H]^{3+}: 1032,9316; \text{ найдено: } 1032,9278,$
 $n = 48, C_{153}H_{265}N_9O_{57}S [M+H]^{2+}: 1570,9068; \text{ найдено: } 15,9043,$
 $n = 48, C_{153}H_{266}N_9O_{57}S [M+2H]^{3+}: 1047,6070; \text{ найдено: } 1047,6022,$
 $n = 49, C_{155}H_{269}N_9O_{58}S [M+H]^{2+}: 1592,9200; \text{ найдено: } 1592,9150,$
 $n = 49, C_{155}H_{270}N_9O_{58}S [M+2H]^{3+}: 1062,2824; \text{ найдено: } 1062,2809,$
 $n = 50, C_{157}H_{273}N_9O_{59}S [M+H]^{2+}: 1614,9331; \text{ найдено: } 1614,9302,$
 $n = 50, C_{157}H_{274}N_9O_{59}S [M+2H]^{3+}: 1076,9578; \text{ найдено: } 1076,9546.$



**Диметилловый эфир 1,2-дикарба-клозо-
 додекаборан-3-аминокарбонил- N^{α} -бутаноил-(N^{ω} -
 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-
 сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой
 кислоты (49).** К раствору 78,6 мг (0,106 ммоль)

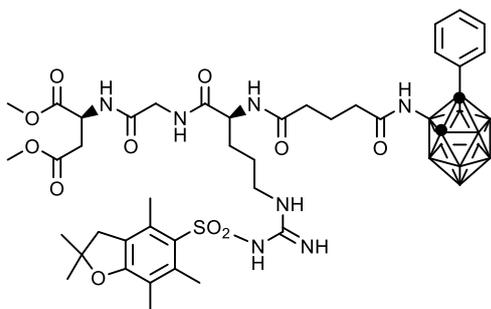
соединения **20** в 10 мл CH_2Cl_2 добавляли 23 мкл (0,2092 ммоль) N-метилморфолина и 10 мкл (0,106 ммоль) этилхлорформиата при охлаждении до $-5\text{ }^{\circ}C$, реакционную массу перемешивали 15 мин. Затем добавляли 16,9 мг (0,106 ммоль) соединения **45**. Реакционную массу перемешивали 1 ч при $-5\text{ }^{\circ}C$ и еще 19 ч при $+20\text{ }^{\circ}C$, упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 64,3 мг (55%) белого порошка, т.пл. 120-122 $^{\circ}C$. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): $R_f = 0,67$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 7,8$ мин. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,29 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,24 (с, 1H (NH карборанил)); 8,23 (т, $J = 5,7$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,01 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,18-6,56 (уш с, 2H ($N^{\omega}H$ Arg)); 6,56-6,12 (уш с, 1H ($N^{\omega}H$ Arg)); 5,06 (с, 2H (2CH карборанил)); 4,67 (дт, $J = 6,9, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,19 (дт, $J = 6,9, 6,7$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,72 (ддд, $J = 5,9, 17,0, 25,8$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,03 (дт, $J = 6,0, 6,0$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,97 (с, 2H (CH2 Pbf)); 2,80 (дд, $J = 6,1, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,9, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,6-1,2 (м, 10H (BH)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,43 (с, 3H (Me Pbf));

2,20 (т, $J = 7,7$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,14 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,01 (с, 3H (Me Pbf)); 1,77-1,67 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,67–1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,53-1,33 (м, 2H (H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6): 12,18 (с, 1C (Me Pbf)), 17,50 (с, 1C (Me Pbf)), 18,85 (с, 1C (Me Pbf)), 20,85 (с, 1C (C3 глутарил)), 25,41 (с, 1C (C4 Arg)), 28,23 (с, 2C (2Me Pbf)), 29,15 (с, 1C (C3 Arg)), 34,20 (с, 1C (C4 глутарил)), 35,90 (с, 1C (C2 глутарил)), 37,14 (с, 1C (C3 Asp)), 41,50 (с, 1C (CH₂ Pbf)), 41,59 (с, 1C (C2 Gly)), 42,43 (с, 1C (C5 Arg)), 48,32 (с, 1C (C2 Asp)), 52,10 (с, 1C (C2 Arg)), 52,18 (с, 1C (OMe Asp)), 52,31 (с, 1C (OMe Asp)), 157,06 (с, 2C (2C карборанил)), 86,21 (с, 1C (C Pbf)), 116,19 (с, 1C (Ar Pbf)), 124,23 (с, 1C (Ar Pbf)), 131,39 (с, 1C (Ar Pbf)), 134,14 (с, 1C (Ar Pbf)), 137,21 (с, 1C (Ar Pbf)), 155,99 (с, 1C (Ar Pbf)), 157,41 (с, 1C (C6 Arg)), 168,57 (с, 1C (CO Gly)), 168,70 (с, 1C (CO Asp)), 170,21 (с, 1C (CO Asp)), 170,89 (с, 1C (CO глутарил)), 171,97 (с, 1C (CO Arg)), 176,16 (с, 1C (CO глутарил)). ^{11}B ЯМР (160 МГц, ДМСО- d_6): -5,51 (4В); -10,69 (1В); -13,43 (2В); -15,0 (уш с, 3В). МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{B}_{10}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 882,5070; найдено: 882,5082.



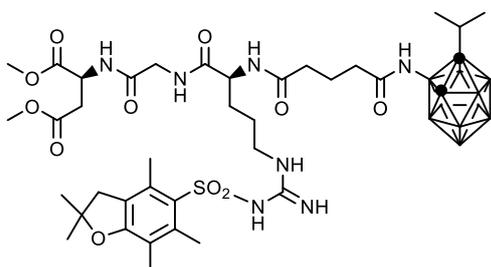
Диметилловый эфир 1-метил-2-дикарба-клозо-додекаборан-3-аминокарбонил- N^{α} -бутаноил-(N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (50). К раствору 59,6 мг (0,08 ммоль)

соединения **20** в 10 мл CH_2Cl_2 добавляли 18 мкл (0,16 ммоль) N-метилморфолина и 8 мкл (0,08 ммоль) этилхлорформиата при охлаждении до -5 °С, перемешивали 15 мин. Затем добавляли 13,9 мг (0,08 ммоль) соединения **46**, перемешивали 1 ч при -5 °С и еще 19 ч при $+20$ °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 34,7 мг (48%) белого порошка. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): $R_f = 0,7$ (проявление *o*-толидином в парах Cl_2). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 8,7$ мин. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 8,33 (с, 1H (NH карборанил)); 8,28 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,21 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,01 (д, $J = 7,3$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,20-6,53 (уш с, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 6,53-6,17 (уш с, 1H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 5,19 (с, 1H (CH карборанил)); 4,66 (дт, $J = 6,9, 7,0$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,18 (дт, $J = 6,0, 6,9$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,71 (ддд, $J = 5,8, 16,8, 28,2$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 6,0, 6,0$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,80 (дд, $J = 6,1, 16,6$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,72 (дд, $J = 6,9, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,6-1,2 (м, 9H (BH)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,27 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,15 (т, $J = 7,3$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,84 (с, 3H (Me карборанил)); 1,77-1,69 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,67–1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,51-1,33 (м, 2H (H4 Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{B}_{10}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 896,5226; найдено: 896,5231.



Диметилловый эфир 1-фенил-2-дикарба-клозо-додекаборан-3-аминокарбонил-*N*^α-бутаноил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (51). К раствору 98,8 мг (0,133 ммоль) соединения **20** в 10 мл CH₂Cl₂ добавляли при

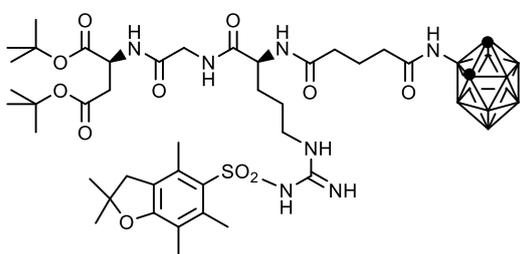
охлаждении (–5 °С) 29 мкл (0,266 ммоль) N-метилморфолина и 13 мкл (0,136 ммоль) этилхлорформиата, перемешивали 15 мин. Затем добавляли 31,4 мг (0,133 ммоль) соединения **47**, перемешивали 1 ч при –5 °С и еще 19 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 53,7 мг (40%) белого порошка. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): *R*_f = 0,8 (проявление *o*-толидином в парах Cl₂). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): τ = 13,7 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,29 (д, *J* = 7,8 Гц, 1H (NH Asp)); 8,20 (т, *J* = 5,9 Гц, 1H (NH Gly)); 8,08 (с, 1H (NH карборанил)); 7,85 (д, *J* = 7,3 Гц, 1H (NH Arg)); 7,48-7,31 (м, 5H (фенил)); 7,09-6,53 (уш с, 2H (N^ωH Arg)); 6,53-6,18 (уш с, 1H (N^ωH Arg)); 5,93 (с, 1H (CH карборанил)); 4,66 (дт, *J* = 7,0, 7,1 Гц, 1H (H₂ Asp)); 4,16 (дт, *J* = 6,5, 6,6 Гц, 1H (H₂ Arg)); 3,71 (ддд, *J* = 6,4, 17,9, 24,3 Гц, 2H (H₂ Gly)); 3,63 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,03 (дт, *J* = 6,0, 6,0 Гц, 2H (H₅ Arg)); 2,97 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,80 (дд, *J* = 6,1, 16,6 Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,71 (дд, *J* = 6,0, 16,6 Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,6-1,2 (м, 9H (BH)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,27 (т, *J* = 7,6 Гц, 2H (H₂ глутарил)); 2,16 (т, *J* = 7,8 Гц, 2H (H₄ глутарил)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,92-1,79 (м, 2H (H₃ глутарил)); 1,67–1,54 (м, 2H (H₃ Arg)); 1,51-1,31 (м, 2H (H₄ Arg)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)), МСВР (ESI-POS) вычислено для C₃₄H₅₉B₁₀N₇O₁₁S [M+H]⁺: 958,5383; найдено: 958,5390.



Диметилловый эфир 1-изопропил-2-дикарба-клозо-додекаборан-3-аминокарбонил-*N*^α-бутаноил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (52). К раствору 100,3 мг (0,135 ммоль) соединения **20** в 10 мл CH₂Cl₂ добавляли при охлаждении (–5 °С) 30 мкл (0,27 ммоль) N-

метилморфолина и 13 мкл (0,136 ммоль) этилхлорформиата, перемешивали 15 мин. Затем добавляли 27,3 мг (0,135 ммоль) соединения **48**, перемешивали 1 ч при –5 °С и еще 19 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 40,9 мг (33%) белого порошка. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): *R*_f = 0,8 (проявление *o*-толидином в парах Cl₂). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): τ = 12,6 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.):

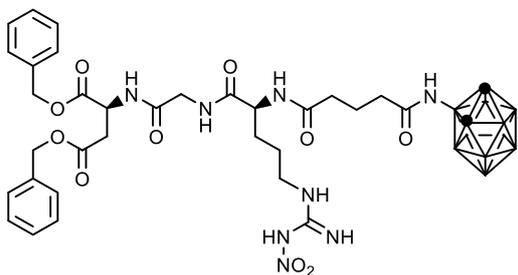
8,35 (с, 1H (NH карборанил)); 8,28 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,22 (т, $J = 5,9$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,02 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,21-6,54 (уш с, 2H (N^{OH} Arg)); 6,54-6,19 (уш с, 1H (N^{OH} Arg)); 5,09 (с, 1H (CH карборанил)); 4,66 (дт, $J = 7,1, 7,2$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,19 (дт, $J = 6,7, 6,7$ Гц, 1H (H2 Arg)); 3,71 (ддд, $J = 6,4, 14,1, 26,2$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,02 (дт, $J = 5,8, 5,6$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,80 (дд, $J = 6,2, 16,7$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,8, 16,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,6-1,2 (м, 9H (BH)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,24 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,18 (с, 1H (CH изопротил)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,77-1,67 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,67-1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,51-1,33 (м, 2H (H4 Arg)); 1,42 (с, 6H (2Me изопротил)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)). МСВР (ESI-POS) вычислено для C₃₇H₆₆B₁₀N₇O₁₁S [M+H]⁺: 924,5539; найдено: 924,5542.



**Ди-*tert*-бутиловый эфир 1,2-дикарба-
клозо-додекаборан-3-аминокарбонил-*N*^α-бутаноил-
(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-
сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой
кислоты (53).** К раствору 86,2 мг (0,105 ммоль)

соединения **21** в 5 мл CH₂Cl₂ добавляли при охлаждении (−5 °С) 23 мкл (0,21 ммоль) *N*-метилморфолина и 10 мкл (0,105 ммоль) этилхлорформиата, перемешивали 15 мин. Затем добавляли 27,3 мг (0,135 ммоль) соединения **48**, перемешивали 1 ч при −5 °С и еще 16 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 56,6 мг (56%) белого порошка, т.пл. 125–126 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 7:1): $R_f = 0,7$ (проявление *o*-толидином в парах Cl₂). $[\alpha]_D^{20} +5,5^\circ$ (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 7:3; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 24,0$ мин. ¹H ЯМР (CDCl₃, 500 МГц), δ (м.д.): 8,31 (с, 1H (NH карборанил)); 8,29 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,25 (т, $J = 5,9$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,01 (д, $J = 7,4$ Гц, 1H (NH Arg)); 7,12-6,58 (уш с, 2H (N^{OH} Arg)); 6,57-6,22 (уш с, 1H (N^{OH} Arg)); 4,72 (дт, $J = 6,5, 6,7$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,53 (дт, $J = 6,9, 6,6$ Гц, 1H (H2 Arg)); 4,48 (с, 2H (2CH карборанил)); 4,04 (д, $J = 4,6$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,26 (дт, $J = 5,6, 5,7$ Гц, 2H (H5 Arg)); 2,95 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,86 (дд, $J = 5,2, 17,2$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,70 (дд, $J = 4,3, 17,2$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,6-1,2 (м, 10H (BH)); 2,55 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (H2 глутарил)); 2,50 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H (H4 глутарил)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,34 (с, 3H (Me Pbf)); 2,08 (с, 3H (Me Pbf)); 2,04-1,83 (м, 2H (H3 глутарил)); 1,83-1,71 (м, 2H (H3 Arg)); 1,69-1,52 (м, 2H (H4 Arg)); 1,46 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,44 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,43 (с, 9H (OtBu Asp)). ¹³C ЯМР (125 МГц, DMSO-*d*₆): 12,18 (с, 1C (Me Pbf)), 17,50 (с, 1C (Me Pbf)), 18,85 (с, 1C (Me Pbf)), 20,85 (с, 1C (C3 глутарил)), 25,41 (с, 1C (C4 Arg)), 27,47 (с, 3C (OtBu Asp)), 27,61 (с, 3C (OtBu Asp)), 28,23 (с, 2C (2Me Pbf)), 29,15 (с, 1C (C3 Arg)), 34,20 (с, 1C (C4 глутарил)),

35,90 (с, 1C (C2 глутарил)), 37,14 (с, 1C (C3 Asp)), 40,10 (с, 1C (CH₂ Pbf)), 41,59 (с, 1C (C2 Gly)), 42,43 (с, 1C (C5 Arg)), 49,12 (с, 1C (C2 Asp)), 52,30 (с, 1C (C2 Arg)), 57,06 (с, 2C (2C карборанил)), 80,39 (с, 1C (OtBu Asp)), 80,95 (с, 1C (OtBu Asp)), 86,21 (с, 1C (C Pbf)), 116,19 (с, 1C (Ar Pbf)), 124,23 (с, 1C (Ar Pbf)), 131,39 (с, 1C (Ar Pbf)), 134,14 (с, 1C (Ar Pbf)), 137,21 (с, 1C (Ar Pbf)), 155,99 (с, 1C (Ar Pbf)), 157,41 (с, 1C (C6 Arg)), 168,53 (с, 1C (CO Gly)), 169,01 (с, 1C (CO Asp)), 169,47 (с, 1C (CO Asp)), 171,89 (с, 1C (CO глутарил)), 171,97 (с, 1C (CO Arg)), 176,16 (с, 1C (CO глутарил)). ¹¹B ЯМР (160 МГц, ДМСО-*d*₆): -5,52 (4В); -10,69 (1В); -13,46 (2В); -15,0 (уш с, 3В). Найдено, %: С, 49,65; Н, 7,30; N, 9,98. Вычислено, %: С, 49,72; Н, 7,41; В, 11,19; N, 10,15; O, 18,21; S, 3,32. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₄₀H₇₂B₁₀N₇O₁₁S [M+H]⁺: 966,6009; найдено: 966,6011.

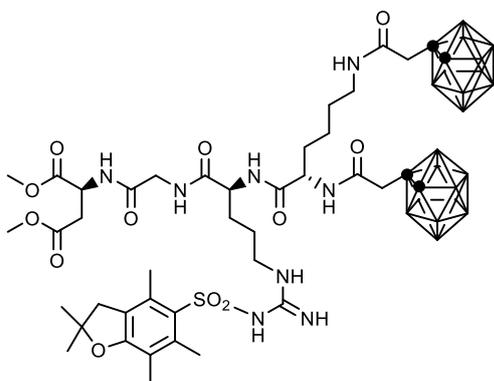


Дибензиловый эфир 1,2-дикарба-клозо-додекаборан-3-аминокарбонил-N^α-бутаноил-N^ω-нитро-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (54).

К раствору 240,7 мг (0,351 ммоль) соединения **22** в 10 мл CH₂Cl₂ добавляли при охлаждении (-5 °С) 77 мкл (0,7 ммоль) N-

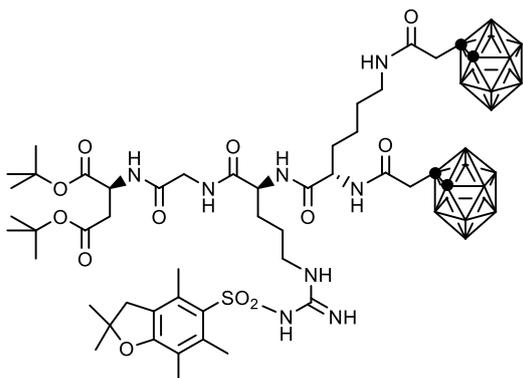
метилморфолина и 33 мкл (0,351 ммоль) этилхлорформиата, перемешивали 15 мин. Затем добавляли 55,9 мг (0,351 ммоль) соединения **45**, перемешивали 1 ч при -5 °С и еще 16 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ-этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 154,7 мг (53%) белого порошка, т.пл. 94–98 °С. ТСХ (хлороформ-этанол 7:1): R_f = 0,44 (проявление *o*-толидином в парах Cl₂). [α]_D²⁰ +2,0° (с 1,0, CHCl₃). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил – 0,06 М фосфатный буфер (рН = 7) 55:45; детектирование при 220 нм): τ = 20,9 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 8,50 (с, 1H (NH карборанил)); 8,41 (д, J = 8,0 Гц, 1H (NH Asp)); 8,23 (т, J = 7,2 Гц, 1H (NH Gly)); 8,01 (д, J = 7,5 Гц, 1H (NH Arg)); 8,11-7,62 (м, 3H (N^ωH Arg)); 7,38-7,30 (м, 10H (2OBn Asp)); 5,09 (с, 2H (OBn Asp)); 5,07 (с, 2H (OBn Asp)); 5,05 (с, 2H (2CH карборанил)); 4,76 (дт, J = 7,0, 7,2 Гц, 1H (H₂ Asp)); 4,22 (дт, J = 6,5, 6,8 Гц, 1H (H₂ Arg)); 3,74 (ддд, J = 5,4, 14,0, 23,9 Гц, 2H (H₂ Gly)); 3,17-3,10 (уш с, 2H (H₅ Arg)); 2,90 (дд, J = 6,3, 16,6 Гц, 1H (H₃-A Asp)); 2,81 (дд, J = 6,9, 16,6 Гц, 1H (H₃-B Asp)); 2,6-1,3 (м, 10H (BH)); 2,21-2,12 (м, 4H (H₂, H₄ глутарил)), 1,75-1,67 (м, 4H (H₃ глутарил, H₃ Arg)), 1,54-1,46 (м, 2H, (H₄ Arg)). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆): 20,86 (с, 1C (C3 глутарил)), 24,67 (с, 1C (C4 Arg)), 29,00 (с, 1C (C3 Arg)), 32,85 (с, 1C (C4 глутарил)), 34,24 (с, 1C (C2 глутарил)), 35,76 (с, 1C (C3 Asp)), 40,20 (с, 1C (C5 Arg)), 41,55 (с, 1C (C2 Gly)), 48,51 (с, 1C (C2 Asp)), 52,24 (с, 1C (C2 Arg)), 57,06 (с, 2C (2C карборанил)), 65,85 (с, 1C (OBn Asp)), 66,26 (с, 1C (OBn Asp)), 127,62 (с, 2C (OBn Asp)), 127,83 (с, 2C (OBn Asp)), 127,95 (с, 1C (OBn Asp)), 127,97 (с, 1C (OBn Asp)), 128,34 (с, 4C (OBn Asp)), 135,62 (с, 1C (OBn

Asp)), 135,75 (с, 1C (OBn Asp)), 159,24 (с, 1C (C6 Arg)), 168,76 (с, 1C (CO Gly)), 169,65 (с, 1C (CO Asp)), 170,23 (с, 1C (CO Asp)), 171,88 (с, 1C (CO глутарил)), 172,07 (с, 1C (CO Arg)), 176,18 (с, 1C (CO глутарил)). ^{11}B ЯМР (160 МГц, ДМСО-*d*6): $-5,51$ (4В); $-10,67$ (1В); $-13,42$ (2В); $-15,0$ (уш с, 3В). Найдено, %: С, 48,78; Н, 6,15; N, 13,29. Вычислено, %: С, 47,93; Н, 6,09; В, 13,07; N, 13,55; O, 19,35. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{B}_{10}\text{N}_8\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 827,4726; найдено: 827,4734.



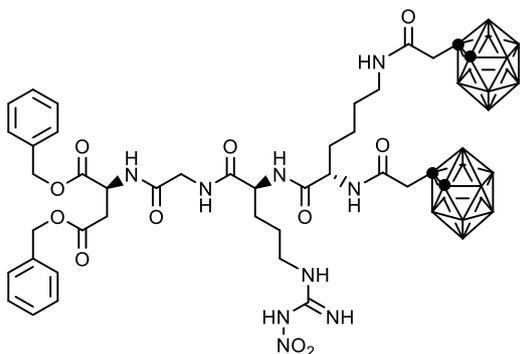
Диметиловый эфир (N^{α}, N^{ϵ} -ди(1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-1-ацетил))-L-лизил-(N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (58). К раствору 499,5 мг (0,797 ммоль) соединения **17**, 410,2 мг (0,797 ммоль) соединения **57**, 255,9 мг (0,797 ммоль) ТВТУ в 15 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли 278 мкл (1,594 ммоль) DIPEA, перемешивали 20 ч при $+20$ °С.

Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 582,8 мг (65%) белого порошка, т.пл. $157\text{--}158$ °С. ТСХ (хлороформ–этанол 10:1): $R_f = 0,8$ (проявление в парах I_2). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -1,1^{\circ}$ (с 1,0, CHCl_3). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода 1:1; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 25,1$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 8,38 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,33 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,24-8,18 (м, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Lys, NH Gly)); 8,14 (т, $J = 6,0$ Гц, 1H ($N^{\epsilon}\text{H}$ Lys)); 7,11-6,53 (уш с, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 6,53-6,22 (уш с, 1H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 5,12 (с, 1H (CH карборанил)); 5,05 (с, 1H (CH карборанил)); 4,63 (дт, $J = 7,1, 7,3$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,28-4,20 (м, 2H (H2 Arg, H2 Lys)); 3,73 (ддд, $J = 5,8, 15,5, 24,6$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,62 (с, 3H (OMe Asp)); 3,60 (с, 3H (OMe Asp)); 3,17 (дд, $J = 7,9, 20,4$ Гц, 2H (CH₂ карборанил)); 3,09 (с, 2H (CH₂ карборанил)); 3,05-2,97 (м, 4H (H5 Arg, H6 Lys)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,78 (дд, $J = 5,6, 10,9$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,71 (дд, $J = 6,0, 10,5$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,7-1,5 (м, 20H (20BH)); 2,48 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,70-1,58 (м, 4H (H3 Arg, H3 Lys)); 1,54-1,43 (м, 4H (H4 Arg, H5 Lys)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,40-1,34 (м, 2H (H4 Lys)). Найдено, %: С, 43,64; Н, 6,89; N, 9,88. Вычислено, %: С, 43,84; Н, 7,00; В, 19,25; N, 9,97; O, 17,09; S, 2,85. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{41}\text{H}_{79}\text{B}_{20}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1123,7540; найдено: 1123,7545.



Ди-трет-бутиловый эфир (N^{α}, N^{ϵ} -ди(1,2-дикарба-κ-озо-додекаборан-1-ацетил))-L-лизил- (N^{ω} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (59). К раствору 641,9 мг (0,903 ммоль) соединения **18**, 464,7 мг (0,903 ммоль) соединения **57**, 289,9 мг (0,903 ммоль) ТВТУ в 15 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли 315 мкл (1,806 ммоль) DIPEA.

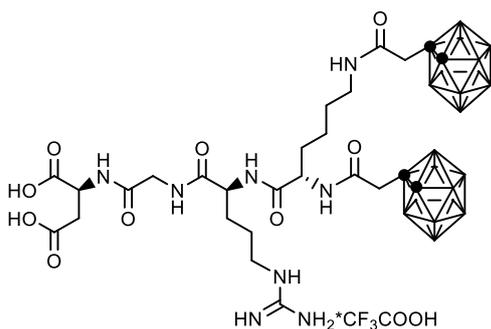
Реакционную массу перемешивали 20 ч при +20 °С, упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 678,2 мг (62%) белого порошка, т.пл. 151–152 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 20:1): $R_f = 0,5$ (проявление в парах I_2). $[\alpha]_D^{20} -0,7^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода 1:1; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 27,8$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, $\text{DMSO-}d_6$), δ (м.д.): 8,42 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,26 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,24–8,17 (м, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Lys, NH Gly)); 8,12 (т, $J = 5,8$ Гц, 1H ($N^{\epsilon}\text{H}$ Lys)); 7,10–6,52 (уш с, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 6,52–6,24 (уш с, 1H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 5,11 (с, 1H (CH карборанил)); 5,06 (с, 1H (CH карборанил)); 4,49 (дт, $J = 6,5, 6,5$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,28–4,20 (м, 2H (H2 Arg, H2 Lys)); 3,73 (ддд, $J = 5,6, 14,6, 25,5$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,19 (дд, $J = 14,6, 25,4$ Гц, 2H (CH₂ карборанил)); 3,09 (с, 2H (CH₂ карборанил)); 3,05–2,97 (м, 4H (H5 Arg, H6 Lys)); 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)); 2,63 (дд, $J = 6,1, 16,2$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,54 (дд, $J = 5,5, 15,0$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,7–1,5 (м, 20H (20BH)); 2,47 (с, 3H (Me Pbf)); 2,42 (с, 3H (Me Pbf)); 2,00 (с, 3H (Me Pbf)); 1,72–1,57 (м, 4H (H3 Arg, H3 Lys)); 1,55–1,43 (м, 4H (H4 Arg, H5 Lys)); 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)); 1,39 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,38 (с, 9H (OtBu Asp)); 1,31–1,20 (м, 2H (H4 Lys)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 17,50 (с, 1C), 18,85 (с, 1C), 22,52 (с, 1C), 25,27 (с, 1C), 27,47 (3C), 27,61 (3C), 28,23 (3C), 29,28 (с, 1C), 30,59 (с, 1C), 31,40 (с, 1C), 37,19 (с, 1C), 38,56 (с, 1C), 41,50 (с, 1C), 41,78 (с, 1C), 42,16 (с, 1C), 42,44 (с, 1C), 49,16 (с, 1C), 52,07 (с, 1C), 52,62 (с, 1C), 61,11 (с, 1C), 61,15 (с, 1C), 71,28 (с, 1C), 71,41 (с, 1C), 80,41 (с, 1C), 80,97 (с, 1C), 86,19 (с, 1C), 116,18 (с, 1C), 124,22 (с, 1C), 131,38 (с, 1C), 134,16 (с, 1C), 137,20 (с, 1C), 156,00 (с, 1C), 157,40 (с, 1C), 165,40 (с, 1C), 165,63 (с, 1C), 168,35 (с, 1C), 169,03 (с, 1C), 169,48 (с, 1C), 171,07 (с, 1C), 171,42 (с, 1C). ^{11}B ЯМР (160 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): –3,15 (2B); –6,0 (2B); –9,0...–15,0 (уш с, 16B). Найдено, %: С 46,59, Н 7,50, N 9,01. Вычислено, %: С 46,75, Н 7,51, N 9,28. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{47}\text{H}_{91}\text{B}_{20}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1207,8479; найдено: 1207,8478.



Дибензиловый эфир (N^{α}, N^{ϵ} -ди(1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-1-ацетил))-L-лизил-(N^{ω} -нитро)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (60).

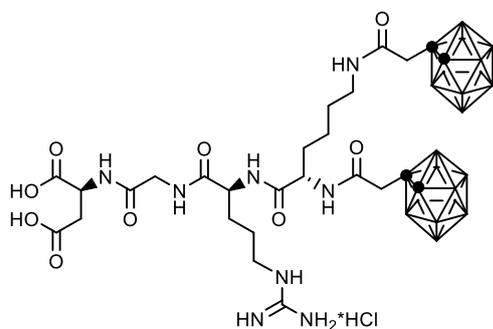
К раствору 341,7 мг (0,427 ммоль) соединения **19**, 219,9 мг (0,427 ммоль) соединения **57**, 137,1 мг (0,427 ммоль) ТВТУ в 15 мл сухого CH_2Cl_2 добавляли 94 мкл (0,855 ммоль) DIPEA. Реакционную массу

перемешивали 20 ч при +20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 80:20). Получали 291,9 мг (64%) белого порошка, т.пл. 113–115 °С. ТСХ (хлороформ–этанол 9:1): $R_f = 0,7$ (проявление в парах I_2). $[\alpha]_D^{20} -8,4^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 1:1; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 7,0$ мин. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6), δ (м.д.): 8,46 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,40 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,21 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H (NH Gly)); 8,18-8,13 (м, 2H ($N^{\alpha}\text{H}$ Lys, $N^{\epsilon}\text{H}$ Lys)); 8,09-7,58 (уш с, 2H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 7,38-7,30 (м, 10H (2OBn Asp)); 7,08-6,80 (уш с, 1H ($N^{\omega}\text{H}$ Arg)); 5,12 (с, 1H (CH карборанил)); 5,09 (с, 2H (OBn Asp)); 5,07 (с, 2H (OBn Asp)); 5,06 (с, 1H (CH карборанил)); 4,78 (дт, $J = 7,1, 7,2$ Гц, 1H (H2 Arg)); 4,23 (дт, $J = 7,4, 6,9$ Гц, 1H (H2 Lys)); 3,75 (ддд, $J = 4,4, 17,0, 23,6$ Гц, 2H (H2 Gly)); 3,19 (дд, $J = 14,5, 29,0$ Гц, 2H (CH₂ карборанил)); 3,09 (с, 2H (CH₂ карборанил)); 3,16-3,10 (м, 2H (H5 Arg)); 3,00 (дт, $J = 6,1, 6,2$ Гц, 1H (H6 Lys)); 2,90 (дд, $J = 6,4, 16,8$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,80 (дд, $J = 6,8, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,7-1,5 (м, 20H (20BH)); 1,75–1,58 (м, 2H (H3 Arg)); 1,58-1,44 (м, 4H (H3 Lys, H4 Arg)); 1,42-1,34 (м, 2H (H5 Lys)); 1,32-1,20 (м, 2H (H4 Lys)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6): 22,58 (с, 1C), 24,54 (с, 1C), 28,27 (с, 1C), 29,14 (с, 1C), 31,27 (с, 1C), 35,79 (с, 1C), 38,58 (с, 1C), 40,16 (с, 1C), 41,49 (с, 1C), 41,88 (с, 1C), 42,15 (с, 1C), 48,53 (с, 1C), 52,11 (с, 1C), 52,45 (с, 1C), 54,22 (с, 1C), 61,11 (с, 1C), 61,17 (с, 1C), 65,86 (с, 1C), 66,28 (с, 1C), 71,35 (с, 1C), 71,43 (с, 1C), 127,62 (с, 2C), 127,85 (с, 2C), 127,97 (с, 1C), 127,99 (с, 1C), 128,35 (4C), 135,61 (с, 1C), 135,74 (с, 1C), 165,39 (с, 1C), 165,54 (с, 1C), 168,65 (с, 1C), 169,68 (с, 1C), 170,23 (с, 1C), 171,18 (с, 1C), 171,48 (с, 1C). ^{11}B ЯМР (160 МГц, ДМСО- d_6): -3,14 (2B); -5,98 (2B); -9,0...-15,0 (уш с, 16B). Найдено, %: С 44,86, Н 6,59, N 11,66. Вычислено, %: С 44,97, Н 6,51, N 11,80. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{B}_{20}\text{N}_9\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1068,7196; найдено: 1068,7220.



(N^{α}, N^{ϵ} -Ди(1,2-дикарба-*клозо*-додекаборан-1-ацетил))-L-лизил-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновая кислота трифторацетат (61). Раствор 467,5 мг (0,387 ммоль) соединения **59** в 5 мл 95% TFA выдерживали 4 ч при +20 °С, затем осаждали сухим Et_2O , осадок промывали сухим Et_2O . Получали 351,8 мг

(95%) белого порошка, т.пл. 160–162 °С. ТСХ (этанол–вода 9:1): $R_f = 0,55$ (проявление в парах I_2). $[\alpha]_D^{20} +2,4^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода:трифторуксусная кислота 50:49,9:0,1; детектирование при 220 нм): $\tau = 25,2$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 12,4–11,5 (уш с, 2H (2COOH Asp)); 8,47 (д, $J = 7,5$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,29 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,31–8,15 (м, 3H ($N^{\alpha}H$ Lys, NH Gly, $N^{\epsilon}H$ Lys)); 7,96–7,65 (уш с, 1H ($N^{\omega}H^+$ Arg)); 7,41–6,68 (уш с, 4H ($N^{\omega}H^+$ Arg)); 5,13 (с, 1H (CH карборанил)); 5,08 (с, 1H (CH карборанил)); 4,74 (дт, $J = 6,7, 6,8$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,30–4,20 (м, 2H (H2 Arg, H2 Lys)); 3,79 (дд, $J = 6,1, 16,9$ Гц, 1H (H2-A Gly)); 3,68 (дд, $J = 5,5, 17,2$ Гц, 1H (H2-B Gly)); 3,25 (д, $J = 14,7$ Гц, 1H (CH-A карборанил)); 3,17 (д, $J = 14,7$ Гц, 1H (CH-B карборанил)); 3,10 (с, 2H (CH2 карборанил)); 3,09–2,97 (м, 4H (H5 Arg, H6 Lys)); 2,62 (дд, $J = 5,9, 16,3$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,57 (дд, $J = 6,1, 16,6$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,7–1,5 (м, 20H (20BH)); 1,67–1,57 (м, 2H (H3 Arg)); 1,58–1,44 (м, 4H (H3 Lys, H4 Arg)); 1,43–1,36 (м, 2H (H5 Lys)); 1,32–1,20 (м, 2H (H4 Lys)). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*6): 22,52 (с, 1C), 24,77 (с, 1C), 28,19 (с, 1C), 29,19 (с, 1C), 31,35 (с, 1C), 36,50 (с, 1C), 38,51 (с, 1C), 40,41 (с, 1C), 41,58 (с, 1C), 41,84 (с, 1C), 42,22 (с, 1C), 48,58 (с, 1C), 52,12 (с, 1C), 52,73 (с, 1C), 61,29 (с, 2C), 71,37 (с, 1C), 71,49 (с, 1C), 156,69 (с, 1C), 165,45 (с, 1C), 165,68 (с, 1C), 168,27 (с, 1C), 171,20 (с, 1C), 171,42 (с, 1C), 171,88 (с, 1C), 172,34 (с, 1C). ^{11}B ЯМР (160 МГц, ДМСО-*d*6): –3,15 (2B); –6,03 (2B); –9,0...–15,0 (уш с, 16B). Найдено, %: С, 34,98; Н, 6,38; N, 11,57. Вычислено, %: С, 35,14; Н, 6,21; N, 11,71. МСВР (ESI-POS) вычислено для $C_{26}H_{59}B_{20}N_8O_9$ $[M+H]^+$: 843,6406; найдено: 843,6403.

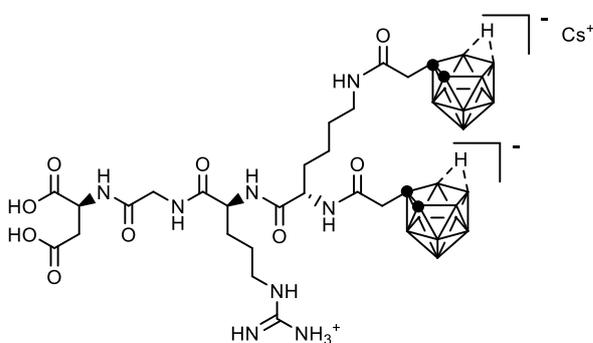


(N^{α}, N^{ϵ} -Ди(1,2-дикарба-клозо-додекаборан-1-ацетил))-L-лизил-L-аргинил-глицил-L-

аспарагиновая кислота гидрохлорид (62). К раствору 387 мг (0,362 ммоль) соединения **60** в 20 мл EtOH, добавили 38,7 мг катализатора Pd/C 10% (10 мас.%), 55 мкл конц. HCl (0,543 ммоль) перемешивали 10 ч при температуре +20 °С и давлении 15 Бар в атмосфере H_2 .

Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (этанол–вода, от 100:0 до 50:50). Получали 188,3 мг (59%) белого порошка, т.пл. 177–179 °С. ТСХ (этанол–вода 9:1): $R_f = 0,55$ (проявление в парах I_2). $[\alpha]_D^{20} +1^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–трифторуксусная кислота 50:49,9:0,1; детектирование при 220 нм): $\tau = 25,3$ мин. 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*6), δ (м.д.): 12,4–11,5 (уш с, 2H (2COOH Asp)); 8,48 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H (NH Asp)); 8,28 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H (NH Arg)); 8,31–8,15 (м, 3H ($N^{\alpha}H$ Lys, NH Gly, $N^{\epsilon}H$ Lys)); 7,96–7,65 (уш с, 1H ($N^{\omega}H^+$ Arg)); 7,41–6,67 (уш с, 4H ($N^{\omega}H^+$ Arg)); 5,12 (с, 1H (CH карборанил)); 5,07 (с, 1H (CH карборанил)); 4,73 (дт, $J = 6,7, 6,9$ Гц, 1H (H2 Asp)); 4,30–4,20 (м, 2H (H2 Arg, H2 Lys)); 3,79 (дд, $J = 6,2, 17,0$ Гц, 1H (H2-A Gly)); 3,68 (дд, $J = 5,9, 17,2$ Гц, 1H

(H2-B Gly)); 3,25 (д, $J = 14,5$ Гц, 1H (CH-A карборанил)); 3,17 (д, $J = 14,6$ Гц, 1H (CH-B карборанил)); 3,10 (с, 2H (CH₂ карборанил)); 3,10-2,97 (м, 4H (H5 Arg, H6 Lys)); 2,62 (дд, $J = 6,0, 16,1$ Гц, 1H (H3-A Asp)); 2,57 (дд, $J = 6,1, 16,2$ Гц, 1H (H3-B Asp)); 2,7-1,5 (м, 20H (20BH)); 1,79–1,70 (м, 1H (H3-A Arg)); 1,66–1,58 (м, 1H (H3-B Arg)); 1,57-1,44 (м, 4H (H3 Lys, H4 Arg)); 1,43-1,36 (м, 2H (H5 Lys)); 1,32-1,20 (м, 2H (H4 Lys)). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆): 23,03 (с, 1C), 25,28 (с, 1C), 28,68 (с, 1C), 30,26 (с, 1C), 31,73 (с, 1C), 34,96 (с, 1C), 37,93 (с, 1C), 40,97 (с, 1C), 42,31 (с, 1C), 42,53 (с, 1C), 42,63 (с, 1C), 49,49 (уш с, 1C), 52,62 (с, 1C), 53,17 (с, 1C), 61,89 (с, 2C), 71,99 (с, 1C), 72,13 (с, 1C), 157,63 (с, 1C), 165,98 (с, 1C), 166,14 (с, 1C), 168,42 (с, 1C), 170,08 (с, 1C), 171,72 (с, 1C), 172,26 (с, 1C), 174,15 (с, 1C). ¹¹B ЯМР (193 МГц, ДМСО-*d*₆): -3,01 (2B); -5,94 (2B); -9,0...-15,0 (уш с, 16B). Найдено, %: С, 35,14; Н, 7,02; N, 11,95. Вычислено, %: С, 35,51; Н, 6,76; N, 12,74. МСВР (ESI-POS) вычислено для C₂₆H₅₉B₂₀N₈O₉ [M+H]⁺: 843,6406; найдено: 843,6402.



(N^α,N^ε-Ди(1,2-дикарба-нидо-

ундекаборан-1-ацетил))-L-лизил-L-аргинил-

глицил-L-аспарагиновой кислоты цезиевая

соль (63). Раствор 205,4 мг (0,215 ммоль)

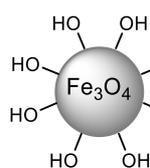
соединения **61**, 195,6 мг (1,288 ммоль) CsF в 15

мл EtOH кипятили в течении 15 ч. Затем

реакционную массу перемешивали с катионитом

Amberlite IRC-120 в течение 10 ч при температуре +20 °С. Ионообменную смолу отфильтровывали, фильтрат очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 0:100). Получали 136,9 мг (78%) белого порошка, т.пл. 179–181 °С. ТСХ (этанол–уксусная кислота 40:1): $R_f = 0,7$ (проявление в парах I₂). $[\alpha]_D^{20} -2^\circ$ (с 1,0, EtOH). ВЭЖХ (Phenomenex Luna C18(2); ацетонитрил–вода–трифторуксусная кислота 50:49,9:0,1; детектирование при 210, 220 нм): $\tau = 6,4$ мин (диастереомер 1), 6,6 мин (диастереомер 2). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь диастереомеров), δ (м.д.): 8,26-7,93 (м, 3H (N^αH Lys, NH Asp, NH Arg)); 7,57-7,36 (м, 1H (N^αH Arg, NH Gly, N^εH Lys)); 7,34-6,52 (уш с, 7H (N^αH⁺ Arg, 2COOH Asp, H⁺ карборанил)); 4,54 (дт, $J = 6,5, 6,5$ Гц, 1H (H2 Asp диастереомер 1)); 4,53 (дт, $J = 6,5, 6,5$ Гц, 1H (H2 Asp диастереомер 2)); 4,32-4,16 (м, 2H (H2 Arg, H2 Lys)); 3,84-3,66 (м, 2H (H2 Gly)); 3,15-3,08 (м, 2H (H5 Arg)); 3,04-2,96 (м, 2H (H6 Lys)); 2,71-2,63 (м, 1H (H3-A Asp)); 2,62-2,53 (м, 1H (H3-B Asp)); 2,5-0,5 (м, 18H (18BH)); 2,46-2,36 (м, 2H (CH₂ карборанил)); 2,19-2,02 (м, 2H (CH₂ карборанил)); 1,84 (с, 1H (CH карборанил)); 1,85 (с, 1H (CH карборанил)); 1,81–1,70 (м, 1H (H3-A Arg)); 1,68–1,60 (м, 1H (H3-B Arg)); 1,59-1,45 (м, 4H (H3 Lys, H4 Arg)); 1,43-1,34 (м, 2H (H5 Lys)); 1,34-1,24 (м, 2H (H4 Lys)); -2,45...-2,97 (уш с, 2H (2BHВ)). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь диастереомеров): 23,07 и 23,12 (1C), 23,24 и 23,27 (1C), 25,34 (с, 1C), 25,50 и

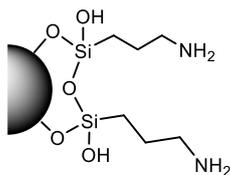
25,54 (1C), 29,36–29,53 (м, 2C), 32,05 и 32,25 (1C), 36,48 и 36,52 (1C), 38,91 (с, 1C), 40,85 (с, 1C), 42,03 и 42,13 (1C), 45,73 (с, 1C), 46,68 (уш с, 2C), 48,95 и 48,99 (1C), 52,46 и 52,61 (1C), 52,99 и 53,01 и 53,14 и 53,29 (1C), 55,25 (уш с, 2C), 157,06 (с, 1C), 168,96 и 169,00 (1C), 171,63 и 171,68 (1C), 171,82 и 171,92 (1C), 172,09 (с, 1C), 172,40 и 172,52 (1C), 172,71 (с, 1C). ^{11}B ЯМР (193 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь диастереомеров): – 10,45 (4В), – 14,09 (2В), – 16,97 (2В), – 17,68 (2В), – 18,50 (2В), – 21,74 (2В), – 33,00 (2В), – 38,63 (2В). Найдено, %: С 32,43, Н 6,61, N 11,20, В 20,23. Вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{59}\text{V}_{18}\text{CsN}_8\text{O}_9 \times \text{H}_2\text{O}$, %: С 32,09, Н 6,32, N 11,51, В 19,99. МСВР (ESI-POS) вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{61}\text{V}_{18}\text{N}_8\text{O}_9 [\text{M}^{2-} + 3\text{H}^+]^+$: 824,6340; найдено: 824,6334.



МНЧ на основе Fe_3O_4 (64). К раствору 600,4 мг (2,16 ммоль)

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 1167,4 мг (4,32 ммоль) $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в 50 мл деионизованной воды добавляли 5 мл 25%-ного водного раствора NH_4OH , перемешивали 10 мин при 40 °С и сонификации (35 кГц, 100 Вт). Затем осаждали МНЧ на

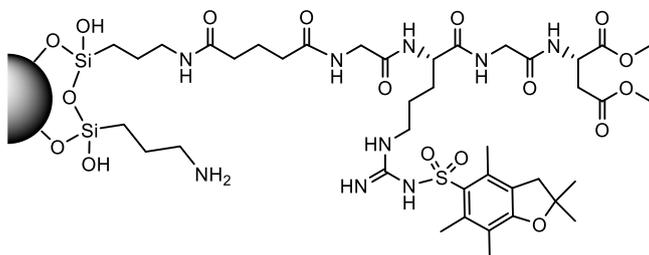
постоянном Nd-Fe-B магните, промывали деионизованной водой до нейтрального pH. Суспендировали в деионизованной воде, получали 50 мл коллоидного раствора МНЧ **64** с концентрацией 10,6 мг/мл.



МНЧ на основе Fe_3O_4 , функционализированные APS (65). К

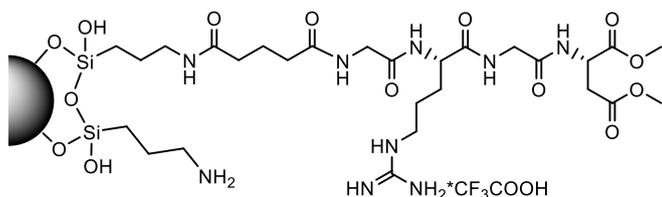
коллоидному раствору 350,9 мг (1,516 ммоль) МНЧ **64** в 90 мл 70% этанола добавляли раствор 185 мкл (1,053 ммоль) АРТМС в 10 мл 95% этанола (из расчета 3 ммоль АРТМС на 1 г МНЧ), затем прикапывали

1,8 мл 25%-ного водного раствора NH_4OH в течение 10 мин при 40 °С, перемешивании и сонификации (35 кГц, 100 Вт). Реакционную массу перемешивали 4 ч при 40 °С и еще 16 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на постоянном Nd-Fe-B магните, промывали этанолом 2×30 мл, деионизованной водой 3×30 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали 41 мл коллоидного раствора МНЧ **65** с концентрацией 9,45 мг/мл.



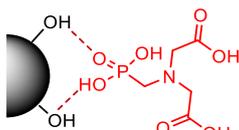
МНЧ на основе Fe_3O_4 , функционализированные APS и пептидом **29 (66).** К коллоидному раствору 60 мг МНЧ **65** в 10 мл сухого ацетонитрила добавляли раствор 3,7 мг

(1,1 ммоль) ТВТУ, 10,1 мг (1,1 ммоль) соединения **29**, 4 мкл (1,1 ммоль) DIPEA в 10 мл сухого ацетонитрила, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 18 ч при 20 °С. Затем осаждали МНЧ на постоянном Nd-Fe-B магните, промывали ацетонитрилом 2×10 мл, деионизованной водой 2×10 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали 15 мл коллоидного раствора МНЧ **66** с концентрацией 4,4 мг/мл.



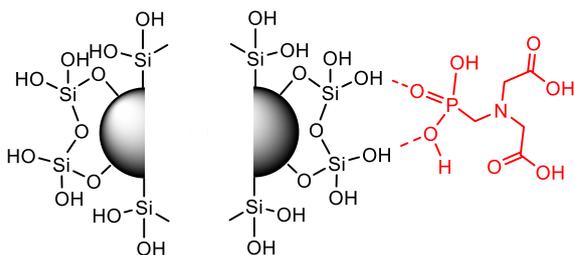
МНЧ на основе Fe_3O_4 , функционализированные APS и глутарил-GRGD-пептидом (67).

Коллоидный раствор 49,5 мг МНЧ **66** в 5 мл ТФА– H_2O (95:5) обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин и перемешивали еще 20 мин при 20 °С. Затем осаждали МНЧ на постоянном Nd-Fe-B магните, промывали метанолом 3×5 мл. Коллоидный раствор упаривали, сушили. Получали 33,6 мг черного порошка МНЧ **67**.



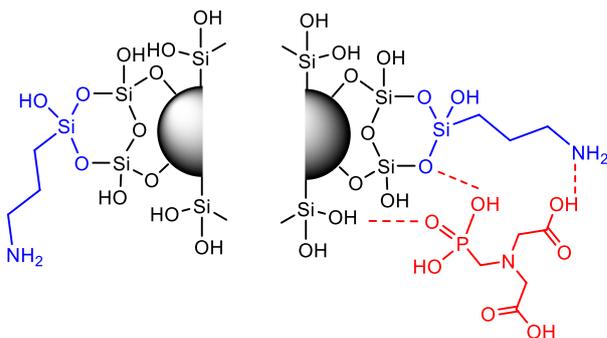
МНЧ на основе Fe_3O_4 , стабилизированные PMIDA (68). К коллоидному раствору 485 мг (2,09 ммоль) МНЧ **64** в 75 мл деионизованной воды добавляли раствор 0,357 мг (1,57 ммоль)

PMIDA× H_2O в 75 мл деионизованной воды, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 20 мин, перемешивали 4 ч при 40 °С и еще 16 ч при 20 °С. Затем осаждали МНЧ на центрифуге (30000 g, 20 мин), промывали деионизованной водой 3×50 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали 67 мл коллоидного раствора МНЧ **68** с концентрацией 7,8 мг/мл.



МНЧ на основе Fe_3O_4 , покрытые оболочкой SiO_2 (69-71) и МНЧ на основе Fe_3O_4 , стабилизированные PMIDA, покрытые оболочкой SiO_2 (72-74) (общая методика). К коллоидному раствору 450 мг МНЧ **65** или **68** в

150 мл 70% этанола добавляли раствор TMOS в 10 мл 95% этанола, взятого в мольном избытке 1.5, 3.0, 5.0 (650, 1300, 2170 мкл соответственно) в расчете на Fe_3O_4 . Затем прикапывали 5 мл 25%-ного водного раствора NH_4OH в течение 20 мин при 40 °С, перемешивании и сонификации (35 кГц, 100 Вт). Реакционную массу перемешивали 4 ч при 40 °С и еще 16 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (40000 g, 30 мин), промывали деионизованной водой 3×60 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (69-74).

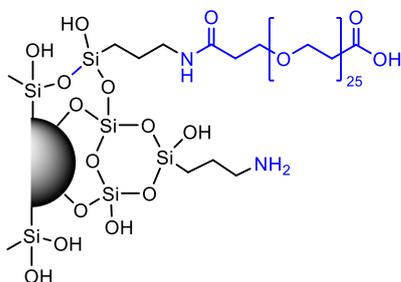


МНЧ на основе Fe_3O_4 , покрытые оболочкой SiO_2 , функционализированные APS (75-77) и МНЧ на основе Fe_3O_4 , стабилизированные PMIDA, покрытые оболочкой SiO_2 , функционализированные APS (78-80) (общая методика). К коллоидному раствору 450 мг МНЧ **69-71** или **72-74** в 150 мл

70% этанола добавляли раствор 235 мкл (1,335 ммоль) АРТМС в 20 мл 95% этанола (из расчета

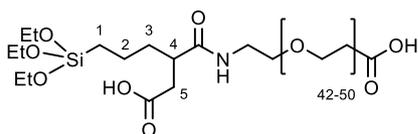
3 ммоль АРТМС на 1 г МНЧ). Затем прикапывали 5 мл 25%-ного водного раствора NH_4OH в течение 20 мин при 40 °С, перемешивании и сонификации (35 кГц, 100 Вт). Реакционную массу перемешивали 4 ч при 40 °С и еще 16 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на постоянном магните, промывали деионизованной водой 3×60 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (75-80).

МНЧ на основе Fe_3O_4 , покрытые оболочкой SiO_2 , загруженные Dox (81-92) (общая методика). К коллоидному раствору 100 мг МНЧ 81-92 в 50 мл деионизованной воды добавляли раствор 100 мг Dox в 50 мл деионизованной воды, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 24 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (20000 g, 30 мин), промывали 20 мл деионизованной воды. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (81-92).



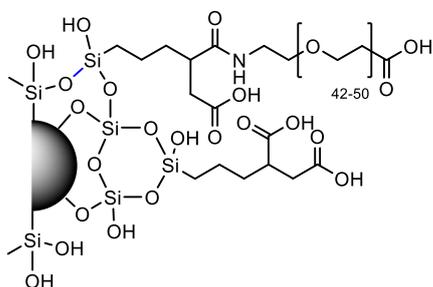
МНЧ на основе Fe_3O_4 , покрытые оболочкой SiO_2 , функционализированные APS, PEG (94а-в) (общая методика). К коллоидному раствору 100 мг МНЧ 75 в 20 мл сухого ацетонитрила добавляли 10 мл раствора PEG 93, взятого в массовом соотношении PEG к МНЧ 1:2 (94а), 1:10 (94б), 1:50 (94в), в сухом ацетонитриле, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 24 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (30000 g, 10 мин), промывали деионизованной водой 3×20 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (94а-в).

МНЧ на основе Fe_3O_4 , покрытые оболочкой SiO_2 , функционализированные APS, PEG, загруженные Dox (95а-в) (общая методика). К коллоидному раствору 50 мг МНЧ (94а-в) в 50 мл фосфатного буфера 1% (рН 7,4) добавляли раствор 50 мг Dox в 50 мл фосфатного буфера 1% (рН 7,4), обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 30 мин при 50 °С и еще 20 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (25000 g, 10 мин), промывали 20 мл деионизованной воды. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (95а-в).



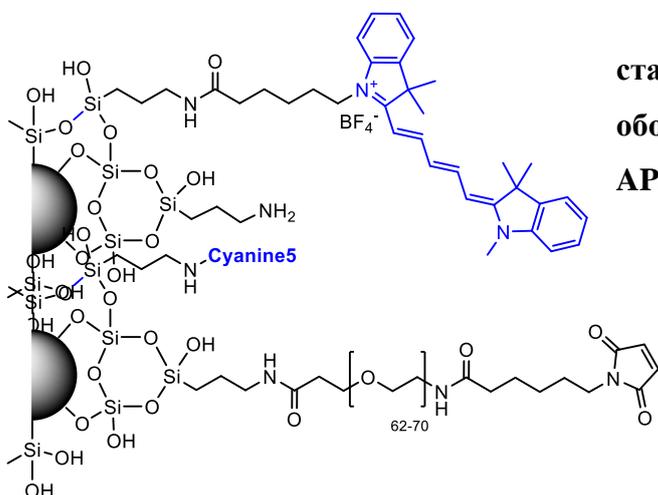
O-(2-амино-(3-этоксисилилпропилсукцинил))-O'-(2-карбоксиэтил)полиэтиленгликоль (97). К раствору 100 мг (0,033 ммоль) соединения 41 в 3 мл сухого ДМСО-d6 добавляли 92 мкл (0,333 ммоль) соединения 96, перемешивали, выдерживали 1 ч при 20 °С. Полученный продукт без выделения использовали в дальнейшем синтезе. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d6) (для 41 и 96 взятых эквимольно), δ (м.д.): 12,5–11,8 (уш с, 1H (COOH PEG)); 8,0–7,7 (уш с, 1H (COOH силан)); 6,3–5,5 (уш с, 1H (NH)); 3,74 (к, $J = 7,1$ Гц, 6H (3CH₂ OEt)); 3,56–3,45 (м, 190H (PEG)); 3,26–3,16 (м, 1H (H4 силан)); 3,02 (дд, $J = 9,9, 18,3$ Гц, 1H (H5-A силан));

2,97 (дт, $J = 5,5, 5,5$ Гц, 2H (N-CH₂ PEG)); 2,71 (дд, $J = 6,6, 18,2$ Гц, 1H (H5-B силан)); 2,44 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H (CO-CH₂ PEG)); 1,82–1,72 (м, 1H (H3-A силан)); 1,65–1,56 (м, 1H (H3-B силан)); 1,43–1,34 (м, 2H (H2 силан)); 1,15 (т, $J = 7,0$ Гц, 9H (3CH₃ OEt)); 0,63–0,50 (м, 2H (H1 силан)).



МНЧ на основе Fe₃O₄, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные SAPS, PEG (98а-в) (общая методика). К коллоидному раствору 50 мг МНЧ **69** в 10 мл сухого ацетонитрила добавляли 3 мл раствора PEG **97**, взятого в массовом соотношении PEG к МНЧ 1:0,5 (**98а**), 1:5 (**98б**), 1:50 (**98в**), в сухом ДМСО-*d*₆, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 4 ч при 40 °С и еще 16 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (40000 g, 20 мин), промывали деионизованной водой 3×10 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (**98а-в**).

МНЧ на основе Fe₃O₄, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные SAPS, PEG, загруженные Dox (99а-в) (общая методика). К коллоидному раствору 20 мг МНЧ **98а-в** в 10 мл деионизованной воды добавляли раствор 20 мг Dox в 10 мл деионизованной воды, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 24 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (340000 g, 20 мин), промывали 10 мл деионизованной воды. Суспендировали в деионизованной воде, получали коллоидный раствор МНЧ (**99а-в**).

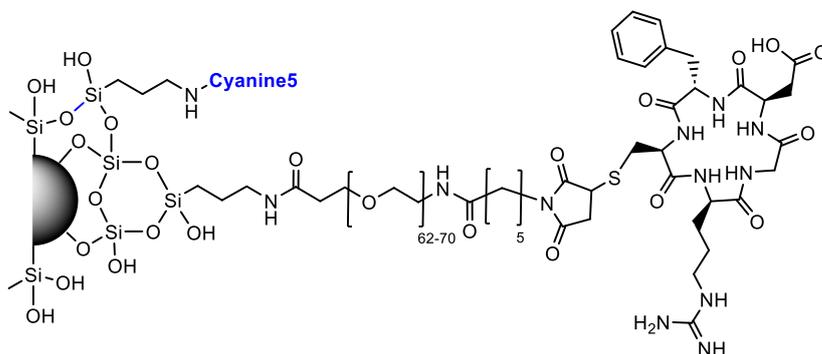


МНЧ на основе Fe₃O₄, стабилизированные PMDA, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные APS, Cyanine5 (101). К коллоидному раствору 400 мг МНЧ **78** в 100 мл ацетонитрила добавляли 3 мг (4,5 мкмоль) соединения **100** (из расчета 0,75 мас.%), обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 4 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (10000 g, 15 мин),

промывали ацетонитрилом до бесцветного фугата. Суспендировали в ацетонитриле, получали 50 мл коллоидного раствора МНЧ **101с** концентрацией 8 мг/мл.

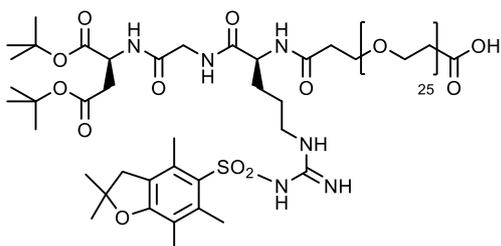
МНЧ на основе Fe₃O₄, стабилизированные PMDA, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные APS, Cyanine5, PEG (103). К коллоидному раствору 250 мг МНЧ **101** в 75 мл ацетонитрила добавляли раствор 10 мг (5 мкмоль) соединения **102** в 10 мл ацетонитрила (из расчета 4 мас.%), обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10

мин, перемешивали 4 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (10000 г, 15 мин), промывали промывали деионизованной водой 2×15 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали 50 мл коллоидного раствора МНЧ **103** с концентрацией 5,1 мг/мл.



МНЧ на основе Fe₃O₄, стабилизированные PMDA, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные APS, Cyanine5, PEG, с(RGDfC) (105). К

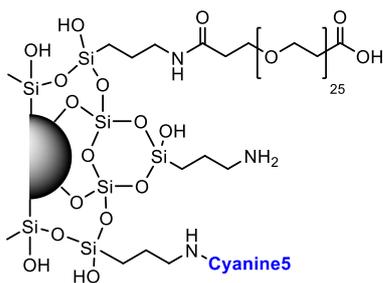
коллоидному раствору 30 мг МНЧ **103** в 15 мл деионизованной воды добавляли раствор 0,6 мг (1 мкмоль) соединения **104** в 1 мл ДМСО (из расчета 2 мас.%), обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 20 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (15000 г, 15 мин), промывали промывали деионизованной водой 2×15 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали 4 мл коллоидного раствора МНЧ **105** с концентрацией 7,5 мг/мл.



Ди-*tert*-бутиловый эфир *O*-(2-этилкарбонил-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты)-*O'*-(2-карбоксиэтил)-полиэтиленгликоль (106). К раствору 100 мг (0,076

ммоль) PEG **93** в 10 мл сухого хлористого метилена добавляли 54,1 мг (0,076 ммоль) соединения **18**, перемешивали и выдерживали 20 ч при 20 °С. Реакционную массу упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (хлороформ–этанол, от 100:0 до 50:50). Получали 139,5 мг (96%) белого порошка. ВЭЖХ (Kromasil 100-5 C18; ацетонитрил–вода 60:40; детектирование при 220, 260 нм): $\tau = 4,6$ мин. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆), δ (м.д.): 11,1-10,0 (уш с, 1H (COOH)), 8,19 (т, $J = 5,9$ Гц, 1H (NH Gly)), 8,14-8,06 (м, 2H (NH Asp, NH Arg)), 4,49 (дт, $J = 6,4, 6,8$ Гц, 1H (H₂ Asp)), 4,20 (дт, $J = 7,1, 6,8$ Гц, 1H (H₂ Arg)), 3,70 (д, $J = 5,9$ Гц, 2H (H₂ Gly)), 3,60 (т, $J = 6,3$ Гц, 2H (N-CO-CH₂ PEG)), 3,54-3,46 (м, 104H (PEG)), 3,02 (дт, $J = 6,4, 6,3$ Гц, 2H (H₅ Arg)), 2,96 (с, 2H (CH₂ Pbf)), 2,64 (дд, $J = 6,4, 16,3$ Гц, 2H (H₃-A Asp)), 2,54 (дд, $J = 6,9, 16,5$ Гц, 2H (H₃-B Asp)), 2,48 (с, 3H (Me Pbf)), 2,44 (т, $J = 6,5$ Гц, 2H (CO-CH₂ PEG)), 2,42 (с, 3H (Me Pbf)), 2,01 (с, 3H (Me Pbf)), 1,68-1,59 (м, 2H (H₃ Arg)), 1,54-1,44 (м, 2H (H₄ Arg)), 1,41 (с, 6H (2Me Pbf)), 1,39 (с, 9H (OtBu Asp)), 1,38 (с, 9H (OtBu Asp)). MCBP (ESI-POS) вычислено для C₈₇H₁₅₉N₆O₃₇S [M+H]⁺: 1912,0460; найдено: 1912,0444.

Суспендировали в деионизованной воде, получали по 5 мл коллоидных растворов МНЧ **111** и **112** с концентрацией 4 мг/мл.



МНЧ на основе Fe₃O₄, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные APS, Cyanine5, PEG (113) и МНЧ на основе Fe₃O₄, стабилизированные PMDA, покрытые оболочкой SiO₂, функционализированные APS, Cyanine5, PEG (114) (общая методика). К коллоидному раствору 80 мг МНЧ **75** или **78** в 14 мл сухого ацетонитрила добавляли раствор

0,6 мг (0,9 мкмоль) соединения **100** и 11 мг (8,4 мкмоль) соединения **93** в 2 мл сухого ацетонитрила, обрабатывали ультразвуком (35 кГц, 100 Вт) в течение 10 мин, перемешивали 20 ч при 20 °С. МНЧ осаждали на центрифуге (25000 g, 15 мин), промывали промывали деионизованной водой 3×5 мл. Суспендировали в деионизованной воде, получали по 10 мл коллоидных растворов МНЧ **113** и **114** с концентрацией 8,8 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методы синтеза новых линкерсодержащих производных RGD-пептида.
2. Разработаны методы синтеза новых конъюгатов RGD-пептида с флуоресцентными красителями: конъюгат PEG-содержащего RGD-пептида с Cyanine5.5; конъюгат линейного RGD-пептида с флуоресцеином; конъюгат тетрапептида KRGD с 6-метил-2-оксо-4-фенил-1,2-дигидропиридином; показано, что оптические свойства полученных производных соответствуют исходным красителям.
3. Разработаны методы синтеза новых конъюгатов глутарилсодержащего RGD-пептида с рядом 1-замещенных 3-амино-1,2-дикарба-клого-додекаборанов, а также конъюгатов KRGD-пептида, содержащих два карборановых ядра в *клого*- или *нидо*-форме; показано, что производное *нидо*-карборана не проявило выраженный цитотоксический эффект и, с учетом его хорошей растворимости в воде, может оказаться перспективным агентом для БНЗТ.
4. Синтезирован и охарактеризован конъюгат глутарилсодержащего GRGD-пептида с МНЧ на основе Fe₃O₄, функционализированных APS.
5. Разработаны методы нанесения SiO₂-оболочки на МНЧ на основе Fe₃O₄, и продемонстрирована возможность проведения эффективной сорбции на них противоопухолевого препарата доксорубицина; для синтезированных материалов продемонстрирован дозозависимый цитотоксический эффект, сопоставимый с доксорубицином.
6. Разработаны методы получения новых материалов на основе МНЧ Fe₃O₄ с PEG-покрытием, проведена сорбция на них Dox; продемонстрирован их терапевтический эффект (в том числе, за счет локальной магнитной гипертермии в экспериментах *in vitro* и *in vivo*), торможение процессов метастазирования и повышение выживаемости экспериментальных животных.
7. Синтезированы и охарактеризованы конъюгаты МНЧ Fe₃O₄, имеющие SiO₂/APS-оболочку с ковалентно закрепленным флуоресцентным красителем Cyanine5 и PEG-покрытие с ковалентно связанным пептидом *c*(RGDfC) или RGD; оценен их цитотоксический эффект; на примере наноконъюгата с *c*(RGDfC) продемонстрировано специфичное связывание с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha\upsilon\beta_3$.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанный подход к синтезу производных RGD-пептида позволяет в дальнейшем получать его новые конъюгаты с функциональными молекулами или МНЧ для получения материалов – потенциальных средств диагностики и терапии опухолей.

Список сокращений

- 4T1 – клеточная линия карциномы молочной железы мыши
- A549 – клеточная линия аденокарциномы базального эпителия альвеол человека
- AMF – переменное магнитное поле
- APS – фрагмент 3-аминопропилсилана
- APTMS – 3-аминопропилтриметоксисилан
- B16 – клеточная линия меланомы кожи мыши
- Вос – *tert*-бутилоксикарбонил
- VJ-5ta – клеточная линия фибробластов кожи человека
- СМС – *N*-циклогексил-*N'*-(2-морфолиноэтил)карбодимид мето-*p*-толуолсульфонат
- СТ26 – клеточная линия карциномы толстой кишки человека
- Суanine5-NHS – сукцинимидный эфир (2,5-диоксопирролидин-1-ил)6-[(2E)-3,3-диметил-2-[(2E,4E)-5-(1,3,3-триметилиндол-1-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]индол-1-ил]гексаноат тетрафторбората
- Суanine5.5-NHS – сукцинимидный эфир (2,5-диоксопирролидин-1-ил)6-[1,1-диметил-2-[5-(1,1,3-триметилбензо[е]индол-3-ий-2-ил)пента-2,4-диенилиден]бензо[е]индол-3-ил]гексаноат тетрафторбората
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DCC – 1,3-дициклогексилкарбодимид
- DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- Dox – доксорубицин
- EDC×HCl – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида гидрохлорид
- ESI – электроспрей
- FBS – fetal bovine serum
- FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- FITC – флуоресцеин изотиоцианат
- Fmoc – флуоренилметоксикарбонил
- НВТУ – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат
- НЕК-293 – клеточная линия почек эмбриона человека
- НерG2 – клеточная линия карциномы гепатоцитов человека
- IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования
- ILP – внутренние потери мощности
- Jurkat – клеточная линия Т-лимфоцитарной лейкемии человека

LC – уровень загрузки
LE – эффективность загрузки
MDA-MB231 – клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека
MDA-MB231_27 – генно-модифицированная клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека с повышенной экспрессией интегрина $\alpha v \beta 3$
MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
NHS – *N*-гидроксисукцинимид
NMM – *N*-метилморфолин
Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил
PBS – фосфатно-солевой буфер
PEG – полиэтиленгликоль
PMIDA – фосфометилиминодиуксусная кислота
PyBOP – (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфоний гексафторфосфат
RGD – L-аргинил-глицил-L-аспарагиновая кислота
SAR – удельный коэффициент поглощения электромагнитной энергии
SK-BR-3 – клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека
SNU-1 – клеточная линия карциномы желудочного эпителия человека
SPS – фрагмент 3-сукцинилпропилсилана
TBTU – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний тетрафторборат
TESPSA – [(3-триэтоксисил)пропил]янтарный ангидрид
TFA – трифторуксусная кислота
TMOS – тетраметоксисилан
WI-38 – клеточная линия фибробластов легкого эмбриона человека
БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО-d6 – диметилсульфоксид
ДРС – динамическое рассеяние света
ДМФА – *N,N*-диметилформамид
ИК – инфракрасный
МНЧ – магнитные наночастицы
МРТ – магнито-резонансная томография
МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
НПВО – спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
РФА – рентгено-флуоресцентный анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТГА – термогравиметрический анализ

ТГФ – тетрагидофуран

ТРО – торможение роста опухоли

ТСХ – тонкослойная хроматография

УЗ – ультразвук

УФ – ультрафиолетовый

ЭА – элементный анализ

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список литературы

1. Mousavizadeh, A. Cell targeting peptides as smart ligands for targeting of therapeutic or diagnostic agents: a systematic review / A. Mousavizadeh, A. Jabbari, M. Akrami [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2017. – Vol. 158. – Pp. 507-517.
2. Erak, M. Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics / M. Erak, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, A.G. Beck-Sickinger // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 26. – Pp. 2759-2765.
3. Pierschbacher, M.D. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule / M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti // *Nature*. – 1984. – Vol. 309. – Pp. 30-33.
4. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins / E. Ruoslahti // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 1996. – Vol. 12. – Pp. 697-715.
5. Pierschbacher, M.D. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity / M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1984. – Vol. 81(19). – Pp. 5985-5988.
6. Yamada, K.M. Dualistic nature of adhesive protein function: Fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function / K.M. Yamada, D.W. Kennedy // *Journal of Cell Biology*. – 1984. – Vol. 99(1). – Pp. 29-36.
7. Gartner, T.K. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets / T.K. Gartner, J.S. Bennett // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260(22). – Pp. 11891-11894.
8. Plow, E.F. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets / E.F. Plow, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 28(23). – Pp. 8057-8061.
9. Suzuki, S. Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin / S. Suzuki, A. Oldberg, E.G. Hayman [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1985. – Vol. 4(10). – Pp. 2519-2524.
10. Gardner, J.M. Interaction of fibronectin with its receptor on platelets / J.M. Gardner, R.O. Hynes // *Cell*. – 1985. – Vol. 42(2). – Pp. 439-448.
11. Plow, E.F. Ligand binding to integrins / E.F. Plow, T.A. Haas, L. Zhang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – Pp. 21785–21788.
12. Ludwig, B.S. RGD-Binding Integrins Revisited: How Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field / B.S. Ludwig, H. Kessler, S.

Kossatz, U. Reuning // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13(7) – 1711.

13. Nieberler, M. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer / M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart [et al.] // *Cancers*. – 2017. – Vol. 9(9). – P. 116.

14. Michel, J.-B. Known and Unknown Extracellular Mediators / J.-B. Michel // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – Pp. 2146–2152.

15. Chew, D.P. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials / D.P. Chew, D.L. Bhatt, S. Sapp [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103. – Pp. 201–206.

16. Cohen, S.A. Potential future clinical applications for the GP_{IIb/IIIa} antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications / S.A. Cohen, M. Trikha, M.A. Mascelli // *Pathology and Oncology Research*. – 2000. – Vol. 6. – Pp. 163-174.

17. Dechantsreiter, M. A. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists / M.A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 42(16). – Pp. 3033-3040.

18. Sani, S. Biological Relevance of RGD-Integrin Subtype-Specific Ligands in Cancer / S. Sani, M. Messe, Q. Fuchs [et al.] // *ChemBioChem*. – 2021. – Vol. 22. – Pp. 1151-1160.

19. Boisbrun, M. Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins / M. Boisbrun, R. Vanderesse, P. Engrand [et al.] // *Tetrahedron*. – 2008. – Vol. 64(16). – Pp. 3494-3504.

20. Liu, Y. Design and synthesis of cyclo[-Arg-Gly-Asp-Ψ(triazole)-Gly-Xaa-] peptide analogues by click chemistry / Y. Liu, L. Zhang, J. Wan [et al.] // *Tetrahedron*. – 2008. – Vol. 64(47). – Pp. 10728-10734.

21. Thieriet, N. Solid-Phase Peptide Synthesis in the Reverse (N-C) Direction / N. Thieriet, F. Guibe, F. Albericio // *Organic Letters*. – 2000. – Vol. 2(13). – Pp. 1815-1817.

22. Nortcliffe, A. Synthesis and anticancer properties of RGD peptides conjugated to nitric oxide releasing functional groups and abiraterone / A. Nortcliffe, I.N. Fleming, N.P. Botting [et al.] // *Tetrahedron*. – 2014. – Vol. 70(44). – Pp. 8343-8347.

23. Welsh, D.J. Comparing dendritic and self-assembly strategies to multivalency--RGD peptide-integrin interactions / D.J. Welsh, D.K. Smith // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2011. – Vol. 9(13). – Pp. 4795-4801.

24. Demin, A.M. Functionalization of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with RGD peptide derivatives / A.M. Demin, A.Yu. Vigorov, I.A. Nizova [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2014. – Vol. 24(1). – Pp. 20-22.

25. Abo-Ghalia, M. Optimized conventional synthesis of "RGD" and "RGDS" peptides and their sarcosine mimics as integrin GP IIb/IIIa antagonists / M. Abo-Ghalia, S.A. El-Rahman, A.

El-Kafrawy [et al.] // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 24(4). – Pp. 405-411.

26. Dong, X. Interaction Mechanism and Clustering among RGD Peptides and Integrins / X. Dong, Y. Yu, Q. Wang [et al.] // *Molecular Informatics*. – 2017. – Vol. 36(5-6). – 1600069.

27. Kulhari, H. Cyclic-RGDfK peptide conjugated succinoyl-TPGS nanomicelles for targeted delivery of docetaxel to integrin receptor over-expressing angiogenic tumours / H. Kulhari, M. Pharm, D. Pooja [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 11. – Pp. 1511-1520.

28. Gormley, A.J. Biological evaluation of RGDfK-gold nanorod conjugates for prostate cancer treatment / A.J. Gormley, A. Malugin, A. Ray // *Journal of Drug Targeting*. – 2011. – Vol. 19(10). – Pp. 915-924.

29. Oz, Y. Functionalization of Reduced Graphene Oxide via Thiol-Maleimide "Click" Chemistry: Facile Fabrication of Targeted Drug Delivery Vehicles / Y. Oz, A. Barras, R. Sanyal [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2017. – Vol. 9(39). – Pp. 34194-34203.

30. Xia, Y. Targeted delivery of siRNA using RGDfCconjugated functionalized selenium nanoparticles for anticancer therapy / Y. Xia, Z. Lin, Y. Li [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – Vol. 5. – Pp. 6941-6952.

31. Frochot, C. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity / C. Frochot, B.D. Stasio, R. Vanderesse [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. – 2007. – Vol. 35(3). – Pp. 205-220.

32. Рахимов, М.Г. Соединения для радионуклидной визуализации и терапии очагов злокачественных новообразований, характеризующихся повышенным ангиогенезом / М.Г. Рахимов, А.Я. Марук, А.Б. Брускин // *Известия АН. Серия химическая*. – 2016. – № 2. – С. 363-383.

33. Yang, Y. Design, synthesis, and in vitro evaluation of a binary targeting MRI contrast agent for imaging tumor cells / Y. Yang, J. Zhou, K. Yu // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46(2). – Pp. 449-457.

34. Xu, D. Iminodiacetic acid as bifunctional linker for dimerization of cyclic RGD peptides / D. Xu, Z. Zhao, S. Chen [et al.] // *Nuclear Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 48. – Pp. 1-8.

35. Smith, B.R. Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature / B.R. Smith, Z. Cheng, A. De [et al.] // *Nano Letters*. – 2008. – Vol. 8(9). – Pp. 2599-2606.

36. Chen, K. Triblock copolymer coated iron oxide nanoparticle conjugate for tumor integrin targeting / K. Chen, J. Xie, H. Xu [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30(36). – Pp. 6912-6919.

37. Вигоров, А.Ю. Синтез производных RGD-пептида, содержащих остатки глутаровой и адипиновой кислот / А.Ю. Вигоров, А.М. Демин, И.А. Низова, В.П. Краснов // *Биоорганическая химия*. – 2014. – Т. 40(2). – С. 157-165.
38. Vilaca, H. New cyclic RGD peptides: synthesis, characterization, and theoretical activity towards $\alpha_v\beta_3$ integrin / H. Vilaca, P.M.T. Ferreira, N.M. Micaelo // *Tetrahedron*. – 2014. – Vol. 70(35). – Pp. 5420-5427.
39. Sacco, G. RGD Cyclopeptide Equipped with a Lysine-Engaging Salicylaldehyde Showing Enhanced Integrin Affinity and Cell Detachment Potency / G. Sacco, D. Arosio, M. Paolillo [et al.] // *Chemistry Europe*. – 2023. – Vol. 29. – e2022037.
40. Colombo, M. Click Chemistry for the Synthesis of RGD-Containing Integrin Ligands / M. Colombo, A. Bianchi // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15(1). – Pp. 178-197.
41. Zhu, J. Design and Synthesis of Biomimetic Hydrogel Scaffolds with Controlled Organization of Cyclic RGD Peptides / J. Zhu, C. Tang, K. Kottke-Marchant and R.E. Marchant // *Bioconjugate Chemistry*. – 2009. – Vol. 20(2). – Pp. 333-339.
42. Spears, R.J. Cysteine protecting groups: applications in peptide and protein science / R.J. Spears, C. McMahon, V. Chudasama // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – 11098.
43. Massaguer, A. Integrin-targeted delivery into cancer cells of a Pt(IV) pro-drug through conjugation to RGD-containing peptides / A. Massaguer, A. González-Cantó, E. Escribano [et al.] // *Dalton Transactions*. – 2015. – Vol. 44(1). – Pp. 202-212.
44. Liu, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptide Bioconjugates as Radiotracers Targeting Multiple Integrins / S. Liu // *Bioconjugate Chemistry*. – 2015. – Vol. 26(8). – Pp. 1413-1438.
45. Shao, Y. A direct comparison of tumor angiogenesis with ^{68}Ga -labeled NGR and RGD peptides in HT-1080 tumor xenografts using microPET imaging / Y. Shao, W. Liang, F. Kang [et al.] // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46(10). – Pp. 2355-2364.
46. Chen, X. Pharmacokinetics and tumor retention of ^{125}I -labeled RGD peptide are improved by PEGylation / X. Chen, R. Park, A.H. Shahinian [et al.] // *Nuclear Medicine and Biology*. – 2004. – Vol. 31(1). – Pp. 11-9.
47. Cheng, Z. Near-Infrared Fluorescent RGD Peptides for Optical Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression in Living Mice / Z. Cheng, Y. Wu, Z. Xiong [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2005. – Vol. 16(6). – Pp. 1433-1441.
48. Rizvi, S.F.A. Fluorescent RGD-based pro-apoptotic peptide conjugates as mitochondria-targeting probes for enhanced anticancer activities / S.F.A. Rivzi, S. Mu, Y. Wang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 127. – 110179.
49. Shao, J. Targeting Fluorescence Imaging of RGD-Modified Indocyanine Green Micelles on Gastric Cancer / J. Shao, X. Zheng, L. Feng [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and*

Biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – 575365.

50. Piktel, E. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy / E. Piktel, K. Niemirowicz, M. Watek [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2016. – Vol. 14. – 39.

51. Zheng, S. RGD-conjugated iron oxide magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast enhancement and hyperthermia / S. Zheng, M. Huang, R. Hong [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2014. – Vol. 28(7). – Pp. 1051-1059.

52. Qin, W. New opportunities for RGD-engineered metal nanoparticles in cancer / W. Qin, J. Chandra, M.A.S. Abourehab [et al.] // *Molecular Cancer*. – 2023. – Vol. 22. – 87.

53. Luo, Y. RGD-functionalized ultrasmall iron oxide nanoparticles for targeted T1-weighted MR imaging of gliomas / Y. Luo, J. Yang, Y. Yan [et al.] // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – Pp. 14538-14546.

54. Colombo, R. Synthesis and biological evaluation (in vitro and in vivo) of cyclic arginine-glycine-aspartate (RGD) peptidomimetic-paclitaxel conjugates targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ / R. Colombo, M. Mingozzi, L. Belvisi [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 55(23). – Pp. 10460-10474.

55. Wang, X. RGD and NGR modified TRAIL protein exhibited potent anti-metastasis effects on TRAIL-insensitive cancer cells in vitro and in vivo / X. Wang, X. Qiao, Y. Shang [et al.] // *Amino Acids*. – 2017. – Vol. 49(5). – Pp. 931-941.

56. Alves, C.G. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies / C.G. Alves, R. Lima-Sousa, D. Melo-Diogo [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 542(1-2). – Pp. 164-175.

57. Ye, Y. Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors / Y. Ye, S. Bloch, B. Xu [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49(7). – Pp. 2268-2275.

58. Lee, M.H. Direct fluorescence monitoring of the delivery and cellular uptake of a cancer-targeted RGD peptide-appended naphthalimide theragnostic prodrug / M.H. Lee, J.Y. Kim, J.H. Han [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134(30). – Pp. 12668-12674.

59. Cao, J. Fast clearing RGD-based near-infrared fluorescent probes for *in vivo* tumor diagnosis / J. Cao, S. Wan, J. Tian [et al.] // *Contrast Media and Molecular Imaging*. – 2012. – Vol. 7(4). – Pp. 390-402.

60. Liu, Z. Optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression with near- infrared fluorescent RGD dimer with tetra(ethylene glycol) linkers / Z. Liu, S. Liu, G. Niu [et al.] // *Molecular Imaging*. – 2010. – Vol. 9(1). – Pp. 21-29.

61. Yue, X. RGD-conjugated two-photon absorbing near-IR emitting fluorescent probes for tumor vasculature imaging / X. Yue, A.R. Morales, G.W. Githaiga [et al.] // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2015. – Vol. 13(43). – Pp. 10716-10725.
62. Liu, L. Near-infrared fluorescent peptide probes for imaging of tumor in vivo and their biotoxicity evaluation / L. Liu, G. Lin, F. Yin [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. – 2016. – Vol. 104(4). – Pp. 910-916.
63. Hu, Z. A fluorescent Arg-Gly-Asp (RGD) peptide-naphthalenediimide (NDI) conjugate for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* / Z. Hu, R.L. Arrowsmith, J.A. Tyson [et al.] // *Chemical Communications*. – 2015. – Vol. 51(32). – Pp. 6901-6904.
64. Yang, S. Study on target marking of quantum dots-RGD probe in human pancreatic carcinoma cell line SW1990 / S. Yang, Q. Ni, C. Qu [et al.] // *Chinese Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 17(6). – Pp. 354-357.
65. Welsh, D.J. Self-assembled multivalent RGD-peptide arrays – morphological control and integrin binding / D.J. Welsh, P. Posocco, S. Pricl, D.K. Smith // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2013. – Vol. 11. – 3177.
66. Cheng, Z. Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in living mice / Z. Cheng, Y. Wu, Z. Xiong [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2005. – Vol. 16. – Pp. 1433-1441.
67. West, J.L. Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics / J.L. West, N.J. Halas // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2003. – Vol. 5. – Pp. 285-292.
68. Jiang, Y. Multimodal Biophotonics of Semiconducting Polymer Nanoparticles / Y. Jiang, K. Pu // *Accounts of Chemical Research*. – 2018. – Vol. 51(8). – Pp. 1840-1849.
69. Xue, L. Imaging and manipulating proteins in live cells through covalent labeling / L. Xue, I.A. Karpenko, J. Hiblot [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 11(12). – Pp. 917-923.
70. Jung, D. Chemical biology-based approaches on fluorescent labeling of proteins in live cells / D. Jung, K. Min, J. Jung [et al.] // *Molecular Biosystems*. – 2013. – Vol. 9(5). – Pp. 862-872.
71. Swiecicki, J.-M. A Strategic Approach for Fluorescence Imaging of Membrane Proteins in a Native-like Environment / J.-M. Swiecicki, J.T. Santana, B. Imperiali // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 27(2). – Pp. 245-251.
72. Chan, H.L. Unique Fluorescent Imaging Probe for Bacterial Surface Localization and Resistant Enzyme Imaging / H.L. Chan, L. Lyu, J. Aw [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 13(7). – Pp. 1890-1896.
73. Sahoo, H. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback / H. Sahoo //

RSC Advances. – 2012. – Vol. 2(18). – Pp. 7017-7029.

74. Li, C. Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging / C. Li, A.G. Tebo, A. Gautier [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18(7). – 1473.
75. Dean, K.M. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging / K.M. Dean, A.E. Palmer // Nature Chemical Biology. – 2014. – Vol. 10(7). – Pp. 512-523.
76. Kozma, E. Fluorogenic probes for super-resolution microscopy / E. Kozma, P. Kele // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2019. – Vol. 17(2). – Pp. 215-233.
77. Tebo, A.G. Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging / A.G. Tebo, B. Moeyaert, M. Thauvin [et al.] // Nature Chemical Biology. – 2021. – Vol. 17(1). – Pp. 30-38.
78. Lavis, L.D. Bright building blocks for chemical biology / L.D Lavis, R.T. Raines // ACS Chemical Biology. – 2014. – Vol. 9(4). – Pp. 855-866.
79. Umezawa, K. Bright, color-tunable fluorescent dyes in the visible-near-infrared region / K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2008. – Vol. 130(5). – Pp. 1550-1551.
80. Sun, X. Fluorescence based explosive detection: from mechanisms to sensory materials / X. Sun, Y. Wang, Y. Lei // Chemical Society Reviews. – 2015. – Vol. 44(22). – Pp. 8019-8061.
81. Peng, H.-S. Soft fluorescent nanomaterials for biological and biomedical imaging / H.-S. Peng, D.T. Chiu // Chemical Society Reviews. – 2015. – Vol. 44(14). – Pp. 4699-4722.
82. Lavis, L.D. Bright ideas for chemical biology / L.D Lavis, R.T. Raines // ACS Chemical Biology. – 2008. – Vol. 3(3). – Pp. 142-155.
83. Jensen, E.C. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations / E.C. Jensen // Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. – 2012. – Vol. 295(12). – Pp. 2031-2036.
84. Kobayashi, H. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging / H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford [et al.] // Chemical Reviews. – 2010. – Vol. 110(5). – Pp. 2620-2640.
85. Ulrich, G. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed / G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman // Angewandte Chemie International Edition. – 2008. – Vol. 47(7). – Pp. 1184-1201.
86. Heyer, E. Highly fluorescent and water-soluble diketopyrrolopyrrole dyes for bioconjugation / E. Heyer, P. Lory, J. Leprince [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2015. – Vol. 54(10). – Pp. 2995-2999.
87. Wang, X. Compact instrument for fluorescence image-guided surgery / X. Wang, S.

Bhaumik, Q. Li [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2010. – Vol. 15(2). – 020509.

88. Li, K. Photostable fluorescent organic dots with aggregation-induced emission (AIE dots) for noninvasive long-term cell tracing / K. Li, W. Qin, D. Ding [et al.] // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – 1150.

89. Kimura, S. Synthesis and evaluation of cyclic RGD-boron cluster conjugates to develop tumor-selective boron carriers for boron neutron capture therapy / S. Kimura, S.-I. Masunaga, T. Harada [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 19(5). – Pp. 1721-1728.

90. Nakamura, H. Cyclic RGD-functionalized *closo*-dodecaborate albumin conjugates as integrin targeting boron carriers for neutron capture therapy / H. Nakamura, K. Kawai, K. Nishimura [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 17(10). – Pp. 3740-3747.

91. Krijger, G.C. Tumor cell and tumor vasculature targeted liposomes for neutron capture therapy / G.C. Krijger, M.M. Fretz, U.D. Woroniecka [et al.] // *Radiochimica Acta*. – 2005. – Vol. 93(9-10). – Pp. 589-593.

92. Koning, G.A. Targeting liposomes to tumor endothelial cells for neutron capture therapy / G.A. Koning, M.M. Fretz, U. Woroniecka [et al.] // *Applied Radiation and Isotopes*. – 2004. – Vol. 61(5). – Pp. 963-967.

93. Neiryneck, P. Carborane- β -cyclodextrin complexes as a supramolecular connector for bioactive surfaces / P. Neiryneck, J. Schimer, P. Jonkheijm [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2015. – Vol. 3(4). – Pp. 539-545.

94. Dymova, M.A. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives / M.A. Dymova, S.Yu. Taskaev, V.A. Richter [et al.] // *Cancer Communications*. – 2020. – Vol. 40. – Pp. 406-421.

95. Sauerwein, W. Principles and roots of neutron capture therapy / W. Sauerwein // Springer: Berlin/Heidelberg. – 2012. – Vol. 1. – Pp. 1-16.

96. Sauerwein, W. Theranostics in Boron Neutron Capture Therapy / W. Sauerwein, L. Sancey, E. Hey-Hawkins [et al.] // *Life*. – 2021. – Vol. 11(4). – 330.

97. Hu, K. Boron agents for neutron capture therapy / K. Hu, Z. Yang, L. Zhang [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2020. – Vol. 405. – 213139.

98. Gruzdev, D.A. Carborane-containing amino acids and peptides: Synthesis, properties and applications / D.A. Gruzdev, G.L. Levit, V.P. Krasnov [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – Vol. 433. – 213753.

99. Hawthorne, M.F. The Role of Chemistry in the Development of Boron Neutron Capture Therapy of Cancer / M.F. Hawthorne // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1993. – Vol. 32(7). – Pp. 950-984.

100. Soloway, A.H. The chemistry of neutron capture therapy / A.H. Soloway, W. Tjarks,

B.A. Barnum [et al.] // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98(4). – Pp. 1515-1562.

101. Moss, R.L. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron neutron capture therapy / R.L. Moss // *Applied Radiation and Isotopes*. – 2014. – Vol. 88. – Pp. 2-11.

102. Barth, R.F. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer / R.F. Barth, M.G.H. Vicente, O.K. Harling [et al.] // *Radiation Oncology*. – 2012. – Vol. 7(1). – 146.

103. Hu, K. Boron agents for neutron capture therapy / K. Hu, Z. Yang, L. Zhang [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2020. – Vol. 405. – 213139.

104. Miyatake, S.-I. Boron neutron capture therapy for malignant brain tumors / S.-I. Miyatake, S. Kawabata, R. Hiramatsu [et al.] // *Neurologia Medico-Chirurgica*. – 2016. – Vol. 56(7). – Pp. 361-371.

105. Suzuki, M. Boron neutron capture therapy outcomes for advanced or recurrent head and neck cancer / M. Suzuki, I. Kato, T. Aihara [et al.] // *Journal of Radiation Research*. – 2014. – Vol. 55(1). – Pp. 146-153.

106. Sivaev, I.B. Polyhedral boranes for medical applications: Current status and perspectives / I.B. Sivaev, V.V. Bregadze // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2009. – Vol. 11. – Pp. 1433-1450.

107. Lesnikowski, Z.J. Challenges and opportunities for the application of Boron clusters in drug design / Z.J. Lesnikowski // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59(17). – Pp. 7738-7758.

108. Stockmann, P. New keys for old locks: Carborane-containing drugs as platforms for mechanism-based therapies / P. Stockmann, M. Gozzi, R. Kuhnert [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2019. – Vol. 48(13). – Pp. 3497-3512.

109. Nakahara, Y. Boron neutron capture therapy and photodynamic therapy for high-grade meningiomas / Y. Nakahara, H. Ito, J. Masuoka [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12(5). – 1334.

110. Suzuki, M. Boron neutron capture therapy (BNCT): a unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era / M. Suzuki // *International Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 25(1). – Pp. 43-50.

111. Shen, Y. Efficient access to amides of the carborane carboxylic acid [1-(COOH)-CB₁₁H₁₁]⁻ / Y. Shen, K. Zheng, R. Dontha [et al.] // *RCS Advances*. – 2018. – Vol. 8(40). – Pp. 22447-22451.

112. Gruzdev, D.A. *N*-Aminoacyl-3-amino-*nido*-carboranes as a group of boron-containing derivatives of natural amino acids / D.A. Gruzdev, A.A. Telegina, G.L. Levit, V.P. Krasnov // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2022. – Vol. 87(8). – Pp. 5437-5441.

113. Hattori, Y. Synthesis and in vitro evaluation of thiododecaborated

α,α -cycloalkylamino acids for the treatment of malignant brain tumors by boron neutron capture therapy / Y. Hattori, S. Kusaka, M. Mukumoto [et al.] // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46. – Pp. 2715-2720.

114. Mi, P. Block copolymer-boron cluster conjugate for effective boron neutron capture therapy of solid tumors / P. Mi, H. Yanagie, N. Dewi [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 254. – Pp. 1-9.

115. Ol'shevskaya, V.A. Novel *bis*[(1,2,3-triazolyl)methyl]carborane derivatives via regioselective copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition / V.A. Ol'shevskaya, A.V. Makarenkov, E.G. Kononova [et al.] // *Polyhedron*. – 2012. – Vol. 42(1). – Pp. 302-306.

116. Lerouge, F. High boron content carboranyl-functionalized aryl ether derivatives displaying photoluminescent properties / F. Lerouge, C. Vinas, F. Teixidor [et al.] // *Dalton Transactions*. – 2007. – Vol. 21(19). – Pp. 1898-1903.

117. Ongayi, O. Synthesis and characterization of a carboranyl-tetrabenzoporphyrin / O. Ongayi, V. Gottumukkala, F.R. Fronczek, M.G.H. Vicente // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – Vol. 15(6). – Pp. 1665-1668.

118. Bolotin, D.S. Nucleophilicity of oximes based upon addition to a nitrilium *closo*-decaborate cluster / D.S. Bolotin, V.K. Burianova, A.S. Novikov [et al.] // *Organometallics*. – 2016. – Vol. 35(20). – Pp. 3612-3623.

119. Scobie, M. Synthesis of carbamate-linked nitroimidazolyl carboranes designed for boron neutron capture therapy of cancer / M. Scobie, M.D. Threadgill // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. – 1994. – Pp. 2059-2063.

120. Nie, Y. Synthesis and characterization of carboranyl schiff base compounds from 1-amino-*o*-carborane / Y. Nie, Y. Wang, J. Miao [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2015. – Vol. 798(1). – Pp. 182-188.

121. Novikov, A.S. Nucleophilic addition of hydrazine and benzophenone hydrazone to 2-acetonitrilium *closo*-decaborate cluster: structural and photophysical study / A.S. Novikov, N.T. Kuznetsov, K. Yu. Zhizhin [et al.] // *Inorganica Chimica Acta*. – 2018. – Vol. 482(1). – Pp. 838-845.

122. Zhou, P. Photoacoustic-enabled self-guidance in magnetic-hyperthermia Fe@Fe₃O₄ nanoparticles for theranostics *in vivo* / P. Zhou, H. Zhao, Q. Wang [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2018. – Vol. 7(9). – 1701201.

123. Shen, J.-M. Heterogeneous dimer peptide-conjugated polylysine dendrimer-Fe₃O₄ composite as a novel nanoscale molecular probe for early diagnosis and therapy in hepatocellular carcinoma / J.-M. Shen, X.-X. Li, L.-L. Fan [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – Pp. 1183-1200.

124. Arriortua, O.K. Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized

Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases / O.K. Arriortua, E. Garaio, B.H. Parte [et al.] // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2016. – Vol. 7(1). – Pp. 1532-1542.

125. Wang, J. MR/SPECT imaging guided photothermal therapy of tumor-targeting Fe@Fe₃O₄ nanoparticles *in vivo* with low mononuclear phagocyte uptake / J. Wang, H. Zhao, Z. Zhou [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2016. – Vol. 8(31). – Pp. 19872-19882.

126. Moros, M. Triggering antitumoural drug release and gene expression by magnetic hyperthermia / M. Moros, J. Idiago-López, L. Asín [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – Vol. 138. – Pp. 326-343.

127. Tebaldi, M.L. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic response: Current preclinical investigations / M.L. Tebaldi, M.R. Oda, O.F. Monteiro [et al.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2018. – Vol. 461. – Pp. 116-127.

128. Li, K. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics / K. Li, H. Nejadnik, H.E. Daldrup-Link // *Drug Discovery Today*. – 2017. – Vol. 22(9). – Pp. 1421-1429.

129. Purbia, R. Yolk/shell nanoparticles: classifications, synthesis, properties, and applications / R. Purbia, S. Paria // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7(47). – Pp. 19789-19873.

130. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application / Y.-X. J. Wang // *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. – 2011. – Vol. 1(1). – Pp. 35-40.

131. Miao, C. A T₁/T₂ dual functional iron oxide MRI contrast agent with super stability and low hypersensitivity benefited by ultrahigh carboxyl group density / C. Miao, F. Hu, Y. Rui [et al.] // *Journal of Material Chemistry. B*. – 2019. – Vol. 7(12). – Pp. 2081-2091.

132. Yang, H. Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles / H. Yang, Y. Zhuang, Y. Sun [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32(20). – Pp. 4584-4593.

133. Arriortua, O.K. RGD-Functionalized Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia / O.K. Arriortua, M. Insausti, L. Lezama [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2018. – Vol. 165. – Pp. 315-324.

134. Mehdaoui, B. Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study / B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2011. – Vol. 21. – Pp. 4573-4581.

135. Mody, V.V. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor / V.V. Mody, A. Cox, S. Shah [et al.] // *Applied Nanoscience*. – 2014. – Vol. 4. – Pp. 385-392.

136. Demin, A.M. L-Lysine-modified Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic cell labeling / A.M.

Demin, A.V. Mekhaev, O.F. Kandarakov [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2020. – Vol. 190. – Pp. 110879-110888.

137. Savvateeva, M.V. Magnetic stromal layers for enhanced and unbiased recovery of co-cultured hematopoietic cells / M.V. Savvateeva, A.M. Demin, V.P. Krasnov [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2016. – Vol. 509. – Pp. 146-155.

138. Field, L.D. Peptides for specifically targeting nanoparticles to cellular organelles: quo vadis? / L.D. Field, J.B. Delehanty, Y.C. Chen [et al.] // *Accounts of Chemical Research*. – 2015. – Vol. 48(5). – Pp. 1380-1390.

139. Huang, X. pH-responsive theranostic nanocomposites as synergistically enhancing positive and negative magnetic resonance imaging contrast agents / X. Huang, Y. Yuan, W. Ruan [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2018. – Vol. 16. – Pp. 30-42.

140. Balasubramanian, S. Curcumin and 5-Fluorouracil-loaded, folate- and transferrin-decorated polymeric magnetic nanoformulation: a synergistic cancer therapeutic approach, accelerated by magnetic hyperthermia / S. Balasubramanian, A.R. Girija, Y. Nagaoka [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 9. – Pp. 437-460.

141. Pershina, A.G. Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles / A.G. Pershina, O.Ya. Brikunova, A.M. Demin [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 32. – Pp. 102317-102330.

142. Goutam, S.P. Green synthesis of nanoparticles and their applications in water and wastewater treatment / S. P. Goutam, G. Saxena, D. Roy [et al.] // *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 16. – Pp. 349-379.

143. Alonso, J. Magnetic nanoparticles, synthesis, properties, and applications / J. Alonso, J. M. Barandiarán, L. Fernández Barquín [et al.] // *Magnetic Nanostructured Materials*. – 2018. – Vol. 1. – Pp. 1-40.

144. Guo, L. Effects of surface modifications on the physicochemical properties of iron oxide nanoparticles and their performance as anticancer drug carriers / L. Guo, H. Chen, N. He [et al.] // *Chinese Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 29. – Pp. 1829-1833.

145. Zhan, H. Preparation and potential applications of super paramagnetic Nano-Fe₃O₄ / H. Zhan, Y. Bian, Q. Yuan [et al.] // *Processes*. – 2018. – Vol. 6. – Pp. 1-22.

146. Stober, W. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range / W. Stober, A. Fink, E. Bohn // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1968. – Vol. 26(1). – Pp. 62-69.

147. Liu, S. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles / S. Liu, B. Yu, S. Wang [et al.] // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2020. – Vol. 281. – Pp. 102165.

148. Bruce, I.J. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations / I.J. Bruce, T. Sen // *Langmuir*. – 2005. – Vol. 21. – Pp. 7029-7035.
149. Demin, A. 3-Aminopropylsilane-modified iron oxide nanoparticles for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of liver lesions induced by *Opisthorchis felineus* / A. Demin, A. Pershina, V. Ivanov [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – Pp. 4451-4463.
150. Palma, D. Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible / D. Palma, R. Peeters, S. Van Bael [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2007. – Vol. 19(7). – Pp. 1821-1831.
151. Zhou, H. IGF1 Receptor Targeted Theranostic Nanoparticles for Targeted and Image-Guided Therapy of Pancreatic Cancer / H. Zhou, W. Qian, F.M. Uckun [et al.] // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9(8). – Pp. 7976-7991.
152. Hayashi, K. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release / K. Hayashi, M. Nakamura, H. Miki [et al.] // *Theranostics*. – 2014. – Vol. 4(8). – Pp. 834-844.
153. Mouli, S.K. Image-guided local delivery strategies enhance therapeutic nanoparticle uptake in solid tumors / S.K. Mouli, P. Tyler, J.L. McDevitt [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7(9). – Pp. 7724-7733.
154. Fan, C.-H. SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery / C.-H. Fan, C.-Y. Ting, H.-J. Lin [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34(14). – Pp. 3706-3715.
155. Lee, G.Y. Theranostic nanoparticles with controlled release of gemcitabine for targeted therapy and MRI of pancreatic cancer / G.Y. Lee, W.P. Qian, L. Wang [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7(3). – Pp. 2078-2089.
156. Wang, L. GEM-loaded magnetic albumin nanospheres modified with cetuximab for simultaneous targeting, magnetic resonance imaging, and double-targeted thermochemotherapy of pancreatic cancer cells / L. Wang, Y. An, C. Yuan [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – Pp. 2507-2519.
157. Chen, Y.-C. Paclitaxel and iron oxide loaded multifunctional nanoparticles for chemotherapy, fluorescence properties, and magnetic resonance imaging / Y.-C. Chen, W.-F. Lee, H.-H. Tsai, W.-Y. Hsieh // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2012. – Vol. 100(5). – Pp. 1279-1292.
158. Liu, D. Conjugation of paclitaxel to iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy / D. Liu, W. Wu, X. Chen [et al.] // *Nanoscale*. – 2012. – Vol. 4(7). – Pp. 2306-2310.

159. Rao, Y.-F. Epirubicin-loaded superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for transdermal delivery: cancer therapy by circumventing the skin barrier / Y.-F. Rao, W. Chen, X.-G. Liang [et al.] // *Small*. – 2015. – Vol. 11(2). – Pp. 239-247.
160. Huang, J. Magnetic Nanoparticle Facilitated Drug Delivery for Cancer Therapy with Targeted and Image-Guided Approaches / J. Huang, Y. Li, A. Orza [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2016. – Vol. 26(22). – Pp. 3818-3836.
161. Mezo, G. Oxime-Linked Peptide–Daunomycin Conjugates as Good Tools for Selection of Suitable Homing Devices in Targeted Tumor Therapy: An Overview / G. Mezo, J. Gomena, I. Randelovic [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – 1864.
162. Chatzisideri, T. Cancer-targeted delivery systems based on peptides / T. Chatzisideri, G. Leonidis, V. Sarli // *Future Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 10(18). – Pp. 2201-2226.
163. Rizvi, C.F.A. Identification of a pH-Responsive Peptide–Paclitaxel Conjugate as a Novel Drug with Improved Therapeutic Potential / C.F.A. Rizvi, N. Abbas, H. Zhang, Q. Fang // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 66(12). – Pp. 8423-8437.
164. Sayyad, N. Development of bioactive gemcitabine-D-Lys6-GnRH prodrugs with linker-controllable drug release rate and enhanced biopharmaceutical profile / N. Sayyad, E.I. Vrettos, T. Karampelas [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 166. – Pp. 256-266.
165. Wang, L. The development of peptide-drug conjugates (PDCs) strategies for paclitaxel / L. Wang, H. Chen, F. Wang, X. Zhang // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2021. – Vol. 19(2). – Pp. 147-161.
166. Kalia, J. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes / J. Kalia, R.T. Raines // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Vol. 47(39). – Pp. 7523-7526.
167. Liu, S. A Novel Homodimer Peptide-Drug Conjugate Improves the Efficacy of HER2-Positive Breast Cancer Therapy / S. Liu, Y. Tian, S. Jiang, Z. Wang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24(5). – 4590.
168. Ziaei, E. Targeting Triple Negative Breast Cancer Cells with Novel Cytotoxic Peptide-Doxorubicin Conjugates / E. Ziaei, A. Saghaeidehkordi, C. Dill [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2019. – Vol. 30(12). – Pp. 3098-3106.
169. Liang, J. An Acid-Sensitive Nanofiber Conjugate Based on a Short Aromatic Peptide for Targeted Delivery of Doxorubicin in Liver Cancer / J. Liang, R. Guo, M. Xuan [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2022. – Vol. 17. – Pp. 2961-2973.
170. Gonzaga, R.V. Perspectives About Self-Immolative Drug Delivery Systems / R.V. Gonzaga, L.A. Nascimento, S.S. Santos [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol.

109(11). – Pp. 3262-3281.

171. Borbely, A. Synthesis and Biological Evaluation of RGD–Cryptophycin Conjugates for Targeted Drug Delivery / A. Borbely, E. Figueras, A. Martins [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11(4). – 151.

172. Bohme, D. Controlling Toxicity of Peptide–Drug Conjugates by Different Chemical Linker Structures / D. Bohme, A.G. Beck-Sickinger // *ChemMedChem*. – 2015. – Vol. 10(5). – Pp. 804-814.

173. Deng, Z. Disulfide-Based Self-Immolative Linkers and Functional Bioconjugates for Biological Applications / Z. Deng, J. Hu, S. Liu // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2020. – Vol. – 41(1). – e1900531.

174. Dirisala, A. Precise tuning of disulphide crosslinking in mRNA polyplex micelles for optimising extracellular and intracellular nuclease tolerability / A. Dirisala, S. Uchida, T.A. Tockary [et al.] // *Journal of Drug Targeting*. – 2019. – Vol. 27. – Pp. 670-680.

175. Xie, J. Dual-Sensitive Nanomicelles Enhancing Systemic Delivery of Therapeutically Active Antibodies Specifically into the Brain / J. Xie, D. Gonzalez-Carter, T.A. Tockary // *ACS Nano*. – 2020. – Vol. 14(6). – Pp. 6729-6742.

176. Krishnan, M.A. Preparation of Ligand-Targeted Drug Conjugates for Cancer Therapy and Their Evaluation In Vitro / M.A. Krishnan, S. Sengupta, V. Chelvam // *Current Protocols in Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 10(4). – e50.

177. Almuqbil, R.M. Dendrimer Conjugation Enhances Tumor Penetration and Efficacy of Doxorubicin in Extracellular Matrix-Expressing 3D Lung Cancer Models / R.M. Almuqbil, R.S. Heyder, E.R. Bielski [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 17(5). – Pp. 1648-1662.

178. Gilad, Y. Dual-drug RGD conjugates provide enhanced cytotoxicity to melanoma and non-small lung cancer cells / Y. Gilad, E. Noy, H. Senderowitz [et al.] // *Peptide Science*. – 2016. – Vol. 106. – Pp. 160-171.

179. Klimpel, A. Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria / A. Klimpel, I. Neundorff // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 291. – Pp. 147-156.

180. Liang, Y. A comparative study of the antitumor efficacy of peptide-doxorubicin conjugates with different linkers / Y. Liang, S. Li, X. Wang // *Journal of Controlled Release*. – 2018. – Vol. 275. – Pp. 129-141.

181. Sestak, J. Single-step grafting of aminoxy-peptides to hyaluronan: a simple approach to multifunctional therapeutics for experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Sestak, M. Mullins, L. Northrup [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – Vol. 168. – Pp. 334-340.

182. Edupuganti, O.P. The oxime bond formation as an efficient chemical tool for the preparation of 3',5'-bifunctionalised oligodeoxyribonucleotides / O.P. Edupuganti, O. Renaudet, E.

Defrancq [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2004. – Vol. 14(11). – Pp. 2839-2842.

183. Grigalevicius, S. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines / S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2005. – Vol. 16(5). – Pp. 1149-1159.

184. Tang, W. Click reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates / W. Tang, M.L. Becker // *Chemical Society Reviews*. – 2014. – Vol. 43. – 7013.

185. Petrov, R.A. Synthesis and biological evaluation of novel mono- and bivalent ASGP-R-targeted drug-conjugates / R.A. Petrov, S.Yu. Maklakova, Y.A. Ivanenkov [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 28(3). – Pp. 382-387.

186. Ivanenkov, Y.A. Synthesis and biological evaluation of Doxorubicin-containing conjugate targeting PSMA / Y.A. Ivanenkov, A.E. Machulkin, A.S. Garanina [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 29(10). – Pp. 1246-1255.

187. Efremova, M.E. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics / M.E. Efremova, V.A. Naumenko, M. Spasova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – 11295.

188. Tang, R. Tunable ultrasmall visible-to-extended near-infrared emitting silver sulfide quantum dots for integrin-targeted cancer imaging / R. Tang, J. Xue, B. Xu [et al.] // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9(1). – Pp. 220-230.

189. Demin, A.M. PMIDA-Modified Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Application for Liver MRI / Demin A.M., Pershina A.G., Minin A.S. [et al.] // *Langmuir*. – 2018. – Vol. 34(11). – Pp. 3449–3458.

190. AlSawaftah, N.M. pH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy / N.M. AlSawaftah, N.S. Awad, W.G. Pitt, G.A. Hussein // *Polymers*. – 2022. – Vol. – 14. – 936.

191. Franco, M.S. Triggered Drug Release from Liposomes: Exploiting the Outer and Inner Tumor Environment / M.S. Franco, E.R. Gomes, M.C. Roque, M.C. Oliveira // *Frontiers of Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – 623760.

192. Sun, Y. Nanoplatforms for Targeted Stimuli-Responsive Drug Delivery: A Review of Platform Materials and Stimuli-Responsive Release and Targeting Mechanisms / Y. Sun, E. Davis // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11(3). – 746.

193. Liu, G. Stimulus-Responsive Nanomedicines for Disease Diagnosis and Treatment / G. Liu, J.F. Lovell, L. Zhang, Y. Zhang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21(17). – 6380.

194. Peer, D. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / D. Peer, J.M. Karp,

- S. Hong [et al.] // Nature Nanotechnology. – 2007. – Vol. – 2(12). – Pp. 751-760.
195. Yu, M. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture / M. Yu, S. Huang, K.J. Yu, A.M. Clyne // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13(5). – Pp. 5554-5570.
196. Otsuka, H. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications / H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2003. – Vol. 55(3). – Pp. 403-419.
197. Shi, L. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery / L. Shi, J. Zhang, M. Zhao [et al.] // Nanoscale. – 2021. – Vol. 13. – 10748.
198. Nie, S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine / S. Nie // Nanomedicine. – 2010. – Vol. 5(4). – Pp. 523-528.
199. Nel, A.E. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol [et al.] // Nature Materials. – 2009. – Vol. 8(7). – Pp. 543-557.
200. Дёмин А.М. Синтез глутарил-содержащих производных GRGD и KRGD пептидов / А.М. Дёмин, А.В. Вахрушев, А.А. Тумашов, В.П. Краснов // Известия АН. Серия химическая. – 2019. – №12. – С. 2316-2324.
201. Yang, X. Making smart drugs smarter: the importance of linker chemistry in targeted drug delivery / X. Yang, Z. Pan, M.R. Choudhury [et al.] // Medicinal Research Reviews. – 2020. – Vol. 40(6). – Pp. 2682-2713.
202. Mallesha, N. An efficient synthesis of *tert*-butyl ethers/esters of alcohols/amino acids using methyl *tert*-butyl ether / N. Mallesha, S. Prahlada Rao, R. Suhas [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2012. – Vol. 53. – Pp. 641-645.
203. Brenner, M. Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester / M. Brenner, W. Huber // Helvetica Chimica Acta. – 1953. – Vol. 36. – Pp. 1109-1115.
204. Позднев В. Применение ди-*трет*бутилпиروкарбоната для получения *N-трет*-бутилоксикарбонильных производных аминокислот // Химия природных соединений. – 1974. – № 6. – С. 764-767.
205. Vakhrushev, A.V. Synthesis of fluorescent GRGD peptide derivatives / A.V. Vakhrushev, A.M. Demin, V.P. Krasnov // AIP Conference Proceedings. – 2022. – Vol. 2390. – 020083.
206. Vakhrushev, A.V. Synthesis of Novel Carborane-Containing Derivatives of RGD Peptide / A.V. Vakhrushev, D.A. Gruzdev, A.M. Demin [et al.] // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – 3467.
207. Gruzdev, D. Synthesis of purine conjugates with bis-carboranyl derivatives of (S)-lysine or (S)-glutamic acid / D.A. Gruzdev, E.N. Chulakov, G.L. Levit, V.P. Krasnov // Tetrahedron

Letters. – 2023. – Vol. 127. – 154686.

208. Gruzdev, D.A. Synthesis of *closo*- and *nido*-carborane derivatives of the KRGD peptide / D.A. Gruzdev, A.V. Vakhrushev, A.M. Demin [et al.] // Journal of Organometallic Chemistry. – 2024. – Vol. 1008. – 123052.

209. Demin, A.M. Covalent modification of surface of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and amino acids / A.M. Demin, V.P. Krasnov, V.N. Charushin // Mendeleev Communications. – 2013. – Vol. 23. – P. 14-16.

210. Schmidt, H. Principles of hydrolysis and condensation reaction of alkoxy silanes / H. Schmidt, H. Scholze, A. Kaise // Journal of Non-Crystalline Solids. – 1984. – Vol. 63. – Pp. 1-11.

211. Дёмин А.М. Модификация магнитных наночастиц Fe₃O₄ GRGD пептидом / А.М. Дёмин, А.В. Вахрушев, А.В. Мехаев [и др.] // Известия АН. Серия химическая. – 2021. – №3. – С. 449-456.

212. Дёмин, А.М. Количественное определение 3-аминопропилсилана на поверхности модифицированных магнитных наночастиц Fe₃O₄ методом ИК спектроскопии НПВО / Дёмин А.М., Корякова О.В., Краснов В.П. // Журнал прикладной спектроскопии. – 2014. – Т. 81(4). – С. 510-514.

213. Kharisov, B.I. Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends / B.I. Kharisov, H.V.R. Dias, O.V. Kharissova [et al.] // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – P. 45354–45381.

214. Demin, A.M. Immobilization of PMIDA on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles surface: Mechanism of bonding / Demin A.M., Mekhaev A.V., Esin A.A. [et al.] // Applied Surface Science. – 2018. – Vol. 440. – Pp. 1196–1203.

215. Demin, A.M. Magnetic-responsive doxorubicin-containing materials based on Fe₃O₄ nanoparticles with a SiO₂/PEG shell and study of their effects on cancer cell lines / A.M. Demin, A.V. Vakhrushev, A.G. Pershina [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – 9093.

216. Arami, H. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles / H. Arami, A. Khandhar, D. Liggitt [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2015. – Vol. 44(23). – Pp. 8576-8607.

217. Kralj, S. Design and Fabrication of Magnetically Responsive Nanocarriers for Drug Delivery / S. Kralj, T. Potrč, P. Kocbek [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 24(5). – Pp. 454-469.

218. Chen, F.H. The grafting and release behavior of doxorubicin from Fe(3)O(4)@SiO(2) core-shell structure nanoparticles via an acid cleaving amide bond: the potential for magnetic targeting drug delivery / F. H. Chen, Q. Gao, J. Z. Ni // Nanotechnology. – 2008. – Vol.

19(16). – 165103.

219. Liang, P. Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy / P.-C. Liang, Y.-C. Chen, C.-F. Chiang [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – Pp. 2021-2037.

220. Дёмин А.М. Дизайн SiO₂/аминопропилсилан-модифицированных магнитных наночастиц Fe₃O₄ для иммобилизации на них доксорубицина / А.М. Дёмин, А.В. Вахрушев, М.С. Валова [и др.] // *Известия АН. Серия химическая*. – 2021. – №5. – С. 987-994.

221. Demin, A.M. Features of doxorubicin adsorption on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with SiO₂ or SiO₂/aminopropylsilane / A.M. Demin, A.V. Vakhrushev, M.S. Valova [et al.] // *Mendeleev Communications*. – 2023. – Vol. 33. – Pp. 160-163.

222. Demin, A.M. Effect of the Silica–Magnetite Nanocomposite Coating Functionalization on the Doxorubicin Sorption/Desorption / A.M. Demin, A.V. Vakhrushev, M.S. Valova [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – 2271.

223. Najafi, M. DFT study of SiO₂ nanoparticles as a drug delivery system: Structural and mechanistic aspects / M. Najafi, A. Morsali, M.R. Bozorgmehr // *Structural Chemistry*. – 2019. – Vol. 30. – Pp. 715–726.

224. Neese, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0 // *Wiley Interdisciplinary Reviews, Computational Molecular Science*. – 2012. – Vol. 2. – Pp. 73–78.

225. Geraldes, C.F.G.C. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging / C.F.G.C. Geraldes, S. Laurent // *Contrast Media & Molecular Imaging*. – 2009. – Vol. 4. – Pp. 1-23.

226. Demin, A.M. Smart design of pH-responsive system based on pHLIP-modified magnetite nanoparticles for tumor MRI / A.M. Demin, A.G. Pershina, A.S. Minin, [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2021. – Vol. 13. – Pp. 36800-36815.

227. Kovrigina, E. Nylon-6-Coated Doxorubicin-Loaded Magnetic Nanoparticles and Nanocapsules for Cancer Treatment / E. Kovrigina, Y. Poletaeva, Y. Zheng, [et al.] // *Magnetochemistry*. – 2023. – Vol. 9. – 106.

228. Kovrigina, E. High drug capacity doxorubicin-loaded iron oxide nanocomposites for cancer therapy / E. Kovrigina, A. Chubarov, E. Dmitrienko // *Magnetochemistry*. – 2022. – Vol. 8. – 54.

229. Xie, P. Stimuli-responsive hybrid cluster bombs of PEGylated chitosan encapsulated DOX-loaded superparamagnetic nanoparticles enabling tumor-specific disassembly for on-demand drug delivery and enhanced MR imaging / P. Xie, P. Du, J. Li, P. Liu // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 205. – Pp. 377-384.

230. Liu, X.L. Magnetic vortex nanorings: a new class of hyperthermia agent for highly efficient in vivo regression of tumors / X.L. Liu, Y. Yang, C.T. Ng [et al.] // *Advanced Materials*. – 2015. – Vol. 27. – Pp. 1939-1944.
231. Chen, X. An injectable and active hydrogel induces mutually enhanced mild magnetic hyperthermia and ferroptosis / X. Chen, H. Wang, J. Shi [et al.] // *Biomaterials*. – 2023. – Vol. 298. – 122139.
232. Xue, W. AMF responsive DOX-loaded magnetic microspheres: transmembrane drug release mechanism and multimodality postsurgical treatment of breast cancer / W. Xue, X.-L. Liu, H. Ma [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2018. – Vol. 6. – Pp. 2289-2303.
233. Barabanova, A.I. Anhydride modified silica nanoparticles: Preparation and characterization / A.I. Barabanova, T.A. Pryakhina, E.S. Afanas'ev [et al.] // *Applied Surface Science*. – 2012. – Vol. 258. – Pp. 3168–3172.
234. Pershina, A.G. Peptide ligands on the PEGylated nanoparticle surface and human serum composition are key factors for the interaction between immune cells and nanoparticles / A.G. Pershina, A.M. Demin, N.A. Perekucha [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2023. – Vol. 221. – 112981.