

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи



ВАХРУШЕВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ

**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ RGD-ПЕПТИДА И ИХ КОНЬЮГАТОВ –
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**

1.4.3. Органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена в лаборатории асимметрического синтеза ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук.

Научные руководители:

кандидат химических наук

ДЁМИН Александр Михайлович;

доктор химических наук, профессор

КРАСНОВ Виктор Павлович.

Официальные оппоненты:

КОРОТАЕВ Владислав Юрьевич,

доктор химических наук, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», ведущий научный сотрудник отдела химического материаловедения Научно-исследовательского института физики и прикладной математики Института естественных наук и математики;

ПЕТРОВ Александр Юрьевич,

доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, профессор кафедры фармации;

СИТНИКОВ Петр Александрович;

кандидат химических наук, доцент, Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Сыктывкар, ведущий научный сотрудник лаборатории ультрадисперсных систем.

Защита состоится «18» декабря 2024 г. в 16:30 часов на заседании диссертационного совета УрФУ 1.4.06.09 по адресу: 620062, Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»: <https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?d=12&rid=6448>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Поспелова Татьяна Александровна

ОСНОВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Создание 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, аптамеры, пептиды, углеводы и др., обеспечивающие их адресную доставку и удержание в опухолевых тканях за счет специфического взаимодействия с молекулами-мишенями.

Семейство RGD-пептидов, содержащих 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 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 фрагмент глутаровой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG). Для оптимизации синтеза пептидов проведен сравнительный анализ ряда конденсирующих агентов в реакциях образования пептидной связи и 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 Fe_3O_4 . Проведена оптимизация нанесения покрытия на основе диоксида кремния на МНЧ и разработаны подходы к иммобилизации противоопухолевого препарата доксорубицина (Dox) на полученные МНЧ. Изучено влияние функциональных групп на SiO_2 -покрытии на сорбцию Dox. Впервые продемонстрировано, что наличие на поверхности наноматериалов стабилизатора *N*-фосфонометилиминодиуксусной кислоты (PMIDA) 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 SiO_2 -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*. Демонстрирована 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 -карбоксильная 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 -карбоксильная 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 PMIDA 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 и ^{11}B ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия, поляриметрия, элементный анализ, рентгено-флуоресцентный анализ, метод динамического и электрофоретического рассеяния света, просвечивающая электронная микроскопия, 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 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 производными RGD-пептида.
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 специфического 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 4 российских конференциях (Москва, Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии 2018; Екатеринбург ФТИ 2020; Екатеринбург Рутений 2021, 2022).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (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 научных изданий, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ, из них 9 статей в журналах, индексируемых международной библиографической базой данных WoS, и в 12 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Личный вклад автора Личный вклад 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 диссертации. Работа состоит из введения, трех глав (литературный обзор (глава 1), обсуждение результатов (глава 2), экспериментальная часть (глава 3)), заключения, списка сокращений и списка литературы (234 наименований), изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 49 рисунков, 33 схемы и 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 и 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 рентгено-флуоресцентного анализа (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, 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. Бызова (ИФМ УрО РАН, г. Екатеринбург), а также к.ф.-м.н. Д.К. Кузнецова и д.ф.-м.н. проф. В.Я. Щур (УрФУ, г. Екатеринбург) за исследование образцов МНЧ комплексом физических методов; к.х.н. доц. А.Л. Шацаускаса, д.х.н. проф. А.С. Фисюка (ОмГТУ, г. Омск) и к.х.н. В.А. Ольшевскую (ИНЭОС РАН, г. Москва) за предоставление исходных соединений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследования. В **обзоре литературы** (глава 1) рассмотрены современные методы синтеза RGD-пептидов, введения линкеров, типы присоединяемых функциональных молекул, методы синтеза МНЧ и способы модификации их поверхности. **Основные результаты** работы приводятся в главе 2, где обсуждаются результаты разработки методов получения новых производных RGD-пептидов; методы синтеза защищенных пептидов, в том числе содержащих линкер в виде глутаровой кислоты; методы конъюгации полученных пептидов с флуоресцентными красителями, карборанами, МНЧ и изучение их физико-химических свойств и биологической активности. В **экспериментальной части** (глава 3) описаны использованное оборудование, методы синтеза и характеристики полученных соединений.

Глава 2 Обсуждение результатов

2.1 Синтез линкерсодержащих производных RGD-пептида

Для получения целевых пептидов использованы методы классического пептидного синтеза в растворе. При этом были использованы три стратегии синтеза, отличающиеся по набору защитных групп и методу деблокирования целевых соединений. Синтез пептидов начинали с *C*-конца, исходя из алкиловых эфиров Asp путем последовательного присоединения *N*-защищенных производных Gly и Arg (схема 1). Защита гуанидиновой группы Arg и карбоксильных группы Asp подбиралась так, чтобы она сохранялась в ходе синтеза пептида, но могла быть удалена в одну или две стадии на последнем этапе.

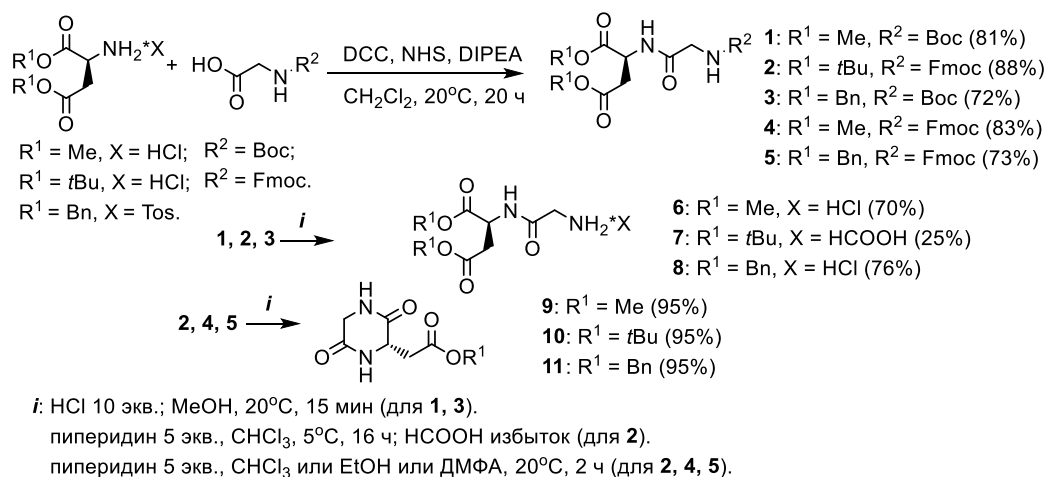
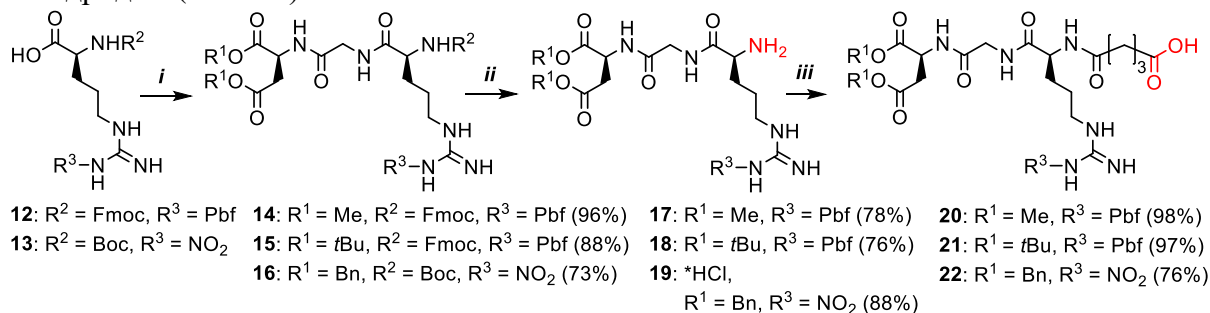


Схема 1

Если для дипептидов **1** и **3** удаление Boc-защиты ацидолизом проходило гладко, то удаление Fmoc-группы дипептидов **2, 4, 5** пиперидином сопровождалось образованием побочных продуктов – 2,5-дикетопиперазинов **9–11**. Однако для соединения **2** оптимизация условий удаления Fmoc-группы (снижение температуры с 20 до 5 °C и увеличение времени реакции с 2 до 16 ч) все же позволила выделить целевой продукт **7** в виде формиата с выходом 25%. Для синтеза трипептидов дипептиды **6–8** конденсировали с защищенными производными Arg **12** или **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).



i: **6-8**, TBVTU, DIPEA, CH₂Cl₂, 20°C, 20 ч. *ii:* пиперидин, MeOH, 2 ч (для **14, 15**); HCl 10 экв., ТГФ, 15 мин (для **16**).
iii: глутаровый ангидрид, CH₂Cl₂, 20°C, 20 ч.

Схема 2

На стадиях синтеза дипептида **1** и трипептида **14** был проведен сравнительный анализ конденсирующих реагентов ряда карбодиимидов и урониевых солей. Наиболее эффективными оказались агенты урониевой природы (TBVTU и HBTU) (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный анализ конденсирующих агентов.

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

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

Для синтеза тетрапептидных производных RGD-пептида, трипептид **17** со свободной α-аминогруппой Arg конденсировали либо с соединением **23**, либо с

соединением **24**. Затем удаляли Fmoc-защиту пиперидином и вводили линкер (глутаровую кислоту) путем конденсации тетрапептидов **27**, **28** с глутаровым ангидридом (схема 3).

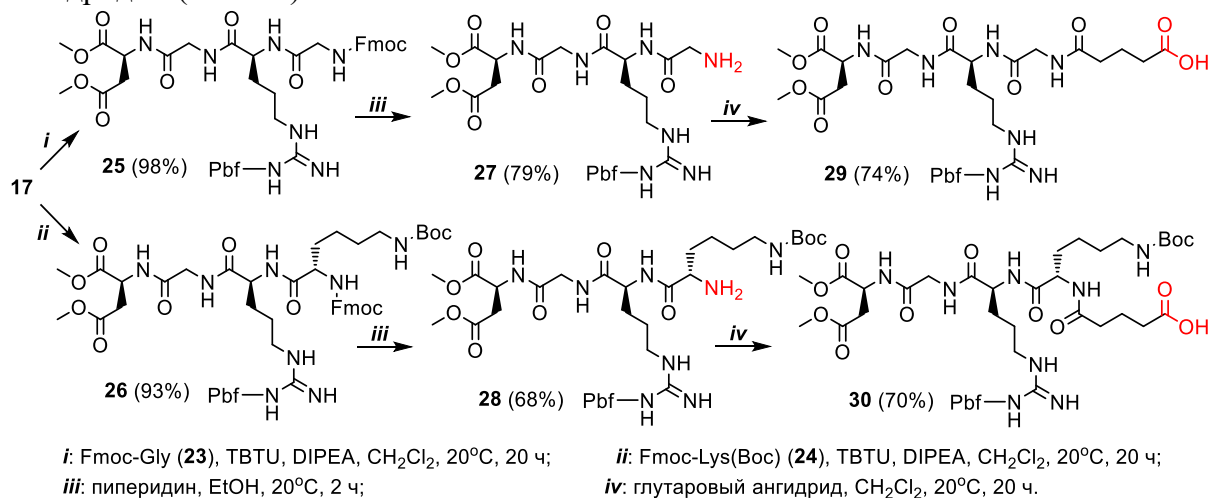


Схема 3

В результате разработаны методы синтеза избирательно защищенных производных RGD трипептидов **17–19** и тетрапептидов **27** и **28**, имеющих свободную аминогруппу, а также новых производных, содержащих линкер – глутаровую кислоту (**20–22**, **29**, **30**) со свободной карбоксильной группой.

Защитные группы боковых цепей аминокислот могут быть удалены на последней стадии. 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

Конъюгаты флуоресцентных красителей (нового красителя **31**, производного пиридинона, а также красителей, используемых в биологической практике, FITC (**32**) и Cyanine5.5 (Cy5.5-NHS, **33**)) с пептидами **17**, **18** были получены напрямую или через линкер. Для конденсации использовали красители, молекулы которых содержали свободные карбоксильные группы или группы в активированной форме.

В работе был использован новый флуоресцентный краситель **31**¹. Конъюгат **34** получали конденсацией пептида **18** и соединения **31** с использованием конденсирующего агента TBTU. Конъюгат **35** получали конденсацией пептида **18** с FITC (**32**). Защитные группы соединений **34** и **35** удаляли в TFA/H₂O (95:5) в течение 4 ч при комнатной температуре. Деблокированные соединения **36** и **37** выделяли в виде трифторацетатов (схема 4).

Для конъюгата пептида с Cy5.5-NHS (**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 TFA/H₂O (95:5) происходило разложение соединения **39**, и выделить целевой продукт **40** не удалось (схема 5).

¹ Синтезирован в ОмГТУ (г. Омск) под руководством д.х.н. проф. Фисюка А.С.

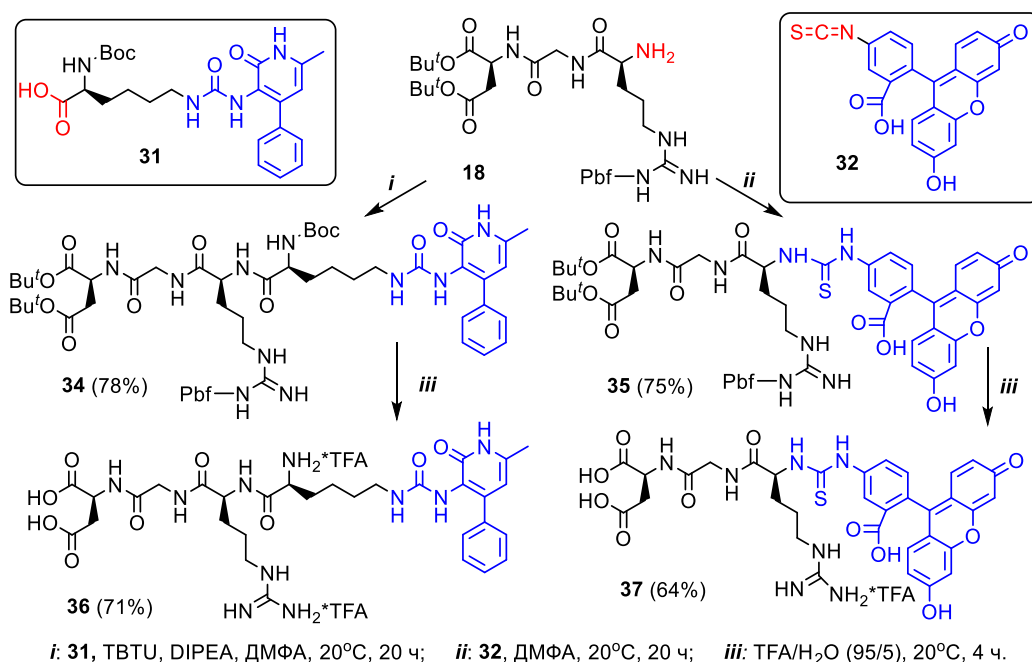


Схема 4

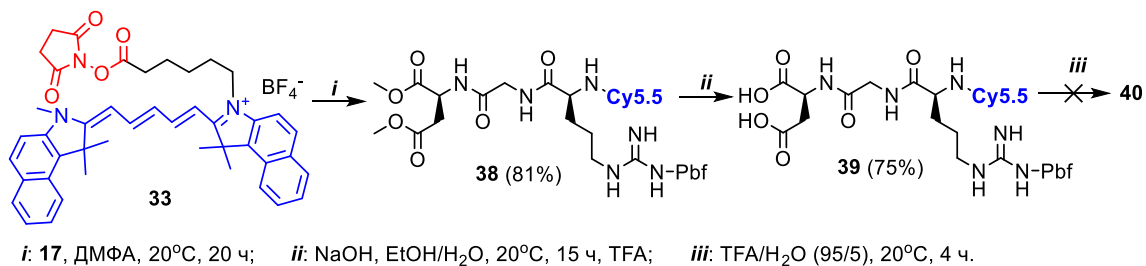


Схема 5

Для решения данной проблемы, а также для увеличения растворимости целевого соединения в воде был разработан подход к синтезу PEG-содержащего конъюгата **43** пептида **17** и Cy5.5 с использованием молекулы бифункционального PEG ($M = 2000$ Да) в качестве линкера (схема б). Деблокирование боковых функциональных групп пептида удалось провести в стандартных условиях. Полученный конъюгат **44** оказался легкорастворимым в воде.

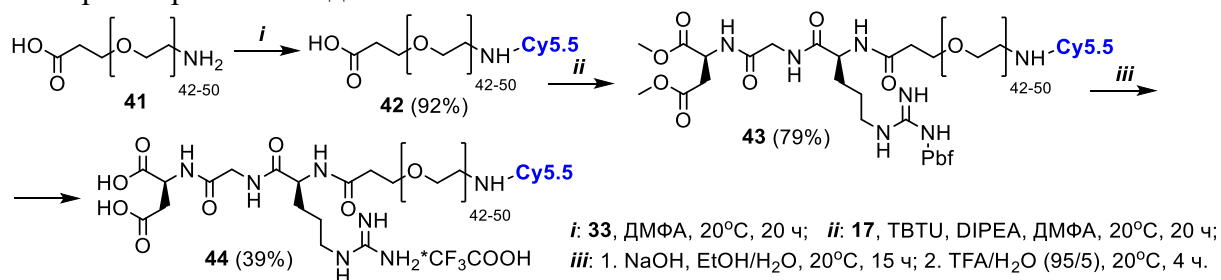


Схема б

Спектры поглощения и испускания полученных соединений соответствовали спектрам поглощения и испускания исходных красителей, что говорит о сохранении их флуоресцентных свойств (рисунок 1).

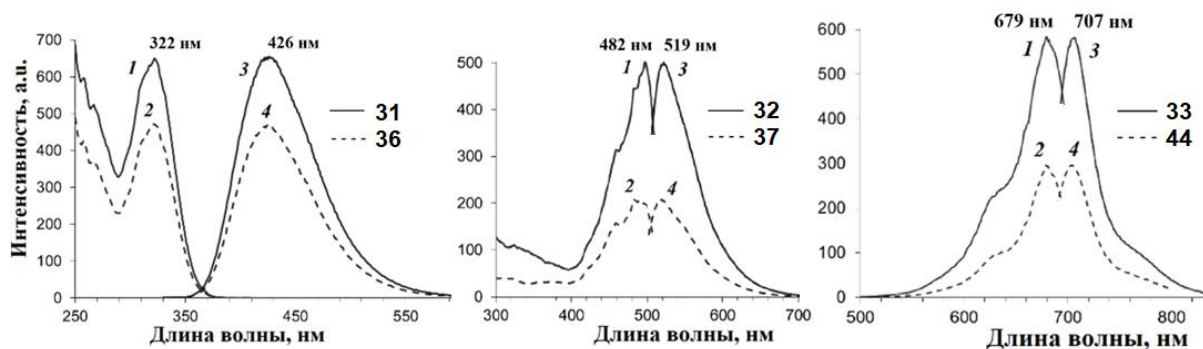


Рисунок 1 – Спектры флуоресценции ((1, 2) спектры поглощения и (3, 4) спектры испускания) исходных красителей **31–33** и их конъюгатов **36, 37, 44**.

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

Еще одним примером функциональных молекул, которые можно присоединить к RGD-пептиду, являются соединения боранового ряда. Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – это терапия, принцип которой основан на свойстве изотопа ^{10}B захватывать тепловые нейтроны, распадаясь на ядра ^4He и ^7Li . Если эта реакция происходит в ткани, обе частицы эффективно разрушают клетки благодаря их свойству высокой линейной передачи энергии. Из-за небольшого пробега данных частиц в ткани (около 5–9 мкм) повреждение остается почти полностью ограниченным теми клетками, которые содержат атомы ^{10}B . 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. Проведен синтез конъюгатов **49–54** на основе производных RGD-пептида **20–22**, содержащих в составе линкер (глутаровую кислоту), и карборанов **45–47**. Синтез проводили методом смешанных ангидридов с использованием этилхлорформата (схема 7).

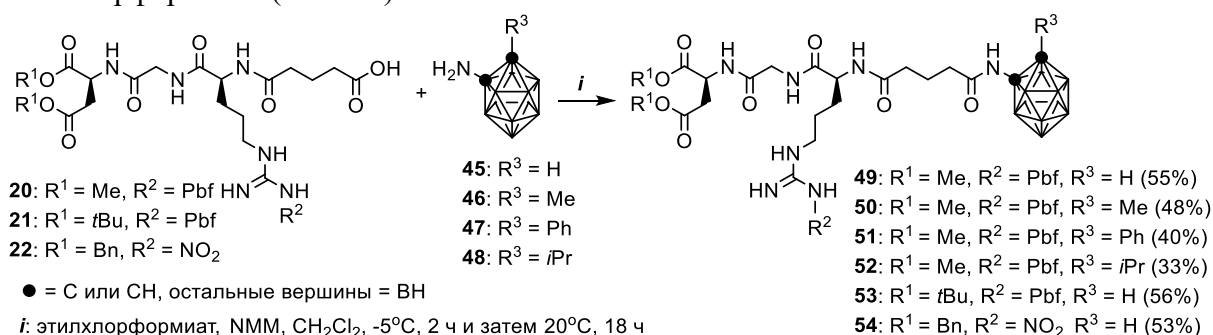


Схема 7

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. Функциональные группы соединений **49, 53, 54** деблокировали (схема 8). Соединения **55** и **56** содержали целевой продукт (по данным ЯМР), но полностью их очистить не удалось.

С целью получить соединения, содержащие большее количество атомов бора и потенциально более эффективные для БНЗТ, нами были получены ди-карборановые

производные KRGD-пептида путем конденсации производного Lys **57**, содержащего два карборановых ядра, с трипептидами **17–19**, имеющими разные типы защиты функциональных групп (схема 9). Наибольший выход (95%) достигнут при удалении защитных групп ацидолизом. Удаление защиты соединений **49** и **58** в условиях щелочного гидролиза приводило к разложению пептидной части молекулы (схемы 8, 9).

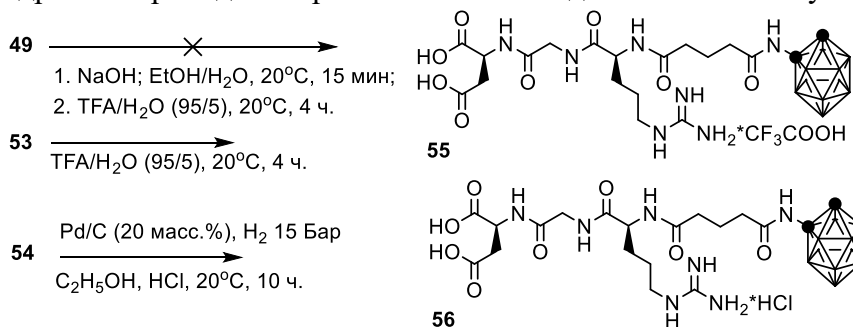


Схема 8

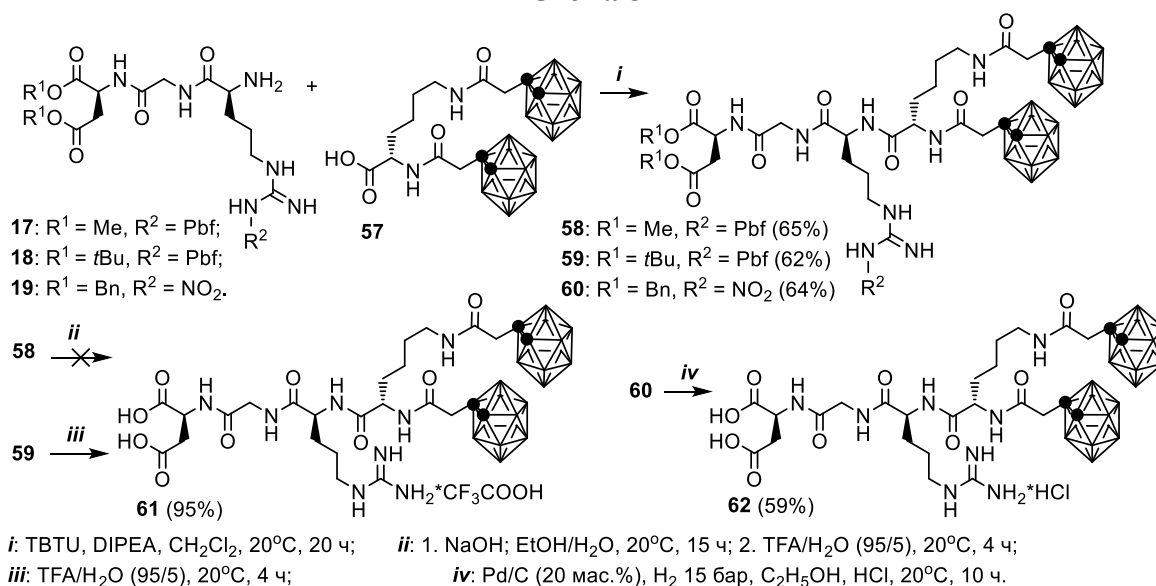


Схема 9

Однако водорастворимость соединений **61** и **62** составляла всего 0,1 мг/мл. Чтобы увеличить гидрофильность, необходимую для проведения биологических испытаний, проведена реакция деборирования соединения **61** в присутствии CsF, в результате которой карборановое ядро переходит из закрытой *клозо*-формы в открытую *нидо*-форму, имеющую делокализованный отрицательный заряд и склонность к солеобразованию с положительно заряженными ионами (схема 10).

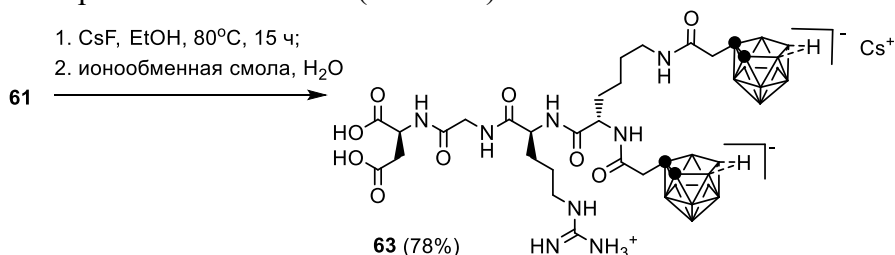


Схема 10

Водорастворимость полученного соединения **63** увеличилась до 5 мг/мл. Так как относительно C–C связи в карборановом ядре могут элиминироваться различные атомы В, 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. Наибольший общий выход (~13% для **56** и для **62**) по всем стадиям синтеза, начиная с дипептида, был достигнут для стратегии с использованием защиты, удаляемой гидролизом. Соединение **63** легко растворимо в воде и может оказаться эффективным агентом для БНЗТ опухолей.

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

С целью получения наноконъюгатов производных RGD-пептида и МНЧ нами проведен синтез наночастиц **64** на основе Fe_3O_4 методом соосаждения (схема 11). Для ковалентного присоединения к ним RGD-пептида, проведена химическая модификация поверхности МНЧ 3-аминопропилтриметоксисиланом (АРТМС) в водно-спиртовой среде по аналогии с ранее разработанными методиками. В результате были получены МНЧ **65**, содержащие на поверхности NH_2 -группы, которые далее конденсировали с защищенным GRGD-пептидом **29**, через линкер в виде глутаровой кислоты. Защитные группы удаляли в стандартных условиях (схема 11).

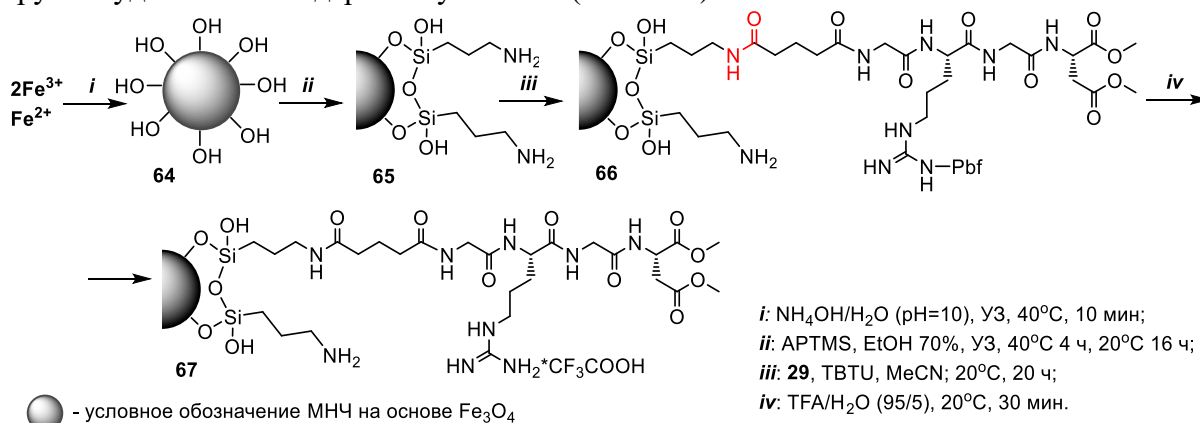


Схема 11

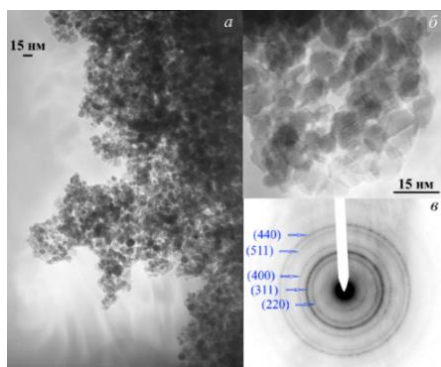


Рисунок 2 – Изображения ПЭМ (а, б) и электронограмма (в) МНЧ **67**.

Диаметр МНЧ **67** по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) составил 11 нм (рисунки 2а и 2б). Электронограмма полученных МНЧ соответствует электронограмме магнетита и свидетельствует о том, что фазовое состояние шпинели Fe_3O_4 не изменялось в ходе модификации (рисунок 2в). 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. Значения коэрцитивной силы обоих образцов близки к нулю. Данными ИК-спектроскопии подтверждена ковалентная модификация поверхности МНЧ GRGD-пептидом. На основе данных элементного анализа проведена количественная оценка органических компонентов на каждой стадии модификации МНЧ. Синтезированный наноконъюгат **67** содержал 19 мкмоль производного RGD-пептида в расчете на 1 г наночастиц.

В результате разработан метод синтеза конъюгата производного RGD-пептида **29**,

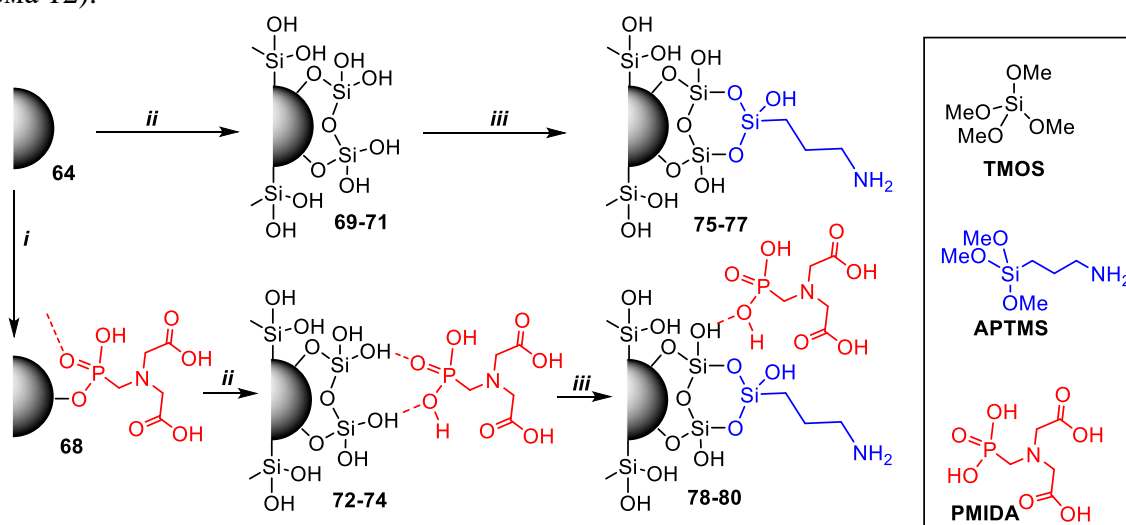
содержащего остаток глутаровой кислоты в качестве линкера, с МНЧ на основе Fe_3O_4 , модифицированных фрагментами 3-аминопропилсилана (APS). Результаты могут быть использованы в дальнейшем для дизайна диагностических материалов.

2.4.2 Разработка метода нанесения SiO_2 /APS-покрытия на МНЧ

С целью получения магнитных наноматериалов, которые можно рассматривать как платформу для иммобилизации биологически активных молекул, изучен процесс нанесения на МНЧ SiO_2 -покрытия и дальнейшей его функционализации APS.

Известно, что ПАВ (в частности, карбоновые, фосфоновые, сульфоновые кислоты и др.) позволяют получать устойчивые водные коллоидные растворы МНЧ, что в свою очередь положительно сказывается на нанесении на них SiO_2 -покрытия: можно избегать образования химически связанных агломератов частиц; контролировать толщину покрытия, создавать пористые покрытия. Покрытие наночастиц оболочкой SiO_2 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 немодифицированные МНЧ **64**, так и наночастицы **68**, модифицированные PMIDA, которые были получены в соответствии со схемой 13. МНЧ **64** и **68** покрывали SiO_2 -оболочкой с использованием тетраметоксисилана (TMOS), взятого в 1,5; 3,0; 5,0 кратном мольном избытке по отношению к МНЧ, и получали частицы **69–74**. Далее осуществляли APS-функционализацию и получали МНЧ **75–80**, содержащие на поверхности NH_2 -группы (схема 12).



i: PMIDA, H_2O , 40°C, 4 ч, 20°C, 16 ч;

ii: TMOS 1,5; 3,0; 5,0 мол.экв., NH_4OH ; EtOH 70%, УЗ, 40°C, 4 ч, 20°C, 16 ч;

iii: APTMS, NH_4OH ; EtOH 70%, УЗ, 40°C, 4 ч, 20°C, 16 ч.

Схема 12

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.

Для APS-модифицированных МНЧ **75–80** проведено измерение удельной поверхности ($S_{\text{уд}}$) методом BET. Показано, что SiO_2 -покрытие в случае использования PMIDA-модифицированных МНЧ имеет более высокую $S_{\text{уд}}$ в сравнении с покрытием МНЧ, полученным без стабилизаторов. Был измерен D_h и распределение МНЧ 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 параметры D_h и PdI (индекс полидисперсности) по сравнению с немодифицированными МНЧ **75–77** (таблица 2). Размеры частиц в сериях МНЧ **75–77** и **78–80**, полученных с использованием 1.5-, 3-, 5-кратных мольных избытков TMOs, закономерно возрастали.

Таблица 2 – Физико-химические характеристики МНЧ **75–80**.

МНЧ	%C	$S_{уд}$, м ² /г	D_h , нм (PdI)
75	2,02	101	265 (0,24)
76	1,97	122	325 (0,26)
77	2,44	95	326 (0,25)
78	4,02	61	137 (0,12)
79	3,79	110	151 (0,13)
80	3,34	239	289 (0,36)

По данным ПЭМ средний диаметр исходных МНЧ **64** составлял 9 нм. Диаметр МНЧ **78–80**, полученных из PMIDA-стабилизированных наночастиц, по данным СЭМ увеличился до 15, 18 и 29 нм соответственно (толщина SiO₂-оболочки для МНЧ **78–80** составляла 3, 4.5, 10 нм соответственно).

Таким образом, 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

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 13).

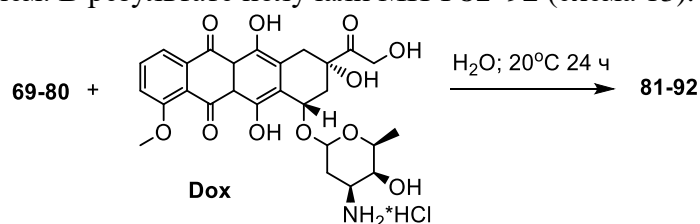


Схема 13

Иммобилизацию Dox качественно подтверждали данными CHN-элементного анализа и ИК спектроскопии. Количество иммобилизованного Dox определяли косвенно как разницу концентраций Dox в исходном растворе и в фугатах, выделенных после проведения сорбции. Концентрацию Dox в водных растворах определяли методами ВЭЖХ, флуориметрии и УФ-спектрофотометрии. Наиболее точным оказался метод УФ-спектрофотометрии ($\lambda_{max} = 480$ нм). Для МНЧ, загруженных Dox, рассчитывали два параметра: эффективность загрузки (LE) и уровень загрузки (LC). Значения LC и LE увеличивались с ростом площади удельной поверхности и доли SiO₂ в образцах. Лучшие показатели LC и LE были достигнуты для PMIDA-стабилизированных МНЧ (рисунок 3).

Для МНЧ **81–92** исследовали процесс десорбции Dox. Известно, что опухолевые ткани имеют среду с пониженным pH (<7), кроме того, при попадании внутрь клетки по

эндоцитозному механизму МНЧ оказываются в лизосомах, pH среды в которых ~ 4,5. Поэтому была исследована десорбция Dox из МНЧ **81–92** в фосфатных буферных растворах (PBS) с pH = 5,8 и 7,4. Количество выделившегося Dox определяли методом флуоресцентной спектроскопии ($\lambda_{ex} = 480$ нм, $\lambda_{em} = 590$ нм). Так, коллоидные растворы МНЧ выдерживали в течение 24 ч при 37°C, после чего МНЧ осаждали центрифугированием, а в полученных фугатах определяли количество Dox.

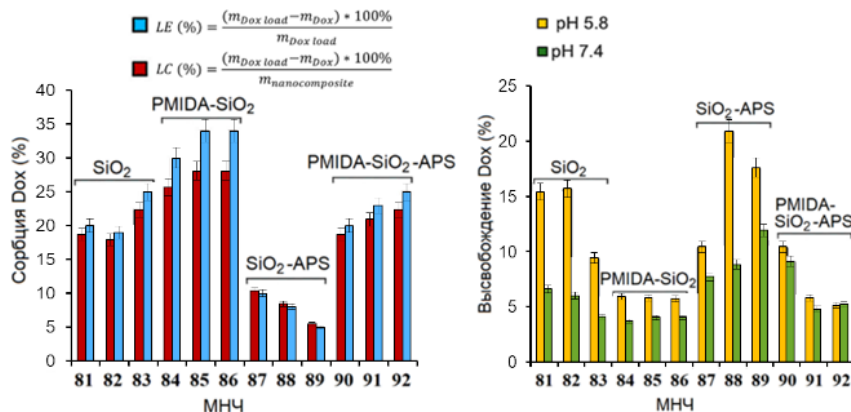


Рисунок 3 – Данные по сорбции и десорбции для МНЧ **81–92**.

Одновременно происходит протонирование аминогрупп Dox ($pK_a = 8,2$) и разрушение нековалентных связей с поверхностными атомами носителя. Присутствие на поверхности МНЧ молекул APS способствует процессу десорбции. Наличие же на поверхности МНЧ молекул PMIDA понижает эффективность десорбции.

В результате, продемонстрирована возможность иммобилизации противоопухолевого препарата 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 TMOs, использованием PMIDA, без APS-модификации. 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 наночастиц и уменьшить их распознавание и захват клетками макрофагальной системы. Нами изучена возможность нанесения PEG-покрытия на SiO₂-покрытие, содержащее как аминогруппы (МНЧ, модифицированные APS), так и карбоксильные группы (МНЧ, модифицированные [(3-триэтоксисилил)пропил]янтарным ангидридом (TESPSA)), 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 NH₂-группы, модифицировали молекулами PEG **93**, имеющими активированную карбоксильную группу (схема 14). Используя различные массовые соотношения PEG(**93**):МНЧ(**75**) (1:2, 1:10, 1:50), мы получили наноконъюгаты **94a-в** соответственно. Продемонстрировано, что МНЧ, полученные с использованием больших количеств PEG, обладали лучшими параметрами (таблица 3). Как оказалось, традиционный метод

В результате продемонстрирована pH-зависимая десорбция Dox с синтезированных материалов (рисунок 3), которая объясняется протонированием силанольных групп и гидрофобизацией SiO₂-поверхности в средах с пониженным pH.

сорбции (сорбция Dox в воде или в PBS (pH = 7,4) при комнатной температуре), применяемый в большинстве работ, не позволил достичь удовлетворительных результатов. Поэтому мы провели иммобилизацию в PBS с pH = 7,8 при нагревании до 50 °C с последующим охлаждением до комнатной температуры.

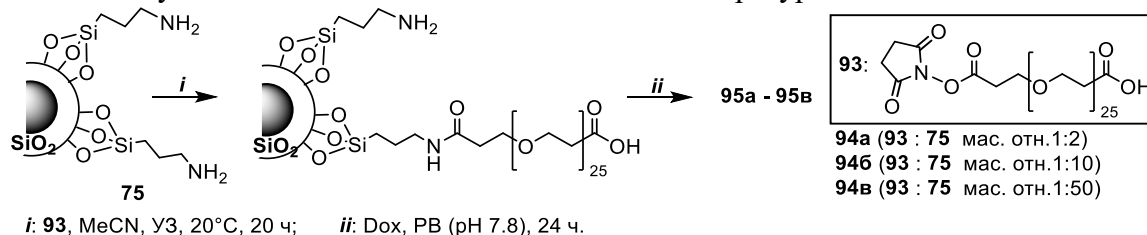


Схема 14

Эффективность процесса оценивали по параметрам LE и LC по аналогии с методом, описанным в разделе 2.4.3 (таблица 3).

Таблица 3 – Гидродинамические характеристики МНЧ и данные о сорбции на них Dox.

МНЧ	Данные ДРС			МНЧ	Данные ДРС			Сорбция	
	D_h , нм	PdI	Z^{av} , мВ		D_h , нм	PdI	Z^{av} , мВ	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

В результате 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**, средний размер которых составил ~12 нм (рисунок 4а). Удельная намагниченность насыщения для синтезированных МНЧ **94б** и **95б** составила 50 и 39 А·м²/кг соответственно. Для полученных МНЧ **94б** и **95б** с использованием генератора переменного высокочастотного магнитного поля (AMF) были измерены скорости разогревания при наложении AMF и рассчитаны значения удельного поглощения энергии (SAR) и мощность внутренних потерь (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 4б). Показано, что МНЧ **75**, **94б** и **95б** имели сопоставимые значения SAR – 54, 48, 62 Вт/г [Fe], и ILP – 0,51, 0,45, 0,58 нН м²/кг соответственно.

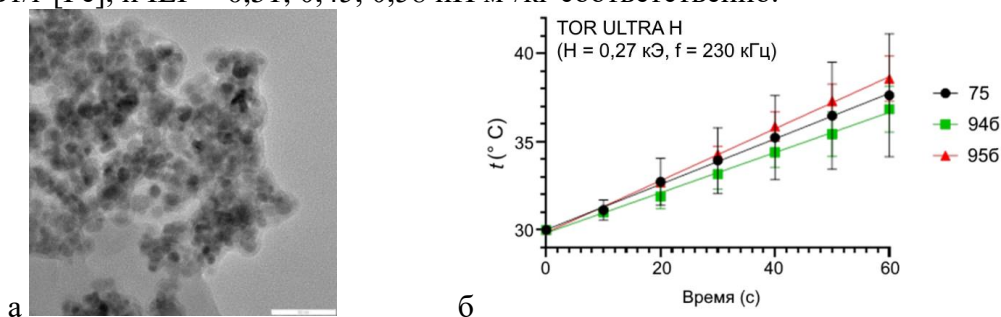


Рисунок 4 – (а) Изображения ПЭМ МНЧ **95б**. (б) Начальный линейный участок кривых нагрева водных суспензий МНЧ **75**, **94б**, **95б** с концентрацией 10 мг[Fe]/мл.

Таким образом, получен и охарактеризован физико-химическими методами новый наноконъюгат на основе МНЧ, 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 при наложении AMF, а наличие у водных коллоидных растворов материала высоких значений релаксивности r_2

(188 1/с mM) позволит проводить визуализацию распределения 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, силан **96** 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 15).

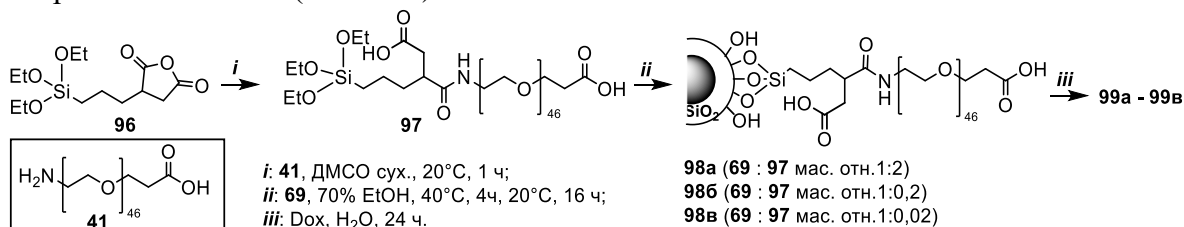


Схема 15

Для оптимизации реакции модификации МНЧ PEG 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 и 1:0,02 (схема 15) и получали МНЧ **98а–98в** соответственно. Закрепление конъюгата **97** на поверхности МНЧ происходило за счет образования Si–O–Si связи. Иммунизацию PEG подтверждали данными элементного анализа, РФА, ИК-спектроскопии. Эффективность сорбции оценивали по параметрам LE и LC по аналогии с методом, описанным в разделе 2.4.3. В результате оптимальными по уровню загрузки и по гидродинамическим характеристикам оказались МНЧ **98а**, **99а** (средний диаметр по ПЭМ составил ~13 нм (рисунок 5а)), которые и были наработаны, для дальнейших биологических исследований. M_s для синтезированных МНЧ **98б** и **99б** составила 53 и 48 А·м²/кг соответственно. Для полученных МНЧ **99а** с использованием генератора АМФ 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 5б). Показано, что МНЧ **99а** имели значения SAR – 11,4 Вт/г [Fe] и ILP – 0,11 нН м²/кг.

Для МНЧ **99а** было изучено выделение Dox в средах с pH = 5,8 и 7,4, в том числе с использованием АМФ (непрерывное воздействие в течение 1 ч). Количество выделившегося Dox определяли методом флуоресцентной спектрометрии ($\lambda_{ex} = 480$ нм, $\lambda_{em} = 590$ нм). Продемонстрировано, что при pH = 5,8 выделение было наибольшим, при этом использование АМФ усиливало десорбцию Dox (рисунок 5в).

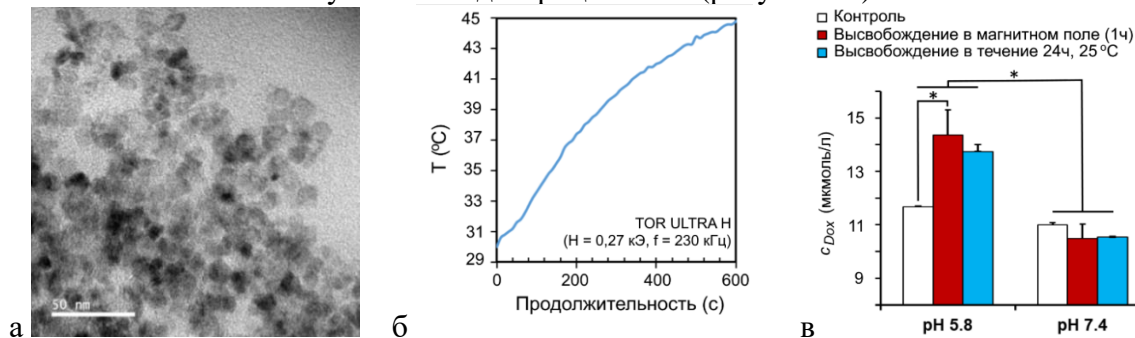


Рисунок 5 – (а) Изображение ПЭМ и (б) кривая нагрева для МНЧ **99а**. (в) Высвобождение Dox из МНЧ **99а** в средах с различным pH под воздействием (и без) АМФ (контроль – высвобождение Dox из МНЧ **99а** в течение 1 ч в отсутствии воздействия АМФ), * – достоверность отличий.

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 pH-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 получен наноконъюгат **105**, содержащий ядро на основе Fe₃O₄, SiO₂/APS-оболочку с флуоресцентной меткой Cy5 (для визуализации накопления МНЧ в клетках оптическими методами) и имеющий PEG-покрытие с ковалентно связанным циклическим пептидом *c*(RGDfC). Для этого часть аминогрупп МНЧ **78** конденсировали с активированным эфиром Cy5 **100**, взятым в количестве 0,75 масс.% по отношению к МНЧ. Далее наносили PEG-покрытие путем конденсации аминогрупп APS-фрагментов с активированным эфиром PEG **102**. Ковалентно закрепленный PEG имел 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 16). Средний диаметр МНЧ **105** составил 22–26 нм (рисунок 6) (средний диаметр ядра – 9 нм). Наличие у водных коллоидных растворов МНЧ **105** высоких значений релаксивности r_2 (189 1/с мМ) позволит проводить их визуализацию в тканях методом МРТ.

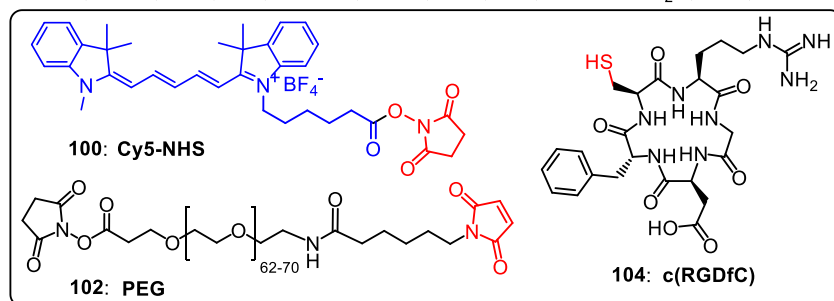
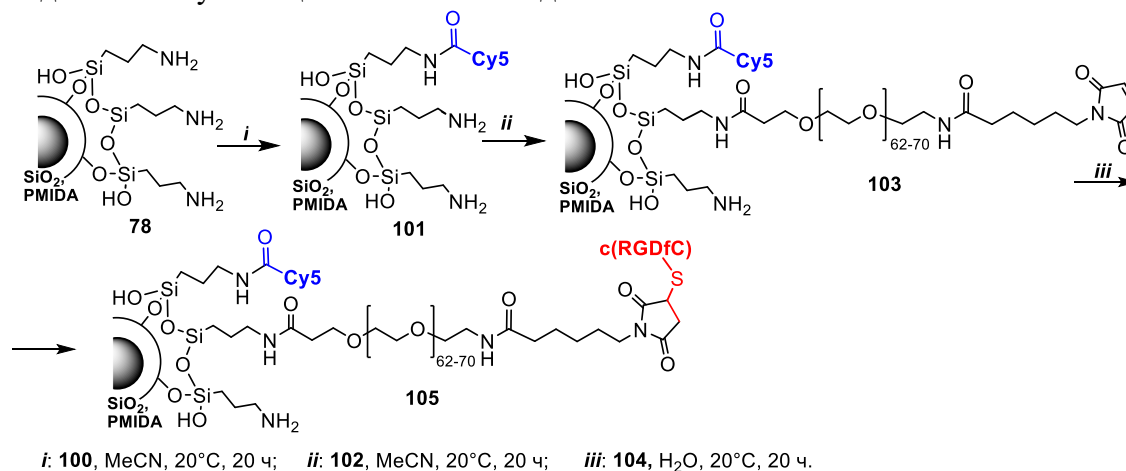


Схема 16

Используя этот же подход, были получены наноконъюгаты **111**, **112** на основе МНЧ Fe₃O₄ (в синтезе использованы как PMIDA-модифицированные, так и не стабилизированные МНЧ), имеющие SiO₂/APS-оболочку, модифицированную конъюгатом PEG и RGD-пептида **106**, и содержащие флуоресцентную метку. Для этого защищенный RGD-пептид **18** со свободной α-аминогруппой L-Arg конденсировали с

NHS-эфиром PEG **93** (схема 17).

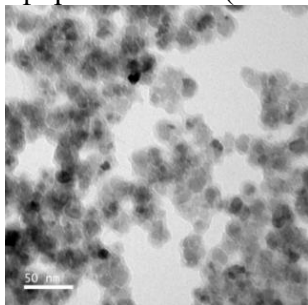


Рисунок 6 – Изображение ПЭМ МНЧ **105**.

Далее конъюгат **106** конденсировали с NH₂-группами на поверхности МНЧ **75** и **78** в соотношении МНЧ:конъюгат 5:1. Защитные группы пептида МНЧ **107** и **108** удаляли ацидолизом в TFA/H₂O (95:5) и получали МНЧ **109** и **110** (схема 17). Наличие каждого присоединяемого фрагмента оценивали по ИК-спектрам, данным РФА и элементного анализа. На примере красителя Cy5 продемонстрирована возможность введения в структуру наноконъюгата флуоресцентной метки.

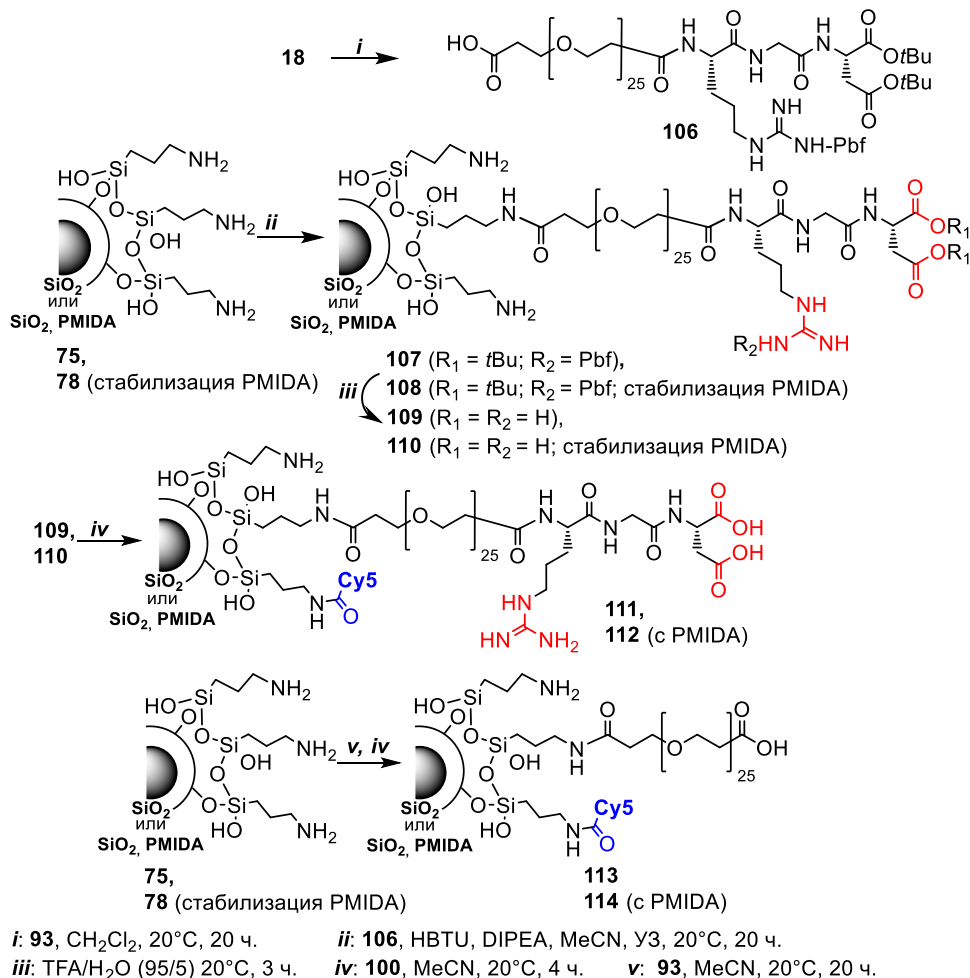


Схема 17

Чтобы избежать деструкции цианинового красителя в сильноокислых условиях, как это произошло в случае соединения **40**, Cy5 вводили на последнем этапе путем

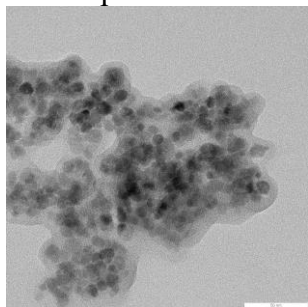


Рисунок 7 – Изображение

конденсации свободных аминогрупп APS с Cy5-NHS **100** (схема 17). Для проведения биологических экспериментов также были синтезированы PEG-модифицированные МНЧ **113** и **114** (на основе МНЧ и PMIDA-модифицированных МНЧ соответственно) аналогичного строения, меченные Cy5, но не содержащие фрагмента RGD. Спектры флуоресценции полученных наноконъюгатов **111–114** соответствовали спектрам красителя Cy5. Средний диаметр ядра наноконъюгатов составил 9 нм, а толщина оболочки 4–

ПЭМ МНЧ **110**. 7 нм (рисунок 7).

Водные коллоидные растворы МНЧ **110** имели высокие значения релаксивности r_2 (189 1/с mM), что позволит проводить их визуализацию в тканях с помощью МРТ. Образцы, полученные на основе PMDA-стабилизированных МНЧ, содержат большее количество пептида, а также имеют лучшие гидродинамические характеристики, чем образцы, полученные на основе нестабилизированных МНЧ. Синтезированные наноконъюгаты могут представлять интерес для диагностики 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, проводили в отношении клеток нормальной ткани WI-38 и клеток опухолевых тканей человека A549, SK-BR-3, SNU-1, Jurkat ². Производные *нидо-*карборана не проявили выраженного цитотоксического эффекта на все типы исследуемых тканей. Производные *клозо-*карборана проявили выраженную цитотоксичность на все типы исследуемых тканей в концентрации менее 0,1 мМ. С учетом хорошей растворимости производных *нидо-*карборана в водных средах, они являются более подходящими кандидатами для разработки на их 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

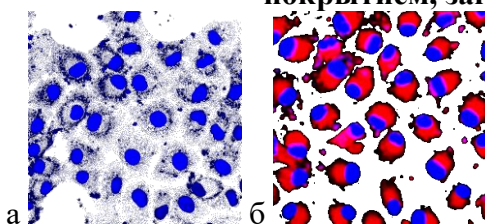


Рисунок 8 – Изображения конфокальной микроскопии (а) исходных клеток HEK-293, окрашенных Hoechst 33342 (синий), и (б) клеток после 24 ч инкубации с МНЧ **86**.

Оценку цитотоксичности (МТТ-тест) МНЧ **81–92**, загруженных Dox, и исходных для них МНЧ **69–80** проводили в отношении клеток HEK-293 ³. С помощью конфокальной микроскопии продемонстрирована десорбция Dox (красный) с МНЧ **86** и его накопление внутри клеток HEK-293 (рисунок 8).

Цитотоксичность МНЧ **95б**, загруженных Dox, и исходных для них МНЧ **94б**, оценивали в отношении фибробластов (BJ-5ta) и опухолевых клеточных линий человека (4T1, MDA-MB231) ⁴. Продемонстрировано, что МНЧ **95б** проявляют дозозависимый токсический эффект в отношении всех типов клеток в тестируемом диапазоне концентраций (0-80 мкг[Fe]/мл), при этом цитотоксичность в отношении фибробластов была заметно менее выражена. МНЧ **94б**, не содержащие Dox, выраженный токсический эффект не проявили.

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

Цитотоксичность МНЧ **99а**, загруженных Dox, и исходных для них МНЧ **98а** оценивали в отношении опухолевых клеточных линий человека и мыши: MDA-MB231, HerG2, 4T1, CT26, B16. МНЧ **99а** проявили дозозависимый токсический эффект в отношении всех типов клеток в исследуемом концентрационном диапазоне (0-335

² Исследования проведены в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва) под руководством к.фарм.н. Барышниковой М.А.

³ Исследования проведены в ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург) к.б.н. Поздиной В.А. и Мининым А.С.

⁴ Исследования проведены в ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск) Ефимовой Л.В. и Семчиной А.А. под руководством к.б.н. А.Г. Першиной

мкг[Fe]/мл) (эффект при концентрации МНЧ от 20,9 мкг[Fe]/мл, был сопоставим с цитотоксичностью раствора Dox в концентрации 582 мкг/мл (1 мкМ)).

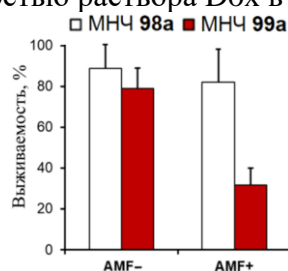


Рисунок 9 – Жизнеспособность клеток линии 4Т1 в зависимости от инкубации с МНЧ 98а и 99а без (-) и при использовании AMF (+).

На примере МНЧ 99а дополнительно было изучено цитотоксическое действие в отношении 4Т1 с использованием генератора AMF TOR Ultra HT ($H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц), и показано усиление гибели клеток в 2,5 раза при наложении переменного магнитного поля (AMF) в присутствии синтезированных МНЧ 99а в сравнении с исходными МНЧ 98а (без Dox) (рисунок 9).

2.5.3 Оценка эффективности материалов на основе МНЧ для терапии опухолей в опытах *in vivo*⁵

Проведена оценка противоопухолевой активности МНЧ 956 в отношении опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c при внутривенном и внутриопухолевом способе введения препарата. Для оценки терапевтической эффективности применения наночастиц в сочетании с воздействием AMF (TOR Ultra HT, $H = 0,27$ кЭ, $f = 230$ кГц) измеряли объем и массу опухоли, рассчитывали индекс торможения роста опухоли (ТРО), проводили анализ выживаемости. Показано, что внутриопухолевое введение МНЧ 956 в дозе 0,3 мг с последующим воздействием AMF оказывает слабую противоопухолевую активность (индекс ТРО до 20%) в отношении опухоли 4Т1 у мышей линии BALB/c (рисунок 10а), но при этом тормозит процессы метастазирования в легкие и брюшную полость, а также увеличивает выживаемость мышей (до 100%) по сравнению с группой животных, которые проходили терапию Dox или контролем (рисунок 10б).

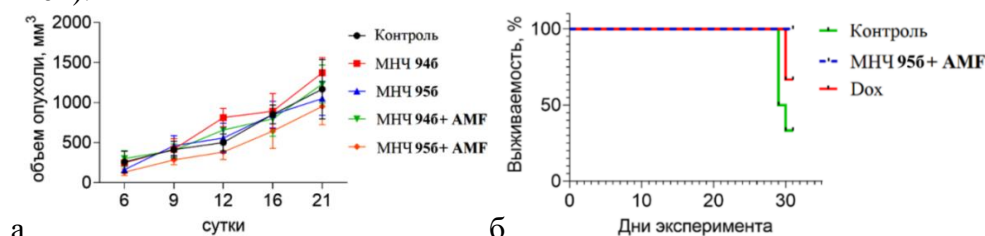


Рисунок 10 – (а) Размер опухоли 4Т1 после внутриопухолевого введения МНЧ 946 и 956, в том числе, с последующим воздействием AMF. (б) Влияние терапии на выживаемость животных, кривые выживаемости Каплана-Мейера.

2.5.4 Оценка цитотоксичности МНЧ, содержащих RGD-пептид⁵

Была исследована цитотоксичность (MTT-тест) МНЧ 111–114 на клеточной линии НЕК293 и опухолевых линиях 4Т1 и MDA-MB231. В целом исследуемые МНЧ понижали выживаемость клеток, причем в большинстве случаев спустя 48 ч инкубации цитотоксический эффект усиливался. Продемонстрирована возможность поглощения RGD-модифицированных МНЧ клетками на примере клеток линии MDA-MB231 и возможность оценки их количества флуориметрическим методом.

2.5.5 Оценка специфического связывания МНЧ, содержащих RGD-пептид, с клетками опухолевой линии MDA-MB231_27 с повышенной экспрессией интегрина $\alpha v \beta 3$ ⁵

Проведено исследование возможности специфического связывания МНЧ 105,

⁵ Исследования проведены в ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск) Ефимовой Л.В. под руководством к.б.н. А.Г. Першиной

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 интегрин $\alpha\beta_3$ (основной мишени RGD-пептида) (рисунок 11).

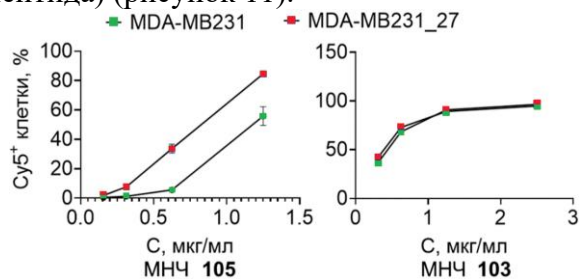


Рисунок 11 – Оценка поглощения МНЧ **105** и **103** клетками.

Показано, что разработанная конструкция МНЧ **105**, модифицированных производным RGD-пептида, специфично связывается с клетками MDA-MB231_27 (в отличие от МНЧ **103**) и может оказаться эффективной платформой для адресной доставки препаратов в ткани, экспрессирующие интегрин $\alpha\beta_3$.

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-клозо-додекаборанов, а также конъюгатов KRGD-пептида, содержащих два карборановых ядра в клозо- 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 Fe_3O_4 , функционализированных APS.
5. Разработаны методы нанесения SiO_2 -оболочки на МНЧ на основе Fe_3O_4 , и показана возможность проведения эффективной сорбции на них противоопухолевого препарата доксорубинина; для синтезированных материалов продемонстрирован дозозависимый цитотоксический эффект, сопоставимый с Dox.
6. Разработаны методы получения новых материалов на основе МНЧ Fe_3O_4 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 животных.
7. Синтезированы и охарактеризованы конъюгаты МНЧ Fe_3O_4 , имеющие SiO_2 /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 интегрин $\alpha\beta_3$.

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ

1. 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. – Т. 68. – №12. – С. 2316–2324. (0.56 п.л./0.14 п.л.) (WOS)
2. Дёмин, А.М. Дизайн SiO₂/аминопропилсилан-модифицированных магнитных наночастиц Fe₃O₄ для иммобилизации на них доксорубицина / А.М. Дёмин, **А.В. Вахрушев**, М.С. Валова, А.С. Минин, Д.К. Кузнецов, М.А. Уймин, В.Я. Шур, В.П. Краснов, В.Н. Чарушин // Известия АН. Серия химическая. – 2021. – Т. 70. – №5. – С. 987–994. (0.5 п.л./0.06 п.л.) (WOS)
3. Дёмин, А.М. Модификация магнитных наночастиц Fe₃O₄ GRGD пептидом / А.М. Дёмин, **А.В. Вахрушев**, А.В. Мехаев, М.А. Уймин, В.П. Краснов // Известия АН. Серия химическая. – 2021. – Т. 70. – №3. – С. 449-456. (0.5 п.л./0.1 п.л.) (WOS)
4. **Vakhrushev, A.V.** Synthesis of fluorescent GRGD peptide derivatives / **A.V. Vakhrushev**, А.М. Demin, V.P. Krasnov // AIP Conference Proceedings. – 2022. – Vol. 2390. – 020083. (0.31 п.л./0.1 п.л.)
5. Demin, А.М. Magnetic-responsive doxorubicin-containing materials based on Fe₃O₄ nanoparticles with a SiO₂/PEG shell and study of their effects on cancer cell lines / А.М. Demin, **A.V. Vakhrushev**, А.Г. Pershina, М.С. Valova, L.V. Efimova, А.А. Syomchina, М.А. Uimin, А.С. Minin, G.L. Levit, V.P. Krasnov, V.N. Charushin // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – Iss. 16. – 9093. (0.88 п.л./0.8 п.л.) (WOS)
6. Demin, А.М. Effect of the Silica–Magnetite Nanocomposite Coating Functionalization on the Doxorubicin Sorption/Desorption / А.М. Demin, **A.V. Vakhrushev**, М.С. Valova, М.А. Korolyova, М.А. Uimin, А.С. Minin, V.A. Pozdina, I.V. Byzov, А.А. Tumashov, К.А. Chistyakov, G.L. Levit, V.P. Krasnov, V.N. Charushin // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – 2271. (1.38 п.л./0.11 п.л.) (WOS)
7. Pershina, А.Г. Peptide ligands on the PEGylated nanoparticle surface and human serum composition are key factors for the interaction between immune cells and nanoparticles / А.Г. Pershina, А.М. Demin, N.A. Perekucha, O.Y. Brikunova, L.V. Efimova, K.V. Nevskaya, **A.V. Vakhrushev**, V.G. Zgoda, М.А. Uimin, А.С. Minin, D. Malkeyeva, E. Kiseleva, А.Р. Zima, V.P. Krasnov, L.M. Ogorodova // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2023. – Vol. 221. – 112981. (0.81 п.л./0.05 п.л.) (WOS)
8. Demin, А.М. Features of doxorubicin adsorption on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with SiO₂ or SiO₂/aminopropylsilane / А.М. Demin, **A.V. Vakhrushev**, М.С. Valova, М.А. Korolyova, М.А. Uimin, А.С. Minin, К.А. Chistyakov, V.P. Krasnov, V.N. Charushin // Mendeleev Communications. – 2023. – Vol. 33. – № 2. – P. 160–163. (0.25 п.л./0.03 п.л.) (WOS)
9. **Vakhrushev, A.V.** Synthesis of Novel Carborane-Containing Derivatives of RGD Peptide / **A.V. Vakhrushev**, D.A. Gruzdev, А.М. Demin, G.L. Levit, V.P. Krasnov // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 8. – 3467. (0.69 п.л./0.14 п.л.) (WOS)
10. Gruzdev, D.A. Synthesis of *closo*- and *nido*-carborane derivatives of the KRGD peptide / D.A. Gruzdev, **A.V. Vakhrushev**, А.М. Demin, М.А. Baryshnikova, G.L. Levit, V.P. Krasnov, V.N. Charushin // Journal of Organometallic Chemistry. – 2024. – Vol. 1008. – 123052. (0.44 п.л./0.06 п.л.) (WOS)

Другие публикации

11. **Вахрушев А.В.** Синтез флуоресцентно меченного производного GRGD пептида / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, В.П. Краснов // I Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 12-13 декабря 2017 г. – С. 90. (0.06 п.л./0.02 п.л.)
12. **Вахрушев А.В.** Синтез флуоресцентного производного RGD-пептида / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, В.П. Краснов // XV Всероссийская научно-практическая

конференция «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы»: тезисы докладов. Москва. – 29-30 марта 2018 г. – Т.17. – С.16. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

13. **Вахрушев А.В.** Синтез карборансодержащего RGD-пептида / **А.В. Вахрушев**, А. М. Дёмин, В.П. Краснов // II Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 15-17 ноября 2018 г. – СД-33. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

14. **Vakhrushev A.** Synthesis of Fluorescent Derivative of RGD Peptide / **A. Vakhrushev**, A. Demin, V. Krasnov // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants «MedChem Russia 2019»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 10-14 июня 2019 г. – Р. 295. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

15. **Вахрушев А.В.** Сорбция доxorубицина на поверхность SiO₂/аминопропилсилан модифицированных магнитных наночастиц / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, М.С. Валова, А.С. Минин, В.П. Краснов // VII Международная молодежная научная конференция «Физика. Технологии. Инновации»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 18-22 мая 2020 г. – С. 682-684. (0.06 п.л./0.01 п.л.)

16. **Вахрушев А.В.** Синтез модифицированных магнитных наночастиц и их загрузка доxorубицином / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, М.С. Валова, А.С. Минин, В.П. Краснов // IV Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 16-20 ноября 2020 г. – OR-46. (0.06 п.л./0.01 п.л.)

17. **Вахрушев А.В.** Синтез флуоресцентных производных RGD пептида / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, В.П. Краснов // Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 18-21 ноября 2020 г. – С. 91. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

18. **Вахрушев А.В.** Синтез карборансодержащих производных RGD-пептида / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, В.П. Краснов // XXXI Российская молодежная научная конференция с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 20-23 апреля 2021 г. – С. 249. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

19. **Вахрушев А.В.** Сорбция доxorубицина на наночастицы Fe₃O₄@SiO₂-APS / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, М.С. Валова, А.А. Тумашов, В.П. Краснов // 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим Россия 2021»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 5-8 октября 2021 г. – С. 250. (0.06 п.л./0.01 п.л.)

20. **Vakhrushev A.V.** Doxorubicin sorption/desorption on modified silica-magnetite nanocomposites / **A.V. Vakhrushev**, А.М. Demin, V.P. Krasnov // VI Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 7-11 ноября 2022 г. – III-26. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

21. **Вахрушев А.В.** Синтез карборансодержащих RGD-пептидов / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, Д.А. Груздев, В.П. Краснов // XXXII Российская молодежная научная конференция с международным участием «Проблемы теоретической и экспериментальной химии»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 19-22 апреля 2022 г. – С. 306. (0.06 п.л./0.02 п.л.)

22. **Вахрушев А.В.** Синтез функциональных производных RGD пептида / **А.В. Вахрушев**, А.М. Дёмин, Д.А. Груздев, В.П. Краснов, А.Л. Шацаускас, А.С. Фисюк // VIII Научно-практическая конференция с международным участием «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»: тезисы докладов. Екатеринбург. – 9-13 июня 2024 г. – R-31. (0.06 п.л./0.01 п.л.)