

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

На правах рукописи



Юрьев Данил Юрьевич

**ДИЗАЙН И СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,8-НАФТАЛИМИДА
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ**

Специальность 1.4.3. Органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель
кандидат химических наук, доцент
Ткаченко Сергей Витальевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1. Модификация полимеров природного и синтетического происхождения производными 1,8-нафталимида.....	12
1.1.1. Модификация природных полимеров производными 1,8-нафталимида.....	13
1.1.2. Модификация синтетических полимеров производными 1,8-нафталимида.....	18
1.2. Векторные группы, используемые для избирательного нацеливания систем адресной доставки в органеллы.....	23
1.3. Производные 1,8-нафталимида, содержащие векторные группы для связывания с клеточными органеллами.....	24
1.4. Флуорофоры, использующиеся для визуализации отложений гидроксиапатита и клеток костной ткани.....	31
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	39
2.1. Производные 1,8-нафталимида для ковалентной модификации альбумина.....	40
2.1.1. Синтез производных 1,8-нафталимида, содержащих малеимидную группу	40
2.1.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств малеимидных производных 1,8-нафталимида.....	45
2.1.3. Получение флуоресцентных систем адресной доставки на основе альбумина	47
2.2. Производные 1,8-нафталимида для ковалентной модификации <i>PLGA</i>	49
2.2.1. Синтез производных 1,8-нафталимида для ковалентной модификации <i>PLGA</i>	49
2.2.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств производных 1,8-нафталимида	55
2.2.3. Получение конъюгатов <i>PLGA</i> с производными 1,8-нафталимида.....	60
2.2.4. Изучение спектрально-люминесцентных свойств конъюгатов <i>PLGA</i> с производными 1,8-нафталимида	65
2.2.5. Получение наночастиц <i>PLGA</i> -1,8-нафталимид и изучение их свойств	66
2.2.6. Биовизуализация наночастиц <i>in vitro</i> на клеточной линии 4T1.....	71
2.3. Производные 1,8-нафталимида, содержащие α -гидроксисфосфонатную группу.....	73
2.3.1. Синтез флуоресцентных бисфосфонатов на основе 1,8-нафталимида	73
2.3.2. Получение систем адресной доставки на основе <i>PLGA</i> , модифицированного флуоресцентным бисфосфонатом 57	77

2.3.3. Визуализация распределения бисфосфоната 57, наночастиц <i>PLGA-57</i> и <i>PLGA-57-Dox</i> на клетках остеосаркомы <i>Saos-2</i>	83
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Разработка новых эффективных флуорофоров, пригодных для создания систем адресной доставки, является одной из актуальных задач современной органической химии и нанотехнологии. Флуоресцентная визуализация позволяет изучать биораспределение и кинетику высвобождения лекарственных препаратов *in vitro* и *in vivo* в режиме реального времени, а также открывает возможности для интраоперационного мониторинга, обеспечивая визуальное сопровождение хирургических вмешательств.

Среди многообразия органических флуорофоров производные 1,8-нафталимида выделяются уникальным сочетанием свойств: химической активностью (относительная легкость функционализации), высокими спектрально-люминесцентными характеристиками (значительные квантовые выходы флуоресценции в водных и биологических средах, высокая фотостабильность) и благоприятным биологическим профилем (низкая токсичность, наличие биологической активности). Эти особенности обуславливают интенсивное развитие химии данного класса соединений, в частности, в направлении создания тераностических систем, объединяющих диагностическую и терапевтическую функции. Варьирование заместителей в положении 4 ароматического бицикла (введение *O*-, *S*- или *N*-содержащих групп) позволяет получать флуорофору, люминесцирующие в широком диапазоне оптического спектра. Введение в структуру 1,8-нафталимида реакционноспособных функциональных групп открывает возможность их ковалентного связывания с полимерными носителями, что создает основу для разработки систем адресной доставки, снабженных флуоресцентной меткой для биовизуализации.

В качестве носителей лекарственных веществ широко используются полимеры как природного, так и синтетического происхождения. Наиболее востребованным природным полимером является человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), характеризующийся высокой биосовместимостью и низкой иммуногенностью. Среди синтетических полимеров особого внимания заслуживает биосовместимый и биоразлагаемый сополимер молочной и гликолевой кислот (*PLGA*). На основе этих полимеров разработано и внедрено в клиническую практику более 30 лекарственных препаратов.

Для обеспечения избирательного нацеливания на клеточные структуры полимеры функционализируют векторными группами. Так, например, для создания остеотропных систем используют α -гидроксисфосфонатный фрагмент, обладающий высоким сродством к гидроксиапатиту и костной ткани. Наличие в структуре флуорофора векторной группы и функционального заместителя для ковалентного связывания с полимером позволяет создавать системы адресной доставки с возможностью флуоресцентной визуализации, при этом введение метки не оказывает существенного влияния на физико-химические свойства носителя и профиль высвобождения фармацевтической субстанции.

В настоящей работе осуществлен синтез новых производных 1,8-нафталимида, отвечающих перечисленным требованиям. Полученные соединения могут рассматриваться как доступная альтернатива зарубежным аналогам при проведении медико-биологических исследований.

Степень разработанности темы. Известной научной группой, занимающейся разработкой и изучением 1,8-нафталимидов, является коллектив под управлением профессора Божинова В. (Болгария). Среди российских ученых, необходимо отметить научную группу д.х.н., проф. Федоровой О. А. (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова (ИНЭОС РАН)).

Несмотря на то, что производные 1,8-нафталимида широко применяются для решения задач биовизуализации, в мировой практике представлено ограниченное число примеров их использования для ковалентной модификации *PLGA* и ЧСА при создании систем адресной доставки. В рамках выполнения работы реализован первый пример разработки остеотропной системы с возможностью флуоресцентного детектирования наночастиц на основе *PLGA*, меченных 1,8-нафталимидом с бисфосфонатной группой.

Цель работы: разработка методов синтеза новых производных 1,8-нафталимида, обладающих флуоресценцией в широком диапазоне оптического спектра, и создание на их основе полимерных систем адресной доставки фармацевтических субстанций с возможностью флуоресцентной биовизуализации.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Синтез *O*-, *S*-, *N*-замещённых производных 1,8-нафталимида, содержащих amino-, карбокси-, гидроксид- и малеимидную функциональные группы для последующей ковалентной модификации природных и синтетических полимеров.

2. Синтез *O*-, *S*-, *N*-замещённых 1,8-нафталимидов с α -гидроксифосфонатным фрагментом, для визуализации гидроксиапатита и изучения остеотропных систем адресной доставки на их основе.

3. Ковалентная модификация сополимера молочной и гликолевой кислот (*PLGA*) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) синтезированными производными 1,8-нафталимида с целью получения флуоресцентных систем адресной доставки биологически активных соединений.

4. Исследование спектрально-люминесцентных свойств полученных флуорофоров, их конъюгатов с полимерами и наночастиц, включая определение квантовых выходов флуоресценции, яркости и фотостабильности.

5. Оценка способности синтезированных флуорофоров и полимерных систем к внутриклеточной локализации и визуализации *in vitro* на клеточных культурах методами флуоресцентной микроскопии.

Научная новизна результатов. В представленной работе получено: 23 новых соединения, среди них 6 новых производных 4-(2-гидроксиэтилтио)-1,8-нафталимида, содержащих 4-(2-аминоэтил)морфолиновый, *N*-тозилэтилендиаминовый, *N,N*-диметилендиаминовый, этилендиаминовый, гексаметилендиаминовый и пропилендиаминовый заместители при имидном атоме азота для создания флуорофоров для ковалентной модификации *PLGA*. Введение в структуру флуорофоров векторных групп потенциально позволяет использовать их для селективного мечения клеточных органелл – лизосом, эндоплазматического ретикулума, митохондрий.

Синтезировано 6 новых производных 1,8-нафталимида, содержащих первичную аминогруппу, и 2 ранее неописанных флуорофора, содержащих карбоксильную группу. На основе соединений, излучающих в диапазоне 460-625 нм, осуществлена ковалентная модификация *PLGA* с получением 12 новых конъюгатов, которые были использованы для получения флуоресцентных наночастиц.

Впервые получено 5 новых малеимидных производных 1,8-нафталимида для ковалентной модификации человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

Синтезировано 4 новых *O*-, *S*- и *N*-замещённых производных 1,8-нафталимида, содержащих бисфосфонатный фрагмент. Впервые в мировой практике проведена флуоресцентная визуализация остеотропной системы адресной доставки на основе *PLGA*

на клеточной линии остеосаркомы *Saos-2*, что открывает возможность для разработки эффективных тераностических агентов для лечения заболеваний костной ткани.

Теоретическая и практическая значимость. Синтез и исследование новых производных 1,8-нафталимида расширяют фундаментальные представления о взаимосвязи структуры и фотофизических свойств в ряду гетероциклических флуорофоров. Полученные данные о влиянии природы заместителей (*O*-, *S*-, *N*-содержащих, а также малеимидных и бисфосфонатных фрагментов) на спектрально-люминесцентные характеристики соединений вносят вклад в понимание механизмов фотофизических процессов, включая формирование *PICT*-состояния, и создают основу для направленного дизайна флуорофоров с заданными свойствами.

В работе получены новые производные 1,8-нафталимида, содержащие векторные группы, обеспечивающие селективное нацеливание на лизосомы, эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Синтезированные флуорофоры с α -гидроксибисфосфонатным фрагментом могут быть использованы для визуализации гидроксиапатита в мягких тканях, а также при исследовании микрокальцинозов и метастатических поражений костной ткани.

Разработанные малеимидные производные 1,8-нафталимида позволяют осуществлять ковалентную модификацию человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), расширяя арсенал флуоресцентных систем доставки на основе природных полимеров.

Ковалентная модификация сополимера молочной и гликолевой кислот (*PLGA*) синтезированными флуорофорами представляет собой один из первых примеров создания систем адресной доставки с возможностью флуоресцентной визуализации на основе данного класса соединений. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что полученные наночастицы *PLGA*-1,8-нафталимид характеризуются высокой фотостабильностью, сопоставимой со стабильностью частиц на основе коммерчески доступных маркеров, что позволяет проводить долговременные исследования распределения нанообъектов и их взаимодействия с клетками в сложных биологических средах.

Полученные в работе соединения могут рассматриваться в качестве доступной отечественной альтернативы зарубежным флуоресцентным маркерам, применяемым в

нанотехнологии для визуализации систем адресной доставки, а также в микроскопии для исследования биологических объектов.

Методология и методы исследования. Представленные в работе результаты получены с использованием современных физико-химических методов анализа, включающих ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), элементный анализ, оптическую и флуоресцентную спектроскопию, спектрофотометрию, спектрофлуориметрию, флуоресцентную микроскопию, *FLIM*-микроскопию.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны методы синтеза *O*-, *S*- и *N*-замещённых производных 1,8-нафталимида, содержащих амино-, карбокси-, гидроксид- и малеимидные функциональные группы. Полученные соединения позволяют осуществлять ковалентную модификацию полимеров природного (ЧСА) и синтетического (PLGA) происхождения с целью создания флуоресцентных систем адресной доставки.

2. Предложенные подходы к синтезу *O*-, *S*- и *N*-замещённых 1,8-нафталимидов, содержащих α -гидроксидибисфосфонатный фрагмент, обеспечивают возможность визуализации гидроксиапатита и создают основу для разработки остеотропных систем адресной доставки.

3. Ковалентное связывание синтезированных производных 1,8-нафталимида с сополимером молочной и гликолевой кислот (*PLGA*) и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) приводит к образованию флуоресцентных конъюгатов, перспективных для создания систем адресной доставки биологически активных соединений.

4. Спектрально-люминесцентные свойства синтезированных флуорофоров (положение максимумов поглощения и эмиссии, квантовые выходы флуоресценции, фотостабильность) сохраняются после их ковалентного связывания с полимерами и при формировании наночастиц на основе полученных конъюгатов.

5. Наночастицы на основе *PLGA*, меченные производными 1,8-нафталимида, эффективно интернализируются клетками мышшиной карциномы молочной железы линии 4T1 и могут быть визуализированы методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, что подтверждает их пригодность для изучения внутриклеточного распределения *in vitro*.

6. Впервые экспериментально продемонстрирована способность *S*-замещённого 1,8-нафталимида с бисфосфонатным фрагментом и полученных на его основе *PLGA*-наночастиц, загруженных доксорубицином, к избирательному связыванию с гидроксиапатитом и визуализации клеток остеосаркомы линии *Saos-2*, что свидетельствует о перспективности данного соединения в качестве флуоресцентного зонда для исследования костной ткани и создания тераностических систем.

Степень достоверности результатов. Достоверность количественных оценок и объективность выводов обеспечены статистической обработкой полученных результатов, исключающей влияние субъективных факторов при интерпретации данных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе данных *Scopus*, и 9 тезисов международных и всероссийских конференций.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 2023, 2024, 2025); Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (г. Москва, 2023, 2024, 2025); IV и V Международные Школы молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (г. Москва, 2024, 2025); IV Конференция молодых ученых с международным участием «Новые материалы и химические технологии» (г. Москва, 2023); III международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 2024); Академический форум молодых ученых стран Большой Евразии «Континент науки» (г. Москва, 2023).

Личный вклад автора состоит в непосредственном выполнении всего объёма экспериментальной работы, включая синтез новых производных 1,8-нафталимида, ковалентную модификацию полимеров (ЧСА и *PLGA*) и получение на их основе флуоресцентных систем адресной доставки. Автором самостоятельно проведены исследования спектрально-люминесцентных свойств синтезированных соединений, конъюгатов и наночастиц, а также осуществлены обработка, систематизация и интерпретация полученных результатов. Личный вклад также включает подготовку публикаций по теме диссертации и представление результатов работы в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях.

Автор выражает особую благодарность доц., к.х.н. Ткаченко С. В., доц., д.х.н. Ощепкову М. С., к.х.н. Малиновской Ю. А. и к.х.н. Мельникову П. А. (Государственный Научный Центр Социальной и Судебной Психиатрии им. В.П. Сербского), к.х.н. Рябовой А. В. (Институт общей физики имени А. М. Прохорова РАН), к.х.н. Акимову М. Г. и к.х.н. Пахомову А. А. (Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)), а также коллективам кафедры Химии и технологии биомедицинских препаратов и Лаборатории нанофармацевтики ФГБОУ ВО РХТУ им. Д. И. Менделеева за участие в планировании экспериментальной работы и обсуждении полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (FSSM-2025-0002).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста и включает в себя введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть, заключение, список сокращений, список литературы из 169 источников. Работа содержит 23 таблицы и 63 рисунка.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Производные 1,8-нафталимида вызывают большой интерес среди многообразия органических люминофоров благодаря уникальному сочетанию свойств, а именно возможности химической модификации, высоким спектрально-люминесцентным характеристикам (значительные квантовые выходы флуоресценции в водных и биологических средах, высокая фотостабильность) и низкой токсичности [1]. Эти особенности обуславливают широкое использование данного класса соединений в различных областях науки и техники, в частности, они используются для создания флуоресцентных сенсоров, текстильных красителей, органических светодиодов, а также диагностических и терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний [2]. В связи с этим разработка новых флуоресцентных маркеров на основе 1,8-нафталимида представляет собой актуальное направление органической химии, что позволит существенно расширить области применения указанных соединений.

Одним из перспективных направлений современного материаловедения является создание функциональных материалов с улучшенными свойствами, в том числе на основе полимеров медицинского назначения [3]. Особый интерес представляет модификация природных (коллаген, хитозан, альгинат, гиалуроновая кислота) и синтетических (полимолочная кислота, полигликолевая кислота, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (*PLGA*)) полимеров, одобренных *FDA* для клинического применения [4]. Введение флуоресцентной метки в их структуру открывает возможность создания систем адресной доставки лекарственных веществ (СДЛВ), визуализация которых может осуществляться методами магнитно-резонансной томографии [5], ядерной медицины [6], а также различными видами микроскопии, включая флуоресцентную [7]. Это позволяет в режиме реального времени отслеживать фармакокинетику, биораспределение, локализацию и эффективность нацеливания лекарственных препаратов [8]. В связи с этим первая часть литературного обзора посвящена анализу подходов к модификации полимеров медицинского назначения производными 1,8-нафталимида для решения задач нанотехнологии и адресной доставки.

Для обеспечения селективного нацеливания на внутриклеточные структуры в состав полимерной системы или непосредственно в структуру флуорофора могут быть введены векторные группы [9]. Во втором разделе обзора рассмотрены основные типы таких

заместителей, обеспечивающих избирательное связывание с различными клеточными мишенями. Отдельное внимание уделено подходам к получению флуоресцентных бисфосфонатов – перспективных соединений для разработки остеотропных систем адресной доставки, способных к визуализации костной ткани и её патологий.

1.1. Модификация полимеров природного и синтетического происхождения производными 1,8-нафталимида

В последние десятилетия наблюдается устойчивый рост интереса к использованию полимеров и наноматериалов в биомедицине и смежных областях [10]. Одним из ключевых подходов к улучшению физико-химических и биологических свойств таких материалов является функционализация их поверхности путём введения реакционноспособных групп, обеспечивающих направленное взаимодействие с клетками или тканями-мишенями [11]. Для повышения селективности доставки лекарственных веществ к внутриклеточным органеллам активно разрабатываются наносомальные формы – наночастицы, мицеллы и липосомы [12]. Такие функционализированные системы позволяют не только улучшить традиционные характеристики лекарственных средств (биодоступность, гидрофильность, биосовместимость, биоразлагаемость и контролируемое высвобождение), но и придать им новые свойства, включая способность к таргетированию, повышение безопасности и снижение риска побочных эффектов, а также реализацию тераностических функций [13].

В качестве полимерных матриц для создания систем доставки наиболее широко используются природные (коллаген, хитозан, альгинат, гиалуроновая кислота) и синтетические (полимолочная кислота, полигликолевая кислота, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот – *PLGA*) полимеры, одобренные для медико-биологического применения.

Флуоресцентные полимеры, подобно низкомолекулярным флуорофорам, находят использование в самых разных областях: от создания сенсорных устройств и оптоэлектроники до молекулярной визуализации, фотодинамической терапии, органических светодиодов, флуоресцентных биозондов, и технологий защиты информации [14]. Перспективной платформой для разработки таких материалов являются

производные 1,8-нафталимида, сочетающие высокие фотофизические характеристики с возможностью химической модификации [15]. Важным преимуществом флуоресцентных нанообъектов на их основе являются возможность одновременной визуализации с помощью различных видов микроскопии и загрузка терапевтических агентов, что открывает широкие перспективы для терапии социально значимых заболеваний. Представим последние достижения в области модификации полимеров этим классом флуорофоров.

1.1.1. Модификация природных полимеров производными 1,8-нафталимида

Хитозан – линейный аминополисахарид, состоящий из случайно распределенных остатков N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, соединенных β -(1→4)-гликозидными связями. Его получают щелочным деацетилированием хитина, содержащегося в водорослях и экзоскелетах членистоногих (ракообразных и насекомых), а также в грибах [16]. Благодаря нетоксичности, биосовместимости, биоразлагаемости, а также антимикробным и бактерицидным свойствам материалы на основе хитозана широко используются в сельском хозяйстве, фармацевтических разработках, биомедицине и защите окружающей среды [17].

В работе Yang L. [18] получены самоорганизующиеся наночастицы на основе хитозана **1**, модифицированного 4-метокси-замещенным 1,8-нафталимидом, и загруженные N-бутил-4-гидразином-1,8-нафталимидом **2** для количественного обнаружения формальдегида в воде, воздухе, образцах кожи и живых клетках (рисунок 1). Предел обнаружения аналита в широком диапазоне pH (3,0-11,0) составил 66,29 нМ. В экспериментах *in vitro* на клетках линии HeLa наблюдалось значительное усиление интенсивности флуоресценции в синем и зеленом каналах, обусловленное нарушением фотоиндуцированного переноса электронов (*PET, Photoinduced Electron Transfer*) при взаимодействии формальдегида с гидразиновой группой флуорофора [19].

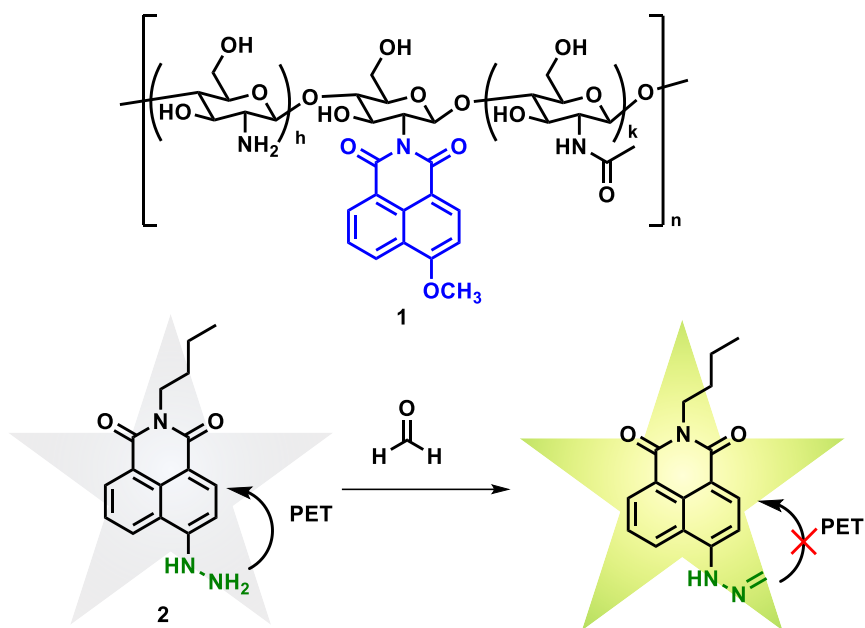


Рисунок 1 – Структура хитозана **1**, модифицированного 4-метокси-замещенного 1,8-нафталимида и схема взаимодействия производного **2** с формальдегидом

В исследовании Yu W. [20] разработан полимерный флуоресцентный зонд **3** на основе хитозана для селективного обнаружения ионов Cu^{2+} (рисунок 2). Материал содержал фрагмент 1,8-нафталиimid-салицилиденгидразона и проявлял интенсивную флуоресценцию при $\lambda = 560$ нм в 10% водно-спиртовом растворе (pH = 7,0). Добавление ионов Cu^{2+} в концентрации 100 мкМ приводило к практически полному тушению флуоресценции по *PET*-механизму. Присутствие катионов щелочных и щелочноземельных металлов не оказывало влияния на спектральные характеристики, что свидетельствует о перспективности зонда для селективного определения ионов меди (II) в водных средах.

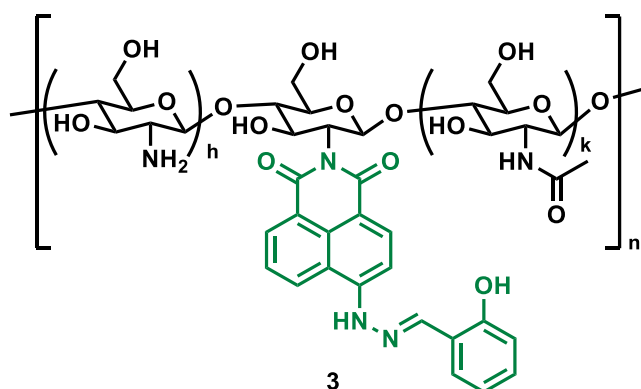


Рисунок 2 – Структура хитозана **3**, модифицированного производным 1,8-нафталиimid-салицилиденгидразона

Yuan X. с соавт. [21] модифицировали хитозан 4-тиоморфолил-1,8-нафталиimidом, получив конъюгат **4**, способный детектировать хлорат анион ClO^- в воде (рисунок 3).

Окисление атома серы аналитом сопровождалось значительным увеличением интенсивности флуоресценции при 494 нм. Предел обнаружения составил 0,27 мкМ, время отклика – 60 с.

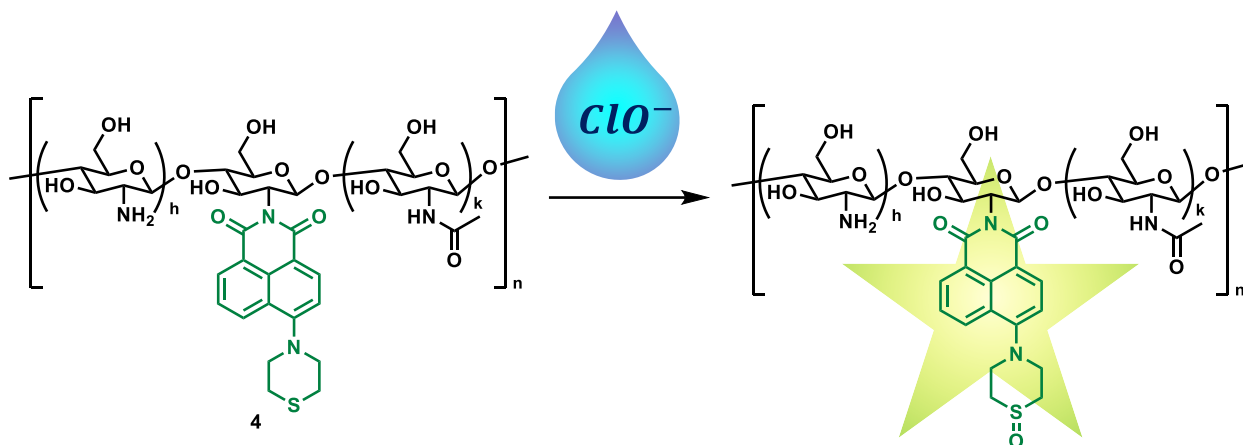


Рисунок 3 – Структура хитозана **4**, модифицированного производным 1,8-нафталимида для обнаружения хлорат аниона ClO^-

Целлюлоза – полисахарид с общей формулой $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, линейная цепь которого образована остатками β -D-глюкозы, соединенными $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидными связями [22]. В работе [23] описан флуоресцентный гидрогель с трехмерной двойной сетчатой структурой на основе целлюлозы, модифицированной N-этилендиамин-1,8-нафталимидом **5**, для обнаружения и адсорбции ионов хрома Cr (VI). Материал позволял определять хром (VI) в диапазоне концентраций 1-400 мкмоль/л с пределом обнаружения 0,58 мкмоль/л; максимальная величина адсорбции катионов Cr (VI) составила 189,04 мг/г (рисунок 4).

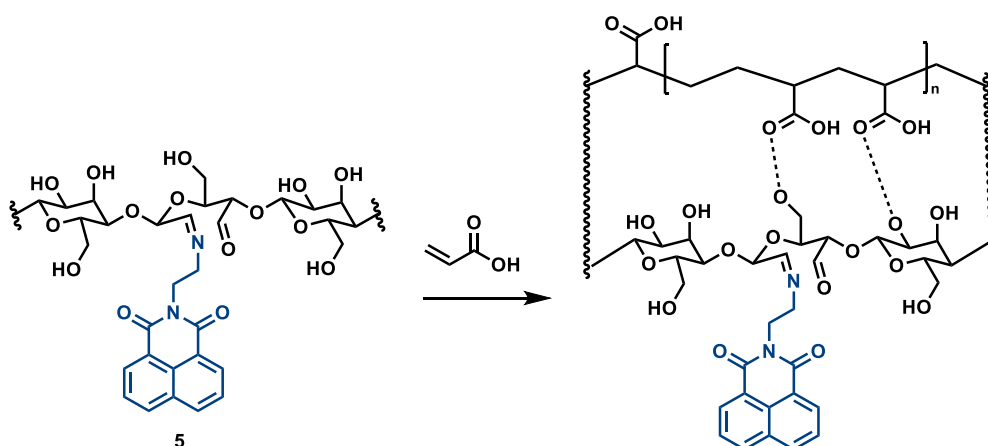


Рисунок 4 – Структура флуоресцентного гидрогеля на основе целлюлозы, модифицированной N-этилендиамин-1,8-нафталимидом

Гиалуроновая кислота – анионный несulfатированный гликозаминогликан, широко распространенный в соединительной, эпителиальной и нервной тканях, один из основных компонентов внеклеточного матрикса [24]. Liu M. с соавт. [25] впервые разработали электрохимический цитосенсор сэндвич-типа для количественного

определения клеток HeLa, сверхэкспрессирующих рецепторы CD44. Гиалуроновая кислота, модифицированная N-бутил-4-(6'-аминогексил)амино-1,8-нафталимидом **6**, выполняла роль молекулы-мишени и была иммобилизована на электроде из оксида индия-олова, модифицированном многослойными углеродными нанотрубками (рисунок 5). Выбор 1,8-нафталимида обусловлен его высокой фотостабильностью. Связывание с клетками регистрировали по изменению хронокулонометрического сигнала, который линейно уменьшался в диапазоне концентраций клеток от $2,1 \times 10^2$ до $2,1 \times 10^7$ клеток HeLa·мл⁻¹ с пределом обнаружения 70 клеток·мл⁻¹. Предложенный подход может быть адаптирован для создания высокочувствительных методов детекции опухолевых клеток.

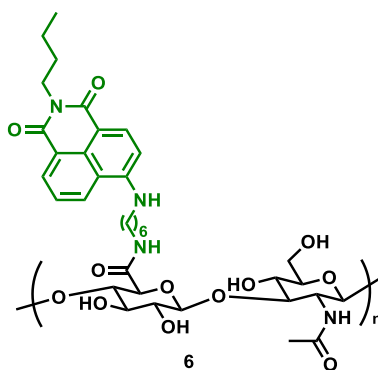


Рисунок 5 – Структурная формула гиалуроновой кислоты **6**, модифицированной производным 1,8-нафталимида для создания электрохимического цитосенсора

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) – основной белок плазмы крови (концентрация 35-50 г/л), состоящий из 585 аминокислотных остатков, с молярной массой 66,5 кДа [26]. Молекула ЧСА содержит 35 остатков цистеина, 34 из которых образуют 17 дисульфидных связей, стабилизирующих структуру белка и доступных для модификации [27]. Благодаря множеству центров связывания альбумин широко используется для адресной доставки как гидрофильных, так и гидрофобных лекарственных препаратов [28]. В последние годы модификация ЧСА флуоресцентными зондами приобретает особое значение для биовизуализации и адресной терапии опухолевых заболеваний.

Один из подходов к ковалентной модификации альбумина основан на реакции Михаэля между сульфгидрильными группами белка и малеимидной группой флуорофора [29]. В работе [30] синтезировано производное 1,8-нафталимида **7**, содержащее 4-(N-этилмалеимид)аминный заместитель в 4-ом положении ароматического кольца (рисунок 6). Для осуществления реакции был взят бычий сывороточный альбумин (БСА), который инкубировали с красителем **7** при 37 °С в течение 5 мин. Электрофорез в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси синим подтвердил

наличие флуоресценции модифицированного белка, что доказывает применимость малеимидных производных 1,8-нафталимида для ковалентного мечения сульфгидрильных групп белков.

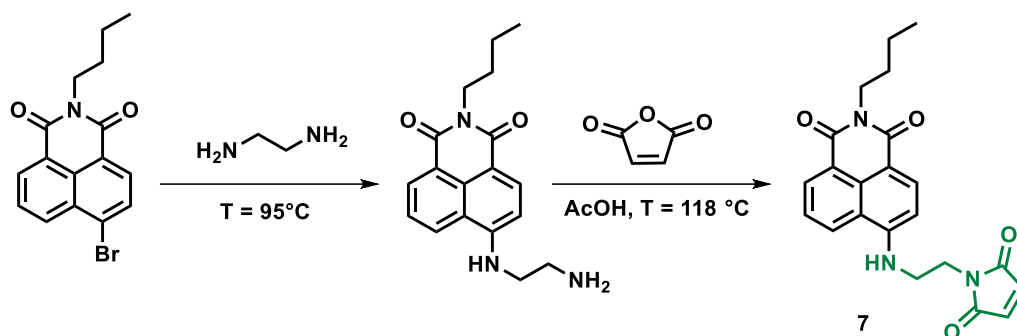


Рисунок 6 – Реакция получения 4-(N-этилмалеимид)амино производного 1,8-нафталимида 7

Для изучения *S*-нитрозилирования – важного механизма регуляции активности белков – в работе [31] получен ряд 4-алкил- и арилсульфонил-N-*n*-бутил-1,8-нафталимидов (**8а-в**) (рисунок 7). Бычий сывороточный альбумин с восстановленными сульфгидрильными группами предварительно обрабатывали *S*-нитрозоцистеином – индуктором *S*-нитрозилирования. Оставшиеся SH-группы модифицировали флуорофором по механизму нуклеофильного ароматического замещения, что приводило к более чем 100-кратному увеличению интенсивности флуоресценции 1,8-нафталимида. Эксперимент показал, что в клетках, не подвергающихся стрессу, большинство сульфгидрильных групп белков находятся в восстановленной форме. Таким образом, 4-сульфонильные производные 1,8-нафталимида могут служить платформой для разработки инструментов изучения модификации тиольных групп.

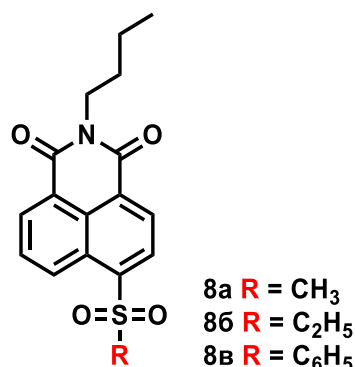


Рисунок 7 – Химическая структура 4-сульфонил-N-*n*-бутил-1,8-нафталимидов **8а-в**.

Группа исследователей под руководством Li X. [32] синтезировала ряд 4-гидразон-1,8-нафталимидов **9а-г**. Полученные *in situ* нитрилимины вступали в реакцию

1,3-диполярного циклоприсоединения с бицикло[6.1.0]нонином (BCN) (рисунок 8). Конъюгат альбумина с BCN инкубировали при 37°C в течение 24 часов с гидразоном и йодозилбензолом, выступающим в качестве окислителя для превращения исходного гидразона в нитрилимин *in situ*. Анализ методом электрофореза в полиакриламидном геле с окрашиванием Кумасси синим показал наличие полосы флуоресценции, соответствующей модифицированному бициклононином альбумину, что подтверждает возможность использования 4-гидразон-замещенных производных 1,8-нафталимида для флуоресцентного мечения белков.

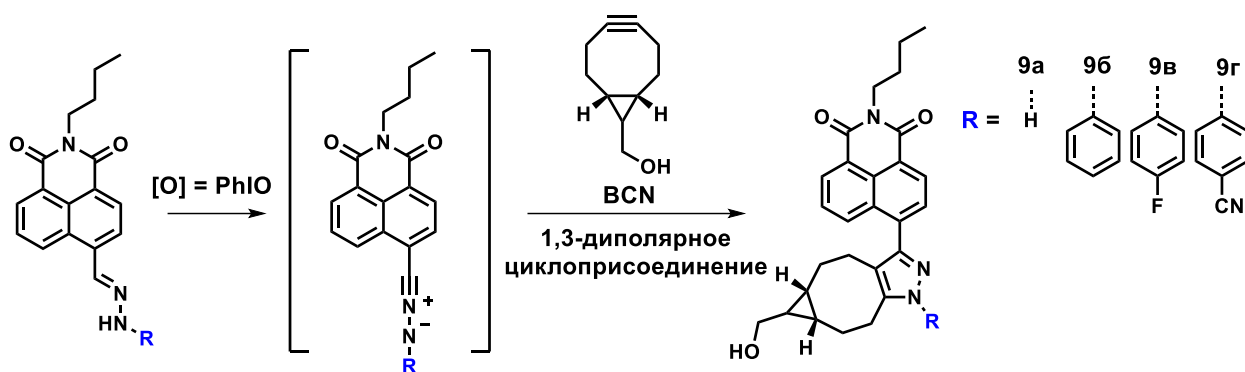


Рисунок 8 – Производные 4-гидразон-1,8-нафталимидов, полученные в работе [32]

Представленные примеры демонстрируют широкий спектр применения производных 1,8-нафталимидов для ковалентной модификации природных полимеров. На их основе созданы флуоресцентные зонды для обнаружения различных аналитов, системы адресной доставки и платформы для изучения клеточных процессов.

1.1.2. Модификация синтетических полимеров производными 1,8-нафталимида

Флуоресцентное мечение и визуализация играют ключевую роль в современных естественно-научных и медицинских исследованиях, обеспечивая возможность анализа биомолекул, отслеживания биологических процессов, визуализации опухолей и терапевтической эффективности [33]. Разработка флуоресцентных биоразлагаемых полимеров открывает новые перспективы для решения актуальных задач биомедицины, включающих тканевую инженерию, адресную доставку и диагностику социально значимых заболеваний [34].

В настоящее время для медицинской визуализации, в частности для хирургии с флуоресцентным контролем, одобрено несколько флуоресцентных красителей (индоцианиновый зелёный, метиленовый синий, 5-аминолевулиновая кислота, флуоресцеин) [35]. Однако, большинство органических красителей, характеризуются низкой специфичностью к тканям-мишеням, недостаточной стабильностью, токсичностью и быстрым выведением из организма. К числу их основных ограничений относятся потенциальное канцерогенное действие, обусловленное ароматической структурой [36,37], быстрое фотообесцвечивание [38] и отсутствие функциональных групп для дальнейшей конъюгации. Включение красителей в состав биоразлагаемых полимеров позволяет в значительной степени преодолеть эти недостатки. Производные 1,8-нафталимида, лишённые многих из перечисленных проблем, рассматриваются как перспективные кандидаты для создания флуоресцентных полимерных материалов медико-биологического назначения. Ниже рассмотрены примеры ковалентной модификации синтетических биоразлагаемых полимеров данным классом флуорофоров.

Одним из эффективных подходов к получению полимерных структур является введение фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ) в ароматическое ядро 1,8-нафталимида. ПЭГ широко используется в биоконъюгации и наномедицине как «золотой стандарт» для увеличения времени циркуляции лекарственных препаратов в кровотоке и повышения эффективности их действия [39,40]. Так, в работе Petkova V. [41] описан синтез новых амфифильных зондов **10-13** на основе производных 1,8-нафталимида, содержащих *n*-октильный заместитель при имидном атоме азота и циклические или ациклические фрагменты полиэтиленгликоля (рисунок 9). Максимумы длины волны поглощения и флуоресценции полученных соединений составили 370 и 450 нм соответственно. Для флуорофора **11** наблюдался эффект эмиссии, вызванной агрегацией (*Aggregation-Induced Emission, AIE*) [42]. С помощью расчетов методом теории функционала плотности (*Density Functional Theory, DFT*) была показана склонность красителей к агрегации за счет π -стекинг взаимодействий, а также образования водородных связей между гидроксильными группами ПЭГ-фрагментов. Полученные соединения могут служить основой для разработки мембранных добавок на основе ПЭГ-функционализированных 1,8-нафталимидов.

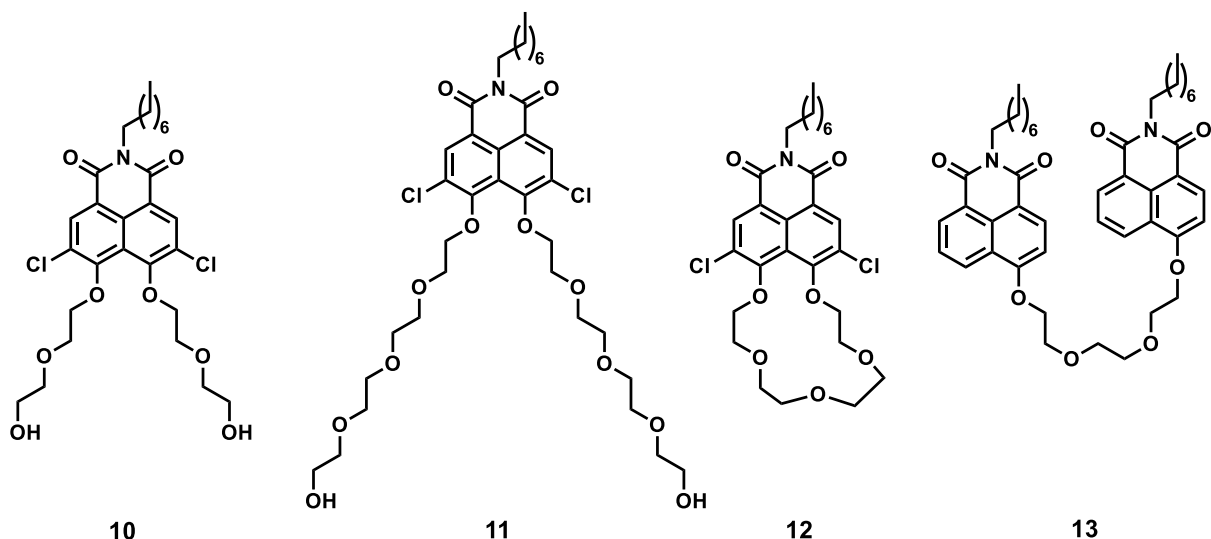


Рисунок 9 – Структурные формулы 1,8-нафталимидов **10-13**, содержащих ПЭГ-заместители

В работе [43] впервые получен флуоресцентный амфифильный блок-сополимер Poly(Nap-Lyso-MMA-co-PEGMA₃₀₀) **15**, предназначенный для одновременной визуализации как липидных капель, так и лизосом клеток (рисунок 10).

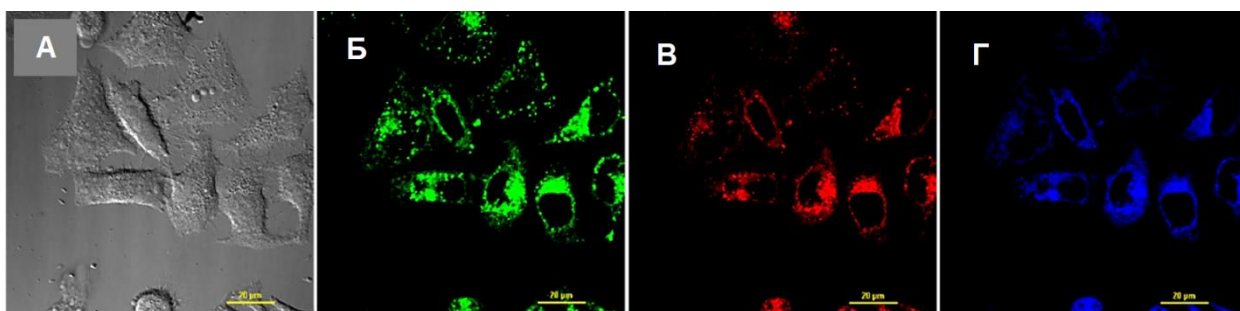
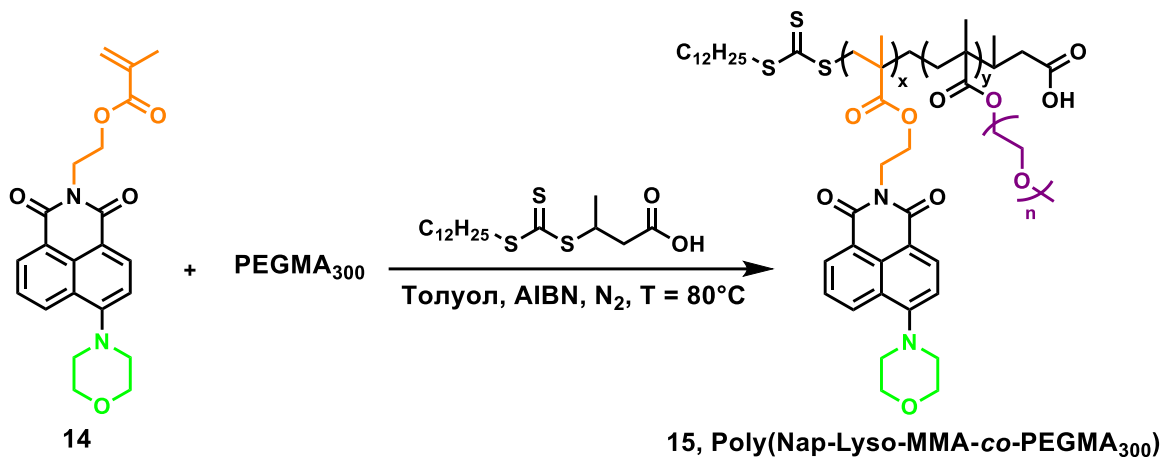


Рисунок 10 – Реакция получения блок-сополимера и флуоресцентные изображения клеток HeLa. А) Светлопольное изображение; Б) Poly(Nap-Lyso-MMA-co-PEGMA₃₀₀); В) Нильский красный; Г) *LysoTracker Red*

Сополимер характеризовался низкой цитотоксичностью, хорошей растворимостью в воде, высокой фотостабильностью, а также большим стоксовым сдвигом (~130 нм). Его фотофизические свойства не зависели от рН среды и присутствия биологически значимых

ионов, активных форм кислорода и серы, но проявляли чувствительность к полярности растворителя. В клетках линии HeLa сополимер Poly(Nap-Lyso-MMA-co-PEGMA₃₀₀) **15** одновременно локализовался в лизосомах и липидных каплях, причем интенсивность флуоресценции в последних была значительно выше. Полученный флуоресцентный полиакрилат может рассматриваться как перспективная платформа для визуализации клеточных структур и изучения взаимодействий между ними.

ПЭГилирование широко используется для достижения пролонгированной циркуляции лекарственных препаратов за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания (*Enhanced Permeability and Retention, EPR-эффект*), что открывает возможности для создания наноразмерных систем доставки [44]. Liu В.-Y. с соавт. [45] получили биосовместимые самособирающиеся флуоресцентные полимерные мицеллы на основе амфифильного блок-сополимера, содержащего фрагмент 1,8-нафталимида **16** (рисунок 11). Сополимер включал полиэтиленгликоль, связанный через триазольный спейсер с нафталимидным ядром, которое, свою очередь, было замещено в положении 4 остатком стеариновой кислоты. Метилполиэтиленгликоль обеспечивал растворимость в воде и защиту мицелл от захвата макрофагами и клетками ретикулоэндотелиальной системы. Полученные мицеллы характеризовались узким распределением по размерам, $d_{cp} = 20,8 \pm 0,6$, $PDI = 0,39 \pm 0,01$. Конъюгат **18** проявлял рН-чувствительность, обусловленную ингибированием фотоиндуцированного переноса электронов (*PET*) при протонировании аминогруппы флуорофора: квантовый выход флуоресценции возрастал с 0,8 до 40% при изменении рН от 11,91 до 1,81. Эксперименты *in vitro* на клетках HeLa подтвердили, что полученные мицеллы могут служить сенсорами для внутриклеточного измерения рН.

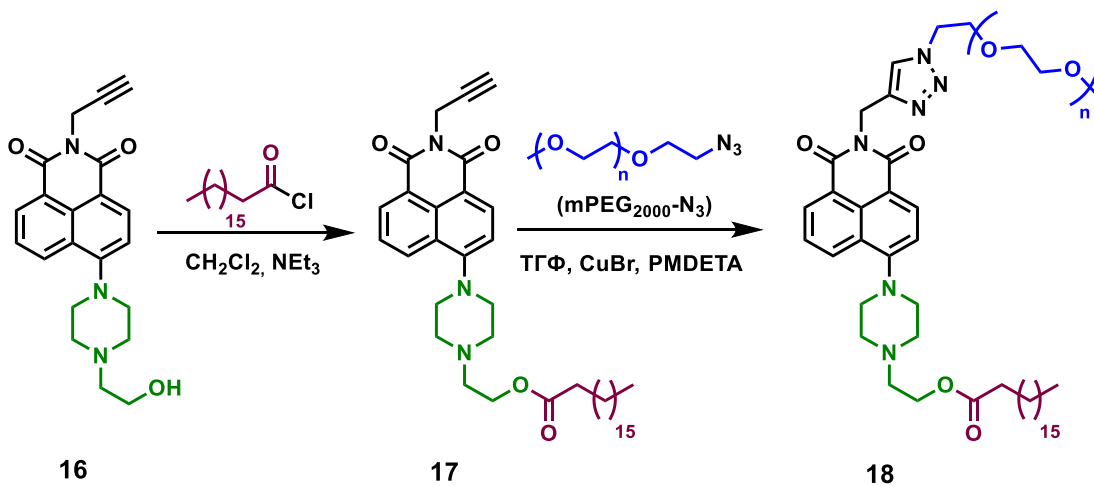


Рисунок 11 – Реакция получения рН чувствительного конъюгата **18**

В работе [46] синтезированы полилактидные полимеры (**19-22**), модифицированные производными 1,8-нафталимида с карбазольной и *n*-бутильной группами, для создания материалов, обладающих флуоресценцией при комнатной температуре (рисунок 12). Полилактид, содержащий карбазол-нафталимидный фрагмент (**21**), характеризовался временем жизни флуоресценции 407 мс в вакууме и длинами волн поглощения и излучения 590 и 635 нм, что соответствует красной области спектра. Новые полимеры отличаются высокой растворимостью, простотой получения и биосовместимостью, что открывает перспективы их применения для клеточной визуализации.

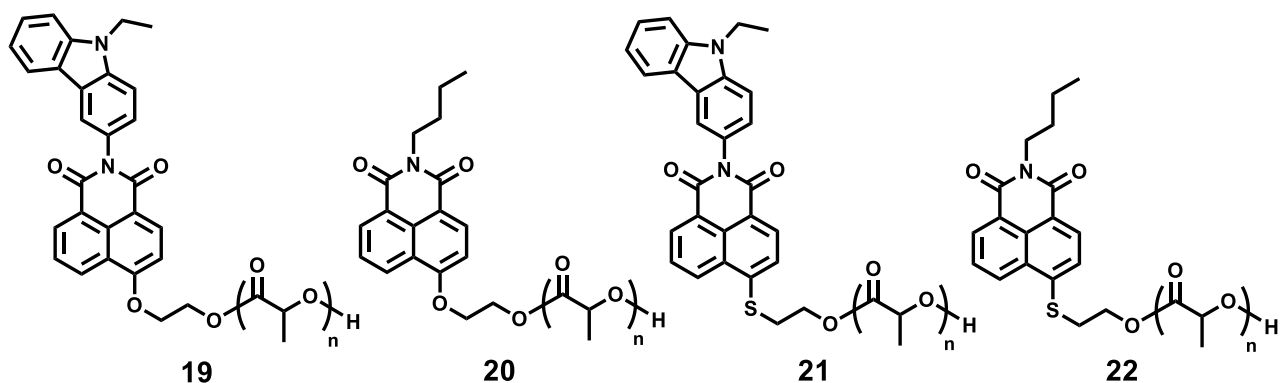


Рисунок 12 – Структурные формулы полилактидных полимеров, модифицированных производными 1,8-нафталимида с карбазольной и *n*-бутильной группами

Ратиометрические флуоресцентные методы, основанные на регистрации изменений соотношения интенсивностей на нескольких длинах волн возбуждения или испускания, широко используются для обнаружения локальных изменений окружающей среды. Перспективным подходом к созданию таких наносенсоров являются полимерные наночастицы, позволяющие неинвазивно отслеживать клеточные процессы *in situ* [47]. Примером служат настраиваемые ратиометрические флуоресцентные рН-наносенсоры, полученные путем конъюгации 4-метилпиперазиновых и 4-(*N,N*-диметилэтанол-аминовых) производных 1,8-нафталимида. На основе этих конъюгатов сформированы наночастицы со средними размерами $d_{cp} = 70 - 100$ нм. В клетках HeLa наблюдалась колокализация наночастиц с красителем *LysoTracker Deep Red* в лизосомах, что указывает на возможность их использования в качестве эффективной сенсорной платформы для определения внутриклеточного рН в живых клетках [48].

Таким образом, успешное применение биоразлагаемых флуоресцентных материалов непосредственно связано с разработкой полимеров, обладающих регулируемыми физико-химическими и фотофизическими свойствами, отвечающими разнообразным требованиям биологических и биомедицинских приложений. Исследования в области

функционализации полимеров производными 1,8-нафталимида вносят существенный вклад в достижение этих целей.

1.2. Векторные группы, используемые для избирательного нацеливания систем адресной доставки в органеллы

Разработка наноносителей (наночастицы, липосомы, мицеллы, дендримеры), предназначенных для избирательного нацеливания на определенные органеллы посредством взаимодействия лиганд-рецептор, является перспективным подходом для повышения эффективности действия лекарственных веществ (ЛВ) при минимизации побочных эффектов [49]. Основными мишенями воздействия являются ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи или лизосомы, принимающие участие в развитии патологического процесса. Избирательно доставляя ЛВ к молекулярным мишеням, такие системы повышают его терапевтический индекс и обеспечивают доступ к внутриклеточным компартментам [50]. Эта точность также позволяет модулировать специфические клеточные процессы и пути, имеющие решающее значение для прогрессирования заболевания, тем самым открывая потенциал для более эффективного лечения. Кроме того, специфичные для органелл наноплатформы, облегчают комбинированную терапию, одновременно доставляя несколько ЛВ к разным органеллам внутри одной клетки, открывая новые возможности для инновационных стратегий лечения [51].

Основные подходы для селективного связывания с мишенями включают модификацию векторными группами, целевыми/трансмембранными пептидами и аптамерами [52]. Кроме того, некоторые наноматериалы по своей природе нацелены на определенные субклеточные структуры. Так, например, наночастицы размером менее 9 нм могут проходить через ядерную мембрану, что дает им возможность нацеливаться на ядро и проникать в него [53]. Материалы с высоким положительным зарядом, как правило, нацелены на митохондрии. Полимеры, богатые анионными группами (например, карбоксильными), могут связываться с ионами Ca^{2+} в ЭПР посредством координационных связей. Хондроитин сульфат может эффективно воздействовать на аппарат Гольджи, взаимодействуя с гликопротеинами и гликолипидами на мембране [54]. Особое внимание

необходимо уделить остеотропным системам адресной доставки, использующимся для лечения заболеваний костной ткани [55]. Наиболее изученными на данный момент являются такие векторные группы как бисфосфонаты, олигопептиды, тетрациклины и аптамеры [56]. Бисфосфонаты преимущественно связываются с гидроксиапатитом благодаря сходному строению бисфосфонатной и пирофосфатной групп. Они отличаются высоким сродством к материалу костного матрикса, быстрым связыванием и высокой стабильностью, а также способностью ингибировать функции остеокластов и смещать равновесие в постоянных процессах образования и резорбции кости. Наиболее распространенными молекулами для введения бисфосфонатной группы в различные наноплатформы являются алендроновая и золендроновая кислоты [57].

Рассмотренные выше принципы дизайна систем адресной доставки лекарственных веществ, нацеленных в органеллы, также используются для разработки флуоресцентных маркеров, селективно связывающихся с клеточными структурами.

1.3. Производные 1,8-нафталимида, содержащие векторные группы для связывания с клеточными органеллами

Среди большого разнообразия органических флуорофоров лишь немногие обладают способностью избирательно накапливаться в клеточных органеллах, что объясняется особенностями их химического строения. Модификация 1,8-нафталимидного каркаса путем введения различных векторных групп обеспечивает селективное связывание молекул с интересующими мишенями. В данном разделе рассмотрены последние достижения в области разработки производных 1,8-нафталимида для избирательной визуализации лизосом, митохондрий и эндоплазматического ретикула.

На рисунке 13 представлены наиболее часто используемые векторные группы для модификации органических молекул для нацеливания на клеточные компартменты. Так, флуоресцентные зонды, селективно направленные на лизосомы, содержат в своем составе слабоосновные функциональные группы, такие как морфолин, метилпиперазин, липофильные аминогруппы, или метилкарбитоловые фрагменты, что приводит к их удерживанию в мембране лизосом, например, за счет протонирования третичного атома азота в кислой среде органелл ($\text{pH}=4,5-5,5$) [58].

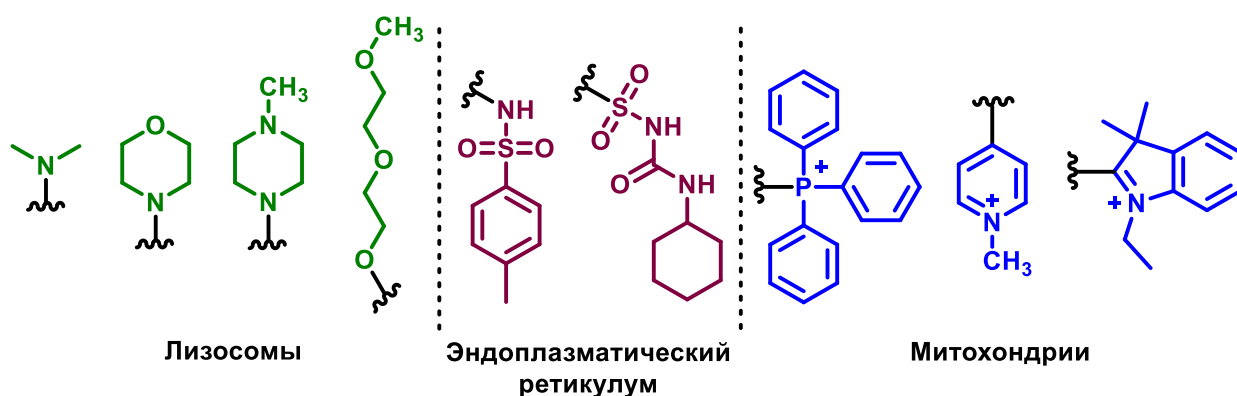


Рисунок 13 – Векторные группы для избирательного связывания с клеточными компартментами

Известным коммерческим маркером является *LysoSensor Green DND-189* **23**, содержащий морфолиноэтиламинный заместитель в 4-ом положении и использующийся для измерения pH лизосом (рисунок 14) [59]. За счет блокировки процесса переноса электрона (*PET*), связанного с протонированием третичного атома азота, происходит значительное увеличение интенсивности флуоресценции. Значение максимума длины волны поглощения для соединения **23** составляет $\lambda_{max}^{полгл} = 443$ нм, максимума длины волны флуоресценции $\lambda_{max}^{фл} = 505$, молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 16\ 000\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$, квантовый выход флуоресценции $\Phi_{фл} = 41\%$ (в PBS), $pK_a \sim 5,2$.

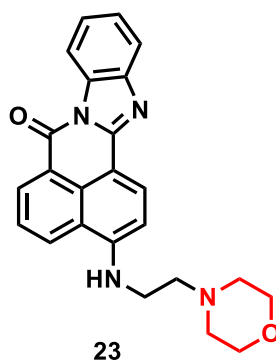


Рисунок 14 – Структурная формула *LysoSensor Green DND-189* **23**

В 2025 году Hou S. и соавт. [60] получили флуоресцентный зонд, излучающий в ближней инфракрасной области спектра ($\lambda_{max}^{фл} = 688$ нм) для селективного обнаружения биогенного тиола (цистеина) в лизосомах. Структура красителя **24** представляет собой конъюгат электроноакцепторного фрагмента дицианоизофорона с 1,8-нафталимидом, в котором остаток акриловой кислоты, введенный в 4-ое положение ароматического ядра, выполнял функцию расщепляемого заместителя, а этиленморфолиновая группа служила векторной группой для связывания с лизосомами. В отсутствие цистеина зонд **24** обладал

слабой флуоресценцией, что объясняется блокированием процесса внутримолекулярного переноса заряда (*Intramolecular Charge Transfer, ICT*) [61]. При добавлении аминокислоты наблюдалось значительное увеличение интенсивности флуоресценции при $\lambda = 688$ нм, связанное с усилением *ICT*-процесса при протекании реакции присоединения с последующей циклизацией в соответствии с механизмом, представленным на рисунке 15. Флуорофор **24** позволил определить содержание цистеина в диапазоне концентраций 0,2 – 10 мкМ, предел обнаружения составил 0,036 мкМ. Исследуемое производное **24** было использовано для определения эндогенного и экзогенного цистеина в лизосомах клеток A549, а также в опытах *in vivo* у *Danio rerio* и мышей.

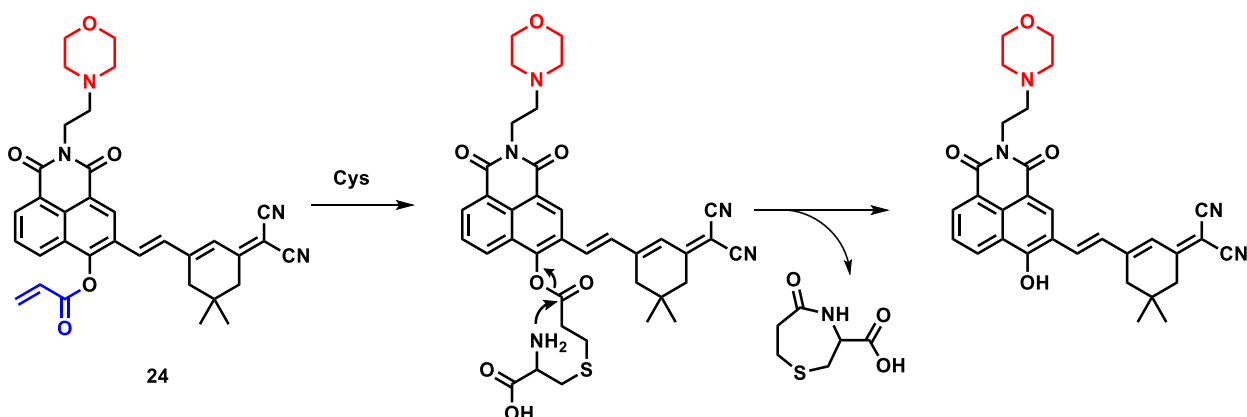


Рисунок 15 – Механизм реакции присоединения с последующей циклизацией при взаимодействии зонда **24** с цистеином

Ввиду отрицательного потенциала внутренней мембраны митохондрий, достигающего значений -180 – -150 мВ, концепция дизайна зондов, нацеленных на эти органеллы, заключается во введении катионов, обладающих высокой липофильностью, которые могут легко перемещаться через фосфолипидный бислой внутренней мембраны и накапливаться в митохондриальном матриксе под действием градиента концентрации [62]. В качестве липофильных катионов чаще всего выступают катионы трифенилфосфония (ТФФ), метилпиридиния и 3*H*-индолия (рисунок 13).

Векторная группа, представленная в виде катиона трифенилфосфония (ТФФ), благодаря своей универсальности является одним из наиболее часто используемых заместителей для доставки лекарственных веществ в митохондрии и для флуоресцентных зондов. Она может быть связана через алкильную цепь (линкер), что влияет на липофильность молекулы, а также на клеточное поглощение и место митохондриальной секвестрации (изоляции). Модификация катионом трифенилфосфония полимеров или пептидов для создания мицеллярных систем может являться перспективным подходом для

адресной доставки в митохондрии [63]. Приведем несколько примеров применяемых митохондриальных красителей на основе 1,8-нафталимида.

Одним из них является исследование Wu Z. [64], в котором был синтезирован зонд **25** для визуализации и одновременного определения изменения концентрации митохондриальных перекиси водорода H_2O_2 и АТФ в синем и красном флуоресцентных каналах в режиме реального времени (рисунок 16). Под действием H_2O_2 эфир бензилбороновой кислоты подвергался гидролитическому расщеплению, в то время как аминогруппы линкера между 1,8-нафталимидным и родамидным фрагментами образовывали водородные связи с трифосфатной группой АТФ. Кватернизированный пиридиновый заместитель выступал в качестве вектора для нацеливания на митохондрии. Использование зонда **25** позволило обнаружить 4-кратное увеличение концентрации митохондриальной H_2O_2 и 14% снижение уровня АТФ на клеточной линии кортикальных нейронов мыши линии C57BL/6 при её стимулировании супероксид анионом $O_2^{\cdot-}$. С помощью флуорофора **25** *in vivo* была определена концентрацию H_2O_2 в митохондриях *Danio rerio* как в нормальных условиях, так и в случае гипоксии.

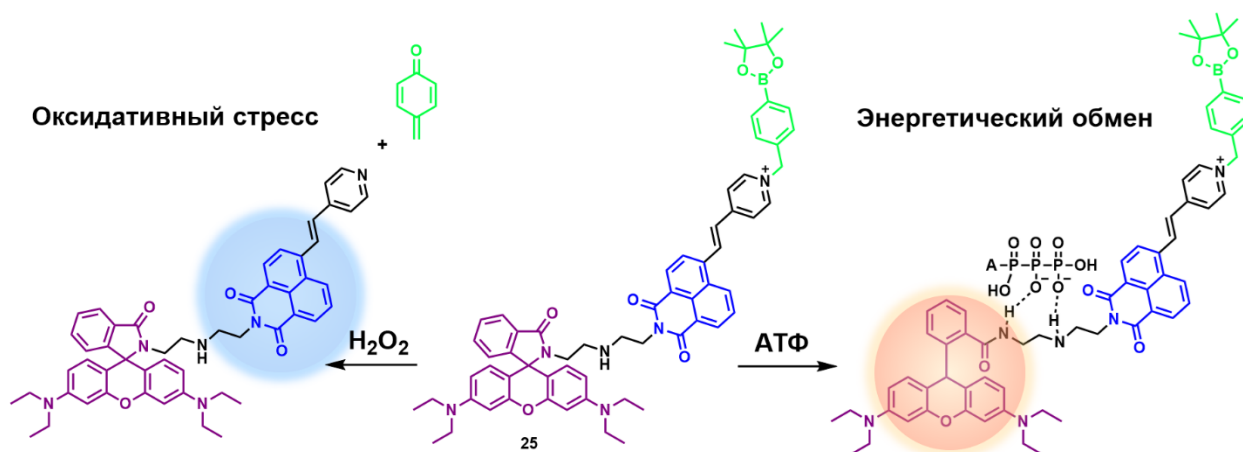


Рисунок 16 – Механизм включения флуоресценции зонда **25** в присутствии H_2O_2 и АТФ

На основе производных 1,8-нафталимида могут быть разработаны молекулярные сенсоры, чувствительные к изменениям вязкости среды, что связано с наличием скрученного состояния с внутримолекулярным переносом заряда (*Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT*). Так, в работе [65] синтезирован флуорофор **26**, содержащий бензоксазол[4,5-*b*]пиридиновый катион, выступающий в качестве векторной группы для нацеливания на митохондрии (рисунок 17). Ввиду *TICT*-процесса, время жизни возбужденного состояния флуорофора **26** в 40% водном растворе глицерина составило 203 пс, в то время как в 80% – 725 пс. С помощью лазерной конфокальной микроскопии было

подтверждено, что зонд **26** колокализовался с *MitoTracker Green FM* в митохондриях клеточной линии HeLa. Изменения вязкости митохондриального матрикса путем обработки культуральной среды антибиотиком моненсином привело к увеличению интенсивности флуоресценции флуорофора при длине волны $\lambda = 614$ нм по сравнению с контролем. Эксперимент подтвердил, что *TICT*-сенсоры могут выступать в качестве эффективных инструментов для *in situ* мониторинга изменений вязкости среды в биологических средах.

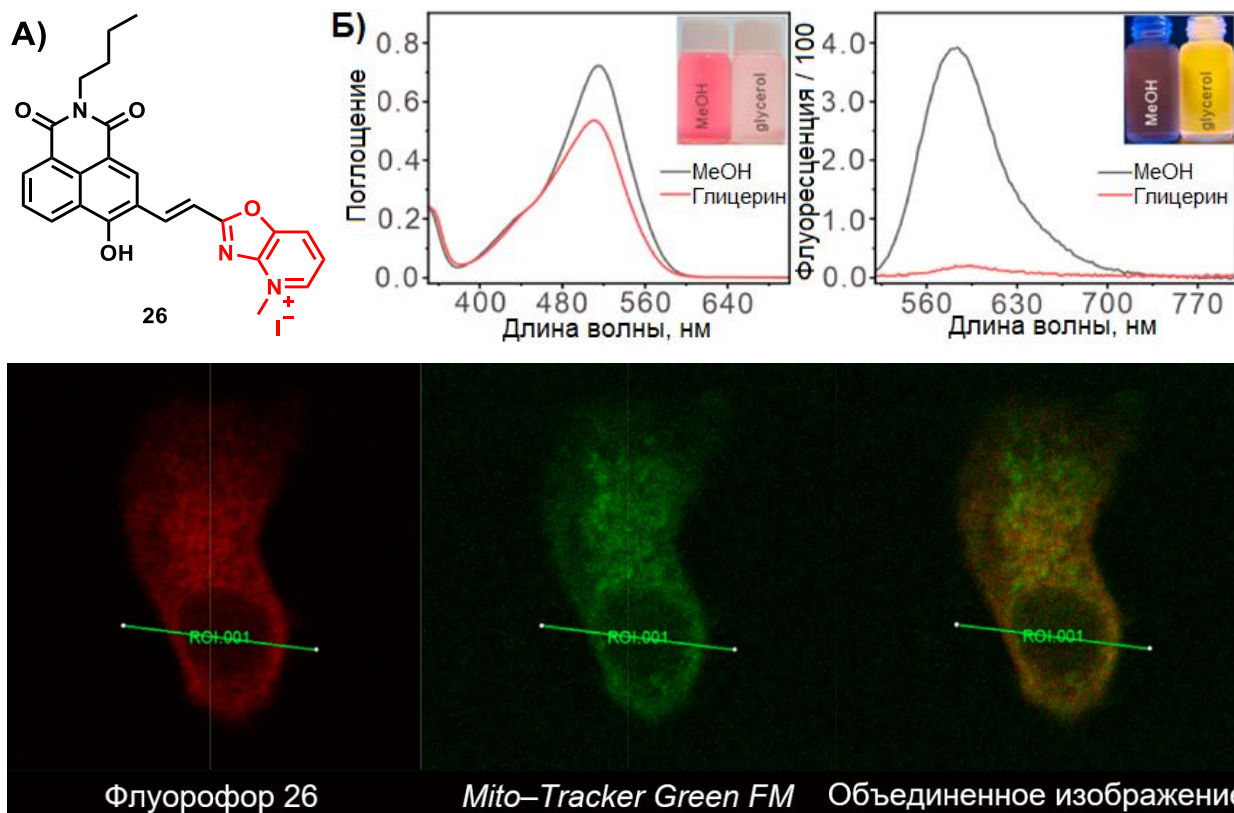


Рисунок 17 – А) Структурная формула флуорофора **26**; Б) Спектры поглощения и флуоресценции **26** (10 мкМ) в растворе 0–99% глицерина в метаноле; В) Флуоресцентная визуализация колокализации **26** (10 мкМ) с *MitoTracker Green FM* (50 нМ) в клетках HeLa

Еще одним направлением в создании люминофоров, селективно взаимодействующих с органеллами, является разработка флуоресцентных зондов, нацеленных на эндоплазматический ретикулум (ЭПР). В настоящее время можно выделить три основные стратегии их синтеза (рисунок 18) [66]:

1) Совмещение в структуре молекулы как алкильных гидрофобных цепей, так и положительно заряженного фрагмента, что приводит к связыванию с мембраной ЭПР, состоящей преимущественно из глицерофосфолипидов и обладающей высокой липидной растворимостью.

2) Введение функциональных групп для связывания с белками и рецепторами, специфически экспрессируемых на мембране ЭПР. Одной из наиболее распространенных является метилсульфонамидная группа, специфически взаимодействующая с рецептором сульфонилмочевины (SUR) АТФ-чувствительного калиевого канала [67].

3) Введение атома хлора в молекулу флуорофора, что может обеспечивать селективное связывание с хлорным каналом ЭПР.

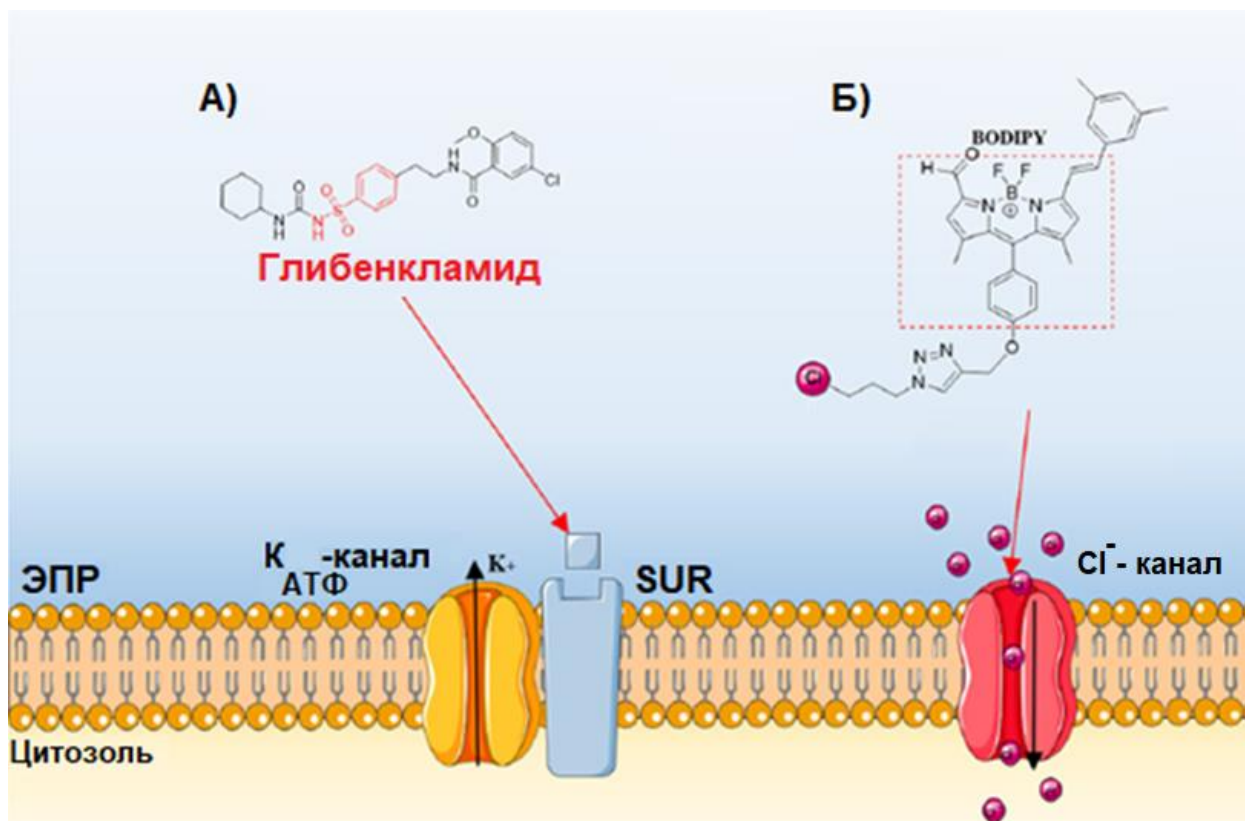


Рисунок 18 – Стратегии нацеливания на ЭПР, опосредованные лиганд рецепторным взаимодействием. А) Специфическое взаимодействие лиганда циклогексилсульфонилмочевины с АТФ-чувствительным K⁺-каналом (SUR-рецепторы на мембране ЭПР); Б) Специфическое взаимодействие флуорофора, содержащего хлорную группу, связывающуюся с хлорным каналом на поверхности ЭПР

В исследовании 2025 года Kumar P. и соавт. [68] получено соединение **27** (рисунок 19), в котором фенилсульфонамидный заместитель обеспечивает связывание с эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи. Введение трифениламинно группы в 4-ое положение нафталимидного ядра позволило получить зонд, проявляющий агрегационно-индуцированную эмиссию (*Aggregation Induced Emission, AIE*). Молекулярно-динамическое моделирование и расчёты с использованием теории функционала плотности (*DFT*) показали, что основной механизм эмиссии флуорофра **27** в таких растворителях, как ТГФ, ДМСО и вода обусловлен стабилизацией

внутримолекулярного переноса заряда (*ICT*) и процессами агрегации. На клеточных линиях колоректального рака НСТ-116 и нераковых пигментных клетках эпителия сетчатки человека (RPE-1) было показано, что зонд **27** эффективно связывался одновременно с аппаратом Гольджи и ЭПР; интенсивность флуоресценции возрастает со временем и достигает максимума через 30 мин инкубации. Коэффициент колокализации Пирсона между флуорофором **27** и маркером *ERTracker Red* составил 0,89 (рисунок 19).

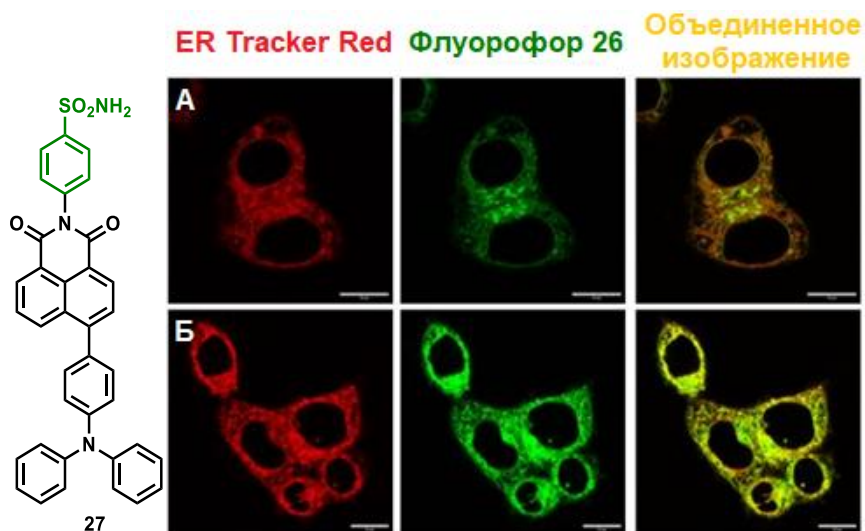


Рисунок 19 – Изображения клеток НСТ-116, инкубированных с красителем **27** в течение 15 мин (А) и 30 мин (Б). Масштаб – 10 мкм

Интересным примером векторной группы для связывания с ЭПР, являются комплексы на основе 4,7-дифенил-1,10-фенантролина. Вian H. с соавт. [69] с помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения синтезировали флуорофор **28** (рисунок 20), содержащий люминофор на основе комплекса Ir(III) с 4-аминопроизводным 1,8-нафталимида, люминесценция которого зависит от концентрации кислорода. Введение комплекса Ir (III) в молекулу обеспечило локализацию соединения в ЭПР на клеточной линии MCF-7.

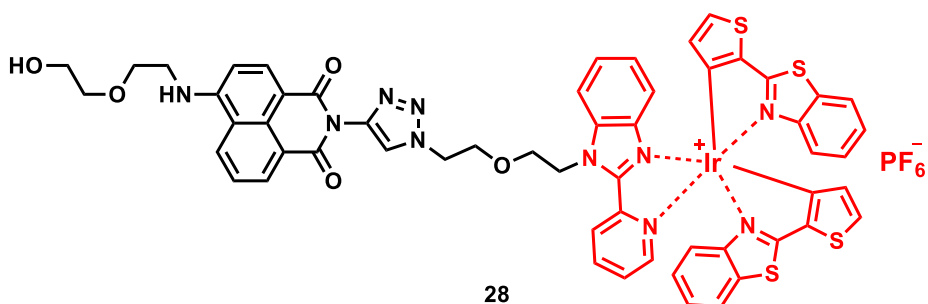


Рисунок 20 – Структурная формула флуорофора **28**

1.4. Флуорофоры, использующиеся для визуализации отложений гидроксиапатита и клеток костной ткани

Кальцификация – это строго регулируемый физиологический процесс, происходящий в костях и зубах, или патологический процесс, происходящий в мягких тканях [70]. Системные концентрации катиона кальция Ca^{2+} и фосфат-аниона PO_4^{3-} строго контролируются. Известно, что примерно 99% от общего количества Ca^{2+} в организме и 85% PO_4^{3-} содержится в костях, и этот большой минеральный пул находится в постоянном обмене (например, формирование и резорбция костей), который регулируется многочисленными факторами, включая паратиреоидный и тиреоидный гормоны, кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D_3), простагландины, катион алюминия Al^{3+} , фторид анион F^- и остеоиндуктивные факторы [71]. Клетки поддерживают низкую концентрацию Ca^{2+} в цитозоле в состоянии покоя (~70 – 100 нМ) благодаря действию кальциевых АТФаз и обменных механизмов, которые секвестрируют (связывают с белками или другими молекулами) ион во внутриклеточных хранилищах или вытесняют его через плазматическую мембрану [72].

Патологическая кальцификация может возникнуть в любой ткани [73]. Она встречается при старении организма и часто локализована в области кровеносных сосудов, суставов и опухолей. Кальцифицированные отложения (кристаллы фосфата кальция «зафиксированные» во внеклеточном матриксе) часто используются в качестве маркера заболеваний, хотя их наличие может быть опасно, поскольку они вызывают механическое напряжение и жёсткость в поражённых тканях, что приводит к повреждениям этих участков и воспалению [74].

Дифференциация опухолей мягких тканей как доброкачественных, так и злокачественных является сложной задачей, и различные методы визуализации играют в этом процессе решающую роль [75,76]. В последнее десятилетие все большее внимание ученых привлекают методы флуоресцентной визуализации для решения этой задачи [77,78]. Следует отметить, что текущими «золотыми» стандартами для обнаружения отложений кальцификации в сосудах или *in vitro* являются фотометрическое количественное определение содержания кальция при деминерализации ткани или клеток и гистологическое окрашивание с помощью ализаринового красного и метода фон Косса

[79]. Одним из главных недостатков этих методов является их неспецифичность в отношении гидроксиапатита [80].

На протяжении нескольких десятилетий бисфосфонаты являются эффективным классом препаратов, обладающим антирезорбтивным действием [81,82]. Так, например, азотсодержащие бисфосфонаты (памидронат, алендронат, ризедронат, ибандронат, минодронат и золедронат) ингибируют ключевые ферменты пути биосинтеза мевалоната/холестерина [83]. Основной мишенью для них является фарнезилдифосфатсинтаза, ингибирование которой происходит при связывании бисфосфонатов с активным центром этого фермента, что предотвращает биосинтез изопреноидных соединений (в частности, фарнезилдифосфата и геранилгеранилдифосфата), которые необходимы для посттрансляционного пренилирования малых ГТФ-связывающих белков, таких как Rab, Ras, Rho и Rac, которые играют ключевую роль во внутриклеточных сигнальных событиях в остеокластах [84,85]. Кроме того, введение бисфосфонатного фрагмента в структуру молекул придает им значительную специфичность по отношению к гидроксиапатиту, что открывает широкие перспективы для исследования процессов, происходящих в костной ткани [86].

Существует несколько подходов введения бисфосфонатного фрагмента в структуру органического красителя. В большинстве научных статей распространены два метода, подразумевающие ковалентную модификацию карбоксильной группы бисфосфонатом с первичной аминогруппой или использование линкера на основе 3-аминопропеноксида, который хемоселективно алкилирует атом азота в гетероциклическом фрагменте аминокислоты бисфосфоната.

В качестве исходных красителей, в структуру которых может быть введен бисфосфонатный фрагмент, могут выступать флуорофоры, давно использующиеся для флуоресцентной визуализации и нашедшие широкое применение во многих областях науки и технологии, например, производные дансилхлорида, бордипиррометена (BODIPY), флуоресцеина, изотиоционата флуоресцеина (FITC), родамина 6Ж, метиновых красителей, дикето-пирроло-пиррола (ДПП). Ниже будут рассмотрены примеры таких флуоресцентных зондов. На рисунке 21 представлены структурные формулы флуоресцентных бисфосфонатов, полученных по реакции ацилирования карбоксильной группы.

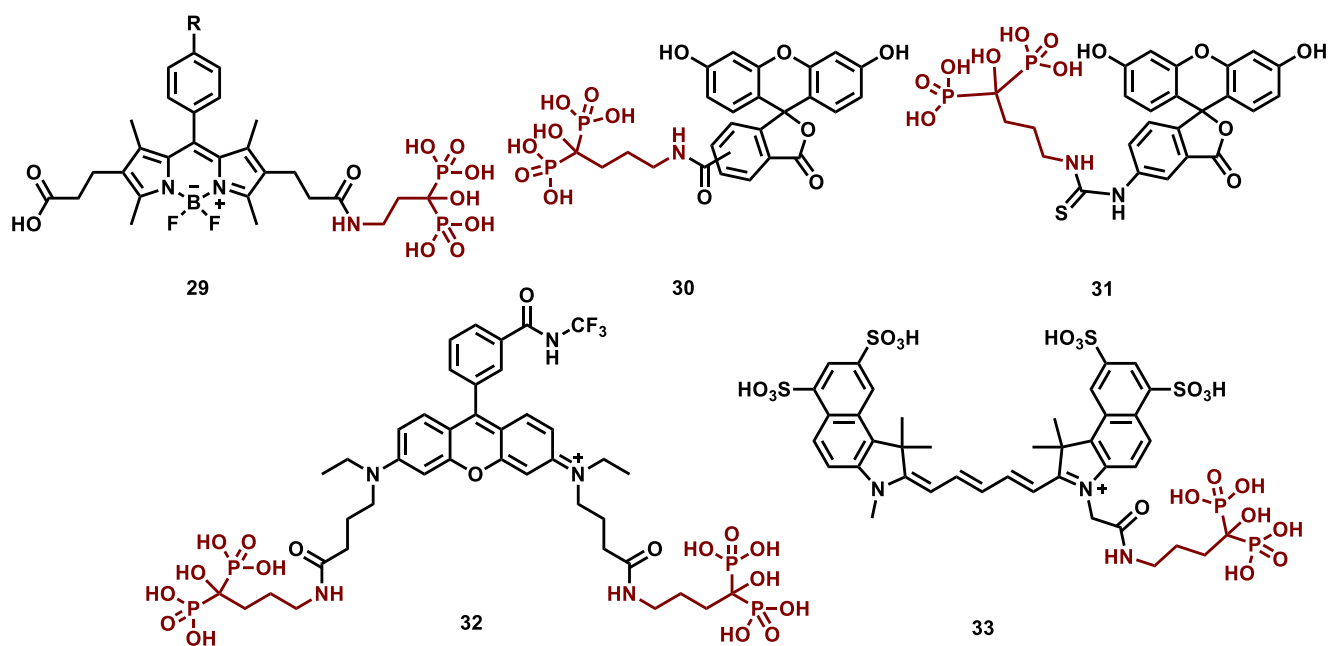


Рисунок 21 – Структурные формулы флуоресцентных бисфосфонатов, полученных по реакции ацилирования карбоксильной группы

Начиная с 2011 года группа исследователей из Университета Осаки проводит работы по созданию рН-чувствительных флуоресцентных бисфосфонатов на основе BODIPY. Синтез целевых соединений осуществляли путём активации карбоксильных групп красителя с последующей конъюгацией с алендроновой кислотой (**29**, рисунок 21) [87]. При визуализации остеокластов *in vivo* методом двухфотонной микроскопии на трансгенных мышях TRAP-tdTomato было показано, что флуоресцентный сигнал регистрируется локально, исключительно в зоне контакта между остеокластами и костной тканью. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования рН-чувствительных зондов для детекции резорбирующей костную ткань остеокластов в экспериментах *in vivo*.

В исследовании [88] получен обладающий высокой яркостью рН-активируемый зонд на основе BODIPY для визуализации в ближней ИК-области, предназначенный неинвазивного обнаружения ранних костных метастазов рака молочной железы. Структура зонда включала замещенный анилиновый фрагмент, ядро BODIPY и два функционализированных полиэтиленгликолем спейсера. Благодаря избирательному нацеливанию бисфосфонат накапливался в костной ткани бедра мыши, что позволило рассматривать его в качестве эффективной платформы для флуоресцентной навигации при хирургических вмешательствах.

В исследовании [89] был синтезирован флуоресцентный бисфосфонат на основе флуоресцеина для визуализации гидроксиапатита и изучения кальцификации на клеточных моделях, а также в сосудистых тканях мыши и человека. Полученный бисфосфонат **30** (рисунок 21) продемонстрировал на порядок более высокую селективность к гидроксиапатиту по сравнению с широко применяемым гистологическим красителем ализарином S. С помощью этого зонда была обнаружена кальцификация в медиальном слое срезов аорты крысы.

В исследовании [90] получен рН-чувствительный флуоресцентный зонд на основе алендроната, модифицированного изотиоцианатом флуоресцеина **31** (рисунок 21) для неинвазивного определения рН в костной ткани в реальном времени в экспериментах *in vivo* на модели метаболического ацидоза.

Одним из первых сообщений о создании флуоресцентного бисфосфоната на основе сульфонилхлорида родамина Б была работа [91], в которой был получен конъюгат для спектрофлуориметрического определения алендроната в кровяном русле и изучения его фармакокинетики в организме человека.

В работе [92] разработан новый флуоресцентный зонд на основе спиролактамов родамина. Прижизненная визуализация костной ткани свода черепа у мышей показала, что зонд **32** (рисунок 21) избирательно связывается с участками локального закисления, обусловленного активацией остеокластов. Впервые с помощью флуоресцентной визуализации *in vivo* продемонстрировано прямое участие протонных насосов в закислении костной ткани: протонные помпы динамически мигрируют в остеокластах и накапливаются вдоль базальных мембран в зонах резорбции кости.

В работе [93] осуществлена конъюгация маркера Cy5.5, флуоресцирующего в ближней ИК-области, с алендроновой кислотой. В экспериментах *in vitro* бисфосфонат **33** (рисунок 21) избирательно связывался с минерализованным костным матриксом дифференцированных клеток MC3T3-E1 и эндотелиальных клеток 2H11. Флуоресцентная микроскопия показала, что флуорофор **33** колокализуется с костным матриксом, окружающим опухоль. Максимальное связывание **33** с гидроксиапатитом составляло 85%, тогда как для свободного Cy5.5 этот показатель не превышал 6%.

Вторым распространённым подходом к синтезу флуоресцентных бисфосфонатов является использование специального линкера на основе 3-аминопропеноксида, который обладает высокой хемоселективностью при алкилировании пиридинного азота в

молекуле ризедроната по отношению к двум фосфонатным группам, что позволяет проводить реакцию в мягких условиях (метанол–вода) без катализатора. Альтернативный метод заключается в использовании эпихлоргидрина. Оба синтетических пути могут быть использованы для получения флуоресцентных бисфосфонатов. На рисунке 22 представлены структурные формулы флуоресцентных бисфосфонатов, полученных с применением 3-аминопропеноксида.

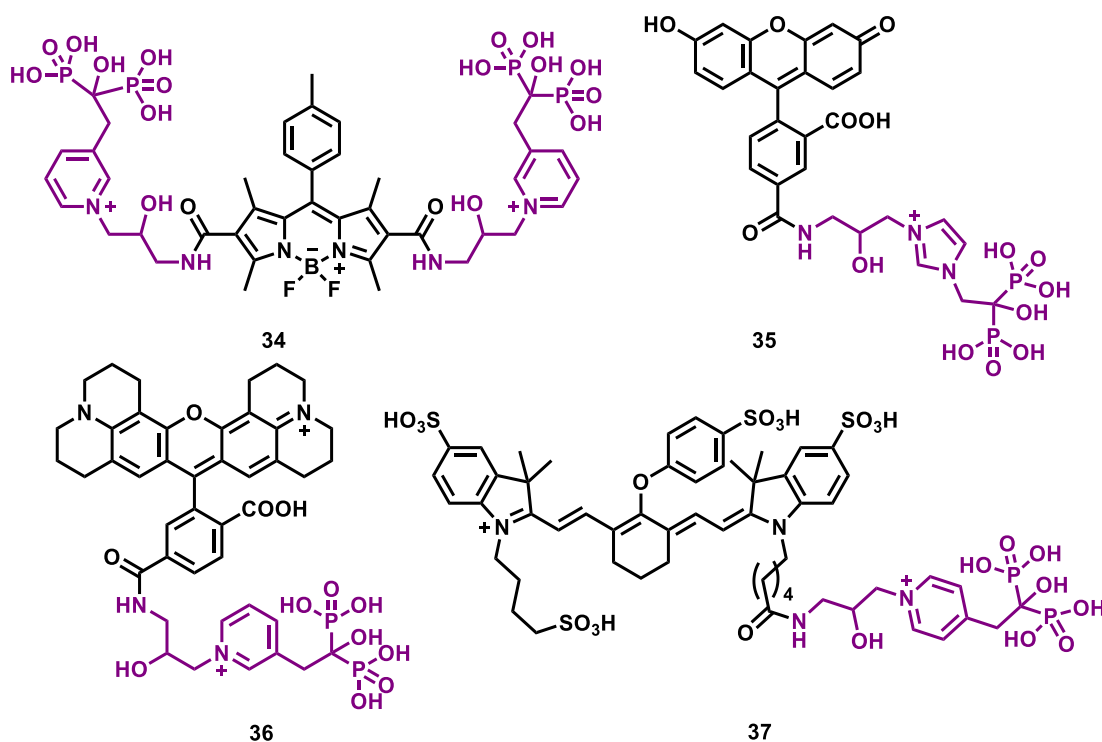


Рисунок 22 – Структурные формулы флуоресцентных бисфосфонатов, полученных по реакции с применением 3-аминопропеноксида

В исследовании [94] были получены рН-чувствительные зонды, содержащие фрагменты ризедроновой кислоты и обладающие высоким сродством к кости, а также эффективно проникающие в костный матрикс. Интенсивность флуоресценции зонда **34** (рисунок 22) увеличивалась примерно в 15 раз при снижении рН от 8,0 до 4,0.

Статья Sun S. [95] обобщает работы по синтезу флуоресцентных бисфосфонатов с помощью 3-аминопропенксидного линкера. В ней были использованы следующие флуоресцентные маркеры: карбоксифлуоресцеин, карбокси-X-родамин, родамин Red™-X, IRDye 800CW, сульфо-Cy5, Alexa Fluor 647. Все флуоресцентные зонды получены с выходами 50–77%. Таким образом, новый синтетический подход с использованием 3-аминопропеноксида и эпихлоргидрина в качестве линкера позволил расширить набор флуоресцентных бисфосфонатов на основе клинически значимых золендроновой,

ризедроновой и миондроновой кислот и их аналогов. Конъюгаты с карбоксифлуоресцеином в концентрациях 10–100 мкМ проявляли антипренилирующую активность в экспериментах *in vitro*.

В исследовании [96] изучалось влияние разовой дозы производных золендроновой и ризедроновой кислоты с карбоксифлуоресцеином (**35**) и карбокси-Х-родамином (**36**) в условиях сниженной функции почек (рисунок 22). Интенсивность эмиссии зонда **35** в проксимальном отделе трабекулярной большеберцовой кости была значительно выше у животных с хронической болезнью почек по сравнению с контрольной группой. Было показано, что связывание зонда через 24 часа отличается в зависимости от функции почек, что свидетельствует о нежелательном применении бисфосфонатов на поздних стадиях заболевания.

Связанный с бисфосфонатами остеонекроз челюсти является редким, но серьезным побочным эффектом применения азотсодержащих бисфосфонатов, назначаемых при злокачественных новообразованиях костей и остеопорозе. В статье [97] разработан изомер ризедроната **37**, замещенный по 4-положению, на основе красителя IRDye 800CW для визуализации в ближней ИК-области спектра (рисунок 22). Для флуорофора характерны $\lambda_{max}^{погл} = 778$ нм и $\lambda_{max}^{фл} = 794$ нм. Исследование показало, что локальное интраоральное применение бисфосфоната **37** вокруг удаляемого зуба является простым и удобным средством уменьшения побочных эффектов N-бисфосфонатов при заживлении ран после удаления.

На рисунке 23 представлены флуорофоры, содержащие бисфосфонатную группу, полученные методами, отличными от описанных ранее.

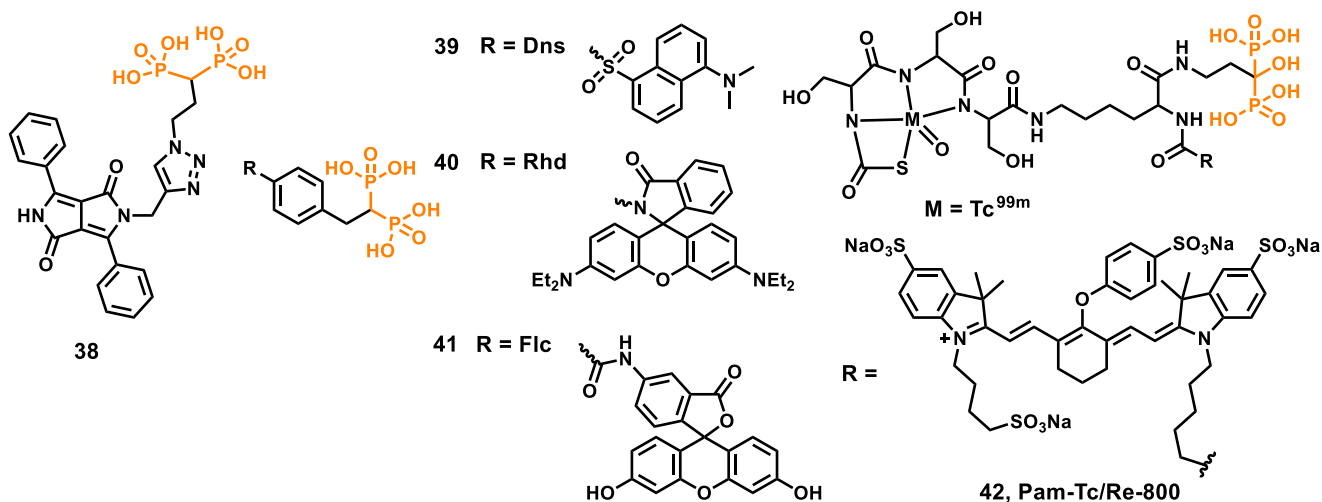


Рисунок 23 – Структурные формулы флуоресцентных бисфосфонатов **38-42**

Одним из подходов является реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая медью. В работе [98] сообщается о синтезе конъюгата бисфосфоновой кислоты с дикето-пирроло-пирролом (ДПП) (**38**) (рисунок 23) с помощью клик-реакции между азидо-БФ и алкин-модифицированным ДПП. Конъюгация триазольным мостиком позволила получить новый флуоресцентный зонд, в котором сохраняется антирезорбтивная активность, что дает возможность использовать **38** в качестве флуоресцентного зонда в *in vitro* исследованиях активности остеокластов.

В работе [99] синтез флуоресцентных бисфосфонатов был основан на блочном подходе, включающем получение фосфонатной компоненты с последующим ее введением в реакцию с люминофором. В качестве флуорофорного остова были выбраны дансилхлорид **Dns**, **39**, флуоресцеин **Fic**, **40** и родамин Б **Rhd**, **41**, рисунок 23. Целевые бисфосфонаты флуоресцеина и родамина Б были получены путём конъюгации аминогруппы, содержащейся в фосфонатном блоке, с флуоресцентным красителем с использованием активирующего агента и последующей переэтерификацией продукта. Все изученные соединения продемонстрировали значительную сорбцию на гидроксиапатите; их сродство к нему было выше, чем у паминдроната. Результаты показали, что представленные бисфосфонатные производные могут рассматриваться как перспективные строительные блоки для модификации различных субстратов с высоким выходом.

В работе [100] описан синтез трифункционального агента **Pam-Tc/Re-800** (**42**) (рисунок 23) для визуализации микрокальцинатов рака молочной железы с помощью гибридного метода однофотонной эмиссионной компьютерной томографии и компьютерной томографии (ОФЭКТ/КТ), объединенной со специальной интраоперационной системой флуоресцентной визуализации в ближнем ИК-диапазоне. Максимумы длин волн поглощения и флуоресценции зонда составляли 781 нм и 800 нм соответственно. Молярный коэффициент экстинкции **Pam-Tc/Re-800** (**42**) при 781 нм составил $197\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Квантовый выход в фосфатном буфере достигал 8,9%, в эмбриональной телячьей сыворотке – 8,7%. Радиофармацевтический агент накапливался в костях, быстро выводился из мягких тканей и обеспечивал высокую чувствительность обнаружения микрокальцинированных опухолей по сравнению с известным клиническим препаратом $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -метилендифосфоновой кислотой.

Несмотря на значительные достижения в разработке остеотропных зондов, существующие флуоресцентные бисфосфонаты обладают рядом недостатков: ограниченная возможность настройки спектральных свойств, необходимость использования дополнительных линкеров для конъюгации, и недостаточное понимание структурно-функциональных зависимостей, влияющих на клеточную интернализацию. Таким образом, разработка новых флуоресцентных маркеров, содержащих векторную бисфосфонатную группу, является актуальной задачей современной органической химии для решения указанных проблем.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ¹

Как показано в литературном обзоре, производные 1,8-нафталимида являются объектом активного изучения благодаря сочетанию высоких люминесцентных характеристик, значительной фотостабильности и возможности тонкой настройки спектральных свойств в диапазоне от синей до красной области путём варьирования заместителей в ароматическом ядре. Особую значимость для современных медико-биологических исследований, использующих методы флуоресцентной микроскопии, приобретает создание флуорофоров, которые содержат векторную группу, обеспечивающую селективное связывание с биомолекулами, и функциональную группу, пригодную для конъюгации с биологически активными веществами или высокомолекулярными соединениями.

В настоящей работе был получен ряд функциональных производных 1,8-нафталимида, предназначенных для создания флуоресцентных систем адресной доставки. В зависимости от структурных особенностей полученные соединения можно разделить на 5 групп:

1. Производные 1,8-нафталимида, содержащие малеимидную группу (а) при имидном атоме азота или (б) в положении 4 ароматического ядра, предназначенные для ковалентной модификации человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

2. *O*-, *N*-замещенные производные 1,8-нафталимида со свободной аминогруппой при имидном атоме азота для ковалентной модификации сополимера молочной и гликолевой кислот *PLGA*.

3. *O*-, *N*-замещенные производные 1,8-нафталимида, содержащие карбоксильную группу при имидном атоме азота, для ковалентной модификации сополимера молочной и гликолевой кислот *PLGA*.

4. *S*-замещенные производные 1,8-нафталимида с гидроксильной группой для ковалентной модификации *PLGA*.

5. *O*-, *S*-, и *N*-замещенные производные 1,8-нафталимида, содержащие α -гидроксисфосфонатный фрагмент, для визуализации гидроксиапатита и создания остеотропных систем адресной доставки на основе *PLGA*.

¹ Нумерация соединений отличается от нумерации в Литературном обзоре

2.1. Производные 1,8-нафталимида для ковалентной модификации альбумина

2.1.1. Синтез производных 1,8-нафталимида, содержащих малеимидную группу

Системы адресной доставки на основе альбумина представляют значительный интерес благодаря возможности инкапсуляции гидрофобных фармацевтических субстанций, таких как доксорубин или паклитаксел, с использованием *nanobio*™-технологии. Для изучения распределения таких нанообъектов *in vitro* и *in vivo* актуальным направлением является создание флуоресцентных систем доставки на основе альбуминовых наночастиц.

Реакция тиол–малеимидного присоединения (реакция Михаэля) широко применяется в биологических системах благодаря высокой селективности в водной среде, стабильности образующегося продукта и достаточно высокой скорости [101]. Она используется для сшивания гидрогелей, флуоресцентного мечения молекул, а также создания люминесцентных сенсоров на их основе. В ходе данной реакции тиольная группа (как правило, из цистеина) атакует электронодефицитную двойную связь малеимида, образуя стабильную сукцинимидилтиоэфирную связь; реакция протекает предпочтительно при значениях pH близких к нейтральному (рисунок 24) [102].

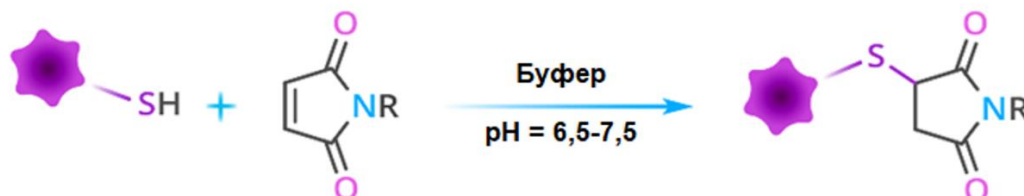


Рисунок 24 – Схема реакции тиол-малеимидного присоединения (реакция Михаэля) между сульфгидрильной группой остатка цистеина в белке и малеимидной группой флуорофора с образованием сукцинимидилтиоэфирной связи

При наличии в субстрате N-концевых аминогрупп их протонирование в интервале pH = 6,5 – 7,5 предотвращает нуклеофильную атаку по двойной связи, что исключает образование побочных продуктов присоединения по типу аза-Михаэля [103,104]. Высокая реакционная способность C=C связи в малеимидной группе обусловлена двумя основными факторами: 1) искажением валентных углов, создающим напряжение в цикле, и 2) наличием карбонильных групп в *цис*-конформации [105].

Поскольку одним из главных достоинств нафталимидного ядра является возможность его относительно легкой модификации, в настоящей работе предложен синтез двух типов флуорофоров: содержащих малеимидную группу в положении 4

ароматического бицикла, а также при имидном атоме азота. Получение таких соединений, отличающихся расположением функциональной группы, осуществлено с целью изучения ее влияния на оптические свойства маркеров.

Исходным соединением для синтеза служил 1,8-нафталевый ангидрид, получаемый окислением аценафтена дихроматом натрия в кислой среде. На первом этапе был получен 4-галоген-1,8-нафталевый ангидрид, необходимый для последующих реакций нуклеофильного ароматического замещения и введения различных функциональных групп в ароматическое ядро. В качестве галогена использовали хлор или бром. Общая схема получения этих ангидридов представлена на рисунке 25.

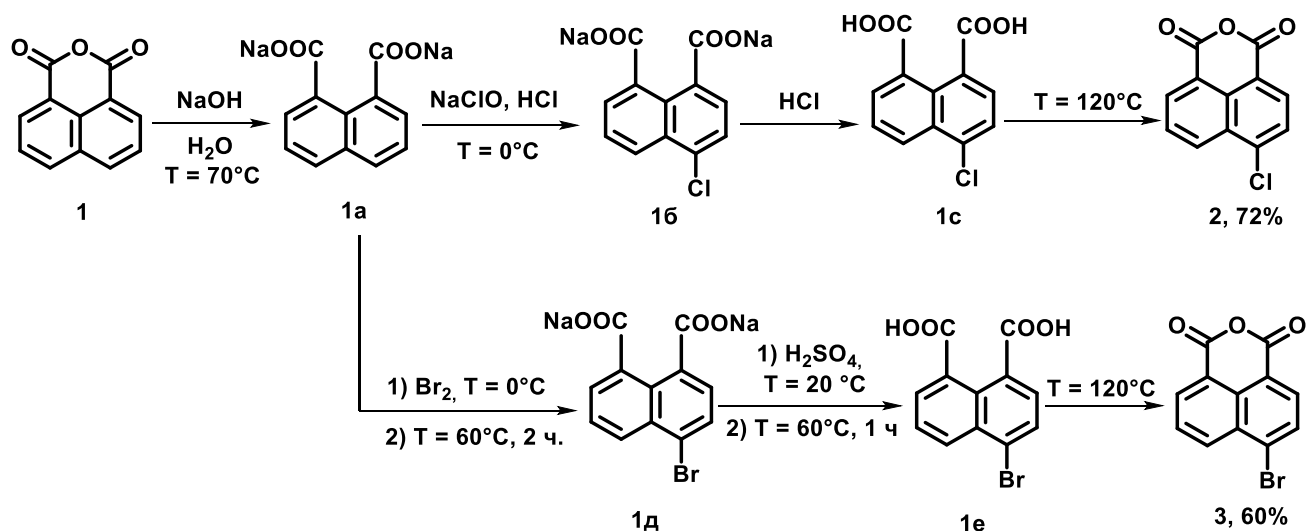


Рисунок 25 – Схема получения 4-галоген-1,8-нафталимидов **2** и **3**

Сначала 1,8-нафталевый ангидрид **1** переводили в динатриевую соль нафталин-1,8-дикарбоновой кислоты **1a** нагреванием с концентрированным водным раствором щелочи. Для получения 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида **2** реакцию проводили с использованием гипохлорита натрия в кислой среде при охлаждении. Последующее добавление концентрированного раствора соляной кислоты приводило к выпадению осадка, который отфильтровывали и сушили при температуре $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ для перевода 4-хлор-1,8-нафталиндикарбоновой кислоты **1c** в 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид **2**. Выход составил 72%.

При получении 4-бром-1,8-нафталевого ангидрида **3** в качестве галогенирующего агента использовали молекулярный бром, который добавляли к раствору динатриевой соли **1a** с последующим нагреванием реакционной массы до температуры $T = 85 - 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2,5 ч. Подкисление раствора серной кислотой приводило к образованию бледно-коричневого осадка, который отфильтровывали, сушили при $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и получали

4-бром-1,8-нафталевый ангидрид **3** с выходом 60%. Очистку соединений можно проводить перекристаллизацией из ледяной уксусной кислоты.

Хотя атом брома является лучшей уходящей группой по сравнению с атомом хлора, в последующих реакциях нуклеофильного ароматического замещения выходы продуктов для обоих галогенпроизводных были сопоставимы. Поэтому в связи с высокой токсичностью чистого брома для дальнейшей работы было принято решение о наработке 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида в граммовых количествах.

Первый тип малеимидных производных представляет собой 4-(N-алкилмалеимид)амино-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимида (**8-10**), полученные по трёхстадийной схеме, рисунок 26. На первой стадии получали N-тозилэтилендиамин **6** взаимодействием этилендиамина **4** с тозилхлоридом **5** в хлористом метиле. Избыток амина, охлаждение реакционной массы до $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ и интенсивное перемешивание способствовали образованию преимущественно продукта монозамещения **6** с выходом 89%. Следует отметить, что метилсульфонамидный фрагмент может выступать в качестве векторной группы для селективного нацеливания на эндоплазматический ретикулум (ЭПР). В литературе [106] указано, что существует ограниченное число маркеров, пригодных одновременно для модификации SH-групп в тиолах (в цистеине, гомоцистеине, глутатионе, белках) и для селективного связывания с ЭПР. В связи с этим производные первого типа представляют значительный интерес как потенциальные кандидаты для решения данной задачи.

На второй стадии 4-хлор-1,8-нафталевым ангидридом **2** был ацилирован N-тозилэтилендиамин **6**, в результате чего был получен 4-хлор-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталиимид **7**. Полученное соединение использовали на третьей стадии в реакции нуклеофильного ароматического замещения атома хлора на этилендиамин, 1,4-тетраметилендиамин и 1,6-гексаметилендиамин. Реакцию проводили в диметилформамиде (ДМФА) при температуре $T = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$; нагревание реакционной массы до температуры $T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ приводило к осмолению и затрудняло очистку продуктов. Использование двукратного избытка указанных диаминов приводило к образованию смеси, состоящей из моно- и бис-замещенных производных, что потребовало оптимизации условий синтеза.

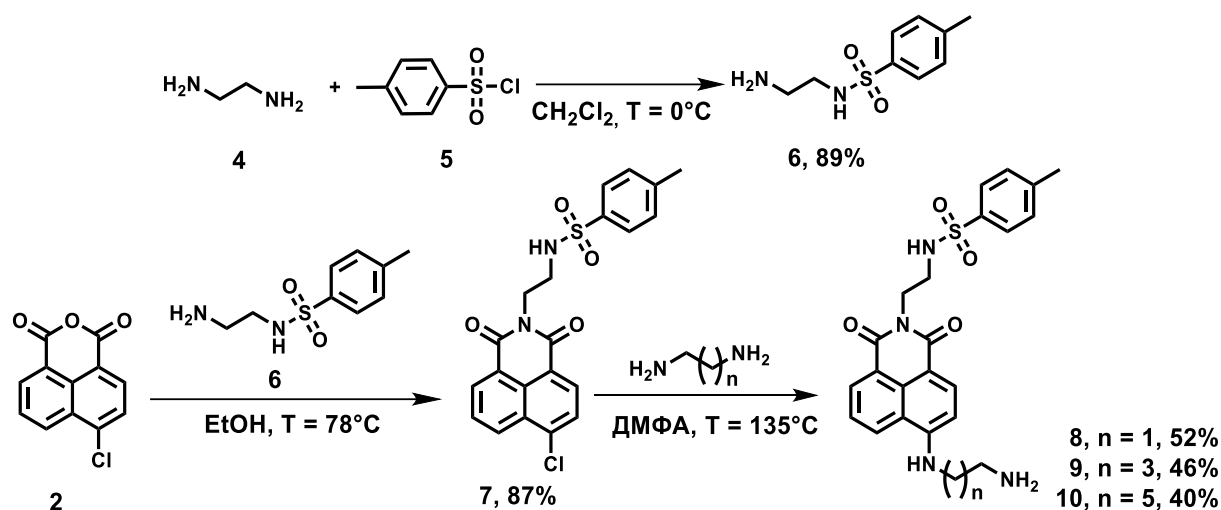


Рисунок 26 – Схема получения флуорофоров **8-10**

Согласно литературным данным [107,108], для получения 1,8-нафталимидов, содержащих первичную аминогруппу, может быть использован десятикратный избыток реагента (метод А, таблица 1). Для синтеза соединения **8** предпочтительным оказалось проведение реакции непосредственно в среде этилендиамина без использования ДМФА (метод Б, таблица 1). Добавление в реакционную массу воды приводило к выпадению осадка, не требующего дополнительной очистки. Выход продукта **8** по методу Б достигал 95%, тогда как при использовании ДМФА он составлял 78%. В случае получения продуктов **9** и **10** ДМФА отгоняли при пониженном давлении, а остатки очищали колоночной хроматографией с градиентным элюированием смесью хлористого метилена и этилового спирта (содержание спирта варьировали от 0 до 10 %). Выходы промежуточных флуорофоров **8-10** представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия синтеза соединений **8-10** по методам А и Б

Продукт	n	Метод	Соотношение 7 : диамин	Растворитель	Температура, °С	Время, ч	Выход продукта, %
8	1	А	1 : 10	ДМФА	135	8	78
		Б		Этилендиамин	116	12	95
9	3	А	1 : 10	ДМФА	135	8	77
10	5	А	1 : 10	ДМФА	135	8	75

Для введения малеимидного фрагмента в структуру флуорофоров **8-10** использовали два метода (А и Б), схема которых представлена на рисунке 27. Метод А включал две стадии: на первой проводили ацилирование аминогруппы 1,8-нафталимидов малеиновым ангидридом в хлористом метилена; на второй – циклизацию полученного амида под действием уксусного ангидрида в присутствии ацетата никеля (II) и триэтиламина.

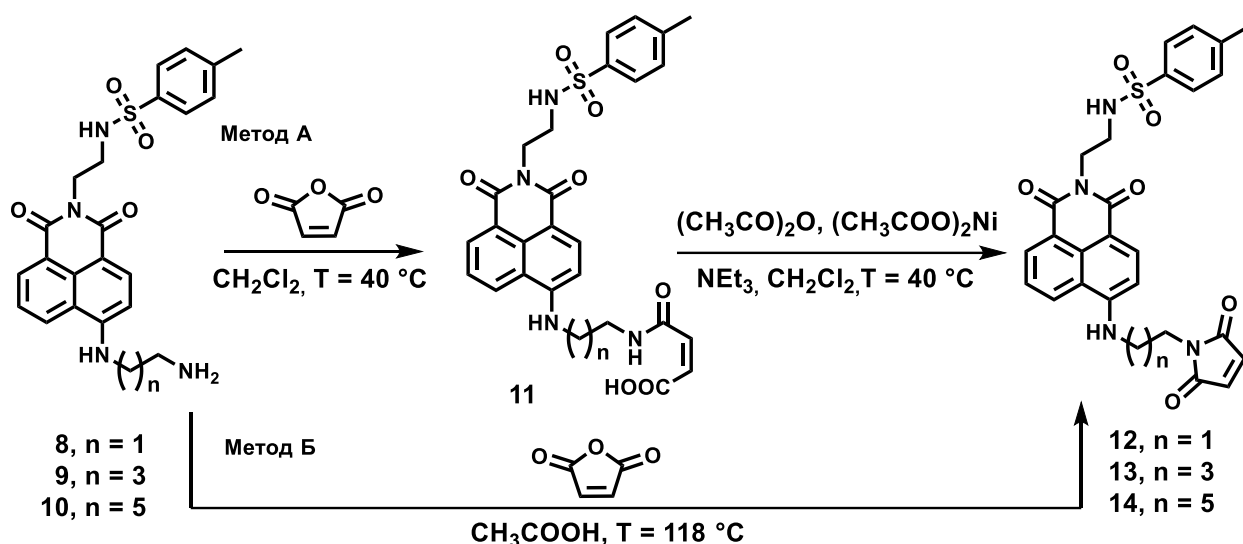


Рисунок 27 – Схема ацилирования аминогруппы флуорофоров **8-10** малеиновым ангидридом с последующей циклизацией при синтезе малеимидных производных **12-14**

Ввиду ограниченной растворимости соединений **8-10** в хлористом метиле выходы целевых продуктов **12-14** по методу А не превышали 30% (таблица 2). Замена хлористого метилена на уксусную кислоту, которая одновременно выступала в роли водоотнимающего агента (метод Б), позволила повысить выходы **12-14** до 87-95%. Таким образом, метод Б является предпочтительным для введения малеимидной группы и был использован для получения всех малеимидных производных 1,8-нафталимида в настоящей работе.

Таблица 2 – Выходы малеимидных производных **12-14**, полученных по двухстадийному методу А (в хлористом метиле) и одностадийному методу Б (в уксусной кислоте)

Исходное соединение	Продукт	n	Выход, %	
			Метод А	Метод Б
8	12	1	30	95
9	13	3	30	87
10	14	5	24	90

Второй тип производных, содержащих малеимидную группу при имидном атоме азота, позволяет получать флуорофоры с эмиссией в двух различных областях спектра в зависимости от заместителя в 4-ом положении (рисунок 28). Для синтеза соединений с максимумом флуоресценции при 550 нм исходный ангидрид **2** вводили в реакцию с морфолином при нагревании в среде ДМФА. Полученный продукт **15** обрабатывали 80% раствором гидразин-гидрата в этиловом спирте. Использование четырехкратного избытка амина и нагревание до $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 8 часов приводило к получению монозамещенного 1,8-нафталимида **16** с выходом 81%. На заключительной стадии в

уксусной кислоте вводили малеимидную группу, получая целевое соединение **17**. Общий выход по трем стадиям составил 53%.

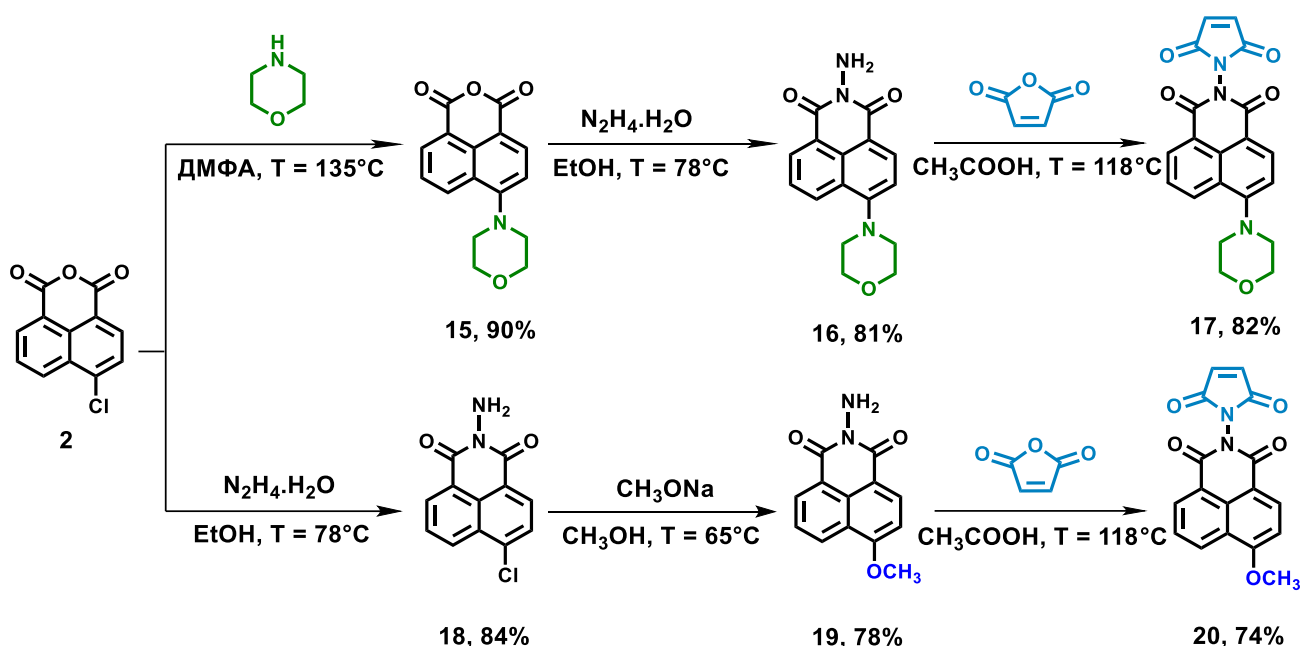


Рисунок 28 – Схема получения флуорофоров **17** и **20**

Для получения производных с флуоресценцией в области 460 нм сначала синтезировали 4-хлор-N-амино-1,8-нафталиимид **18**, который затем выдерживали при нагревании с метилатом натрия в метаноле, что привело к получению 4-метокси-N-амино-1,8-нафталиимида **19** с выходом 78%. Последующее введение малеимидной группы в среде уксусной кислоты привело к получению целевого флуорофора **20** с общим выходом 48% по трем стадиям.

2.1.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств малеимидных производных 1,8-нафталиимида

Спектрально-люминесцентные свойства соединений **8-10**, **16**, **19**, содержащих первичную аминогруппу, и их малеимидных аналогов **12-14**, **17**, **20**, были исследованы в хлористом метиле, диметилсульфоксиде (ДМСО) и воде. Полученные данные – максимумы длин волн поглощения ($\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}}$) и флуоресценции ($\lambda_{\text{max}}^{\text{фл}}$), молярные коэффициенты экстинкции (ϵ) и квантовые выходы флуоресценции ($\Phi_{\text{фл}}$) – представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров **8-10, 16, 19** и их малеимидных аналогов **12-14, 17, 20** в различных средах, 25 °С

	№ соединения									
	8	9	10	12	13	14	16	17	19	20
Хлористый метилен										
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	434	434	434	429	432	434	403	403	368	367
$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	515	520	520	511	518	519	518	515	428	431
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	15,70	17,60	16,90	11,65	12,20	12,40	14,60	12,85	11,75	15,10
$\Phi_{\text{фл}}$, %	73,70	66,40	65,00	9,00	19,00	22,10	1,70	10,70	16,00	14,90
ДМСО										
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	440	444	444	441	443	444	407	415	369	371
$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	534	534	534	525	534	535	547	544	441	443
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	17,15	17,65	17,10	13,90	13,55	13,50	13,80	10,95	12,10	15,30
$\Phi_{\text{фл}}$, %	65,50	55,00	50,00	11,40	19,60	19,30	0,14	0,34	10,10	17,3
Вода										
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	450	458	455	450	455	456	405	415	368	367
$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	550	554	551	538	554	552	552	545	456	460
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	15,85	15,75	15,70	12,25	8,80	9,00	13,60	11,20	12,00	13,45
$\Phi_{\text{фл}}$, %	27,60	24,60	23,50	5,00	6,90	7,30	0,20	0,10	13,80	40,20

Как следует из таблицы 3 для аминосодержащих производных **8-10, 16, 19** характерны более высокие значения квантовых выходов по сравнению с соответствующими малеимидными флуорофорами (**12-14, 17, 20**). Наблюдаемое различие обусловлено сильными электроноакцепторными свойствами малеимидной группы. Для соединений данного типа, согласно литературным данным [109,110], типичен фотоиндуцированный перенос электрона (*PET*-процесс), который увеличивает вклад безызлучательной дезактивации возбужденного состояния и, как следствие, снижает квантовый выход флуоресценции [111].

Взаимодействие малеимидного заместителя с сульфгидрильной группой цистеина (например, в составе человеческого сывороточного альбумина) по реакции Михаэля блокирует *PET*-процесс, что приводит к разгоранию флуоресценции. Таким образом, соединения **12-14, 17, 20** могут рассматриваться как *PET*-сенсоры, пригодные для детекции тиолсодержащих биомолекул [112–114]. Схема взаимодействия малеимидного производного 1,8-нафталимида **12** с остатком цистеина в ЧСА в соответствии с реакцией Михаэля представлена на рисунке 29.

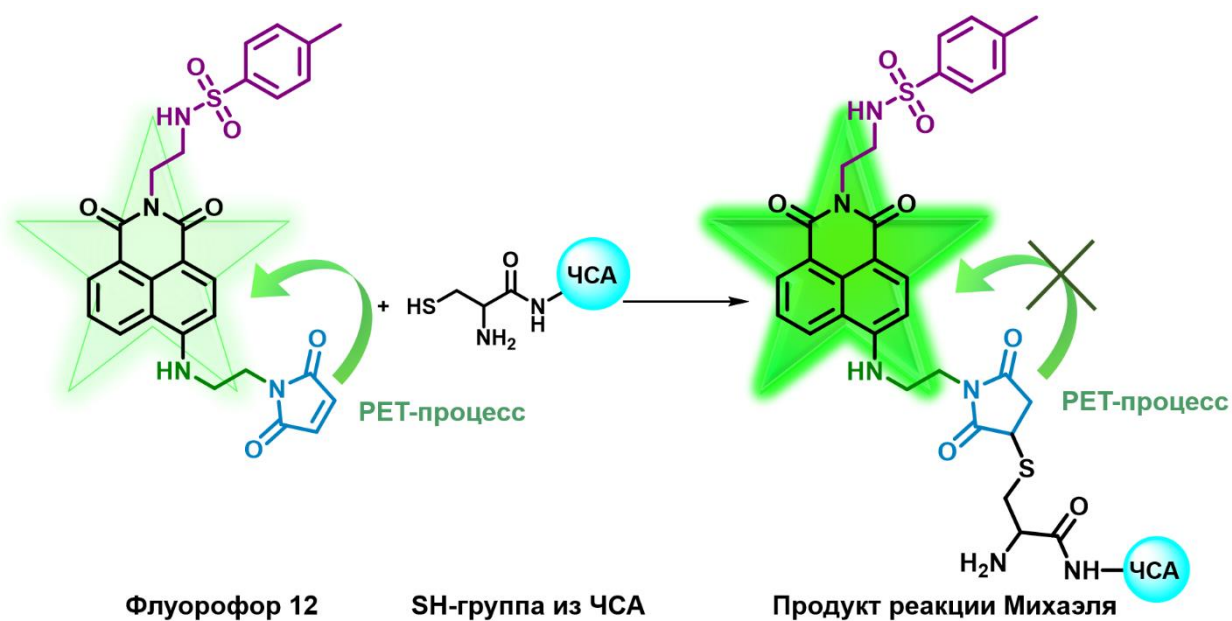


Рисунок 29 – Схема реакции тиол-малеимидного присоединения (реакция Михаэля) между производным 1,8-нафталимида **12** и остатком цистеина-34 человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с образованием сукцинимидилтиоэфирной связи

2.1.3. Получение флуоресцентных систем адресной доставки на основе альбумина

Введение флуорофоров в полимерные наночастицы может осуществляться двумя основными способами: нековалентной инкапсуляцией гидрофобных красителей и ковалентной модификацией полимерной цепи. Нековалентный подход обладает рядом недостатков, главные из которых – недостаточное удержание красителя в частицах и его диффузия в окружающую среду. Это снижает стабильность флуоресцентного сигнала и делает количественное отслеживание флуоресцентных наноносителей в сложных биологических средах ненадежным [115]. Ковалентное связывание флуорофора с полимерной цепью, напротив, обеспечивает химическую стабильность конъюгата и воспроизводимость сигнала при визуализации [115].

В структуре человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) присутствует только одна свободная SH-группа (остаток цистеина-34). Для увеличения числа реакционноспособных тиольных групп используют реактив Траута (2-иминотиолан). В качестве модельного соединения для ковалентной модификации ЧСА выбрано соединение **12**, обладающее высокой растворимостью в водно-органических средах (рисунок 30).

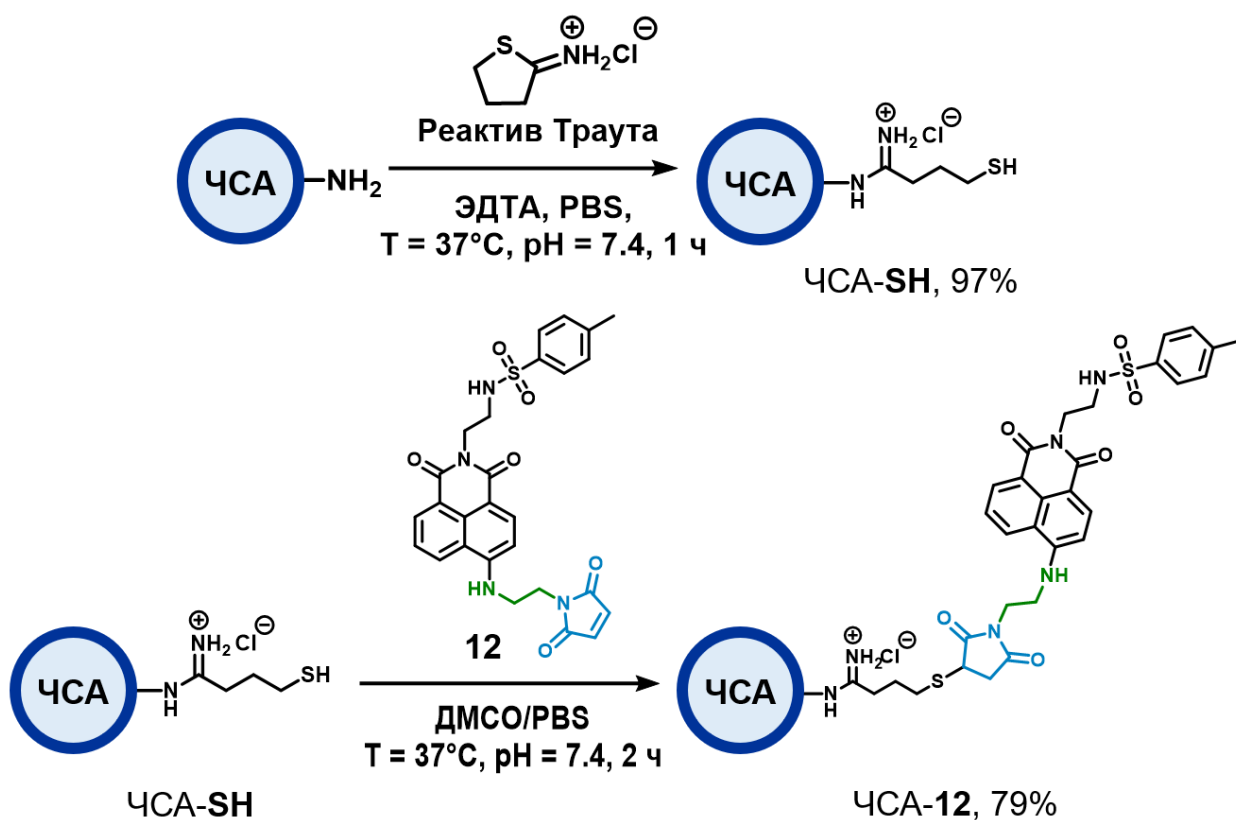


Рисунок 30 – Ковалентная модификация ЧСА малеимидным производным **12**

Реакцию альбумина с реактивом Траута проводили в фосфатном буферном растворе (0,02 М, $\text{pH} = 7,4$) в присутствии ЭДТА для хелатирования катионов двухвалентных металлов и предотвращения окисления ими SH-групп. Затем осуществляли реакцию тиол-малеимидного присоединения (реакция Михаэля) с соединением **12** при его инкубации с ЧСА при 37°C в течение 2 часов. Конъюгат выделяли методом диализа против воды и лиофилизировали.

На основе полученного конъюгата ЧСА-**12** ультразвуковым методом были получены флуоресцентные наночастицы (НЧ) со средним размером $d_{\text{ср}} = 278 \pm 3$ нм и индексом полидисперсности $\text{PDI} = 0,19 \pm 0,02$. Спектральные характеристики флуорофора в составе наночастиц сохранились: максимум длины волны поглощения $\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}} = 450$ нм, максимум длины волны флуоресценции $\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}} = 552$ нм (для свободного соединения **12**: $\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}} = 550$ нм). Таким образом, продемонстрирована возможность создания флуоресцентных систем доставки на основе альбумина, модифицированного производным 1,8-нафталимида.

2.2. Производные 1,8-нафталимида для ковалентной модификации *PLGA*

2.2.1. Синтез производных 1,8-нафталимида для ковалентной модификации *PLGA*

Материал опубликован в работе [116]. Второй раздел экспериментальной работы посвящен получению производных 1,8-нафталимида, предназначенных для ковалентной модификации сополимера молочной и гликолевой кислот (*PLGA*). Наличие в структуре флуорофоров амино-, карбокси- или гидроксигрупп позволяет осуществлять связывание с карбоксильной группой *PLGA* тремя способами: 1) карбодиимидным методом; 2) в условиях реакции Штеглица; 3) с использованием линкерной группы (рисунок 31). Все три подхода были реализованы в настоящей работе.

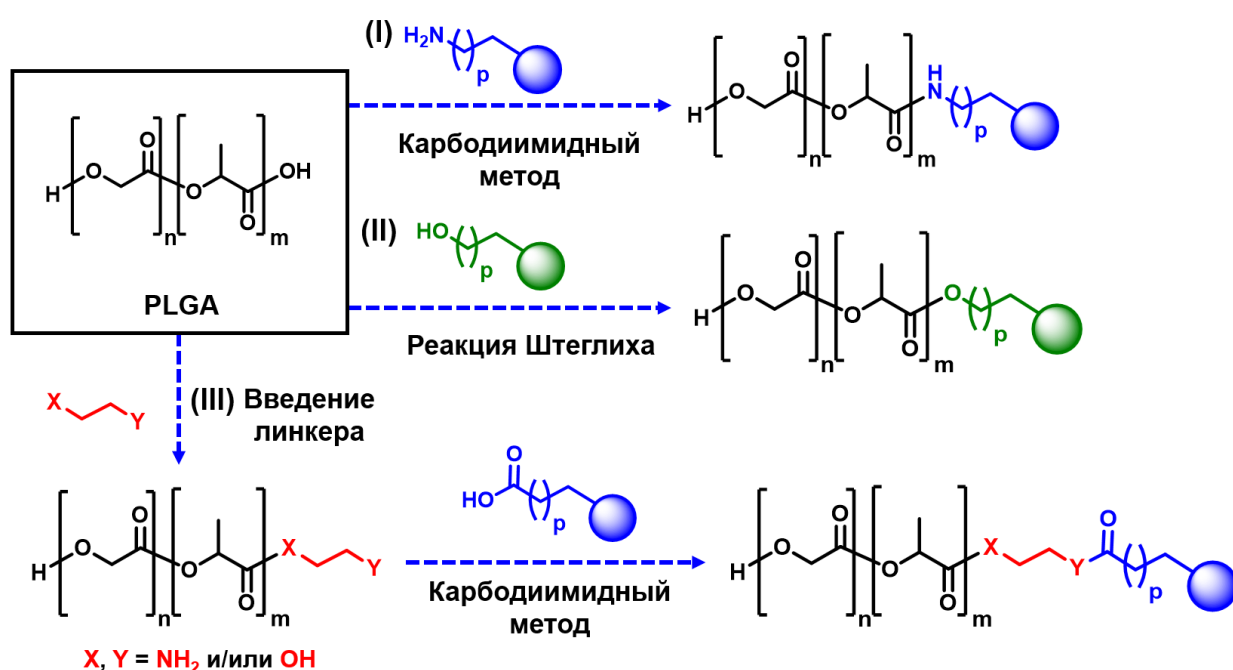


Рисунок 31 – Три подхода к ковалентной модификации *PLGA* производными 1,8-нафталимида, реализованные в работе: карбодиимидный метод (I), реакция Штеглица (II) и линкерная стратегия (III)

Для получения флуорофоров, пригодных для ковалентной модификации *PLGA* были синтезированы 4-морфолинил- и 4-этоксиптил-замещенные 1,8-нафталимиды, содержащие первичную аминогруппу при имидном атоме азота. В каждой из этих групп варьировалась длина углеродного спейсера, соединяющего нафталимидный фрагмент с аминогруппой, которая образует стабильную амидную связь с карбоксильной группой полимера. Целью такого варьирования было выявление влияния длины спейсера на оптические свойства флуорофоров и их конъюгатов, а также поиска наиболее перспективных соединений для проведения медико-биологических исследований и биовизуализации.

Для получения производных с максимумом флуоресценции в области 460 нм (этоксиэтил-замещенные) на первой стадии проводили реакцию ацилирования симметричных аминов (этилендиамина, 1,3-триметилендиамина, 1,4-тетраметилендиамина (путресцина) и 1,6-гексаметилендиамина) 4-хлор-1,8-нафтаlevым ангидридом **2** (рисунок 32). Для предотвращения образования бис-замещенных продуктов был использован 4-кратный избыток амина. Выходы промежуточных продуктов **21-24** составляли 56-65%.

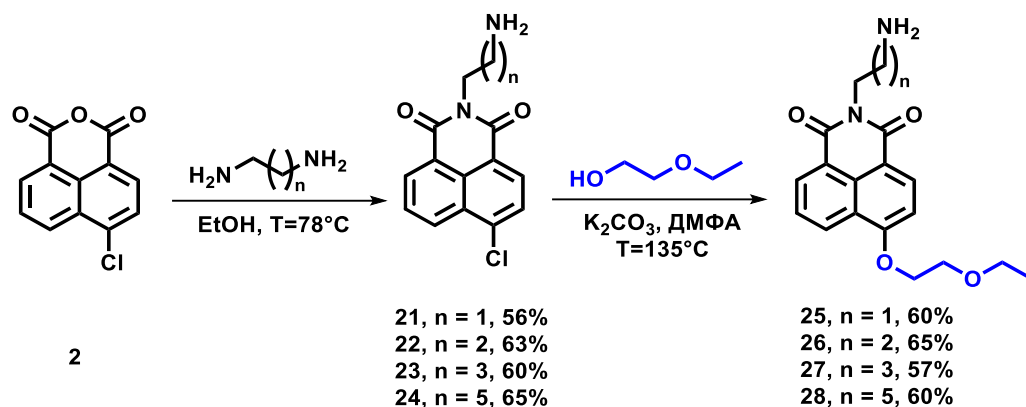


Рисунок 32 – Схема получения производных **25-28**

Замещение атома хлора на этоксиэтильную группу проводили в ДМФА в присутствии этилцеллозольва и 5-кратного избытка безводного карбоната калия K_2CO_3 по отношению к соединениям **21-24** (Метод А, таблица 4). Реакционную смесь выдерживали при нагревании в течение 10-12 часов, окончание реакции отслеживали с применением тонкослойной хроматографии. После охлаждения к смеси добавляли воду; выпавшие осадки целевых продуктов **25-28** отфильтровывали и очищали с помощью колоночной хроматографии (градиентное элюирование смесью дихлорметан-этанол (10:1)). Выходы составили 57-65%.

Таблица 4 – Условия синтеза соединений **25-28** по методам А и Б

Продукт	n	Метод	Количество K_2CO_3	Растворитель	Температура, °C	Время, ч	Выход продукта, %
25	1	А	5 моль	ДМФА	135	10	60
		Б		Этилцеллозольв	125	16	54
26	2	А	5 моль	ДМФА	135	10	65
		Б		Этилцеллозольв	125	16	50
27	3	А	5 моль	ДМФА	135	10	57
		Б		Этилцеллозольв	125	16	53
28	5	А	5 моль	ДМФА	135	12	60
		Б		Этилцеллозольв	125	16	55

Следует отметить, что вторую стадию для получения целевых соединений **25-28** можно проводить в избытке этилцеллозольва без использования ДМФА (таблица 4, метод Б). После отгонки растворителя добавляли воду, в результате чего выпадали осадки продуктов **25-28** не требующие дальнейшей очистки. Выходы флуорофоров варьировались от 50 до 55%. Таким образом, метод Б является альтернативным способом получения 4-этоксиэтил-замещенных 1,8-нафталимидов; он был использован на более поздних этапах работы (см. раздел 3.1).

Для получения производных с максимумом флуоресценции в области 550 нм, была реализована двухстадийная схема синтеза (рисунок 33). На первой стадии 4-хлор-1,8-нафталеновый ангидрид **2** вводили в реакцию с морфолином в диметилформамиде при температуре $T = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образующийся 4-морфолинил-1,8-нафталеновый ангидрид **15** на второй стадии подвергали ацилированию 4-кратным избытком соответствующих аминов при кипячении в этиловом спирте в течение 8-10 часов. Целевые продукты **29-32** выделяли с помощью колоночной хроматографии при элюировании смесью дихлорметан-этанол (10:1). Выходы соединений достигали 62-75%.

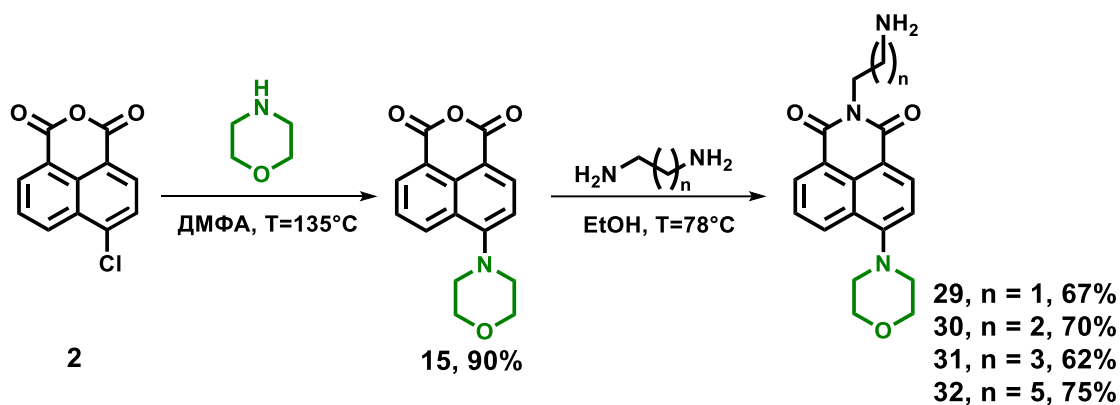


Рисунок 33 – Схема получения производных **29-32**

Альтернативный подход к ковалентной модификации *PLGA* основан на использовании бифункционального линкера – этаноламина, который благодаря наличию гидроксид- и аминогрупп широко применяется в качестве «строительного блока» в синтезе биологически активных веществ. Образование сложноэфирной связи между карбоксильной группой флуорофора и гидроксильной группой линкера осуществляли по реакции Штеглица. Для этого были получены флуорофоры **34** и **35**, содержащие остаток масляной кислоты при имидном атоме азота (рисунок 34). Ацилирование ангидридов **2** и **15** проводили в присутствии триэтиламина, необходимого для перевода γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) из цвиттер-ионной формы в нуклеофильную.

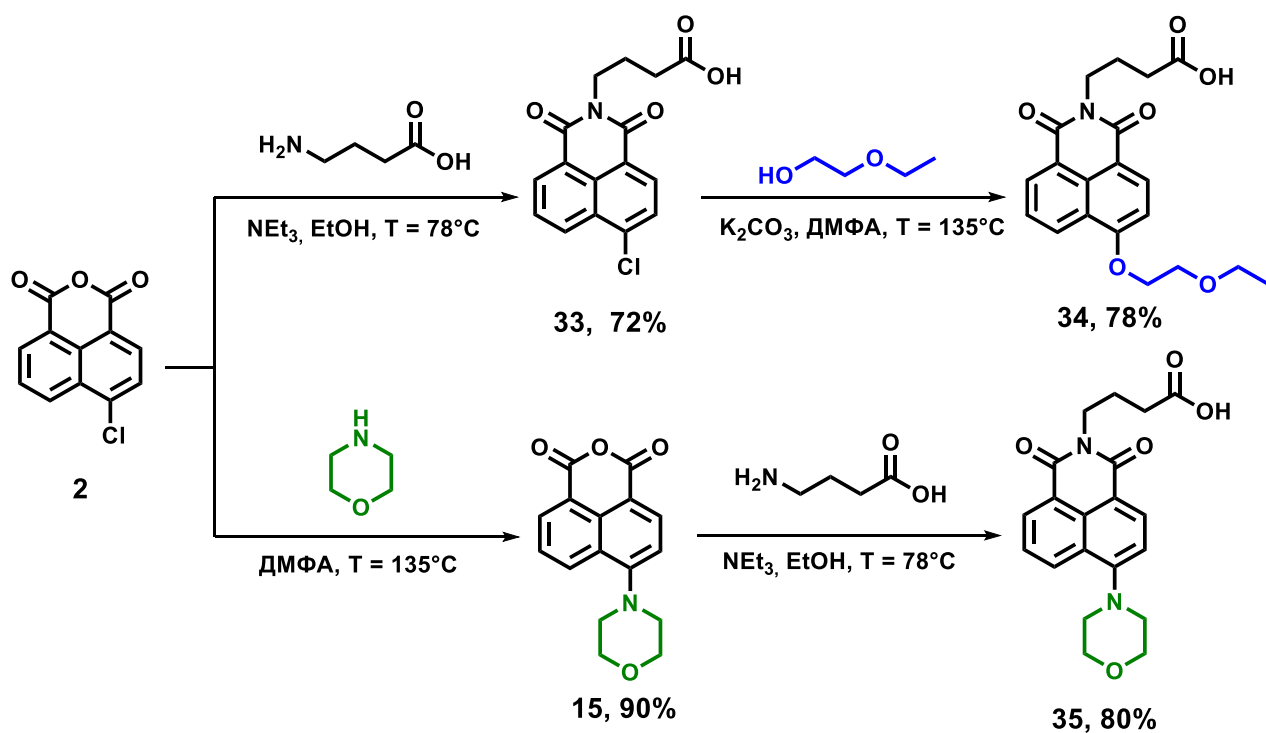


Рисунок 34 – Схема получения производных **34** и **35**

Для мультиплексной визуализации нескольких клеточных структур необходимы флуорофоры с эмиссией в разных областях спектра. Излучение в длинноволновой области спектра (600-800 нм) обладает рядом преимуществ: минимальное фотоповреждение клеток, слабая автофлуоресценция образцов и глубокое проникновение в ткани [117]. Чувствительность флуоресцентной микроскопии может быть значительно повышена за счёт использования флуорофоров с большим значением Стоксова сдвига [118].

В связи с этим следующей задачей диссертационного исследования стала разработка флуорофора с длинноволновой эмиссией, что потребовало расширения π -сопряженной ароматической системы нафталимидного ядра. Схема синтеза такого соединения представлена на рисунке 35.

На первом этапе проводили реакцию алкилирования γ -пиколина **36** метилйодидом в хлористом метиле с получением 1,4-диметилпиколия йодида **37**. Далее осуществляли нуклеофильное замещение атома галогена в производном **33** на гидроксильную группу в присутствии N-гидроксисукцинимид (*NHS*) в системе супероснования $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$ с получением 4-гидрокси-(N-пропилкарбокси)-1,8-нафталимида **38**. Затем по реакции Даффа вводили формильную группу в положение 3 нафталимидного ядра кипячением соединения **38** с уротропином в трифторуксусной кислоте (ТФУ).

Использование ТФУ в качестве растворителя и катализатора, позволяет получить преимущественно 3-формил-4-гидрокси-1,8-нафталимид **39**. Появление сигнала при $\delta = 10,3$ м.д. в спектре ^1H -ЯМР подтверждает наличие формильной группы.

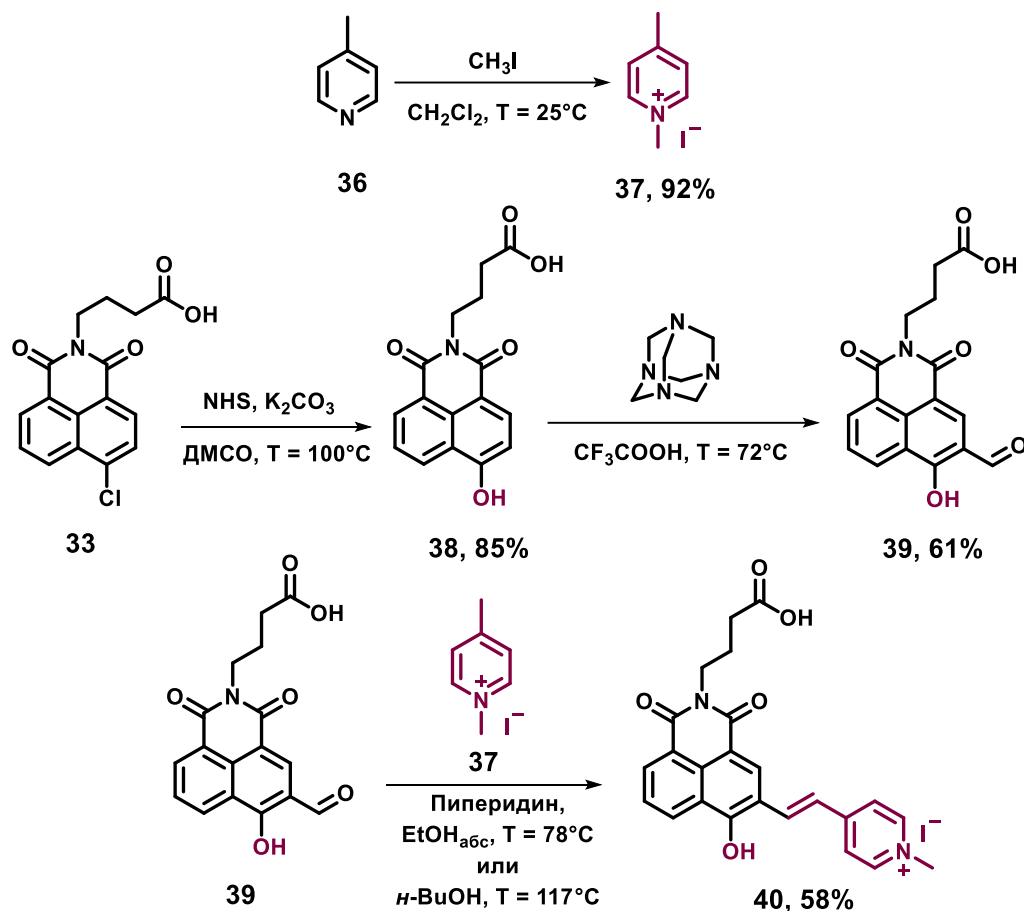


Рисунок 35 – Схема получения производного **40**

Заключительная стадия – реакция Кнёвенагеля между соединением **39** и 1,4-диметилпиридиния йодидом **37**. Реакцию конденсации проводили в среде этилового спирта с добавлением пиперидина в качестве катализатора; замена растворителя на *n*-бутанол не влияла на выход целевого продукта. Образование *E*-изомера подтверждается значением константы спин-спинового взаимодействия винильных протонов, значение которой равно $J_{\text{вин}} = 15,9$ Гц. Следует отметить, что соединение **40** содержит катион пиколина, который может выступать в качестве векторной группы для нацеливания на митохондрии.

Следующей группой соединений являются *S*-содержащие производные **43-48**, схема синтеза которых представлена на рисунке 36. В качестве заместителя в положении 4 бицикла был выбран остаток β -меркаптоэтанола, что позволяет получать флуорофоры с эмиссией в области 500-530 нм, содержащие гидроксильную группу для последующей конъюгации с *PLGA*.

4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталеновый ангидрид **42** получали взаимодействием 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида **2** с β -меркаптоэтанолом **41** в ДМФА в присутствии мягкого основания гидрокарбоната натрия NaHCO_3 . Благодаря более высокой нуклеофильности тиолят-анионов по сравнению с алкогилят-анионами основным продуктом реакции являлся целевой ангидрид **42**, выход которого составил 83%. На следующем этапе проводили ацилирование 4-(2-аминоэтил)морфолина, N-тозилэтилендиамина, N,N-диметилэтилендиамина, этилендиамина, 1,6-гексаметилендиамина и γ -аминомасляной кислоты ангидридом **42** при кипячении в этиловом спирте. Выходы полученных соединений **43-48** представлены в таблице 5.

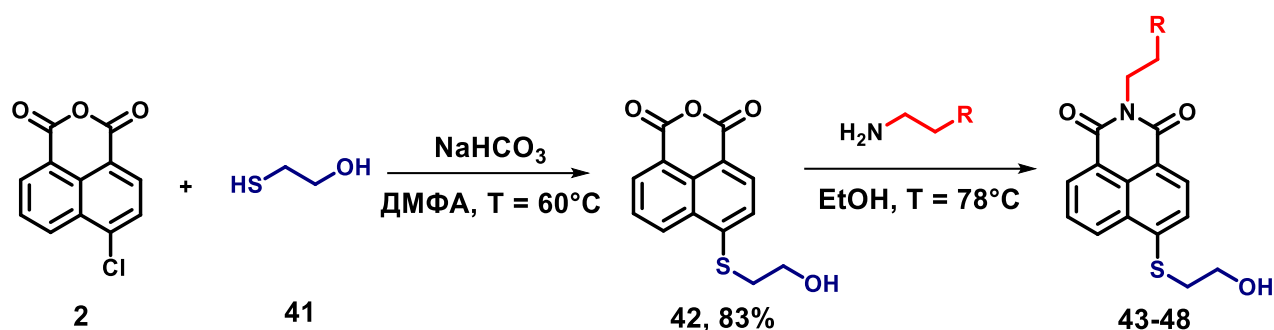


Рисунок 36 – Схема получения 4-(2-гидроксиэтилтио)-замещенных производных 1,8-нафталимида **43-48**

Таблица 5 – Выходы 4-(2-гидроксиэтилтио)-замещенных производных 1,8-нафталимида **43-48**

Соединение	Заместитель R	Выход, %	Соединение	Заместитель R	Выход, %
43		55	46		58
44		67	47		65
45		50	48		60

Наличие в соединениях **43-48** векторных групп при имидном атоме азота, обеспечивающих селективное связывание с клеточными органеллами, позволяет рассматривать их не только как перспективные флуорофоры для создания систем адресной доставки на основе *PLGA*, но и в качестве самостоятельных зондов для визуализации внутриклеточных структур.

2.2.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств производных 1,8-нафталимида

Для каждой из синтезированных групп флуорофоров (**25-28**, **29-32**, **34-35**, **40**, **43-48**) исследованы спектрально-люминесцентные свойства в трех растворителях: дихлорметане (ДХМ), диметилсульфоксиде (ДМСО) и воде.

Соединения первой группы (**25-28**), содержащие этоксиэтильный заместитель в положении 4 нафталиimidного ядра, характеризуется максимумами поглощения ($\lambda_{max}^{погл}$) около 375 нм и флуоресценции ($\lambda_{max}^{фл}$) около 460 нм (в воде), что соответствует синей области спектра. Вторая группа соединений (**29-22**) с морфолиновым заместителем имеет $\lambda_{max}^{погл} \approx 400$ нм и $\lambda_{max}^{фл} \approx 530$ нм (зеленая область). Наблюдаемое различие обусловлено сильным влиянием электронных свойств заместителей на π -систему 1,8-нафталимида, что подтверждает возможность варьирования оптического отклика путем замены атома или группы в 4-ом положении ароматического бицикла.

Внутри каждой из указанных групп варьировалась длина углеродного спейсера, соединяющего нафталиimidный фрагмент с концевой аминогруппой при имидном атоме азота. Проведенные эксперименты не выявили систематической зависимости спектральных или люминесцентных характеристик от длины спейсера. Это свидетельствует о том, что электронные переходы в основном локализованы в ароматическом ядре и существенно не зависят от заместителя при имидном атоме азота. Появление в спектрах поглощения полос при ~ 365 нм (для соединений **25-28** в хлористом метиле) и при ~ 495 нм (для соединений **29-32** в хлористом метиле) связано с внутримолекулярным переносом заряда (*ICT*) от электронодонорного заместителя в 4-ом положении к электроноакцепторной карбоксиимидной группе [119,120]. Заместитель при имидном атоме азота, напротив, не участвует в этом перераспределении заряда.

Для всех изученных флуорофоров характерно наличие узких полос поглощения, симметричных спектров флуоресценции. В таблицах 6 и 7 для соединений **25-32** приведены экспериментально определенные параметры (максимумы длин волн поглощения и флуоресценции, молярные коэффициенты экстинкции (ϵ), квантовые выходы флуоресценции ($\Phi_{фл}$) и яркость) в дихлорметане, ДМСО и воде.

Таблица 6 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров **25-28** в дихлорметане, ДМСО и воде, 25°C

	Флуорофор			
	25, n=2	26, n=3	27, n=4	28, n=6
Дихлорметан				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полгл}}$, нм	368	365	365	365
$\lambda_{\text{таx}}^{\text{фл}}$, нм	430	430	430	432
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	12,2	14,5	18,6	14,4
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	83,3	50,7	52,8	60,8
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	10 170	7 350	9 820	8 760
ДМСО				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полгл}}$, нм	368	357	368	368
$\lambda_{\text{таx}}^{\text{фл}}$, нм	446	446	447	448
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	9,7	17,0	15,3	17,1
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	52,0	41,6	40,7	45,9
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	5 040	7 070	6 230	8 750
Вода				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полгл}}$, нм	375	373	375	374
$\lambda_{\text{таx}}^{\text{фл}}$, нм	457	468	460	457
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	10,3	10,8	8,5	12,5
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	72,2	7,5	5,5	78,2
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	7 440	810	470	9 780

Таблица 7 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров **29-32** в дихлорметане, ДМСО и воде, 25°C

	Флуорофор			
	29, n=2	30, n=3	31, n=4	32, n=6
Дихлорметан				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полгл}}$, нм	394	397	395	394
$\lambda_{\text{таx}}^{\text{фл}}$, нм	532	512	510	508
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	12,2	12,6	14,7	10,1
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	64,3	48,5	69,7	74,0
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	7 850	6 110	10 250	7 480
ДМСО				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полгл}}$, нм	400	402	402	401
$\lambda_{\text{таx}}^{\text{фл}}$, нм	533	540	541	540
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	14,0	11,5	14,6	10,7

Продолжение таблицы 7

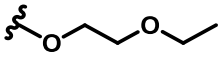
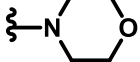
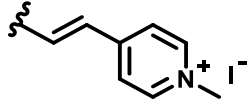
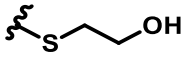
	Флуорофор			
	29, n=2	30, n=3	31, n=4	32, n=6
ДМСО				
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	8,2	2,3	2,4	3,2
Яркость, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	1 150	265	350	345
Вода				
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{полл}}$, нм	400	403	401	400
$\lambda_{\text{фл}}^{\text{полл}}$, нм	565	560	559	547
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	14,3	9,2	13,3	11,7
Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	1,0	0,4	0,4	0,6
Яркость, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	143	37	53	70

Особого внимания заслуживают производные **29-32**, содержащие морфолиновый заместитель в 4-ом положении. Их квантовые выходы флуоресценции в воде оказались существенно ниже (около 1%) по сравнению с измеренными в органических растворителях. Этот выраженный эффект тушения объясняется образованием скрученного состояния с внутримолекулярным переносом заряда (*Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT*), которое возникает вследствие свободного вращения заместителя в возбужденном состоянии относительно плоскости нафталимидного ядра [121,122]. Такое вращение способствует безызлучательной релаксации возбужденного состояния молекулы флуорофора, снижая вклад флуоресценции. Можно ожидать, что в твердой фазе, например в составе *PLGA* наночастиц, ограничение конформационной подвижности приведет к подавлению *TICT*-процесса, и как следствие, к повышению квантовых выходов флуоресценции.

Анализ полученных данных показал, что среди этоксиэтил-замещенных производных **25–28** наиболее перспективными являются соединения **25** и **28**, содержащие, соответственно, два и шесть метиленовых звеньев в линкере. Они обладают высокой яркостью в воде, что имеет важное значение для эффективной биовизуализации клеточных структур. Среди морфолиновых производных (**29–32**) соединениями-лидерами являются флуорофоры **29** и **31** (с двумя и четырьмя атомами углерода в спейсере соответственно), демонстрирующие высокие значения яркости в исследуемых средах.

Аналогичные спектрально-люминесцентные исследования были проведены и для соединений **34-35**, **40**, **48**, содержащих карбоксильную группу. Результаты представлены в таблице 8 и на рисунке 37.

Таблица 8 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров **34**, **35**, **40**, **48** в дихлорметане, ДМСО и воде, 25°C

Свойства	Флуорофор			
	34	35	40	48
Заместитель				
Дихлорметан				
$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	365	394	589	388
$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	430	511	677	462
$\varepsilon \cdot 10^{-3}, \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	10,70	11,20	41,10	8,25
Квантовый выход	97,3	70,3	10,0	45,1
$\Phi_{\text{фл}}, \%$				
Яркость, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	10 410	7 870	4 110	3 720
ДМСО				
$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	368	400	533	394
$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	445	540	653	487
$\varepsilon \cdot 10^{-3}, \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	10,15	11,55	34,30	9,30
Квантовый выход	62,8	3,0	5,0	12,0
$\Phi_{\text{фл}}, \%$				
Яркость, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	6 370	350	1 715	1 120
Вода				
$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$	375	399	468	398
$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$	456	557	624	506
$\varepsilon \cdot 10^{-3}, \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	11,00	13,45	24,10	7,70
Квантовый выход	85,3	0,5	1,5	32,2
$\Phi_{\text{фл}}, \%$				
Яркость, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	9 400	670	360	2 490

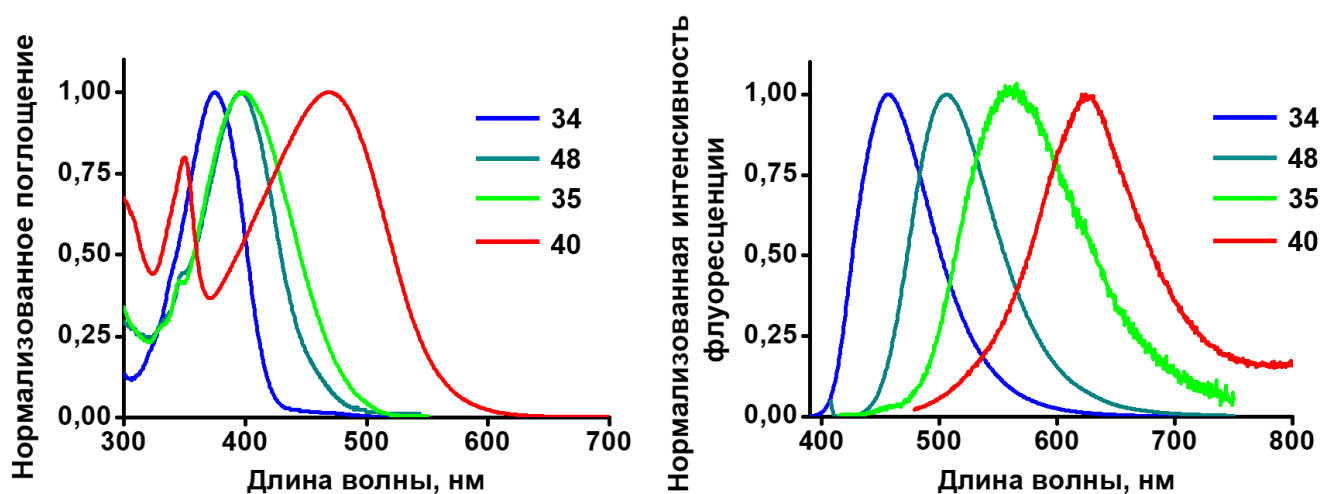


Рисунок 37 – Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции в воде производных **34**, **35**, **40**, **48**

Введение более электронодонорного заместителя в ароматическую систему 1,8-нафталимида приводило к батохромному сдвигу максимумов поглощения и батофлорному сдвигу максимумов флуоресценции. Для флуорофоров **35** и **40** квантовые выходы флуоресценции в воде характеризовались меньшими значениями, чем для хлористого метилена и ДМСО, что связано с переходом в *ТICT*-состояние.

Таким образом, получена серия флуорофоров, содержащих карбоксильную группу и охватывающих широкий диапазон эмиссии – от 460 до 624 нм (в воде). Для последующих исследований, ориентированных на применение в биовизуализации, выбрано соединение **40**, характеризующееся наиболее длинноволновым излучением (624 нм), что предпочтительно для минимизации фоновой автофлуоресценции биологических образцов и увеличения глубины проникновения сигнала в ткани.

S-замещенные производные **43-47** продемонстрировали высокие значения квантовых выходов флуоресценции и яркости в воде (таблица 9).

Таблица 9 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров **43-47** в дихлорметане, ДМСО и воде, 25°C

Свойства	Флуорофоры				
	43	44	45	46	47
R =					
Дихлорметан					
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	389	393	400	389	388
$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$, нм	462	469	475	465	464
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹¹	16,40	15,35	10,55	15,85	15,65
Квантовый выход	4,6	73,8	50,0	65,4	69,2
Φ_{fl} , %					
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	755	11 330	5 250	10 700	10 830
ДМСО					
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	396	395	398	397	397
$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$, нм	490	490	496	492	492
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	17,45	16,30	11,90	16,90	16,70
Квантовый выход	10,2	13,6	9,0	11,7	12,4
Φ_{fl} , %					
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	1 780	2 220	1 070	2 000	2 070
Вода					
$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	397	403	398	398	398
$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$, нм	510	507	511	510	511
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$, М ⁻¹ ·см ⁻¹	16,30	13,65	11,40	15,00	15,30
Квантовый выход	3,0	32,0	35,0	33,8	36,2
Φ_{fl} , %					
Яркость, М ⁻¹ ·см ⁻¹	500	4 370	3 990	5 070	5 540

Замена атома кислорода на серу в положении 4 привела к небольшому батофлорному сдвигу максимумов эмиссии по сравнению с кислородсодержащими аналогами. Для последующей ковалентной модификации полимерной матрицы выбраны соединения **43**, **44** и **45**, структура которых включает векторные группы, наиболее часто используемые для создания систем адресной доставки, нацеленных на лизосомы и эндоплазматический ретикулум (ЭПР).

2.2.3. Получение конъюгатов *PLGA* с производными 1,8-нафталимида

Сополимер молочной и гликолевой кислот (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, *PLGA*) широко используется в биомедицине для создания систем адресной доставки молекул лекарственных веществ, белков или других макромолекул с контролируемым высвобождением [123,124]. Применение наносомальных форм позволяет повысить терапевтическую эффективность лекарственных веществ, которые часто характеризуются низкой растворимостью, коротким периодом полувыведения и недостаточной биодоступностью [125,126]. Введение флуоресцентной метки в состав *PLGA*-частиц открывает возможности для оценки эффективности клеточного поглощения, внутритканевого распределения и накопления в опухолях методами флуоресцентной микроскопии *in vitro* и *in vivo* [127]. В связи с этим, производные 1,8-нафталимида представляются перспективными кандидатами для создания флуоресцентных *PLGA*-конъюгатов.

В работе использован коммерчески доступный полимер *Resomer*[®] *RG 502H* с соотношением лактид:гликолид 50:50 (17 кДа), содержащий свободные терминальные карбоксильные группы. Общая схема ковалентной модификации *PLGA* производными 1,8-нафталимида **25-32** представлена на рисунке 38. Функционализацию осуществляли по реакции амидирования между концевой карбоксильной группой полимера и аминогруппой флуорофора карбодиимидным методом. Все реакции проводились в мягких условиях, карбоксильную группу активировали N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидом (*EDC*) и N-гидроксисукцинимидом (*NHS*) в присутствии каталитических количеств диизопропилэтиламина (*DIPEA*) необходимого для депротонирования карбоксильной группы *PLGA*.

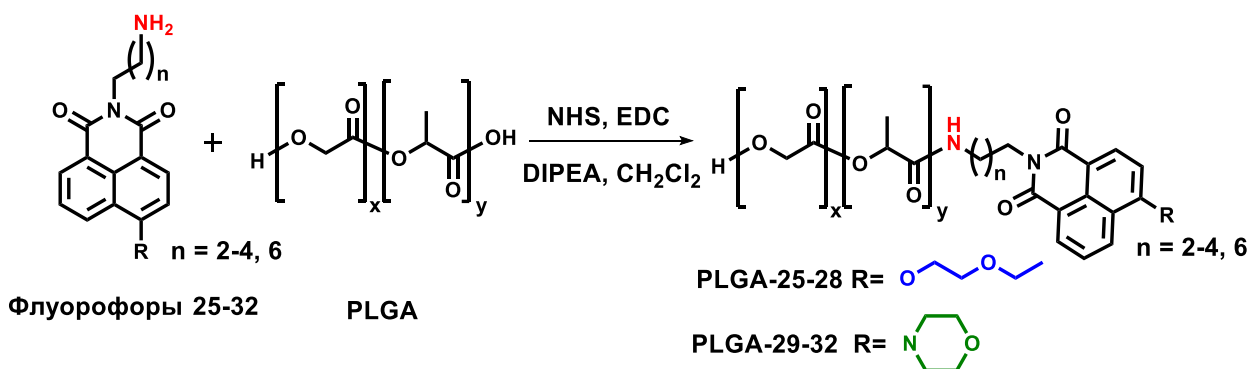


Рисунок 38 – Схема ковалентной модификации *PLGA* производными 1,8-нафталимида **25-32**

Реакции проводили в дихлорметане или диметилформамиде, обеспечивающих гомогенные условия; продолжительность составляла 48 ч при комнатной температуре, что исключало деградацию полимера и изменение его молекулярной массы. Конъюгаты выделяли экстракцией с последующим осаждением раствора полимера в этилацетате в гексан. Выходы очищенных продуктов составили 75 – 85%.

Структура полученных конъюгатов подтверждена комплексом физико-химических методов анализа. В спектре ЯМР ^1H конъюгата *PLGA-29* (рисунок 39) в ароматической области 7,0–8,7 м.д. присутствуют сигналы, соответствующие ароматическому ядру 1,8-нафталимида, отсутствующие в спектре исходного немодифицированного *PLGA*.

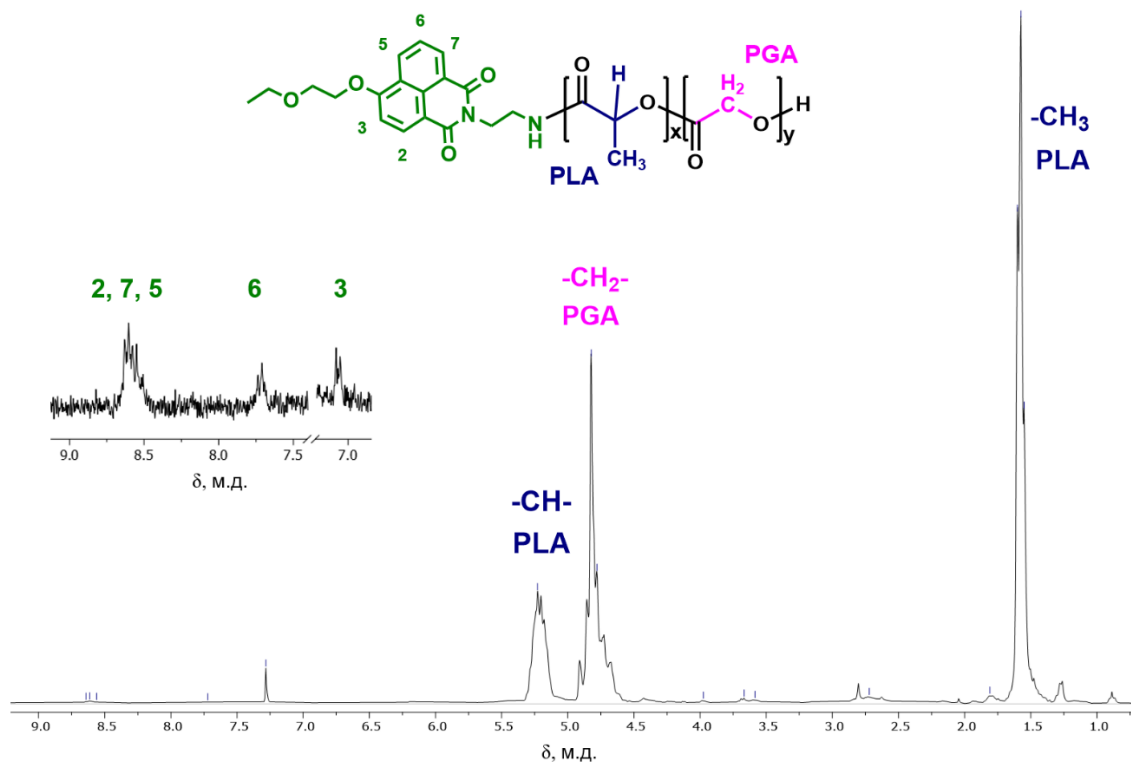


Рисунок 39 – ^1H ЯМР-спектр конъюгата *PLGA-29* в CDCl_3

Сравнительный анализ ИК-спектров исходного полимера *PLGA* (рисунок 40) и конъюгата *PLGA-29* (рисунок 41) показал сохранение характерных полос сложноэфирных

групп: валентные колебания карбонильных связей C=O при 1748 см^{-1} , асимметричные и симметричные колебания C–O при 1167 и 1087 см^{-1} , а также полосы валентных колебаний C–H метиленовых звеньев при 2951 см^{-1} , что свидетельствует о неизменности основной полимерной цепи.

Ключевым доказательством формирования амидной связи между карбоксильными группами полимера и первичной аминогруппой нафталимидного флуорофора **29** служит появление в спектре конъюгата двух новых полос поглощения: при 1682 см^{-1} (валентные колебания C=O амидной группы) и при 1543 см^{-1} (деформационные колебания N–H) (рисунок 41). Таким образом, данные ИК-спектроскопии убедительно подтверждают, что модификация полимера протекает селективно по концевым карбоксильным группам с образованием устойчивой амидной связи, не затрагивая при этом сложноэфирный остов полимера.

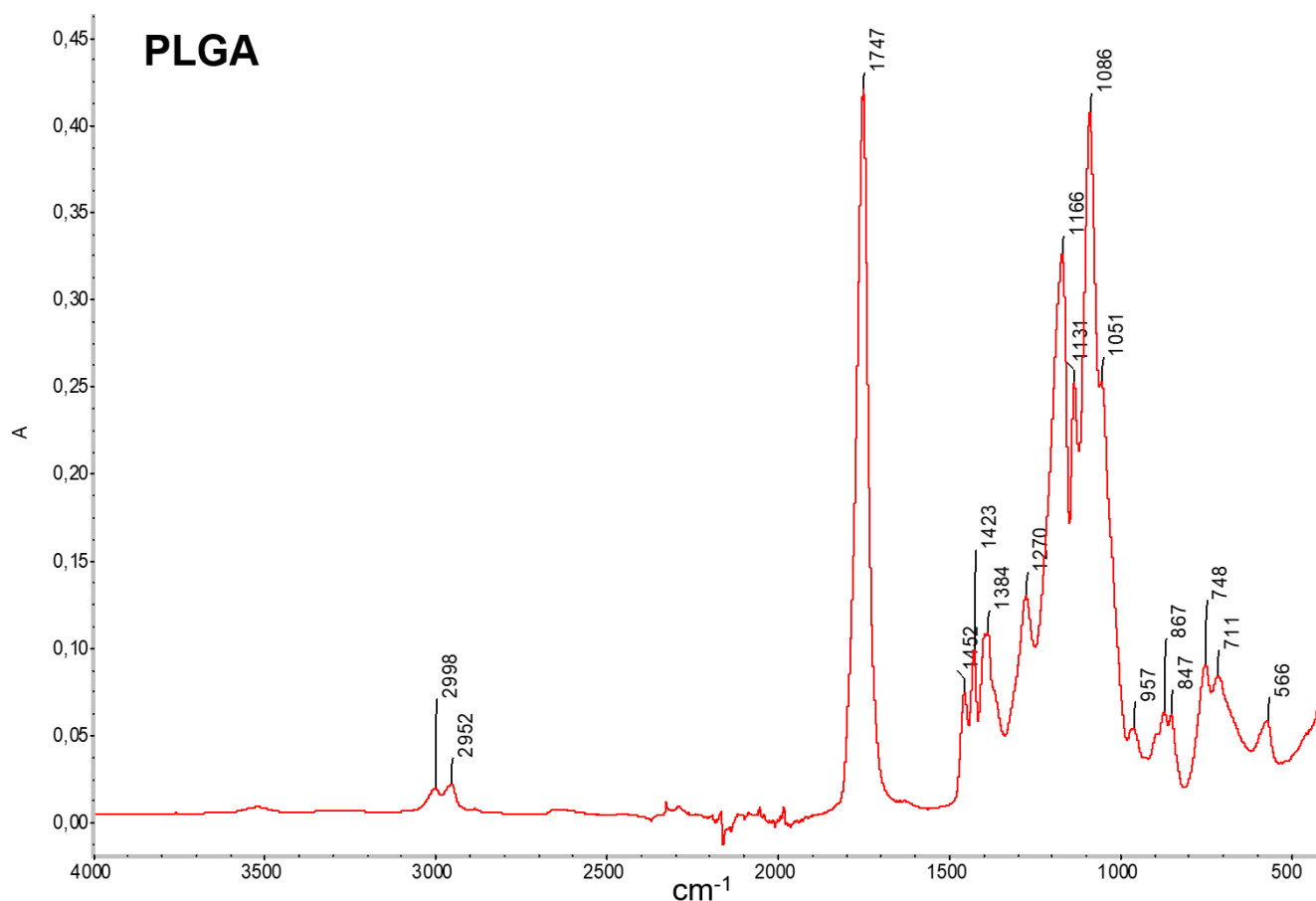


Рисунок 40 – НПВО ИК-Фурье спектр немодифицированного *PLGA*

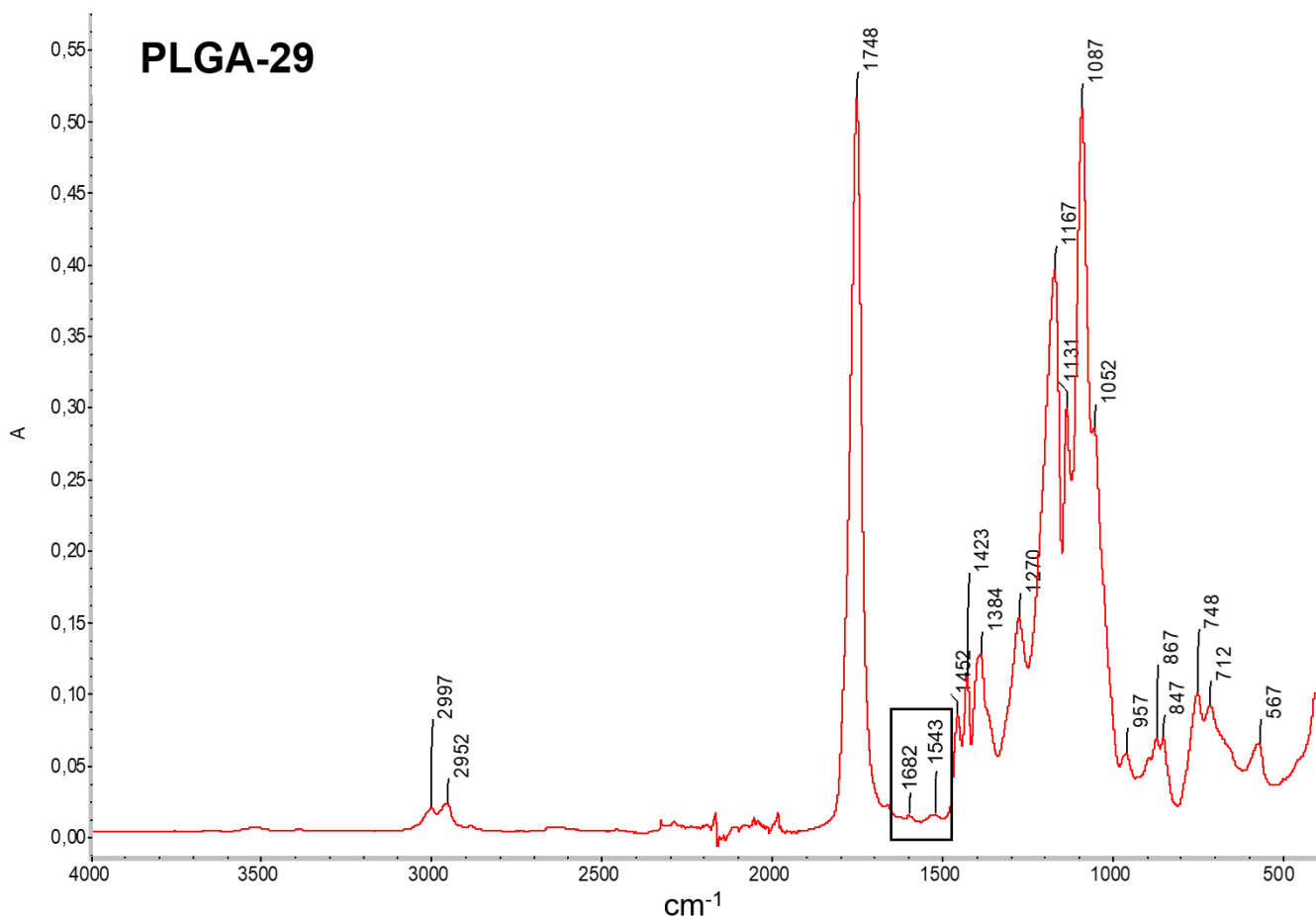


Рисунок 41 – НПВО ИК-Фурье спектр конъюгата **PLGA-29**

Гель-проникающая хроматография конъюгата **PLGA-29** с УФ-детектированием (рисунок 42) подтвердила образование флуоресцентного продукта со среднемассовой молекулярной массой $M_w = 14,6$ кДа и среднечисловой $M_n = 7,8$ кДа.

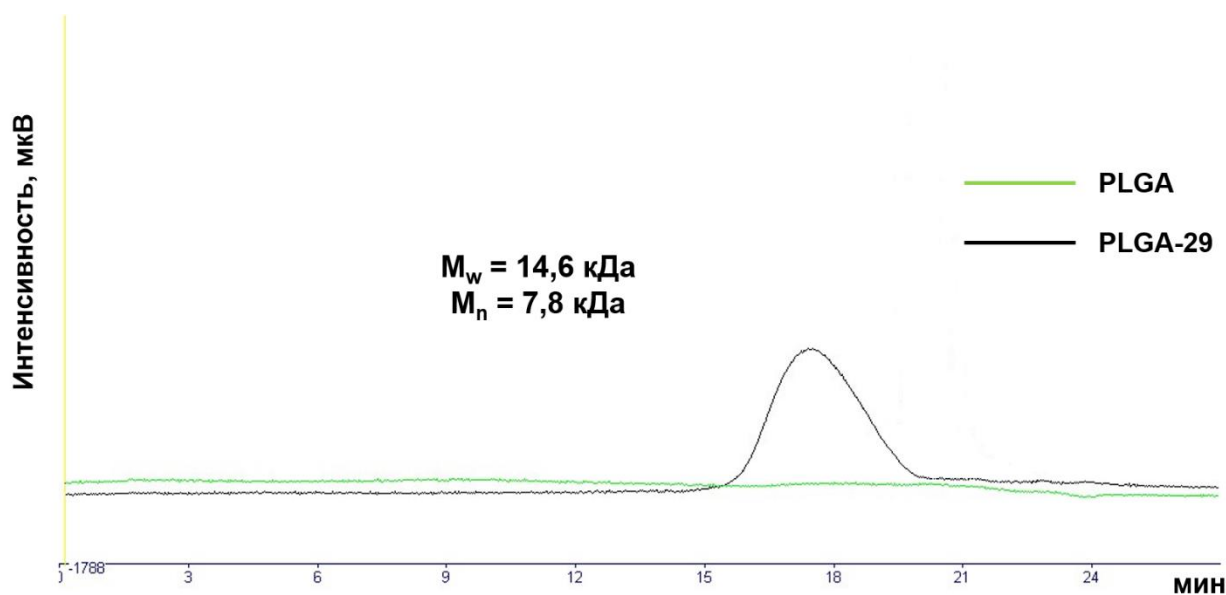


Рисунок 42 – Гель-проникающая хроматограмма (УФ-детектор, $\lambda = 254$ нм) конъюгата **PLGA-29**

Для дополнительной проверки эффективности ковалентной модификации полимера и количественного определения несвязанного (свободного) красителя в составе материала конъюгаты *PLGA-27* и *PLGA-29*, содержащие флуорофоры с морфолиновым и этоксиэтильным заместителями соответственно, были проанализированы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В обоих случаях содержание свободного красителя в конечных образцах не превышало 0,03%, что указывает на высокую степень очистки полимеров при выделении, а также гарантирует, что флуоресцентный сигнал формируется именно ковалентно связанным флуорофором.

Следующий этап работы включал получение конъюгатов *PLGA* с 4-(2-гидроксиэтилтио)-замещенными производными **43-45**, содержащими векторные группы (морфолиновую, *p*-толуолсульфамидную и *N,N*-диметиламинную). Ковалентная модификация *PLGA* производными **43-45** была осуществлена в условиях реакции Штеглиха (рисунок 43). В качестве агента, активирующего карбоксильную группу полимера, выступал *EDC*, катализатором реакции *O*-ацилирования служил 4-диметиламинопиридин (ДМАП). Выходы конъюгатов составили 75-85%.

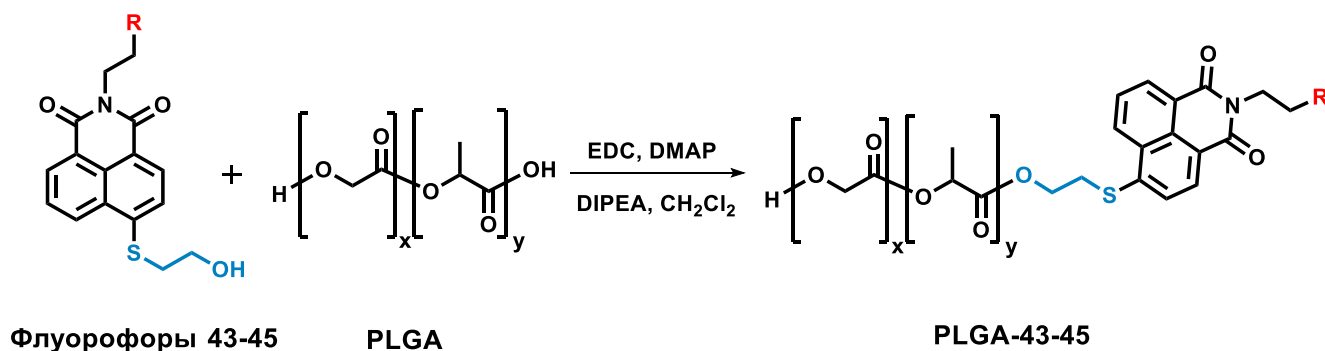


Рисунок 43 – Схема ковалентной модификации *PLGA* производными 1,8-нафталимида **43-45**

Для введения флуорофора **40**, обладающего эмиссией в красной области спектра (624 нм), предварительно осуществляли модификацию *PLGA* этаноламином карбодимидным методом, что приводило к образованию амидной связи между полимером и линкером. Затем в условиях реакции Штеглиха гидроксильную группу этаноламинового фрагмента ацилировали карбоксильной группой флуорофора **40** (рисунок 44). Конъюгат выделяли осаждением из гексана, выход составил 80%.

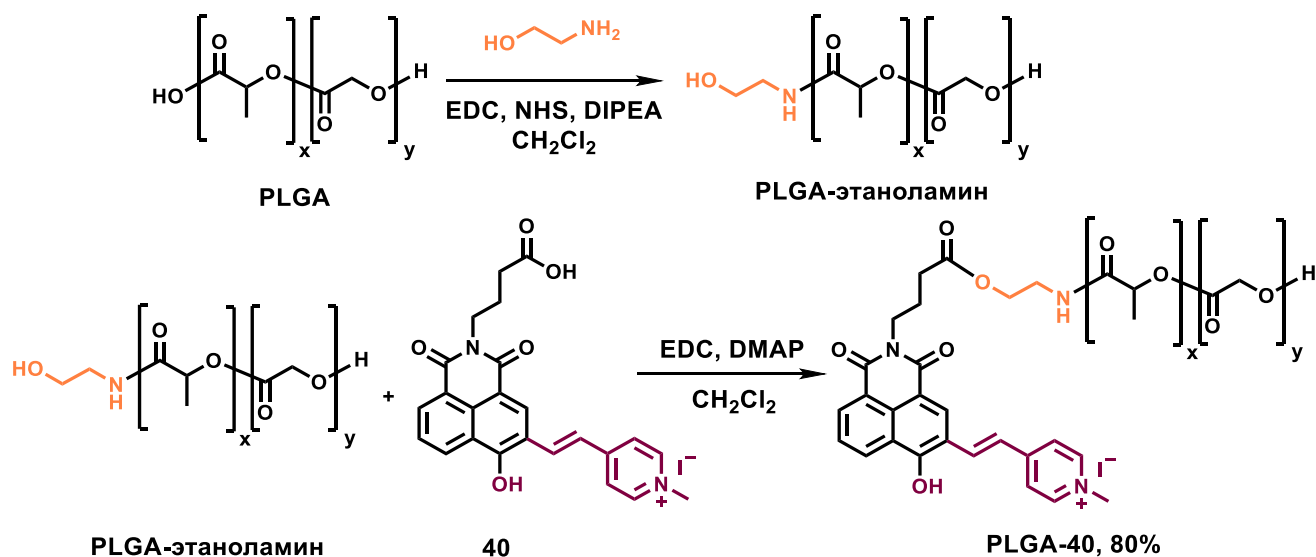


Рисунок 44 – Схема ковалентной модификации конъюгата *PLGA*-этаноламин производным 1,8-нафталимида **40**

Структуры конъюгатов *PLGA*-этаноламин и *PLGA-40* также были подтверждены методом ИК-спектроскопии. При анализе ИК-спектра конъюгата *PLGA-40* было отмечено отсутствие полосы при 3477 см⁻¹, соответствующей валентным колебаниям концевой OH-группы остатка этаноламина, что свидетельствует о прохождении реакции этерификации.

2.2.4. Изучение спектрально-люминесцентных свойств конъюгатов *PLGA* с производными 1,8-нафталимида

Спектрально-люминесцентные характеристики всех синтезированных конъюгатов исследованы в дихлорметане и ДМСО – средах, обеспечивающих хорошую растворимость и позволяющих проводить корректное сравнение с соответствующими свободными флуорофорами. Полученные данные (максимумы поглощения и флуоресценции, квантовые выходы) представлены в таблице 10.

Установлено, что основные спектральные характеристики исходных 1,8-нафталимидов сохраняются в составе конъюгатов. Форма и интенсивность полос поглощения и флуоресценции остаются близкими к таковым для свободных флуорофоров, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния ковалентного связывания с полимером на электронную структуру хромофорной системы. Это подтверждает

пригодность полученных конъюгатов для использования в качестве флуоресцентных меток при создании систем адресной доставки.

Таблица 10 – Спектрально-люминесцентные свойства конъюгатов *PLGA*-1,8-нафталимид **25-32, 40, 43-45**, 25°C

Полимер	$\lambda_{max}^{погл}$, нм		$\lambda_{max}^{фл}$, нм		Квантовый выход $\Phi_{фл}$, %	
	CH ₂ Cl ₂	ДМСО	CH ₂ Cl ₂	ДМСО	CH ₂ Cl ₂	ДМСО
<i>PLGA-25</i>	367	364	437	446	79,0	62,4
<i>PLGA-26</i>	366	369	429	445	49,3	42,5
<i>PLGA-27</i>	366	370	430	446	56,2	41,7
<i>PLGA-28</i>	364	367	431	447	60,1	43,9
<i>PLGA-29</i>	400	401	503	534	44,3	4,2
<i>PLGA-30</i>	399	401	515	539	63,7	2,9
<i>PLGA-31</i>	395	400	512	539	50,6	3,3
<i>PLGA-32</i>	393	398	508	540	67,9	3,7
<i>PLGA-43</i>	388	396	462	491	12,0	10,2
<i>PLGA-44</i>	394	395	468	490	75,1	15,7
<i>PLGA-45</i>	400	398	474	495	52,8	11,4
<i>PLGA-40</i>	589	533	676	653	23,8	9,3

Наблюдаемые сдвиги максимумов поглощения и флуоресценции – до 10 нм – обусловлены изменениями сольватации и локальной диэлектрической проницаемости в микроокружении флуорофора, связанного с полимерной матрицей. Величина сдвига зависит как от природы нафталимидного красителя, так и от полярности растворителя.

2.2.5. Получение наночастиц *PLGA*-1,8-нафталимид и изучение их свойств

На основе всех синтезированных конъюгатов *PLGA*-1,8-нафталимид получены соответствующие наночастицы (НЧ). Их размер и биораспределение зависят от метода получения, молекулярной массы самого сополимера, а также от присутствия поверхностно-активных веществ и других добавок [128–130]. Размер НЧ является критическим параметром, определяющим способность преодолевать биологические барьеры. НЧ с $d_{cp} < 10$ нм быстро выводятся через почки и имеют малое время циркуляции в кровотоке [131]; частицы крупнее $d_{cp} > 200$ нм легко поглощаются макрофагами [132]. Размер НЧ равный 100–200 нм считается оптимальным для достижения эффекта

повышенной проницаемости и удерживания (*Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR*) в солидных опухолях [133]. *PLGA* наночастицы с ζ -потенциалом от -10 до -20 мВ считаются достаточно стабильными и несклонными к агрегации [134]. Таким образом, указанные физико-химические параметры задают довольно жесткие требования, предъявляемые к разрабатываемым наносистемам.

PLGA наночастицы могут быть получены следующими методами: наноосаждение [135], гомогенизация под давлением [136], ультразвуковой метод [137], а также микрофлюидный [138]. В настоящей работе был выбран ультразвуковой метод, позволяющий получать наночастицы контролируемых размеров (менее 200 нм) с узким распределением по размерам (индекс полидисперсности $PDI < 0,2$).

Процесс получения НЧ был оптимизирован для обеспечения воспроизводимости физико-химических и коллоидных характеристик всех партий наночастиц. Оптимизированные условия: (1) стабилизирующая фаза – 2 % водный раствор поливинилового спирта (ПВС); (2) органическая фаза – раствор конъюгата *PLGA*–1,8-нафталимид в хлористом метилена (50 мг/мл); (3) мощность УЗ-гомогенизатора – 55 Вт (79% от максимальной мощности Bandelin Sonopuls HD), время обработки – 5 мин, импульсный режим – 3 с работа/1 с пауза). Общая схема получения наночастиц *PLGA*–1,8-нафталимид представлена на рисунке 45.



Рисунок 45 – Схема получения наночастиц ультразвуковым методом

Для полученных наночастиц были определены следующие параметры: гидродинамический диаметр (d_{cp}), дзета-потенциал (ξ -потенциал) и индекс полидисперсности (PDI). Результаты, представленные в таблице 11, свидетельствуют об узком распределении частиц по размерам и стабильном поверхностном заряде во всех образцах.

Таблица 11 – Свойства полученных наночастиц *PLGA*-1,8-нафталимид **25-32, 40, 43-45**

НЧ <i>PLGA</i> -1,8-нафталимид	Размер d_{cp} , нм	PDI	ξ -потенциал, мВ
<i>PLGA-25</i>	$132,8 \pm 2,1$	$0,11 \pm 0,02$	$-10,9 \pm 1,0$
<i>PLGA-26</i>	$127,5 \pm 3,4$	$0,16 \pm 0,04$	$-6,6 \pm 1,4$
<i>PLGA-27</i>	$137,6 \pm 1,2$	$0,12 \pm 0,02$	$-10,4 \pm 1,8$
<i>PLGA-28</i>	$128,9 \pm 4,1$	$0,13 \pm 0,03$	$-13,1 \pm 1,3$
<i>PLGA-29</i>	$126,3 \pm 1,2$	$0,15 \pm 0,01$	$-13,8 \pm 1,2$
<i>PLGA-30</i>	$129,4 \pm 2,1$	$0,12 \pm 0,02$	$-10,5 \pm 1,0$
<i>PLGA-31</i>	$119,6 \pm 5,1$	$0,13 \pm 0,01$	$-15,3 \pm 2,1$
<i>PLGA-32</i>	$125,8 \pm 3,3$	$0,14 \pm 0,04$	$-13,6 \pm 1,1$
<i>PLGA-43</i>	$141,2 \pm 4,2$	$0,12 \pm 0,01$	$-7,2 \pm 0,5$
<i>PLGA-44</i>	$155,5 \pm 1,1$	$0,11 \pm 0,01$	$-11,6 \pm 0,3$
<i>PLGA-45</i>	$132,9 \pm 3,1$	$0,11 \pm 0,02$	$-6,4 \pm 0,2$
<i>PLGA-40</i>	$143,6 \pm 2,4$	$0,13 \pm 0,02$	$-9,6 \pm 0,6$

Включение флуорофоров в состав *PLGA* не оказывало существенного влияния на физико-химические характеристики наночастиц (средний размер, индекс полидисперсности, ξ -потенциал), что указывает на то, что ковалентное связывание производных 1,8-нафталимида с полимером не препятствует формированию коллоидно-стабильных структур.

В спектрах поглощения наночастиц полоса, соответствующая флуорофору, выражена слабо на фоне рассеяния света частицами и собственного поглощения *PLGA*, что обусловлено невысоким содержанием красителя в полимере (рисунок 46). В то же время в спектрах флуоресценции наблюдаются отчетливые полосы эмиссии, положение которых соответствует исходным 1,8-нафталимидам. Это подтверждает сохранение фотофизических свойств флуорофоров после формирования наночастиц.

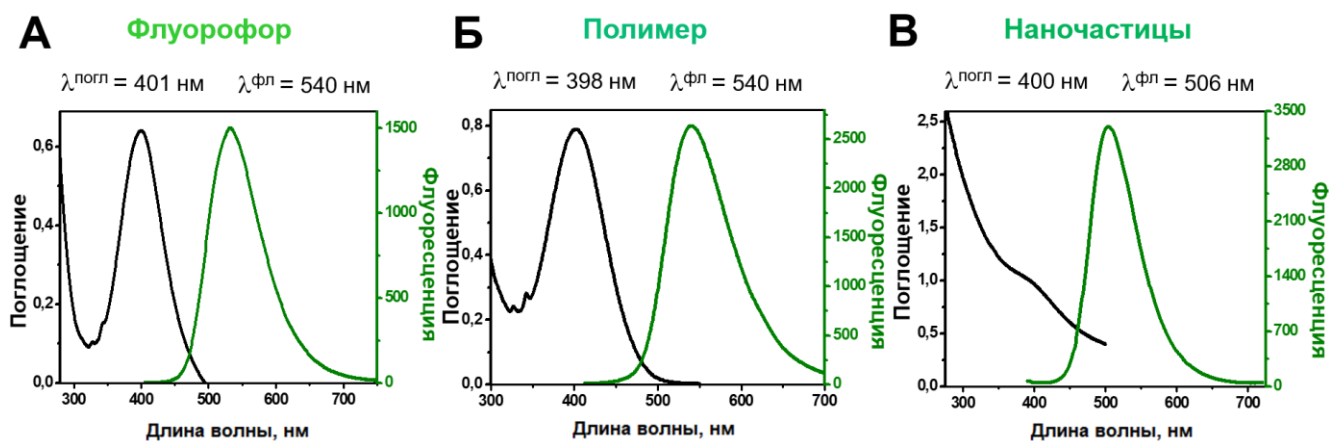


Рисунок 46 – А) Спектры поглощения и флуоресценции красителя **32** в ДМСО, [**32**] = 19,61 мг/л; Б) Спектры поглощения и флуоресценции полимера **PLGA-32** в ДМСО, [**PLGA-32**] = 12,0 мг/мл; В) Спектры поглощения и флуоресценции наночастиц **PLGA-32** в воде, [**НЧ PLGA-32**] = 2,5 мг/мл

Для всех полученных наночастиц рассчитаны квантовый выход флуоресценции в воде ($\Phi_{\text{НЧ}}$) и яркость образца (таблица 12). Яркость определяли по формуле (1) в соответствии с методиками используемыми для наночастиц [139,140]:

$$B = \varepsilon \cdot \Phi_{\text{НЧ}} \cdot n \quad (1)$$

где ε – молярный коэффициент поглощения флуорофора, определяемый по закону Бугера–Ламберта–Бера, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

$\Phi_{\text{НЧ}}$ – квантовый выход флуоресценции наночастиц;

n – число молекул флуорофора на мг **PLGA**, mg^{-1} .

Таблица 12 – Спектрально-люминесцентные свойства наночастиц **PLGA-1,8-нафталимид 25-32, 40, 43-45**, в воде, 25°C

НЧ	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	Квантовый выход $\Phi_{\text{фл}}$, %	Яркость НЧ, на мг материала, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
PLGA-25	365	451	55	$2,1 \cdot 10^{20}$
PLGA-26	370	433	13	$4,8 \cdot 10^{19}$
PLGA-27	375	436	5	$1,4 \cdot 10^{19}$
PLGA-28	369	445	82	$1,6 \cdot 10^{20}$
PLGA-29	400	507	16	$1,1 \cdot 10^{19}$
PLGA-30	400	510	17	$2,7 \cdot 10^{19}$
PLGA-31	394	508	25	$5,5 \cdot 10^{19}$
PLGA-32	400	506	81	$1,5 \cdot 10^{20}$
PLGA-43	402	492	13	$3,5 \cdot 10^{19}$
PLGA-44	400	491	67	$8,2 \cdot 10^{20}$
PLGA-45	401	494	45	$9,1 \cdot 10^{19}$
PLGA-40	498	623	73	$7,5 \cdot 10^{20}$

Анализ спектральных характеристик позволил выделить соединения **25**, **32**, **40** и **44** в качестве наиболее перспективных для дальнейшего применения. Установлено, что значения яркости наночастиц на основе *PLGA*-1,8-нафталимид сопоставимы со значениями яркости *PLGA* наночастиц, функционализированных коммерчески доступными флуорофорами – полиметиновыми (сульфо-Су3, Су3, Су5) и ксантоновыми (*FITC*) (таблица 13).

Таблица 13 – Спектрально-люминесцентные свойства полученных наночастиц *PLGA*-1,8-нафталимид и наночастиц *PLGA*, функционализированных коммерческими флуорофорами (вода, 25 °С)

Флуорофор	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	Стоксов сдвиг, нм	Коэффициент молярной экстинкции красителя, ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции красителя, %	Яркость НЧ, на мг материала НЧ
Сульфо-Су3	548	563	15	162 000	10	$2,0 \cdot 10^{19}$
Су3	544	557	13	133 000	7	$2,5 \cdot 10^{19}$
Су5	646	658	12	200 000	40	$2,1 \cdot 10^{19}$
<i>FITC</i>	500	541	41	92 300	97	$6,7 \cdot 10^{17}$
25	375	457	82	12 200	72	$2,1 \cdot 10^{20}$
32	400	546	146	11 740	0,58	$1,5 \cdot 10^{20}$
44	400	491	91	13 650	32	$8,2 \cdot 10^{20}$
40	498	623	125	24 100	1,5	$7,5 \cdot 10^{20}$

Полученные результаты свидетельствуют о потенциале синтезированных систем в качестве эффективных инструментов для оптической биовизуализации, тераностики и отслеживания наноразмерных объектов в режиме реального времени.

Для более детального изучения фотофизических характеристик синтезированных флуорофоров проведены измерения времени жизни возбуждённого состояния как для свободных молекул, так и для их конъюгатов в составе *PLGA*-наночастиц. Использован метод флуоресцентной микроскопии с визуализацией времени жизни возбужденного состояния (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, *FLIM*-микроскопия), позволяющий получить информацию о влиянии микроокружения на динамику возбужденного состояния [141,142]. На рисунке 47 представлены значения среднего времени жизни флуоресценции $\tau_{\text{ср}}$ для соединений **25-32** в свободной форме и в составе *PLGA* наночастиц.

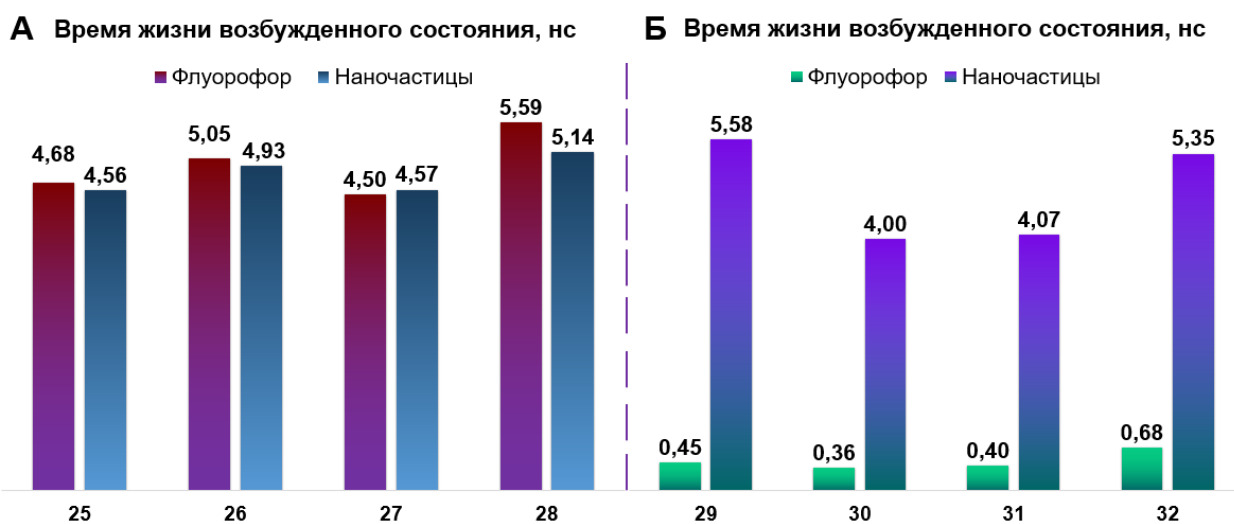


Рисунок 47 – Среднее время жизни возбужденного состояния ($\tau_{ср}$, нс) соединений **25–28** (А) и **29–32** (Б) в свободной форме и в составе наночастиц *PLGA*

Возбуждение образцов осуществляли с помощью фемтосекундного лазера ($\lambda = 770$ нм), в режиме двухфотонного возбуждения. Регистрацию кривых затухания и расчет среднего времени жизни флуоресценции $\tau_{ср}$ проводили методом время-коррелированного счета одиночных фотонов (*Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC*).

При анализе полученных результатов были сделаны следующие выводы: для производных **25-28**, содержащих этоксиэтильный заместитель, средние времена жизни возбужденного состояния в свободном виде и в *PLGA* наночастицах имели одинаковый порядок, в то время как для морфолиновых производных **29-32** наблюдалось почти десятикратное увеличение времени жизни при включении в полимерную матрицу: с $\sim 0,5$ нс в растворе до 4–5 нс в составе наночастиц. Эти результаты подтверждают, что в полимерной матрице подавляется безызлучательный канал дезактивации, связанный с образованием скрученного состояния с внутримолекулярным переносом заряда (*TICT*). Ограничение конформационной подвижности заместителя в жёстком окружении наночастицы стабилизирует излучающее состояние, что приводит к увеличению как времени жизни, так и квантового выхода флуоресценции.

2.2.6. Биовизуализация наночастиц *in vitro* на клеточной линии 4T1

Для оценки клеточного поглощения и внутриклеточной локализации наиболее перспективных флуоресцентных систем проведены эксперименты *in vitro* на живых клетках мышинной карциномы молочной железы линии 4T1. Для этого исследования были выбраны наночастицы на основе флуорофоров **25** и **32** благодаря их высокой яркости и

фотостабильности. Лизосомы окрашивали коммерческим маркером *LysoTrackerRed DND-99* (50 нМ), который селективно накапливается в кислых компартментах.

После инкубации клеток с *LysoTrackerRed DND-99* и суспензиями наночастиц в физиологических условиях несвязавшиеся частицы удаляли трёхкратной промывкой фосфатным буфером. Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию в реальном времени проводили на инвертированном микроскопе Nikon A1RMP с лазером $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм (диапазон детектирования 425-475 и 500-550 нм для *PLGA-25* и *PLGA-32* соответственно) и лазером $\lambda_{\text{возб}} = 561$ нм (диапазон детектирования 570-620 нм для *LysoTrackerRed DND-99*). На рисунках 48 и 49 представлены флуоресцентные микрофотографии, демонстрирующие внутриклеточное распределение наночастиц *PLGA-25* и *PLGA-32* через 30 минут после введения.

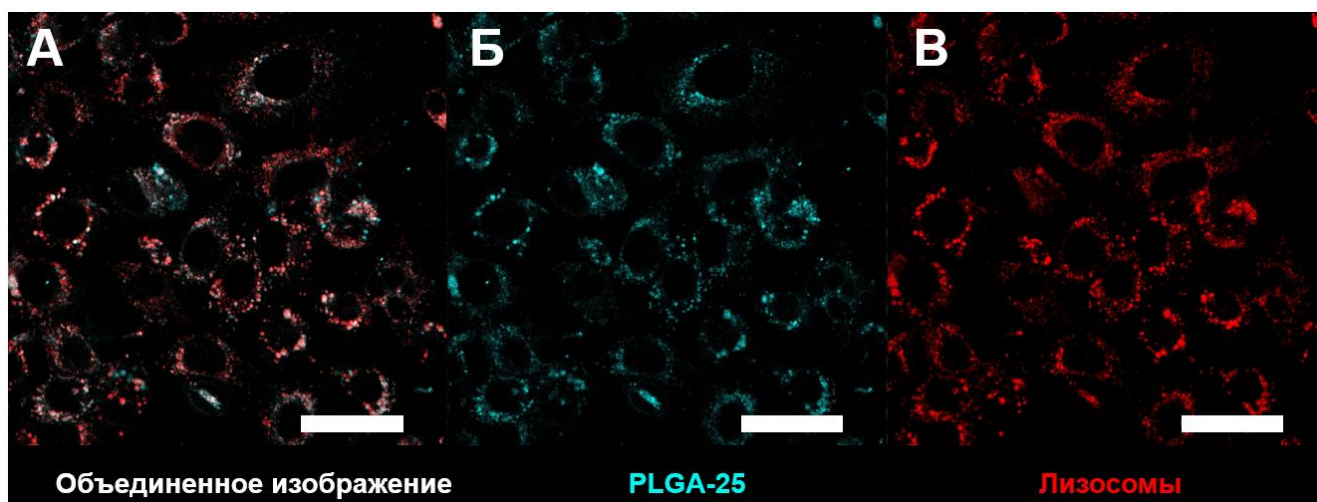


Рисунок 48 – Конфокальные изображения клеток 4Т1 после инкубации с наночастицами *PLGA-25*: А – объединенное изображение; Б – через 30 минут после инкубации с наночастицами *PLGA-25*; В – лизосомы клеток, окрашенные *LysoTracker Red DND-99*. Шкала – 50 мкм

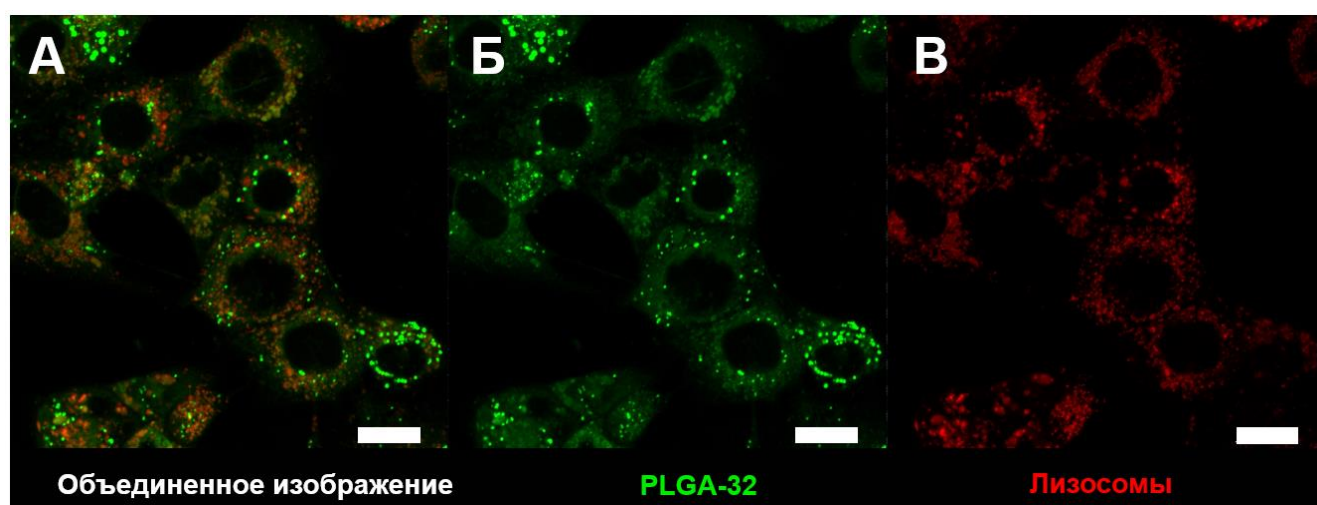


Рисунок 49 – Конфокальные изображения клеток 4Т1 после инкубации с наночастицами *PLGA-32*: А – объединенное изображение; Б – через 30 минут после инкубации с наночастицами *PLGA-32*; В – лизосомы клеток, окрашенные *LysoTracker Red DND-99*. Шкала – 20 мкм

Количественную оценку колокализации сигналов наночастиц и лизосом проводили с использованием коэффициента корреляции Пирсона (ККП) и коэффициента перекрытия Мандерса (КПМ). Эти коэффициенты служат для количественной оценки специфического для органелл накопления и путей проникновения. Для наночастиц *PLGA-25* значения ККП и КПМ составили 0,63 и 0,70; для *PLGA-32* – 0,68 и 0,72 соответственно. Полученные значения указывают на высокую степень колокализации с лизосомальными компартментами, что согласуется с механизмом интернализации *PLGA* наночастиц посредством эндоцитоза, опосредованного клатрином [143,144]. В ходе экспериментов не зафиксировано негативного влияния наночастиц на жизнеспособность клеток.

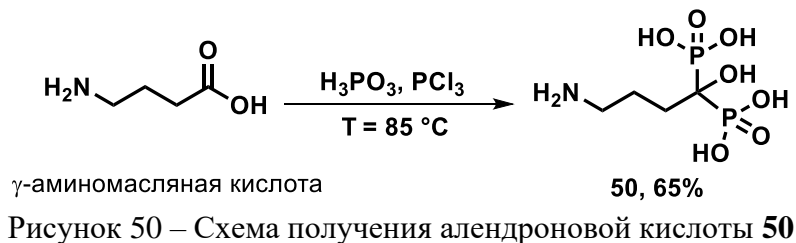
Отсутствие цитотоксичности в сочетании со стабильной флуоресценцией подчеркивает перспективность производных 1,8-нафталимида как основы для создания флуоресцентных систем адресной доставки, пригодных для изучения новых терапевтических агентов и визуализации клеточных процессов.

2.3. Производные 1,8-нафталимида, содержащие α -гидроксифосфонатную группу

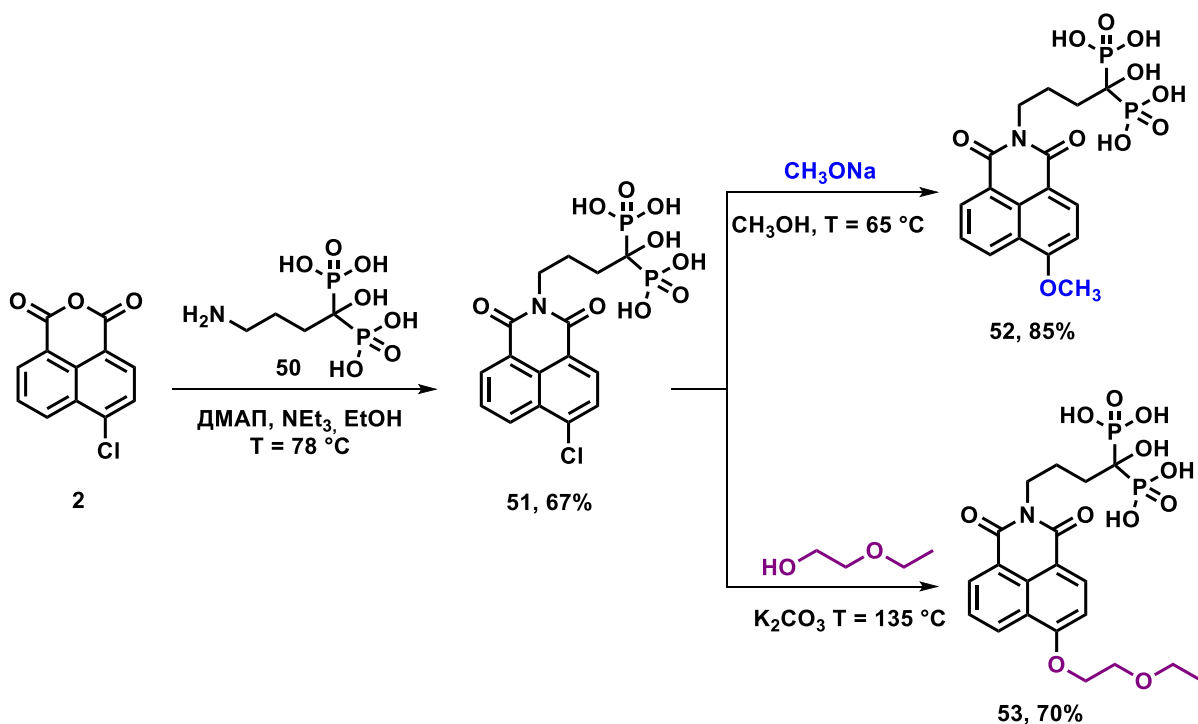
2.3.1. Синтез флуоресцентных бисфосфонатов на основе 1,8-нафталимида

Материал опубликован в работе [145]. Третий раздел диссертационного исследования посвящен синтезу флуоресцентных бисфосфонатов. Существует несколько подходов для введения бисфосфонатного фрагмента в структуру органического флуорофора. В научной литературе наиболее часто используют два варианта: (1) ацилирование первичной аминогруппы бисфосфоната карбоксильной группой красителя и (2) применение линкера на основе 3-аминопропеноксида для хемоселективного алкилирования гетероциклического атома азота аминоксифосфонатов [26]. Целевые продукты чаще всего требуют сложной очистки, заключающейся в использовании препаративной хроматографии, что существенно ограничивает выходы на уровне ~ 30% [27]. В настоящей работе предложены новые 4-метокси-, 4-этоксиэтил-, 4-(2-гидроксиэтилтио)-, 4-морфолинил-, 4-пиперазинил-замещенные 1,8-нафталимиды, содержащие α -гидроксифосфонатный фрагмент, получаемые ацилированием алендроновой кислоты. Новые соединения могут найти применение для флуоресцентной визуализации кальцификации тканей, отложений гидроксиапатита или метастазов костной ткани.

В качестве векторной компоненты использована 4-амино-1-гидроксипутан-1,1-бисфосфоная (алендроновая) кислота **50**. Её получали по реакции взаимодействия γ -аминомасляной кислоты с хлоридом фосфора (III) и фосфористой кислотой при температуре $T = 85^\circ\text{C}$, выход составил 65% (рисунок 50) [146].



На первом этапе работы для получения *O*-замещенных производных синтезировали 4-хлор-(*N*-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид **51** по реакции ацилирования алендроновой кислоты ангидридом **2** в присутствии триэтиламина и каталитических количеств 4-диметиламино-пиридина (ДМАП) в среде этилового спирта при кипячении (рисунок 51).



В ходе исследования было обнаружено, что реакция не протекает в отсутствие ДМАП, образующего с ацилирующим агентом реакционноспособный ацилпиридиновый интермедиат, впоследствии атакующий аминный субстрат. Выход соединения **51** составил 67%. Далее проводили реакцию нуклеофильного ароматического замещения между

4-хлорпроизводным **51** и метилатом натрия в метаноле при кипячении с получением 4-метокси-(*N*-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимида **52**. Для получения более гидрофильного бисфосфоната **53** в положение 4 ароматического кольца вводили этоксиэтильный заместитель по реакции соединения **51** с этилцеллозольвом в присутствии безводного карбоната калия; избыток этилцеллозольва служил одновременно и реагентом, и растворителем, что позволило отказаться от использования ДМФА (рисунок 51).

На следующем этапе работы получали *N*-замещенные 1,8-нафталимиды, содержащие бисфосфонатную группу (рисунок 52).

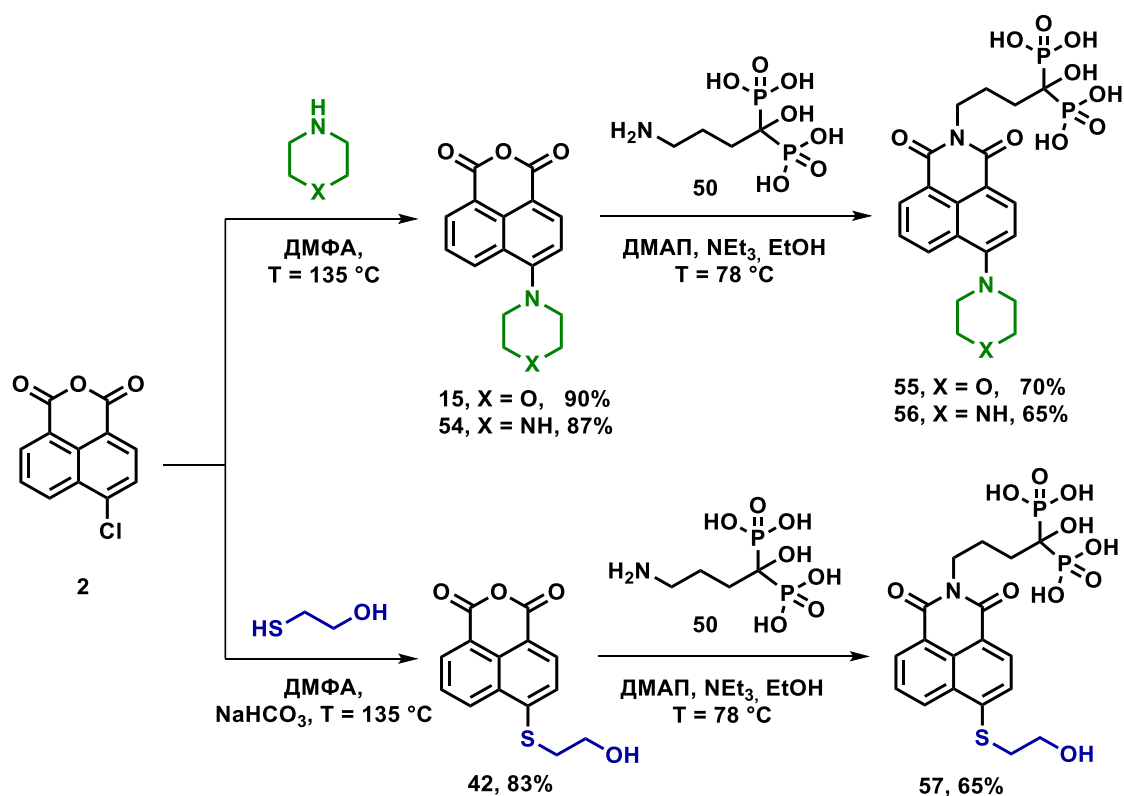


Рисунок 52 – Схема получения 1,8-нафталимидов **55-57**, содержащих α -гидробисфосфонатную группу

Для этого были использованы 4-морфолинил- и 4-пиперазинил-1,8-нафталевые ангидриды **15** и **54** соответственно. Ангидрид **15** был получен ранее в разделе 1.1; для получения **54** использовали 5-кратный избыток пиперазина, чтобы снизить вероятность образования бис-замещённого продукта (выход 87 %). Для получения *S*-замещённого производного был выбран 4-(2-гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид **42**, полученный в разделе 2.1. Ацилированием ангидридов **15**, **54** и **42** алендроновой кислотой в условиях, аналогичных описанным для **51**, получены бисфосфонаты **55-57**. Структура всех полученных продуктов подтверждена комплексом физико-химических методов анализа, спектры ЯМР ^1H и ^{31}P для соединения **55** в D_2O представлены на рисунке 53.

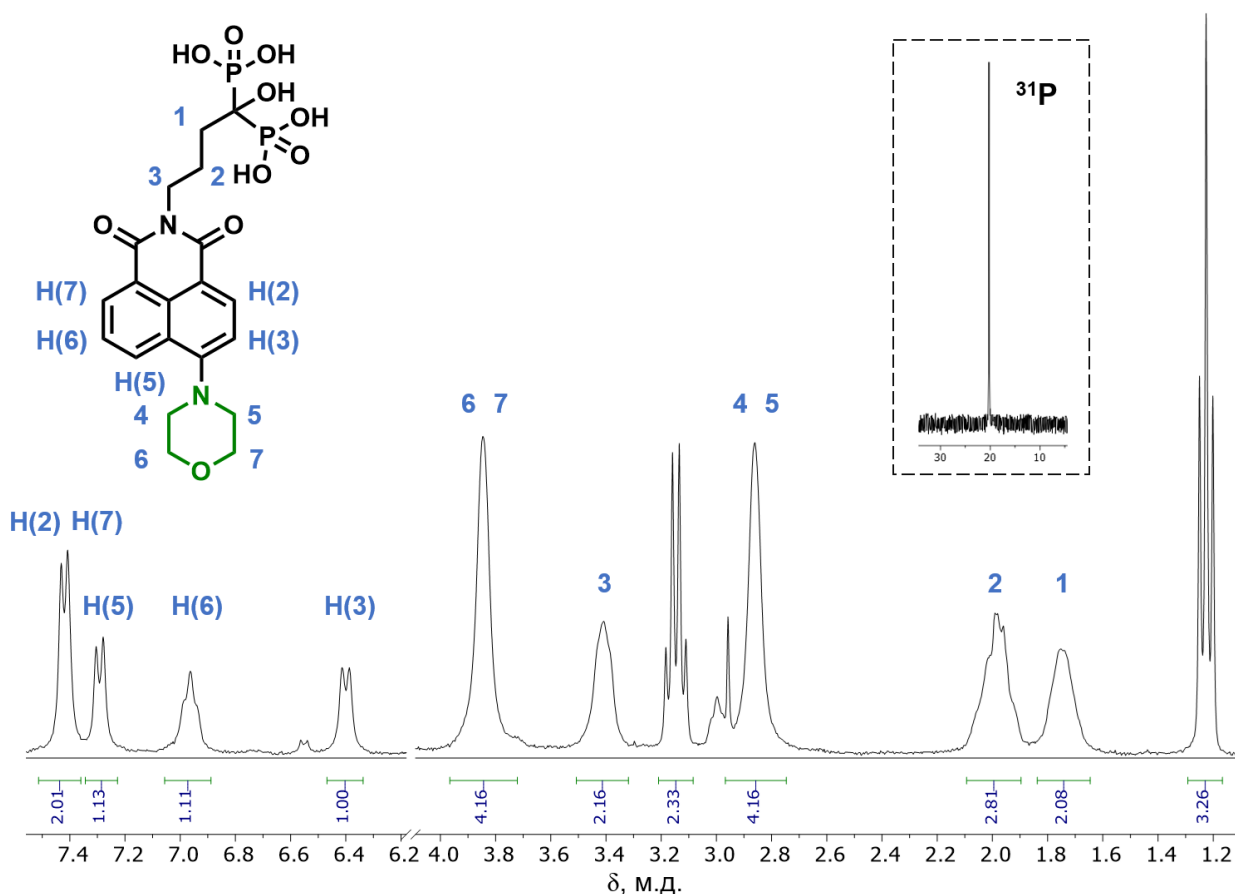


Рисунок 53 – Спектр ^1H -ЯМР и фрагмент спектра ^{31}P соединения **55** в D_2O

В работе были получены бисфосфонаты **52-53**, **55-57**, выходы которых составили 65-70%, что в 2-3 раза выше, чем в методиках, описанных ранее для таких классов флуоресцентных красителей, как ксантеновые [147] и полиметиновые [148].

Водорастворимость является ключевым требованием к флуоресцентным маркерам для биовизуализации. Она обеспечивает высокую интенсивность сигнала флуоресценции и минимизирует артефакты, связанные с агрегацией или неспецифическим связыванием с клеточными мембранами. Эти факторы критически важны для получения достоверных результатов при проведении *in vitro* и *in vivo* исследований в режиме реального времени. Синтезированные в настоящей работе 1,8-нафталимиды, содержащие α -гидробисфосфонатный фрагмент, обладают высокой растворимостью в воде, что выгодно отличает их от многих коммерчески доступных цианиновых красителей, склонных к агрегации в водных средах.

Спектрально-люминесцентные свойства всех полученных флуорофоров были изучены в водной среде. Соединения **52** и **53** характеризуются более коротковолновой полосой поглощения с максимумом в области 360-370 нм и эмиссией в области 450-460 нм, что соответствует синей области спектра. Производные **55-57** характеризуется более

длинноволновым максимумом поглощения в области 400-440 нм и максимумом флуоресценции при 500-560 нм, что соответствует зелёной области спектра. Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров приведены на рисунке 54 и в таблице 14.

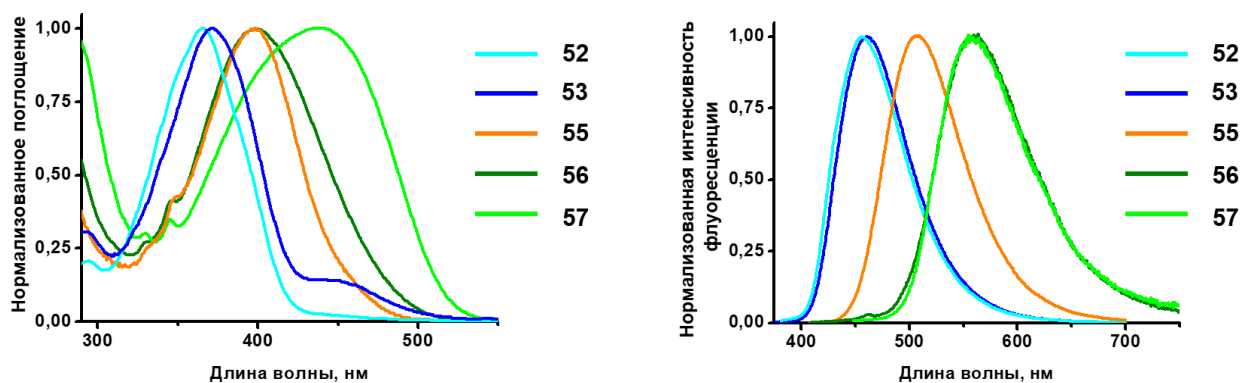


Рисунок 54 – Нормализованные спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) бисфосфонатов 52-53, 55- 57 в воде

Таблица 14 – Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров 52-53, 55-57 в воде, 25 °С

Флуорофор	$\lambda_{\text{погл}}^{\text{max}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\Phi_{\text{фл}}$, %
52	398	559	10 600	7,00
53	436	559	8 400	0,24
55	397	507	3 800	41,7
56	365	461	8 650	40,0
57	371	456	5 100	61,4

Квантовые выходы флуоресценции для *O*- и *S*-замещенных бисфосфонатов имеют на порядок большие значения, чем для *N*-замещенных производных. Данное различие может быть объяснено возникновением для последних скрученного состояния с внутримолекулярным переносом заряда – *TICT*-состояния, которое возникает вследствие свободного вращения морфолинового или пиперазинового заместителей в возбужденном состоянии относительно простой связи С-*N* в положении 4 нафталимидного ядра.

2.3.2. Получение систем адресной доставки на основе *PLGA*, модифицированного флуоресцентным бисфосфонатом 57

Как было отмечено ранее, введение свободной гидроксильной группы в структуру бисфосфоната 57 расширяет возможности его применения в новых смежных областях химико-биологических и биомедицинских исследований. В частности, возрастающий интерес для лечения заболеваний костной ткани представляют системы адресной доставки на основе синтетических полимеров [149]. Именно биосовместимый сополимер молочной

и гликолевой кислот (*PLGA*) является одним из основных носителей для получения наносомальных лекарственных форм, в том числе для лечения остеосаркомы [150,151]. Изучение влияния таких систем на уменьшение роста и объема опухоли может быть осуществлено с применением флуоресцентных методов анализа, в связи с чем получение новых флуоресцентных полимеров, обладающих тропностью к костной ткани и выступающих в качестве матрицы для загрузки лекарственных препаратов, является перспективной научной задачей.

В этой связи сначала осуществляли синтез конъюгата *PLGA* с бисфосфонатом **57** в условиях реакции Штеглица (рисунок 55). В качестве агента, активирующего карбоксильную группу полимера, выступал 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (*EDC*), катализатором реакции *O*-ацилирования служил 4-диметиламинопиридин (*DMAP*). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 48 ч в смеси растворителей хлористый метилен–диметилформамид. Продукт очищали методом экстракции водно-метанольной смесью, выделяли из гексана, что позволило получить полимер *PLGA-57* с выходом 86%. Бисфосфонат **57** сохранял свои спектрально-люминесцентные свойства в составе конъюгата *PLGA-57*, таблице 15.

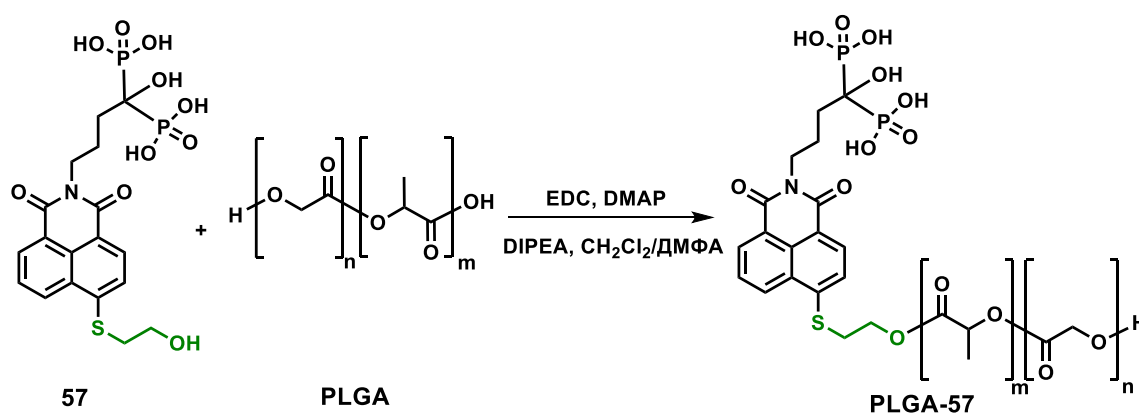


Рисунок 55 – Ковалентная модификация *PLGA* бисфосфонатом **57**

Таблица 15 – Спектрально-люминесцентные свойства **57** и наночастиц *PLGA-57*

	$\lambda_{max}^{полгл}$, нм		$\lambda_{max}^{фл}$, нм		Квантовый выход $\Phi_{фл}$, %	
	CH ₂ Cl ₂	DMCO	CH ₂ Cl ₂	DMCO	CH ₂ Cl ₂	DMCO
57	390	395	465	486	55,4	6,1
PLGA-57	390	395	466	487	47,7	9,5

Известно, что ковалентная модификация терминальных карбоксильных групп полимеров аминогруппой алендроновой кислоты придает конъюгату высокую аффинность к костной ткани [152,153], а инкапсуляция различных противоопухолевых агентов, таких как цисплатин, ифосфамид, доксорубицин или паклитаксел в наночастицы

обеспечивает их контролируемое высвобождение, достижение локального действия и снижение системной токсичности [154,155]. Стоит отметить, что сегодня интерес ученых направлен на поиск новых лекарственных форм, обладающих улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками, меньшим количеством побочных эффектов и низкой токсичностью [156].

В связи с этим в представленном исследовании разработана остеотропная система адресной доставки на основе *PLGA*, модифицированного флуорофором **57**, и загруженная доксорубицином гидрохлоридом (далее – *Dox*). Поскольку доксорубин в форме свободного основания обладает низкой растворимостью в воде, для его включения в наночастицы применяется гидрохлорид. Выбор этой фармацевтической субстанции обусловлен ее широким применением в химиотерапии остеосаркомы, рака молочной железы и лейкозов, однако высокая кардио- и гепатотоксичность требует создания препаратов с контролируемым высвобождением [157].

Для включения *Dox* в *PLGA* наночастицы существует несколько методов: наноосаждение, метод двойных эмульсий и ультразвуковой метод (УЗ) [158]. Среди перечисленных, последний представляет собой достаточно простой и эффективный способ, позволяющий достичь высокой степени загрузки лекарственного вещества [159]. При использовании УЗ метода были получены два типа наночастиц – плацебо (незагруженные лекарственным веществом) и с включенным доксорубином гидрохлоридом.

Для получения плацебо наночастиц были использованы следующие условия синтеза: (1) водная фаза – 2 % водный раствор поливинилового спирта (ПВС); (2) органическая фаза – раствор конъюгата *PLGA-57* в хлористом метиле (50 мг/мл); (3) мощность УЗ-гомогенизатора – 55 Вт (79% от максимальной мощности *Bandelin Sonopuls HD*), время обработки – 7 мин, импульсный режим – 3 с/1 с) [160,161]. В результате были получены наночастицы *PLGA-57*, характеризующиеся размером $d_{cp} \sim 150$ нм и индексом полидисперсности $PDI < 0,2$ (таблица 16). Наличие невыраженного максимума поглощения при $\lambda_{max}^{погл} \approx 402$ нм и максимума флуоресценции $\lambda_{max}^{фл} \approx 492$ нм свидетельствует о сохранении оптических свойств бисфосфоната в составе полимерной основы (рисунок 56).

Таблица 16 – Физико-химические и спектрально-люминесцентные свойства наночастиц **PLGA-57**

Наночастицы	Размер, нм	PDI	ζ -потенциал, мВ	$\lambda_{max}^{полгл}$, нм	$\lambda_{max}^{фл}$, нм
PLGA-57	152,7±1,1	0,11±0,02	-5,42±0,33	402	492

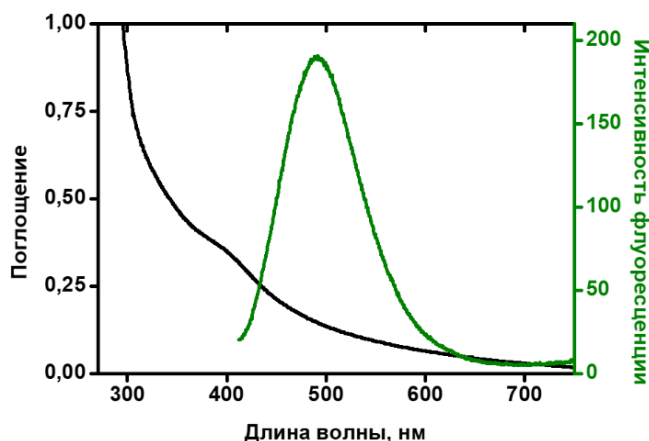


Рисунок 56 – Спектры поглощения и флуоресценции наночастиц **PLGA-57** в воде, $[PLGA-57] = 0,5$ мг/мл

Следующим этапом работы являлась инкапсуляции доксорубина гидрохлорида (*Dox*) в **PLGA** наночастицы, схема представлена на рисунке 57. Первая стадия заключалась в интенсивном перемешивании на встряхивателе типа “*Vortex*” в течение 2 мин раствора гидрохлорида доксорубина в 0,001 н HCl (концентрация 16,7 мг/мл) с раствором полимера **PLGA-57** в хлористом метиле (концентрация 83,3 мг/мл) для получения первичной эмульсии (W1/O, где W1 – водная фаза, O – органическая фаза). Далее её приливали к раствору 2% ПВС и перемешивали в течение 2 мин для получения грубой эмульсии (W1/O/W2). Используемое соотношение массы лекарственного вещества к массе полимера $m_{Dox} : m_{PLGA}$ (мкг/мг) = 100 используется в работе [162], поскольку позволяет достичь эффективности включения доксорубина гидрохлорида до 90%, что критически важно при разработке наносомальной формы.

УЗ-гомогенизация осуществлялась в условиях аналогичных описанным ранее для плацебо частиц. После удаления органической фазы на роторном испарителе, добавления криопротектора (D-маннит, концентрация 2,5 % об./об.) и лиофилизации были получены наночастицы размером $d_{cp} \sim 209$ нм и $PDI \sim 0,19$ (таблица 17).

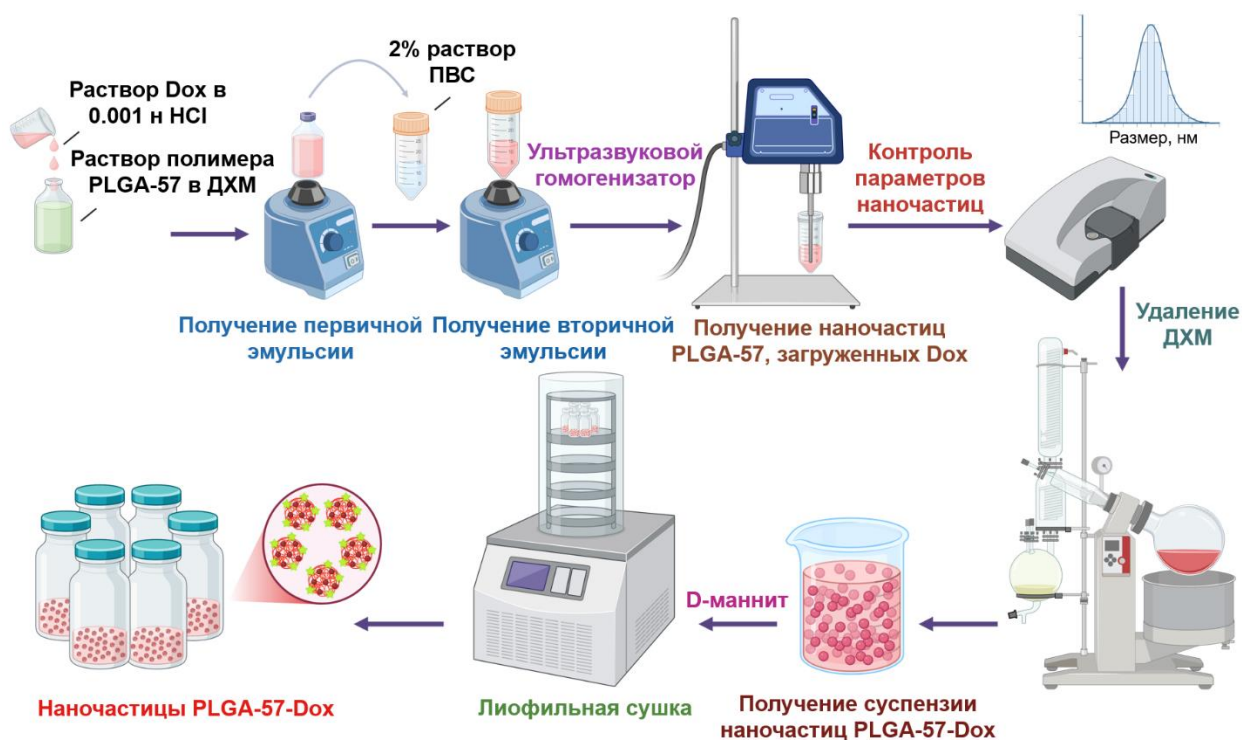


Рисунок 57 – Общая схема получения наночастиц *PLGA-57-Dox* ультразвуковым методом

Таблица 17 – Физико-химические и спектрально-люминесцентные свойства наночастиц *PLGA-57-Dox*

Наночастицы	Размер, нм	PDI	ζ -потенциал, мВ	$\lambda_{max}^{погл}$, нм	$\lambda_{max}^{фл}$, нм
<i>PLGA-57-Dox</i>	209,0 \pm 0,8	0,19 \pm 0,02	-5,63 \pm 0,41	480	600

Следует отметить, что использование ультразвукового гомогенизатора позволило получить наночастицы на основе *PLGA*, ковалентно модифицированного 1,8-нафталимидным флуорофором, с коллоидными свойствами (размер, полидисперсность, ζ -потенциал), сопоставимыми с показателями, достигаемыми альтернативными методами [163,164], что подтверждает эффективность данного подхода для инкапсуляции доксорубина гидрохлорида.

Для двух типов наночастиц были рассчитаны яркости образцов *B* на мг материала ($M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot mg^{-1}$) согласно формуле (1) (раздел 2.3). Для плацебо НЧ *PLGA-57* с учетом спектральных характеристик флуорофора **57** это значение составило $B_{(НЧ\ PLGA-57)} = 3,7 \cdot 10^{19} M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot mg^{-1}$. Для загруженных НЧ *PLGA-57-Dox* яркость составила $B_{(НЧ\ PLGA-57-Dox)} = 1,2 \cdot 10^{20} M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot mg^{-1}$ в пересчете на доксорубина гидрохлорид. Согласно расчётам, яркость наночастиц, загруженных лекарственным веществом, оказалась в 3 раза выше яркости плацебо наночастиц *PLGA-57*. На рисунке 58 представлены спектры НЧ *PLGA-57-Dox*, которые характеризуются выраженными полосами поглощения и

флуоресценции доксорубина гидрохлорида, что обусловлено его относительно высокой долей по отношению к доле модифицированного бисфосфоната **57** в составе наночастиц. Так, соотношение $m_{\text{флуорофор } 57}:m_{\text{PLGA}} = 20$ (мкг/мг), в то время как соотношение $m_{\text{Dox}} : m_{\text{PLGA-57}} = 100$ (мкг/мг).

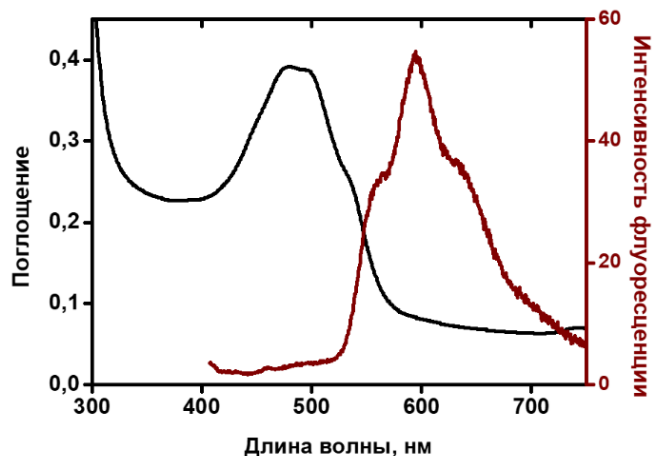


Рисунок 58 – Спектры поглощения и флуоресценции наночастиц *PLGA-57-Dox* в воде, $[PLGA-57-Dox] = 0,2$ мг/мл

Ключевыми характеристиками наночастиц как лекарственной формы являются нагрузка препарата (общее содержание активного вещества в наночастицах) и инкапсуляционная эффективность (доля препарата, успешно включённого в наночастицы относительно исходно загруженного количества). Для НЧ *PLGA-57-Dox* эти параметры определяли спектрофотометрически при $\lambda = 480$ нм. Для количественного определения общего содержания предварительно был построен калибровочный график доксорубина гидрохлорида в ДМСО (рисунок 59А).

Для определения свободного (неинкапсулированного) доксорубина в образце наночастицы ресуспендировали в воде, центрифугировали при ускорении $14000 \times g$, в течение 30 мин при $T = +5$ °С для полного осаждения нагруженных частиц и определяли количество доксорубина гидрохлорида в супернатанте с использованием калибровочного графика *Dox* в воде (рисунок 59Б). Отношение массы включенного *Dox* к общему его содержанию в НЧ позволило рассчитать эффективность инкапсуляции. Данный метод позволяет корректно оценить эти два параметра.

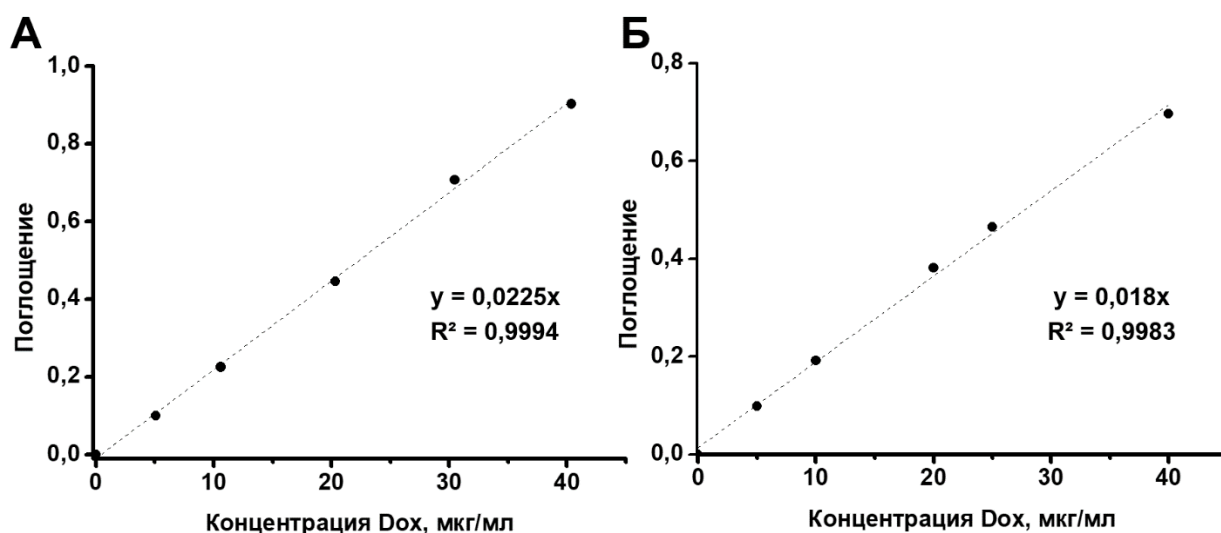


Рисунок 59 – А) Калибровочный график доксорубина гидрохлорида в ДМСО в диапазоне концентраций до 40,36 мкг/мл. Б) Калибровочный график доксорубина гидрохлорида в воде в диапазоне концентраций до 40,00 мкг/мл

Общее содержание доксорубина гидрохлорида составило 1,19 мг/флакон, а степень его включения – 81%. Концентрация полимера *PLGA-57* соответствовала 10 мг/мл. В работе Maksimenko O. [165] получены *PLGA* наночастицы, загруженные доксорубина гидрохлоридом, при соотношении $m_{Dox} : m_{PLGA} = 100$ (мкг/мг), степень его включения варьировалась в диапазоне 80-90%. Авторами были использованы два метода: микрофлюидный (на гомогенизаторе *M-110P*) и метод гомогенизации «под давлением» (на установке *EmulsiFlex C5*), требующие комплексного оборудования в отличие от ультразвукового способа.

Таким образом, впервые в мировой практике была получена остеотропная система адресной доставки на основе *PLGA*, ковалентно меченного производным 1,8-нафталимида, содержащим α -гидроксифосфонатный фрагмент. Воспроизводимость метода, высокая степень включения фармацевтической субстанции, возможность биовизуализации *in vitro* являются главными достоинствами полученной наносомальной формы для последующей разработки новых агентов для диагностики и лечения заболеваний костной ткани.

2.3.3. Визуализация распределения бисфосфоната 57, наночастиц *PLGA-57* и *PLGA-57-Dox* на клетках остеосаркомы *Saos-2*

Для оценки остеотропных свойств синтезированных производных 1,8-нафталимида, содержащих α -гидроксифосфонатную группу, и их конъюгатов с *PLGA* была

использована клеточная линия остеосаркомы *Saos-2*. Данная линия характеризуется остеобластоподобным фенотипом и способностью к минерализации внеклеточного матрикса *in vitro* [166]. Индукцию минерализации осуществляли путём культивирования клеток в остеогенной среде, содержащей аскорбиновую кислоту (кофактор гидроксилирования пролина, необходимый для синтеза коллагенового каркаса), дексаметазон (индуктор остеогенной дифференцировки через активацию транскрипционного фактора *RUNX2*) и β -глицерофосфат (источник неорганического фосфата для образования кристаллов гидроксиапатита) [167].

Экспериментальный дизайн предусматривал параллельное сравнение распределения и связывания флуорофоров и соответствующих наночастиц на двух типах культур: (а) недифференцированных клетках *Saos-2* (без остеоиндукции) и (б) дифференцированных клетках со сформированным минерализованным матриксом, содержащим гидроксиапатит. Такой подход позволяет однозначно оценить вклад бисфосфонатного фрагмента в селективное распознавание минерализованного матрикса.

Отсутствие флуоресцентного сигнала от исследуемых образцов недифференцированных клеток *Saos-2* свидетельствует о низкой способности к связыванию бисфосфоната **57** с клеточными структурами и его полному удалению при промывке средой после инкубации перед проведением визуализации. Напротив, в клетках, культивированных в остеогенной среде, наблюдалась эффективная интернализация флуорофора **57** с образованием локальных зон накопления (рисунок 60А-В). Согласно литературным данным [168] такие зоны могут соответствовать матриксным везикулам – структурам, инициирующим минерализацию матрикса на ранних этапах пролиферации клеток. Эти везикулярные структуры, образующиеся в клетках, служат центрами нуклеации гидроксиапатита, что обусловлено наличием в них аннексинов и переносчиков фосфата, способствующих первоначальному осаждению катионов кальция и фосфат-анионов [169].

Аналогичное поведение наблюдалась для соответствующих наночастиц *PLGA-57* (рисунок 60Г-Е), что, по-видимому, обусловлено экспонированием свободных бисфосфонатных групп на поверхности наночастиц, обеспечивающих их взаимодействие с кальцийсодержащими структурами.

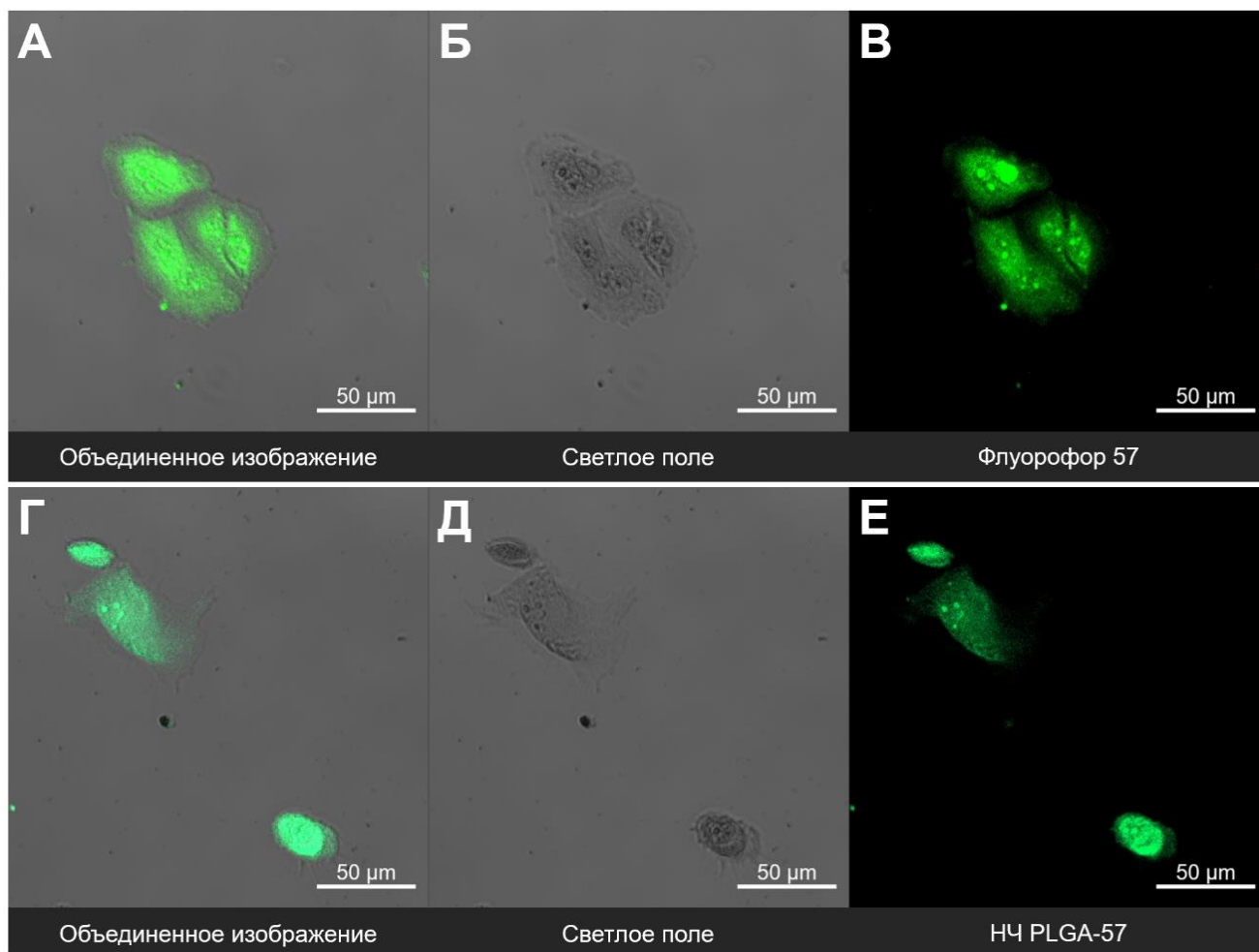


Рисунок 60 – Флуоресцентные изображения распределения флуорофора **57** (А-В) и наночастиц **PLGA-57** (Г-Е) на клеточной линии *Saos-2*. А – Объединенное изображение; Б – Светлое поле; В – Флуорофор **57** ($[57] = 20 \text{ мМ}$). Г – Объединенное изображение; Д – Светлое поле; Е – Наночастицы **PLGA-57** ($[PLGA-57] = 200 \text{ мкг/мл}$). Шкала – 50 мкм

В следующей серии экспериментов исследовано распределение наночастиц **PLGA-57-Dox**, загруженных доксорубицином. Суспензию наночастиц с концентрацией 200 мкг/мл инкубировали с дифференцированными клетками *Saos-2*, обработанными остеогенной добавкой. Установлено, что наночастицы **PLGA-57-Dox** также эффективно интернализировались клетками; при этом высвободившийся доксорубицин накапливался преимущественно в ядрах, тогда как полимерная матрица, содержащая бисфосфонатный фрагмент, связывалась с отложениями гидроксиапатита во внеклеточном матриксе (рисунок 61).

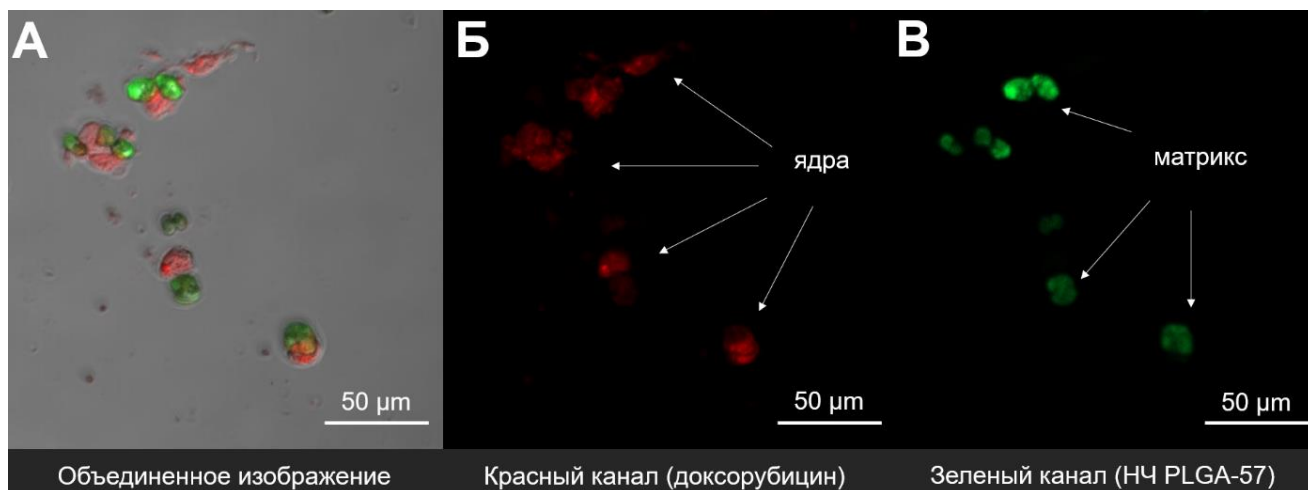


Рисунок 61 – Флуоресцентные изображения распределения наночастиц *PLGA-57-Dox* на клеточной линии *Saos-2*. А – Объединенное изображение; Б – Красный канал (доксорубицин); В – Зеленый канал (наночастицы *PLGA-57*). [*PLGA-57-Dox*] – 200 мкг/мл. Шкала – 50 мкм

Таким образом, в настоящей работе впервые экспериментально показано, что включение α -гидроксифосфонатного фрагмента в структуру 1,8-нафталиimidного флуорофора **57** и последующая конъюгация с полимерным носителем *PLGA* не нарушают его биохимической функции. Свободные бисфосфонатные группы сохраняют высокую аффинность к гидроксиапатиту как в структуре флуорофора, так и в составе полимерных наночастиц, обеспечивая селективное связывание с минерализованным внеклеточным матриксом. Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанные соединения могут служить полноценными остеотропными векторами для направленного транспорта к костной ткани.

Эти результаты формируют химическую и биологическую основу для создания нового поколения тераностических систем, объединяющих в единой платформе функции целевой доставки лекарственных агентов к минерализованным тканям и их флуоресцентной визуализации. Разработанный подход открывает перспективы для диагностики и терапии патологий костной ткани, включая остеосаркому, остеопороз и метастатические поражения скелета.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. 1,8-Нафталевый ангидрид, морфолин, пиперазин, β -маркаптоэтанол, малеиновый ангидрид, этилендиамин, 1,4-тетраметилендиамин, 1,6-гексаметилендиамин, тозилхлорид, малеиновый ангидрид, гидразин-гидрат (80%), γ -аминомасляная кислота, γ -пиколин, метилйодид, 4-(2-аминоэтил)морфолин, N,N-диметилэтилендиамин, метиловый спирт, этиловый спирт, этилцеллозольв, диметилформамид, уксусная кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), хлористый метилен, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), N-гидроксисукцинимид, N,N-диметиламинопиридин (ДМАП), диизопропилэтиламин (DIPEA), полимер PLGA (Resomer® RG 502 H, Lot# 170300516), поливиниловый спирт (9-10 кДа, гидролизован на 80%), D-маннит от компаний Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Evonik Röhm GmbH, Диа-М, ВЕКТОН, АО «ЭКОС-1» использовались без дополнительной очистки.

Спектры поглощения и флуоресценции регистрировали с использованием растворителей для спектроскопии (Aldrich, Acros). В качестве стандартов для определения квантовых выходов флуоресценции применяли пригодные для спектральных исследований кумарин 6, хинин сульфат, флуоресцеин и родамин Б (Sigma Aldrich, США).

Среда McCoy 5A, MEM, раствор L-глутамина, раствор антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В) приобретены у компании Хеликон, Россия. Раствор Версена, раствор Хэнкса, 1M раствор HEPES, фосфатный буфер (PBS), D-глюкоза, раствор трипсина в ЭДТА приобретены у компании ПанЭко, Россия. Коровья эмбриональная сыворотка производства BioSera, Франция. Бета-глицерофосфат, дексаметазон, аскорбиновая кислота приобретены у компании Sigma-Aldrich, США.

Клеточная линия рака молочной железы мыши 4T1 приобретена в ATCC® (кат. № CRL 2539) (США). Линия человеческой остеосаркомы Saos-2 (HTB-85) приобретена в ATCC® (США).

Методы. Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P регистрировали на спектрометрах компании Bruker с рабочей частотой 300, 400 МГц (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского ИОХ РАН), внутренний стандарт – тетраметилсилан. Использовали образцы соединений в дейтерированных растворителях – ДМСО- d_6 , CDCl_3 и D_2O . Химические сдвиги измеряли с точностью до 0,01 м.д., а КССВ – с точностью до 0,1 Гц.

Контроль реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F254.

Элементный состав образцов определяли на CHNS-анализаторе Vario EL Cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). В качестве стандартов использовались бензойная кислота, сульфаниловая кислота, ацетанилид, ацетонитрил и сульфаниламид.

Для записи ИК-спектров использовали Фурье-ИК-спектрометр Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с приставкой НПВО и дополнительным оборудованием.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Миллихром А-02 (ЭкоНова, Россия), оснащенный УФ-детектором и колонкой ProntoSIL-120-5-C18 (2x75 мм, зерно 5 мкм).

Гель-проникающую хроматографию проводили на высокоэффективном хроматографе Waters (Waters Corporation, США), оснащенный инжектором Rheodyne 7161, колоночной системой Styrogel HR 4E+5E, детекторами Milton Roy UV Spectromonitor 3100, рефрактометром Waters RI 2414 и программным обеспечением для сбора и обработки данных Z-lab. Система была откалибрована с использованием набора полистирольных стандартов Waters с молекулярной массой 600–500 000 Да.

Центрифугирование образцов осуществляли на лабораторной центрифуге с охлаждением Sigma 1-14K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия), а также на центрифуге Centrifuge 5418R (Eppendorf, Германия).

Упаривание растворителей проводили на роторном испарителе Hei-VAP Core (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия).

Для получения наночастиц использовали ультразвуковой гомогенизатор Bandelin SONOPULS HD 2070 (BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Германия).

Измерения размера наночастиц и дзета-потенциала проводили методом динамического рассеяния света с использованием системы Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания).

Электронные спектры поглощения записывали на сканирующем спектрофотометре модели UV-1800 (Shimadzu, Япония), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре модели RF-6000 (Shimadzu, Япония) при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Измерения времени жизни флуоресценции проводились с использованием модуля FLIM (Becker&Hickl, Германия), соединенного с лазерным сканирующим микроскопом LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение осуществлялось фемтосекундным

лазером Cameleon Ultra II (Coherent, США; ширина импульса 140 фс, частота повторения 80 МГц, $\lambda = 770$ нм). В состав установки FLIM входили система TCSPC (SPC 150), гибридный фотодетектор GaAsP HPM-100-07 и программное обеспечение SPCImage 8.0 (Becker&Hickl, Германия) для сбора данных и анализа затухания. Аппроксимацию затухания флуоресценции проводили одно-, двух- или трехкомпонентной экспонентой.

Конфокальная микроскопия в реальном времени проводилась с использованием инвертированного микроскопа Nikon A1R MP (Nikon, Япония), оснащенного лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 561 нм и объективами Plan Apo 20x/0.75 Dic N и Apo TIRF 60x/1.49 oil Dic. Максимальные проекции по оси Z были сделаны с использованием программного обеспечения NIS-Elements AR.

Для визуализации клеточной линии Saos-2 был использован инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Ti-S, оснащенный объективами 20x и 40x, камерой Andor Zyla 3.1 и кубиками фильтров GFP-3035D и TxRed-4040C (Semrock, США).

1. Синтез соединений к разделам 2.1, 3.1, 4.1²

4-Хлор-1,8-нафталевый ангидрид, 2. В концентрированном растворе NaOH (12,1 г в 330 мл воды) растворяли 1,8-нафталевый ангидрид **1** (20 г, 0,09 моль) при температуре 95°C. После охлаждения до 25°C к смеси медленно добавляли 70 мл раствора гипохлорита натрия с концентрацией активного хлора 140 г/дм³. Реакционную массу охлаждали до 0°C и подкисляли до значения pH среды 6-7 15%-ным раствором HCl. Далее доводили значение pH ~ 3-4 36%-ным раствором HCl. Образовавшийся осадок фильтровали, промывали водой (300 мл) и 5%-ым раствором карбоната натрия. Образовавшийся осадок сушили при 120°C в течение 8 часов. Получали 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид **2** в виде порошка серого цвета массой 17,1 г (выход 72%).

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆, 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 8.01-8.05 (дд, ³J₁=7,31, ³J₂=8,58, 1H), 8.06-8.08 (д, ³J=7.63, 1H), 8.43-8.45 (д, ³J=7.63, 1H), 8.58-8.66 (дд, ³J₁=7.31, ³J₂=8.58, 2H).

4-Бром-1,8-нафталевого ангидрид, 3. В 24 мл 4 М раствора NaOH растворяли 1,8-нафталевый ангидрид (4 г, 0,02 моль) при 95°C. Реакционную массу охлаждали до 0°C,

² Методики синтезов флуорофоров разработаны на кафедре ХТ БМП РХТУ им. Д. И. Менделеева совместно с д.х.н. Ощепковым М. С.

затем медленно по каплям добавляли молекулярный бром (1,54 мл, 0,03 моль) в течение 30 минут. Реакционную массу нагревали до 85-90°C и выдерживали 2,5 часа. После охлаждения до комнатной температуры, добавляли 10 мл 98 %-ной серной кислоты и кипятили 1,5 часа. Образовавшийся осадок фильтровали, промывали 30 мл холодной воды, 50 мл метанола, 30 мл диэтилового эфира. Полученный осадок перекристаллизовывали из ледяной уксусной кислоты и сушили при 120°C в течение 8 часов. Получали 4-бром-1,8-нафталевый ангидрид **3** в виде порошка серого цвета массой 3,33 г (выход 60 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 8.05 (дд, $^3J_1=7.5$, $^3J_2=7.9$, 1H), 8.27(д, $^3J = 7.51$, 1H), 8.37(д, $^3J = 7.5$, 1H), 8.62 (дд, $^3J_1=7.5$, $^3J_2=7.9$, 2H).

N-(2-Аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид, 6. В круглодонную колбу, снабженную термометром и магнитной мешалкой, добавляли этилендиамин (26,00 мл, 0,39 моль) и 80 мл хлористого метилена. Смесь охлаждали на ледяной бане до температуры $T = 0^\circ\text{C}$ и в течение 1 часа медленно по каплям добавляли раствор тозилхлорида (3,00 г, 15,72 ммоль) в дихлорметане (20 мл). Реакционную массу перемешивали 24 часа, после чего экстрагировали три раза водой (30 мл), органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, который затем отфильтровывали, растворитель удаляли на роторном испарителе. Получали продукт **6** в виде белых кристаллов массой 2,94 г (выход 89%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 2.41 (с, 3H), 2.81 (т, $J = 6.4$, 2H), 2.97 (т, $J = 5.2$, 2H), 3.12 (т, $J = 5.2$, 2H), 7.29 (д, $J = 7.96$, 2H), 7.75 (д, $J = 8.29$, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, CDCl_3 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.8, 41.1, 45.3, 127.3, 130.0, 136.9, 137.1, 143.6, 143.8.

4-Хлор-N-(2-аминоэтил)-4-метил-бензолсульфонамид-1,8-нафталимид (7). В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид **2** (1,81 г, 7,8 ммоль), N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид **6** (2 г, 9,35 ммоль) в 80 мл этилового спирта, после чего добавляли триэтиламин (0,75 мл). Реакционную массу перемешивали при 78 °C в течение 8 ч. После охлаждения образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали этиловым спиртом и сушили 5 ч при 60 °C. Получали продукт **7** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 2,62 г (выход 78 %).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 2.24 (с, 3H), 3.09 (т, $J = 6.4$, 2H), 4.09 (т, $J = 6.5$, 2H), 7.20 (д, $J = 8.1$, 2H), 7.56 (д, $J = 8.1$, 2H), 7.78 (т, $J = 6.3$, 1H), 8.06 – 7.93 (м, 1H), 8.35 (д, $J = 8.2$, 1H), 8.51 (д, $J = 7.2$, 1H), 8.51 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.3, 39.4, 42.6, 121.8, 122.8, 126.8, 128.3, 129.1, 129.3, 130.7, 130.9, 131.3, 131.4, 131.6, 132.4, 133.8, 137.3, 142.8, 164.2, 164.6.

4-Этилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид, 8. В двугорлой колбе, снабженной магнитной мешалкой, термометром и обратным холодильником, растворяли 4-хлор-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид (**7**) (0,5 г, 1,17 ммоль) в 10 мл диметилформамида и медленно добавляли этилендиамин (0,781 мл, 11,7 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 135 °С в течение 10 часов, протекание реакции отслеживали с помощью ТСХ, (хлористый метилен:этанол = 10:1). К реакционной массе добавляли 100 мл воды и удаляли ДМФА и избыток этилендиамина на роторном испарителе. Маслообразный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **8** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,41 г (выход 78 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 2.26 (с, 3H), 2.88 (т, $J = 6.5$, 2H), 3.03 (т, $J = 6.7$, 2H), 3.39 (т, $J = 6.5$, 2H), 4.07 (т, $J = 6.7$, 2H), 6.80 (д, $J = 8.7$, 1H), 7.22 (д, $J = 8.1$, 2H), 7.59 (д, $J = 8.2$, 2H), 7.68 – 7.65 (м, 1H), 8.21 (д, $J = 8.5$, 1H), 8.39 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.70 (д, $J = 8.4$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.5, 36.6, 40.1, 42.4, 43.1, 114.8, 117.9, 121.4, 126.5, 127.2, 129.6, 130.7, 131.5, 131.9, 132.3, 133.2, 137.3, 142.2, 156.4, 164.1, 164.5.

4-Тетраметилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид, 9. В двугорлой колбе, снабженной магнитной мешалкой, термометром и обратным холодильником, растворяли 4-хлор-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид (**7**) (0,4 г, 0,93 ммоль) в 10 мл диметилформамида и медленно добавляли 1,4-тетраметилендиамин (0,82 мл, 9,30 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 135 °С в течение 10 часов. Контроль реакции осуществляли с

применением ТСХ, система элюирования хлористый метилен:этанол = 10:1. К реакционной массе добавляли 100 мл воды и удаляли ее и ДМФА на роторном испарителе. Маслообразный продукт хроматографировали на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (0 – 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **9** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,40 г (выход 77 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 1.66 (м, 4H), 2.25 (с, 3H), 3.08 (квартет, $J = 6.8$, 2H), 3.39 (м, 2H), 3.50 (т, $J = 6.8$, 2H), 4.09 (т, $J = 6.7$, 2H), 6.77 (д, $J = 8.6$, 1H), 7.22 (д, $J = 8.3$, 2H), 7.59 (д, $J = 8.3$, 2H), 7.82 – 7.63 (м, 2H), 8.23 (д, $J = 8.0$, 1H), 8.40 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.71 (д, $J = 8.3$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.4, 27.0, 29.4, 41.7, 42.0, 42.9, 44.2, 114.9, 117.9, 121.6, 126.1, 127.2, 129.6, 130.7, 131.7, 131.9, 132.2, 133.2, 137.3, 142.2, 156.4, 164.3, 164.8.

4-Гексаметилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид, 10. В двугорлой колбе, снабженной магнитной мешалкой, термометром и обратным холодильником, растворяли 4-хлор-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид (**7**) (0,40 г, 0,93 ммоль) в 10 мл диметилформамида и медленно добавляли 1,6-гексаметилендиамин (1,08 г, 9,30 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 135 °С в течение 10 часов. Далее добавляли 100 мл воды и удаляли ее и ДМФА на роторном испарителе. Маслообразный продукт хроматографировали на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **10** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,35 г (выход 75 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 1.40 (м, 4H), 1.77 – 1.62 (м, 2H), 2.25 (с, 3H), 3.05 (м, 4H), 3.31 – 3.36 (м, 2H), 4.07 (т, $J = 6.7$, 2H), 6.75 (д, $J = 8.7$, 1H), 7.21 (д, $J = 8.0$, 2H), 7.59 (д, $J = 8.1$, 2H), 7.72 – 7.62 (м, 2H), 7.76 (т, 1H), 8.21 (д, $J = 8.5$, 1H), 8.38 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.69 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.5, 27.1, 27.5, 29.4, 30.6, 41.7, 42.1, 43.0, 44.2, 115.1, 118.2, 121.6, 126.1, 127.2, 129.6, 130.7, 131.6, 131.9, 132.2, 133.2, 137.3, 142.2, 155.3, 164.1, 164.6.

4-(N-Этилмалеимид)амино-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид, 12. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-этилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид (**8**) (0,10 г, 0,22 ммоль) в 10 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли малеиновый ангидрид (0,15 г, 1,55 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 118 °С в течении 12 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а к остатку приливали 15 мл холодной воды. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали продукт **12** в виде порошка коричневого цвета массой 0,11 г (выход 95 %).

Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆, 25,1°С, δ / м. д., J / Гц): 2.25 (с, 3H), 3.04 (квартет, J = 6.7, 2H), 3.61 (т, J = 5.8, 2H), 3.70 (д, J = 5.7, 2H), 4.07 (т, J = 6.7, 2H), 6.85 (д, J = 8.6, 1H), 7.03 (с, 1H), 7.22 (д, J = 8.0, 2H), 7.59 (д, J = 8.0, 2H), 7.75 – 7.65 (м, 2H), 7.87 (т, J = 6.0, 1H), 8.22 (д, J = 8.4, 1H), 8.37 (д, J = 7.3, 1H), 8.49 (д, J = 8.5, 1H).

Спектр ¹³C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО-d₆, 25,1°С, δ / м. д., J / Гц): 21.5, 37.6, 40.1, 42.4, 43.4, 109.1, 112.2, 121.4, 126.5, 127.2, 129.6, 130.7, 131.5, 131.9, 132.3, 133.2, 134.8, 137.3, 142.2, 156.4, 163.1, 163.6, 173.2.

Найдено (%): С, 60.98, Н, 4.61, N, 10.56; S, 5.97. C₂₇H₂₄N₄O₆S. Вычислено (%): С, 60.89; Н, 4.54; N, 10.52; S, 6.02.

4-(N-Тетраметилмалеимид)амино-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфон-амид-1,8-нафталимид, 13. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-тетраметилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид-1,8-нафталимид (**8**) (0,1 г, 0,21 ммоль) в 10 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли малеиновый ангидрид (0,143 г, 1,46 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 118 °С в течении 12 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а к остатку приливали 15 мл холодной воды. Выпавший осадок фильтровали и сушили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали продукт **13** в виде порошка коричневого цвета массой 0,10 г (выход 87 %).

Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆, 25,1°С, δ / м. д., J / Гц): 1.66 (м, 4H), 2.25 (с, 3H), 3.05 (квартет, J = 6.8, 2H), 3.36 (м, 2H), 3.47 (т, J = 6.8, 2H), 4.07 (т, J = 6.7, 2H), 6.76 (д, J = 8.6, 1H), 7.01 (с, 2H), 7.21 (д, J = 8.3, 2H), 7.59 (д, J = 8.3, 2H), 7.81 – 7.63 (м, 2H), 8.20 (д, J = 8.0, 1H), 8.38 (д, J = 7.3, 1H), 8.67 (д, J = 8.3, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.4, 26.2, 29.4, 38.7, 41.9, 42.7, 44.2, 112.2, 121.4, 126.5, 127.2, 129.6, 130.3, 131.5, 131.8, 132.3, 133.2, 134.5, 137.3, 142.2, 156.4, 163.4, 164.1, 173.3.

Найдено (%): С, 62.18, Н, 5.19, N, 10.01; S, 5.69. $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$. Вычислено (%): С, 62.13; Н, 5.03; N, 9.99; S, 5.72.

4-(N-Гексаметилмалеимид)амино-N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфон-амид-1,8-нафталимид, 14. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-гексаметилендиамин-N-(2-аминоэтил)-4-метил-бензолсульфон-амид-1,8-нафталимид (**10**) (0,1 г, 0,20 ммоль) в 10 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли малеиновый ангидрид (0,137 г, 1,40 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 118 °С в течении 12 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а к остатку приливали 15 мл холодной воды. Выпавший осадок фильтровали и сушили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали продукт **14** в виде порошка коричневого цвета массой 0,10 г (выход 90 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 1.40 (м, 4H), 1.77 – 1.62 (м, 2H), 2.25 (с, 3H), 3.05 (м, 4H), 3.31 – 3.36 (м, 2H), 4.07 (т, $J = 6.7$, 2H), 6.75 (д, $J = 8.7$, 1H), 7.01 (с, 2H), 7.21 (д, $J = 8.0$, 2H), 7.59 (д, $J = 8.1$, 2H), 7.72 – 7.62 (м, 2H), 7.76 (т, 1H), 8.21 (д, $J = 8.5$, 1H), 8.38 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.69 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 21.5, 26.2, 26.5, 29.4, 28.2, 37.8, 42.1, 43.0, 44.2, 112.2, 121.4, 126.5, 127.3, 129.7, 130.3, 131.4, 131.8, 132.6, 133.2, 135.1, 137.3, 141.7, 160.6, 163.9, 164.5, 173.6.

Найдено (%): С, 63.20, Н, 4.52, N, 9.49; S, 5.49. $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$. Вычислено (%): С, 63.25; Н, 5.48; N, 9.52; S, 5.45.

4-Морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид, 15. 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (1 г, 4,3 ммоль) суспендировали в 20 мл диметилформамида и добавляли морфолин (0,743 мл, 8,6 ммоль). Реакционную массу нагревали при 135 °С в течение 8 часов, охлаждали и добавляли 70 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 80 °С в течение 10 ч. Получали твердый продукт **15** оранжевого цвета массой 1,1 г (выход 90%).

Спектр ^1H ЯМР (300,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 3.22 (т, $J = 4.5$, 4H), 3.91 (т, $J = 4.5$, 4H), 7.32 (д, $J = 8.2$, 1H), 7.8 (т, $J = 8.1$, 1H), 8.39 (д, $J = 8.1$, 1H), 8.51 – 8.43 (м, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 55.3, 66.9, 114.9, 117.3, 120.6, 125.3, 130.7, 131.6, 132.6, 134.2, 135.4, 156.9, 160.4, 161.1.

Найдено (%): С, 67.79; Н, 4.58; N, 5.04. $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$. Вычислено (%): С, 67.84; Н, 4.63; N, 4.94.

4-Морфолинил-N-амино-1,8-нафталимид, 16. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид **15** (0,5 г, 1,77 ммоль) в 50 мл этилового спирта и добавляли 80%-ный раствор гидразин-гидрата (0,547 мл, 8,83 ммоль). Реакционную массу перемешивали при температуре 60 °С в течении 6 часов, охлаждали, образовавшийся осадок отфильтровывали и сушили при 70 °С в течение 5 часов. Получали продукт **16** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,427 г (выход 81 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 3.22 (т, $J = 4.5$, 4H), 3.90 (т, $J = 4.5$, 4H), 5.76 (с, 2H), 7.32 (д, $J = 8.3$, 1H), 7.79 (т, $J = 8.3$, 1H), 8.39 (д, $J = 8.0$, 1H), 8.54 – 8.43 (м, 2H).

4-Морфолинил-N-малеимидамино-1,8-нафталимид, 17. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, растворяли 4-морфолинил-N-амино-1,8-нафталимид (**16**) (0,18 г, 0,61 ммоль) в 10 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли малеиновый ангидрид (0,416 г, 4,24 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 118 °С в течении 12 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а к остатку приливали 15 мл холодной воды. Выпавший осадок фильтровали и сушили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Получали продукт **17** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,19 г (выход 82 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 3.30 (т, $J = 5.0$, 4H), 3.93 (т, $J = 4.5$, 4H), 7.41 (д, $J = 8.2$, 1H), 7.48 (с, 2H), 7.88 (т, $J = 8.0$, 1H), 8.50 (д, $J = 8.2$, 1H), 8.60 (дд, $^3J_1 = 8.4$, $^3J_2 = 7.3$, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 55.3, 66.9, 114.9, 116.6, 120.6, 125.3, 130.2, 130.7, 131.9, 132.6, 134.2, 135.4, 156.9, 160.4, 161.1, 170.1.

Найдено (%): С, 63.71, Н, 3.97, N, 11.09. $C_{20}H_{15}N_3O_5$. Вычислено (%): С, 63.66; Н, 4.01; N, 11.14.

4-Хлор-N-амино-1,8-нафталимид, 18. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-хлор-1,8-нафталеновый ангидрид (**2**) (1,2 г, 5,16 ммоль) в 50 мл этилового спирта и медленно по каплям добавляли 80%-ный раствор гидразин-гидрата (0,895 мл, 18,0 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 60 °С в течение 8 часов, охлаждали, образовавшийся осадок отфильтровывали и сушили 6 часов при 70 °С. Получали продукт **18** в виде порошка бледно-коричневого цвета массой 1,07 г (выход 84%).

Спектр 1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°С, δ / м. д., J / Гц): 5.78 (ш.с., 2H), 7.90 – 7.95 (м, 2H), 8.33 (д, $J = 7.7$, 1H), 8.48 (д, $J = 8.6$, 1H), 8.51 (д, $J = 7.4$, 1H).

4-Метокси-N-амино-1,8-нафталимид, 19. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, суспендировали 4-хлор-N-амино-1,8-нафталимид (**18**) (0,25 г, 1,01 ммоль) и метилат натрия (0,548 г, 10,1 ммоль) в 50 мл метилового спирта. Реакционную массу перемешивали при 65 °С в течение 10 часов, охлаждали, концентрировали и добавляли 20 мл холодной воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали метиловым спиртом, сушили при 60 °С в течение 6 часов. Получали продукт **19** в виде порошка серого цвета массой 0,19 г (выход 78%).

Спектр 1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°С, δ / м. д., J / Гц): $\delta = 4.11$ (с, 3H), 5.74 (ш.с., 2H), 7.30 (д, $J = 8.3$, 1H), 7.80 (т, $J = 7.9$, 1H), 8.56 – 8.31 (м, 3H).

4-Метокси-N-малеимидамино-1,8-нафталимид, 20. В круглодонной колбе, снабженной магнитной мешалкой и обратным холодильником, растворяли 4-метокси-N-амино-1,8-нафталимид (**19**) (0,1 г, 0,41 ммоль) в 10 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли малеиновый ангидрид (0,284 г, 2,89 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 118 °С в течении 12 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а к остатку приливали 15 мл холодной воды. Выпавший осадок фильтровали и сушили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Целевое соединение очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). Получали продукт **20** в виде порошка серого цвета массой 0,10 г (выход 74%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 4.17 (с, 3H), 7.40 (д, J = 8.5, 1H), 7.50 (с, 2H), 7.89 (т, J = 7.9, 1H), 8.68 – 8.54 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 56.4, 113.7, 120.7, 122.4, 125.9, 127.4, 128.5, 131.3, 133.2, 156.6, 162.2, 162.5, 167.4.

Найдено (%): С, 63.41, Н, 3.18, N, 8.67. $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено (%): С, 63.36; Н, 3.13; N, 8.69.

2-(2-Аминоэтил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 21. В круглодонной колбе суспендировали в 50 мл этилового спирта 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (0,20 г, 0,86 ммоль), добавляли этилендиамин (0,23 мл, 3,44 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 8 часов. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре холодным этанолом. Получали продукт **21** в виде порошка коричневого цвета массой 0,13 г (выход 56%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 2.77-2.86 (м, 2H), 4.00-4.10 (м, 2H), 7.94-8.03 (дд, $^3J_1=7,81$, $^3J_2=8,53$, 1H), 8.06-8.08 (д, $^3J=7.63$, 1H), 8.35-8.38 (д, $^3J=7.83$, 1H), 8.54-8.62 (дд, $^3J_1=7,34$, $^3J_2=8,08$, 2H).

2-(2-Аминопропил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 22. В круглодонной колбе суспендировали в 50 мл этилового спирта 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (0,20 г, 0,86 ммоль) и добавляли 1,3-диаминопропан (0,29 мл, 3,44 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 12 часов. Осадок фильтровали и промывали холодным этанолом. Получали продукт **22** в виде порошка коричневого цвета массой 0,16 г (выход 63 %).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.43 (с, 2H), 1.88–1.75 (м, 2H), 2.71 (т, J = 6.5, 2H), 4.15 (т, J = 6.9, 2H), 7.73–7.61 (м, 2H), 8.31 (д, J = 7.8, 1H), 8.39 (д, J = 8.3, 1H), 8.48 (д, J = 7.0, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 32.1, 37.8, 39.5, 121.3, 122.7, 127.2, 127.7, 128.7, 129.1, 130.3, 130.8, 131.9, 138.9, 163.3, 163.6.

2-(2-Аминобутил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 23. В круглодонной колбе суспендировали в 50 мл этилового спирта 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (0,20 г, 0,86 ммоль) и добавляли 1,4-тетраметилендиамин (0,34 мл, 3,44 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 8 часов. Осадок

фильтровали и промывали холодным этанолом. Получали продукт **23** в виде порошка коричневого цвета массой 0,16 г (выход 60%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.56 (м, 2H), 1.74 (дд, $J = 7.8$, 4H), 2.75 (т, $J = 6.9$, 2H), 4.22–4.07 (м, 2H), 7.85–7.72 (м, 2H), 8.43 (д, $J = 7.9$, 1H), 8.52 (д, $J = 8.3$, 1H), 8.59 (д, $J = 7.2$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 25.4, 31.1, 40.3, 41.8, 121.5, 122.9, 127.1, 127.8, 128.9, 129.3, 130.5, 131.1, 131.9, 139.0, 163.4, 163.8.

2-(2-Аминогексил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 24. В круглодонной колбе суспендировали в 50 мл этилового спирта 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (0,20 г, 0,86 ммоль) и добавляли 1,6-гексаметилендиамин (0,39 г, 3,44 ммоль). Реакционную массу перемешивали при $T = 78$ °C в течение 8 часов. Осадок фильтровали и промывали холодным этанолом. Получали продукт **24** в виде порошка коричневого цвета массой 0,19 г (выход 65%).

Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.18-1.42 (м, 8H), 2.86-3.10 (м, 2H), 4.02-4.09 (м, 2H), 7.94-8.03 (дд, $^3J_1=7.81$, $^3J_2=8.53$, 1H), 8.03-8.11 (д, $^3J=7.87$, 1H), 8.38-8.42 (д, $^3J=7.87$, 1H), 8.53-8.62 (дд, $^3J_1=7.34$, $^3J_2=8.07$, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, DMSO-d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 26.7, 27.4, 27.9, 30.7, 40.8, 41.9, 121.5, 122.9, 127.2, 127.8, 128.9, 129.5, 130.6, 131.2, 131.9, 139.2, 163.3, 163.9.

2-(2-Аминоэтил)-6-(2-этоксиэтил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 25. В круглодонной колбе, снабженной термометром и магнитной мешалкой, суспендировали в 10 мл ДМФА 2-(2-аминоэтил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (**21**) (0,40 г, 1,46 ммоль), K_2CO_3 (1,00 г, 7,30 ммоль) и добавляли 5 мл этилцеллозольва. Реакционную смесь перемешивали при 135°C в течение 10 часов. После охлаждения реакционной массы добавляли 100 мл воды и удаляли растворитель на роторном испарителе. Целевое соединение очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **25** в виде порошка светло-желтого цвета массой 0,29 г (выход 60%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, DMSO-d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.21-1.16 (м, 3H), 3.05 (т, 2H, $J=6,5$), 3.58-3.63 (м, 2H), 3.95-4.11 (м, 4H), 4.20 (м, 2H), 7.32 (д, $^3J=8.4$, 1H), 7,81 (дд, $^3J_1=8.3$, $^3J_2=7.4$, 1H), 8.37-8.48 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, DMCO-d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 15.2, 37.8, 54.6, 66.5, 69.7, 69.9, 117.3, 122.0, 122.8, 128.3, 128.8, 129.0, 129.8, 130.9, 131.3, 131.5, 132.4, 132.5, 132.8, 163.3, 163.8.

Масс-спектр (ИЭР), m/z : вычислено 328.4; найдено 329.6 $[\text{MH}]^+$. Найдено (%): С, 65.71, Н, 6.23, N, 8.93. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено (%): С, 65.84, Н, 6.14, N, 8.53.

2-(2-Аминопропил)-6-(2-этоксиэтил)-1*H*-бензо[de]изохинолин-1,3(2*H*)-дион, 26. В круглодонной колбе, снабженной термометром и магнитной мешалкой, суспендировали в 10 мл ДМФА 2-(2-аминопропил)-6-хлор-1*H*-бензо[de]изохинолин-1,3(2*H*)-дион (**22**) (0,40 г, 1,39 ммоль), K_2CO_3 (0,96 г, 6,95 ммоль) и добавляли 5 мл этилцеллозольва. Реакционную смесь перемешивали при 135°C в течение 10 часов. После охлаждения реакционной массы добавляли 100 мл воды и удаляли растворитель на роторном испарителе. Целевое соединение очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **26** в виде порошка желто-коричневого цвета массой 0,31 г (выход 65%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.21-1.16 (м, 3H), 2.04-2.10 (м, 2H), 3.05 (т, $J=6.5$, 2H), 3.60-3.66 (м, 2H), 3.93-4.10 (м, 4H), 4.23 (м, 2H), 7.03 (д, $J=8.4$, 1H), 7.68 (т, $J=7.4$, 1H), 8.50 (д, $J=8.2$, 1H) 8.55-8.63 (м, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 15.4, 32.2, 37.6, 39.6, 65.5, 68.7, 70.0, 108.9, 121.3, 127.1, 127.7, 128.7, 129.0, 130.2, 131.9, 138.9, 160.6, 163.9, 164.5.

Масс-спектр (ИЭР), m/z : вычислено 342.4; найдено 343.6 $[\text{MH}]^+$. Найдено (%): С, 66.78, Н, 6.54, N, 8.32. $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено (%): С, 66.65; Н, 6.48; N, 8.18.

2-(2-Аминобутил)-6-(2-этоксиэтил)-1*H*-бензо[de]изохинолин-1,3(2*H*)-дион, 27. В круглодонной колбе, снабженной термометром и магнитной мешалкой, суспендировали в 10 мл ДМФА 2-(2-аминобутил)-6-хлор-1*H*-бензо[de]изохинолин-1,3(2*H*)-дион (**23**) (0,40 г, 1,32 ммоль), K_2CO_3 (0,91 г, 6,60 ммоль) и добавляли 5 мл этилцеллозольва. Реакционную смесь перемешивали при 135°C в течение 10 часов. После охлаждения реакционной массы добавляли 100 мл воды и удаляли растворитель на роторном испарителе. Целевое соединение очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен

– этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **27** в виде порошка желто-коричневого цвета массой 0,27 г (выход 57%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.29 (м, 5H), 1.89 (м, 4H), 3.68 (квартет, $J = 7.3$, 2H), 3.98 (м, 3H), 4.25 (м, 4H), 4.43 (т, $J = 4.8$, 2H), 7.03 (д, $J = 8.5$, 1H), 7.68 (т, $J = 7.9$, 1H), 8.50 (д, $J = 8.2$, 1H), 8.54 – 8.62 (м, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, CDCl_3 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 15.5, 25.8, 29.3, 32.1, 39.6, 40.3, 65.8, 68.6, 69.2, 108.9, 121.3, 127.2, 127.7, 128.7, 129.0, 130.4, 131.9, 138.9, 160.2, 163.9, 164.4.

Масс-спектр (ИЭР), m/z : вычислено 356.4; найдено 357.3 $[\text{MH}]^+$. Найдено (%): С, 67.61; Н, 6.94; N, 8.01. $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено (%): С, 67.40; Н, 6.79; N, 7.86.

2-(2-Аминогексил)-6-(2-этоксиэтил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 28. В круглодонной колбе, снабженной термометром и магнитной мешалкой, суспендировали в 10 мл ДМФА 2-(2-аминогексил)-6-хлор-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (**24**) (0,40 г, 1,20 ммоль), K_2CO_3 (0,83 г, 6,04 ммоль) и добавляли 5 мл этилцеллозольва. Реакционную смесь перемешивали при 135°C в течение 12 часов. После охлаждения реакционной массы добавляли 100 мл воды и удаляли растворитель на роторном испарителе. Целевое соединение очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиентного элюирования смесью хлористый метилен – этанол (от 0 до 10 % спирта). После удаления растворителей получали продукт **28** в виде порошка желто-коричневого цвета массой 0,28 г (выход 60%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.21-1.16 (м, 3H), 1.66-1.36 (м, 6H), 2.77 (т, 2H, $J=6.5$), 3.64-3.57 (м, 2H), 3.96-4.13 (м, 4H), 4.20-4.23 (м, 2H), 7.33 (д, $^3J=8.4$, 1H), 7.82 (дд, $^3J_1=8.3$, $^3J_2=7.4$, 1H), 8.38-8.49 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 15.2, 26.4, 30.2, 30.7, 40.5, 42.8, 54.6, 66.5, 69.7, 69.9, 117.3, 122.0, 122.8, 128.3, 128.8, 129.0, 129.8, 130.9, 131.3, 131.5, 132.4, 132.5, 132.8, 163.4, 163.9.

Масс-спектр (ИЭР), m/z : вычислено 384.5; найдено 385.7 $[\text{MH}]^+$. Найдено (%): С, 69.11; Н, 7.46; N, 7.32. $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено (%): С, 68.73; Н, 7.34; N, 7.29.

2-(2-Аминоэтил)-6-морфолин-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 29. 4-Морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид (**15**) (0,50 г, 1,77 ммоль) суспендировали в 50 мл этилового спирта и добавляли этилендиамин (0,47 мл, 7,07 ммоль). Реакционную массу

перемешивали при 78 °С в течение 8 ч. После охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили при 80 °С. Получали продукт **29** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,38 г (выход 67%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 3.07 (т, 2H, $J=6.4$), 3.25-3.37 (м, 4H), 3.94-4.10 (м, 4H), 4.20 (м, 2H), 7.25 (д, $J=8,1$, 1H), 7.78 (дд, $^3J_1=7.9$, $^3J_2=7.8$, 1H), 8.42-8.54 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 40.6, 43.1, 53.5, 70.0, 115.1, 117.0, 123.2, 125.9, 126.1, 129.9, 130.2, 131.3, 132.7, 155.7, 164.2, 164.7.

2-(2-Аминопропил)-6-морфолин-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 30. 4-Морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид (**15**) (0,50 г, 1,77 ммоль) суспендировали в 50 мл этилового спирта и добавляли триметилендиамин (0,59 мл, 7,07 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили при 80 °С. Получали продукт **30** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,42 г (выход 70%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.95 (т, 2H, $J = 6.7$), 2.80 (т, 2H, $J = 6.7$), 3.23- 3.27 (м, 4H), 3.95-4.10 (м, 4H), 4.26 (т, 2H, $J = 6.6$), 7.26 (д, $J=8.1$, 1H), 7.77 (дд, $^3J_1=7.9$, $^3J_2=7.8$, 1H), 8.42-8.54 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 31.1, 39.3, 40.3, 53.5, 70.0, 115.1, 117.1, 123.2, 125.9, 126.1, 129.9, 130.2, 131.2, 132.6, 155.7, 164.1, 164.6.

2-(2-Аминобутил)-6-морфолин-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 31. 4-Морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид (**15**) (0,50 г, 1,77 ммоль) суспендировали в 50 мл этилового спирта и добавляли тетраметилендиамин (0,70 мл, 7,07 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили при 80 °С. Получали продукт **31** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,39 г (выход 62%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.54-1.58 (м, 2H), 1.78-1.82 (м, 2H), 2.82 (т, 2H, $J = 6.7$), 3.24- 3.27 (м, 4H), 3.95-4.09 (м, 4H), 4.26 (т, 2H, $J = 6.6$), 7.26 (д, $^3J_1=8.1$, 1H), 7,78 (дд, $^3J_1=7.9$, $^3J_2=7.8$, 1H), 8.42-8.54 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 25.4, 29.6, 39.9, 40.3, 53.5, 70.0, 115.1, 117.0, 123.1, 125.9, 126.2, 129.9, 130.4, 131.3, 132.7, 155.7, 164.1, 164.7.

2-(2-Аминогексил)-6-морфолин-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-1,3(2*H*)-дион, 32. 4-Морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид (**15**) (0,50 г, 1,77 ммоль) суспендировали в 50 мл этанола и добавляли гексаметилендиамин (0,82 г, 7,07 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили при 80 °С. Получали продукт **32** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,50 г (выход 75%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.66-1.36 (м, 6H), 1.68-1.83 (м, 2H), 2.63-2.77 (м, 2H), 3.37-3.20 (м, 4H), 4.05-3.95 (м, 4H), 4.21-4.16 (м, 2H), 7.25 (д, $J=8.2$, 1H), 7,78 (дд, $^3J_1=7.8$, $^3J_2=7.9$, 1H), 8.42-8.54 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 26.8, 27.3, 27.9, 30.6, 40.7, 41.8, 53.5, 70.1, 115.1, 117.1, 123.2, 125.9, 126.3, 129.9, 130.2, 131.2, 132.6, 155.7, 164.2, 164.6.

4-(6-Хлор-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановая кислота, 33. 4-Хлор-1,8-нафталевый ангидрид (**2**) (2,5 г, 10,75 ммоль) суспендировали в 50 мл этилового спирта, добавляли γ -аминомасляную кислоту (1,29 г, 12,90 ммоль) и триэтиламин (1,78 мл, 12,90 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали холодным этанолом и сушили при 80 °С в течение 6 часов. Получали продукт **33** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 2,45 г (выход 72%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 1.88 (дд, $^3J_1=6.7$, $^3J_2=6.9$, 2H), 2.31 (т, $J = 7.3$, 2H), 4.06 (т, $J = 6.9$, 2H), 7.91 – 8.03 (м, 2H), 8.30 – 8.41 (м, 2H), 8.46 – 8.56 (м, 2H), 12.03 (с, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 23.5, 31.8, 40.0, 122.3, 123.0, 128.6, 129.1, 129.4, 130.1, 131.2, 131.6, 131.9, 132.5, 163.3, 174.5.

4-(6-Этоксиптил-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановая кислота, 34. В круглодонной колбе, снабженной термометром и магнитной мешалкой, суспендировали в 30 мл этилцеллозольва 4-(6-хлор-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-

2(3*H*)-ил)бутановую кислоту (**33**) (0,35 г, 1,17 ммоль) и K₂CO₃ (0,89 г, 6,43 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 125°C в течение 12 часов. После охлаждения реакционной массы растворитель удаляли на роторном испарителе и к остатку добавляли 20 мл холодной воды. Выпавший осадок фильтровали, а затем сушили при 100°C. Получали продукт **34** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 0,44 г (выход 78%).

Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.17 (т, J = 7.0, 3H), 1.89 (п, J = 7.1, 2H), 2.30 (т, J = 7.3, 2H), 3.60 (квартет, J = 7.0, 2H), 3.90 (т, J = 4.5, 2H), 4.08 (т, J = 7.0, 2H), 4.46 (т, J = 4.6, 2H), 7.33 (д, J = 8.4, 1H), 7.83 (т, J = 7.8, 1H), 8.42 (т, J = 7.5, 1H), 8.57 – 8.47 (м, 2H).

Спектр ¹³C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО-d₆, 21°C, δ / м. д., J / Гц): 15.4, 23.4, 32.2, 41.3, 65.7, 68.5, 69.3, 108.9, 122.3, 128.6, 129.1, 129.4, 130.1, 131.6, 131.9, 132.5, 156.6, 163.9, 164.5, 174.7.

4-(6-Морфолин-1,3-диоксо-1*H*-бензо[de]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановая кислота, 35. 4-Морфолин-1,8-нафталеновый ангидрид (**15**) (0,50 г, 1,77 ммоль) суспендировали в 50 мл этилового спирта, добавляли γ-аминомасляную кислоту (0,20 г, 1,94 ммоль) и триэтиламин (0,27 мл, 1,94 ммоль). Реакционную массу нагревали при 78 °C в течение 8 часов. После ее охлаждения до комнатной температуры образовавшийся осадок фильтровали, промывали холодным этанолом, а затем сушили при 80 °C в течение 6 часов. Получали продукт **35** в виде порошка оранжевого цвета массой 0,52 г (выход 80%).

Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.87 (п, J = 7.2, 2H), 2.29 (т, J = 7.3, 2H), 3.21 (т, J = 4.5, 4H), 3.91 (т, J = 4.4, 4H), 4.06 (т, J = 6.9, 2H), 7.34 (д, J = 8.1, 1H), 7.79 (т, J = 7.9, 1H), 8.38 (т, J = 8.1, 1H), 8.46 (дд, J=8.5, 2H).

Спектр ¹³C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО-d₆, 21°C, δ / м. д., J / Гц): 23.5, 31.8, 40.0, 117.6, 122.3, 128.6, 129.1, 129.4, 130.1, 131.2, 131.6, 132.5, 155.3, 164.1, 164.6, 174.3.

1,4-Диметилпиридиния йодид, 37. К раствору γ-пиколина (1 г, 10,7 ммоль) в 4 мл хлористого метилена добавляли метилйодид (1 мл, 16,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Последующее добавление гексана приводило к выпадению осадка, который фильтровали и сушили. Получали продукт **37** в виде светло-желтых кристаллов массой 2,83 г (выход 95%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 2.59 (с, 3H), 4.26 (с, 3H), 7.95 (д, 2H, $J = 6.5$), 8.81 (д, 2H, $J = 6.5$).

4-(6-Гидрокси-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановая кислота, 38. 4-(6-хлор-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановую кислоту (**33**) (1,00 г, 3,15 ммоль) суспендировали в 15 мл диметилсульфоксида и добавляли NHS (0,40 г, 3,46 ммоль) и безводный K_2CO_3 (1,44 г, 10,40 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 90 °C в течение 4 часов. После охлаждения до комнатной температуры ее выливали в 90 мл холодной воды, медленно прибавляли 36%-ый раствор соляной кислоты, доводя значение pH = 5, в результате чего выпадал осадок, который фильтровали и сушили при 90 °C в течение 8 часов. Получали продукт **38** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 0,79 г (выход 85%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25,1°C, δ / м. д., J / Гц): 1.87 (т, $J = 7.3$, 2H), 2.29 (т, $J = 7.4$, 2H), 4.56 (ш.с., 1H), 4.07 (т, $J = 6.9$, 2H), 7.15 (д, $J = 8.1$, 1H), 7.76 (т, $J = 7.8$, 1H), 8.34 (д, $J = 8.0$, 1H), 8.46 (д, $J = 8.0$, 1H), 8.54 (д, $J = 8.4$, 1H), 11.87 (с, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 23.6, 31.8, 39.3, 110.3, 113.1, 122.2, 122.8, 125.9, 129.2, 129.6, 131.5, 133.9, 160.6, 162.5, 164.2, 170.1.

4-(5-Формил-6-гидрокси-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановая кислота, 39. К перемешиваемому при охлаждении раствору 4-(6-гидрокси-1,3-диоксо-1*H*-бензо[*de*]изохинолин-2(3*H*)-ил)бутановой кислоты (**38**) (0,24 г, 0,80 ммоль) в трифторуксусной кислоте (15 мл) добавляли гексаметиленetetрамин (0,56 г, 4,00 ммоль). После добавления реагентов реакционную массу нагревали до 72 °C. Ход реакции контролировали методом ТСХ. По окончании реакции смесь охлаждали и выливали в 80 мл холодной воды, доводя pH до 7 с помощью раствора 1 М NaOH. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 90 °C в течение 8 ч. Получали продукт **39** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 0,16 г (выход 61%).

Спектр ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.86 (п, $J = 7.3$, 2H), 2.29 (т, $J = 7.3$, 2H), 4.04 (т, $J = 6.9$, 2H), 7.81 (т, $J = 7.8$, 1H), 8.51 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.69 – 8.57 (м, 2H), 10.33 (с, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО- d_6 , 21°C, δ / м. д., J / Гц): 23.6, 31.8, 39.3, 110.3, 117.1, 122.2, 122.8, 126.9, 130.2, 131.5, 133.2, 133.9, 163.2, 163.7, 165.0, 170.1, 193.7.

(E)-4-(2-(2-(3-Карбоксипропил)-6-гидрокси-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-бензо[de]изохинолин-5-ил)винил)-1-метилпиридин-1-ия йодид, 40. К смеси 4-(5-формил-6-гидрокси-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)бутановой кислоты (39) (0,10 г, 0,31 ммоль) и 1,4-диметилпиридиния йодида (37) (0,15 г, 0,50 ммоль) в абсолютном этиловом спирте (10 мл) добавляли 20 мкл пиперидина. Реакционную смесь перемешивали при 78 °С в течение 6 часов. После охлаждения растворитель удаляли на роторном испарителе. Образовавшийся осадок бордового цвета фильтровали, сушили при 60 °С в течение 8 часов и дополнительно перекристаллизовывали из этанола. Получали продукт **40** в виде порошка бордового цвета массой 0,10 г (выход 58%).

Спектр ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.85 (п, J = 7.4, 3H), 2.27 (т, J = 7.4, 3H), 4.05 (т, J = 6.9, 2H), 7.42 (т, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 (д, J = 15.9, 1H), 7.97 (д, J = 6.7, 2H), 8.10 (д, J = 15.9, 1H), 8.26 (д, J = 7.4, 1H), 8.37 (с, 1H), 8.48 (д, J = 7.8, 1H), 8.52 (д, J = 6.6, 2H), 12.04 (с, 1H).

Спектр ¹³C ЯМР (100,61 МГц, ДМСО-d₆, 21°C, δ / м. д., J / Гц): 23.7, 31.9, 39.3, 46.3, 101.4, 116.8, 118.8, 121.5, 121.7, 123.0, 129.7, 130.8, 132.0, 132.5, 138.5, 142.7, 144.2, 155.6, 163.2, 164.6, 170.1.

4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид, 42. 4-хлор-1,8-нафталевый ангидрид (2) (2,32 г, 10,00 ммоль), β-меркаптоэтанол (1,00 мл, 15,00 ммоль) и гидрокарбонат натрия (0,84 г, 10,00 ммоль) растворяли в 30 мл ДМФА и перемешивали при 135 °С в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали и добавляли 50 мл холодной воды, что приводило к выпадению осадка, который фильтровали и сушили при 80 °С в течение 8 часов. Получали продукт **42** в виде порошка желтого цвета массой 2,27 г (выход 83%).

Спектр ¹H ЯМР (300,21 МГц, ДМСО-d₆, 26,7°C, δ / м. д., J / Гц): 3.40 (т, J = 6.4, 2H), 3.78 (т, J = 6.2, 2H), 5.19 (у.с., 1H), 7.81 (д, J = 8.0, 1H), 7.92 (т, J = 7.9, 1H), 8.37 (д, J = 8.0, 1H), 8.57 (дд, ³J₁=8.6, ³J₂=8.5, 2H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 34.6, 59.6, 115.2, 120.0, 123.2, 128.0, 129.1, 130.3, 131.2, 132.7, 133.3, 147.2, 160.9, 161.2.

Найдено (%): С, 60.95; Н, 3.84; S, 11.86. С₁₄Н₁₀О₄S. Вычислено (%): С, 61.31; Н, 3.67; S, 11.69.

6-((2-Гидроксиэтил)тио)-2-(2-морфолиноэтил)-1*H*-бензо[de]изохинолин-1,3(2*H*)-дион, 43. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (**42**) (0,20 г, 0,74 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл) и добавляли 4-(2-аминоэтил)морфолин (0,12 г, 0,96 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на роторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **43** в виде порошка светло-желтого цвета массой 0,17 г (выход 55%).

Спектр ¹H ЯМР (300,21 МГц, ДМСО-d₆, 26,7°C, δ / м. д., J / Гц): 2.46 (м, 4H), 2.56 (т, J = 7.0, 2H), 3.54 (м, 4H), 3.75 (м, 2H), 4.16 (т, J = 7.0, 2H), 5.15 (у.с., 1H), 7.75 (д, J = 8.2, 1H), 7.85 (т, J = 7.9, 1H), 8.33 (д, J = 7.9, 1H), 8.50 (м, 2H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 34.6, 42.5, 53.7, 55.6, 59.6, 65.7, 115.2, 120.1, 123.2, 128.1, 129.1, 130.2, 131.2, 132.7, 133.3, 147.2, 160.9, 161.2.

Найдено (%): С, 61.95; Н, 5.80; N, 7.30; S, 8.41. C₂₀H₂₂N₂O₄S. Вычислено (%): С, 62.16; Н, 5.74; N, 7.25; S, 8.30.

N-(2-(6-((2-Гидроксиэтил)тио)-1,3-диоксо-1*H*-бензо[de]изохинолин-2(3*H*)-ил)этил)-4-метилбензолсульфонамид, 44. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (**42**) (0,20 г, 0,74 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл) и добавляли N-(2-аминоэтил)-4-метилбензолсульфонамид (**6**) (0,20 г, 0,96 ммоль) и триэтиламин (0,13 мл, 0,096 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на роторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **44** в виде порошка желтого цвета массой 0,23 г (выход 67%).

Спектр ¹H ЯМР (300,21 МГц, ДМСО-d₆, 26,7°C, δ / м. д., J / Гц): 2.24 (с, 3H), 3.09 (т, J = 6.9, 2H), 3.37 (м, 2H), 3.76 (м, 2H), 4.09 (т, J = 6.6, 2H), 5.15 (у.с., 1H), 7.20 (д, J = 8.0, 2H), 7.57 (д, J = 8.1, 2H), 7.76 (д, J = 8.1, 1H), 7.86 (т, J = 7.9, 1H), 8.30 (д, J = 7.9, 1H), 8.46 (д, J = 7.3, 1H), 8.53 (д, J = 8.4, 1H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 21.5, 34.5, 42.5, 43.7, 59.6, 115.2, 120.1, 123.2, 127.4, 128.1, 129.1, 129.6, 130.2, 131.2, 132.7, 133.3, 138.1, 143.0, 147.2, 160.9, 161.2.

Найдено (%): С, 58.03; Н, 4.81; N, 6.03; S, 13.80. C₂₃H₂₂N₂O₅S₂. Вычислено (%): С, 58.71; Н, 4.71; N, 5.95; S, 13.63.

2-(2-(Диметиламино)этил)-6-((2-гидроксиэтил)тио)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 45. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (**42**) (0,20 г, 0,74 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл) и добавляли N,N-диметилэтилендиамин (0,1 мл, 0,96 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на роторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **45** в виде порошка желтого цвета массой 0,13 г (выход 50%).

Спектр ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 3.27 – 3.49 (м, 8H), 3.63 (т, J = 7.2, 2H), 3.68 – 3.80 (м, 2H), 4.46 (т, J = 7.1, 2H), 5.16 (у.с., 1H), 7.82 (д, J = 8.3, 1H), 7.92 (т, J = 8.2, 1H), 8.38 (д, J = 7.5, 1H), 8.59 (дд, ³J₁=8.6, ³J₂=7.5, 2H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 34.6, 42.6, 45.9, 55.0, 59.6, 115.2, 120.1, 123.2, 128.1, 129.1, 130.2, 131.2, 132.7, 133.3, 147.2, 160.9, 161.2.

Найдено (%): С, 62.39; Н, 5.74; N, 8.22; S, 9.37. C₁₈H₂₀N₂O₃S. Вычислено (%): С, 62.77; Н, 5.85; N, 8.13; S, 9.31.

2-(2-Аминоэтил)-6-((2-гидроксиэтил)тио)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 46. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (**42**) (0,30 г, 1,10 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл) и добавляли этилендиамин (0,67 мл, 1,10 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на роторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **46** в виде порошка желтого цвета массой 0,21 г (выход 58%).

Спектр ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 3.32 (м, 4H), 3.74 (т, J = 6.3, 2H), 4.45 (т, J = 6.2, 2H), 5.13 (у.с., 1H), 7.67 (д, J = 8.0, 1H), 7.78 (т, J = 7.9, 1H), 8.15 (д, J = 7.9, 1H), 8.32 (д, J = 7.3, 1H), 8.49 (д, J = 8.5, 1H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО-d₆, 25°C, δ / м. д., J / Гц): 34.6, 42.3, 54.8, 59.6, 115.3, 120.1, 123.1, 128.1, 129.2, 130.2, 131.3, 132.7, 133.3, 147.2, 160.9, 161.2.

Найдено (%): С, 60.83; Н, 4.97; N, 8.51; S, 10.02. C₁₆H₁₆N₂O₃S. Вычислено (%): С, 60.74; Н, 5.10; N, 8.85; S, 10.13.

2-(2-Аминогексил)-6-((2-гидроксиэтил)тио)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион, 47. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (**42**) (0,30 г, 1,10 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл) и добавляли гексаметилендиамин (0,13 г, 1,10 ммоль).

Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на ротаторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **47** в виде порошка желтого цвета массой 0,27 г (выход 65%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.64 – 1.35 (м, 6H), 1.67 – 1.82 (м, 2H), 2.61 – 2.75 (м, 2H), 3.09 (т, $J = 6.4$, 2H), 3.69 – 3.81 (м, 2H), 4.21 – 4.16 (м, 2H), 5.14 (у.с., 1H), 7.66 (д, $J = 8.0$, 1H), 7.78 (т, $J = 7.9$, 1H), 8.16 (д, $J = 7.8$, 1H), 8.31 (д, $J = 7.2$, 1H), 8.49 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 26.9, 27.3, 28.5, 30.8, 34.5, 40.3, 42.7, 59.6, 115.2, 120.1, 123.2, 128.1, 129.1, 130.1, 131.2, 132.8, 133.4, 147.2, 161.2, 161.6.

Найдено (%): С, 66.59; Н, 6.44; N, 7.47; S, 8.68. $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Вычислено (%): С, 64.49; Н, 6.49; N, 7.52; S, 8.61.

4-(6-((2-Гидроксиэтил)тио)-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)бутановая кислота, 48. 4-(2-Гидроксиэтилтио)-1,8-нафталеновый ангидрид (**42**) (0,20 г, 0,74 ммоль) суспендировали в этаноле (20 мл), добавляли γ -аминомасляную кислоту (0,09 г, 0,88 ммоль) и триэтиламин (0,12 мл, 0,88 ммоль). Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 6 ч. После охлаждения смесь упаривали на ротаторном испарителе, выпавший осадок отфильтровывали и сушили при 65 °С в течение 6 ч. Получали продукт **48** в виде порошка желтого цвета массой 0,24 г (выход 60%).

Спектр ^1H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.88 (дд, $^3J_1=6.7$, $^3J_2=6.9$, 2H), 2.31 (т, $J = 7.3$, 2H), 3.12 (т, $J = 6.4$, 2H), 3.72 – 3.83 (м, 2H), 4.06 (т, $J = 6.9$, 2H), 5.16 (у.с., 1H), 7.67 (д, $J = 8.0$, 1H), 7.77 (т, $J = 7.9$, 1H), 8.17 (д, $J = 7.8$, 1H), 8.31 (д, $J = 7.2$, 1H), 8.49 (д, $J = 8.5$, 1H), 11.88 (с, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, ДМСО- d_6 , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 23.6, 33.0, 34.6, 42.1, 59.6, 115.2, 120.1, 123.3, 128.1, 129.2, 130.2, 131.2, 132.7, 133.3, 147.3, 162.8, 163.2, 173.1.

Найдено (%): С, 59.99; Н, 4.81; N, 3.89; S, 8.89. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S}$. Вычислено (%): С, 60.16; Н, 4.77; N, 3.90; S, 8.92.

4-Амино-1-гидроксибутан-1,1-бисфосфоновая кислота, 50. В расплав фосфористой кислоты (8,2 г, 0,1 моль) порционно вносили γ -аминомасляную кислоту (8,58 г, 0,08 моль) и перемешивали в течение 25 мин, после чего медленно по каплям

добавляли хлорид фосфора (III) (14,50 мл, 0,08 моль) в течение 1 часа. Реакционную массу перемешивали при 85 °С в течение 4 часов, затем охлаждали до комнатной температуры и медленно добавляли 100 мл воды. Реакционную массу нагревали при 100 °С в течение 8 часов, мелкодисперсный осадок отфильтровывали, фильтрат охлаждали и разбавляли этанолом в 10 раз (по объему). Образующийся осадок белого цвета отфильтровывали, сушили при $T = 90$ °С в течение 7 часов. Получено 16,19 г (65 %) соединения **50**.

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°С, δ / м. д., J / Гц): 1.74-1.97 (м, 4H), 2.63-2.96 (м, 2H).

Спектр ^{31}P ЯМР (121,49 МГц, D_2O , 25°С, δ / м. д.): $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$: 18.9 (с, P-C-P).

4-Пиперазинил-1,8-нафталевый ангидрид, 54. 4-Хлор-1,8-нафталевый ангидрид **2** (0,93 г, 4 ммоль) и пиперазин (1,72 г, 20 ммоль) суспендировали в 30 мл ДМФА и выдерживали при 135 °С в течение 4 часов. Реакционную массу охлаждали и добавляли 50 мл холодной воды, что приводило к выпадению осадка, который фильтровали и перекристаллизовывали из этилового спирта. Получали продукт **54** в виде кристаллов оранжевого цвета массой 0,98 г (выход 87%).

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, DMSO-d_6 , 26,7°С, δ / м. д., J / Гц): 3.16 (м, 8H), 7.18 (д, $J = 8.5$, 1H), 7.76 (д, $J = 7.6$, 1H), 8.31 (д, $J = 8.4$, 1H), 8.45 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.57 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, DMSO-d_6 , 25°С, δ / м. д., J / Гц): 44.8, 53.3, 108.4, 113.2, 119.3, 124.1, 125.5, 132.9, 133.0, 133.7, 134.8, 157.8, 164.1, 164.6.

Найдено (%): С, 68.16; Н, 5.10; N, 9.73. $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$. Вычислено (%): С, 68.08; Н, 5.00; N, 9.92.

Общая методика получения 4-замещенных-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимидов 51, 55-57

К суспензии 4-замещенного 1,8-нафталевого ангидрида (1 экв.) в 50 мл этилового спирта добавляли заранее приготовленную смесь 4-амино-1-гидроксипропил-1,1-бисфосфоновой кислоты (1 экв.), N,N-диметиламино-пиридина (0,083 экв.), 1,5 мл этилового спирта, триэтиламина (10 экв.) и 1 мл воды. Реакционную массу перемешивали при 78 °С в течение 7 часов, охлаждали и доводили значение pH = 4-5 концентрированной соляной кислотой. Осадок фильтровали и сушили при 80 °С в течение 8 часов.

4-Хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид (**51**), выход 67%.

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.98 – 1.63 (м, 4H), 3.72 (м, 2H), 7.28 (д, $J = 7.8$, 1H), 7.35 (т, $J = 7.9$, 1H), 7.64 (д, $J = 8.0$, 1H), 7.85 (м, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, D_2O , 20°C, δ / м. д., J / Гц): 22.2, 30.6, 39.9, 73.6 (т, $J_{\text{C,P}}=134.25$, $-\text{C}(\text{OH})$), 119.2, 120.1, 125.9, 127.9, 128.2, 130.4, 130.6, 130.9, 131.8, 133.1, 163.5, 163.7.

Спектр ^{31}P ЯМР (161,98 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д.): $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$: 18.3 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 41.40; Н, 3.45; N, 3.07. $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_9\text{P}_2$. Вычислено (%): С, 41.44; Н, 3.48; N, 3.02.

4-Морфолинил-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид (**55**), выход 70%.

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.83-2.03 (м, 4H), 3.16-3.31 (м, 4H), 3.85-3.97 (м, 4H), 3.97-4.09 (м, 2H), 7.36 (д, $^3J=7.9$, 1H), 7.82 (дд, $^3J_I=7.9$, $^3J_I=7.8$, 1H), 8.41 (д, $^3J=7.9$, 1H), 8.44-8.57 (м, 2H).

Спектр ^{13}C ЯМР (75,50 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 22.0, 27.9, 39.6, 51.2, 66.2, 75.2 (т, $J_{\text{P-C-P}}=130.1$ $-\text{C}(\text{OH})$), 115.1, 115.9, 122.6, 125.2, 126.2, 129.1, 130.5, 130.6, 132.2, 155.4, 163.1, 163.6.

Спектр ^{31}P ЯМР (121,49 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д.): 20.2 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 46.65; Н, 4.80; N, 5.39. $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2$. Вычислено (%): С, 46.70; Н, 4.70; N, 5.45.

4-Пиперазинил-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид (**56**), выход 65%.

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 2.01 – 1.68 (м, 4H), 2.98 (м, 8H), 3.70 (м, 2H), 6.76 (д, $J = 8.6$, 1H), 7.30 (т, $J = 8.2$, 1H), 7.69 (д, $J = 8.4$, 1H), 7.88 (д, $J = 7.3$, 1H), 8.03 (д, $J = 8.5$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, D_2O , 20°C, δ / м. д., J / Гц): 22.6, 34.6, 42.8, 46.1, 46.2, 50.3, 50.5, 76.3 ($J_{\text{C,P}}=134.22$, $-\text{C}(\text{OH})$), 113.8, 124.2, 124.8, 125.2, 127.2, 127.5, 128.2, 130.3, 130.5, 150.2, 163.5, 163.9.

Спектр ^{31}P ЯМР (121,73 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д.): $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$: 18.4 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 46.74; Н, 4.87; N, 8.25. $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_2$. Вычислено (%): С, 46.79; Н, 4.91; N, 8.19.

4-(2-Гидроксиэтилтио)-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафтали-мид (**57**), выход 65%.

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.80 (м, 2H), 1.97 (м, 2H), 2.99 (м, 2H), 3.56 (м, 2H), 3.82 (м, 2H), 6.61 (д, $J = 8.0$, 1H), 6.95 (т, $J = 7.9$, 1H), 7.24 (д, $J = 8.0$, 1H), 7.33 (д, $J = 8.3$, 1H), 7.49 (д, $J = 7.2$, 1H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,61 МГц, D_2O , 20°C, δ / м. д., J / Гц): 22.8, 34.5, 36.6, 42.9, 60.4, 76.1 ($J_{\text{C,P}}=134.20$, -C(OH), 123.4, 125.2, 127.4, 127.6, 128.2, 129.1, 130.3, 130.7, 131.8, 134.3, 163.3, 163.7.

Спектр ^{31}P ЯМР (121,49 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д.): 19,3 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 42.71; Н, 4.23; N, 3.32; S, 5.80. $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}\text{P}_2\text{S}$. Вычислено (%): С, 42.78; Н, 4.19; N, 2.77; S, 6.34.

4-Метокси-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид, 54. 4-хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид (**51**) (0,3 г, 0,65 ммоль) суспендировали в метаноле (10 мл) и медленно добавляли свежеприготовленный раствор метилата натрия (0,37 г, 6,9 ммоль) в 20 мл безводного метанола. Реакционную массу перемешивали при 65 °С в течение 8 часов, охлаждали и подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH = 4-5. Приливали 50 мл метанола, образующийся осадок фильтровали, промывали смесью метанол-вода (9:1 об./об.), сушили при 60 °С в течение 8 часов. Получали продукт **52** в виде порошка светло-коричневого цвета массой 0,25 г (выход 85%).

Спектр ^1H ЯМР (300,21 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д., J / Гц): 1.48 (м, 4H), 3.54 (м, 2H), 3.66 (с, 3H), 6.84 (д, $^3J=8.4$, 1H), 7.34 (дд, $^3J_1=8.3$, $^3J_2=7.5$, 1H) 7.93-8.08 (м, 3H).

Спектр ^{13}C ЯМР (100,24 МГц, D_2O , 22°C, δ / м. д., J / Гц): 25.4, 27.5, 40.6, 57.1, 74.3 (т, $J_{\text{C,P}}=130,11$, -COH), 106.4, 111.5, 119.1, 121.8, 126.6, 126.7, 127.3, 130.1, 132.4, 157.7, 162.2, 163.3.

Спектр ^{31}P ЯМР (121,49 МГц, D_2O , 25°C, δ / м. д.): 18,4 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 44.42; Н, 4.20; N, 3.01. $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_{10}\text{P}_2$. Вычислено (%): С, 44.46; Н, 4.17; N, 3.05.

4-Этоксипропил-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид, 53. 4-Хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимид (**51**) (0,2 г, 0,43 ммоль), карбонат калия K_2CO_3 (0,6 г, 0,43 ммоль) суспендировали в 30 мл этилцеллозольва.

Реакционную массу перемешивали при 125 °С в течение 8 часов. После охлаждения до комнатной температуры доводили значение рН = 4-5 концентрированной соляной кислотой. Приливали 50 мл метанола, образующийся осадок фильтровали, промывали смесью метанол-вода (9:1 об./об.), сушили при 60 °С в течение 8 часов. Получали продукт **53** в виде порошка коричневого цвета массой 0,16 г (выход 70%).

Спектр ¹H ЯМР (300,21 МГц, D₂O, 25°С, δ / м. д., J / Гц): δ = 1.30 (т, J = 7.0, 2H), 1.95 (м, 4H), 3.79 (квартет, J = 7.1, 3H), 3.91 (м, 2H), 4.05 (м., 2H), 4.30 (м, 2H), 7.57 (м, 2H), 7.92 (д, J = 8.0, 1H), 8.12 (д, J = 7.5, 1H), 8.18 (д, J = 8.5, 1H).

Спектр ¹³C ЯМР (75,50 МГц, D₂O, 25°С, δ / м. д., J / Гц): δ = 13.4, 21.8, 30.8, 40.5, 66.2, 67.2, 67.4, 73.2 (д, J_{CP}=129,02, –СОН), 118.6, 120.0, 126.3, 126.9, 130.0, 130.6, 131.0, 132.9, 138.2, 158.9, 162.1, 163.4.

Спектр ³¹P ЯМР (121,49 МГц, D₂O, 25°С, δ / м. д.): 18,3 (с, P-C-P).

Найдено (%): С, 46.36; Н, 4.72; N, 2.88. C₂₀H₂₅NO₁₁P₂. Вычислено (%): С, 46.43; Н, 4.87; N, 2.71.

2. Синтез конъюгатов ЧСА и PLGA с 1,8-нафталимидами

Конъюгат ЧСА-SH. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (55,31 мг, 0,83 мкмоль) растворяли в 10 мл 5 мМ раствора ЭДТА в фосфатном буфере (PBS, рН = 7,4) и добавляли реактив Траута (2,67 мг, 16,54 мкмоль) в 2 мл PBS. Реакционную массу инкубировали 1 час при 37 °С. Тиолированный белок очищали методом диализа против воды с использованием диализного мешка Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI, 20K MWCO. Суспензию разливали по пенициллиновым флаконам по 5 мл, замораживали при –70°С и лиофильно высушивали в два этапа: первый этап – основная сушка – 20 ч под давлением 0,30 мбар, второй этап – конечная сушка – 4 ч под давлением 0,12 мбар. Выход конъюгата ЧСА-SH – 97%.

Конъюгат ЧСА-12. Конъюгат ЧСА-SH (30 мг, 0,45 мкмоль) растворяли в 15 мл фосфатного буфера (PBS, рН=7,4) и добавляли раствор 4-(N-этилмалеимид)амино-N-(2-аминоэтил)-4-метил-бензолсульфонамид-1,8-нафтали-мида (**12**) (14,4 мг, 27,06 мкмоль) в 5 мл диметилсульфоксида. Реакционную смесь инкубировали при постоянном перемешивании при 37 °С в темноте в течение 2 часов. Конъюгат ЧСА-12 очищали

методом диализа против воды с использованием диализного мешка Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI, 20K MWCO. Суспензию разливали по пенициллиновым флаконам по 2 мл, замораживали при -70°C и лиофильно высушивали в два этапа: первый этап – основная сушка – 20 ч под давлением 0,30 мбар, второй этап – конечная сушка – 4 ч под давлением 0,12 мбар. Выход конъюгата ЧСА-12 – 79%.

Конъюгаты PLGA с флуорофорами 25-32. Навеску флуорофора растворяли в 1 мл хлористого метилена, полимер PLGA (*Resomer[®] RG 502 H*) растворяли в 3 мл хлористого метилена, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*) и N-гидроксисукцинимид растворяли в 3 мл хлористого метилена каждый. В реакционную массу вносили 25 мкл диизопропилэтиламина (*DIPEA*). Реакционную массу перемешивали 48 часов при комнатной температуре. Далее ее экстрагировали смесью 10 мл хлористого метилена и 10 мл дистиллированной воды (2 раза), 10 мл дистиллированной воды и 10 мл метанола (1 раз), и 25 мл дистиллированной воды (2 раза) для удаления водорастворимых побочных продуктов и исходных реагентов. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный осадок растворяли в 5 мл этилацетата, раствор вносили в 50 мл гексана для осаждения полимера, фильтровали и сушили на воздухе. Образование конъюгата определяли при помощи ТСХ (элюент – дихлорметан:метанол:вода 6,5:2,5:0,4). Загрузки исходных реагентов для получения конъюгатов **25-32** и их выходы представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Загрузки исходных реагентов для получения конъюгатов **25-32** и их выходы

Флуорофор	25	26	27	28	29	30	31	32
$m_{\text{флуорофора}}$, МГ	10	10	10	10	9,8	10,0	10,4	11,0
$\vartheta_{\text{флуорофорв}}$, МКМОЛЬ	30,4	29,2	28,1	26,0	30,0	29,5	29,4	29,0
m_{PLGA} , МГ	501	500	501	500	500	500	500	503
m_{EDC} , МГ	47,3	56,03	53,82	49,8	46,5	45,7	45,6	45,0
ϑ_{EDC} , МКМОЛЬ	304	292	281	260	300	295	294	290
m_{NHS} , МГ	35	33,6	32,28	29,9	34,5	33,9	33,8	33,3
ϑ_{NHS} , МКМОЛЬ	304	292	281	260	300	295	294	290
$m_{\text{конъюгата}}$, МГ	376	410	401	425	375	375	400	428
$\eta_{\text{конъюгата}}$, %	75	82	80	85	75	75	80	85

Конъюгат PLGA-этаноламин. Навеску полимера PLGA (*Resomer[®] RG 502 H*) (0,5 г) растворяли в 10 мл хлористого метилена, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*) (51,9 мг, 33,4 мкмоль) и N-гидроксисукцинимид (38,4 мг, 33,4 мкмоль) растворяли

в 3 мл хлористого метилена каждый. Этанолламин (25 мкл, 33,4 мкмоль) вносили при охлаждении смеси до температуры $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$, далее добавляли 25 мкл диизопропилэтиламина (*DIPEA*). После прибавления реагентов реакцию перемешивали 24 часа при комнатной температуре. Далее ее экстрагировали смесью 10 мл хлористого метилена и 10 мл дистиллированной воды (2 раза), 10 мл дистиллированной воды и 10 мл метанола (1 раз), и 25 мл дистиллированной воды (2 раза) для удаления водорастворимых побочных продуктов и исходных реагентов. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный осадок растворяли в 5 мл этилацетата, раствор вносили в 50 мл гексана для осаждения полимера, фильтровали и сушили на воздухе. Получали конъюгат **PLGA-этанолламин** в виде белых хлопьев массой 0,39 г (выход 78%).

Конъюгат PLGA-40. Навеску соединения **40** (8,5 мг, 15,3 мкмоль) растворяли в 2 мл смеси ДМФА: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 10:1$, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*) (28,5 мг, 18,4 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (22,5 мг, 18,4 мкмоль) растворяли в 2 мл хлористого метилена каждый. После перемешивания смеси в течение 1 часа добавляли раствор конъюгата **PLGA-этанолламин** (0,36 г) в 10 мл хлористого метилена и вносили 20 мкл диизопропилэтиламина (*DIPEA*). Реакционную массу перемешивали 48 часов при комнатной температуре. Контроль реакции осуществляли при помощи ТСХ (элюент – дихлорметан:метанол:вода 6,5:2,5:0,4). Далее реакцию экстрагировали смесью 10 мл хлористого метилена и 10 мл дистиллированной воды (2 раза), 10 мл дистиллированной воды и 10 мл метанола (1 раз), и 25 мл дистиллированной воды (2 раза) для удаления водорастворимых побочных продуктов и исходных реагентов. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный осадок растворяли в 5 мл этилацетата, раствор вносили в 50 мл гексана для осаждения полимера, фильтровали и сушили на воздухе. Получали конъюгат **PLGA-40** в виде хлопьев бледно-красного цвета массой 0,31 г (выход 80%).

Конъюгаты PLGA с флуорофорами 43-45. Навеску флуорофора растворяли в 2 мл хлористого метилена, полимер *PLGA (Resomer[®] RG 502 H)* растворяли в 3 мл хлористого метилена, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*) и 4-диметиламино-

пиридин растворяли в 3 мл хлористого метилена каждый. В реакционную массу вносили 25 мкл диизопропилэтиламина (*DIPEA*). Реакционную массу перемешивали 48 часов при комнатной температуре. Контроль реакции осуществляли при помощи ТСХ (элюент – дихлорметан:метанол:вода 6,5:2,5:0,4). Далее реакционную массу экстрагировали смесью 10 мл хлористого метилена и 10 мл дистиллированной воды (2 раза), 10 мл дистиллированной воды и 10 мл метанола (1 раз), и 25 мл дистиллированной воды (2 раза) для удаления водорастворимых побочных продуктов и исходных реагентов. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный осадок растворяли в 5 мл этилацетата, раствор вносили в 50 мл гексана для осаждения полимера, фильтровали и сушили на воздухе. Загрузки исходных реагентов для получения конъюгатов и их выходы представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Загрузка исходных реагентов для получения конъюгатов *PLGA-43-45* и их выходы

Флуорофор	43	44	45
$m_{\text{флуорофора}}$, МГ	9,8	12,0	8,8
$\vartheta_{\text{флуорофорв}}$, МКМОЛЬ	25,5	25,5	25,5
m_{PLGA} , МГ	500	500	500
m_{EDC} , МГ	39,6	39,6	39,6
ϑ_{EDC} , МКМОЛЬ	255	255	255
m_{NHS} , МГ	31,0	31,0	31,0
ϑ_{NHS} , МКМОЛЬ	255	255	255
$m_{\text{конъюгата}}$, МГ	375	405	400
$\eta_{\text{конъюгата}}$, %	75	81	80

Конъюгат *PLGA-57*. Навеску соединения **57** (25 мг, 0,05 мкмоль) растворяли в 3 мл ДМФА, полимер PLGA (1 г) растворяли в 10 мл хлористого метилена, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*) (76,8 мг, 0,5 мкмоль) и 4-диметиламинопиридин (ДМАП) (60,5 мг, 0,5 мкмоль) растворяли в 3 мл хлористого метилена каждый. В реакционную массу вносили 86 мкл диизопропилэтиламина (*DIPEA*). Реакционную массу перемешивали 48 часов при комнатной температуре. Контроль реакции осуществляли при помощи ТСХ (элюент – дихлорметан:метанол:вода 6,5:2,5:0,4). Далее реакционную массу экстрагировали смесью 20 мл хлористого метилена и 20 мл дистиллированной воды (2 раза), 20 мл дистиллированной воды и 20 мл метанола (1 раз), и 25 мл дистиллированной воды (2 раза) для удаления водорастворимых побочных продуктов и исходных реагентов. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным

сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Полученный осадок растворяли в 10 мл этилацетата, раствор вносили в 500 мл гексана для осаждения полимера, фильтровали и сушили на воздухе. Получали конъюгат *PLGA-57* в виде хлопьев светло-желтого цвета массой 0,86 г (выход 86%).

4. Получение наночастиц на основе конъюгатов ЧСА и *PLGA* с 1,8-нафталимидом

Наночастицы ЧСА-12. Модифицированный человеческий сывороточный альбумин ЧСА-12 массой 10,17 мг растворяли в 1,5 мл фосфатного буфера (0,02 М PBS, pH = 7,4). Раствор гомогенизировали в течение 5 мин с охлаждением на ледяной бане на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonoplus HD 2070 при 79% мощности, что соответствует 55 Вт, цикл работы – 3 с включение/1 с пауза. Контроль размеров и полидисперсности наночастиц осуществляли через 1, 2, 3, 4 и 5 мин. Суспензию наночастиц разливали во флаконы по 0,5 мл, замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофильно высушивали в две стадии: основная сушка при 0,340 мбар в течение 24 ч и конечная сушка при 0,120 мбар в течение 4 ч.

Наночастицы *PLGA*-1,8-нафталиמיד (25-32, 40, 43-45, 57). Конъюгат *PLGA*-1,8-нафталиמיד (25-32, 40, 43-45, 57) массой 100 мг растворяли в 1,2 мл хлористого метилена и приливали к 10 мл 2% (масс./об.) раствора поливинилового спирта (ПВС, 9-10 кДа, гидролизован на 80%), перемешивали на встряхивателе типа “Vortex” в течение 2 мин и гомогенизировали в течение 5 мин с охлаждением на ледяной бане на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonoplus HD 2070 при 79% мощности, что соответствует 55 Вт. Органический растворитель удаляли на роторном испарителе, добавляли D-маннит в качестве криопротектора в количестве, необходимом для создания концентрации 2,5% (масс./об.), разливали во флаконы по 1 мл, замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофильно высушивали в две стадии: основная сушка при 0,30 мбар в течение 24 ч и конечная сушка при 0,120 мбар в течение 4 ч.

Получение наночастиц *PLGA-57-Dox*. Навеску гидрохлорида доксорубицина (10 мг) растворяли в 0,6 мл 0,001 н раствора соляной кислоты, добавляли к раствору полимера *PLGA-57* (100 мг) в 1,2 мл хлористого метилена и помещали на встряхивателе типа “Vortex” на 2 мин. Затем добавляли полученную эмульсию к 10 мл 2% (масс./об.) раствора

поливинилового спирта (ПВС), перемешивали на встряхивателе типа “Vortex” в течение 2 мин и гомогенизировали в течение 7 мин с охлаждением на ледяной бане на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonoplus HD 2070 при 79% мощности, что соответствует 55 Вт. Органический растворитель удаляли на роторном испарителе, добавляли D-маннит в качестве криопротектора в количестве, необходимом для создания концентрации 2,5% (масс./об.), разливали во флаконы по 1,5 мл, замораживали при -70°C и лиофильно высушивали в две стадии: основная сушка при 0,30 мбар в течение 24 ч и конечная сушка при 0,120 мбар в течение 4 ч.

5. Исследование полученных конъюгатов и наночастиц

Построение градуировочной зависимости для определения остаточного содержания флуорофора **25** в конъюгате *PLGA-25* методом ВЭЖХ

Методика адаптирована из [116]. Для построения градуировочной зависимости для 1,8-нафталимида **25** было приготовлено шесть растворов с концентрацией от 7,4 до 236,0 мкг/мл. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Элюент А представлял собой 0,2 М LiClO₄ в 0,05 М HClO₄. Элюент В – ацетонитрил. Использовали градиентное элюирование (от 5% элюента В до 95% элюента В) с объёмом элюента, проходящего через колонку, равным 2500 мкл. Длина волны UV-детектора составляла 240 нм. Постоянная времени – 0,18 с. Объём образца, наносимого на хроматографическую колонку, составлял 2 мкл. После проведения анализа полученные сигналы обрабатывали в программе MultiChrom. В результате была получена градуировочная зависимость концентрации флуорофора (мг/мл) от поглощения с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9991$, описываемая уравнением $Q = 0,0234 \times A$. Время выхода флуорофора составило 9,17 мин. В таблице 20 и на рисунке 62 представлены результаты эксперимента по построению градуировочного графика.

Таблица 20 – Градуировочная зависимость для флуорофора **25** в диапазоне концентраций 7,4 – 236,0 мкг/мл

Точка	Концентрация, мкг/мл	Высота	Площадь
1	7,4	0,0281	0,4579
2	14,8	0,0059	0,9757
3	29,5	0,1331	2,1490
4	59,0	0,2980	4,8150
5	118,0	0,5874	9,7070
6	236,0	1,1330	20,440

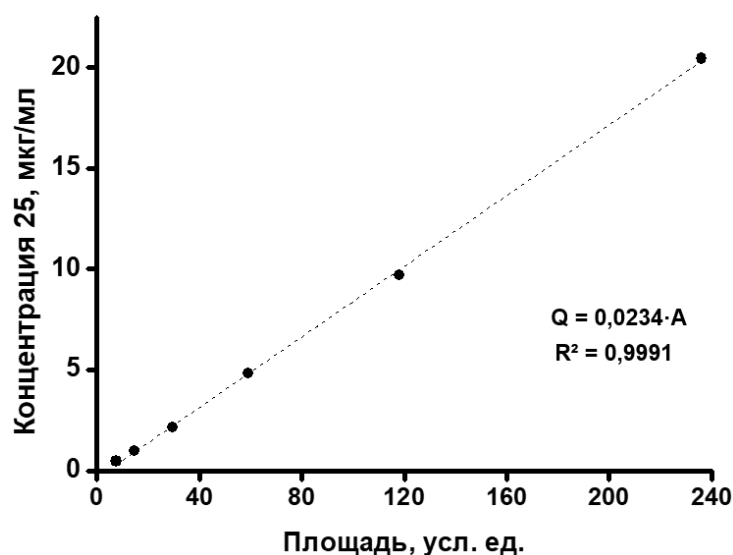


Рисунок 62 – Градуировочная зависимость для флуорофора **25** в диапазоне концентраций 7,4 – 236,0 мкг/мл

Построение градуировочной зависимости для определения остаточного содержания флуорофора **31** в конъюгате **PLGA-31** методом ВЭЖХ

Методика адаптирована из [116]. Для определения остаточного содержания флуорофора **31** в конъюгате было приготовлено пять градуировочных растворов для флуорофора **31** с концентрацией от 10,8 до 172,0 мг/мл. Элюент А представлял собой 0,2 М LiClO₄ в 0,05 М HClO₄. Элюент В – ацетонитрил. Краситель растворяли в ацетонитриле. Использовали градиентное элюирование (от 5% элюента В до 95% элюента В) с объемом элюента, проходящего через колонку, равным 2500 мкл. Длина волны UV-детектора составляла 230 нм. Постоянная времени – 0,18 с. Объем образца, наносимого на хроматографическую колонку, составлял 2 мкл. После проведения анализа полученные пики обрабатывали в программе MultiChrom. В результате была получена градуировочная зависимость концентрации флуорофора (мг/мл) от поглощения с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9991$, описываемая уравнением $Q = 0,0346 \times A$. Время выхода флуорофора составило 9,04 мин. В таблице 21 и на рисунке 63 представлены результаты эксперимента по построению градуировочного графика.

Таблица 21 – Градуировочная зависимость для флуорофора **31** в диапазоне концентраций 10,8 – 172,0 мг/мл

Точка	Концентрация, мкг/мл	Высота	Площадь
1	10,8	0,0354	0,5475
2	21,5	0,0748	1,1410
3	43,0	0,1581	2,4050
4	86,0	0,3435	5,2460
5	172,0	0,6125	9,8470

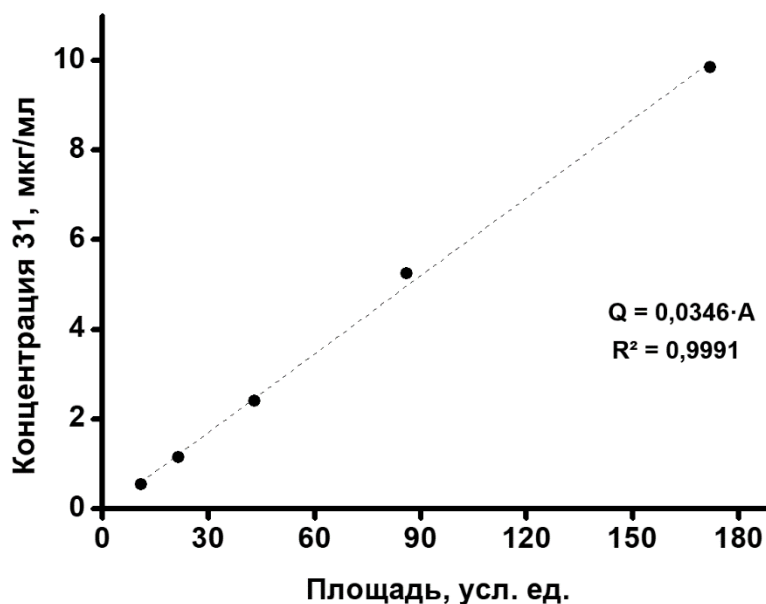


Рисунок 63 – Градуировочная зависимость для флуорофора **31** в диапазоне концентраций 10,8 – 172,0 мкг/мл

6. Гель-проникающая хроматография

Анализ молекулярно-массового распределения конъюгатов *PLGA*-1,8-нафталиimid проводили методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографе высокого давления «Waters». В качестве элюента использовали тетрагидрофуран (ТГФ), скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Концентрация растворов конъюгатов составляла 1 мг/мл, объем вводимой пробы – 70 мкл. Калибровку системы проводили по набору полистирольных стандартов с молекулярной массой 600 – 500 000 Да. Образцы анализировали после фильтрования. Данные обрабатывали с применением программного комплекса Z-lab.

7. Определение общего содержания доксорубина гидрохлорида в *PLGA* наночастицах спектрофотометрическим методом

Построение градуировочной зависимости для определения общего содержания доксорубина гидрохлорида в наночастицах *PLGA-57-Dox*

Методика адаптирована из [161]. Для построения градуировочной зависимости для доксорубина гидрохлорида (*Dox*) было приготовлено пять растворов с концентрацией от 5,08 до 40,36 мкг/мл. В качестве растворителя использовали ДМСО. Спектрофотометрическое исследование проводилось при длине волны $\lambda = 480$ нм. В результате была получена градуировочная зависимость концентрации *Dox* (мкг/мл) от

оптической плотности с коэффициентом корреляции $R = 0,9994$, описываемая уравнением $A = 0,0225 \times C$. В таблице 22 представлены результаты эксперимента.

Таблица 22 – Градуировочная зависимость для доксорубина гидрохлорида в ДМСО в диапазоне концентраций 5,08 – 40,36 мкг/мл

№	Концентрация, мкг/мл	Оптическая плотность
1	5,08	0,10
2	10,60	0,23
3	20,32	0,45
4	30,48	0,71
5	40,36	0,90

Определение общего содержания доксорубина в наночастицах *PLGA-57-Dox*

Методика адаптирована из [161]. Лиофилизат наночастиц *PLGA-57-Dox* (1 флакон) растворяли в 2 мл ДМСО и добавляли 40 мкл 0,1 н. соляной кислоты. Аликвоту раствора объемом 100 мкл переносили в колбу на 5 мл, добавляли 50 мкл 0,1 н. соляной кислоты, объем доводили ДМСО до метки. По предварительно определенной калибровочной зависимости ($A = 0,0225 \times C$; $R^2 = 0,9994$; 0,00-40,36 мкг/мл) при $\lambda = 480$ нм определяли концентрацию доксорубина гидрохлорида в полученном образце.

Определение степени включения доксорубина гидрохлорида в *PLGA* наночастицы спектрофотометрическим методом

Построение градуировочной зависимости для определения степени включения доксорубина гидрохлорида в наночастицах *PLGA-57-Dox*

Методика адаптирована из [161]. Для построения градуировочной зависимости для доксорубина гидрохлорида (*Dox*) было приготовлено пять растворов с концентрацией от 5,00 до 40,00 мкг/мл. В качестве растворителя использовали воду. Спектрофотометрическое исследование проводилось при длине волны $\lambda = 480$ нм. В результате была получена градуировочная зависимость концентрации *Dox* (мкг/мл) от оптической плотности с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9983$, описываемая уравнением $A = 0,018 \times C$. В таблице 23 представлены результаты эксперимента по построению градуировочного графика.

Таблица 23 – Градуировочная зависимость для доксорубина гидрохлорида в воде в диапазоне концентраций 5,00 – 40,00 мкг/мл

№	Концентрация, мкг/мл	Оптическая плотность
1	5,00	0,10
2	10,00	0,19
3	20,00	0,38
4	25,00	0,47
5	40,00	0,69

Определение степени включения доксорубина в наночастицах *PLGA-57-Dox*

Методика адаптирована из [161]. Лиофилизат наночастиц *PLGA-57-Dox* ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды. С использованием центрифуги 5804R (Eppendorf, Германия) (ускорение 14000×g, 30 мин, T = +5 °C) отделяли наночастицы. Объем центрифугируемой суспензии составлял – 1 мл, объем отбираемой аликвоты – 100 мкл. По предварительно построенной калибровочной зависимости ($A = 0,018 \times C$; $R^2 = 0,9983$; 0,50-40,00 мкг/мл) при $\lambda = 480$ нм определяли концентрацию доксорубина гидрохлорида в супернатанте.

Степень включения доксорубина в наночастицы рассчитывали по формуле:

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{C_{\text{общ}} - C_{\text{своб}}}{C_{\text{общ}}} \times 100\%$$

где $C_{\text{общ}}$ – концентрация общего доксорубина в суспензии наночастиц *PLGA-57-Dox*;

$C_{\text{своб}}$ – концентрация доксорубина в супернатанте после осаждения наночастиц.

8. Определение квантовых выходов флуоресценции 1,8-нафталимидов

Для определения квантовых выходов флуоресценции флуорофоров была приготовлена серия растворов 1,8-нафталимидов и выбранных стандартов. Для соединений **29-32**, **35**, **43-48**, **55-57** в качестве стандарта использовался кумарин 6, растворенный в этаноле, характеризующийся $\lambda_{\text{погл}}^{\text{пол}} = 457$ нм, $\lambda_{\text{мах}}^{\text{фл}} = 500$ нм, $\Phi_{\text{фл}} = 78$ %.

Для соединений **25-28**, **34**, **52-55** использовался сульфат хинина в 0,5 М серной кислоте, характеризующийся $\lambda_{\text{погл}}^{\text{пол}} = 317$ и 349 нм, $\lambda_{\text{мах}}^{\text{фл}} = 450$ нм, $\Phi_{\text{фл}} = 54,6$ %.

Для соединения **40** в качестве стандарта использовался раствор флуоресцеина в форме свободной карбоновой кислоты в этаноле, характеризующийся $\lambda_{\text{погл}}^{\text{пол}} = 483$ нм, $\lambda_{\text{мах}}^{\text{фл}} = 515$ нм, $\Phi_{\text{фл}} = 79$ % (для определения квантового выхода в воде) и раствор

родамина Б в этаноле, характеризующийся $\lambda_{max}^{погл} = 544$ нм, $\lambda_{max}^{фл} = 565$ нм, $\Phi_{фл} = 70\%$ (для определения квантового выхода хлористом метилена и ДМСО).

Квантовый выход флуоресценции рассчитывался по формуле:

$$\Phi_{фл} = \Phi_{ст} \times \frac{S_{фл}}{S_{ст}} \times \left(\frac{1 - 10^{A_{ст}}}{1 - 10^{A_{фл}}} \right) \times \left(\frac{n_{фл}}{n_{ст}} \right)^2$$

где $\Phi_{фл}$ и $\Phi_{ст}$ – квантовые выходы флуоресценции исследуемого флуорофора и стандарта, $S_{фл}$ и $S_{ст}$ – площадь под кривой спектра флуоресценции исследуемого флуорофора и стандарта, $A_{ст}$ и $A_{фл}$ – оптическая плотность исследуемого флуорофора и стандарта, $n_{фл}$ и $n_{ст}$ – показатели преломления растворителей для флуорофора и стандарта.

Определение квантовых выходов флуоресценции наночастиц

Расчет квантовых выходов флуоресценции наночастиц был осуществлен согласно методике [139]. Для их определения была приготовлена серия суспензий. Условия эмиссии при регистрации спектров оставались такими же, как и для исходных флуорофоров. Построены графики зависимости интегральной интенсивности флуоресценции от поглощения. Определены тангенсы угла наклона графиков ($tg\alpha$). Для расчета квантового выхода флуоресценции наночастиц использовалось следующее уравнение:

$$\Phi_{нч} = \Phi_{ст} \times \frac{tg\alpha_{нч}}{tg\alpha_{ст}} \times \frac{n_{нч}^2}{n_{ст}^2}$$

где $\Phi_{нч}$ и $\Phi_{ст}$ – квантовые выходы флуоресценции наночастиц и стандарта, $tg\alpha_{нч}$ и $tg\alpha_{ст}$ – тангенсы угла наклона графиков зависимости интегральной интенсивности флуоресценции от поглощения для наночастиц и стандарта, $n_{нч}$ и $n_{ст}$ – показатели преломления растворителя.

9. Флуоресцентная визуализация

Подготовка клеточных линий 4Т1 и Saos-2

Клетки 4Т1 культивировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂ на среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1 % антибиотико-антимикотической смесью (10 000 ЕД/мл пенициллина, 10 000 ЕД/мл стрептомицина). Клетки 4Т1 культивировали в конфокальных чашках с крышкой и дном (3,5 SPL Life Sciences Co., Ltd.) при достижении 70% слияния за 24 часа до исследования.

Клетки линии Saos-2 культивировали в среде McCoy 5A с добавлением 1,5 мМ L-глутамина, 15% коровьей эмбриональной сыворотки FBS (BioSera, France), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2.5 мкг/мл амфотерицина В.

Для стимуляции образования кальциевых отложений использовали среду MEM с 2 мМ L-глутамина, 10% FBS и тем же содержанием антибиотиков, но без добавления пирувата натрия и заменимых аминокислот. При пересеве клетки однократно промывали раствором Версена и открепляли с помощью 0,25% раствора трипсина в 0,03% растворе ЭДТА (ПанЭко, Россия). Контаминацию микоплазмой проверяли с помощью набора MycoReport (Евроген, Россия).

Для стимуляции синтеза гидроксиапатита клетки высевали с плотностью 480 тыс. клеток на лунку 24-луночного планшета в среде MEM. Через сутки после посева меняли среду на аналогичную с добавлением 50 мМ аскорбиновой кислоты, 5 мМ бета-глицерофосфата, 10 нМ дексаметазона и 25 мМ HEPES и инкубировали в течение 48 часов. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в неостеогенной среде.

Для окрашивания клеток среду из лунок удаляли, однократно промывали лунки раствором Хэнкса, после чего добавляли исследуемые флуорофоры в растворе Хэнкса (20 мМ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. После этого лунки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH=7,4).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Лизосомы клеток 4T1 окрашивали красителем *LysoTracker Red DND-99* (50 нМ, Life Technology, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки инкубировали с *LysoTracker Red DND-99* в течение 10 минут и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH = 7,4). Наночастицы **PLGA-25** добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 200 мкг/мл, клетки инкубировали в течение 1 часа. Для наночастиц **PLGA-32** использовали концентрацию 100 мкг/мл. После инкубации клетки трижды промывали PBS. Изображения регистрировали при следующих параметрах оптической системы: для флуорофоров **25–28** — лазер 405 нм, диапазон детекции 425–475 нм; для флуорофоров **29–32** — лазер 405 нм, диапазон детекции 500–550 нм. Анализ и количественную обработку изображений проводили с использованием программного обеспечения *NIS Elements AR*.

Клетки *Saos-2* со сформированным минерализованным матриксом инкубировали с наночастицами ***PLGA-57*** в концентрации 200 мкг/мл в течение 1 часа. После инкубации клетки трижды промывали средой. Изображения регистрировали с использованием конфокального микроскопа при следующих параметрах: возбуждение лазером с длиной волны 405 нм, детекция в диапазоне 500–550 нм (флуорофор **57**).

Аналогичный эксперимент проведён для наночастиц ***PLGA-57-Dox***. Условия детекции: для флуорофора **57** – лазер 405 нм, фильтр 500–550 нм; для доксорубина гидрохлорида – лазер 488 нм, фильтр 580–650 нм. Анализ и количественная обработка изображений выполнены с использованием программного обеспечения *NIS Elements AR*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы были сформулированы следующие выводы:

1. Разработаны методы синтеза новых производных 1,8-нафталимида, сочетающих векторный фрагмент для селективного связывания с биологическими мишенями и реакционноспособную группу для ковалентной модификации природных (человеческий сывороточный альбумин, ЧСА) и синтетических (сополимер молочной и гликолевой кислот, *PLGA*) полимеров.

2. Установлено, что ацилирование малеиновым ангидридом аминогруппы при имидном атоме азота или в заместителе в 4-ом положении 1,8-нафталимида при использовании уксусной кислоты в качестве растворителя вместо хлористого метилена позволяет проводить реакцию в одну стадию и повышает выход целевых продуктов до 95 %.

3. Показано, что получение *N*- и *S*-замещённых по 4-положению 1,8-нафталевых ангидридов на первой стадии упрощает введение бисфосфонатного заместителя, тогда как *O*-замещённые производные целесообразно получать нуклеофильным замещением на заключительном этапе синтеза.

4. Доказано сохранение спектрально-люминесцентных свойств синтезированных флуорофоров после их ковалентного связывания с ЧСА и *PLGA*; полученные конъюгаты флуоресцируют в диапазоне 460-625 нм и могут быть использованы в качестве маркеров для систем адресной доставки.

5. Установлено, что введение фрагмента алендроновой кислоты в структуру 1,8-нафталимида придает полученным на его основе *PLGA*-наночастицам аффинность к гидроксиапатиту, что открывает перспективы создания остеотропных систем доставки.

6. Впервые с использованием флуоресцентного *S*-замещённого производного 1,8-нафталимида **57**, содержащего α -гидроксифосфонатную группу, визуализированы отложения гидроксиапатита, продуцируемого дифференцированными клетками остеосаркомы линии *Saos-2*.

7. Показано, что наночастицы *PLGA-57-Dox* интернализуются клетками *Saos-2*: высвободившийся доксорубин накапливается преимущественно в ядрах, а полимерная матрица, содержащая бисфосфонатный фрагмент, связывается с отложениями гидроксиапатита во внеклеточном матриксе, что позволяет рассматривать

полученные наночастицы как прототип тераностической системы для диагностики и лечения онкологических заболеваний костной ткани.

Дальнейшее развитие тематики исследования может включать: (1) расширение ряда производных 1,8-нафталимида с эмиссией в более длинноволновой области спектра и повышенной селективностью к целевым мишеням; (2) ковалентную модификацию других полимеров медико-биологического назначения для создания на их основе систем адресной доставки, обладающих возможностью флуоресцентной биовизуализации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	Аденозинтрифосфат
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГТФ	Гуанозинтрифосфат
ДМАП	4-Диметиламинопиридин
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДМФА	N,N-Диметилформамид
ДПП	Дикето-пирроло-пиррол
ККП	Коэффициент корреляции Пирсона
КПМ	Коэффициент перекрытия Мандерса
ЛВ	Лекарственное вещество
НЧ	Наночастицы
ОФЭКТ/КТ	Однофотонная эмиссионная компьютерная томография, совмещенная с компьютерной томографией
ПВС	Поливиниловый спирт
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
СДЛВ	Система адресной доставки лекарственных веществ
ТФУ	Трифторуксусная кислота
УЗ	Ультразвук
ЭПР	Эндоплазматический ретикулум
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
АIE	Aggregation-Induced Emission; Эмиссия, вызванная агрегацией
BCN	Бицикло[6.1.0]нонин
DFT	Density Functional Theory; Теория функционала плотности
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DOX	Доксорубицин
EDC	1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EPR	Enhanced Permeation and Retention; Эффект повышенной проницаемости и удерживания
FBS	Fetal Bovine Serum; Эмбриональная бычья сыворотка

FDA	Food and Drug Administration; Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
FITC	Изотиоцианат флуоресцеина
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy; Микроскопия визуализации времен жизни флуоресценции
ICT	Intramolecular Charge Transfer; Внутримолекулярный перенос заряда
NHS	N-Гидроксисукцинимид
PBS	Фосфатно-солевой буферный раствор
PDI	Индекс полидисперсности
PET	Photoinduced Electron Transfer; Фотоиндицированный перенос электрона
SUR	Рецептор сульфонилмочевины
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting; Время-коррелированный счет одиночных фотонов
TICT	Twisted Intramolecular Charge Transfer; Скрученное состояние с внутримолекулярным переносом заряда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nie W., Hu L. Design of 1,8-Naphthalimide-Based Fluorescent Functional Molecules for Biological Application: A Review // *ChemistrySelect*. – 2024. – Vol. 9. – №3. – P. 354–372.
2. Sanaullah, Walczak K. 1,8-Naphthalimide derivatives as small molecules with multi-applications in chemistry and biology // *Org. Biomol. Chem.* – 2025. – Vol. 23. – P. 6287–6319.
3. Ornaghi H., Monticeli F., Agnol L. A Review on Polymers for Biomedical Applications on Hard and Soft Tissues and Prosthetic Limbs // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – №19. – P. 4034.
4. Abdulsalam L., Abubakar S., Permatasari I., Lawal A.A. Advanced Biocompatible and Biodegradable Polymers: A Review of Functionalization, Smart Systems, and Sustainable Applications // *Polymers*. – 2025. – Vol. 17. – №21. – P. 2901.
5. Smolak B., Dynarowicz K., Bartusik-Aebisher D. *et al.* Combining Fluorescence and Magnetic Resonance Imaging in Drug Discovery—A Review // *Pharmaceuticals*. – 2025. – Vol. 19. – №1. – P. 56.
6. Li Z., Liu Z., Yu D., *et al.* Next-generation red ultra-bright fluorescent dyes for nuclear imaging and peripheral blood leukocytes sorting // *Chem. Sci.* – 2024. – Vol. 15. – №42. – P. 17524–17532.
7. Raju G., Le Gratiet A., Sancataldo G. *et al.* Light sheet fluorescence microscopy for monitoring drug delivery: Unlocking the developmental phases of embryos // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2025. – Vol. 218. – P. 115520.
8. Sieroń A., Sieroń-Stołtny K., Kawczyk-Krupka A. *et al.* The role of fluorescence diagnosis in clinical practice // *OncoTargets Ther.* – 2013. – Vol. 6. – P. 977–982.
9. Alamudi S., Yong-Ann L. Design strategies for organelle-selective fluorescent probes: where to start? // *RSC Adv.* – 2025. – Vol. 15. – P. 2115–2131.
10. Yoon H. Polymer Nanomaterials in Biomedicine // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – №8. – P. 7480.
11. Delfi M., Ghomi M., Zarrabi A. *et al.* Functionalization of Polymers and Nanomaterials for Biomedical Applications: Antimicrobial Platforms and Drug Carriers // *Prosthesis*. – 2020. – Vol. 2. – №2. – P. 117–139.
12. Reshma J., Jinu G., Franklin J. Brief Outlook on Polymeric Nanoparticles,

Micelles, Niosomes, Hydrogels and Liposomes: Preparative Methods and Action // ChemistrySelect. – 2022 – Vol. 7. – №6. – P. 3456–3488.

13. Angioletti-Uberti S. Theory, simulations and the design of functionalized nanoparticles for biomedical applications: A Soft Matter Perspective // npj Comput Mater. – 2017. – Vol. 3. – №48. – P. 1578–1597.

14. Ahumada G., Borkowska M. Fluorescent Polymers Conspectus // Polymers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2022. – Vol. 14. – №6. – P. 1118.

15. Kagatkar S., Sunil D. A systematic review on 1,8-naphthalimide derivatives as emissive materials in organic light-emitting diodes // J. Mater. Sci. – 2022. – Vol. 57. – P. 105–139.

16. Chicea D., Nicolae-Maranciuc A. A Review of Chitosan-Based Materials for Biomedical, Food, and Water Treatment Applications // Materials. – 2024. – Vol. 17. – №23. – P. 5770.

17. De Lima S., Santos T. T. S., Costa T. V. *et al.* Optical Characterization of Fluorescent Chitosan-Based Carbon Dots Embedded in Aqueous Natural Dye // Colorants. – 2024. – Vol. 3. – №4. – P. 269–281.

18. Yang L. Han Q., Ling X. *et al.* N-Butyl-4-hydrazino-1,8-naphthalimide-Loaded Chitosan Self-Assembled Nanoparticles as Fluorescent Ratiometric Chemosensors for Detection of Formaldehyde // ACS Appl. Nano Mater. – 2022. – Vol. 5. – №5. – P. 7392–7401.

19. Huiyu N., Liu J., O'Connor M. H. *et al.* Photoinduced electron transfer (PeT) based fluorescent probes for cellular imaging and disease therapy // Chem. Soc. Rev. – 2023. – Vol. 52. – P. 2322–2357.

20. Yu C., Huang J., Yang M. *et al.* Construction of Chitosan-Modified Naphthalimide Fluorescence Probe for Selective Detection of Cu²⁺ // Sensors. – 2024. – Vol. 24. – №11. – P. 3425.

21. Yung X. A., Zhang W., Liu L. *et al.* Chitosan-Based Fluorescent Probe Combined with Smartphone Technology for the Detection of Hypochlorite in Pure Water // Molecules. – 2023. – V. 28. – №17. – P. 6316.

22. Zennifer A., Senthilvelan P., Sethuraman S., Sundaramurthi D. Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 256. – P. 117561.

23. Zuo J., Lu S., Liang S. *et al.* Fabrication of 1,8-naphthalimide modified cellulose

derivative composite fluorescent hydrogel probes and their application in the detection of Cr(VI) // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – Vol. 253. – №4. – P. 127082.

24. Bokatyi A., Dubashynskaya N., Skorik Y. Chemical modification of hyaluronic acid as a strategy for the development of advanced drug delivery systems // *Carbohydr. Polym.* – 2024. – Vol. 337. – P. 122145.

25. Liu M., Xu Y., Huang C. *et al.* Hyaluronic acid-grafted three-dimensional MWCNT array as biosensing interface for chronocoulometric detection and fluorometric imaging of CD44-overexpressing cancer cells // *Microchim Acta*. – 2018. – Vol. 185. – №338. – P. 3765–3773.

26. Li C., Zhang D., Pan Y., Chen B. Human Serum Albumin Based Nanodrug Delivery Systems: Recent Advances and Future Perspective // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – №16. – P. 3354.

27. Wang Y., Huo F., Yin C. Development of Human Serum Albumin Fluorescent Probes in Detection, Imaging, and Disease Therapy // *J. Phys. Chem. B*. – 2024. – Vol. 128. – №5. – P. 1121–1138.

28. Ashraf M., Shen B., Raza M. A. *et al.* Albumin: A Review of Market Trends, Purification Methods, and Biomedical Innovations // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2025. – Vol. 47. – №5 – P. 303.

29. Devatha R., Chatani S., Podgorski M., Gong T. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry // *Chem. Mater.* – 2014. – Vol. 26. – №1 – P. 724–744.

30. Sun J., Xiaolong Z., Zhang L., Hu Y. An ultrafast turn-on thiol probe for protein labeling and bioimaging // *Analyst*. – 2016. – Vol. 141. – P. 2009–2015.

31. Zhou P., Yao J., Hu G., Fang J. Naphthalimide Scaffold Provides Versatile Platform for Selective Thiol Sensing and Protein Labeling // *ACS Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 11. – №4. – P.1098–1105.

32. Li X., Wang Y., Yang H., Yin D. Design of Hydrazone-Modified 1,8-Naphthalimides as Fluorogenic Click Probes Based on Nitrile Imine-Alkyne Cycloaddition // *Eur. J. Org. Chem.* – 2020. – Vol. 2020. – №28. – P. 4296–4300.

33. Zhang Y., Yang J. Design Strategies for Fluorescent Biodegradable Polymeric Biomaterials // *J. Mater. Chem. B*. – 2013. – Vol. 1. – №2. – P. 132–148.

34. Kurowiak J., Klekiel T., Będziński R. Biodegradable Polymers in Biomedical

Applications: A Review—Developments, Perspectives and Future Challenges // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – №23. – P. 16952.

35. Seah D., Cheng Z., Vendrell M. Fluorescent Probes for Imaging in Humans: Where Are We Now? // *ACS Nano.* – 2023. – Vol. 17. – №20. – P. 19478–19490.

36. Negi A. Natural Dyes and Pigments: Sustainable Applications and Future Scope // *Sustain. Chem.* – 2025. – Vol. 6. – №3. – P. 23.

37. Chung K. Azo dyes and human health: A review // *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* – 2016. – Vol.34. – №4. – P. 233–261.

38. Lu S., Chemla Y. R. Optical traps induce fluorophore photobleaching by two-photon excitation // *Biophys. J.* – 2023. – Vol. 122. – №22. – P. 4316–4325.

39. Thi T. T. H., Pilkington E., Nguyen D. H. *et al.* The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation // *Polymers.* – 2020. – Vol. 12. – №2. – P. 298.

40. D'souza A., Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2016. – Vol. 13. – №9. – P. 1257–1275.

41. Petkova V., Anastasova D., Dobrev S. *et al.* Naphthalimide-Based Amphiphiles: Synthesis and DFT Studies of the Aggregation and Interaction of a Simplified Model System with Water Molecules // *Molecules.* – 2024. – Vol. 39. – №17. – P. 4204.

42. Gopikrishna P., Meher N., Iyer P. Functional 1,8-Naphthalimide AIE/AIEEgens: Recent Advances and Prospects // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – Vol.10. – №15. – P. 12081–12111.

43. Zhang Z., Li C.-C., Cui W.-L. *et al.* A novel and modified fluorescent amphiphilic block copolymer simultaneously targeting to lysosomes and lipid droplets for cell imaging with large Stokes shift // *European Polymer Journal.* – 2022. – Vol.166. – P. 111030.

44. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application // *J Pers Med.* – 2021. – Vol. 11. – №8. – P. 771.

45. Liu B., Wu W.-X., Wang N., Yu X.-Q. Novel biocompatible fluorescent polymeric micelles based on 1,8-naphthalimide derivatives for cell imaging // *Polym. Chem.* – 2015. – Vol. 6. – P. 364–368.

46. Li Z., Zhang X. Research on Long-Lived Room-Temperature Phosphorescence of

Carbazole-Naphthalimide Polylactides // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – №4. – P. 790-805.

47. Haidar L., Bilek M., Akhavan B. Surface Bio-engineered Polymeric Nanoparticles. // *Small*. – 2024. – Vol. 20. – №21. – P. 2849–2855.

48. Bao Y., Corneillie S., De Keersmaecker. Tunable Ratiometric Fluorescence Sensing of Intracellular pH by Aggregation-Induced Emission-Active Hyperbranched Polymer Nanoparticles // *Chem. Mater.* – 2015. – Vol. 27. – №9. – P. 3450–3455.

49. Singh D. Organelle Targeted Drug Delivery: Key Challenges, Recent Advancements and Therapeutic Implications // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. – 2024. – Vol. 24. – №13. – P. 1480–1487.

50. Liu Z., Liu Y., Kang X. *et al.* Subcellular Organelle Targeting as a Novel Approach to Combat Tumor Metastasis // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – №2. – P. 198.

51. Woodring R. N., Gurysh E. G., Bachelder E. M. Drug Delivery Systems for Localized Cancer Combination Therapy // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2023. – Vol. 6. – №3. – P. 934–950.

52. Yang J., Griffin A., Qiang Z. Organelle-targeted therapies: a comprehensive review on system design for enabling precision oncology // *Signal Transduct. Target. Ther.* Nature Publishing Group. – 2022. – Vol. 7. – №1. – P. 379.

53. Skowicki M., Kraus M., Tarvirdipour S. Nanoassemblies designed for efficient nuclear targeting // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2024. – Vol. 211. – P. 115354.

54. Ahmad S., Hameed H., Al-Hussain S. A. *et al.* Chondroitin sulfate: An ideal biomaterial based scaffolds for cartilage regeneration and its therapeutic potential // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* – 2025. – Vol. 10. – P. 100742.

55. Chen Y., Wu X., Li J. *et al.* Bone-Targeted Nanoparticle Drug Delivery System: An Emerging Strategy for Bone-Related Disease // *Front. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 909408.

56. Wu Y., Sun B., Tang Y. *et al.* Bone targeted nano-drug and nano-delivery // *Bone Research*. – 2024. – Vol. 12. – №51. – P. 5296.

57. Jing C., Li B., Tan H. *et al.* Alendronate-Decorated Nanoparticles as Bone-Targeted Alendronate Carriers for Potential Osteoporosis Treatment // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2021. – Vol. 4. – №6. – P. 4907–4916.

58. Nguyen V., Li H. Recent Development of Lysosome-Targeted Organic Fluorescent Probes for Reactive Oxygen Species // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – №18. – P.

6650.

59. Perzov N., Padler-Karavani V., Nelson H. Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis // *J. Exp. Biol.* – 2002. – Vol. 205. – P. 1209–1219.

60. Hou S., Xu J., Ma Q. *et al.* A near-infrared fluorescent probe derived from naphthalimide for detecting cysteine within lysosomes // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2025. – Vol. 265. – P. 116987.

61. Yuan Y., Cao F. A near-infrared fluorescent probe for imaging cysteine changes in *Arabidopsis thaliana* // *New J. Chem.* – 2025. – Vol. 49. – №9. – P. 3599–3605.

62. Wang M., Liu M., Gao L. Mitochondria-Targeted Fluorescent Probes: Bridging Molecular Innovation and Disease Diagnosis // *J. Med. Chem.* – 2025. – Vol. 68. – №23. – P. 24806–24829.

63. Tereshchenkov A., Khairullina Z., Volynkina I. *et al.* Triphenylphosphonium Analogs of Short Peptide Related to Bactenecin 7 and Oncocin 112 as Antimicrobial Agents // *Pharmaceutics.* – 2024. – Vol. 16. – №1. – P. 148.

64. Geng Y., Wang Z., Zhou J. Recent progress in the development of fluorescent probes for imaging pathological oxidative stress // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry,* – 2023. – Vol. 52. – №11. – P. 3873–3926.

65. Wei Y.-F., Zhang X.-Q., Sun R. Fluorescent probes based 1,8-naphthalimide-nitrogen heterocyclic for monitoring the fluctuation of mitochondrial viscosity // *Dyes Pigments.* – 2021. – Vol. 194. – P. 109559.

66. Tang Q., Li H., Hu H. New tool for diseases mechanism studies: Endoplasmic reticulum-targeted fluorescent probes // *Dyes Pigments.* – 2023. – Vol. 219. – P. 111634.

67. Niu J., Wang Y.-R., Li C.-C. *et al.* An endoplasmic reticulum-targeted fluorescent probe for detecting polarity and viscosity and its bioimaging in vitro and vivo // *Sens. Actuators B Chem.* – 2026. – Vol. 447. – P. 138803.

68. Kumar P., Mishra T., Sanyam. Triphenylamine-Naphthalimide-Based “On–Off–On” AIEgen for Imaging Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2025. – Vol. 8. – №2. – P. 1524–1532.

69. Bian H., Song X., Ning L. Quantitatively monitoring oxygen variation in endoplasmic reticulum with a fluorophore–phosphor energy transfer cassette // *J. Mater. Chem. B.* – 2018. – Vol. 6. – P. 1699-1705.

70. Masroori Z., Haseli S., Azhideh A. Pictorial Review of Soft Tissue Lesions with Calcification // *Diagnostics*. – 2025. – Vol. 15. – №7. – P. 811.
71. Ciosek Z., Kot K., Kosik-Bogacka D. *et al.* The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – №4. – P. 506.
72. Proudfoot D. Calcium Signaling and Tissue Calcification // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2019. – Vol. 11. – №10. – P. 4611.
73. Hwang Z.-A., Suh K. J., Chen D. Imaging Features of Soft-Tissue Calcifications and Related Diseases: A Systematic Approach // *Korean J. Radiol.* – 2018. – Vol. 19. – №6. – P.1147–1160.
74. Kostyunin A., Yuzhalin A., Reznova M. *et al.* Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves: Update 2020 // *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* – 2020. – Vol. 9. – №19. – P. 18506.
75. Teixeira P., Kessler H., Morbee L. Mineralized tissue visualization with MRI: Practical insights and recommendations for optimized clinical applications // *Diagn. Interv. Imaging*. – 2025. – Vol. 106. – №5. – P. 147–156.
76. Zhu X., Liu T., Yang X. Identifying subcutaneous tissue microcalcification by Fluo-3 AM imaging in cutaneous calciphylaxis // *Exp. Dermatol.* – 2022. – Vol. 31. – №10. – P. 1632–1634.
77. Hedge K., Puche A., Szmackinski H. *et al.* Fluorescence Lifetime Imaging of Human Sub-RPE Calcification In Vitro Following Chlortetracycline Infusion // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – №7. – P. 6421.
78. Zuncheddu D., Bella E. D., Schwab A. *et al.* Quality control methods in musculoskeletal tissue engineering: from imaging to biosensors // *Bone Res.* – 2021. – Vol. 9. – P. 1-21.
79. Criswell S. Von Kossa Calcium Staining Procedure Revisited // *J. Histochem. Cytochem.* – 2025. – Vol. 14. – P. 2535.
80. Schneider M. Von Kossa and his staining technique // *Histochem Cell Biol.* – 2021. – Vol. 156. – P. 523–526.
81. Hadad H. A., de Jesus L. K., da Silva M. P. Systematic Review of the Effects of Bisphosphonates on Osteoblasts In Vitro // *Calcif. Tissue Int.* – 2025. – Vol. 116. – №1. – P. 86.
82. Xu X., Wang L., Yang M. *et al.* Efficacy and safety of bisphosphonates in pediatric

glucocorticoid-induced osteoporosis: a meta-analysis and pharmacovigilance study // *Front. Pediatr. Frontiers.* – 2025. – Vol. 13. – P. 16357.

83. Hou W., Chen X., Zhang Y. *et al.* Promising efficacy of nitrogen-containing bisphosphonates against the infection of *Cryptosporidium* spp // *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* – 2025. – Vol. 29. – P. 100607.

84. Ebetino F. H., Sun S., Cherian P. *et al.* Bisphosphonates: The role of chemistry in understanding their biological actions and structure-activity relationships, and new directions for their therapeutic use // *Bone.* – 2022. – Vol. 156. – P. 116289.

85. Rogers M. J., Mönkkönen J., Munoz M. A. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton // *Bone.* – 2020. – Vol. 139. – P. 115493.

86. Xiao T., Gong Z., Duan D. *et al.* Injectable magnesium-bisphosphonate MOF-based bone adhesive prevents excessive fibrosis for osteoporotic fracture repair // *Nat Commun.* – 2025. – Vol. 16. – P. 5679.

87. Bura T., Ziessel R. Water-soluble phosphonate-substituted BODIPY derivatives with tunable emission channels // *Org. Lett.* – 2011. – Vol. 13. – №12. – P. 3072–3075.

88. Wu P., Zhu Y., Liu S., Xiong H. Modular Design of High-Brightness pH-Activatable Near-Infrared BODIPY Probes for Noninvasive Fluorescence Detection of Deep-Seated Early Breast Cancer Bone Metastasis: Remarkable Axial Substituent Effect on Performance // *ACS Central Science.* – 2021. – Vol. 7. – №12. – P. 2039–2048.

89. Sim A. M., Rashdan M. A. A novel fluorescein-bisphosphonate based diagnostic tool for the detection of hydroxyapatite in both cell and tissue models // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 17360.

90. Li Y., Fu Y., Zhang H. *et al.* FITC-Labeled Alendronate as an In Vivo Bone pH Sensor // *BioMed Research International.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 1521-1529.

91. Jeong Y., Park J. K., Jing G. W., Park S. J. Spectrofluorimetric Determination of Alendronate by Conjugation with the Rhodamine B Sulfonyl Group // *Bulletin of the Korean Chemical Society.* – 2011. – Vol. 32. – №5. – P. 1777–1780.

92. Minoshima M., Kikuta J., Omori Y. *et al.* In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps // *ACS Central Science.* – 2019. – Vol. 5. – №6. – P. 1059–1066.

93. Damasco J. A., Yu G., Kumar A. *et al.* Alendronate Conjugate for Targeted

Delivery to Bone-Forming Prostate Cancer // bioRxiv. – 2022. – P. 987-1012.

94. Hashimoto R., Minoshima M., Kikuta J. *et al.* An Acid-Activatable Fluorescence Probe for Imaging Osteocytic Bone Resorption Activity in Deep Bone Cavities // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – Vol. 59. – №47. – P. 20996–21000.

95. Sun S., Błażewska K. M., Kadina A. P. *et al.* Fluorescent Bisphosphonate and Carboxyphosphonate Probes: A Versatile Imaging Toolkit for Applications in Bone Biology and Biomedicine // *Bioconjugate Chemistry*. – 2016. – Vol. 27. – №2. – P. 329–340.

96. Swallow E., Aref M. W., Chem N. *et al.* Skeletal accumulation of fluorescently-tagged zoledronate is higher in animals with early stage chronic kidney disease // *Osteoporosis International*. – 2018. – Vol. 29. – №9. – P. 2139–2146.

97. Okawa H., Kondo T., Hokugo A. *et al.* Fluorescent risedronate analogue 800CW-pRIS improves tooth extraction-associated abnormal wound healing in zoledronate-treated mice // *Communications Medicine*. – 2022. – Vol. 2. – P. 112.

98. Chiminazzo A., Borsato G., Favero A. *et al.* Diketopyrrolopyrrole Bis-Phosphonate Conjugate: A New Fluorescent Probe for In Vitro Bone Imaging // *Chemistry – A European Journal*. – 2019. – Vol. 25. – №14. – P. 3617–3626.

99. David T., Kotek J., Kubicek V. Bis(phosphonate)-Building Blocks Modified with Fluorescent Dyes // *Heteroatom Chemistry*. – 2013. – Vol. 24. – P. 413–425.

100. Bhushan K. R., Misra P., Liu P. *et al.* Detection of Breast Cancer Microcalcifications Using a Dual-modality SPECT/NIR Fluorescent Probe // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – №52. – P. 17648–17649.

101. Ahangarpour M., Kavianiinia I., Brimble M. A. Thia-Michael addition: the route to promising opportunities for fast and cysteine-specific modification // *Org. Biomol. Chem.* – 2023 – Vol. 21. – P. 3057-3072.

102. Berne D., Ladmiral V., Leclerc E. Thia-Michael Reaction: The Route to Promising Covalent Adaptable Networks // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – №20. – P. 4457.

103. Gurjar A., Sinha P., Bansal R.K. Tandem Michael addition of amines to maleic anhydride and 1,3-prototropic shift: experimental and theoretical results // *Tetrahedron*. – 2014. – Vol. 70. – №34. – P. 5052–5056.

104. Rulev A.Y. Aza-Michael Reaction: A Decade Later – Is the Research Over? // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2023. – Vol. 26. – №26. – P. 605–632.

105. Belbekhouche S., Guerrouache M., Carbonnier B. Thiol–Maleimide Michael

Addition Click Reaction: A New Route to Surface Modification of Porous Polymeric Monolith // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2016. – Vol. 217. – №8. – P. 997-1006.

106. Wang S., Huang Y., Guan X. Fluorescent Probes for Live Cell Thiol Detection // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №12. – P. 3575.

107. Luo W., Jiang H., Tang X. *et al.* A reversible ratiometric two-photon lysosome-targeted probe for real-time monitoring of pH changes in living cells // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – Vol. 5. – №24. – P. 4768–4773.

108. Zhou J., Fang C., Liu Y. *et al.* Visible-light-induced cleavage of 4- α -amino acid substituted naphthalimides and its application in DNA photocleavage // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2015. – Vol. 13. – №13. – P. 3931–3935.

109. Chen X., Zhou Y., Peng X. Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – P. 2120-2135.

110. Qian J., Zhang G., Cui J. *et al.* Fluorescent detection of biothiols with maleimide-based probes: Effect of the spacer on the selectivity // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2020. – Vol. 311. – P. 254–271.

111. de Silva A.P. Crossing the divide: Experiences of taking fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensing/switching systems from solution to solid // *Dyes and Pigments*. – 2022. – Vol. 4. – P. 110453.

112. Qu L., Yin C., Huo F. *et al.* A maleimide-based thiol fluorescent probe and its application for bioimaging // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – Vol. 195. – P. 246–251.

113. Liu T., Huo F., Yin C. *et al.* A triphenylamine as a fluorophore and maleimide as a bonding group selective turn-on fluorescent imaging probe for thiols // *Dyes and Pigments*. – 2016. – Vol. 128. – P. 209–214.

114. Zhu X., Gao H., Zan W. *et al.* A rational designed thiols fluorescence probe: the positional isomer in PET // *Tetrahedron*. – 2016. – Vol. 72. – №16. – P. 2048–2056.

115. Yuriev D.Y., Tkachenko S.V., Polivanova A.G. Oshchepkov M.S. Application of Organic Fluorophores in the Development of Drug Delivery Systems Based on Synthetic and Natural Polymers // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2025. – Vol. 51. – P. 533–555.

116. Oshchepkov M.S., Tkachenko S.V., Popov K.I., Semyonkin A.S., Yuriev D.Y., Solovieva I.N., Melnikov P.A., Malinovskaya J.A., Oshchepkov A.S. Continuous-flow synthesis of the naphthalimide derivatives for medical and engineering applications // *Dyes and*

Pigments. – 2024. – Vol. 231. – P. 112386.

117. Tsai S.-R., Hamblin M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2017. – Vol. 170. – P. 197–207.

118. Gao Z., Hao Y., Zheng M. A fluorescent dye with large Stokes shift and high stability: synthesis and application to live cell imaging // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry.* – 2017. – Vol. 7. – №13. – P. 7604–7609.

119. Wynne C., Elmes R. B. P. Utilising a 1,8-naphthalimide probe for the ratiometric fluorescent visualisation of caspase-3 // *Frontiers in Chemistry.* – 2024. – Vol. 12. – P. 12.

120. Sakr A., Georgiev N., Bojinov V. Design, Photochemistry, Logic Gates Behavior and Antibacterial Evaluation of ICT Systems based on 1,8-naphthalimides // *Journal of Fluorescence.* – 2023. – Vol. 33. – №1. – P. 43–51.

121. Ohno H., Sumatani S., Sasaki E. *et al.* Recent advances in fluorogenic probes based on twisted intramolecular charge transfer (TICT) for live-cell imaging // *Chemical Communications.* – 2025. – Vol. 61. – №69. – P. 12871–12884.

122. Yan X., Feng R., Fu J. *et al.* Supramolecular Engineering of Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Dyes into Bright Fluorophores with Large Stokes Shifts // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2025. – Vol. 64. – №50. – P. 1345–1361.

123. Su Y., Zhang B., Sun R. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application // *Drug Delivery.* – 2021. – Vol. 28. – №1. – P. 1397–1418.

124. Siepman J., Siepman F. Release mechanisms of PLGA-based drug delivery systems: A review // *International Journal of Pharmaceutics: X.* – 2025. – Vol. 10. – P. 100440.

125. Yang B., Dong Y., Wang F. Nanoformulations to Enhance the Bioavailability and Physiological Functions of Polyphenols // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – №20. – P. 4613.

126. Liu Y., Liang Y., Yuhong J. *et al.* Advances in Nanotechnology for Enhancing the Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs // *Drug Design, Development and Therapy.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1469–1495.

127. Shi Y. Y., Li X., Li Z. Nano-formulations in disease therapy: designs, advances, challenges, and future directions // *Journal of Nanobiotechnology.* – 2025. – Vol. 23. – P. 396.

128. Stevanović M. M., Qian K., Huang L. PLGA-Based Co-Delivery Nanoformulations: Overview, Strategies, and Recent Advances // *Pharmaceutics.* – 2025. – Vol. 17. – №12. – P. 1613.

129. Haque S., Boyd B. J., McIntoch M. P. *et al.* Suggested Procedures for the Reproducible Synthesis of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Using the Emulsification Solvent Diffusion Platform // *Current Nanoscience*. – 2018. – Vol. 14. – №5. – P. 448–453.
130. Adscheid S. A., Rojas-Rodríguez M., Abdel-Hafez S. M. *et al.* Scalable Manufacturing Method for Model Protein-Loaded PLGA Nanoparticles: Biocompatibility, Trafficking and Release Properties // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – №1. – P. 87.
131. Choi C. H. J., Zuckerman J. E., Webster P. *et al.* Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108. – №16. – P. 6656–6661.
132. Zhang M., Gao S., Yang D. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors in vivo // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Vol. 11. – №8. – P. 2265–2285.
133. Narum S. M., Le T., Le D. P. Passive targeting in nanomedicine: fundamental concepts, body interactions, and clinical potential // *Nanoparticles for Biomedical Applications* / ed. by E.J. Chung, L. Leon, C. Rinaldi. – Elsevier, 2020. – P. 37–53.
134. Chiu H. I., Samad N. A., Fang L. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11. – №16. – P. 9433–9449.
135. Huang W., Zhang C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation // *Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 13. – №1. – P. 1700203.
136. Panigrahi D., Scherließ R. Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles // *SN Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 3. – №6. – P. 638.
137. Pucek-Kaczmarek A. Influence of Process Design on the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by an Ultrasonic-Nanoemulsification Method // *Processes*. – 2021. – Vol. 9. – №8. – P. 1265.
138. Roces C.B., Christensen D., Perrie Y. Translating the fabrication of protein-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles from bench to scale-independent production using microfluidics // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2020. – Vol. 10. – P. 582–593.
139. Zhukova V., Osipova N., Semyonkin A. *et al.* Fluorescently Labeled PLGA Nanoparticles for Visualization In Vitro and In Vivo: The Importance of Dye Properties //

Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – №8. – P. 1145.

140. Kovshova T., Malinovskaya J., Kotova J. *et al.* Core–Shell PLGA Nanoparticles: In Vitro Evaluation of System Integrity // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – №12. – P. 1601.

141. Datta R., Heaster T. M., Sharick J. T. *et al.* Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications // *Journal of Biomedical Optics*. – 2020. – Vol. 25. – №7. – P. 1–43.

142. López P. A., Blum S. A. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) as a Tool to Understand Chemical Reactions and Catalysis // *ACS Catalysis*. – 2024. – Vol. 14. – №22. – P. 17132–17147.

143. Garanina A., Vishnevskiy D., Chernysheva A. The Internalization Pathways of Liposomes, PLGA, and Magnetic Nanoparticles in Neutrophils // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – №10. – P. 2180.

144. Alkan A. B., Arslanhan E., Bahadori F. *et al.* Effects of Polysaccharide Coating on Cell-Surface Association and Endocytic Uptake of PLGA Nanomicelles in MCF-7 Cells // *Pharmaceutics*. – 2026. – Vol. 18. – №1. – P. 17.

145. Yuriev D.Y., Barabanshchikov I.V., Strukova V.A., Tkachenko S.V., Pakhomov A.A., Deev S.M., Akimov M.G., Ternovaya N.D., Sherstyanykh G.D., Sazonova V.A., Kalinkina V.A., Ulasevich S.A., Oshchepkov M.S. 1,8-Naphthalimide-based fluorescent bisphosphonates: molecular design, spectral-luminescent properties, and osteotropic targeted delivery systems // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2026. – Vol. 52. – №2. – P. 1–20.

146. Пат. 13720 Республика Беларусь, МПК C07F 9/00. Способ получения алендроновой кислоты / И.П. Прокопович, А.И. Хоменко, О.М. Бондарева, Д.В. Лопатик, З.И. Куваева. – Заявл. 13.12.2007, опубл. 30.10.2010.

147. Ye Y.-X., Guan J., Chen X.-Y. A new fluorescently labeled bisphosphonate for theranostics in tumor bone metastasis // *Talanta*. – 2021. – Vol. 235. – P. 122796.

148. Zaheer A., Lenkinski R. E. In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity // *Nat. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 1148–1154.

149. Shi S., Duan H., Ou X. Targeted delivery of anti-osteoporosis therapy: Bisphosphonate-modified nanosystems and composites // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 175. – P. 116699.

150. Qiu E., Liu F. PLGA-based drug delivery systems in treating bone tumors //

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – Vol. 11. – P. 1199343.

151. Jin S., Huang J., Yuan C. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration // *Acta Biomaterialia*. – 2021. – Vol. 127. – P. 56-79.

152. Liu P., Sun L., Zhou D.-S. *et al.* Development of Alendronate-conjugated Poly (lactic-co-glycolic acid)-Dextran Nanoparticles for Active Targeting of Cisplatin in Osteosarcoma // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 17387.

153. Jing C., Chen S., Bhatia S. S. *et al.* Bone-targeted polymeric nanoparticles as alendronate carriers for potential osteoporosis treatment // *Polymer Testing*. – 2022. – Vol. 110. – P. 107584.

154. Omidian H., Wilson R. L. PLGA Implants for Controlled Drug Delivery and Regenerative Medicine: Advances, Challenges, and Clinical Potential // *Pharmaceuticals*. – 2025. – Vol. 18. – №5. – P. 631-642.

155. Bakir M., Dawalibi A., Mufti M.A. Nano-Drug Delivery Systems for Bone Metastases: Targeting the Tumor-Bone Microenvironment // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – №5. – P. 603.

156. Ambrosio L., Raucci M. G., Vadalà G. *et al.* Innovative Biomaterials for the Treatment of Bone Cancer // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – №15. – P. 8214.

157. Aydin V. K., Saleh L., Ottewell P. D. *et al.* Doxorubicin induces bone loss and modifies multiple cell populations in vivo - Implications for modelling of bone metastasis // *Journal of Bone Oncology*. – 2025. – Vol. 56. – P. 100736.

158. Zhang N., Liu X., Hou R. *et al.* Ultrasound-Triggered Gas-Generating Doxorubicin Poly(lactic-co-glycolic acid)-Nanoparticles for Cancer Therapy // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2019. – Vol. 19. – №9. – P. 5463–5468.

159. Udepurkar A., Mampaey L., Clasen C. Microfluidic synthesis of PLGA nanoparticles enabled by an ultrasonic microreactor // *Reaction Chemistry & Engineering*. – 2024. – Vol. 9. – №8. – P. 2208–2217.

160. Choi Y., Kim J., Yoon H. Y. Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles for Cancer Therapy: Molecular Weight Effect of PLGA in Doxorubicin Release for Controlling Immunogenic Cell Death // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12. – №12. – P. 1165.

161. Ковшова Т. С., Осипова Н. С., Фортуна А. С., Ермоленко Ю. В., Максименко О. О., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э. Оптимизация методов оценки степени

включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 113–118.

162. Wohlfart S., Khalansky A. S., Gelperina S. E. *et al.* Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – №5. – P. 121-137.

163. Al-Saedi R. H., Khalaj-Kondori M., Feizi M. A. H. DOX-PLGA Nanoparticles Effectively Suppressed the Expression of Pro-Inflammatory Cytokines TNF- α , IL-6, iNOS, and IL-1 β in MCF-7 Breast Cancer Cell Line // Reports of Biochemistry and Molecular Biology. – 2024. – Vol. 12. – №4. – P. 530–539.

164. Pieper S., Langer K. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters // Materials Today: Proceedings. – 2017. – Vol. 4. – P. 188–192.

165. Maksimenko O., Malinovskaya J., Shipulo E. *et al.* Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 572. – P. 118733.

166. Prideaux M. SaOS2 Osteosarcoma cells as an in vitro model for studying the transition of human osteoblasts to osteocytes // Calcified Tissue International. – 2014. – Vol. 95. – №2. – P. 183–193.

167. Yevlashevskaya O., Wijenayaka A. R., Kumarasinghe D. D. *et al.* Differing responses of osteogenic cell lines to β -glycerophosphate // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13. – P. 14472.

168. Bozycki L., Komiazyk M., Mebarek S. *et al.* Analysis of Minerals Produced by hFOB 1.19 and Saos-2 Cells Using Transmission Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray Microanalysis // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – №136. – P. 134–156.

169. Strzelecka-Kiliszek A., Bozycki L., Mebarek S. *et al.* Characteristics of minerals in vesicles produced by human osteoblasts hFOB 1.19 and osteosarcoma Saos-2 cells stimulated for mineralization // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2017. – Vol. 171. – P. 100–107.