

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
им. А.Н.НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЗАХАРКО Марина Александровна

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ
1,8-НАФТАЛИМИДА ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
ДИАГНОСТИКИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

02.00.03 – органическая химия

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

Научные руководители:

Федорова Ольга Анатольевна

доктор химических наук, профессор,
заведующая лабораторией Фотоактивных
супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН

Панченко Павел Александрович

кандидат химических наук, доцент, старший научный
сотрудник лаборатории Фотоактивных
супрамолекулярных систем ИНЭОС РАН

Официальные оппоненты:

Травень Валерий Федорович

доктор химических наук, профессор, декан ВХК РАН
факультета Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Российский химико-технологический
университет им. Д.И. Менделеева»

Стужин Павел Анатольевич

доктор химических наук, профессор, заведующий
кафедрой органической химии Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Ивановский
государственный химико-технологический
университет»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита состоится «14» ноября 2019 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.250.01 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, В-334, ул. Вавилова, 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН.

Автореферат диссертации разослан « » октября 2019.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.250.01
кандидат химических наук

Ольшевская В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Разработка бифункциональных агентов для комбинированной фотодинамической терапии (ФДТ) и флуоресцентной диагностики (ФД) является актуальной задачей не только в связи с востребованностью подобных систем для практического применения, но и с научной точки зрения.

На сегодняшний день ФДТ является одним из наиболее щадящих и эффективных методов лечения онкологических заболеваний. Этот метод основан на введении пациенту раствора вещества-фотосенсибилизатора (ФС), способного избирательно накапливаться в опухолевых клетках, а при облучении светом определенной длины волны генерировать активные формы кислорода, воздействие которых приводит к деструкции опухоли. Часть энергии поглощенного света фотосенсибилизатор испускает в виде флуоресценции, что позволяет определять локализацию опухоли в организме, однако собственные флуоресцентные характеристики фотосенсибилизаторов часто не отвечают требованиям эффективной диагностики.

Большинство ФС характеризуются невысокими значениями Стоксова сдвига, что затрудняет выделение флуоресцентного сигнала на фоне рассеянного света возбуждения при флуоресцентной навигации. Кроме того, генерация активных форм кислорода и флуоресценция являются конкурентными процессами для молекулы ФС в возбужденном состоянии. В связи с вышесказанным разработка препаратов, совмещающих в себе свойства терапевтического (фотосенсибилизатор) и диагностического (флуорофор) агентов является актуальной задачей. Подход к созданию таких бифункциональных агентов носит название «Тераностика». На рисунке 1 показан принцип работы препарата-тераностика, который представляет собой (бис)хромофорную систему, функциональные фрагменты которой связаны посредством спейсера. Сочетание в одной молекуле двух фотоактивных компонентов позволяет проводить избирательно лечение или диагностику опухоли, варьируя длину волны возбуждения.

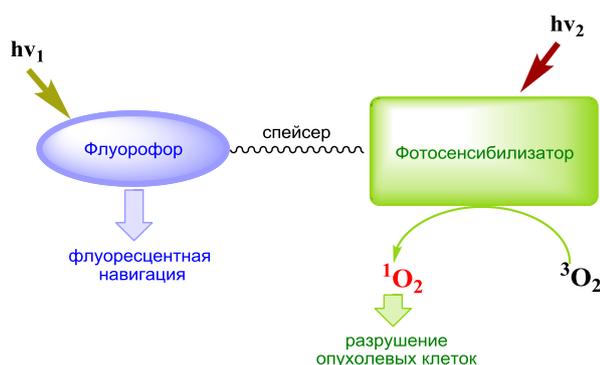


Рисунок 1 – Принцип работы конъюгата

Большой вклад в развитие данного направления внесен группой Р. Пандея, занимающейся разработкой тераностиков на основе цианиновых красителей, обладающими поглощением в ближней ИК-области. К недостаткам подобных систем можно отнести невысокую фотостабильность, а также низкие значения Стоксова сдвига (около 25 нм) флуорофоров. В научной литературе описано несколько примеров конъюгатов фталоцианиновых фотосенсибилизаторов с флуоресцентными родаминовыми красителями и BODIPY, которые отличаются более высокой фотостабильностью по сравнению с цианиновыми хромофорами, однако также демонстрируют небольшую разницу длин волн

поглощения и флуоресценции. Основной проблемой, с которой сталкиваются ученые при разработке (бис)хромофорных систем является возможность реализации между хромофорами процесса переноса энергии, ухудшающего флуоресцентные характеристики флуорофора или фотосенсибилизатора. Поэтому на сегодняшний день поиск способов минимизации переноса энергии является актуальной научной задачей.

В рамках данной работы в качестве потенциальных тераностиков для ФДТ рассматриваются конъюгаты фотосенсибилизатора бактериохлорина и флуоресцентных красителей на основе производных 1,8-нафталимида. Хромофорная система 1,8-нафталимида является популярной платформой для создания на ее основе оптических отбеливателей и красителей для полимерных волокон, электролюминесцентных материалов флуоресцентных маркеров и сенсоров для биологических исследований. Высокая фотостабильность флуорофоров на основе нафталимида, большие значения Стоксова сдвига (более 150 нм в растворителях высокой полярности), а также относительная простота химической модификации делают люминофоры на основе 1,8-нафталимида перспективными кандидатами и для применения в качестве флуоресцентных компонентов препаратов-тераностиков для ФДТ. В качестве компонента, отвечающего за терапевтические свойства конъюгата, был выбран фотосенсибилизатор второго поколения, относящийся в группе бактериохлоринов, для которых характерно наличие полосы поглощения в ближней ИК-области, относительно низкая кожная и темновая токсичность, а также быстрое выведение из организма.

Цель работы

Целью данной работы является создание препарата-тераностика для применения в фотодинамической терапии рака. Разработка подобных систем является комплексной задачей, которая включает в себя: синтез флуорофоров, модифицированных функциональными группами, для дальнейшей сшивки с фотосенсибилизатором; подробное изучение оптических свойств каждого из компонентов (бис)хромофорной системы в растворе; анализ фотофизических процессов, происходящих в конъюгате при фотовозбуждении и влияния на них структуры спейсера, а также рассмотрение влияния флуорофора на фотодинамические характеристики исходного ФС.

Научная новизна

В настоящей работе предложены методы синтеза неописанных ранее 4-стирил- и 4-пиразолинил-1,8-нафталимидов, содержащих при имидном атоме азота следующие спейсерные группы: азидоэтил, (азидоэтил)нонаэтиленгликоль и мотив капроновой кислоты.

Впервые подробно изучено влияние природы растворителя на спектральные характеристики 4-стирилнафталимидов и их склонность к образованию скрученных возбужденных состояний. Показано, что в случае метоксизамещенных 4-стирилнафталимида скрученные состояния являются флуоресцентными.

В рамках данной работы впервые получены и исследованы конъюгаты нафталиimidных флуорофоров и фотосенсибилизатора бактериохлорина, а также показано, что конъюгация нафталиimidных красителей с ФС не снижает фотодинамической эффективности последнего.

Впервые описаны апконверсионные наночастицы, модифицированные хромофорами на основе нафталимида и бактериохлорина, открывающие возможность для проведения диагностики и терапии при возбуждении светом ИК-области.

Практическая ценность

Полученные в рамках работы флуорофоры являются удобными компонентами для синтеза на их основе конъюгатов с фотосенсибилизаторами, содержащими пропаргильные или аминогруппы.

Определены факторы, влияющие на эффективность флуоресценции 4-стрилнафталимидов в растворах, которые в дальнейшем могут быть использованы при выборе подходящих флуорофоров для биологических исследований.

Получены (бис)хромофорные системы, эффективность которых исследована на биологических объектах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что конъюгаты и бактериохлорина и 4-стрилнафталимида являются перспективными тераностиками для ФДТ, так как позволяют получать флуоресцентные изображения опухолевых клеток и обладают высокой фотодинамической активностью.

Предложен синтез 4-пиразолинилзамещенного производного нафталимида, модификация которым (совместно с фотосенсибилизатором) апконверсионных наночастиц позволяет проводить флуоресцентную диагностику без сопутствующего токсического действия на клетки.

Личный вклад автора

Автор диссертации участвовал в анализе литературных данных, обсуждении задач, решаемых в диссертационной работе, разработке методик синтеза новых соединений, подготовке и проведении экспериментов, интерпретации полученных результатов и их обобщении, формулировке основных научных выводов, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-33-00581, 15-03-04705, 14-03-31935, 18-33-20111, 14-03-31935, РФФИ № 16-13-10226, Программы РАН 1.35P, соглашения с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.616.21.0037.

Автор выражает особую благодарность д.х.н. Федорову Ю.В., к.х.н. Шепелю Н.Э., к.х.н. Годовикову И.А., к.х.н. Павлову А.А., к.х.н. Архиповой А.Н., к.х.н. Архипову Д.Е., Притьмому Д.А., д.х.н. Грину М.А., д.х.н. Миронову А.Ф., к.х.н. Морозовой Т.Б., д.х.н. Якубовской Р.И. за участие в постановке экспериментов и обсуждении результатов на разных этапах работы.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 8 статей (4 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 4 – в журнале, включенном в РИНЦ) и 14 тезисов докладов. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Первый международный форум онкологии и радиологии (Москва, Россия, 2018); XI Конкурс проектов молодых ученых (Москва, Россия, 2017); The Fourth International Scientific Conference «Advances in synthesis and complexing» (Москва, Россия, 2017); VIIIth International Symposium «Design 7 and Synthesis of Supramolecular Architectures» IInd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry (Казань, Россия, 2016); Зимняя конференция молодых ученых по органической химии (WSOC-2016) (Красновидово, Россия, 2016); Международный Конгресс «KOST-2015» (Москва, Россия, 2015); IV и V Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия, 2015, 2017); XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, Россия, 2015); Студенческая стендовая сессия «Начинающий учёный» (Москва, 2014); X, XII, XIII, XIV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, Россия, 2014, 2016, 2017, 2018).

Структура работы

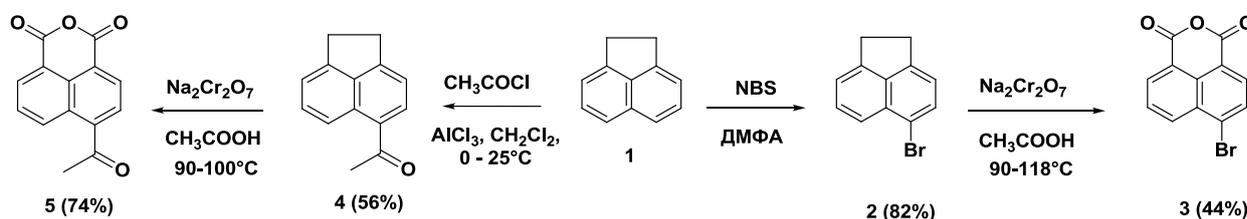
Диссертационная работа общим объемом 229 страниц состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и приложения и содержит 63 схемы, 21 таблицы и 108 рисунков. Список литературы включает 204 наименования.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Синтез флуоресцентных красителей на основе 1,8-нафталимида

Как показал литературный обзор, введение электронодонорных заместителей в четвертое положение нафталимидного ядра приводит к появлению длинноволновых полос поглощения в спектрах красителей. Так, введение пиразолинильного фрагмента в 4-е положение нафталимида позволяет получать хромофоры, максимум флуоресценции которых располагается в области 670-680 нм. Известно, что 4-стирилзамещенные производные нафталимида могут быть использованы как флуоресцентные маркеры и сенсоры для клеток, так как обладают способностью проникать через клеточную мембрану и интенсивно люминесцировать в клеточной среде. Поэтому для разработки флуоресцентных навигаторов для ФДТ нами были выбраны 4-пиразолинил- и 4-стирилнафталимиды, содержащие при имидном атоме азота различные спейсерные группы для дальнейшей пришивки фотосенсибилизатора.

Схема 1

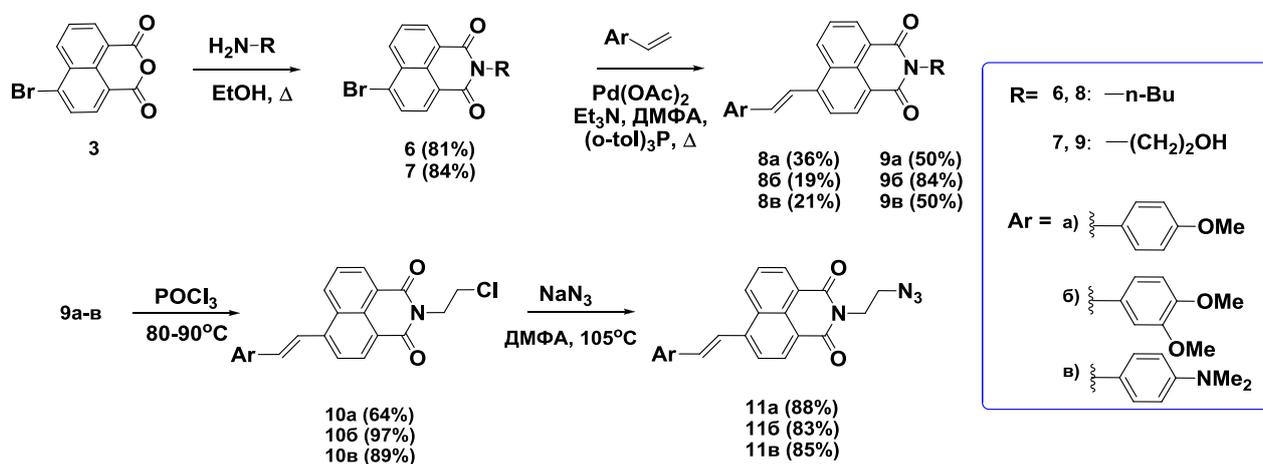


В рамках данной работы в качестве промежуточных продуктов для получения целевых флуорофоров на основе нафталимида нами были использованы 4-бром- и 4-ацетилнафталевый ангидриды **3** и **5**, полученные по описанным в литературе методикам по схеме 1.

1.1. Синтез 4-стирилзамещенных производных 1,8-нафталимида

Синтез *N*-бутил- и *N*-азидоэтил- производных нафталимида **8а-в** и **11а-в**, содержащих в четвертом положении нафталимидного ядра стироловые заместители с метокси-, *N,N*-диметиламиногруппами был проведен по схеме 2. *N*-бутил-производные **5а-в** были получены с целью изучения оптических свойств стироловых хромофоров, а введение азидной группы в структуру соединений **11а-в** обусловлено необходимостью дальнейшей сшивки нафталимидных красителей с пропаргильным производным фотосенсибилизатора бактериохлорина путем клик-реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения.

Схема 2



На первом этапе синтеза проводилось амидирование 4-бромнафталевого ангидрида **3** соответствующим амином, затем полученные соединения **6** и **7** вводили в реакцию Хека с различными стирилами. Продукты **8а-в** и **9а-в** получены с умеренными выходами, что согласуется с литературными данными для подобного типа субстратов. Заключительной стадией синтеза стало проведение реакций **10а-в** с азидом натрия в среде ДМФА, протекавших с высокими выходами. Соединения **11а-в** были выделены в виде *E*-изомеров, на что указывают константы спин-спинового взаимодействия протонов при двойной связи в спектрах ^1H ЯМР ($J_{H-H} = 16.0$ Гц), структура соединения **9а** была подтверждена с помощью метода рентгеноструктурного анализа (рисунок 2).

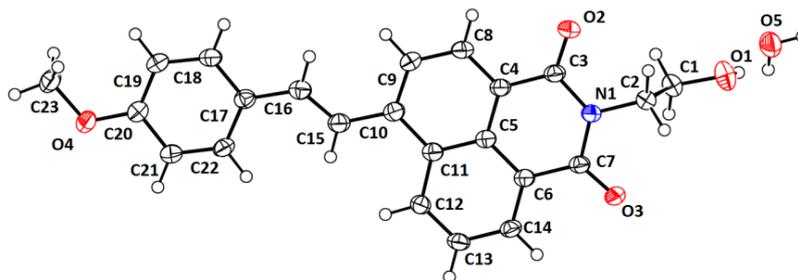
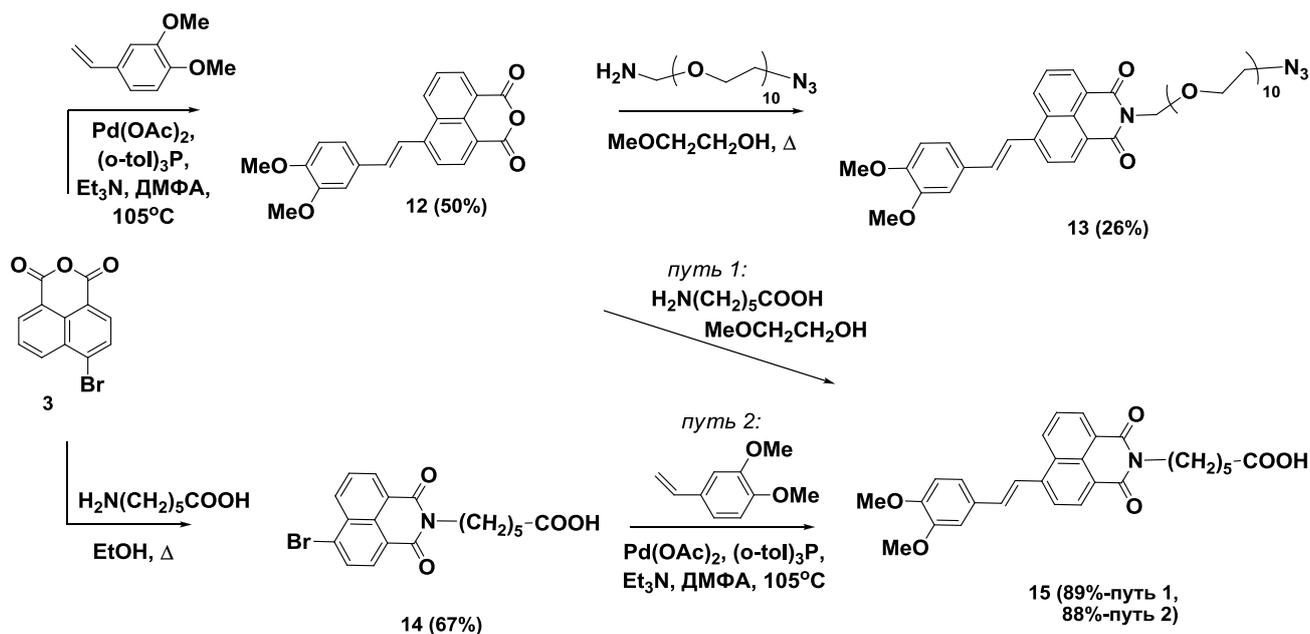


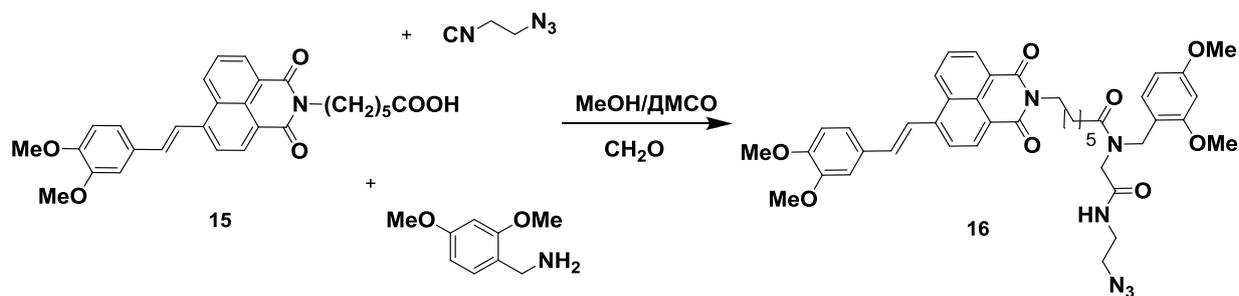
Рисунок 2 – Структура стирилнафталимида **9а** ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Схема 3



Одной из стратегий по повышению растворимости и биодоступности лекарственных препаратов является введение в их молекулы полиэтиленгликольных фрагментов. С целью увеличения расстояния между хромофорами в конъюгате, а также получения водорастворимого (за счет наличия большого числа гидрофильных групп) тераностика, нами был получен нафталиimidный флуорофор **13** (схема 3), содержащий полигликолевый спейсер при имидном атоме азота. Нафталевый ангидрид **12**, содержащий стироловый заместитель в 4-м положении нафталиimidного ядра был получен по реакции Хека в вышеописанных условиях. Имидрование ангидрида **12** O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)нонаэтиленгликолем проводилось кипячением в среде 2-метоксиэтанола, что связано с низкой растворимостью исходного ангидрида в этиловом спирте.

Схема 4



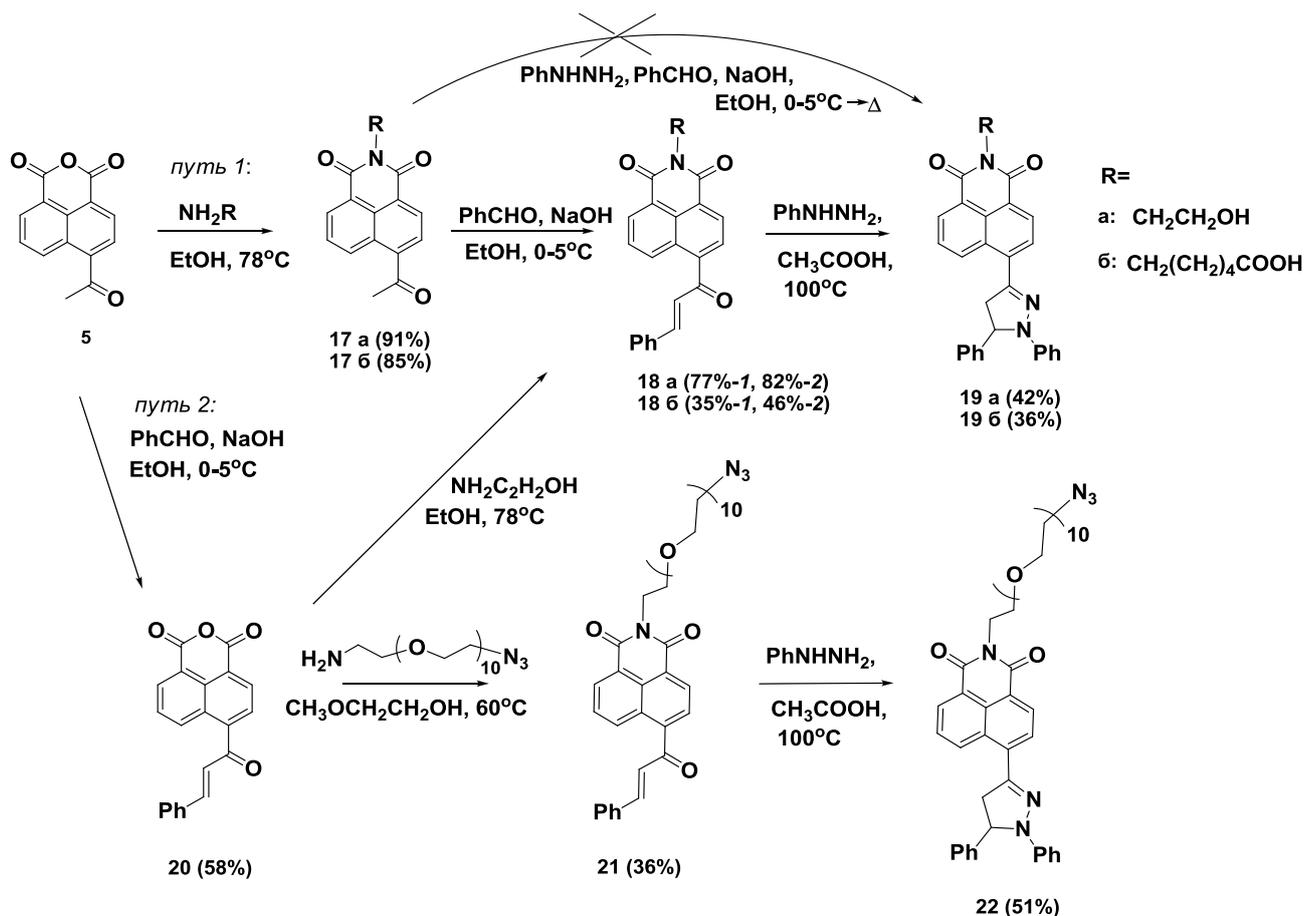
В структуру 4-стирилнафталимида **12** был также введен фрагмент 6-аминогексановой кислоты для дальнейшего введения пептидного спейсера по реакции Уги. Наличие спейсерного фрагмента, содержащего амидные связи, должно повысить сродство конъюгата к биомолекулам. Нами было опробовано два пути синтеза соединения **15**, содержащего при имидном атоме азота мотив гексановой кислоты, различающихся последовательностью проведения реакции Хека и амидирования (*путь 1* и *путь 2* на схеме 3). Путь 1 позволяет упростить синтетическую процедуру в случае, если необходимо получить производные 3,4-диметокси-4-стирилнафталимида с различными спейсерными группами, позволяя получить их в одну стадию из исходного ангидрида **12**. Кроме того, в рамках пути 1 спейсерный фрагмент вводится в молекулу флуорофора на заключительной стадии синтеза, что важно при наличии в спейсере малоустойчивых групп (например, в случае азидной группы в соединении **13**). Однако оптимальным из рассмотренных методов является путь 2, так как он обеспечивает больший суммарный выход продукта по двум стадиям, а также позволяет использовать меньшие количества 3,4-диметоксистирола – более дорогого реагента по сравнению с аминокснковой кислотой. Соединение **15** с карбоксильной группой в составе заместителя при имидном атоме азота использовалось в реакции Уги с целью получения продукта **16** (схема 4). Данная стадия синтеза проводилась Зарезиным Д.П., сотрудником кафедры Органической химии МГУ им. М.В. Ломоносова.

1.2 Синтез 4-пиразолинилзамещенных производных нафталимида

Синтез 4-пиразолинилзамещенных красителей на основе нафталимида, содержащих при имидном атоме азота алкильные цепочки с азидной и карбоксильной группами представлен на схеме 6. Амидирование 4-ацетилнафталевого ангидрида проводилось по литературным методикам путем кипячения с этаноламином или аминокснковой кислотой в этаноле (*путь 1*, схема 6). Циннамоилпроизводные **18a** и **186** были получены в результате кротоновой конденсации ацетилзамещенных **17a** и **176** и бензальдегида в щелочной среде. Реакция проводилась с использованием небольшого избытка бензальдегида (1.2 экв.) в атмосфере аргона.

Для получения соединения **18a** и **186** был опробован второй синтетический путь (*путь 2*, схема 5), отличающийся последовательностью проведения стадий амидирования и конденсации с бензальдегидом. Суммарные выходы по двум стадиям для обоих соединений оказались выше для пути 1 (для **18a**: *путь 1*: $0.91 \cdot 0.77 = 0.70$, *путь 2*: $0.82 \cdot 0.58 = 0.48$; для **186**: *путь 1*: $0.85 \cdot 0.35 = 0.30$, *путь 2*: $0.58 \cdot 0.46 = 0.27$). Это связано с невысоким выходом кротоновой конденсации с участием 4-ацетилнафталевого ангидрида, в которой он может вступать в реакцию самоконденсации или под действием воды претерпевать превращение в форму дикарбоновой кислоты, которая обладает меньшей реакционной способностью вследствие слабых акцепторных свойств кислотных групп по сравнению в ангидридными.

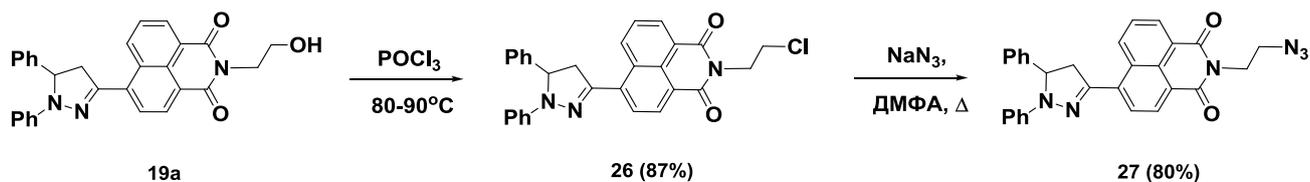
Схема 5



Для получения пиразолинилпроизводных **19a** и **19б** соответствующие циннамоилпроизводные **18a** и **18б** кипятили с двукратным избытком фенилгидразина в ледяной уксусной кислоте с инертной атмосферой в течение 11 часов. В качестве альтернативного метода синтеза **19a** был испробован одностадийный способ его получения из соединения **17a**, по методике, описанной в литературе для получения 1,3,5-трифенил-4,5-дигидропиразола. Прибавление смеси кетона **17б**, бензальдегида и фенилгидразина в этаноле к смеси этанола и 10% (масс.) раствора NaOH при охлаждении и последующее кипячение реакционной массы в течение 3-х часов не привело к образованию целевого продукта реакции. Анализ методом ТСХ показал наличие в реакционной смеси исходных соединений и одного неокрашенного в видимой области продукта реакции, предположительно, представляющего собой гидразон бензальдегида. С целью изучения влияния длины спейсерного фрагмента на эффективность переноса энергии по схеме б был получен 4-пиразолинилзамещенный нафталиimid **22**, содержащий спейсер из 10 остатков гликоля. Имидирование 4-циннамоилнафталевого ангидрида проводили в среде 2-метоксиэтанола при нагревании до 60°C в связи с низкой растворимостью **20** в этиловом спирте.

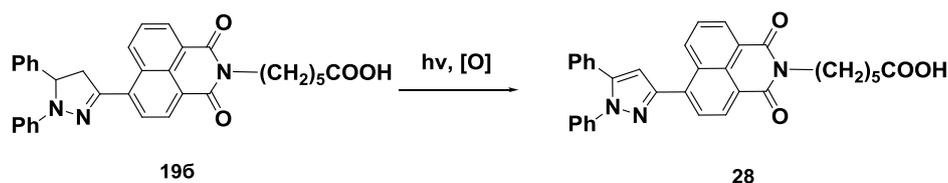
Замещение гидроксильной группы в алифатической части молекулы **19a** на азидную (схема б) проводилось через промежуточное получение хлор-производного **26** действием избытка оксихлорида фосфора при 80-90°C. В результате взаимодействия **26** с азидом натрия в ДМФА был получен целевой флуорофор **27**.

Схема 6



В ходе синтеза соединения **19b** была обнаружена побочная реакция фотоокисления пиразолинильного заместителя в 4-м положении нафталимидного ядра до пиразольного (соединение **28**, схема 7).

Схема 7



Нами был проведен фотохимический эксперимент по мониторингу процесса окисления пиразолинил-нафталимида **19b** в хлороформе, изменения в спектрах поглощения раствора при облучении полным светом ртутной лампы представлены на рисунке 3.

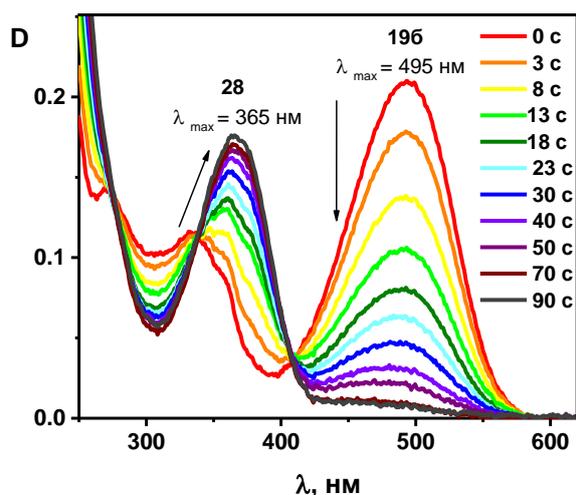


Таблица 1 – Спектральные характеристики **19b** и **28** в ацетонитриле

Соединение	19b	28
$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$, нм	495	365
$\lambda_{\text{max}}^{\text{fluor}}$, нм	684	486
φ^{fl}	0.071	0.49

Рисунок 3 – а) Спектры поглощения соединения **19b** в хлороформе ($c=1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) при облучении полным светом ртутной лампы в течение 3, 8, 13, 18...90 секунд

В спектре поглощения 4-пиразолинилнафталимида **19b** наблюдаются две полосы – интенсивная полоса с максимумом 495 нм, а также более коротковолновая в области 330 нм (красная линия на рисунке 3). При облучении светом ртутной лампы наблюдается снижение оптической плотности раствора в области 495 нм и появление новой полосы поглощения с максимумом 365 нм (черная линия на рисунке 3). Данный процесс можно наблюдать и невооруженным глазом при больших концентрациях **19b** в хлороформе - окраска раствора на свету изменяется с интенсивно красной на бледно-желтую. Фотоокисление соединения **19b** сопровождается значительными изменениями в спектрах поглощения и флуоресценции. В таблице 1 представлены спектральные характеристики флуорофоров **19b** и **28**.

Результаты ЯМР-эксперимента по облучению раствора **19b** в дейтерохлороформе полным светом ртутной лампы представлены на рисунке 4. Изменения в протонных спектрах **19b** при

окислении легко проследить по исчезновению сигналов СН- и СН₂-групп пиразолильного фрагмента (5.48, 4.17 и 3.46 м.д., соответственно) и значительному смещению Н(5) и Н(3) протонов нафталимидного ядра в сильное и в слабое поле, соответственно. Кроме того, в протонном спектре наблюдается появление узкого синглета с химическим сдвигом 7.02 м.д., принадлежащего СН-группе пиразола. Сигналы фенильных заместителей, а также метиленовых групп алифатического остатка при имидном атоме нафталимида практически не сдвигаются.

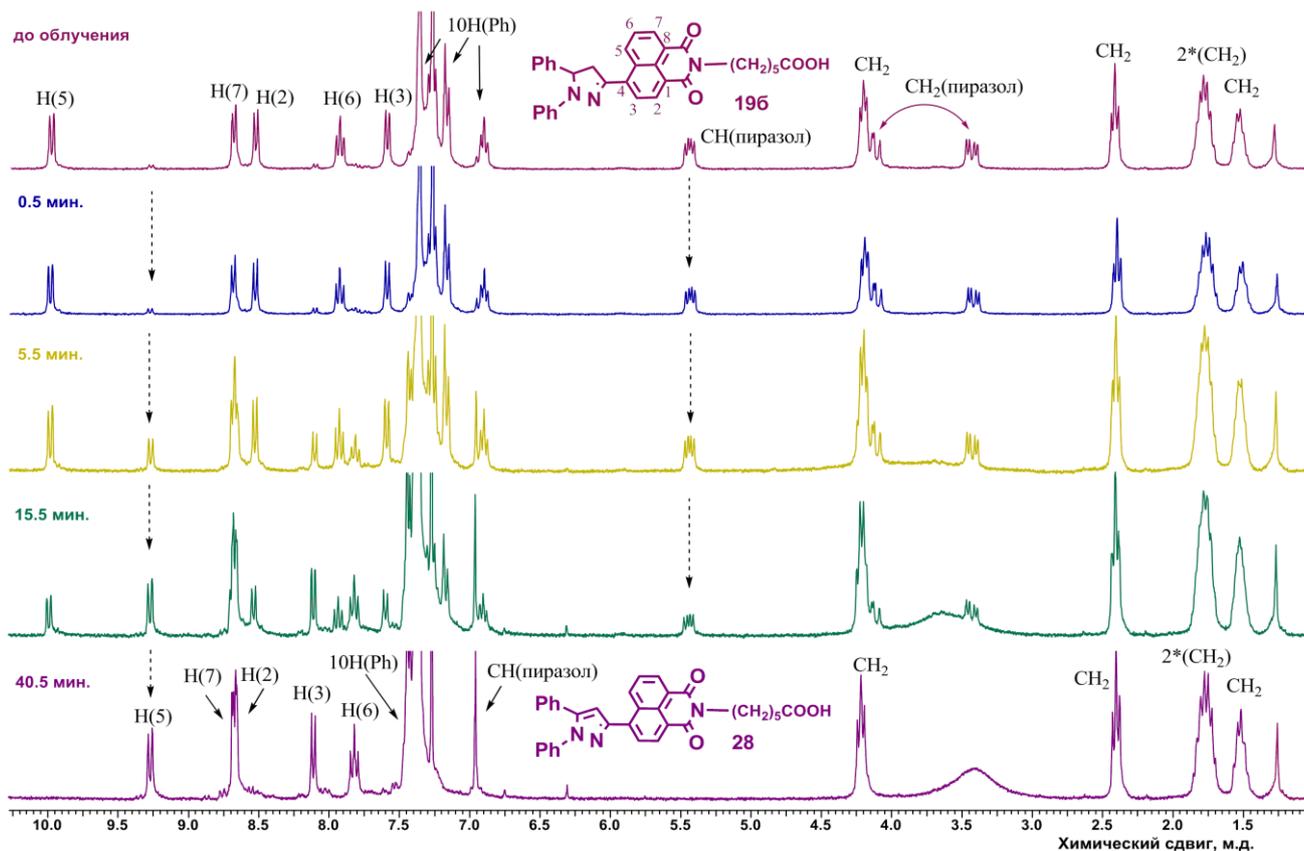


Рисунок 4 – ¹H ЯМР спектры соединения **196** после облучения полным спектром ртутной лампы в течение 0.5 мин, 5.5 мин, 15.5 мин, 40.5 мин, соответственно. Растворитель – CDCl₃, концентрация вещества $7.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Для подтверждения химической природы изменений, происходящих с пиразолинил-замещенным нафталимида в растворе, соединение **196** было подвергнуто окислению бихроматом калия в среде ледяной уксусной кислоты. Продукт **28** был очищен методом колоночной хроматографии и охарактеризован с помощью методов ЯМР, масс-спектроскопии, элементного анализа. Сигналы протонного спектра, полученного после 40.5 мин облучения, полностью соответствуют сигналам протонов соединения **28**, полученного по реакции окисления **196** бихроматом калия.

2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств N-бутил-4-стирил нафталимидов

Распределение электронной плотности по граничным молекулярным орбиталям (ВЗМО и НСМО) соединений **8a-b** (рисунок 5) свидетельствует о том, что наличие длинноволновой полосы в спектрах поглощения исследованных красителей связано с процессом внутримолекулярного переноса заряда с ЭД стирилового фрагмента молекул на акцепторные карбонильные группы нафталимида.

На рисунке 6 в качестве примера приведены спектры поглощения и флуоресценции **8a-b** в этилацетате. Усиление ЭД характера заместителя в 4-м положении при переходе от метокси-

к диметокси-, а затем к диметиламиностирилнафталимиду вызывает значительный батохромный и батофлорный сдвиги в оптических спектрах, что объясняется сближением уровней S_0 и S_1 и повышением эффективности образования ICT-состояния (состояния с переносом заряда).

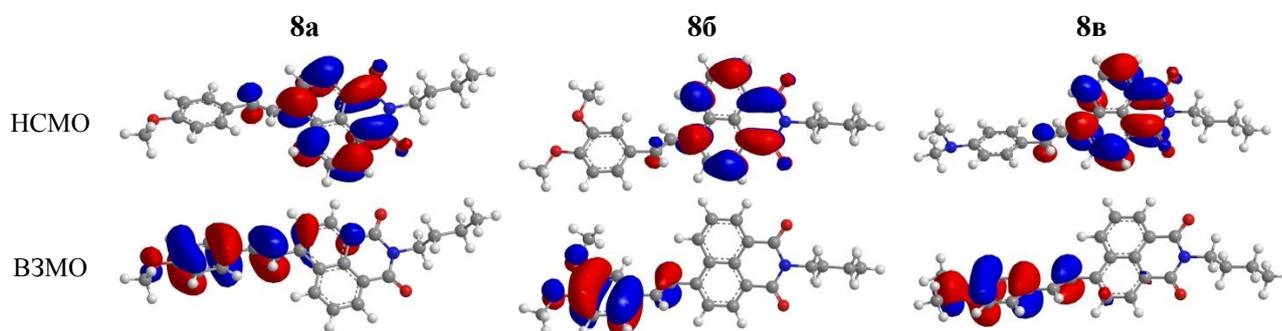


Рисунок 5 – Распределение электронной плотности в граничных орбиталях ВЗМО и НСМО соединений **8a**, **8b** и **8v**. Данные получены в результате расчета методом РМ6.

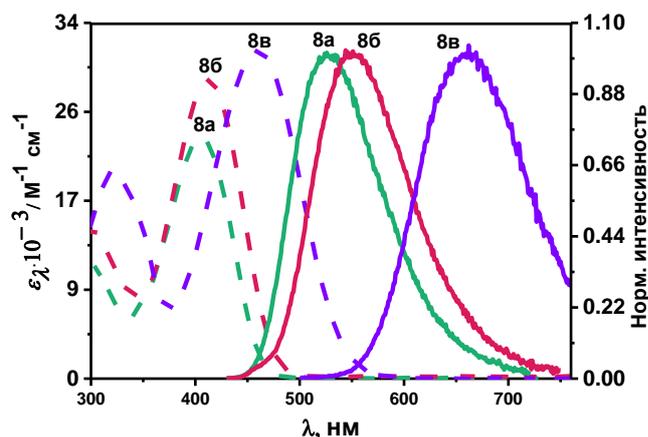


Рисунок 6 – Спектры поглощения (пунктирные линии) и нормализованные спектры испускания флуоресценции соединений **8a**, **8b** и **8v** в этилацетате

Спектральные свойства красителей **8a-в** были исследованы в 15-ти растворителях различной полярности. По полученным данным с помощью уравнения Липперта-Матаги были рассчитаны изменения дипольных моментов молекул **8a-в** при переходе в возбужденное состояние, значения составили 20.78, 21.96 и 22.95 Д, соответственно, что соответствует разделению единичных зарядов на 4.33, 4.58 и 4.78 Å. Подобный характер перераспределения электронной

плотности при поглощении света свидетельствует об образовании возбужденных состояний с переносом заряда.

Квантовый выход флуоресценции соединений **8a-в** при варьировании природы растворителя изменяется по-разному. В случае **8a** и **8b** эффективность излучательной дезактивации приблизительно одинакова как в полярных, так и в неполярных растворителях, в то время как для **8v** рост полярности растворителя и его протонодонорных свойств вызывает тушение флуоресценции. Для более полного понимания природы процессов, происходящих при фотофобуждении **8a-в**, были проанализированы спектры поглощения возбужденных состояний флуорофоров. На рисунке 7а представлена карта поглощения возбужденных состояний соединения **8a** в циклогексане. Карта представляет собой двумерный спектр, одна из осей которого отражает время задержки между импульсами возбуждения, другая – разность оптических плотностей возбужденного и основного состояний **8a**. Отрицательный сигнал в области 425-500 нм можно отнести к стимулированной эмиссии локального возбужденного

состояния нафталимида **8a**, обладающего относительно жесткой планарной геометрией. Такой же характер локальных возбужденных состояний можно предположить и для хромофоров **8б** и **8в**, так как для них наблюдаются подобные сигналы стимулированной эмиссии в циклогексане.

При переходе от циклогексана к более полярному растворителю – диэтиловому эфиру (рисунок 7б-г) в спектрах поглощения возбужденных состояний всех трех соединений появляется новый отрицательный сигнал, смещенный в красную область спектра (575-600 нм). Появление такого сигнала означает наличие более низкого по энергии возбужденного состояния.

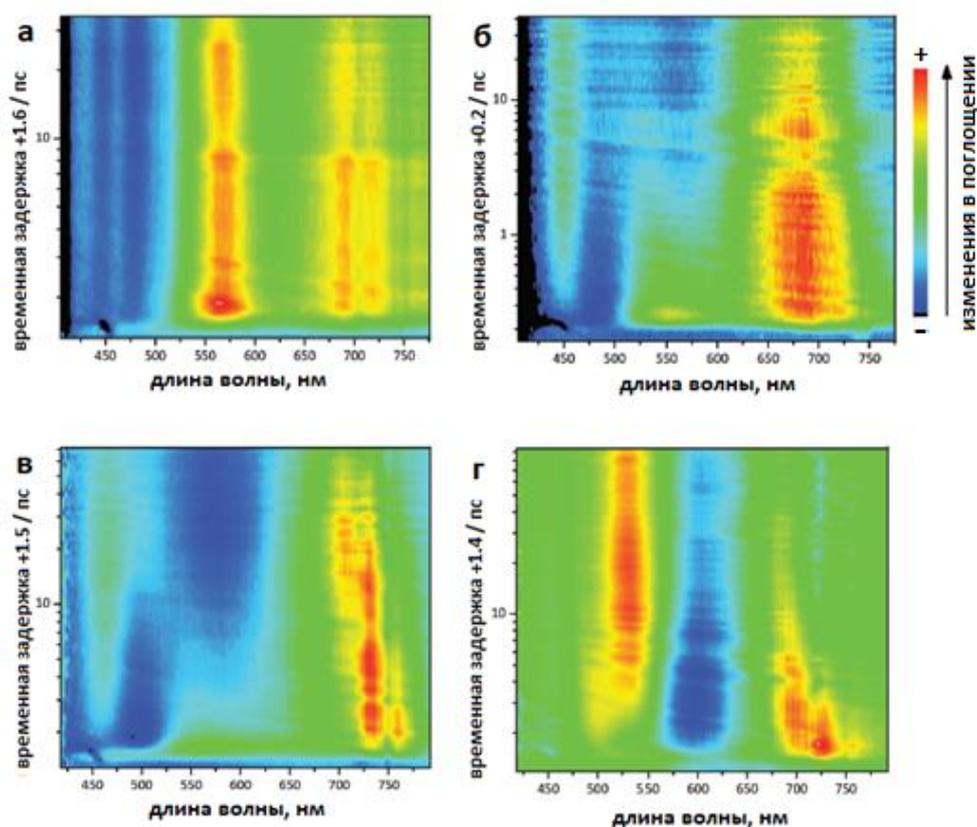


Рисунок 7 – Спектрально-временные карты поглощения возбужденных состояний **8a-в**: а) **8a** в циклогексане; б) **8a** в диэтиловом эфире; в) **8б** в диэтиловом эфире; г) **8в** в диэтиловом эфире. Для визуализации кинетики процессов в логарифмической шкале добавлены искусственные временные задержки +1.6/+1.5/+0.2/+0.4 нс.

Для флуорофоров ICT-типа, содержащих стильбеновый фрагмент, возможно существование дополнительного пути дезактивации локально-возбужденного состояния (помимо флуоресценции, внутренней конверсии и интеркомбинационной конверсии). Этот путь заключается в образовании «скрученного» состояния с переносом заряда (TICT, англ. Twisted Intramolecular Charge Transfer), обладающего большим дипольным моментом и неплоской геометрией. Данная модель предполагает существование двух энергетических минимумов на потенциальной поверхности возбужденного состояния: первый минимум соответствует локально возбужденному состоянию с квазиплоским расположением π -системы и донорной группы ($\text{Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4-$ в случае **8в**); второй – состоянию с переносом заряда с квазиперпендикулярным расположением π -системы и донорной группы. В рамках модели TICT образование «скрученного» состояния с переносом заряда включает две стадии: перенос заряда и последующий поворот донора относительно остальной части молекулы.

График зависимости энергии возбужденного состояния S_1 хромофора **8a** от угла поворота вокруг σ -связи C10-C15 для растворителей различной полярности также подтверждает возможность образования ТИСТ-состояний (рисунок 8а). В неполярном растворителе ($\epsilon=1$) изменение угла от 0° до 90° ведет к повышению энергии первого возбужденного состояния, в то время как в полярном ($\epsilon=20$) растворителе она достигает максимума при 40° , а затем быстро падает с увеличением угла. Этот эффект объясняется стабилизацией ТИСТ-состояния в полярных средах.

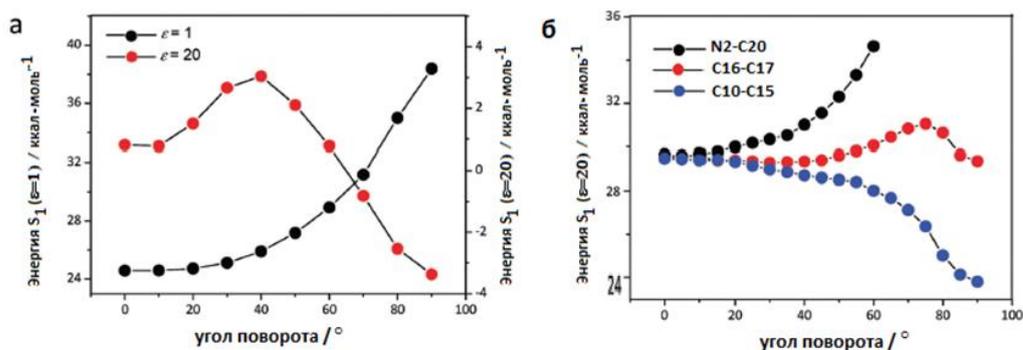


Рисунок 8 – Зависимость энергии возбужденного состояния S_1 : а) для **8a** при повороте вокруг связи C10-C15; б) для **8b** при повороте вокруг связей NMe₂-C20 (черные точки), C16-C17 (красные точки); C10-C15 (синие точки). Нумерация атомов углерода представлена на рисунке 1.

Для выявления наиболее вероятного пути формирования скрученного состояния были построены зависимости энергии S_1 -состояния от угла поворота вокруг вышеназванных связей (рисунок 8б) в полярном растворителе. Как видно из рисунка 8б, как поворот фенильного фрагмента, так и нафталимидного могут приводить к образованию скрученного состояния, однако в случае поворота вокруг связи C10-C15 образование ТИСТ-состояния более энергетически выгодно. Поворот аминогруппы приводит к увеличению энергии возбужденного состояния, поэтому его можно исключить. Наиболее вероятно формирование ТИСТ-состояния за счет поворота нафталимида вокруг связи C10-C15, так как этот процесс приводит к наиболее низкому по энергии скрученному возбужденному состоянию, кроме того в этом случае отсутствует барьер потенциальной энергии, который необходимо преодолеть для вращения вокруг связи C16-C17.

В спектрально-временной карте поглощения возбужденных состояний соединения **8в** (рисунок 7г) наблюдаются значительные отличия от карт **8a** и **8б**. Для **8в** не наблюдается образования планарного скрученного состояния. Фотовозбуждение **8в** напрямую приводит к формированию возбужденного состояния со скрученной геометрией, о чем свидетельствует появление в длинноволновой области отрицательной полосы стимулированной эмиссии ТИСТ-состояния без временной задержки после импульса. Двугранные углы связей C9-C10-C15-C6 для **8a-в** составляют 10.8° , 1.6° и 32.5° , соответственно, что указывает на предорганизацию молекулы **8в** для быстрого формирования ТИСТ-состояния при фотовозбуждении.

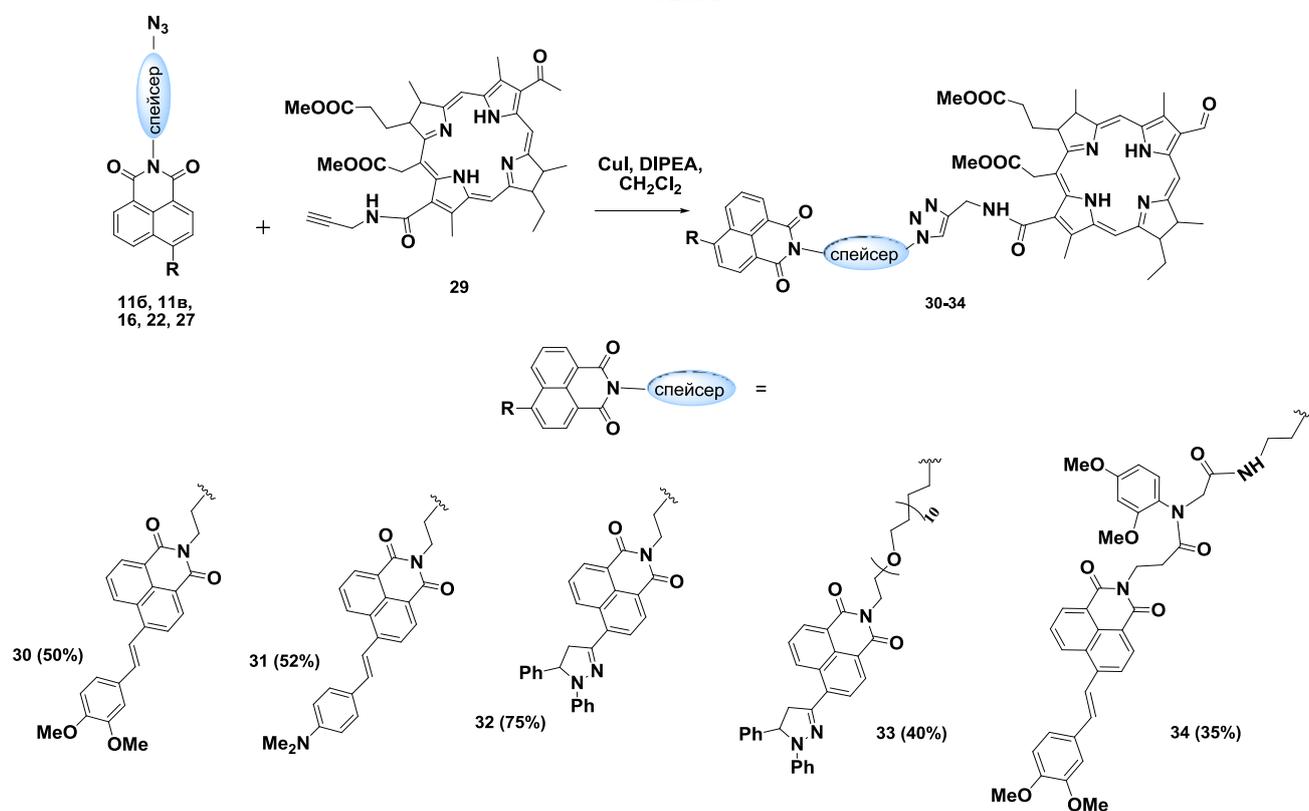
Анализ зависимости квантовых выходов флуоресценции (ϕ^{fl}) **8a-в** от времени жизни возбужденного состояния (τ) показал, что увеличение времени жизни возбужденного состояния (при замене растворителя) приводит к повышению ϕ^{fl} **8a-в**. При этом константа скорости излучательной релаксации k_r , равная отношению ϕ^{fl}/τ , поддерживается постоянной для большинства апротонных растворителей. Хорошая линейная корреляция между значениями ϕ^{fl} и τ наблюдалась для большинства использованных апротонных растворителей, за исключением циклогексана и толуола (а также диэтилового эфира для **8a** и **8б**), что

указывает на формирование в указанных растворителях второго излучательного состояния, обладающего другим значением k_r .

3. Синтез и изучение оптических свойств (бис)хромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и бактериохлорина

В качестве фотосенсибилизирующего компонента конъюгатов нами было выбрано производное фотосенсибилизатора 2-го поколения бактериохлорина (соединение **29** на схеме 13). В абсорбционных спектрах производных бактериохлорина помимо полосы $Soret$, расположенной в области 400 нм, наблюдается интенсивная длинноволновая полоса поглощения с максимумом 750 нм, которая попадает в терапевтическое окно прозрачности биологических тканей - диапазон длин волн, поглощение которых тканями минимально (600-1200 нм). Кроме того, производные бактериохлорина характеризуются низкой темновой токсичностью, быстрым выведением из организма и невысокой кожной фототоксичностью. Синтез конъюгатов **30-34**, представленный на схеме 8, проведен сотрудником кафедры ХТБАС МИТХТ Притыковым Д.А.

Схема 8



Результаты экспериментов по изучению флуоресцентных характеристик конъюгатов **30-32** (схема 8) показали, что во всех (бис)хромофорных системах с высокой эффективностью реализуется процесс резонансного переноса энергии. Далее будут подробно рассмотрены оптические характеристики конъюгатов на примере соединения **31**, в спектрах поглощения и флуоресценции **30** и **32** прослеживаются похожие закономерности.

На рисунке 9 представлены электронные спектры поглощения и флуоресценции соединений **8в**, **29**, **31** и эквимольной смеси **29** и **8в**. Спектр поглощения конъюгата **31** в высокой степени похож на спектр эквимольной смеси **29** и **8в** (рис.9в), что указывает на слабое взаимодействие хромофоров в основном состоянии. Максимум поглощения нафталимидного хромофора в составе конъюгата претерпевает незначительное батохромное

смещение относительно спектра индивидуального красителя **8в**, что можно объяснить акцепторным влиянием триазольного фрагмента, появление которого в структуре конъюгата приводит к усилению ICT-процесса по сравнению с *N*-бутилнафталимидом **8в**. Максимумы флуоресценции красителя и бактериохлорина расположены в области 760 нм (рисунок 9б), однако спектр флуоресценции красителя представляет собой более широкую полосу, попадающую в ИК-область (рисунок 9б). В случае эквимольярной смеси (рисунок 9в,г) возбуждение в области 490 нм, которое поглощается в основном красителем, приводит к появлению широкой полосы эмиссии, по форме похожей на спектр флуоресценции индивидуального красителя, однако с небольшим острым пиком с максимумом 760 нм, который соответствует флуоресценции бактериохлорина за счет прямого фотовозбуждения.

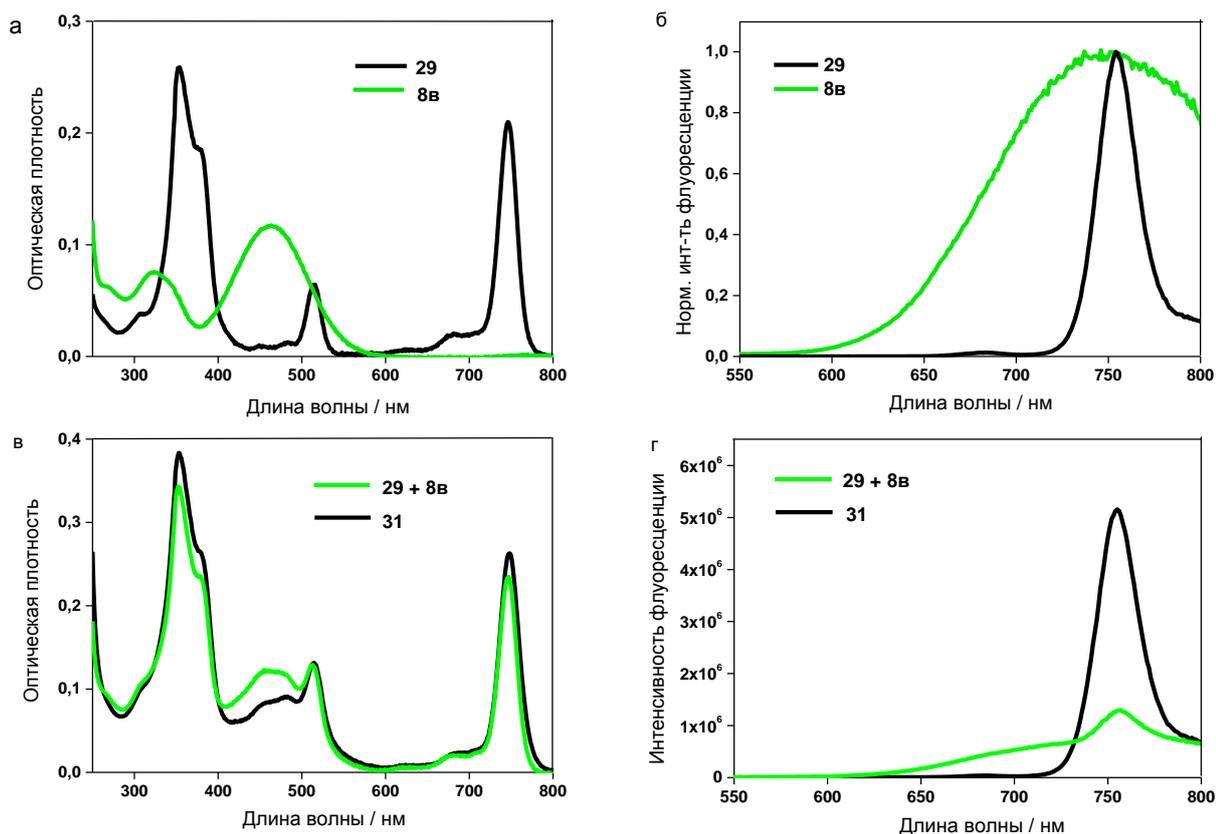


Рисунок 9 – Электронные спектры поглощения (а, в) и флуоресценции (б, г) соединений **8в**, **29**, **31** и эквимольярной смеси **29** и **8в** (обозначено **29+8в**) в ацетонитриле. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** – 490 нм, для **29** – 515 нм. Концентрация всех соединений $4.7 \cdot 10^{-6}$ М.

При облучении конъюгата, в котором два фотоактивных компонента связаны ковалентно, светом с длиной волны 460 нм наблюдаемый спектр флуоресценции резко отличается от спектра эквимольярной смеси: в области 760 нм проявляется узкий пик флуоресценции, что соответствует флуоресценции свободного бактериохлорина, в то время как флуоресценция нафталимидного красителя тушится полностью (рисунок 9б). Это свидетельствует о том, что нафталимидный флуорофор после перехода в возбужденное состояние принимает участие в быстром безызлучательном процессе. Наиболее вероятно протекание в системе внутримолекулярного переноса энергии с донорного нафталимидного фрагмента на акцептор – бактериохлорин.

Природа фотофизических процессов, происходящих в конъюгате **31** при фотовозбуждении, была изучена при помощи метода время разрешенной спектроскопии поглощения возбужденных состояний. На рисунке 10а представлена карта поглощения

возбужденных состояний конъюгата **31**. Положительный сигнал (красная область) соответствует поглощению возбужденного состояния **31**, отрицательный (синяя область) может соответствовать или вынужденной эмиссии или так называемому «выцветанию» основного состояния хромофора.

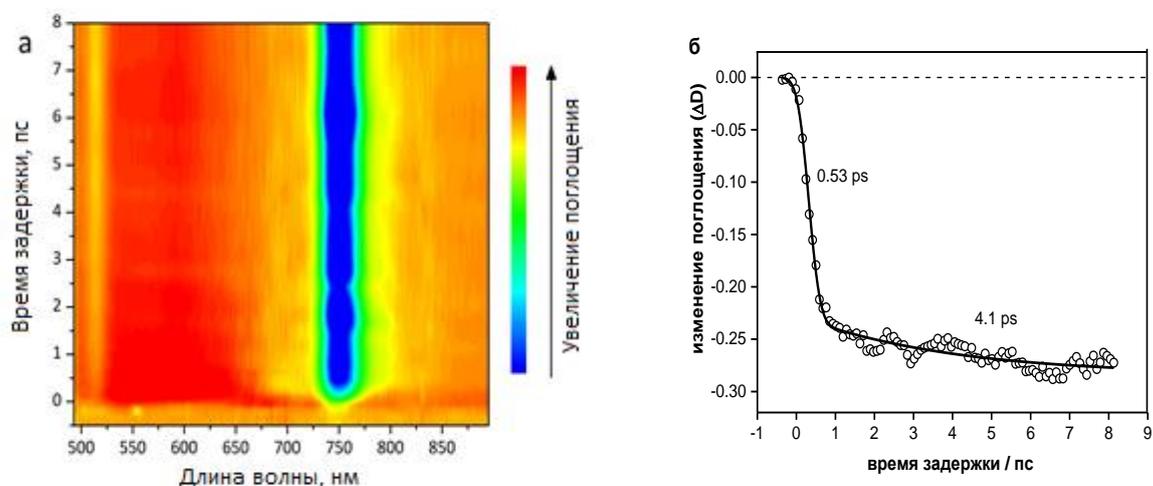


Рисунок 10 – а) спектрально-временная карта поглощения возбужденных состояний соединения **31**; б) кинетика поглощения соединения **31** на длине волны 750 нм

В спектрально-временной карте, представленной на рисунке 10а, можно наблюдать отрицательный сигнал, максимум которого расположен в области 750 нм. Так как именно в этой области расположена полоса поглощения бактериохлоринового хромофора (см. рисунок 9а), отрицательный сигнал можно отнести к выцветанию основного состояния бактериохлорина, что указывает на переход фрагментов ФС в возбужденное состояние. Положительный сигнал в области 500-680 нм, по-видимому, соответствует поглощению S_1 -состояний обоих хромофоров. В области 750 нм этот сигнал может так же иметь ненулевую интенсивность и снижаться при увеличении времени задержки, что объясняет проявление на рисунке 10б все более и более отрицательного сигнала даже по истечении 4.1 пс – характеристического времени релаксации возбужденного состояния бактериохлорина.

По временному профилю на длине волны 750 нм (рисунок 10б) было вычислено характеристическое время процесса перехода фотосенсибилизатора в возбужденное состояние, которое составило 0.53 пс. Можно заключить, что фрагмент 4-стирилнафталимида после возбуждения 490 нм переходит в возбужденное состояние, участвующее в быстром безызлучательном процессе, которым, вероятнее всего, является перенос энергии на бактериохлорин. С использованием характеристического времени перехода фотосенсибилизатора в возбужденное состояние были вычислены значения константы скорости RET-процесса ($k_{RET} = \frac{1}{\tau_{RET}} = \frac{1}{0.53} \cdot 10^{-12} = 1.89 \cdot 10^{12} \text{c}^{-1}$) и его эффективности, которая составила 99.9%.

Эффективность переноса энергии в конъюгатах также была оценена на основании теоретических расчетов в рамках резонансно-индуктивной модели Ферстера. Для расчета теоретической эффективности переноса энергии и констант скорости RET-процесса в конъюгатах **29-31** использовались соотношения (1) и (2):

$$EET_{RET} = \frac{k_{RET}}{k_{RET} + (\tau_D^{-1})} \quad (1), \quad k_{RET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2)$$

где τ_D – время жизни возбужденного состояния хромофора донора (нафталимид) в отсутствие акцептора (бактериохлорин) и r – расстояние между донором и акцептором. В качестве параметра τ_D использовалось время жизни флуоресценции флуорофоров **8a-b** в ацетонитриле. Расстояние между донором и акцептором (r) было найдено путем оптимизации геометрии молекул с помощью метода РМ6. R_0 – критический радиус Ферстера (расстояние между хромофорами, на котором эффективность переноса энергии равна 50%). Экспериментальные значения переноса энергии в конъюгате **30** было оценено по формуле (3):

$$EET_{RET} = 1 - \frac{\varphi_D^f}{\varphi} \quad (3), \quad EET_{RET} = 1 - \frac{\tau_D^f}{\tau} \quad (4)$$

где φ^f и φ^f / φ_D^f – квантовые выходы хромофора-донора в присутствии и в отсутствии акцептора, соответственно. Так как для соединений **31** и **32** квантовые выходы донорных компонентов в присутствии акцепторов измерить невозможно, расчет проводился с использованием времен жизни по формуле (4). В таблице 2 приведены основные характеристики переноса энергии в конъюгатах **30-32**, эффективность переноса энергии во всех (бис)хромофорных системах близка к 100%.

Таблица 2 – Спектральные свойства и характеристики переноса энергии для конъюгатов **30-32**, пропаргил-производного бактериохлорина **29** и нафталимидов **8b**, **8в** и **19a** по сравнению с эквимольными смесями (обозначены **8b+29**, **8в+29**, **19a+29**) отдельных компонентов конъюгатов^a в ацетонитриле.

Соед-е	φ^{fluor}	λ_{max}^{fluor} ($\lambda_{возб}$), нм	R_0 , Å	r , Å	Интеграл перекрыт. ^a , $M^{-1} \cdot M^{-1} \cdot nm^4$	k_{RET} (теор. р.), c^{-1}	ЕЕТ, %	
							Теор.	Эксп.
29	0.030	758 (515)	-	-	-	-	-	-
8b	0.210	618 (420)	-	-	-	-	-	-
8b+29	0.19	618 (420)	-	-	-	-	-	-
30	0.034	755 (420)	39.58	10.8	$1.0 \cdot 10^{15}$	$6.26 \cdot 10^{11}$	99.96	99.95
8в	0.006	773 (460)	-	-	-	-	-	-
8в+29	0.0075	755 (460)	-	-	-	-	-	-
31	0.023	755 (460)	12.96	15.0	$4.4 \cdot 10^{15}$	$1.07 \cdot 10^{11}$	97.63	99.9 ^b
19a	0.071	651 (490)	-	-	-	-	-	-
19a+29	0.0088	651, 755 (490)	-	-	-	-	-	-
32	0.028	755(490)	30.88	11.3	$6.8 \cdot 10^{14}$	$4.45 \cdot 10^{11}$	99.79	*

*- определение значения эффективности переноса энергии затруднено.

^aРассчитано из спектров поглощения бактериохлорина **28** и флуоресценции соединений **7b**, **7б** и **19a**.

^bРасчитано с использованием значений времен жизни флуоресценции донорного компонента конъюгата.

На время жизни T_1 -состояния бактериохлорина значительное влияние оказывает присутствие кислорода в растворе. Время жизни триплетного состояния бактериохлорина в конъюгате **31** в дегазированном растворе ацетонитрила составляет 19 мкс (τ_T), в случае раствора, насыщенного воздухом, наблюдается время жизни триплетного состояния 0.355 нс

(τ_T^{O2}). С использованием этих значений по формуле (9) была рассчитана эффективность переноса энергии между T_1 -состояниями бактериохлорина и кислорода, которая составила 0.981. Полученное значение указывает на то, что бактериохлорин в составе конъюгата **31** служит эффективным фотосенсибилизирующим агентом.

4. Изучение влияния спейсерного фрагмента на эффективность переноса энергии в конъюгатах

Одним из наиболее эффективных способов снижения эффективности переноса энергии в системе является удлинение спейсера между хромофорами. В состав конъюгата **33** был введен полигликолевый спейсер для увеличения расстояния между хромофорами. Геометрия конъюгата **33** была оптимизирована в программном комплексе МОРАС с использованием метода РМ6. Расчетное значение расстояния между хромофорами в конъюгате составило 48.0Å. С использованием значения критического радиуса Ферстера (см. таблицу 4) нами была оценена теоретическая эффективность переноса энергии в конъюгате **33**, она составила 6.5%.

На рисунке 16 представлены электронные спектры поглощения и флуоресценции соединений **32**, **33** (схема 8) и эквимольярной смеси **29** и **19a**. В случае эквимольярной смеси (рис.11в,г) возбуждение в области 470 нм, которое поглощается в основном нафталимидным красителем, приводит к появлению широкой полосы эмиссии, соответствующей спектру флуоресценции индивидуального красителя с небольшим пиком в области 760 нм, который соответствует флуоресценции бактериохлорина. При облучении **32** и **33** светом с длиной волны 470 нм наблюдается узкий пик флуоресценции с максимумом 760 нм, что отвечает флуоресценции бактериохлорина, в то время как флуоресценция нафталимидного красителя тушится (рисунок 11г). Однако в случае конъюгата **33** процесс внутримолекулярного переноса энергии протекает менее эффективно по сравнению с **32**. Эффективность переноса энергии в конъюгате **33** была оценена с использованием значений времен жизни нафталидного хромофора в присутствии и отсутствии акцептора по формуле (7) и составила: $1 - (0.065/0.93) = 0.93$ (93%).

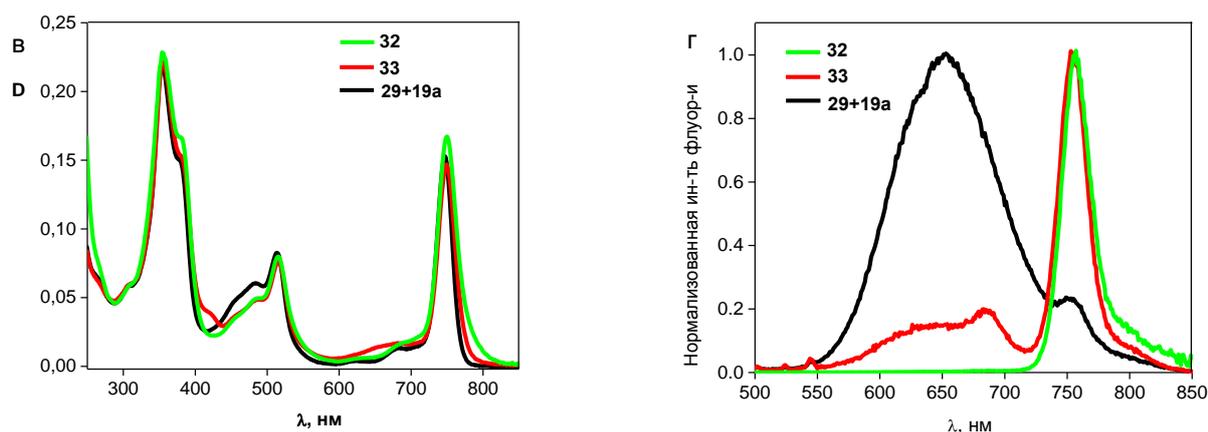


Рисунок 11 – Электронные спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) соединений **32**, **33** и эквимольярной смеси **19a** и **29** (обозначено **29+19a**) в ацетонитриле. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** – 470 нм, для **29**– 515 нм. Концентрация всех соединений $5 \cdot 10^{-6}$ М.

Существенное различие значений эффективности RET-процесса, полученных из теоретических и экспериментальных данных может быть объяснено тем, что для полигликолевого спейсера конъюгата **33** в растворе преобладает скрученная конформация, обеспечивающая эффективное сближение хромофоров в пространстве. Для снижения

эффективности переноса энергии необходимо вводить в состав конъюгатов спейсер, имеющий более жесткую структуру в растворе. Перенос энергии в конъюгатах **32** и **33** эффективно протекает и в биологических средах: растворе бычьего сывороточного альбумина и в сыворотке крови кролика.

Флуоресценция нафталимидного хромофора в составе конъюгата **34** эффективно тушится, что указывает на реализацию переноса энергии в системе (квантовые выходы флуоресценции для **16** и **34** составили 34.4 и 1.7%, соответственно). Кроме того конъюгат **34** продемонстрировал слабую флуоресценцию в растворе бычьего сывороточного альбумина.

5. Изучение эффективности генерации конъюгатами синглетного кислорода в растворе

Квантовый выход синглетного кислорода является одним из важнейших параметров, определяющих эффективность потенциального тераностика. Наиболее простым подходом к его определению для реализации на практике является метод химической ловушки. Он основан на добавлении к раствору фотосенсибилизатора ловушек синглетного кислорода - органических соединений, способных мгновенно и количественно реагировать с частицами $^1\text{O}_2$, образуя при этом только продукты, не мешающие спектрофотометрическому определению концентрации не окисленной ловушки в растворе. Для определения квантовых выходов генерации синглетного кислорода полученных в рамках данной работы конъюгатов мы использовали дифенилизобензофуран (DPIBF), окисление которого синглетным кислородом изображено на схеме 9. Кратковременное облучение фотосенсибилизатора в максимум его поглощения приводит к образованию в растворе, содержащем ловушку, синглетного кислорода, взаимодействие которого с DPIBF сопровождается падением оптической плотности в области 410 нм, что связано с окислением ловушки до неокрашенного эндопероксида. Проведение эксперимента со стандартом, для которого известен квантовый выход синглетного кислорода, позволяет рассчитать этот параметр и для исследуемого фотосенсибилизатора. В качестве стандарта нами был использован тетрафенилпорфирина (TPP (схема 9), ϕ_{O_2} (ацетон) = 0.7).

Схема 9

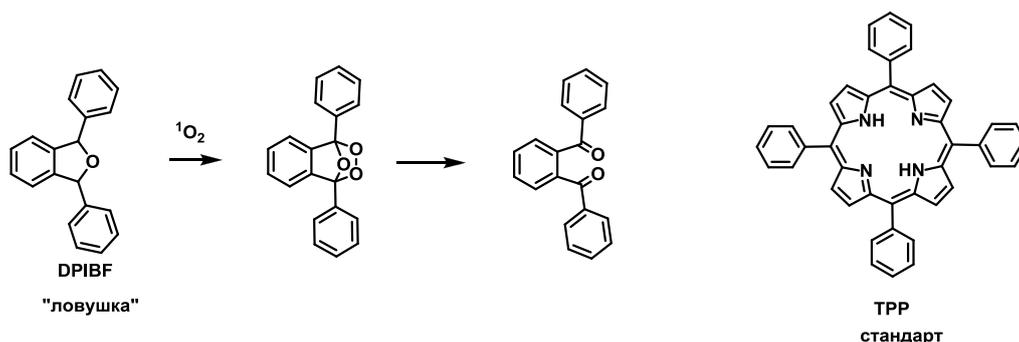


Таблица 3 – Квантовые выходы генерации синглетного кислорода фотосенсибилизаторов **29-34** в ацетоне.

Соединение	29	30	31	32	33	34
$\phi^1\text{O}_2$	79%	65%	82%	67%	84%	49%

Представленные в таблице 3 значения квантовых выходов позволяют сделать важный вывод о том, что пришивка к молекуле бактериохлорина нафталимидных флуорофоров в случае **30-33** не приводит к снижению эффективности генерации фотосенсибилизатором синглетного кислорода. Для конъюгата **34** эффективность генерации синглетного кислорода

оказалась самой низкой из рассмотренных соединений, это можно связать с наличием в спейсерном фрагменте **34** фенильного ядра с двумя метоксигруппами, обладающими ЭД-свойствами, что повышает вероятность окисления самих молекул конъюгата под действием выделяющихся в растворе активных форм кислорода. Стоит отметить, что при облучении растворов нафталиimidных красителей светом с длиной волны 510 нм в присутствии ловушки наблюдалось лишь незначительное снижение оптической плотности в области 410 нм.

6. Исследование фотодинамической эффективности и флуоресценции тераностика на клетках аденокарциномы человека

В рамках клеточных испытаний конъюгата **30** с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа были получены изображения клеток линии A549 (аденокарцинома легких человека), инкубированных с раствором конъюгата (2 мкмоль/л) в течение 3 часов, а затем подвергнутых фотовозбуждению монохроматическим излучением лазера на длине волны 488 нм (рисунок 12а-г). При кратковременном низкоинтенсивном облучении клеток в область поглощения красителя флуоресценции самого красителя (рисунок 12а) не наблюдалось, но интенсивно флуоресцировал бактериохлорин (рисунок 12б). Это наблюдение подтверждает, что перенос энергии с нафталиimidного флуорофора на фотосенсибилизатор происходит и внутри клеток. В спектрах флуоресценции на рис. 12д наблюдается сигнал в области 760 нм, что соответствует люминесценции бактериохлорина.

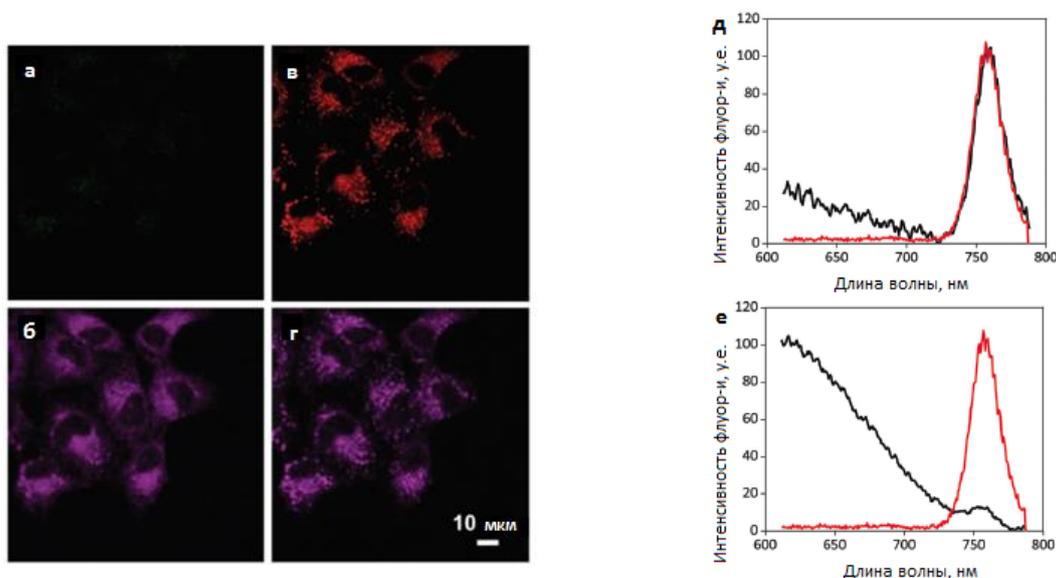


Рисунок 12 – Снимки конфокального флуоресцентного микроскопа: а и в – детекция флуоресценции в области 550-650 нм (краситель); б и г – детекция >730 нм (бактериохлорин). а и б – до продолжительного и интенсивного облучения лазером; в и г – после продолжительного облучения клеток лазером в области 488 нм; д и е – спектры флуоресценции конъюгата **30** в клетках при возбуждении 488 нм до (д) и после (е) длительного высокоинтенсивного облучения лазером. Красная линия на рис.19 д, е – спектр флуоресценции бактериохлорина **28** в 1%-м водном растворе солюбилизатора Chremophore EL.

После высокоинтенсивного облучения клеток на изображении, соответствующем детекции 550-650 нм (рис. 12в) можно наблюдать проявление флуоресцентного изображения клеток, а в спектре флуоресценции образца появляется широкий пик (600-730 нм), при этом интенсивность люминесценции на 750 нм значительно снижается. Данные спектральные эффекты свидетельствуют о фотообесцвечивании бактериохлоринового фрагмента, вероятно,

под действием синглетного кислорода. При облучении в максимум поглощения флуорофора (488 нм) энергия возбуждения эффективно передается с нафталимида на акцептор-бактериохлорин, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала последнего (760 нм), а также образованию в системе активных форм кислорода. При длительном высокоинтенсивном облучении в клетках наблюдается фотодинамический эффект – разрушение компонентов клеток, а также самого бактериохлоринового хромофора под действием АФК. Частичное разрушение акцепторных фрагментов конъюгатов приводит к проявлению собственной флуоресценции нафталимидного красителя.

Конъюгат **30** проявляет фотодинамическую активность по отношению к клеткам линии A549. При облучении в области длинноволнового максимума поглощения бактериохлорина, наблюдается гибель 90% клеток при концентрации 0.7 ммоль/л. В исследованных концентрациях (<8 мкмоль/л) конъюгат не проявляет токсичности для клеток без фотовозбуждения.

7. Изучение фотодинамической активности конъюгатов *in vitro* и *in vivo*

Фотодинамическая эффективность соединений **29-32** была исследована на мышах с саркомой мягких тканей S37 на 7-8 сутки роста опухоли. Наиболее высокую фотоиндуцированную активность в отношении клеток саркомы S37 проявляет пропаргил бактериохлорина **29** и конъюгаты **30** и **31**. Флуорофоры на основе нафталимида **9б**, **9в** и **19а** (схемы 2 и 6) не обладают фотоиндуцированной активностью. Эффективность фотосенсибилизаторов **29**, **30** и **31** сопоставима с препаратом Бактериосенс, успешно прошедшим стадию доклинической оценки фотодинамической эффективности.

На мышах с саркомой мягких тканей S37 были проведены исследования биораспределения **29-32**, а также их фотоиндуцированной противоопухолевой активности. Показано, что все исследованные фотосенсибилизаторы проявляют высокую фотодинамическую эффективность. Пришивка хромофора к бактериохлорину не оказывает негативного влияния на эффективность терапии в случае конъюгатов **30** и **31**, в случае конъюгата **32** наблюдается небольшое снижение эффективности по сравнению с остальными соединениями.

8. Гибридные наночастицы для фотодинамической терапии

Полученные в рамках работы гибридные наночастицы NaYF_4 , допированные ионами иттербия, эрбия и туллия при возбуждении светом с длиной волны 975 нм в результате эффективно протекающего процесса апконверсии демонстрируют узкие пики люминесценции с максимумами 475 нм, 520 нм, 540 нм, 650 нм и 808 нм (рисунок 14а). В качестве фотосенсибилизатора для пришивки на поверхность $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ нами был выбран *N*-аминобактериопурпуринимид **35** (рисунок 13), длинноволновый пик поглощения которого перекрывается с флуоресценцией частицы в области 808 нм, что делает возможным перенос энергии между этими компонентами. В качестве флуорофора было использовано производное 4-пиразолил-замещенного нафталимида **19б**, содержащее концевую карбоксильную группу, характеризующийся широким спектром поглощения в области 490 нм и оранжевой люминесценцией с максимумом 637 нм.

Из представленных на рисунке 26а,б спектров поглощения флуоресценции видно, что возбуждение раствора частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{19б}$ и $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{35}$ в области 975 нм приводит к снижению интенсивности зеленой люминесценции эрбия и туллия в области 520-550 нм (на 80% и 55%, соответственно) по сравнению с не модифицированными частицами и появлению низкоинтенсивных пиков в области 550-600 нм (рисунок 14а) и 830 нм (рисунок 14б), соответствующих полосам испускания флуорофоров **19б** и **35**. Данный спектральный эффект

свидетельствует о том, что на поверхности частиц реализуется перенос энергии фотовозбуждения не только на фотосенсибилизатор **35**, но и на нафталимидный краситель.

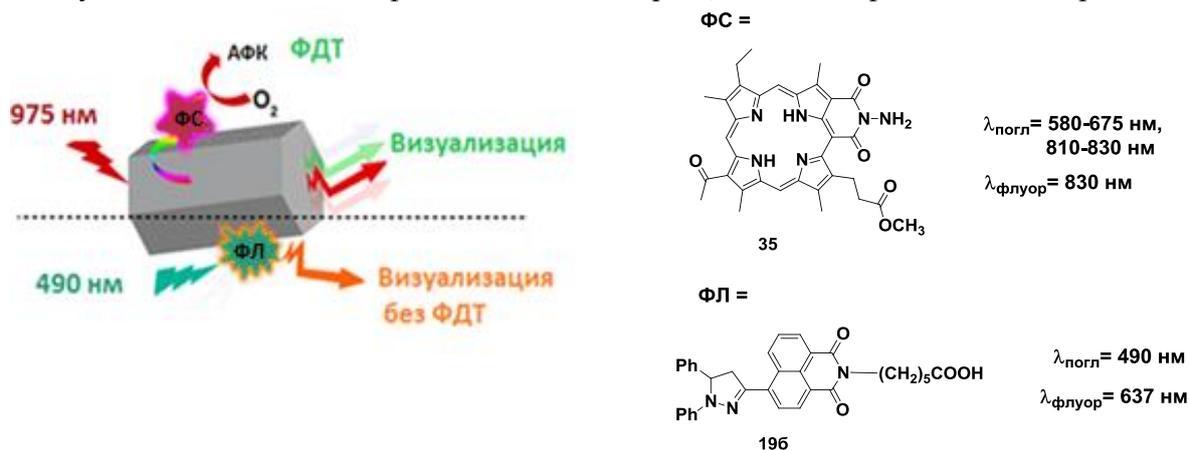


Рисунок 13 – Принцип работы гибридной наночастицы для ФДТ и структурные формулы фотосенсибилизатора аминобактериопурпинимида **35** и флуорофора, иммобилизованных на поверхности частиц.

При облучении частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ светом с длиной волны 975 нм (рисунок 14г) также наблюдается тушение люминесценции в зеленой области спектра (на 40%) и появление интенсивной полосы флуоресценции с максимумом 830 нм, что соответствует испусканию *N*-аминобактериохлорина.

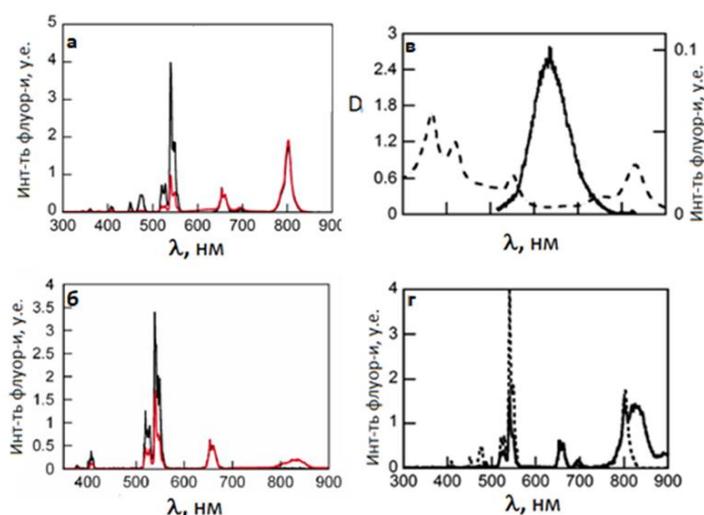


Рисунок 14 – Спектры флуоресценции частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}$ (а) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\mathbf{35}$ (б) - красные линии и не модифицированных частиц - черные линии при возбуждении 975 нм; в) Спектр поглощения (пунктир) и флуоресценции при возбуждении 490 нм наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$; г) Нормализованные спектры флуоресценции $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ (пунктир) и $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ ($\lambda_{\text{возб.}}=975$ нм). Концентрация частиц в растворе 1г/л, ацетонитрил.

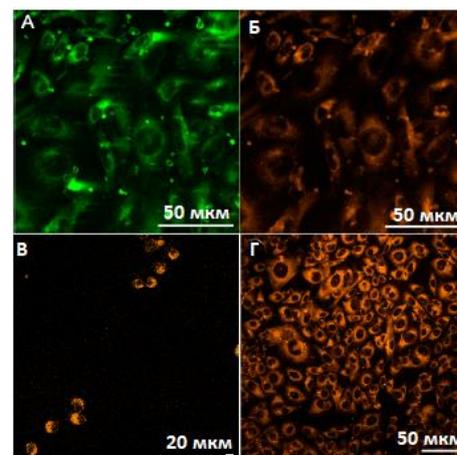


Рисунок 15 – Снимки клеток SH-SY5Y, инкубированных с гибридными наночастицами: А - $\lambda_{\text{возб.}}=975$ нм, детекция 515-518 нм; Б - $\lambda_{\text{возб.}}=975$ нм, детекция 590-650 нм; В - $\lambda_{\text{возб.}}=880$ нм, детекция 590-650 нм; Г - $\lambda_{\text{возб.}}=488$ нм, детекция 570-670 нм.

Интересно, что интенсивность флуоресценции пурпинимида при облучении гибридной частицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ значительно более высока, чем при облучении частиц без флуорофора **196** ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{35}$). Это связано с тем, что на поверхности частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ реализуется сразу несколько процессов переноса энергии. Фотовозбуждение иттрия (975 нм) переносится на ионы эрбия и тулия, от них передается

молекулам фотосенсибилизатора и флуорофора, при этом фотовозбуждение флуорофора сопровождается последующим переносом энергии на ФС, что приводит к разгоранию его флуоресценции. Таким образом флуорофор **19б** выступает в роли «антенны», усиливающей эмиссию фотосенсибилизатора при возбуждении частиц в области 975 нм. Возбуждение наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{19б/35}$ в области 490 нм (рис.14в) приводит к появлению в спектре флуоресценции широкой полосы с максимумом 637 нм, соответствующей нафталимидному флуорофору. Это свидетельствует, что процесс переноса энергии в определенной мере подавляется на поверхности наночастиц.

На рисунке 15 представлены изображения клеток, инкубированных с раствором наночастиц (100мкг/мл), полученные с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа. Возбуждение клеток светом с длиной волны 975 нм приводит к испусканию как самих частиц (рисунок 15а), так и нафталимидного фрагмента в результате частичного переноса энергии него (рисунок 15б). Нафталимидный хромофор напрямую может быть возбужден светом с длиной волны 488 нм (рисунок 15г), кроме того, было обнаружено, что **19б** обладает свойством двухфотонного поглощения. Это позволяет использовать ИК-лазер с длиной волны излучения 880 нм для возбуждения нафталимидных фрагментов на поверхности частиц (рисунок 15в) и проведения флуоресцентной диагностики без сопутствующего терапевтического эффекта, так как частицы прозрачны в области 880 нм (рисунок 15а).

ВЫВОДЫ

1. В настоящей работе предложены методы синтеза неописанных ранее производных 4-стирил- и 4-пиразолинил-1,8-нафталимида, содержащих азидные группы в алифатических заместителях при имидном атоме азота нафталимида, которые могут быть использованы для ковалентной сшивки с фотосенсибилизатором бактериохлорином посредством клик-реакции диполярного циклоприсоединения.

2. Установлено, что *N*-бутил-4-стирилнафталимида в растворителях высокой полярности при фотовозбуждении образуют ТІСТ-состояния, для которых возможна излучательная дезактивация. Найдено, что образованию скрученных состояний способствует увеличение ЭД характера стирилового фрагмента в 4-м положении нафталинового ядра, а также увеличение полярности растворителя и его способности к образованию водородных связей. Эффективность флуоресценции скрученных состояний также зависит от перечисленных факторов.

3. Установлено, что в конъюгатах нафталимидных флуорофоров и фотосенсибилизатора бактериохлорина с высокой эффективностью реализуется процесс резонансного переноса энергии возбуждения, ухудшающий их флуоресцентные характеристики. Тем не менее, в результате клеточных исследований конъюгата *N,N*-диметиламиностирилнафталимида было установлено, что флуоресцентный отклик нафталимидного фрагмента, проявляющийся в результате разрушения бактериохлорина под действием синглетного кислорода, может быть использован для подбора оптимальных значений мощности и дозы облучения для терапии.

4. Показано, что снижение эффективности РЕТ-процесса за счет введения в конъюгат полигликолиевого спейсера приводит к незначительному снижению эффективности переноса энергии и проявлению флуоресцентного отклика нафталимидного остатка. Имобилизация на поверхности апконверсионных наночастиц является эффективным способом улучшения имиджинговых свойств систем на основе бактериохлорина и нафталимида и позволяет проводить диагностику без сопутствующего фотодинамического эффекта.

5. Показано, что конъюгация нафталимидных красителей с фотосенсибилизатором не снижает фотодинамической эффективности последнего: (бис)хромофорные системы сохраняют

способность проникать в клетки, демонстрируют низкую темновую токсичность и высокую фотодинамическую эффективность в клеточных испытаниях и опытах *in vivo*.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Francés-Soriano L., Zakharko M.A., González-Béja M., Panchenko P.A., Herranz-Pérez V., Pritmov D.A., Grin M.A., Mironov A.F., García-Verdugo J.M., O.A. Fedorova O.A., Pérez-Prieto J. A nanohybrid for photodynamic therapy and fluorescence imaging tracking without therapy // *Chem. Mater.* – 2018. – Vol. 30. – P. 3677-3682.
2. Panchenko P.A., Arkhipova A.N., Zakharko M.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V., Arkhipov D.E., Jonusauskas G. Controlling photophysics of styrylnaphthalimides through TICT, fluorescence and E,Z-photoisomerization interplay // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 19. – P. 1244–1256.
3. Panchenko P.A., Grin M.A., Fedorova O.A., Zakharko M.A., Pritmov D.A., Mironov A.F., Arkhipova A.N., Fedorov Yu.V., Jonusauskas G., Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Ignatova A.A., Feofanov A.V. Novel Bacteriochlorin–Styrylnaphthalimide Conjugate for Simultaneous Photodynamic Therapy and Fluorescence Imaging // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol.19. – P. 30195-30206.
4. Панченко П.А., Архипова А.Н., Захарко М.А., Йонушаускас Г., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Синтез и спектральные свойства флуоресцентных красителей на основе производных 4-стирил-1,8-нафталимида // *Изв. АН. Сер. Хим.* – 2016. – № 10. – С. 2444–2450.
5. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А. Изучение влияния природы спейсерной группы на эффективности переноса энергии в конъюгатах бактериохлорина и нафталимида // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2018. – Т. 32. – №5. – С. 76-78.
6. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез и исследование оптических свойств конъюгата бактериохлорина и красителя на основе нафталимида для комбинированной фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики рака // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2017. – Т. 31. – №12. – С. 45-47.
7. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез новых стироловых производных 1,8-нафталимида // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2016. – Т. 30. – №11. – С. 33-35.
8. Захарко М.А., Сергеева А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез 4-стирилзамещенных 1,8-нафталимида для применения в качестве флуоресцентных навигаторов в фотодинамической терапии онкологических заболеваний // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2014. – Т. 28. – №10. – С. 49-51.

Тезисы конференций:

1. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А., Притъмов Д.А., Грин М.А., Миронов А.Ф., Морозова Н.Б., Якубовская Р.И. Тераностики на основе бактериохлорина и нафталимида: фотофизические и биологические свойства // VII Всероссийский конгресс "Фотодинамическая терапия и фотодиагностика", отель Radisson Slavyanskaya, Москва, 2018, Сборник тезисов, Т.5, Спецвыпуск 2, с.256.
2. Захарко М.А., Панченко П.А., Фёдорова О.А. Изучение влияния природы спейсерной группы на эффективность переноса энергии в конъюгатах бактериохлорина и нафталимида // XIV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии «UCChT-2018», Москва, 2018, с. 76-78.
3. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А. Разработка бифункциональных систем для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака // XI

Конкурс проектов молодых ученых в рамках выставки "Химия-2017", Москва, 2017, Сборник тезисов, с.153.

4. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Разработка бифункциональных систем для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака // V Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела», Туапсе, 2017, Сборник тезисов, с. 39.

5. Zakharko M.A., Arkhipova A.N., Panchenko P.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V., Bacteriochlorine-naphthalimide conjugates for photodynamic therapy and fluorescent imaging of cancer // The Fourth International Scientific Conference "Advances in Synthesis and Complexing", Moscow, 2017, Book of abstracts, p. 226.

6. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Фёдорова О.А. Синтез и исследование оптических свойств конъюгата бактериохлорина и красителя на основе нафталимида для комбинированной фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики рака // XIII Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии «УСChT-2017», Москва, 2017, с. 45-47.

7. Zakharko M.A., Panchenko P.A., Arkhipova A.N., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A., Bacteriochlorine-naphthalimide conjugates for photodynamic therapy and fluorescent imaging of cancer // VIIIth International Symposium "Design and Synthesis of Supramolecular Architectures" IInd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry, Kazan, 2016, Book of abstracts, p.185.

8. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Фёдорова О.А. Синтез новых стироловых производных 1,8-нафталимида // XII Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии «УСChT-2016», Москва, 2016, с. 33-35.

9. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез и оптические свойства конъюгатов бактериохлорина и красителей на основе 1,8-нафталимида для применения в ФДТ рака // Зимняя конференция молодых ученых по органической химии «WSOC 2016», 16-21 января 2016 г., Красновидово, Россия, Сборник тезисов, с. 154.

10. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез и оптические свойства бисхромофорных систем на основе производных нафталимида и бактериохлорина для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака // Международный Конгресс «KOST-2015», Москва, 2015, Сборник тезисов, с. 241.

11. Захарко М.А., Шепель Н.Э., Панченко П.А., Синтез и оптические свойства бисхромофорных систем на основе производных нафталимида и бактериохлорина // IV Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела», Туапсе, 2015, Сборник тезисов, с. 47.

12. Захарко М.А., Панченко П.А. Синтез 4-стирилзамещенных 1,8-нафталимида для использования в качестве флуоресцентных навигаторов в фотодинамической терапии рака // XXI Международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 2014 г., электр.ресурс, с.28.

13. Захарко М.А. Синтез 4-стрилзамещенных производных нафталимида для использования в качестве флуоресцентных навигаторов в фотодинамической терапии рака // Студенческая стендовая сессия «Начинающий ученый», Москва, 2015.

14. Захарко М.А., Сергеева А.Н., Панченко П.А., Фёдорова О.А. Синтез 4-стирилзамещенных 1,8-нафталимида для применения в качестве флуоресцентных навигаторов в фотодинамической терапии онкологических заболеваний // X Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии «УСChT-2014», Москва, 2014, с. 49-51.