

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
М.В.ЛОМОНОСОВА»**

---

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

На правах рукописи

*П. Руф*

**Рудаковская Полина Григорьевна**

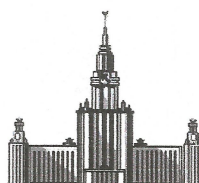
**НОВЫЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЛИГАНДЫ  
ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И  
МАГНЕТИТА И ГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ИХ ОСНОВЕ:  
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ**

02.00.03 – органическая химия

05.16.08 – нанотехнологии и наноматериалы

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
проф., д.х.н. Белоглазкина Е.К.  
доц., д.х.н. Мажуга А.Г.



**Москва - 2015**

## Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	4
<b>1. Обзор литературы Синтез и применение в биологии и медицине бифункциональных органических лигандов и наночастиц магнетит-золото типа ядро-оболочка.....</b>	<b>8</b>
1.1. Введение.....	8
1.2. Органические лиганды для терапии и адресной доставки.....	8
1.2.1. Лекарственные препараты на основе пептидов.....	8
1.2.2. Использование векторных пептидов для адресной доставки.....	10
1.2.2.1. Лиганды, содержащие NLS-пептид.....	10
1.2.2.2. Лиганды, содержащие RGD и бомбезин -пептиды.....	14
1.2.2.3. Лиганды, содержащие TAT -пептид.....	18
1.2.2.4. Лиганды, содержащие ПСА-пептид.....	20
1.2.2.5. Лиганды, содержащие биотин.....	21
1.3. Наночастицы магнетита: синтез и биомедицинское применение.....	22
1.3.1. Синтез наночастиц магнетит-золото типа ядро-оболочка.....	22
1.3.1.1. Виды защитных оболочек.....	22
1.3.1.2. Методы формирования бислойных структур.....	24
1.3.1.3. Методы формирования мультислойных структур.....	30
1.3.2. Очистка и функционализация наночастиц магнетит-золото.....	32
1.3.2.1. Очистка от частиц, не покрытых оболочкой.....	33
1.3.2.2. Очистка от частиц, не содержащих магнитного ядра.....	34
1.3.2.3. Функционализация наночастиц магнетит-золото.....	35
1.3.3. Биомедицинское применение наночастиц магнетита и магнетит-золото.....	38
1.3.3.1. Биораспределение и токсичность магнитных наночастиц.....	39
1.3.3.2. Применение магнитных наночастиц в диагностике (МРТ).....	42
1.3.3.3. Адресная доставка лекарств на магнитных наночастицах.....	45
1.3.3.4. Применение магнитной гипертермии.....	47
1.3.3.5. Применение магнитных наночастиц в тераностике.....	47
1.3.3.6. Влияние переменного магнитного поля на ферментативные реакции.....	49
<b>2. Обсуждение результатов.....</b>	<b>53</b>
2.1. Синтез бифункциональных органических лигандов.....	53
2.1.1. Синтез исходных соединений.....	54
2.1.2. Лиганды – производные аминокислот и пептидов.....	56
2.1.3. Лиганды – производные пептидов (твёрдофазный метод синтеза).....	59
2.1.4. Лиганд - производное N-аминобактериопурпуринимида.....	61
2.1.5. Лиганд на основе ПСМА-вектора.....	63
2.1.6. Лиганды – производные биотина.....	67
2.2. Синтез наночастиц золота и магнетита.....	73
2.2.1. Синтез наночастиц золота.....	73
2.2.2. Получение сорбента для ВЭЖХ на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота.....	74
2.2.3. Получение материала для ФДТ.....	92
2.2.4. Синтез наночастиц магнетита.....	95
2.2.5. Синтез наночастиц магнетит-золото.....	106
2.2.5.1. Синтез и очистка наночастиц $Fe_3O_4@Au$ .....	106
2.2.5.2. Доказательство структуры наночастиц $Fe_3O_4@Au$ типа «ядро-оболочка».....	112
2.2.5.3. Анализ порошков наночастиц $Fe_3O_4$ и $Fe_3O_4@Au$ .....	116

2.2.5.4. Функционализация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ .....	117
2.2.5.5. Модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ химо tripsином .....	121
2.2.5.6. Концепция наномеханического воздействия магнитного поля .....	127
3. Экспериментальная часть .....	132
3.1. Общие сведения .....	132
3.2. Синтез органических бифункциональных лигандов .....	134
3.2.1. Синтез исходных соединений .....	134
3.2.2. Синтез ауروفильных серосодержащих лигандов. ....	138
3.2.2.1. Реакции серосодержащих спиртов с производными аминокислот .....	138
3.2.2.2. Реакции липоевой кислоты с производными аминокислот .....	143
3.2.2.4. Конъюгат <i>N</i> -аминобактериопурпуринимида с липоевой кислотой (ФС) 44. ....	149
3.2.2.5. Синтез серосодержащего ПСМА-лиганда .....	150
3.2.3. Синтез лигандов производных биотина .....	152
3.3. Синтез наночастиц и материалов на их основе .....	160
3.3.1. Синтез наночастиц золота .....	160
3.3.2. Синтез наночастиц магнетита .....	161
3.3.3. Синтез наночастиц магнетит-золото .....	165
3.3.3.1. Синтез наночастиц магнетита .....	165
3.3.3.2. Покрытие наночастиц магнетита золотой оболочкой .....	166
3.3.3.3. Очистка наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ методом хроматографии .....	166
3.3.3.4. Очистка наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ методом центрифугирования .....	166
3.3.3.5. Концентрирование наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ .....	167
3.3.3.6. Функционализация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ .....	167
3.3.3.7. Модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ химо tripsином .....	167
3.3.3.8. Изучение токсичности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ .....	167
3.3.3.9. Анализ частиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ , модифицированных химо tripsином .....	168
3.3.4. Синтез сорбентов для ВЭЖХ .....	169
3.3.5. Получение материала для ФДТ .....	173
4. Выводы .....	174
5. Список литературы .....	175

## Введение

**Актуальность темы.** В состав многих современных лекарственных препаратов (противоопухолевые, антигистаминные и противомикробные средства, нейростимуляторы) входят аминокислоты, олигопептиды и пептиды. В последнее время активно разрабатываются методы адресной доставки лекарственных препаратов при помощи пептидных векторов. Пептиды, в состав которых, помимо природных, входят и неканонические аминокислоты, обладают большей конформационной подвижностью, энзимологической устойчивостью, улучшенной фармакодинамикой и биодоступностью. Таким образом, синтез соединений пептидного типа представляет интерес для органической химии и биомедицины.

Открытый в 1980-х годах простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) экспрессируется преимущественно в клетках простаты, а в случае возникновения опухоли предстательной железы происходит гиперэкспрессия данного антигена. Органические соединения, имеющие в своем составе фрагмент ПСМА, могут найти применение как для селективной доставки противоопухолевых препаратов непосредственно в ткани опухоли и её метастазы, так и при разработке методов ранней диагностики рака предстательной железы.

Наночастицы (НЧ) металлов и их оксидов могут быть использованы для создания материалов при конструировании сенсорных устройств, компонентов микроэлектроники, сепарационных материалов. Среди металлических наночастиц наибольший интерес представляют НЧ благородных металлов, благодаря их возможности образовывать биосовместимые наноматериалы. Поверхность НЧ золота может быть модифицирована серосодержащими органическими лигандами за счет образования ковалентной связи Au-S. Магнитные НЧ оксидов железа, в частности магнетита, нашли в последнее десятилетие широкое применение в практике и биомедицинских исследованиях. Их предложено использовать для лечения раковых заболеваний методом гипертермии, транспортировки и адресной доставки лекарств, получения опухоль-селективных контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Эффективность биомедицинского применения наноматериалов достигается за счет введения в структуру материала органических функциональных лигандов. В связи с этим актуальной задачей является синтез бифункциональных органических соединений, способных связываться с поверхностью НЧ и одновременно содержащих в своем составе биологически активные фрагменты, например, аминокислотные и пептидные, биотин и другие векторные молекулы.

В последние два десятилетия активно развиваются новые методы лечения онкологических заболеваний, в том числе фотодинамическая терапия (ФДТ) - комбинированное

действия трех факторов: фотосенсибилизатора (ФС), света и кислорода. Данный метод лечения обладает малой инвазивностью, высокой избирательностью поражения опухоли, низкой токсичностью вводимых препаратов и отсутствием риска тяжелых местных и системных осложнений лечения. Поиск новых эффективных ФС является важной проблемой.

Еще одной актуальной задачей является получение на основе НЧ магнетита опухоль-селективных контрастных средств для магнитно-резонансной томографии (МРТ), материалов для адресной доставки лекарственных средств и противоопухолевой терапии методом локальной гипертермии. Типичные значения релаксивности для магнитных НЧ на порядок выше, чем соответствующие значения для используемых повсеместно в клинике контрастных агентов на основе хелатных комплексов гадолиния, что позволяет существенно снизить дозировку диагностического препарата и уменьшить его стоимость.

Известные препараты на основе магнетита также имеют ряд недостатков: высокая токсичность, склонность к быстрой агрегации в физиологических условиях, трудности функционализации поверхности. В связи с этим, актуальной задачей является получение материалов, обладающих аналогичными магнетиту магнитными свойствами, но лишенных этих недостатков. Одним из перспективных типов таких материалов являются НЧ типа «ядро-оболочка» магнетит-золото.

**Цели и задачи работы.** (1) разработка синтетических подходов к новым бифункциональным органическим лигандам, способным к адсорбции на поверхности НЧ различной природы и имеющим в составе группы, отвечающие за функциональные биохимические свойства (адресную доставку, терапевтическое действие); (2) разработка и оптимизация методов синтеза НЧ золота и магнитных НЧ; (3) получение функциональных материалов на основе НЧ и органических лигандов и исследование их биохимических свойств.

**Научная новизна.** Предложены новые и оптимизированы известные методы синтеза бифункциональных серосодержащих органических лигандов на основе природных и не природных аминокислот и пептидов. Получены новые серосодержащие производные вектора простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) и фотосенсибилизатора бактериохлорина *a* (ФС). Оптимизированы методы синтеза бифункциональных органических лигандов на основе биотина, аминокислот и пептидов.

Разработана новая твердофазная методика получения производных пептидов, имеющих в составе липоевую кислоту и биотин.

Предложен новый метод ацилирования этилового эфира биотина по атому азота.

Оптимизированы методы получения НЧ золота диаметром от 2 до 100 нм и НЧ магнетита различной формы и размера от 4 до 50 нм с узким распределением по размерам.

Изучены физико-химические свойства полученных НЧ. Разработаны методы функционализации поверхности НЧ бифункциональными лигандами.

Оптимизирован метод синтеза НЧ магнетит-золото типа «ядро-оболочка». Продемонстрированы новые эффективные методы очистки, выделения и концентрирования подобных НЧ; изучены их физико-химические свойства.

**Практическая значимость.** Разработаны методы твердофазного синтеза новых производных пептидов, а также методы получения бифункциональных органических лигандов, содержащих аминокислоты, биотин, ПСМА-вектор, ФС и ацилирования биотина по атому азота.

Получены новые материалы – сорбенты для хиральной ВЭЖХ на основе неорганических матриц, НЧ золота и органических лигандов. Продемонстрирована эффективность разделения оптически активных соединений, а также лекарственных препаратов на данных сорбентах.

Получены новые материалы на основе наночастиц золота, ПСМА-лиганда и ФС и изучены их свойства; продемонстрирована потенциальная возможность использования полученных материалов для биомедицинских целей.

Разработан и оптимизирован метод получения коллоидно стабильных и легко функционализуемых наночастиц магнетита. Изучена релаксивность наночастиц магнетита и показано, что полученные наночастицы магнетита потенциально могут применяться в качестве T2-контрастных агентов для МРТ.

Осуществлена функционализация поверхности НЧ  $Fe_3O_4@Au$  серосодержащими лигандами, а также химотрипсином. Продемонстрирован эффект замедления ферментативной реакции с участием иммобилизованного химотрипсина под действием магнитного поля.

Показано, что НЧ магнетит-золото обладают низкой токсичностью и высокой скоростью T2-релаксации, что делает возможным применение данных материалов в биомедицине.

**На защиту выносятся следующие положения:**

- Новые и оптимизированные подходы к получению бифункциональных органических лигандов следующих типов: ауروفильные лиганды на основе аминокислот и пептидов, биотин-содержащие лиганды, ПСМА-векторные лиганды, производные силана.
- Оптимизированные методики получения НЧ золота и магнетита и результаты исследования их физико-химических свойств. Новые подходы к функционализации НЧ бифункциональными органическими лигандами. Способы получения материалов на основе НЧ. Результаты изучения физико-химических свойств полученных материалов.
- Способы получения, очистки и функционализации НЧ магнетит-золото типа «ядро-оболочка» и результаты исследования их физико-химических и биологических свойств.

Результаты изучения влияния переменного магнитного поля на химотрипсин, иммобилизованный на поверхности НЧ магнетит-золото.

**Автор выражает искреннюю благодарность** • к.т.н., ст. преп. Щетинину И.В., асп. Гребенникову И.С. за проведение рентгенофазового анализа, магнитных измерений, мёссбауэровской спектроскопии; • проф., д.х.н. Клячко Н.Л., проф., д.ф.-м.н. Савченко А.Г., проф., д.ф.-м.н. Головину Ю.И. за полезные обсуждения и ценные советы и указания, данные в процессе выполнения работы; • асп., инж. Гараниной А.С. за проведение экспериментов по изучению токсичности; • с.н.с. к.ф.-м.н. Упорову И.В. за проведение экспериментов по компьютерному моделированию; • к.х.н. Абакумову М.А. за измерение времен релаксивности; • к.х.н. Ананьевой И.А., проф., д.х.н. Шпигуну О.А. за помощь в изучении хроматографических свойств сорбентов; • д.х.н. Грину М.А., Пантюшенко И.В. за помощь в выполнении работ по ФДТ; • студентам Денисову Д.Д., Ковальчуку М.В., Ефремовой М.В. за помощь в организации различных экспериментов.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии «Менделеев 2007» (Москва, Россия, 2007), I Международной научной школе «Нanomатериалы и нанотехнологии в живых системах – Нано 2009» (Москва, Россия, 2009), V Конференции молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН (Москва, Россия, 2010), Международной научной конференции «Наука будущее» (Санкт-Петербург, Россия, 2014), XII Международной конференции наноструктурных материалов «Нано 2014» (Москва, Россия, 2014), I и V Российско-Греческом Симпозиуме с международным участием «Бионанотокс» (Крит, Греция, 2010 и 2014), I и II Всероссийской научной конференции «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, Россия, 2012 и 2014), VI Международной конференции наноматериалов «Нанокон 2014» (Чехия, 2014), IV Международной конференции «Мультифункциональные, гибридные и наноматериалы» (Барселона, Испания, 2015).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 9 статей (из списка ВАК и/или WOS), 28 тезисов докладов, 2 патента.

## **1. Обзор литературы**

### **Синтез и применение в биологии и медицине бифункциональных органических лигандов и наночастиц магнетит-золото типа ядро-оболочка**

#### **1.1. Введение**

В последние десятилетия исследование наноматериалов является ведущей областью материаловедения. Наночастицы (НЧ) и материалы на их основе обладают рядом перспективных свойств, отличными от макро материалов, благодаря чему находят применение в различных областях науки и техники, таких как: химия, физика, биология, медицина, нанотехнологии, биотехнологии, а также смежных областях [1,2,3,4,5]. Для решения биохимических задач необходимо сочетание свойств НЧ и функциональной поверхности. НЧ, функционализированные биомолекулами (антителами, ферментами, нуклеотидами и др.) для нацеливания или узнавания биологических систем, могут быть использованы в качестве материалов для адресной доставки лекарственных препаратов [6,7,8]. Также возможна модификация НЧ молекулами лекарственных препаратов для достижения терапевтического эффекта [9]. Особое внимание заслуживают новые типы материалов – тераностика [10,11], несущие одновременно несколько функций (диагностика и терапия), что позволяет снизить токсичность и увеличить эффективность материалов.

Несмотря на все преимущества, НЧ имеют ряд ограничений. Например, их небольшой размер и большая площадь поверхности может привести к агрегации частиц и уменьшению функциональности [12]. Следует отметить, что только НЧ определенного размера и поверхностной химии не сразу распознаются иммунной системой и демонстрируют увеличение времени циркуляции в крови [13]. Таким образом, для получения материалов, являющихся потенциально перспективными в медицине и биологии, необходимо изучение методов синтеза НЧ различной морфологии и их свойств, а также изучение методов функционализации поверхности различными активными молекулами.

#### **1.2. Органические лиганды для терапии и адресной доставки**

##### **1.2.1. Лекарственные препараты на основе пептидов**

В настоящее время рынок лекарственных препаратов очень велик. Большая ниша отводится препаратам на основе пептидов, в состав которых входят не только природные, но и неканонические аминокислоты. Лекарственные средства на основе олигопептидов являются противоопухолевыми препаратами, нейростимуляторами, антигистаминными и противомикробными средствами [14,15,16]. Олигопептиды входят в состав ряда лекарственных препаратов, таких как антибиотики ампициллин и амоксициллин [17], средств для лечения



гипертензии - эналаприл и тд [18,19], некоторые из которых на данный момент введены в клиническую практику (Рисунок 1) [20,21,22,23].

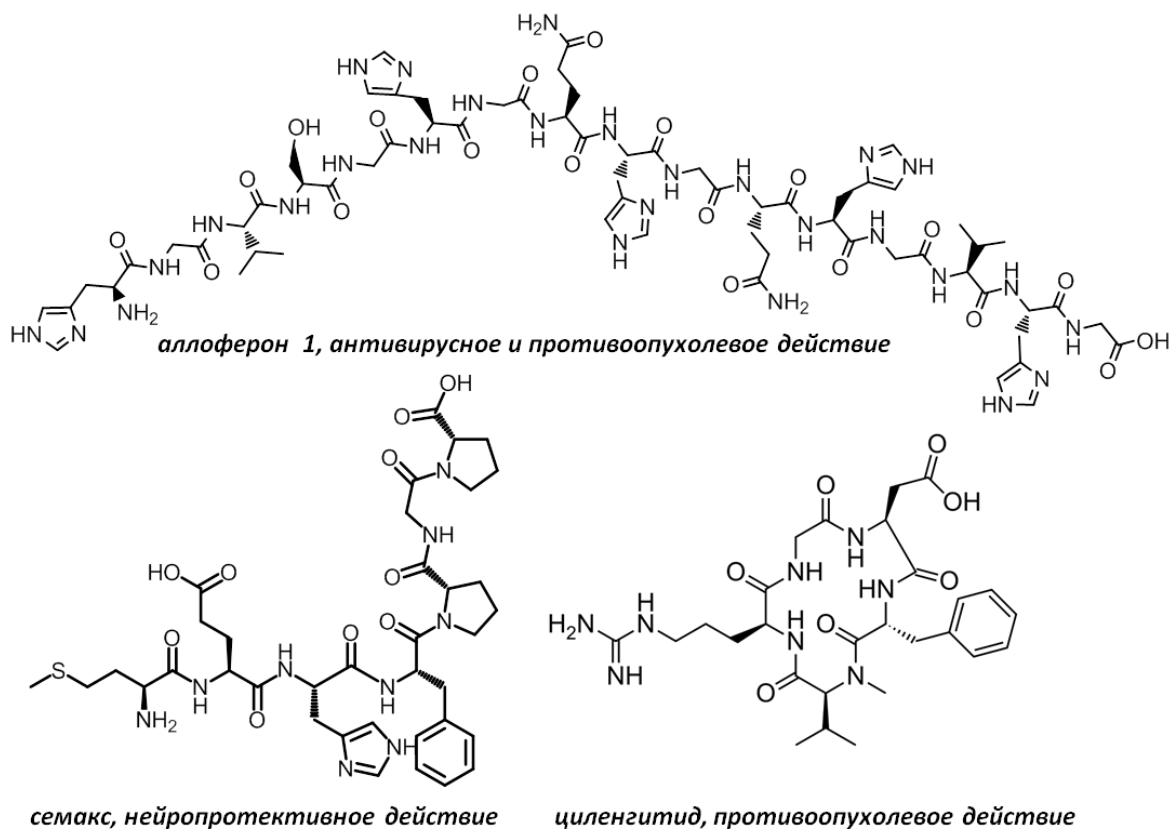
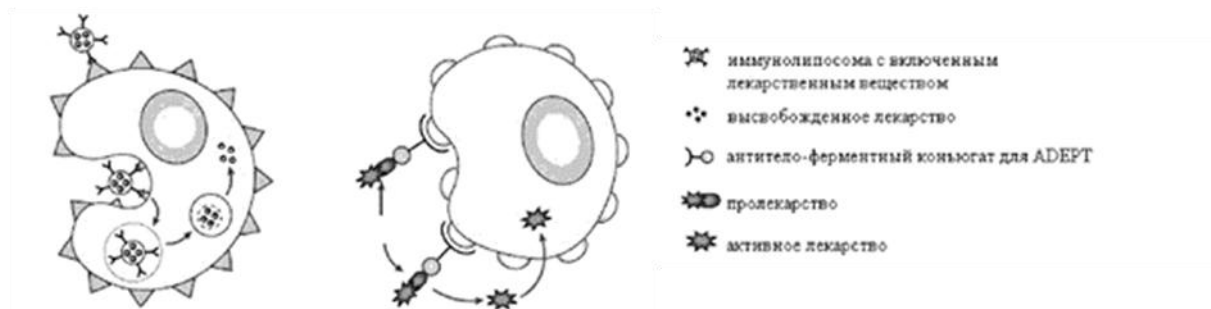


Рис. 1. Структура лекарств на основе пептидов

Существует и другая область применения олигопептидов и белков. Это область получила широкое применение в последние годы в связи с активным развитием лекарственных препаратов имеющих высокую токсичность, но при этом проявляющие положительные результаты при лечении конкретного очага. В таком случае важным и необходимым является адресная доставка лекарственного препарата.

В качестве векторов используют адресные пептиды, способные селективно связываться со специфическими мишенями, локализованными на поверхности клеток. На поверхности клеток происходит взаимодействие антиген-антитело (Рисунок 2), в результате чего лекарство переносится непосредственно внутрь больной клетки[24].



## Рис.2 Взаимодействие антиген-антитело на поверхности клетки

Существует ряд пептидов выделенных из природных соединений [25,26], а также найденных путем скрининга библиотек пептидов [27,28,29,30,31,32] отвечающих за адресную доставку.

### 1.2.2. Использование векторных пептидов для адресной доставки

#### 1.2.2.1. Лиганды, содержащие NLS-пептид

Так например, NLS-пептид (NLS = *Nuclear localization sequence*, -Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-) (Рисунок 3) регулирует активный транспорт белков, и обеспечивает проникновение в ядро клетки. Он был впервые выделен из большого Т антигена вируса SV40 [33]. Для увеличения эффективности введения препарата внутрь клетки и снижения повреждений здоровых клеток получают производные NLS-пептида.

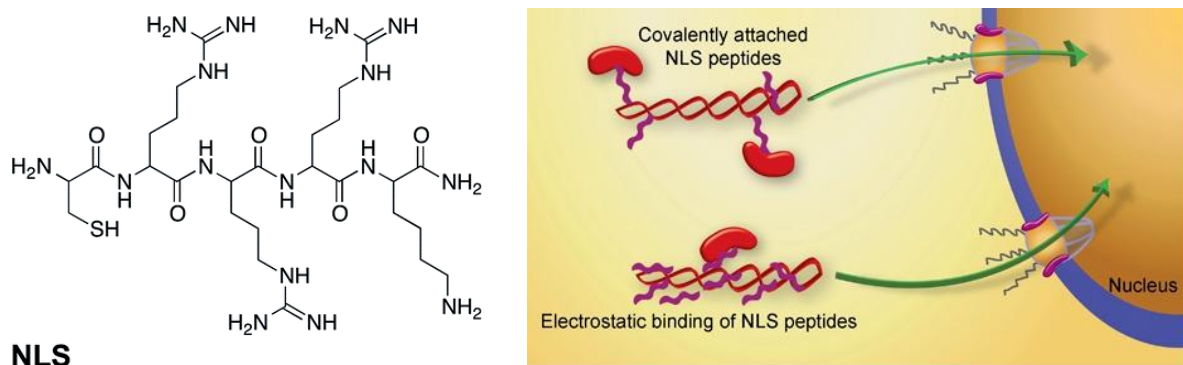
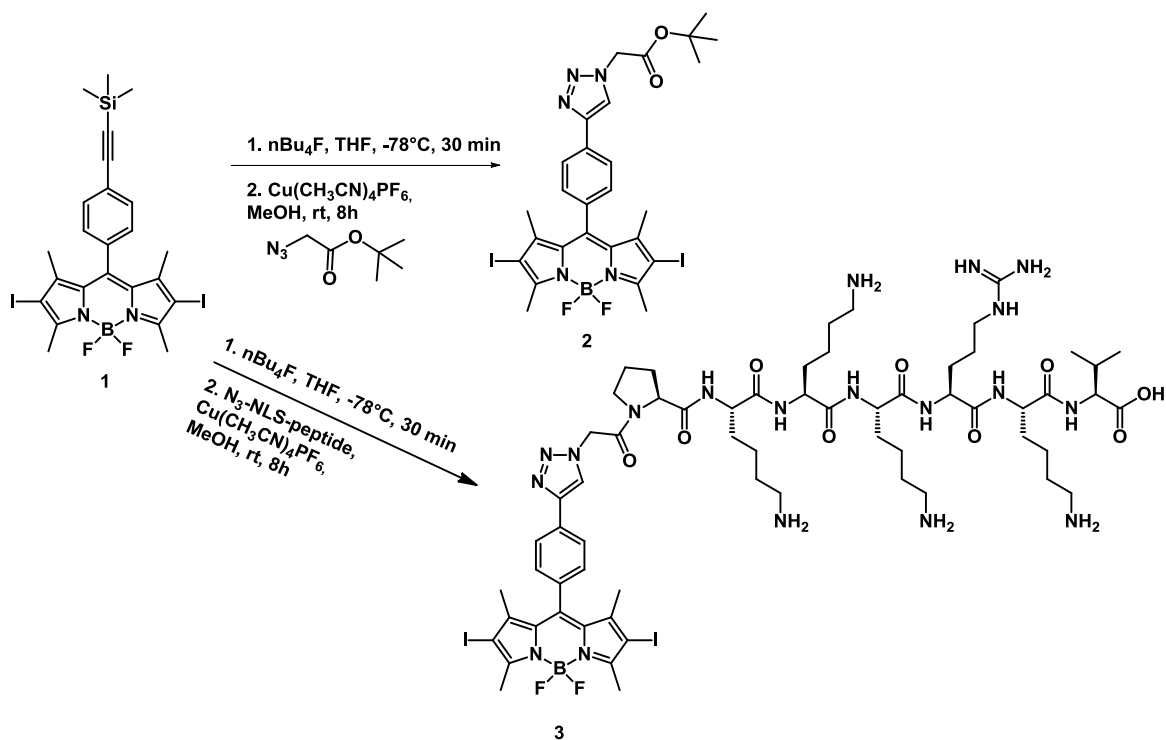


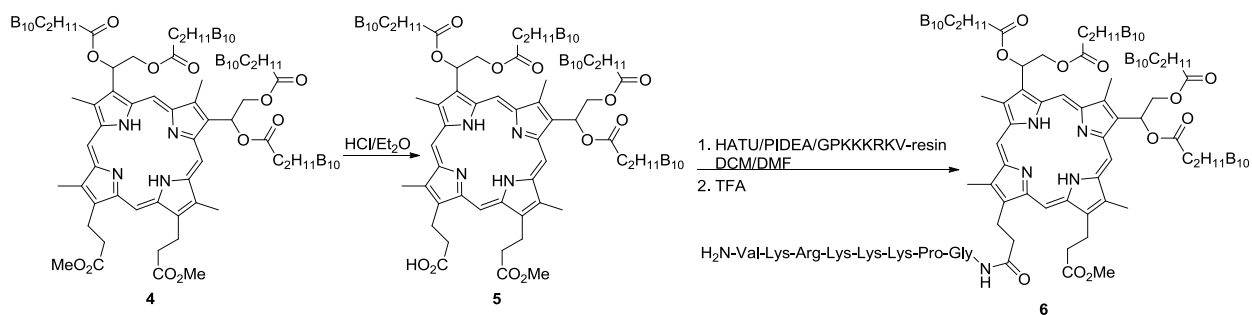
Рис. 3 Структура NLS-пептида (слева), действие NLS-пептида (справа)

В работе [34] показано увеличение эффективности фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии рака (ФДТ) на основе бор-дипиррометена (*BODIPY*) при использовании NLS-последовательности. В данной работе для увеличения эффективности (введения фотосенсибилизатора внутрь клетки) и снижения повреждений здоровых клеток было получено производное *BODIPY*, содержащее NLS-последовательность, и контрольное соединение с неактивным пептидным фрагментом вместо нее. Оба соединения были получены *click*-реакцией соединения **1** с соответствующим азидом. Схема синтеза:



Роль NLS-последовательности заключается в осуществлении доставки производного BODIPY в ядро клетки. Фототоксичность обоих соединений была изучена *in vitro* на серии клеток T24 (карцинома мочевого пузыря человека), при облучении дозой  $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Для оценки эффективности соединения определялась величина  $\text{IC}_{50}$  - концентрация фотосенсибилизатора, ингибирующая на 50% рост клеток по сравнению с ростом клеток в отсутствие фотосенсибилизатора. Для соединения **3**  $\text{IC}_{50}$  оказалось в 2,6 раз ниже, чем для соединения **2** ( $0,016 \text{ }\mu\text{M}$  против  $0,042 \text{ }\mu\text{M}$ ). Таким образом, введение NLS-фрагмента увеличивает эффективность активного соединения в несколько раз.

Еще один пример использования NLS-последовательности для увеличения специфичности связывания описан в работе [35]. Фотосенсибилизатор для ФДТ на основе порфирина, содержащего фрагмент бороновой кислоты, был модифицирован NLS-последовательностью. Схема синтеза конъюгата боронированного порфирина и NLS-пептида:



Затем были проведены *in vitro* исследования, доказывающие ассоциацию данного конъюгата с липопротеинами низкой плотности. Плазма крови человека была обработана

конъюгатом **6**, затем проведен электрофорез, после которого одна половина геля обработана красителем судан черный для визуализации липопротеинов, а другая половина подверглась облучению UV-излучением для визуализации конъюгата **6**. При помощи электрофореза плазмы крови человека было показано, что большая часть конъюгата ассоциирована с липопротеинами низкой плотности (LDL = low density lipoproteins), что говорит о перспективности использования подобных соединений для ФДТ рака. Конъюгаты типа NLS-порфирин проявили себя *in vitro* как соединения преимущественно связывающиеся с липопротеинами низкой плотности. Такое связывание предлагает потенциальный путь введения лекарства в опухолевые клетки, которые избыточно экспрессируют рецепторы липопротеинов низкой плотности.

Еще одним примером модификации порфиринов с помощью введения пептидной последовательности является работа [36], в которой были получены конъюгаты порфирина и линейных пептидов, содержащих одновременно NLS и CPP последовательности (CPP = cell-penetrating peptide). Пептидные последовательности синтезировались с помощью твердофазного пептидного синтеза по Фмос-стратегии, на последней стадии свободная аминогруппа пептидов вводилась в реакцию с ПЕГилированным порфирином **7** и полученные конъюгаты снимались с резины с помощью TFA/H<sub>2</sub>O/Ph-OH/TIS 88/5/5/2. Результаты испытания *in vitro* представлены в Таблице 1, из которой видно, что самую большую активность показало соединение **11**, содержащее последовательность KRPAATKKAGQAKKKLEDPRKKRRQRRRPPQG.

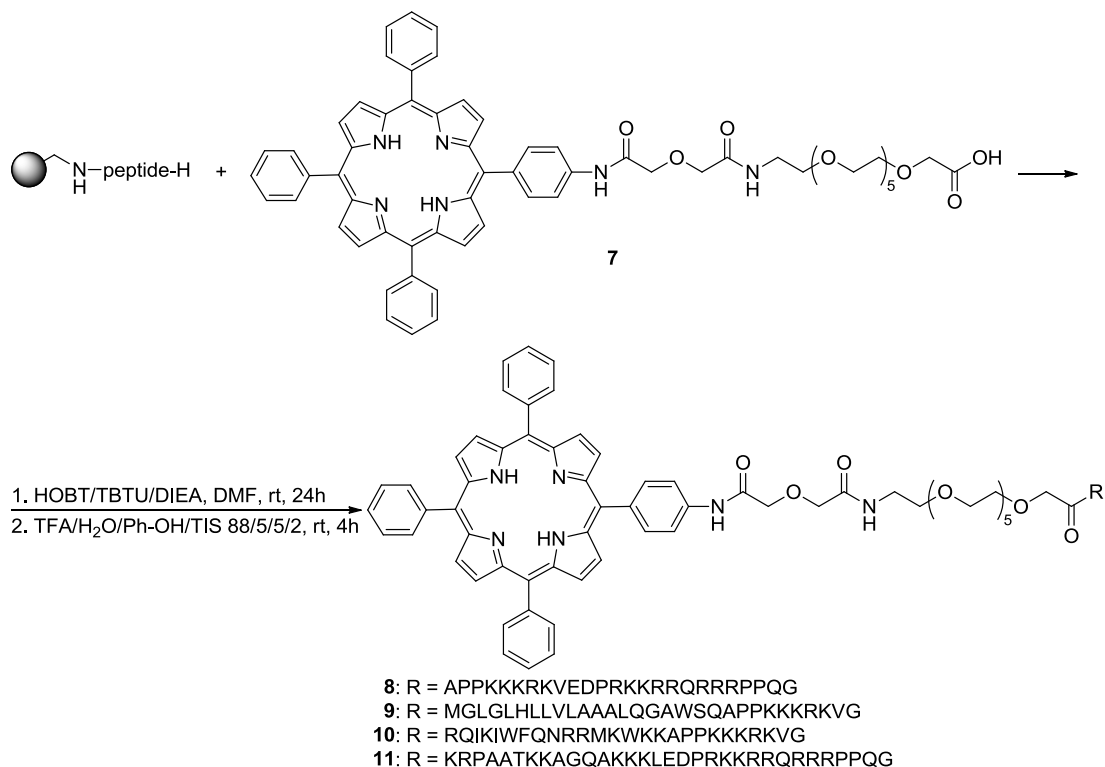
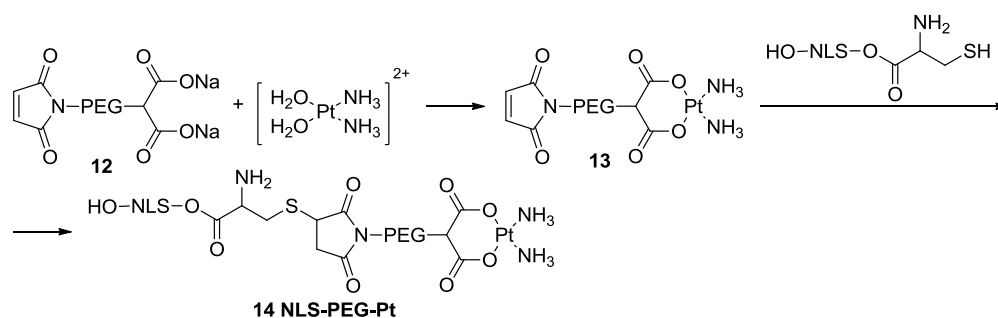


Таблица 1. Фототоксичность соединений 8-11 при дозе 1 J/cm<sup>2</sup>

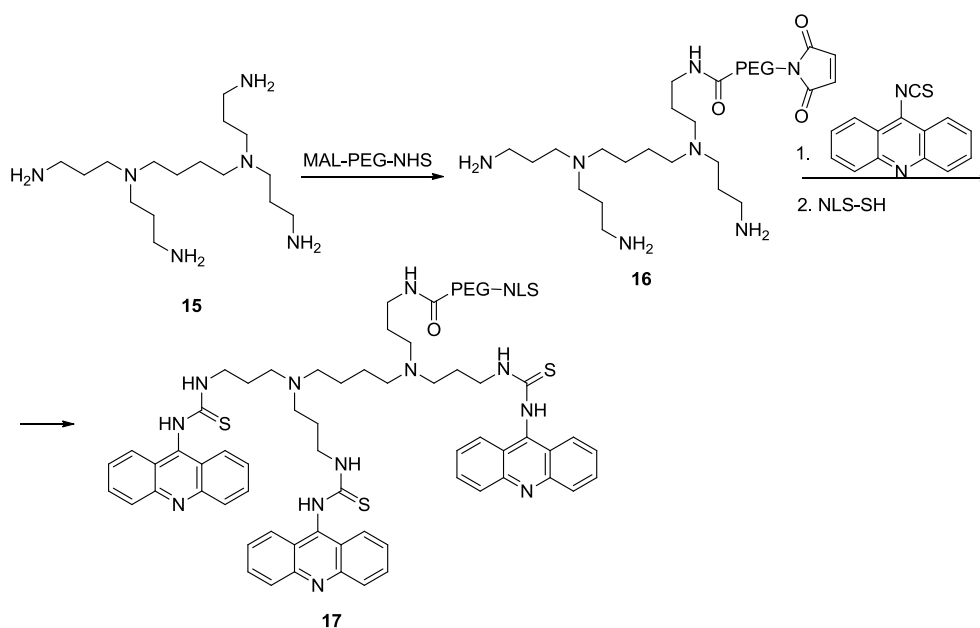
Соединение	Пептидный фрагмент	IC <sub>50</sub> , μM
<b>8</b>	APPKKRKVEDPRKKRRQRRRPPQG	7,5
<b>9</b>	MGLGLHLLVLAALQGAWSQAPPKKKRKVG	>10
<b>10</b>	RQIKIWFQNRMRKWKKAPPKKKRKVG	9,3
<b>11</b>	KRPAATKKAGQAKKLEDPRKKRRQRRRPPQG	6,9

Широко известны и используются противоопухолевые препараты на основе комплексов платины. Так например, карбоплатин — цитостатический препарат алкилирующего действия. Данный препарат применяется в клинике, но имеет ряд тяжелых побочных действий из-за недостаточной специфичности. Аналог противоракового средства карбоплатина, содержащий NLS-последовательность получен в работе [37]. Предполагаемый механизм действия для карбоплатина и его аналогов – ковалентное связывание с двумя гуанинами из разных цепочек ДНК [38], что делает невозможным дальнейшую репликацию ДНК и приводит к подавлению биосинтеза нуклеиновых кислот и гибели клеток. Схема синтеза аналога карбоплатина содержащего пептидный фрагмент для адресной доставки внутрь клетки:



Однако эксперименты на серии клеток M109 показали, что IC<sub>50</sub> соединения **14** NLS-PEG-Pt почти в 3 раза выше чем для карбоплатина (83.5 μM против 33.15 μM), при том что захват раковыми клетками соединения NLS-PEG-Pt происходит лучше, чем у карбоплатина (19 Pt на 10<sup>6</sup> клеток, против 6,7 у карбоплатина). Есть предположение, что карбоплатин должен сначала претерпеть некую, пока неизученную, активацию внутри клетки, после которой эффективность платинирования ДНК значительно возрастает. NLS-производные карбоплатина, по-видимому, неспособны к этой активации, чем и объясняется их низкая активность при большом уровне захвата раковыми клетками.

Конъюгаты акридина с NLS-пептидом через образование липоплексов и полиплексов [39] могут преодолевать гематоэнцефалический барьер, который затрудняет лечение многих заболеваний центральной нервной системы, так как он не пропускает целый ряд лекарственных препаратов. Липоплексы это комплексы катионных липидов и ДНК, полиплексы – комплексы положительно заряженных полимеров и ДНК. Схема синтеза конъюгатов акридин-PEG-NLS:



Для изучения проникновения конъюгатов через гематоэнцефалический барьер использовалось ДНК, меченное красителем родамином. С помощью конфокальной микроскопии показано, что конъюгаты NLS-PEG-Acridine вызывают проникновение меченного ДНК внутрь клетки с помощью образования липоплексов и полиплексов. Роль NLS-фрагмента заключается в связывании с ДНК для образования липо- и полиплексов.

#### 1.2.2.2. Лиганды, содержащие RGD и бомбезин -пептиды

В некоторых случаях лекарственные пептиды обнаруживают не путем скрининга библиотек, а выделяя соответствующие последовательности из природных материалов. Так например адресные пептиды RGD (Arg-Gly-Asp) и Бомбезин (BBN, Tyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) (Рисунок 4), обладающие специфичностью к опухолевым клеткам, были выделены из яда змей и кожи жабы соответственно [14, 15].

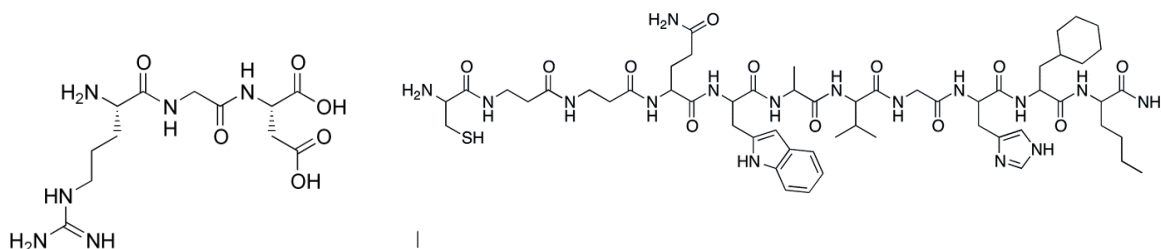


Рис. 4 Структура адресных пептидов RGD и BBN

В работе [40] изучены бифункциональные конъюгаты пептид-фталоцианин для ФДТ и флуоресцентного изображения раковых клеток. В работе использованы конъюгаты, содержащие RGD, Bombesin, и инертную YVG (Tyr-Val-Gly) последовательность для контроля. В Таблице 2 приведены LD<sub>50</sub> для данных конъюгатов, откуда видно что наилучшие результаты

на всех протестированных видах клеток (рак простаты, аденокарцинома) показал конъюгат ZnPc–BBN. Схема синтеза:

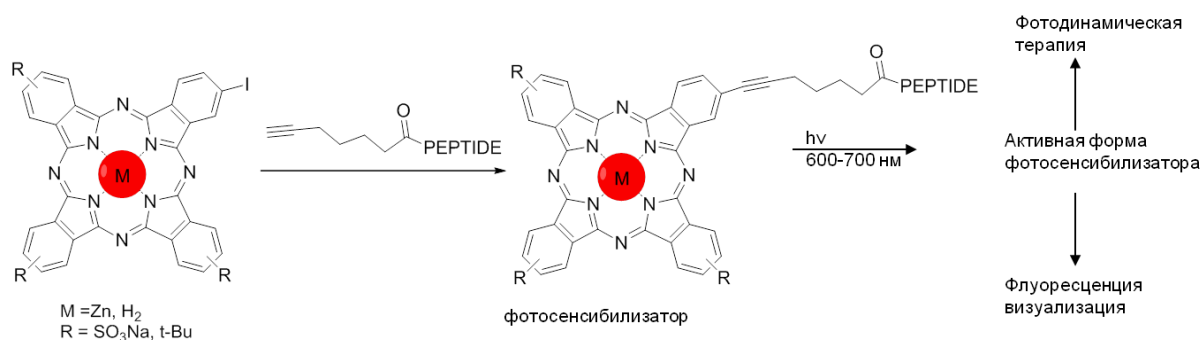


Таблица 2. LD<sub>50</sub> для конъюгатов пептид-фталоцианин

Серия клеток	Соединение	LD <sub>50</sub> (J cm <sup>-2</sup> )
PC3	ZnФC–BBN	1.81 ± 0.20
PC3	ZnФC–RGD	16.16 ± 0.74
PC3	ZnФC–YVG	9.83 ± 0.76
A549	ZnФC–BBN	3.70 ± 0.46
A549	ZnФC–RGD	26.45 ± 2.44
A549	ZnФC–YVG	7.76 ± 0.38
MDA-MB-231	ZnФC–BBN	2.78 ± 0.17
MDA-MB-231	ZnФC–RGD	10.21 ± 1.00
MDA-MB-231	ZnФC–YVG	9.59 ± 0.94

В работе [41] описана адресная доставка гидрофильного лекарства оксиматрин внутри биоразлагаемых полимерсом, меченных RGD-пептидом, в звёздчатые клетки печени. Строение меченных полимерсом показано на Рисунке 5.

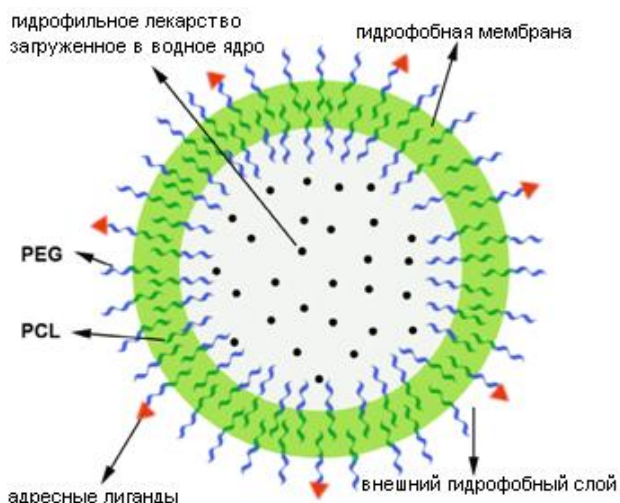


Рис. 5 Строение полимерсом, меченных RGD пептидом

Кроме терапии рака важной задачей является визуализация опухолей. В работе [42] показано использование RGD-пептида для получения изображения опухолей радиоактивным

изотопом  $^{99}\text{Tc}$ , В работе осуществлен синтез конъюгата RGD-пептида и радиоактивного изотопа  $^{99}\text{Tc}$  (Рисунок 6).

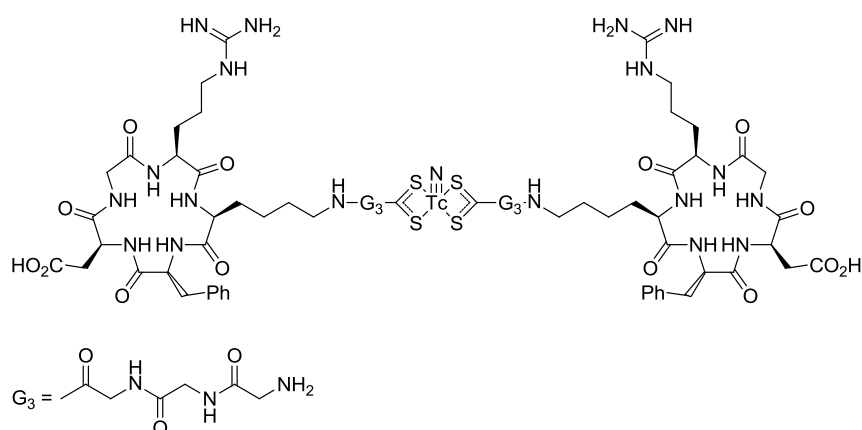


Рис. 6 Конъюгат RGD-пептида и радиоактивного изотопа  $^{99}\text{Tc}$

В работе [43] так же показана возможность использовать конъюгат  $^{64}\text{Cu}$ -AmBaSar-RGD, содержащий RGD последовательность, для визуализации опухолей методом MicroPET, который показывает сопоставимые с используемым в данный момент конъюгатом  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD. Структуры конъюгатов представлены на Рисунке 7.

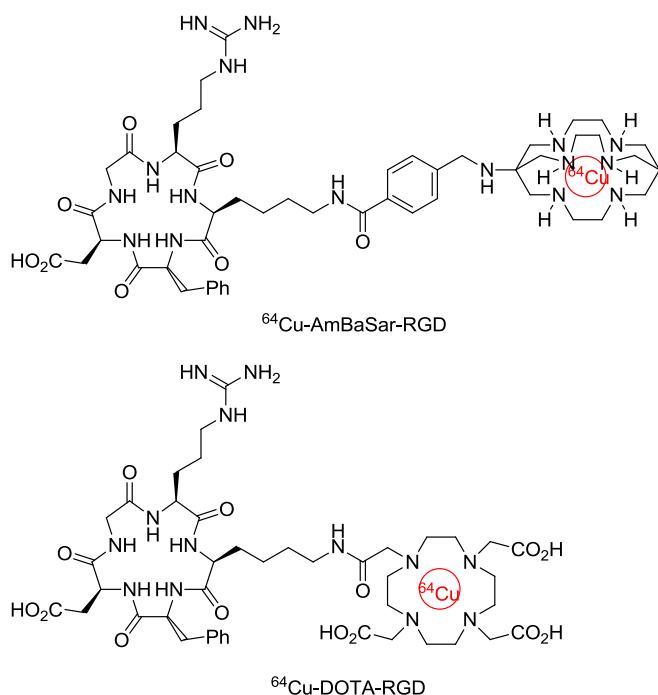


Рис. 7 Структуры конъюгатов  $^{64}\text{Cu}$ -AmBaSar-RGD и  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD.

В работе [44] описаны соединения несущие радиоактивную метку и способные специфично связываться с интегрином  $\alpha_v\beta_3$  и GRPR-рецептором (GRPR = gastrin releasing peptide receptor) за счет наличия в них одновременно RGD и VBN фрагмента (Рисунок 8).



Эти соединения являются перспективными препаратами для изображения опухолей с помощью позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). В Таблице 3 представлены  $IC_{50}$  для этих соединений, определенные при тестах на клетках рака груди, показывающие высокое сродство полученных соединений к выбранным рецепторам.

Таблица 3.  $IC_{50}$  для соединений  $^{18}F$ -FB-PEG<sub>3</sub>-RGD-BBN и  $^{64}Cu$ -NOTA-RGD-BBN

Соединение	$IC_{50}$ , nM	
	интегрин $\alpha_v\beta_3$	GRPR-рецептор
$^{18}F$ -FB-PEG <sub>3</sub> -RGD-BBN	13,77±1,82	73.28±1.57
$^{64}Cu$ -NOTA-RGD-BBN	16,15±2,77	92.75±3.53

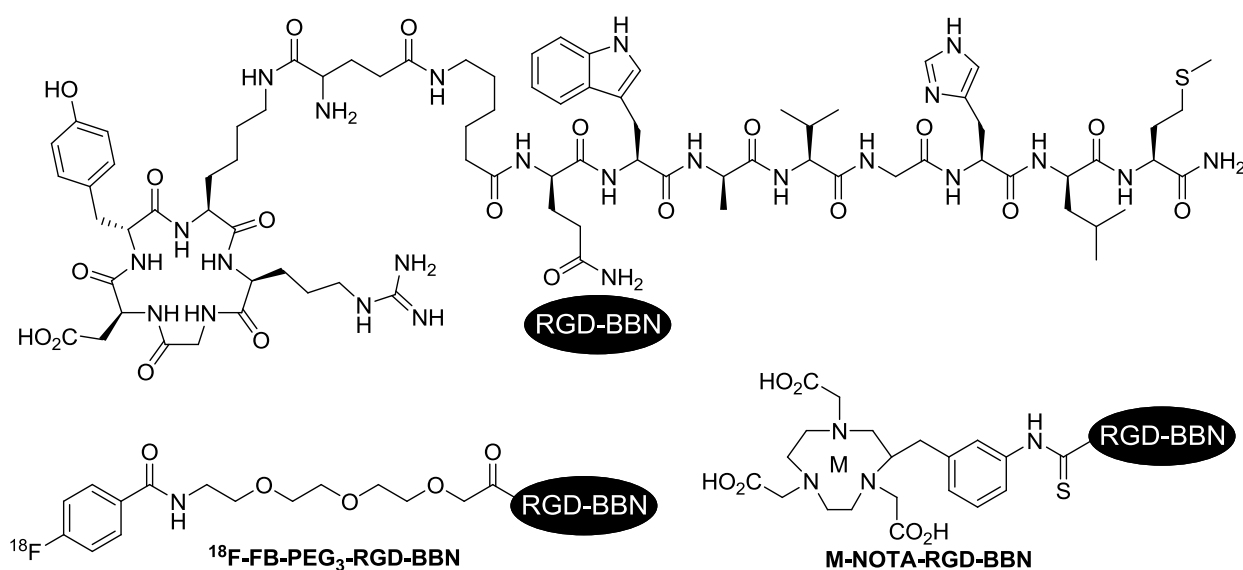


Рис. 8 Структурные формулы соединений FB-PEG<sub>3</sub>-RGD-BBN и  $^{64}Cu$ -NOTA-RGD-BBN.

Так же в работе были получены ПЭТ-изображения мыши через 30 минут после введения препарата (Рисунок 9), на них видна преимущественная локализация радиоактивного препарата в месте нахождения опухоли.

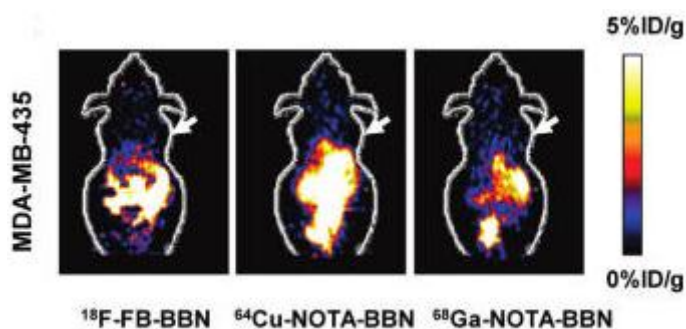


Рис. 9 ПЭТ-изображения мыши через 30 минут после введения препарата.

### 1.2.2.3. Лиганды, содержащие ТАТ -пептид

В работе [45] описана активируемая UV-излучением внутриклеточная доставка липосом с помощью ТАТ-пептида (YGRKKRRQRRRGС) (Рисунок 10). ТАТ-пептид, полученный из HIV-1 ТАТ белка [46], обладает способностью проникать внутрь клетки, пронося в клетку связанный с ним «груз» [47].

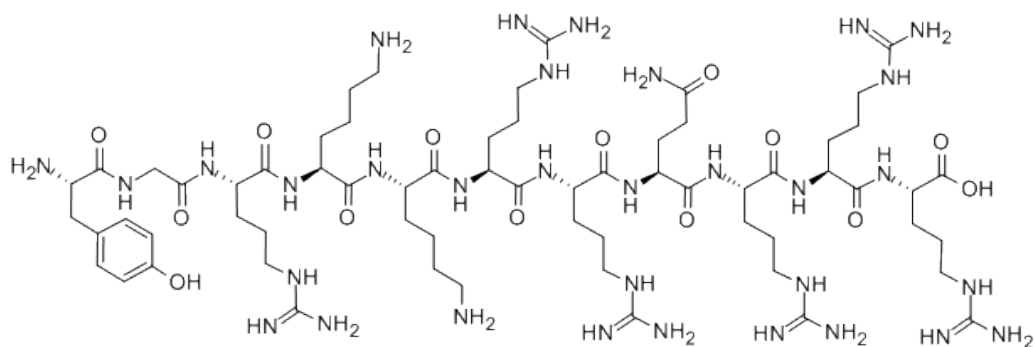


Рис. 10 Структура ТАТ -пептид

Модификация липосом ТАТ-пептидом приводит к неспецифическому проникновению липосом в нецелевые клетки [48]. Что бы избежать этого, в данной работе были разработаны соединения, высвобождающие ТАТ-пептид только после UV-активации. До активации, ТАТ-пептид закрыт от взаимодействия с клеткой фрагментом ПЭГ, и проникновения не происходит. При UV-облучении разрушается линкер и высвобождается ТАТ-фрагмент, обеспечивающий захват соединения в клетку (Рисунок 11).

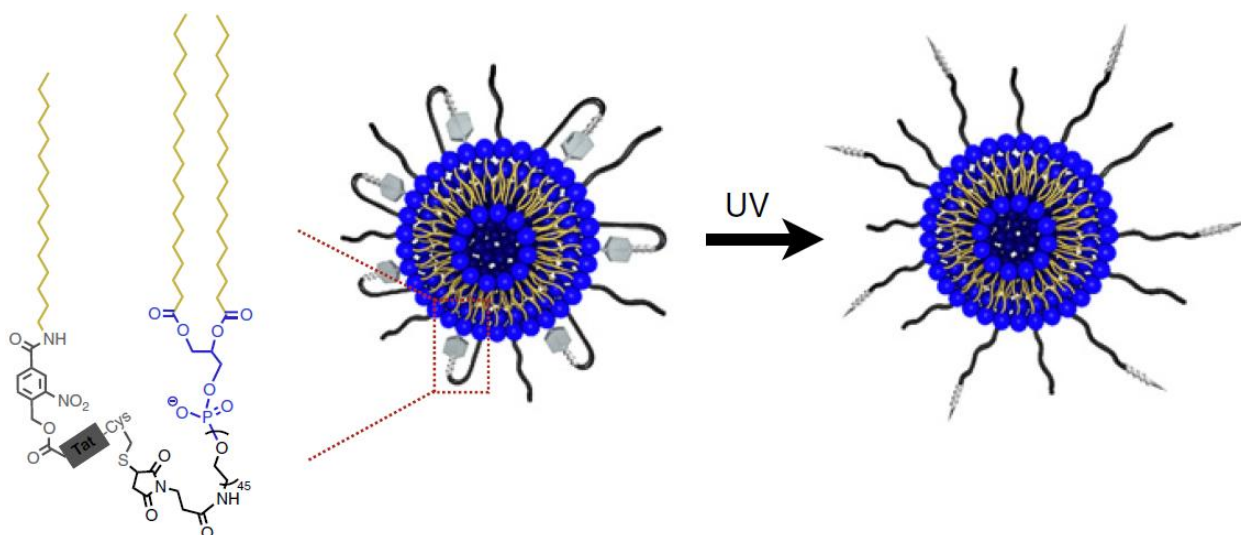
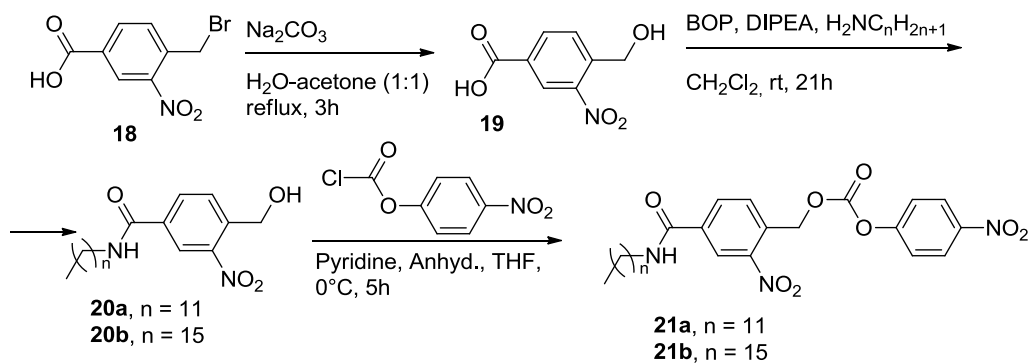
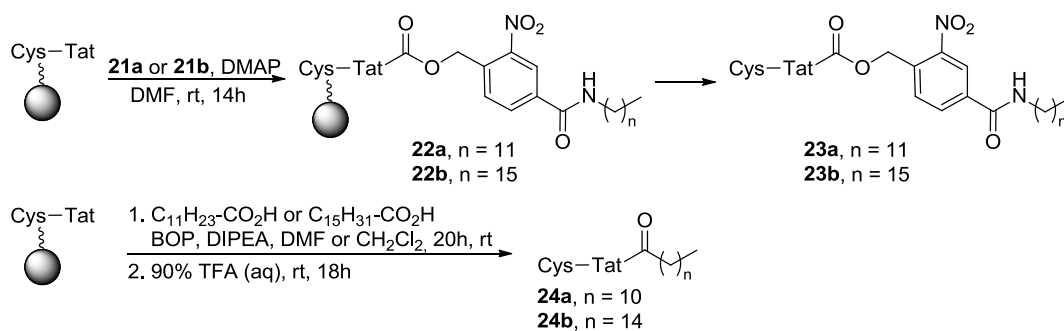


Рис. 11 Схема UV-активации и высвобождения ТАТ-фрагмента

UV-раскрываемый линкер был синтезирован по следующей схеме:



ТАТ-пептид был синтезирован с помощью классического твердофазного пептидного синтеза, затем введен в реакцию с линкером:



Для сравнения были сделаны липосомы, содержащие расщепляемый и не расщепляемый линкер при UV-облучении. Строение комплекса с липосомой представлено на Рисунке 12.

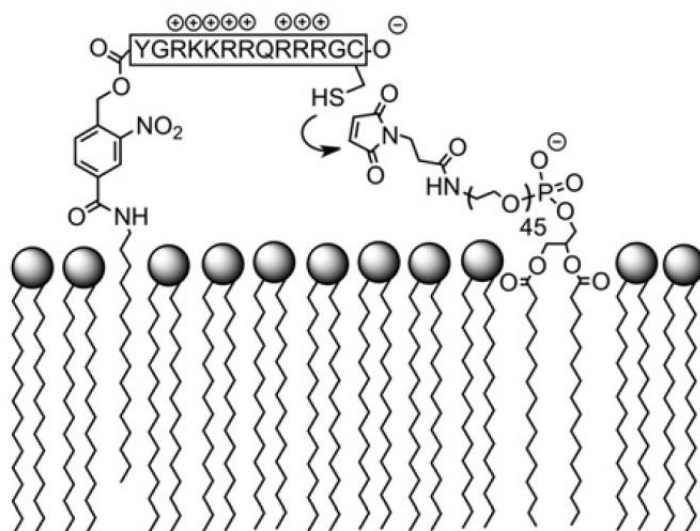


Рис. 12 Сочетание тат-пептида и липосомы

Для изучения захвата липосом клетками в них инкапсулировали флуоресцентный маркер Atto655. Изучение проводили с помощью метода конфокальной микроскопии, которая показывает незначительный захват липосом клетками до облучения, и 15-кратное увеличение захвата после облучения.

Доксорубин, являющийся широко используемым противоопухолевым препаратом [49], обладает довольно низкой селективностью к раковым клеткам, вследствие чего является довольно токсичным веществом. В работе [50] описаны конъюгаты пептид-доксорубин, обладающие повышенной по сравнению с доксорубином способностью захватываться раковыми клетками. Для повышения специфичности в данной работе был использован декапептид  $\text{NH}_2\text{-WxEYAAQkFL-CONH}_2$ , который вводили в разные положения доксорубина (Рисунок 13).

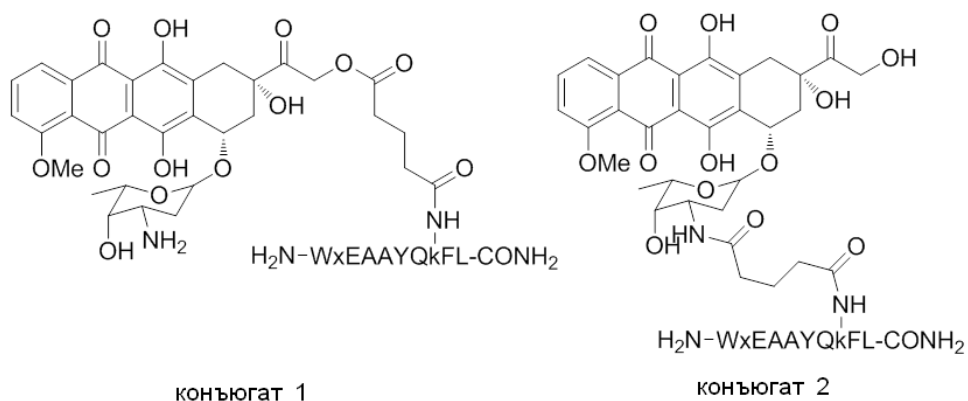


Рис. 13 Конъюгаты пептид-доксорубин

С данными конъюгатами, а так же с самим доксорубином, были проведены биологические испытания на сериях опухолевых (MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-435-MDR) и здоровых (MCF-10A и HUVEC) клеток. Результаты приведены в Таблице 4, из них видно, что доксорубин обладает примерно одинаковой токсичностью как к здоровым так и к опухолевым клеткам, в то время как для *конъюгата 1* токсичность по отношению к здоровым клеткам в 5-40 раза меньше чем к опухолевым, что является подтверждением эффективности использования адресного фрагмента.

Таблица 4. Результаты биологических испытаний конъюгатов доксорубина и пептида

Вещество	IC <sub>50</sub> (μM)				
	MCF-7	MDA-MB-435	MDA-MB-435R	MCF10A	HUVEC
Доксорубин	1.2±0.27	0.6±0.07	21.9±4.2	1.2±0.15	1.1±0.5
конъюгат 1	0.9±0.07	1.5±0.09	5.4±0.62	35.1±2.2	42.3±2.4
Конъюгат 2	19.1±2.8	18.6±2.5	19.7±3.1	40.5±4.3	50.9±3.2

#### 1.2.2.4. Лиганды, содержащие ПСА-пептид

В работе [51] описан конъюгат векторный пептид-лекарство, специфично действующий против рака простаты. Пептидный фрагмент содержит лиганд рецептора HER2, который экспрессируется в клетках рака простаты. С его помощью осуществляется адресная доставка вещества TGX-D1, являющегося ингибитором фосфоинозитид 3-киназы β (PI3Kβ), фермента

участвующего в росте и делении клеток [52], ингибирование которого, предположительно, может остановить рост опухоли. Структурная формула конъюгата представлена на Рисунке 14. Так же в соединение входит лиганд фермента PSA (простатический специфичный антиген), который часто экспрессируется в раковых клетках, и не экспрессируется в здоровых [53]. Это фрагменты соединены между собой двумя линкерами – первый, состоящий из трех остатков глицина, соединяет пептидный лиганд и лиганд фермента PSA, выполняя роль разделителя (spacer). Второй линкер, состоящий из остатков серина и валина, соединяет лиганд PSA и TGX-D1.

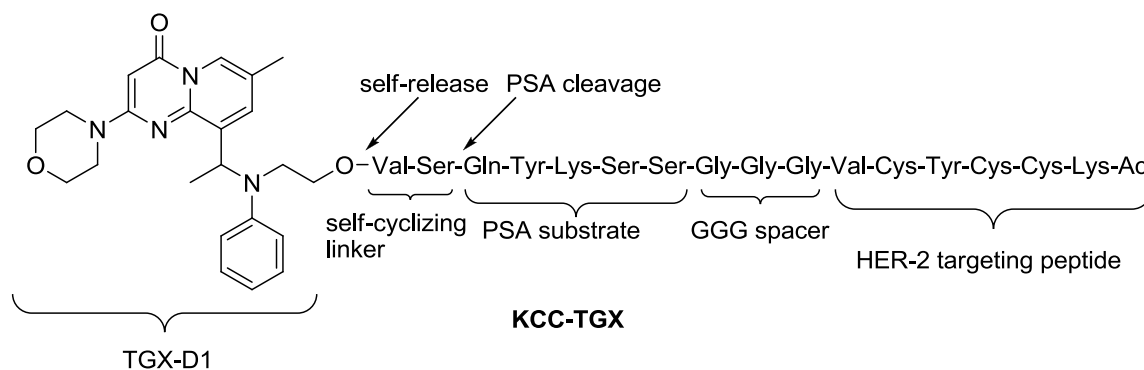
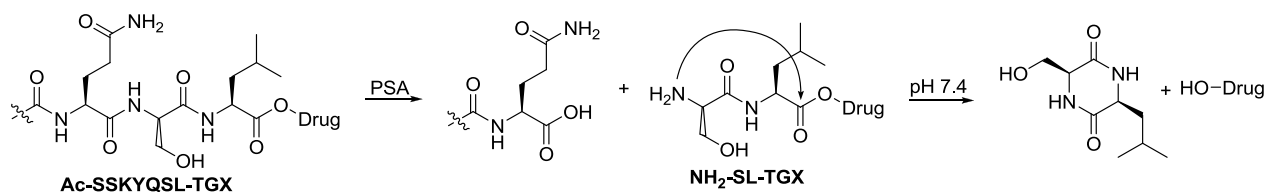


Рис. 14 Структура конъюгата и его составные части

После расщепления соединения ферментом PSA, этот линкер самоциклизуется с высвобождением соединения лекарства TGX-D1:



Полученные соединения были протестированы на биологическую активность на серии клеток LNCaP. Захват раковыми клетками лекарства для данного конъюгата в 4-8 раз больше чем для его составных частей по отдельности, следовательно конъюгаты данного типа могут применяться для адресной доставки лекарств в опухолевые клетки.

#### 1.2.2.5. Лиганды, содержащие биотин

Биотин, также известный как витамин H или коэнзим R – биологически активное соединение, присутствующее в каждой клетке. Биотин является необходимым соединением для процессов роста клетки, синтеза жирных кислот и их метаболизма, а также метаболизма

аминокислот. Биотин является кофактором, ответственным за перенос диоксида углерода в некоторых процессах карбоксилирования-декарбоксилирования.

Биотин и его производные широко применяются в биотехнологии благодаря его способности образовывать прочный ( $K_d=10^{-15} \text{ M}^{-1}$ ) комплекс со стрептавидином. Это взаимодействие является одним из наиболее сильных известных нековалентных взаимодействий. Большинство используемых производных биотина являются амидами или эфирами биотина, т.е. в их образовании задействована карбоксильная группа боковой цепи. В то же время, т.к. за связывание со стрептавидином ответственен мочевиновый фрагмент кольца, N-ацилированные и N-алкилированные биотины применяются реже. N-ацилированный биотин применен в качестве ингибитора биотин-CoA-карбоксилазы [54]. N,N'-диалкилированный биотин использован в качестве ингибитора протеазы ВИЧ [55].

Биотинилированные белки и пептиды широко применяются в различных биологических и биохимических исследованиях. Примерами использования таких соединений идентификация и оптимизация субстратов для различных киназ [56], фосфатаз [57], ацетилтрансфераз и гистон-деацетилаз [58]. Биотинилированные пептиды применяют для исследования белок-белковых взаимодействий с помощью технологии пептидных микрочипов (peptide microarray) [59,60]. Пептиды и белки, содержащие биотиновый фрагмент, также нашли применение в иммуноферментном анализе (ELISA) [61].

Следует отметить, что биотин экспрессируется в опухолевых клетках молочной железы, кишечника и желудка, что также определяет использование его производных в качестве векторных опухолевых лигандов [62,63].

В ходе первой части литературного обзора рассмотрены различные виды органических лигандов, ответственных за биологическое действие (адресную доставку, терапию), их синтез и применение. Во второй части литературного обзора будут рассмотрены варианты НЧ для биомедицинского применения, методы их синтеза и использования.

### **1.3. Наночастицы магнетита: синтез и биомедицинское применение**

#### **1.3.1. Синтез наночастиц магнетит-золото типа ядро-оболочка**

##### **1.3.1.1. Виды защитных оболочек**

Как уже было отмечено ранее, НЧ на основе оксидов железа представляются наиболее привлекательными с точки зрения биомедицинского применения. Однако при их введении в живой организм в отсутствие защитной оболочки возникают проблемы, такие как: нестабильность при физиологических условиях [64,65], образование свободных радикалов, опасных для организма [66], а также недостаточно прочная связь с лигандами, необходимыми

для адресной доставки лекарств, что приводит к невозможности последней [67,68]. Устранить вышеперечисленные недостатки способно покрытие НЧ оболочкой, которая, очевидно, должна обеспечивать стабильность НЧ, снижать их токсичность до минимума, а также обладать способностью образовывать прочные связи с различными типами лигандов, которые используются для функционализации поверхности НЧ.

Существует широкий спектр веществ, способных образовывать защитную оболочку на поверхности магнитных ядер, например, органические лиганды [69], полимеры: ПЭГ, декстран, крахмал, хитозан и т.д. [70], биомакромолекулы, липиды [71]; неорганические материалы, такие как оксид кремния, углерод [72,73], а также металлы: золото, серебро, платина [1,74]. Существует и другой способ защиты магнитных наночастиц (МНЧ) – получение частиц с заданными свойствами в полимерной матрице [75]. Метод позволяет получать микрокапсулы, которыми легко управлять при помощи магнитного поля, но он имеет и ряд недостатков – полученные магнитные капсулы имеют достаточно большой размер (порядка 1 мкм) и сложны для функционализации.

Из всех рассмотренных материалов золото является наиболее подходящим кандидатом благодаря его стабильности, биосовместимости, низкой реакционной способности. Также, за счет образования прочной связи сера-золото, энергия которой составляет 40 ккал/моль [76], возможно проведение функционализации поверхности лигандами, содержащими с одной стороны серосодержащий фрагмент (тиольная, дисульфидная группы), а с другой требуемую функциональную группу. Сам процесс покрытия МНЧ золотой оболочкой представляется сложным вследствие большой разницы в природе двух поверхностей. Однако эта задача решается при помощи подбора различных условий получения МНЧ и растворителя [77].

Все методы синтеза МНЧ типа ядро-оболочка схожи в том, что это несколько стадийный процесс, первой стадией которого является получение магнитного ядра. Наиболее распространенным методом синтеза магнитных ядер для НЧ типа ядро-оболочка магнетит-золото является соосаждение солей железа (II, III). Так, например, в работах [78,79] рассмотрены методы получения НЧ магнетит-золото на основе смеси солей железа осаждением растворами аммиака и гидроксида натрия [80] в различных концентрациях. В зависимости от концентрации и условий проведения реакции (температуры, растворителя) размер НЧ магнетита (ядра для НЧ типа ядро-оболочка) может варьироваться от 5 до 30 нм.

Рассмотрим основные методы синтеза МНЧ типа ядро-оболочка, в которых ядром является магнетит, а оболочка – золото (Рисунок 15).

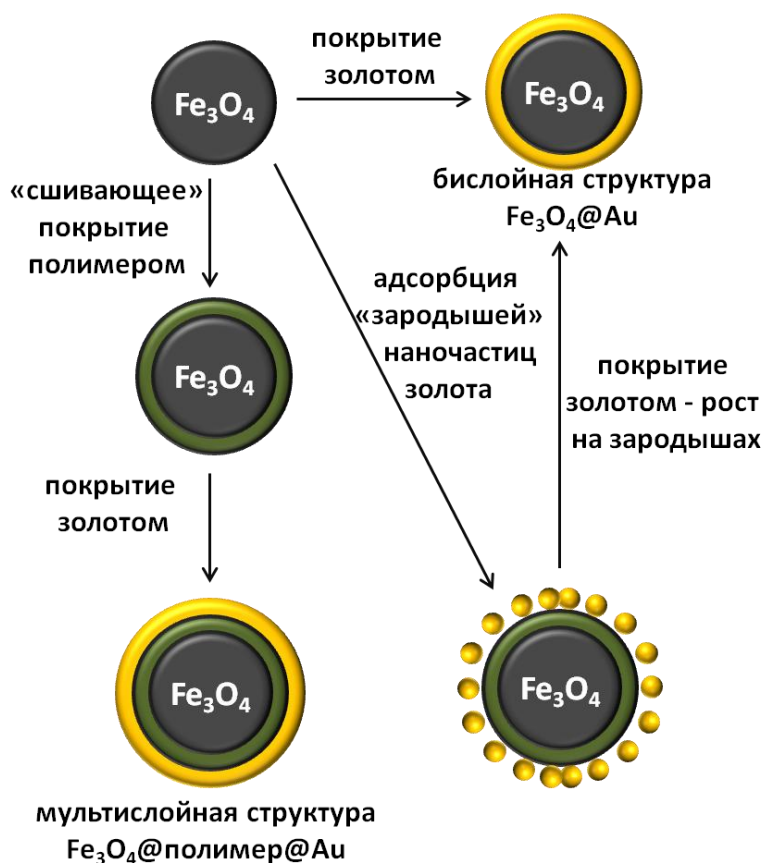


Рис 15 Методы получения НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au типа «ядро-оболочка»

Все структуры магнетит – золото типа «ядро-оболочка» можно разделить на две группы: бислойные и мультислойные (Рисунок 15). Бислойные структуры являются «классическими» и состоят только из магнитного ядра, окруженного золотой оболочкой. Мультислойные структуры состоят более чем из двух слоев; как правило, их три: магнитное ядро, «сшивающий» материал (SiO<sub>2</sub>, полимеры) и золотая оболочка. Соответственно, все подходы к синтезу МНЧ типа «ядро-оболочка», покрытых золотом, можно разделить на две группы: те, в которых авторы получают бислойные структуры и те, в которых авторы получают мультислойные структуры. В свою очередь, в первой группе методов можно выделить «прямое» нанесение золотой оболочки на поверхность НЧ магнетита, а также покрытие оболочкой, в котором как промежуточный этап используется получение зародышей золота.

### 1.3.1.2. Методы формирования бислойных структур

Наиболее часто встречающиеся методы получения НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au предполагают формирование золотой оболочки непосредственно на поверхности МНЧ. Ниже будут перечислены основные подходы.

#### 1. Восстановление золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия при кипячении.

Так, в работах [75,81] методом соосаждения были синтезированы НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> средним диаметром 9 и 20 нм; на этапе покрытия оболочкой они были добавлены в раствор HAuCl<sub>4</sub>, доведенный до



кипения, затем в реакционную смесь быстро приливали раствор цитрата натрия, играющего роль восстановителя, затем реакционную смесь кипятили в течение 5 минут (Рисунок 16).

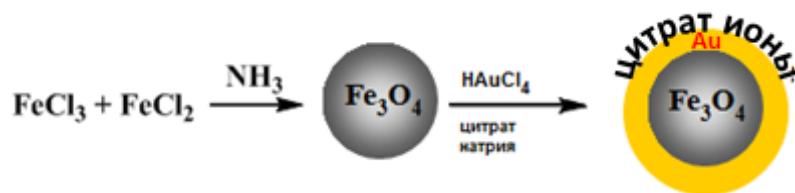


Рис. 16 Получение НЧ магнетит-золото методом восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия

По данным ПЭМ, средний диаметр полученных сферических частиц составил 12 и 22 нм, соответственно. Данный метод является одним из самых простых; вместе с тем, в итоговой смеси присутствовало большое количество непокрытого магнетита, а также золотых частиц, не содержащих магнитного ядра. Для очистки полученных частиц авторы предлагали использовать магнитную декантацию.

## 2. Восстановление золотохлористоводородной кислоты боргидридом натрия при воздействии ультразвука.

В статье [82] приводится пример синтеза НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  диаметром  $9,5 \pm 3$  нм методом соосаждения с последующим окислением поверхности хлорной кислотой в инертной атмосфере. На этапе покрытия оболочкой в раствор НЧ добавляли  $\text{HAuCl}_4$  и  $\text{NaBH}_4$  и обрабатывали ультразвуком в течение 5-10 мин для предотвращения агрегации частиц. Полученные НЧ имели диаметр  $12,5 \pm 3$  нм. Достоинствами данного метода являются его простота и отсутствие высоких температур, недостатками – неясность механизма образования золотой оболочки в условиях ультразвуковой обработки, неоднородность получаемых частиц по морфологии.

## 3. Итерационное восстановление золотохлористоводородной кислоты гидрохлоридом гидроксиламина.

В работе [83] описан синтез НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  диаметром  $9 \pm 3$  нм методом соосаждения с последующим их окислением до  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  в кислой среде при умеренном нагревании; после этого частицы перемешивали с раствором цитрата натрия в течение 15-30 минут для замены  $\text{OH}^-$  - ионов на поверхности маггемита на цитрат-ионы. Затем получившийся осадок растворяли в растворе ТМАОН (тетраметил-аммоний гидроксида), далее при перемешивании в течение часа попеременно вносили порции растворов  $\text{HAuCl}_4$  и  $\text{NH}_2\text{OH}^+\text{HCl}$  с интервалом 15-20 минут между добавлениями. Диаметр полученных НЧ составил  $57 \pm 14$  нм. Авторы отмечают, что, начиная со второй итерации, после внесения порций золотосодержащей

соли и восстановителя средний диаметр частиц не менялся, они лишь становились более сферическими, что по их мнению, свидетельствовало о поэтапном наращивании золотой оболочки на поверхности МНЧ (Рисунок 17). Таким образом, данный метод проводится при комнатной температуре и позволяет наблюдать процесс образования оболочки *in situ*, однако приводит к широкому распределению НЧ по размерам.

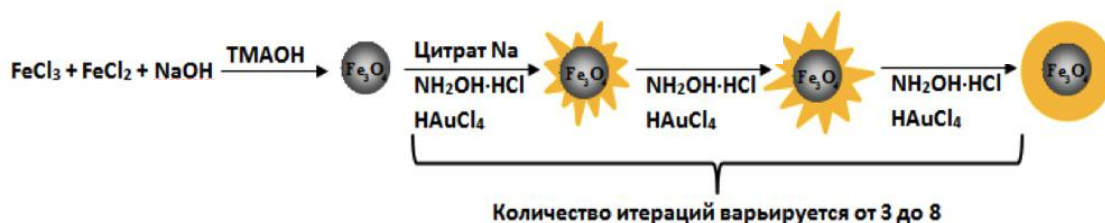


Рис. 17 Схема итерационного восстановления  $\text{H[AuCl}_4\text{]}$  на поверхности магнетита

#### 4. Термическое разложение ацетата золота в присутствии восстановителя. [84,85]

Другим методом получения НЧ магнетита для синтеза материалов типа ядро-оболочка является восстановление солей железа (III). Для получения НЧ магнетита диаметром 4-5 нм используют частичное восстановление ацетилацетоната железа (III) в дифениловом эфире, в присутствии 1,2-гексадекандиола, олеиновой кислоты, олеиламина в инертной атмосфере при тщательном перемешивании при  $210^\circ\text{C}$  [86]. Смесь используют без дополнительного выделения и очистки магнетита. НЧ ядро-оболочка получают восстановлением ацетата золота в присутствии магнетита [87] (соотношение  $\text{Au:Fe} = 7:1$ ), стабилизирующего лиганда и восстановителя в дифениловом эфире при  $180^\circ\text{C}$ . При помощи центрифугирования выделены две серии частиц размером  $12.1 \pm 1.4$  нм и  $6.6 \pm 0.4$  нм (Рисунок 18) суспензированные в гексане в присутствии олеиламина и олеиновой кислоты.

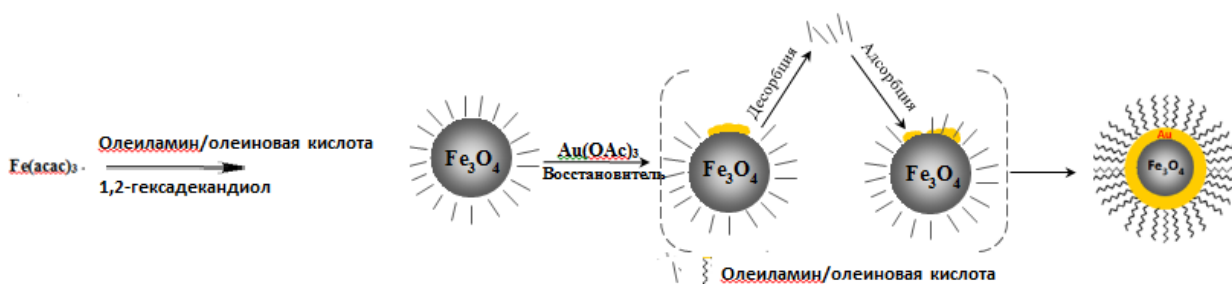


Рис. 18 Получение НЧ магнетит-золото в органической фазе

Частицы размером 12 нм могут быть получены в присутствии олеиламина и олеиновой кислоты по модифицированной методике [84]. Магнитные ядра  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  покрыты олеиламином и

олеиновой кислотой (10нм) получают по представленной ранее методике, термическим разложением олеата железа (III) в смеси олеиламина и олеиновой кислоты [88].

Синтез НЧ ядро-оболочка ведут при комнатной температуре восстановлением золотохлористоводородной кислоты в хлороформе в присутствии олеиламина (Рисунок 19). Полученные НЧ оксид железа-золото переводят в водную фазу смешиванием цитрата натрия и цетилтриметиламмоний бромида. Полученные водорастворимые частицы  $Fe_3O_4@Au$  получают с различной толщиной слоя золота, что дает возможность варьировать магнитные и оптические свойства.



Рис. 19 Получение НЧ магнетит-золото в хлороформе в присутствии олеиламина

Данный метод [83,87,89,90,91,92,93]отличается от предыдущих тем, что частицы могут быть легко переведены из органической в водную фазу. Было показано, что СТАВ является необходимым реагентом для этого процесса. Для таких частиц характерна возможность получать различную оболочку и варьировать в широком спектре плазмонные свойства частиц [94,<sup>95</sup>,<sup>96</sup>]. МНЧ ядро-оболочка стабилизированные цитрат ионом и СТАВ устойчивы длительное время в водном растворе.

Достоинствами этого метода являются однородность и узкое распределение получаемых частиц по размеру, отсутствие дополнительной стадии выделения и обработки магнетита перед покрытием; недостатками – длительное время синтеза, необходимость высоких температур, проведение синтеза в органической среде с необходимостью дальнейшего перевода в водную фазу.

5. Синтез в обратных мицеллах [97]. Синтез МНЧ ядро-оболочка по методу Лина [89] заключается в получении НЧ в обратных мицеллах ЦТАБ соосаждением и неполным восстановлением боргидридом натрия солей железа (II, III) в присутствии бутанола-1 и октана как масляной фазы. Размер обратных мицелл зависит от мольного соотношения воды и

поверхностно-активного вещества, в данном случае соотношение вода : ЦТАБ составляло 8:1. Для получения МНЧ типа ядро-оболочка к смеси частиц магнетита в обратных мицеллах добавляли раствор золотохлористоводородной кислоты, также в ЦТАБ, бутанол, октан и раствор восстановителя боргидрида натрия, рН раствора поддерживали около 11 при помощи добавления щелочи (Рисунок 20). Были получены МНЧ ядро-оболочка размером 22 нм, магнетит имел средний размер – 16 нм, таким образом толщина золотой оболочки составила около 3 нм. Путем варьирования температуры и соотношения реагентов для образования мицелл [98] могут быть получены частицы магнетита и магнетита-золото со средним диаметром 9 и 13 нм, соответственно. Преимущества и недостатки метода получения НЧ магнетита, покрытого золотой оболочкой, в обратных мицеллах те же, что и для получения НЧ магнетита.

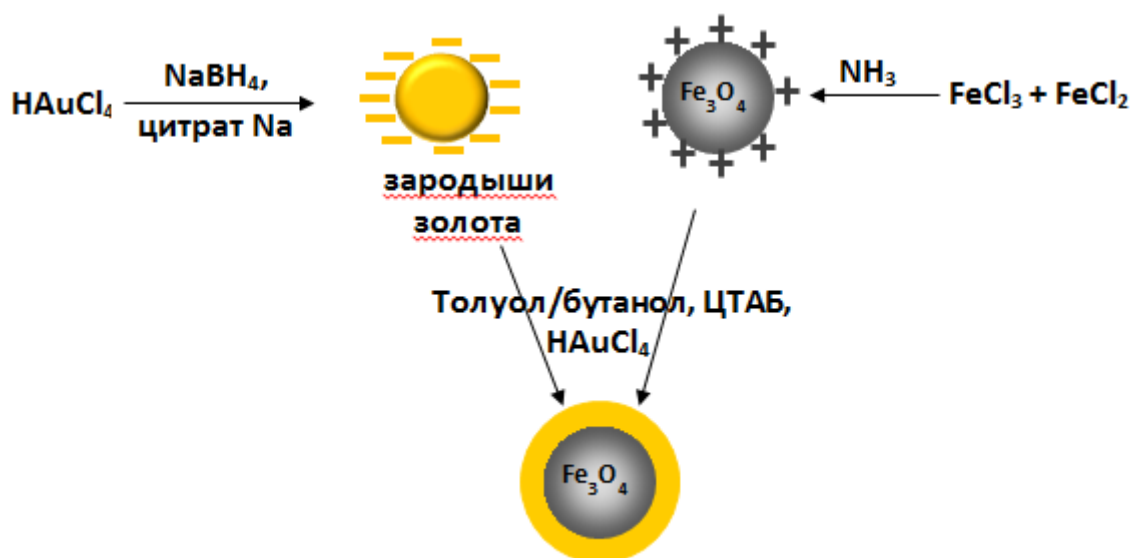


Рис. 20 Получение НЧ магнетит-золото в обратных мицеллах

#### 6. Одностадийный метод синтеза в присутствии углеводов

Перспективным методом получения частиц типа ядро-оболочка является одностадийный метод синтеза НЧ магнетит-золото в присутствии углеводов (Рисунок 21) [99]. Данный метод отличается от приведенных ранее тем, что в одну стадию получают частицы золото-оксид железа, модифицированные необходимым лигандом.

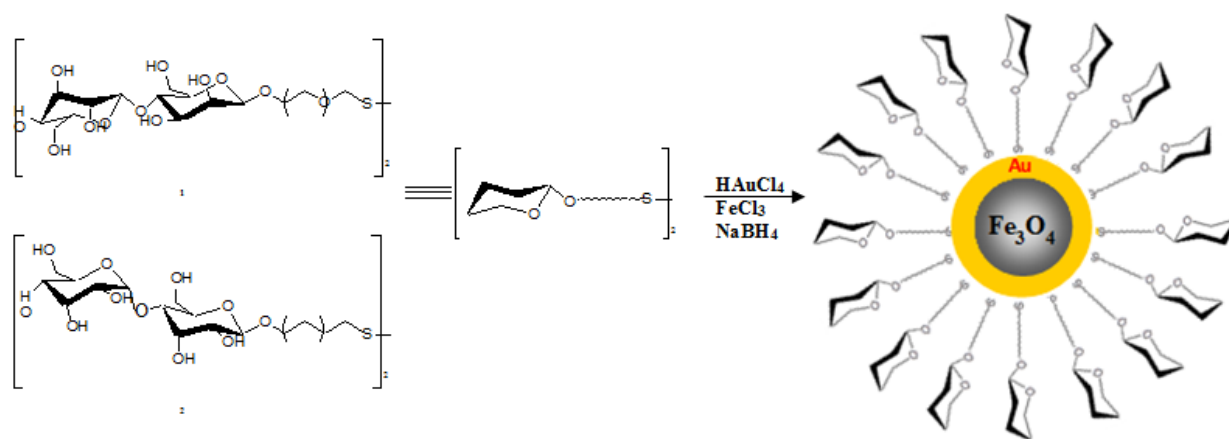


Рис. 21 Получение НЧ магнетит-золото одностадийно в присутствии углеводов

Для приготовления МНЧ типа ядро-оболочка, содержащих углеводы на поверхности, к раствору бифункционального дисульфида, содержащего фрагмент сахара, в метаноле добавляют водные растворы золотохлористоводородной кислоты и хлорида железа (III) и восстанавливают полученную смесь боргидридом натрия на воздухе. Полученные частицы имеют средний диаметр 2 нм и следующий элементный состав:  $(C_{20}H_{37}O_{14}S)_{95}Au_{266}Fe_{48}$ . По представленной методике были получены НЧ магнетит-золото функционализированные различными углеводами: мальтоза, глюкоза, лактоза. Диаметр частиц варьируется от 1.6 до 2.5 нм, с очень узким распределением по размерам [100]. В данном методе не показано имеют ли полученные частицы структуру ядро-оболочка, но есть доказательства преимущества использования таких частиц по сравнению с частицами на основе только золота. Данные частицы обладают магнитными свойствами, и, следовательно, легко управляемы и выделяемы, а также могут быть использованы для получения магнитно-резонансного изображения, точечной доставки и медицинской диагностики.

### 7. Восстановление в присутствии ТМАОН

Еще одним методом получения золотой оболочки на поверхности магнитных ядер, полученных соосаждением солей железа, является восстановление золотохлористоводородной кислоты гидразином в присутствии ТМАОН (Рисунок 22) [101,102]. Соотношение магнитных частиц к золоту используют 1 к 5, что является оптимальным методом получения НЧ типа ядро-оболочка с минимальной толщиной оболочки (3-4 нм). Размер полученных НЧ составляет 20 нм.

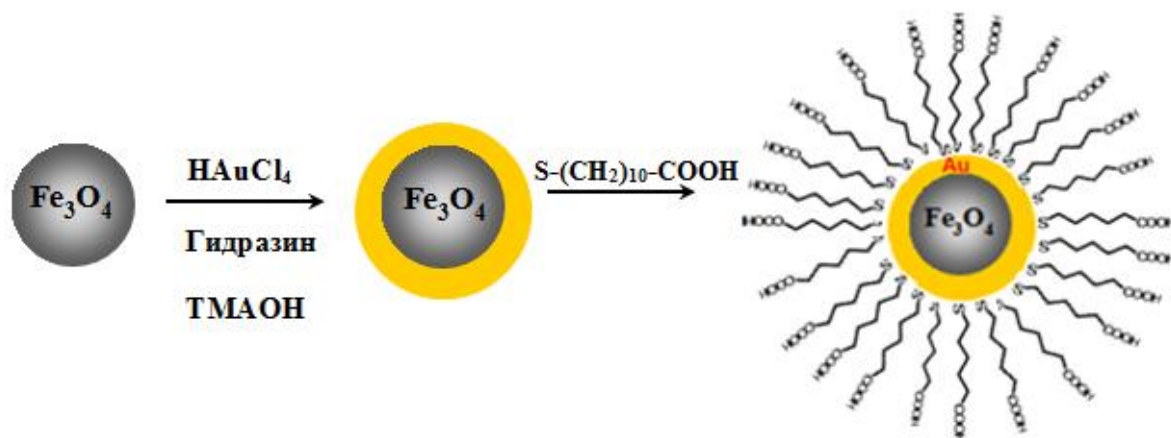


Рис. 22 Получение НЧ магнетит-золото восстановлением гидразином

### 1.3.1.3. Методы формирования мультислойных структур

Мультислойные структуры в большинстве случаев состоят из магнитного ядра, «сшивающего» материала и золотой оболочки. В качестве «сшивающего» материала могут выступать оксид кремния [103], полимеры [104] и некоторые другие. «Сшивающий» слой должен стабилизировать НЧ магнетита и предотвращать их агрегацию, обеспечивать прочную связь магнетита с зародышами золота на поверхности, создавая центры зародышеобразования для формирования золотой оболочки; кроме того, такой слой должен быть биосовместимым и стабильным при повышенных температурах. В связи с вышеперечисленным выбор «сшивающего» слоя и подхода к его получению представляется крайне важным.

В качестве «сшивающего» материала часто используется полиэтиленимин (PEI), так как каждый третий его атом – это атом азота аминогруппы, содержащий протон. Для синтеза магнитных ядер стабилизированных полиэтиленимином могут быть использован метод соосаждения с дальнейшим покрытием НЧ магнетита полимером [105], так и метод окисления солей железа (II) с последующим осаждением в присутствии полиэтиленимина. В работах [106,107] НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$  были синтезированы при помощи окисления сульфата железа (II) нитратом калия в щелочной среде в присутствии PEI. Полученные НЧ имели форму кубов с диагональю 50 нм и 20 нм. Для получения НЧ типа ядро-оболочка на первой стадии магнитные ядра покрывают предварительно синтезированными НЧ золота, диаметром 2-3 нм (зародышами). Синтез зародышей осуществляется путем восстановления золотохлористоводородной кислоты боргидридом в присутствии цитрата натрия [108]. Затем поверхность частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI@Au$  (зародыши) вновь функционализировали PEI. На заключительном этапе золотую оболочку на поверхности частиц получали путем итерационного восстановления  $\text{HAuCl}_4$  гидрохлоридом гидроксилamina  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (Рисунок

23). По данным ПЭМ, были получены НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@\text{Au}$  диаметром 50-150 нм и  $30\pm 5$  нм соответственно.



Рис. 23 Схема получения НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@\text{Au}$  [41]

Для получения многослойных МНЧ типа ядро-оболочка, содержащих в качестве ядра – НЧ магнетита, а в качестве оболочек последовательно слои полимера и золота, используется многостадийный синтез [109]. На первом этапе классическим методом соосаждения получают НЧ магнетита, в присутствии олеиламина, затем их покрывают слоем полимера в инертной атмосфере в гексане, используя в качестве сополимеров метакриловую кислоту и стирол. На первом этапе функционализируют поверхность частицы (магнетит-полимер) хитозаном, затем адсорбируют зародыши НЧ золота, предварительно полученные восстановлением золотохлористоводородной кислоты боргидридом в присутствии цитрата натрия, и на финальной стадии получают золотую оболочку восстановлением дополнительной порции золотохлористоводородной кислоты гидроксиламином (Рисунок 24). Полученные сферические частицы имеют размер  $300\pm 20$  нм.

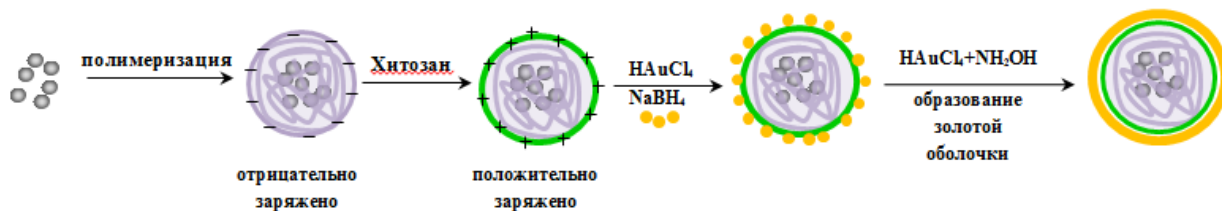


Рис. 24 Получение многослойных НЧ магнетит-полимер-золото

В качестве «сшивающего» материала также используется полианилин (PANI). Было показано, что МНЧ, покрытые PANI, являются перспективными для иммобилизации ферментов, выделения нуклеиновых кислот, материалов для биосенсоров и т.д. [110]. НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  были получены сольвотермальным методом и суспензированы в воде, далее к ним был добавлен анилин в присутствии  $\text{HCl}$ , полученную смесь перемешивали в течение 12 часов. Для инициирования окислительной полимеризации в раствор был добавлен пероксодисульфат аммония. Последующая обработка НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PANI}$  ультразвуком и присутствие уксусной кислоты вызывало появление на их поверхности положительных зарядов; дальнейшее присоединение зародышей золота осуществлялось благодаря электростатическому

притяжению. На заключительном этапе была получена золотая оболочка, в качестве восстановителя использовался  $\text{NaBH}_4$ . Диаметр магнитного ядра составил 170 нм, толщина золотой оболочки – 3 нм.

Отдельным классом материалов магнетит-золото являются НЧ имеющие на поверхности магнитного ядра не связанные между собой НЧ золота [111]. Такие НЧ имеют физико-химические свойства отличные от рассмотренных выше. В большинстве случаев получение НЧ имеющих структуру типа ядро-зародыши основано на получении на первой стадии частиц магнетита в полимерной матрице, и на дальнейшей адсорбции НЧ золота на поверхности полимера (Рисунок 25) [112]. Адсорбция может иметь как физическую, так и химическую природу [113]. Так например, в работе [114] представлено получение НЧ магнетит-золото по золь-гель технологии с использованием тетраэтоксисилана и 3-(меркаптопропил)триметоксисилана (МРТМС). На первом этапе получают гель, содержащий магнетит покрытый силаном, затем поверхность НЧ активируют вводя серосодержащие группы, и на последней стадии проводят хемосорбцию НЧ золота за счет образования связей сера-золото. Размер НЧ золота при покрытии поверхности магнитного ядра не увеличивается, и составляет 16 нм. Кроме МРТЭС в реакции активации частиц магнетита стабилизированных силаном может быть использован 3-аминопропилтриэтоксисилан.

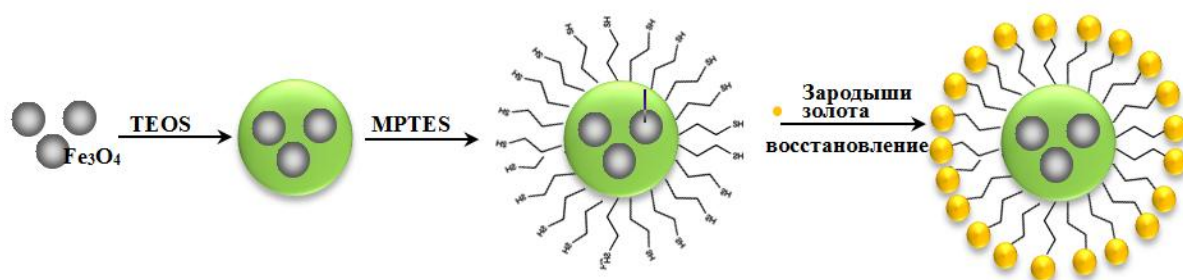


Рис. 25 Получение мультислойных НЧ магнетит-силан-золото

Аналогичное взаимодействие тио-группы с поверхностью НЧ золота используют в синтезе НЧ магнетит-золото (типа ядро-зародыши) в полиэтиленгликоле [115]. Для синтеза магнитного ядра хлорид железа (III) частично восстанавливают в присутствии ацетата натрия и 1,6-диамингексана, затем активируют поверхность частиц магнетита аминокислотой (цистеином) в условиях карбодиимидного синтеза. На последней стадии НЧ золота сорбируются с образованием связи сера-золото.

### 1.3.2. Очистка и функционализация наночастиц магнетит-золото



Отличительной особенностью синтеза МНЧ типа «ядро-оболочка» является необходимость их очистки от не покрытых оболочкой частиц, а также от частиц, не содержащих магнитного ядра. Стоит отметить, что большое число авторов не описывают проведение очистки, считая выход наночастиц «ядро-оболочка» близким к 100%. Для дальнейшего биомедицинского применения также важна функционализация поверхности частиц, то есть, их связывание с различными органическими лигандами и биомолекулами.

### 1.3.2.1. Очистка от частиц, не покрытых оболочкой

Распространенным способом очистки от не покрытых НЧ магнетита/ маггемита является центрифугирование при умеренных скоростях (до 1000 об/мин). Наиболее подробно этот процесс описан в статье [93], авторы которой выделили фракцию НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  диаметром  $12,1 \pm 1,4$  и  $6,6 \pm 0,4$  нм, последовательно центрифугируя раствор и отделяя осадок при 7000 и 14000 об/мин, соответственно; в конечном растворе присутствовали только НЧ магнетита (Рисунок 26). Данный метод очистки является щадящим, однако необходимо тщательно подбирать скорость и время центрифугирования, чтобы, с одной стороны, полностью осадить покрытые частицы, с другой – свести к минимуму присутствие магнетита в осадке.

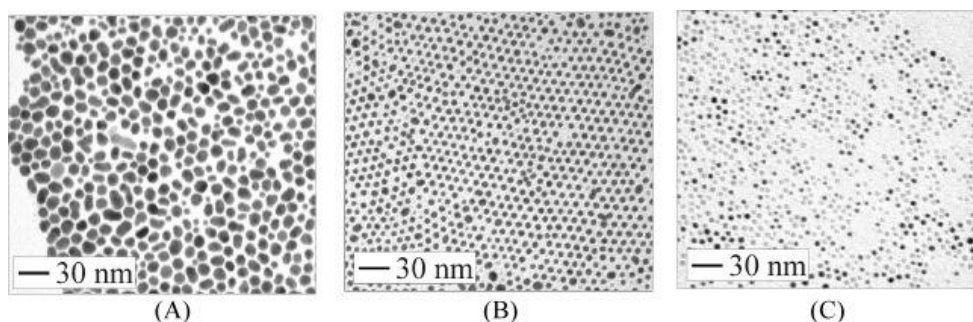


Рис. 26 ПЭМ-микрофотографии НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ , осажденных после центрифугирования при 7000 rpm (А), повторного центрифугирования при 14000 rpm (В) и НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , оставшихся в конечном растворе (С)

Вторым способом является растворение не покрытых частиц магнетита при помощи кислоты, в то время как золотая оболочка (при условии ее сплошности) должна защищать покрытые частицы от реакции с кислотой. В работах [116,117] НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  подвергали обработке 1М/2М раствором  $\text{HCl}$  в течение 18/2 часов, после чего в реакционной смеси остались только НЧ, оболочка которых не содержала дефектов (Рисунок 27). Наличие магнитного ядра внутри оболочки подтверждалось ферромагнитными свойствами полученных частиц. В работе [118] для очистки НЧ  $\text{Fe}@Au$  использовали многократную обработку 3М раствором  $\text{HCl}$ , причем ее повторяли до тех пор, пока в промывных водах не оставалось железа.

К сожалению, авторами указанных выше работ не обсуждался вопрос стабильности частиц после воздействия на них сильной кислоты в большой концентрации. Возможно, решить эту проблему может выбор более слабой кислоты. Примером может служить статья [119], в которой для воздействия на частицы использовался раствор с 3М концентрацией оксалат-анионов, содержащий в составе оксалат аммония и щавелевую кислоту. Было показано, что в условиях контрольного эксперимента данная смесь полностью растворяет не покрытый магнетит в течение 1 часа, в то время после 24 часов обработки магнетита, покрытого золотой оболочкой, содержание железа в промывных водах не превышало 1%, и цифра не изменилась даже после 168 часов обработки.

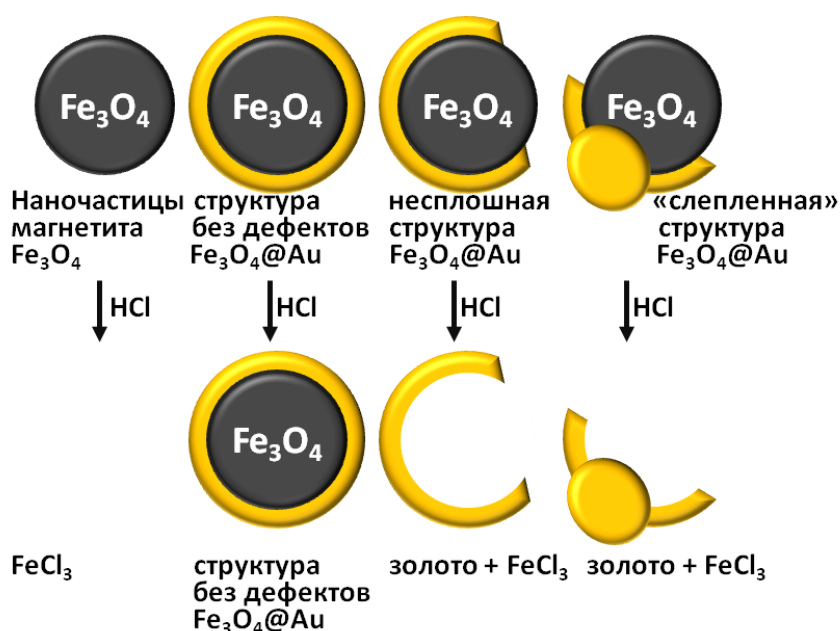


Рис. 27 Воздействие HCl на различные типы частиц [47]

### 1.3.2.2. Очистка от частиц, не содержащих магнитного ядра

Единственный очевидный факт, который можно использовать для очистки от частиц, содержащих в составе только золото, – это проявление магнитных свойств самим ядром. Поэтому все методы очистки от частиц, не содержащих магнитного ядра, так или иначе подразумевают применение магнитной декантации и/или магнитной сепарации.

В работе [89] авторы использовали классическую реакцию получения НЧ  $Fe@Au$  в обратных мицеллах, однако проводили ее по действием магнитного поля величиной 0,5 Тл. В работе [120] упоминается применение колонки MidiMACS<sup>®</sup> для магнитной сепарации, а авторы статьи [121] подробно описали условия очистки НЧ  $Fe_3O_4@Au$  при помощи системы для высокоградиентной магнитной фильтрации, представляющей собой колонку, наполненную стальной пряжей, на которую подается напряжение. Раствор частиц пропускать через эту

систему при помощи перистальтического насоса, после чего МНЧ оставались внутри колонки, а золотые НЧ проходили в свободном объеме.

Заметим, что хорошие результаты может давать и магнитная декантация при помощи постоянного магнита силой 3000-4000G [122] (Рисунок 28, слева). В сочетании с центрифугированием при умеренных скоростях авторам [123] также удалось выделить НЧ  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  средним диаметром 70 нм из смеси частиц  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , Au и  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  в интервале размеров 10-100 нм (Рисунок 28, справа).

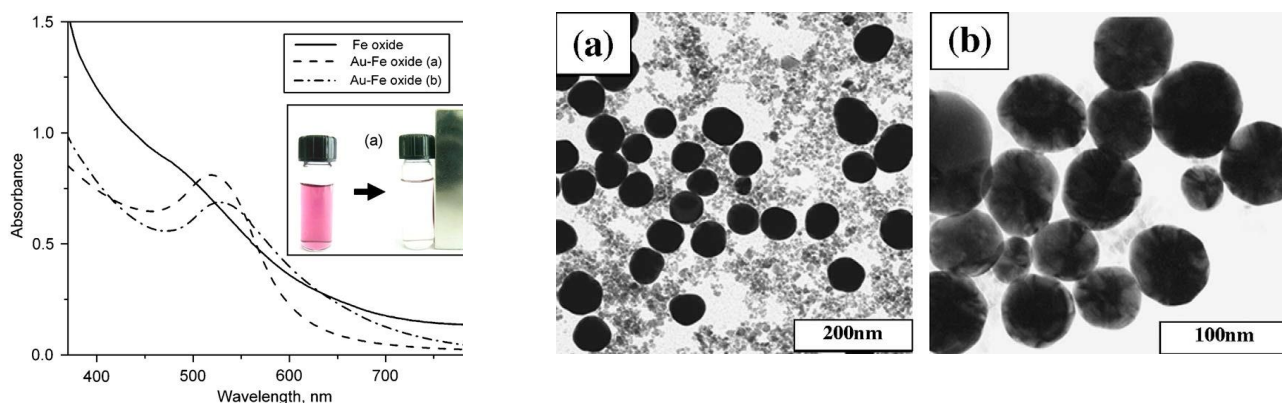


Рис.28 Спектры НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$  в УФ-видимом диапазоне [122] до и после магнитной сепарации (слева) ; ПЭМ-микрофотографии НЧ  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$  до (a) и после очистки (b) [123]

### 1.3.2.3. Функционализация наночастиц магнетит-золото

Одним из преимуществ покрытия МНЧ золотой оболочкой является простота дальнейшей функционализации поверхности, в первую очередь, за счет образования прочной связи золота с серой, и соответственно, связи с тиольной, дисульфидной группой. Также возможно образование связей с аминогруппами лиганда или же взаимодействие по электростатическому механизму. Ниже будут перечислены основные примеры функционализации поверхности МНЧ для дальнейшего биомедицинского применения.

Для стабилизации золотых частиц широко используется их покрытие тиополиэтиленгликолем (ПЭГ, SH-PEG). Он может применяться и для стабилизации магнетит-золотых НЧ, в виде индивидуального покрытия или в смеси с другим лигандом [124]. Однако более практически значимым является использование другого его бифункционального производного, а именно меркапто-PEG-кислоты (Рисунок 29, слева) с молекулярной массой 500-5000 г/моль, которое, помимо повышения растворимости и стабильности частиц, позволяет использовать карбоксильную группу для образования ковалентной связи с аминогруппами биомолекул, обладающих требуемыми функциональными свойствами. Так, в работе [125] меркапто-PEG-кислота использовалась как промежуточное соединение для модификации

поверхности магнитно-золотых НЧ антителами к PSCA (специфичному антигену простаты у человека).

Для функционализации поверхности частиц также используются тио-кислоты с меньшей длиной углеводородной цепи, в частности, описано применение 3-меркаптопропионовой (3-МПК) кислоты (Рисунок 29, слева) как промежуточного линкера. В [126] его карбоксильная группа используется для образования связи с алкил-замещенной борной кислотой, которая выступает в роли сенсора для обнаружения многоатомных спиртов (например, фруктозы, Рисунок 29, справа). В [105] при помощи 3-МПК модифицировали поверхность магнитно-золотых НЧ нитрилотриуксусной кислотой (Рисунок 31, слева), которая в сочетании с  $Ni^{2+}$  используется как сенсор на белковые молекулы с гистидином на конце. В качестве примера короткого линкера можно также привести тиомочевину (Рисунок 29, слева), которая совместно с глутаровым альдегидом использовалась в [127] для пришивки к МНЧ антител Cту1Ас.

В литературе описано покрытие НЧ  $Fe_3O_4@Au$  11-меркаптоундекановой (11-МУК) и 16-меркаптогексадекановой (16-МГК) кислотами (Рисунок 29, слева), которые также выступают как линкеры, содержащие функциональные группы для дальнейшего связывания. В [128] 11-МУК использовалась для модификации поверхности НЧ стрептавидином, меченным флуоресцентной меткой. В других работах частицы  $Fe_3O_4@Au$  предварительно покрывали 16-МГК, для того чтобы впоследствии присоединить к ним моноклональные антитела Anti-CD3 [129] и концевую гекса-аргинин-эстеразу [123].

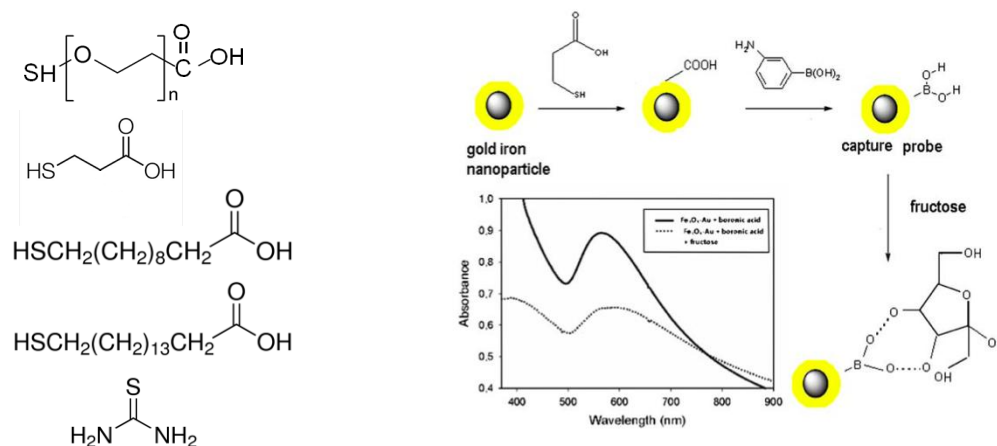


Рис. 29 Лиганды, используемые для функционализации поверхности НЧ, сверху вниз: меркапто-PEG-кислота, 3-МПК, 11-МУК, 16-МГК, тиомочевина (слева); схема функционализации и УФ-видимый спектр НЧ  $Fe_3O_4@Au$ , покрытых 3-МПК и 3-аминофенилборной кислотой, а также их взаимодействие с фруктозой

Стоит отметить, что во всех вышперечисленных работах для модификации НЧ целевыми биомолекулами карбоксильную группу меркапто-кислоты в растворе необходимо

было активировать промежуточной реакцией с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимидом (S-NHS) (Рисунок 30). В совокупности все стадии реакции занимали от 3 до 48 часов и проводились при комнатной температуре или умеренном нагревании в деионизованной воде, либо этиловом спирте. Для очистки от не связавшегося лиганда большинство авторов использовали магнитную декантацию.

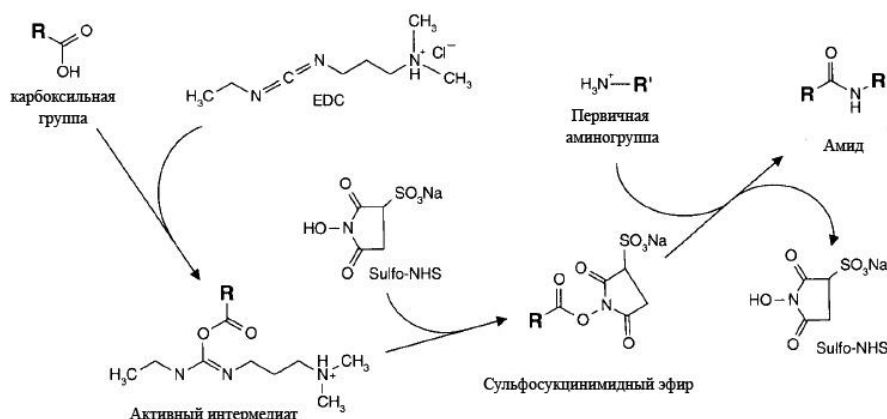


Рис. 30 Сшивка карбоксильной и аминогруппы с применением EDC и S-NHS

Во многих случаях НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  напрямую модифицируют соединениями, несущими функциональную нагрузку. Так, в работе [130] описана процедура покрытия б-ферроценилгексантиолом (Рисунок 31, слева), а в [102] – 3'-алкантиол-олигонуклеотидами для их использования в качестве детекторов точечных мутаций ДНК. Если говорить о модификации соединениями с большей молекулярной массой, то можно привести примеры присоединения к НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  антибиотика доксорубина [131] за счет связи с его концевой аминогруппой, полиакриловой кислоты по электростатическому механизму (Рисунок 31, справа) в присутствии ЦТАБ с последующей модификацией иммуноглобулином G козы, меченным флуоресцентной меткой, либо же иммуноглобулином G напрямую [122], а также хитозаном [132].

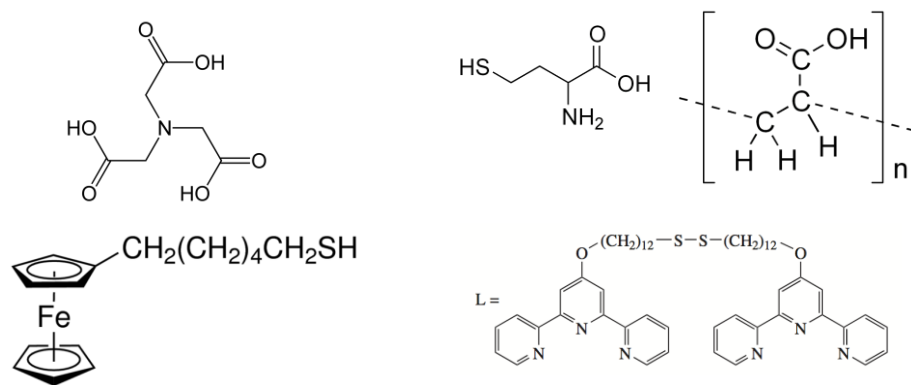


Рис. 31 Соединения, используемые для модификации НЧ, сверху вниз: нитрилотриуксусная кислота, 6-ферроценилгексантиол (слева), гомоцистеин, полиакриловая кислота, терпиридин-содержащий лиганд (справа)

Отдельно стоит рассмотреть модификацию, когда для нее используются частицы без дополнительной стадии выделения и очистки. Так, в [133,79] описана функционализация лигандом НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ , полученных методом цитратного восстановления при повышенной температуре, причем лиганд добавлялся в кипящую смесь виде порошка. В [133] это был гомоцистеин (Рисунок 31, справа), в работе [79] использовался терпиридин-содержащий лиганд (Рисунок 31, справа), сам процесс функционализации занимал 5-10 минут.

### 1.3.3. Биомедицинское применение наночастиц магнетита и магнетит-золото

В области биомедицинского применения МНЧ можно выделить два направления. Первое, наиболее изученное в настоящее время – диагностика *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* МНЧ оксидов железа используются для увеличения контрастности изображения в магнитно-резонансной томографии [134]. Примерами применения НЧ магнетита и магнетит-золото в диагностике *in vitro* является их использование в качестве сенсоров на различные антитела, для магнитной сепарации [135], иммуноанализа, иммобилизации различных биомолекул, например, стрептавидина [128], моноклональных антител Anti-CD3 [129], фермента химотрипсина [136], олигонуклеотидов [102] и так далее.

Вторым, еще не получившим широкого распространения, но не менее перспективным направлением, является терапевтическое воздействие. Здесь, в свою очередь, можно выделить адресную доставку лекарств [137] и магнитную гипертермию [138]. Стоит отметить, что одна система может представлять собой средство для диагностики заболевания (например, быть МРТ-контрастным агентом) и одновременно содержать в себе лекарственный препарат. В таком случае говорят о так называемых агентах-тераностиках [70].

Кроме того, если речь идет о диагностике и биомедицинском применении частиц *in vivo*, важную роль играет изучение вопросов, связанных с их биораспределением и токсичностью.

### **1.3.3.1. Биораспределение и токсичность магнитных наночастиц**

Если МНЧ попадают в организм при внутривенном введении, происходит быстрая опсонизация - реакция НЧ с белками плазмы крови [139]. Далее опсонизированные частицы быстро выводятся из полости сосудов в результате их захвата макрофагами печени (клетками Купфера), селезенки и костного мозга – тканей, принадлежащих к ретикулоэндотелиальной системе (РЭС) [140]. Если эти органы и являются целевыми сайтами для доставки частиц, такой захват может быть выгодным. Если же необходимо доставить МНЧ к органам, не принадлежащим РЭС, следует предотвратить опсонизацию частиц. Одним из наиболее эффективных методов их защиты является покрытие ПЭГ, который замедляет опсонизацию частиц за счет стерического эффекта, повышая время их циркуляции в крови [141]. Долго циркулирующие частицы могут достичь пораженной области (опухоли) пассивным образом вследствие повышенной проницаемости стенок ее сосудов к различным веществам. Однако накоплением МНЧ в опухоли можно управлять и при помощи внешнего магнитного поля. Глубина эффективного действия магнитного поля составляет от 0,5 до 15 см в зависимости от размера МНЧ, силы магнитного поля, типа ткани.

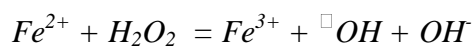
Оптимальными для внутривенного введения с точки зрения размера являются МНЧ диаметром 10-100 нм. Если диаметр МНЧ составляет менее 5 или более 200 нм, они подвергаются быстрой фильтрации почками или селезенкой, соответственно [142]. В целом время циркуляции МНЧ в крови обратно пропорционально их размеру, а также зависит от материала покрытия. Так, в случае НЧ магнетита, покрытых декстраном и предложенных для использования в клинике (Ferumoxide диаметром 120-180 нм и Ferumoxtran-10 диаметром 20-40 нм), время полувыведения препарата Ferumoxtran-10 составило 25-30 ч, в то время как для Ferumoxide – всего 8-30 мин [140]. С точки зрения поверхностного заряда предпочтительным является использование нейтрально заряженных частиц, которые в минимальной степени взаимодействуют с белками плазмы, что повышает время их циркуляции в крови [13,141]. В то же время, для отрицательно заряженных частиц, например, магнетита диаметром 8,7 нм, покрытого димеркаптоянтарной кислотой, наблюдается повышенный уровень захвата клетками (например, раковыми клетками шейки матки HeLa) по сравнению с нейтрально заряженными частицами [140]. Основным методом захвата частиц магнетита клетками – клатрин-зависимый эндоцитоз, после чего они попадают в лизосомы, где подвергаются расщеплению ферментами, ответственными за метаболизм железа. Образовавшиеся ионы пополняют запас железа в организме и постепенно выводятся из него пищеварительной системой или почками [143].

С вопросом биораспределения МНЧ неразрывно связан вопрос их токсичности. В случае, если речь идет о НЧах магнетита, покрытого золотом, следует отдельно учитывать возможную токсичность всех компонентов.

Наиболее распространена оценка токсичности НЧ *in vitro* на изолированных клеточных культурах. В основном используется МТТ-тест, при помощи которого изучается активность ферментов митохондрий. После инкубирования с раствором НЧ к клеткам добавляется МТТ, который под действием ферментов митохондрий живых клеток способен восстанавливаться до окрашенного вещества – формазана, определяемого спектрофотометрически. В присутствии позитивного и негативного контроля (0% и 100% выживаемости клеток, соответственно) значение оптической плотности пересчитывается в процент живых клеток. Альтернативным способом оценки токсичности *in vitro* может служить LDH-тест. Он заключается в спектрофотометрическом наблюдении высвобождения фермента LDH (лактатдегидрогеназы) из клетки, которое происходит при нарушении целостности клеточной мембраны.

Захват НЧ клетками можно определить на качественном уровне при помощи оптической и флуоресцентной микроскопии. Для количественного анализа требуется разрушение клеток и растворение частиц под действием раствора сильной кислоты (в случае золотых НЧ – царской водки) и определение концентрации ионов железа и золота в растворе при помощи метода ИСП-МС [144].

При взаимодействии с клетками магнетит может вызывать различные негативные последствия, такие как повреждение целостности мембраны, нарушение функции митохондрий, воспаление, повреждение ДНК, окислительный стресс. [142]. Последнее явление происходит при образовании активных форм кислорода (АФК) по реакции Фентона. Ионы железа возникают в клетке при разложении магнетита в лизосомах; образовавшиеся гидроксильные радикалы могут вступать в нежелательные реакции с ДНК, белками, полисахаридами и липидами.



В большинстве работ исследователи считают магнетит нетоксичным до концентраций порядка 100 мкг/мл [142]. Однако также обнаружено, что эта величина может существенно меняться в зависимости от размера, покрытия частиц или продуктов его разложения, химического состава среды, соотношения ионов  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  в частицах и т.д. Так, в работе [145] было показано, что НЧ магнетита в концентрации 50 мкг/мл, как не покрытые так и покрытые декстраном, вызывают клеточную смерть и сокращают пролиферацию. Причиной токсичности покрытых частиц называется разрушение оболочки декстрана на отдельные цепи, которые взаимодействуют с клетками и вызывают агрегацию магнетита. В то же время, если



для покрытия частиц в этой работе использовался бычий альбумин, токсичности не наблюдалось. Для снижения токсичности частиц также может применяться ПЭГ, ПЭО (полиэтиленоксид) и т.д.

Большинство исследователей считают золотые НЧ нетоксичными вследствие инертности золота. Так, в работе [146] НЧ золота диаметром 4, 12 и 18 нм, функционализированные как ковалентно, так и не ковалентно связанными лигандами (цитрат-ионами, цистеином, глюкозой, биотином, ЦТАБ) при концентрации до 0,25 мкМ были нетоксичны для клеток лейкемии человека. Однако существуют данные, свидетельствующие о токсичности НЧ золота, которая зависит от размера, природы лиганда на поверхности, исследуемой клеточной линии. В работе [147] была обнаружена токсичность НЧ золота диаметром 0,8-1,8 нм в концентрации до 5,6 мкМ для клеток HeLa, в то время как частицы диаметром 15 нм оказались нетоксичны. В работе [148] золотые НЧ диаметром 33 нм до концентрации 120 нМ являлись нетоксичными для клеток карциномы печени человека, однако вызывали дозозависимую смерть клеток карциномы легких человека.

В настоящее время существует ограниченное число работ, посвященных изучению токсичности НЧ магнетита, покрытых золотой оболочкой. Очевидно, что, как и для НЧ магнетита и золота, токсичность должна зависеть от метода получения, размера частиц, природы лиганда на поверхности; кроме того, добавляются такие факторы, как наличие сплошной оболочки и степень очистки от не покрытого магнетита.

В работе [149] изучали токсичность НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  диаметром 18 нм, стабилизированных цитрат-ионами, в концентрации 50 мкг/мл на клетках карциномы печени человека. Вплоть до 24 часов инкубации наблюдалась более чем 80% выживаемость клеток, после 48 часов она снизилась до уровня 60%.

В работе [150] для НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  диаметром 50 нм, стабилизированных цитрат-ионами, наблюдалась более чем 90% выживаемость клеток карциномы печени человека вплоть до концентрации частиц 2 мг/мл. В [151] обнаружили более чем 80% выживаемость клеток HeLa, подвергавшихся воздействию НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  диаметром 5-6 нм, стабилизированных цитрат-ионами, ПЭГ, глюкозой, в концентрации до 1 мг/мл. Кроме того, авторы исследовали захват НЧ клетками, установив их прохождение через клеточную мембрану без нарушения целостности цитоскелета (Рисунок 32).

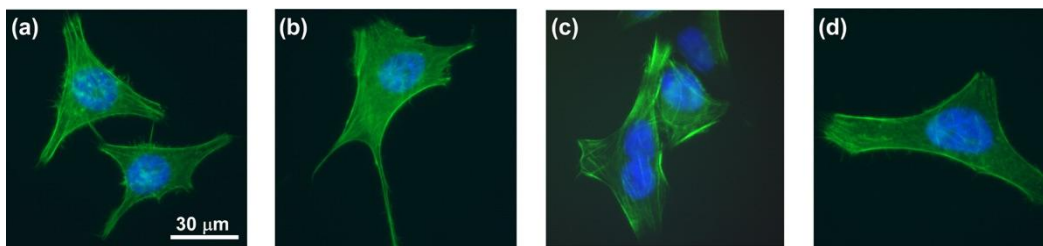


Рис. 32 Конфокальная микроскопия клеток HeLa с окрашенными волокнами F-актина: (a) контрольных, (b), (c), (d) – инкубированных с НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ , стабилизированными цитрат-ионами, ПЭГ и глюкозой, соответственно

В своем роде уникальной работой является [1], авторы которой проводили комплексное изучение токсичности НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  диаметром 35 нм, стабилизированных цитрат-ионами, как *in vitro*, так и *in vivo*. Было установлено, что при инкубировании частиц с фибробластами мыши в течение 24 часов наблюдалась более чем 75% выживаемость клеток вплоть до концентрации частиц 1 мг/мл. Также обнаружено, что при обработке крови кролика растворами НЧ концентрацией до 100 мг/мл в течение часа, гемолиз клеток крови составлял менее 1%. Средняя летальная доза частиц при их внутривенном введении мышам составила 8,39 г/кг веса. При изучении острой токсичности частиц в концентрации 0,1г/кг веса на гоНЧх собаках не было обнаружено побочных эффектов (снижения аппетита, потери веса, изменений в поведении и т.д.).

### 1.3.3.2. Применение магнитных наночастиц в диагностике (МРТ)

В основе метода МРТ лежит взаимодействие радиочастотного поля с магнитными ядрами, находящимися во внешнем магнитном поле [152]. В случае биологических объектов такими магнитными ядрами служат протоны, которые входят в состав молекул воды. Биологические объекты, как правило, содержат большое количество воды и создают в магнитном поле сигналы, которые можно зарегистрировать техническими средствами.

Существуют три основных способа построения МР – изображения [153]: измерение концентрации протонов, а фактически распределения воды в тканях; измерение времени спин-решеточной релаксации  $T_1$  – времени обмена избыточной энергией между магнитными ядрами и решёткой и измерение времени спин-спиновой релаксации  $T_2$  – времени обмена избыточной энергией между магнитными ядрами. Концентрация протонов в тканях является практически постоянной величиной; следовательно, если необходимо повысить контраст в МР-изображении, время  $T_1$  или  $T_2$  – релаксации изменяют при помощи контрастных агентов. В качестве  $T_1$ -контрастных агентов чаще всего используют парамагнитные низкомолекулярные комплексы  $\text{Gd}^{3+}$ , способные координировать молекулы воды и ускорять спин-решеточную релаксацию. [94]. Наиболее распространенными  $T_2$ -контрастными агентами являются ферро- и

суперпарамагнитные НЧ оксида железа, покрытые защитными оболочками, которые создают вокруг себя магнитное поле и уменьшают время спин-спиновой релаксации (Таблица 5). Однако при уменьшении размера частиц до некоторой величины МНЧ могут использоваться и как T1-контрастные агенты [134].

Таблица 5. Наиболее известные T2-контрастные агенты на основе Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [134,154,155]

Соединение	Торговое название	d <sub>HD</sub> , нм	Покрытие	R1, мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> (0,47Т, 37°С)	R2, мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> (0,47Т, 37°С)	Назначение
Ferristene (OMP)	Abdoscan	200-300	Полимер Стирола	нет данных	нет данных	Органы пищеварительной системы
Ferumoxil (AMI 121)	GastroMARK Lumirem	200-300	Силоксан	3,2	72	Органы пищеварительной системы
Ferumoxide AMI-25	Feridex I.V. Endorem	120-180	Декстран	23,9	98,3	Органы РЭС (печень)
Ferucarbotran SHU-555A	Resovist Cliavist	45-60	Карбодекстран	25,4	151	Органы РЭС (печень)
Ferumoxtran (AMI-227)	Combidex Sinerem	20-40	Декстран	21,6	44,1	Лимфоузлы, костный мозг
Feruglose (NC100150)	Clariscan	20	Крахмал, ПЭГ	20	35	Лимфоузлы, органы РЭС, сосуды
SHU-555C	Supravist	15-20	Карбодекстран	7,3	57	Лимфоузлы, костный мозг, сосуды
VSOP-C184	-	8-10	Цитрат	19	29	Сосуды
MION-46	-	8-10	Декстран	16	35	Лимфоузлы, сосуды, сердце

МНЧ оксидов железа чаще всего используют для визуализации печени, селезенки, костного мозга, так как при попадании в организм частицы интенсивно поглощаются органами РЭС. Однако, если на поверхности НЧ находятся специфические молекулы, например, антитела, то возможна направленная визуализация конкретного органа, например, головного мозга. В Таблице 5 собраны характеристики наиболее распространенных МР-контрастных агентов на основе оксидов железа, разработанных для коммерческого использования. Стоит отметить, что в качестве величины, характеризующей эффективность контрастного агента, обычно используют релаксивность R1/R2, обратно пропорциональную соответствующему времени релаксации, отнесенную к концентрации агента.

К недостаткам существующих агентов на основе оксида железа относится их высокая стоимость, возникновение побочных эффектов, а также отсутствие селективности. Поэтому

поиск и разработка новых T2-специфичных контрастных агентов является актуальной задачей. В частности, в литературе для этих целей предлагаются и НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au.

В работе [78] для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au с диаметром ядра менее 10 нм и общим диаметром 19 нм были получены значения R1 и R2 релаксивности 6,87 и 28,15 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> при силе поля 7Т, соответственно. С учетом низкого отношения R2/R1 такие частицы могут использоваться как контрастные агенты обоих типов (Рисунок 33).

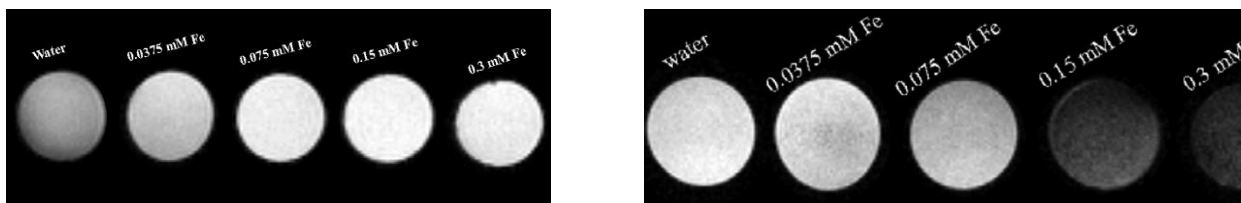


Рис. 33 T1-взвешенное (слева) и T2-взвешенное (справа) изображение НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au в различных концентрациях [78]

В работе [81] изучали релаксивность НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au с диаметром ядра около 14 нм и общим диаметром 20 нм, модифицированных гомоцистеином. При силе поля 1,5 Т были получены значения R1 и R2, равные 3,145 и 165,04 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, соответственно. Вследствие высокого соотношения R2/R1 данные частицы были предложены в качестве T2-контрастного агента. Авторы также отмечали, что соотношение R2/R1, полученное в данной работе, превышает аналогичную величину для коммерческого препарата Resovist в 3 раза, в то время как размер частиц был в 3 раза меньше. Кроме того, при введении частиц в брюшную полость крысы на МРТ-снимках было видно значительное уменьшение интенсивности сигнала от печени, что подтверждало эффективность данного T2-агента.

Комплексное изучение релаксивности также проводилось в статье [156], авторы которой получили НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au с диаметром ядра около 5 нм и толщиной золотой оболочки около 1 нм, модифицированные ПЭГ, а также лигандом cRGD, специфичным к определенным интегринам (антитела). На Рисунке 34, слева приведены полученные значения R1 и R2-релаксивности; стоит отметить, что было получено высокое отношение R2/R1. Частицы также были введены в брюшную полость здоровой крысы, наблюдалось увеличение скорости T2-релаксации и снижение интенсивности сигнала от печени на уровне 70% (Рисунок 34, справа).

LONGITUDINAL ( $R_1$ ) AND TRANSVERSE ( $R_2$ )  
RELAXIVITIES AND RATIO  $R_2/R_1$

	$R_1$ ( $\text{ms}^{-1} \text{ mL mg}^{-1}$ )	$R_2$ ( $\text{ms}^{-1} \text{ mL mg}^{-1}$ )	F
1.5 T	$(3.62 \pm 0.76)10^{-4}$	$(2.1 \pm 0.2)10^{-2}$	58.0
3 T	$(2.88 \pm 0.80)10^{-4}$	$(1.86 \pm 0.06)10^{-2}$	64.6

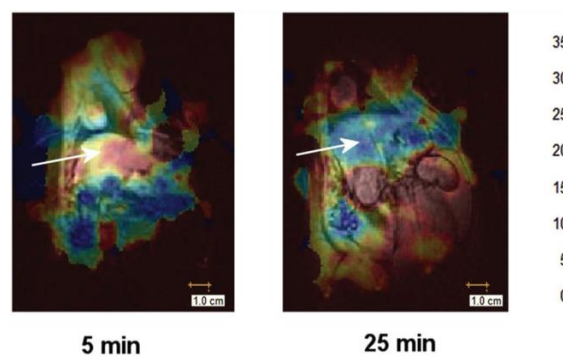


Рис. 34 Скорости T1 и T2-релаксации частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (слева), T2-взвешенное изображение крысы после введения НЧ, печень обозначена стрелкой; также приведена шкала соответствия цвета и времени релаксации (справа)

### 1.3.3.3. Адресная доставка лекарств на магнитных наночастицах

Главными преимуществами использования МНЧ для адресной доставки является то, что они легко визуализируются, в процессе доставки ими можно управлять при помощи внешнего магнитного поля, а также МНЧ могут использоваться как триггеры для контролируемого высвобождения лекарственного вещества из матрицы (геля, дендримера и т.п.) [157].

Для адресной доставки лекарств могут быть использованы МНЧ, либо магнитные нанокапсулы. В первом случае молекулы лекарственного вещества закреплены на поверхности МНЧ или адсорбированы в ее порах. В свою очередь, нанокапсулы представляют собой систему, в которой лекарство заключено в полость, заполненную водой или органическим растворителем, также туда помещаются МНЧ. Обычно их получают в процессе синтеза обратных мицелл, окружают органической мембраной (магнитные липосомы), либо помещают в капсулу из неорганического материала [158].

Существуют работы, в которых для адресной доставки лекарств предлагают использовать магнитные НЧ, покрытые золотом. Так, в статье [128] авторы модифицировали НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (диаметром 15 нм) стрептавидином – белком, имеющим высокое сродство к биотину, который был помечен флуоресцентной меткой. Данная система была предложена для адресной доставки лекарств к мишеням с высокой экспрессией биотин-содержащих соединений. В качестве иллюстрации в работе была проведена предварительная модификация клеток крови селезенки мыши биотин-мечеными антителами anti-CD4 mAbs. Они селективно связывались с  $\text{CD4}^+$ -лимфоцитами, которые далее были успешно выделены из крови путем магнитной сепарации.

В работе [131] НЧ  $\text{Fe}@Au$  с толщиной золотой оболочки 2 и 4 нм было предложено использовать для адресной доставки доксорубина – противоопухолевого антибиотика, который используется при терапии рака желудка, яичников, щитовидной железы. Было

показано, что в течение 26 часов происходит загрузка доксорубицина на уровне 83-94 мкг/мг частиц; исследовалось и высвобождение препарата, оно составило 18-25 процентов от первоначальной загрузки (Рисунок 35, слева). Особенностью этой работы является то, что авторы смоделировали удержание загруженных препаратом частиц действием магнитного поля при симулировании потока крови (использовался PBS-буфер) под давлением в сосудах на специальной установке (Рисунок 35 справа). Было показано, что при умеренных скоростях потока (6 мм/с) и градиенте магнитного поля 15 Т/м происходит удержание в требуемом месте около 50-60% введенных в поток частиц.

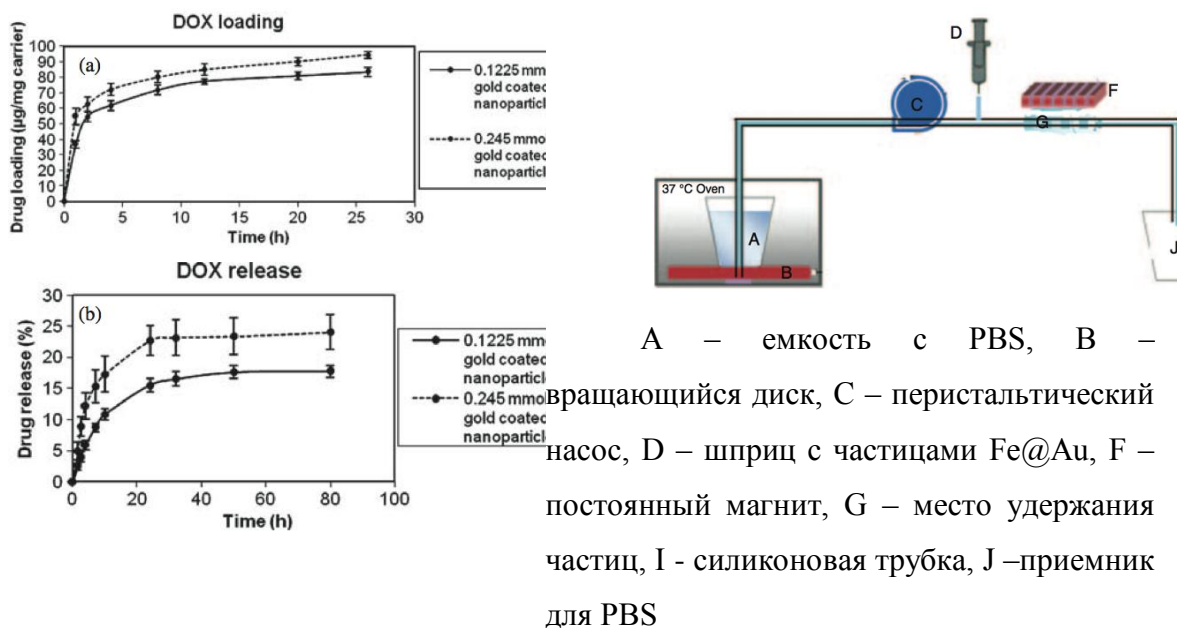


Рис. 35 Кинетика загрузки и высвобождения доксорубицина (слева), установка для изучения удержания частиц, загруженных препаратом, при одновременном действии магнитного поля и давления симулированного потока крови (справа)

Несмотря на то, что адресная доставка лекарств с использованием МНЧ открывает широкие перспективы, существует ряд проблем, препятствующих ее клиническому использованию в данный момент. К ним относятся риск закупоривания сосудов из-за скопления МНЧ; не решены вопросы о возможном токсичном действии НЧ, механизмов их выведения из организма или биодegradации. Высокая эффективность магнитного нацеливания, показанная в культурах клеток и на лабораторных животных, не всегда может быть достигнута у человека, так как требуется наложение очень сильных магнитных полей, что не всегда возможно. В настоящее время также не удается полностью избежать активации клеток иммунной системы [159].

#### 1.3.3.4. Применение магнитной гипертермии

Механизм действия магнитной гипертермии основан на повышенной чувствительности опухолевых клеток к воздействию высокой температуры (43-45°C) по сравнению со здоровыми. Это связано с тем фактом, что стремительно делящиеся клетки, образующие раковую опухоль, находятся в состоянии нехватки кислорода (гипоксии) и избытка кислых продуктов обмена веществ (ацидоза). При повышенных температурах оба процесса становятся более ярко выраженными, приводя к гибели раковых клеток [160]. Наиболее перспективным подходом к локальному нагреву опухоли является гипертермия с применением МНЧ. С физической точки зрения это означает превращение магнитной энергии в тепло при перемагничивании частиц в высокочастотном магнитном поле, а также процессах Неелевской релаксации.

Существует ограниченное число примеров использования МНЧ, покрытых золотой оболочкой, в качестве материала для гипертермии. В частности, в работе [161] в течение 10 минут обработки магнитным полем вызывали апоптоз до 90% клеток глиобластомы *in vitro* при помощи частиц FeNi дисковидной формы (диаметром около 1 мкм и толщиной 60 нм), покрытых 5 нм золотой оболочкой. В качестве особенностей можно выделить специфическое взаимодействие клеток и частиц, так как последние были модифицированы антителами, а также низкую частоту используемого поля (10-60 Гц).

Авторы [162] сравнивали процессы тепловыделения в водном растворе НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> диаметром 5,4 нм и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au с толщиной оболочки около 0,5 нм. Было обнаружено, что покрытие частиц золотой оболочкой приводило к увеличению плотности мощности тепловыделения (SAR) до 1,5 раз по сравнению с магнетитом (444 и 257 Вт/г при частоте поля 44 Гц, соответственно), кроме того, SAR менялась в зависимости от растворителя; максимальная величина для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au составила 976 Вт/г в этаноле при частоте поля 430 Гц. Частицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au были нетоксичны *in vitro* для кардиомиобластов (здоровые клетки) и раковых клеток молочной железы. Таким образом, была показана возможность потенциального применения данных частиц для магнитной гипертермии.

В настоящий момент наибольшую проблему, лимитирующую использование гипертермии с применением МНЧ, представляет трудность контроля температуры. Также к недостаткам этого подхода можно отнести необходимость использования высоких концентраций частиц и необходимость доставки лекарственных средств непосредственно в тот орган, в котором планируется произвести воздействие.

#### 1.3.3.5. Применение магнитных наночастиц в тераностике

Возможность придать МНЧ различные функции при помощи модификации поверхности, а также одновременно управлять их поведением при помощи внешнего магнитного поля делает

МНЧ незаменимым инструментом для тераностики – технологии сочетания средства терапевтического воздействия и ранней диагностики соответствующего заболевания в одном агенте [163]. В настоящее время известны примеры комбинирования МРТ-технологии с иммунотерапией, тканеспецифичной доставкой генов, терапией клеточного замещения и т.д.

В качестве примера использования НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  в тераностике можно привести работу [164]. НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  диаметром 5 нм были покрыты золотой оболочкой толщиной 20-25 нм, затем модифицированы моноклональными антителами 7F5, специфичные для рака простаты (далее – 7F5). На первом этапе было показано, что НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au@7F5$  вызывают *in vitro* подавление роста клеток рака простаты РС-3 с экспрессией соответствующих антигенов, причем терапевтическое действие модифицированных частиц не отличалось от действия свободных антител, а НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  не проявляли токсичности по отношению к клеткам.

Затем была установлена максимальная доза НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au@7F5$ , не оказывающая влияния на рост здоровых мышей – 200 мкл раствора, содержащего 0,2 мг НЧ и 10 мкг антител. В этой концентрации НЧ внутривенно ввели мышам, которым предварительно имплантировали РС3-опухоль простаты. Наблюдалось значительное ослабление сигнала на T2-взвешенном МР-изображении опухоли в течение 24 часов после введения частиц (Рисунок 36, слева). Инъекцию НЧ повторяли еще 3 раза с промежутком в 4 дня и наблюдали за ростом опухоли в течение двух месяцев с момента первой инъекции. Было установлено, что на 65 день объем опухоли мышей, которым вводили НЧ, был в три раза меньше по сравнению с контрольной группой (Рисунок 36, справа). Таким образом, в работе было продемонстрировано возможное применение НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  в качестве МР-контрастного агента и носителя антител для адресной доставки к опухоли простаты.

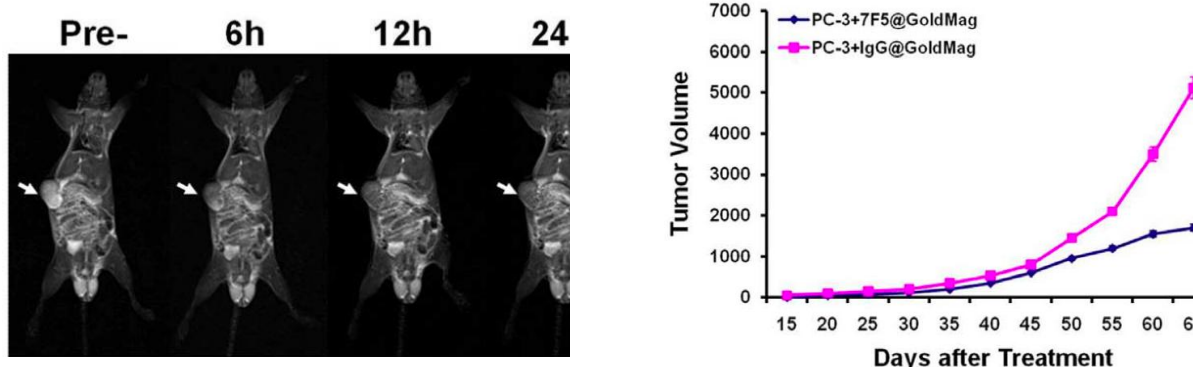


Рис. 36 T2-взвешенное МР-изображение мыши до и после инъекции НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au@7F5$ , опухоль простаты показана стрелкой (слева); динамика роста опухоли после инъекции НЧ по сравнению с контрольной группой (справа).



### 1.3.3.6. Влияние переменного магнитного поля на ферментативные реакции

#### *Теоретическое обоснование*

Еще одно явление, которым можно воспользоваться для применения МНЧ в биомедицине – их влияние на протекание ферментативных реакций *in vitro* и *in vivo*.

Если в химической реакции так или иначе принимают участие МНЧ, то возможно два принципиально разных подхода к оценке роли магнитного поля. Большинство исследователей возлагает надежды на локальный разогрев МНЧ и прилегающих объемов окружающей среды вследствие Неелевской релаксации магнитной энергии, сообщаемой НЧ накладываемым РЧ МП, то есть, на эффект гипертермии, речь о котором шла в разделе 2.5.3.2. Однако нетрудно показать [165], что в типичных условиях осуществления такого разогрева с помощью РЧ МП необходимое увеличение температуры ( $\Delta T \sim 10\text{-}15\text{ K}$ ) требует экспозиции в несколько сотен секунд. Вместе с тем, характерное время термической диффузии  $\tau \approx R^2/\kappa$  для НЧ с радиусом  $R = 12\text{ нм}$ , окруженных водным раствором (коэффициент температуропроводности  $\kappa = \lambda/c\rho = 1.5 \cdot 10^{-7}\text{ м}^2/\text{с}$ ,  $\rho$  – плотность воды =  $1000\text{ кг/м}^3$ ,  $c$  – удельная теплоемкость воды =  $4,2\text{ кДж/кг}\cdot\text{K}$ ) составляет  $\sim 10^{-9}\text{ с}$ . Это означает, что за время экспозиции в РЧ МП теплопроводность успеет сильно выровнять температурное поле, и локальный перегрев на границе МНЧ не превышает, по оценкам, величину  $10^{-4}\text{ K}$  даже в очень концентрированных магнитных суспензиях.

С другой стороны, если макромолекулы (ММ) – реагенты или ферменты прикреплены к поверхности МНЧ, то в результате переориентации последних под действием переменного МП они будут испытывать различного вида деформацию – растяжение, скручивание, сжатие и т.п. В результате могут измениться длины и углы в связях между атомами, произойти изменения в конформации или вторичной, третичной и т.д. надмолекулярной структуре. Для пары взаимодействующих молекул, одна из которых прикреплена к МНЧ, а другая – нет (или прикреплена к другой МНЧ), может измениться взаимное положение, время поиска активных центров, прикрепления к ним и инициирования химической реакции. При воздействии МП в первом случае вращение МНЧ с частотой поля создает ситуацию, аналогичную той, что возникает при гидродинамическом вытягивании ММ в потоке жидкости, а во втором – наномеханическая деформация ММ растяжения, сжатия, скручивания, сдвига (Рисунок 37).

Расчеты [166] для пары МНЧ-ММ показывают, что, для НЧ размером  $R = 14\text{ нм}$  и ММ длиной  $L = 50\text{ нм}$  при частоте МП  $f = 100\text{ кГц}$  гидродинамическая сила, действующая на макромолекулу, составляет  $F_{\text{HD}} \approx 10\text{ пН}$ . В случае кластера из МНЧ размером  $R = 14\text{ нм}$  при напряженности МП  $H=200\text{ кА/м}$  механическая сила составляет  $F_{\text{анс}} \approx 500\text{ пН}$ . Методами

силовой спектроскопии одиночных молекул было показано, что такой диапазон сил достаточен для проведения любых манипуляций с макромолекулами.

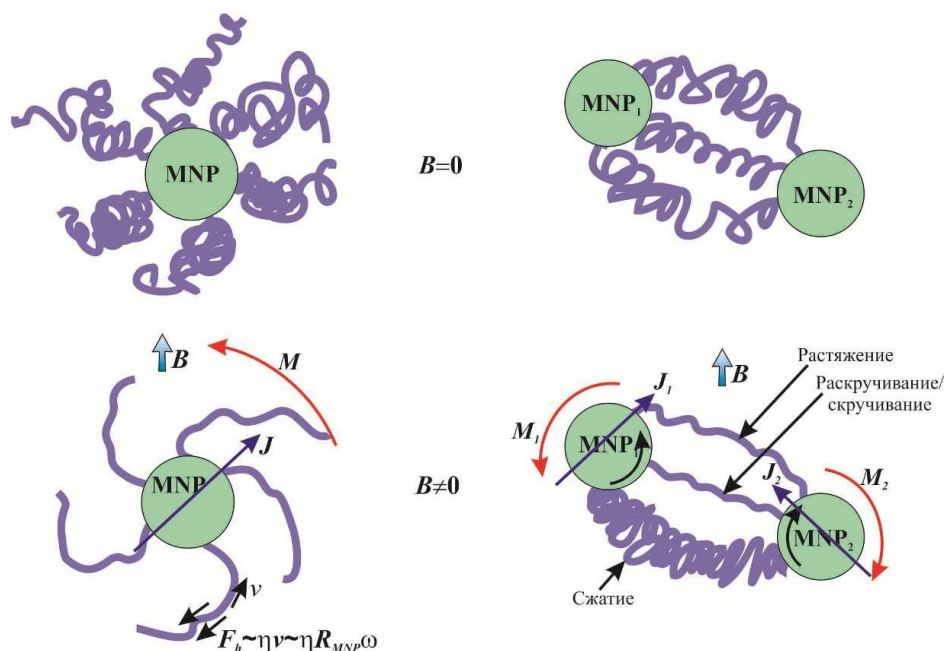


Рис. 37 Действие МП на макромолекулы, прикрепленные к МНЧ (MNP)

В литературе возможность наномеханического влияния на кинетику ферментативных реакций освещена крайне слабо. Стоит отметить, что во всех работах механохимическое воздействие осуществлялось без использования МНЧ.

#### *Механохимическое влияние на ферментативные реакции*

Впервые работа по изучению механохимии иммобилизованных ферментов была выполнена в 1970х годах советскими учеными А.М.Клибановым, И.В.Березиным, Г.П. Самохиным, В.С Гольдмахером.

В этой работе [167] изучалось изменение каталитической активности трипсина и химотрипсина, ковалентно иммобилизованных на различных волокнах (нейлоновых, целлюлозных, волосах человека) под действием внешней растягивающей силы, приложенной к волокнам. Было обнаружено, что при увеличении степени деформации нейлоновых волокон от 0 до 1-3% наблюдается резкое снижение активности иммобилизованных ферментов до 30-50% от первоначальной, при дальнейшей деформации скорость катализируемых ими реакций не изменялась (Рисунок 38, слева). При использовании других типов волокон наблюдалась меньшая инактивация ферментов, однако, общий характер эффекта сохранялся (Рисунок 38, справа).

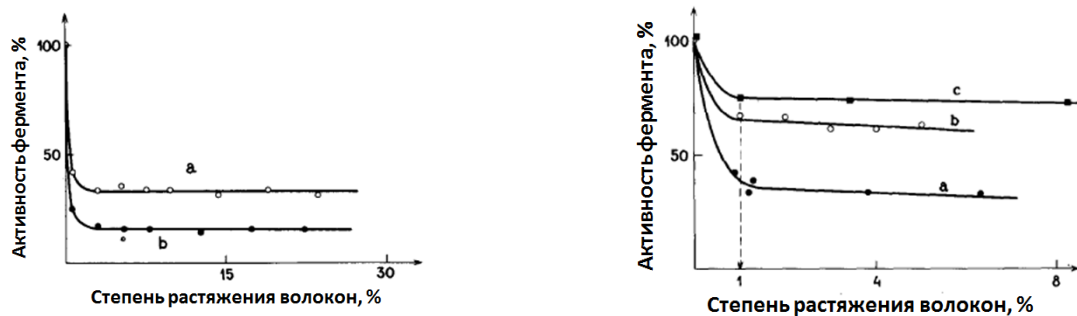


Рис. 38 Зависимость относительной активности иммобилизованного на нейлоновых волокнах химотрипсина (а) и трипсина (b) от степени растяжения волокон (слева), зависимость относительной активности от степени растяжения волокон для а) химотрипсина, иммобилизованного на нейлоновых волокнах, б) трипсина – на волосах человека, с) химотрипсина – на целлюлозных волокнах (справа)

Кроме того, было показано, что эффект является обратимым, то есть, при снятии внешних сил активность ферментов полностью восстанавливается даже после многократного нагружения-разгружения. Также эффект не зависит от температуры в диапазоне 15-35 С, концентрации субстрата, ионной силы (от 0,01 до 3 М КСl, добавляемого в раствор), рН в диапазоне 7,0-8,5 и многих других факторов. То есть, наблюдаемое влияние на фермент приложенной к волокнам внешней силы нельзя объяснить локальным изменением диффузии или свойств микросреды (заряда, гидрофобности/гидрофильности, диэлектрической проницаемости). Таким образом, авторы пришли к выводу, что инактивация фермента происходит вследствие изменения конфигурации его активного центра (Рисунок 39).



Рис. 39 Схематическое изображение деформации активного центра фермента при растяжении волокон

Таким образом, было показано, что каталитической активностью фермента можно управлять путем механического приложения сил, однако то, как осуществить такое воздействие дистанционно, в работе не изучалось.

Таким образом, наиболее перспективными среди МНЧ с точки зрения биомедицинского применения являются НЧ магнетита, для получения которых разработано множество методик. Оптимальным методом защиты МНЧ магнетита является их покрытие золотом вследствие его стабильности, биосовместимости, низкой реакционной способности, а также легкости функционализации лигандами, содержащими тиольную или дисульфидную группу. Несмотря на существование нескольких способов покрытия МНЧ золотой оболочкой, неотъемлемым этапом каждого из них является стадия очистки и концентрирования частиц.

НЧ на основе магнетита являются перспективными T2-контрастными агентами в МРТ, а также могут быть использованы в адресной доставке лекарств. Эффективность материалов на основе НЧ достигается модификацией поверхности НЧ бифункциональными органическими лигандами, обладающими как руппами для связывания с поверхностью НЧ, так и группами отвечающими за биологическое действие (терапию, адресную доставку).

Для осуществления адресной доставки может быть реализована концепция механохимического действия МП. Механические силы, появляющиеся за счет поворотов МНЧ и их комплексов под действием поля, влияют на каталитические свойства иммобилизованного на них фермента. При помощи включения/выключения внешнего МП может быть запущена определенная реакция в организме с участием лекарственного вещества, иммобилизованного на МНЧ и доставленного в нужный орган.

Таким образом, актуальной задачей является получение гибридных материалов на основе НЧ, функционализированных бифункциональными органическими лигандами для биомедицинского применения. Для достижения этого необходимо решение следующих проблем: разработка и оптимизация методов синтеза НЧ магнетит-золото, достижение стабильности получаемых НЧ, получение бифункциональных органических лигандов и изучение эффективной функционализации НЧ лигандами.

## 2. Обсуждение результатов

Целью данной работы явилась разработка синтетических подходов к новым бифункциональным органическим лигандам, способным к адсорбции на поверхности наночастиц различной природы и имеющим в составе группы, отвечающие за функциональные биохимические свойства (адресную доставку, терапевтическое действие). Параллельно решалась задача разработки и оптимизации подходов к синтезу наночастиц золота и магнитных наночастиц. Заключительной задачей являлось получение функциональных материалов на основе наночастиц и органических лигандов и исследование их биохимических свойств.

### 2.1. Синтез бифункциональных органических лигандов

В первой части работы нами были получены органические лиганды различных структурных типов, общая схема строения которых представлена на Рисунке 1.

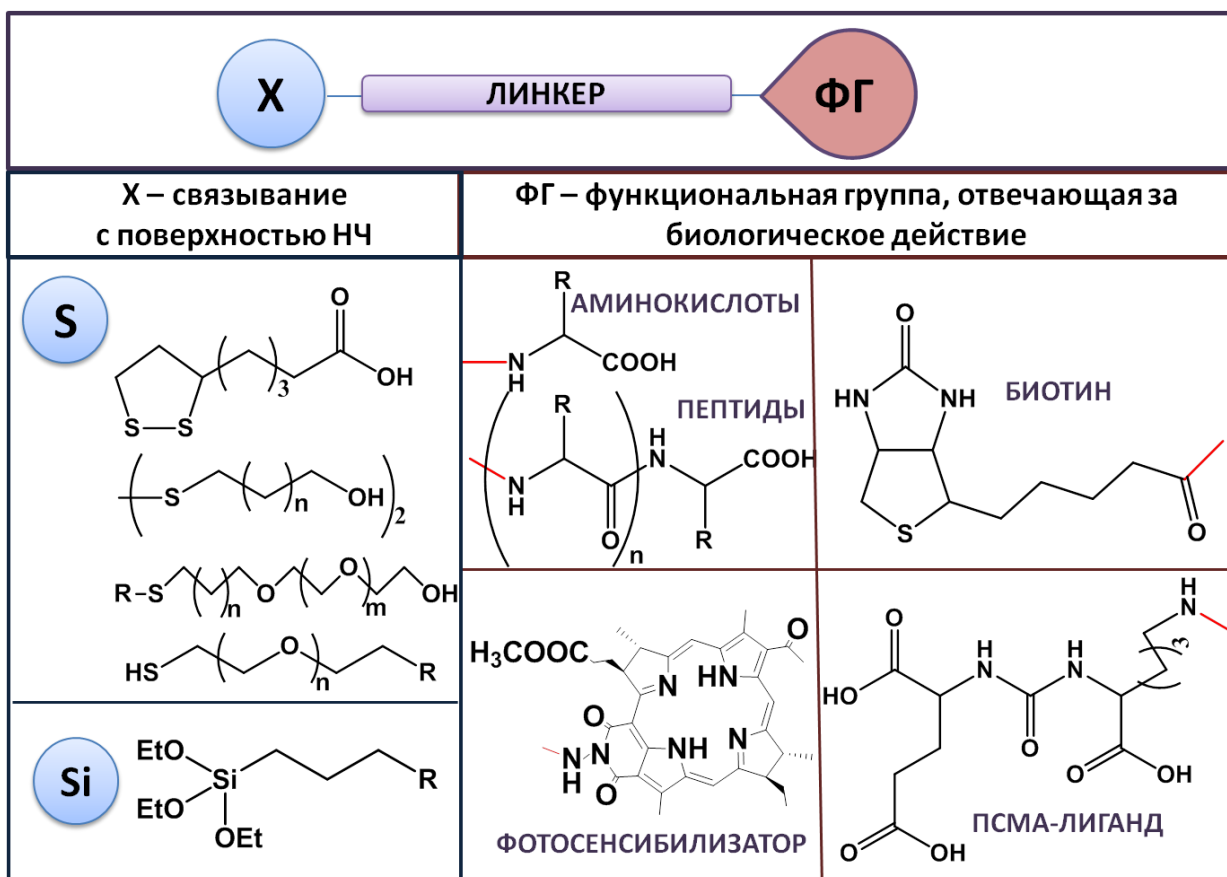


Рис. 1 Общая схема строения бифункциональных органических лигандов

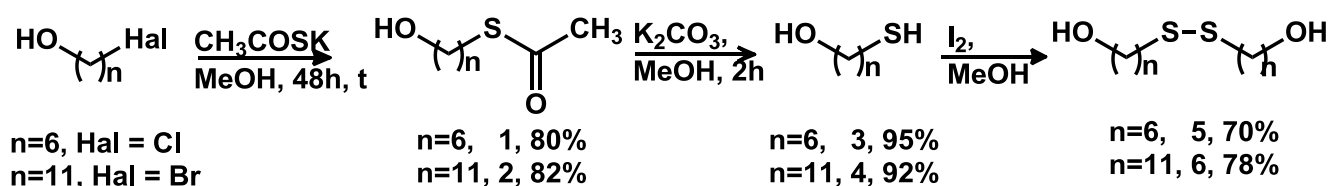
Все синтезированные лиганды имеют в своем составе фрагмент, необходимый для адсорбции на поверхности НЧ (в случае НЧ золота - серосодержащие группы: тиольные, сульфидные и дисульфидные; в случае НЧ магнетита – силан). Терминальная функциональная группа представляет собой либо адресный лиганд (аминокислоты и пептиды, биотин, ПСМА-лиганд), либо терапевтический препарат (производное бактериопурпуринымида для ФДТ). В

качестве фрагментов-линкеров были выбраны углеводородные и полиэтиленгликольные цепи; последние позволяют увеличить гидрофильность конечных продуктов, важную для работы с водорастворимыми НЧ.

### 2.1.1. Синтез исходных соединений

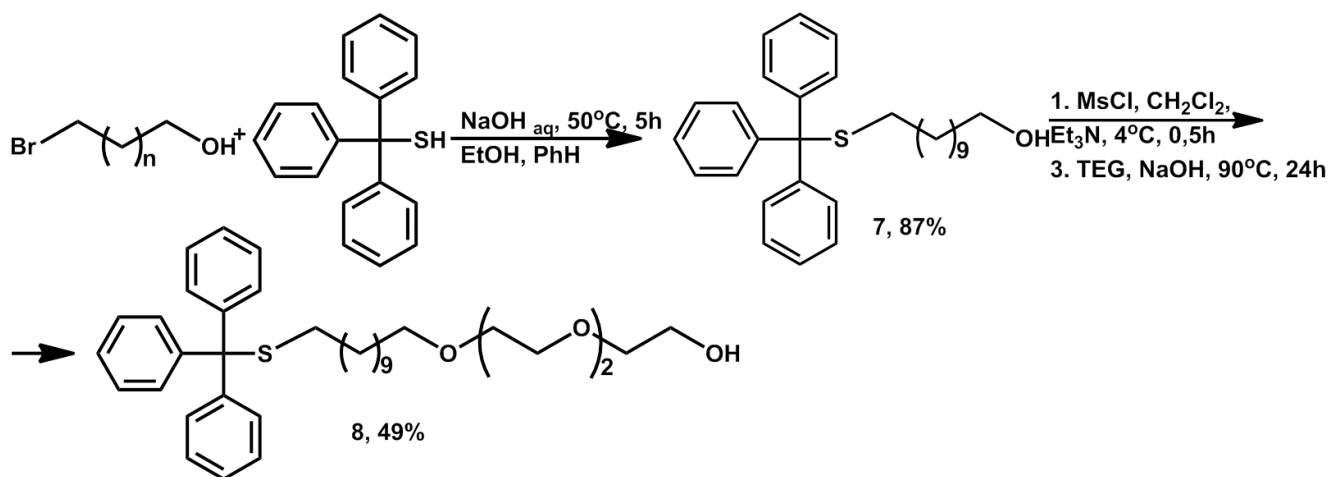
В качестве исходных соединений для синтеза были использованы серосодержащие соединения, имеющие реакционноспособные функциональные группы: спиртовую, кислотную, amino-, азидо и различные линкеры – гидрофобные, на основе углеводородов, смешанные и гидрофильные, полученные из триэтиленгликоля.

Серосодержащие спирты **5** и **6** с 6 и 11 метиленовыми группировками в углеводородной цепи соответственно были синтезированы в три стадии по следующей схеме:



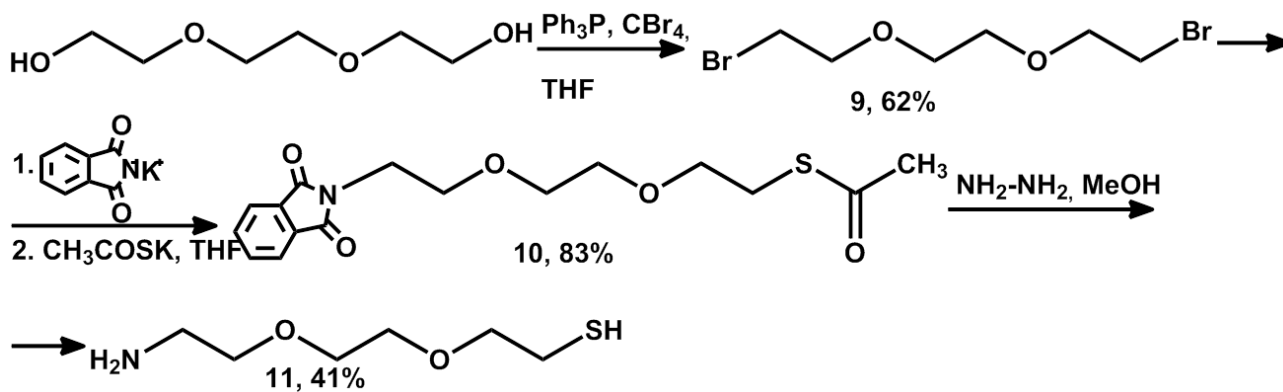
На первой стадии были получены S-11-гидроксиундециловый **1** и S-6-гидроксигексилловый **2** эфиры тиоуксусной кислоты. Синтез протекает в соответствии с методикой [168,169] по механизму нуклеофильного замещения. В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  продуктов наблюдаются протоны метиленовых групп  $\text{CH}_2\text{-S}$  при 2,85 и 2,89 м.д. для соединений **1** и **2** соответственно. На следующей стадии, полученные S-ацильные производные гидролизуют в мягких условиях до тиола раствором карбоната калия в метаноле. По сравнению со спектром  $^1\text{H}$  соединений **1** и **2**, в соответствующих спектрах соединений **3** и **4** отсутствуют синглеты протонов  $\text{CH}_3$  групп. На третьей стадии, полученные тиолы окисляли до дисульфидов раствором йода в метаноле. Структуры спиртов **5**, **6** были подтверждены данными  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии, температуры плавления соответствуют литературным данным. Исходные спирты являются удобными серосодержащими предшественниками для дальнейшего синтеза сложных эфиров.

Так как целью работы является получение материалов на основе наночастиц и органических лигандов, для дальнейшего использования важно, чтобы получаемые органические лиганды имели достаточную растворимость в воде. Для увеличения гидрофильности в структуру линкера вводили полиэтиленгликольный фрагмент. Для этого в качестве исходного соединения был получен 2-(2-(3-(тримилтио)пропокси)этокси)этанол **8**. Синтез проводили в две стадии:



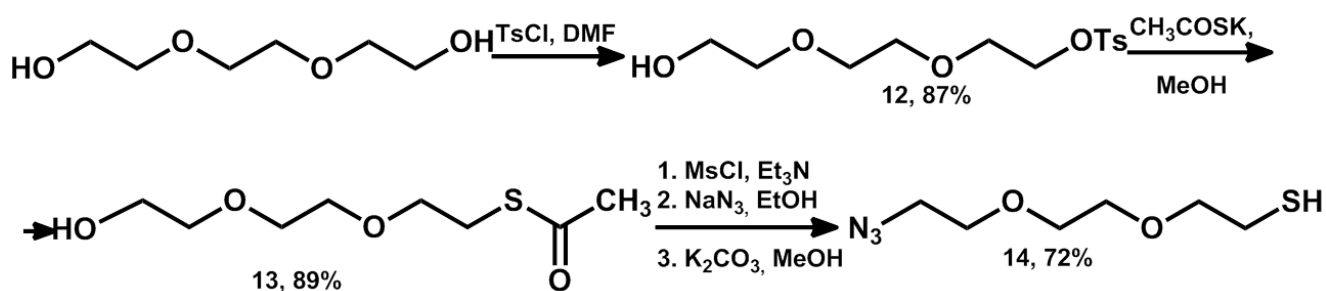
На первой стадии 11-бромундеканол-1 вводили в реакцию нуклеофильного замещения с тритилтиолом [170]. На следующей стадии полученный S-содержащий спирт был активирован мезилхлоридом и введен в реакцию нуклеофильного замещения с триэтиленгликолем в присутствии основания. Полученное производное **8** было выделено в чистом виде при помощи колоночной хроматографии. Структуры обоих спиртов подтверждены методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии, состав - данными элементного анализа.

Полиэтиленгликоли с функциональными группами (амино, азидо) были синтезированы исходя из триэтиленгликоля [171,172,173,174]. 2-(2-(2-(Тиоэтокс)этокс)этанамин **11** получали в три последовательные стадии:



На первой стадии по реакции нуклеофильного замещения гидроксильной группы под действием четырехбромистого углерода в присутствии трифенилфосфина был получен 1,2-бис(2-бромэтокс)этан **9** [172]. На второй стадии были введены последовательно фталимидная и тиоацетатная группа с получением соединения **10**. Последующая обработка гидразином и метанола приводит к целевому соединению.

Синтез линкера, содержащего тио и азидо группы, - 2-(2-(2-(азидоэтокс)этокс)этил)этанттиоата **14** провели по следующей схеме:



На первой стадии получали моно-тозилат **12** по реакции триэтиленгликоля с паратолуолсульфохлоридом в присутствии триэтиламина. На второй стадии происходит нуклеофильное замещение по  $S_N2$  механизму с получением соединения **13**. На последней стадии проводили активацию гидроксильной группы мезилхлоридом в триэтилаmine для дальнейшего замещения анионом азида в этиловом спирте. На заключительной стадии в щелочной среде происходил гидролиз этантиоата до тиола.

Все полученные соединения были охарактеризованы данными  $^1H$  ЯМР спектроскопии и хромато-масс спектрометрии.

### 2.1.2. Лиганды – производные аминокислот и пептидов

Для получения целевых соединений, содержащих аминокислотные и пептидные фрагменты, применяли две методологии с использованием карбодиимидного синтеза (Рисунок 2). Первая включала получение сложного эфира из серосодержащего спирта (**5,6** и **8**) и N-Boc-аминокислоты, вторая - использование в качестве исходных соединений серосодержащей кислоты и эфира аминокислоты с получением амидов.

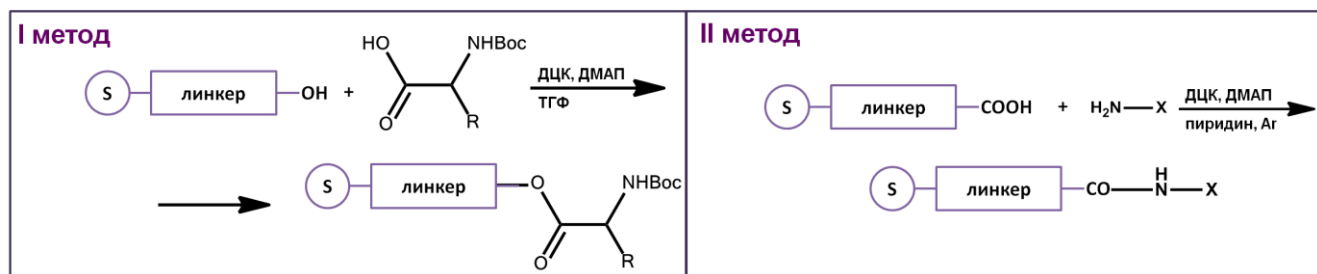
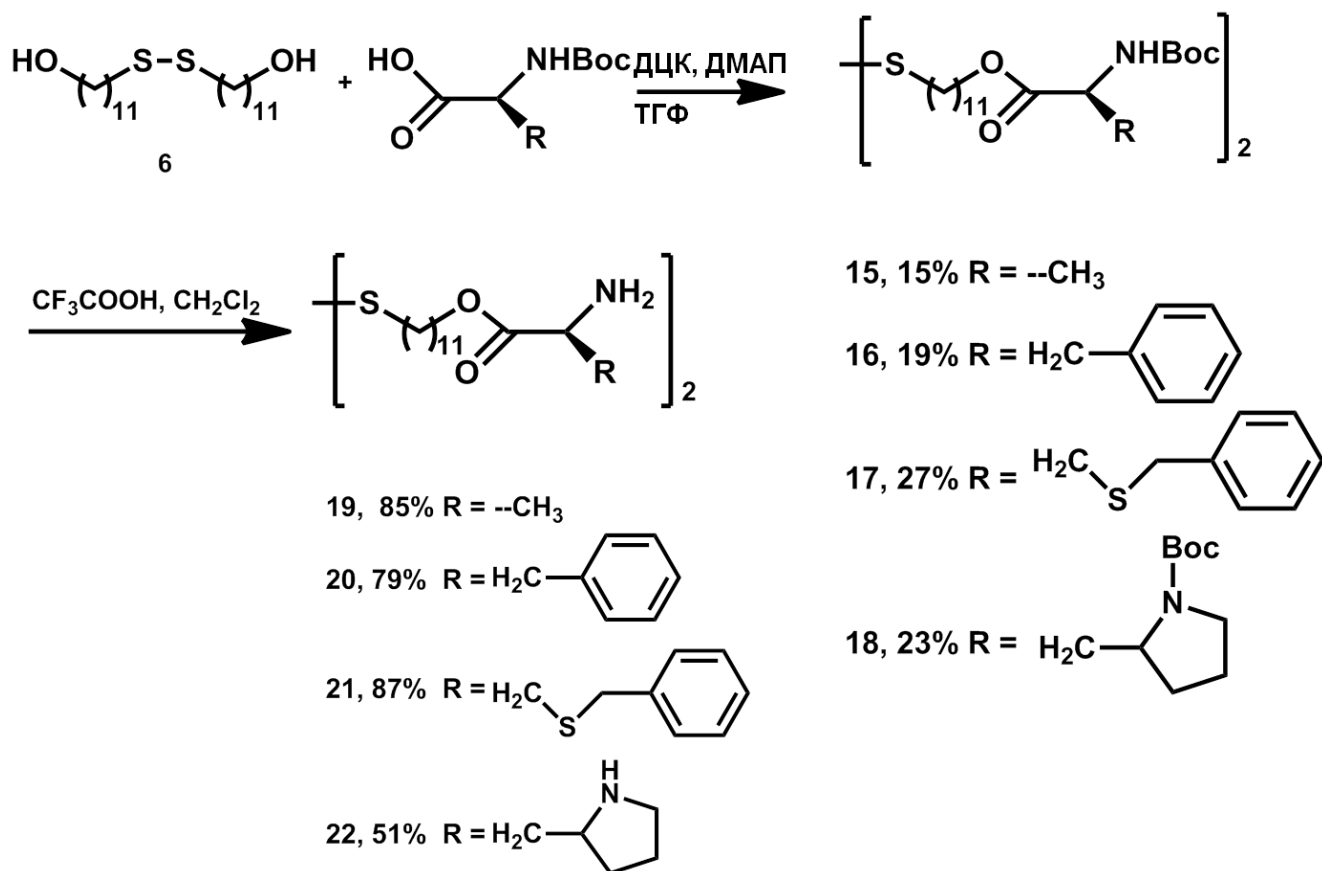


Рис. 2 Два подхода к синтезу производных аминокислот и пептидов

Согласно выбранной стратегии, первым этапом синтеза было получение аурофильных эфиров аминокислот. Для синтеза сложных эфиров нами были опробованы различные методы проведения карбодиимидного синтеза с использованием карбонилдиимдазола, этилдиметиламинопропилкарбодиимид/гидроксибензотриазола, смеси дициклогексилкарбодиимид/диметиламинопиридин. С использованием последнего реагента целевые соединения были получены с наилучшими выходами. Тщательный подбор растворителя, соотношения реагентов, времени протекания реакции и протокола выделения



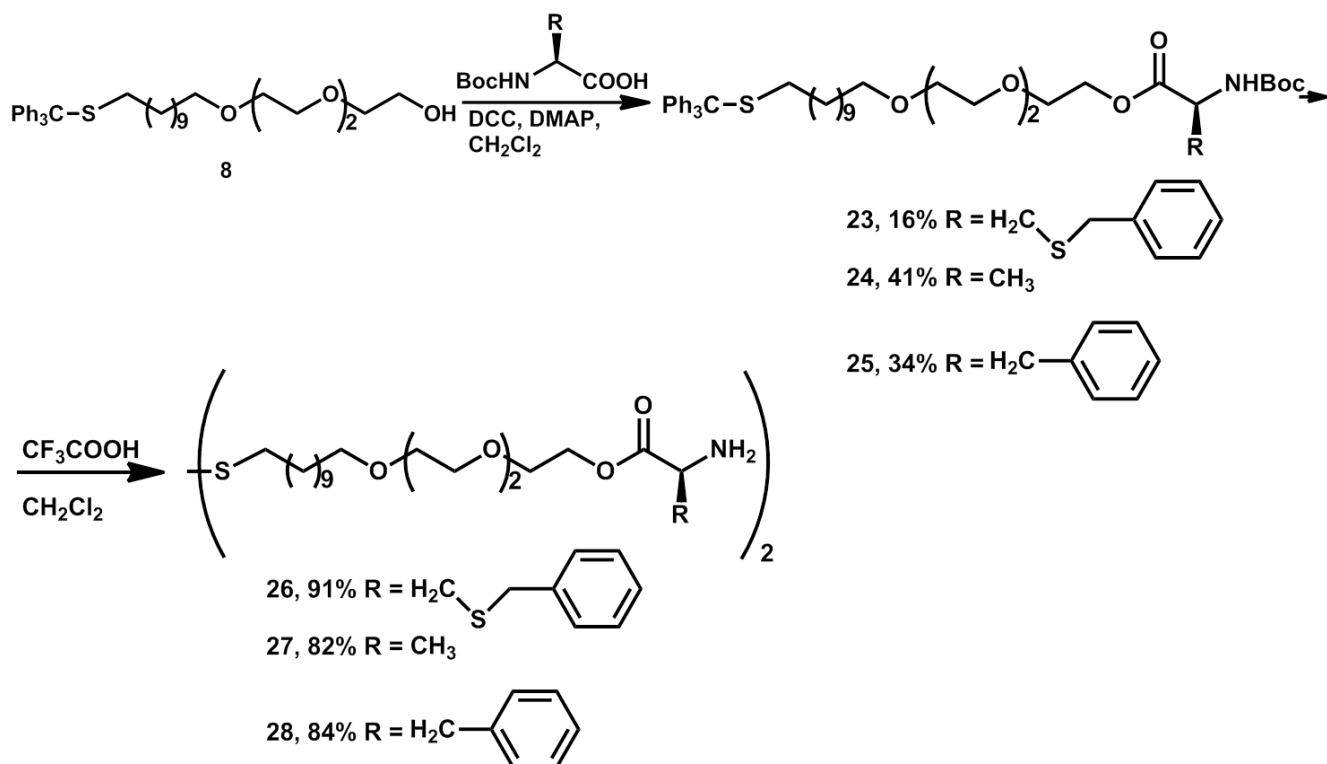
продуктов позволило оптимизировать условия реакции. Таким образом нами были получены сложные эфиры из бис(11-гидроксиундецил)дисульфида **5** и N-Вос-аланина, N-Вос-фенилаланина, N-Вос-S-бензилцистеина, N-Вос-пролина:



Все соединения были очищены методом колоночной хроматографии и охарактеризованы данными <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопии, а состав подтвержден данными элементного анализа.

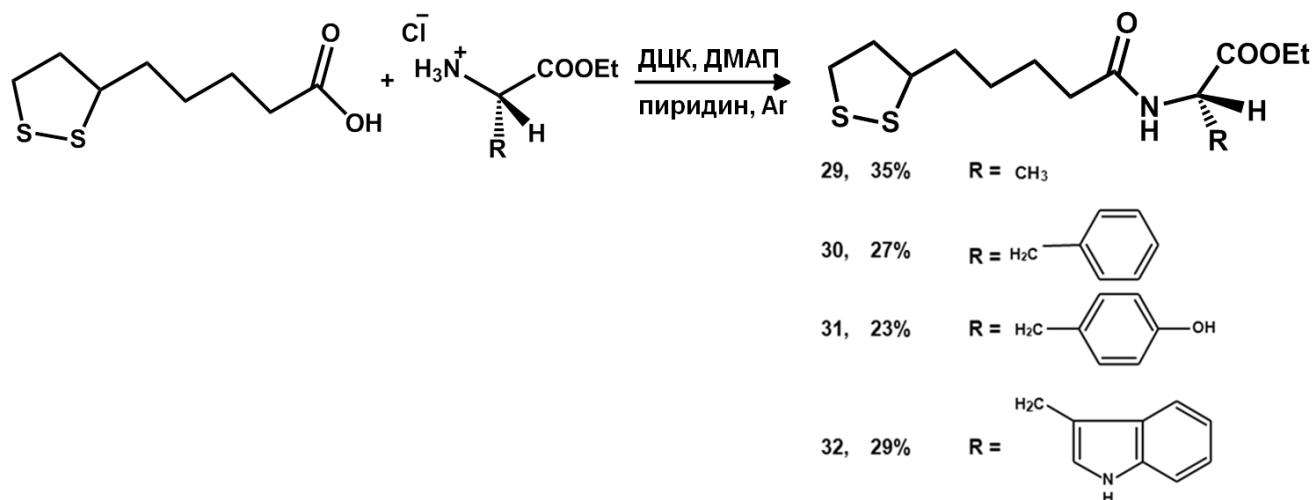
Для получения целевых соединений **19-22** Вос-защита снималась обработкой трифторуксусной кислотой в хлористом метиле. Полученные соединения **19-22** были выделены в чистом виде и охарактеризованы при помощи <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопии, а состав подтвержден данными элементного анализа.

По отработанной методике согласно первому подходу были получены производные спирта **11**, содержащего гидрофильный линкер, – соединения **23, 24, 25**, и аминокислот N-Вос-S-бензилцистеина, N-Вос-аланина, N-Вос-фенилаланина. На второй стадии была проведена реакция снятия Вос-защиты трифторуксусной кислотой в метиле, в процессе которой также произошло отщепление трифенилметильной группы с образованием соответствующих дисульфидов **26-28**.

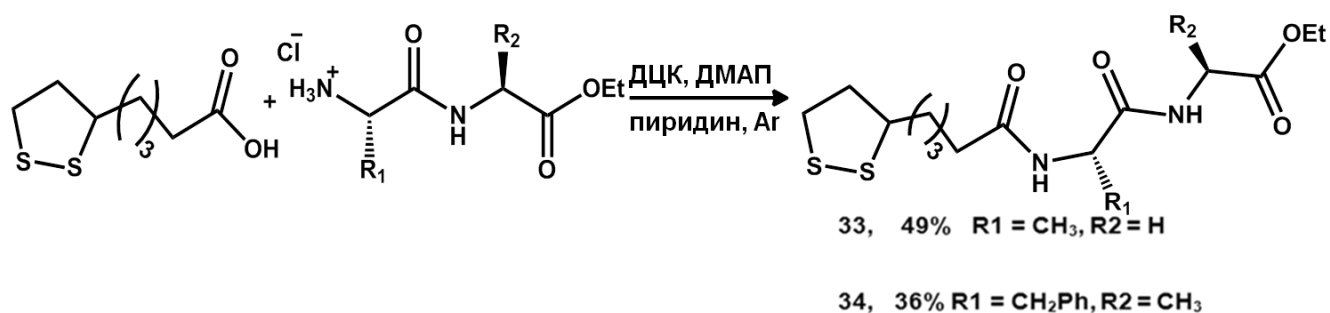


Соединения **23-28** были охарактеризованы данными <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопии, а их состав и чистота подтверждены данными хромато-масс-спектрометрии. Полученные соединения **15-18**, **19-22**, **23-25** и **26-28** перспективны с точки зрения их дальнейшего использования в хиральной хроматографии, как в защищенном виде, так и после снятия N-Вос защиты.

Согласно второму подходу, карбодиимидным синтезом по отработанной нами методике были получены амиды **29 - 32** на основе этиловых эфиров аланина, фенилаланина, тирозина и триптофана.



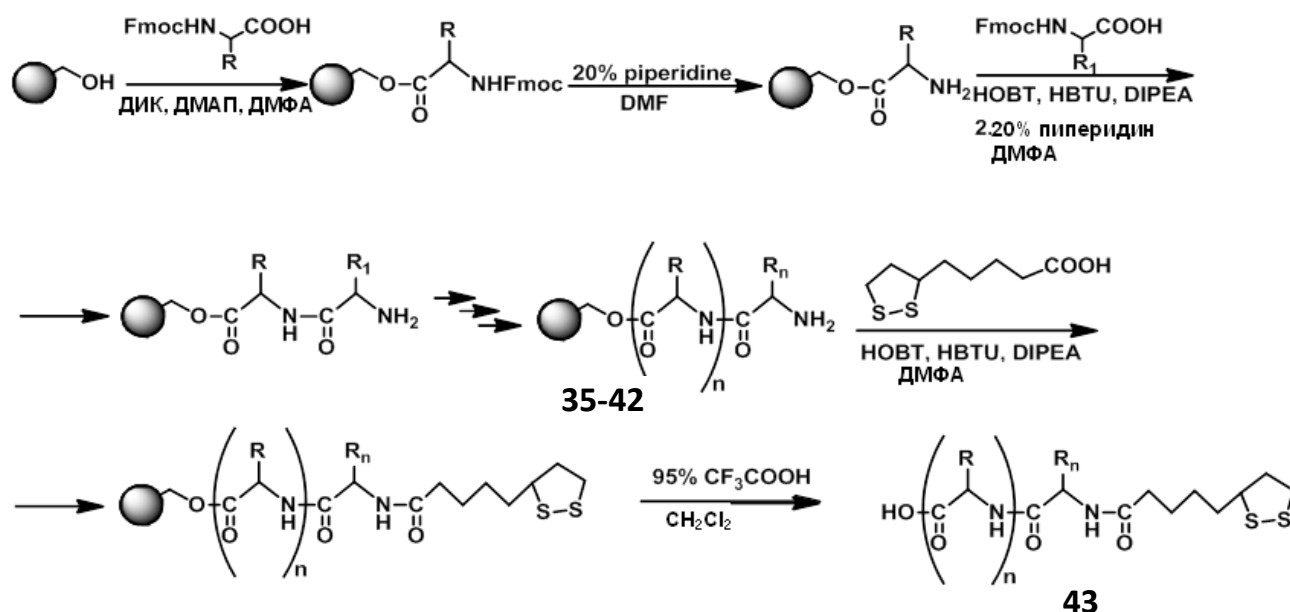
По аналогичной методике были проведены реакции этиловых эфиров дипептидов аланил-глицина и фенилаланил-аланина с липоевой кислотой:



Промежуточные и конечные соединения были очищены методом колоночной хроматографии. Все полученные соединения были охарактеризованы данными <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии, а состав подтвержден данными элементного анализа.

### 2.1.3. Лиганды – производные пептидов (твердофазный метод синтеза)

Жидкофазный метод синтеза производных пептидов трудоемок и требует длительной очистки продуктов реакции, поэтому для получения производных липоевой кислоты и пептидов, содержащих более двух аминокислот, был использован твердофазный метод синтеза. Методика была разработана на основе классического твердофазного метода на смоле Ванга с использованием на последней стадии избытка липоевой кислоты (5 эквивалентов) вместо аминокислоты.



Для оптимизации и отработки методики твердофазного синтеза на смоле Ванга были получены модельные пептиды **35 – 42** (Таблица 1) с использованием классической Fmoc-стратегии. Активация гидроксильной группы смолы первой аминокислотой происходила действием диизопропилкарбодиимида на смесь смолы с аминокислотой при охлаждении.

Покрытие уже при первой активации происходит более чем на 93% (см. далее), что позволяло не повторять активацию, что заметно экономит время и реактивы.

В ходе оптимизации синтеза нами были использован и другой метод активации гидроксильных групп смолы – использование HBTU (N,N,N',N'-тетраметил-О-(1Н-бензотриазол-1-ил)урониум гексафторфосфат), но данная методика приводит к активации только 40-50% процентов смолы при первой активации, а требуемое заполнение поверхности достигается лишь при повторном проведении процедуры активации, что приводит к большему расходу реагентов и удлиняет время проведения синтеза.

Эффективность активации смолы, с целью оценки степени модификации первой аминокислотой и трансформации гидроксильных групп в сложноэфирные группы, определяли по следующему тесту [175]. Образцы сухой смолы после первой процедуры активации карбоксильных групп и реакции с первой аминокислотой обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФА и при помощи УФ-спектрофотометра измеряли поглощение раствора при  $\lambda = 300$  нм. Количество первой аминокислоты рассчитывали по уравнению: ммоль/г =  $(Abs_{\text{раствора}} - Abs_{\text{сравнения}}) / (1,28 * \text{мг образца})$ ; считается, что заполнение поверхности должно превышать 90%, в противном случае продукт будет получен с минимальными выходами и большим количеством примесей.

Следующими последовательными этапами были снятие Fmoc-защиты и взаимодействие со следующей аминокислотой; данные два этапа повторялись до получения пептида требуемой длины. В качестве активаторов реакции образования пептидной связи использовали гексафторфосфат О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония и гидроксибензотриазол. На каждой стадии проводили пробу на наличие свободных аминогрупп – тест Кайзера, заключающийся в появлении синего окрашивания суспензии смолы при добавлении смеси реагентов (*нингидрин, цианид калия, фенол*) в присутствии свободных аминов.

После получения пептида заданной длины проводили его снятие со смолы с использованием смеси трифторуксусной кислоты с водой. Одновременно при обработке трифторуксусной кислотой происходило снятие используемых защитных групп, что позволяло быстро и эффективно получать требуемый пептид.

В качестве модельных соединений были выбраны пептиды как на основе природных аминокислот (треонина, глутаминовой кислоты, лизина, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина, пролина, тирозина и аргинина), так и на основе неприродных аминокислот (2-аминоциклогексанкарбоновой кислоты, 3-(3-пиридил)-D-аланина, 5-аминовалериановой кислоты, гомолизина, гомотирозина). Введение в пептиды неприродных аминокислот часто используется для достижения большей энзиматической устойчивости полученных соединений в физиологических средах, а также для достижения более эффективного взаимодействия

полученных пептидов с активным центром. Все полученные соединения были охарактеризованы данными спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР и масс-спектрометрии.

Таблица 1. Структура полученных твердофазным синтезом пептидов

№	пептид	выход	№	Пептид	выход
35	Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Glu	17%	40	Lys-2-aminocyclohexanecarbonyl-3-(3-pyridyl)-D-Ala-Met	36%
36	Glu-Glu-Glu-Glu-Lys-Glu	49%	41	Met-5-aminovaleryl-Glu-Lys	28%
37	Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu	30%	42	Leu-Ile-Tyr-Pro-Homolys	50%
38	Gly-Gly-Leu-Val-Phe-Val	30%	43	Gly-Gly-Leu-Val-Phe-Val-lipoic	25%
39	Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	51%			

По описанной выше методике – введением на последней стадии липоевой кислоты - был получен амид **43** липоевой кислоты и модельного пептида **38**. Полученный продукт был охарактеризован данными  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии MALDI, ВЭЖХ.

#### 2.1.4. Лиганд - производное N-аминобактериопурпуринимида

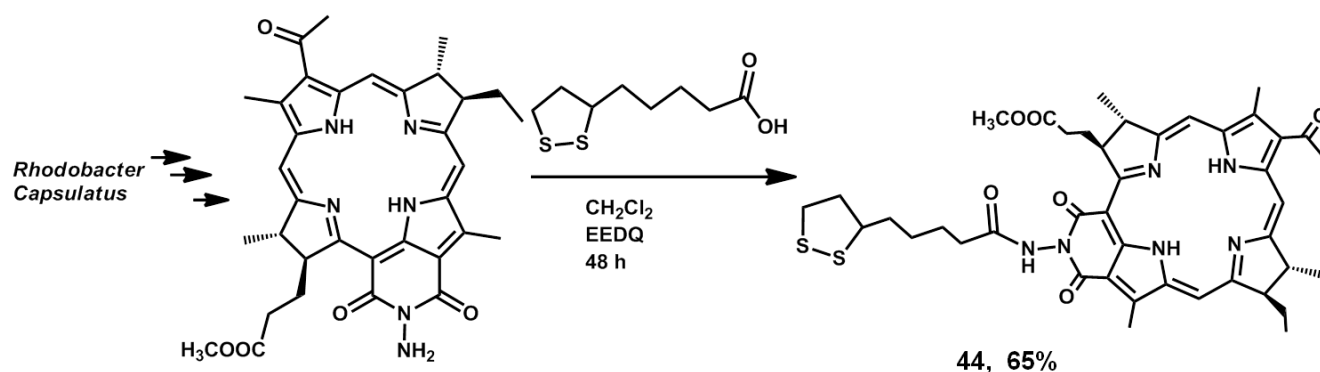
Основными методами лечения в онкологии являются хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Однако в последние два десятилетия все большее распространение получают новые методы, среди которых следует отметить фотодинамическую терапию (ФДТ), которая является результатом комбинированного действия трех нетоксичных факторов – фотосенсибилизатора, света и кислорода [176,177,178]. Противоопухолевые эффекты данного вида лечения обусловлены комбинацией прямого фотоповреждения клеток, разрушения сосудистой сети опухоли и активации иммунного ответа [179,180,181]. Данный метод лечения обладает малой инвазивностью, высокой избирательностью поражения опухоли, низкой токсичностью вводимых препаратов и отсутствием риска тяжелых местных и системных осложнений лечения.

Вместе с тем, важным фактором, ограничивающим применение ФДТ при лечении онкологических заболеваний является недостаточная глубина проникновения светового излучения, а также невысокая селективность накопления официальных фотосенсибилизаторов в опухоли [182,183]. В настоящее время применяются в клинике или находятся на разных стадиях клинических испытаний фотосенсибилизаторы (ФС) различных классов (порфирины и их металлокомплексы, хлорины, бензопорфирины, фталоцианины и др.). Среди них особый интерес представляют природные хлорофиллы и их производные с интенсивным поглощением в красной и ближней ИК-области спектра, поскольку их

терапевтическое окно поглощения (660 - 800 нм) открывает новые возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Свет с подобной длиной волны проникает в ткань на глубину более 20 мм, что позволяет проводить лечение глубокозалегающих и пигментированных опухолей [184,185]. Выбор природных пигментов для создания новых ФС обусловлен рядом причин, включая их распространенность в природе, интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра, возможность химической модификации боковых заместителей, структурную близость к эндогенным порфиринам, что предполагает низкий уровень токсичности подобных соединений и быстрое выведение из организма.

Однако сами хлорины и бактериохлорины имеют ограниченное применение в качестве ФС из-за высокой гидрофобности, низкой химической и фотостабильности, умеренной селективности накопления в раковых клетках. Это диктует необходимость создания устойчивых производных хлоринов и бактериохлоринов с улучшенными спектральными характеристиками, повышенной гидрофильностью для растворимости в полярных растворителях и воде, обладающих значительной тропностью к опухолям [186,187,188,189,190].

В ходе нашей работы было получено новое производное бактериохлорофилла *a*, (выделяемого из биомассы несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* штамм В10). Синтезированный фотосенсибилизатор **44** представляет собой *N*-аминобактериопурпуринимид, экзоциклическая аминогруппа которого ацилирована остатком липоевой кислоты. В качестве лидерного соединения нами был выбран *N*-аминобактериопурпуринимид, который обладает высокой стабильностью, поглощает в области 830 нм и, как показали эксперименты на животных, проявляет высокую фотоиндуцированную активность [191]. Ацилирование *N*-аминобактериопурпуринимиды липоевой кислотой в присутствии конденсирующего агента EEDQ (*N*-карбоэтокси-2-этокси-1,2-дигидрохиолин) привело к образованию серосодержащего пигмента **44**.



Строение конечного бифункционального ауروفильного лиганда **44** доказано методами ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектроскопии, а также хромато-масс-спектрометрии.

### **2.1.5. Лиганд на основе ПСМА-вектора**

В 1980-х годах был обнаружен простатический специфический мембранный антиген [192], данный белок является наиболее привлекательной мишенью в терапии и диагностике рака предстательной железы, в связи с тем, что он находится на клеточной поверхности и его экспрессия в раковых клетках многократно выше, чем в здоровых клетках предстательной железы, а также по сравнению с его экспрессией в клетках других органов и тканей, таких как почки, проксимальный отдел тонкого кишечника и слюнные железы, небольшой уровень экспрессии данного антигена был обнаружен в мозге [193]. Характерной особенностью PSMA является тот факт, что данный антиген гиперэкспрессируется в опухолевых клетках рака предстательной железы (экспрессия данного белка на поверхности опухолевых клеток увеличивается тысячекратно, по сравнению со здоровыми клетками).

PSMA представляет собой трансмембранный гликопротеид II типа массой  $\sim 100$  кДа, состоящий из 750 аминокислот. Данный белок состоит из короткого внутриклеточного участка (1-18 аминокислоты), трансмембранного домена (19-43 аминокислоты) и большого внеклеточного домена (44-750 аминокислоты) [194]. Данные по кристаллизации PSMA свидетельствуют, что его внеклеточный домен при сворачивании образует 3 отдельных домена, различающихся по своим свойствам и структуре: протеазный домен (56-116 аминокислоты), апикальный домен (117-351 аминокислоты) и С-концевой домен (592-750 аминокислоты).

Анализ кристаллической структуры PSMA (с разрешением 3,5 Å), свидетельствует о том, что данный антиген кристаллизуется в виде гомодимера, имеющего симметрию второго порядка, активный сайт которого содержит два атома цинка, координируемых остатками гистидина (His553 или -377), глутаминовой (Glu425) и аспарагиновой кислот (Asp453 и -387), а также молекулой воды, остаток Asp387 участвует в координации обоих атомов цинка (Рисунок 3). Glu424 выполняет роль основания, в результате чего происходит депротонирование молекулы воды, находящейся в координационном окружении атомов цинка.

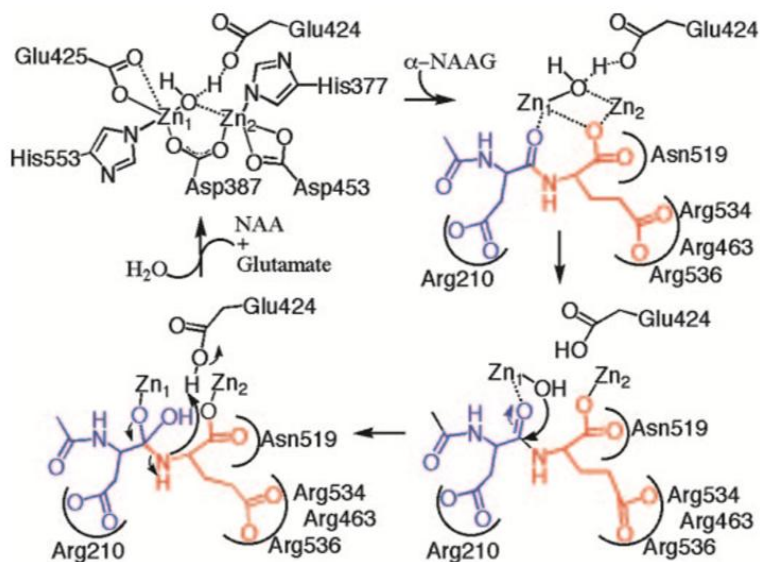


Рис. 3 Структура активного сайта PSMA и его взаимодействие с нативным субстратом N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматом [195].

Связывание субстрата осуществляется благодаря карману, содержащему три остатка аргинина (Arg463, -534 и -536), находящихся друг от друга на расстоянии 4.5 Å, и удалены от ближайшего атома цинка на расстояние от 6 до 12 Å. Данные остатки участвуют в формировании подходящей пространственной ориентации субстрата в активном центре фермента, за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной  $\gamma$ -карбоксильной группой глутаминовой кислоты и отрицательно заряженной гуанидиновой группой аргининов. Четвертый аргинин (Arg210), встречающийся во всех ортологах PSMA расположен в противоположной части кармана, где также участвует в связывании субстрата. Предполагается, что образование такого кластера из четырех аминокислотных остатков аргинина способствует тому, что PSMA приобретает специфичность к субстратам, содержащим С-концевые остатки глутаминовой кислоты. Расположение 4 аминокислотных остатков аргинина коррелирует с возможностью данного белка расщеплять N-ацетил-L-аспартил-L-глутамат. Так отсутствия двух или более аргининов в PSMA приводит к отсутствию активности белка к расщеплению подобных субстратов. Примером подтверждающим это является AMP1 из *Arabidopsis thaliana* (Резуховидка Талья), имеющего подобную PSMA структуру (сходство ~48%), но не способный к расщеплению N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата вследствие отсутствия трех остатков Arg кроме Arg210 [195].

В настоящее время среди лигандов, обеспечивающих селективное связывание с PSMA, выделяют две основные группы соединений. К первой группе относятся вещества,



представляющие собой аналоги переходного состояния субстрата (NAAG), ко второй соединения-аналоги субстрата (Рисунок 4) [196].

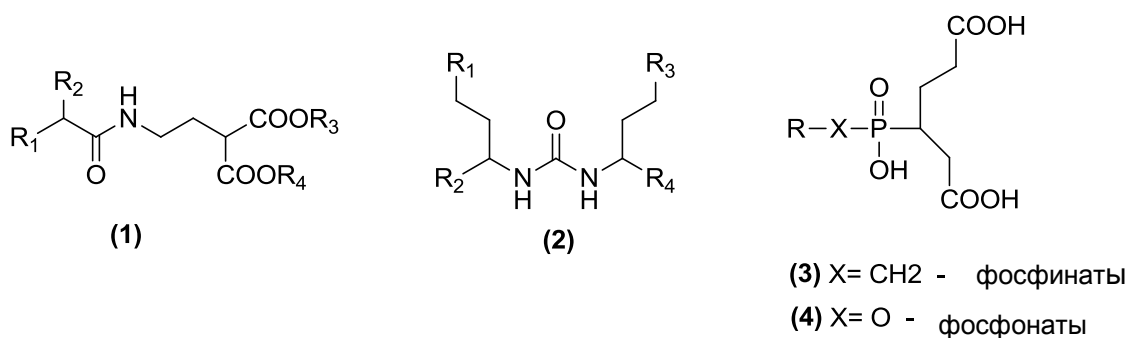


Рис. 4 Лиганды PSMA: аналоги субстрата (NAAG) (1, 2), аналоги переходного состояния (3, 4)

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что наибольшее внимание исследователей привлекают ПСМА-векторы на основе производных мочевины [196], среди которых особенно выделяются структуры DCL и DUPA (Рисунок 5), проявляющие высокую способность связывания с ПСМА. В связи с доступностью исходных соединений, а также из-за легкости дальнейшей его модификации методами тонкого органического синтеза, соединение DCL было выбрано в качестве векторного фрагмента с целью получения конъюгатов с серосодержащими линкерами.

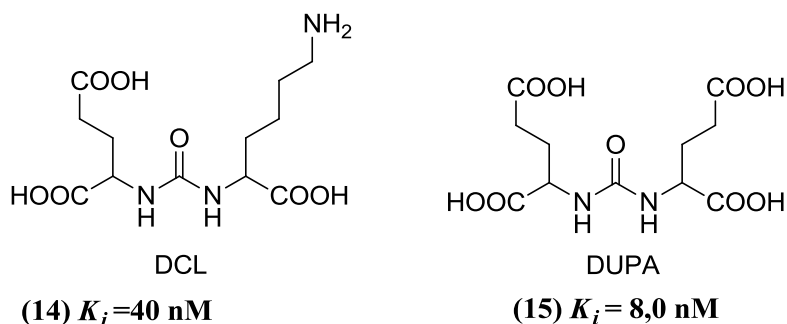
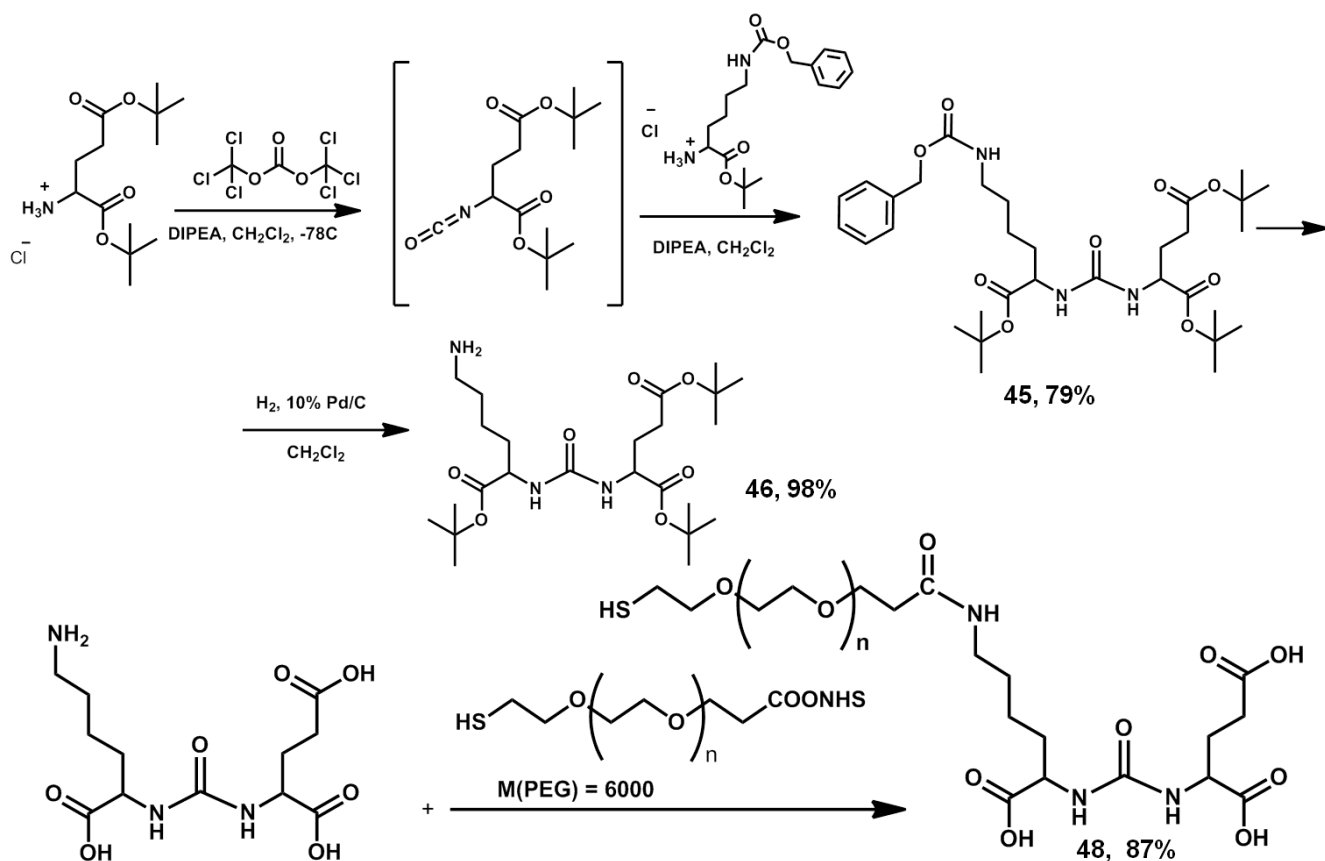


Рис. 5 Селективные ингибиторы PSMA: гетеродимер глутаминовой кислоты и лизина и гомодимер глутаминовой кислоты (DUPA)

Сопоставление литературных данных, посвященных методам получения уреидов на основе L-лизина и L-глутамин свидетельствуют о том, что наиболее препаративно удобным методом их синтеза является генерация изоцианата из ди-трет-бутилового эфира глутаминовой кислоты и его взаимодействие *in situ* с карбоксибензоильным (Cbz) производным лизина по следующей схеме:



При реализации этой схемы на первой стадии синтеза на первой стадии был получен изоцианат, диющий в реакции с амином мочевины **45**. Дальнейшая реакция гидрогенолиза соединения **45** в присутствии 10%  $\text{Pd/C}$  привела к свободному амину **46** с выходом 98%.

Согласно литературным данным последующее удаление трет-бутильных защит с векторного фрагмента проводят в 10% растворе трифторуксусной кислоты (TFA) в метаноле, однако, нам не удалось воспроизвести эту методику. При оптимизации условий было установлено, что только обработка кислотой высокой концентрации (90%) в течение 12 часов позволяет полностью удалить защитные группы с количественным выходом. Таким образом было получено соединение **47**, использованное нами далее для получения конъюгата с бифункциональным серосодержащим производным полиэтиленгликоля – полиэтиленгликоль-2-меркаптоэтиловый эфир уксусной кислоты. Полученное бифункциональное производное **48** было охарактеризовано при помощи ЯМР-спектроскопии и МАЛДИ – масспектрометрии.

### 2.1.6. Лиганды – производные биотина

В работе стояла задача получения двух типов лигандов, в состав которых входит биотин (Рисунок 6).

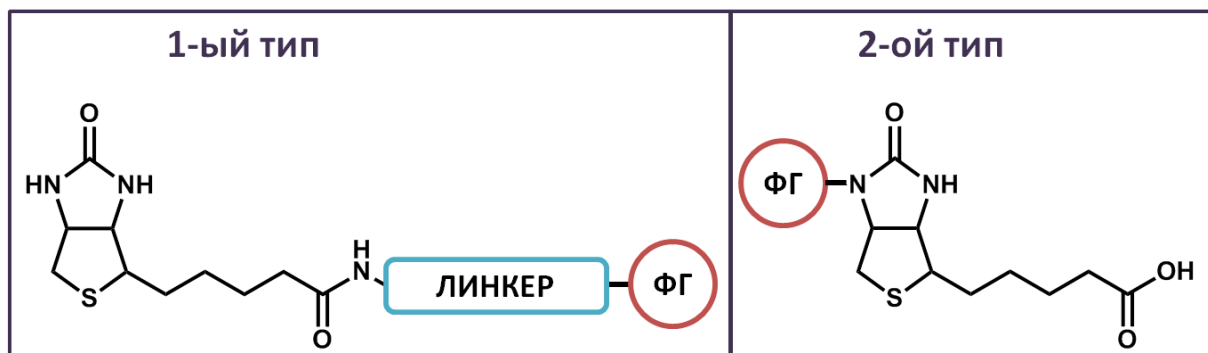
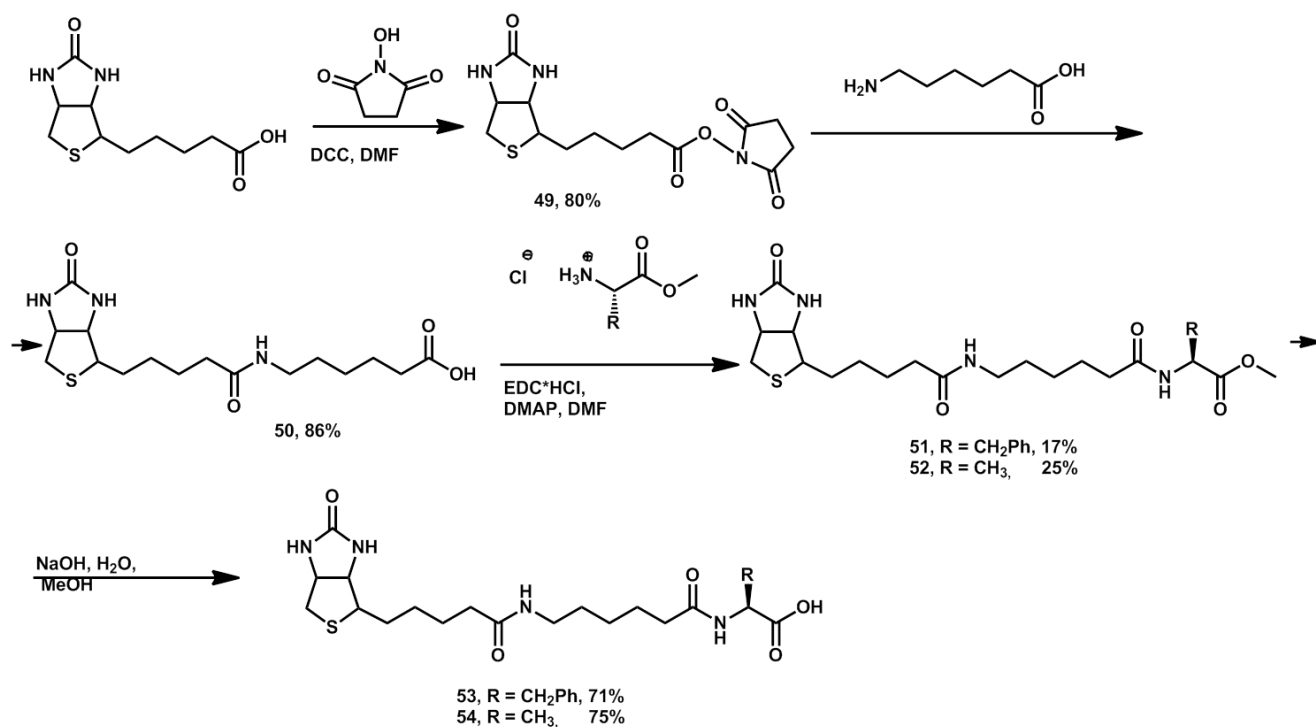


Рис. 6 Два типа лигандов – производных биотина

1-ый Структурный тип полученных соединений представлял собой производные со свободным фрагментом биотина, 2-ой - с ацилированным фрагментом биотина.

В первом случае целевые соединения включали в себя фрагмент биотина и аминокислот, а также пептидов. Для получения соединений типа биотин-линкер-аминокислота синтез проводили по следующей схеме:

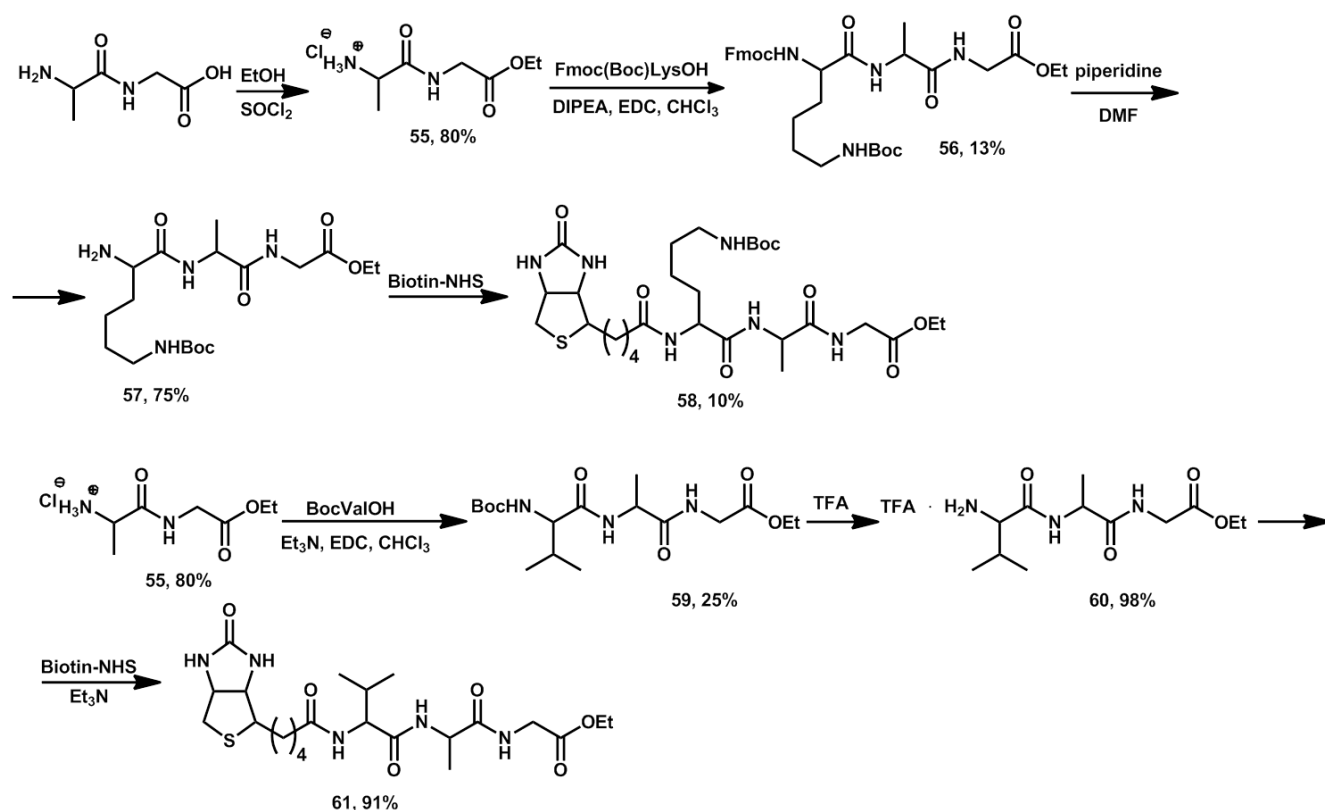


На первом этапе карбоксильная группа биотина была активирована – получен N-гидроксисукцинимид биотина, который затем вводили в реакцию с 6-аминогексановой кислотой в системе диоксан/вода с получением амида **50**. Соединение «биотин-линкер» **50**

вводили в реакции карбодиимидного синтеза с метиловым эфиром гидрохлорида фенилаланина и метиловым эфиром гидрохлорида аланина в присутствии этилдиметиламинопропилкарбодиимида и каталитических количеств 4-диметиламинопиридина. Соединения «биотин-линкер-эфир» **51** и **52** были очищены при помощи колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=1:10$  и получены с выходами 17% и 25%. Полученные продукты были подвергнуты щелочному гидролизу с последующим подкислением с целью снятия метильной защиты с карбоксильной группы и выделения целевых лигандов «биотин-линкер-аминокислота» **53** и **54**. Все полученные соединения были охарактеризованы данными  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии.

Помимо этого, был получен лиганд **61**, содержащий не один, а три аминокислотных фрагмента. Синтез проводили по жидкофазной и твердофазной методики.

В первом случае (жидкофазная методика) синтез осуществлялся по следующей схеме:

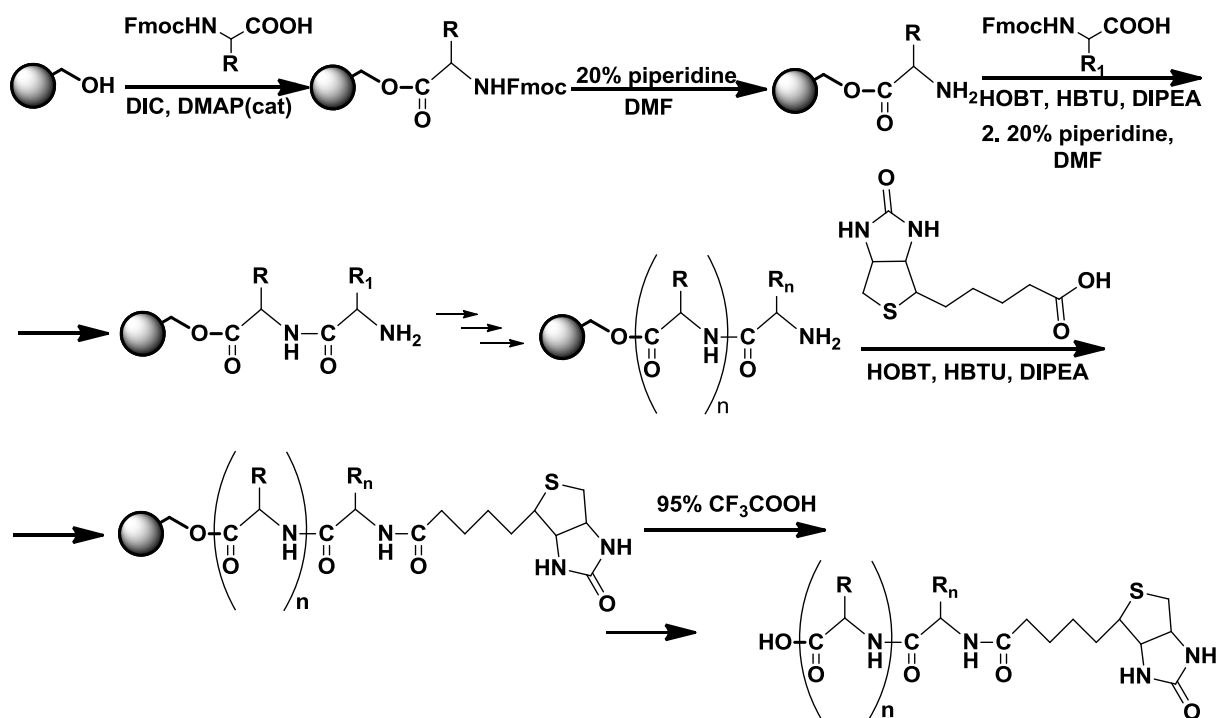


На первом этапе был получен гидрохлорид этилового эфира дипептида аланилглицин. В ходе реакции реакцией тионилхлорида с дипептидом при охлаждении в абсолютном этаноле генерировали хлорангидрид дипептида, который затем взаимодействовал с этанолом с образованием сложного эфира **55** с выходом 80%. Полученный гидрохлорид этилового эфира дипептида **55** вводили в реакцию карбодиимидного пептидного синтеза с двумя аминокислотами – L-Fmoc(Boc)-лизином и L-Boc-валином. Реакция получения соединений **56** и **59** проходила в метиле при  $0^\circ\text{C}$  при активации карбоксильной группы 1-этил-3-(3-

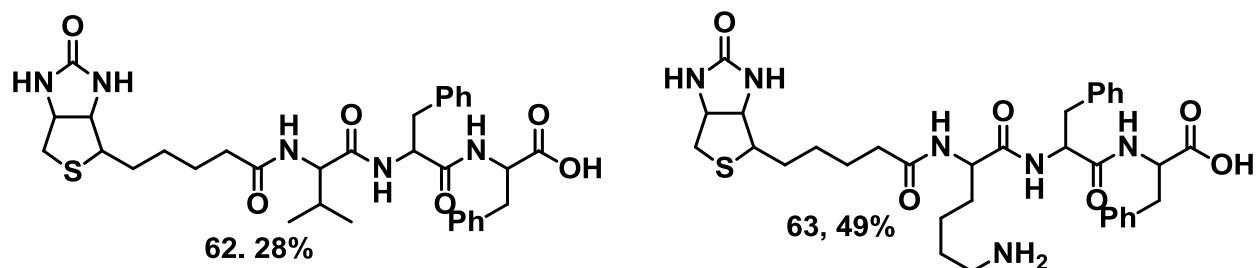
диметиламинопропил)карбодиимидом, также в реакцию добавляли эквивалентное количество диизопропилэтиламина для генерации *in situ* эфира дипептида. В результате были получены соединения **56** и **59** соответственно. На следующем этапе было осуществлено снятие защиты с  $\alpha$ -аминогрупп N-концевых аминокислот в обоих пептидах. В случае соединения **56** удаление защитной группы Fmoc проводили по стандартной методике пиперидином в диметилформамиде, продуктом явился пептид **57** (выход 75%). В случае соединения **59** снятие Boc-защиты проводили трифторуксусной кислотой, в результате с количественным выходом получили трифторацетат этилового эфира валил-аланилглицина (**60**).

Последняя стадия синтеза обоих модельных соединений включала взаимодействие NHS-эфира биотина **49** с этиловыми эфирами трипептидов в присутствии диизопропилэтиламина, причем в случае соли **57** дополнительный эквивалент DIPEA добавляли для депротонирования N-концевой аминогруппы. Полученные производные биотина - этилового эфира биотинил(Boc)лизилаланилглицина **58** и биотинилвалилаланилглицина **61** были очищены методом колоночной хроматографии и выделены в чистом виде с выходами 10% и 91% соответственно. Все промежуточные соединения были охарактеризованы данными ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии, элементного анализа и масс-спектрометрии. Конечные соединения охарактеризованы данными ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии, чистота подтверждена данными хромато-масс-спектрометрии.

Для оптимизации методики получения производных биотина и пептидов было предложено проведение реакции на твердой фазе. Данный подход использовался ранее (раздел 3.1.3.) для получения производных липоевой кислоты. Оптимизация методики для получения производных биотина на твердой фазе позволила получить производные трипептида и биотина с хорошими выходами и значительно упростить проведение реакции и очистку целевых лигандов. Реакцию проводили по приведенной ниже схеме, на последней стадии вместо аминокислоты вводили в реакцию биотин (3 эквивалента):



Синтез олигопептидов проводился на смоле Ванга с использованием рассмотренной выше Fmoc-стратегии. В качестве модельных соединений были получены пептиды **62** и **63**:



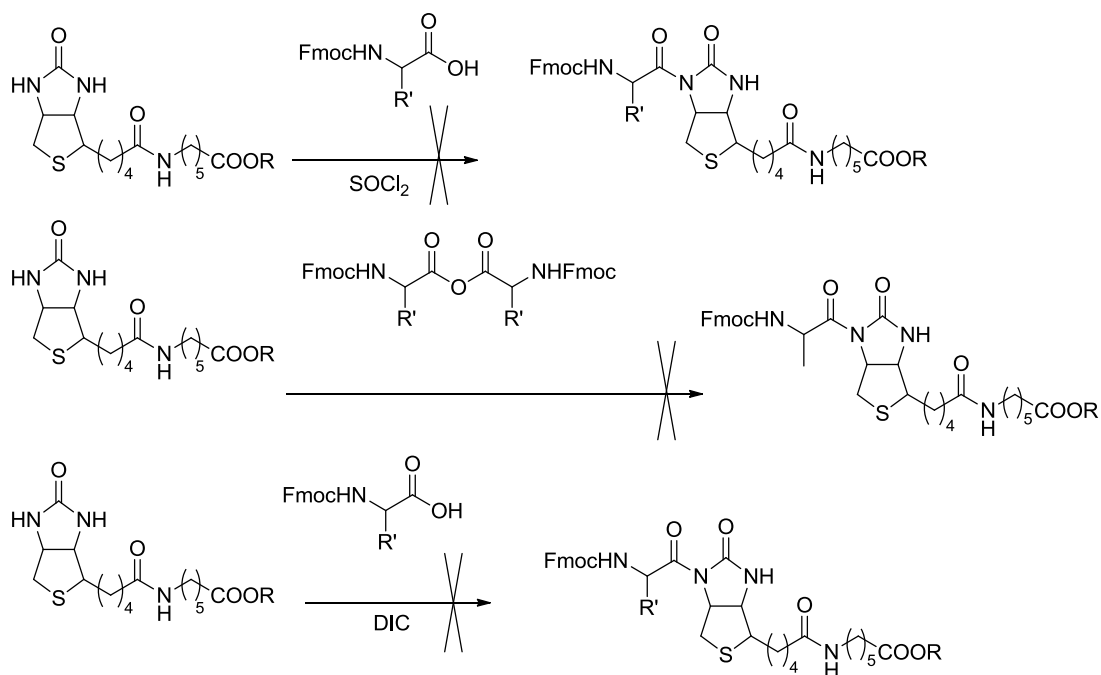
Для получения пептидов **62** и **63** на последней стадии синтеза вместо соответствующей аминокислоты в реакцию вводили биотин. Подобные реакции биотина на твердой фазе не описаны в литературе. Получили с выходами 35% и 30% соответственно целевые соединения **62** и **63**.

Второй тип производных биотина типа «аминокислота-биотин» получен реакцией ацилирования биотина производными аминокислот.

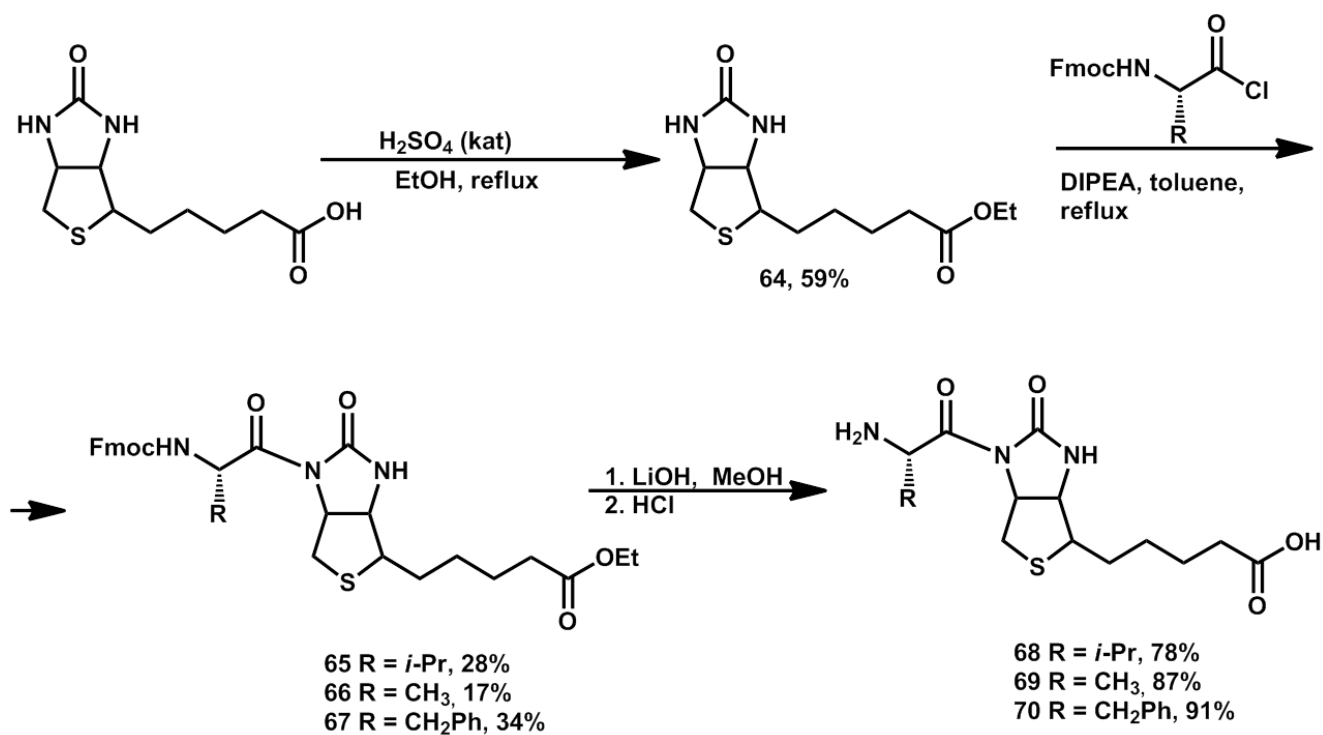
Для получения целевых соединений необходимо было осуществить ацилирование соединений биотина производным аминокислоты по атому азота. Атомы азота биотинового кольца аналогичны по реакционной способности атомам азота в мочеvine и инертны в реакциях ацилирования и алкилирования. Известно, что наличие 4-карбоксивбутильного заместителя делает 3'-атом азота кольца существенно более пространственно затрудненным

(твист-конформация биотинового кольца), поэтому ацилирующие реагенты взаимодействуют в первую очередь с более нуклеофильным 1'-атомом азота [197,198]. Наилучшим способом ацилирования биотина, по литературным данным, является взаимодействие с галогенангидридами кислот [199,200]. При этом карбоксильную группу биотина предварительно превращают в сложноэфирную [201]. Описано ацилирование эфиров биотина галогенангидридами уксусной, хлоруксусной, диэтоксифосфонуксусной кислот [197].

Поскольку в литературе не описаны методики ацилирования биотина аминокислотами, для проведения данных реакций была взята за основу методика ацилирования биотина хлорангидридами кислот, а также различные методики ацилирования мочевины. Мы провели попытки ацилирования производных биотина симметричным и смешанным ангидридами аминокислот в условиях карбодиимидного синтеза в присутствии дициклогексилкарбодиимида и диизопропилкарбодиимида соответственно, а также хлорангидридом аминокислоты, генерированном *in situ*. В результате проведенных реакций продукт ацилирования выделить не удалось; более того, целевой продукт в полученной после реакции смеси обнаружен не был.



Успешной оказалась лишь попытка ацилирования биотина предварительно выделенными хлорангидридами аминокислот в жестких условиях:



На первом этапе по этой методике был получен этиловый эфир биотина **64** реакцией биотина со спиртом в присутствии каталитических количеств серной кислоты с выходом 59%. Хлорангидриды валина, аланина и фенилаланина были получены реакцией тионилхлорида с соответствующими аминокислотами в хлористом метиле при кипячении и введены в реакцию с этиловым эфиром биотина в толуоле в присутствии 1 эквивалента диизопропилэтиламина. В результате методом колоночной хроматографии выделены соединения **65** - **67**. Для получения целевых соединений «аминокислота-биотин» ацилированные производные биотина обрабатывали спиртовым раствором щелочи, что привело к снятию одновременно двух защитных групп – сложноэфирной и Fmoc. Строение полученных целевых соединений **68**, **69** и **70** установлено методами ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии и подтверждено данными масс-спектрометрии.

Таким образом, в ходе выполнения первой части работы нами были получены новые бифункциональные органические лиганды, потенциально способные адсорбироваться на поверхности наночастиц (золота и магнитных), а также имеющие активные функциональные группы для взаимодействия с биологическими объектами.



## 2.2. Синтез наночастиц золота и магнетита

### 2.2.1. Синтез наночастиц золота

Для синтеза НЧ золота в работе были использованы два метода: метод Бруста-Шифрина [202] (Рисунок 7 слева) для получения НЧ размером до 2 нм и метод Туркевича [203] (Рисунок 7 справа) для получения НЧ диаметром >2,5 нм.

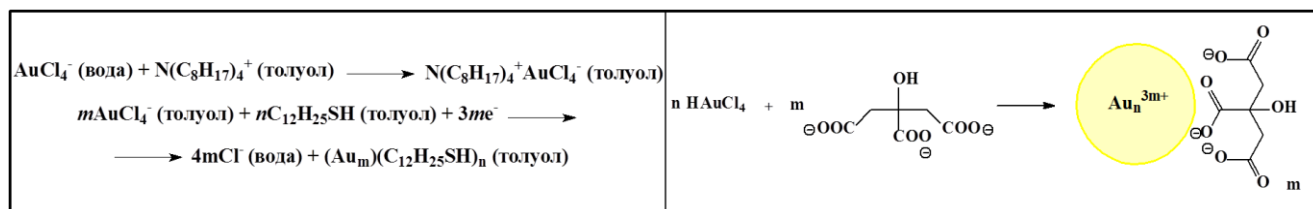


Рис. 7 Методы синтеза наночастиц золота (а) Бруста-Шифрина, (б) Туркевича

В ходе работы нами были получены НЧ золота со средним диаметром  $1,7 \pm 0,3$  нм (**1н**),  $2,5 \pm 0,5$  нм (**2н**),  $5 \pm 1$  нм (**3н**),  $10 \pm 2$  нм (**4н**),  $25 \pm 3$  нм (**5н**),  $40 \pm 3$  нм (**6н**),  $70 \pm 10$  нм (**7н**). Размер образующихся в ходе реакции Туркевича золотых НЧ контролировали, варьируя соотношение реагирующих веществ:  $\text{HAuCl}_4$  и восстановителя. При уменьшении мольного содержания цитрата в растворе происходит образование наночастиц большего диаметра. Цитрат-ионы в данном случае служат также стабилизирующими агентами, так как они образуют на поверхности НЧ отрицательно заряженную оболочку, что препятствует их взаимодействию за счет электростатического отталкивания. Для получения НЧ **2н** и **3н** в раствор добавляли танниновую кислоту. Наночастицы **6н** были получены в присутствии аскорбиновой кислоты. Полученные НЧ были охарактеризованы данными электронной спектроскопии в видимой области (Рисунок 8) и просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 9). Полоса плазмонного резонанса в электронном спектре полученных наночастиц наблюдается при 523 нм для НЧ диаметром 10 нм; с увеличением размера наночастиц золота полоса плазмонного резонанса сдвигается в длинноволновую область.

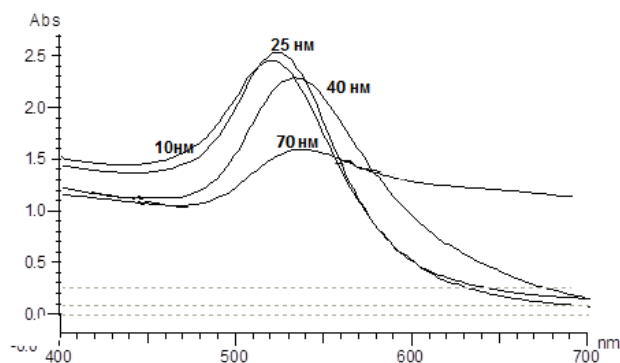


Рис. 8 Электронный спектр в видимой области растворов нч золота различного размера

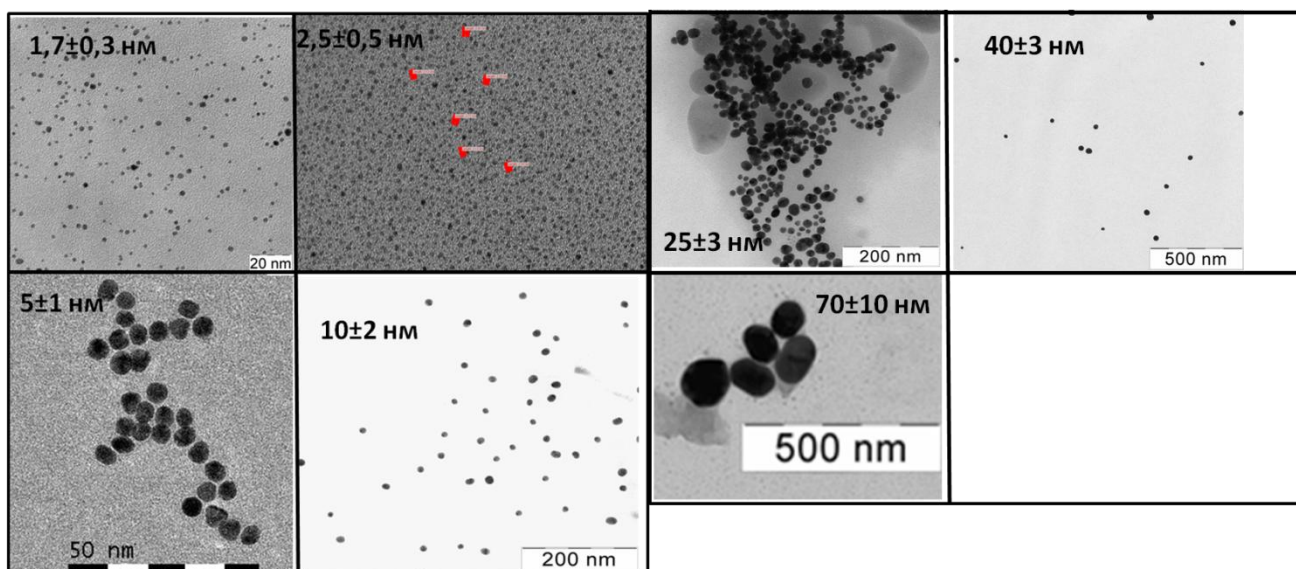


Рис. 9 Данные ПЭМ для нч золота различного размера

### 2.2.2. Получение сорбента для ВЭЖХ на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) широко используется для разделения и количественного анализа различных классов органических веществ, и является важным инструментом исследования в области материаловедения, экологии, медицины и др. Отдельным типом ВЭЖХ является хроматографическое разделение энантимеров – хиральная ВЭЖХ. Неподвижные фазы для хиральной ВЭЖХ можно классифицировать по типу хирального селектора на натуральные (протеины, олигосахариды, антибиотики, алкалоиды), полусинтетические (модифицированные олигосахариды, полисахариды, низкомолекулярные природные соединения), синтетические (полимеры, низкомолекулярные синтетические соединения). Поиск новых эффективных и селективных сорбентов для хиральной ВЭЖХ является актуальной научной задачей.

В настоящей работе нами впервые получены и протестированы образцы неподвижных фаз на основе наночастиц металлов.

Полученные золотые НЧ различного диаметра (от 2 нм до 50 нм) наносили на поверхность сорбента – силикагеля. Для этого использовались различные синтетические последовательности: наночастицы или напрямую адсорбировались на поверхности силикагеля, или носитель (силикагель) предварительно модифицировали аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) или меркаптопропилтриметоксисиланом (МПТМС), что приводило к функционализации поверхности амино- или меркапто-группами соответственно, и на

следующем этапе НЧ золота адсорбировались на поверхности носителя за счет химического связывания: электростатического и ковалентного соответственно (Рисунок 10).

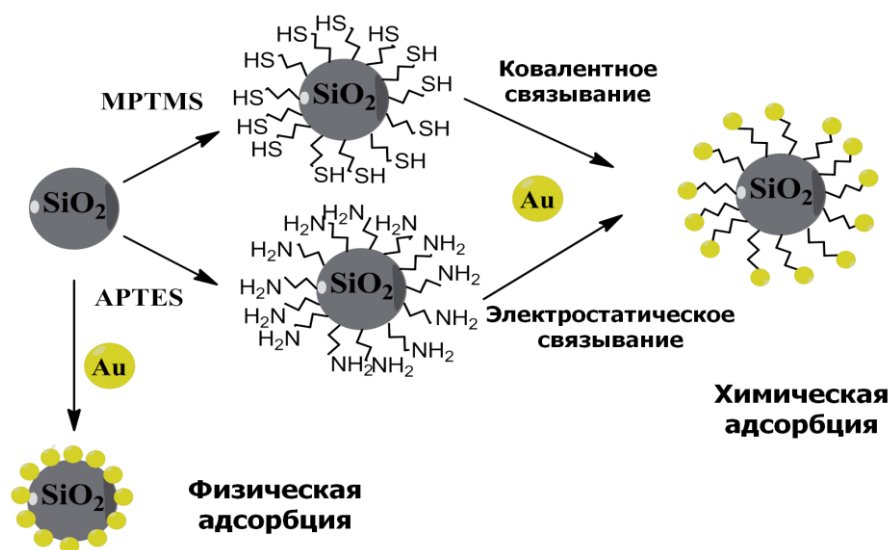


Рис. 10 Схема модификации поверхности сорбента наночастицами золота

Далее поверхность НЧ золота функционализировали серосодержащими лигандами (L-цистеином, меркаптопропионовой кислотой (МПК)) (Рисунок 11). Для адсорбции на поверхности сорбента хирального высокомолекулярного селектора (бычий сывороточный альбумин (БСА), ванкомицин), не содержащего тио-групп, проводили последовательно модификацию МПК, а затем реакцию карбодиимидного синтеза на поверхности НЧ, в результате которой образовывалась амидная связь со свободной амино-группой БСА или ванкомицина:

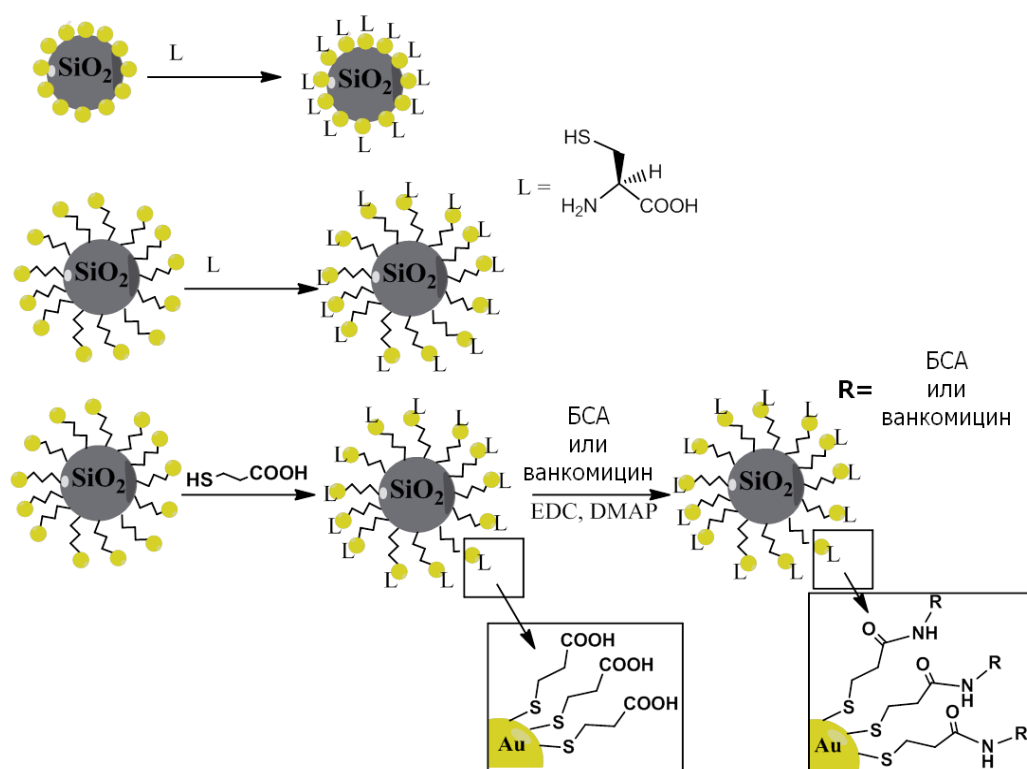


Рис. 11 Функционализация поверхности сорбента серосодержащими лигандами

В результате были получены 6 видов сорбентов:  $\text{SiO}_2 - \text{Au} - \text{цитрат}$  (**1м**),  $\text{SiO}_2 - \text{Au} - \text{L-цистеин}$  (**2м**),  $\text{SiO}_2 - \text{NH}_2 - \text{Au} - \text{L-цистеин}$  (**3м**),  $\text{SiO}_2 - \text{S} - \text{Au} - \text{L-цистеин}$  (**4м**),  $\text{SiO}_2 - \text{S} - \text{Au} - \text{бычий сывороточный альбумин (БСА)}$  (**5м**) и  $\text{SiO}_2 - \text{S} - \text{Au} - \text{ванкомицин}$  (**6м**). Полученные сорбенты исследовались в качестве стационарной фазы ВЭЖХ для разделения различных соединений<sup>1</sup>: аминопиридинов, нитроанилинов, пестицидов, витаминов, энантимеров  $\beta$ -блокаторов и лекарственных препаратов; было также проведено хроматографическое определение гидразинов в виде производных с 2,3-нафталиндикарбальдегидом (НДА), в том числе в образце природной воды озера Имандра (Таблица 2).

<sup>1</sup> Хроматографические исследования сорбентов проводились совместно с кафедрой аналитической химии МГУ, под руководством Шпигуна О.А.

Таблица 2. Структуры сорбентов и типы разделяемых веществ

№	Сорбент	Способ получения	Разделяемые вещества
1м	SiO <sub>2</sub> – Au – L-цитрат	Адсорбция нч золота (2,5 ± 0,5 нм, 10 ± 2 нм, 25 ± 3 нм, 40 ± 3 нм), покрытых цитратом	Аминопиридины, Нитроанилины Пестициды
2м	SiO <sub>2</sub> – Au – L-цистеин	Адсорбция нч золота (10 ± 2 нм), ковалентная модификация нч золота L-цистеином	Аминопиридины, Нитроанилины Пестициды, НДА-гидразины, в том числе анализ образца природной воды Энантиомеры β-блокаторов
3м	SiO <sub>2</sub> – NH <sub>2</sub> – Au – L-цистеин	Химическая адсорбция нч золота (10 ± 2 нм) за счет взаимодействия NH <sub>2</sub> группы с золотом (10 ± 2 нм), ковалентная модификация нч золота L-цистеином	Аминопиридины Пестициды Нитроанилины Витамины
4м	SiO <sub>2</sub> – S – Au – L-цистеин	Химическая адсорбция нч золота (10 ± 2 нм) за счет ковалентной связи S-Au, ковалентная модификация нч золота L-цистеином	Аминопиридины Пестициды Нитроанилины Витамины
5м	SiO <sub>2</sub> – S – Au – бычий сывороточный альбумин (БСА)	Химическая адсорбция нч золота (10 ± 2 нм) за счет ковалентной связи S-Au, модификация поверхности нч золото меркаптопропионовой кислотой и проведение реакции карбодиимидного синтеза на поверхности нч золота с образованием амидной связи МПК и аминогруппы БСА	Энантиомеры β-блокаторов
6м	SiO <sub>2</sub> – S – Au – ванкомицин	Химическая адсорбция нч золота (10 ± 2 нм) за счет ковалентной связи S-Au, модификация поверхности нч золото меркаптопропионовой кислотой и проведение реакции карбодиимидного синтеза на поверхности нч золота с образованием амидной связи МПК и аминогруппы ванкомицина	Энантиомеры β-блокаторов, в том числе лекарственные препараты на их основе

На первом этапе было проведено изучение влияния размера НЧ золота на эффективность сорбента SiO<sub>2</sub>-Au-L-цистеин. Полученные сорбенты были охарактеризованы данными

сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), согласно которым наночастицы золота любого размера способны сорбироваться на поверхности, но в случае более крупных НЧ адсорбируются в основном не дискретные частицы, а их агрегаты (Рисунок 12, справа).

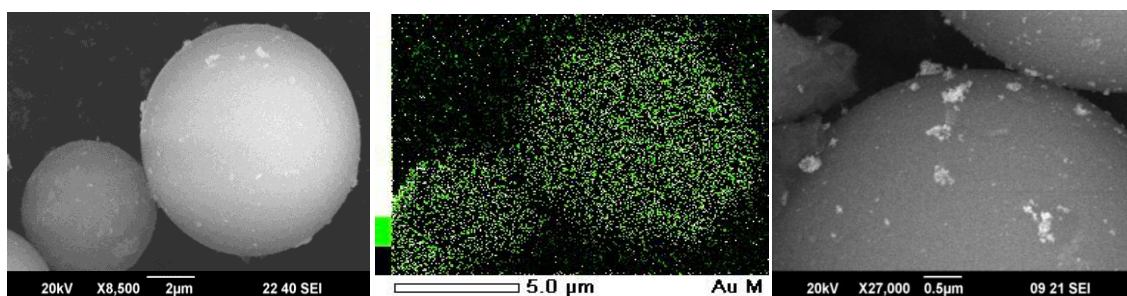


Рис. 12 Данные сканирующей электронной микроскопии (слева и в центре - адсорбция нч золота, размером  $10 \pm 2$  нм, справа – размером  $40 \pm 3$  нм)

Для оценки концентрации золотых НЧ на поверхности силикагеля использовали метод атомной абсорбционной спектроскопии (ААС) (Таблица 3). Анализ проводили на основании смывов золота с поверхности силикагеля, после обработки сорбента царской водкой. Полученная градуировочная зависимость описывается уравнением  $A=0.0028+0.047 \times c$ , где  $A$  – величина оптической плотности,  $c$  – концентрация наночастиц золота (мкг/мл). Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что наибольшая поверхностная концентрация золотых НЧ на носителе наблюдается при размере НЧ = 10 нм и 30-100 нм, но так как в последнем случае происходит агрегация, оптимальным размером НЧ золота представляется 10 нм.

Таблица 3. Количество адсорбированного золота на поверхности сорбента (ААС)

Диаметр НЧЗ, нм	$m_{Au}$ (мкг)/1 г $SiO_2$	Масс. % Au
2	$23 \pm 4$	$0.12 \pm 0.02$
10	$62 \pm 10$	$6 \pm 1$
20	$53 \pm 9$	$4.8 \pm 0.8$
30-100	$107 \pm 15$	$8 \pm 1$

Поверхность сорбентов была проанализирована при помощи спектроскопии диффузного отражения. Полученные результаты (Рисунок 13, слева) коррелируют с данными спектроскопии в видимой области (Рисунок 8).

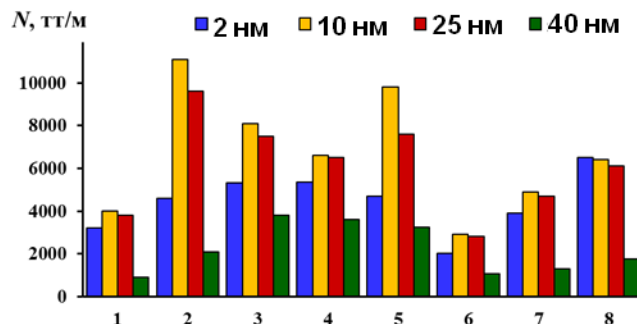
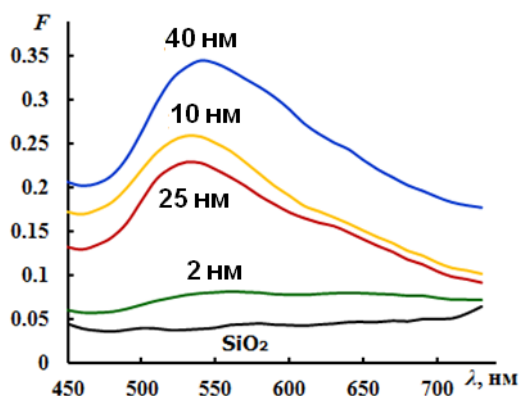


Рис. 13 Спектроскопия диффузного отражения. Рис. 14. Эффективность сорбентов

Полученные образцы силикагель-золото были функционализированы L-цистеином. Об успешной модификации свидетельствовало изменение  $\xi$ -потенциала поверхности с  $-29.2$  mV (для НЧ, покрытых цитратом) до  $-16.8$  mV (для НЧ, покрытых L-цистеином). Хроматографические свойства полученных сорбентов были исследованы на примере разделения аминопиридинов: 1 – 2-амино-5-хлорпиридин, 2 – 2-амино-пиридин, 3 – 2-амино-метилпиридин, 4 – 2-амино-4-метилпиридин, 5 – 3-аминопиридин; и изомерных нитроанилинов: 6 – 2-нитроанилин, 7 – 3-нитроанилин, 8 – 4-нитроанилин. Как показано на рис. 11 наибольшей эффективностью обладает сорбент – силикагель, покрытый наночастицами золота, диаметром 10 нм. Далее по результатам проведенных экспериментов для модификации силикагеля использовали наночастицы диаметром 10 нм.

Для характеристики сорбента **1м** была также использована ПЭМ, показавшая, что частицы адсорбента имеют структуру, представленную на рис. 15.

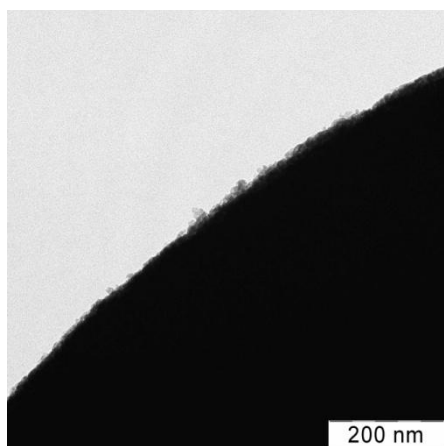


Рис. 15 Данные ПЭМ для сорбента **1м**

Хроматографические характеристики были изучены для двух полученных сорбентов: силикагеля с адсорбированными наночастицами золота, модифицированными L-цистеином (**1м**), и силикагеля с адсорбированными наночастицами золота, стабилизированными цитратом

(2м). Проведен сравнительный анализ удерживания ряда тестовых соединений (нитроанилины, аминопиридины и их производные, триазольные пестициды) на сорбентах 1м, 2м и на немодифицированном силикагеле в нормально-фазовом режиме ВЭЖХ.

Для оценки удерживающей способности полученных сорбентов использовали модельные соединения. При элюировании соединений смесью гексана с изопропанолом факторы емкости увеличиваются при уменьшении полярной добавки в подвижной фазе. Исследования показали, что оптимальной подвижной фазой (по факторам емкости и селективности) оказалась смесь, содержащая 90% гексана и 10% изопропанола.

Для сравнения полярности синтезированных неподвижных фаз и силикагеля в качестве модельных соединений использовали: *о*-, *м*- и *п*- нитроанилины. Из рассчитанных факторов емкости нитроанилинов (Таблица 4) видно, что удерживание сорбатов на всех трех сорбентах растет в ряду *орто* < *мета* < *пара*, что подтверждает нормально-фазовый механизм удерживания соединений. Заметное удерживание *п*-нитроанилина говорит о высокой полярности полученных новых сорбентов, причем наиболее полярен силикагель, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионом.

Таблица 4. Факторы емкости нитроанилинов для исследованных сорбентов. Подвижная фаза: гексан/изопропанол (90/10). Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{макс}} = 230$  нм

Сорбент	<i>о</i> -нитроанилин	<i>м</i> -нитроанилин	<i>п</i> -нитроанилин
SiO <sub>2</sub> – Au – L-цистеин	0.5	2.0	2.7
SiO <sub>2</sub> – Au – цитрат	0.6	2.6	3.9
SiO <sub>2</sub>	0.6	1.9	3.1

Полученные данные по удерживанию и разделению производных аминопиридина представлены на рис. 16.



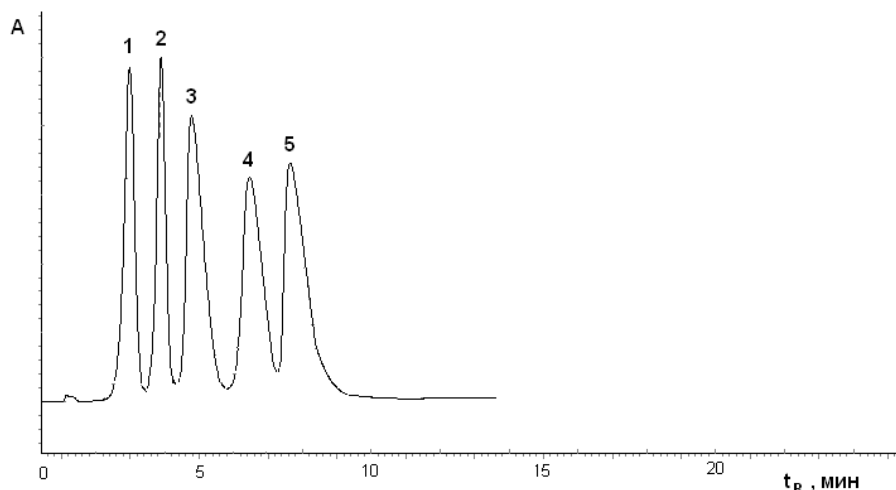
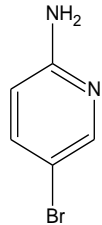
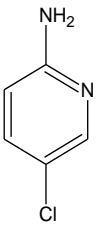
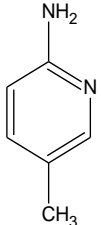
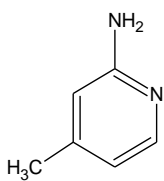


Рис. 16 Хроматограмма разделения смеси замещенных пиридинов. Подвижная фаза: гексан/изопропанол (90/10), скорость подвижной фазы 1 мл/мин, детектор спектрофотометрический ( $\lambda=254$  нм). Неподвижная фаза: силикагель 5 мкм – наночастицы золота – L-цистеин (100x4,0 мм). **1** - 2-амино-5-хлорпиридин; **2** - 1-пиридил-2-(2-аминофенил)этан; **3** - 2-амино-5-метилпиридин; **4** - 2-амино-4-метилпиридин; **5** – 3-аминопиридин

Из Таблицы 5, в которой представлены рассчитанные значения факторов емкости замещенных аминопиридинов, видно, что полученные для нитроанилинов закономерности соблюдаются и в этом случае. Наибольшее время удерживания всех соединений наблюдается для силикагеля, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионом, хотя значения факторов емкости близки между собой.

Таблица 5. Факторы емкости производных аминопиридина для исследованных сорбентов. Подвижная фаза: гексан/изопропанол (90/10). Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{макс}} = 230$  нм

Сорбент	 2-амино-5-бромпиридин $pK_a$ 4.65 $\log P$ 1.36	 2-амино-5-хлорпиридин $pK_a$ 4.67 $\log P$ 1.21	 2-амино-5-метилпиридин $pK_a$ 7.04 $\log P$ 0.94	 2-амино-4-метилпиридин $pK_a$ 7.38 $\log P$ 0.91
SiO <sub>2</sub> – Au - L-цистеин	3.2	3.1	9.7	10.7

SiO <sub>2</sub> – Au – Цитрат	3.5	3.4	8.0	9.3
SiO <sub>2</sub>	2.9	2.8	7.0	8.0

В качестве тестовых соединений использовали также триазолы: диниконазол, пенконазол, тебуконазол и дифеноконазол, которые применяют как пестициды и регуляторы роста растений (Рисунок 17).

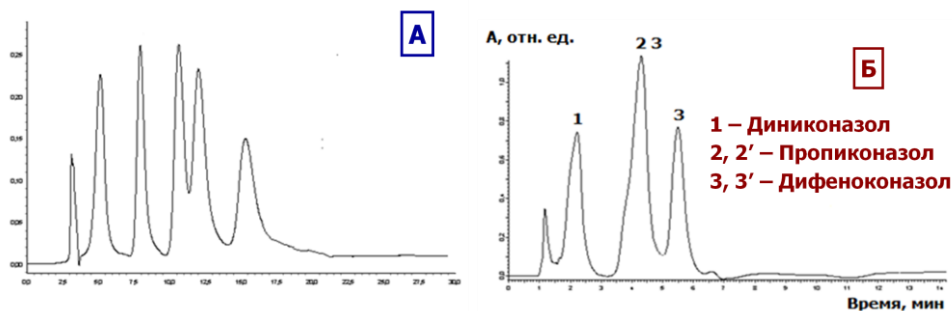
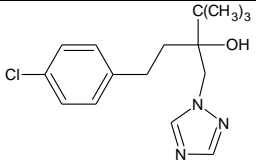
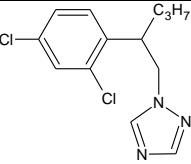
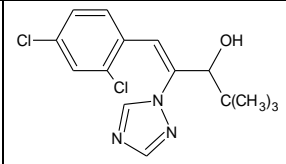
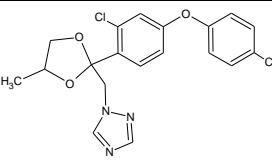


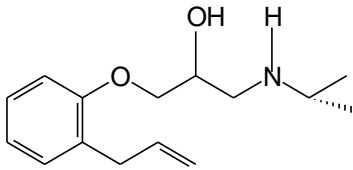
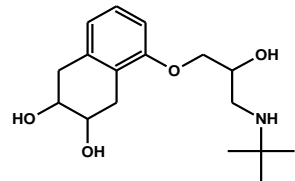
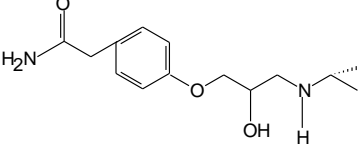
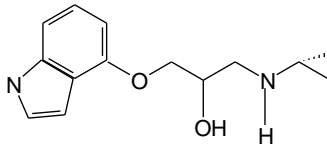
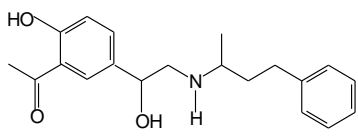
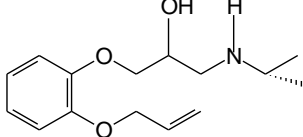
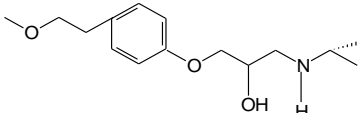
Рис. 17. Хроматограммы разделения смеси пестицидов на (А) SiO<sub>2</sub> – Au – L-цистеин, (Б) SiO<sub>2</sub> (4.6×100.0 мм). ПФ: гексан/изопропанол (90/10 об.%). Скорость потока 0.8 мл/мин. λ<sub>макс</sub> = 230 нм.

Таблица 6. Факторы емкости пестицидов для исследованных сорбентов. Подвижная фаза: гексан/изопропанол (90/10). Спектрофотометрический детектор, λ<sub>макс</sub> = 230 нм.

Сорбент	 тебуконазол logP 3.75	 пенконазол logP 4.25	 диниконазол logP 3.91	 дифеноконазол logP 4.24
SiO <sub>2</sub> – Au – L-цистеин	3.1	4.5	1.1	4.0 (4.8)
SiO <sub>2</sub> – Au – Цитрат	2.9	5.5	1.0	3.8 (5.4)
SiO <sub>2</sub>	2.7	4.8	0.8	3.7 (5.1)

Была также изучена возможность использования синтезированных сорбентов для хроматографического разделения β-блокаторов. Структуры исследованных β-блокаторов представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Структурные формулы  $\beta$ -блокаторов

Название $\beta$ -блокатора	Структурная формула	Название $\beta$ -блокатора	Структурная формула
Алпренолол		Надолол	
Атенолол		Пиндолол	
Лабеталол		Окспренолол	
Метопролол			

В Таблице 8 представлены данные по удерживанию  $\beta$ -блокаторов на колонке 1 в зависимости от состава подвижной фазы.

Таблица 8. Хроматографические параметры разделения  $\beta$ -блокаторов на сорбенте: SiO<sub>2</sub> – Au – L-цистеин (150×2.1 мм). T<sub>m</sub> = 0.6 мин. Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{макс}}$  = 276 нм

$\beta$ -блокатор	k'	$\alpha$	Rs	N, тт/м	Подвижная фаза
Лабетолол	1.7	-	-	900	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 80/20/0.01/0.01
Окспренолол	3.3	-	-	2500	
Метопролол	4.3	-	-	5000	
Алпренолол	4.7	-	-	2600	
Пиндолол	4.9	-	-	3600	
Надолол	9.0	-	-	6400	
Атенолол	9.7	-	-	4900	
Лабетолол	5.5	1.16	0.40	1600	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 90/10/0.01/0.01
Алпренолол	9.9 11.5	-	-	90000 40000	
Окспренолол	10.7 12.9	-	-	40000 10000	
Пиндолол	11.2	-	-	4900	
Метопролол	13.7	-	-	3700	
Надолол	23.5	-	-	90000	
Атенолол	27.5	1.2	0.50	160000	
Алпренолол	5.5	-	-	3000	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 95/5/0.1/0.1
Окспренолол	5.5	-	-	1700	
Пиндолол	5.5 6.3	1.15	0.67	250000 250000	
Лабетолол	5.8	-	-	500	
Метопролол	6.0	-	-	2500	
Надолол	11.7	-	-	5000	
Атенолол	13.5	-	-	3800	
Пиндолол	5.1 5.9	1.16	0.68	250000 250000	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 95/5/0.1/0.05
Алпренолол	5.7	-	-	2400	
Окспренолол	6.0	-	-	4800	
Метопролол	6.3	-	-	4900	
Лабетолол	6.5	-	-	1100	
Надолол	8.8	-	-	5000	
Атенолол	14.2	-	-	1200	
Пиндолол	3.9 4.5	1.13	0.64	360000 490000	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 95/5/0.15/0.05
Пиндолол	3.1 3.5	1.14	0.40	160000 400000	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH 95/5/0.2/0.05

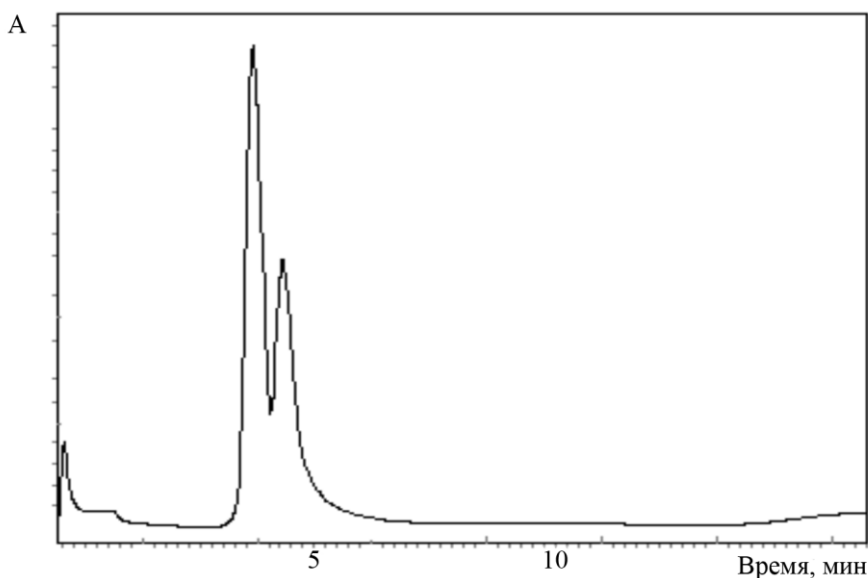


Рис. 18 Хроматограмма разделения пиндолола. Неподвижная фаза:  $\text{SiO}_2 - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин ( $150 \times 2.1$  мм). Подвижная фаза:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_3\text{COOH}$  95/5/0.1/0.05. Скорость потока 1 мл/мин. Спектрофотометрический детектор,  $\lambda_{\text{макс}} = 276$  нм.

На заключительном этапе работы было проведено сравнение свойств трех типов материалов:  $\text{SiO}_2 - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (**2м**),  $\text{SiO}_2 - \text{NH}_2 - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (**3м**),  $\text{SiO}_2 - \text{S} - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (**4м**). Атом азота способен взаимодействовать с поверхностью НЧ золота за счет координационных и электростатических сил, тогда как сера ковалентно связывается с поверхностью золота, образуя прочную ковалентную связь Au-S (энергия связи 40 ккал/моль).

СЭМ изображения полученных сорбентов, покрытых наночастицами золота представлены на Рисунке 19. Во всех случаях происходит адсорбция НЧ на поверхности силикагеля, однако, для нефункционализированных частиц силикагеля (Рисунок 19а) визуализируются только отдельные покрытые наночастицами области, в то время как многие частицы остаются непокрытыми. Для тио-функционализированных частиц силикагеля (Рисунок 19в) общее количество сорбированных золотых НЧ существенно больше, чем для немодифицированного силикагеля, но на поверхности помимо дискретных НЧ в значительном количестве присутствуют иммобилизованные агрегаты. В случае аминокислотного функционализированного сорбента (Рисунок 19с) количество адсорбированных НЧ промежуточное между нефункционализированным и тио-функционализированным силикагелем, однако, отсутствуют адсорбированные кластеры.

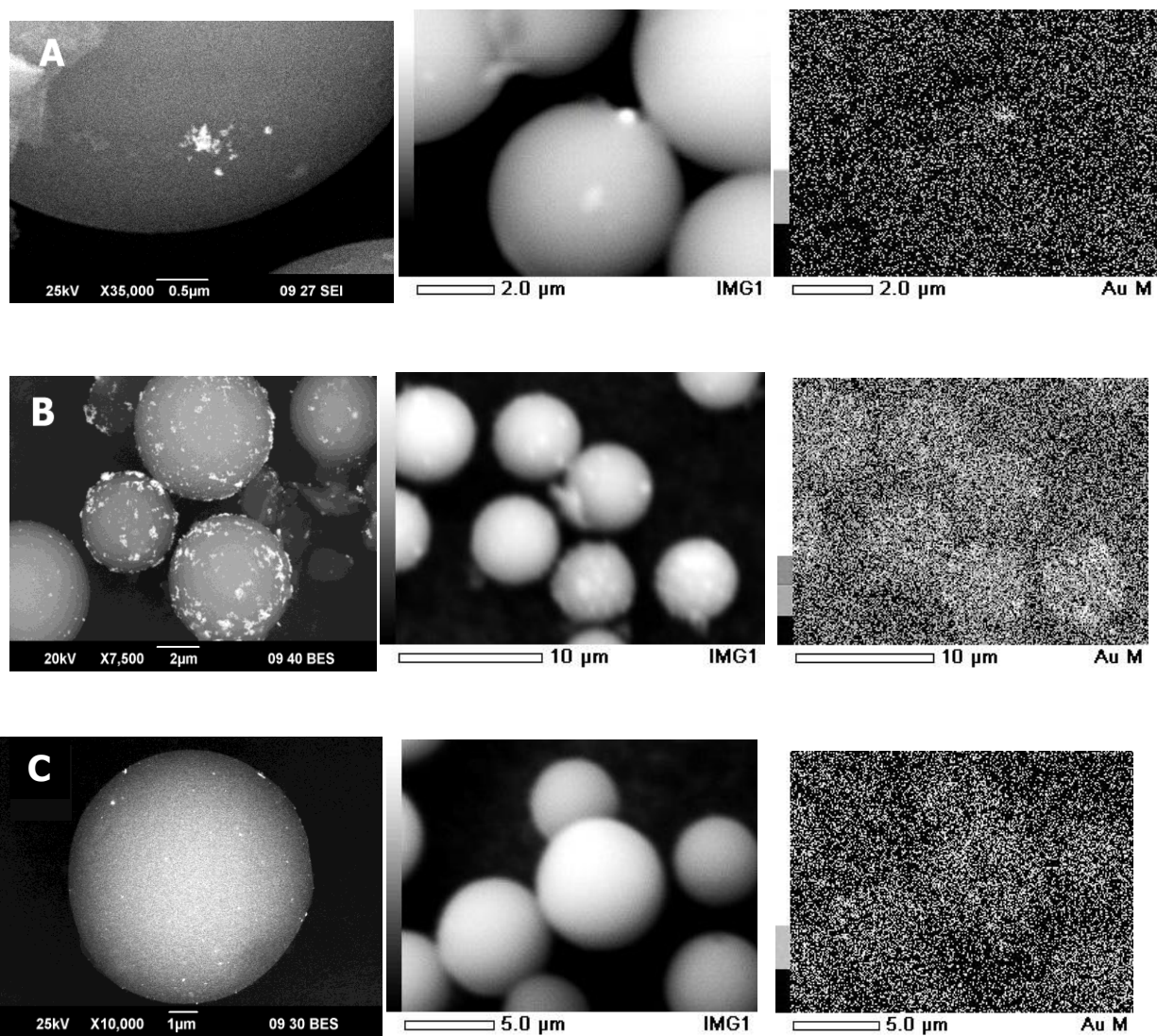


Рис. 19 Данные СЭМ для сорбентов **2м**, **3м** и **4м**

Результаты СЭМ подтверждаются данными спектроскопии диффузного отражения (Рисунок 20): интенсивность поглощения, характеризующая количество иммобилизованного золота, растет от **2м** к **4м**, и максимум пика смещается в длиноволновую область из-за процесса агрегации НЧ.

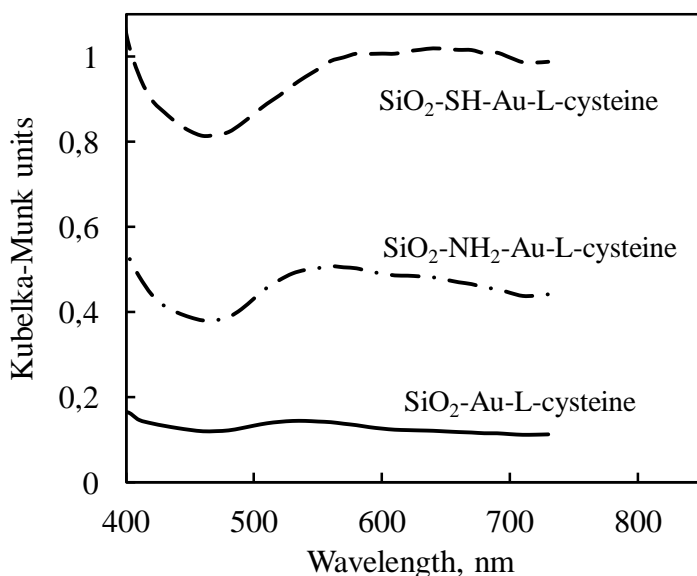


Рис. 20 Спектр диффузного отражения для образцов 2м, 3м и 4м

Согласно данным ААС при длине волны 242,8 нм (Таблица 9) концентрация НЧ золота, адсорбированных на поверхности немодифицированного силикагеля составляет 1,8 мг/г оксида кремния, что соответствует 69% НЧ, введенных в реакцию, а в случае амино- и тио-функционализированного силикагеля - 2,8 мг и 10,3 мг/г соответственно (99% и 100%).

Таблица 9. Количество золота на поверхности сорбента (ААС)

Сорбент	$m_{Au}$ (мг)/1г SiO <sub>2</sub>	$m_{Au}$ на поверхности SiO <sub>2</sub> / $m_{Au}$ добавленного в реакцию (%)
SiO <sub>2</sub> – Au – citrate	1.8	69.0%
SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> – Au – citrate	2.8	99.0%
SiO <sub>2</sub> -SH – Au – citrate	10.3	100%

Также был измерен  $\zeta$ -потенциал полученных наноматериалов. Непокрытый силикагель обладает слабым отрицательным зарядом при нейтральном рН из-за диссоциации протона гидроксильной группы с поверхности силикагеля (-21 мВ). Поверхность амино-функционализированного силикагеля заряжена положительно из-за протонирования аминогрупп на поверхности силикагеля - 25.4 мВ. Заряд тио-функционализированного силикагеля -40.2 мВ. Измеренные значения  $\zeta$ -потенциала силикагеля, модифицированного наночастицами золота значительно отличались от показателей для непокрытого силикагеля. Дзета потенциал сорбента, покрытого цитратом имеет больший отрицательный заряд по сравнению с цистеином, благодаря отрицательно заряженным цитрат ионам. Замена цитрата на L-цистеин повышает значение потенциала из-за биполярности аминокислоты. Результаты измерения  $\zeta$ -потенциала

косвенно доказывают успешность проведения модификации поверхности золота аминокислотой.

В качестве модельных соединений для сравнения хроматографических свойств сорбентов **2м**, **3м** и **4м** были выбраны 2-аминопиридин, 3-аминопиридин, 4-аминопиридин, 2-амино-5-хлорпиридин и 2-амино-4-метилпиридин. Рост количества иммобилизованного золота на поверхности сорбента значительно влияет на хроматографические свойства.

Согласно представленным данным (Рисунок 21) времена удерживания всех исследованных аминопиридинов значительно меньше на колонке с аминофункционализированным силикагелем, покрытом золотыми НЧ. Данная колонка позволяет разделить смесь 2-, 3- и 4-аминопиридинов в течение 30 минут. Однако, эффективность и селективность всех трех колонок сравнимы. Полученные сорбенты проявили себя аналогично и в случае разделения пестицидов.

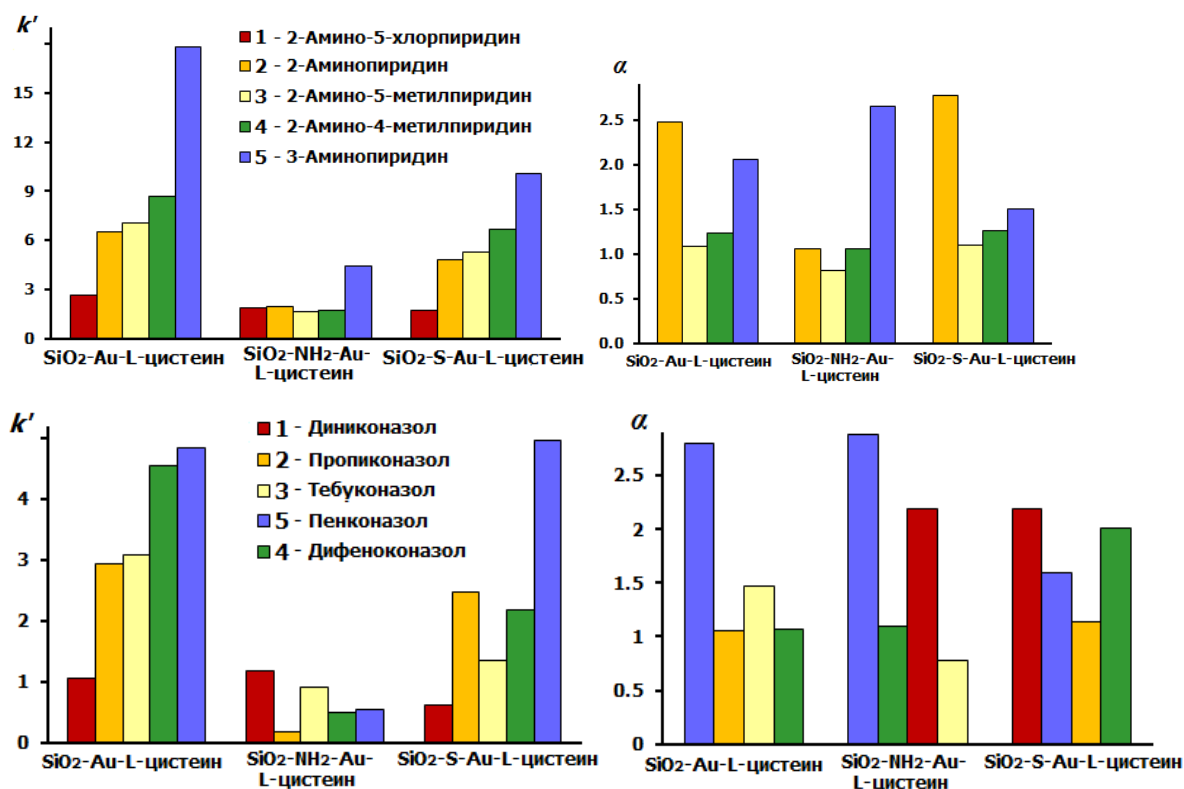


Рис. 21 Сравнение хроматографических свойств сорбентов

Таким образом, наиболее перспективным является сорбент на основе аминированного силикагеля, покрытого НЧ золота. На данном сорбенте было изучено разделение более сложных соединений – витаминов, и было продемонстрировано эффективное разделение витаминов С, В3, В12, В5 (Рисунок 22).



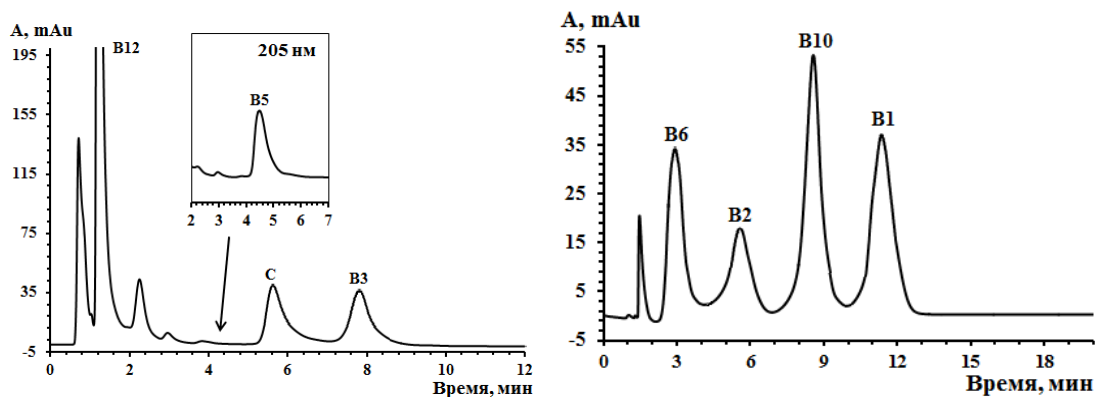


Рис. 22 Разделение витаминов С, В3, В12, В5 на SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Au-L-цистеин (4.6 × 100 мм). ПФ 25% АСN – 75% аммонийно-ацетатного буфера (рН 3.8, 50 мМ). λ<sub>max</sub> = 270 нм. C<sub>В3</sub> = C<sub>В5</sub> = C<sub>С</sub> = 0.5 мг/мл, C<sub>В12</sub> = 5 мг/мл Разделение витаминов В1, В2, В6, В10 на SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Au-L-цистеин (4.6 × 100 мм). ПФ 92% АСN – 8% аммонийно-ацетатного буфера (рН 3.8, 50 мМ). λ<sub>max</sub> = 270 нм. C<sub>В1</sub> = C<sub>В6</sub> = C<sub>В10</sub> 1 мг/мл, C<sub>В2</sub> = 0.04 мг/мл.

В ходе работы нами было исследовано два высокомолекулярных соединения – бычий сывороточный альбумин (БСА) и ванкомицин (Рисунок 23). Сорбенты **5м** и **6м** были получены путем последовательной ковалентной модификации. В качестве основы использовали сорбент тио-функционализированный силикагель, покрытый наночастицами золота. Адсорбция лиганда на поверхности силикагеля была подтверждена при помощи элементного анализа; в обоих случаях (БСА и ванкомицин) наблюдалось значительное увеличение массы лиганда. Были изучены энантиоселективные свойства сорбентов **5м** и **6м**. С иммобилизованными наночастицами золота, модифицированными БСА и ванкомицином в обращенно-фазовом и полярно-органическом режиме ВЭЖХ на примере разделения энантиомеров β-блокаторов (Таблица 10).

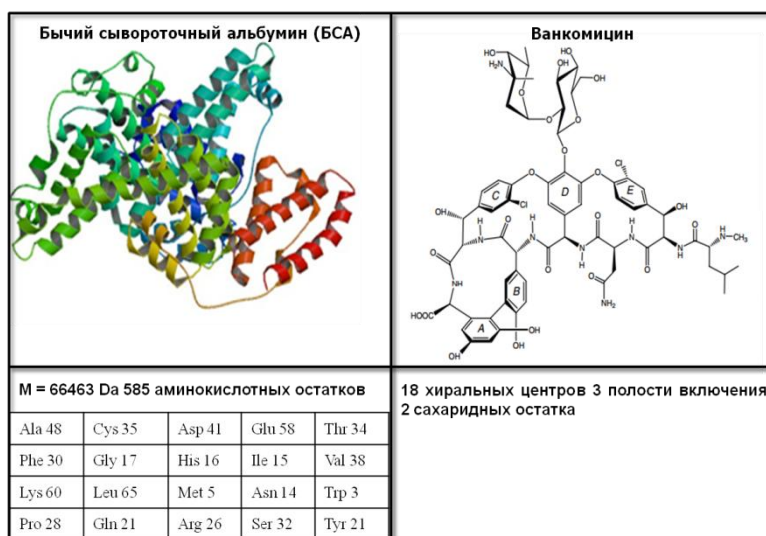


Рис. 23 Структура БСА и ванкомицина

Таблица 10. Данные по разделению энантимеров  $\beta$ -блокаторов

Блокатор	<b>SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-COOH-BCA</b>					ПФ
	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$	N, тт/м	
Атенолол	8.2	8.2	1.00	0.00	7900	
Надолол	16.7	18.5	1.11	0.84	8300 8920	
Пиндолол	20.1	21.0	1.04	0.37	10500 11300	
Метопролол	21.1	23.3	1.11	0.78	11700 11900	
Оксспренолол	24.3	25.1	1.03	0.33	12800 13300	
Алпренолол	63.5	63.5	1.00	0.00	5700	
	<b>SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-COOH-ванкомицин</b>					
Атенолол	0.57	0.73	1.28	0.53	7600 10500	ААБ (50 мМ, рН 4.0)/CH <sub>3</sub> CN (96/4 об.%)
Надолол	0.62	0.85	1.38	0.71	8200 9700	ААБ (25 мМ, рН 4.0)/CH <sub>3</sub> CN (96/4 об.%)
Пиндолол	0.94	1.22	1.30	0.93	16400 13200	ФБ (25 мМ, рН 4.0)/CH <sub>3</sub> CN (96/4 об.%)
Метопролол	1.11	1.40	1.27	0.92	10100 13200	
Оксспренолол	1.10	1.43	1.30	0.91	13000 16300	
Алпренолол	1.23	1.58	1.28	0.81	10700 12600	

Наиболее эффективным и селективным в указанных подвижных фазах проявил себя сорбент **6м** на основе ванкомицин. Были изучены метрологические характеристики хроматографического определения пиндолола и метопролола ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ) на сорбенте **6м** с целью дальнейшего анализа лекарственных препаратов на их основе (вискен и вазокардин).

Таблица 11. Метрологические характеристики определения пиндолола и метопролола

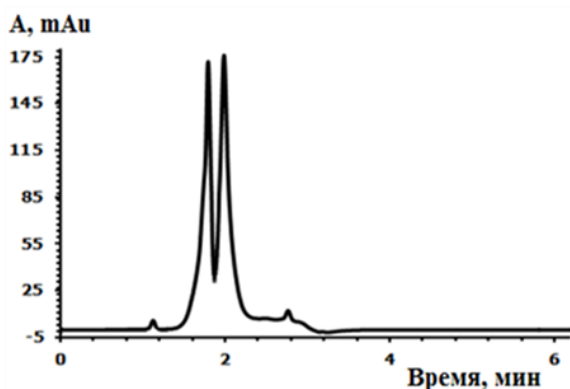
β-Блокатор	Диапазон определяемых концентраций, мг/л	Уравнение градуировочной зависимости	$r$	$s_f$
Пиндолол	0.001 – 50	$y = (1819 \pm 30) \times c$	0.9994	0.06
Метопролол	0.005 – 100	$y = (1278 \pm 15) \times c$	0.9998	0.05

В ходе заключительного анализа было продемонстрировано разделение энантиомеров пиндолола и метопролола в лекарственных препаратах (вискен и вазокардин) (рис. 21). Полученные результаты совпадают с данными, заявленными производителем.

Пиндолол (Вискен) ( $n = 5, P = 0.95$ )

Получено:  $4.7 \pm 0.5$  мг

Заявлено: 5.0 мг

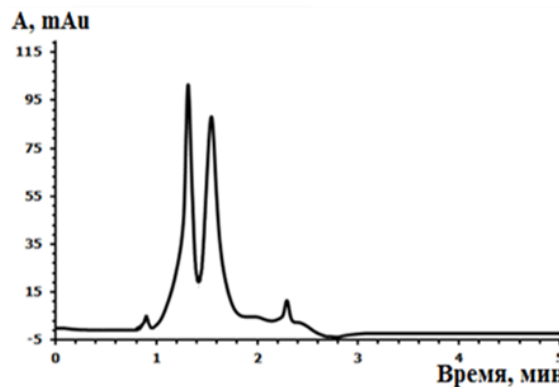


Хроматограмма препарата Вискен. ПФ: 95% фосфатный буфер (25 мМ, рН 4.0) – 5% АСН. 0.5 мл/мин.  $\lambda_{\max} = 270$  нм.

Метопролол (Вазокардин) ( $n = 5, P = 0.95$ )

Получено:  $110 \pm 10$  мг

Заявлено: 100 мг



Хроматограмма препарата Вазокардин. ПФ: 95% фосфатный буфер (25 мМ, рН 4.0) – 5% АСН. 0.5 мл/мин.  $\lambda_{\max} = 270$  нм.

Рис. 24 Данные разделения препаратов (вискен, вазокардин)

Таким образом, в ходе выполнения данной части работы впервые синтезированы шесть новых сорбентов на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота, для разделения широкого круга органических соединений, включая 4 сорбента для экспрессного разделения энантиомеров β-блокаторов. Разработанные методики апробированы при анализе лекарственных препаратов «Вискен» и «Вазокардин».

### 2.2.3. Получение материала для ФДТ

Применение НЧ золота с иммобилизованными на них ФС открывает новые возможности для повышения результативности ФДТ. Применение НЧ перспективно также в случае использования сочетания ФДТ и лазерной гипертермии опухолей. Золотые НЧ обладают уникальным свойством возбуждать локализованный поверхностный плазмонный резонанс в видимой или ближней ИК-области спектра, что приводит к повышенному поглощению и рассеянию ими зондирующего излучения. Путем варьирования различных параметров наночастиц можно контролировать длину волны плазмонного резонанса и получать частицы с заданными оптическими свойствами.

Поскольку фотодинамическое воздействие реализуется при облучении опухоли лазерным излучением, соответствующим длине волны поглощения фотосенсибилизатора, то использование пигментов бактериохлоринового ряда, поглощающих в области 800 нм, может вызвать локальную гипертермию опухоли за счет разогрева используемых наночастиц золота. Селективное накопление наночастиц в опухолевой ткани резко повышает градиент температуры между опухолью и окружающими здоровыми тканями, что обеспечивает локальность нагрева опухоли. Это делает лазерное воздействие прицельным и снижает его негативное влияние на нормальные ткани. Поэтому селективное накопление наночастиц в опухолевой ткани открывает перспективу использования локальной лазерной гипертермии в онкологии.

В настоящей работе реализован синтез аурофильного производного бактериохлорофила *a* **44**, которое было ковалентно присоединено к НЧ золота, и изучены спектральные, фотофизические и биологические свойства полученного наноструктурированного ФС.

В качестве прекурсора нами был использован *N*-аминобактериопурпуринимид, выделяемый из пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter capsulatus* штамм В10, который обладает высокой стабильностью, поглощает в области 830 нм и, как показали эксперименты на животных, проявляет высокую фотоиндуцированную активность [191].

В работе получен материал **7м** на основе лиганда **44** (Рисунок 25), ковалентно иммобилизованного на НЧ золота, и изучены спектральные, фотофизические и биологические свойства полученного наноструктурированного ФС.

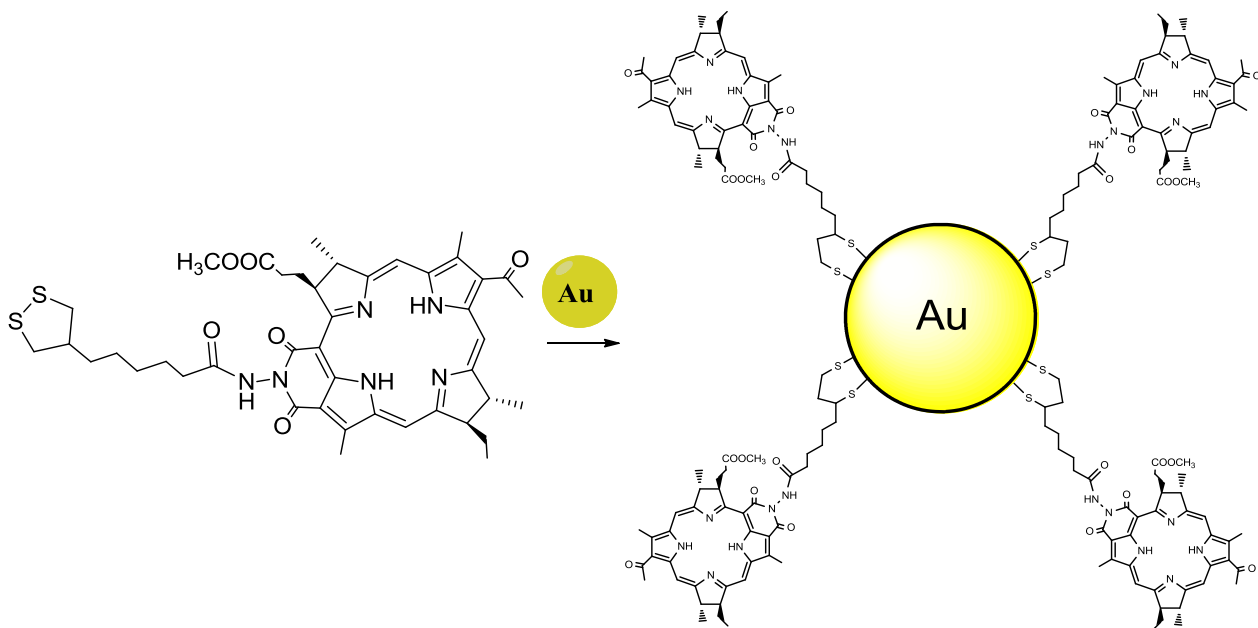


Рис. 25 Иммунизация лиганда **44** на поверхности наночастиц золота

Наличие полос  $Q_1$  (550 нм) и  $Q_2$  (824 нм) в электронном спектре поглощения суспензии подтвердило факт иммобилизации пигмента на НЧ золота, а характер сигналов свидетельствует о мономерной форме ФС. Сигнал НЧ Au в электронном спектре поглощения проявляется в виде «плеча» при 520 нм (см. спектр свободных НЧ золота, пунктир, Рисунок 26)

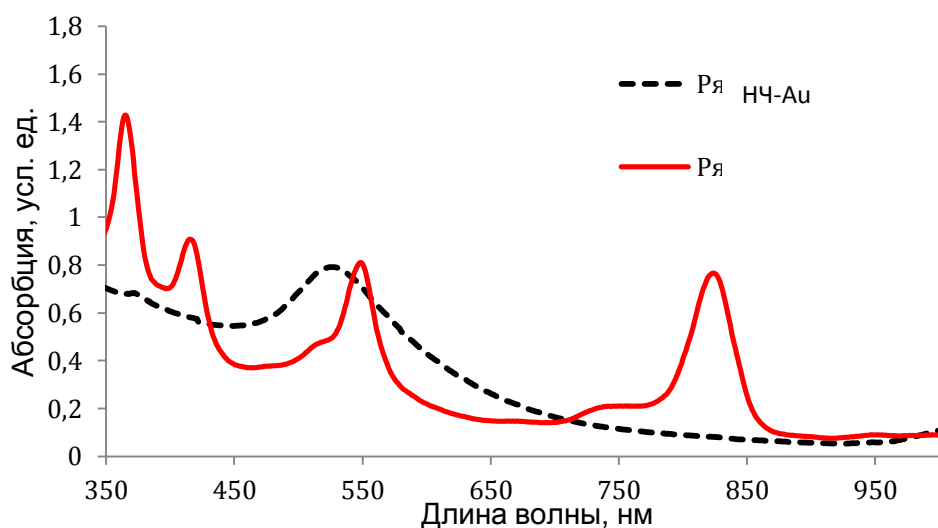


Рис. 26 Электронный спектр поглощения мицеллярной водно-кремоформной дисперсии наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Au

Собственная флуоресценция у производных бактериохлорофилла *a* делает возможным мониторинг накопления НЧ золота в опухоли. Облучение полученного в настоящей работе наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Au **7м** светом с длиной волны полосы  $Q_1$

приводит к интенсивной флуоресценции при 830 нм (Рисунок 27), что позволило нам изучить кинетику распределения в органах и тканях, а также накопление фотосенсибилизатора в опухоли.

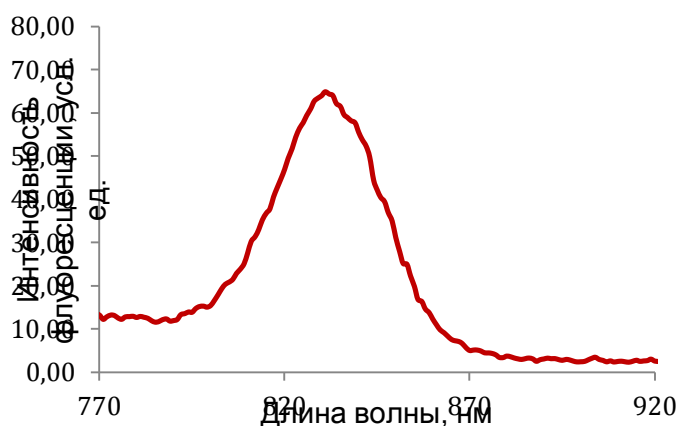


Рис. 27 Спектр флуоресценции мицеллярной водно-кремоформной дисперсии наноструктурированного фотосенсибилизатора ФС-Аu (возбуждение в полосу 540 нм).

Для проведения данного эксперимента использовались наночастицы золота **5нм**. Размеры НЧ с иммобилизованным бактериопурпуринимидом **7нм** были определены с использованием метода динамического светорассеяния (ДСР) (Рисунок 28), микрофотографии наночастиц получены с помощью ПЭМ (Рисунок 29).

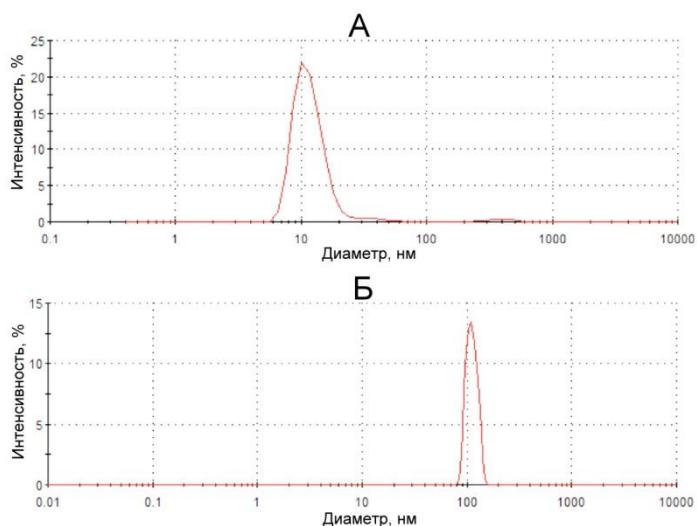


Рис. 28 Распределение по размерам (данные ДСР) немодифицированных наночастиц золота (А) и НЧ с иммобилизованным фотосенсибилизатором ФС-Аu (Б).

Согласно полученным данным, после иммобилизации ФС на наночастицах золота было зафиксировано значительное увеличение размера последних с 10-12 нм для свободных НЧ до

100-110 нм для ФС-Au. На микрофотографиях (Рисунок 29) также заметно увеличение диаметра НЧ после иммобилизации на них пигмента.

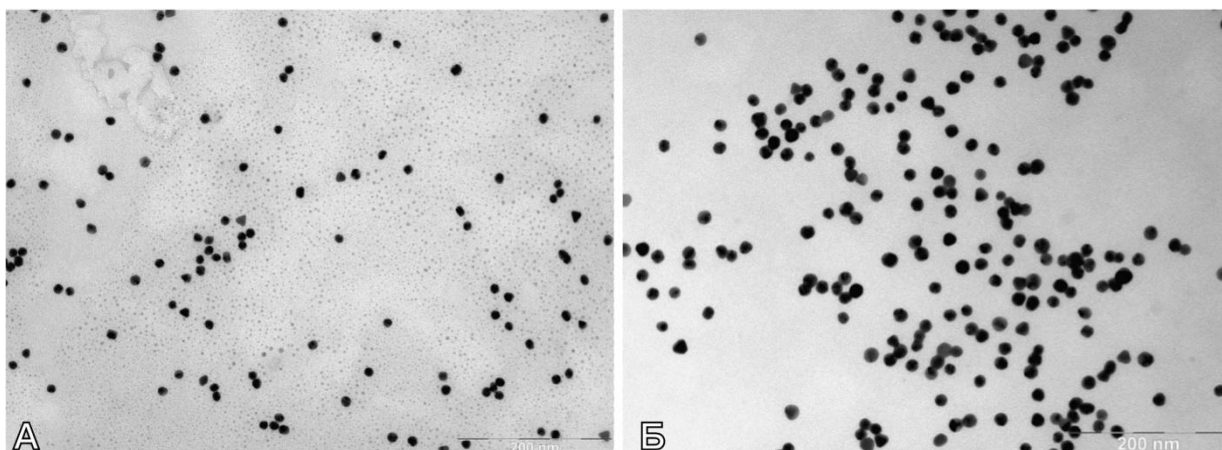


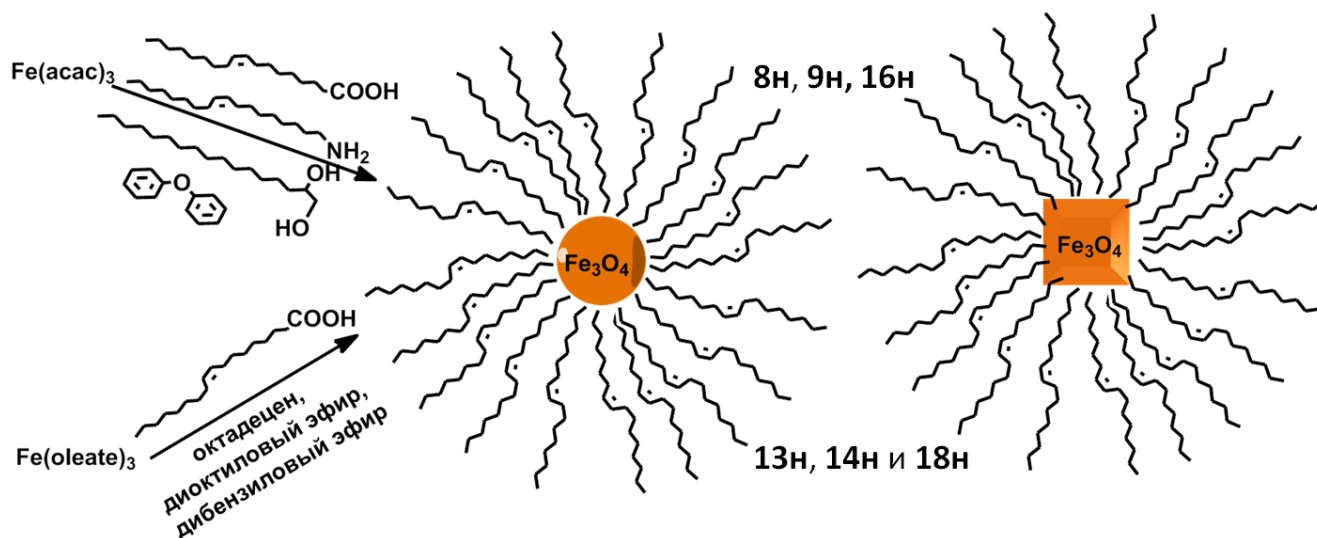
Рис. 29 Микрофотографии немодифицированных наночастиц золота (А) и НЧ с иммобилизованным фотосенсибилизатором ФС-Au (Б).

В ходе изучения свойств образца 7м показано, что иммобилизация ФС 44 на НЧ золота увеличивает время циркуляции наноструктурированного ФС в кровотоке и повышает его тропность к опухоли за счет неспецифического таргетинга, реализуемого путем экстравазации НЧ, нагруженных пигментом, из дефектных сосудов опухоли.

#### 2.2.4. Синтез наночастиц магнетита

Наночастицы магнетита с функционализированной поверхностью находят применение в различных отраслях биомедицины и фармакологии, таких, как контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [204], направленная доставка лекарств [1], гипертермия [137]. Основным методом диагностики опухолей является магнитно-резонансная томография (МРТ) с использованием контрастных агентов. Вследствие высокой удельной намагниченности и возможности функционализации поверхности магнитные наночастицы на основе  $Fe_3O_4$  являются перспективным материалом для разработки опухоль-селективных МРТ-контрастирующих агентов. Кроме того, типичные значения релаксивности для наночастиц оксида железа на порядок выше, чем соответствующие значения для используемых повсеместно в клинике контрастных агентов на основе хелатных комплексов гадолиния. В литературе имеется ряд работ [205,197], направленных на разработку подходов к синтезу бифункциональных материалов, так называемых тераностиков, сочетающих в себе диагностику и терапию. Один из методов придания заданных свойств наночастицам магнетита основан на покрытии их поверхности различными материалами, например полимерами, имеющими функциональные группы, для дальнейшей модификации поверхности.

В ходе настоящей работы были получены наночастицы магнетита различной формы и размера. Все известные методы синтеза таких НЧ могут быть разделены на два основных типа: получение в органической среде и синтез в водном растворе. Нами были использованы оба метода для получения широкого спектра НЧ магнетита (различные размеры – от 5 до 100 нм и форма – сферическая, кубическая и цилиндрическая). Образцы **8н**, **9н**, **13н**, **14н**, **16н** и **18н** были получены в органической среде согласно схеме



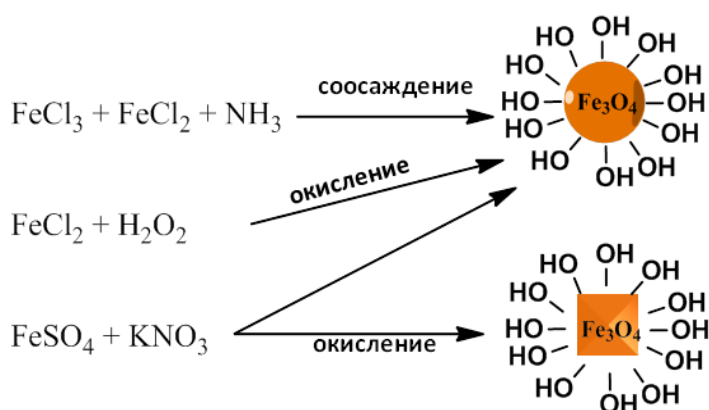
Форму и размер получаемых частиц определяли по данным ПЭМ (рис. 27). Морфология НЧ магнетита, полученных в органической среде, зависит от соотношения стабилизирующих реагентов – олеиновой кислоты и олеиламина и температуры проведения реакции (температуры кипения растворителей). Так, варьируя растворитель – диоктиловый эфир, дибензиловый эфир и октадецен, были получены в одинаковых условиях из олеата железа образцы **13н**, **14н** и **18н** соответственно. Рост температуры кипения (286, 298, 315°C) приводит к увеличению размера частиц. Также изменяется форма, в случае образца **18н** были получены НЧ кубической формы.

Образцы **8н** и **16н** были получены при варьировании соотношения стабилизирующих агентов. Методика получения наночастиц **9н** основана на зародышеобразовании. В качестве зародышей были выбраны частицы **8н** и далее рост частиц проводили в аналогичных условиях синтеза (олеиновая кислота, олеиламин, 1,2-гексадекандиол в дифениловом эфире).

Получение наночастиц в органических растворителях имеет свои преимущества: узкое распределение получаемых НЧ по размерам, их стабильность за счет углеводородной оболочки, но также и ряд недостатков, таких как сложность функционализации, и как следствие – перевода наночастиц в водную среду для изучения биохимических свойств.

Для сравнения была получена серия НЧ магнетита в водных растворах, согласно схеме:





Наночастицы различного размера не могут быть получены по одной универсальной методике, например, только соосаждением или только окислением. Согласно литературным данным [79], известен метод получения НЧ диаметром 9 нм с узким распределением по размерам путем соосаждения. По указанному методу был получен образец **10н**. Меняя условия соосаждения (используя более сильное основание) был получен образец **11н**, с НЧ диаметром 16 нм. Для получения частиц большего размера был выбран метод окисления. Так, были получены образцы сферической (**12н** и **15н**) и кубической формы (**17н**, **19н**, **20н**) (Рисунок 30). Используемые методики основаны на окислении солей железа (II), но отличаются по условиям проведения и реагентам. Однако, в обоих случаях при проведении реакций согласно литературной методике, результаты не воспроизводились. Частицы были получены, но с очень широким распределением по размерам и низкой стабильностью; поэтому потребовалась оптимизация синтеза.

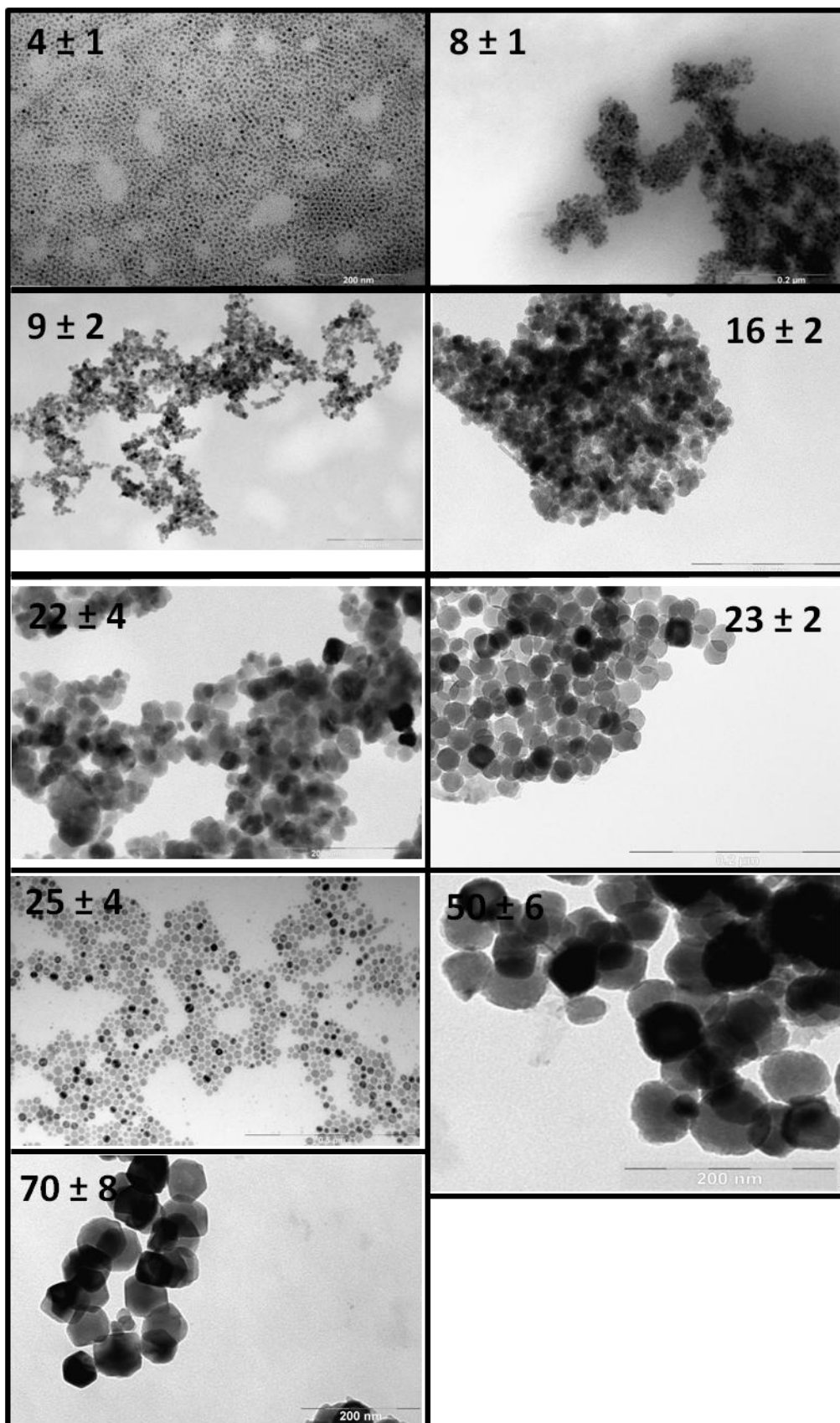


Рис. 30 Данные ПЭМ сферических наночастиц магнетита

В первом случае (частицы диаметром 22 нм – **12н**) изменение концентрации окислителя по сравнению с литературной методикой [217] позволило получить НЧ с необходимым узким размерным распределением. Для приготовления частиц размером  $22 \pm 4$  нм использовали методику [217], основанную на окислении сульфата железа (II) пероксидом водорода. Нами были оптимизированы условия проведения реакции; было обнаружено, что увеличение количества пероксида водорода приводит к получению образцов с большей монодисперсностью. При использовании концентрации перекиси водорода, указанной в литературе [217], были получены наночастицы магнетита с широким распределением по размерам от 10 до 40 нм, тогда как увеличение концентрации позволяет получить частицы размером  $22 \pm 4$  нм.

Для получения НЧ сферической формы большего диаметра, согласно [219], необходимо использование более мягкого окислителя и иных условий синтеза. Воспроизведение методики [219] привело к получению частиц несферической формы с размером от 10 до 60 нм, непригодных для использования в биологических экспериментах. Мы заменили пероксид водорода (окислитель) на нитрат калия, в результате чего были получены наночастицы двух типов: сферические размером  $50 \pm 6$  нм (**15н**) и кубические  $17 \pm 6$  нм (**17н**),  $29 \pm 4$  нм (**19н**),  $40 \pm 5$  нм (**20н**). Использование смеси сульфата железа(II) ( $2.5 \times 10^{-3}$  М) с нитратом калия в щелочной среде позволяет получать наночастицы сферической формы (средний размер  $50 \pm 6$  нм). Следует отметить, что, меняя концентрации реагентов, можно достичь контроля морфологии наночастиц. Использование более высокой концентрации сульфата железа(II) (от  $5 \times 10^{-3}$  М) в эксперименте с нитратом калия позволяет получить наночастицы магнетита кубической формы. Также было продемонстрировано, что увлечение (на несколько порядков) концентраций реагентов (соли железа и нитрата калия) в той же реакции позволяет получать стержни (образец **22н**).

Другой способ получения стержней размером  $50 \pm 2$  нм \*  $10 \pm 1$  нм (образец **21н**), заключается в получении комплекса  $Fe^{3+}$  с дофамином и дальнейшем частичном восстановлении гидразином:



Таким образом, были получены 15 образцов магнитных НЧ различной формы и размера (данные суммированы в Таблице 12).

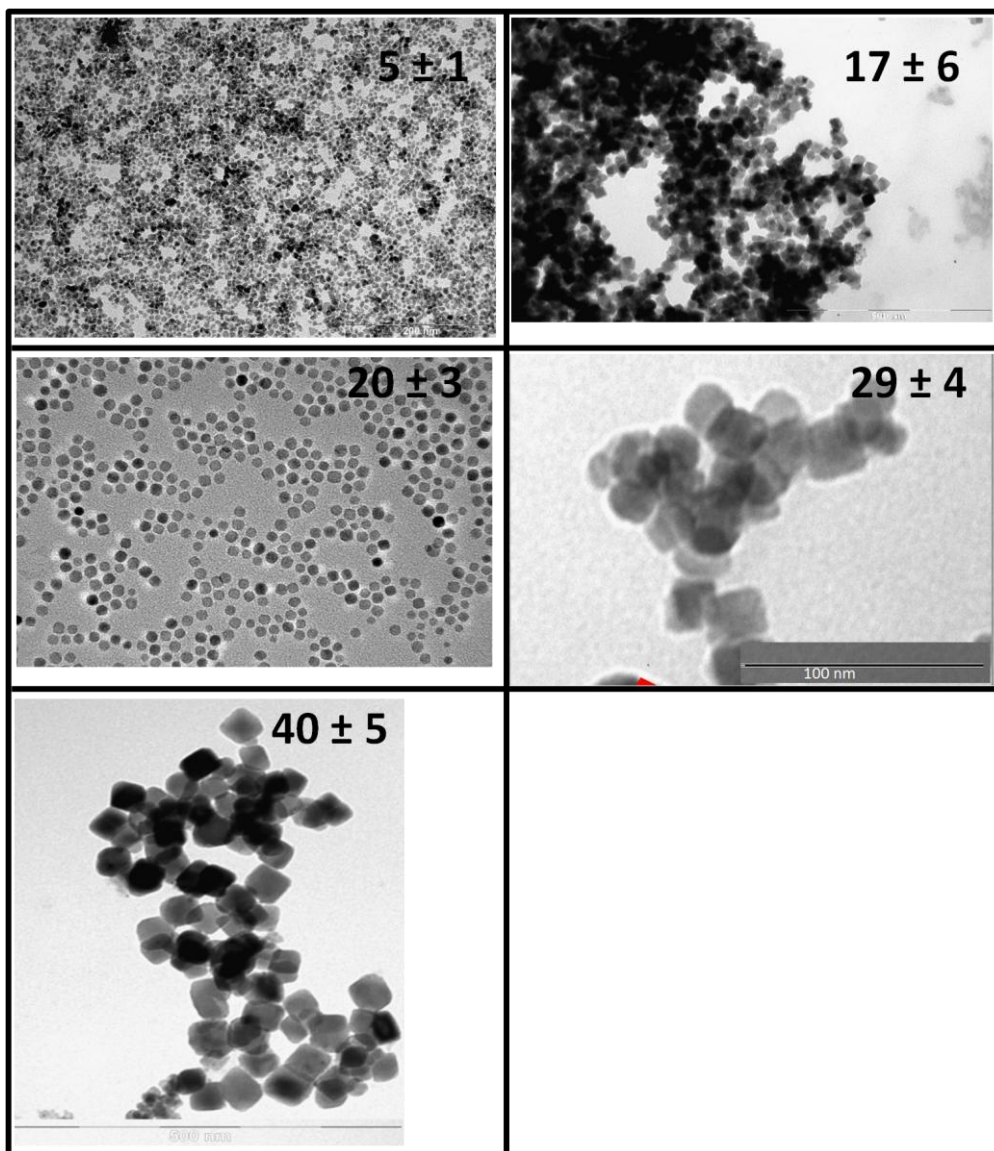


Рис. 31 Данные ПЭМ кубических наночастиц магнетита

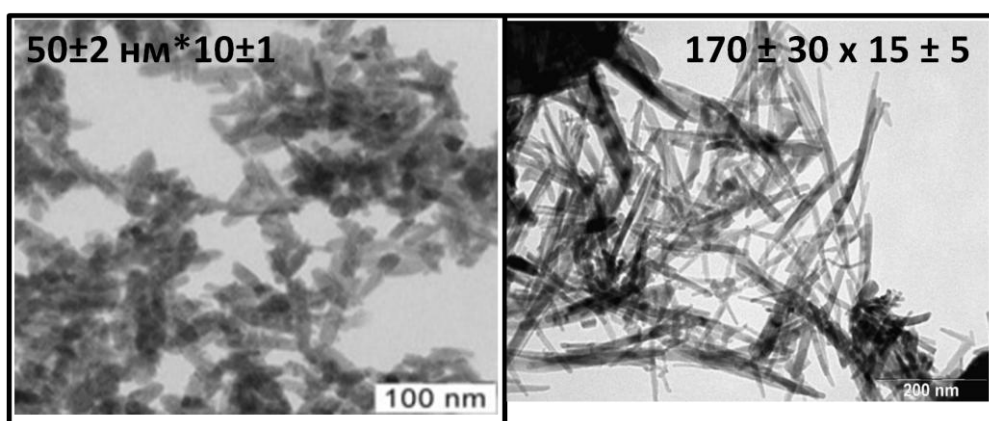


Рис. 32 Данные ПЭМ наночастиц магнетита (стержни)

Параметры гистерезиса при комнатной температуре для наночастиц различных форм и размеров приведены в Таблице 12. Ферромагнитные свойства наблюдались для всех образцов. В целом величины намагниченности изменяются от 50 до 80 Ам<sup>2</sup>/кг, а коэрцитивная сила

наночастиц увеличивается от 33 до 147 Э, что согласуется с результатами, полученными другими авторами [218], а также с выводами модели когерентного вращения вектора намагниченности Стонера–Вольфарта [206].

Таблица 12. Физико-химические исследования наночастиц магнетита

№	Диаметр, нм	Форма	Намагниченность, А <sup>2</sup> /кг	Коэрцитивная сила, Э	Фаза	ОКР, нм	Период решетки, нм
8н	4 ± 1	Сфера	69	40	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4 ± 1	0,8361(2)
9н	8 ± 1	Сфера	67	41	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4 ± 1	0,8374(2)
10н	9 ± 2	Сфера	63	33	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 1	0,8364(2)
11н	16 ± 2	Сфера	61	20	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 1	0,8368(2)
12н	22 ± 4	Сфера	55	35	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 1	0,8383(2)
13н	23 ± 2	Сфера	55	33	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4 ± 1	0,8363(2)
14н	25 ± 4	Сфера	53	25	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (73 %)	4 ± 1	0,8423(2)
					FeO (27 %)	9 ± 1	0,4262(2)
15н	50 ± 6	Сфера	80	147	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8 ± 1	0,8385(2)
16н	5 ± 1	Куб	74	40	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	5 ± 1	0,8380(2)
17н	17 ± 6	Куб	70	120	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	16 ± 2	0,8353(2)
18н	20 ± 3	Куб	64	117	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	21 ± 2	0,8353(2)
19н	29 ± 4	Куб	59	140	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	12 ± 1	0,8423(2)
20н	40 ± 5	Куб	58	107	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	38 ± 2	0,8367(2)
21н	50±2* 10±1	Стержни	36	-	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (30 %)	5 ± 1	0,8380(2)
					α-FeOOH (70 %)	20 ± 2	
22н	170±30 *15±5	Стержни	91	220	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (40 %)	61 ± 5	0,8393(2)
					α-FeOOH (60 %)	20 ± 2	

На Рисунке 33 представлены характерные петли гистерезиса для некоторых исследованных образцов. Основываясь на полученных и литературных данных, можно заметить, что намагниченность кубических наночастиц обладают более высокими значениями по сравнению со сферическими. Это связано с различным распределением магнитных моментов.

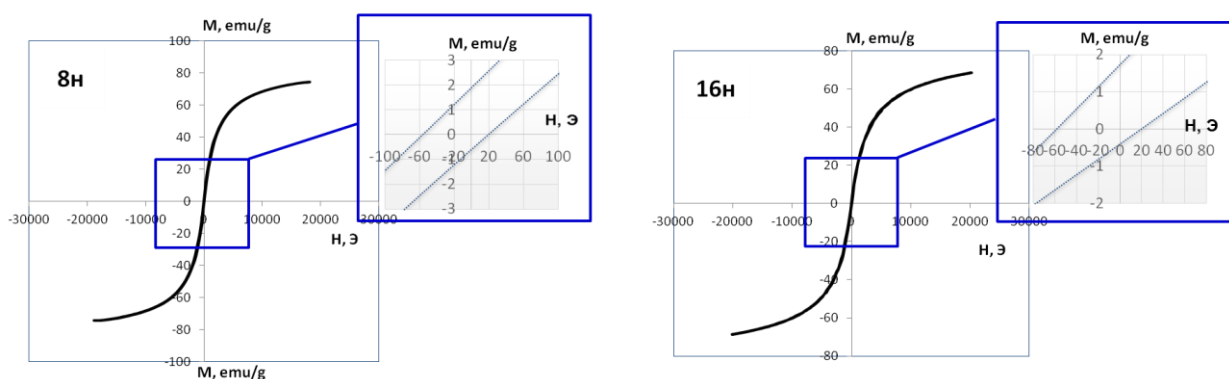


Рис. 33 Петли гистерезиса для образцов **8н** и **16н**

С целью определения кристаллической структуры и фазового состава исследуемых нанопорошков были проведены их рентгенофазовые исследования. На Рисунке 34 представлены характерные дифрактограммы для образцов **11н** и **14н** соответственно, а все данные сведены в Таблицу 12. Все образцы содержат фазу магнетита, а в образцах **14н** и **22н** качественный анализ выявил также вюстит и гютит соответственно.

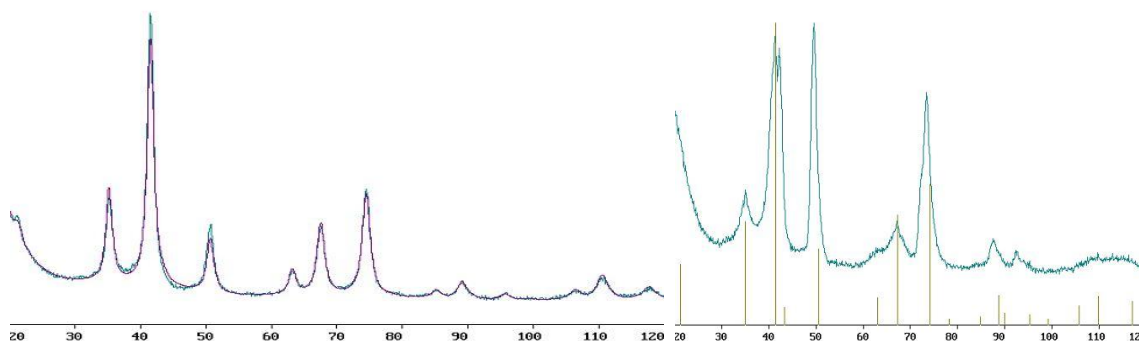


Рис. 34 Дифрактограмма наночастиц магнетита (образцы **11н** и **14н**)

Размер ОКР (Области когерентного рассеивания) измеряется экспериментально на основании данных дифракции рентгеновских лучей и используется для оценки размеров порошковых наноматериалах. Размер ОКР в этих случаях, обычно, отождествляется со средним размером частиц по ПЭМ изображению, хотя реальный размер ОКР в некоторых случаях меньше определенного по ПЭМ изображению, что говорит о том, что структура состоит из блоков, как в образцах **9н**, **11н**, **12н**, **13н**, **15н** и **19н**. Данные для образцов **14н**, **21н** и **22н** также показывают заниженный размер НЧ по сравнению с микроскопией, но это напрямую связано с фазовым составом, а именно, наличием фаз вюstitа (27 %) (**14н**) и гютита (60 %) (**21н** и **22н**). Также можно сделать предположение о том, что образец **14н** является структурой типа «ядро-оболочка», где сердечник магнетита покрыт оболочкой из вюstitа, и с учетом этого предположения размер частицы оказывается близок к среднему размеру по результатам ПЭМ.

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  обладают структурой типа шпинели, а их периоды решеток очень близки по своим значениям и равны 0,8397 нм и 0,8340 нм соответственно, поэтому их рентгеноструктурные спектры полностью совпадают и идентификация данных фаз невозможна. Для решения вопроса о наличии фаз магнетита и маггемита в образцах нанопорошков оксидов железа было проведено их исследование методом Мессбауэровской спектроскопии. Как известно из литературных данных, Мессбауэровские спектры на ядрах железа фаз магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и маггемита  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  существенно отличаются друг от друга, прежде всего, из-за того, что в первом оксиде присутствуют двухвалентные и трехвалентные ионы железа, а в маггемите – только трехвалентные.

На Рисунке 35 представлены Мессбауэровские спектры нанопорошков оксидов железа, полученных различными химическими методами.

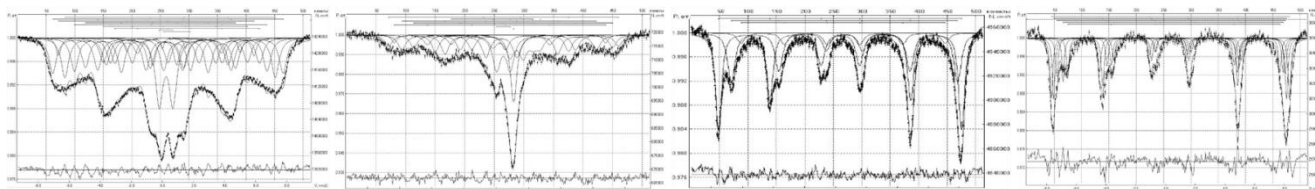


Рис. 35 Данные мессбауэровской спектроскопии (**11н**, **14н**, **17н**, **19н**)

Результаты Мессбауэровской спектроскопии подтвердили фазовый и количественный состав, полученный по рентгеновским данным. Образцы **11н**, **17н** и **19н** по фазовому составу полностью соответствуют магнетиту, что подтверждается расположением атомов железа 2+ и 3+ в октаэдрических и тетраэдрических позициях. Для образца **14н** подтверждено присутствие фазы магнетита и вюстита.

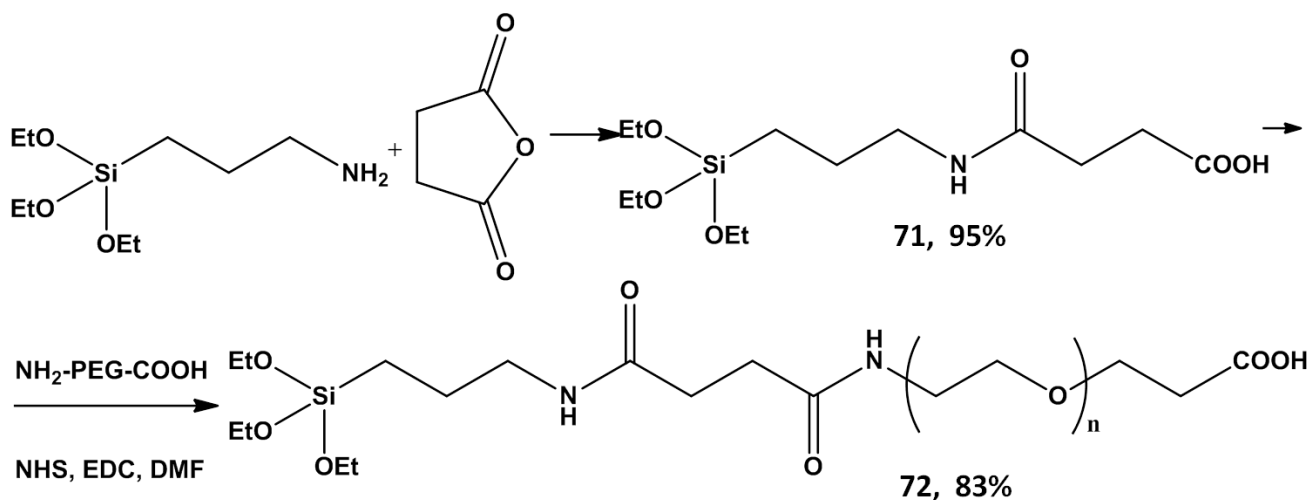
Проведенный анализ показал, что спектры нанопорошков оксидов железа, полученных различными химическими методами, соответствуют магнетиту нестехиометрического состава.

Мессбауэровская спектроскопия полностью подтвердила результаты рентгеноструктурного анализа. Также была выявлена зависимость структуры от размера частиц. Для частиц меньшего размера характерна более дефектная структура. По мере увеличения размера НЧ спектры становятся все более совершенными и приближаются к виду, характерному для массивного магнетита.

Поскольку использование образцов магнетита в биомедицине возможно только в форме водных суспензий, необходимо обеспечить их коллоидную стабильность, что достигается применением функционализированных водорастворимых полимерных стабилизаторов, способных к специфическому взаимодействию с поверхностью наночастиц, например, гетеробифункционального производного полиэтиленгликоля, содержащего триэтоксисилановую и карбоксильную группы.

Гидродинамический диаметр нефункционализированных наночастиц магнетита, диспергированных в воде, приведен в Таблице 13. Нефункционализированные наночастицы образуют агломераты со средним размером от 100 до 800 нм в зависимости от диаметра и формы ядра наночастиц.

Для синтеза бифункционального производного полиэтиленгликоля, содержащего триэтоксисилановую и карбоксильную группы, на первой стадии проводили реакцию между 3-аминопропилтриэтоксисиланом и янтарным ангидридом в сухом диоксане [207], в результате было получено соединение **71**:



На второй стадии бифункциональный полиэтиленгликоль, содержащий amino- и карбоксигруппы, с молекулярной массой 2500 г/моль, реагировал с соединением **71**, предварительно активированным N-гидроксисукцинимидом в присутствии N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида, в сухом метаноле с образованием соединения **72** (бифункционального производного полиэтиленгликоля, содержащего триэтоксисилановую и карбоксильную группы). Для модификации наночастиц бифункциональным производным полиэтиленгликоля, содержащего триэтоксисилановую и карбоксильную группы, магнитные НЧ диспергировали в растворе соединения **2** в этаноле при перемешивании. Данная методика не использовалась в литературе ранее для получения стабильных наночастиц магнетита; ранее было показано, что использование ковалентного покрытия полиэтиленгликолем позволяет получать стабильные коллоидные системы для НЧ диаметром до 50 нм.

Использование гетеробифункционального производного полиэтиленгликоля решает проблему коллоидной стабильности наночастиц магнетита. Так, по данным метода динамического светорассеивания (ДСР), гидродинамический размер частиц, функционализированных лигандом **72** (по схеме ниже), значительно уменьшается по сравнению с размером немодифицированных наночастиц. Была показана стабильность образующейся



дисперсии в течение, как минимум, суток. Например, сферы размером  $50 \pm 6$  нм без покрытия обладали диаметром 251 нм (согласно данным ДСР), а диаметр соответствующих сфер после функционализации снизился до 76 нм.

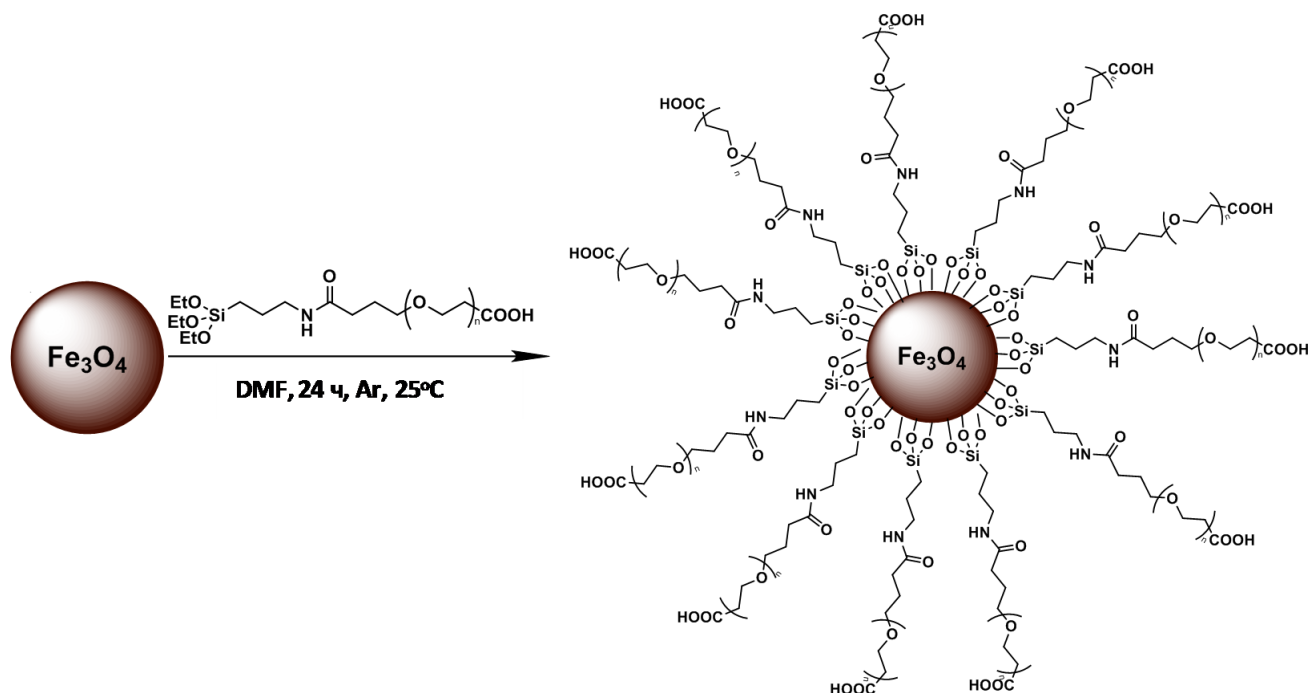


Таблица 13. Данные ДСР и измерения релаксивности

№	Диаметр (ПЭМ), нм	Диаметр (ДСР) (НЧ без покрытия), нм	Диаметр (ДСР) (НЧ с покрытием ПЭГ), нм	Релаксивность, T2, 1/ммоль/с
10н	$9 \pm 2$	231	36	109
12н	$22 \pm 4$	475	54	140
20н	$40 \pm 5$	689	92	130
15н	$50 \pm 6$	251	76	189

С использованием метода МРТ была продемонстрирована потенциальная возможность использования полученных наночастиц магнетита в качестве T2-контрастных агентов. Релаксивности НЧ магнетита (образцы 10н, 12н, 20н и 15н, покрытые гетеробифункциональным производным полиэтиленгликоля), представлены в Таблице 13. При сопоставлении коммерчески доступного клинического T2-контрастного агента для визуализации печени с синтезированными в настоящей работе материалами, можно сделать вывод, что НЧ, покрытые гетеробифункциональным производным полиэтиленгликоля, являются высокоэффективными T2-контрастными агентами, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных материалов для визуализации опухоли.

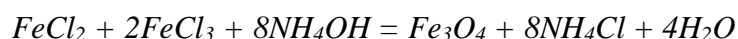
### 2.2.5. Синтез наночастиц магнетит-золото

В отсутствие защитной оболочки наночастицы магнетита являются нестабильными и токсичными в физиологических условиях, а также сложными для функционализации [64,65]. Чтобы устранить эти недостатки, мы покрыли поверхность НЧ магнетита золотом, которое обеспечивает их стабильность, снижает до минимума токсичность частиц, а также образует прочные ковалентные связи с серосодержащими лигандами, что обеспечивает простоту модификации поверхности [9,128].

На текущий момент существует большое число работ, посвященных покрытию магнитных НЧ золотой оболочкой [208]; тем не менее, проблема оптимизации методики синтеза таких частиц остается актуальной из-за большой разницы в природе поверхностей магнетита и золота и, как следствие, необходимости стадии очистки. Кроме того, лишь в единичных работах приводится комплексная характеристика свойств наночастиц магнетит-золото, в то время как физико-химические свойства препарата, претендующего на биомедицинское применение, должны быть полностью изучены. В связи с этим, основными задачами исследования стали разработка и оптимизация методик получения и очистки наночастиц магнетит-золото типа «ядро-оболочка», проведение комплексного физико-химического исследования наночастиц магнетит-золото с последующей демонстрацией возможного применения в биомедицине.

#### 2.2.5.1. Синтез и очистка наночастиц $Fe_3O_4@Au$

Получение наночастиц типа «ядро-оболочка» проводилось в три последовательные стадии: синтез ядра – наночастицы магнетита, покрытие оболочкой золота и очистка конечных НЧ. На первом этапе синтеза методом соосаждения солей железа раствором аммиака были получены наночастицы  $Fe_3O_4$  по реакции:



Данное уравнение является суммарным; в действительности процесс проходит через стадию образования ферригидрита  $(Fe^{3+})_2O_3 \cdot 0.5H_2O$ , в который встраиваются ионы  $Fe^{2+}$  (Рисунок 36) [79]; таким образом, продуктом реакции является магнетит.

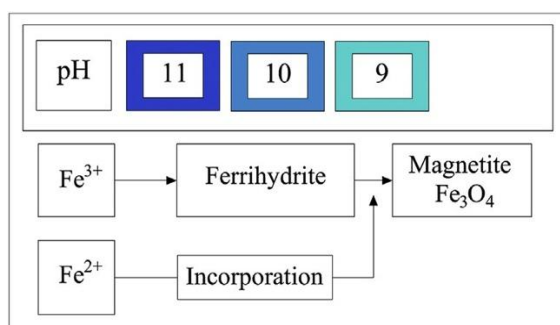


Рис. 36 Схема получения наночастиц магнетита

В ходе синтеза мы варьировали среду, которой магнетит промывали перед покрытием оболочкой: в одном случае использовалась деионизованная  $H_2O$ , в другом – 2М  $HClO_4$ . В работе [83] было высказано предположение, что покрытие золотом происходит более эффективно при частичном или полном окислении магнетита до маггемита  $\gamma-Fe_2O_3$ ; затем данное предположение было подтверждено экспериментально. Для этого авторы работы предварительно выдерживали магнетит на воздухе в течение недели до покрытия оболочкой, либо вводили дополнительную стадию нагревания магнетита в кислой среде. Однако из литературы [209] известно, что хлорная кислота способна селективно переводить в раствор ионы  $Fe^{2+}$  на поверхности наночастиц  $Fe_3O_4$ . Это может служить более удобной альтернативой окислению магнетита кислородом воздуха, так как в процессе последнего теряется коллоидная стабильность наночастиц. Обработка раствором сильной кислоты позволяет стабилизировать наночастицы магнетита в растворе за счет электростатического взаимодействия.

По данным ПЭМ диаметр НЧ магнетита не изменяется при обработке хлорной кислотой и составляет  $9\pm 2$  нм как до, так и после промывки кислотой (Рисунок 37):

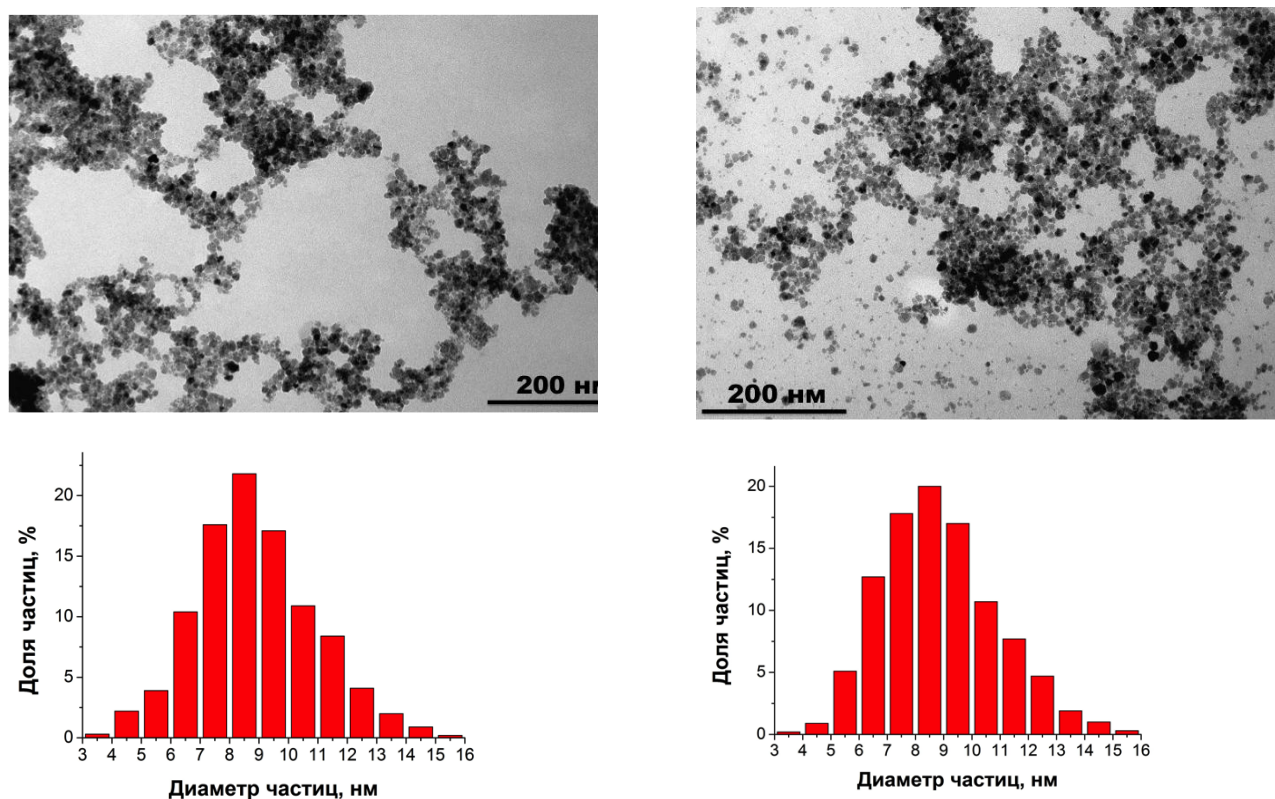


Рис. 37 Данные ПЭМ наночастиц магнетита (до и после промывки кислотой)

Следующим этапом синтеза являлось покрытие магнетита золотой оболочкой. Были использованы оптимизированные литературные методики [83, 133] (в исходных методиках

отсутствовали стадии очистки и модификации поверхности наночастиц). Для покрытия магнетита золотом использовался метод восстановления золотохлористоводородной кислоты при кипячении цитратом натрия (рис. 38).

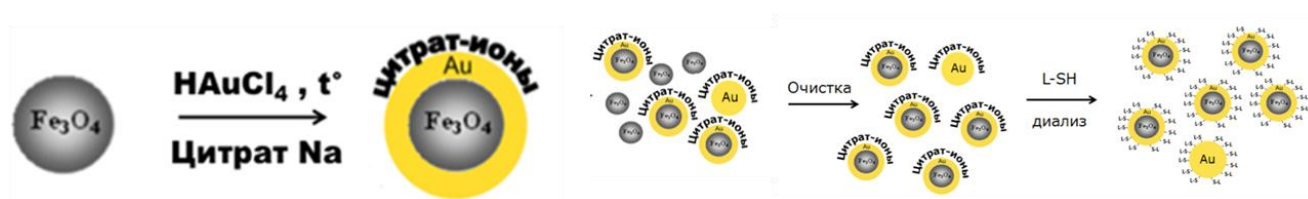


Рис. 38 Схема синтеза и очистки наночастиц магнетит-золото

Преимуществом данной методики является простота и удобство проведения (нет необходимости использования высоких температур и давлений), возможность регулирования толщины золотой оболочки за счет изменения концентрации реагентов, а также отсутствие органической фазы (весь синтез проводится в водном растворе), что существенно упрощает процедуры модификации, очистки и исследования НЧ.

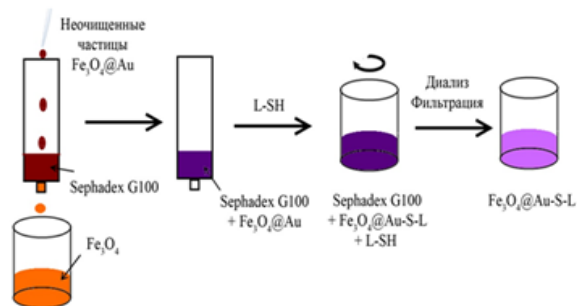
В ходе работы было получено 2 образца: **23н** ( $19,6 \pm 6,8$  нм) и **24н** ( $22,6 \pm 3,2$  нм) (на основе магнетита промытого водой и 2М  $\text{HClO}_4$  соответственно). Было обнаружено, что выбор среды ( $\text{H}_2\text{O}/\text{HClO}_4$ ) для промывки магнетита оказывает существенное влияние на размер, морфологию и состав частиц, которые образуются в результате покрытия магнетита золотой оболочкой.

В действительности в ходе покрытия оболочкой получается смесь наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $Au$ . Поэтому следующим этапом является очистка наночастиц и их стабилизация органическими лигандами (Рисунок 38). Следует отметить, что во многих работах исследуются неочищенные наночастицы, что влияет на результаты изучения магнитных свойств, измерения токсичности и т.д. В рамках данной работы было предложено и оптимизировано два метода очистки – хроматография на различных сорбентах Sephadex G10/G50/G100 и центрифугирование.

Первым способом очистки наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  от не покрытых наночастиц магнетита является хроматография на Sephadex. Метод хроматографической очистки подобных НЧ был предложен и разработан нами впервые. По механизму разделения компонентов данный вид хроматографии можно отнести к смешанному типу (афинно-эксклюзионная). Основой метода является использование различного удерживания  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  на хроматографическом сорбенте вследствие разницы в свойствах поверхности. Не покрытые золотом наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в растворе образуют кластеры и в процессе хроматографии проходят в свободном объеме. Следовательно, по способу очистки от магнетита хроматография является эксклюзионной. В

свою очередь, наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  сорбируются на носителе (Sephadex G10/50/100) за счет взаимодействия цитрат-ионов на поверхности частиц с сахарами, входящими в состав носителя. Поэтому хроматография также можно отнести к аффинной. Принципиальная схема процесса представлена на Рисунке 39.

### Хроматографическое разделение



### Центрифугирование



Рис. 39 Подходы к очистке наночастиц магнетит-золото

Было обнаружено, что при использовании носителя Sephadex G10 в свободном объеме выходили все частицы, содержащиеся в растворе. Оптимальным среди носителей оказался Sephadex G50, после очистки на котором на микрофотографиях полученных НЧ не было обнаружено наночастиц магнетита (Рисунок 40):

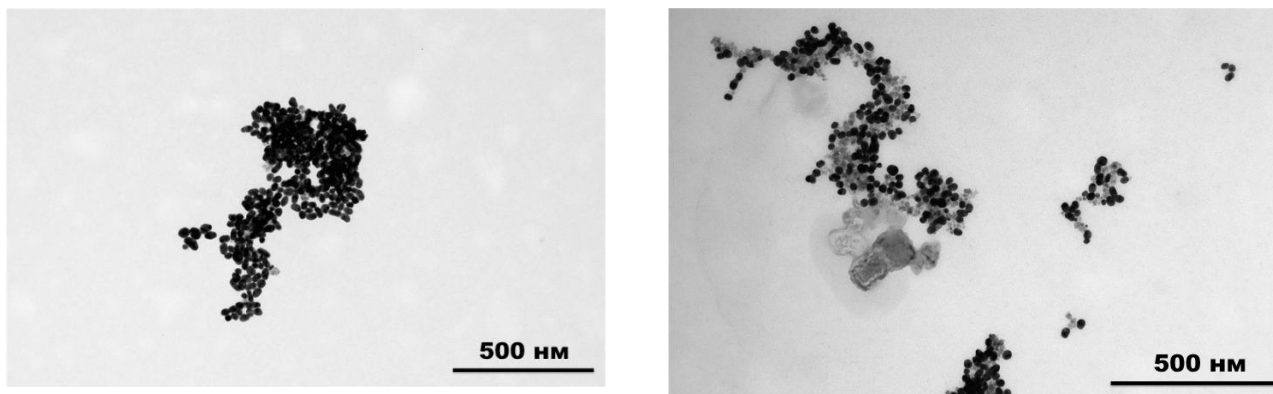


Рис. 40 Очистка наночастиц на сорбенте Sephadex G50 и G100

Несмотря на высокую эффективность очистки наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  при помощи хроматографии на Sephadex G50, этот метод обладает существенным недостатком. Для того, чтобы нарушить прочное связывание наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  с носителем и перевести их в состояние коллоидно-стабильное состояние, необходимо использовать раствор серосодержащего лиганда; следовательно, проведение очистки невозможно без последующей за ней стадии функционализации. На практике это приводит к разбавлению раствора наночастиц более чем в два-три раза по сравнению с исходной концентрацией.

Для того, чтобы избежать процесса разбавления (снижения концентрации), а также для упрощения метода очистки был предложен второй подход – центрифугирование. В литературе данный метод описан в единственной публикации [87], но для другого типа частиц. В настоящей работе был оптимизирован данный метод очистки для конкретных материалов  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ . Суть процесса заключается в подборе скоростей, при которых более крупные и тяжелые наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  выпадают в осадок, в то время как более легкие частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  остаются в надосадочной жидкости. Это более простой способ очистки по сравнению с хроматографией; он также позволяет отделить стадию очистки от стадии функционализации и достичь больших концентраций наночастиц в растворе. Схема процесса представлена на Рисунке 39.

Следует отметить, что метод очистки наночастиц при помощи центрифугирования также позволяет концентрировать частицы без потери коллоидной стабильности (при условии подбора скоростей и соответствующего времени). В работе были подобраны оптимальные условия центрифугирования; в осадке при этом преимущественно содержались наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (Рисунок 41, слева), в надосадочной жидкости – наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Рисунок 41, справа).

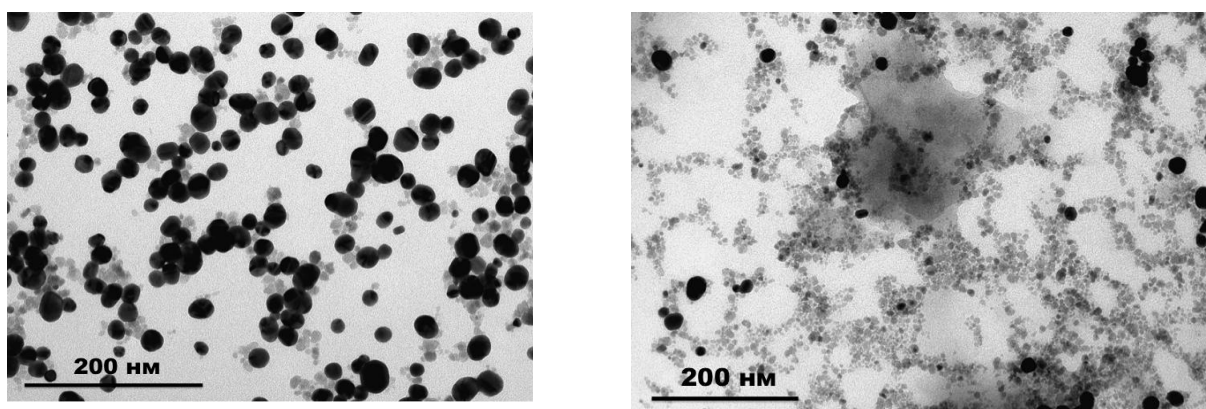


Рис. 41 Данные ПЭМ после очистки методом центрифугирования

Оценка степени очистки наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  проводилась рядом методов, как качественных, так и количественных. Для качественного описания использовались методы ПЭМ, электронной спектроскопии а для количественного - метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС).

На Рисунке 42 представлены спектры наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (образец **24н**) до и после стадии очистки и стабилизации SH-PEG-COOH на Sephadex (слева), до и после стадии очистки при помощи центрифугирования (справа).

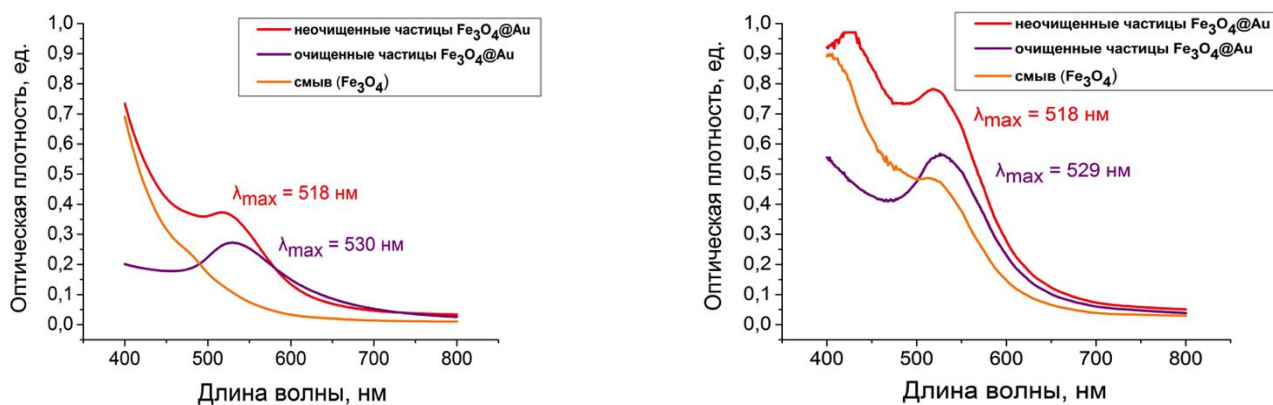


Рис. 42 Данные спектроскопии в видимой области

По данным электронной спектроскопии, в надосадочной жидкости содержится также некоторое количество золотых частиц (Рисунок 42, справа); это могут быть наночастицы золота, не содержащие магнитного ядра. На спектре очищенных частиц в обоих случаях присутствует пик плазмонного резонанса (529 нм).

Методом ИСП-МС определяли концентрацию железа и золота в коллоидных растворах НЧ до и после их очистки при помощи центрифугирования (предварительно растворив соответствующие аликвоты в царской водке), а также после промывки раствором HCl. Кроме того, было определено массовое соотношение железа и золота, из которого рассчитывали массовое соотношение магнетита и золота (долю магнетита в массе всей частицы) (Таблица 14). После центрифугирования массовое соотношение Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au в осадке уменьшается и приближается к рассчитанным теоретическим значениям (см. п. 4.1.2.), что свидетельствует об увеличении доли наночастиц, покрытых золотой оболочкой. Из этих данных можно также сделать вывод о средней толщине золотой оболочки.

Таблица 14. Концентрации элементов и их соотношение для наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au, определенные по данным ICP MS

Образец	Состояние очистки	c (Fe), мг/л	c(Au), мг/л	m(Fe)/m(Au)	m(Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )/m(Au)	m(Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )/m (частицы)
Образец 23н	до центрифугирования	232,75	170,50	1,365	1,885	0,653
	после центрифугирования	139,40	119,00	1,171	1,618	0,618
	после обработки HCl	8,62	117,32	0,077	0,106	0,096
Образец 24н	до центрифугирования	218,00	167,50	1,301	1,797	0,643
	после центрифугирования	24,30	147,40	0,165	0,228	0,185
	после обработки HCl	9,00	148,41	0,060	0,083	0,076

Таким образом, разделение наночастиц при помощи центрифугирования сопоставимо по эффективности с хроматографированием на Sephadex G50. Вследствие возможности эффективного отделения непокрытого магнетита при помощи центрифугирования, в дальнейшем использовали именно этот способ очистки.

Было обнаружено, что выбор среды ( $H_2O/HClO_4$ ) для обработки магнетита оказывает существенное влияние на размер, морфологию и состав частиц, которые были получены при покрытии магнетита золотой оболочкой. Если магнетит промывали кислотой размер частиц увеличивается, а соответственно и толщина оболочки, но эффективность покрытия возрастает, что является более важным фактором. На Рисунке 43 представлены ПЭМ-микрофотографии наночастиц после покрытия золотой оболочкой при разной подготовке магнетита к покрытию. Образцы, полученные на основе магнетита, промытого водой, имеют более широкое распределение по размерам. Кроме того, при одинаковых условиях очистки образец 23н содержит большое количество непокрытого магнетита. Таким образом было получено 2 образца: **23н** ( $19,6\pm 6,8$  нм) и **24н** ( $22,6\pm 3,2$  нм) (на основе магнетита промытого водой и 2М  $HClO_4$  соответственно) с толщиной оболочки  $5\pm 3$  нм и  $7\pm 2$  нм соответственно.

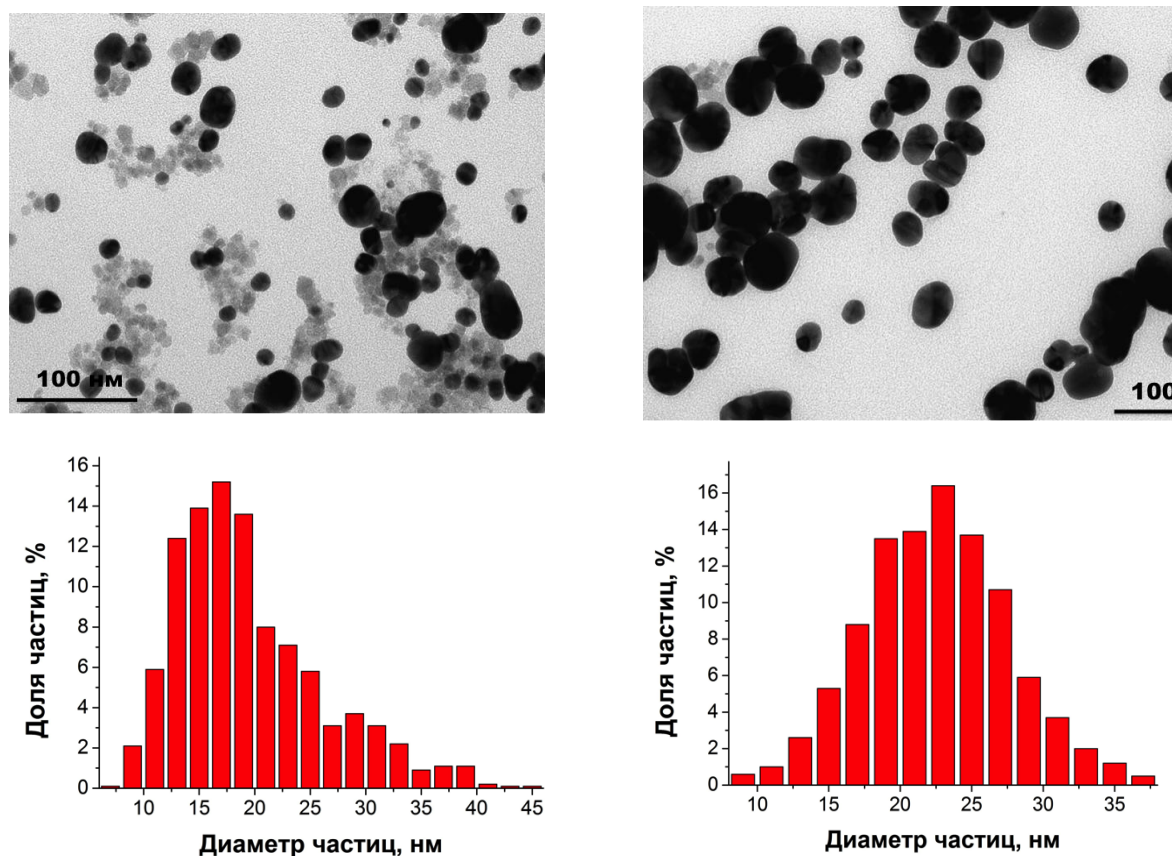


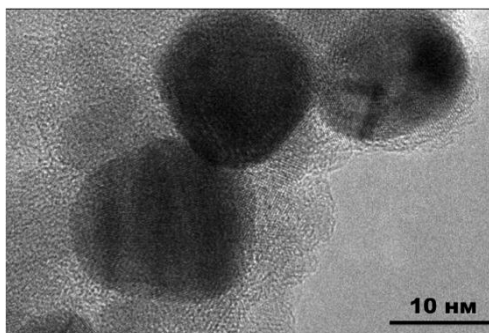
Рис. 43 Микрофотографии и распределение по размеру частиц  $Fe_3O_4@Au$ , очищенных при помощи центрифугирования : образец 23н (слева), образец 24н (справа)

### 2.2.5.2. Доказательство структуры наночастиц $Fe_3O_4@Au$ типа «ядро-оболочка»

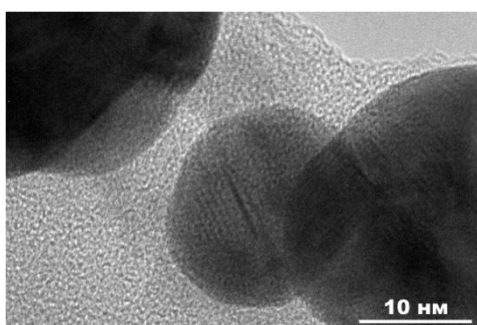
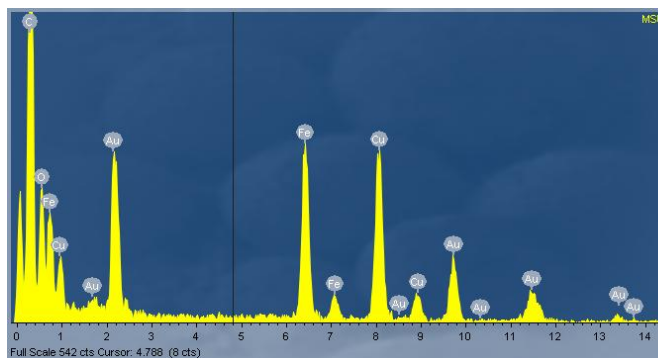
Прямым методом доказательства структуры «ядро-оболочка» служат результаты энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС), снятой в ходе анализа методом ПЭМ (Рисунок 44).



Оба образца наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ , полученные в данной работе и очищенные при помощи центрифугирования, были исследованы методом ПЭМ высокого разрешения, с областей указанных на микрофотографиях –(Рисунок 44) был снят ЭДРС–спектр.



Образец 1



Образец 2

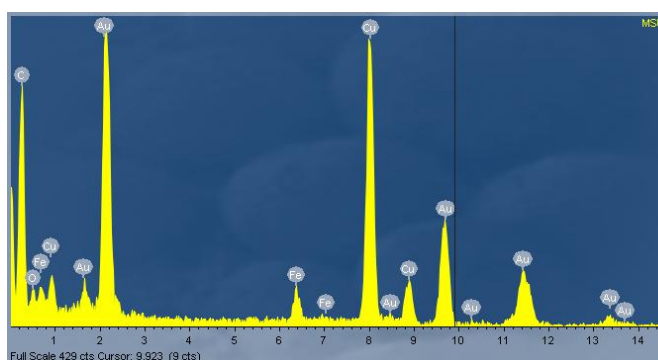


Рис. 44 ПЭМ-микрофотографии высокого разрешения и ЭДРС -спектры наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$

Кроме того, для образца **24н**, очищенного при помощи хроматографии на Sephadex, были получены карты распределения элементов на изображении (Рисунок 45), для Fe по K-линиям (7,1 кэВ), для Au – по M-линиям (2,7 кэВ).

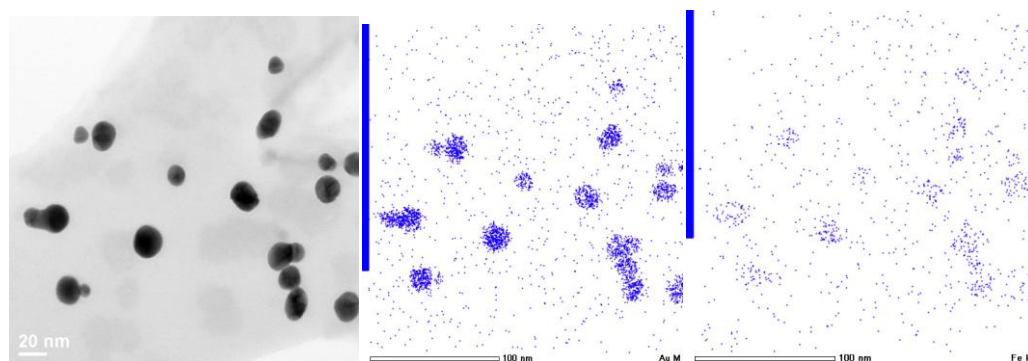


Рис. 45 ПЭМ-микрофотография наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  (слева), ЭДРС -карта

Можно видеть, что на микрофотографиях данных образцов отсутствуют отдельные наночастицы магнетита, в то время как в спектре одновременно присутствуют линии железа и линии золота. На микрофотографии образца **23н** видны непокрытые наночастицы магнетита;

этим объясняется высокая интенсивность пика железа, сопоставимая с интенсивностью пика золота. Из карт распределения золота и железа видно, что оба этих элемента располагаются в тех же местах, что и наночастицы, то есть наночастицы содержат одновременно и золото и железо. Данный факт говорит в пользу формирования структуры типа «ядро-оболочка».

В качестве контрольного эксперимента были синтезированы золотые наночастицы при условиях, аналогичных покрытию магнетита золотой оболочкой, добавляя вместо последнего воду. В результате были получены наночастицы Au диаметром  $13,8 \pm 1,3$  нм (Рисунок 46) с пиком плазмонного резонанса на 518 нм.

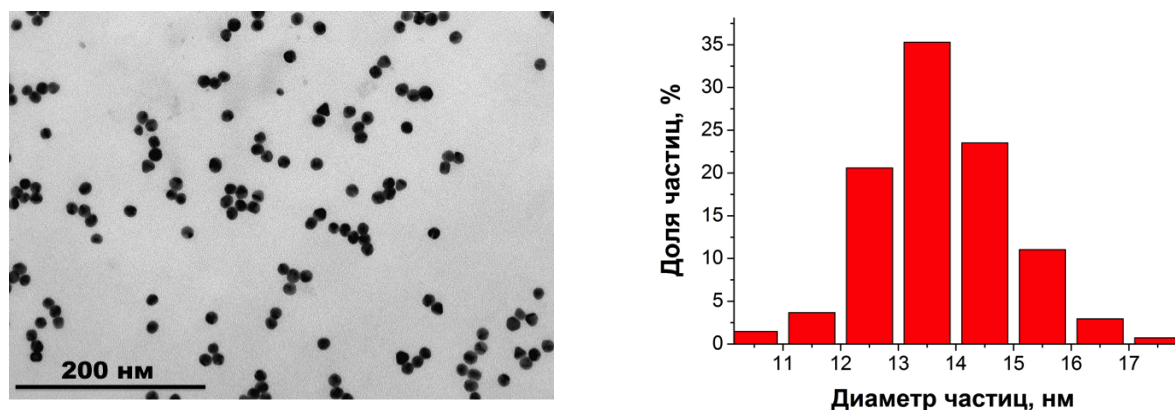


Рис. 46 ПЭМ-микрофотография наночастиц Au, полученных методом восстановления цитратом натрия (слева); распределение наночастиц Au по размерам(справа)

Полученный результат свидетельствует в пользу того, что для образования стабильных коллоидных растворов наночастиц магнетит-золото в воде диаметром более 15 нм необходимо селективное зародышеобразование золота на поверхности наночастиц магнетита. Поскольку при равномерной адсорбции  $\text{Au}^{3+}$ -ионов поверхностью магнетита и доступе электронов от растворителя (в данном случае, воды) образуется множество центров нуклеации золота, преимущественно формируется структура с ядром магнетита и золотой оболочкой, а не гантелевидная (Рисунок 47).

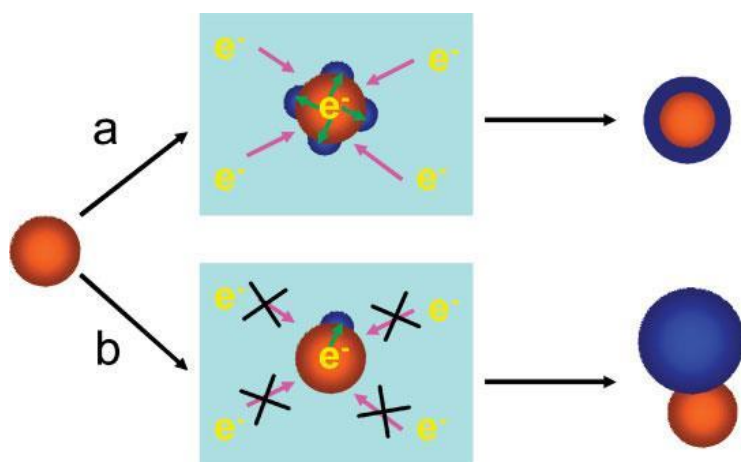


Рис. 47 Схема, поясняющая механизм образования структуры «ядро-оболочка» в полярных растворителях (а) и гантелевидной структуры в неполярных (б)

Еще одним косвенным подтверждением структуры «ядро-оболочка» служат результаты ИСП-МС для образцов, обработанных раствором соляной кислоты, которая растворяет непокрытые наночастицы магнетита (Таблица 15). Значения массового соотношения  $Fe_3O_4/Au$ , полученные в этом эксперименте, сравнивались с теоретическими, рассчитанными на основе данных ПЭМ по формуле в предположении идеальных сферических частиц со структурой «ядро-оболочка»:

$$\omega_{Fe_3O_4(\text{ядро})} = \frac{V_{Fe_3O_4(\text{ядро})} \times \rho_{Fe_3O_4(\text{ядро})}}{(V_{\text{частицы}} - V_{Fe_3O_4(\text{ядро})}) \times \rho_{Au} + V_{Fe_3O_4(\text{ядро})} \times \rho_{Fe_3O_4(\text{ядро})}}$$

Таблица 15. Сравнение массовой доли магнетита, рассчитанной по данным ICP MS с теоретическими значениями

Маркировка образца	Средний диаметр частиц, нм	$m(Fe_3O_4)/m(\text{частицы})$ , по данным ICP MS	$m(Fe_3O_4)/m(\text{частицы})$ , теоретическое значение
Образец 23н	20	0,096	0,025
Образец 24н	23	0,076	0,016

Отличие экспериментальных и расчетных данных для образцов **23н** и **24н** (большее, по сравнению с теоретическим, содержание магнетита) может быть объяснено наличием более чем одной магнитной наночастицы в ядре под золотой оболочкой, а также отличием формы частиц от идеальной сферической. Наличие магнетита после обработки соляной кислотой свидетельствует о присутствии в составе образцов наночастиц со структурой «ядро-оболочка».

### 2.2.5.3. Анализ порошков наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au

Для проведения исследований методами рентгенофазового анализа, Мёссбауэровской спектроскопии, изучения магнитных свойств, образцы были упарены на роторном испарителе до состояния порошка.

С целью определения параметров кристаллической структуры образцов проводились исследования методом порошковой рентгеновской дифракции. Определяли параметры решетки, объемную долю фаз Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и Au, размер кристаллитов (таблица 16).

Таблица 16. Результаты рентгеноструктурного анализа образцов и магнитных измерений

Образец	Объемная доля, ±1 %		Размер кристаллитов, нм		Период решетки, ±0,0005 нм		Ms, э.м.е./г	Hс, Э
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Au	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Au	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Au		
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	100,0	0	8±1	-	0,8368	-	61	38
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au (23н)	83,20	16,8	11±2	13±2	-	0,4077	59	38
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (HClO <sub>4</sub> )	100,0	0	8±1	-	0,8362	-	61	35
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au (24н)	0	100,0	-	14±2	-	0,4078	61	39

В ходе рентгенофазового анализа было обнаружено, что до покрытия оболочкой НЧ обладают кристаллической структурой магнетита с периодом решетки 0,8362 – 0,8368 нм. Это является промежуточной величиной между параметрами решетки  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,835 нм) и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (0,839 нм), которые обладают схожими структурными характеристиками [210]. Частичное окисление Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> до  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> практически не приводит к изменению структуры и, следовательно, изменению межплоскостных расстояний. Существенно более важным является отсутствие в образце практически немагнитного оксида  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, структура которого сильно отличается от структур Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и может быть легко идентифицирована с помощью методов дифракции. При обработке данных рентгенограмм в образцах магнетита были вычислены размеры кристаллитов; они совпадают с диаметром частиц, полученным по данным ПЭМ, что говорит о монокристалличности магнитного ядра. На рентгенограмме наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au (24н) отсутствовали пики магнетита. Эти результаты согласуются с данными статей [84, 87], в которых говорится об «эффекте тяжелых атомов» золота, а именно большем коэффициенте поглощения рентгеновского излучения золотом по сравнению с магнетитом. Также отсутствие пиков магнетита на рентгенограмме связано с толщиной золотой оболочки более 5 нм. Для образца 23н была получена смесь фаз магнетита и золота, что согласуется с данными ПЭМ (наличие большого числа не покрытых наночастиц магнетита). По данным рентгенограмм вычисляли также размер кристаллитов золота, которые составляют 13-15 нм. В совокупности с данными ПЭМ можно сделать вывод о соответствующей толщине золота/золотой оболочки в

образцах (средним диаметром 20 нм и 23 нм по данным ПЭМ для образцов **23н** и **24н** соответственно).

В ходе работы изучали поведение образцов во внешнем магнитном поле (Рисунок 48) и определяли магнитные характеристики полученных частиц – коэрцитивную силу и намагниченность насыщения (Таблица 16). В случае образцов, покрытых золотой оболочкой, намагниченность насыщения нормировали на содержание магнетита, определенное при помощи ИСП-МС.

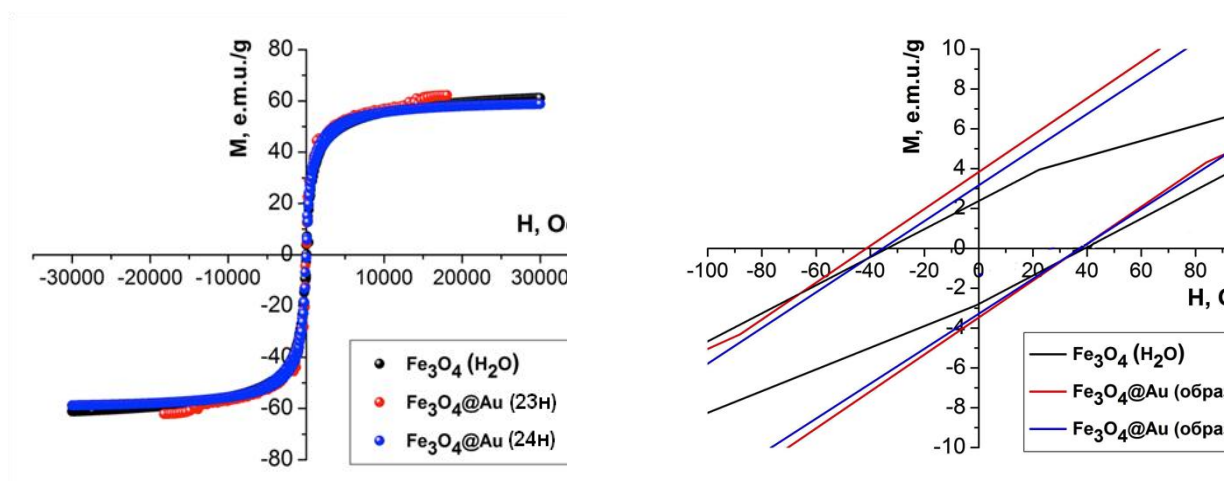


Рис. 48 Петли гистерезиса (слева) и их увеличенные около нуля области (справа) для: наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , промытых DI  $\text{H}_2\text{O}$  и наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  на их основе (сверху); наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , промытых  $\text{HClO}_4$  и наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  на их основе (снизу)

По результатам изучения магнитных свойств было обнаружено, что все образцы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  являются ферромагнетиками с коэрцитивной силой 35-47 Э и намагниченностью насыщения 59-62 э.м.е./г  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (в случае образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  производился пересчет с учетом массовой доли магнетита в частицах, вычисленной при помощи ИСП-МС). Таким образом, золотая оболочка на поверхности магнетита не оказывает влияние на намагниченность насыщения и лишь незначительно влияет на коэрцитивную силу в случае образца 4 (увеличение от 35 до 47 Э), что объясняется диамагнитными свойствами золота, которое ослабляет взаимодействие магнитных моментов соседних частиц.

#### 2.2.5.4. Функционализация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

Для демонстрации простоты функционализации поверхности магнитных частиц после их покрытия золотой оболочкой и для изучения биохимических свойств была получена серия НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au - L$ , где L – серосодержащие органические соединения, как низко-, так и высокомолекулярные. В ходе работы был получен ряд образцов НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (**24н**),

функционализованных серосодержащими органическими лигандами: L-цистеином **8м**, 3-меркаптопропионовой кислотой (3-МПК) **9м**, липоевой кислотой **10м**, 11-меркаптоундекановой кислотой (11-МУК) **11м**, меркаптополиэтиленгликолевой кислотой (SH-PEG-COOH) **12м** (на основе образца **23н**) и **13м**. Цитрат-ионы, электростатически связанные с поверхностью частиц после их получения, полностью вытесняются серосодержащим лигандом. Для функционализации наночастиц использовали: линкеры с короткой углеводородной (УВ) цепью (L-цистеин, 3-МПК), линкеры со средней УВ-цепью (липовая кислота, 11-МУК), и, наконец, с длинной и гибкой полимерной цепью (SH-PEG-COOH). Количество лиганда, которое необходимо добавить с целью полностью покрыть поверхность наночастиц, было оценено в  $5 \cdot 10^{-7}$  моль (5% от общего количества моль золота, добавленного на стадии покрытия частиц).

Полученные коллоидные растворы наночастиц достаточно стабильны во времени. Так, после трех недель хранения при  $+4^\circ\text{C}$  оптическая плотность растворов в максимуме поглощения (526-530 нм) составляет 0,98 - 1,02 от исходной. Стоит отметить, что до функционализации образцы были стабильны в течение 1-2 недель. Анализ коллоидных растворов наночастиц был проведен с применением методов NTA и DLS; данные собраны в Таблицу 17.

Таблица 17. Диаметр в пике,  $\zeta$ -потенциал и концентрации частиц по данным DLS, NTA

Название	d, нм (DLS)	d, нм (NTA)	$\zeta$ -потенциал, мВ	конц., шт/мл (NTA)
23н	110±48	66±30	-50±5	$8,2 \cdot 10^{11}$
24н	70±38	54±29	-37±4	$5,6 \cdot 10^{11}$
8м	93±34	71±33	-9±2	$1,5 \cdot 10^{10}$
9м	69±33	47±32	-19±3	$1,0 \cdot 10^{10}$
10м	65±33	46±35	-15±3	$3,1 \cdot 10^9$
11м	65±25	47±32	-20±3	$1,1 \cdot 10^{10}$
12м	70±35	48±34	-18±4	$5,0 \cdot 10^{10}$
13м	79±38	53±29	-19±4	$4,6 \cdot 10^{11}$

Размер частиц, определенный методами динамического рассеяния света (DLS) и анализа траектории наночастиц (NTA), после функционализации достоверно не изменяется; вероятно, играют роль два параллельных процесса – уменьшение агрегации наночастиц в растворе вследствие стабилизации лигандом и одновременный рост их гидродинамического радиуса. Также можно отметить, что при использовании центрифугирования на этапе очистки в финальном растворе была достигнута на порядок большая концентрация функционализированных частиц по сравнению с очисткой на Sephadex.  $\zeta$ -Потенциалы наночастиц до и после функционализации были отрицательными (в среднем, -40 и -25 мВ, соответственно). До функционализации это объясняется наличием цитрат-ионов на поверхности золотой оболочки, которые обеспечивают ее стабилизацию; после покрытия серосодержащими лигандами и диализа отрицательный  $\zeta$ -потенциал зависит от лиганда (меркаптокислоты), связавшегося с

поверхностью. Для образцов **12м** и **13м** был проведен термогравиметрический анализ в интервале температур от 40 до 600°C (Рисунок 49).

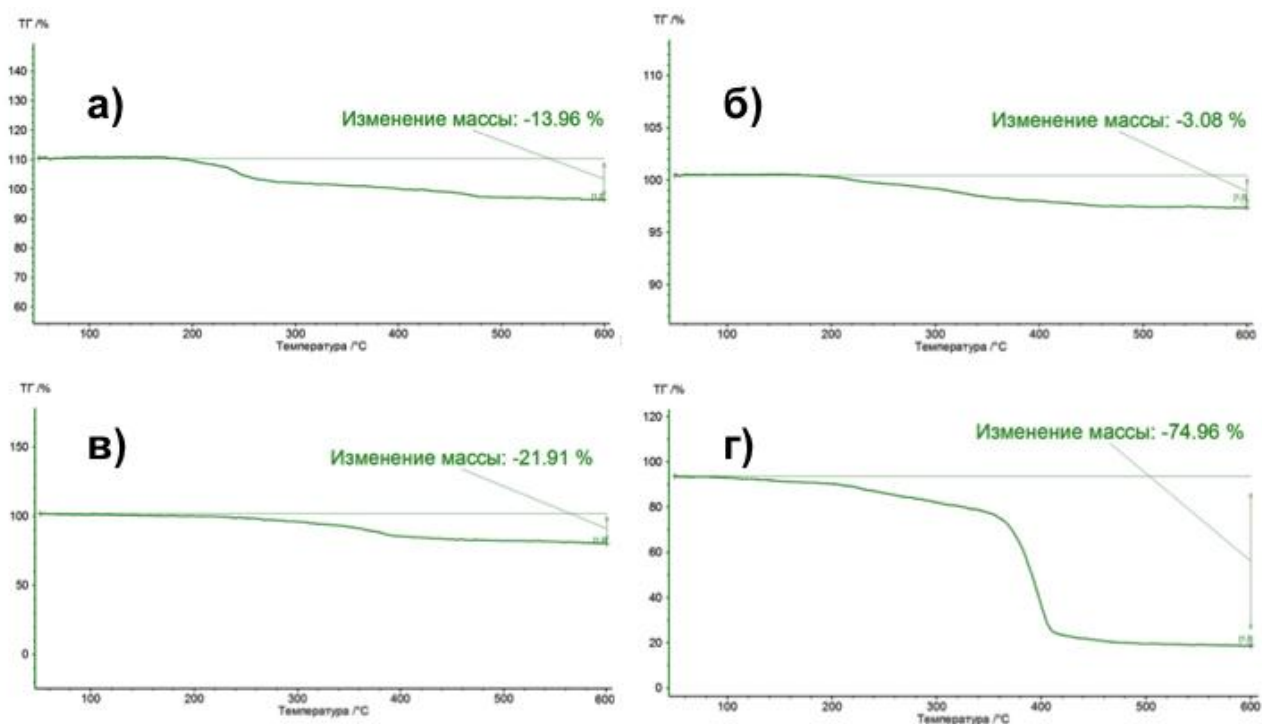


Рис. 49 ТГ-кривые для образцов **23н** (а), **24н** (б), **12м** (в), **13м** (г)

Суммарная потеря массы на 14% в интервале температур 200-600°C для образца **23н** (Рисунок 49,а) и на 3% в аналогичном интервале для образца **24н** (Рисунок 49,б) соответствует разложению стабилизирующей оболочки из цитрат-анионов. Потеря массы на 22% в интервале температур 200-400°C для образца **12м** (Рисунок 49,в) и на 75% в том же интервале температур для образца **13м** (Рисунок 49,г) соответствует разложению SH-PEG-COOH, связанной с поверхностью частиц. Стоит отметить существенно большую потерю массы образца **13м** по сравнению с образцом **12м**, что свидетельствует о более эффективной функционализации лигандом. Кроме того, на ТГ-кривой образца **13м** отчетливо видно два участка с разной скоростью потери массы и ее абсолютной величиной. Мы полагаем, что участок от 200 до 360°C с постепенной потерей массы соответствует отрыву нековалентно связанного с поверхностью ПЭГ, в то время как резкий спад на 360-400°C – отрыву ковалентно связанного лиганда, что согласуется с литературными данными [117].

Для образцов **12м** и **13м** определяли релаксивность *in vitro* при 25°C и силе поля 7Т, которую сравнивали с релаксивностью не покрытого магнетита. На рис.49 слева, представлена зависимость интенсивности сигнала от времени эха для наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au с разной концентрацией железа (образец **12м**); на Рисунке 50, справа – зависимость скорости T2-

релаксации от концентрации железа в образце для наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (образцы **12м** и **13м**).

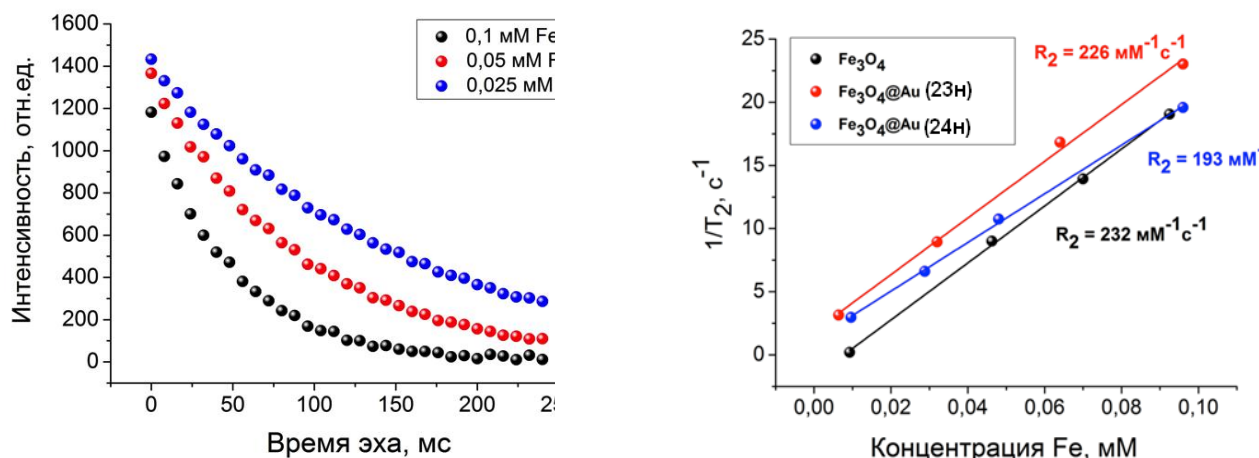


Рис. 50 Зависимость интенсивности сигнала от  $T_{\text{эха}}$  при различной концентрации Fe (слева); зависимость скорости релаксации от концентрации Fe (справа) для образцов **12м** и **13м**

Было установлено, что исследованные образцы существенно уменьшают время T2-релаксации протонов воды; ослабление сигнала коррелирует с концентрацией частиц в растворе (Рисунок 50, слева). Для образцов  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , **12м** и **13м** были получены величины R2-релаксивности 232, 226 и 193  $\text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ , соответственно, что превышает аналогичные величины существующих контрастных агентов на основе магнитных НЧ оксидов железа. Можно сделать вывод, что покрытие золотой оболочкой не приводит к существенному влиянию на способность наночастиц магнетита уменьшать время T2-релаксации протонов воды за счет создания вокруг себя неоднородного магнитного поля, что коррелирует также с отсутствием влияния золотой оболочки на параметры петли гистерезиса. Поскольку зависимость  $1/T_2$  от концентрации железа линейная с коэффициентом корреляции  $> 0,995$ , это значит, что образцы не агрегируют под действием поля.

В ходе работы также изучали токсичность наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , **12м** и **13м** для клеточных линий LNCaP и PC-3 (клетки рака предстательной железы человека). Результаты представлены на Рисунке 51.



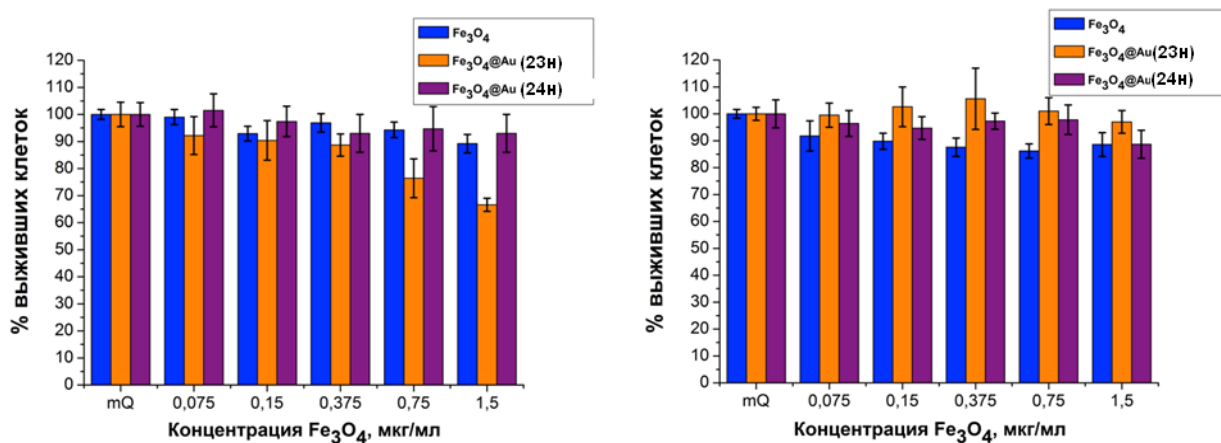


Рис.51 Результаты МТТ-теста для наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  (образцы 12м и 13м), на клетках LNCaP (слева) и PC-3 (справа)

Исследованные образцы были нетоксичны в диапазоне 0,075 – 1,5 мкг/мл по магнетиту (>90% выживших клеток по сравнению с контролем); исключение составлял образец **12м** в концентрации 0,75 – 1,5 мкг/мл по магнетиту, который приводил к снижению выживаемости клеток до 65-75%).

#### 2.2.5.5. Модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ химотрипсином

Следующим этапом работы была модификация поверхности наночастиц химотрипсином – ферментом, каталитические свойства которого подробно изучены в литературе. Данный белок был использован в качестве модели для изучения механохимического действия магнитного поля, а именно возможности регулирования каталитической активности иммобилизованного на магнитных наночастицах фермента за счет изменения его конформации под действием сил поля.

Целью данной работы было изучение влияния переменного магнитного поля на активность фермента иммобилизованного на поверхности наночастиц. Для иммобилизации на наночастицах магнетит-золото химотрипсина был выбран карбодиимидный метод с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида для активации карбоксильных групп и N-гидроксисульфосукцинимид (S-NHS), для стабилизации образующегося промежуточного соединения. Схема реакции приведена на Рисунке 52. Добавление S-NHS обусловлено тем, что активный интермедиат, получаемый после взаимодействия карбоксильной группы с молекулой карбодиимида, медленно реагирует с молекулами первичных аминов и быстро гидролизуется в водных растворах. Использование S-NHS позволяет получить интермедиат, который стабилен в растворе в течение большего времени и активнее взаимодействует с первичными аминогруппами.

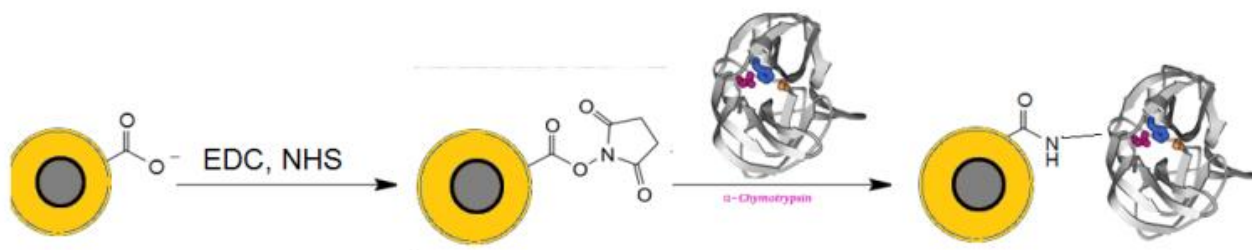


Рис. 52. Схема модификации поверхности наночастиц магнетит-золото химотрипсином

### 3.2.6.5.1. Определение содержания белка и свободных аминогрупп

Для определения общего количества химотрипсина, иммобилизованного на поверхности наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ , использовалась реакция с бицинхониновой кислотой, которая образует ярко окрашенный фиолетовый комплекс с катионом  $\text{Cu}^+$ . В свою очередь, катион  $\text{Cu}^+$  образуется при восстановлении  $\text{Cu}^{2+}$  белком в щелочной среде (Рисунок 53, слева). Данный метод позволяет определять концентрации белка в диапазоне 0,5-20 мкг/мл из градуировочного графика, построенного для образцов с известной концентрацией (Рисунок 53, справа).

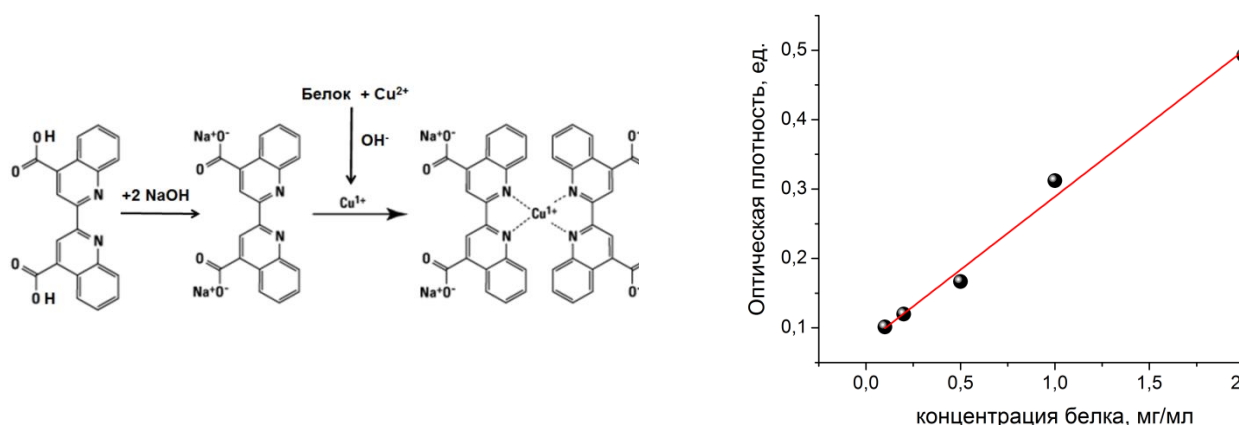


Рис. 53 Схема образования окрашенного комплекса с бицинхониновой кислотой (слева), градуировочный график для определения количества белка (справа)

Для определения количества свободных аминогрупп на поверхности иммобилизованного белка использовалась реакция с 2,4,6-трибензолсульфоновой кислотой, которая образует ярко окрашенный желто-оранжевый комплекс с первичными аминогруппами (Рисунок 54, слева). Данный метод также очень чувствителен, количество свободных аминогрупп определяется из градуировочного графика, построенного для образцов с известной концентрацией белка (которое пересчитывается в количество аминогрупп исходя из 15 доступных аминогрупп на поверхности молекулы химотрипсина), (Рисунок 54, справа).

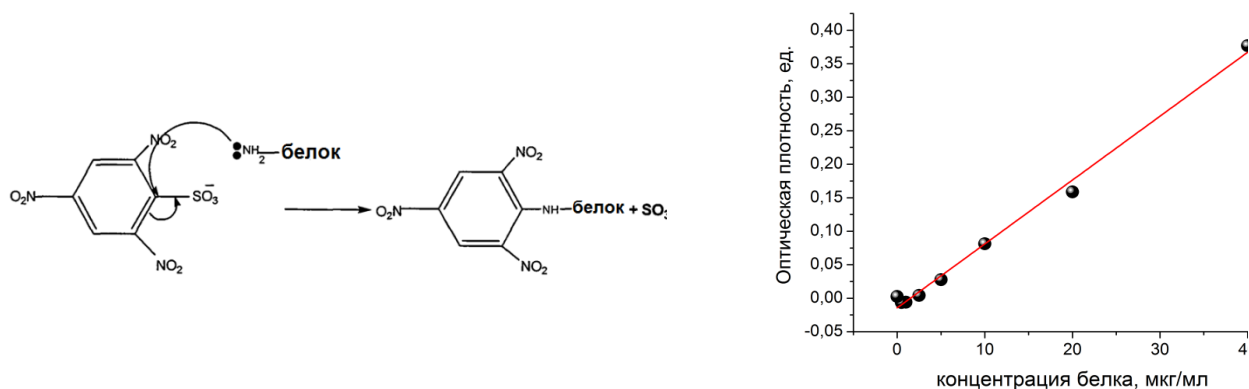


Рис. 54 Схема образования окрашенного комплекса с 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (слева), градуировочный график для определения свободных аминогрупп (справа)

Данные об общем количестве белка и количестве свободных аминогрупп в расчете на одну молекулу химотрипсина для каждого образца приведены в таблице 18.

Таблица 18. Концентрация белка и количество свободных аминогрупп на 1 молекулу химотрипсина

Образцы Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au-лиганд	Концентрация белка, добавленного к НЧ, мкг/мл	Концентрация белка, связанного с НЧ, мкг/мл	Количество свободных NH <sub>2</sub> -групп, шт
8м	600±30	92±15	7±2
9м	600±30	97±15	6±2
10м	600±30	87±15	6±2
10м	100±5	17±4	8±2
10м	25±1	16±4	7±2
11м	600±10	82±15	5±2
12м	600±10	100±15	5±2

Концентрация белка в образцах **8м**, **9м**, **10м**, **11м**, **12м** составляет 80-100 мкг/мл, что соответствует ≈15-18% от первоначально добавленного в систему (600 мкг/мл); для образца **10м-1** – 17 мкг/мл (17% от первоначально добавленных 100 мкг/мл), образца **10м-2** – 16 мкг/мл (66% от первоначально добавленных 25 мкг/мл). Количество свободных аминогрупп, приходящихся на одну молекулу иммобилизованного химотрипсина, для всех образцов составляет 5-7 из 15 теоретически доступных. В целом полученный результат свидетельствует о том, что химотрипсин действительно был химически иммобилизован на частицах, и изучаемая нами система отличается от гетерогенной смеси магнитных наночастиц и белка.

В качестве субстрата для каталитической реакции был выбран *n*-нитроанилид *N*-бензоил-L-тирозина (BTNA). Выбор данного субстрата был обусловлен тем, что он, хотя и является специфичным субстратом для исследуемого фермента, обладает относительно низкими константами  $K_M$  и  $k_{cat}$  по сравнению с другими субстратами химотрипсина, что

приводит к невысокой скорости накопления окрашенного продукта реакции (p-нитроанилина). На практике это означает, что если наблюдать за кинетикой реакции в спектрофотометре, зависимость оптической плотности от времени будет линейной в течение часа и более (подчиняется основному закону светопоглощения), что позволяет достоверно фиксировать изменение скорости реакции после действия магнитного поля, в то время как скорость контрольной реакции остается неизменной. Во всех экспериментах изучалась кинетика реакции гидролиза BTNA, катализируемая химотрипсином (Рисунок 55).

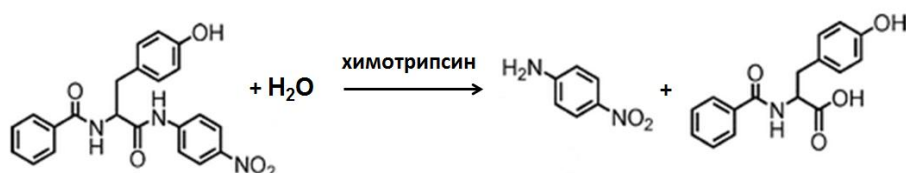


Рис. 55 Схема реакции гидролиза BTNA, катализируемого химотрипсином

Кинетические эксперименты под действием поля<sup>2</sup> проводились, согласно описанной в экспериментальной части последовательности. В образцах **8м**, **9м**, **10м-1**, **10м-2**, **10м-3** подвергавшихся действию магнитного поля, наблюдалось замедление реакции после каждой экспозиции в поле (типичная кинетическая кривая показана на Рисунке 56, слева). Для того, чтобы выяснить природу этого эффекта, были сделаны контрольные эксперименты (параметры, связанные с обработкой магнитным полем, не изменялись). Во первых, обработка раствора свободного химотрипсина в поле (в соответствии с диапазоном концентраций, указанных в Таблице 18) – см. Таблицу 19. Во вторых, обработка смеси магнитных наночастиц и химотрипсина, взятых в стандартном соотношении, в поле без добавления в систему сшивающих агентов – см. Таблицу 19. А также, эксперимент с добавлением субстрата только после обработки раствора иммобилизованного химотрипсина в поле (кинетическая кривая на Рисунке 56, справа), также наблюдалось замедление скорости реакции  $\approx$  на 15%.

Таблица 19. Результаты контрольных экспериментов:

Образец	Остаточная активность, %
Свободный химотрипсин	98 $\pm$ 5
Смесь химотрипсин/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au	96 $\pm$ 6

<sup>2</sup> Кинетические эксперименты проводились совместно с кафедрой химической энзимологии МГУ, под руководством д.х.н. Клячко Н.Л.

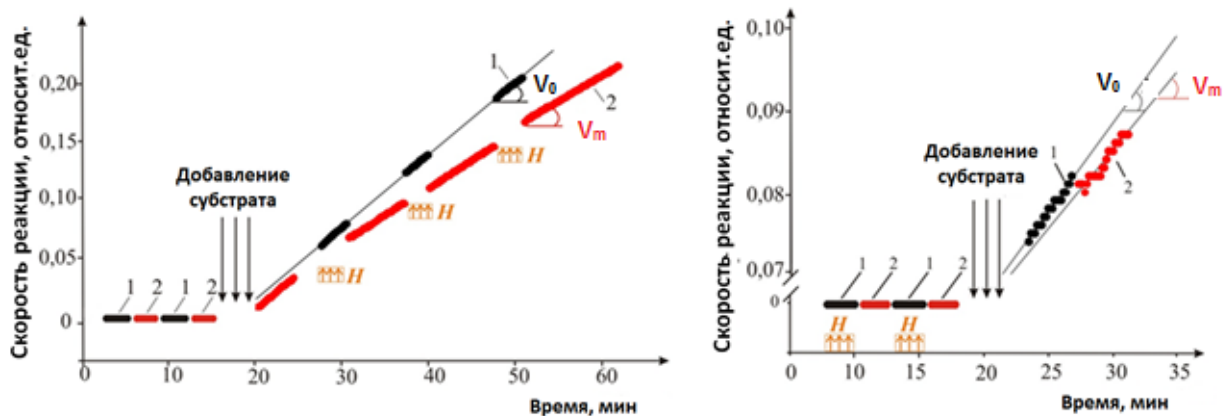


Рис. 56 Кинетика изучаемой реакции в ПМ поле,  $H = 110 \text{ кА/м}$ , частота 50 Гц, для образца 10м. Обработка в магнитном поле после добавления субстрата (слева), до добавления субстрата (справа). 1 – контрольный образец без обработки в МП, 2 – образец, подвергающийся действию поля

Также в работе была изучена зависимость эффекта магнитного поля от структуры соединения, используемого в качестве линкера. Изучение проводили, сравнивая степень инактивации иммобилизованного фермента после его обработки в поле (50 Гц, 110 кА/м) для образцов 8м, 9м, 10м. Для образцов 11м, 12м влияния магнитного поля практически не наблюдалось, для образцов 8м, 9м, 10м было обнаружено замедление каталитической реакции после каждой обработки в поле (Рисунок 57).

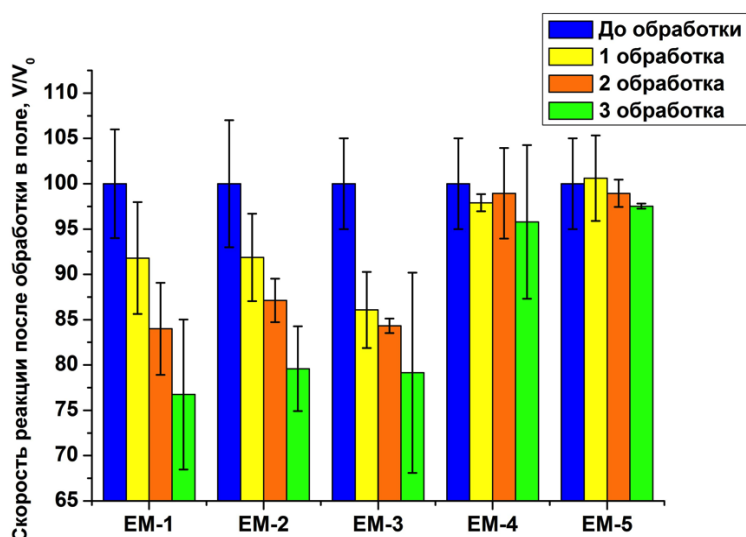


Рис. 57 Влияние магнитного поля на активность химотрипсина, иммобилизованного при помощи различных линкеров (слева направо): L-цистеин, 3-меркаптопропионовая кислота, липоевая кислота, 11-меркаптоундекановая кислота, меркаптополиэтиленгликолевая кислота

В работе было выявлено изменение активности фермента после действия магнитного поля для образцов **8м, 9м, 10м-1, 10м-2, 10м-3**. Принципиально обнаруженный эффект может быть вызван двумя причинами: влиянием магнитного поля непосредственно на иммобилизованный химотрипсин, либо на его реакцию с субстратом. Для выяснения того, какой из двух механизмов является преобладающим, была проведена серия экспериментов с добавлением субстрата уже после обработки раствора иммобилизованного химотрипсина в поле; в этом случае также наблюдалось замедление скорости на 10-15 %. Это подтверждает факт непосредственного влияния на структуру фермента, не опровергая, однако того, что магнитное поле может также влиять, например, на взаимное положение активных центров связывания фермента и субстрата. Для выяснения всех возможных механизмов механического влияния магнитного поля в данной системе требуются дополнительные эксперименты. Дополнительным подтверждением достоверности обнаруженного эффекта служат также результаты контрольных экспериментов, в котором действию поля подвергался либо свободный химотрипсин, либо смесь химотрипсина и магнитных частиц (сшивающие агенты не добавлялись). Активность фермента в этих случаях сохранялась (Таблица 19).

Нагревом раствора в магнитном поле (МП) столь низкой частоты можно пренебречь (и общий разогрев образца, и локальный нагрев магнитных НЧ за время экспозиции в МП по оценкам не превышал  $10^{-4}$  К). Ячейка с индуктором термостатировалась, и прямые измерения показали, что ее разогрев током, протекающим по катушкам магнитной системы за время экспозиции образца в МП, не превышал нескольких десятых долей К. Следует также заметить, что повышение температуры сосуда, в котором протекала реакция, даже на несколько К привела бы к росту скорости реакции, а не замедлению, как это наблюдалось экспериментально, так что возможный нагрев (по любой причине) может только уменьшать наблюдаемый эффект замедления реакции в МП, а не создавать его. В исследуемой реакции не образуется радикальных пар, на которые может повлиять МП.

На Рисунке 57 сравнивается относительная скорость реакции после действия магнитного поля (50 Гц, 110 кА/м) для образцов **8м, 9м, 10м, 11м, 12м**, в состав которых входили линкеры с разной длиной углеводородной цепи и разной химической природой. Было обнаружено, что после третьей обработки полем достигается снижение скорости катализируемой реакции на 20-25% для образцов **8м, 9м, 10м**. Это может быть объяснено малой длиной и жесткостью L-цистеина и 3-меркаптопропионовой кислоты, наличием жесткого кольца и двух атомов серы в молекуле липоевой кислоты. В то же время для образцов **11м** и **12м** скорость реакции оставалась практически неизменной, что может объясняться большой длиной и гибкостью молекул 11-меркаптоундекановой и меркаптополиэтиленгликолевой кислоты, за счет чего

воздействие магнитного поля на частицы практически не передается ферменту, тем самым, не влияет на его активность.

### 2.2.5.6. Концепция наномеханического воздействия магнитного поля

Предполагаемая структура комплексов, получаемых в данной работе, изображена на Рисунке 58. При закреплении макромолекулы к поверхности одной наночастицы, то есть, образования «мономера» (Рисунок 58, сверху) в магнитном поле может быть реализован механизм гидродинамического вытягивания за счёт сил трения, возникающих из-за взаимодействия молекулы и растворителя. В первом приближении, для молекул, имеющих форму глобулы, сила, согласно формуле Стокса, будет равна:

$$F_{HD} = f_{fr}u = 6\pi\eta R_{MHD}u$$

где  $f_{fr}$  – коэффициент вязкого трения,  $u$  – скорость,  $\eta$  – вязкость растворителя,  $R_{MHD}$  – гидродинамический радиус молекулы.

Значение скорости  $u$  может быть получено исходя из формулы:

$$u = 2\pi f R_{HD}$$

где  $f$  – частота поля,  $R_{HD}$  – гидродинамический радиус наночастицы.

Численная оценка показывает, что при  $f = 100$  кГц и  $R_{HD} = 20$  нм величина  $F_{HD}$  составляет несколько единиц пН (если растворитель имеет вязкость, близкую к вязкости воды  $\eta \approx 10^{-3}$  Па·с). Для более вязких жидкостей (например, гелеобразных)  $F_{HD}$  может возрасти в  $\eta_g/\eta \approx 10 \dots 1000$  раз, где  $\eta_g$  – вязкость геля.

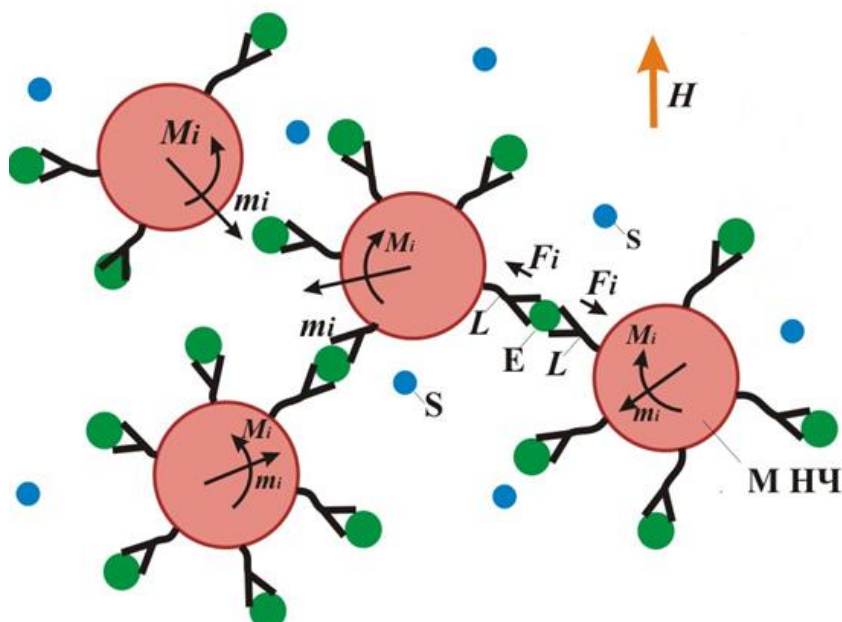


Рис. 58 Схема, поясняющая концепцию наномеханического воздействия в рамках комплексов, полученных в данной работе. E – молекулы фермента, L – молекулы линкера,  $m_i$  – магнитный момент наночастицы,  $M_i$  – действующий на нее механический момент,  $F_i$  – сила, приложенная к молекуле фермента

Следует отметить, что магнитные НЧ будут успевать вращаться синхронно с изменением переменного магнитного поля до тех пор, пока будет выполняться условие:  $\omega \tau_B \ll 1$ , здесь  $\omega = 2\pi f$  – круговая частота поля,  $\tau_B$  – характерное время гидродинамической релаксации ( $1 \div 10$  мкс, как было указано выше).

В случае закрепления макромолекулы одновременно на нескольких наночастицах, (рис. 58, в центре), величина механической силы будет определяться положениями точек закрепления и взаимной ориентацией магнитных моментов НЧ. В простейшем случае, если магнитные моменты двух НЧ антипараллельны и лежат в одной плоскости, вращающий момент  $\vec{L}$ , действующий на случайно ориентированную частицу в переменном магнитном поле, равен:

$$\vec{L} = \vec{m}_\Sigma \times \vec{B},$$

где  $\vec{m}_\Sigma$  – суммарный магнитный момент наночастицы, который может быть представлен как  $\vec{m}_\Sigma = V_M \vec{J}_S$ , где  $V_M$  – объем наночастицы,  $\vec{J}_S$  – намагниченность насыщения.

Тогда максимальная сила растяжения  $F_M$ , может быть представлена в виде:

$$F_M = \frac{L}{R_{HD}} \approx \frac{4\pi R_M^3 J_S}{3R_{HD}} B$$

В первом приближении  $F_M$  не зависит от частоты поля и вязкости растворителя, но линейно зависит от  $B$ .

Численные оценки показывают, что к макромолекулам, прикрепленным одновременно к нескольким НЧ, можно приложить гораздо большие силы, чем в случае закрепления только на одной НЧ. Так, для частиц  $Fe_3O_4$  радиусом  $R_M = 10$  нм в поле  $B = 0,1$  Тл можно получить силу  $F_M \approx 100$  пН, а на частицах с радиусом  $R_M = 20$  нм в поле  $B = 0,2$  Тл силу  $F_M \approx 1000$  пН.

Таким образом, значительное влияние магнитного поля на кинетику изучаемой в этой работе реакции будет наблюдаться именно в случае наличия в нашей системе магнитных НЧ, соединенных между собой через молекулу химотрипсина – «димеров». Косвенным доказательством этого предположения является сравнение результатов НТА для образцов **10м**, **10м-1** и **10м-2** (Рисунок 59, Таблица 19).

Таблица 19. Распределение по размерам по данным НТА до и после модификации белком

Образец	Отношение количества димеров к количеству мономеров	Эффект поля после первой обработки, %
<b>10м</b>	0,4	13±3
<b>10м-1</b>	0,85	41±5
<b>10м-2</b>	1,6	63±4



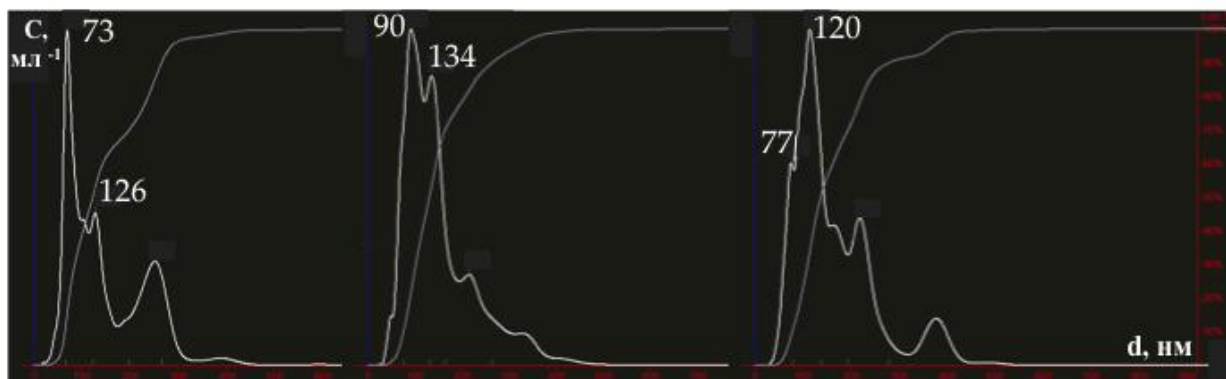


Рис. 59 Распределение по размерам для образцов 10м, (слева) 10м-1 (в центре), 10м-2 (справа) по данным NTA, по горизонтальной оси диаметр, нм, по вертикальной – концентрация\*10<sup>6</sup>, нч/мл

На Рисунке 59 видно, что для всех образцов, модифицированных белком, происходит сдвиг максимума относительно исходного распределения (у образца 10м до модификации значение диаметра в пике составляло 46 нм); само распределение по размерам становится более широким. Также можно заметить, что помимо пика на 75-90 нм, отвечающего «мономерным» структурам, для каждого образца наблюдается второй пик на 120-135 нм, который соответствует «димерным» структурам. В ряду образцов 10м, 10м-1, 10м-2 одновременно растет доля димеров в смеси и увеличивается эффект магнитного поля после первой обработки, что подтверждает гипотезу о большем влиянии магнитного поля на каталитическую активность фермента, закрепленного одновременно на двух и более магнитных частицах.

#### *Метод управляемой молекулярной динамики*

Чтобы попытаться выявить возможные механизмы уменьшения ферментативной активности химотрипсина, а также более точно оценить диапазон сил, необходимых для их реализации, был использован метод управляемой молекулярной динамики (программный пакет NAMD [117]). Проводилось компьютерное моделирование<sup>3</sup> деформации глобулы фермента под действием сил, приложенных к различным аминокетам на поверхности белка. В эксперименте следили за двумя ключевыми областями активного центра фермента: каталитическим центром и центром связывания.

В результате моделирования было установлено, что каталитический центр химотрипсина представляет собой достаточно жесткое образование, и сил даже в 800 пН недостаточно для изменения его геометрии, т.е. расстояния между различными остатками каталитической триады остаются практически неизменными. Однако было выяснено, что механических воздействий в

<sup>3</sup> Компьютерное моделирование было проведено с.н.с. к.ф.-м.н. Упоровым И.В.

80 и 160 пН на протяжении всего 1 нс уже достаточно для изменения сетки водородных связей и, как следствие, укладки полипептидных цепей в области центра связывания субстрата.

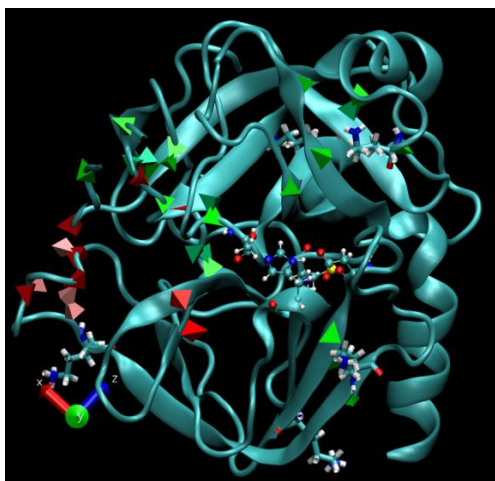


Рис. 60 Укладка полипептидной цепи молекулы бычьего химотрипсина. Остатки каталитической триады изображены в шаро-стержневом представлении, остатки лизинов, к которым приложена внешняя радиальная сила 160 пН, изображены в стержневом представлении. Зелёные пирамиды указывают на остатки, формирующие водородные связи только в свободном химотрипсине, красные – в растягиваемом химотрипсине

Данное искажение структуры однозначно приведёт к уменьшению функциональной активности фермента. На Рисунке 60 приведена структура химотрипсина, в которой показано изменение сетки водородных связей под действием внешней силы в 160 пН.

Таким образом, основываясь на вышеизложенных результатах моделирования, можно заключить, что наблюдаемый эффект уменьшения ферментативной активности под действием магнитного поля может быть вызван наномеханическим воздействием со стороны магнитных наночастиц в переменном магнитном поле.

Неполная потеря активности химотрипсином может быть объяснена тем, что воздействие на различные аминокислотные группы фермента может различным образом влиять на его активность. В дополнение к этому, наличие золотых частиц без магнитного ядра тоже должно отразиться на величине остаточной активности. Ещё одним фактором, не позволяющим полностью инактивировать фермент, может являться размер наночастиц магнетита, часть из которых подвергается процессу Неелевской релаксации, то есть повороту магнитного момента в практически неподвижной частице, что не приводит к механической деформации фермента.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует перспективность использования наночастиц магнетит-золото типа «ядро-оболочка» для биомедицинского применения. Наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  обладают выраженными магнитными свойствами

(высокая намагниченность насыщения, высокая скорость T2-релаксации), низкой токсичностью, а также простотой функционализации поверхности.

Также в ходе исследования обнаружен эффект влияния слабого низкочастотного (не греющего) магнитного поля на кинетику катализируемой химотрипсином реакции. Наиболее вероятной причиной наблюдавшегося эффекта является изменение топологии групп в активном центре на поверхности молекулы фермента в результате ее необратимой (или, по крайней мере, надолго запоминаемой) деформации приложенными силами поля.

Продемонстрированные свойства наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  позволяют говорить об их перспективности в качестве лекарственных и диагностических препаратов, в том числе, тераностиков.

### 3. Экспериментальная часть

#### 3.1. Общие сведения

Контроль за ходом реакций и индивидуальностью продуктов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля (Silufol). Используемые растворители были очищены и абсоллированы по методикам, приведенным в руководстве [211].

Температуры плавления определяли в блоке с открытым капилляром.

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  были зарегистрированы на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 400 МГц. В качестве растворителей использовали дейтерохлороформ, диметилсульфоксид- $d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ . Масс-спектры (лазерная ионизация) регистрировали на масс-спектрометре MALDI "UltrafleXtreme BrukerDaltonics" с УФ лазером в режиме положительных ионов. Элементный анализ синтезированных соединений был выполнен на CHN-анализаторе фирмы MicroCube. ИК-спектры регистрировали на приборах UR-20 в вазелиновом масле или на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье Thermo Nicolet IR200 в КВг. Регистрация оптических спектров в УФ и видимой области, а также кинетические и точечные эксперименты проводились на приборах Thermo Scientific Multiskan GO, SpectraMax M5, Beckman Coulter DU 720.

Анализ методом ГХ-МС проводили на хроматомасс-спектрометре Finnigan MAT SSQ 7000 (энергия ионизации – 70 эВ, кварцевая капиллярная колонка OV-1 (25м), температурный режим: 70°C (2 мин.) – 20°C/мин – 280°C (10 мин)).

Микрофотографии образцов были получены на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ, а так же на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-2100F/Cs/GIF (200 kV, 0.8 A). Тёмнопольные изображения, карты распределения элементов и спектры EDX, были получены в режиме STEM (детекторы HAADF и JED 2300 (JEOL)), размер пятна составлял 1 нм. Образцы подготавливали нанесением 3-5 мкл раствора на покрытую формваром или углеродом медную сетку ( $d = 3.05$  мм), которую затем высушивали на воздухе.

Рентгеноструктурный анализ образцов проводился на дифрактометре ДРОН-4 (CoK $\alpha$  излучение с  $\lambda = 0,179$  нм, напряжение трубки 40 кВ, ток – 30 мА) в диапазоне дифракционных углов  $2\theta$  от 20° до 120° с шагом 0,1°; время экспозиции на точку съёмки 3 с. Качественный фазовый анализ проводили путём сопоставления спектров с использованием базы данных по рентгеновским спектрам фаз (программа PHAN, около 200000 фаз). Количественный фазовый анализ (включая оценку размеров кристаллитов по ОКР) проводили с помощью программ PHAN% и SPECTRUM, разработанных на кафедре физического материаловедения НИТУ "МИСиС" [110]. Данная методика представляет собой модификацию метода Ритвельда,

основанного на минимизации разницы между снятым по точкам экспериментальным и модельным (расчётным) спектрами.

Измерение магнитных свойств в интервале магнитных полей от -30 до 30 кЭ при 300 К проводили с помощью установки “Quantum Design” Physical Property Measurement System (PPMS), оборудованной вибромагнетометрической вставкой (VSM), амплитуда колебаний составляла 2 мм, частота – 40 Гц. Чувствительность прибора –  $10^{-6}$  э.м.е.

Мёссбауэровские исследования на ядрах  $^{57}\text{Fe}$  проводили при комнатной температуре на спектрометре MS-1104Em в геометрии пропускания, источник излучения –  $^{57}\text{Co}$  в матрице Rh. Путём обработки мёссбауэровских спектров по программе Univem MS определяли значения эффективных магнитных полей  $H_{\text{эфф}}$  на ядрах  $\text{Fe}^{57}$ , изомерные сдвиги  $\delta_s$  и квадрупольные расщепления  $\Delta$  элементарных спектров, а также относительную интенсивность (площадь) последних. Погрешность измерения величины  $H_{\text{эфф}}$  составляла  $\pm 5$  кЭ (0,4 МА/м);  $\delta_s$  – 0,01-0,02 мм/с;  $\Delta$  –  $\pm 0,01$  мм/с, площади компонент –  $\pm 0,6$  %.

Термогравиметрический анализ проводился на синхронном термоанализаторе Netzsch STA 449 F3, который позволяет проводить синхронные измерения методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрического анализа (ТГА). Нагрев образцов проводили в алундовых тиглях в токе аргона в температурном интервале от 50 до 800°C со скоростью 10°C/мин.

Для проведения РФА, ТГА, съёмки Мёссбауэровских спектров и измерения магнитных свойств водные растворы частиц были упарены до состояния порошка на роторном испарителе. Получаемая масса сухих образцов составляла 30-50 мг.

Масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой проводили на приборе ELAN DRC II 9000 (PerkinElmer SCIEX), центр коллективного пользования ФНМ МГУ. Для измерения готовили серии из 5 калибровочных стандартов в диапазоне концентраций 0,1 -10 мг/л по определяемому элементу путем разбавления коммерческих стандартных растворов смесью  $\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3 : 1$  (царской водкой), разбавленной DI водой так, чтобы концентрация  $\text{HNO}_3$  не превышала 2-5%. Определяемые образцы аналогичным образом растворяли в разбавленной царской водке так, чтобы попасть в калибровочный диапазон.

Методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS (угол  $173^\circ$ ) с применением He-Ne лазера (633 нм, 5 мВ) проводилось исследование распределения частиц по размерам и измерение  $\zeta$ -потенциала. Для каждого образца проводилось не менее 3-х экспериментов с 11-15 измерениями в каждом.

Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS500. Время записи видео составляло не менее 60 секунд (внутренние параметры камеры: shutter 1000, gain 400), для каждого образца делалось не менее 3 повторений (с прокачиванием новой части раствора

под объектив). Для обработки видео использовался программный пакет NTA Analytical Software (версия 2.3), предел определения (detection threshold) был равен 5.

Измерение T2-релаксивности проводили с помощью магнитно-резонансного томографа ClinScan с мощностью поля 7Т в режиме Spin Echo (SE) с параметрами TR=10000 мс, TE = 8, 16, 24, ... , 240 мс в пробирках на 500 мкл с объемом раствора не менее 300 мкл.

Эксперименты в магнитном поле проводились с использованием индуктометров «Astra-50» и «Astra-M» (ООО «Нанодиагностика») с многоуровневой системой охлаждения, системой термостатирования кюветы и возможностью регистрации кинетических кривых при фиксированной длине волны.

## **3.2. Синтез органических бифункциональных лигандов**

### **3.2.1. Синтез исходных соединений**

#### **3.2.1.1. Синтез 11-тиоацетилундеканола-1 (1)**

Синтез проводили по методу [169]. В круглодонной колбе на 250 мл с обратным холодильником перемешивали на магнитной мешалке при кипячении в атмосфере аргона 3,00 г (12 ммоль) 11-бромундеканола и 2,74 г (24ммоль) тиоацетата калия в 50 мл метанола в течении 10 часов. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры ее выливали в водный раствор хлорида аммония и экстрагировали тремя порциями диэтилового эфира (по 10мл). Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в гексане и осаждали продукт добавлением небольшого количества диэтилового эфира и охлаждением в течении 5 часов. Полученное вещество отфильтровывали на воронке со стеклянным фильтрующим дном. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 2,36 г (9,6 ммоль), 80%.  $T_{пл} = 103^{\circ}\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.65 (т, 2H,  $J = 6.3$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,5 (с, ушир, 1H, OH), 2.85 (т, 2H,  $J = 6.3$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 2.3 (с, 3H,  $\text{CO-CH}_3$ ), 1.5-1.0 (м, 18H)

#### **3.2.1.2. Синтез 6-тиоацетилгексанола-1 (2)**

Методика аналогичная 3.2.1.1. [169]. Перемешивали при кипячении 2,2 г (12 ммоль) 6-бромгексанола и 2,74 г (24ммоль) тиоацетата калия в 50 мл метанола в течении 10 часов. После охлаждения смесь выливали в водный раствор хлорида аммония и экстрагировали диэтиловым эфиром. Растворитель удаляли в вакууме. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 1,6 г (9,6 ммоль), 82%.  $T_{пл} = 65^{\circ}\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.67 (т, 2H,  $J = 6.57$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,89 (т, 2H,  $J=7.2$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 2.34 (с, 3H,  $\text{CO-CH}_3$ ), 1.81 (п, 2H,  $J=6.82$ ), 1.4 (м, 6H)

#### **3.2.1.3. Синтез 11-меркаптоундеканола-1 (3) [169]**

В круглодонной колбе на 250 мл 2,00 г (8,1 ммоль) 11-тиоацетилундеканол-1 добавляли к суспензии карбоната калия 3,31 г (24 ммоль) в 70 мл метанола и перемешивали в течении 3

часов при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали 50 мл насыщенного водного раствора хлорида аммония и экстрагировали три раза 30 мл диэтилового эфира. Экстракт сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и удаляли растворитель в вакууме. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 1,57 г (7,7 ммоль), 95%.  $T_{пл}=35,5-36^{\circ}\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.65 (т, 2H,  $J = 6.3$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,5 (с, ушир, 1H, OH), 2.5 (кв, 2H,  $J = 6$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-SH}$ ), 1.5-1.0 (м, 18H)

#### **3.2.1.4. Синтез 6-меркаптогексанола-1 (4) [169]**

Методика аналогичная 4.2.1.3. 1,33 г (8,1 ммоль) 6-тиоацетилгексанола-1 добавляли к суспензии карбоната калия 3,31 г (24 ммоль) в метаноле. Спустя 3 часа смесь обрабатывали 50 мл насыщенного раствора хлорида аммония и экстрагировали диэтиловым эфиром. Экстракт сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и удаляли растворитель в вакууме. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 0,97 г (7,4 ммоль), 92 %.  $T_{пл}=28^{\circ}\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.66 (т, 2H,  $J = 6.69$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.54 (кв, 2H,  $J=6.9$ ,  $\text{CH}_2\text{-SH}$ ), 1.81 (п, 2H,  $J=6.82$ ), 1.4 (м, 6H)

#### **3.2.1.5. Синтез бис(11-гидроксиундецил)дисульфида (5) [169]**

В круглодонной колбе на 250 мл растворяли 1,4 г (6,86 ммоль) 11-меркаптоундеканолола-1 в 50 мл метанола. По каплям прибавляли 1М раствор йода в метаноле (2,5 г (9,8 ммоль)  $\text{I}_2$  в 10 мл MeOH). Окраска йода исчезает, йод продолжали прикапывать до появления желтой окраски раствора. Выпал белый осадок, который отфильтровывали на воронке со стеклянным фильтрующим дном. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 1,10 г (5,4 ммоль), 70%,  $T_{пл}=78,5-79^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.65 (т, 4H,  $J = 6.4$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,4 (с, ушир, 1H, OH), 2.5 (т, 4H,  $J = 7,3$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1.65 (м, 4H), 1.4-1.1 (м, 32H).

#### **3.2.1.6. Синтез бис(6-гидроксигексил)дисульфида (6) [169]**

Методика аналогичная 4.2.1.5. Растворяли 0,9 г (6,86 ммоль) 6-меркаптогексанола-1 в 50 мл метанола, а затем прикапывали 1М раствор йода в метаноле (2,5 г (9,8 ммоль)  $\text{I}_2$  в 10 мл MeOH). Выпавший осадок отфильтровывали на воронке со стеклянным фильтрующим дном. Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 1,42 г (5,35 ммоль), 78%.  $T_{пл}=68^{\circ}\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 3.56 (т, 2H,  $J = 6.69$  Гц,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.7 (т, 2H,  $J=7.2$ ,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1.81 (п, 4H,  $J=6.82$ ), 1.4 (м, 12H)

#### **3.2.1.7. Синтез 11-(трифенилтио)ундекан-1-ола (7) [170]**

Трифенилметантиол (7,92 г, 28,65 ммоль) растворяли в смеси этанол/бензол (1:1, 50 мл), и добавляли гидроксид натрия (1,43 г, 35,75 ммоль) в 15 мл воды. Затем 11-бром-1-ундеканол (6 г, 23,88 ммоль) растворяли в этанол/бензол (1:1, 50 мл) и добавляли к первой смеси. Реакционную смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре. После завершения реакции (контроль по ТСХ) смесь выливали в насыщенный раствор соды,

органическую фазу промывали раствором соли (трижды), сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и удаляли растворитель в вакууме. Продукт очищали при помощи колоночной хроматографии в системе гексан/этил ацетат (4:1). Растворитель упаривали в вакууме. Продукт представляет собой бесцветное масло. Выход: 9,28 г (20,76 ммоль), 87%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7.41 (дд, 6H, 3Ph), 7.36 (тд, 6H, 3Ph), 7.29 (тд, 6H, 3Ph), 3.63 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2.44 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1.61 (м, 2H), 1.4 – 1.2 (м, 16H)

### 3.2.1.8. Синтез 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ол (8) [170]

К раствору соединения **7** (8,52 г; 19,08 ммоль) в дихлорметане при 4°C добавляли 3,86 г триэтиламина. Далее по каплям добавляли мезилхлорид (3,28 г; 28,59 ммоль), чтобы температура реакционной смеси не превышала 5°C. Через 30 мин доводят температуру смеси до комнатной и перемешивали еще 30 мин. По окончании реакции упаривали растворитель, затем разбавляли дихлорметаном, промывали 0,1М HCl, далее насыщенными растворами  $\text{NaHCO}_3$  и NaCl (по 3 раза каждый). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и удаляли растворитель в вакууме, таким образом выделяли промежуточное соединение – мезилат спирта **7**. Далее к 23,76 г (158,4 ммоль; 21,1 мл) триэтиленгликоля добавляли 0,47 г (11,76 ммоль) гидроксида натрия в 0,59 мл воды и перемешивали 1 ч при 90°C в инертной атмосфере. К смеси добавляли 5,88 г полученного мезилата и перемешивали 24 ч при 90°C в атмосфере аргона. По окончании реакции 6 раз промывали смесь раствором ПЭ/ЭА (4:1). Органический слой отделяли и удаляли растворитель при пониженном давлении. Полученный продукт очищали колоночной хроматографией в системе ПЭ/ЭА (1:1). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт представляет собой бесцветное масло. Выход 2,76 г (4,77 ммоль), 49%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7.41 (дд, 6H, 3Ph), 7.36 (тд, 6H, 3Ph), 7.29 (тд, 3H, 3Ph), 4,21 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,4 – 1,2 (м, 16H)

### 3.2.1.9. Синтез 1,2 – бис (2-бромэтокси)этана (9) [171]

К раствору триэтиленгликоля (1.96 г, 13 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавили трифенилфосфин (7 г, 26.7 ммоль), затем  $\text{CBr}_4$  (8.7 г, 26.2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 часов. Отфильтровали белый осадок. Раствор упарили и образовавшееся масло растворили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Добавили петролейный эфир и выпавший осадок отфильтровали. Фильтрат упарили и делили колоночной хроматографией на силикагеле в системе 4:1 петролейный эфир/этилацетат. Выход: 2.23 г (62%) бесцветного масла:  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 3.49 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.69 (s, 4H), 3.83 (t, J = 6.0 Hz, 4H).

### 3.2.1.10. Синтез S-2-(2-(2-фталимидоэтокси)этокси)этил этантиоацетат (10)

Синтез проводили по методике аналогичной [172]. К раствору дибромида **9** (1.25 г, 4.56 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавили фталимид калия (844 мг, 4.56 ммоль) в ДМФ (3мл).



Реакционную смесь кипятили при перемешивании в течение 5 часов. Раствор упарили и остаток растворили в этилацетате, промыли водой, солью и сушили над  $MgSO_4$ . Раствор упарили и делили колоночной хроматографией на силикагеле в системе 2:1 петролейный эфир/этилацетат.  $R_f = 0,63$ . Получили 1-(2-(2-фталимидоэтокси)этокси)-2-бромэтан в виде прозрачного масла.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  3.31 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.56 (m, 4H), 3.66 (m, 4H), 3.83 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 7.6-7.8 (m, 4H).

Полученный 1-(2-(2-фталимидоэтокси)этокси)-2-бромэтан растворили в ацетонитриле (10 мл), к нему прибавили карбонат калия (755 мг, 5.45 ммоль) и тиоуксусную кислоту (0.39 мл, 5.45 ммоль). Реакционную смесь кипятили при перемешивании в течение 2 часов. Раствор упарили и осадок растворили в этилацетате, промыли  $NH_4Cl$ , солью, сушили над  $MgSO_4$  и упарили. Делили колоночной хроматографией на силикагеле в системе 1:1 петролейный эфир/этилацетат. Выход: 586 мг (38%) желтого масла:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2.23 (s, 3H), 2.94 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.44 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.49 (m, 2H), 3.54 (m, 2H), 3.66 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.81 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 7.6-7.8 (m, 4H).

#### **3.2.1.11. Синтез 2-(2-(2-(тиоэтокси)этокси)этанамина (11)**

Синтез проводили по методике аналогичной [173]. К раствору **10** (586 мг, 1.74 ммоль) в метаноле (15 мл) добавили гидразин (0.55 мл, 17 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 часов. Белый осадок отфильтровали и фильтрат упарили. Делили колоночной хроматографией на силикагеле в системе 5:1  $CH_2Cl_2/MeOH$ .  $R_f = 0,74$ . Выход: 119 мг (41%) бесцветного масла:  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2.64 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.88 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 3.52 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 3.56 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.57 (s, 4H).

#### **3.2.1.12. Синтез 2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этил 4-метилбензолсульфонат (12) [174]**

К раствору, содержащему триэтиленгликоль (3,75 мл, 28 ммоль, 7 экв.), триэтиламин  $Et_3N$  (0,6 мл, 4 ммоль, 1 экв.) и  $CH_2Cl_2$  (4 мл) при интенсивном перемешивании в атмосфере аргона в течение 2 часов добавили раствор тозилхлорида (750 мг, 4 ммоль, 1 экв.) в  $CH_2Cl_2$  (5 мл). Реакционную смесь перемешивали еще 24 часа, после чего добавили раствор  $HCl$  (1 M, 5 мл), воду (5 мл) и насыщенный раствор  $NaCl$  (6 мл). Из водной фракции провели экстракцию (3 раза по 4 мл  $CH_2Cl_2$ ). Объединенные органические фракции сушили над  $MgSO_4$ , после чего растворитель отогнали на роторном испарителе. Соединение **12** было выделено с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе чистого этилацетата в виде бесцветного масла.  $R_f = 0,68$ . Выход: 434 мг (36%).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.78 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH (ArH)), 7.33 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, CH (ArH)), 4.14 (dd,  $J = 9.2, 4.4$  Hz, 2H,  $CH_2$  (PEG)), 3.72 – 3.64 (m, 4H,  $CH_2$  (PEG)), 3.62 – 3.50 (m, 6H,  $CH_2$  (PEG)), 2.43 (s, 3H,  $CH_3$  (Ts)).

#### **3.2.1.13. Синтез 2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этил этантиоат (13)**

Синтез проводили по методике аналогичной [174]. К соединению **12** (200 мг, 0,66 ммоль, 1 экв.) в DMF (5 мл) добавили тиоацетат калия KSAc (120 г, 1,05 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона 24 часа. Затем к реакционной смеси добавили насыщенный раствор NH<sub>4</sub>Cl (1,7 мл), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 мл) и NaCl (0,33 мл), и полученный раствор интенсивно перемешивали в течение 15 минут. Из водной фракции провели экстракцию (2 раза по 5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Объединенные органические фракции были высушены над MgSO<sub>4</sub>, и растворитель был удален под вакуумом на масляном насосе. Соединение **13** очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе 1:1 петролейный эфир : этилацетат. R<sub>f</sub> = 0,79. Выход: 104 мг (76%) желтого масла. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.69 (dt, J = 8.0, 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (PEG)), 3.67 – 3.51 (m, 8H, CH<sub>2</sub> (PEG)), 3.06 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (PEG)), 2.34 – 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C(O)S).

#### **3.2.1.14. Синтез бис(2-(2-(2-(азидоэтокси)этокси)этил)дисульфида (14)**

Синтез проводили по методике аналогичной [174]. Раствор соединения **13** (104 мг, 0,50 ммоль) и триэтиламина Et<sub>3</sub>N (0,1 мл) в сухом эфире (0,4 мл) охладили до 0 °C в атмосфере аргона. Добавили мезилхлорид (30 мг, 0,25 ммоль), после чего раствору дали нагреться до комнатной температуры. Раствор сконцентрировали на роторном испарителе, после чего добавили 95% этанол (0,6 мл) и азид натрия NaN<sub>3</sub> (36 мг, 0,56 ммоль). Смесь перемешивали при нагревании в течение 24 часов, после чего дали остыть до комнатной температуры и сконцентрировали на роторном испарителе. Оставшееся вещество растворили в сухом диэтиловом эфире (4 мл), промыли раствором NaCl (2 раза по 4 мл) и высушили над MgSO<sub>4</sub> и упарили на роторном испарителе. Из полученной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе чистого этилацетата было выделено вещество **14**. R<sub>f</sub> = 0,49. Выход: 72 мг (62%) жёлтого масла. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.73 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (PEG)), 3.69 – 3.61 (m, 6H, CH<sub>2</sub> (PEG)), 3.38 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.88 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-SH).

### **3.2.2. Синтез аурофильных серосодержащих лигандов.**

#### **3.2.2.1. Реакции серосодержащих спиртов с производными аминокислот**

##### **3.2.2.1.1. Общая методика бис(11-гидроксиундецил)дисульфида и N-Вос-аминокислоты**

В плоскодонной колбе объемом 100 мл при перемешивании к раствору N-Вос-аминокислоты (2 экв) в 20 мл ТГФ добавляли дициклогексилкарбодиимид (ДЦК) (2,5 экв) и каталитические количества 4-диметиламинопиридина (ДМАП). К полученному раствору добавляли раствор бис(11-гидроксиундецил)дисульфида (1 экв) в 10 мл ТГФ. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течении 48ч. В процессе реакции выпадает белый осадок дициклогексилмочевины, который затем отфильтровывали на бумажном фильтре.

Фильтрат упаривали. Для выделения продукта реакции в индивидуальном виде полученную смесь исходных веществ и продукта реакции делят при помощи колоночной хроматографии.

#### 3.2.2.1.2. Реакция бис(11-гидроксиундецил)дисульфида и N-Вос-аланина

В результате реакции 295 мг (1,56 ммоль) N-Вос-L-аланина, 420 мг (2,03 ммоль) ДЦК, 317 мг (0,78 ммоль) бис(11-гидроксиундецил)дисульфида получили дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)аланинат (15). Элюент – петролейный эфир:этилацетат 3:1.  $R_f = 0,83$  Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 75 мг (0,1 ммоль), 15%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 5,09 (уш.с., 2H, NH), 4,29 (м, 2H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,12 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,67 (тр,  $J=7,33$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,64 (м, 8H), 1,44 (с, 18H, Вос), 1,38 (д,  $J=7,20$  Гц, 6H,  $\text{CH}_3\text{-C}^*$ ), 1,35-1,20 (м, 28H). Элементный анализ:  $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  формула вычислено С% – 60,96, Н% – 9,63, N% – 3,74; найдено: С% – 60,49, Н% – 9,91, N% – 3,76.

#### 3.2.2.1.3. Реакция бис(11-гидроксиундецил)дисульфида и Вос-фенилаланина

В результате реакции 80 мг (0,66 ммоль) N-Вос-L-фенилаланина, 170 мг (1,80 ммоль) ДЦК, 130 мг (0,33 ммоль) бис(11-гидроксиундецил)дисульфида получили дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)фенилаланинат (16). Система для колоночной хроматографии – петролейный эфир:этилацетат 4:1.  $R_f = 0,91$  Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 55 мг (0,13 ммоль), 19%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7,4-7,1 (м, 10H, Ph), 5,01 (уш.д.,  $J=7,62$ Гц, 2H, NH), 4,60 (м, 2H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,10 (тр.д.,  $J=6,46$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,10 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2,70 (тр,  $J=7,23$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,52 (м, 8H), 1,44 (с, 18H, Вос), 1,35-1,20 (м, 28H). Элементный анализ:  $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  формула вычислено С% – 66,63, Н% – 8,95, N% – 3,11; найдено: С% – 66,70, Н% – 8,87, N% – 3,10

#### 3.2.2.1.4. Реакция бис(11-гидроксиундецил)дисульфида и N-Вос-S-бензил-L-цистеина.

В результате реакции 156 мг (0,5 ммоль) N-Вос-S-бензил-L-цистеина, 150 мг (0,7 ммоль) ДЦК, 100 мг (0,25 ммоль) бис(11-гидроксиундецил)дисульфида получили 65 мг (27%) дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил-S-бензил)цистеината (17). Система для колоночной хроматографии – петролейный эфир:этилацетат 3:1.  $R_f = 0,89$  Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 65 мг (0,07 ммоль), 27%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7,35-7,20 (м, 10H, Ph), 5,35 (уш.д.,  $J=7,83$ Гц, 2H, NH), 4,53 (м, 2H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,13 (тр,  $J=6,44$ Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,73 (с, 4H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-S}$ ), 2,90-2,76 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-C}^*$ ), 2,68 (тр,  $J=7,20$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,65 (м, 8H), 1,46 (с, 18H, Вос), 1,35-1,20 (м, 28H). Элементный анализ:  $\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_4$  формула вычислено С% – 62,90, Н% – 8,48, N% – 2,81; найдено: С% – 62,70, Н% – 8,34, N% – 2,90. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 171.16 155.17, 137.73, 128.94, 128.54, 127.17, 79.96, 65.77, 53.18, 39.12, 36.59, 33.65, 29.69, 29.47, 29.21, 28.50, 28.33, 25.81

### 3.2.2.1.5. Реакция бис(11-гидроксиундецил)дисульфида и N-Вос-пролина

В результате реакции 75 мг (0,35 ммоль) N-Вос-L-пролина, 85 мг (0,43 ммоль) ДЦК, 70 мг (0,17 ммоль) бис(11-гидроксиундецил)дисульфида получили дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)пролинат (**18**). Система для колоночной хроматографии – петролейный эфир:этилацетат 5:1  $R_f = 0,81$ . Продукт представляет собой белое кристаллическое вещество. Выход: 30 мг (0,04 ммоль), 23%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 4,31 (м, 2H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,12 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,43 (д,  $J=7,04$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 2,67 (тр,  $J=7,33$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,9 (м, 4H), 1,64 (м, 8H), 1,44 (с, 18H, Вос), 1,35-1,20 (м, 28H). Элементный анализ:  $\text{C}_{42}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  формула вычислено С% – 62,96, Н% – 9,56, N% – 3,50; найдено: С% – 63,02, Н% – 9,65, N% – 3,50.

### 3.2.2.1.6. Общая методика снятия Вос-защиты

В круглодонной колбе объемом 50 мл при перемешивании к раствору производного серосодержащего спирта и N-Вос-аминокислоты в 20 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  добавляли 10 мл раствора трифторуксусной кислоты в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (в соотношении 1:5). Смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре в атмосфере аргона. Растворитель удаляли в вакууме.

### 3.2.2.1.7. Реакция снятия Вос-защиты с дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)аланината

В результате реакции 60 мг соединения **15** по общей методике **4.2.2.1.6**. получили 35 мг трифторуксусная соль дитиобис(ундекан-11,1-диил)бисаланината (**19**). Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 44 мг (0,08 ммоль), 85%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,02 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 4,33 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,12 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,67 (тр,  $J=7,33$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,64 (м, 8H), 1,38 (д,  $J=7,20$  Гц, 6H,  $\text{CH}_3\text{-C}^*$ ), 1,35-1,20 (м, 28H).

### 3.2.2.1.8. Реакция снятия Вос-защиты с дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)фенилаланината

В результате реакции 45 мг соединения **16** по общей методике **4.2.2.1.6**. получили 39 мг трифторуксусная соль дитиобис(ундекан-11,1-диил)бисфенилаланината (**20**). Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 39 мг (0,09 ммоль), 79%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,11 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 7,4-7,1 (м, 10H, Ph), 4,66 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,10 (тр.д.,  $J=6,46$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,10 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ), 2,70 (тр,  $J=7,23$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,52 (м, 8H), 1,35-1,20 (м, 28H).

### 3.2.2.1.9. Реакция снятия Вос-защиты с дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил-S-бензил)цистеината

В результате реакции 55 мг соединения **17** по общей методике **4.2.2.1.6**. получили 45 мг трифторуксусная соль дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(S-бензил)цистеината (**21**). Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 45 мг (0,05 ммоль), 87%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,

$\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,01 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 7,35-7,20 (м, 10H, Ph), 4,68 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,13 (тр,  $J=6,44$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,73 (с, 4H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-S}$ ), 2,90-2,76 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-C}^*$ ), 2,68 (тр,  $J=7,20$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,65 (м, 8H), 1,35-1,20 (м, 28H).

#### **3.2.2.1.10. Реакция снятия Вос-защиты с дитиобис(ундекан-11,1-диил)бис(N-третбутоксикарбонил)пролината**

В результате реакции 20 мг соединения **18** по общей методике **4.2.2.1.6.** получили 7 мг трифторуксусная соль дитиобис(ундекан-11,1-диил)биспролината (**22**). Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 7 мг (0,01 ммоль), 51%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,12 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 4,41 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 4,12 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,43 (д,  $J=7,04$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ) 2,67 (тр,  $J=7,33$  Гц, 4H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,9 (м, 4H), 1,64 (м, 8H), 1,44 (с, 18H, Вос), 1,35-1,20 (м, 28H).

#### **3.2.2.1.11. Общая методика 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ола (8) и N-Вос-аминокислоты:**

В плоскодонной колбе объемом 100 мл при перемешивании к раствору N-Вос-аминокислоты (1,1 экв) в 20 мл метилена добавляли ДЦК (1,5 экв) и каталитические количества ДМАП. К полученному раствору добавляли раствор 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ола (**8**) (1 экв) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течении 48ч. В процессе реакции выпадает белый осадок дициклогексилмочевины, который затем отфильтровывали на бумажном фильтре. Фильтрат упаривали. Для выделения продукта реакции в индивидуальном виде полученную смесь исходных веществ и продукта реакции делят при помощи колоночной хроматографии.

#### **3.2.2.1.12. Реакция N-Вос-S-бензил-цистеина и 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ола**

В результате реакции 100 мг N-Вос-S-бензил-цистеина, 90 мг ДЦК, 10 мг ДМАП и 580 мг спирта **8** по общей методике **4.2.2.1.11** было получено 40 мг **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ил-3-(бензилтио)-2-((третбутоксикарбонил)амино)пропаноата (23)**. Из полученной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе чистого этилацетата было выделено вещество **23**.  $R_f = 0,39$ . Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 40 мг (0,046 ммоль), 16%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7,41 (дд, 6H, 3Ph), 7,36 (тд, 6H, 3Ph), 7,28 (тд, 3H, 3Ph), 7,35-7,30 (м, 5H, Ph), 5,35 (уш.д.,  $J=7,83$  Гц, 1H, NH), 4,53 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,73 (с, 2H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-S}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,90-2,76 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}^*$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,46 (с, 18H, Вос), 1,4 – 1,2 (м, 16H). Элементный анализ:  $\text{C}_{51}\text{H}_{69}\text{NO}_7\text{S}_2$  формула вычислено С% – 70,23, Н% – 7,97, N% – 1,61; найдено: С% – 69,98, Н% – 7,98, N% – 1,59.

### 3.2.2.1.13. Реакция N-Вос-аланина и 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ола

В результате реакции 100 мг N-Вос-аланина, 99 мг ДЦК, 15 мг ДМАП и 278 мг спирта **8** по общей методике **4.2.2.1.11** было получено 148 мг **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)пропаноата (24)**. Из полученной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе чистого этилацетата было выделено вещество **24**.  $R_f = 0,36$ . Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 148 мг (0,20 ммоль), 41%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7.41 (дд, 6H, 3Ph), 7.36 (тд, 6H, 3Ph), 7.28 (тд, 3H, 3Ph), 5,38 (уш.с., 1H, NH), 4,41 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,75 (д, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C}^*$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,46 (с, 18H, Вос), 1,4 – 1,2 (м, 16H). Элементный анализ:  $\text{C}_{51}\text{H}_{69}\text{NO}_7\text{S}_2$  формула вычислено С% – 70,46, Н% – 8,47, N% – 1,87; найдено: С% – 70,01, Н% – 8,39, N% – 1,69.

### 3.2.2.1.14. Реакция N-Вос-фенилаланина и 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиодокосан-22-ола

В результате реакции 100 мг N-Вос-фенилаланина, 106 мг ДЦК, 16 мг ДМАП и 198 мг спирта **8** по общей методике **4.2.2.1.11** было получено 96 мг **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)фенилпропаноата (25)**. Из полученной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе чистого этилацетата было выделено вещество **25**.  $R_f = 0,41$ . Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 96 мг (0,117 ммоль), 34%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7.41 (дд, 6H, 3Ph), 7.36 (тд, 6H, 3Ph), 7.28 (тд, 3H, 3Ph), 7,35-7,30 (м, 5H, Ph), 5,21 (уш.с., 1H, NH), 4,34 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,87 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,46 (с, 18H, Вос), 1,4 – 1,2 (м, 16H). Элементный анализ:  $\text{C}_{51}\text{H}_{69}\text{NO}_7\text{S}_2$  формула вычислено С% – 70,46, Н% – 8,47, N% – 1,87; найдено: С% – 70,84, Н% – 8,53, N% – 1,93.

### 3.2.2.1.15. Реакция снятия Вос-защиты с 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-3-(бензилтио)-2-((третбутоксикарбонил)амино)пропаноата

В результате реакции 20 мг соединения **23** по общей методике **4.2.2.1.6** получили 16 мг трифторацетат **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-3-(бензилтио)-2-((амино)пропаноата (26)**. Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 16 мг (0,021 ммоль), 91%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,21 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 7.41 (дд, 6H, 3Ph), 7.36 (тд, 6H, 3Ph), 7.28 (тд, 3H, 3Ph), 7,35-7,30 (м, 5H, Ph), 4,72 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,73 (с, 2H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-S}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,11-3,01 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}^*$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,4 – 1,2 (м, 16H).

### 3.2.2.1.16. Реакция снятия Вос-защиты с 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)пропаноата

В результате реакции 74 мг соединения **24** по общей методике **4.2.2.1.6.** получили 55 мг трифторацетат **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)пропаноата (27)**. Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 55 мг (0,082 ммоль), 91%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,42 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 7,41 (дд, 6H, 3Ph), 7,36 (тд, 6H, 3Ph), 7,28 (тд, 3H, 3Ph), 4,58 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,68 (д, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C}^*$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,4 – 1,2 (м, 16H).

**3.2.2.1.17. Реакция снятия Вос-защиты с 1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)фенилпропаноата (28)**

В результате реакции 48 мг соединения **25** по общей методике **4.2.2.1.6.** получили 42 мг трифторацетат **1,1,1-трифенил-14,17,20-триокса-2-тиадокосан-22-ил-2-((третбутоксикарбонил)амино)фенилпропаноата (28)**. Продукт представляет собой желтое масло. Выход: 42 мг (0,055 ммоль), 94%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 8,34 (уш.с., 3H,  $\text{NH}_3$ ), 7,41 (дд, 6H, 3Ph), 7,36 (тд, 6H, 3Ph), 7,28 (тд, 3H, 3Ph), 7,35-7,30 (м, 5H, Ph), 4,51 (м, 1H,  $\text{C}^*\text{H}$ ), 3,92 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,65 (м, 10H, ТЭГ), 3,42 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 2,87 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2,43 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 1,61 (м, 2H), 1,4 – 1,2 (м, 16H).

### **3.2.2.2. Реакции липоевой кислоты с производными аминокислот**

#### **3.2.2.2.1. Общая методика получения амидов липоевой кислоты**

В коническую колбу на 50 мл снабженную магнитной мешалкой помещали липоевую (тиоктовую) кислоту (1,1экв), ДЦК (1,1экв) и каталитическое количество кристаллов ДМАП и добавляли 3 мл сухого пиридина, затем к суспензии добавляли эфир аминокислоты (1экв). Реакция проводится в атмосфере инертного газа (аргон). Реакционную смесь перемешивали в течении 24 часов, затем при пониженном давлении пиридин удаляли, обрабатывали полученное твердое вещество смесью этилацетат-вода, затем разделяли органическую и водную фазы. Органическую фазу сушат над сульфатом натрия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и удаляли растворитель при пониженном давлении. Для выделения продукта реакции в индивидуальном виде полученную смесь исходных веществ и продукта делят при помощи колоночной хроматографии.

#### **3.2.2.2.2. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира аланина**

В результате реакции 530 мг (2,57 ммоль) липоевой кислоты, 530 мг (2,57 ммоль) ДЦК, 270 мг (2,34 ммоль) этилового эфира D,L-аланина получили **этил N-[5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентаноил]аланинат (29)**. Система для колоночной хроматографии–хлороформ:метанол 20:1.  $R_f = 0,65$ . Продукт представляет собой маслянистую жидкость желтого цвета. Выход: 250 мг (0,82 ммоль), 35%. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 173.11, 172.39, 61.43, 56.33, 48.01, 40.18, 38.44, 36.08, 33.26, 25.23, 24.72, 18.18, 14.15. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ,

м.д.): 5,82(уш.д., 1H, NH), 4,35 (кв, J=6,3Гц NH-CH-C=O), 4,21(кв., J=7,1Гц, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,6 (м, 1H, CH-S-S), 2,68(тр., J=7,4Гц, 2H, CH<sub>2</sub>-S-S), 2,50 (м., 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S), 2,21 (тр., J=7,5Гц, 2H, CH<sub>2</sub>C=O), 1,95 (м, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1,48(тр., J=6,7Гц, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,27 (тр., J=7,8Гц, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) Масс-спектр (m/z (I, %)): 305 (100 %) (M<sup>+</sup>). ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 1660 (C(O)NH), 1740 (COOR), 3330 (NH).

#### 3.2.2.2.3. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира фенилаланина

В результате реакции 400 мг (2 ммоль) липоевой кислоты, 400 мг (2 ммоль) ДЦК, 300 мг (1,55 ммоль) этилового эфира L-фенилаланина получили **этил N-[5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентаноил]фенилаланинат (30)**. Система для колоночной хроматографии – хлороформ:метанол 9:1. R<sub>f</sub> = 0,68. Продукт представляет собой рыже-коричневую маслянистую жидкость. Выход: 140 мг (0,37 ммоль), 24%. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400МГц, CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.) 7,25-7,10 (м, 5H, Ph), 6,18 (уш.д., 1H, NH), 4,84 (м, NH-CH-C=O), 4,14 (кв., J=7,24Гц, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,50 (п, 1H, J=6,46, CH-S-S), 3,15-3,00 (м, 4H, CH<sub>2</sub>Ph+CH<sub>2</sub>-S), 2,41 (м., 1H), 2,15 (тр., J=6,85Гц, 2H, CH<sub>2</sub>C=O), 1,86 (м, 1H), 1,72-1,3 (м, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1,21 (тр., J=7,04Гц, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C (100МГц, CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 172.29, 171.72, 135.98, 129.30, 128.51, 127.06, 61.50, 56.34, 53.00, 40.21, 38.47, 37.97, 36.16, 34.61, 28.76, 25.21, 14.13. Элементный анализ: C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>S<sub>2</sub> формула вычислено C% – 55,21, H% – 6,54, N% – 3,39, S% – 15,50; найдено: C% – 55,42, H% – 6,45, N% – 3,49, S% – 15,47. ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 1660 (C(O)NH), 1740 (COOR), 3330 (NH).

#### 3.2.2.2.4. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира тирозина

В результате реакции 65 мг (0,31 ммоль) липоевой кислоты, 65 мг (0,31 ммоль) ДЦК, 55 мг (0,26 ммоль) этилового эфира L-тирозина получили **этил N-[5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентаноил]тирозинат (31)**. Система для колоночной хроматографии – хлороформ:метанол 95:5 R<sub>f</sub> = 0,75. Продукт представляет собой коричневую маслянистую жидкость. Выход: 30 мг (0,08 ммоль), 29%. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400МГц, CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.) 7,14 (д, J=8,2Гц, 2H, HC<sub>аром</sub>), 7,03 (д, J=8,5Гц, 2H, HC<sub>аром</sub>), 5,95(уш.д., 1H, NH), 4,88 (кв, J=5,8Гц NH-CH-C=O), 4,20(кв., J=7,2Гц, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,6 (м, 1H, CH-S-S), 3,21(м., 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH), 2,68(тр., J=7,5Гц, 2H, CH<sub>2</sub>-S-S), 2,50 (м., 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S), 2,21 (тр., J=7,5Гц, 2H, CH<sub>2</sub>C=O), 1,95 (м, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1,27 (тр., J=7,8Гц, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C (100МГц, CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 173.35, 171.78, 155.40, 130.79, 127.31, 115.30, 60.96, 56.26, 53.01, 40.13, 38.39, 37.96, 36.82, 33.54, 26.58, 25.51, 13.89. ИК-спектр (см<sup>-1</sup>): 1660 (C(O)NH), 1740 (COOR), 3330 (NH). Масс-спектр (m/z (I, %)): 397 (85 %) (M<sup>+</sup>)

#### 3.2.2.2.5. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира триптофана

В результате реакции 80 мг (0,35 ммоль) липоевой кислоты, 80 мг (0,35 ммоль) ДЦК, 60 мг (0,26 ммоль) этилового эфира L-триптофана получили **этил N-[5-(1,2-дитиолан-3-**



**ил)пентаноил]триптофанат (32).** Система для колоночной хроматографии – хлороформ:метанол 9:1  $R_f = 0,58$ . Продукт представляет собой рыже-коричневую маслянистую жидкость. Выход: 25 мг (0,06 ммоль), 23%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 7,63 (д, 1H,  $J=7,63$  Гц,  $\text{HC}_{\text{аром}}$ ), 7,41 (д, 1H,  $J=8,02$  Гц,  $\text{HC}_{\text{аром}}$ ), 7,26 (с, 1H,  $\text{HC}_{\text{аром}}$ ), 7,13 (тр.д., 1H,  $J_1=7,04$ Гц,  $J_2=0,98$ Гц,  $\text{HC}_{\text{аром}}$ ), 7,10 (тр.д., 1H,  $J_1=7,04$ Гц,  $J_2=0,79$ Гц,  $\text{HC}_{\text{аром}}$ ), 4,48 (кв,  $J=5,8$ Гц  $\text{NH}-\underline{\text{CH}}-\text{C}=\text{O}$ ), 4,20(кв.,  $J=7,2$ Гц, 2H,  $\text{O}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$ ), 3,6 (м, 1H,  $\text{CH}-\text{S}-\text{S}$ ), 3,37 (м, 2H,  $\underline{\text{CH}}_2-\text{C}^*$ ), 2,68(тр.,  $J=7,5$ Гц, 2H,  $\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}$ ), 2,50 (м., 2H,  $\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}$ ), 2,21 (тр.,  $J=7,5$ Гц, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 1,95 (м, 6H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1,27 (тр., 3H,  $J=7,05$  Гц,  $\text{CH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 174.89, 171.92, 136.76, 127.78, 123.68, 121.66, 119.38, 119.24, 111.73, 109.84, 59.36, 56.26, 55.98, 40.13, 38.37, 36.82, 33.54, 27.63, 26.58, 14.05. Масс-спектр ( $m/z$  (I, %)): 420 (100 %) ( $\text{M}^+$ ). ИК-спектр ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1660 ( $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ ), 1740 ( $\text{COOR}$ ), 3330 ( $\text{NH}$ ).

#### 3.2.2.2.6. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира пептида Ala-Gly

В результате реакции 194 мг (0,94 ммоль) липоевой кислоты, 194 мг (0,94 ммоль) ДЦК, 126 мг (0,72 ммоль) этилового эфира дипептида аланин-глицин получили **этил 2-(2-(5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентанамидо)пропанамидо)ацетат (33)**. Система для колоночной хроматографии –хлороформ:метанол 12:1  $R_f = 0,47$ . Продукт представляет собой желтую маслянистую жидкость. Выход: 167 мг (0,46 ммоль), 49%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.) Спектр ЯМР 1H (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.) 6,01 (уш.с., 1H, NH), 5,83 (уш.с., 1H, NH), 4,48 (м, 1H,  $\text{NH}-\text{C}^*\text{H}-\text{C}=\text{O}$ ), 4,12 (м, 2H,  $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ ), 4,01 (кв., 2H,  $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 3,50 (м, 1H,  $\text{CH}-\text{S}-\text{S}$ ), 3,15 (д, 3H,  $\text{CH}_3-\text{CH}^*$ ), 3,00 (м, 2H,  $\text{CH}_2-\text{S}$ ), 2,41 (м., 1H), 2,15 (тр., 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 1,87 (м, 1H), 1,72-1,3 (м, 6H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1,21 (тр, 3H,  $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ). Элементный анализ:  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$  формула вычислено C% – 49,70, H% – 7,23, N% – 7,73, S% – 17,65; найдено: C% – 49,82, H% – 7,22, N% – 7,81, S% – 17,63.

#### 3.2.2.2.7. Реакция липоевой кислоты и этилового эфира пептида Phe-Ala

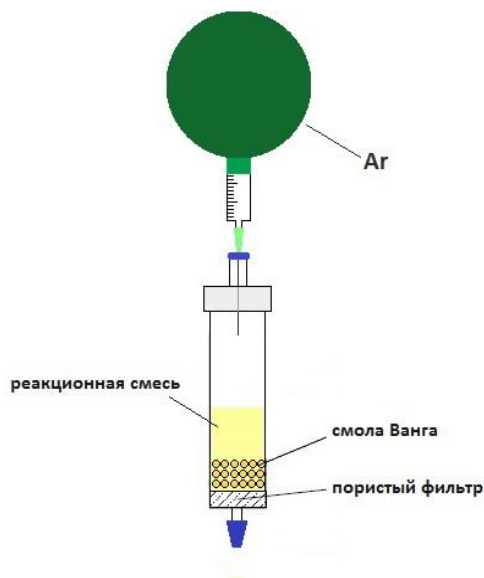
В результате реакции 248 мг (0,94 ммоль) липоевой кислоты, 194 мг (0,94 ммоль) ДЦК, 126 мг (0,72 ммоль) этилового эфира дипептида фенилаланин-аланин получили **ethyl 2-(2-(5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamido)-3-phenylpropanamido)propanoate** **этил 2-(2-(5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентанамидо)-3-фенилпропанамидо)пропаноат (34)**. Система для колоночной хроматографии –хлороформ:метанол 12:1  $R_f = 0,49$ . Продукт представляет собой желтую маслянистую жидкость. Выход: 144 мг (0,32 ммоль), 36%. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.) 7,20-7,10 (м, 5H, Ph), 6,19 (уш.д., 1H, NH), 5,58 (уш.д., 1H, NH), 4,84 (м, 1H,  $\text{NH}-\text{C}^*\text{H}-\text{C}=\text{O}$ ), 4,62 (м, 1H,  $\text{NH}-\text{C}^*\text{H}-\text{C}=\text{O}$ ), 4,10 (кв., 2H,  $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 3,50 (м, 1H,  $\text{CH}-\text{S}-\text{S}$ ), 3,20 (д, 3H,  $\text{CH}_3-\text{CH}^*$ ), 3,15-3,00 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{Ph}+\text{CH}_2-\text{S}$ ), 2,40 (м., 1H), 2,31 (тр., 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 1,86 (м, 1H), 1,72-1,3 (м, 6H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1,15 (тр.,  $J=7,04$ Гц, 3H,  $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ). Элементный анализ:

$C_{22}H_{32}N_2O_4S_2$  формула вычислено С% – 58,38, Н% – 7,13, N% – 6,19, S% – 14,17; найдено: С% – 58,25, Н% – 7,22, N% – 6,21, S% – 14,36.

### 3.2.2.3. Твердофазный синтез пептидов на смоле Ванга

Синтез пептидов **1-8** на смоле Ванга проводили по модифицированной методике, основанной на литературных методиках [212].

#### 3.2.2.3.1. Иммунизация первой аминокислоты



100 мг смолы Ванга (1 ммоль/г, 0,1 ммоль) помещали в колонку с пористым фильтром, промывали сухими диметилформамидом (ДМФА) (5 x 2 мл), хлористым метиленом ( $CH_2Cl_2$ ) (5 x 2 мл), ДМФА (5 x 2 мл) и оставляли в 2 мл сухого ДМФА на 30 мин для набухания. Фмос-защищенную аминокислоту АК<sub>1</sub> (1 ммоль, 10 экв.) суспензировали в 7 мл сухого  $CH_2Cl_2$ , прибавляли 0,5 мл ДМФА и охлаждали раствор до 0 °С. К раствору добавляли 78 мкл (0,5 ммоль) диизопропилкарбодиимида (ДИК) и реакционную смесь перемешивали при охлаждении в течение 20 мин. По окончании реакции растворитель удаляли при пониженном давлении при комнатной температуре. Полученный симметричный ангидрид растворяли в 2 мл сухого ДМФА и добавляли к набухшей смоле. Затем прибавляли раствор 1,3 мг (10 мкмоль) (ДМАП) в 0,5 мл сухого ДМФА и оставляли реакционную смесь перемешиваться в течение 2 ч. После окончания реакции смолу отфильтровывали и промывали сухими ДМФА (5 x 2 мл),  $CH_2Cl_2$  (5 x 2 мл), ДМФА (5 x 2 мл).

#### 3.2.2.3.2. Определение степени иммунизации АК<sub>1</sub> на смолу Ванга

Образцы сухой смолы (2 x 1 мг) обрабатывали 3 мл 20% раствора пиперидина в ДМФА в течение 4 минут, затем помещали растворы в кюветы для УФ-спектрофотометра и регистрировали поглощение каждого образца при 300 нм. Загрузку первой аминокислоты рассчитывали по уравнению:

$$\text{ммоль/г} = (\text{Abs}_{\text{раствора}} - \text{Abs}_{\text{сравнения}}) / (1,28 * \text{мг образца}).$$

Если выход реакции иммобилизации меньше 90%, посадку АК<sub>1</sub> следует повторить.

#### **3.2.2.3.3. Снятие Fmoc-защиты**

Набухшую смолу, после пришивания первой АК, промывания и проверки заполнения поверхности, обрабатывали 2 мл 20% раствора пиперидина в ДМФА в течение 5 минут, затем раствор спускали и промывали смолу сухим ДМФА (2 x 2 мл). Процедуру повторяли до 4-х раз, после чего смола промывается ДМФА (4 x 2 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 мл).

*Замечание: Смола не должна оставаться сухой в течение всей процедуры снятия защиты. Остаток пиперидина может привести к преждевременному снятию Fmoc-защиты, что снижает выход и чистоту продукта. Следует отметить продолжительность процедуры не более 5-10 мин, более длительное протекание реакции может приводить к разрыву связи пептида со смолой и снижать выход реакции.*

#### **3.2.2.3.4. Присоединение последующих аминокислот**

0,5 ммоль (5 экв.) Fmoc-аминокислоты АК<sub>2</sub>, 67,5 мг (0,5 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола (HOBT), 185,7 мг (0,49 ммоль) гексафторфосфата O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (HBTU) растворяли в 2 мл сухого ДМФА, затем добавляли 174 мкл (1 ммоль) диизопропилэтиламина (DIPEA), перемешивали и прибавляли полученный раствор к предварительно набухшей в ДМФА смоле. Реакционную смесь оставляли перемешиваться на 2 часа, после чего раствор спускали и промывали смолу сухими ДМФА (4 x 2 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 мл). Полноту протекания реакции определяли, проводя тест Кайзера на наличие свободных аминогрупп. Если тест дает положительный результат, конденсацию повторяли.

#### **3.2.2.3.5. Тест Кайзера**

В трех мерных колбах на 25 мл готовят следующие растворы: 1) 5% нингидрин в этаноле; 2) 80% фенол в этаноле; 3) KCN в пиридине (из расчета 2 мл 0,001 М водного раствора KCN на 98 мл пиридина).

Небольшое количество смолы из реакционного сосуда (~1 мг) промывали несколько раз этанолом, переносят в пробирку, добавляли по 3 капли каждого из приготовленных растворов и, встряхивая, нагревали при 120 °С в течение 4–6 мин. Глубокая темно-синяя окраска смолы и раствора свидетельствует о присутствии на смоле первичной аминной функции. Если же цвет остается желтым, то аминная функция на смоле отсутствует.

Стадии снятия Fmoc-защиты и конденсации следующей аминокислоты повторяли до получения требуемого пептида.

#### **3.2.2.3.6. Снятие пептида со смолы**

После последнего снятия Fmoc-защиты смолу промывали сухими ДМФА (4 x 2 мл), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 мл), MeOH (1 x 2 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 мл), после чего смолу сушили в вакууме. К

сухой смоле Ванга приливали 1,5 мл раствора TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) и оставляли смесь перемешиваться на 2 ч. Далее раствор спускали и промывали смолу 2 x 1 мл TFA/H<sub>2</sub>O (95/5). Собранный фильтрат упаривали при пониженном давлении. Продукт представляет собой белое или светло-желтое кристаллическое вещество.

Таблица 20. Твердофазный синтез пептидов **35-42**

	Пептид <b>35</b>	Пептид <b>36</b>	Пептид <b>37</b>	Пептид <b>38</b>
AK <sub>1</sub> , m(AK <sub>1</sub> )	Thr, 397 мг	Glu, 425 мг	Glu, 425 мг	Gly, 297 мг
AK <sub>2</sub> , m(AK <sub>2</sub> )	Thr, 198 мг	Glu, 212 мг	Glu, 212 мг	Gly, 149 мг
AK <sub>3</sub> , m(AK <sub>3</sub> )	Thr, 198 мг	Glu, 212 мг	Glu, 212 мг	Leu, 177 мг
AK <sub>4</sub> , m(AK <sub>4</sub> )	Thr, 198 мг	Glu, 212 мг	Glu, 212 мг	Val, 169 мг
AK <sub>5</sub> , m(AK <sub>5</sub> )	Thr, 198 мг	Lys, 234 мг	Glu, 212 мг	Phe, 193 мг
AK <sub>6</sub> , m(AK <sub>6</sub> )	Glu, 212 мг	Glu, 212 мг	Glu, 212 мг	Val, 169 мг
Выход, %	16	45	31	30
Данные MALDI	M(+H <sup>+</sup> )=653 M(+Na <sup>+</sup> )=675 M(+K <sup>+</sup> )=691	M(+H <sup>+</sup> )=792 M(+Na <sup>+</sup> )=814 M(+K <sup>+</sup> )=830	M(+H <sup>+</sup> )=793 M(+Na <sup>+</sup> )=815 M(+K <sup>+</sup> )=831	M(+H <sup>+</sup> )=592 M(+Na <sup>+</sup> )=614 M(+K <sup>+</sup> )=630
	Пептид <b>39</b>	Пептид <b>40</b>	Пептид <b>41</b>	Пептид <b>42</b>
AK <sub>1</sub> , m(AK <sub>1</sub> )	Leu, 353 мг	Lys, 468 мг	Met, 371 мг	Leu, 353 мг
AK <sub>2</sub> , m(AK <sub>2</sub> )	Ile, 177 мг	2-amino-cyclohexanecarboxylic acid, 183 мг	5-Aminovaleric acid, 170 мг	Ile, 177 мг
AK <sub>3</sub> , m(AK <sub>3</sub> )	Tyr, 202 мг	3-(3-pyridyl)-D-Ala, 194 мг	Glu, 212 мг	Tyr, 202 мг
AK <sub>4</sub> , m(AK <sub>4</sub> )	Pro, 169 мг	Met, 186 мг	Lys, 234 мг	Pro, 169 мг
AK <sub>5</sub> , m(AK <sub>5</sub> )	Arg, 397 мг	-	-	Homolys, 241 мг
AK <sub>6</sub> , m(AK <sub>6</sub> )	Arg, 397 мг	-	-	-
Выход, %	51	36	28	50
Данные MALDI	M(+H <sup>+</sup> )=819 M(+Na <sup>+</sup> )=841 M(+K <sup>+</sup> )=857	M(+H <sup>+</sup> )=552 M(+Na <sup>+</sup> )=574 M(+K <sup>+</sup> )=590	M(+H <sup>+</sup> )=507 M(+Na <sup>+</sup> )=529 M(+K <sup>+</sup> )=545	M(+H <sup>+</sup> )=648 M(+Na <sup>+</sup> )=670 M(+K <sup>+</sup> )=686

**Данные <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 95:5, DMSO d<sup>6</sup> δ, м.д):**

Пептид **35**: 8,24(с уш., 1H, NH), 7,19(с уш., 1H, NH), 6,72 (с уш., 1H, NH), 6,03(с уш., 1H, NH), 5,93 (с уш., 1H, NH), 5,87 (с уш., 1H, NH), 4,79 (м, 1H)б 4,69(д, 1H, J=7,1), 4,60 (д, 1H, J=8,5), 4,50 (д, 1H, J=3), 4,46 (м, 1H), 4,32-4,22 (м, 2H), 4,16-4,09 (м, 3H), 2, 49 (тр, 2H, J=6,3), 1,78-1,96 (м, 2H), 1,21 (д, 3H, J=6,3), 1,13 (д, 3H, J=7,1), 1,06 (д, 3H, J=7,3)

Пептид **36**: 8,86(с уш., 2H), 7,01(с уш., 1H), 6,54(с уш., 1H), 6,23(с уш., 1H), 6,08(с уш., 1H), 5,80(с уш., 1H), 5,50(с уш., 1H), 5,18(м, 2H), 4,78(м, 2H), 4,59(м, 1H), 4,28(м, 1H), 2,75(тр., 2H, J=7,5), 2,60(тр., 2H, J=7,5), 2,49(тр., 2H, J=7,5), 2,28(тр., 2H, J=7,3), 2,15(м, 6H), 1,95-1,77(м, 8H), 1,62-1,39(м, 6H)

Пептид **37**: 8,92(с уш., 2H), 7,09(с уш., 1H), 6,74 (с уш., 1H), 6,52(с уш., 1H), 6,08 (с уш., 1H), 5,89 (с уш., 1H), 5,29 (м, 1H), 5,15(м, 2H), 4,76 (м, 1H), 4,59(м, 1H), 4,28(м, 1H), 2,62(тр., 2H, J=6,9), 2,49(тр., 2H, J=7,3), 2,28 (тр, 2H, J=7,3), 2,15(м, 8H), 1,94-1,77 (м, 8H)

Пептид **38**: 8,31(с уш., 2H), 7,26(м.,5H), 7,01(с уш., 1H), 6,82 (с уш., 1H), 6,28(с уш., 1H), 5,94 (с уш., 1H), 5,57 (с уш., 1H), 4,36 (м,1H), 4,11(м, 2H), 4,03 (м, 4H), 3,90 (с, 2H), 3,65 (с, 2H), 3,07(м, 2H), 2,27(м, 1H), 1,62 (м, 1H), 1,52(м, 2H), 1,13 (д, 3H, J=5,9), 1,10 (д, 3H, J=5,9), 0,96 (д, 3H, J=6,3), 0,88 (м, 6H), 0,74 (д, 3H, J=6,3)

Пептид **39**: 8,24(д,J=7,3Гц,1H,NH);8,06(д,J=7,2Гц,1H,NH); 7,90(д,J=8,6Гц,1H,NH); 7,16(м,2H,NH,HO-Ar); 7,07(д,J=8,5Гц,2H,Ar); 6,78(д,J=8,5Гц,2H,Ar); 6,62(уш.с,2H,NH=); 4,08(м,2H,CH); 3,79(дт, J=7,0Гц,1H,CH); 3,59(м,1H,CH); 3,18(м,5H,CH+2CH<sub>2</sub>N); 2,95(м,3H,CH, CH<sub>2</sub>N); 1,97(м,2H,CH<sub>2</sub>); 1,89(м,2H,CH<sub>2</sub>);1,82-1,56(м,14H,CH<sub>2</sub>); 1,37(м,1H,CH); 1,07(м,1H,CH); 0,90(д,J=6,3Гц,3H,CH<sub>3</sub>); 0,84(м,6H,2CH<sub>3</sub>); 0,80(т,J=7,5Гц,3H,CH<sub>3</sub>)

Пептид **40**: 8,91;8,88(д,J=8,0Гц,1H,NH); 8,68(м,2H,Py); 8,49(д,J=6,6J,1H,Py); 8,12;8,04(д,J=7,7Гц,1H,NH); 8,00(м,1H,Py); 7,92(т,J=7,7Гц,1H,NH); 4,23-4,05(м,1H,CH); 4,01(м,1H,CH); 3,33(м,1H,CH); 3,15(м,1H,CH); 2,92(уш.с,2H,CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2,65(м,1H,CH); 2,32-1,70(м, 23H, CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub>)

Пептид **41**: 8.22(м,3H,NH), 7.51(уш.с,3H,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 4.00(т,J=6,7Гц,CH), 3.23(м,1H,CH), 3.15(м, 1H,CH), 2.97(м,2H,CH<sub>2</sub>), 2.59(м,2H,CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2.51(м,2H,CH<sub>2</sub>-S), 2.44(м,2H,CH<sub>2</sub>-NH), 2.29(т,J=7,4Гц,2H, CH<sub>2</sub>), 2.07(с,3H,CH<sub>3</sub>-S-), 1.93-2.18(м,4H,CH<sub>2</sub>), 1.87(м,2H,CH<sub>2</sub>), 1.67(м,2H,CH<sub>2</sub>), 1.57(м,2H,CH<sub>2</sub>), 1.49(м,2H,CH<sub>2</sub>), 1.40(м,2H,CH<sub>2</sub>)

Пептид **42**: 8.24 (д, J=7,3Гц, 1H, NH), 8.18 (д,J=7,3Гц, 1H, NH), 7.95 (д,J=7,3Гц, 1H, NH), 7.68 (уш.с, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.49 (уш.с, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.09 (д, J=8,5Гц, 2H, Ar), 6.80 (д, J=8,5Гц, 2H, Ar), 3.53 (м, 3H, CH), 2.95 (м, 10H, CH,CH<sub>2</sub>), 1.50-1.90 (м, 12H, CH<sub>2</sub>), 0.75-0.94 (м, 16H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>,CH)

### 3.2.2.3.7. Синтез амида липоевой кислоты и модельного пептида **43**

Реакцию взаимодействия пептида **38** с липоевой кислотой проводят аналогично конденсации АК по следующей разработанной нами методике: 67 мг (0,33 ммоль, 5 экв.) липоевой (тиоктовой) кислоты, 43,9 мг (0,33 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола (HOBT), 120,7 мг (0,32 ммоль) гексафторфосфата O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния (HBTU) растворяли в 1,3 мл сухого ДМФА, затем добавляли 113 мкл (0,65 ммоль) диизопропилэтиламина (DIPEA), перемешивали и прибавляли полученный раствор к 65 мкмоль смолы Ванга с загруженным пептидом ( $\leq 1$  ммоль/г). Реакционную смесь оставляли перемешиваться на 2 часа, после чего раствор спускали и промывали смолу сухими ДМФА (4 x 1,5 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 1,5 мл). Выход амида после снятия со смолы – 25%. Продукт охарактеризован данными масс-спектрометрии, и чистота доказана методом ВЭЖХ.

### 3.2.2.4. Конъюгат N-аминобактериопурпинимида с липоевой кислотой (ФС) **44**.

К раствору 30 мг (0.048 ммоль) N-аминобактериопурпинимида **3** в 5 мл хлористого метилена прибавляли 20 мг (0.096 ммоль) α-липоевой кислоты и 12 мг (0,048 ммоль) N-

карбоэтокси-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Полученный раствор перемешивали в течение 36 часов при комнатной температуре. Ход реакции контролировали спектрофотометрически и при помощи ТСХ. Затем реакцию смесь разбавляли 150 мл дистиллированной воды и экстрагировали хлористым метиленом до полного обесцвечивания хлороформного слоя (3x30 мл). Экстракты объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт очищали с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  (v/v 50:1).  $R_f = 0,36$ . Выход 65%. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $50^\circ\text{C}$ ,  $\delta$ , м.д.): 9.10 (с, 10-Н), 8.75 (с, 5-Н), 8.50 (с, 20-Н), 5.25 (м, 17-Н), 4.33 (м, 18-Н, 7-Н), 4.1 (м, 8-Н), 3.68 (с, 12- $\text{CH}_3$ ), 3.60 (д,  $J = 5,1$  Гц, 4Н,  $-\text{CHCH}_2\text{S}-$ ), 3.55 (с,  $17^5\text{-CH}_3$ ), 3.50 (с, 2- $\text{CH}_3$ ), 3.40–3.60 (1Н,  $-\text{CH}_2\text{CHS}-\text{S}$ ), 3.18 (с,  $3^2\text{-CH}_3$ ), 3.05–3.12 (2Н,  $-\text{CH}_2\text{S}-\text{S}-$ ), 2.75 (м,  $8^1\text{-CH}_2$ ), 2.42–2.50 (4Н,  $-\text{S}-\text{SCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}-\text{SCHCH}_2-$ ), 2.4 (м,  $17^2\text{-CH}_2$ ), 2.30 (т,  $J = 6,7$  Гц, 2Н,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 2.1 (м,  $17^1\text{-CH}_2$ ), 1.85 (д,  $J = 7$  Гц, 7- $\text{CH}_3$ ), 1.71–1.93 (2Н,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 1.70 (д,  $J = 8$  Гц, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.60–1.68 (2Н,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 1.12 (т,  $J = 7$  Гц,  $8^2\text{-CH}_3$ ), -0.25 (с, NH), -0.5 (с, NH). Масс-спектр, (MALDI),  $m/z$ : 799 ( $\text{M}^+$ ). UV-VIS ( $\text{H}_2\text{O}/\text{кремофор}$  4%),  $\lambda_{\text{max}}$  (относ. инт.): 365, 415 (Core), 551 и 824 (1: 0.68: 0.39: 0.92).

### 3.2.2.5. Синтез серосодержащего ПСМА-лиганда

#### 3.2.2.5.1. Синтез (9S,13S)-три-трет-бутил 3,11-диоксо-1-фенил-2-окса-4,10,12-триазапентадекан-9,13,15-трикарбоксилата (45)

Гидрохлорид дитретбутилового эфира L-глутаминовой кислоты (1.0 г, 3.38 ммоль) и триэтиламин (1,54, 11.09 ммоль) были растворены в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл), полученный раствор был охлажден до  $-78^\circ\text{C}$ . К полученному раствору был добавлен по каплям раствор трифосгена (341 мг, 1.15 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . После добавления раствора трифосгена температура реакции была постепенно доведена до комнатной температуры, после этого раствор перемешивался ещё в течение 30 мин. Далее в реакцию смесь был внесен раствор H-Lys(Z)-Ot-Bu (757 мг, 2.03 ммоль) и триэтиламина (283 мкл, 2.03 ммоль) в дихлорметане. Полученную реакцию смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. После этого реакция смесь была разбавлена 50 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , и промыта водой ( $2 \times 100$  мл). Объединенные органические фракции были высушены над сульфатом натрия. Растворитель был удален при пониженном давлении. Дальнейшую очистку полученной фракции проводили методом колоночной хроматографии (1.5:1 гексан: этилацетат). Продукт был выделен в виде безцветного маслянистого вещества (1 г., 79 %). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ , м.д.): 7.35 (м, 3Н, Ph), 7.33-7.30 (м, 2Н, Ph), 5.32 (с, 2Н,  $J = 4.6$  Гц,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.06-5.01 (м, 2Н,  $-\text{NHCO}-\text{NH}-$ ), 4.99 (с, 1Н, NH(Lys)), 4.34-4.31 (м, 2Н,  $\text{NHCHCOO}(t\text{-Bu})$  (Lys),  $\text{NHCHCOO}(t\text{-Bu})$  (Glu)), 3.20-3.18 (м, 2Н),

2.36-2.23, (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.10-2.03 (м, 1H), 1.88-1.75 (м, 2H), 1.65-1.57 (м, 1H), 1.57-1.45 (м, 2H), 1.49 (с, 9H, *t*-Bu), 1.47, (с, 9H, *t*-Bu), 1.45 (с, 9H, *t*-Bu), 1.40-1.30 (м, 2H). Спектр соединения соответствует литературным данным [213].

#### **3.2.2.5.2. Синтез 2-[3-(5-амино-1-трет-бутоксикарбонилфенил)уреидо] глутаминовой кислоты дитрет-бутиловый эфир (46)**

К раствору ((9S,13S)-три-трет-бутил 3,11-диоксо-1-фенил-2-окса-4,10,12-триазапентадекан-9,13,15-трикарбоксилата (1.0 г., 1.59 ммоль) в метаноле (30 мл) было добавлено 100 мг 10% Pd/C. Реакция проводилась в атмосфере водорода (p=1 атм.). Контроль окончания реакции проводился с помощью тонкослойной хроматографии. По окончании реакции полученная реакционная смесь была отфильтрована через диатомитовый порошок Celite. Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был выделен в виде постепенно кристаллизующейся жёлтой маслянистой жидкости (762 мг, 1.56 ммоль, 98%). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, м.д.): 5.03 (м, 2H, NH(мочевина)), 4.33 (м, 2H, NHCHCOO(*t*-Bu) (Lys), NHCHCOO(*t*-Bu) (Glu)), 3.29 (уш. с, NH<sub>2</sub>), 3.05 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.33 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.06-1.47 (м, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.45-1.40 (м, 27H, *t*-Bu). Спектр соединения соответствует литературным данным [209].

#### **3.2.2.5.3. Синтез 2-(3-(5-амино-1-карбоксипентил)уреидо)пентандиовая кислота (47)**

Удаление трех трет-бутильных групп с 2-[3-(5-амино-1-трет-бутоксикарбонилфенил)уреидо] глутаминовой кислоты дитрет-бутилового эфира (46) (19 мг, 0.026 ммоль) проводили в растворе 9:1 (TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), полученную реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, окончание реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии. После протекания реакции растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт представлял собой твердое кристаллическое вещество, выход 95 % (17 мг, 0.025 ммоль). T<sub>пл</sub>= 51°C Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, дмсо-d<sub>6</sub>, м.д.): 11.02 (с, 3H, COOH), 6.04 (уш.с., 2H, NH), 5.13 (с, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.55 (м, 2H, C<sup>\*</sup>H), 2.65 (м, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.33 (т, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 1.84-2.05 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.25-1.55 (м, 4H, CH<sub>2</sub>). HRMS (*m/z*) для C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: [M+H<sup>+</sup>], расщ.: 319.1435; найдено: 319.1447.

#### **3.2.2.5.4. Синтез ауروفильного производного ПСМА-лиганда (2-(3-(5-амино-1-карбоксипентил)уреидо)пентандиовой кислоты) (48)**

Реакция 100 мг полиэтиленгликоля 2 меркаптоэтилового эфира уксусной кислоты (6000 г/моль) с 2-(3-(5-амино-1-карбоксипентил)уреидо)пентандиовой кислотой (25 мг) в диметилформамиде 20 мл в присутствии N-гидроксисукцинимиде (10 мг) и EDC\*HCl (12 мг). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Вещество очищали диализом 2л воды. Масс-спектр, (MALDI), *m/z*: 6301 (M<sup>+</sup>). Выход 87%.

### 3.2.3. Синтез лигандов производных биотина

#### 3.2.3.1. Синтез Биотинил-N-гидроксисукцинимид (49)

В круглодонную колбу на 100 мл поместили 1,00 г ( $4,09 \cdot 10^{-3}$  моль) биотина. Добавили в колбу 50 мл диметилформаида, поместили в ультразвуковую баню для полного растворения биотина. В колбу поместили 0,941 г ( $4,91 \cdot 10^{-3}$  моль) EDC·HCl и 0,565 г ( $4,91 \cdot 10^{-3}$  моль) N-гидроксисукцинимид. Оставили перемешиваться на магнитной мешалке при комнатной температуре на ночь. Упарили DMF под вакуумом. Промыли из AcOH:EtOH:H<sub>2</sub>O = 1:95:4, поместили на фильтр Шотта, промыли спиртом и высушили. Выход 1,12 г (80%) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.42 (s, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, NH), 4.30 (m, 1H, NH-CH), 4.15 (m, 1H, NH-CH), 3.11 (q, *J* = 11.7, 7.2 Hz, 1H, CH-S), 2.87 – 2.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-S), 2.81 (s, 4H, NHS), 2.67 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-COONHS), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-S), 1.65 - 1.48 (m, 6H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-) MALDI: *m/z* 364 [M+Na] Элементный анализ: вычислено C (49,3%), H (5,6%), N (12,3%); найдено: C (48,95%), H (5,36%), N (12,30%)

#### 3.2.3.2. Синтез (N-биотинил)-6-аминогексановой кислоты (50)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, при охлаждении до 0°C поместили 0,115 г ( $8,79 \cdot 10^{-4}$  моль) 6-аминогексановой кислоты, 3,5 мл диоксана и 3,5 мл воды. Перемешивали в течение 5 минут, после чего добавили 0,300 г ( $8,79 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения **49** и продолжили перемешивание магнитной мешалкой в течение 12 часов при комнатной температуре. Выход 0,126 г (40%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.73 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 6.39 (d, *J* = 25.8 Hz, 2H, 2NH), 4.31 (m, 1H, CH-NH), 4.13 (m, 1H, CH-NH), 3.13 – 3.05 (m, 1H, CH-S), 3.01 (q, *J* = 12.6, 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 2.82 (dd, *J* = 12.5, 5.1 Hz, 1H, CH-S), 2.58 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, CH-S), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CONH), 2.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.68 – 1.18 (m, 12H).MALDI: *m/z* 381 [M+Na] Элементный анализ: вычислено C (53,8%), H (7,56%), N (11,8%), S (8,96%); найдено: C (54,1%), H (7,59%), N (11,8%), S (8,57%)

#### 3.2.3.3. Синтез метилового эфира N'-((N-биотинил)-аминогексаноил)-фенилаланина (51)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 8 мл диметилформаида, 0,108 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения **50**, 0,058 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) EDC·HCl, 0,037 г DMAP ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) и 0,065 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) гидрохлорида метилового эфира фенилаланина. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 12 часов, после чего вылили в воду и экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. После упаривания растворителя на роторном испарителе продукт был очищен методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:10. Выход 0,026 г (17%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.50 (s, 1H, NH), 7.31 (m, 5H, Ph), 6.80 (s, 1H, NH), 6.09 (s, 1H, NH), 4.91 (m, 1H, CH-Bn), 4.58 (m, 1H, CH-NH), 4.40



(m, 1H, CH-NH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.40 – 2.72 (m, 6H CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>CONH, CH<sub>2</sub>-CONH), 2.69 (s, 1H, CH-S), 2,26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph, NH-CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 12H). MALDI: m/z 542 [M+Na]

#### 3.2.3.4. Синтез метилового эфира N'-((N-биотинил)-аминогексаноил)-аланина (52)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 15 мл диметилформамида, 0,108 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения **50**, 0,058 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) EDC•HCl, 0,037 г DMAP ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) и 0,031 г ( $3,02 \cdot 10^{-4}$  моль) гидрохлорида метилового эфира аланина. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 12 часов, после чего вылили в воду и экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. После упаривания растворителя на роторном испарителе продукт был очищен методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1:7. Выход 0,028 г (25%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45 (s, 1H, NH), 6.79 (s, 1H, NH), 6.09 (s, 1H, NH), 4.91 (m, 1H, CH-CH<sub>3</sub>), 4.58 (m, 1H, CH-NH), 4.40 (m, 1H, CH-NH), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.40 – 2.72 (m, 6H CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>CONH, CH<sub>2</sub>-CONH), 2.69 (s, 1H, CH-S), 2,26 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 1.61-0,84 (m, 12H). 1.36 (d, J=6.2 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>). MALDI: m/z 465 [M+Na]

#### 3.2.3.5. Синтез N'-((N-биотинил)-аминогексаноил)-фенилаланина (53)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,026 г ( $5,01 \cdot 10^{-5}$  моль) соединения **51**, 150 мкл 0,1M раствора NaOH ( $5,01 \cdot 10^{-5}$  моль), 800 мкл метанола и 250 мкл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 18 часов, после чего довели pH раствора до 2 разбавленной серной кислотой. Раствор с осадком поместили в пробирки Эппендорфа, центрифугировали, удалили супернатант. Полученный продукт высушили под вакуумом. Выход 0,018 г (71%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.49 (s, 1H, NH), 7.27 – 7.02 (m, 5H, Ph), 6.28 (s, 2H, NH(biotin)), 4.49 (m, 1H, CH-Bn), 4.31 (m, 1H, CH-NH), 4.14 (m, 1H, CH-NH), 2.80 (m, 6HCH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>CONH, CH<sub>2</sub>-CONH), 2.61 (d, J = 12.7 Hz, 1H, CH-S), 2.05 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph, NH-CH<sub>2</sub>), 1.71 – 0.97 (m, 12H). MALDI: m/z 528 [M+Na]

#### 3.2.3.6. Синтез N'-((N-биотинил)-аминогексаноил)-аланина (54)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,026 г ( $5,8 \cdot 10^{-5}$  моль) соединения **52**, 150 мкл 0,1M раствора NaOH ( $5,8 \cdot 10^{-5}$  моль), 1 мл метанола и 250 мкл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 18 часов, после чего довели pH раствора до 2 разбавленной серной кислотой. Раствор с осадком поместили в пробирки Эппендорфа, центрифугировали, удалили супернатант. Полученный продукт высушили под вакуумом. Выход 0,018 г (75%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.49 (s, 1H, NH), 6.28 (s, 2H, NH(biotin)), 4.38 (m, 1H, CH-CH<sub>3</sub>), 4.31 (m, 1H, CH-NH), 4.14 (m, 1H, CH-NH), 2.80 (m, 6H CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>CONH, CH<sub>2</sub>-CONH), 2.61 (d, J = 12.7 Hz, 1H, CH-S), 2.05 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 1.71-1,49, 1,23– 0.97 (m, 12H), 1.36 (d, J=6.2 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>) MALDI: m/z 429 [M+H]

### 3.2.3.7. Синтез гидрохлорида этилового эфира аланилглицина (55)

Синтез проводили по методике [213]. В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 8 мл этанола и охладили до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Прикапывали 0,4 мл  $\text{SOCl}_2$ , затем добавили 0,400 г ( $2,73 \cdot 10^{-3}$  моль) аланилглицина, довели полученную суспензию до  $-5^{\circ}\text{C}$ , и перемешивали 2 часа при  $40^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упарили на роторном испарителе, дважды добавляя по 30 мл спирта. Добавили диэтиловый эфир, отфильтровали выпавший осадок. Выход 0,460 г (80%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.70 (s, 1H, NH), 8.17 (s, 3H,  $\text{NH}_3$ ), 4.27 (s, 1H,  $\text{NH-CH-COOEt}$ ), 4.03 (q,  $J = 14.2, 7.1$  Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.98 – 3.77 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CONH}$ ), 1.51 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 1.25 – 1.05 (t,  $J = 6.0$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )

### 3.2.3.8. Синтез этилового эфира Fmoc(Вос)лизилаланилглицина (56)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой поместили 0,291 г ( $6,21 \cdot 10^{-4}$  моль) Fmoc(Вос)лизина, 4 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и охладили до  $0^{\circ}\text{C}$ . Добавили 0,130 г ( $6,17 \cdot 10^{-4}$  моль) гидрохлорида этилового эфира аланилглицина, 0,125 г ( $6,52 \cdot 10^{-4}$  моль)  $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ , 108 мкл ( $6,20 \cdot 10^{-4}$  моль) DIPEA, и перемешивали 16 часов при  $0^{\circ}\text{C}$ . Обработали хлороформом, последовательно промыли 1М раствором  $\text{NaOH}$ , водой, 1М раствором  $\text{HCl}$ , водой, раствором хлорида натрия. Сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили растворитель под вакуумом. Продукт очистили колоночной хроматографией на силикагеле в системе  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:5$ . Выход 0,05 г (13%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, Fmoc), 7.60 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc), 7.40 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc), 7.30 (dd,  $J = 15.8, 8.7$  Hz, 2H, Fmoc), 6.78 (s, 1H, NH), 6.62 (s, 1H, NH), 5.62 (s, 1H, NH), 4.75 (m, 1H, NH), 4.54 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.40 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.23 – 3.99 (m, 7H, Fmoc( $\text{CH}_2, \text{CH}$ ),  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH(Lys)}$ ), 1.88 - 1.64 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3$ ), 1.43 (s, 9H, Вос), 1.40 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 1.30 – 1.20 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MALDI:  $m/z$  648 [M+Na]

### 3.2.3.9. Синтез этилового эфира Вос-лизилаланилглицина (57)

Синтез проводили аналогично методике [214]. В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,110 г ( $1,76 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения (56), 10,7 мл 1% раствора пиперидина в диметилформамиде, перемешивали 3 часа при комнатной температуре, упарили растворитель под вакуумом, экстрагировали в системе петролейный эфир : вода = 1:1. Водную фазу отделяли, растворитель упаривали под вакуумом. Выход 0,053 г (75%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.79 (t,  $J = 13.9$  Hz, 1H, NH), 7.07 (s, 1H, NH), 4.71 (s, 1H, NH), 4.59 – 4.43 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.18 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.08 – 3.88 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 3.49 – 3.34 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 3.10 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH(Lys)}$ ), 1.61 – 1.31 (m, 18H, 9H – Вос, 6H -  $(\text{CH}_2)_3$ , 3H -  $\text{CHCH}_3$ ), 1.30 – 1.19 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MALDI:  $m/z$  426 [M+Na]

### 3.2.3.10. Синтез этилового эфира биотинил(Вос)лизилаланилглицина (58)

Синтез проводили по аналогично методике [215]. В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,129 г ( $3,20 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения **57**, 3,5 мл диметилформамида, 0,125 г ( $3,65 \cdot 10^{-4}$  моль) биотинил-N-гидроксиукцинимид, 330 мкл ( $1,93 \cdot 10^{-3}$  моль) DIPEA. Перемешивали 35 часов, упарили растворитель под вакуумом, промыли метанолом и высушили. Выход 0,020 г (10%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.24 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.89 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH), 6.72 (s, 1H, NH), 6.41 (s, 1H, NH(biotin)), 6.36 (s, 1H, NH(biotin)), 4.34 – 4.23 (m, 2H, CH-NHbiotin), 4.21 (m, 1H, m, 1H, NHCHCO), 4.13 (m, 1H, NH<sub>2</sub>CHCO), 4.11 – 4.03 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.31 (m, 1H, CH-S), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH(Lys)), 2.87 – 2.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-S), 2.67 (m, 2HCH<sub>2</sub>-CONH), 2.58 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-S) 2.11 (dd,  $J = 14.0, 7.0$  Hz, 3H), 1.70 – 1.40 (m, 6H, biotin-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1.37-1.20 (m, 9H, Вос, 6H - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, 3H - CHCH<sub>3</sub>-, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). MALDI:  $m/z$  652 [M+Na]

### 3.2.3.11. Синтез этилового эфира Вос-валилаланилглицина (59)

Синтез проводили аналогично методике [211].

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,142 г ( $6,53 \cdot 10^{-4}$  моль) (Вос)валина, 4 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, охладили до 0°C. Добавили 0,138 г ( $6,55 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения гидрохлорида этилового эфира аланилглицина, 0,125 г ( $6,52 \cdot 10^{-4}$  моль) EDC·HCl, 90мкл ( $6,52 \cdot 10^{-4}$  моль) триэтиламина, и перемешивали 16 часов при 0°C. Обработали хлороформом, последовательно промыли 1М раствором NaOH, водой, 1М раствором HCl, водой, раствором хлорида натрия. Сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили растворитель под вакуумом. Продукт очистили колоночной хроматографией на силикагеле в системе MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:5. Выход 0,061г (25%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.70 (s, 1H, NH), 6.46 (s, 1H, NH), 4.98 (s, 1H, NH), 4.60 – 4.49 (p,  $J = 7,2$  Hz, 14,57 Hz, 1H, CH(Ala)), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.00 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.91 (m, 1H, CH(Val)), 2.16 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.48 – 1.37 (m, 9H – Вос + 3HCH-CH<sub>3</sub>), 1.30 – 1.19 (3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.97 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)), 0.92 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)). MALDI:  $m/z$  396 [M+Na]. Элементный анализ: вычислено C (53,2%), H (8,6%), N (11,6%); найдено: C (53,29%), H (8,23%), N (11,30%)

### 3.2.3.12. Синтез трифторацетата этилового эфира валилаланилглицина (60)

Синтез проводили по методике [216]. В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,125 г ( $3,35 \cdot 10^{-4}$  моль) соединения **59**, 5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, охладили до 0°C, добавили 5 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали при комнатной температуре до полного расходования исходного соединения (контроль ТСХ). Упаривали растворитель под вакуумом, затем к продукту несколько раз добавляли метанол и упаривали на роторном испарителе для удаления остаточных количеств трифторуксусной кислоты. Выход 0,130 г (99%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.03 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, NH), 4.47 (m, 1H, CH(Ala)), 4.17 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.00 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.92 (m, 1H, CH(Val)), 2.25 (m,

1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (d, 3H, *J* = 5.2 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1.35 – 1.13 (m, 6H, 3H - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 3H - CH(CH<sub>3</sub>)), 0.92 (m, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)). MALDI: *m/z* 410 [M+Na]

### 3.2.3.13. Синтез этилового эфира биотинилвалилаланилглицина (61)

В круглодонную колбу на 25 мл, снабженную магнитной мешалкой, поместили 0,103 г (2,66·10<sup>-4</sup> моль) соединения **60**, 4,0 мл диметилформамида, 0,142 г (4,16·10<sup>-4</sup> моль) соединения биотинил-N-гидроксисукцинимид, 380 мкл (2,19·10<sup>-3</sup> моль) DIPEA. Перемешивали 35 часов, упарили растворитель под вакуумом, промыли метанолом и высушили. Выход 0,133 г (91%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 8.92 (s, 1H, ), 8.24 (t, *J*=6.26 Hz, 1H, NH), 7.94 (m, 1H, NH), 7.78 (d, *J*=8,61 Hz, 1H, NH), 6.41 (s, 1H, NH(biotin)), 6.32 (s, 1H, NH(biotin)), 4.28 (m, 2H, CH(Ala), NH-CH(biotin)), 4.14-4.00 (m, 3H, 2H - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 1H - NHCH(biotin)), 3.86-3.69 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.41 (m, 1H - CH(Val)), 3.06 (m, 5H, CH-S, CH<sub>2</sub>S, CH<sub>2</sub>CONH), 2.78 (dd, 1H), 2.56 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1HCH<sub>2</sub>S), 1.65-1.23 (m, 3H - CHCH<sub>3</sub>), 1.14 (m, 6H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1.15 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.18 (t, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)), 1.02 (t, 3HCH(CH<sub>3</sub>))MALDI: *m/z*523 [M+Na]

### 3.2.3.14. Общая методика конденсации биотина

0,5 ммоль (5 экв.) биотина, 67,5 мг (0,5 ммоль) 1-гидроксибензотриазола (HOBT), 185,7 мг (0,49 ммоль) гексафторфосфата O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (HBTU) растворяли в 2 мл сухого ДМФА, затем добавляли 174 мкл (1 ммоль) диизопропилэтиламина (DIPEA), перемешивали и прибавляли полученный раствор к предварительно набухшей в ДМФА смоле. Реакционную смесь оставляли перемешиваться на 2 часа, после чего раствор спускали и промывали смолу сухими ДМФА (4 x 2 мл) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 мл).

### 3.2.3.15. Синтез биотинилвалилфенилаланилфенилаланина (62)

В результате синтеза получено 44 мг тетрапептида Biotin-Lys-Phe-Phe-OH с выходом 35%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 8.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 7.30 – 7.11 (m, 10H, Ph), 6.41 (m, 2H, CHNH(biotin)), 4.55 (m, 1H, CHNH), 4.44 (q, *J* = 7.3, 13,5 Hz, 1H, CHNH), 4.29 (m, 1H, CH(Val)), 4.16 – 4.05 (m, 2H, 2CH(Phe)), 2.65-3.12 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-S, CH-S, CH<sub>2</sub>CONH(biotin), 2CH<sub>2</sub>Ph), 2.57 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH-S), 1.85 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.46 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). MALDI: *m/z* 676 [M+K]. Масс-спектр: *m/z* 638 [M+H].

### 3.2.3.16. Синтез биотиниллизилфенилаланилфенилаланина (63)

В результате синтеза получено 40 мг тетрапептида Biotin-Lys-Phe-Phe-OH с выходом 30%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ 8.32 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, NH,NH), 7.66 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.35 – 7.08 (m, 10H, 2Ph), 6.40 (d, *J* = 13.9 Hz, 2H, NH(biotin)), 4.53 (m, 1H, CH-NH), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, *J* = 13.1 Hz, 1H, CH-NH), 4.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CH(lys)), 4.13 (m,

2H, 2CH(phen)), 3.16 – 2.63 (m, 9H, 2CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CONH, CH-S, CH<sub>2</sub>-S), 2.08 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 1.47 - 1.28 (m, 12H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>). MALDI: m/z 667 [M+H]. Масс-спектр: m/z 667 [M+H].

### 3.2.3.17. Синтез этилового эфира биотина (64)

Синтез проводили по методике [217]. В круглодонную колбу поместили 0,2 г биотина, добавили 6,7 мл этанола и 2 капли концентрированной серной кислоты, затем кипятили 24 часа с обратным холодильником. Растворитель упаривали на роторном испарителе, затем экстрагировали в системе CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(водн). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали на роторном испарителе. Выход 0,131 г (59%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, cdCl<sub>3</sub>) δ 4.68 (m, 1H, CH-NH), 4.44 (m, 1H, CH-NH), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.23 (m, 1H, CH-S), 2.98 (d, J = 10.9 Hz, 1H, CH-S), 2.87 (d, J = 13.5 Hz, 1H, CH-S), 2.40 – 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 1.84 – 1.60 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, CH<sub>2</sub>-CH-S), 1.57 – 1.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.31 – 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

### 3.2.3.18. Общая методика синтеза хлорангидридов Fmoc-аминокислот

Синтез проводили по методике [218].

В круглодонной колбе суспензировали 1,2 ммоль Fmoc-аминокислоты в 2 мл сухого хлористого метилена, затем добавили 0,8 мл SOCl<sub>2</sub> и перемешивали час при 55°C с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой. Растворитель отгоняли под вакуумом, дважды добавляя 4 мл хлористого метилена. Полученный хлорангидрид сразу использовали в следующей стадии.

### 3.2.3.19. Общая методика ацилирования этилового эфира биотина хлорангидами Fmoc-аминокислот

В круглодонной колбе растворяли 93 мг этилового эфира биотина (64) в 4 мл толуола при нагревании, добавляли 1 экв (60 мкл) DIPEA и 1,2 экв Fmoc-аминокислоты, кипятили 2 часа с обратным холодильником под аргоном, затем упарили растворитель при пониженном давлении. Чистое вещество выделяли при помощи колоночной хроматографии в системе ПЭ:ЭА:MeOH 10:1:0,01.

### 3.2.3.20. Реакция этилового эфира биотина и хлорангида Fmoc-валина

По реакции 93 мг этилового эфира биотина с 143 мг FmocValCl по методике 4.2.3.21. было получено ацилированное производное 65. Чистое вещество было выделено при помощи колоночной хроматографии, выход 56 мг (0,095 ммоль) 28%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (m, 2H, Fmoc), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.40 (m, 2H, Fmoc), 7.34 (m, 2H, Fmoc), 5.67 (m, 1H, NH), 5.61 (m, 1H, NH), 4.87 (m, 1H, CH-NH), 4.58 – 4.49 (m, 1H, CH-NH), 4.49 – 4.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Fmoc)), 4.25 (m, 1H, CH-NH), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H, CHCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.18 (dd, J = 13.7, 5.6 Hz, 1H, CH-S), 3.09 (m, 1H, CH(Fmoc)), 2.98 – 2.85 (m, 1H, CH-S), 2.77 (d, J = 12.8 Hz, 1H, CH-S), 2.35 – 2.28 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOEt), 1.75 – 1.61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, CH<sub>2</sub>-CH-

S), 1.45 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.30 – 1.22 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). Масс-спектр:  $m/z$  594 [M+H].

### 3.2.3.21. Реакция этилового эфира биотина и хлорангидрида Fmoc-аланина

По реакции 93 мг этилового эфира биотина с 132 мг FmocAlaCl по методике 4.2.3.19. было получено ацилированное производное 66. Чистое вещество было выделено при помощи колоночной хроматографии, выход 33 мг (0,058 ммоль) 17%.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78 (m, 2H, Fmoc), 7.65 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, Fmoc), 7.41 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc), 7.37 – 7.31 (m, 2H, Fmoc), 5.57 (s, 1H, NH), 5.40 (s, 1H, NH), 4.56 – 4.49 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4.45 – 4.29 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.25 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4.14 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.74 – 3.59 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.18 (dd,  $J = 14.0, 5.3$  Hz, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 3.08 (dt,  $J = 13.5, 9.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{Fmoc})$ ), 2.99 – 2.87 (m, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 2.77 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 2.36 – 2.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOEt}$ ), 1.79 – 1.60 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH-S}$ ), 1.56 – 1.36 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.30 – 1.23 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MALDI:  $m/z$  604 [M+K]. Масс-спектр:  $m/z$  566 [M+H].

### 3.2.3.22. Реакция этилового эфира биотина и хлорангидрида Fmoc-фенилаланина (67)

По реакции 93 мг этилового эфира биотина с 153 мг FmocPheCl по методике 4.2.3.19. было получено ацилированное производное 67. Чистое вещество было выделено при помощи колоночной хроматографии, выход 74 мг (0,116 ммоль) 34%.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (m, 2H, Fmoc), 7.64 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, Fmoc), 7.39 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc), 7.37 – 7.31 (m, 2H, Fmoc), 7,01-6,95 (m, 5H, Ph), 5.58 (s, 1H, NH), 5.40 (s, 1H, NH), 4.56 – 4.49 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4.40 – 4.21 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.15 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4.04 (q, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.74 – 3.59 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.18 (dd,  $J = 14.0, 5.3$  Hz, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 3.08 (dt,  $J = 13.5, 9.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{Fmoc})$ ), 2.99 – 2.87 (m, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 2.77 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H,  $\text{CH-S}$ ), 2.36 – 2.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOEt}$ ), 1.79 – 1.60 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH-S}$ ), 1.56 – 1.36 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.30 – 1.23 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). MALDI:  $m/z$  680 [M+K]. Масс-спектр:  $m/z$  642 [M+H].

### 3.2.3.23. Общая методика снятия Fmoc-защиты и этилового эфира

В круглодонную колбу поместили  $5,05 \cdot 10^{-5}$  моль ацилированного производного этилового эфира биотина и добавили 5 мл 1М раствора LiOH (3экв – изб.) в смеси метанол-вода 1:1. Перемешивали в течение 12 часов. Добавили 0,1 М HCl до pH 3. Выпавший осадок отделили центрифугированием, высушили под вакуумом.

### 3.2.3.24. Синтез 5-(1-(2-амино-3-метилбутаноил)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)пентановая кислота (68)

По реакции 28 мг (0,048 ммоль) соединения 65 с гидроксидом лития было выделено 13 мг (0,037 ммоль) 78%.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,11 (s, 1H, COOH), 8,21 (s, 3H,  $-\text{NH}_3$ ), 5,67 (m, 1H, NH), 5,61 (m, 1H, NH), 4,87 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4,58 – 4,49 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4,25 (m, 1H,

CH-NH), 3,67 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,18 (dd, 1H, CH-S), 2,98 – 2,85 (m, 1H, CH-S), 2,77 (d, 1H, CH-S), 2,58 (t, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 1,75 – 1,61 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, CH<sub>2</sub>-CH-S), 1,45 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)  
Масс-спектр: *m/z* 344 [M+H].

### 3.2.3.25. Синтез 5-(1-(2-аминопропаноил)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)пентановая кислота (69)

По реакции 17 мг (0,029 ммоль) соединения **66** с гидроксидом лития было выделено 8 мг (0,025 ммоль) 87%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,01 (с, 1H, NH), 5,11 (д, 2H, NH<sub>2</sub>), 4,59 (м, 2H, CH), 3,74 (м, 1H, C\*H), 3,36 (м, 1H, C\*H-S), 3,10 (м, 1H, CH<sub>2</sub>-S), 2,85 (м, 1H, CH<sub>2</sub>-S), 2,30 (т, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH), 1,43-1,62 (м, 6H, CH<sub>2</sub>), 1,28 (д, 3H, CH<sub>3</sub>-CH\*). Масс-спектр: *m/z* 315 [M+H].

### 3.2.3.26. Синтез 5-(1-(2-амино-3-фенилпропаноил)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)пентановая кислота (70)

По реакции 37 мг (0,058 ммоль) соединения **67** с гидроксидом лития было выделено 13 мг (0,052 ммоль) 91%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,21 (с, 1H, COOH), 8,03 (с, 3H, -NH<sub>3</sub>), 7,25-7,01 (м, 5H, Ph), 5,64 (м, 1H, NH), 5,59 (м, 1H, NH), 4,87 (м, 1H, CH-NH), 4,56 – 4,49 (м, 1H, CH-NH), 4,25 (м, 1H, CH-NH), 3,42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3,18 (dd, 1H, CH-S), 2,98 – 2,85 (м, 1H, CH-S), 2,77 (д, 1H, CH-S), 2,63 (т, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 1,75 – 1,60 (м, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO, CH<sub>2</sub>-CH-S) Масс-спектр: *m/z* 392 [M+H].

## 3.2.4. Синтез производных силана

### 3.2.4.1. Синтез N-(4,4,4-триэтоксисиланбутил)сукцинаминовой кислоты (71)

1 г (9.9 ммоль) янтарного ангидрида растворили в сухом 1,4-диоксане при 60 °C в атмосфере аргона. При комнатной температуре по каплям добавили 2.1 мл (9.0 ммоль) (3-аминопропил)-триэтоксисилана в 10 мл 1,4-диоксана. Раствор перемешивали в течение 1 часа и профильтровали. После испарения растворителя был получен N-(4,4,4-триэтоксисиланбутил)сукцинаминовой кислоты (**49**). Продукт представляет собой бесцветное масло. <sup>1</sup>H NMR (м.д.) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.56–0.64 (т, 2H), 1.15–1.22 (т, 9H), 1.50–1.66 (м, 2 H), 2.44–2.50 (т, 2H), 2.60–2.71 (т, 2H), 3.15–3.25 (м, 2H), 3.77–3.89 (кв, 6H), 6.58–6.64 (с, 1H), 10.39–10.88 (с, 1H)

### 3.2.4.2. Реакция N-(4,4,4-триэтоксисиланбутил)сукцинаминовой кислоты с полиэтиленгликоль-2-аминоэтиловым эфиром уксусной кислоты (M=2000г/моль) (72)

Реакция 100 мг полиэтиленгликоль-2-аминоэтилового эфира уксусной кислоты (M=2000г/моль) с N-(4,4,4-триэтоксисиланбутил)сукцинаминовой кислотой (10 мг) в диметилформамиде 20 мл в присутствии N-гидроксисукцинимиды (6 мг) и EDC\*HCl (11 мг). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Вещество очищали диализом 2л воды. <sup>1</sup>H NMR (м.д.) (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>): δ 0.56–0.64 (т, 2H), 1.15–1.22 (т, 9H), 1.50–1.66 (м, 2 H), 2.44–2.50 (т, 2H), 2,55 (т, 2H), 2.60–2.71 (т, 2H), 3.15–3.25 (м, 2H), 3,50-3,55 (м, 180H), 3,68 (т,

2H), 3.87–3.93 (кв, 6H), 6.58–6.64 (с, 1H), 10.21–10.58 (с, 1H). Масс-спектр, (MALDI),  $m/z$ : 2309 ( $M^+$ ).

### **3.3. Синтез наночастиц и материалов на их основе**

#### **3.3.1. Синтез наночастиц золота**

##### **3.3.1.1. Синтез наночастиц золота размером $1,7 \pm 0,3$ нм (1н)**

В круглодонную колбу, объемом 250 мл, помещали 30 мл раствора 306мг  $H[AuCl_4]$  в дистиллированной воде и раствор 2,184г бромида тетраоктиламмония в 80мл толуола и смешивали два раствора при интенсивном перемешивании до того, как весь  $H[AuCl_4]$  переходит в органическую фазу. Затем в реакционную смесь добавляли 0,119мл гексантиола и по каплям приливали свежеприготовленный раствор боргидрида натрия ( 380мг  $NaBH_4$  в 25мл дистиллированной воды) при тщательном перемешивании. Перемешивание продолжали в течение 3 часов. Отделяли на делительной воронке органическую фазу, упаривали при пониженном давлении до 10мл, затем смешивали с 400мл этанола и оставляли при температуре  $-18^{\circ}C$  на 4 часа для осаждения. Выпавшие черно-коричневые кристаллы отфильтровывали и промывали этанолом.

##### **3.3.1.2. Синтез наночастиц золота размером $2,5 \pm 0,5$ нм (2н)**

В круглодонную колбу А на 100 мл, снабженную обратным холодильником прилили 40 мл DI воды и 0,5 мл 1%-ного раствора  $HAuCl_4$ . В круглодонную колбу В на 100 мл, снабженную обратным холодильником прилили 2 мл 1%-ного раствора цитрата натрия, 5 мл таниновой кислоты, 5 мл карбоната натрия (50 mM), 8 мл DI воды. Обе колбы нагрели при магнитном перемешивании до  $60^{\circ}C$ . Далее, содержимое обеих колб смешали при тщательном магнитном перемешивании и, после изменения окраски, нагреваем до  $95^{\circ}C$  и поддерживаем температуру 15 мин, после чего охладили до комнатной температуры.

##### **3.3.1.3. Синтез наночастиц золота размером $5 \pm 1$ нм (3н)**

В круглодонную колбу А на 100 мл, снабженную обратным холодильником прилили 40 мл DI воды и 0,5 мл 1%-ного раствора  $HAuCl_4$ . В круглодонную колбу В на 50 мл, снабженную обратным холодильником прилили 2 мл 1%-ного раствора цитрата натрия, 2,5 мл таниновой кислоты, 2,5 мл карбоната натрия (25 mM), 8 мл DI воды. Обе колбы нагрели при магнитном перемешивании до  $60^{\circ}C$ . Далее, содержимое обеих колб смешали при тщательном магнитном перемешивании и, после изменения окраски, нагреваем до  $95^{\circ}C$  и поддерживаем температуру 15 мин, после чего охладили до комнатной температуры.

##### **3.3.1.4. Синтез наночастиц золота размером $10 \pm 2$ нм (4н)**

В круглодонную колбу, объемом 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75мг  $H[AuCl_4] \cdot 3H_2O$  в 110мл дистиллированной воды и довели раствор до



кипения. Быстро добавляли 26.25мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течение одного часа. При кипении наблюдалось изменение цвета раствора со светло-желтого на вишневый через темные тона. При перемешивании раствор охлаждали до комнатной температуры. Далее частицы использовали в виде коллоидно стабильного раствора.

#### **3.3.1.5. Синтез наночастиц золота размером $25 \pm 3$ нм (5н)**

В круглодонную колбу, объемом 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75мг  $\text{H[AuCl}_4\text{]}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  в 110мл дистиллированной воды и доводили раствор до кипения. Быстро добавляли 19.5мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течение одного часа. При перемешивании раствор охлаждали до комнатной температуры. Далее частицы использовали в виде коллоидно стабильного раствора.

#### **3.3.1.6. Синтез наночастиц золота размером $40 \pm 3$ нм (6н)**

В круглодонную колбу, объемом 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75мг  $\text{H[AuCl}_4\text{]}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  в 110мл дистиллированной воды и доводили раствор до кипения. Быстро добавляли 13 мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течение одного часа. При перемешивании раствор охлаждали до комнатной температуры. Далее частицы использовали в виде коллоидно стабильного раствора.

#### **3.3.1.7. Синтез наночастиц золота размером $70 \pm 10$ нм (7н)**

В круглодонную колбу, объемом 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75мг  $\text{H[AuCl}_4\text{]}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  в 110мл дистиллированной воды и доводили раствор до кипения. Быстро добавляли 9 мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течение одного часа. При перемешивании раствор охлаждали до комнатной температуры. Далее частицы использовали в виде коллоидно стабильного раствора.

### **3.3.2. Синтез наночастиц магнетита**

#### **3.3.2.1. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $4 \pm 1$ нм (8н)**

В двугорлой колбе с обратным холодильником смешивали дифениловый эфир (20 мл), ацетилацетонат железа (III) (2 ммоль), олеиновую кислоту (6 ммоль), олеиламин (6 ммоль) и 1,2-гексадекандиол (10 ммоль). Полученный раствор нагревали в атмосфере аргона, довели до кипения при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и выдерживали при постоянной температуре в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры смесь промывали этанолом и выделяли наночастицы магнетита при помощи магнитной декантации. Для получения порошка наночастиц магнетита растворитель упаривали при пониженном давлении.

### **3.3.2.2. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $8 \pm 1$ нм (9н)**

В двугорлой колбе с обратным холодильником смешивали 5 мл наночастиц магнетита (8н), дифениловый эфир (20 мл), ацетилацетонат железа (III) (2 ммоль), олеиновую кислоту (6 ммоль), олеиламин (6 ммоль) и 1,2-гексадекандиол (10 ммоль). Полученный раствор нагревали в атмосфере аргона, довели до кипения при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и выдерживали при постоянной температуре в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры смесь промывали этанолом и выделяли наночастицы магнетита при помощи магнитной декантации. Для получения порошка наночастиц магнетита растворитель упаривали при пониженном давлении.

### **3.3.2.3. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $9 \pm 2$ нм (10н)**

Наночастицы магнетита были синтезированы методом соосаждения [75]. 4 мл 1 М водного раствора хлорида железа (III) и 1 мл 2 М водного раствора хлорида железа (II) с добавлением 10 мл 2 М HCl были перемешаны, после чего было добавлено 50 мл 0.7 М NH<sub>3</sub>(28%). Смесь перемешивали 30 мин на 500 об/мин. Затем осадок был отделен магнитной декантацией. Осадок перемешивали с добавлением 50 мл 2 М HClO<sub>4</sub>, затем осадок был отделен магнитной декантацией. Объем остатка был доведен до 50 мл водой. Для магнитных измерений наночастицы были отделены магнитной декантацией и суспензированы в этаноле, приготовленная суспензия была упарена при пониженном давлении.

### **3.3.2.4. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $16 \pm 2$ нм (11н)**

Наночастицы магнетита были синтезированы методом соосаждения [81]. 4 мл 1 М водного раствора хлорида железа (III) и 1 мл 2 М водного раствора хлорида железа (II) с добавлением 10 мл 2 М HCl были перемешаны, после чего было добавлено 50 мл 2 М NaOH. Смесь перемешивали 30 мин на 500 об/мин. Затем осадок был отделен магнитной декантацией. Осадок перемешивали с добавлением 50 мл 2 М HClO<sub>4</sub>, затем осадок был отделен магнитной декантацией. Объем остатка был доведен до 50 мл водой. Для магнитных измерений наночастицы были отделены магнитной декантацией и суспензированы в этаноле, приготовленная суспензия была упарена при пониженном давлении.

### **3.3.2.5. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $22 \pm 4$ нм (12н)**

Наночастицы магнетита были синтезированы окислением соли железа (II) [219]. 25 мл 0,1 М водного раствора хлорида железа (II) дегазировали продуванием аргона. pH раствора был доведен до 7.8 раствором основания (1 М гидроксид калия). Раствор приобрел темно-зеленый цвет. Соль железа была окислена 0,375 мкл 3% пероксида водорода в ультразвуковой ванне. Осадок был отделен магнитной декантацией и несколько раз промыт дистиллированной водой.

### **3.3.2.6. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $23 \pm 2$ нм (13н)**

На первом этапе получали олеат железа (III) [220]. Смесь хлорида железа (III) –  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (40 ммоль) с олеатом натрия (120 ммоль) растворяли в смеси 80 мл этанола, 60 мл  $\text{DI H}_2\text{O}$  и 140 мл гексана. Полученный раствор нагревали до  $70\text{ }^\circ\text{C}$  и выдерживали при этой температуре в течение четырех часов. По окончании реакции, верхний органический слой, содержащий олеат железа, промывали  $\text{DI H}_2\text{O}$  в делительной воронке. Далее органический слой упаривали при пониженном давлении, для избавления от гексана, до образования тягучей жидкости. Полученный олеат железа (III) 6г (6,67 ммоль), олеиновую кислоту 1г (3,33 ммоль) растворяли в 33,3 г диоктилового эфира, при комнатной температуре в трехгорлой колбе с обратным холодильником в атмосфере аргона. Реакционную смесь нагревали до температуры кипения –  $286\text{ }^\circ\text{C}$  с постоянной скоростью нагрева  $3,3\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ , а затем выдерживают при температуре кипения в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры, раствор магнитно декантировали и промывали этанолом.

### **3.3.2.7. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $25 \pm 4\text{ нм}$ (14н)**

Полученный согласно 3.3.2.6. олеат железа (III) 6г (6,67 ммоль), олеиновую кислоту 1г (3,33 ммоль) растворяли в 35 г дибензилового эфира, при комнатной температуре в трехгорлой колбе с обратным холодильником в атмосфере аргона. Реакционную смесь нагревали до температуры кипения –  $298\text{ }^\circ\text{C}$  с постоянной скоростью нагрева  $3,3\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ , а затем выдерживают при температуре кипения в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры, раствор магнитно декантировали и промывали этанолом.

### **3.3.2.8. Синтез наночастиц магнетита сферической формы размером $50 \pm 6\text{ нм}$ (15н)**

Наночастицы магнетита были синтезированы окислением соли железа (II) нитратом калия в щелочной среде [221]. Осаждение и последующее старение  $\text{FeSO}_4$  проводили в закрытой системе, состоящей из трехгорлой колбы, помещенной в водяную баню при перемешивании механической мешалкой. После продувания аргона с постоянной скоростью был добавлен раствор соли железа (II). В начале через исходные растворы продували аргон: (1) 180 мл воды, содержащей  $\text{NaOH}$  и  $\text{KNO}_3$  для получения концентраций  $0,07\text{ M NaOH}$  и  $0,1\text{ M KNO}_3$  в финальном растворе и (2) 20 мл раствора  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в  $10^{-2}\text{ M H}_2\text{SO}_4$  для получения концентрации  $2,5 \times 10^{-3}$  в финальном растворе. Через 2 часа, раствор сульфата железа (II) был добавлен к щелочному раствору при постоянной скорости и механическом перемешивании. Когда осаждение было завершено, через раствор пропускали аргон в течение 5 минут, после чего систему без перемешивания держали при  $90\text{ }^\circ\text{C}$  24 часа. После охлаждения осадок был отделен магнитной декантацией и несколько раз промыт дистиллированной водой.

### **3.3.2.9. Синтез наночастиц магнетита кубической формы размером $5 \pm 1\text{ нм}$ (16н)**

В двухгорлой колбе с обратным холодильником смешивали дифениловый эфир (20 мл), ацетилацетонат железа (III) (2 ммоль), олеиновую кислоту (1 ммоль), олеиламин (6 ммоль) и

1,2-гексадекандиол (12 ммоль). Полученный раствор нагревали в атмосфере аргона, довели до кипения при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и выдерживали при постоянной температуре в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры смесь промывали этанолом и выделяли наночастицы магнетита при помощи магнитной декантации. Для получения порошка наночастиц магнетита растворитель упаривали при пониженном давлении.

#### **3.3.2.10. Синтез наночастиц магнетита кубической формы размером $17 \pm 6$ нм (17н)**

В плоскодонных колбах готовили два раствора и выдерживали в атмосфере аргона в течение двух часов. Раствор (1): 360 мл DI H<sub>2</sub>O растворяли 1,008 г NaOH и 3,636 г KNO<sub>3</sub>. Раствор (2): в 40 мл 10<sup>-2</sup> М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> растворяли 0,26 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. После чего к раствору 2 в атмосфере аргона добавляли с постоянной скоростью при механическом перемешивании. Систему нагревали на водяной бане до 90 °С и выдерживали при температуре и перемешивании в течении 24 часов. После охлаждения до комнатной температуры осадок отделяли магнитной декантацией и несколько раз промывали DI H<sub>2</sub>O. Для получения порошка наночастиц магнетита растворитель упаривали при пониженном давлении.

#### **3.3.2.11. Синтез наночастиц магнетита кубической формы размером $20 \pm 3$ нм (18н)**

Полученный согласно 4.3.2.6. олеат железа (III) 6г (6,67 ммоль), олеиновую кислоту 1г (3,33 ммоль) растворяли в 35 г октадецена, при комнатной температуре в трехгорлой колбе с обратным холодильником в атмосфере аргона. Реакционную смесь нагревали до температуры кипения – 298 °С с постоянной скоростью нагрева 3,3 °С/мин, а затем выдерживают при температуре кипения в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры, раствор магнитно декантировали и промывали этанолом.

#### **3.3.2.12. Синтез наночастиц магнетита кубической формы размером $29 \pm 4$ нм (19н)**

В плоскодонных колбах готовили два раствора и выдерживали в атмосфере аргона в течение двух часов. Раствор (1): 360 мл DI H<sub>2</sub>O растворяли 1,008 г NaOH и 3,636 г KNO<sub>3</sub>. Раствор (2): в 40 мл 10<sup>-2</sup> М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> растворяли 0,26 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. После чего к раствору 2 в атмосфере аргона быстро прилили, затем использовали магнитное перемешивание. Систему нагревали на водяной бане до 90 °С и выдерживали при температуре и перемешивании в течении 48 часов. После охлаждения до комнатной температуры осадок отделяли магнитной декантацией и несколько раз промывали DI H<sub>2</sub>O.

#### **3.3.2.13. Синтез наночастиц магнетита кубической формы размером $40 \pm 5$ нм (20н)**

Наночастицы магнетита были синтезированы окислением соли железа (II) нитратом калия в щелочной среде [218]. Осаждение и последующее старение FeSO<sub>4</sub> проводили в закрытой системе, состоящей из трехгорлой колбы, помещенной в водяную баню при перемешивании механической мешалкой. После продувания аргона с постоянной скоростью

был добавлен раствор соли железа (II). В начале через исходные растворы продували аргон: (1) 180 мл воды, содержащей NaOH и KNO<sub>3</sub> для получения концентраций 0.07 М NaOH и 0.1М KNO<sub>3</sub> в финальном растворе и (2) 20 мл раствора FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O в 10<sup>-2</sup> М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с различными концентрациями для получения концентрации 5 × 10<sup>-3</sup>М в финальном растворе. Через 2 часа, раствор сульфата железа (II) был добавлен к щелочному раствору при постоянной скорости и механическом перемешивании. Когда осаждение было завершено, через раствор пропускали аргон в течение 5 минут, после чего систему без перемешивания держали при 90 °С 24 часа. После охлаждения осадок был отделен магнитной декантацией и несколько раз промыт дистиллированной водой.

#### **3.3.2.14. Синтез наночастиц магнетита размером 50±2\*10±1 нм (21н) (стержни)**

Магнетит цилиндрической формы получали частичным восстановлением в условиях микроволнового излучения комплекса железа (III) с дофамином в щелочной среде. Раствор хлорида железа FeCl<sub>3</sub> (0.5М) смешали с раствором 0.04 М HCl. 5 мл дофамина (3мг/мл) добавили при тщательном перемешивании и оставили на 10 мин при тщательном магнитном перемешивании. Затем 90 мл воды при температуре 80-90<sup>0</sup>С прилили к перемешивающемуся раствору. Раствор прокипятили в течение 2 часов при тщательном перемешивании. Суспензию охладили до комнатной температуры и довели pH до 7-8 добавлением щелочи (1 М KOH). Осадок отделили центрифугированием и промыли деионизованной водой. Полученную желтую коллоидную суспензию (2 мл) смешали с 100 мкл гидразина (водный раствор) и поместили в микроволновую печь (2 цикла по 2 мин 200 W). Продукт отделили центрифугированием.

#### **3.3.2.15. Синтез наночастиц магнетита размером 170±30\*15±5 нм (22н) (стержни)**

В колбе растворяли 0,156 г. (5,61·10<sup>-4</sup> моль) FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O в 1,5 мл 2 М KNO<sub>3</sub>, а затем добавляли 1,5 мл 2 М NaOH. Смесь интенсивно перемешивали в токе аргона, затем помещали в автоклав с металлическим кожухом, нагревали до 100 °С и выдерживали в течение 8 часов. Получившийся осадок промывали DI H<sub>2</sub>O и магнитно декантировали.

### **3.3.3. Синтез наночастиц магнетит-золото**

#### **3.3.3.1. Синтез наночастиц магнетита**

650 мг FeCl<sub>3</sub> (4\*10<sup>-3</sup> моль) и 398 мг FeCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O (2\*10<sup>-3</sup> моль) растворяли в 5 мл 2М HCl (0,01 моль, V(36% HCl)=0,86 мл), полученный раствор медленно прикапывали (в течение 1 минуты) к 50 мл 0,7М раствора NH<sub>3</sub> в DI H<sub>2</sub>O (0,035 моль, V(28% NH<sub>3</sub>)= 4,86 мл), смесь перемешивали 30 минут, затем образовавшийся магнетит декантировали при помощи магнита, промывали 50 мл 2М HClO<sub>4</sub> (V(70% HClO<sub>4</sub>)=8,63 мл) либо 50 мл DI H<sub>2</sub>O, затем вновь подвергали магнитной декантации и растворяли осажденный магнетит в 50 мл DI H<sub>2</sub>O при помощи ультразвуковой бани (30 мин).

### 3.3.3.2. Покрывание наночастиц магнетита золотой оболочкой

Восстановление  $\text{HAuCl}_4$  при помощи  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  при кипячении – образцы 23н (19,6±6,8 нм) и 24н (22,6±3,2 нм). В круглодонной колбе при перемешивании на магнитной мешалке растворяли 35 мг  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0.088 ммоль) в 120 мл DI  $\text{H}_2\text{O}$ , доводили раствор до кипения, затем прибавляли 5 мл раствора наночастиц магнетита ( $2 \cdot 10^{-4}$  моль), в случае контрольного эксперимента вместо него прибавляли 5 мл DI  $\text{H}_2\text{O}$ . После закипания добавляли 5 мл раствора цитрата натрия (0,08М,  $m(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,1176$  г). Затем раствор кипятили ещё 5 минут, в течение которых раствор приобретал красно-вишневый цвет с коричневым оттенком, после чего выключали нагревание, охлаждали полученный раствор до комнатной температуры и хранили в холодильнике. Полученные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  были стабилизированы цитрат-ионами.

### 3.3.3.3. Очистка наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ методом хроматографии

Очистка при помощи хроматографии на Sephadex сопряжена со стадией функционализации. 0,15 г Sephadex G10/G50/G100 суспендировали в 10 мл воды и оставляли набухать на ночь в холодильнике. Полученную суспензию выливали в пустой картридж (12 г) для колоночной хроматографии Interchim PF-50SHP с фильтром на дне. Затем сорбент промывали 20 мл 0,01М цитратного буфера (pH=5), и наносили на сорбент по каплям 15 мл раствора наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ , стабилизированных цитрат-ионами (предварительно выдержанных в ультразвуковой бане в течение 10 минут). После сорбент промывали 10 мл 0,01М цитратного буфера (pH=5). Полученный сорбент с нанесенными на него наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  смешивали с 10 мл DI  $\text{H}_2\text{O}$ , затем при перемешивании – 10 мл раствора лигандов и оставляли перемешивание на ночь. Затем проводили диализ полученной смеси в DI воде с использованием пакетов для диализа SERVAPOR 44146 MWCO 12-14 kDa (3 раза по 1 л в течение 3-х дней). Далее смесь декантировали, пропускали через шприцевой фильтр Millipore Hydrophilic HV 0,22  $\mu\text{m}$ . Полученные 18-20 мл раствора наночастиц хранили в холодильнике.

### 3.3.3.4. Очистка наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ методом центрифугирования

Вторым способом очистки являлось центрифугирование (MiniSpin Plus, Eppendorf). 12 пробирок, содержащих по 2 мл раствора наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  в каждой, подвергали центрифугированию при 7000 оборотах в минуту (RCF 3300g) в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отделяли при помощи пипетки, осадок ресуспендировали в 1 мл DI  $\text{H}_2\text{O}$  при помощи ультразвуковой бани. Полученные 23-25 мл коллоидного раствора наночастиц хранили в холодильнике. Для исследования методом ICP MS образцы очищали путем обработки кислотой. К 50 мл раствора наночастиц при перемешивании добавляли 10 мл раствора концентрированной соляной кислоты, время обработки варьировали от 0,5 ч до 12 ч.

### **3.3.3.5. Концентрирование наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au**

Концентрирование образцов, очищенных на Sephadex, проводили при помощи метода лиофилизации. 5-10 мл раствора наночастиц замораживали при температуре -70°C, затем подвергали лиофилизационной сушке в течение суток. После этого сухие наночастицы растворяли в 1-2 мл DI H<sub>2</sub>O при помощи ультразвуковой бани. Концентрирование частиц, очищенных при помощи центрифугирования, производилось при ресуспендировании осадка в меньшем по сравнению с исходным (в 5-10 раз), объеме DI H<sub>2</sub>O.

### **3.3.3.6. Функционализация наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au**

В случае использования хроматографии на Sephadex функционализация сопряжена со стадией очистки (см. выше). Если очистка наночастиц производилась путем центрифугирования, к 10 мл раствора очищенных наночастиц, стабилизированных цитрат-ионами (предварительно выдержанных в ультразвуковой бане в течение 10 минут), при перемешивании приливали 10 мл раствора лиганда и оставляли перемешивание на ночь. Затем проводили диализ полученного раствора в DI воде с использованием пакетов для диализа SERVAPOR 44146 MWCO 12-14 kDa (3 раза по 1 литру в течение 3-х дней). Полученные 18-20 мл раствора наночастиц хранили в холодильнике.

### **3.3.3.7. Модификация наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au химотрипсином**

К 0,75 мл раствора наночастиц, предварительно выдержанных на ультразвуковой бане в течение 10 минут, добавляли 0,25 мл цитратного буфера (20 mM, pH 5,9), суммарный объем раствора был равен 1 мл. Затем в раствор добавляли требуемое количество свежеприготовленных водных растворов EDC и S-NHS (концентрации стоковых растворов 10 мг/мл). После этого в раствор добавляли 10 мкл водного раствора химотрипсина (концентрацию варьировали от 2,5 до 60 мг/мл). Затем полученный раствор ставили в шейкер на 2 часа при комнатной температуре. Последней стадией являлась очистка от избытка несвязавшегося белка, которое осуществляли одним из двух способов:

а) многократным центрифугированием раствора на центрифуге Beckman Coulter Allegra X22R при 4000 оборотах в минуту (RCF 1650g) с применением центрифужных фильтров на 100 kDa.

б) двукратным центрифугированием раствора на центрифуге MiniSpin Plus при 14000 оборотах в минуту (RCF 11340g) и ресуспендированием в DI воде при помощи ультразвуковой бани.

### **3.3.3.8. Изучение токсичности наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au**

Токсичность наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и функционализированных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au изучали на клеточных линиях LNCaP и PC-3 (клетки рака предстательной железы человека). Клетки

выращивали во флаконах на 5 мл в среде RPMI-1640 (GIBCO) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1% L-глутамина, антибиотика (пенициллина и стрептомицина) и раствора витаминов для RPMI. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

При стандартном пассировании и постановке эксперимента клетки снимали раствором трипсина, суспендировали и отливали часть клеток в фалькон на 15 мл. Подсчет клеток производился с помощью камеры Горяева. Далее клетки разводились в среде до конечной концентрации 80 тыс./мл для LNCaP и 40 тыс./мл для PC-3 в ванночке для 8-канальной пипетки. Затем клетки раскапывались в 96-луночные планшеты по 100 мкл в лунку. Через 1 сутки к клеткам добавлялись растворы МНЧ таким образом, что итоговая концентрация частиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> составляла 0,08-1,7 мкг/мл, итоговая концентрация частиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au – 0,07-1,5 мкг/мл по Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, 0,25-90 мкг/мл по Au. В качестве негативного контроля использовали DI H<sub>2</sub>O, в качестве позитивного контроля – 30% ДМСО, разведенный в клеточной среде. Далее клетки инкубировались в течение 48 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для оценки токсичности использовали МТТ-тест. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) разводился при помощи PBS до концентрации 5 мг/мл. В каждую лунку с клетками добавляли по 13 мкл раствора МТТ. 96-луночный планшет находился в CO<sub>2</sub>-инкубаторе до тех пор, пока не выпадали синие кристаллы формазана (~ 45 мин для изучаемых клеток). По завершении инкубации с МТТ тщательно удаляли среду из каждой лунки, не повреждая при этом клетки. Далее добавляли 60 мкл ДМСО в каждую лунку для растворения кристаллов формазана при перемешивании на планшетном шейкере. После растворения гранул формазана снимали данные оптической плотности при 570 нм на спектрофотометре.

### **3.3.3.9. Анализ частиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au, модифицированных химотрипсином**

**3.3.3.9.1. Определение общего количества белка** проводилось при помощи стандартного набора реактивов Micro BCA Protein Assay Kit. 150 мкл реагентов добавляли к 150 мкл образцов, содержащих химотрипсин, (измерения проводились в микропланшетах), интенсивно перемешивали на шейкере в течение 1 минуты, далее смесь выдерживалась при 37°C в течение 2 часов, после чего микропланшет охлаждали до комнатной температуры и измеряли поглощение на длине волны 562 нм. Количество белка на наночастицах определяли из линейного (в диапазоне 2-40 мкг белка/мл) калибровочного графика для стандартных образцов. Изучаемые образцы были разбавлены в несколько раз.

**3.3.3.9.2. Определение количества свободных аминогрупп** проводилось с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты по методике, описанной в [222]. К 25 мкл исследуемых образцов/стандартов (в микропланшете) добавляли 25 мкл раствора



тетрабората натрия  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 0,1 М растворе NaOH, затем 1 мкл 1 М раствора ТНБС. Смесь выдерживали ровно 5 минут при 23°C, затем добавляли 100 мкл смеси 0,1 М раствора сульфита натрия  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и 0,1 М раствора дигидрофосфата натрия  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в соотношении 1:65, после чего регистрировали оптическую плотность при длине волны 420 нм. Количество аминокрупп определяли из линейного калибровочного графика для стандартных образцов.

#### **3.3.3.9.3. Определение активности иммобилизованного химотрипсина**

Активность химотрипсина определяли с использованием субстрата BTNA. Изначально к 1 мл буферного раствора TRIS-HCl (pH=8,2) в пластиковой кювете (длина оптического пути 1 см) добавлялось 3 мкл субстрата BTNA (концентрация 0,04 мМ в смеси диоксан – ацетонитрил 1:1), кювету интенсивно встряхивали до полного растворения субстрата. Затем в раствор добавлялось требуемое количество раствора, содержащего химотрипсин (с расчётом на то, чтобы иметь итоговую активность 0,0005-0,005 опт. ед./мин). После тщательного перемешивания кювета ставилась в спектрофотометр, в котором регистрировалась оптическая плотность во времени при длине волны 380 нм. Активность фермента определяли по тангенсу угла наклона.

#### **3.3.3.9.4. Определение активности химотрипсина после действия магнитного поля.**

В 2 мл буфера TRIS-HCl (pH 8,2) добавлялось необходимое количество коллоидного раствора наночастиц с иммобилизованным ферментом в цитратном буфере (100 -400 мкл, с расчётом на то, чтобы иметь финальную активность 0,002-0,005 опт. ед./мин) и 6 мкл субстрата BTNA (концентрация 0.04 мМ в смеси диоксан – ацетонитрил 1:1). Далее содержимое тщательно перемешивалось и делилось на две одинаковые светопрозрачные кюветы. Одна из кювет являлась контрольной, она изначально ставилась в спектрофотометр. В это время другая кювета ставилась в магнитное поле. После 5,5-минутной выдержки в поле (2 экспозиции по 2,5 мин в поле + 0,5 мин паузы) эта кювета ставилась в спектрофотометр, а контрольная кювета 5,5 мин термостатировалась без магнитного поля. Процесс повторялся несколько раз. Влияние поля оценивалось как отношение активности в кювете, подвергаемой действию поля, к активности в контрольной кювете.

### **3.3.4. Синтез сорбентов для ВЭЖХ**

#### **3.3.4.1. Получение сорбента $\text{SiO}_2$ – Au – L-цитрат (1м)**

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 30 мл раствора золотых наночастиц (различного размера – образцы  $2,5 \pm 0,5$  нм (**2н**),  $10 \pm 2$  нм (**4н**),  $25 \pm 3$  нм (**5н**),  $40 \pm 3$  нм (**6н**)), 1,5 г оксида кремния в деионизированной воде. Силикагель приобретает характерную лиловую окраску.

Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом.

#### **3.3.4.2. Получение сорбента $\text{SiO}_2 - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (2м)**

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,5 г силикагеля, модифицированного наночастицами золота, и раствор 100мг (0,83ммоль) L-цистеина в 50 мл деионизованной воды. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали деионизованной водой.

#### **3.3.4.3. Получение сорбента $\text{SiO}_2 - \text{NH}_2 - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (3м)**

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,5 г силикагеля, 0,5 мл 3-аминопропилтриэтоксисилана в 50 мл этанола. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анали: С (3,2%), Н (0,6%), N (1,1%).

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,4 г аминированного силикагеля, 50 мл раствора золотых наночастиц (4н), стабилизированных цитрат-ионами, и 5 мл этанола. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,6%), Н (0,7%), N (1,0%).

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1г аминированного силикагеля, покрытого наночастицами золота, 0,026 г L-цистеина (0,21 ммоль) в 50 мл этанола. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,9%), Н (0,76%), N (1,2%).

#### **3.3.4.4. Получение сорбента $\text{SiO}_2 - \text{S} - \text{Au} - \text{L}$ -цистеин (4м)**

В круглодонной колбе объемом 500 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,5 г силикагеля, 1,5 мл 3-меркаптопропилтриэтоксисилана в 300 мл толуола. Раствор довели до кипения и выдерживали при кипении и при перемешивании 4ч в атмосфере аргона. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали последовательно толуолом, этанолом и деионизованной водой. Элементный анали: С (3,3%), Н (0,9%), S (1,9%).

В плоскодонной колбе объемом 150 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,4 г тиолированного силикагеля, 80 мл раствора золотых

наночастиц (**4н**), стабилизированных цитрат-ионами, и 10 мл этанола. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,7%), Н (1,1%), S (1,8%).

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1г тиолированного силикагеля, покрытого наночастицами золота, 0,026 г L-цистеина (0,21 ммоль) в 50 мл смеси этанол/вода (1/1). Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,8%), Н (1,2%), S (2,4%).

#### **3.3.4.5. Получение сорбента SiO<sub>2</sub> – S – Au – БСА (5м)**

В круглодонной колбе объемом 500 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,5 г силикагеля, 1,5 мл 3-меркаптопропилтриэтоксисилана в 300 мл толуола. Раствор довели до кипения и выдерживали при кипении и при перемешивании 4ч в атмосфере аргона. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали последовательно толуолом, этанолом и деионизованной водой. Элементный анали: С (3,3%), Н (0,9%), S (1,9%).

В плоскодонной колбе объемом 150 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1,4 г тиолированного силикагеля, 80 мл раствора золотых наночастиц (**4н**), стабилизированных цитрат-ионами, и 10 мл этанола. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,7%), Н (1,1%), S (1,8%).

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1г тиолированного силикагеля, покрытого наночастицами золота, 2,5 мл меркаптопропионовой кислоты, в 50 мл смеси этанол/вода (1/1). Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (3,8%), Н (1,1%), S (2,4%).

В плоскодонной колбе объемом 200 мл с магнитной мешалкой суспензировали при непрерывном перемешивании 1г тиолированного силикагеля, покрытого наночастицами золота, в 50 мл 0,1 М фосфатного буфера при рН 6,4 и выдерживали в течение 3 часов. К суспензии добавляли 45 мг EDC\*HCl, 38 мг гидроксibenзотриазола, 0,5 г БСА в 50 мл 0,1 М фосфатного буфера. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали

на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (6,2%), Н (1,5%), S (2,2%), N (1,2%).

#### 3.3.4.6. Получение сорбента SiO<sub>2</sub> – S – Au – ванкомицин (6м)

В ходе синтеза использовали полученный по методике 4.3.4.5 сорбент – силикагель, модифицированный наночастицами золота, функционализированными меркаптопропионовой кислотой.

В плоскодонной колбе объемом 100 мл с магнитной мешалкой смешивали при непрерывном перемешивании 1г силикагеля, 0,1 г ванкомицина, 35 мг ДЦК, 3 мг ДМАП в 50 мл воды. Перемешивание проводили в течение 12 часов. Полученный порошок отфильтровывали на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали этанолом и деионизованной водой. Элементный анализ: С (6,3%), Н (1,4%), S (1,6%), N (0,6%).

#### 3.3.4.7. Хроматографический анализ сорбентов

Перед получением хроматограмм колонку кондиционировали в течение 20-30 минут, промывая подвижной фазой, повторяя при каждой смене подвижной фазы. Аликвотную часть 20мкл исследуемого раствора β-блокатора вводили в колонку при помощи петлевого дозатора (инжектора), включали подачу элюента со скоростью 2 мл/мин.

Для описания удерживания и анализа разделения энантиомеров при получении хроматограмм с удовлетворительным разрешением пиков рассчитывали исправленное время удерживания ( $t'_r$ ), коэффициент емкости ( $k'$ ), коэффициент селективности ( $\alpha$ ), разрешения ( $R_s$ ), число теоретических тарелок ( $N$ ) по следующим формулам:

$$t'_r = t_r - t_m$$

$$k = \frac{t'_r}{t_m}$$

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2$$

где  $t_m$  – мертвое время – время удерживания неударживаемого компонента;

$t_{r1}$ ,  $t_{r2}$  – времена удерживания компонентов;

$w_1$ ,  $w_2$  – значение ширины пика у основания.

С получаемой хроматограммы снимали данные о времени удерживания неударживаемых (мертвое время) и ударживаемых компонентов и ширине пиков. Визуально анализировали соотношение площадей пиков. Мертвое время определяли по системному пику из получаемых

хроматограмм.  $t_m = 0.6$  мин. В ходе эксперимента для анализа свойств колонки использовали семь видов подвижных фаз, различной полярности как без, так и с использованием органических солей. Таким образом, применялись два вида хроматографии нормально-фазовая и полярно-органическая.

### **3.3.5. Получение материала для ФДТ**

Иммобилизацию проводили путем перемешивания мицеллярной водно-кремофорной дисперсии соединения **44** с водным раствором наночастиц золота в течение суток, последующим отделением наночастиц с иммобилизованным фотосенсибилизатором **7м**.

#### **3.3.5.1. Получение мицеллярной водной дисперсии конъюгата **44** метилового эфира *N*-аминобактериопуринимида с липоевой кислотой**

Раствор 10 мг ФС **44** в 3 мл хлористого метилена порциями по 0.5 мл с периодичностью в 8-10 минут добавляли в 10 мл 4% раствор Кремофора в деионизованной воде. Под непрерывным током аргона в термостатируемой водяной бане при 40 °С выпаривали хлористый метилен до полного перехода ФС **44** в водную эмульсию, которую затем стерилизули фильтрацией на фильтрах Millipore 0.4 мкм, а концентрацию фильтрата доводят до необходимого значения путем разбавления деионизованной водой.

#### **3.3.5.2. Иммобилизация ФС **44** на наночастицах золота**

К водному раствору НЧ золота при интенсивном перемешивании добавляли раствор ФС в расчёте 1 мг на 10 мл раствора наночастиц и выдерживали в течение 24 часов. Затем полученный раствор центрифугировали при 15 g в течение 30 минут, декантировали надосадочный слой с несвязавшимся пигментом, а осадок наночастиц золота с иммобилизованным ФС (ФС-*Au*) **7м** ресуспензировали в 4% водном растворе Кремофора.

#### 4. Выводы

1. Разработаны и оптимизированы методы получения новых органических бифункциональных ауروفильных лигандов: серосодержащих производных аминокислот, пептидов, ПСМА-вектора, бактериопуринимиды.
2. Разработана новая твердофазная методика получения производных пептидов, содержащих в своем составе липоевую кислоту и биотин. Предложен метод ацилирования этилового эфира биотина по атому азота.
3. Оптимизированы методы получения НЧ золота различного размера (2 -100 нм и НЧ магнетита различной формы и размера (4 - 50 нм) с узким распределением по размерам. Предложена и оптимизирована методика стабилизации наночастиц магнетита в водном растворе путем функционализации НЧ производными полиэтиленгликоля. Изучена T2-релаксивность функционализированных наночастиц магнетита.
4. Разработаны и оптимизированы методы синтеза, очистки и концентрирования НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  типа «ядро-оболочка». Изучены физико-химические свойства частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ; обнаружено, что золотая оболочка НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  не оказывает влияния на их магнитные свойства. Осуществлена функционализация поверхности НЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  серосодержащими лигандами, а также ферментом химотрипсином. Обнаружен эффект замедления ферментативной реакции с участием иммобилизованного химотрипсина под действием переменного низкочастотного магнитного поля.
5. Получены новые материалы на основе НЧ: сорбенты для хиральной ВЭЖХ на основе неорганических матриц, НЧ золота и органических лигандов; материал для ФДТ на основе НЧ золота и ФС.

## 5. Список литературы

- 1 Li Y., Liu J., Zhong J. Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au composite magnetic nanoparticles in vitro and in vivo // *International Journal of Nanomedicine*. - 2011. - № 6. - P. 2805-2819.
- 2 Barrera C., Herrera A., Zayas Y., Rinaldi C. Surface modification of monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications // *J Magn. and Magn. Mat.* - 2009. – V. 321. - № 10. - P. 1397-1399.
- 3 Torres-Lugo M., Rinaldi C. Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles // *Nanomedicine (Lond)*. - 2013. - № 10. - P. 1689-1707.
- 4 Kleinauskas A., Kim J., Choi G. et al. Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for Cancer Theranostics // *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology*. - 2012. – V. 1. - № 4. - P. 271-283.
- 5 Majewski P., Thierry B. Functionalized Magnetite Nanoparticles—Synthesis, Properties, and BioApplications // *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. - 2007. - V. 32. - № 3. - P. 203-215.
- 6 McBain S., Yiu H., Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery // *Int. J. Nanomedicine*. - 2008. - № 3. - P. 169-180.
- 7 Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering // *Pharmacol Res.* - 2010. - № 62. - P. 144-149.
- 8 Sensenig R., Sapir Y., MacDonald C. et al. Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo // *Nanomedicine*. - 2012. - № 7. - P. 1425-1442.
- 9 Khandhar A., Ferguson M., Krishnan M. Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: Implications in biological systems // *J. Appl. Phys.* - 2011. - № 109. - P. 310-313
- 10 Shubayev V.I., Pisanic T.R., Jin S. Magnetic nanoparticles for theranostics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2006. - V. 61. - P. 467–477.
- 11 Yoo D., Lee J., Shin T., Cheon J. Theranostic Magnetic Nanoparticles // *Accounts of chemical research* – 2011. – V. 44. – P. 863–874.
- 12 Amendola V. A General Technique to Investigate the Aggregation of Nanoparticles by Transmission Electron Microscopy // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2015. V. 15. - № 5. – P. 3545-51.
- 13 Xu C., Sun S. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. – V. 65. - P. 732–743.
- 14 Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library // *Science*. – 1999. - № 249. - P. 386-390.
- 15 Oliphant A.R., Nussbaum A.L., Struhl K. Cloning of random-sequence oligodeoxynucleotides // *Gene*. – 1986. - № 44. - P. 177-183.
- 16 Barbas C.F., et al. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem // *PNAS*. – 1992. – V. 89. – P. 4457-4461.
- 17 Bycroft B.W., Lockey P.M., Penrose A., Grout R.J., Williams P. Antibacterial and immunostimulatory properties of chemotactic N-formyl peptide conjugates of ampicillin and amoxicillin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1989. - V.33. - № 9. - P. 1516-21.
- 18 Petkov V., Mosgoeller W., Ziesche R., Raderer M., Stiebellehner L., Vonbank K., Funk G., Hamilton G., Novotny C., Burian B., Block L. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension // *J Clin Invest.* – 2003. – V. 111. - № 9. – P. 1339-46.
- 19 Uusimaa P., Peuhkurinen S., Ylitalo A., Vuolteenaho O., Risteli J., Peuhkurinen K. Natriuretic peptides and collagen biomarkers in patients with medical treatment for hypertension // *Acta Cardiol.* – 2011. – V. 66. № 1. – P. 21-27.
- 20 Dutta A., Gormley J., McLachlan M., Major J. Novel inhibitors of human renin. Cyclic peptides based on the tetrapeptide sequence Glu-D-Phe-Lys-D-Trp // *J. Med. Chem.* - 1990. - V. 33. - P. 2552.
- 21 Murphy T., Roy I., Harrop A., Dixon K., Keshavarz T. Effect of oligosaccharide elicitors on bacitracin a production and evidence of transcriptional level control // *Journal of biotechnology*. - 2007. - V. 131. - P. 397.

- 
- 22 Kuczer M., Błaszak M., Czarniewska E., Rosiński G., Jankowska T. Mono- and Polynuclear Copper(II) Complexes of Alloferons 1 with Point Mutations (H6A) and (H12A): Stability Structure and Cytotoxicity // *Inorg. Chem.* - 2013. - V. 52. - P. 5951.
- 23 Boohaker R., Lee M., Vishnubhotla P., Perez J., Khaled A. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells // *Curr Med Chem.* - 2012. - V. 19. - P. 3794.
- 24 Desai P., Patlolla R., Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery // *Mol Membr Biol.* - 2010. - V. 27. - № 7. - P. 247–259.
- 25 Pierschbacher M., Ruoslahti D. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule // *Nature.* - 1984. - № 309. - P. 30-33.
- 26 Anastasi A., Erspamer V., Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes* // *Experientia.* - 1971. - № 27. - P. 166-167.
- 27 Giudicessi S. L., Messina J. M. G., Martínez-Ceron M. C., Erra-Balsells R., Albericio F., Cascone O., Camper S. A. Friendly Strategy to Prepare Encoded One Bead–One Compound Cyclic Peptide Library // *ACS Comb. Sci.* *ACS Comb. Sci.* - 2013. - V. 15. - № 10. - P. 525–529.
- 28 Ding H., Proding W. M., Kopeček J. Two-Step Fluorescence Screening of CD21-Binding Peptides with One-Bead One-Compound Library and Investigation of Binding Properties of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer-Peptide Conjugates // *Biomacromolecules.* -2006. - № 7. - P. 3037–3046.
- 29 Bicker K. L., Sun J., Lavigne J. J., Thompson P. R. Boronic Acid Functionalized Peptidyl Synthetic Lectins: Combinatorial Library Design, Peptide Sequencing, and Selective Glycoprotein Recognition // *ACS Comb. Sci.* - 2011. - № 13. - P. 232–243.
- 30 Kit S. L., Michal L., The “One-Bead-One-Compound” Combinatorial Library Method // *Chem. Rev.* - 1997. - № 97. - P. 411-448.
- 31 Barbas C.F., et al. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 1992. - V. 89. - № 10. - P. 4457-4461.
- 32 Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library // *Science.* - 1999. - № 249. - P. 386-390.
- 33 Kalderon D.; Roberts B. L.; Richardson W. D., Smith A. E. A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location // *Cell.* - 1984. - № 39. - P. 499-509.
- 34 Verwilt P., David C. C., Leena V., Hofkens J., Witte P. A. M., De Borggraeve W. M. Synthesis and in vitro evaluation of a PDT active BODIPY–NLS conjugate // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2013. - № 23. - P. 3204–3207.
- 35 Ramsey D. M., McAlpine S. R. Synthesis, Characterization, and Plasma Lipoprotein Association of a Nucleus-Targeted Boronated Porphyrin // *J. Med. Chem.* - 2005. - № 48. - P. 357–359.
- 36 Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Graça M., Vicente H.. Synthesis, Characterization, and Metabolic Stability of Porphyrin-Peptide Conjugates Bearing Bifunctional Signaling Sequences // *J. Med. Chem.* - 2008. - № 51. - P. 2915–2923.
- 37 Aronov O., Horowitz A T, Gabizon A., Fuertes M. A., Pe´rez J.M., Gibson D. Nuclear Localization Signal-Targeted Poly(ethylene glycol) Conjugates as Potential Carriers and Nuclear Localizing Agents for Carboplatin Analogues // *Bioconjugate Chem.* - 2004. - № 15. - P. 814–823.
- 38 Cohen S. M., Lippard S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol.Biol.* - 2001. - № 67. - P. 93-130.
- 39 Zhang H., Mitin A., Vinogradov S.V.. Efficient Transfection of Blood-Brain Barrier Endothelial Cells by Lipoplexes and Polyplexes in the Presence of Nuclear Targeting NLS-PEG-Acridine Conjugates // *Bioconjugate Chem.* - 2009. - № 20. - P. 120–128.
- 40 Ranyuk E., Cauchon N., Klarskov K., Guerin B., van Lier J. E. Phthalocyanine–Peptide Conjugates: Receptor-Targeting Bifunctional Agents for Imaging and Photodynamic Therapy // *J. Med. Chem.* - 2013. - № 56. - P. 1520–1534.



- 
- 41 Yanga J., Houb Y., Ji G., Songa Z., Liub Y., Dai G., Zhangc Y., Chen J.. Targeted delivery of the RGD-labeled biodegradable polymersomes loaded with the hydrophilic drug oxymatrine on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. - № 52. – P. 180–190.
- 42 Sweetey M., Mohini B., Sudipta C., A novel concept of radiosynthesis of a <sup>99m</sup>Tc-labeled dimeric RGD peptide as a potential radiotracer for tumor imaging // *Bioorg Med Chem Lett*. - 2013. - № 23. - P. 1808-1812.
- 43 Cai H., Li Z., Huang C.-W., Shahinian A. H., Wang H., Park R., Conti P. S.. Evaluation of Copper-64 Labeled AmBaSar Conjugated Cyclic RGD Peptide for Improved MicroPET Imaging of Integrin  $\alpha_3\beta_1$  Expression // *Bioconjugate Chem*. – 2010. - № 21. - P. 1417–1424.
- 44 Liu Z., Yan Y., Liu S., Wang F., Chen X. RGD-Bombesin Heterodimeric Peptides for PET Imaging of Breast Cancer // *Bioconjugate Chem*. – 2009. - № 20. - P. 1016–1025.
- 45 Hansen M. B., van Gaal E., Minten I., Storm G., van Hest J. C.M., Löwik D.W.P.M. Constrained and UV-activatable cell-penetrating peptides for intracellular delivery of liposomes // *J. of Controlled Release*. – 2012. - № 164. – P. 87–94.
- 46 Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat // *Traffic*. – 2012. - № 13. - P. 355–363.
- 47 Xiong R., Li Z., Mi L., Wang P.-N., Chen J.-Y., Wang L., Yang W.-L. Study on the intracellular fate of Tat peptide-conjugated quantum dots by spectroscopic investigation // *J. Fluoresc*. – 2010. - № 20. - P. 551–556.
- 48 Sarko D., Beijer B., Boy R.G., Nothelfer E.M., Leotta K., Eisenhut M., Altmann A., Haberkorn U., Mier W. The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides // *Mol. Pharm*. – 2010. - № 7. – P. 2224–2231.
- 49 Teicher B.A. Israel M. In *Cancer Therapeutics, Experimental and Clinical Agents* / Humana Press: Totowa, NJ. – 1997. – 451 p.
- 50 Soudy R., Chen C., Kaur K.. Novel Peptide–Doxorubicin Conjugates for Targeting Breast Cancer Cells Including the Multidrug Resistant Cells // *J. Med. Chem*. – 2013. - № 56. – P. 7564–7573.
- 51 Tai W., Shukla R. S., Qin B., Li B., Cheng K. Development of a Peptide\_Drug Conjugate for Prostate Cancer Therapy // *Mol. Pharmaceutics*. – 2011. - № 8. – P. 901–912.
- 52 Engelman J. A., Luo J., Cantley L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism // *Nat.Rev. Genet*. – 2006. - № 7. – P. 606–619.
- 53 Watt K. W., Lee P. J., M'Timkulu T., Chan W. P., Loor R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. – 1986. - № 83. – P. 3166–3170.
- 54 Amspacher D.R., et al. Synthesis of a Reaction Intermediate Analogue of Biotin-Dependent Carboxylases via a Selective Derivatization of Biotin // *Organic Letters*. – 1999. - № 1. - P. 99-102.
- 55 Han Q., et al., Synthesis of (+)-biotin derivatives as HIV-1 protease inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. - 1996. - № 6. - V. 12. - P. 1371-1374.
- 56 Sillibourne J.E., et al. Autophosphorylation of Polo-like Kinase 4 and Its Role in Centriole Duplication // *Molecular Biology of the Cell*. - 2010. - № 21. - V. 4. - P. 547-561.
- 57 Pilecka I. et al. Protein-tyrosine Phosphatase H1 Controls Growth Hormone Receptor Signaling and Systemic Growth // *Journal of Biological Chemistry*. - 2007. - № 282. - V. 48. - P. 35405-35415.
- 58 Kuo Y.M. and Andrews A.J. Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3 // *PLoS One*. - 2013. - № 8. - V. 2. - P. 54896-54991.
- 59 Schnatbaum K., et al., Peptide microarrays enable rapid mimotope optimization for pharmacokinetic analysis of the novel therapeutic antibody IMAB362 // *Biotechnol J*. - 2014. - № 9. - P. 545-54.
- 60 Vickery B.P., et al. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens // *J Allergy Clin Immunol*. - 2013. - № 131. - P. 128-134.
- 61 Nerrant E. Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis // *Mult Scler*. – 2014. – V. 20. - № 13. – P. 1699-703.

- 
- 62 Arakaki A., Masuda F., Amemiya Y., Tanaka T. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2010. - № 343. - P. 65–70.
- 63 Shuyi C., Xianrui Z., Jingyi C., Jin C., Larisa K. Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release // *Bioconjug Chem.* – 2010. - № 19 - P. 979–987.
- 64 Yu M.K., Jeong Y.Y., Park J. et al Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo // *Angew. Chem. Int Ed.* - 2008. - V.47. - P. 5362-5365.
- 65 Markides H., Rotherham M., El Haj A. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine // *J of Nanomaterials* - 2011. - P. 1-11.
- 66 Kayal S., Ramanujan R.V. Anti-Cancer drug loaded Iron-Gold Core-Shell nanoparticles (Fe@Au) for magnetic drug targeting // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2010. - V.10. - P. 1-13.
- 67 Likhitar S., Bajpai A.K. Magnetically controlled release of cisplatin from superparamagnetic starch nanoparticles // *Carbohydr. Polym.* - 2012. - V. 87. - P. 300-308.
- 68 Sushilkumar A., Bongiovanni R. Synthesis And Organic Functionalization Approaches For Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles // *Advanced Materials Letters* - 2012. - № 5. - P. 356-361.
- 69 Cheraghipour E., Tamaddon A.M., Javadpour S. PEG conjugated citrate-capped magnetite nanoparticles for biomedical applications // *Journal of Magn. and Magn. Mat.* - 2013. - V. 328. - P. 91-95.
- 70 Wainaina J., Kim N., Kim J. et al. Synthesis of Magnetite/Amphiphilic Polymer Composite Nanoparticles as Potential Theragnostic Agents // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2012. - V.12. - P. 5920-5924.
- 71 Nicolás P., Saleta M., Troiani H. et al. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues // *Acta Biomater.* - 2013. - V 9. - P. 4754-4762.
- 72 Shen K., Wang J., Li Y. et al. Preparation of magnetite core-shell nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and carbon with aryl sulfonyl acetic acid // *Materials Research Bulletin.* – 2013. - V. 11. - P. 4655-4660.
- 73 Fajaroha F., Setyawanb H., Nurb A., Lenggoro W. Thermal stability of silica-coated magnetite nanoparticles prepared by an electrochemical method // *Advanced Powder Technology.* - 2013. - № 2. - P. 507-511.
- 74 Iglesias-Silva E., Rivasa J., León I. et al. Synthesis of silver-coated magnetite nanoparticles // *Journal of Non-Crystalline Solids.* - 2007. - V.353. - № 8. - P. 829-831.
- 75 Granitzer P., Rumpf K. Magnetic Nanoparticles Embedded in a Silicon Matrix // *Materials.* - 2011. - V. 4. - P. 908-928.
- 76 Tiwari P., Vig V., Dennis V. et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications // *Nanomaterials.* - 2011. - V.1. - P. 31-63.
- 77 Nikitenko S. I., Koltypin Y., Palchik O. et al. Synthesis of Highly Magnetic, Air-Stable Iron-Iron Carbide Nanocrystalline Particles by Using Power Ultrasound // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2001. - № 40. - P. 4447-4449.
- 78 Cho S., Jarrett B., Louie A., Kauzlarich S. Gold-coated iron nanoparticles: a novel magnetic resonance agent for T1 and T2 weighted imaging // *Nanotechnology.* - 2006. – V. 17. - № 3. - P. 640
- 79 Rudakovskaya P., Beloglazkina E., Majouga A., Zyk N. Synthesis and characterization of terpyridine-type ligand-protected gold-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles // *Mendeleev Commun.* - 2010. - № 20. - P. 158-160.
- 80 Lua Q., Yao K., Xie D. et al Interfacial electronic structure and oxygen vacancy states in Fe/MgO/Fe tunneling junctions. // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* - 2006. - № 301. - P. 644-645.
- 81 Ahmad T., Bae H., Rhee I. et al. Gold-coated iron oxide nanoparticles as a T2 contrast agent in magnetic resonance imaging. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2012. - V. 12. - P. 5132-5137.
- 82 Tamer U, Gündoğdu Y, Hakkı Boyacı I. et. al. Synthesis of magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection // *J. Nanopart. Res.* - 2009. - V. 12. - № 4. - P.1187-1196.

- 
- 83 Lyon J.L., Fleming D.A., Stone M.B. et al. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding // *Nano Lett.* - 2004. - V. 4. - № 4. - P. 719–723.
- 84 Robinson I., Tung D., Maenosono S. et al. Synthesis of core-shell gold coated magnetic nanoparticles and their interaction with thiolated DNA // *Nanoscale.* - 2010. - V. 12. - P. 2624-2630.
- 85 Xu Z., Hou Y., Sun S. Magnetic core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - № 28. - P. 8698-8699.
- 86 Wang L., Park H., Lim S. et al. Core@shell nanomaterials: gold-coated magnetic oxide nanoparticles // *J. Mater. Chem.* - 2008. - № 18. - P. 2629-2635.
- 87 Wang L. Y., Luo J., Maye M. M., Fan Q., Rendeng Q., Engelhard M. H., Wang C. M., Lin Y. H., Zhong C. J. Iron oxide–gold core–shell nanoparticles and thin film assembly // *J. Mater. Chem.* – 2005. - № 15. – P. 1821-1839.
- 88 Park J. N., An K. J., Hwang Y. S., Park J. G., Noh H. J., Kim J. Y., Park J. H., Hwang N. M., Hyeon T. W. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals // *Nat. Mater.* - 2004. - № 3. - P. 891-895.
- 89 Lin J., Zhou W., Kumbhar A. et al. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly // *J. Solid State Chem.*. - 2001. - V. 159. - P. 26-31.
- 90 Cho S. J., Idrobo J. C., Olamit J., Liu K., Browning N. D., Kauzlarich S. M. Growth mechanisms and oxidation resistance of gold-coated iron nanoparticles // *Chem. Mater.* – 2005. - № 17. – P. 3181-3186.
- 91 Mikhaylova M., Kim D. K., Bobrysheva N., Osmolowsky M., Semenov V., Tsakalatos T., Muhammed M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification // *Langmuir.* – 2004. - № 20. – P. 2472-2477.
- 92 Mandal M., Kundu S., Ghosh S. K., Panigrahi S., Sa T. K., Yusuf S. M., Pal T. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. - № 286. – P. 187-194.
- 93 Wang L. Y., Luo J., Fan Q., Suzuki M., Suzuki I. S., Engelhard M. H., Lin Y. H., Kim N., Wang J. Q., Zhong C. J. Monodispersed core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles // *J. Phys. Chem. B* – 2005. - № 109. – P. 21593-21601.
- 94 Nikoobakht B., El-Sayed M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method // *Chem. Mater.* – 2003. - № 15. – P. 1957-1962.
- 95 Gao J. X., Bender C. M., Murphy C. J. Dependence of Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution // *Langmuir* – 2003. - № 19. – P. 9065-9070.
- 96 Liu M. Z., Guyot-Sionnest P. Synthesis and optical characterization of Au/Ag core/shell nanorods // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. - № 108. – P. 5882-5888.
- 97 Kouassi G., Irudayaraj J. Magnetic and Gold-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Sensor // *Anal. Chem.* – 2006. - № 78. – V. 10. – P. 3234–3241.
- 98 Maleki H., Simchi A., Imani M. Size-controlled synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their surface coating by gold for biomedical applications // *J. Magn. Magn. Mat.* – 2012. - V. 324. - P. 3997–4005.
- 99 Fuente J., Alca'ntara D., Eaton P., Crespo P., Rojas T., Ferna'ndez A., Hernando A. Gold and Gold-Iron Oxide Magnetic Glyconanoparticles: Synthesis, Characterization and Magnetic Properties // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. - V. 110. - № 26. – P. 13021–13028.
- 100 Barrientos A. G.; Fuente J. M.; Rojas T. C., Ferna'ndez A., Penade's S. Gold glyconanoparticles: synthetic polyvalent ligands mimicking glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies // *Chem.sEur. J.* – 2003. - № 9. – P. 1909-1921
- 101 Xu, Z. C.; Hou, Y. L.; Sun, S. Magnetic Core/Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. - № 129. - P. 8698–8699.
- 102 Pang L. L., Li J. S., Jiang J. H., Le Y., Shen G. L., Yu R. Q. A novel detection method for DNA point mutation using QCM based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au core/shell nanoparticle and DNA ligase reaction // *Sens. Actuators B.* – 2007. - № 127. – P. 311–316.

- 
- 103 Salgueirino-Maceira V., Duarte M.C., Farle M. et al. Bifunctional Gold-Coated Magnetic Silica Spheres // *Chem. Mater.* - 2006. - V. 18. - P. 2701–2706.
- 104 Hu Y, Meng L, Niu L, Facile synthesis of superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@polyphosphazene@Au shells for magnetic resonance imaging and photothermal therapy // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2013. - V. 5. - № 11. - P. 4586-4591.
- 105 Zhou X., Wenlong X., Wang Y. Fabrication of Cluster/Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au Nanoparticles and Application in Protein Detection via a SERS Method // *J. Phys. Chem. C.* - 2010. - № 114. - P. 19607-19613.
- 106 Xie H-Y., Zhen R., Wang B. et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au Core/Shell Nanoparticles Modified with Ni<sup>2+</sup>-Nitrilotriacetic Acid Specific to Histidine-Tagged Proteins // *J. Phys. Chem C.* - 2010. - V. 114. - № 11. - P. 4825-4830.
- 107 Goon I.Y., lai L.M., Lim M. Fabrication and Dispersion of Gold-shell-Protected Magnetite nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine // *Chem. Mater.* - 2009. - V. 21. - P. 673–681.
- 108 Jana N., Gearheart L., Murphy C. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template // *Advanced Materials* - 2001. – V. 13. - № 18. P. 1389-1393.
- 109 Lim J., Majetich S., Tilton R. Stabilization of superparamagnetic iron oxide core – gold shell nanoparticles in high ionic strength media // *Langmuir* - 2009. - V. 25. - № 23. - P. 13384-13393.
- 110 Lee G., Kim J., Lee J.H. Development of magnetically separable polyanilinenanofibers for enzyme immobilization and recovery // *Enzyme Microb. Technol.* - 2008. - V. 45. - P. 466–472.
- 111 Li J., Zheng L., Cai H. Facile One-Pot Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Composite Nanoparticles for Dual-Mode MR/CT Imaging Applications // *ACS Appl. Mater. Interfaces* - 2013. - № 5. - P. 10357-10366.
- 112 Zhai Y., Zhai J., Wang Y. et al. Fabrication of Iron Oxide Core/Gold Shell Submicrometer Spheres with Nanoscale Surface Roughness for Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering // *J. Phys. Chem. C* - 2009. - № 113. - P. 7009-7014.
- 113 Turcheniuk K., Tarasevych A., Kukhar V. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles // *Nanoscale* - 2013. - № 5. - P. 10729-10752.
- 114 Guerrero-Martínez A., Pe´rez-Juste J., Liz-Marzan L. et al. Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials // *Adv.Mater.* - 2010. - № 22. - P. 1182-1195.
- 115 Jie B., Wei C., Taotao L. et al. Bifunctional Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Protein Separation // *Acs Nano* - 2007. – V. 1. - № 4. - P. 293-298.
- 116 Montazeri H., Amani A., Shahverdi H.R., et al. Separation of the defect-free Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au core/shell fraction from magnetite-gold composite nanoparticles by an acid wash treatment // *J. Nanostr. Chem.* - 2013. - V. 3. - № 25. - P. 1–6.
- 117 Shi F., Hui W., Cui Y., et al. Surface modification and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au composite nanoparticles // *Nano.* - 2011. - V. 6. - P. 145–151.
- 118 Zhang J., Post M., Veres T., et al. Laser-Assisted Synthesis of Superparamagnetic Fe@Au Core-Shell Nanoparticles // *J. Phys. Chem.* - 2006. - V. 110. – P. 7122–7128.
- 119 Goon I.Y., lai L.M., Lim M. Fabrication and Dispersion of Gold-shell-Protected Magnetite nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine // *Chem. Mater.* - 2009. - V. 21. - P. 673–681.
- 120 Kinoshita T., Seino S., Okitsu K., et al. Magnetic evaluation of nanostructure of gold–iron composite particles synthesized by a reverse micelle method // *J. Alloys Com.* - 2003. - V. 359. - P. 46–50.
- 121 Lua Q.H., Yao K.L., Xi D., et al. Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores // *J. Magn. Magn. Mater.* - 2006. - V. 301. - P. 44–49.
- 122 Pham T.T., Cao C., Sim S.J. Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations // *J. Magn. Magn. Mater.* - 2008. - V. 320. - P. 2049–2055.

- 
- 123 Jeong J., Ha T.H., Chung B.H. Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles // *Anal. Chim. Act.*. - 2006. - V. 569. - P. 203–209.
- 124 Zhou X., Xu W., Wang Y. et al. Fabrication of Cluster/Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au Nanoparticles and Application in Protein Detection via a SERS Method // *J. Phys. Chem. C*. - 2010. - V. 114. - P. 19607–19613.
- 125 Zhou T., Wu B., Xing D. Bio-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core/Au shell nanoparticles for targeting and multimodal imaging of cancer cells // *J. Mater. Chem.*. – 2012. - V. 22. - P. 470-477.
- 126 Tamer U, Gündoğdu Y, HakkıBoyacı I. et. al. Synthesis of magnetic core–shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection // *J. Nanopart. Res.*. - 2009. - V. 12. - № 4. - P.1187-1196.
- 127 Li J., Xu Q., Wei X. et al. Electrogenerated Chemiluminescence Immunosensor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Nanoparticles // *J. Agric. Food Chem.*. – 2013. - V. 61. - P. 1435–1440.
- 128 Liu H. L., Sonn C. H., Wu J. H. et al. Synthesis of streptavidin-FITC-conjugated core–shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au nanocrystals and their application for the purification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes // *Biomater.*. – 2008. - V. 29. - P. 4003-4011.
- 129 Y.-R. Cui, Hong C., Zhou Y.-L. et al. Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au magnetic nanoparticles for cell separation // *Talanta*. – 2011. - V. 85. - P. 1246–1252.
- 130 J.-D. Qui, Xiong M., Liang R.-P. Synthesis and characterization of ferrocene modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au magnetic nanoparticles and its application // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. - V. 24. - P. 2649–2653.
- 131 Kayal S., Ramanujan R. V. Anti-Cancer drug loaded iron–gold core–shell nanoparticles (Fe@ Au) for magnetic drug targeting // *J. of nanosci. and nanotech.*. – 2010. - V. 10. - № 9. - P. 5527-5539.
- 132 Salehizadeh H., Elham H., Meisam S. et al. Synthesis and characterization of core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-gold-chitosan nanostructure // *J. of Nanobiotech.*. – 2012. - V. 10. - № 1. - P. 1-7.
- 133 Lo C.K., Xiao D., Choi M. Homocysteine-protected gold-coated magnetic nanoparticles: synthesis and characterization // *J. Mater. Chem.*. - 2007. - V. 17. - № 23. - P.2418–2427.
- 134 Wang Y.J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application // *Quan. Imag. Med. Sur.*. - 2011. - V. 1. - № 1. - P. 36–40.
- 135 Bucak S., Jones D.A., Laibinis P.E. Protein Separations Using Colloidal Magnetic Nanoparticles // *Biotechnol. Prog.*. - 2003. - V. 19. - P. 477–484.
- 136 Klyachko N.L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N. et al. Change of the Enzyme Reaction Rate in Magnetic Nanosuspensions by Non-Heating Magnetic Field // *Angewandte Chemie. International Edition*. - 2012. - V.51. - P. 12016-12019.
- 137 Hergt R., Dutz S., Müller R. et al. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy // *J. Phys.: Condens. Matter.*. - 2006. - V. 18. - P. 2919-2934.
- 138 Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*. - 1978. - V. 58. - P. 141-146.
- 139 Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // *Бюллетень сибирской медицины*. - 2008. - №2. - С.70-78.
- 140 Reddy L., Arias J.L., Nicolas J., et al. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications // *Chem. Rev.*. - 2012. - V. 112. - P. 5818–5878.
- 141 Zhang Y ., Kohler N., Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake // *Biomaterials* - 2002. - V. 23. - P. 1553—1561.
- 142 Singh N., Jenkins G., Asadi R. et al. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) // *Nano Reviews*. – 2010. - V.1. - P. 5358-5372.
- 143 Губин С.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // *Успехи химии*. - 2005. - № 74. - С. 539-574.
- 144 Alkilany A.M., Murphy C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? // *J Nanopart Res.*. – 2010. - V. 12. - P. 2313–2333.

- 
- 145 Berry C.C., Wells S., Charles S. et al. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro // *Biomaterials*. - 2003. - V. 24. - P.4551-4557.
- 146 Connor E.E., Mwamuka J., Gole A. et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity // *Small*. - 2005. - V. 1. - P. 325–327.
- 147 Pan Y., Neuss S., Leifert A. et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // *Small*. - 2007. - V. 3. - P. 1941–1949.
- 148 Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U. et al. Cell selective response to gold nanoparticles // *Nano-medicine*. - 2007. - V. 3. - P. 111–119.
- 149 Ahmed O.S., Mohamed M.B., Zekri A.R.N. Synthesis of the newly developed Core-Shell Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magneto-plasmonic nanocomposite in Cancer Cells // *Life Sci. J.* - 2014. - V. 11. - № 10. - P. 182-187.
- 150 Chao X., Shi F., Zhao Y. Cytotoxicity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au composite nanoparticles loaded with doxorubicin combined with magnetic field // *Pharmazie*. – 2010. - V. 65. - P. 500-504.
- 151 Salado J., Insausti M., Lezama L. Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au superparamagnetic nanoparticles: in vitro bioactivity // *Nanotechnology*. - 2012. - V. 23. - P. 1-10.
- 152 Никифоров В.Н. Биомедицинские применения магнитных наночастиц // *Наука и технологии в промышленности*. - 2011. - № 1. - С. 90-99.
- 153 Руммени Э., Раймер П., Хайндель В. Магнитно-резонансная томография тела (пер.с англ.) / «МЕДпресс-информ»: М. – 2014. – 848 с.
- 154 Wang Y.J., Hussain S.M., Krestin G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging // *Eur. Radiol.* - 2001. - V. 11. - P. 2319–2331.
- 155 Oiao R., Yang C., Gao M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications // *J. Mater. Chem.* - 2009. - V. 19. - P. 6274-6293.
- 156 Menichetti L., Manzoni L., Paduano L. Iron Oxide-Gold Core-Shell Nanoparticles as Multimodal Imaging Contrast Agent // *Ieee sensors J.* – 2013. - V. 13. - № 6. - P. 2341-2347.
- 157 Thomas C.R., Ferris D.P. et al., Noninvasive remote-controlled release of drug molecules in vitro using magnetic actuation of mechanized nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - V. 132. - P. 10623–10625.
- 158 Arruebo M., Fernandez-Pacheco R, Ibarra I.M. et al. Magnetic Nanoparticles for drug delivery // *Nano Today*. - 2007. - V. 2. - № 6. - P. 22-32.
- 159 Mykhaylyk O., Cherchenko A., Ilkin A. et al. Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats // *J. Magn. Magn. Mater.* - 2001. - V. 225. - P. 241—247.
- 160 Cherukuri P., Glazer E.S., Curley S.A. Targeted Hyperthermia using nanoparticles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2010. - V.62. - P. 339-345.
- 161 Kim D., Rozhkova E.A., Ulasov I.V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction // *Nature Mater.* - V. 9. - P. 165-171.
- 162 Mohammad F., Balaji G., Weber A., et al. Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles // *J. Phys. Chem.* - 2010. - V. 114. - P. 19194–19201.
- 163 Shubayev V.I., Pisanic T.R., Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2006. - V. 61. - P. 467–477.
- 164 Ren J., Wang F., Wei G. MRI of Prostate Cancer Antigen Expression for Diagnosis and Immunotherapy // *PLoS ONE*. - 2012. - V. 7. - № 6. - P. 1-10.
- 165 J. Carrey, B. Mehdaoui, M. Respaud. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization // *J. Appl. Phys.* - 2011. - V. 109. - № 8. - P. 132-155.
- 166 Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Головин Д.Ю. и др., Новый подход к управлению кинетикой биохимических реакций в магнитной наносuspension с помощью низкочастотного магнитного поля // *Письма в ЖТФ*. - 2013. - Т. 39. - № 5. - С. 24-32.

- 
- 167 Berezin I.V., Klivanov A.M., Samokhin G.P. et al. Regulation by Mechanical Means of the Catalytic Properties of Enzymes Attached to Polymer Fibers // *Methods in Enzymology*. - 1976. - V. 44. - P. 558-571.
- 168 Ryswyk H.V., Turtle E.D., Watson-Clark R., Tanzer T.A., Herman T.B., Chong P.Y., Wagner C.E. Reactivity of Ester Linkages and Pentaammineruthenium(III) at the Monolayer Assembly/Solution Interface. // *Langmuir*. - 1996. - V.12. - P. 6143-6150.
- 169 Liu F.-K. Preconcentration and separation of neutral steroid analytes using a combination of sweeping micellar electrokinetic chromatography and a Au nanoparticle-coated solid phase extraction sorbent. // *Journal of Chromatography A*. 2008. V. 1215. P.194–202
- 170 Miranda O., Chen H., You C., Mortenson D. Enzyme Amplified Array Sensing of Proteins in Solution and in Biofluids // *J. Am. Chem. Soc.*. – 2010. – V. 132. - № 14. – P. 5285–5289.
- 171 Selve C., Ravey J.-C., Stebe M.-J., Moudjahid C. El, Moumni E.M., Delpuech J.-J. Monodisperse perfluoro-polyethoxylated amphiphilic compounds with two-chain polar head - preparation and properties // *Tetrahedron*. – 1991. - № 47. – P. 411-416.
- 172 Stefanko M. J., Gun'ko Y. K., Rai D. K., Evans P. Synthesis of functionalised polyethylene glycol derivatives of naproxen for biomedical applications // *Tetrahedron*. – 2008. - № 64. - P. 10132-10139.
- 173 Boden N., Bushby R., Clarkson S., Evans S., Knowles P., Marsh A. The design and synthesis of simple molecular tethers for binding biomembranes to a gold surface // *Tetrahedron*. – 1997. - № 53. – P. 10939-10945.
- 174 Pilkington-Miksa M. A., Sarkar S., Writer M. J., Barker S. E., Shamlou P. A., Synthesis of Bifunctional Integrin-Binding Peptides Containing PEG Spacers of Defined Length for Non-Viral Gene Delivery // *Eur. J. Org. Chem.*. – 2008. - № 17. - P. 1900-1914.
- 175 Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы / Киев. Наукова думка. – 1987. - 255 с.
- 176 Bonnett R. Photodynamic therapy in historical perspective // *Rev. Contemp. Pharmacother.* – 1999. – V. 10. - № 1. – P. 1-17.
- 177 Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy // *J. Natl. Cancer Inst.*. – 1998. - № 90. – P. 889-905.
- 178 Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // *Лазерная медицина*. – 2002. № 4. – P. 4-8.
- 179 Ronn A.M. Pharmacokinetics in photodynamic therapy // *Rev. Contemp. Pharmacother.* – 1999. - № 10. – P. 39-46.
- 180 Freitas I. Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer retaining normal and malignant tissues // *J. Photochem. Photobiol.* – 2000. - № 7. – P. 359-361.
- 181 Mason M.D. Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer // *Rev. Contemp. Pharmacother.* – 1999. - № 10. – P. 25-37.
- 182 Vrouwenraets M.B., Visser G.W., Snow G.B., van-Dongen G.A. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy // *Anticancer-Res.*. – 2003. - № 23. – P. 505-522.
- 183 Allison R. R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J.H., Sibata C.H. Photosensitizers in Clinical PDT // *Photodiag. Photodyn. Therapy*. – 2004. - № 1. – P. 27-42.
- 184 Moan J., Peng Q., Iani V. et al. Biodistribution, pharmacokinetic and in vivo fluorescence spectroscopic studies of photosensitizers // *SPIE*. – 1995. - № 2625. – P. 234-238.
- 185 Moser J.G. Definitions and General Properties of 2nd and 3rd Generation Photosensitizers / London: Harwood Academic Publishers. – 1997. - P. 3-8.
- 186 Henderson B.W., Sumlin A.B., Owcharczak B.L., Dougherty T.J. Bacteriochlorophyll a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors // *Photochem. Photobiol. B*. – 1991. - № 10. – P. 303-313.
- 187 Koudinova N.V., Pinthus J.H., Brandis A., Brenner O., Bendel P., Ramon J., Eshhar Z., Scherz A., Salomon Y. Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo

- 
- treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts // *Int. J. Cancer.* – 2006. - № 104. – P. 782-789.
- 188 Brandis A., Mazor O., Neumark E., Rozenbach-Belkin V., Salomon Y., Scherz A. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins // *Photochem. Photobiol.* – 2005. - № 81. – P. 983-993.
- 189 Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll a and Its Derivatives: Chemistry and Perspectives for Cancer Therapy // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* -2008. - № 8. – P. 683-697.
- 190 Mironov A.F., Grin M.A. Synthesis of Chlorin and Bacteriochlorin Conjugates for Photodynamic and Boron Neutron Capture Therapy // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2008. - № 12. – P. 1163-1172.
- 191 Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., Дзарданов Д.В., Головин К.В., Феофанов А.В., Якубовская Р.И. Гидразиды в ряду бактериохлорофилла а, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения / Патент РФ - № 2223274. – 2004.
- 192 Horoszewicz J.S., Kawinski E., Murphy G.P.. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients // *Anticancer Res.* – 1987 – V.7 – P. 927-936.
- 193 Ghoshl A. Heston W. D.W.. Tumor Target Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) and its Regulation in Prostate Cancer // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2004-V. 91 – P. 528–539.
- 194 Grauer L.S., Lawler K.D., Marignac J.L., Kumar A., Goel A.S., Wolfert R.L.. Identification, Purification, and Subcellular Localization of Prostate-specific Membrane Antigen PSM' Protein in the LNCaP Prostatic Carcinoma Cell Line // *Cancer Research* – 1998 – V. 58 –P. 4787-4789.
- 195 Davis M.I., Bennett M.J., Thomas L.M., Bjorkman P.J. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2005. - V. 102 – P. 5981-5987.
- 196 Maresca K.P., Hillier S.M., Femia F.J., Keith D., Barone C., Joyal J.L., Zimmerman C.N., Kozokowski A.P., Barrett J.A., Eckelman W.C., Babich J.W.. A series of Halogenated Heterodimeric Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) as Radiolabeled Probes for Targeting Prostate Cancer // *J. Med. Chem.* -2009. - V.52. - P. 347-357.
- 197 De Titta G.T., et al. Molecular structure of biotin. Results of two independent crystal structure investigations // *J. Am. Chem. Soc.* – 1976. – V. 98. – P. 1920-1926.
- 198 De Clercq P.J. Biotin: A Timeless Challenge for Total Synthesis // *Chem. Rev.* – 1997. - № 97. – P. 1755-1792.
- 199 Chaisemartin L., et al., Synthesis and Application of a N-1' Fluorescent Biotinyl Derivative Inducing the Specific Carboxy-Terminal Dual Labeling of a Novel RhoB-Selective // *Bioconjugate Chem.* – 2009. - № 20. – P. 847-855.
- 200 Baxter, R.L., Coutts A. Chemistry of biotin: access to 2,3- and 5,6-didehydrobiotin derivatives // *J. Chem. Soc.* – 1988. - № 1. – P. 913-915.
- 201 Amspacher D.R., et al. Synthesis of a Reaction Intermediate Analogue of Biotin-Dependent Carboxylases via a Selective Derivatization of Biotin. // *Org. Lett.* – 1999. - № 1. – P. 99-102.
- 202 Brust M., Fink J., Bethell D., Schiffrin D.J., Kiely C.. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles // *Chem. Commun.* – 1995. – P. 1655 – 1656.
- 203 Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J.. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss. Faraday Soc.* – 1951. – V. 11. – P. 55-75.
- 204 Bin H., Song I., Hyeon T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents // *Adv. Mater.* - 2009. - V. 21. - P. 2133–2148.
- 205 Hasany F., Abdurahman H., Sunarti R., Jose R. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Chemical Synthesis and Applications Review // *Current nanoscience.* - 2013. - V. 9. - P.561-575.
- 206 Cullity B.D. *Introduction to Magnetic Materials.* 2 ed.MA: Addison-Wesley. - 2008. - 568 p.
- 207 Kavand A. A new procedure for preparation of polyethylene glycol-grafted magnetic iron oxide nanoparticles // *J Nanostruct Chem.* – 2014. – V. 4. – P. 111 - 118.



- 
- 208 Rudakovskaya P.G., Beloglazkina E.K., Majouga A.G., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Zyk N.V. Synthesis of Magnetite–Gold Nanoparticles with Core–Shell Structure // *Moscow University Chemistry Bulletin*. - 2015. - V. 70. - № 3. - P. 149-156.
- 209 Jolivet J-P., Tronc E. Interfacial electron transfer in colloidal spinel iron oxide. Conversion of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in aqueous medium // *J. Colloid and Interface Science*. - 1988. - V. 125. - P. 688-701.
- 210 Cornell R.M., Schwertmann U. *The Iron Oxides: Structures, Properties, Reactions, Occurrences and Uses* / Wiley VCH Verlag. – Wienheim. - 2004. - 664 p.
211. Л.Титце, Т. Айхер *Препаративная органическая химия* / М: МГУ. - 1964. - 704 с.
- 212 Chan W., White P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* / Oxford. - 2004. - 346 p.
- 213 Maresca K.P., Hillier S.M., Femia F.J., Keith D., Barone C., Joyal J.L., Zimmerman C.N., Kozokowski A.P, Baret J.A., Eckelman W.C., Babich J.W. A series of Halogenated Heterodimeric Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) as Radiolabeled Probes for Targeting Prostate Cancer // *J. Med. Chem.* – 2009. - V.52. - P. 347-357.
- 214 Kiviranta P., Suuronen T., Wallén E., Leppänen J., Tervonen J., Kyrylenko S., Salminen A., Poso A., Nε-Thioacetyl-Lysine-Containing Tri-, Tetra-, and Pentapeptides as SIRT1 and SIRT2 Inhibitors // *J. Med. Chem.*. – 2009. – V. 52. - № 7. – P. 2153–2156.
- 215 Tomohiko F, Yoshiyuki M, Takanori S, Detection of 210 kDa receptor protein for a leaf-movement factor by using novel photoaffinity probes // *Tetrahedron*. – 2005. - №61. – P. 7874–7893.
- 216 Sebastian H, Mary M. N., Stefan H Exponential growth of functional poly(glutamic acid)dendrimers with variable stereochemistry // *Polym. Chem.*. – 2010. - № 1. – P. 69-71.
- 217 Shyamaprasad G., Swapan D., Directed Molecular Recognition: Design and Synthesis of Neutral Receptors for Biotin To Bind Both Its Functional Groups // *J. Org. Chem.* – 2006. - № 71. – P. 7280-7287.
- 218 Andy C. L., Manfred K., John M. S., Ingo K., Cooperative Effect of a Classical and a Weak Hydrogen Bond for the Metal-Induced Construction of a Self-Assembled b-Turn Mimic // *Chem. Eur. J.* – 2009. - № 15. – P. 10405 – 10422.
- 219 Rossi L., Quach A., Rosenzweig Z. Glucose oxidase–magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing // *Anal Bioanal Chem.* - 2004. - V. 380. - P. 606–613.
- 220 Park J., Kwangjin A., Hwang Y. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals // *Nature Materials*. – 2004. - V. 3. - № 12. – P. 891-895.
- 221 Verges A., Costo R., Roca A., Marco F., Morales M. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit // *J. Phys. D Appl. Phys.* - 2008. - V. 41. - P. 134003-134013.
- 222 Fields.R. Estimation of amino groups using TNBS // *Methods in Enzymology*. - 1972. - V. 25. - P. 464-469.