



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 7/06 (2020.05); A61L 27/06 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2019131783, 08.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.10.2019

Дата регистрации:
05.11.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.10.2019

(45) Опубликовано: 05.11.2020 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

450075, Респ. Башкортостан, г. Уфа, пр-кт
Октября, 141, ИНСТИТУТ НЕФТЕХИМИИ
И КАТАЛИЗА УФИЦ РАН

(72) Автор(ы):

Парфенова Людмила Вячеславовна (RU),
Лукина Елена Сергеевна (RU),
Галимшина Зульфия Рамиловна (RU),
Гильфанова Гузель Ураловна (RU),
Парфенов Евгений Владимирович (RU),
Данилко Ксения Владимировна (RU),
Мукаева Вета Робертовна (RU),
Фаррахов Рузиль Галиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ УФИМСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: PARFENOV E.V. et al., Surface
functionalization via PEO peptide for
nanostructured titanium implants and their in
vitro assessment, Surface & Coating Technology,
25.10.2018, v. 357, p. 669-683. BEUVELOT J. et
al, In vitro kinetic study of growth and
mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on
titanium surface coated with a RGD (см. прод.)

(54) КОМБИНИРОВАННЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ RGD-
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ БИФОСФОНАТОВ АМИНОКИСЛОТ И ПЭО-ПОДСЛОЯ ДЛЯ
ТИТАНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области получения
комбинированных покрытий для титана на основе
биологически активных RGD-
функционализированных бифосфонатных
производных Arg-Gly-Asp-Cys-(RGDC)-
замещенных ([[(2,5-диоксо-пирролидин-1-ил)
алканоил]амино}-1-гидроксиалкан-1,1-диил)
бисфосфоновых кислот и применению указанных
соединений в качестве органических покрытий
для моделирования биологической активности

ПЭО-модифицированной поверхности титановых
имплантатов. RGD-функционализированные
бифосфонатные производные Arg-Gly-Asp-Cys-
(RGDC)-замещенных ([[(2,5-диоксо-пирролидин-
1-ил)алканоил]амино}-1-гидроксиалкан-1,1-диил)
бисфосфоновых кислот наносят путем физико-
химической адсорбции из водных растворов с
концентрацией $\sim 10^{-3}$ М/л в течение 1 часа на титан
(Grade 2) с неорганическим оксидированным
пористым подслоем, полученным в ходе

плазменно-электролитического оксидирования.
Технический результат – получение покрытий,
улучшающих адгезию и пролиферацию

мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов
и остеобластоподобных клеток. 2 н.п. ф-лы, 3 пр.,
3 ил.

(56) (продолжение):

functionalized bisphosphonate. Journal Biomedical Materials Research, 2009, v. 90(2), p.873-881. ХЛУСОВ И.А. и др., Модификация результатов биоинженерии костной ткани in vivo RGD пептидами, нанесенными на наноструктурированные кальцийфосфатные покрытия, Гений Ортопедии, 2009, номер 4, с. 25-30. RU 2519736 C2, 20.06.2014. US 20050147645 A1, 07.07.2005.

R U 2 7 3 5 6 4 9 C 1

R U 2 7 3 5 6 4 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 7/06 (2020.05); A61L 27/06 (2020.05)(21)(22) Application: **2019131783, 08.10.2019**(24) Effective date for property rights:
08.10.2019Registration date:
05.11.2020

Priority:

(22) Date of filing: **08.10.2019**(45) Date of publication: **05.11.2020 Bull. № 31**

Mail address:

**450075, Resp. Bashkortostan, g. Ufa, pr-kt
Oktyabrya, 141, INSTITUT NEFTEKHIMII I
KATALIZA UFITS RAN**

(72) Inventor(s):

**Parfenova Lyudmila Vyacheslavovna (RU),
Lukina Elena Sergeevna (RU),
Galimshina Zulfiya Ramilovna (RU),
Gilfanova Guzel Uralovna (RU),
Parfenov Evgenij Vladimirovich (RU),
Danilko Kseniya Vladimirovna (RU),
Mukaeva Veta Robertovna (RU),
Farrakhov Ruzil Galievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE
BYUDZHETNOE NAUCHNOE
UCHREZHDENIE UFIMSKIY FEDERALNYI
ISSLEDOVATELSKIY TSENTR ROSSIJSKOY
AKADEMII NAUK (RU)**

(54) **COMBINED COATINGS BASED ON BIOLOGICALLY ACTIVE RGD-FUNCTIONALISED AMINOACID
BISPHOSPHONATES AND PEO-SUBLAYER FOR TITANIUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

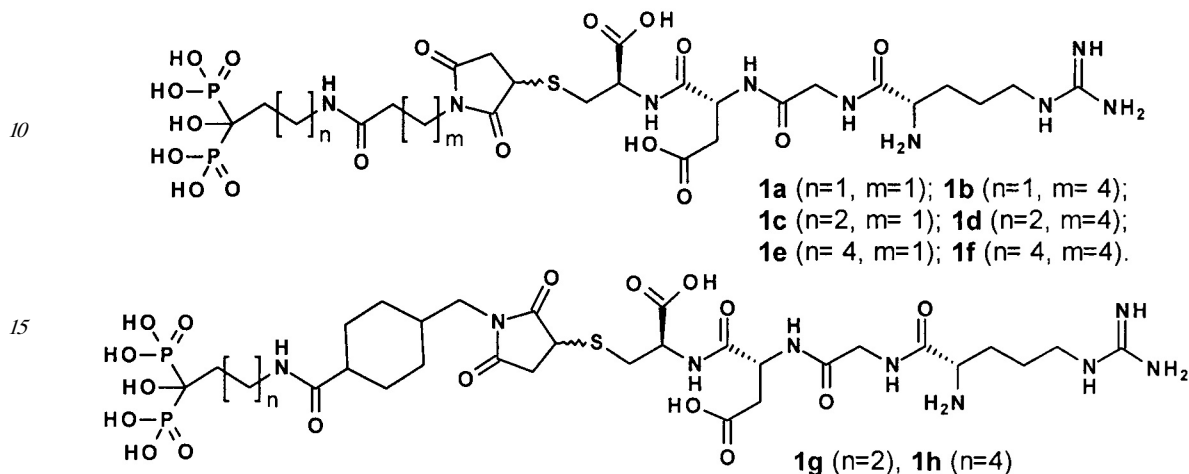
SUBSTANCE: invention relates to production of combined coatings for titanium based on biologically active RGD-functionalised bisphosphonate derivatives Arg-Gly-Asp-Cys-(RGDC)-substituted ($\{[(2,5\text{-dioxo-pyrrolidin-1-yl)alkanoyl]amino}\}$ -1-hydroxyalkane-1,1-diyl)bisphosphonic acids and use of said compounds as organic coatings for simulating biological activity of PEO-modified surface of titanium implants. RGD-functionalised bisphosphonate derivatives of Arg-Gly-Asp-Cys-(RGDC)-substituted ($\{[(2,5\text{-dioxo-pyrrolidin-1-yl)alkanoyl]amino}\}$ -1-hydroxyalkane-1,1-diyl)bisphosphonic acids is applied by physical-chemical adsorption from aqueous solutions with concentration of $\sim 10^{-3}$ M/l for 1 hour on titanium (Grade 2) with inorganic oxidised porous sublayer, obtained during plasma-electrolytic oxidation.

1-yl)alkanoyl]amino}-1-hydroxyalkane-1,1-diyl)bisphosphonic acids is applied by physical-chemical adsorption from aqueous solutions with concentration of $\sim 10^{-3}$ M/l for 1 hour on titanium (Grade 2) with inorganic oxidised porous sublayer, obtained during plasma-electrolytic oxidation.

EFFECT: technical result is obtaining coatings, improving adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblastoid cells.

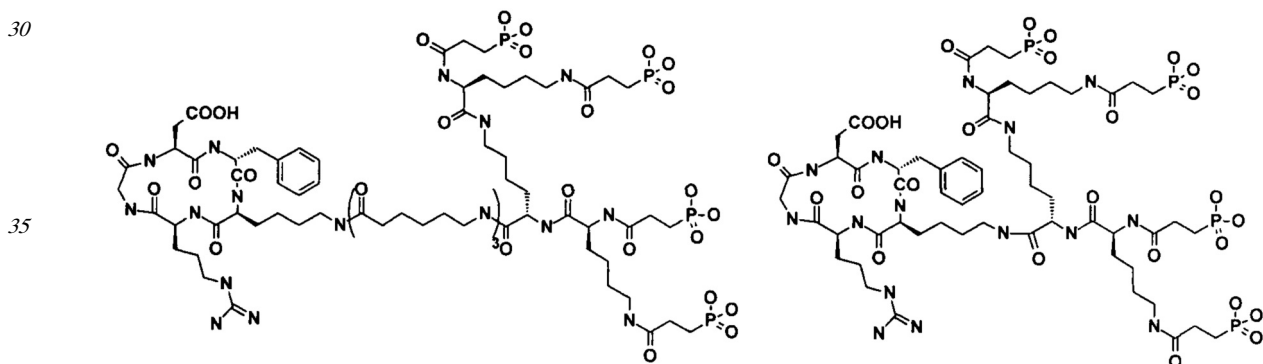
2 cl, 3 ex, 3 dwg

Изобретение относится к области получения комбинированных покрытий для титана на основе биологически активных RGD-функционализированных бифосфонатных производных Arg-Gly-Asp-Cys-(RGDC)- замещенных ($\{[(2,5\text{-диоксо-пирролидин-1-ил})\text{ алканоил}]\text{амино}\}$ -1-гидроксиалкан-1,1-диил)бисфосфоновых кислот общей формулы (1a-h) в сочетании с неорганическим оксидированным пористым подслоем, полученным в ходе плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО) металла:



Полученные покрытия могут найти применение для создания биологически активных биомиметических поверхностей для металлических имплантатов, улучшающих их остеоинтеграцию ([1] Queffelec C., Petit M., Janvier P., Knight D. A., Bujoli B. Chem. Rev. 2012, 112, 3777-3807; [2] Meyers S.R., Grinstaff M.W. Chem. Rev. 2012, 112, 1615-1632).

В работах ([3] Auernheimer J., Zukowski D., Dahmen C., Kantlehner M, Enderle A., Goodman S.L., Kessler H. ChemBioChem. 2005, 6(11), 2034-2040; [4] Mas-Moruno C., Dorfher P.M., Manzenrieder F., Neubauer S., Reuning U., Burgkart R., Kessler H. J. Biomed. Mater. Res. 2013, 101 A, P. 87-97) разработаны покрытия для титановых имплантатов, в которых цикло (-RGDfK-) пептид связан с якорным блоком из четырех фосфонопропионовых кислот через спейсеры, состоящие из одного или трех фрагментов аминокислотных кислот.

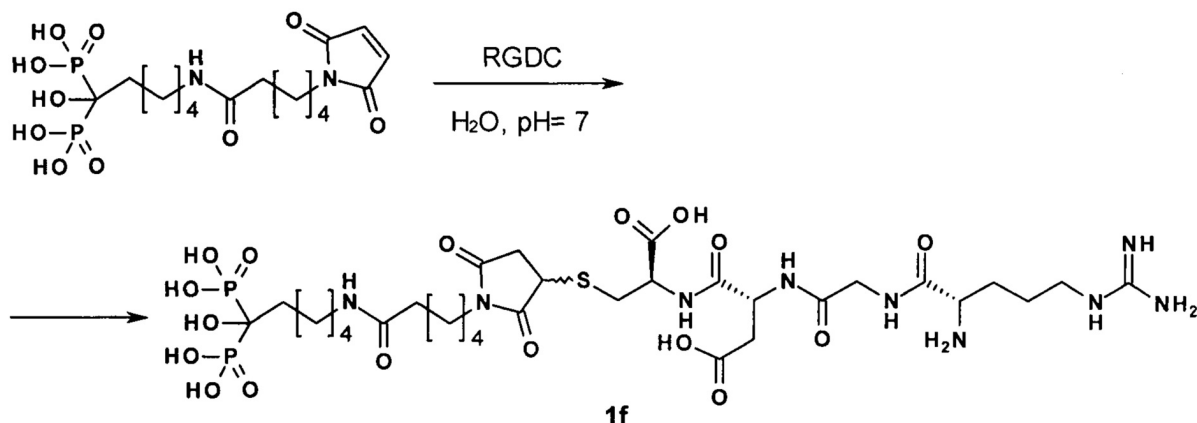


Вещества наносили на титановые диски (Ti6Al4V) путем их вымачивания в буферных растворах с концентрацией действующего вещества 100-0,1 μM при комнатной температуре в течение ночи. Адгезию клеток оценивали после 1 ч высевания клеток в планшеты с металлическими образцами. Показано увеличение степени адгезии мышинных остеобластов MC3T3-E1 на обработанной поверхности титана до 62% [3].

Иммобилизация пептидов на дисках Ti6Al4V привела к более высоким значениям клеточной адгезии по сравнению с нефункционализированными образцами, как на механически отрезанных, так и полученных после пескоструйной обработки поверхностях [4]. В качестве недостатков данного метода следует указать многостадийность синтеза целевых соединений (~ 16 стадий), дороговизну цикло(-

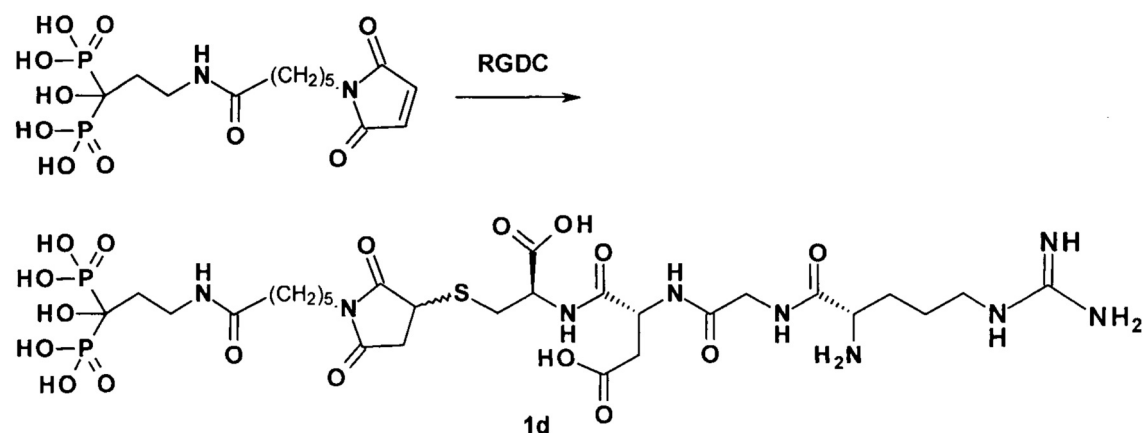
RGDfK-) пептидов, длительность обработки и возможную относительно более низкую степень химической адгезии полученных фосфонатов к неокисленной поверхности титана.

Известен синтез RGDC- замещенной (6-{[6-(2,5-диоксо-пирролидин-1-ил)гексаноил]амино}-1-гидроксигексан-1,1-диил)бисфосфоновой кислоты (1f) в реакции 4-N-(6-малеоимидогексаноил)аминобутан-1-гидрокси-1,1-бифосфоновой кислоты с RGDC-тетрапептидом в воде при pH=7 ([5] Beuvelot J., et al, 2009, J. Biomed. Mater. Res., 90B, 873-881). Полученное соединение наносили на стерилизованную и окисленную термически (15 ч при 200°C) поверхность титана путем физико-химической адсорбции из растворов (выдержка 3 ч) с концентрацией 10^{-4} и 10^{-10} М/л. Фиксация молекул на поверхности происходила путем дегидратации при 50°C, 0,3 мбар в течение 15 часов. Такая обработка поверхности металла улучшала адгезию, степень распределения и минерализацию остеобластоподобных клеток Saos-2.



В качестве недостатка данного метода можно отметить длительность обработки поверхности металла при нанесении покрытий.

Наиболее близким к изобретению является способ [Parfenov E.V. et al, Surface & Coatings Technology, 2019, 357, 669-683], в котором RGDC-замещенную (3-{[6-(2,5-диоксо-пирролидин-1-ил)гексаноил]амино}-1-гидроксигексан-1,1-диил)бисфосфоновую кислоту (1d) наносили на поверхность наноструктурированного титана (Grade 4), модифицированную с помощью плазменно-электролитического оксидирования, путем физико-химической адсорбции из растворов с концентрацией 10^{-3} М/л (время выдержки 3 ч с последующим высушиванием).



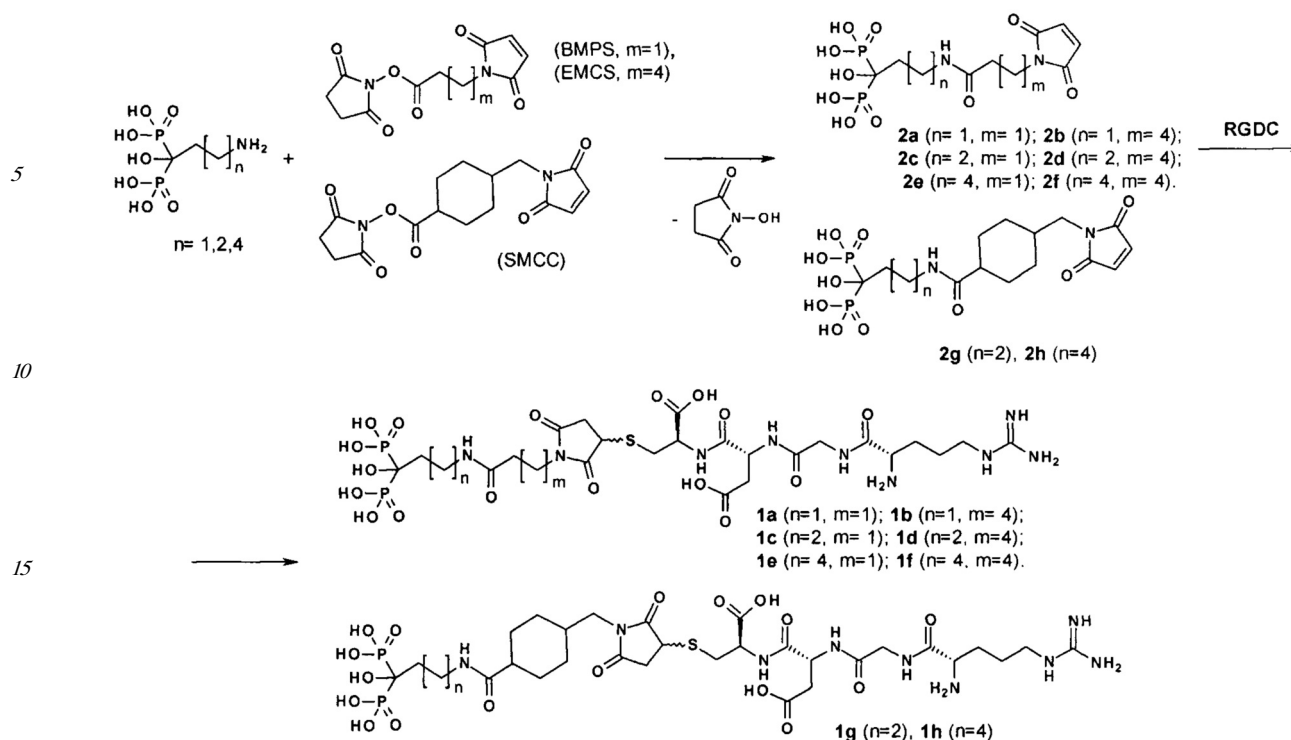
Испытания *in vitro*, проведенные с использованием фибробластов, показали, что данный вариант комбинированного покрытия обеспечивает усиление пролиферации адгезированных клеток на 45% по сравнению с необработанным наноструктурированным

титаном. К недостаткам метода следует отнести меньшую доступность и дороговизну наноструктурированного титана, отсутствие информации по влиянию структуры линкера и аминоксифосфоната на жизнедеятельность клеток различной природы, а также содержание в целевых продуктах примеси продуктов трансформации диоксана, образующихся на стадии синтеза прекурсоров - конъюгатов аминоксифосфоновых кислот с малеимидосукцинимидными линкерами.

Задачей изобретения является разработка комбинированных биологически активных покрытий на основе гибридных молекул, полученных путем химической сшивки

ксифосфонатов аминокислот (β -аланина, γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот) с линейным пептидом RGD - фрагментом белков межклеточного матрикса через линкеры, различающиеся длиной и структурой ((2,5-диоксопирролидин-1-ил)-3-(2,5-диоксопиррол-1-ил)пропаноата (BMPS), (2,5-диоксопирролидин-1-ил) -6- (2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноата (EMCS), (2,5-диоксопирролидин-1-ил) -4- [(2,5-диоксопиррол-1-ил)метил]циклогексанкарбоксилата (SMCC)), в сочетании с неорганическим оксидированным пористым подслоем, полученным в ходе плазменно-электролитического оксидирования металла, а также *in vitro* исследование адгезии, пролиферативной активности, жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов и остеобластоподобных клеток для выявления наиболее перспективных вариантов создаваемых покрытий.

Получение заявленных покрытий осуществляли следующим образом: 1 экв. аминоксифосфонатов аминокислот (β -аланина, γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот) вовлекали во взаимодействие с 1 экв. N-гидроксисукцинимидомалеимидных линкеров (BMPS, EMCS, SMCC), предварительно растворенных в ацетоне. Полученные производные после выделения и сушки смешивали с олигопептидом RGDC в соотношении 1:1 в водной среде при pH=7, в результате чего получали соединения 1a-h, структура которых установлена с помощью 1D и 2D спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P и MALDI-TOF/TOF спектрометрии. ПЭО покрытие получали на титане (Grade 2) в биполярном импульсном режиме в водном растворе, содержащем $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Образцы Ti с нанесенным ПЭО-покрытием выдерживали в водных растворах 1a-h с концентрацией $\sim 10^{-3}$ М/л в течение 1 часа, а затем высушивали.



Предлагаемый способ обладает следующими преимуществами: 1. Способ обеспечивает получение целевых продуктов - (RGDC)-замещенных ({[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)алканойл]амино}-1-гидрокси-алкан-1,1-диил)бисфосфоновых кислот, обладающих большей чистотой в сравнении с известным способом, в котором получаемые продукты содержат побочные продукты трансформации диоксана, используемого на этапе синтеза прекурсоров - конъюгатов аминокислот с малеимидосукцинимидными линкерами.

2. Полученные соединения могут быть применены к ПЭО-модифицированному титану (Grade 2), когда как в известном способе использован более дорогой и менее доступный наноструктурированный титан.

3. Показана перспективность применения новых производных 1a, 1c, 1g, 1h в сочетании с ПЭО - покрытием на Ti марки Grade 2 в качестве покрытий, улучшающих адгезию и пролиферацию фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток и остеобластоподобных MG63, тогда как в известном способе показана применимость 1d в сочетании с ПЭО- покрытием на наноструктурированном титане марки Grade 4 с использованием фибробластов в качестве модели.

Способ поясняется следующими примерами:

Общая методика синтеза RGD-замещенных бифосфонатов. Бифосфонаты аминокислот (β -аланина, γ -аминомасляной и ϵ -аминокапроновой кислот) (0.04 ммоль) растворяют в 0.6 мл воды, pH раствора доводят до 8-9 0.1 N раствором NaOH (~ 150 мкл). При хорошем перемешивании к полученному раствору прибавляют эквимольное количество линкера ((2,5-диоксопирролидин-1-ил)-3-(2,5-диоксопиррол-1-ил)пропаноата (BMPS), (2,5-диоксопирролидин-1-ил) -6- (2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноата (EMCS) или (2,5-диоксопирролидин-1-ил) -4 - [(2,5-диоксопиррол-1-ил)метил] циклогексанкарбоксилата (SMCC)) (0.04 ммоль), растворенного в 0.6 мл ацетона. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем нейтрализуют до pH=7 0.1 N раствором HCl и концентрируют при пониженном давлении. Получают конъюгаты аминокислот с малеимидосукцинимидными линкерами 2a-g в виде белого порошка. Тетрапептид RGDC

(0.01 ммоль) растворяют в 1.5 мл бидистиллированной воды, pH доводят до 7 добавлением 0.1 N р-ра NaOH. К раствору добавляют эквивалентное количество соединений 2a-g (0.01 ммоль). Реакционную массу перемешивают в течение 1-2 часов при 38-40°C, затем растворитель упаривают при пониженном давлении.

5 Пример 1. Синтез соединения 1a.

Бифосфонат (3-аланина (9.4 мг, 0.04 ммоль) растворяют в 0.6 мл воды, pH раствора доводят до 8-9 0.1 N раствором NaOH (~ 150 мкл). При хорошем перемешивании к полученному раствору прибавляют 10.7 мг линкера BMPS (0.04 ммоль), растворенного в 0.6 мл ацетона. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем нейтрализуют до pH=7 0.1 N раствором HCl и концентрируют при пониженном давлении. Получают конъюгат аминокислоты с малеимидосукцинимидным линкером 2a в виде белого порошка. Тетрапептид RGDC (4.5 мг, 0.01 ммоль) растворяют в 1.5 мл бидистиллированной воды, pH доводят до 7 добавлением 0.1 N р-ра NaOH. К раствору добавляют 3.9 мг соединения 2a (0.01 ммоль).
10 Реакционную массу перемешивают в течение 1-2 часов при 38-40°C, затем растворитель упаривают при пониженном давлении. Получают вещество в виде белого порошка с выходом 8.1 мг, 96%.

Пример 2. Синтез соединения 1c.

Бифосфонат γ -аминомасляной кислоты (10 мг, 0.04 ммоль) растворяют в 0.6 мл воды, pH раствора доводят до 8-9 0.1 N раствором NaOH (~ 150 мкл). При хорошем перемешивании к полученному раствору прибавляют 10.7 мг линкера BMPS (0.04 ммоль), растворенного в 0.6 мл ацетона. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем нейтрализуют до pH=7 0.1 N раствором HCl и концентрируют при пониженном давлении. Получают конъюгат аминокислоты с малеимидосукцинимидным линкером 2c в виде белого порошка. Тетрапептид RGDC (4.5 мг, 0.01 ммоль) растворяют в 1.5 мл бидистиллированной воды, pH доводят до 7 добавлением 0.1 N р-ра NaOH. К раствору добавляют 4 мг соединения 2c (0.01 ммоль). Реакционную массу перемешивают в течение 1-2 часов при 38-40°C, затем растворитель упаривают при пониженном давлении.
25 Получают вещество в виде белого порошка с выходом 8.3 мг, 97%.

Пример 3. Синтез соединения 1h.

Бифосфонат ϵ -аминокапроновой кислоты (11.1 мг, 0.04 ммоль) растворяют в 0.6 мл воды, pH раствора доводят до 8-9 0.1 N раствором NaOH (~ 150 мкл). При хорошем перемешивании к полученному раствору прибавляют 13.4 мг линкера SMCC (, 0.04 ммоль), растворенного в 0.6 мл ацетона. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем нейтрализуют до pH=7 0.1 N раствором HCl и концентрируют при пониженном давлении. Получают конъюгат аминокислоты с малеимидосукцинимидным линкером 2h в виде белого порошка. Тетрапептид RGDC (4.5 мг, 0.01 ммоль) растворяют в 1.5 мл бидистиллированной воды, pH доводят до 7 добавлением 0.1 N р-ра NaOH. К раствору добавляют 5.0 мг соединения 2h (0.01 ммоль). Реакционную массу перемешивают в течение 1-2 часов при 38-40°C, затем растворитель упаривают при пониженном давлении. Получают вещество в виде белого порошка с выходом 9.3 мг, 98%. Спектральные характеристики 2a-g, 1a-g.

45 Соединение 2a (BMPS- β). Спектр ЯМР ^1H (D_2O): 1.93-2.09 (м, 2H, C^2H_2), 2.42 (т, $^3\text{J}=6.5$ Гц, 2H, C^5H_2), 3.35 (т, $^3\text{J}=7.8$ Гц, 2H, C^3H_2), 3.71 (т, $^3\text{J}=6.0$ Гц, 2H, C^6H_2), 6.78 (с, HC=CH). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O): 32.61 (C^2), 34.37 (C^6), 34.77 (C^5), 35.57 (т, $^3\text{J}_{\text{C-P}}=7.8$ Гц, C^6),

72.87 (т, $^1J_{C-P}=133.7$ Гц, C^1), 134.43 (C^8), 172.65 (C^4), 173.01 (C^7). Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): 17.68. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 446.093 $[M+Na+K]^+$, 468.063 $[M+2Na+K]^+$, расч. для $C_{10}H_{16}N_2O_{10}P_2$ 386.189.

5 Соединение 2b (EMCS-β). Спектр ЯМР 1H (D_2O): 1.13-1.24 (м, 2H, C^7H_2), 1.43-1.57 (м, 4H, C^6H_2 , C^8H_2), 1.98-2.13 (м, 2H, C^2H_2), 2.14 (т, $^3J=7.4$ Гц, 2H, C^5H_2), 3.35-3.44 (м, 2H, C^3H_2), 3.42 (т, $^3J=7.0$ Гц, 2H, C^9H_2), 6.75 (с, 2H, HC=CH). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O): 10 24.81 (C^6), 25.41 (C^7), 27.28 (C^8), 32.76 (C^2), 35.49 (C^3), 35.74 (C^5), 37.43 (C^9), 72.93 (C^1), 134.27 (C^{11}), 173.42 (C^{10}), 176.46 (C^4). Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): 17.74. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 428.086 $[M]^+$, расч. для $C_{13}H_{22}N_2O_{10}P_2$ 428.269.

15 Соединение 2c (BMPS-γ). Спектр ЯМР 1H (D_2O): 1.63-1.76 (м, 2H, C^3H_2), 1.77-1.89 (м, 2H, C^2H_2), 2.42 (т, $^3J=6.4$ Гц, 2H, C^6H_2), 3.06 (т, $^3J=6.8$ Гц, 2H, C^4H_2), 3.71 (т, $^3J=6.6$ Гц, 2H, C^7H_2), 6.78 (с, HC=CH). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O): 23.18 (т, $^3J_{C-P}=6.8$ Гц, C^3), 31.03 (C^2), 34.46 (C^6), 34.70 (C^7), 40.14 (C^4), 73.78 (т, $^1J_{C-P}=134.8$ Гц, C^1), 134.47 (C^9), 172.66 (C^8), 20 173.37 (C^5). Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): 18.20. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 400.080 $[M]^+$, расч. для $C_{11}H_{18}N_2O_{10}P_2$ 400.215.

Соединение 2d (EMCS-γ). Спектр ЯМР 1H (D_2O): 1.12-1.28 (м, 2H, C^8H_2), 1.41-1.58 25 (м, 4H, C^7H_2 , C^9H_2), 1.66-1.80 (м, 2H, C^3H_2), 1.80-1.95 (м, 2H, C^2H_2), 2.14 (т, $^3J=7.5$ Гц, 2H, C^6H_2), 3.11 (т, $^3J=6.8$ Гц, 2H, C^4H_2), 3.42 (т, $^3J=6.9$ Гц, 2H, $C^{10}H_2$), 6.76 (с, 2H, HC=CH). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O): 23.36 (C^3), 24.87 (C^7), 25.26 (C^8), 27.43 (C^9), 31.06 (C^2), 35.61 30 (C^6), 37.34 (C^{10}), 39.98 (C^4), 73.81 (т, $^1J_{C-P}=134.1$ Гц, C^1), 134.26 (C^{12}), 173.41 (C^{11}), 176.80 (C^5). Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): 18.21. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 440.322 $[M-2H]^+$, расч. для $C_{14}H_{24}N_2O_{10}P_2$ 442.295.

35 Соединение 2e (BMPS-ε). Спектр ЯМР 1H (D_2O): 1.11-1.22 (м, 2H, C^4H_2), 1.32-1.43 (м, 2H, C^5H_2), 1.42-1.56 (м, 2H, C^3H_2), 1.76-1.91 (м, 2H, C^2H_2), 2.41 (т, $^3J=6.0$ Гц, 2H, C^8H_2), 3.04 (т, $^3J=6.8$ Гц, 2H, C^6H_2), 3.71 (т, $^3J=6.4$ Гц, 2H, C^9H_2), 6.82 (с, 2H, $C^{11}H_2$). Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O): 23.23 (т, $^3J_{C-P}=5.8$ Гц, C^3), 27.00 (C^4), 27.97 (C^5), 33.56 (C^2), 34.55 (C^9), 40 34.83 (C^8), 39.41 (C^6), 74.18 (с, $^1J_{C-P}=134.5$ Гц, C^1), 134.53 (C^{11}), 172.60 (C^{10}), 173.21 (C^7). Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): 18.50. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 428.086 $[M]^+$, расч. для $C_{13}H_{22}N_2O_{10}P_2$ 442.295.

45 Соединение 2f (EMCS-ε). Спектр ЯМР 1H (D_2O): 1.13-1.21 (м, 2H, $C^{10}H_2$), 1.20-1.31 (м, 2H, C^4H_2), 1.38-1.52 (м, 2H, C^5H_2), 1.44-1.57 (м, 6H, C^3H_2 , C^9H_2 , $C^{11}H_2$), 1.78-1.92 (м, 2H, C^2H_2), 2.13 (т, $^3J=7.2$ Гц, 2H, C^8H_2), 3.09 (т, $^3J=6.7$ Гц, 2H, C^6H_2), 3.42 (т, $^3J=6.8$ Гц,

2H, C¹²H₂), 6.76 (с, 2H, C¹⁴H₂). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.23 (т, ³J_{C-P}=6.0 Гц, C³), 24.90 (C⁹), 25.33 (C¹⁰), 26.92 (C⁴), 27.26 (C¹¹), 28.12 (C⁵), 33.55 (C²), 35.57 (C⁸), 37.46 (C¹²), 39.29 (C⁶), 74.21 (т, ¹J_{C-P}=133.6 Гц, C¹), 134.27 (C¹⁴), 173.41 (C¹³), 176.66 (C⁷). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.52. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z: 470.391 [M]⁺, расч. для C₁₆H₂₈N₂O₁₀P₂ 470.348.

Соединение 2g (SMCC-γ). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 0.86-1.00, 1.60-1.71 (м, 4H, C⁸H₂), 1.16-1.34, 1.71-1.81 (м, 4H, C⁷H₂), 1.48-1.65 (м, 1H, C⁹H), 1.64-1.78 (м, 2H, C³H₂), 1.80-1.92 (м, 2H, C²H₂), 2.06-2.16 (м, 1H, C⁶H), 3.10 (т, ³J=6.7 Гц, 2H, C⁴H₂), 3.28 (д, ³J=7.0 Гц, 2H, C¹⁰H₂), 6.75 (с, 2H, CH=CH). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.46 (т, ³J_{C-P}=6.2 Гц, C³), 28.33 (C⁷), 29.14 (C⁸), 31.15 (C²), 36.05 (C⁹), 39.95 (C⁴), 43.47 (C¹⁰), 44.86 (C⁶), 73.83 (т, ¹J_{C-P}=132.3, C¹), 134.17 (C¹²), 173.58 (C¹¹), 179.68 (C⁵). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.25.

Соединение 2h (SMCC-ε). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 0.86-1.00, 1.61-1.70 (м, 4H, C¹⁰H₂), 1.20-1.30 (м, 2H, C⁴H₂), 1.23-1.34, 1.70-1.80 (м, 2H, C⁹H₂), 1.38-1.52 (м, 2H, C⁵H₂), 1.44-1.56 (м, 2H, C³H₂), 1.48-1.64 (м, 1H, C⁸H), 1.77-1.90 (м, 2H, C²H₂), 2.04-2.16 (м, 1H, C⁸H), 3.09 (т, ³J=6.8 Гц, 2H, C⁶H₂), 3.28 (д, ³J=7.3 Гц, 2H, C¹²H₂), 6.75 (с, 2H, CH=CH). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.40 (т, ³J_{C-P}=5.8 Гц, C³), 26.90 (C⁴), 28.20 (C⁹), 28.34 (C⁵), 29.14 (C¹⁰), 33.73 (C²), 36.04 (C¹¹), 39.18 (C⁶), 43.46 (C¹²), 44.78 (C⁸), 74.26 (т, ¹J_{C-P}=131.3 Гц, C¹), 134.18 (C¹⁴), 173.58 (C¹³), 179.56 (C⁷). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O) 18.60. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z: 499.066 [M+3H]⁺, расч. для C₁₈H₃₀N₂O₁₀P₂ 496.137.

Соединение 1a (RGDC-BMPS-β). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.55-1.68 (м, 2H, C²³H₂), 1.74-1.84 (м, 2H, C²²H₂), 1.96-2.10 (м, 2H, C²H₂), 2.38-2.45 (м, 2H, C⁵H₂), 2.52 (дд, ³J=8.4 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H, C¹⁶HH), 2.66 (дд, ³J=4.9 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H, C¹⁶HH), 2.94 (дд, ³J=8.5 Гц, ²J=14.0 Гц, 2H, C¹¹H₂), 3.11-3.20 (м, 3H, C²⁴H₂, C¹¹HH), 3.31-3.43 (м, 2H, C³H₂), 3.70 (т, ³J=7.0 Гц, 2H, C⁶H₂), 3.70-3.80 (м, 1H, C²¹H), 3.87 (д, 1H, ²J=16.9 Гц, C¹⁹HH), 4.02 (д, ²J=16.9 Гц, 1H, C¹⁹HH), 4.40 (дд, ³J=4.1 Гц, ³J=8.5 Гц, 1H, C¹²H), 4.58-4.70 (м, 1H, C¹⁵H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.77 (C²³), 29.49 (C²²), 32.97 (C²), 34.79 (C⁵), 35.84 (C⁶), 36.07 (C³), 38.21 (C¹⁶), 39.95 (C¹¹), 40.59 (C²⁴), 42.48 (C¹⁹), 51.39 (C¹⁵), 53.20 (C²¹), 54.39 (C¹²), 156.76 (C²⁵), 170.81 (C¹⁸), 172.54 (C¹⁴), 172.64 (C⁴), 173.82 (C²⁰), 176.43 (C¹³), 178.03 (C¹⁷), 178.91 (C⁷, C¹⁰). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 17.93. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 836.169 [M+H], расч. для C₂₅H₄₃N₉O₁₇P₂S 835.671.

Соединение 1b (RGDC-EMCS-β). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.15-1.30 (м, 2H, C⁷H₂), 1.43-1.53 (м, 4H, C⁶H₂, C⁸H₂), 1.55-1.63 (м, 2H, C²⁶H₂), 1.60-1.76 (м, 2H, C²⁵H₂), 1.98-2.03 (м,

2H, C²H₂), 2.05-2.25 (м, 2H, C⁵H₂), 2.53 (дд, ³J=8.3 Гц, ²J=15.9 Гц, 1H, C¹⁹HH), 2.66 (дд, ³J=4.9 Гц, ²J=15.9 Гц, 1H, C¹⁹HH), 2.93 (дд, ³J=8.6 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁴HH), 3.17 (дд, ³J=4.1 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁴HH), 3.11-3.18 (м, 2H, C²⁷H₂), 3.36-3.46 (м, 4H, C³H₂, C⁹H₂),
 3.47-3.57 (м, 1H, C²⁴H), 3.86 (д, ²J=16.8 Гц, 1H, C²²HH), 4.00 (д, ²J=16.8 Гц, 1H, C²²HH),
 4.40 (дд, ³J=4.1 Гц, ³J=8.6 Гц, 1H, C¹⁵H), 4.58-4.76 (м, 1H, C¹⁸H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O):
 24.00 (C²⁶), 25.55 (C⁷), 25.83 (C⁶), 26.78 (C⁸), 30.72 (C²⁵), 33.66 (C²), 35.64 (C⁵), 35.88 (C³),
 38.23 (C¹⁹), 39.11 (C⁹), 39.79 (C¹⁴), 40.76 (C²⁷), 42.45 (C²²), 51.37 (C¹⁸), 53.84 (C²⁴), 54.34
 (C¹⁵), 156.75 (C²⁸), 170.02 (C²²), 172.59 (C¹⁷), 176.46 (C⁴, C¹⁶, C²³), 178.03 (C²⁰), 179.50
 (C¹⁰, C¹³). Спектр ЯМР ³¹P(D₂O): 17.95.

Соединение 1с (RGDC-BMPS-γ). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.58-1.70 (м, 2H, C²⁴H₂), 1.66-
 1.77 (м, 2H, C³H₂), 1.80-1.91 (м, 2H, C²H₂), 1.85-1.94 (м, 2H, C²³H₂), 2.40-2.46 (м, 2H,
 C⁶H₂), 2.62-2.84 (м, 2H, C¹⁷H₂), 2.98 (дд, ³J=8.3 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹²HH), 3.01-3.12 (м,
 2H, C⁴H₂), 3.10-3.20 (м, 1H, C¹²HH), 3.14-3.20 (м, 2H, C²⁵H₂), 3.68-3.75 (м, 2H, C⁷H₂),
 3.85-3.97 (м, 1H, C²⁰HH), 3.98-4.08 (м, 2H, C²⁰HH), 3.99-4.09 (м, 1H, C²²H), 4.39-4.46 (м,
 1H, C¹³H), 4.66-4.73 (м, 1H, C¹⁶H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.22 (C³), 23.46 (C²⁴), 27.84
 (C²³), 31.01 (C²), 33.62 (C⁶), 35.82 (C⁷), 36.60 (C¹⁷), 40.14 (C¹²), 40.32 (C⁴, C²⁵), 42.31 (C²⁰),
 50.53 (C¹⁶), 52.82 (C²²), 54.21 (C¹³), 156.76 (C²⁶), 169.98 (C¹⁹), 172.01 (C¹⁵, C²¹), 172.89
 (C⁵), 175.97 (C¹⁴), 176.14 (C¹⁸), 178.31 (C⁸, C¹¹). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.17. Масс-
 спектр MALDI-TOF/TOF m/z 849.15 [M]⁺, расч. для C₂₆H₄₅N₉O₁₇P₂S 849.698.

Соединение 1d (RGDC-EMCS-γ). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.16-1.31 (м, 2H, C⁸H₂), 1.38-
 1.55 (м, 4H, C⁷H₂, C⁹H₂), 1.53-1.67 (м, 2H, C²⁷H₂), 1.61-1.77 (м, 2H, C²⁶H₂), 1.66-1.77 (м,
 2H, C³H₂), 1.77-1.90 (м, 2H, C²H₂), 2.05-2.20 (м, 2H, C⁶H₂), 2.52 (дд, ³J=8.4 Гц, ²J=16.2
 Гц, 1H, C²⁰HH), 2.65 (дд, ³J=4.8 Гц, ²J=16.2 Гц, 1H, C²⁰HH), 2.93 (дд, ³J=8.5 Гц, ²J=14.0
 Гц, 1H, C¹⁵HH), 3.16 (дд, ³J=4.0 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁵HH), 3.08-3.15 (м, 2H, C⁴H₂), 3.10-
 3.18 (м, 2H, C²⁸H₂), 3.42 (т, ³J=7.0 Гц, 2H, C¹⁰H₂), 3.54 (т, ³J=6.1 Гц, 1H, C²⁵H), 3.86 (д,
³J=16.8 Гц, 1H, C²³HH), 4.01 (д, ³J=16.8 Гц, 1H, C²³HH), 4.40 (дд, ³J=4.0 Гц, ³J=8.5 Гц, 1H,
 C¹⁶H), 4.59-1.68 (м, 1H, C¹⁹H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.73 (C³), 23.98 (C²⁷), 25.45 (C⁸),
 25.67 (C⁷), 27.73 (C⁹), 30.53 (C²⁶), 31.48 (C²), 35.70 (C⁶), 38.20 (C²⁰), 38.72 (C¹⁰), 39.75 (C⁴),
 39.82 (C¹⁵), 40.71 (C²⁸), 42.45 (C²³), 51.37 (C¹⁹), 53.79 (C²⁵), 54.32 (C¹⁶), 156.75 (C²⁹), 170.95
 (C²²), 172.61 (C¹⁸), 175.85 (C¹⁷), 176.44 (C²⁴), 176.96 (C⁵), 178.01 (C²¹). Спектр ЯМР ³¹P
 (D₂O): 18.24. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 910.533 [M-4H+Na]⁺, 926.498 [M-4H+
 K]⁺, расч. для C₂₉H₅₁N₉O₁₇P₂S 891.778.

Соединение 1e (RGDC-BMPS-ε). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.18-1.32 (м, 2H, C⁴H₂), 1.38-

1.46 (м, 2H, C⁵H₂), 1.46-1.58 (м, 2H, C³H₂), 1.57-1.72 (м, 2H, C²⁶H₂), 1.80-1.93 (м, 2H, C²H₂), 1.84-1.96 (м, 2H, C²⁵H₂), 2.42 (т, ³J=6.7 Гц, 2H, C⁸H₂), 2.72-2.89 (м, 2H, C¹⁹H₂), 2.94-3.02 (м, 1H, C¹⁴HH), 3.00-3.10 (м, 2H, C⁶H₂), 3.10-3.20 (м, 1H, C¹⁴HH), 3.14-3.20 (м, 2H, C²⁷H₂), 3.67-3.75 (м, 2H, C⁹H₂), 3.87-4.09 (м, 2H, C²²H₂), 3.98-4.08 (м, 1H, C²⁴H), 4.40-4.51 (м, 1H, C¹⁵H), 4.65-4.77 (м, 1H, C¹⁸H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.19 (C³), 23.42 (C²⁶), 26.99 (C⁴), 27.89 (C⁵, C²⁵), 33.58 (C²), 33.71 (C⁸), 35.75 (C⁹), 35.93 (C¹⁹), 39.50 (C⁶, C¹⁴), 40.35 (C²⁷), 42.29 (C²²), 50.32 (C¹⁸), 52.81 (C²⁴), 53.88 (C¹⁵), 156.76 (C²⁸), 170.08 (C²³), 170.74 (C²¹), 171.93 (C¹⁷), 172.75 (C⁷), 174.32 (C¹⁶), 174.80 (C²⁰), 177.71 (C¹⁰, C¹³). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.65. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 879.242 [M+2H]⁺, расч. для C₂₈H₄₉N₉O₁₇P₂S 877.751.

Соединение 1f (RGDC-EMCS-ε). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 1.15-1.30 (м, 4H, C⁴H₂, C¹⁰H₂), 1.41-1.53 (м, 2H, C⁵H₂), 1.42-1.50 (м, 2H, C³H₂), 1.45-1.61 (м, 4H, C⁹H₂, C¹¹H₂), 1.54-1.65 (м, 2H, C²⁹H₂), 1.64-1.74 (м, 2H, C²⁸H₂), 1.74-1.90 (м, 2H, C²H₂), 2.13 (т, ³J=7.4 Гц, 2H, C⁸H₂), 2.48-2.72 (м, 2H, C²²H₂), 2.88-2.99 (м, 1H, C¹⁷HH), 3.12-3.29 (м, 1H, C¹⁷H), 3.06-3.17 (м, 2H, C⁶H₂), 3.10-3.18 (м, 2H, C³⁰H₂), 3.42 (т, ³J=7.10 Гц, 2H, C¹²H₂), 3.45-3.52 (м, 1H, C²⁷H), 3.82-3.92 (м, 1H, C²⁵HH), 3.93-4.04 (м, 1H, C²⁵HH), 4.40 (дд, ³J=4.0 Гц, ³J=8.6 Гц, 1H, C¹⁸H), 4.56-4.72 (м, 1H, C²¹H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.55 (т, ³J_{C-P}=6.0 Гц, C³), 24.03 (C²⁹), 25.48 (C⁹), 26.15 (C⁷⁰), 26.36 (C⁴, C¹¹), 30.89 (C²⁸), 33.97 (C²), 35.61 (C⁸), 38.23 (C²²), 38.94 (C⁷²), 39.40 (C⁶, C¹⁷), 40.72 (C³⁰), 42.40 (C²⁵), 51.43 (C²¹), 53.93 (C²⁷), 54.64 (C¹⁸), 74.37 (C¹), 156.74 (C³¹), 171.03 (C²⁴), 172.61 (C²⁰), 177.92 (C²³), 176.46 (C¹⁹), 176.56 (C⁷, C²⁶), 180.08 (C¹³, C¹⁶). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.71. Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 920.398 [M+H]⁺, расч. для C₃₁H₅₅N₉O₁₇P₂S 919.831.

Соединение 1g (RGDC-SMCC-γ). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 0.83-0.99 (м, 2H, C⁸HH), 1.19-1.30 (м, 2H, C⁷HH), 1.37-1.50 (м, 1H, C⁹H), 1.52-1.65 (м, 2H, C²⁷H₂), 1.55-1.72 (м, 2H, C²⁶H₂), 1.67-1.77 (м, 2H, C³H₂), 1.68-1.77 (м, 2H, C⁸HH), 1.77-1.85 (м, 2H, C⁷HH), 1.78-1.87 (м, 2H, C²H₂), 1.96-2.06 (м, 1H, C⁶H), 2.53 (дд, ³J=8.2 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H, C²²HH), 2.66 (дд, ³J=4.8 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H, C²²HH), 2.99-3.05 (м, 2H, C¹⁰H₂), 2.93 (дд, ³J=8.6 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁵HH), 3.17 (дд, ³J=4.1 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁵HH), 3.08-3.12 (м, 2H, C⁴H₂), 3.11-3.16 (м, 2H, C²⁸H₂), 3.41 (т, ³J=6.0 Гц, 1H, C²⁵H), 3.85 (д, ²J=16.8 Гц, 1H, C²³HH), 4.00 (д, ²J=16.8 Гц, 1H, C²³HH), 4.40 (дд, ³J=4.1 Гц, ³J=8.6 Гц, 1H, C¹⁶H), 4.63 (дд, ³J=4.8 Гц, ³J=8.2 Гц, 1H, C¹⁹H). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O): 23.86 (C³), 24.13 (C²⁷), 29.25 (C⁷), 29.53 (C⁸), 29.56 (C²), 31.25 (C²⁶), 36.71 (C⁹), 38.27 (C²⁰), 39.71 (C¹⁵), 40.17 (C⁴), 40.83 (C²⁸), 42.45 (C²³), 45.41 (C¹⁰), 46.98 (C⁶), 51.36 (C¹⁹), 54.06 (C²⁵), 54.32 (C¹⁶), 156.74 (C²⁹), 171.11

(C²²), 172.63 (C¹⁸), 176.49 (C¹⁷), 177.91 (C²¹), 178.01 (C²⁴). Масс-спектр MALDI-TOF/TOF m/z 941.786 [M+H+Na]⁺, расч. для C₃₁H₅₃N₉O₁₇P₂S 917.275.

Соединение 1h (RGDC-SMCC-ε). Спектр ЯМР ¹H (D₂O): 0.84-1.00 (м, 2H, C¹⁰HH),
 1.18-1.32 (м, 2H, C⁹HH), 1.20-1.30 (м, 2H, C⁴H₂), 1.37-1.52 (м, 1H, C¹¹H), 1.41-1.52 (м, 2H,
 C⁵H₂), 1.48-1.56 (м, 2H, C³H₂), 1.55-1.66 (м, 2H, C²⁹H₂), 1.66-1.80 (м, 2H, C¹⁰HH), 1.66-
 1.82 (м, 2H, C²⁸H₂), 1.79-1.85 (м, 2H, C⁹HH), 1.77-1.87 (м, 2H, C²H₂), 1.96-2.06 (м, 1H,
 C⁸H), 2.53 (дд, ³J=8.4 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H, C²²HH), 2.67 (дд, ³J=5.0 Гц, ²J=16.0 Гц, 1H,
 C²²HH), 2.99-3.05 (м, 2H, C¹²H₂), 2.94 (дд, ³J=8.5 Гц, ²J=14.0 Гц, Ш, C¹⁷HH), 3.18 (дд, ³J=
 4.1 Гц, ²J=14.0 Гц, 1H, C¹⁷HH), 3.10 (т, ³J=6.7 Гц, 2H, C⁶H₂), 3.13-3.19 (м, 2H, C³⁰H₂),
 3.58-3.66 (м, 1H, C²⁷H), 3.87 (д, ²J=16.9 Гц, 1H, C²⁵HH), 4.02 (д, ²J=16.9 Гц, 1H, C²⁵HH),
 4.41 (дд, ³J=4.1 Гц, ³J=8.5 Гц, 1H, C¹⁸H), 4.64 (дд, ³J=50 Гц, ³J=8.4 Гц, 1H, C²¹H). Спектр
 ЯМР ¹³C (D₂O): 23.61 (C³), 23.92 (C²⁹), 27.01 (C⁴), 28.29 (C⁵), 29.26 (C⁹), 29.54 (C¹⁰), 30.19
 (C²⁸), 34.22 (C²), 36.77 (C¹¹), 38.25 (C²²), 39.26 (C⁶), 39.86 (C¹⁷), 40.69 (C³⁰), 42.48 (C²⁵),
 45.45 (C¹²), 46.92 (C⁸), 51.38 (C²¹), 53.67 (C²⁷), 54.36 (C¹⁸), 156.75 (C³¹), 172.59 (C²⁰), 175.44
 (C²⁶), 176.46 (C¹⁹), 178.03 (C²³), 179.85 (C⁷). Спектр ЯМР ³¹P (D₂O): 18.77.

Получение покрытия методом плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО).
 ПЭО покрытие получали на титане (Grade 2) в биполярном импульсном режиме в
 водном растворе, содержащем 20 г/л Na₃PO₄·12H₂O и 25 г/л Ca(CH₃COO)₂ при
 температуре 20°C. Длительность обработки составляла 10 минут. Амплитуда
 положительного импульса напряжения составляла 470 В, отрицательного 40 В, частота
 300 Гц. Длительность положительного импульса составляла 1,7 мс, отрицательного
 0,87. Импульсы разделялись паузами в 0,38 мс. Образцы перед покрытием полировались
 до шероховатости Ra<0,15 мкм и промывались в изопропиловом спирте в
 ультразвуковой ванне в течение 3 минут. Полученное оксидное покрытие имеет толщину
 20-30 мкм, пористость 8-10% и шероховатость поверхности Ra 0,8-1,2 мкм.

Исследование биологической активности соединений. Образцы Ti с ПЭО покрытием
 подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин в 95% этаноле и промывали
 деионизированной водой, сушили на воздухе и стерилизовали автоклавированием при
 134°C. Для нанесения органического покрытия образцы помещали в чашку Петри с 10
 М раствором RGD-производного, который предварительно стерилизовали пропусканием
 через фильтр СА 0,22 мкм. Через 1 час образцы высушивали на воздухе. Затем образцы
 помещали в 24-луночный планшет с обработанной для адгезии клеток поверхностью
 (SPL) для культивирования клеток. Фибробласты (ФЛЭЧ-104) из легких эмбриона
 человека, и МСК из жировой ткани человека (Биолот) и остеобластоподобные клетки
 остеосаркомы человека MG63 (ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных»)
 культивировали в модифицированной среде Дульбекко (DMEM) (Sigma), содержащей
 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Biowest), в культуральных флаконах 25 см
 (SPL) в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Среда менялась два раза в неделю. После
 достижения монослоя клетки отделяли с использованием раствора трипсина/Версена
 1:1 (Биолот) и подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток TC20
 (BioRad). В каждую лунку планшета с образцами помещали 16-10 клеток в 0,8 мл

культуральной среды. Клетки в лунках с образцами Ti без органического покрытия обрабатывали как отрицательные контрольные (NC). Лунки планшета без образцов использовали в качестве положительного контроля. Планшеты для культивирования инкубировали в течение 7 суток в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂).

Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. Три образца каждого типа переносили после инкубации в другой 24-луночный планшет с 0,8 мл свежей среды DMEM. Затем к каждой лунке добавляли 80 мкл активированного раствора EZ4U и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 3,5 часов. После чего образцы извлекали и измеряли оптическое поглощение раствора с использованием микропланшетного ридера (Spark 10M, Tecan) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для оптической плотности относительно отрицательного контроля в %.

Результаты *in vitro* исследования представлены на рис. 1-3. Значительное снижение адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток наблюдалось при использовании длинноцепочечных производных, содержащих EMCS-линкер (1b,d,f), а также RGDC-BMPS-ε (производного бифосфоната аминокaproновой кислоты) (1e), тогда как SMCC-связанные продукты (1g,h) приводили к росту клеток на поверхности до 20% (рис. 1).

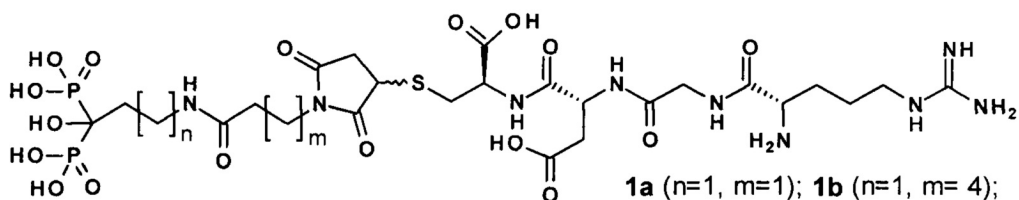
Значительное (на уровне 30%) увеличение степени пролиферации фибробластов наблюдалось в случае использования органических покрытий RGDC-BMPS-β (1a) и RGDC-BMPS-γ (1c) (рис. 2).

Образец с нанесенным органическим покрытием на основе бифосфоната β-аланина с коротким BMPS- линкером и RGD (1a) также показал наилучшую адгезию остеобластоподобных клеток MG-63 через 7 дней, по сравнению с другими образцами (рис. 3). Производные, содержащие EMCS-линкер, RGDC-EMCS-β (1b) и RGDC-EMCS-γ (1d), приводили к снижению степени адгезии и пролиферации данного сорта клеток на поверхности.

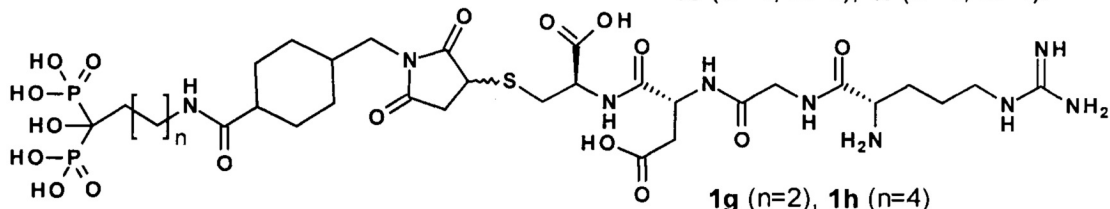
На основании исследования можно заключить, что RGD-функционализированные гибридные молекулы 1a, 1c, 1g, 1h могут быть перспективны в качестве органического покрытия для моделирования биологической активности ПЭО- модифицированной поверхности титановых имплантатов.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения Arg-Gly-Asp-Cys-(RGDC)-замещенных ({[(2,5-диоксо-пирролидин-1-ил)алканоил]амино}-1-гидроксиалкан-1,1-диил)бисфосфоновых кислот (1a-h):



1a ($n=1$, $m=1$); **1b** ($n=1$, $m=4$);
1c ($n=2$, $m=1$); **1d** ($n=2$, $m=4$);
1e ($n=4$, $m=1$); **1f** ($n=4$, $m=4$).



1g ($n=2$), **1h** ($n=4$)

которые наносят путем физико-химической адсорбции из водных растворов с концентрацией $\sim 10^{-3}$ М/л в течение 1 часа на титан (Grade 2) с неорганическим оксидированным пористым подслоем, полученным в ходе плазменно-электролитического оксидирования.

2. Применение соединений **1a**, **1c**, **1g** или **1h**, полученных по п. 1, в качестве органических покрытий для моделирования биологической активности ПЭО-модифицированной поверхности титановых имплантатов, увеличивающих адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов и остеобластоподобных клеток MG-63.

1

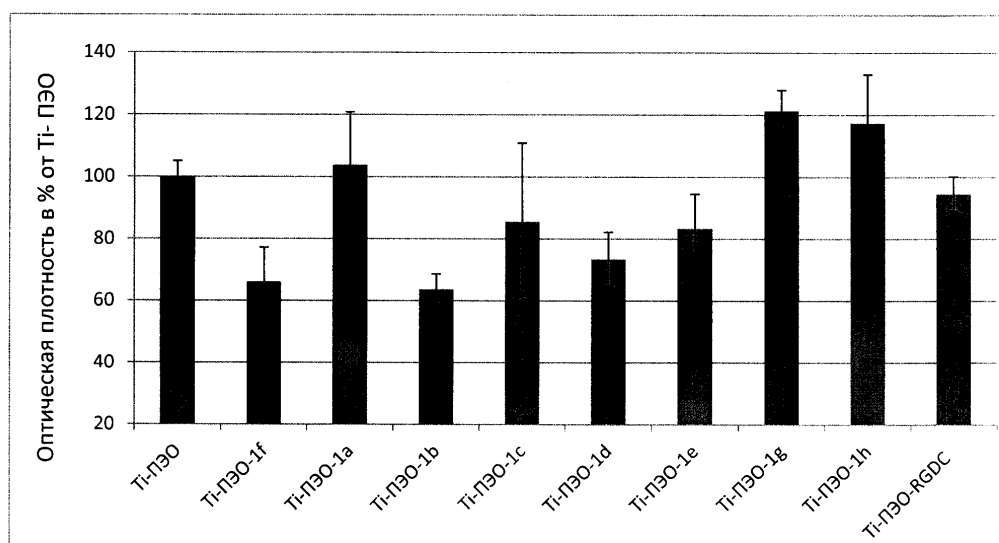


Рисунок 1 - Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток в % через 7 дней для Ti с неорганическим ПЭО и органическим покрытием. SMCC-связанные продукты (**1g,h**) приводят к росту клеток на поверхности до 20%.

2

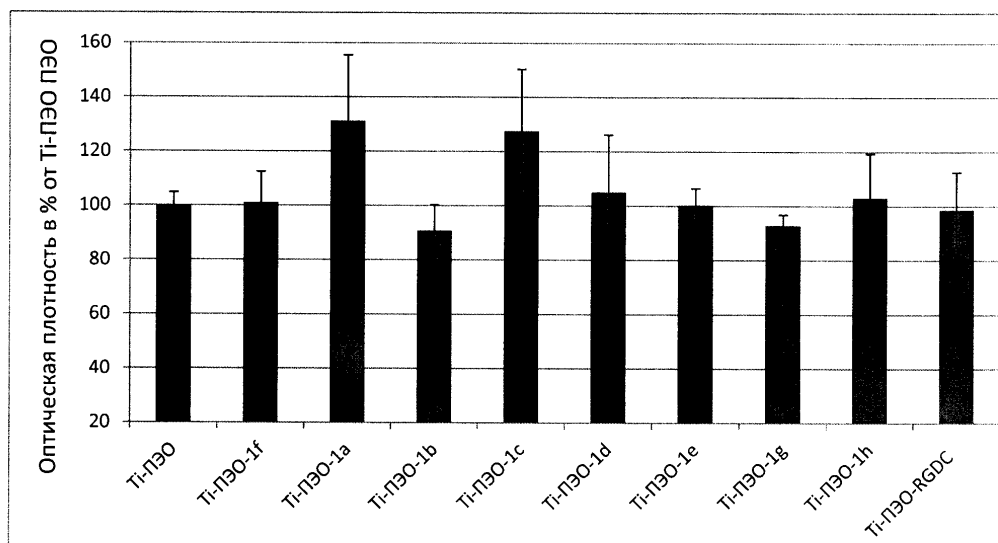


Рисунок 2 - Жизнеспособность фибробластов FLECH-104 в % через 7 дней для Ti с неорганическим ПЗО и органическим покрытием. Наблюдается значительное (на уровне 30%) увеличение степени пролиферации фибробластов в случае использования органических покрытий RGDC-BMPS- β (1a) и RGDC-BMPS- γ (1c).

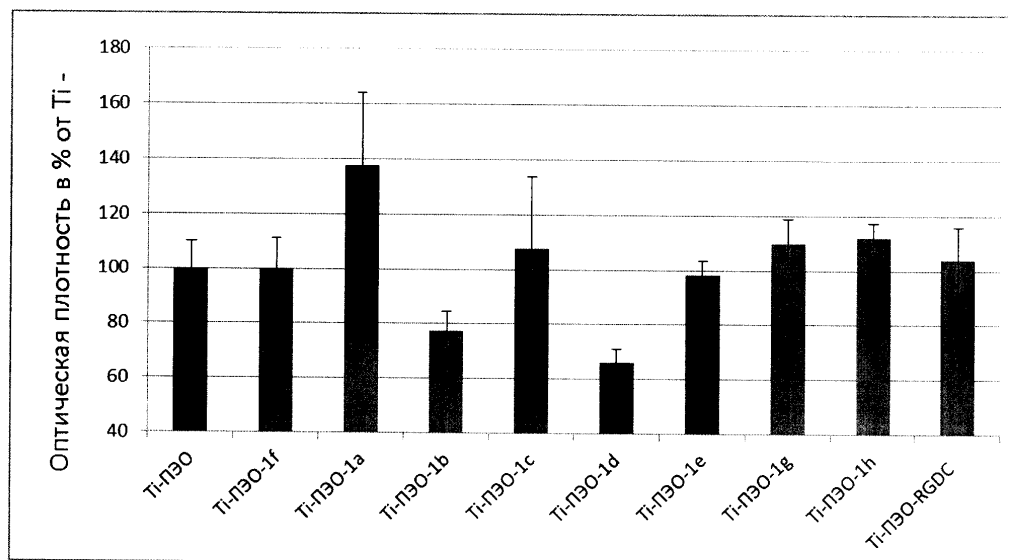


Рисунок 3 - Жизнеспособность остеобластоподобных клеток MG63 в % через 7 дней для Ti с неорганическим ПЭО и органическим покрытием. Бифосфонат β -аланина с коротким BMPs- линкером и RGD (1a) показал наилучшую адгезию остеобластоподобных клеток MG-63.