



УДК 547.661

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БИСФОСФОНАТЫ НА ОСНОВЕ 1,8-НАФТАЛИМИДА: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН, СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА И ОСТЕОТРОПНЫЕ СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ¹

© 2026 г. Д. Ю. Юрьев*,#, И. В. Барабанщиков*, В. А. Струкова*, С. В. Ткаченко*,
А. А. Пахомов**, С. М. Деев**, М. Г. Акимов**, Н. Д. Терновая*, Г. Д. Шерстяных**,
В. А. Сазонова***, В. А. Калинин***, С. А. Уласевич***, М. С. Ощепков*

* Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,
Россия, 125047 Москва, Миусская пл. 9

** ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*** Научный центр инфохимии Университета ИТМО, Россия, 191002 Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Поступила в редакцию 01.12.2025 г.

После доработки 19.12.2025 г.

Принята к публикации 22.12.2025 г.

Патологическая кальцификация и рак с метастазами в кости представляют собой серьезные диагностические и терапевтические проблемы. Хотя бисфосфонаты обладают высокой аффинностью к костной ткани, их сочетание с флуорофором для применения в тераностических целях требует точного молекулярного дизайна, чтобы сбалансировать функции нацеливания, визуализации и доставки. В данном исследовании представлена разработка и синтез серии новых флуоресцентных бисфосфонатов на основе 1,8-нафталимида с различными заместителями в 4-ом положении нафталимидного ядра. Полученные соединения продемонстрировали отличные фотофизические свойства, в том числе высокие квантовые выходы флуоресценции в водной среде. Обнаружена и исследована зависимость флуоресцентных свойств ряда новых производных от вязкости среды, что делает их превосходными зондами для сенсоров микроокружения. Кроме того, путем успешной конъюгации 4-(2-гидроксиэтилтио)-замещенного бисфосфоната с сополимером молочной и гликолевой кислот (PLGA), создана остеотропная система адресной доставки. Эти наночастицы были эффективно интернализированы клетками остеосаркомы Saos-2 после стимуляции, что было подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные бисфосфонаты и наночастицы показали низкую цитотоксичность, что позволяет использовать их для создания новых остеотропных систем адресной доставки. Данное исследование создает универсальную платформу для тераностики, нацеленной на костную ткань.

Ключевые слова: 1,8-нафталимид, бисфосфонаты, PLGA, остеосаркома, флуоресценция, флуоресцентная микроскопия

DOI: 10.7868/S1998286026020135

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.7868/S1998286026020135 для авторизованных пользователей.

Сокращения: АТФ-аза – аденозинтрифосфатаза; ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь; ГТФ – гуанозинтрифосфат; ДМАП – 4-диметиламинопиридин; ДМФА – *N,N*-диметилформамид; ДХМ – дихлорметан; НСМО – низшая свободная молекулярная орбиталь; НЧ – наночастицы; ПВС – поливиниловый спирт; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; FBS – фетальная бычья сыворотка; PDI – индекс полидисперсности; PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот; Rab – Ras-подобные белки в головном мозге; Ras – связанный с Ras субстрат ботулинического токсина C3; Ras – вирус саркомы крыс; Rho – гомолог Ras; RUNX2 – фактор транскрипции Runt-связанный 2; TICT – скрученный внутримолекулярный перенос заряда.

Автор для связи: (эл. почта: iurev.d.i@muctr.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Кальцификация – это строго регулируемый физиологический процесс, происходящий в костях и зубах, или патологический процесс, происходящий в мягких тканях [1]. 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-гидроксивитамин D_3), простагландины, алюминий, фторид анион F^- и остеоиндуктивные факторы [2]. 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 [3].

Патологическая кальцификация может возникнуть в любой ткани [4]. Она встречается при старении организма и часто локализована в области кровеносных сосудов, суставов и опухолей [5]. 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 жесткость в пораженных тканях, что приводит к повреждениям этих участков и воспалению [6].

Дифференциация опухолей мягких тканей как доброкачественных, так и злокачественных – достаточно сложная задача, и различные методы визуализации играют в этом процессе решающую роль [7, 8]. В последнее десятилетие все большее внимание ученых привлекают методы флуоресцентной визуализации для решения этой задачи [9, 10]. Отметим, что текущими “золотыми” стандартами для обнаружения отложений кальцификации в сосудах или *in vitro* выступают фотометрическое количественное определение содержания кальция при деминерализации ткани или клеток и гистологическое окрашивание с помощью ализаринового красного и метода фон Косса [11]. Один из главных недостатков этих методов – их неспецифичность в отношении гидроксиапатита [12].

На протяжении нескольких десятилетий бисфосфонаты – эффективный класс препаратов,

обладающий антирезорбтивным действием [13, 14]. Так, например, азотсодержащие бисфосфонаты (памидронат, алендронат, ризедронат, ибандронат, минодронат и золедронат) ингибируют ключевые ферменты пути биосинтеза мевалоната/холестерина [15]. Основная мишень для них – 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 [16, 17]. 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 [18].

Несмотря на значительные достижения в разработке остеотропных зондов, существующие флуоресцентные бисфосфонаты обладают рядом фундаментальных ограничений: ограниченная способность настраивания спектральных свойств, необходимость использования дополнительных линкеров для конъюгации, и недостаточное понимание структурно-функциональных зависимостей, влияющих на клеточную интернализацию. Критически важно разработать молекулярную платформу, которая бы одновременно совмещала высокое сродство к гидроксиапатиту, предсказуемые фотофизические свойства и возможность структурной оптимизации без существенного влияния на профиль биологической активности [19].

Структурное ядро 1,8-нафталимида представляет уникальную возможность для решения этих проблем благодаря исключительной химической модульности, яркой флуоресценции с большим Стоксовым сдвигом и способности к прямой функционализации по 4-положению [20, 21]. Ключевое преимущество данной платформы заключается в возможности одноэтапного введения бисфосфонатной группы непосредственно в структуру флуорофорного каркаса, что сохраняет высокую аффинность к кальцийсодержащим тканям и матриксу [22]. Более того, систематическое варьирование заместителей в 4-положении позволяет тонко настраивать спектральные характеристики молекул в диапазоне длин волн 450–550 нм, что открывает дополнительные перспективы для мультиплексной визуализации.

В настоящей работе представлен рациональный дизайн и синтез серии новых 1,8-нафталимидных бисфосфонатов, которые впервые сочетают: (i) прямую ковалентную интеграцию бисфосфонатной группы без дополнительных линкеров, (ii) систематическую оптимизацию спектральных свойств через электронные эффекты заместителей и (iii) возможность создания остеотропных наносистем путем ковалентной модификации биосовместимого сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). Полученные в ходе выполнения исследования соединения обеспечивают возможность изучения клеточной интернализации и биораспределения, что имеет фундаментальное значение для разработки следующего поколения диагностических и терапевтических агентов для терапии заболеваний костной ткани [23–25]. Полученные результаты не только расширяют представления о остеотропных системах, но и создают основу для трансляционных исследований в области ранней диагностики патологической кальцификации и таргетной доставки противораковых агентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез бисфосфонатов, содержащих 1,8-нафталимидный фрагмент. Существует несколько подходов для введения бисфосфонатного фрагмента в структуру органического флуорофора. В большинстве научных статей распространены два метода, включающие (1) ковалентную модификацию карбоксильной группы первичной аминогруппой бисфосфоната либо (2) использование

линкера на основе 3-аминопропеноксида, который хемоселективно алкилирует атом азота в гетероциклическом фрагменте аминокислоты бисфосфоната [26]. Конечные вещества чаще всего требуют сложной очистки, заключающейся в использовании препаративной высокоэффективной хроматографии, что существенно снижает выходы целевых соединений, которые достигают порядка 30% [27]. В представленной работе нами были предложены новые 4-метокси-, 4-этоксиэтил-, 4-(2-гидроксиэтилтио)-, 4-морфолинил-, 4-пиперазин-(*N*-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимиды, получаемые по реакции ацилирования аллендроновой кислоты замещенными 1,8-нафталимидами, которые потенциально могут быть использованы для флуоресцентной визуализации кальцификации тканей, отложений внеклеточного матрикса (гидроксипатита) или метастазов костной ткани. Общая схема синтеза производных представлена на рис. 1.

Первый этап работы – синтез ключевых полупродуктов – 4-замещенных 1,8-нафталевых ангидридов – для последующего введения бисфосфонатного фрагмента в структуру красителя. Для получения азотсодержащих производных из исходного 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида (I) были синтезированы 4-морфолинил- и 4-пиперазинил-1,8-нафталевые ангидриды (II) и (III) соответственно. Реакцию получения соединений (II) и (III) осуществляли в среде высокополярного апротонного растворителя диметилформамида (ДМФА) с добавлением соответствующего амина. Для сни-

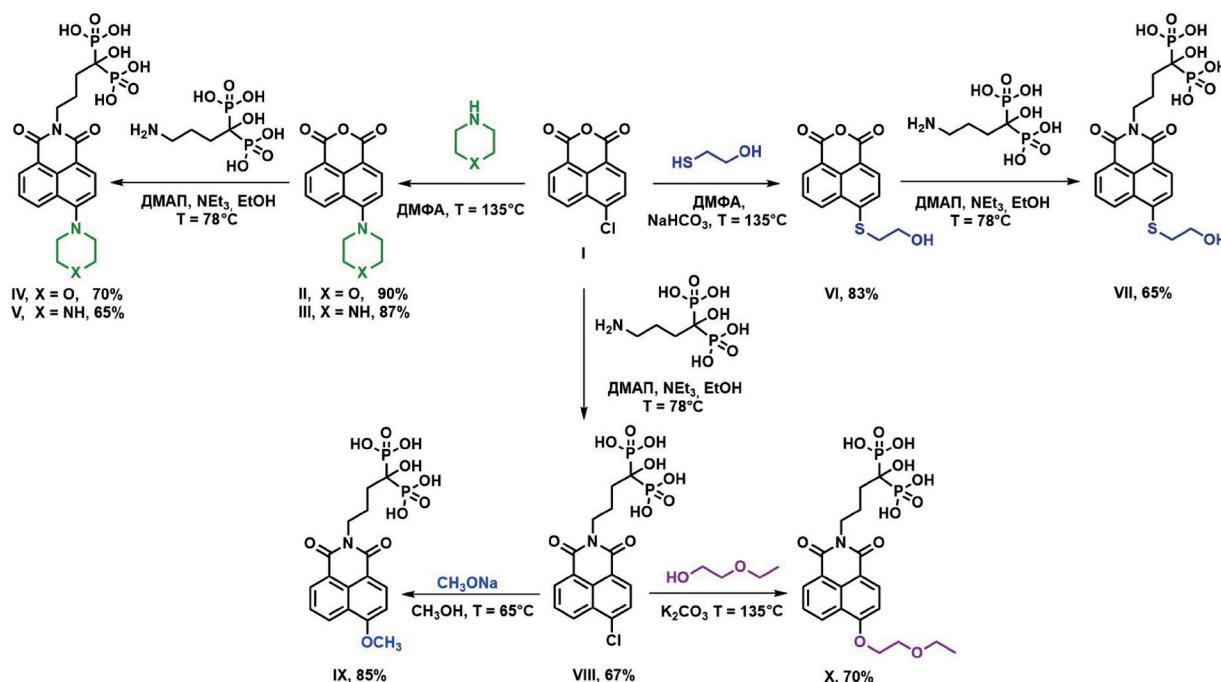


Рис. 1. Общая схема синтеза флуоресцентных бисфосфонатов, изучаемых в работе.

жения образования побочного дизамещенного 4-пиперазинил-1,8-нафталевого ангидрида использовали 5-кратный избыток пиперазина.

Для изучения влияния природы заместителя в 4-ом положении ароматического кольца нами был получен *S*-содержащий 4-(2-гидроксиэтилтио)-1,8-нафталевый ангидрид (VI) путем реакции 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида (I) с β -меркаптоэтанолом в присутствии мягкого основания, в качестве которого выступал гидрокарбонат натрия. Ввиду повышенной нуклеофильной активности тиолят-анионов по отношению к алколят-анионам, основной продукт реакции – целевой ангидрид (VI). Отметим, что наличие свободной гидроксильной группы открывает возможности создания более сложных производных путем модификации различными биологически активными веществами или высокомолекулярными соединениями для создания флуоресцентных агентов, избирательно связывающихся с компонентами костной ткани.

Следующий этап работы заключался в проведении реакции ацилирования 4-амино-1-гидрокси-бутан-1,1-бисфосфоновой (алендроновой) кислоты соответствующими ангидридами (I–VI) в присутствии основания триэтиламина и каталитического количества 4-диметиламинопиридина (ДМАП) в среде этилового спирта при кипячении. В ходе экспериментов было обнаружено, что реакция не

протекает без наличия катализатора ДМАП, образующего с ацилирующим агентом реакционноспособный ацилпиридиновый интермедиат, впоследствии атакующий аминный субстрат. В результате были получены целевые бисфосфонаты (IV), (V), (VII) и (VIII), выходы которых варьировались в диапазоне 65–70%, что в 2–3 раза выше, чем в методиках, описанных ранее [28].

Для получения кислородсодержащих производных проводили реакцию нуклеофильного ароматического замещения между 4-хлор-(*N*-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимидом (VIII) и метилатом натрия в метаноле при кипячении с получением 4-метокси-(*N*-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталимида (IX). Также для получения более гидрофильного бисфосфоната вводили этоксиэтильный заместитель в 4-ое положение ароматического кольца по реакции соединения (VIII) с этилцеллозольвом в присутствии безводного карбоната калия как основания для генерации алколят-анионов, причем этоксиэтанол выступал и в качестве реагента, и в качестве растворителя, что позволило избежать использования высококипящего ДМФА. На рис. 2 представлены ^1H - и ^{31}P -спектры бисфосфоната (IV) в D_2O , подтверждающие структуру полученного флуорофора.

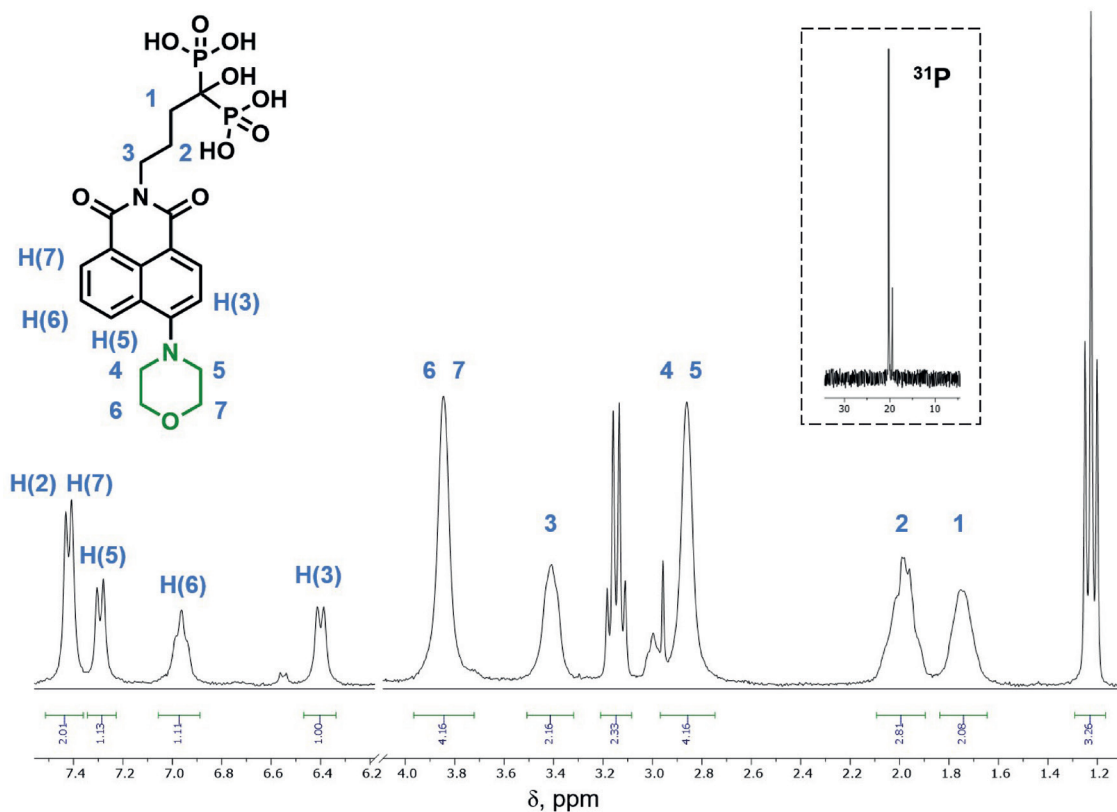


Рис. 2. Спектр ^1H и фрагмент ^{31}P для соединения (IV) в D_2O .

Изучение спектрально-люминесцентных свойств новых бисфосфонатов, содержащих 1,8-нафталимидный фрагмент. Один из ключевых аспектов, который необходимо учитывать при дизайне и синтезе флуоресцентных маркеров для биовизуализации, – получение водорастворимых красителей, что обеспечивает четкие и точные изображения с высокой интенсивностью флуоресценции и позволяет избежать артефактов, вызванных плохой растворимостью, агрегацией и взаимодействием с клеточными мембранами при проведении *in vitro* и *in vivo* исследований в режиме реального времени. Необходимо отметить, что полученные нами в данной работе целевые бисфосфонаты соответствуют этому требованию, что выгодно отличает их от большинства представителей широко используемых в настоящее время классов красителей (например, цианиновых). Для всех полученных флуорофоров были изучены спектрально-люминесцентные свойства в водной среде. Соединения (IX) и (X) характеризуются более коротковолновой полосой поглощения с максимумом в области 360–370 нм и максимумом флуоресценции в области 450–460 нм, что соответствует синей области спектра. Производные (IV), (V) и (VII)

характеризуется максимумом поглощения в области 400–440 нм и максимумом флуоресценции при 500–560 нм, что соответствует зеленой области спектра. Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров приведены на рис. 3 и в табл. 1.

Было установлено, что квантовые выходы флуоресценции для *O*- и *S*-замещенных бисфосфонатов имеют на порядок большие значения, чем для *N*-замещенных производных, что может быть объяснено возникновением для последних скрученного состояния с внутримолекулярным переносом заряда – TICT-состояния (Twisted Intramolecular Charge Transfer) [29, 30], которое возникает из-за свободного вращения морфолинового или пиперазинового заместителей в возбужденном состоянии вокруг простой связи N (аминопроизводного) – C₄ (нафталимидного кольца). Такое вращение приводит к релаксации возбужденного состояния молекулы флуорофора в значительной степени безызлучательным способом, а не путем люминесценции. Таким образом, доля излучательных процессов релаксации 4-аминозамещенных бисфосфонатов значительно снижается, что сказывается на значении квантовых выходов флуорес-

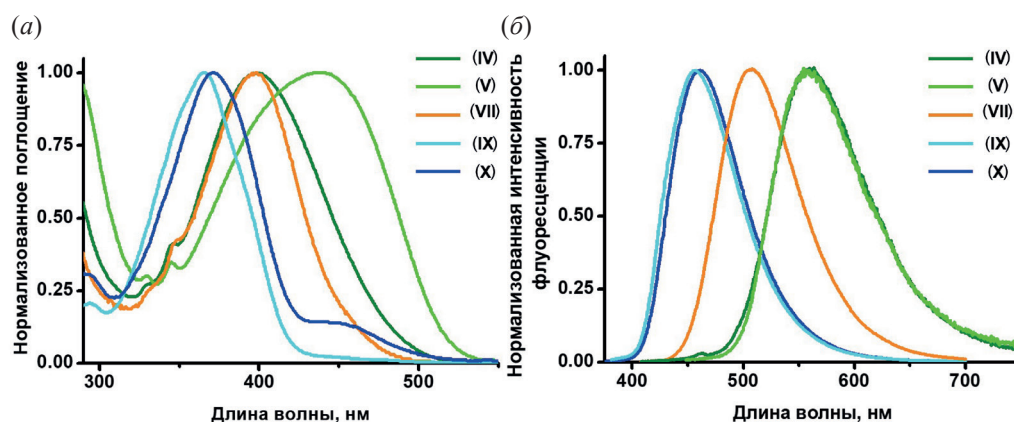


Рис. 3. Нормализованные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) бисфосфонатов (IV), (V), (VII), (IX), (X) в воде.

Таблица 1. Спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров в воде, 25°C

Флуорофор	$\lambda_{\text{погл макс}}$, нм	$\lambda_{\text{фл макс}}$, нм	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹	$\Phi_{\text{фл}}$, %	Яркость, М ⁻¹ см ⁻¹
(IV)	398	559	10600	7.00	750
(V)	436	559	8400	0.24	20
(VII)	397	507	3800	41.7	1600
(IX)	365	461	8650	40.0	3500
(X)	371	456	5100	61.4	3200

ценции, приводя к значительному падению по сравнению с *O*- и *S*-замещенными бисфосфонатами.

Однако, наличие такого состояния не служит ограничением, а открывает дополнительную потенциальную возможность создания специальных молекулярных зондов, чувствительных к свойствам среды, поскольку процессы релаксации в таких молекулах зависят в не меньшей степени и от ее свойств, в частности, от сольватации и вязкости [31]. Так, например, ПИСТ-сенсоры могут быть эффективны для отслеживания изменений вязкости среды, поскольку ограничение свободного вращения (снижение скорости) в вязких (высоковязких) средах должно приводить к повышению квантового выхода флуоресценции путем частичной блокировки безызлучательных каналов релаксации [32].

Для подтверждения данной гипотезы и развития направления специализированных молекулярных сенсоров были протестированы изменения спектральных откликов новых молекул в средах, отличающихся более высокой вязкостью по сравнению с водой. Для реализации этой задачи для *N*-замещенных производных (IV) и (V) проведена серия экспериментов в среде вода–глицерин в широком диапазоне концентраций. Следует особо отметить, что интенсивность флуоресценции бисфосфоната (IV) при длине волны $\lambda = 559$ нм увеличилась примерно в 23 раза (при возбуждении

на длине волны $\lambda = 398$ нм) (табл. 2). Зависимость логарифма интенсивности флуоресценции ($\lg I_{559}$) от логарифма вязкости среды ($\lg \eta$) – линейна ($R^2 = 0.9983$) во всем диапазоне вязкости от 1 до 912 сП (содержание глицерина 0–100%), как показано на рис. 4. Что касается квантового выхода флуоресценции, то в воде это значение составило $\Phi_{\text{фл вода}} = 7\%$, в глицерине $\Phi_{\text{фл глицерин}} = 13\%$ (увеличение в 1.86 раз) при использовании в качестве стандарта кумарина 6 в этаноле.

Для 4-пиперазин замещенного бисфосфоната (V), интенсивность флуоресценции при 559 нм увеличилась примерно в 14 раз (при возбуждении на длине волны 436 нм). Аналогично, при изучении зависимости логарифма интенсивности флуоресценции ($\lg I_{559}$) от логарифма вязкости ($\lg \eta$) для водно-глицериновых сред (от 0 до 100%) наблюдалась линейная зависимость ($R^2 = 0.9961$), рис. 5. Квантовый выход флуоресценции увеличился примерно в 21 раз ($\Phi_{\text{фл вода}} = 0.24\%$, $\Phi_{\text{фл глицерин}} = 5\%$) при определении в тех же условиях. Во всех случаях существенных сдвигов максимумов поглощения или флуоресценции при увеличении доли глицерина в смеси с водой не наблюдалось.

Таким образом, новые производные 1,8-нафталимида (IV) и (V) могут найти потенциальное применение для широкого ряда исследований в качестве сенсоров изменения вязкости в водных средах или в среде клеточных компартментов.

Таблица 2. Сравнение квантовых выходов флуоресценции флуорофоров (IV), (V) в воде и глицерине, 25°C

Флуорофор	$\Phi_{\text{фл}}$ в воде, %	$\Phi_{\text{фл}}$ в глицерине, %	Отношение квантовых выходов
(IV)	7.00	13.00	1.86
(V)	0.24	5.00	20.83

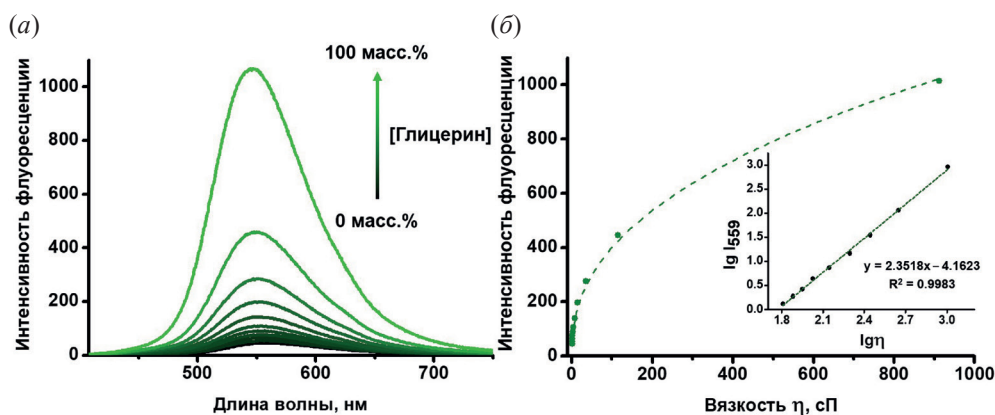


Рис. 4. (а) – Изменение интенсивности флуоресценции соединения (IV) (40 мкМ) в водно-глицериновых смесях (0–100 масс.%). (б) – Зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны 559 нм от вязкости раствора η (сП). На графике представлена зависимость $\lg I_{559}$ от $\lg \eta$. Длина волны возбуждения = 398 нм.

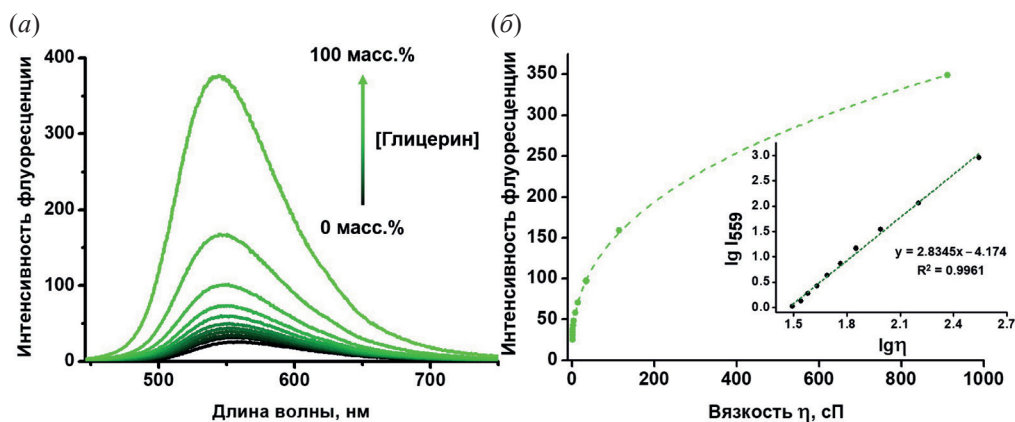


Рис. 5. (а) – Изменение интенсивности флуоресценции соединения (V) (40 мкМ) в водно-глицериновых смесях (0–100 масс.%). (б) – Зависимость интенсивности флуоресценции при 559 нм от вязкости раствора η (сП). На графике представлена зависимость $\lg I_{559}$ от $\lg \eta$. Длина волны возбуждения = 436 нм.

Получение систем адресной доставки на основе PLGA, модифицированного флуоресцентным бисфосфонатом (VII). Как было отмечено ранее, введение свободной OH-группы в структуру бисфосфоната (VII) расширяет возможности его применения в новых смежных областях химико-биологических и биомедицинских исследований. Так, все больший интерес для лечения заболеваний костной ткани представляют системы адресной доставки на основе синтетических полимеров [33]. Биосовместимый сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) – один из основных носителей для получения наносомальных лекарственных форм для лечения остеосаркомы [34, 35]. Ковалентная модификация его карбоксильных групп аминокислотой аллендроновой кислоты позволяет достичь высокой аффинности к костной ткани, а включение различных противоопухолевых агентов, таких как цисплатин, ифосфамид, доксорубин или паклитаксел в наносомалы из модифицированного таким образом полимера обеспечивает их контролируемое высвобождение, достижение локального действия и минимизацию побочных эффектов [36]. Стоит отметить, что сегодня интерес ученых направлен на поиск новых лекарственных форм и препаратов, обладающих улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, меньшими побочными эффектами и токсичностью, что может быть достигнуто путем создания наносомальных лекарственных форм [37]. Изучение их влияния 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, выступает перспективной научной задачей. В целях разработки таких форм нами были получены наносомалы на основе PLGA, модифицированного флуорфороном (VII), которые могут служить эффективным инструментом для исследования и визуализации новых остеотропных систем адресной доставки для лечения новообразований и патологий костной ткани.

Для этого нами была осуществлена ковалентная модификация PLGA гидроксильной группой бисфосфоната (VII) в условиях реакции Штеглица. В качестве агента, активирующего карбоксильную группу полимера, выступал 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), катализатором реакции O-ацилирования служил диметиламинопиридин (ДМАП), реакция протекала в мягких условиях в смеси растворителей хлористый метилен (ДХМ) – диметилформамид (ДМФА). Продукт очищали методом экстракции водно-метанольной смесью и осаждали из гексана, что позволило получить полимер PLGA-VII с выходом 86%.

Для получения PLGA наносомал существует несколько методов: наноосаждение, метод двойных эмульсий и ультразвуковой метод (VЗ) [38]. Среди перечисленных последний представляет собой достаточно простой и эффективный способ, основанный на акустической кавитации – процессе, при котором высокочастотные ультразвуковые волны создают и разрушают мельчайшие пузырьки в жидкой среде [39]. Указанный метод позволяет получать наносомалы с размерами $d_{cp} \sim 100 \div 200$ нм и узким распределением, что важно для создания объектов с предсказуемыми и воспроизводимыми свойствами.

Для получения наночастиц в качестве водной фазы выступал 2%-ый раствор поливинилового спирта (ПВС) в фосфатном буфере (pH 7.4), органическая фаза – раствор конъюгата PLGA-VII в хлористом метиле. После получения вторичной эмульсии при интенсивном встряхивании осуществляли ультразвуковую гомогенизацию в течение 5 мин на аппарате Bandelin Sonoplus HD при 79% мощности прибора, что соответствует 55 Вт (рис. 6). Размеры наночастиц контролировались через определенные промежутки времени с помощью метода динамического лазерного светорассеяния на анализаторе Zetasizer Nano ZS. После упаривания органической фазы, добавления криопротектора (D-маннита) и лиофилизации, были получены наночастицы размером $d_{cp} \sim 150$ нм и $PDI < 0.2$ (табл. 3). Следует отметить, что использование ультразвукового гомогенизатора позволило получить PLGA-наночастицы, модифицированные 1,8-нафталимидным флуорофором, с физико-химическими характеристиками (размер, полидисперсность, дзета-потенциал), сопоставимыми с показателями, достигаемыми альтернатив-

ными методами, что подтверждает эффективность данного подхода для данных целей. Кроме того, наночастицы PLGA-VII характеризовались невыраженным максимумом длины волны поглощения около 402 нм и максимумом длины волны флуоресценции 492 нм, что свидетельствует о сохранении оптических свойств бисфосфоната в составе полимерной основы (рис. 7).

Изучение токсичности бисфосфонатов, содержащих 1,8-нафталимидный фрагмент, и PLGA-наночастиц. На следующем этапе работы была проведена оценка метаболической активности клеточной линии Saos-2 для изучения токсичности полученных флуоресцентных бисфосфонатов (соединения-лидеры (IV), (VII) и (IX)), соответствующих наночастиц PLGA-VII. Цитотоксичность определяли с помощью резазуринового теста, основанного на ферментативном восстановлении индикаторного красителя жизне-способными клетками, что служит эффективным инструментом анализа пролиферации клеток и их скрининга. После обработки клеток бисфос-

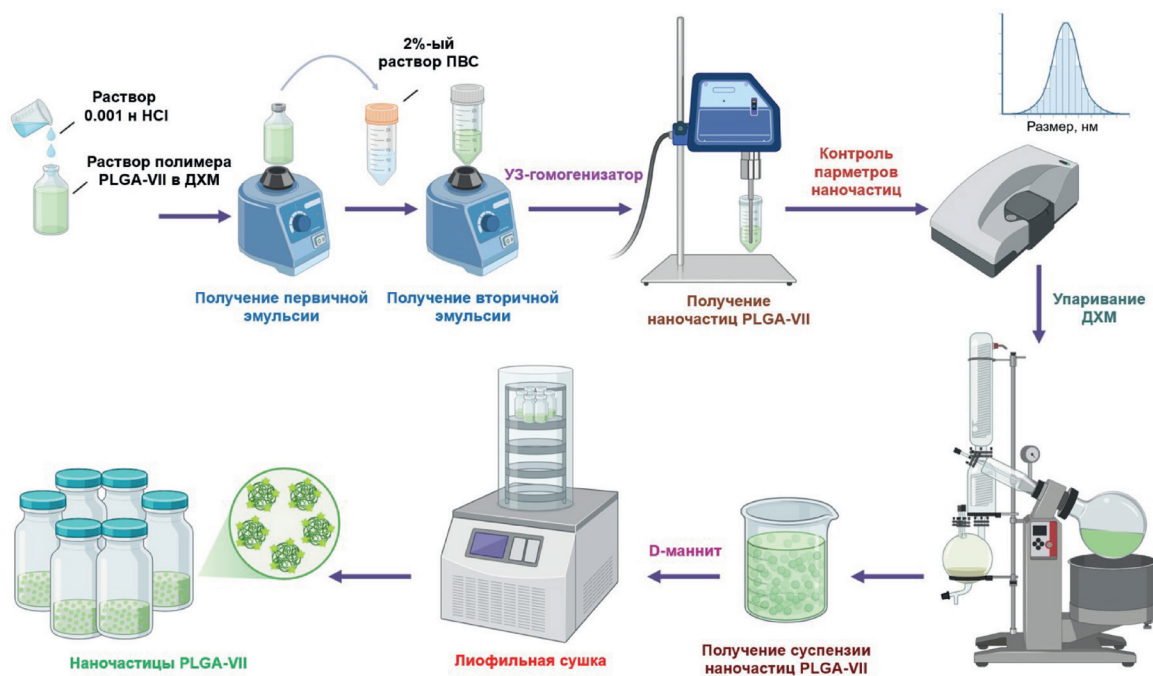


Рис. 6. Общая схема получения наночастиц PLGA-VII ультразвуковым методом.

Таблица 3. Физико-химические и спектрально-люминесцентные свойства наночастиц

Наночастицы	Размер, нм	PDI	ζ -потенциал, мВ	$\lambda_{\text{полг макс}}$, нм	$\lambda_{\text{фл макс}}$, нм
PLGA-VII	152.7 ± 1.136	0.110 ± 0.017	-5.42 ± 0.33	402	492

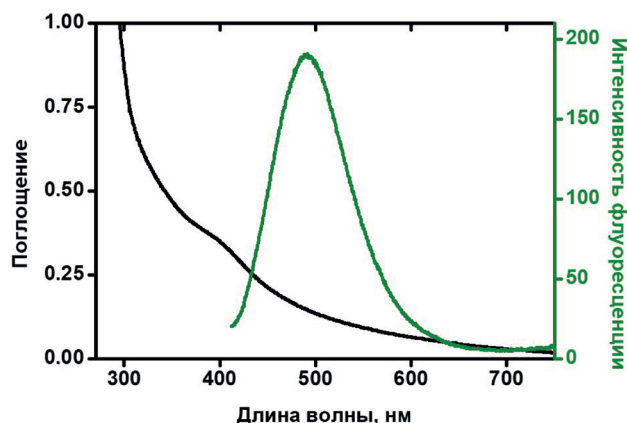


Рис. 7. Спектры поглощения и флуоресценции наночастиц PLGA-VII в воде. Концентрация [PLGA-VII] – 0.5 мг/мл.

фонатами в диапазоне концентраций 1–100 мкМ при 37°C в течение 24 ч жизнеспособность клеток Saos-2 не снижалась, что свидетельствует о низкой цитотоксичности новых флуоресцентных красителей для исследуемых живых клеток (рис. 8). Кроме того, была проведена оценка токсичности для соответствующих наночастиц PLGA-VII. Данные, полученные в результате эксперимента, показали, что наночастицы в широком диапазоне концентраций не влияли на метаболическую активность клеток Saos-2, которая была сопоставима с живым контролем, что указывает на сохранение биосовместимости и биодоступности полученной системы на основе сополимера PLGA. Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что флуоресцентные бисфосфонаты, содержащие 1,8-нафталиimidный фрагмент, и соответствующие наночастицы могут быть в дальнейшем использованы для эффективной визуализации кальцификации тканей, отложений гидроксиапатита и опухолевых образований в ряде *in vitro* или *in vivo* исследований.

Визуализация флуоресцентного бисфосфоната (IX) на клеточной линии миобластов мыши C2C12. Один из важных вопросов, возникающих по время изучения новых флуоресцентных маркеров, – изучение их цитотоксичности и способности проникновения через клеточную мембрану живой клетки. Оценку токсичности красителя и возможности его использования для биовизуализации проводили *in vitro* на клеточной линии миобластов мыши C2C12, которая служит модельной при исследованиях митохондрий, а также способна дифференцироваться как в мышечные клетки, так и в остеобласты [40]. В качестве флуоресцентного маркера в представленной части исследования выступал бисфосфонат (IX), обладающий высокими значениями спектрально-люминесцентных свойств.

Для окраски использовали два варианта протоколов: посмертный – при котором клетки выращивали до определенной плотности, затем фиксировали и окрашивали; и прижизненный – при котором краситель вносили в культуральную среду и

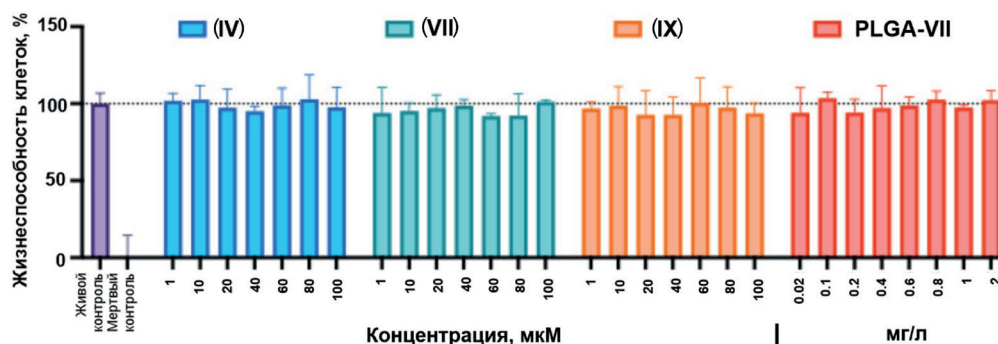


Рис. 8. Исследование цитотоксичности флуорофоров (IV), (VII) и (IX) и наночастиц PLGA-VII на клеточной линии остеосаркомы Saos-2 с применением резазуринового теста. Жизнеспособность клеток оценивалась после инкубации в течение 24 ч. Эксперименты выполнены в трех повторностях.

инкубировали вместе с клетками в течение 4–5 сут. Первый подход к визуализации оказался непригодным из-за низкого контраста и неспецифичного распределения флуоресценции, что не позволяло дифференцировать клеточные компартменты (рис. 9а–б). Ключевые данные были получены методом прижизненного окрашивания. Он подтвердил, что бисфосфонат (IX), содержащий 1,8-нафталимидный фрагмент, (а) – обладал пренебрежимо низкой цитотоксичностью в рабочих концентрациях, (б) – эффективно связывался с клеточной поверхностью и (в) – активно поглощался клетками, что визуализируется появлением яркой внутриклеточной флуоресценции (рис. 9в–г). Внесение красителя на третьи сутки после наращивания клеточного слоя, не привело к развитию апоптоза, наоборот, наблюдалась пролиферация клеток. На пятые сутки было отмечено значительное снижение клеточной плотности, что может быть обусловлено как естественным апоптозом вследствие заселения клетками всей поверхности, так и длительным воздействием красителя. Установлено, что успешная биовизуализация клеточной линии C2C12 требует инкубации флуорофора в течение 24–36 ч. На рис. 9г видно, что краситель (IX) проникает внутрь клеточной мембраны, не прокрашивая ядро. Считается, что в случае, если мембрана повреждена или клетка находится в состоянии апоптоза, флуорофор должен прокрашивать не только цитоплазму, но и ядерные структуры, что, соответственно, может служить дополнительным маркером жизнеспособности клеток.

Таким образом, было продемонстрировано, что прижизненный протокол окрашивания клеток – предпочтителен для проведения *in vitro* исследований по визуализации флуоресцентных бисфосфонатов, содержащих 1,8-нафталимидный фрагмент, что будет использовано в последующих экспериментах.

Визуализация распределения бисфосфонатов и наночастиц PLGA-VII на клеточной линии остеосаркомы Saos-2. В представленном исследовании клеточная линия остеосаркомы Saos-2 была выбрана в качестве остеобластоподобной модели для изучения связывания бисфосфонатов с внеклеточным матриксом (гидроксиапатитом), выделяемым клетками при воздействии остеогенной добавки, состоящей из аскорбиновой кислоты, дексаметазона и β -глицерофосфата [41]. Совокупность этих агентов используется для индукции остеогенного фенотипа в культурах остеобластов. Известно, что аскорбиновая кислота служит кофактором гидроксилирования пролина, участвующего в синтезе коллагена, который необходим для отложения минерального матрикса, в то время как дексаметазон способствует остеогенной дифференцировке путем повышения уровня транскрипции фактора RUNX2. β -глицерофосфат – источник органического фосфата для минерализации внеклеточного матрикса *in vitro* [42]. В связи с этим, нами были изучены распределение и возможность связывания бисфосфонатов и соответствующих наночастиц, как на линии, не подвергшейся обработке этими агентами, так и на линии, продуцирующей образование отложений гидроксиапатита.

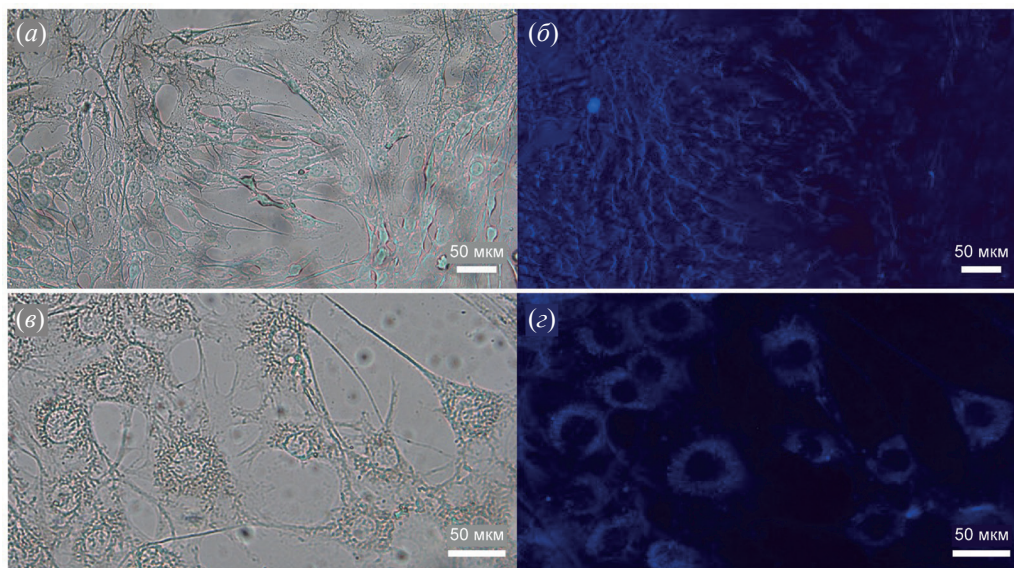


Рис. 9. Изображения клеточной линии C2C12 в светлом поле, полученные при инкубации с флуорофором (IX) (2 мкМ) при посмертном (а) и прижизненном (в) окрашиваниях; Флуоресцентные изображения клеточной линии C2C12, полученные при инкубации с флуорофором (IX) (2 мкМ) при посмертном (б) и прижизненном (г) окрашиваниях.

Флуоресцентные бисфосфонаты (**VII**), представленные на рис. 10*а–в*, (**IV**) и (**IX**) (см. дополнительные материалы рис. 17*а–в*, 18*а–в*) эффективно интернализовались в клетки Saos-2, обработанные остеогенной добавкой, причем наблюдались области скопления флуорофоров внутри них. На основании литературных данных [43] можно предположить, что флуорофор связывался с матриксными везикулами, в которых происходит продуцирование минерализованного матрикса на первых этапах пролиферации клеток. Такие везикулярные структуры, образующиеся в клетках, служат центрами нуклеации для образования минералов, что обусловлено наличием в них аннексинов и переносчиков фосфата, способствующих первоначальному осаждению катионов кальция и фосфат-анионов [44]. Интересно отметить, что при визуализации бисфосфонатов на необработанной линии (контроль) нами не было обнаружено флуоресцентного сигнала от образцов,

что может быть объяснено отсутствием везикул и матрикса, с которым может связываться бисфосфонатная группа флуорофора (рис. 10*г–е*, дополнительные материалы рис. 17*г–е*, 18*г–е*). Отметим, что аналогичная зависимость наблюдалась и для соответствующих PLGA-**VII** наночастиц (рис. 11*а–е*), что может быть обусловлено влиянием свободных бисфосфонатных групп на поверхности наночастиц, выступающих вектором к отложениям кальция в клетках.

Полученные данные подтверждают, что ковалентная модификация PLGA новым флуоресцентным бисфосфонатом (**VII**), содержащим 1,8-нафталиимидный фрагмент, обеспечивает аффинность наночастиц на их основе к минерализованному матриксу, что может быть использовано для разработки безопасных и эффективных инструментов для ранней диагностики заболеваний костной ткани, а также для создания терапевтических агентов.

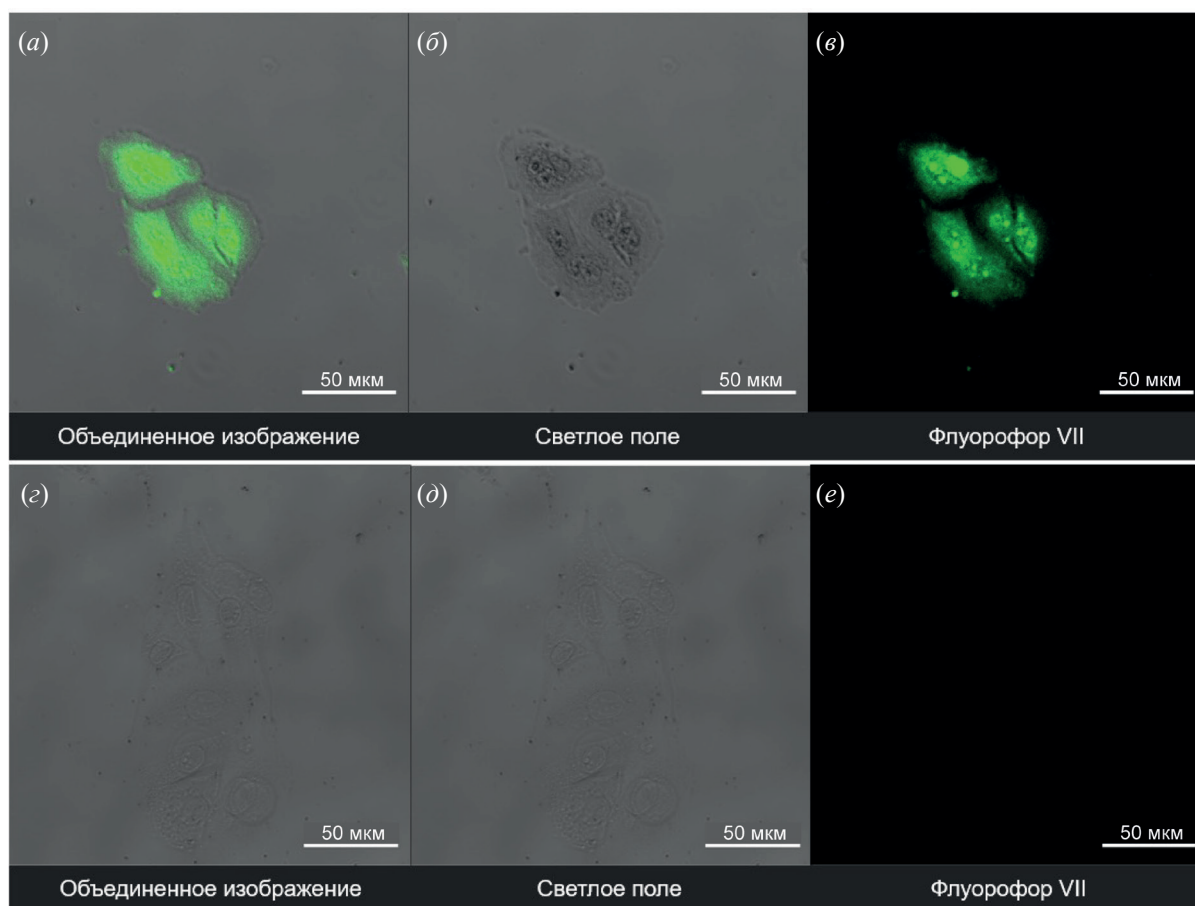


Рис. 10. Флуоресцентные изображения распределения бисфосфоната (**VII**) на клеточной линии Saos-2, обработанной остеогенной добавкой. (а) – Объединенное изображение; (б) – светлое поле; (в) – флуорофор (**VII**) (концентрация – 20 мМ). Флуоресцентные изображения распределения флуорофора (**VII**) на клеточной линии Saos-2, не обработанной остеогенной добавкой. (г) – Объединенное изображение; (д) – светлое поле; (е) – флуорофор (**VII**) (концентрация – 20 мМ).

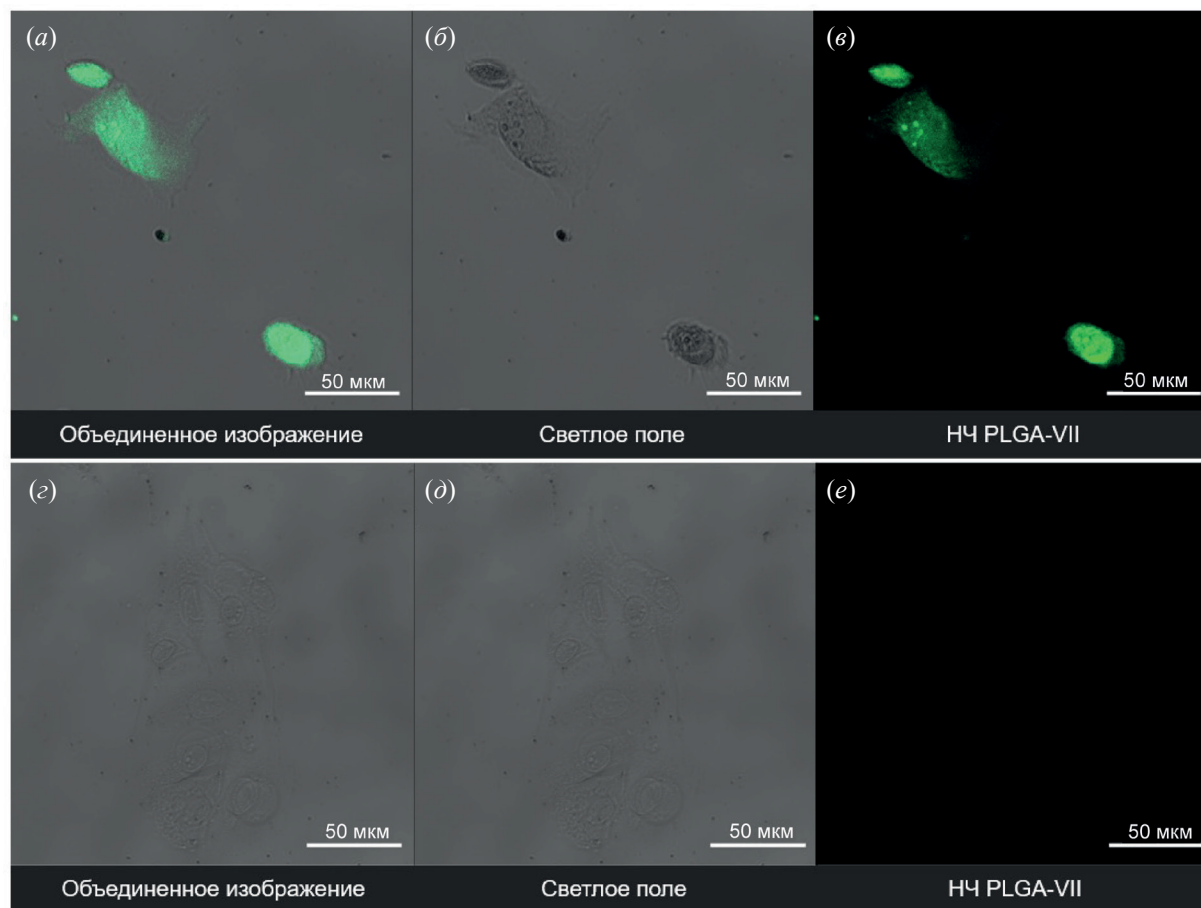


Рис. 11. Флуоресцентные изображения распределения наночастиц PLGA-VII на клеточной линии Saos-2, обработанной остеогенной добавкой. (а) – Объединенное изображение; (б) – светлое поле; (в) – наночастицы PLGA-VII (концентрация – 200 мкг/мл). Флуоресцентные изображения распределения наночастиц PLGA-VII на клеточной линии Saos-2, не обработанной остеогенной добавкой. (з) – Объединенное изображение; (д) – светлое поле; (е) – наночастицы PLGA-VII (концентрация – 200 мкг/мл).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Морфолин, пиперазин, β-маркаптоэтанол, метиловый спирт, этиловый спирт, этилцеллозольв, диметилформамид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), *N,N*-диметиламинопиридин (ДМАП), диизопропилэтиламин (DIPEA), исходный полимер PLGA (Resomer® RG 502 H, Lot# 170300516), поливиниловый спирт (9–10 кДа, гидролизован на 80%), *D*-маннит были поставлены фирмами Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Evonik Röhm GmbH, Диа-М, ВЕКТОН, АО “ЭКОС-1” и использовались без дополнительной очистки.

Среда McCoy 5A, MEM, раствор *L*-глутамина, раствор антибиотиков приобретен в фирме Хеликон, Россия. Раствор Версена, раствор Хэнкса, 1 М раствор НЕРЕС, PBS, *D*-глюкоза, раствор трипсина в ЭДТА приобретены в фирме ПанЭко,

Россия. Коровья эмбриональная сыворотка была производства BioSera, Франция. Ресазурин произведен фирмой Cayman, США. Бета-глицерофосфат, дексаметазон, аскорбиновая кислота приобретены в фирме Sigma-Aldrich, США.

Линия человеческой остеосаркомы Saos-2 (HTB-85) приобретена в ATCC®, США.

Спектры ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{31}P записывали на спектрометрах фирмы 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 – $\text{DMSO-}d_6$ и D_2O . Химические сдвиги измеряли с точностью до 0.01 м.д., а КССВ – с точностью до 0.1 Гц.

Элементный состав образцов определяли на CHNS-анализаторе Vario EL Cube (Elementar).

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

Визуализацию клеточной линии C2C12 выполняли на флуоресцентном микроскопе Leica DMI8 (Leica, Германия). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Для визуализации клеточной линии Saos-2 был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 980 (Германия). Возбуждение осуществлялось лазером 405 нм, детекция флуоресценции – в диапазоне 450–650 нм.

Синтез 4-морфолин-1,8-нафталенового ангидрида (II). 4-Хлор-1,8-нафталеновый ангидрид (I) (1 г, 4.3 ммоль) суспендировали в 20 мл диметилформамида и добавляли морфолин (0.743 мл, 8.6 ммоль). Реакционную массу кипятили в течение 8 ч, охлаждали и добавляли 100 мл холодной воды, в результате чего выпадал осадок, который отфильтровывали и сушили при 80°C в течение 10 ч.

Получали продукт оранжевого цвета массой 1.1 г. Выход 90%. Спектр ЯМР ^1H (300.13 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 25.1°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 3.22$ (т, $J = 4.5$, 4Н), 3.91 (т, $J = 4.5$, 4Н), 7.32 (д, $J = 8.2$, 1Н), 7.8 (т, $J = 8.1$, 1Н), 8.39 (д, $J = 8.1$, 1Н), 8.51–8.43 (м, 2Н). Спектр ЯМР ^{13}C (75.50 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 46.9$, 65.9, 110.5, 113.2, 119.3, 125.1, 128.7, 129.6, 132.8, 133.7, 134.8, 149.0, 157.7, 160.8. 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.

Синтез 4-пиперазин-1,8-нафталенового ангидрида (III). 4-Хлор-1,8-нафталеновый ангидрид (I) (0.93 г, 4 ммоль) и пиперазин (1.72 г, 20 ммоль) суспендировали в 30 мл ДМФА и перемешивали при 135°C в течение 4 ч. Реакционную массу охлаждали и к полученному раствору добавляли 50 мл холодной воды, что приводило к выпадению осадка, который фильтровали и перекристаллизовывали из этилового спирта. В результате получали продукт в виде кристаллов оранжевого цвета массой 0.98 г. Выход 87%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 26.7°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 3.16$ (м, 8Н), 7.18 (д, $J = 8.5$, 1Н), 7.76 (д, $J = 7.6$, 1Н), 8.31 (д, $J = 8.4$, 1Н), 8.45 (д, $J = 7.3$, 1Н), 8.57 (д, $J = 8.5$, 1Н). Спектр ЯМР ^{13}C (75.50 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 44.8$, 108.4, 113.2, 119.3, 124.1, 125.5, 132.9, 133.0, 133.7, 134.8, 157.8, 160.8. 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.

Синтез 4-(2-гидроксиэтилмеркапто)-1,8-нафталенового ангидрида (VI). 4-Хлор-1,8-нафталеновый ангидрид (I) (2.32 г, 10 ммоль), β -меркаптоэтанол (1 мл, 15 ммоль) и гидрокарбонат натрия (0.84 г, 10 ммоль) растворяли в 30 мл ДМФА и перемешивали при 135°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали и добавляли 50 мл холодной воды, что приводило к выпадению осадка, который фильтровали и сушили при 80°C в течение 8 ч. В результате получали вещество желтого цвета массой 2.27 г. Выход 83%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 26.7°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 3.40$ (т, $J = 6.4$, 2Н), 3.78 (т, $J = 6.2$, 2Н), 5.19 (у.с., 1Н), 7.81 (д, $J = 8.0$, 1Н), 7.92 (т, $J = 7.9$, 1Н), 8.37 (д, $J = 8.0$, 1Н), 8.57 (дд, $^3J_1 = 8.6$, $^3J_2 = 8.5$, 2Н). Спектр ЯМР ^{13}C (75.50 МГц, $\text{DMCO}-d_6$, 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 34.6$, 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. $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$. Вычислено, %: С, 61.31; Н, 3.67; S, 11.69.

Общая методика получения 4-замещенных-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиминов. К суспензии 4-замещенного 1,8-нафталенового ангидрида (1 экв.) в 50 мл этилового спирта добавляли заранее приготовленную смесь 4-амино-1-гидрокси-пропил-1,1-бисфосфоновой кислоты (1 экв.), *N,N*-диметиламинопиридина (0.083 экв.) в 1.5 мл этилового спирта с добавлением триэтиламина (10 экв.) и 1 мл воды. Реакционную массу кипятили 7 ч, охлаждали и доводили значение pH 4–5 концентрированной соляной кислотой. В результате выпадал осадок, который фильтровали и сушили при 80°C в течение 8 ч.

4-Морфолин-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталенимид (IV). Выход 70%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, D_2O , 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 1.83$ –2.03 (м, 4Н, 2 CH_2), 3.16–3.31 (м, 4Н, 2N– CH_2 – CH_2 –O), 3.85–3.97 (м, 4Н, 2N– CH_2 – CH_2 –O), 3.97–4.09 (м, 2Н, CH_2), 7.36 (д, 1Н, Н(3), $^3J = 7.9$), 7.82 (дд, 1Н, Н(6), $^3J_1 = 7.9$, $^3J_1 = 7.8$), 8.41 (д, 1Н, Н(2), $^3J = 7.9$), 8.44–8.57 (м, 2Н, Н(2), Н(7)). Спектр ЯМР ^{13}C (75.50 МГц, D_2O , 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): 22.0, 27.9, 39.6, 51.2 (2С, 2N– CH_2 – CH_2 –O), 66.2 (2С, N– CH_2 – CH_2 –O), 75.2 (т, $J_{\text{P-C-P}} = 130.1$, –CON), 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 ЯМР ^{31}P (121.49 МГц, D_2O , 25°C , $\delta/\text{м. д.}$): 20.2 (с, P–C–P). Найдено, %: С, 46.65; Н, 4.80; N, 5.39. $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P}_2$. Вычислено, %: С, 46.70; Н, 4.70; N, 5.45.

4-Пиперазин-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталенимид (V). Выход 65%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, D_2O , 25°C , $\delta/\text{м. д.}, J/\text{Гц}$): $\delta = 2.01$ –1.68 (м, 4Н), 2.98 (м, 8Н), 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 ЯМР ^{13}C (100.61 МГц, D_2O , 20°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 22.6$, 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 ЯМР ^{31}P (121.73 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$): $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$: 18.4 (с, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$). 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-нафталиимид (VII). Выход 65%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 1.80$ (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 ЯМР ^{13}C (100.61 МГц, D_2O , 20°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 22.8$, 34.5, 36.6, 42.9, 60.4, 76.1 ($J_{\text{C,P}} = 134.20$, $-\text{C}(\text{OH})$), 123.4, 125.2, 127.4, 127.6, 128.2, 129.1, 130.3, 130.7, 131.8, 134.3, 163.5, 163.7. Спектр ЯМР ^{31}P (121.49 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$): 19.3 (с, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$). 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-Хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиимид (VIII). Выход 67%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 1.98$ –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 ЯМР ^{13}C (100.61 МГц, D_2O , 20°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 22.2$, 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 ЯМР ^{31}P (161.98 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$): $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$: 18.3 (с, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$). 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.

Синтез 4-метокси-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиимид (IX). 4-Хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиимид (VIII) (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 метанола). Реакционную массу кипятили в течение 8 ч, охлаждали и доводили значение pH 4–5 концентрированной соляной кислотой и добавляли 50 мл метанола, в результате чего выпадал осадок, который фильтровали, промывая смесью метанол–вода (9 : 1, об./об.), и сушили при 60°C в течение 8 ч. Получали целевой продукт (IX) массой 0.25 г. Выход 85%. Спектр ЯМР ^1H (300.21 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 1.48$ (м, 4H, 2CH_2 –), 3.54 (м, 2H, CH_2 –), 3.66 (с, 3H, OMe –), 6.84 (д, 1H, H(3), $^3J = 8.4$), 7.34 (дд, 1H, H(6), $^3J_1 = 8.3$, $^3J_2 = 7.5$) 7.93–

8.08 (м, 3H, H(2), H(5), H(7)). Спектр ЯМР ^{13}C (100.24 МГц, D_2O , 22°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 25.4$, 27.5, 40.6, 57.1, 74.3 (т, $J_{\text{C,P}} = 130.11$, $-\text{C}(\text{OH})$), 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 ЯМР ^{31}P (121.49 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$): 18.4 (с, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$). 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.

Синтез 4-этоксипропил-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиимид (X). 4-Хлор-(N-пропил-1,1-бисфосфоно- α -гидрокси)-1,8-нафталиимид (VIII) (0.2 г, 0.43 ммоль) и карбонат калия (0.6 г, 0.43 ммоль) суспендировали в 30 мл этилцеллозольва и реакционную массу кипятили в течение 8 ч. После охлаждения до комнатной температуры доводили значение pH 4–5 концентрированной соляной кислотой и добавляли 50 мл метанола, в результате чего выпадал осадок, который фильтровали, промывая смесью метанол–вода (9 : 1, об./об.), и сушили при 60°C в течение 8 ч. Получали целевой продукт (X) массой 0.156 г. Выход 70%. Спектр ^1H ЯМР (300.21 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 1.30$ (т, $J = 7.0$, 2H), 1.95 (м, 4H), 3.79 (к, $J = 7.1$, 3H), 3.91 (м, 2H), 4.05 (у.с., 2H), 4.30 (у.с., 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 ЯМР ^{13}C (75.50 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$, $J/\text{Гц}$): $\delta = 13.4$, 21.8, 30.8, 40.5, 66.2, 67.2, 67.4, 73.2 (д, $J_{\text{C,P}} = 129.02$, $-\text{C}(\text{OH})$), 118.6, 120.0, 126.3, 126.9, 130.0, 130.6, 131.0, 132.9, 138.2, 158.9, 163.4, 163.7. Спектр ЯМР ^{31}P (121.49 МГц, D_2O , 25°C, $\delta/\text{м. д.}$): 18.3 (с, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$). Найдено, %: С, 46.36; Н, 4.72; N, 2.88. $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_{11}\text{P}_2$. Вычислено, %: С, 46.43; Н, 4.87; N, 2.71.

Определение квантовых выходов флуоресценции бисфосфонатов. Для определения квантовых выходов флуоресценции красителей в воде была приготовлена серия растворов флуорофоров и выбранных стандартов. Для красителей (IV), (V) и (VII) в качестве стандарта использовался кумарин 6, растворенный в этаноле, характеризующийся $\lambda_{\text{макс}}^{\text{пол}} = 457$ нм, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 500$ нм, $\Phi_{\text{фл}} = 78\%$. Для красителей (IX) и (X) использовался сульфат хинина в 0.5 М серной кислоте, характеризующийся $\lambda_{\text{макс}}^{\text{пол}} = 317$ и 349 нм, $\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}} = 450$ нм, $\Phi_{\text{фл}} = 54.6\%$. Квантовый выход флуоресценции рассчитывался по формуле:

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

где $\Phi_{\text{фл}}$ и $\Phi_{\text{ст}}$ – квантовые выходы флуоресценции флуорофора и стандарта, $S_{\text{фл}}$ и $S_{\text{ст}}$ – интегральные интенсивности флуоресценции флуорофора и стандарта, $A_{\text{фл}}$ и $A_{\text{ст}}$ – поглощение флуорофора и стандарта, $n_{\text{фл}}$ и $n_{\text{ст}}$ – показатели преломления среды.

Синтез конъюгата PLGA-VII. Навеску соединения (VII) (25 мг, 0.05 ммоль) растворяли в 3 мл ДМФА, полимер PLGA (1 г) растворяли в 6 мл хлористого метилена, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) (76.8 мг, 0.5 ммоль) и *N,N*-диметиламинопиридин (ДМАП) (60.5 мг, 0.5 ммоль) растворяли в 3 мл хлористого метилена каждый. В реакционную массу вносили 86 мкл диизопропилэтиламина (DIPEA). Реакционную массу перемешивали 48 ч при комнатной температуре. Далее 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. Образование конъюгата определяли при помощи ТСХ (элюент – дихлорметан : метанол : вода – 6.5 : 2.5 : 0.4).

Получение наночастиц PLGA-VII ультразвуковым методом. Конъюгат PLGA-VII (100 мг) растворяли в 1.2 мл хлористого метилена и приливали к 0.6 мл 0.001 н раствора соляной кислоты, перемешивали на встряхивателе типа “Vortex” в течение 2 мин, затем добавляли 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 упаривали 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°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.

Культивация клеток C2C12. Иммортилизованную линию мышинных миобластов C2C12 культивировали в среде на основе Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) и добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе с содержанием CO_2 равны 5% и влажности 95%. Каждые 2–3 дня при дости-

жении клетками 70–80% монослоя, их пересеивали и меняли среду.

Протоколы для визуализации клеток C2C12. Для прижизненной окраски в культуральную среду на 2 сут, когда плотность монослоя достигала около 50%, добавляли флуорофор, растворенный в диметилсульфоксиде таким образом, чтобы его концентрация в среде составляла 1 мкг/мл культуральной среды. Затем клетки помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали в течение 3–5 сут. На 5 сут среду удаляли, а клетки фиксировали на стекле 70% раствором этанола и смотрели на флуоресцентном микроскопе Leica DM18.

При посмертной окраске клетки культивировали до плотности монослоя 60–70%, затем удаляли культуральную среду, фиксировали клетки с помощью 70% этанола на стекле, промывали десятикратным раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), после промывания добавляли 1 мл раствора ФСБ и вносили флуорофор в диметилсульфоксиде до концентрации 1 мкг/мл. Образцы выдерживали в течение 5–10 мин в темноте при 4°C .

Подготовка клеточной линии Saos-2. Клетки линии Saos-2 культивировали в среде McCoy 5A с добавлением 1.5 mM *L*-глутамина, 15% коровьей эмбриональной сыворотки FBS (Fetal bovine serum, 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 mM *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 mM аскорбиновой кислоты, 5 mM бета-глицерофосфата, 10 нМ дексаметазона и 25 mM NEPES и инкубировали 48 ч. В качестве контроля использовали клетки с заменой среды на аналогичную без стимуляторов.

Для окрашивания клеток среду из лунок удаляли, однократно промывали лунки раствором Хэнкса, после чего добавляли 0.2 г/л раствор исследуемых веществ в растворе Хэнкса и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. После этого лунки трижды промывали раствором фосфатно-солевого буфера.

Оценка цитотоксичности с применением реззуринового теста. Для оценки цитотоксичности клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 2000 клеток на лунку, культивировали 24 ч, после чего добавляли раствор исследуемых соединений в среде культивирования по схеме 100 мкл старой среды в лунке (объем посева) и 100 мкл свежей среды с веществом. Базовые растворы веществ готовили в ростовой среде без сыворотки; при добавлении итоговый добавляемый объем не превышал 11% от объема лунки. Клетки культивировали с веществами в течении суток, после чего оценивали цитотоксичность с помощью реззуринового теста. В качестве контроля использовали клетки с добавлением среды без исследуемых веществ.

Для проведения реззуринового теста использовали 0.2 мМ раствор реззурина в растворе Эрла с добавлением 1 г/л D-глюкозы. Среда в лунках заменяли на раствор реззурина и инкубировали 2 ч при 37°C. После этого измеряли флуоресценцию при длинах волн возбуждения 535 нм и испускания 620 нм с помощью планшетного флуориметра Hidex Sense Beta Plus (Hidex, Финляндия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кальцификация мягких тканей, нарушения остеогенеза, опухолевые поражения костей и ассоциированные метастазы остаются значимыми вызовами современной медицины. Раннее выявление этих патологий требует инновационных диагностических инструментов, среди которых флуоресцентная биовизуализация выступает одним из самых перспективных.

Производные 1,8-нафталимида с интегрированной бисфосфонатной группой представляют собой перспективную платформу для разработки подходов к диагностике и терапии костных заболеваний. В настоящей работе синтезированы и охарактеризованы новые флуоресцентные бисфосфонаты на основе этого флуорофора, обладающие потенциалом для селективной визуализации гидроксиапатитовых отложений в мягких тканях и конструирования наносомальных тераностических систем.

Спектрально-люминесцентные свойства синтетических соединений изучены в водных и высоко вязких средах. Флуорофор со свободной гидроксильной группой использовался для ковалентной модификации биосовместимого сополимера PLGA, что позволило получить остеотропные наночастицы для адресной доставки лекарственных веществ.

Целевые соединения и наночастицы проявили низкую токсичность по отношению к клеточной линии остеосаркомы Saos-2, что подчеркивают перспективность 1,8-нафталиимидных флуоресцентных бисфосфонатов для широкого круга медико-биологических исследований.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи и дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Masroori Z., Mirghaderi P., Haseli S. // *Diagnostics*. 2025. V. 15. P. 811. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15070811>
2. Ciosek Ž., Kot K., Kosik-Bogacka D. // *Biomolecules*. 2021. V. 11. P. 506. <https://doi.org/10.3390/biom11040506>
3. Proudfoot D. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. P. 15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035303>
4. Bagur R., Hajnóczy G. // *Mol. Cell*. 2017. V. 66. P. 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
5. Ibragimova A.G., Stanishevskiy Y.M., Plakkhin A.M. // *Front. Aging Neurosci.* 2023. V. 15. P. 1131548. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1131548>
6. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Rezvova M.A. // *J. Am. Heart Assoc.* 2020. V. 9. P. 6. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018506>
7. Teixeira P.A.G., Kessler H., Morbée L. // *Diagn. Interv. Imaging*. 2025. V. 106. P. 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2024.11.001>
8. Zhu X., Liu Y., Yang X. // *Exp. Dermatol.* 2022. V. 31. P. 1632–1634. <https://doi.org/10.1111/exd.14579>

9. *Hegde K.R., Puche A.C., Szmazinski H.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 6421.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076421>
10. *Sim A.M., Rashdan N.A., Cui L.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 17360.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35454-9>
11. *Criswell S.* // *J. Histochem. Cytochem.* 2025. V. 73. P. 339–344.
<https://doi.org/10.1369/00221554251379535>
12. *Schneider M.R.* // *Histochem. Cell Biol.* 2021. V. 156. P. 523–526.
<https://doi.org/10.1007/s00418-021-02051-3>
13. *Hadad H., de Jesus L.K., da Silva M.P.* // *Calcif. Tissue Int.* 2025. V. 116. P. 86.
<https://doi.org/10.1007/s00223-025-01390-w>
14. *Xu X., Wang L., Yang M.* // *Front. Pediatr.* 2025. V. 13. P. 1571381.
<https://doi.org/10.3389/fped.2025.1571381>
15. *Hou W., Chen X., Zhang Y.* // *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2025. V. 29. P. 100607.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2025.100607>
16. *Ebetino F.H., Sun S., Cherian P.* // *Bone.* 2022. V. 156. P. 116289.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116289>
17. *Rogers M.J., Mönkkönen J., Munoz M.A.* // *Bone.* 2020. V. 139. P. 115493.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115493>
18. *Xiao T., Gong Z., Duan D.* // *Nat. Commun.* 2025. V. 16. P. 5679.
<https://doi.org/10.1038/s41467-025-60853-8>
19. *Mbese Z., Aderibigbe B.A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 6869.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136869>
20. *Zhou C., Zhang Y., Sun Y.* // *J. Mol. Struct.* 2026. V. 1349. P. 143604.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.143604>
21. *Sanaullah S., Walczak K.* // *Org. Biomol. Chem.* 2025. V. 23. P. 6287–6319.
<https://doi.org/10.1039/D5OB00657K>
22. *Kagatkar S., Sunil D.* // *J. Mater. Sci.* 2022. V. 57. P. 105–139.
<https://doi.org/10.1007/s10853-021-06602-w>
23. *Xu H., Wang W., Liu X.* // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023. V. 8. P. 202.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01467-8>
24. *Qing A., Yi X., Chang X.* // *Free Radical Biol. Med.* 2026. V. 243. P. 173–191.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.11.012>
25. *van Houdt C., Gabbai-Armelin P., Lopez-Perez P.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 327–340.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33692-5>
26. *Hassan M., Abdelnabi H., Mohsin S.* // *Pharmaceutics.* 2024. V. 16. P. 223–239.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020273>
27. *Sun S., Błażewska K.M., Kadina A.P.* // *Biomedicine. Bioconjug Chem.* 2016. V. 17 P. 329–340.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00369>
28. *Ya-Xi Y., Jing G., Xin-Yue C.* // *Talanta.* 2021. V. 235. P. 127–156.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122796>
29. *Rudnick-Glick S., Corem-Salkmon E., Grinberg I.* // *J. Nanobiotechnol.* 2015. V. 13. P. 756–773.
<https://doi.org/10.1186/s12951-015-0126-0>
30. *Rikitha S., Ambati H., Balaram G.* // *Appl. Bio Mater.* 2024. V. 7. P. 8248–8260.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.4c00970>
31. *Hishashi O., Shun S., Eita Y.* // *Chem. Commun.* 2025. V. 61. P. 12871–12884.
<https://doi.org/10.1039/D5CC01802A>
32. *Yanpeng D., Han H., Haoting G.* // *J. Mol. Struct.* 2025. V. 1340. P. 2345–2365.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.142529>
33. *Bakov V., Georgiev N., Bojinov V.* // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 7556–7571.
<https://doi.org/10.3390/molecules27217556>
34. *Shi S., Duan H., Ou X.* // *Biomed. Pharmacother.* 2024. V. 175. P. 1645–1662.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116699>
35. *Qiu E., Liu F.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023. V. 11. P. 301–324.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1199343>
36. *Wu Y., Sun B., Tang Y.* // *Bone Res.* 2024. V. 12. P. 893–902.
<https://doi.org/10.1038/s41413-024-00356-2>
37. *Ambrosio L., Raucci M.G., Vadalà G.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 3290–3232.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158214>
38. *Zhang N., Liu X., Hou R. J.* // *Nanosci. Nanotechnol.* 2019. V. 19. P. 5463–5468.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16521>
39. *Aniket U., Mampaey L., Clasen C.* // *React. Chem. Eng.* 2024. V. 9. P. 2208–2217.
<https://doi.org/10.1039/D4RE00107A>
40. *Soundharrajan I., Kim D.H., Kuppusamy P.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 435–449.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45793-w>
41. *Prideaux M., Wijenayaka A., Kumarasinghe D.* // *Calcif. Tissue Int.* 2014. V. 95. P. 183–193.
<https://doi.org/10.1007/s00223-014-9879-y>
42. *Yevlashevskaya O., Scheven B., Walmsley A.* // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 1447–1462.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40835-w>
43. *Bozycki L., Komiazyk M., Mebarek S.* // *J. Vis. Exp.* 2018. V. 24. P. 574–589.
<https://doi.org/10.3791/57423>
44. *Strzelecka-Kiliszek A., Bozycki L., Mebarek S.* // *J. Inorg. Biochem.* 2017. V. 171. P. 100–107.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.03.006>

1,8-Naphthalimide-Based Fluorescent Bisphosphonates: Molecular Design, Spectral-Luminescent Properties, and Osteotropic Targeted Delivery Systems

D. Y. Yuriev^{*,#}, I. V. Barabanshchikov^{*}, V. A. Strukova^{*}, S. V. Tkachenko^{*},
A. A. Pakhomov^{**}, S. M. Deev^{**}, M. G. Akimov^{**}, N. D. Ternovaya^{*}, G. D. Sherstyanykh^{**},
V. A. Sazonova^{***}, V. A. Kalinkina^{***}, S. A. Ulasevich^{***}, and M. S. Oshchepkov^{*}

[#] E-mail: iurev.d.i@muctr.ru

^{*} D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

^{**} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117997 Russia

^{***} Infochemistry Research Center of ITMO University, ul. Lomonosova 9, St. Petersburg, 191002 Russia

Pathological calcification and cancer with bone metastases pose serious diagnostic and therapeutic challenges. Although bisphosphonates exhibit high affinity for bone tissue, their combination with fluorophores for theranostic applications requires precise molecular design to balance targeting, imaging, and delivery functions. This study presents the development and synthesis of a series of new fluorescent bisphosphonates based on 1,8-naphthalimide with various substituents at the 4-position of the naphthalimide core. The obtained compounds demonstrated excellent photophysical properties, including high fluorescence quantum yields in aqueous media. The dependence of the fluorescence properties of these new derivatives on medium viscosity was discovered and investigated, making them excellent probes for microenvironmental sensors. In addition, an osteotropic targeted delivery system was created by successfully conjugating the 4-(2-hydroxyethylthio)-substituted bisphosphonate with a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer. These nanoparticles were effectively internalized by Saos-2 osteosarcoma cells after stimulation, as confirmed by fluorescence microscopy. The resulting bisphosphonates and nanoparticles exhibited low cytotoxicity, enabling their use in the development of new targeted osteotropic delivery systems. This study provides insight into the structure–activity relationships for fluorescent bisphosphonates and establishes a versatile platform for bone-targeted theranostics.

Keywords: 1,8-naphthalimide, bisphosphonates, PLGA, osteosarcoma, fluorescence, fluorescence microscopy