

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

---

на правах рукописи

Смирнов Александр Юрьевич

# **Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP**

специальность 02.00.10 (биоорганическая химия)

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н. Баранов Михаил Сергеевич

Москва – 2020

## Содержание

Содержание.....	2
1. Введение .....	4
2. Обзор литературы .....	7
2.1 Явление флуоресценции .....	7
2.2 Сольватохромные флуоресцентные красители .....	9
2.2.1 Природа сольватохромизма .....	9
2.2.2. Сольватохромные флуоресцентные красители с донорной и акцепторной частью.....	10
2.2.3. Сольватохромные флуоресцентные красители с внутримолекулярным переносом протона .....	19
2.2.4. Сольватохромные флуоресцентные красители с конформационной изомеризацией.....	21
2.2.5. Сольватохромные флуоресцентные красители со структурной изомеризацией	23
2.2.6. Сольватохромные флуоресцентные красители, способные к агрегации .....	24
2.3. Методы синтеза аналогов хромофора GFP .....	27
2.3.1. Синтез с использованием амидов N-ацилдегидроаминокислот .....	27
2.3.2. Конденсация 1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов с карбонильными соединениями .....	28
2.3.3. Синтез с использованием иминов и иминоэфиров.....	29
2.3.4. Прочие методы синтеза .....	29
3. Обсуждение результатов.....	32
3.1. Синтез и исследование производных хромофора GFP - изучение влияния заместителей в бензилиденовом фрагменте.....	35
3.2. Модификация бензилиденимидазолонов .....	37
3.2.1 Синтез и исследование 5-аминометиленимидазолонов.....	37
3.2.2. Синтез аналогов хромофора белка <i>Kaede</i> .....	41
3.2.3. Синтез ауриноподобных флуорофоров .....	43
3.2.4. Исследование реакции кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами .....	44
3.3. Исследование оптических свойств имидазолоновых флуорофоров .....	48
3.4. Окрашивание клеточных культур .....	60
4. Экспериментальная часть.....	70
4.1 Материалы и оборудование .....	70
4.2. Синтез.....	71
4.2.1. Синтез 3,7-диметокси-2-нафталальдегида.....	71

4.2.2. Синтез аналогов хромофора GFP.....	73
4.2.3. Синтез 5-аминометиленимидазолонов.....	80
4.2.4. Синтез борированных 5-аминометиленимидазолонов.....	83
4.2.5. Синтез аналогов хромофора белка <i>Kaede</i> .....	86
4.2.6. Синтез ауриноподобных флуорофоров.....	98
4.2.7. Синтез метилсульфанилвинильных имидазолонов.....	102
4.3. Исследование оптических свойств полученных соединений.....	109
5. Выводы.....	110
6. Благодарности.....	111
7. Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	112
8. Список сокращений и условных обозначений.....	113
9. Список литературы.....	114

## 1. Введение

Современная биология немислима без применения флуоресцентной микроскопии. Краеугольным камнем данного метода является флуоресцентная метка, которая вводится в исследуемый объект. Для успешного использования она должна обладать рядом определенных характеристик – селективным окрашиванием целевого объекта, низким фоновым сигналом, а также незначительным влиянием на свойства окрашиваемой системы (в частности отсутствием токсичности и малым размером). Желательно, чтобы положения максимумов поглощения и испускания лежали в длинноволновой области и по возможности соответствовали используемым в оборудовании фильтрам. Несмотря на то, что к настоящему моменту предложено множество флуоресцентных меток различных типов, которые активно поспособствовали революционному развитию биологических исследований в последние несколько десятилетий, идеальной флуоресцентной метки до сих пор не существует и разработка новых подходов к мечению остается актуальной задачей. В частности, в последние годы стало популярным использование так называемых флуорогенных красителей – веществ, чья флуоресценция в свободном виде выражена незначительно и проявляется интенсивно лишь при взаимодействии с целевым объектом.

Одной из самых распространенных флуоресцентных меток, используемых в современных биологических исследованиях, являются разнообразные флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка (GFP), который был обнаружен у медуз *Aequorea victoria* в 1962 г. Центральной частью данного белка, отвечающей за флуоресцентные свойства, является хромофор, образующийся из собственных аминокислотных остатков и имеющий структуру бензилиденимидазолон. Находясь внутри массивной белковой молекулы, этот хромофор проявляет ярко выраженную флуоресценцию, однако в свободной форме данное соединение флуоресцирует очень слабо. Ранее в нашей лаборатории было показано, что подобное свойство объясняется возможностью конформационных изменений молекулы хромофора, которые приводят к безызлучательному сбросу энергии возбуждения.[1] Фиксация молекулы внутри белка или же внутренним мостиком приводит к значительному увеличению ее квантового выхода флуоресценции, а значит различные производные хромофора GFP являются отличной основой для создания флуорогенных маркеров.

Целью представленной работы является поиск новых флуорогенных производных хромофора GFP и изучения возможности их использования для флуоресцентного мечения биологических объектов. В рамках поставленной цели были реализованы следующие задачи:

- Систематическое изучение влияния различных заместителей на оптические свойства аналогов хромофора GFP.

- Разработка новых подходов к синтезу и модификации производных хромофора GFP и их более отдаленных аналогов.

- Выявление веществ с наиболее выраженной флуорогенностью, а также их модификация, направленная на смещение максимумов абсорбции и эмиссии новых веществ в длинноволновую область.

- Изучение возможности использования созданных флуорогенов в окрашивании живых систем и выявление закономерностей между их строением и свойствами.

В результате проведённой работы были впервые синтезированы аналоги хромофора GFP, проявляющие заметное варьирование квантового выхода флуоресценции в различных средах и ярко выраженный сольватохромизм. Предложены новые методы их модификации, в частности, реакция кросс-сочетания терминальных ацетиленов и 2-метилсульфанилбензилиден-имидазолонов. В результате проведённой работы впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Подробное изучение характеристик предложенных маркеров позволило сделать выводы о причинах селективности выявленного окрашивания, которые могут быть использованы при создании новых флуорогенных маркеров.

Синтетическая работа проводилась с применением классических методов органической и металлоорганической химии. Все новые соединения характеризовались методами ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , масс-спектрометрии высокого разрешения для веществ, обладающих выраженной окраской.

*Положения, выносимые на защиту:*

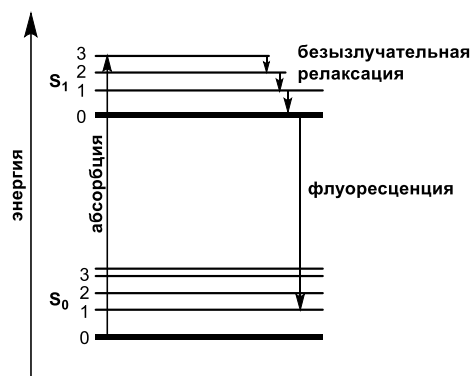
1. Введение в бензилиденный фрагмент производных хромофора GFP акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к усилению сольватохромизма и многократному увеличению интенсивности их флуоресценции в апротонных средах.
2. Аналогичные производные хромофора белка *Kaede* и ауриновых соединений характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения эмиссии, а также зачастую демонстрируют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции в апротонных средах, огромный Стоксов сдвиг и выраженный сольватохромизм в целом.
3. Введение аминогруппы при кратной экзо-связи производных хромофора GFP не приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии, однако позволяет создать на их основе стабилизированные дифторборильным мостиком 5-аминометиленимидазолы, которые демонстрируют интенсивную флуоресценцию и ярко выраженный сольватохромизм.
4. Взаимодействие 2-метилсульфанильных имидазолонов с терминальными ацетиленами приводит к образованию метилсульфанильных аналогов хромофора белка *Kaede*, которые также характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.
5. Полученные соединения могут применяться как сольватохромные флуорофоры, проявляющие высокую флуоресценцию в апротонных средах, и могут быть использованы для селективного окрашивания отдельных клеточных органелл.

Основные материалы диссертации были доложены на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва 2019), а также конкурсе молодых ученых в рамках XXXI зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019). По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах.

## 2. Обзор литературы

### 2.1 Явление флуоресценции

Флуоресценцией называют излучение света веществом (также называемом флуорофором), которое происходит сразу после того, как вещество само поглотило электромагнитное излучение. Поглощение кванта света приводит к переходу молекулы в возбужденное состояние, релаксация которого в исходное невозбужденное состояние сопровождается испусканием фотона. За время пребывания в возбужденном состоянии молекула претерпевает ряд изменений геометрии, при которых происходит понижение энергии, из-за чего практически всегда излученный квант имеет меньшую энергию и, соответственно, большую длину волны.[2] Схематично это изображено на диаграмме Яблонского (Рисунок 1).[3,4]



**Рисунок 1.** Диаграмма Яблонского.

Одним из самых бурно развивающихся направлений применения флуоресцирующих соединений является их использование для визуализации процессов, протекающих в живых объектах. Флуоресцентным красителям (также именуемых флуорофорами) для биологических исследований обычно выдвигаются следующие специфические требования:

- способность проникать через клеточные мембраны
- фото- и биостабильность
- отсутствие токсичности и иного влияния на живые системы
- длинноволновые максимумы поглощения и испускания, желательно в красной и инфракрасной областях (наименее поглощаемое биологическими объектами излучение);
- отсутствие фонового сигнала флуоресценции (обычно в водной среде);
- также часто требуется большая разница между положениями максимумов абсорбции и эмиссии (Стоксов сдвиг) для удобства наблюдения.

Флуорофоры можно условно разделить на две группы – «классические» флуоресцентные красители, испускающие и поглощающие излучение во всех средах примерно в одном диапазоне с одинаковой интенсивностью, и сольватохромные красители, динамично изменяющие свои спектральные характеристики в зависимости от окружающей среды.

В настоящем обзоре будут рассмотрены сольватохромные флуорофоры, которые являются универсальными исследовательскими инструментами, так как они реагируют на небольшие перемены в исследуемой среде, изменяя цвет и интенсивность флуоресценции.[5,6] Благодаря таким свойствам, с помощью этих веществ возможно изучать взаимодействия между биомолекулами, структуру мембран и многое другое.[7] Стоит сразу отметить, что к данному типу флуоресцентных красителей мы не относим сенсоры металлов и pH, так как они фактически претерпевают химическое взаимодействие, в результате которого образуется другое соединение.



## 2.2 Сольватохромные флуоресцентные красители

### 2.2.1 Природа сольватохромизма

Достаточно сложным вопросом является взаимодействием молекул красителя с растворителем. Обычно выделяют следующие характеристики растворителя – вязкость, кислотно-основные свойства, полярность, а в случае биологических объектов – и структура окружения.[8] Самое значительное воздействие на спектральные свойства сольватохромных красителей оказывает полярность растворителя. Это связано с тем, что практически все флуорофоры представляют собой диполи – имеют донорную группу с одной стороны и акцепторную с другой. Более того, почти всегда поглощение кванта света приводит к тому, что происходит увеличение полярности молекулы флуоресцентного красителя, что приводит к увеличению воздействия на ближайшие молекулы растворителя и их ориентацию. На этот процесс тратится часть поглощенной энергии и излучение происходит на большей длине волны, чем если бы растворитель был менее полярным. Соответственно, в более полярных растворителях этот эффект более выражен, а потому наблюдается более длинноволновая эмиссия и больший Стоксов сдвиг. Но при этом также зачастую падает квантовый выход флуоресценции.

Существует несколько математических моделей, описывающих сольватохромизм. Одна из самых известных – уравнение Камлета-Тафта, позволяющее рассчитать влияние растворителя на положение максимумов абсорбции и эмиссии:

$$\nu = \nu_0 + \rho\pi^* + a\alpha + b\beta,$$

где  $\alpha$  – кислотность,  $\beta$  - основность, а  $\pi^*$  – полярность растворителя.[9,10] Эти значения являются постоянными и были определены на множестве красителей в результате расчета линейной регрессии. Используя эту модель и обладая достаточным количеством данных о сольватохромных свойствах флуорофора в нескольких растворителях, можно с не очень большой погрешностью предсказать спектральные характеристики изучаемого красителя в других средах.

Стоит отметить, что кислотность и основность являются достаточно очевидными характеристиками растворителя, тогда как точное физическое определение полярности не дано. Поэтому предсказание сольватохромного эффекта зачастую затруднительно для обычных растворителей, а для биологических сред многократно сложнее. Более того, нет никакой модели, которая могла бы предсказывать такой важный параметр флуоресцентных соединений,

как квантовый выход. Поэтому результаты исследований сольватохромных красителей часто непредсказуемы.

Не смотря на эти затруднения с растворителями, существует много подробных экспериментально доказанных квантово-физических моделей различных явлений, связанных с флуоресценцией. Можно выделить пять основных процессов, обуславливающих сольватохромизм [11]:

- 1 – перенос заряда в молекуле красителя
- 2 – перенос протона в молекуле красителя
- 3 – конформационная изомеризация
- 4 – структурная изомеризация
- 5 – агрегация

Естественно, практически никогда нельзя смело утверждать, что сольватохромный эффект обусловлен только одной определенной причиной. Более того, данное разделение не учитывает, что молекулы растворителя имеют свои собственные структурные особенности и зачастую (особенно если речь идет о биологических объектах) превышают молекулы красителя по размерам, а потому воспринимать их как умозрительную среду, описываемую всего несколькими физико-химическими параметрами, не совсем правильно. В связи с этим в данном обзоре эффекты, обуславливающие сольватохромизм, будут представлены именно такими, какими их описали сами авторы работ.

### **2.2.2. Сольватохромные флуоресцентные красители с донорной и акцепторной частью**

Классическими чувствительными к окружению флуоресцентными красителями являются сопряженные ароматические структуры с донорной и акцепторной частью, называемые также push-pull флуорофорами в англоязычной литературе. В таких соединениях при абсорбции кванта света заряд перераспределяется из донорной части в акцепторную, благодаря чему молекула оказывается еще более поляризованной. Релаксация протекает с участием дипольных молекул растворителя, благодаря чему эмиссия сдвигается в более длинноволновую область с ростом полярности растворителя.

Для большинства флуорофоров такого типа характерны две особенности. Во-первых, их фотостабильность невелика, особенно в неполярных растворителях, что связано с процессом фотоокисления триплетного состояния возбужденной молекулы.[12,13] В этом контексте стоит упомянуть достаточно оригинальный подход к решению данной проблемы в недавней

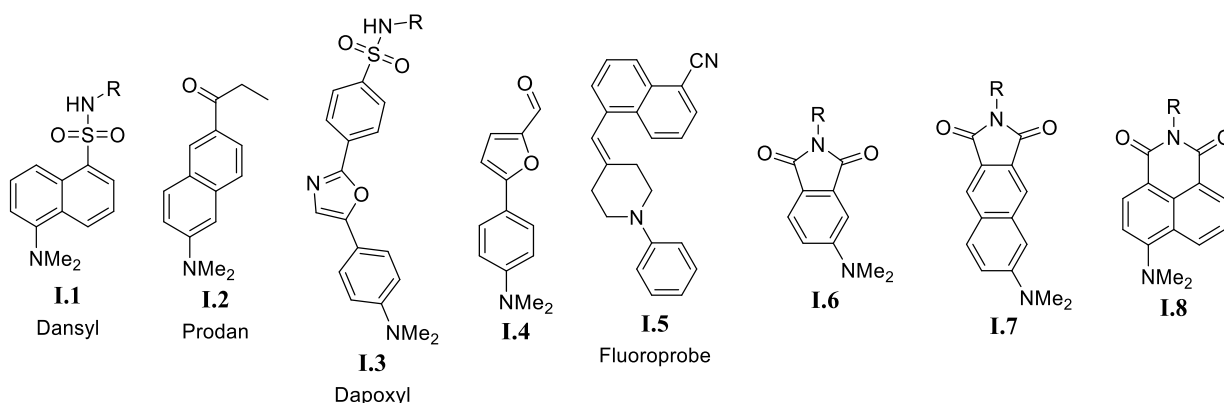
публикации, в которой авторы ввели в молекулу красителя фрагмент циклооктатетраена, который способен эффективно гасить триплетное состояние.[14] Во-вторых, большинство полярных красителей практически не флуоресцируют в полярных протонных растворителях, в основном из-за переноса электрона [15] и безызлучательного перехода в неплоское состояние (twisted intramolecular charge transfer, TICT).[16]

Так как полярные красители весьма чувствительны к полярности среды, с их помощью можно исследовать внутренние биофизические свойства биомембран, такие как полярность, гидратация, электростатический потенциал и другие.[17] Особенно полезны такие флуорофоры для визуализации ориентированных и неориентированных фазовых доменов, которые, как предполагается, оказывают существенное влияние на функционирование биомембран.[18] Другим важным применением сольватохромных флуорофоров является визуализация биомолекулярных взаимодействий.[6]

Так как число полярных флуоресцентных красителей велико и зачастую они сильно отличаются друг от друга по структуре, они будут рассмотрены отдельно по классам соединений.

### Классические нафтиламиновые флуоресцентные красители и их аналоги

Главные представители сольватохромных красителей состоят из трех последовательно соединенных фрагментов – аминного донора, сопряженной ароматической  $\pi$ -системы и акцептора (Рисунок 2). Эти соединения имеют только одну полосу испускания, которая меняет свое положение в зависимости от полярности растворителя. Зачастую указанные соединения имеют максимум абсорбции в фиолетовой и ультрафиолетовой области спектра, а также обладают невысоким коэффициентом экстинкции.



**Рисунок 2.** Классические сольватохромные флуоресцентные красители.

Одними из самых первых сольватохромных красителей, используемых для исследования мембран и белков, являются производные 1-аминонафтил-8-сульфоновой кислоты **I.1**

(Dansyl).[19] Введение Dansyl-фрагмента в белки или липиды позволяет исследовать полярность среды.[20,21] В последние годы этот подход практически не применяется из-за слабого сольватохромизма и необходимости использовать ультрафиолетовое излучение для возбуждения.

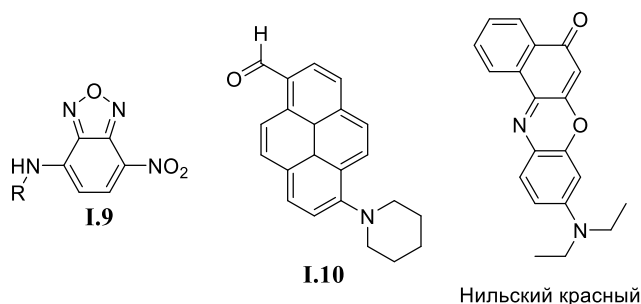
Аминонафталин **I.2** (Prodan) является одним из самых используемых классических сольватохромных флуорофоров.[22] Он обладает небольшим размером и заметной чувствительностью к полярности растворителя.[7] Производные данного соединения не раз вводились в состав белков, что позволило исследовать их взаимодействия с другими биомолекулами.[23–26]

Флуорофор Дарохул **I.3** демонстрирует значительный сольватохромизм (батохромный сдвиг в 200 нм при переходе от гексана к смеси вода - ацетонитрил), а также высокие квантовый выход и коэффициент молярной экстинкции.[27] Однако по причине того, что абсорбция у данного соединения также находится в ультрафиолетовой области, примеров его применения в биологии немного.[27,28] Также стоит упомянуть близкий по структуре к Дарохул аминофуран **I.4**, имеющий схожие оптические свойства, который использовался для исследования неоднородности полярности в адипосомах.[29]

Краситель **I.5** (Fluoroprobe) обладает самым большим сольватохромным разбросом эмиссии среди всех остальных известных флуорофоров из-за очень высокого дипольного момента. Однако из-за слишком активного гашения флуоресценции в полярных средах, а также абсорбции в ультрафиолетовой области, он, к сожалению, так и не нашел применения в биологии.[30]

Еще одним важным семейством сольватохромных красителей являются аминифталимидные соединения **I.6–I.8**. Для данного класса соединений характерен ярко выраженный сольватохромизм, высокая флуоресценция в апротонных растворителях, почти полное гашение флуоресценции в воде и коротковолновые максимумы поглощения. Фталимид **I.6** является одним из первых описанных сенсоров полярности.[31] Введение данного соединения в аминокислотную последовательность позволяет получить датчик полярности, который можно использовать для исследования межбелковых взаимодействий.[32] Нафталимид **I.7** обладает эмиссией в диапазоне 500-600 нм и применяется для изучения конформационных переходов белков.[33] Максимум абсорбции красителя **I.8** смещен в более длинноволновую область по сравнению с вышеописанными соединениями (440 нм), данное соединение также может вводиться в белковые цепи для исследования межмолекулярного взаимодействия.[34]

Так как вышеописанные классические флуорофоры оказались не слишком удобными для современных методов изучения внутриклеточных процессов, были разработаны их более совершенные полициклические аналоги (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Некоторые аминовые полициклические сольватохромные красители.

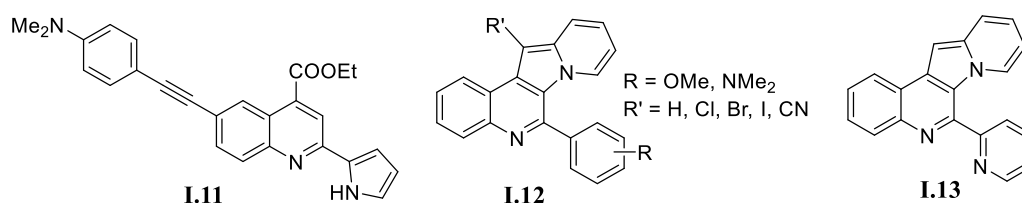
Важным примером флуорофоров с эмиссией в красной области спектра являются производные бензооксадиазола **I.9**. Благодаря своему небольшому размеру они легко проникают через клеточные мембраны, однако их сольватохромизм невелик и их использование имеет смысл только в процессах со значительным изменением полярности.[35]

Аминопиреновый флуорофор **I.10** также обладает длинноволновыми максимумами абсорбции и эмиссии, а также большим сольватохромизмом. Эти его свойства позволили применить данное соединение для изучения распределения липидов во внутриклеточных и внешней мембранах клеток.[13]

Нильский красный и структурно близкие к нему феноксазиновые производные обладают максимумом абсорбции в диапазонах порядка 500-550 нм, а также имеют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции,[36] и потому они достаточно часто применяются в биологических исследованиях.[37] В качестве сенсора полярности нильский красный, например, был введен в молекулу  $\beta_2$ -адренорецептора, что позволило затем изучать изменения его конформации благодаря изменению флуоресценции по причине сольватохромизма.[38]

### Хинолиновые красители

В последние несколько лет было показано, что такие классические гетероциклы, как хинолины, могут применяться как сенсоры полярности для визуализации внутриклеточных процессов.

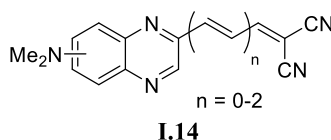


**Рисунок 4.** Хинолиновые сольватохромные флуорофоры.

Так, хинолино-пиррольное производное **I.11** обладает интересным свойством – хотя положение максимума эмиссии варьируется в пределах почти 150 нм в разных растворителях, спектр абсорбции и коэффициент молярной экстинкции практически не меняются. Кроме того, данное соединение обладает практически нулевой флуоресценцией в протонных растворителях, а потому его применение в визуализации биологических объектов не затруднено наличием фонового сигнала. Краситель **I.11** способен проникать через мембраны и селективно окрашивать лизосомы, позволяя исследовать их флуоресцентными методами.[39]

Индолизинохинолины **I.12** и **I.13** продемонстрировали высокую фотостабильность, низкую цитотоксичность, хорошую водорастворимость и заметный сольватохромный эффект. Более того, часть из них оказалась способной проникать через ядерную мембрану и окрашивать ДНК и РНК.[40]

Сольватохромные хиноксалиновые производные **I.14** (Рисунок 5) также демонстрируют замечательные свойства. Они хорошо растворимы в воде, обладают высоким квантовым выходом, имеют максимумы эмиссии в красном и ближнем инфракрасном диапазонах спектров. Но важнее то, что представитель с самой длинной метиновой цепочкой способен проникать через гематоэнцефалический барьер и селективно окрашивать  $\beta$ -амилоидные бляшки и нейрофибрилярные белки в разные цвета из-за отличий в их поверхностной полярности. Это позволяет использовать данное соединение для неинвазивного диагностирования болезни Альцгеймера.[41]

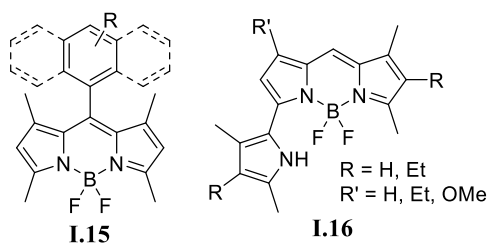


**Рисунок 5.** Хиноксалиновые флуоресцентные красители.

### **BODIPY и другие бороциклические красители**

Борпиррометеновые красители, обычно называемые BODIPY, являются наверно самыми известными и многочисленными борсодержащими флуоресцентными красителями, интерес к которым не ослабевает уже более полувека.[42,43] Среди их достоинств – синтетическая доступность, малый размер, широкие возможности по модификации, очень высокий квантовый выход флуоресценции даже в протонных растворителях. Однако имеются и недостатки, ограничивающие их применение – зачастую низкая растворимость в воде, обычно коротковолновые максимумы абсорбции и эмиссии, небольшой Стоксов сдвиг. Несмотря на это, BODIPY-красители нашли широкое применение как флуоресцентные метки различных биологических объектов,[44–46] хемосенсоры,[47,48] красители для лазеров [49] и т.д. Среди

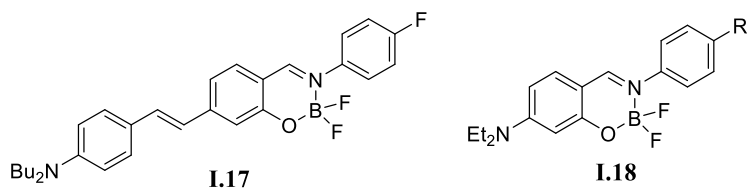
данных соединений есть и те, для которых была обнаружена, исследована и использована зависимость оптических характеристик среды.



**Рисунок 6.** Чувствительные к полярности среды BODIPY-красители.

В ходе исследований BODIPY-красителей с различными ароматическими заместителями **I.15** было установлено, что данные соединения в некоторых случаях могут быть чувствительными к полярности среды. Достаточно интересным оказалось взаимодействие с важным компонентом крови - альбумином – некоторые соединения усиливали свою флуоресценцию в присутствии белка, другие, наоборот, значительно уменьшали, третьи же почти не проявляли никакой реакции. Авторы работы пришли к выводу, что полярность поверхности альбумина соответствует полярности ацетона, тогда как полярность внутриклеточных мембран близка к полярности дихлорметана.[50]

Пирролсодержащие флуорофоры BODIPY **I.16** продемонстрировали достаточно значительную зависимость положения максимумов абсорбции и эмиссии, а также квантового выхода флуоресценции от полярности исследуемого растворителя. Вместе с тем, что данный тип соединений имеет длинноволновые спектральные полосы абсорбции и эмиссии, это позволяет говорить об их потенциально широком использовании в исследовании внутриклеточной полярности. Авторы работы исследовали взаимодействие красителей **I.16** с некоторыми белками, отметив усиление флуоресценции.[51]

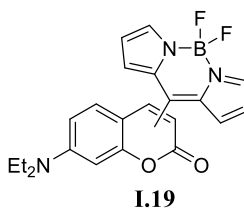


**Рисунок 7.** Циклические флуорофорные эфиры бора.

Совсем недавно были описаны новые шестичленные борсодержащие красители (Рисунок 7). Для данного класса соединений стоит отметить значительное смещение максимумов абсорбции и эмиссии от полярности окружающей среды, огромный Стоксов сдвиг, а также большой потенциал для дальнейшей модификации. Краситель **I.17** обладает эмиссией в дальнем красном и даже инфракрасном диапазоне. Хотя квантовый выход флуоресценции

(менее 1%) и коэффициент экстинкции оказались небольшими, это не помешало использовать данный краситель для исследования внутриклеточных мембран.[52] Соединения **I.18** демонстрируют высокую липофильность и были использованы для исследования адипоцитов и клеток печени, что может быть полезно при изучении заболеваний этого органа.[53]

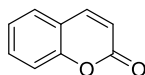
Стоит заметить, что существует немало флуоресцентных красителей, содержащих в своем составе фрагменты нескольких известных флуорофоров. Различный флуоресцентный ответ в зависимости от среды позволяет более подробно изучать происходящие в клетках процессы. Например, нижеприведенное соединение **I.19** содержит фрагмент BODPY и кумарина (Рисунок 8). Исследования показали, что данный краситель имеет два максимума эмиссии, соотношение которых не зависит от вязкости и кислотности среды, а также наличия примесей, а только от полярности растворителя. Благодаря этому возможно наблюдение небольших колебаний полярности цитоплазмы.[54]



**Рисунок 8.** Борциклический кумариновый флуорофор.

### Прочие красители

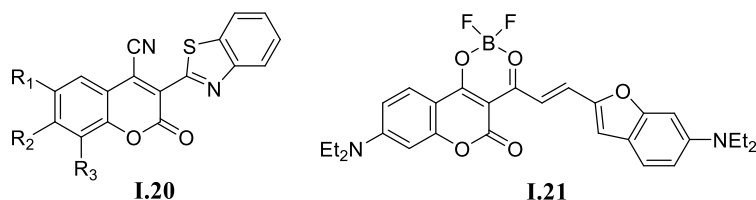
Огромное семейство флуоресцентных кумариновых красителей является одним из самых широко исследуемых. Среди кумаринов есть сенсоры кислотности, ионов тяжелых металлов и небольших органических молекул.[55]



**Рисунок 9.** Структурное ядро кумарина.

Для кумаринов характерен значительный сольватохромизм, поэтому они также не раз использовались как сенсоры полярности среды.[56–58] Однако примеров исследования полярности в биологических объектах немного. Соединения **I.20** проявляют очень высокий квантовый выход и Стоксов сдвиг, при этом в водной среде наблюдается практически полное гашение флуоресценции. Данные флуорофоры не очень селективны и окрашивают практически все апротонные липофильные области внутри клеток. [59]

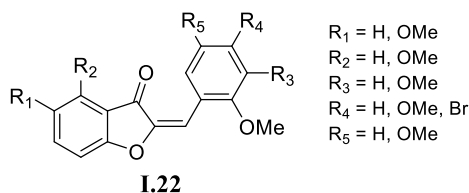




**Рисунок 10.** Кумариновые флуоресцентные сенсоры полярности.

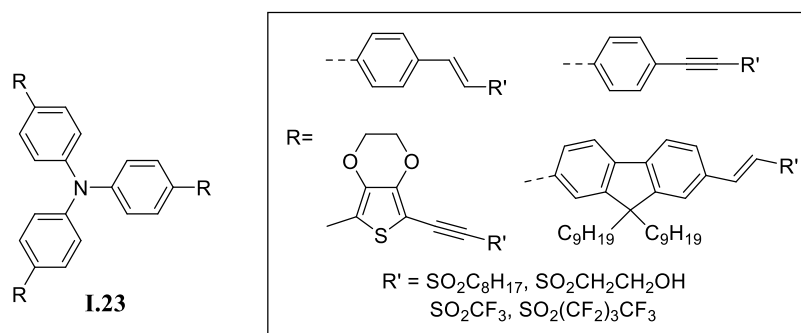
Очень интересен пример кумаринового производного **I.21**, содержащего в своем составе также циклический борный эфират. Линии эмиссии данного соединения смещаются в диапазоне 600-900 нм в зависимости от полярности среды, что позволяет применять его для подробного исследования полярности мембран и адипосом во время окислительного стресса.[60]

Стоит упомянуть также и такой класс природных красителей и одновременно биологически активных веществ, как ауруны.[61,62] Флуорофоры **I.22** (Рисунок 11) проявляют значительный сольватохромный эффект, высокий квантовый выход длинноволновой флуоресценции, что позволяет окрашивать альбумин и исследовать микроокружение в липидных везикулах. Кроме того, авторы исследования показали, что сольватохромный эффект обусловлен именно перераспределением заряда поляризованной молекулы ауруна.[63]



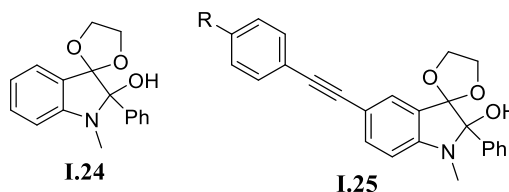
**Рисунок 11.** Сольватохромные ауруновые красители.

Также в литературе описано применение необычных полярных симметричных трифениламинных производных **I.23**. Для данных соединений характерны большие Стоксовы сдвиги и высокий квантовый выход флуоресценции, а также наблюдается значительный сольватохромный эффект. Оказалось, что данные соединения могут проходить через мембраны внутрь клеток, а так как их флуоресценция практически не наблюдалась в водной среде, несколько соединений оказались способными окрасить отдельные органеллы.[64]



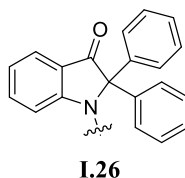
**Рисунок 12.** Трифениламиновые сольватofлуоресцентные красители.

Недавно был синтезирован новый класс индолиновых флуорофоров **I.24** и **I.25** (Рисунок 13). Для данных соединений характерен большой сольватохромизм и очень широкие линии эмиссии и абсорбции, занимающие практически весь видимый диапазон. Однако гораздо более интересной особенностью данного класса соединений является селективное окрашивание эндоплазматического ретикулума. Благодаря этому авторам исследования удалось измерить колебания полярности внутри этой не до конца изученной внутриклеточной системы.[65]



**Рисунок 13.** Индолиновые флуоресцентные красители.

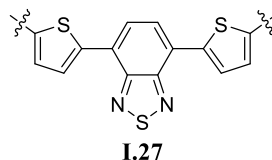
Близкие по структуре индолиновые производные, содержащие в своем составе отвечающий за флуоресцентные свойства фрагмент **I.26** и линкер для связывания с целевым объектом, позволили селективно окрашивать биотиновый рецептор, а также изучить полярность мембран митохондрий. Высокая фотостабильность, большие Стоксовы сдвиги, простота синтеза и водорастворимость исследованных соединений позволяет ожидать дальнейшего расширения сфер использования таких флуоресцентных красителей.[66,67]



**Рисунок 14.** Дифенилиндолиновый фрагмент сольватохромного флуорофора.

Еще одним полярным гетероциклом, способным обуславливать флуоресцентные свойства веществ, является триадиазол. Производные данного соединения снискали большую популярность среди красителей для фотовольтаики, однако есть примеры их использования и в

биологии. Главной отличительной особенностью данных соединений являются длинноволновые максимумы абсорбции и эмиссии. Внедрение фрагмента **I.27** в аминокислотную последовательность позволяет исследовать полярность внутриклеточных органелл, используя для возбуждения менее фототоксичное излучение.[68,69]

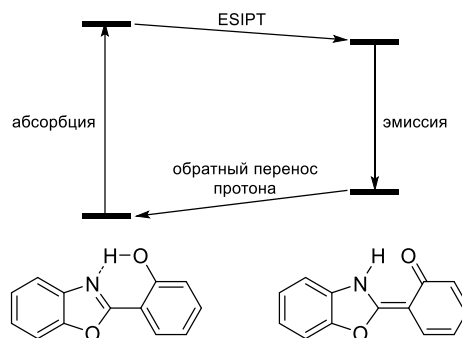


**Рисунок 15.** Сольватохромный тиадиазольный фрагмент флуоресцентных красителей.

Что же касается многочисленных аналогов хромофора зеленого флуоресцентного белка, то для данного класса соединений написано много количество литературных работ, посвященных исследованию сольватохромизма.[70–75] Однако нами не были обнаружены примеры применения данных соединений в качестве чувствительных к полярности среды флуоресцентных меток. Поэтому можно предположить, что реализуемое в ходе нашей работы исследование станет первым в своем роде.

### 2.2.3. Сольватохромные флуоресцентные красители с внутримолекулярным переносом протона

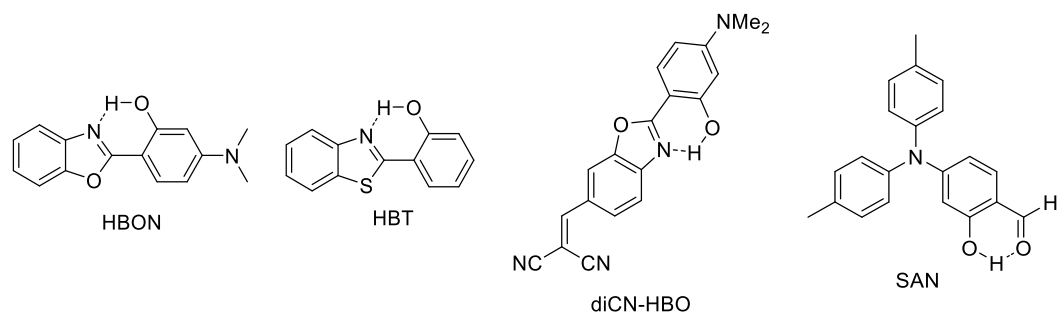
В случае, если внутренняя водородная связь во флуорофоре ослаблена из-за возможного свободного вращения фрагментов или же наличия донорных или акцепторных заместителей, возможна релаксация возбужденного состояния в результате переноса протона в молекуле красителя (excited state intramolecular proton transfer, ESIPT-механизм).[76]



**Рисунок 16.** Принцип ESIPT-механизма на примере 2-(2-гидроксифенил)-бензооксазола.

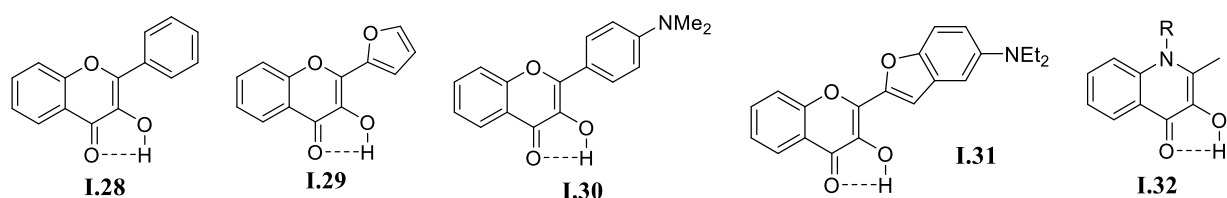
В качестве классических примеров соединений, в которых возможен такой процесс, являются HBON, HBT, diCN-HBO и SAN (Рисунок 17). Отличительной особенностью данных соединений является наличие двух значительно отличающихся максимумов эмиссии, отвечающих двум состояниям молекулы. Кроме того, перенос протона является

энергозатратным процессом, поэтому для данных соединений характерен большой Стоксов сдвиг.[77]



**Рисунок 17.** Флуорофоры с внутримолекулярным переносом протона.

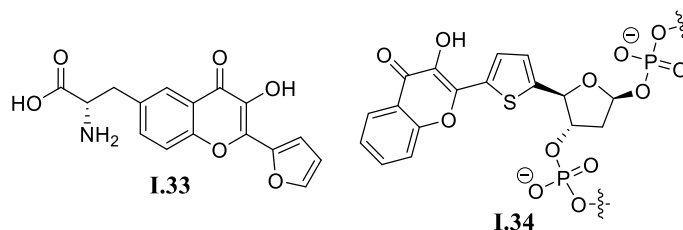
Похожий эффект наблюдается для гидроксихромоновых и родственных им гидроксихинолоновых красителей, содержащих пятичленный фрагмент с протоном **I.28- I.32** (Рисунок 18). Спектры эмиссии данных соединений также содержат две линии, соответствующие исходной (более коротковолновая область) и таутомерной (длинноволновая область) формам. Увеличение полярности и особенно кислотных свойств растворителя значительно снижают долю таутомерной формы. Отметим, что донорные свойства заместителя во втором положении гидроксихромона оказывают большое влияние на возможности их применения в средах с разной полярностью – тогда как соединения **I.28** и **I.29** демонстрируют оба пика эмиссии даже в воде и ацетонитриле, красители **I.30** и **I.31** могут существовать в таутомерной форме только в средах с меньшей полярностью.[78,79]



**Рисунок 18.** Гидроксихромоновые и гидроксихинолоновые флуорофоры.

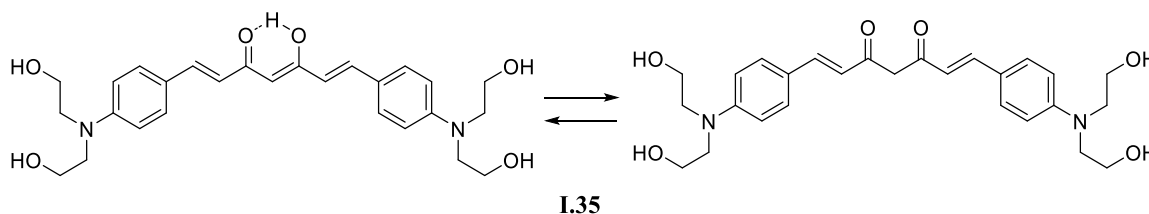
Оптические свойства вышеприведенных гидроксихромонов и их аналогов крайне чувствительны к полярности окружающей среды, зачастую они не флуоресцируют в воде. Данный класс соединений эффективно окрашивает различные клеточные мембраны. Так, с их помощью проводились визуализованные измерения трансмембранного потенциала,[80,81] исследования липидных доменов однослойной лизосомы.[82] С помощью этих соединений из-за изменения полярности внешней клеточной мембраны лимфоцитов удалось исследовать оптическими методами процесс их апоптоза.[83] Более того, производные гидроксихромонов позволяют исследовать очень многие типы взаимодействия биомолекул. Данные флуорофоры, присоединенные к белкам в виде аминокислоты **I.33** (Рисунок 19), позволяют регистрировать

взаимодействия с нуклеиновыми кислотами,[84] белками[85] и мембранами,[86] так как в процессе подобных взаимодействий уменьшается локальная полярность, что в свою очередь увеличивает долю таутомерной формы. Введение этой сенсорной аминокислоты в  $\alpha$ -синуклеин позволяет на ранних стадиях заметить агрегацию белка, которая имеет место при болезни Паркинсона и некоторых других нейродегенеративных заболеваниях.[87] Использование нуклеозидного аналога гидроксихромена **I.34** позволяет визуализировать гибридизацию ДНК и ее взаимодействие с белками-шаперонами.[88]



**Рисунок 19.** Флуоресцентные аминокислота и нуклеозид для визуализации взаимодействия биомолекул.

Достаточно интересен пример с простым, но в то же время весьма чувствительным к полярности и кислотности среды красителем **I.35** (Рисунок 20).[89] Данное соединение имеет длинноволновые максимумы абсорбции и эмиссии, высокие фотостабильность и водорастворимость. Это соединение позволило авторам работы исследовать изменение внутриклеточной полярности клеток HeLa в процессе апоптоза.

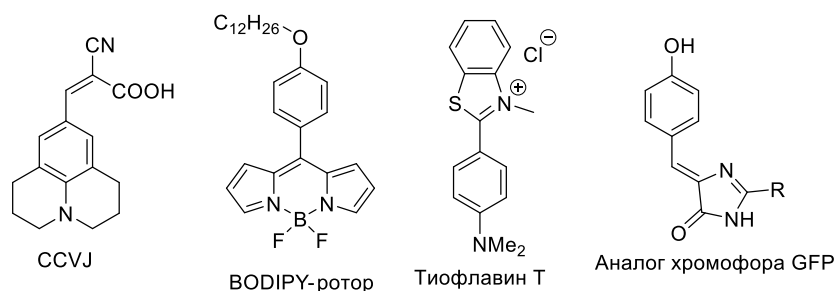


**Рисунок 20.** Пример флуоресцентного красителя с равновесием кето- и енольных форм.

#### 2.2.4. Сольватохромные флуоресцентные красители с конформационной изомеризацией

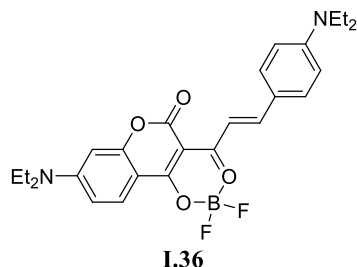
Вращение фрагментов молекулы красителя, разрушающее единую сопряженную  $\pi$ -систему, является причиной безызлучательной релаксации. Одним из препятствий для подобного процесса является использование более вязких растворителей или сред. Соединения, для которых характерно подобное вращение фрагментов, называют молекулярными роторами. Представителями флуоресцентных красителей, для которых явно выражен конформационный сольватохромизм, являются например CCVJ и его аналоги,[90] тиофлавин T,[91] BODIPY

красители с ароматическими заместителями [92] и, конечно, производные хромофора GFP (Рисунок 21).[93,94]



**Рисунок 21.** Основные молекулярные роторы.

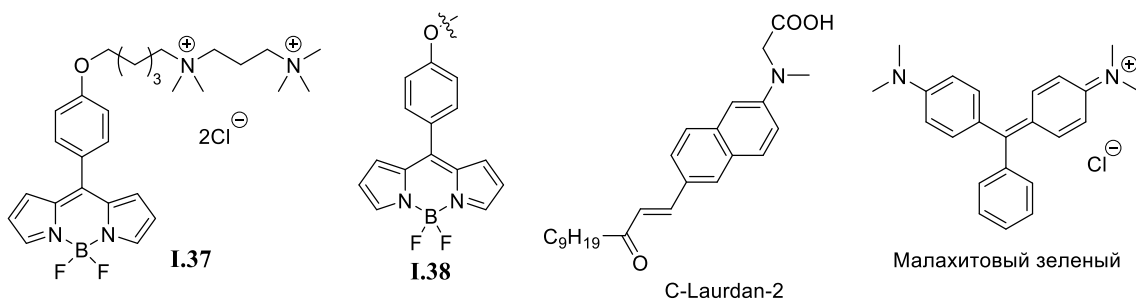
Обычно молекулярные роторы являются полярными молекулами, а потому имеют низкую флуоресценцию в полярных протонных средах.[16] Достаточно новым примером исключения из этих правил является борсодержащее соединение **I.36**, которое проявляет высокую длинноволновую флуоресценцию в вязкой среде глицерина, однако практически не флуоресцирует в воде, а также обладает высокой фотостабильностью и значительной экстинкцией. (Рисунок 22). Модифицированный аналог данного соединения был эффективно использован для мечения окситоциновых рецепторов. Фоновый сигнал практически отсутствовал.[95]



**Рисунок 22.** Флуоресцентный краситель-ротор DXB Red.

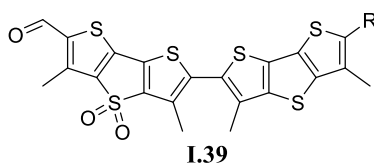
Как и вышеприведенное соединение, большинство молекулярных роторов используются для визуализации вязкости в полярных мембранах.[90,92] Так, производное BODIPY-ротора с длинным гидрофильным алифатическим заместителем **I.37** позволяет определять вязкость внутриклеточных мембран (Рисунок 23).[96] Внедренный в ДНК флуоресцентный нуклеотид с BODIPY-ротором **I.38** способен изменять флуоресценцию при взаимодействии с липидами и белками.[97] Модифицированный флуоресцентный аминафталильный краситель C-Laurdan-2 позволяет визуализировать липидные рафты в мембранах благодаря различиям в вязкости и полярности.[98] Также стоит отметить, что стабилизация красителя в плоской конформации может происходить и в некоторых белках и олигонуклеотидах. Например, связывание нефлуоресцентного малахитового зеленого со специальным белком приводит к тому, что он

начинает флуоресцировать в дальнем красном и инфракрасном диапазоне.[99] Также в нашей лаборатории активно ведется работа над созданием аналогов хромофора GFP, проявляющих значительную флуоресценцию благодаря стабилизации плоской структуры соединения внутри белков.[100,101] Впрочем, данная тематика лежит вне основной области данного обзора, так как эти красители не являются в полной мере сольватохромными.



**Рисунок 23.** Флуоресцентные красители-роторы для визуализации внутриклеточных органелл.

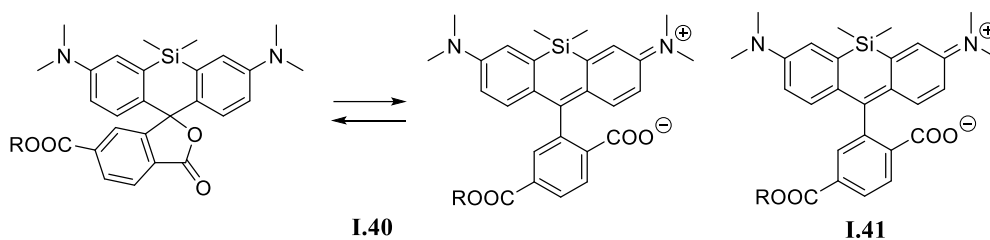
Другим классом флуоресцентных красителей, изменяющих свои оптические свойства в зависимости от конформации, являются недавно описанные димерные политиофеновые соединения **I.39** (Рисунок 24).[102] В невязких полярных средах акцепторная и донорная части молекулы оказываются в разных плоскостях из-за стерических затруднений, однако в вязких средах липидных мембран молекула становится плоской, в результате чего наблюдается значительная флуоресценция в красной части спектра. Для данных соединений зависимость от механических свойств среды столь значительна, что их стоит относить даже не к сольватохромным, а к отдельному типу механочувствительных сенсоров среды.



**Рисунок 24.** Политиофеновые флуоресцентные красители.

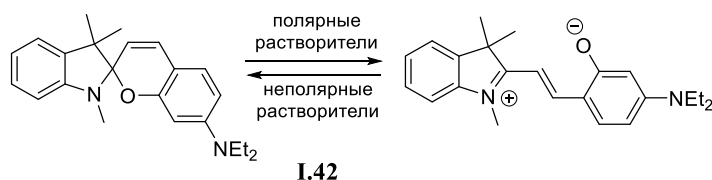
### 2.2.5. Сольватохромные флуоресцентные красители со структурной изомеризацией

Еще один важный механизм изменения флуоресценции красителя связан с обратимым изменением его структуры, в частности с исчезновением сопряжения в молекуле. Например, в родаминовых красителях с карбоксилатной группой в орто-положении фенильной группы возможно образование нефлуоресцирующего спиролактона (Рисунок 25). Данная реакция является обратимой и протекает в неполярных растворителях для большинства соединений такого ряда, однако краситель **I.41** переходит в нефлуоресцирующую форму уже в полярных средах. Данное соединение с длинноволновыми линиями поглощения и эмиссии могут быть использованы для мечения фибробластов.[103,104]



**Рисунок 25.** Кремний-родаминовые флуоресцентные красители.

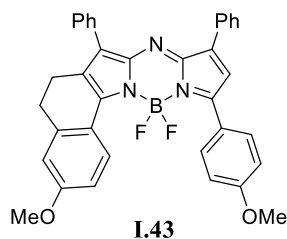
Недавно был представлен индолиновые флуоресцентные красители, один из которых изображен ниже (Рисунок 26). Соединение **I.42** может существовать как в виде сопряженного изоиндолинового цвиттер-иона, так и в виде спиропиранового производного. В результате данное соединение проявляет высокий квантовый выход флуоресценции только в полярных растворителях. Совместно с другими сольватофлуорогенными красителями данное соединение позволило авторам оригинальной работы исследовать внутриклеточную полярность в различных органеллах клеток HeLa.[105]



**Рисунок 26.** Индолиновый сенсор полярности, изменяющий внутреннюю структуру.

### 2.2.6. Сольватохромные флуоресцентные красители, способные к агрегации

Большинство красителей являются плоскими ароматическими соединениями, а значит для них свойственна тенденция образовывать нефлуоресцирующие агрегаты из-за взаимодействия  $\pi$ -орбиталей.[106] Например, гидрофобные соединения в водных условиях могут не проявлять ощутимой флуоресценции из-за образования агрегатов (aggregation-caused quenching, ACQ), тогда как в неполярных растворителях агрегаты не образуются, из-за чего флуоресценция значительно возрастает. Подобный эффект наблюдается, например, у некоторых производных хромофора GFP.[107] Агрегация может происходить как внутримолекулярно, так и межмолекулярно.

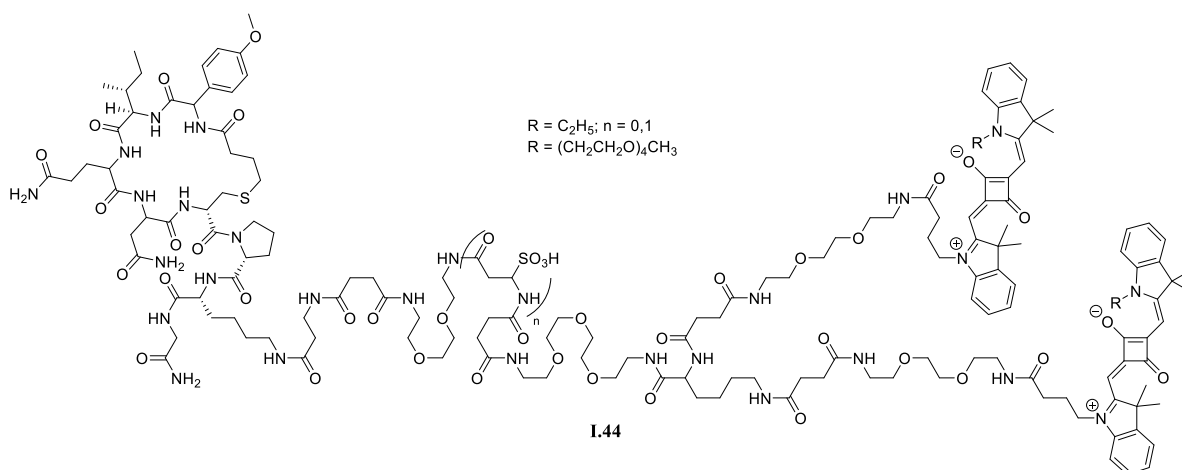


**Рисунок 27.** Образующий агрегаты в водных растворах BODIPY-флуорофор.



Выше представлен один из уже не раз упоминавшихся флуоресцентных красителей **I.43** класса BODIPY. Данное плоское сопряженное соединение проявляет свойства АСQ-флуорофора. Связываясь в внутривенными полимерными мицеллами, оно проявляет высокий квантовый выход флуоресценции, однако в окружающей водной среде не наблюдается мешающего фонового сигнала из-за образования несветящихся агрегатов.[108].

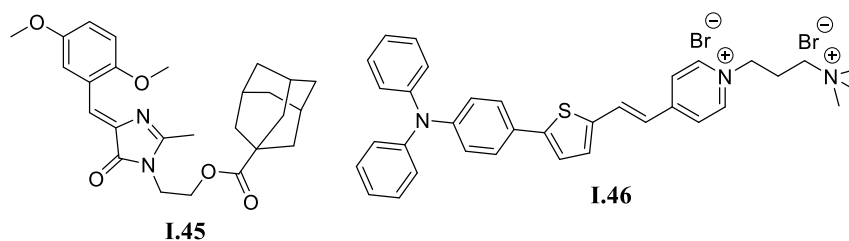
Существует целый класс флуорогенных димерных красителей для олигонуклеотидов, которые в водной среде из-за этого эффекта не флуоресцируют, а значит и не создают нежелательного фонового сигнала.[109] Количество же сенсоров полярности, использование которых основано именно на внутримолекулярной агрегации, при этом достаточно невелико. В одной из работ приводится серия димерных производных квадратной кислоты и карбетона, предназначенных для связывания с рецепторами окситоцина **I.44** (Рисунок 28). Данные соединения продемонстрировали значительное увеличение флуоресценции при уменьшении полярности.[110]



**Рисунок 28.** Склонные к агрегации сольватохромные флуоресцентные красители.

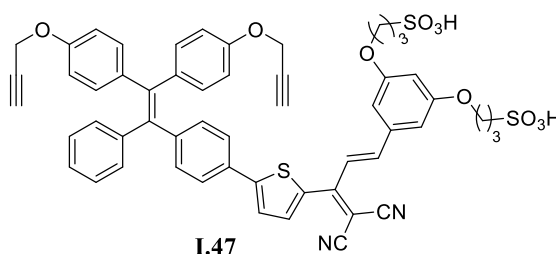
Не всегда агрегация молекул красителя приводит к гашению флуоресценции. В последние два десятка лет достаточно интенсивно исследуется тема так называемых АИЕ (aggregation-induced emission) флуорофоров, которые многократно увеличивают квантовый выход флуоресценции именно из-за образования межмолекулярных агрегатов.[111] Причины у этого явления в целом те же, что и у сольватохромизма. Это может быть перенос заряда или протона, изменение конфигурации или конформации соединения в агрегатах. Соединения с такими оптическими свойствами не раз эффективно использовались и в мечении биологических объектов. Проникая в исследуемую органеллу, АИЕ-флуорофоры образуют флуоресцирующие межмолекулярные агрегаты.[112] Например, производное хромофора зеленого

флуоресцентного белка с адамантильным заместителем **I.45** (Рисунок 29) окрашивает клетки MCF-5 благодаря образованию наноразмерных кластеров.



**Рисунок 29.** АIE-флуорофоры.

Водорастворимый тиофеновый флуорофор **I.46** демонстрирует высокий квантовый выход флуоресценции, проникая и образуя агрегаты в плазматических мембранах клеток HeLa, что позволяет исследовать их апоптоз и некроз.[113]



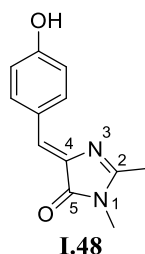
**Рисунок 30.** Тиофенсодержащий АIE флуорофор.

Водорастворимый флуорофор **I.47** (Рисунок 30) также может эффективно применяться для окрашивания плазматической мембраны клеток HeLa и MDA-MB-231, проявляя флуоресценцию в красном и инфракрасном диапазоне длин волн. Более того, данное соединение под воздействием видимого света (400-700 нм) способствует генерации активных форм кислорода, что позволяет также применять его для целенаправленного уничтожения раковых клеток.[114]

В завершение данного раздела хотелось бы заметить, что огромное количество описанных в литературе флуоресцентных красителей, применяемых для визуализации биологических процессов, скорее всего также можно было бы отнести к сенсорам полярности. Однако исследователи обычно ставят перед собой задачу изучить протекающие в живых клетках биопроцессы, тогда как изучение причин работоспособности того или иного флуорофора является достаточно кропотливой и в то же время совершенно необязательной задачей.

### 2.3. Методы синтеза аналогов хромофора GFP

4-(4-гидроксибензилиден)-1H-имидазол-5(4H)-он **I.48** является основой хромофоров большого семейства зеленых флуоресцентных белков (Рисунок 31).[115] В биофлуоресцентных методах анализа нашли свое применение не только сами белки, но и небольшие молекулы, содержащие в своем составе аналоги хромофора GFP.[94,116]

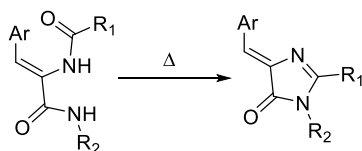


**Рисунок 31.** Хромофор зеленого флуоресцентного белка.

В литературе описано большое число различных методов синтеза бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов и их аналогов. Каждая из предложенных синтетических процедур имеет свои достоинства и недостатки, какого-то универсального подхода не существует. Рассмотрим основные методы синтеза аналогов хромофора GFP.

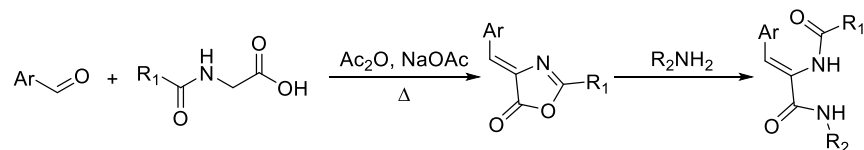
#### 2.3.1. Синтез с использованием амидов N-ацилдегидроаминокислот

Одним из классических методов получения аналогов хромофора GFP является конденсация амидов N-ацилдегидроаминокислот (Рисунок 32). Данная реакция легко протекает при нагревании, иногда требуется наличие основания.



**Рисунок 32.** Конденсация амидов N-ацилдегидроаминокислот.

Обычно данные амиды синтезируют с помощью раскрытия соответствующих оксазолоновых производных амином  $R_2NH_2$ . Реакция обычно проводится при комнатной температуре в спиртах,[117,118] если требуется провести реакцию со слабонуклеофильным анилином, то для катализа процесса достаточно наличия уксусной кислоты.[119] Сами оксазолонны же могут быть получены в результате реакции Эрленмейера (Рисунок 33).[120]

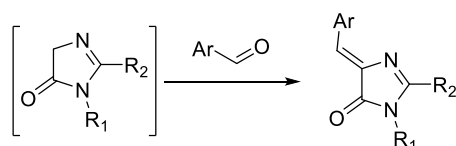


**Рисунок 33.** Синтез амидов N-ацилдегидроаминокислот через оксазолонны.

Данная синтетическая цепочка реакций очень часто применяется для синтеза бензилиденимидазолонов, позволяя получать целевые соединения с достаточно высокими выходами.[121,122] К недостаткам данного метода можно отнести его относительную трудоемкость, а также возможность протекания побочных процессов в жестких условиях синтеза оксазолонов и конденсации амидов N-ацилдегидроаминокислот.

### 2.3.2. Конденсация 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с карбонильными соединениями

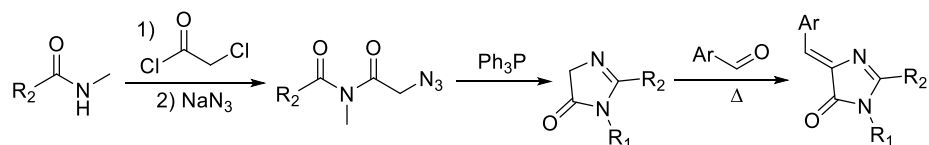
Достаточно эффективным методом синтеза бензилиденимидазолонов является конденсация ариальдегидов с насыщенными 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онами (Рисунок 34).



**Рисунок 34.** Конденсация ариальдегидов с насыщенными имидазолонами.

Исходные имидазолы являются неустойчивыми соединениями, склонными к полимеризации. Поэтому их почти всегда не выделяют, а сразу после осуществления синтеза добавляют в реакционную смесь карбонильное соединение.

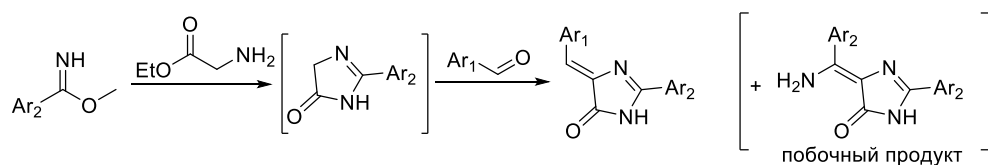
Одним из самых популярных методов синтеза насыщенных имидазолонов является использование имидов азидоуксусной кислоты (Рисунок 35).



**Рисунок 35.** Получение имидазолонов с использованием имидов азидоуксусной кислоты.

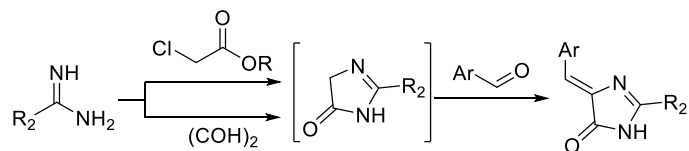
Данный подход позволяет получать целевые соединения с высоким выходом и легко варьировать заместители имидазольного кольца, хотя и является относительно трудоемким.[123,124]

Также в литературе описан метод получения насыщенных имидазолонов в результате взаимодействия имидатов с эфирами глицина (Рисунок 36).[125] Однако данный подход осложнен побочной реакцией между имидазолоном и исходным имидатом, а потому применяется достаточно редко.



**Рисунок 36.** Синтез имидазолонов с использованием имидатов и эфиров глицина.

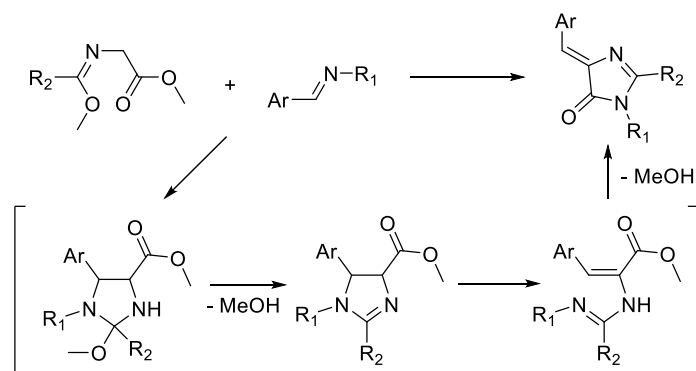
Стоит упомянуть похожий подход к синтезу насыщенных имидазолонов, основанный на взаимодействии амидинов с глиоксалем или эфирами хлоруксусной кислоты (Рисунок 37).[126–128] Данные методы демонстрируют относительно высокие выходы только при использовании ароматических амидинов.



**Рисунок 37.** Синтез имидазолонов с использованием амидинов.

### 2.3.3. Синтез с использованием иминов и иминоэфиров

Очень необычным, но эффективным методом синтеза аналогов хромофора GFP является реакция [3+2] циклоприсоединения иминов и иминоэфиров (Рисунок 38).[129,130]

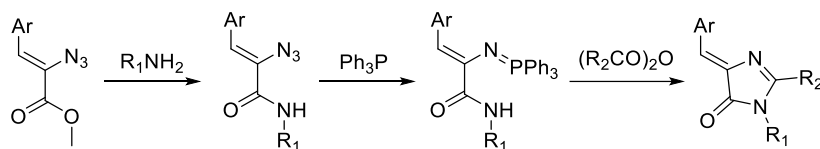


**Рисунок 38.** Реакция иминов и иминоэфиров, а также предполагаемый механизм превращения.

Данная реакция протекает без растворителя при комнатной температуре и зачастую с очень высокими выходами. Синтез иминов из альдегидов и первичных аминов также является очень простой в исполнении реакцией и зачастую протекает при комнатной температуре с близкими к количественным выходами. Поэтому можно смело заявить, что данный метод получения бензилиденимидазолонов является самым эффективным в плане трудозатрат.[100] Однако у него имеются два недостатка – не все иминоэфиры являются доступными реактивами, а кроме того некоторые имины не могут быть получены. Например, если арильный заместитель имеет функциональную группу, вступающую в реакцию с первичными аминами быстрее, чем альдегидная.

### 2.3.4. Прочие методы синтеза

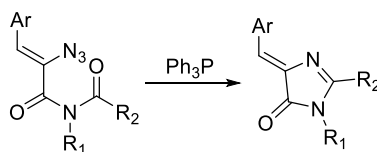
Среди менее распространенных методов синтеза бензилиденимидазолонов в первую очередь стоит обратить внимание на применение производных азидокоричных кислот (Рисунок 39).[131,132]



**Рисунок 39.** Получение бензилиденимидазолонов из азидокоричных кислот.

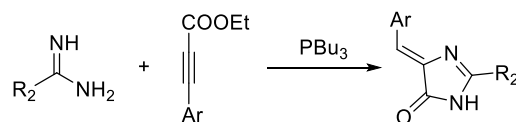
Данный метод позволяет получить целевые продукты с достаточно высоким выходом, а промежуточные реакции не требуют больших трудозатрат.

В похожую реакцию могут вступать и имиды азидокоричных кислот (Рисунок 40). При их обработке фосфином происходит внутримолекулярная конденсация и образование искомого бензилиденимидазолона.[132]



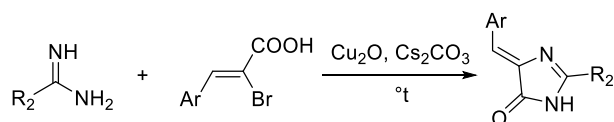
**Рисунок 40.** Синтез бензилиденимидазолонов из имидов азидоуксусной кислоты.

Также стоит упомянуть несколько реакций образования бензилиденимидазолонов, исходным компонентом которых выступают уже упоминавшиеся выше амидинаты. Так, в результате их катализируемого трибутилфосфином взаимодействия с замещенными эфирами ацетиленкарбоновой кислоты могут быть получены искомые аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка (Рисунок 41).[133]



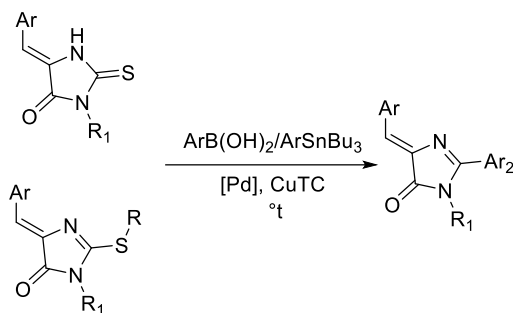
**Рисунок 41.** Взаимодействие амидината и производного ацетиленкарбоновой кислоты.

Схожая реакция протекает и при катализируемом оксидом меди (I) взаимодействии амидинатов с производными бромкоричной кислоты (Рисунок 42).[134]



**Рисунок 42.** Реакция амидината с бромкоричной кислотой.

Также достойным упоминания методом синтеза бензилиденимидазолонов является катализируемое комплексами палладия арилирование тиогидантоинов и их алкилированных аналогов (Рисунок 43).[135,136] Данный подход позволяет ввести во второе положение имидазолонового кольца арильные и гетарильные заместители, которые иными методами ввести было бы затруднительно.



**Рисунок 43.** Каталитическое арилирование тиогидантоинов.

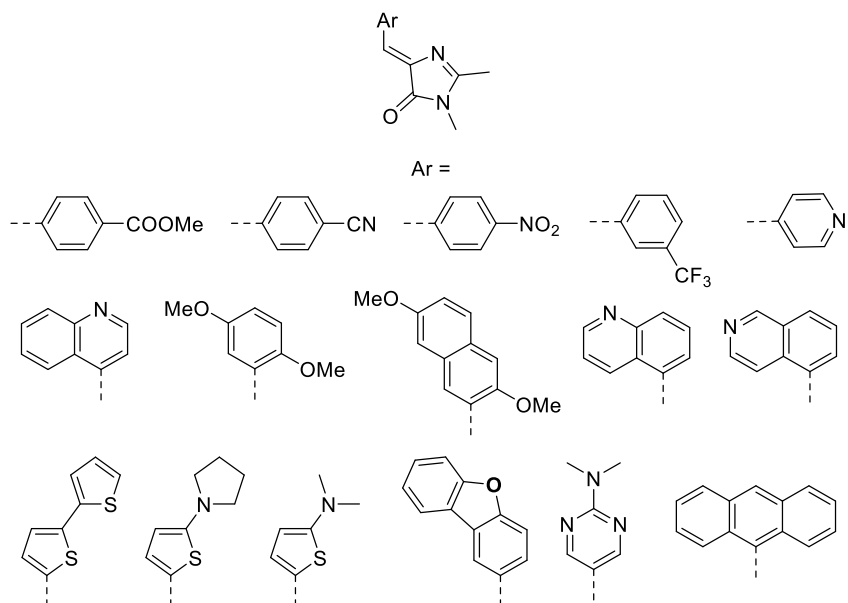
Конечно, данным списком методов синтеза не исчерпываются все подходы к получению бензилиденимидазолонов, однако неописанные в данном обзоре методы являются экзотическими и редко находят применение при получении имидазолонов.

### 3. Обсуждение результатов

Основой флуоресцентных белков семейства GFP являются хромофоры, образующиеся из аминокислотных остатков и имеющих в основе структуру бензилиденимидазолон. В свободном от белка виде такие вещества практически не флуоресцируют из-за возможностей конформационной релаксации энергии возбуждения. Тем не менее в литературе описано несколько родственных веществ, которые слабо флуоресцируют в полярных и протонных средах, однако демонстрируют заметную эмиссию в более липофильном окружении, среди которых можно отметить пара-акцепторные производные.[121,137,138]

В данной работе мы решили систематически изучить возможные модификации бензилиденимидазолонов, которые также приводили бы к увеличению их квантового выхода флуоресценции в том или ином окружении.

В первой части работы нами был создан ряд аналогов хромофора GFP с различными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Синтез такого набора веществ позволил изучить влияние заместителей на оптические свойства (Рисунок 44).

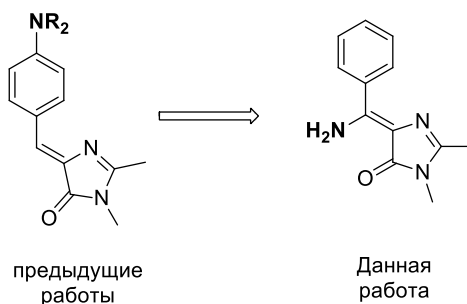


**Рисунок 44.** Предполагаемые флуорофоры на основе аналога хромофора GFP.

Известно, что стандартные аналоги хромофора GFP обладают достаточно коротковолновыми максимумами поглощения и испускания, что ограничивает область их применения в биологических исследованиях. Поэтому вторую часть нашей работы мы посвятили поиску новых путей модификации молекулы бензилиденимидазолон, способных сместить максимумы абсорбции и эмиссии в длинноволновую область с сохранением сольватохромных и флуоресцентных свойств. Известно, что введение аминогруппы в

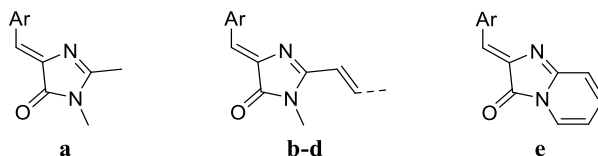


бензилиденный фрагмент приводит к значительному батохромному сдвигу. [100] Мы решили изучить возможность синтеза 5-аминометиленимидазолонов, в которых данная донорная группа располагалась бы у метинового атома углерода. (Рисунок 45).



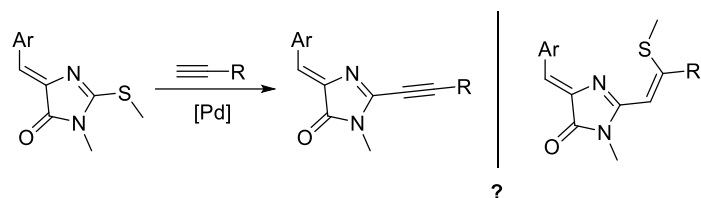
**Рисунок 45.** Введение аминогруппы при кратной экзо-связи.

Также был создан ряд производных с расширенной системой кратных связей **b-d**, являющиеся аналогами хромофора белка *Kaede* (Рисунок 46) их ауриноподобных аналогов **e**.



**Рисунок 46.** Общая структура исследуемых флуорофоров с расширенной системой кратных связей.

Кроме того, мы решили исследовать возможности получения аналогов хромофора *Kaede*, содержащих не двойную, а тройную связь во втором положении имидазолонового цикла. В качестве исходных веществ мы использовали синтетически доступные 2-метилсульфанил-4-бензилиденимидазолы. Сейчас появилось достаточно большое число работ, посвященных взаимодействию алкилсульфанильных производных с различными субстратами в условиях металлорганического катализа, [139] однако ранее никто не проводил реакцию кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами. На основании литературных данных возможно протекание двух реакций – либо замещение SMe группы и образование ацетиленового аналога хромофора белка *Kaede*, [140,141] либо же присоединение ацетилена и образование такого же хромофора с атомом серы при двойной связи (Рисунок 47). [142,143] Оба варианта модификации приводят к увеличению размера системы сопряженных связей и могут приводить к смещению спектральных максимумов в длинноволновую область.



**Рисунок 47.** Возможные продукты реакции 2-метилсульфанилимидазолонов с ацетиленами.

Также на втором этапе нами были первично изучены оптические и иные физико-химические свойства полученных веществ.

Третью часть нашей работы мы посвятили более подробному исследованию оптических свойств наиболее перспективных соединений, их сравнению друг с другом и выявлению перспективных флуорогенов, потенциально пригодных для меченья живых систем. Четвертая же часть данной работы посвящена исследованию нашими коллегами возможностей применения новых сольватохромных флуорогенов в качестве флуоресцентных меток различных органелл.

### 3.1. Синтез и исследование производных хромофора GFP - изучение влияния заместителей в бензилиденовом фрагменте

В качестве основной методики синтеза 2-метил-4-бензилиденимидазолонов мы использовали ставший уже классическим подход, основанный на [3+2] циклоприсоединении арилиминов и иминоэфиров (Рисунок 48). В качестве бензилиденового заместителя мы выбрали несколько групп радикалов – фенильные заместители с акцептором (**II.1-4a**), азотсодержащие гетероциклы (**II.5, II.6a, II.9a, II.10a, II.15a**), тиофенсодержащие гетероциклы (**II.11a-13a**), сопряженные ароматические системы с кислородным мостиком (**II.6a, II.7a, II.14a**) и антраценовый заместитель (**II.16a**).

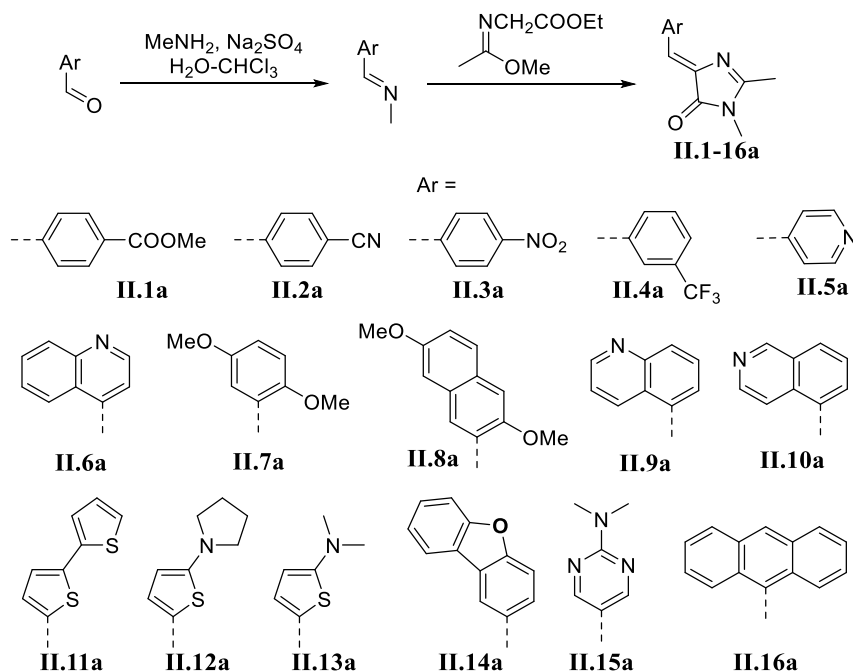


Рисунок 48. Синтез 2-метил-4-бензилиденимидазолонов **II.1-16a**.

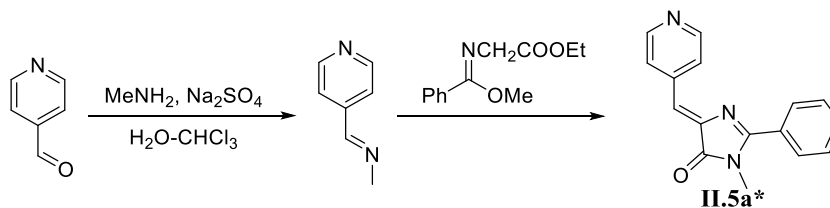
Соединения были получены с хорошими выходами (Таблица 1) и представляли собой желтые, стабильные на воздухе порошки.

Таблица 1. Выходы синтезированных соединений **II.1-16a**.

Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>II.1a</b>	48%	<b>II.5a</b>	73%	<b>II.9a</b>	34%	<b>II.13a</b>	20%
<b>II.2a</b>	79%	<b>II.6a</b>	85%	<b>II.10a</b>	42%	<b>II.14a</b>	67%
<b>II.3a</b>	69%	<b>II.7a</b>	78%	<b>II.11a</b>	38%	<b>II.15a</b>	73%
<b>II.4a</b>	81%	<b>II.8a</b>	73%	<b>II.12a</b>	35%	<b>II.16a</b>	37%

Кроме того, было синтезировано и 2-фенилпроизводное **II.5a\*** из 4-пиридинового альдегида по аналогичной методике с выходом 65% (Рисунок 49). Продукт также представлял

собой желтый порошок. Известно, что введение фенильного заместителя во второе положение имидазолон приводит к заметному батохромному сдвигу.[144]



**Рисунок 49.** Синтез 2-фенильного соединения **II.5a\***.

Оптические свойства растворов всех синтезированных соединений в ацетонитриле представлены ниже (Таблица 2).

**Таблица 2.** Оптические свойства полученных имидазолонов в ацетонитриле.

Соединение	Абсорбция, нм	Эмиссия, нм	КВФ, %
<b>II.1a</b>	364	450	6.4
<b>II.2a</b>	365	454	6.0
<b>II.3a</b>	382	528	2.7
<b>II.4a</b>	353	435	1.8
<b>II.5a</b>	356	452	4.7
<b>II.5a*</b>	377	475	4.8
<b>II.6a</b>	377	462	0.2
<b>II.7a</b>	392	499	6.6
<b>II.8a</b>	371	545	8.4
<b>II.9a</b>	362	~450	<<0.1
<b>II.10a</b>	360	~450	<<0.1
<b>II.11a</b>	416	440	<0.1
<b>II.12a</b>	469	520	<0.1
<b>II.13a</b>	460	515	<0.1
<b>II.14a</b>	364	430	<0.1
<b>II.15a</b>	387	450	<0.1
<b>II.16a</b>	389	436	<0.1

Как видно из вышеприведенных данных, часть предложенных нами соединений проявляет очень слабую флуоресценцию в видимом диапазоне, в случае **II.9-10a** эмиссия оказалась столь невелика, что точно определить положение максимума испускания оказалось затруднительно. В итоге для дальнейших исследований мы отбросили соединения **II.9-16a**.

## 3.2. Модификация бензилиденимидазолонов

### 3.2.1 Синтез и исследование 5-аминометиленимидазолонов

Среди основных методов синтеза бензилиденимидазолонов важное место занимает реакция конденсации ароматических альдегидов с имидазолонами. Также известно, что имидаты могут вступать в реакцию конденсации с похожими субстратами, например с малоновыми эфирами. Потому для синтеза 5-аминометиленимидазолонов мы решили объединить оба этих подхода (Рисунок 50).

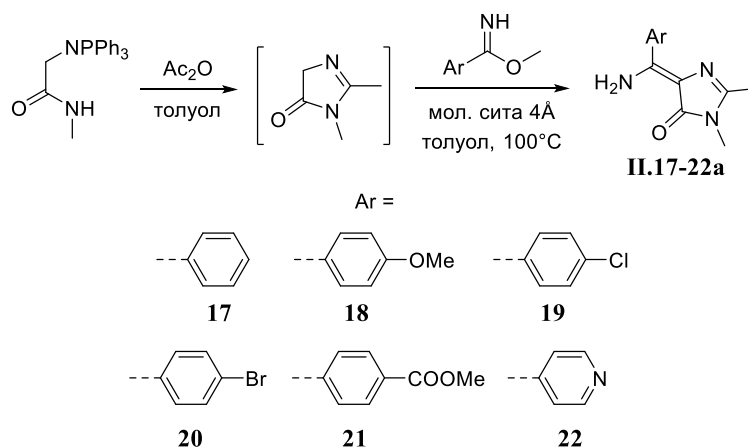


Рисунок 50. Синтез 5-аминометиленимидазолонов.

В результате нами была синтезирована серия новых соединений с умеренными выходами (Таблица 3), которые представляли собой желтые стабильные на воздухе порошки. Главной трудностью получения этих веществ стало образование большого количества примесных соединений, так как в условиях реакции имидат и имидазолон являются нестабильными и реакционноспособными, из-за чего образуется значительное количество трудноидентифицируемых компонентов.

Таблица 3. Выходы 5-аминометиленимидазолонов.

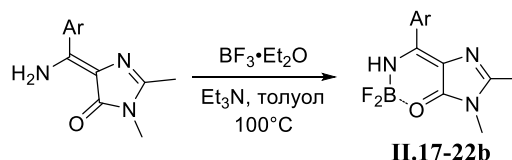
Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>II.17a</b>	15%	<b>II.19a</b>	14%	<b>II.21a</b>	8%
<b>II.18a</b>	14%	<b>II.20a</b>	10%	<b>II.22a</b>	8%

На следующем этапе мы исследовали оптические свойства 5-аминометиленимидазолонов (Таблица 4). Оказалось, что максимумы абсорбции и эмиссии данных соединений лежат в коротковолновой области. Флуоресценция полученных веществ также оказалась очень слабой во всех средах, что связано со стерическими препятствиями, создаваемыми аминогруппой, из-за чего молекула вещества не может принять плоскую форму.

**Таблица 4.** Оптические свойства 5-аминометиленимидазолонов в ацетонитриле.

Соединение	Абсорбция, нм	Эмиссия, нм	КВФ, %
<b>П.17a</b>	356 (9)	400	<0.1
<b>П.18a</b>	360 (12)	413	<0.1
<b>П.19a</b>	363 (10)	385	<0.1
<b>П.20a</b>	363 (9)	387	<0.1
<b>П.21a</b>	379 (8)	410	<0.1
<b>П.22a</b>	373 (7)	400	<0.1

Для перевода созданных веществ в планарную форму и увеличения их КВФ нами была предпринята попытка введения в эти молекулы дифторборильного мостика. Для его внедрения мы использовали эфират трехфтористого бора в присутствии основания при нагревании (Рисунок 51).

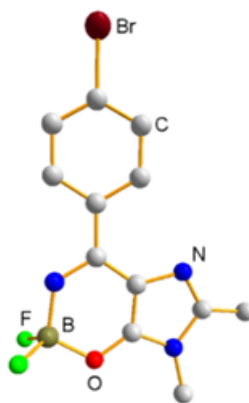
**Рисунок 51.** Синтез борированных 5-аминометиленимидазолонов.

В результате нами с хорошими выходами была получена серия новых соединений (Таблица 5). Продукты представляли собой устойчивые на воздухе желтые порошки. Стоит отметить, что используемая методика позволяет вводить в реакцию соединения с лабильными группами, тогда как введение дифторборильного мостика по атому углерода, предложенное ранее в нашей лаборатории, [1,148] достигалось в результате воздействия агрессивным трибромидом бора, зачастую при нагревании.

**Таблица 5.** Выходы борированных 5-аминометиленимидазолонов.

Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>П.17b</b>	69%	<b>П.19b</b>	34%	<b>П.21b</b>	63%
<b>П.18b</b>	35%	<b>П.20b</b>	48%	<b>П.22b</b>	24%

Структура соединения **П.20b** также была однозначно подтверждена методом рентгеноструктурного анализа (Рисунок 52).



**Рисунок 52.** Структура соединения **II.20b** на основании данных РСА.

Оптические свойства новых борированных соединений в различных растворителях представлены в таблице 6.

**Таблица 6.** Оптические свойства соединений **II.17b-22b** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.17b</b>	Абс.	338 <sup>1</sup> (11 <sup>2</sup> )	341 (10)	348 (11)	352 (10)	351 (11)
	Эм.	470	472	480	470	460
<b>II.18b</b>	Абс.	343 (14)	343 (12)	352 (14)	353 (12)	351 (13)
	Эм.	468	460	468	461	456
<b>II.19b</b>	Абс.	346 (11)	349 (10)	353 (10)	360 (9)	355 (10)
	Эм.	481	483	490	470	431
<b>II.20b</b>	Абс.	346 (11)	350 (8)	353 (9)	361 (10)	361 (9)
	Эм.	481	490	490	470	431
<b>II.21b</b>	Абс.	349 (9)	359 (7)	365 (8)	372 (7)	368 (7)
	Эм.	-*	517	521	466	430
<b>II.22b</b>	Абс.	348 (7)	361 (7)	362 (7)	370 (7)	370 (6)
	Эм.	-*	-*	505	465	430

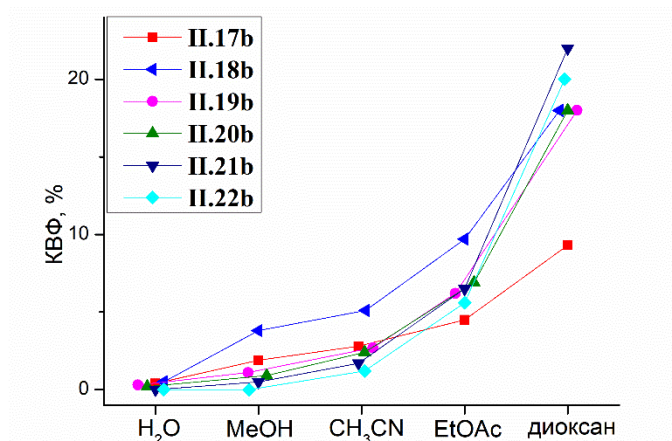
\* нет флуоресценции.

Полученные значения показывают, что для борированных 5-аминометиленимидазолонов характерен достаточно интересный сольватохромизм. В то время как положение максимумов абсорбции практически не менялось при переходе от одного растворителя к другому, максимумы эмиссии смещались более значительно. Также стоит обратить внимание на большие Стоксовы сдвиги полученных производных, превышающие в некоторых случаях 150 нм. Подобное поведение было объяснено нашими коллегами из лаборатории квантовой фотодинамики кафедры физической химии химического факультета МГУ, которые с помощью

<sup>1</sup> Здесь и далее указаны максимумы абсорбции и эмиссии в нм

<sup>2</sup> Здесь и далее в скобках указан коэффициент молярной экстинкции  $M^{-1} \times cm^{-1} \times 10^{-3}$

квантово-механических расчетов показали, что в возбужденном состоянии у этих соединений происходит сильное изменение геометрии и перераспределение заряда, которое лучше происходит в более полярных средах. Кроме того, нами были измерены и квантовые выходы флуоресценции всех соединений **II.17b-22b** (Рисунок 53).



**Рисунок 53.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.17b-22b** в различных растворителях.

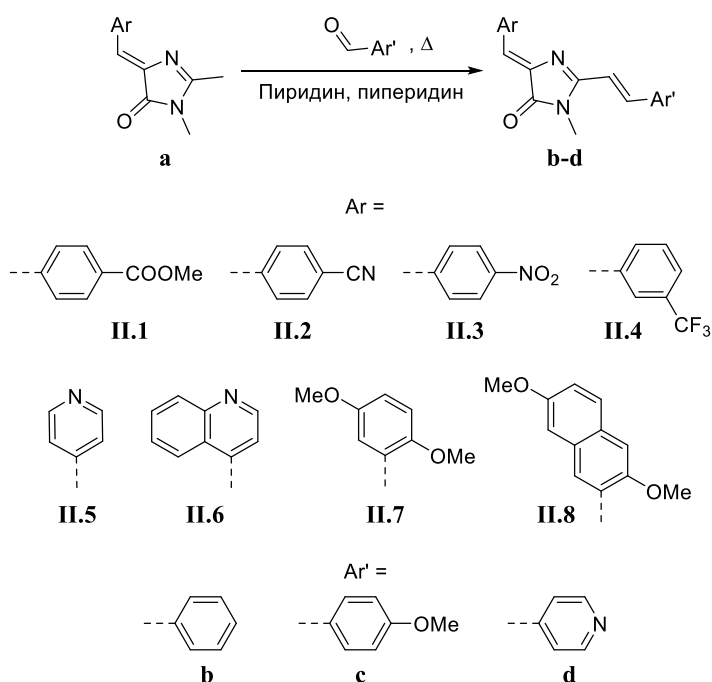
Как видно из полученных данных, стабилизация плоского состояния молекулы приводит к многократному увеличению интенсивности флуоресценции. Большой эффект на флуоресценцию оказывает не только бензилиденный заместитель, но и растворитель. Тот факт, что в воде борированные 5-аминометиленимидазолы практически не флуоресцируют, позволяют полагать, что в живых клетках при использовании в качестве флуоресцентной метки они не будут создавать фонового сигнала.

Однако, к сожалению, все новые соединения хоть и показали достаточно интересные оптические свойства, их применение для биологических исследований является малоперспективным. Причиной этому является тот факт, что введение аминогруппы в метиленовый фрагмент, связывающий арил и имидазолон, не привело к заметному смещению в длинноволновую область абсорбции относительно аналогичных производных GFP, тогда как ранее было показано, что введение аминогруппы в арильный фрагмент приводит к огромному батохромному сдвигу.[148] Более того, введение борного мостика смещает максимум абсорбции в еще более коротковолновую область, что потребовало бы при визуализации биологического процесса применять фототоксичное излучение.



### 3.2.2. Синтез аналогов хромофора белка *Kaede*

Самым распространенным и простым подходом для синтеза аналогов хромофора белка *Kaede* является конденсация альдегидов с соответствующими 2-метилбензилиденимидазолонами. Благодаря этому несложно создавать огромные библиотеки новых соединений, подбирая затем удовлетворяющие поставленным задачам. Реакцию их синтеза проводят при нагревании либо с участием эквивалентных количеств хлорида цинка в апротонных растворителях (ТГФ, диоксан), [145] либо же просто в пиридине. [146] Наши эксперименты показали, что хотя при кипячении исходных компонентов в пиридине с добавлением каталитических количеств пиперидина реакция протекает дольше (до 24 ч), чем при использовании хлорида цинка (обычно не более 1 ч), при этом образуется гораздо меньше побочных продуктов. В качестве альдегидов для создания стирильного заместителя мы выбрали бензальдегид (**b**), донорный 4-метоксибензальдегид (**c**) и акцепторный гетероциклический 4-пиридинкарбальдегид (**d**) (Рисунок 54). В качестве исходных 2-метилимидазолонов были выбраны соединения **II.1a-II.8a**, так как они демонстрировали заметный разброс КВФ в различных средах.



**Рисунок 54.** Синтез аналогов хромофора белка *Kaede*.

В результате нами были успешно синтезированы 24 новых соединения с приемлемыми выходами (Таблица 7). Полученные вещества представляли собой оранжевые либо красные порошки, стабильные на воздухе и в растворах. Можно отметить, что в большинстве случаев реакция с 4-пиридинкарбальдегидом протекала с меньшим выходом, что, по всей видимости,

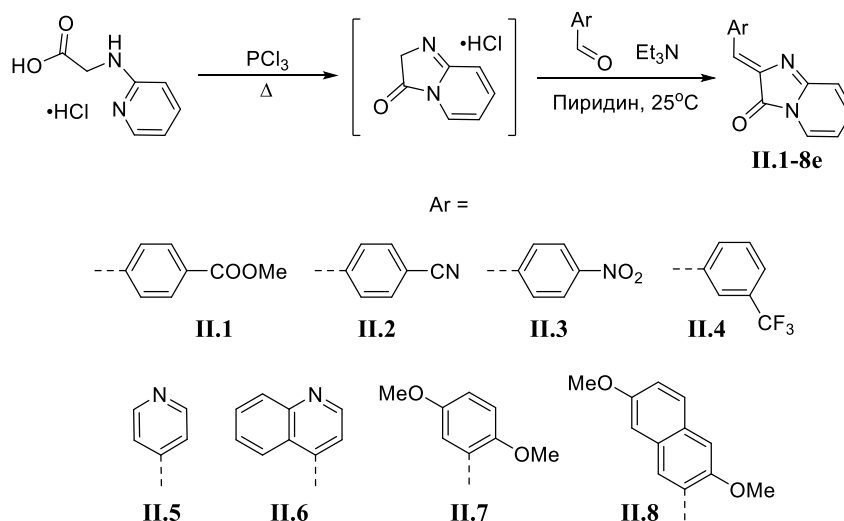
связано с его большей реакционной способностью, которая приводила к образованию побочных продуктов.

**Таблица 7.** Выходы синтезированных аналогов хромофора *Kaede*.

Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>П.1b</b>	40%	<b>П.1c</b>	39%	<b>П.1d</b>	31%
<b>П.2b</b>	30%	<b>П.2c</b>	63%	<b>П.2d</b>	29%
<b>П.3b</b>	69%	<b>П.3c</b>	86%	<b>П.3d</b>	32%
<b>П.4b</b>	46%	<b>П.4c</b>	40%	<b>П.4d</b>	33%
<b>П.5b</b>	40%	<b>П.5c</b>	25%	<b>П.5d</b>	46%
<b>П.6b</b>	82%	<b>П.6c</b>	53%	<b>П.6d</b>	16%
<b>П.7b</b>	38%	<b>П.7c</b>	60%	<b>П.7d</b>	75%
<b>П.8b</b>	62%	<b>П.8c</b>	60%	<b>П.8d</b>	31%

### 3.2.3. Синтез ауриноподобных флуорофоров

Ауриноподобные бензилиденимидазолоновые красители известны достаточно давно. В своей работе мы решили использовать одну из самых первых методик по их синтезу, заключающуюся в конденсации соответствующих альдегидов и имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-оном (Рисунок 55).[147]



**Рисунок 55.** Синтез ауриноподобных имидазолоновых флуорофоров.

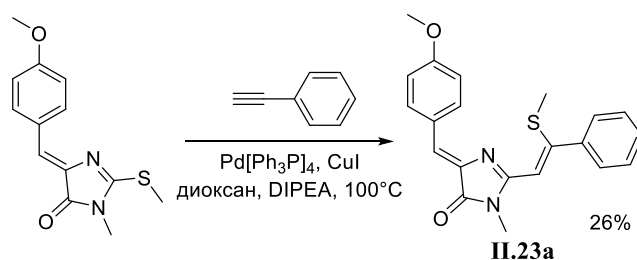
Нами успешно была синтезирована серия новых соединений с удовлетворительными выходами (Таблица 8). Все соединения представляли собой стабильные на воздухе темно-красные порошки.

**Таблица 8.** Выходы синтезированных ауриноподобных соединений **II.1-8e**.

Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>II.1e</b>	16%	<b>II.3e</b>	15%	<b>II.5e</b>	62%	<b>II.7e</b>	22%
<b>II.2e</b>	17%	<b>II.4e</b>	17%	<b>II.6e</b>	5%	<b>II.8e</b>	5%

### 3.2.4. Исследование реакции кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами

В качестве исходного соединения для исследования реакции кросс-сочетания 2-метилсульфанилимидазолонов с ацетиленами мы решили выбрать легкодоступный 5-(4-метоксибензилиден)-3-метил-2-(метилсульфанил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он. В процессе наших первичных исследований мы выяснили, что при его взаимодействии с фенилацетиленом в присутствии йодида меди и катализатора  $\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$  происходит образование аналога хромофора белка *Kaede*, при этом метилсульфанильная группа оказывается при двойной связи (Рисунок 56).



**Рисунок 56.** Взаимодействие 2-метилсульфанилимидазона с фенилацетиленом.

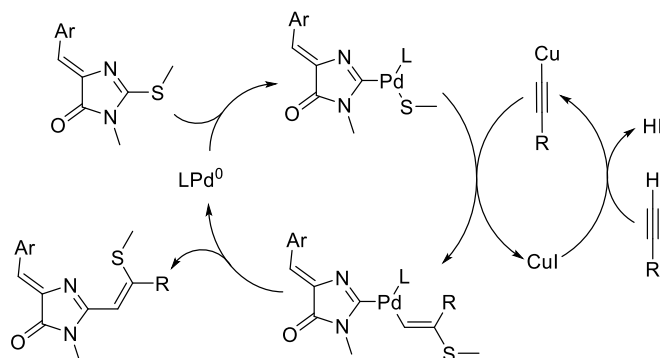
Целевой ацетиленовый продукт не наблюдался вовсе. Затем мы провели серию экспериментов по улучшению выхода продукта реакции (Таблица 9).

**Таблица 9.** Подбор условий реакции кросс-сочетания.

#	Кол-во фенилацетилена	Катализатор	Добавка	Основание	Растворитель	Выход продукта
1	1 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	диоксан	21%
2	1.5 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	диоксан	26%
3	2 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	диоксан	28%
4	2 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	-	31%
5	2 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	2 экв. $\text{CuI}$	-	-	17%
6	2 экв.	$\text{Pd}[\text{Ph}_3\text{P}]_4$	-	DIPEA	-	0%
7	2 экв.	-	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	-	0%
8	2 экв.	$\text{Pd}[\text{dppf}]\text{Cl}_2$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	-	45%
9	2 экв.	$\text{Pd}[\text{dppf}]\text{Cl}_2$	2 экв. $\text{CuI}$	DIPEA	диоксан	38%

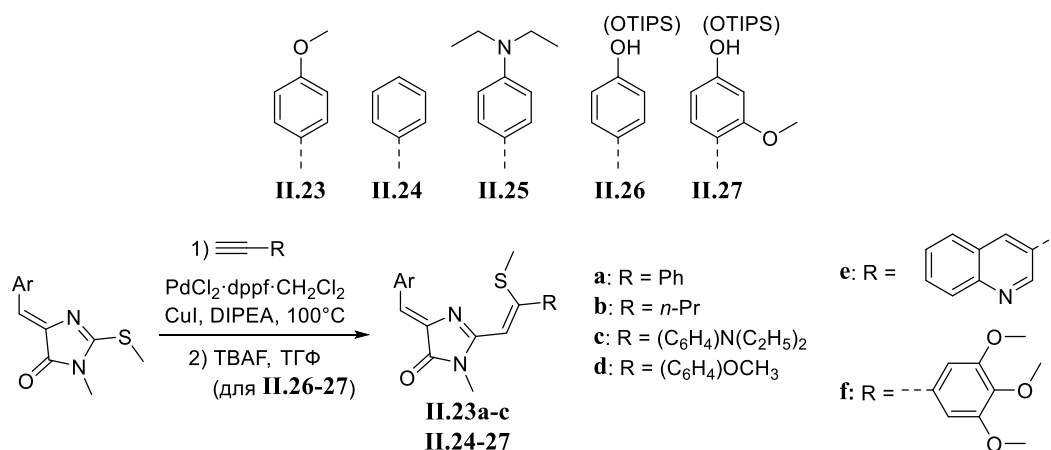
Как видно из полученных данных, оптимальным катализатором является  $\text{Pd}[\text{dppf}]\text{Cl}_2$ , при этом присутствие йодида меди и аминового основания является обязательным. Важно отметить, что в процессе реакции не наблюдалось образование метилмеркаптана, что могло бы свидетельствовать об образовании ацетиленового продукта. Исходя из этого можно предположить, что в процессе реакции не происходит последовательного отщепления

метилсульфанильной группы с ее последующим присоединением к ацетиленовому интермедиату, а происходит синхронное присоединение тиопалладиевого комплекса к ацетилениду меди (Рисунок 57).



**Рисунок 57.** Предполагаемый механизм образования метилсульфанилвинильных соединений.

Обладая полученными данными, мы решили синтезировать серию подобных соединений с различными арильными заместителями (Рисунок 58). Соединения с гидроксигруппой могут быть достаточно интересными для биологии, так как обладают повышенной гидрофильностью, однако очевидны проблемы по их введению в реакцию кросс сочетания. Поэтому предварительно гидроксигруппы были защищены триизопропилсилиловой защитой (OTIPS). После завершения реакции проводилось удаление защитной группы при помощи фторида тетрабутиламмония.



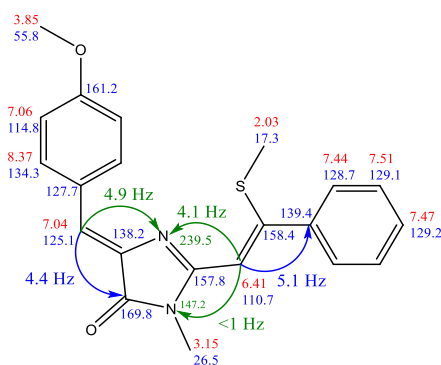
**Рисунок 58.** Полученные в результате реакции кросс-сочетания метилсульфанильные аналоги хромофора белка *Kaede*.

Мы выяснили, что соединения с донорными ацетиленами **II.23d-f** могут быть получены в процессе реакции, однако являются неустойчивыми и легко окисляются на воздухе, что не позволило нам их охарактеризовать и исследовать. Остальные вещества были выделены с неплохими выходами и представляли из себя желтые или красноватые порошки.

Таблица 10. Выходы метилсульфанильных аналогов хромофора белка *Kaede*.

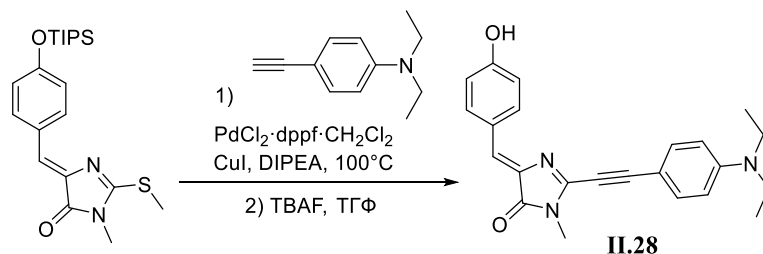
Соединение	Выход	Соединение	Выход	Соединение	Выход
<b>П.23а</b>	45%	<b>П.23с</b>	48%	<b>П.25</b>	69%
<b>П.23б</b>	63%	<b>П.24</b>	55%	<b>П.26</b>	48%

Структура полученных веществ, а также конфигурация двойных связей была дополнительно подтверждена с помощью двумерной спектроскопии ЯМР экспериментами  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC на примере соединения **П.23а** (Рисунок 59). В некоторых случаях продукты содержали небольшое количество неотделимой примеси Е-изомера (по кратной связи при атоме серы), однако ее количество редко превышало 10%. В случае **П.23а** данная примесь также была полностью охарактеризована методами ЯМР спектроскопии.



**Рисунок 59.** Результаты исследования структуры соединения **П.23а** методами гетероядерной ЯМР спектроскопии. Указаны химические сдвиги  $^1\text{H}$  (красным),  $^{13}\text{C}$  (синим),  $^{15}\text{N}$  (зеленым), важнейшие спин-спиновые взаимодействия отмечены стрелками.

Единственный случай протекания данной реакции, приводящий к образованию ацетиленового производного, наблюдался при использовании 4-диэтиламинофенилацетилен с защищенным триизопропилсилиловым метилсульфанилимидазолоном. Нами был получен ацетиленовый продукт **П.28**, а винилового производного мы не обнаружили вовсе (Рисунок 60).



**Рисунок 60.** Реакция образования ацетиленового аналога хромофора белка *Kaede*.

Причины такого явления нам не до конца ясны, так как ранее нами было получено из практически аналогичного исходного соединения продукт **П.23с**. Каким образом силиловая

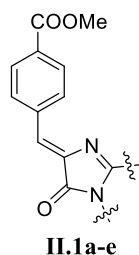
группа способна оказывать столь значительное влияние на механизм реакции предположить довольно трудно.

К сожалению, мы установили, что все эти вещества не флуоресцентны и малостабильны на воздухе и особенно в растворах. Поэтому в качестве флуоресцентных меток для биологических объектов они в дальнейшем не были исследованы.

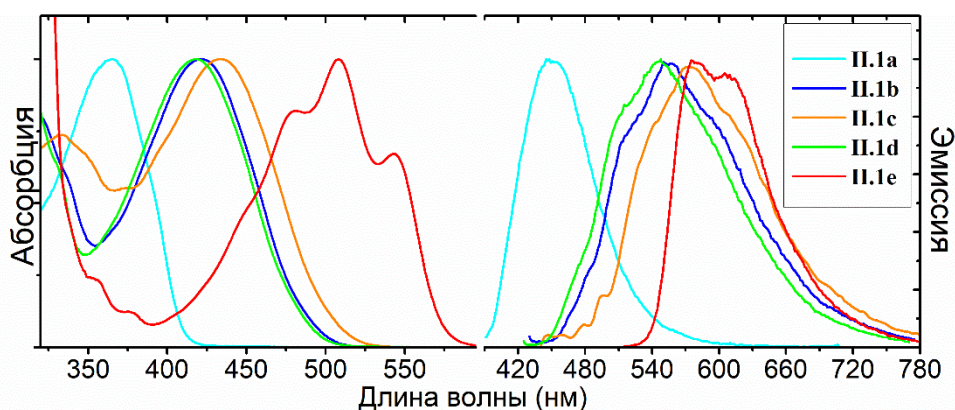
### 3.3. Исследование оптических свойств имидазолоновых флуорофоров

После предварительных исследований нами было проведено подробное изучение оптических свойств новых соединений в различных растворителях. Объектом исследования выступали показавшие заметную флуоресценцию имидазолы **II.1a-II.8a**, а также их производные **d-e**.

*Карбоксибензильные производные*



Ниже приведены нормализованные спектры поглощения и эмиссии данных соединений в ацетонитриле (Рисунок 61). Стоит обратить внимание на несколько фактов: во-первых, заметен значительный батохромный сдвиг соединений **II.1b-e** относительно исходного **II.1a**. Во-вторых, для всех соединений наблюдается большой Стоксов сдвиг, хотя для **II.1e** его значение гораздо меньше, чем для **II.1b-d**. В-третьих, абсорбция и эмиссия соединений **II.1b-e** лежат в области средне- и длинноволнового излучения, а следовательно их исследование как меток в биологических объектах не будет требовать применения разрушительного для живых клеток коротковолнового излучения.



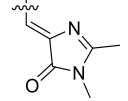
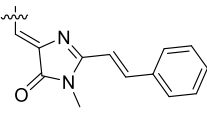
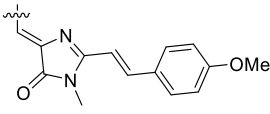
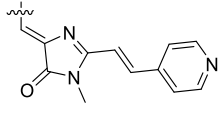
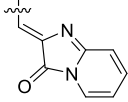
**Рисунок 61.** Нормализованные графики абсорбции и эмиссии соединений **II.1a-e** в ацетонитриле.

Эти же тенденции характерны как для этих же соединений в остальных растворителях, так и для остальных групп флуорофоров, потому дальше мы рассмотрим только основные моменты. Ниже приведены основные оптические свойства исследованных соединений. Обращает на себя внимание тенденция к увеличению длины волны эмиссии и Стоксова сдвига

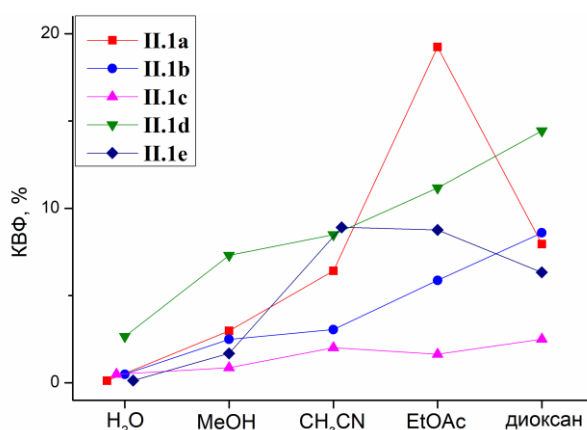


при переходе к полярным растворителям (Таблица 11). Более коротковолновые максимумы имеет пиридиновое производное **II.1d**, а наиболее длинноволновые характерны для **II.1c**.

**Таблица 11.** Оптические свойства соединений **II.1a-e** в различных растворителях.

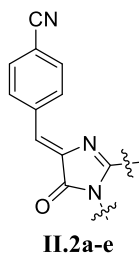
Продукт	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.1a</b> 	Абс.	355 (16)	358 (16)	364 (16)	365 (16)	367 (15)
	Эм.	464	413	450	442	438
<b>II.1b</b> 	Абс.	399 (18)	418 (17)	422 (18)	420 (17)	423 (14)
	Эм.	591	553	555	551	547
<b>II.1c</b> 	Абс.	438 (20)	433 (19)	434 (20)	431 (21)	432 (15)
	Эм.	584	568	575	568	568
<b>II.1d</b> 	Абс.	409 (12)	416 (12)	417 (12)	419 (12)	421 (9)
	Эм.	547	550	546	541	543
<b>II.1e</b> 	Абс.	495 (12)	498 (12)	508 (13)	508 (13)	511 (10)
	Эм.	608	595	580	568	566

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.1a-e** в органических растворителях оказались достаточно высокими (Рисунок 62), что нетипично для обычных нестабилизированных имидазолонов, о чем говорилось ранее. В воде же ожидаемо они оказались очень небольшими. Можно отметить, что для квантовых выходов флуоресценции соединений ряда **II.1b-d** наблюдается обратная тенденция относительно смещения максимумов абсорбции и эмиссии - наименьший квантовый выход характерен для 4-метоксипроизводного **II.1c**, тогда как наибольший - для продукта конденсации с 4-пиридинальдегидом **II.1d**.



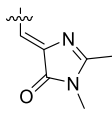
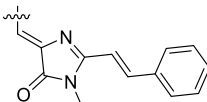
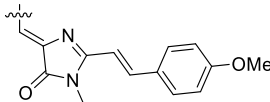
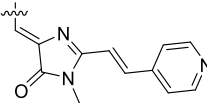
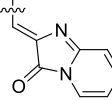
**Рисунок 62.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.1a-e** в различных растворителях.

## Нитрильные производные

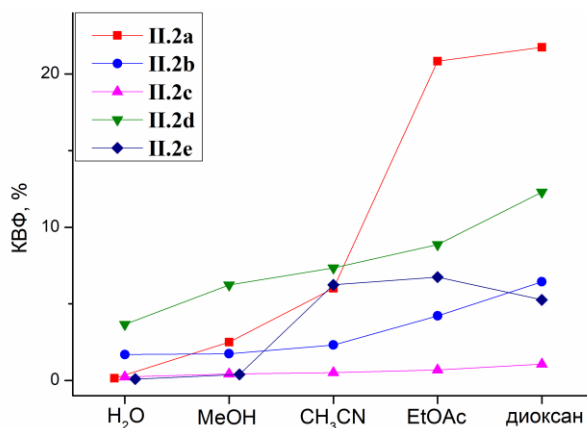


Группа производных хромофора GFP с нитрильным акцепторным заместителем в пара-положении бензилиденового фрагмента также продемонстрировала схожие с **II.1a-e** оптические свойства (Таблица 12). Заметно уменьшение сольватохромизма, что, по всей видимости, связано с меньшей поляризацией нитрильной группы.

**Таблица 12.** Оптические свойства соединений **II.2a-e** в различных растворителях.

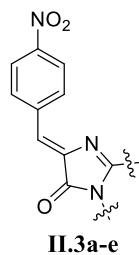
Продукт	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.2a</b> 	Абс.	355 (14)	361 (12)	365 (13)	366 (12)	
	Эм.	456	447	454	446	411
<b>II.2b</b> 	Абс.	461 (19)	423 (19)	423 (19)	422 (20)	424 (7)
	Эм.	597	558	561	554	551
<b>II.2c</b> 	Абс.	443 (21)	436 (21)	436 (21)	433 (21)	435 (12)
	Эм.	596	576	585	576	574
<b>II.2d</b> 	Абс.	409 (16)	415 (15)	418 (16)	419 (16)	420 (12)
	Эм.	547	543	547	544	514
<b>II.2e</b> 	Абс.	497 (11)	505 (11)	512 (10)	512 (11)	514 (9)
	Эм.	616	604	587	574	570

Для квантовых выходов флуоресценции этих соединений также характерно некоторое снижение разброса от растворителя к растворителю (Рисунок 63).



**Рисунок 63.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.2a-e** в различных растворителях.

## Нитро производные



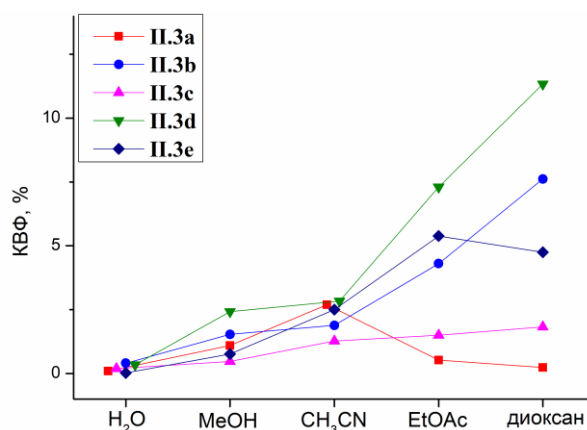
Для нитропроизводных **II.3a-e** характерен очень большой сольватхромизм и огромные Стоксовы сдвиги вплоть до 223 нм (Таблица 13). Также для них характерна плохая растворимость, особенно в воде.

**Таблица 13.** Оптические свойства соединений **II.3a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.3a</b>	Абс.	370 (16)	375 (16)	382 (15)	383 (19)	384 (16)
	Эм.	635	588	528	485	480
<b>II.3b</b>	Абс.	423 (12)	427 (12)	431 (13)	428 (13)	430 (8)
	Эм.	619	614	587	568	544
<b>II.3c</b>	Абс.	450 (23)	448 (22)	452 (24)	449 (24)	452 (11)
	Эм.	636	632	618	594	585
<b>II.3d</b>	Абс.	414 (18)	424 (17)	429 (17)	429 (18)	430 (10)
	Эм.	637	583	574	558	534
<b>II.3e</b>	Абс.	507 (-)	513 (6)	520 (3)	520 (6)	522 (4)
	Эм.	-	634	630	604	588

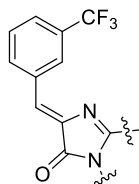
\* - слишком низкая растворимость

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.3a-e** оказались невысокими, хотя и достаточными для их использования как флуоресцентных меток (Рисунок 64).



**Рисунок 64.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.3a-e** в различных растворителях.

## Трифторметильные производные



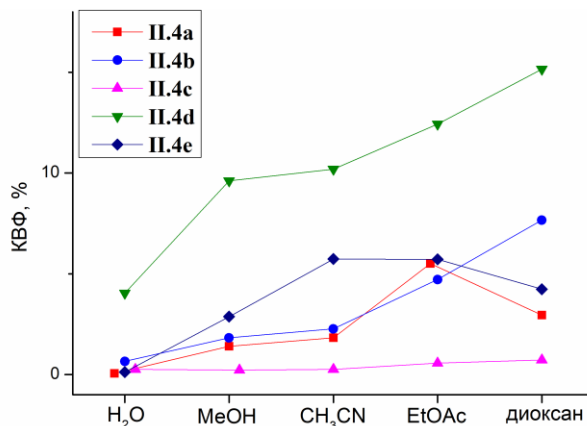
II.4a-e

Для соединений с трифторметильной группой **II.4a-e** характерны относительно коротковолновые максимумы абсорбции и эмиссии, а также не слишком ярко выраженный сольватохромизм (Таблица 14). Однако Стоксовы сдвиги оказались достаточно велики.

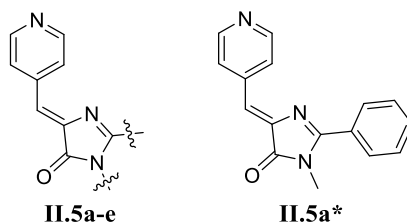
Таблица 14. Оптические свойства соединений **II.4a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан
<b>II.4a</b>	Абс.	346 (12)	349 (12)	353 (12)	355 (13)	356 (12)
	Эм.	447	414	435	430	429
<b>II.4b</b>	Абс.	413 (10)	407 (14)	410 (14)	410 (15)	412 (14)
	Эм.	555	536	542	541	537
<b>II.4c</b>	Абс.	428 (12)	422 (19)	422 (17)	419 (15)	421 (18)
	Эм.	570	552	560	556	555
<b>II.4d</b>	Абс.	402 (9)	407 (11)	408 (11)	410 (12)	412 (11)
	Эм.	534	543	535	534	534
<b>II.4e</b>	Абс.	485 (5)	492 (8)	500 (9)	501 (9)	504 (9)
	Эм.	592	563	564	555	554

Квантовые выходы флуорофоров **II.4a-e** оказались умеренными, однако соединение **II.4d** с пиридиновым фрагментом продемонстрировал довольно неплохие значения (Рисунок 65). Но при этом наблюдалась нежелательная флуоресценция в водной среде.

Рисунок 65. Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.4a-e** в различных растворителях.

Пиридиновые производные

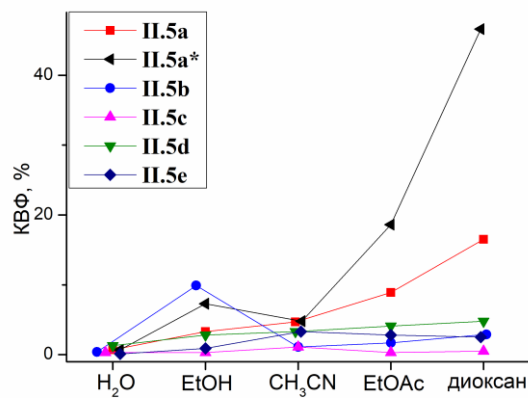


Для пиридиновых производных **II.5a-e** также оказался характерен довольно ограниченный сольватохромизм и сдвинутые в коротковолновую область максимумы абсорбции и эмиссии (Таблица 15). Относительно **II.5a** заметно смещение линий спектров **II.5a\*** в более длинноволновую область.

Таблица 15. Оптические свойства соединений **II.5a-e** и **II.5a\*** различных растворителях.

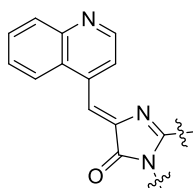
Продукт		H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.5a</b>		Абс.	347 (11)	351 (12)	356 (10)	353 (12)	357 (11)
		Эм.	464	453	452	442	439
<b>II.5a*</b>		Абс.	368 (17)	377 (18)	377 (10)	379 (12)	379 (17)
		Эм.	477	477	475	472	471
<b>II.5b</b>		Абс.	408 (11)	411 (11)	408 (11)	408 (11)	411 (10)
		Эм.	560	550	550	544	546
<b>II.5c</b>		Абс.	425 (14)	433 (12)	428 (13)	423 (12)	422 (13)
		Эм.	577	570	574	566	564
<b>II.5d</b>		Абс.	402 (14)	408 (17)	408 (15)	408 (16)	408 (16)
		Эм.	542	545	541	535	537
<b>II.5e</b>		Абс.	495 (15)	502 (15)	507 (16)	508 (17)	509 (16)
		Эм.	610	598	582	569	570

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.5a-e** также были невелики, однако совершенно неожиданно флуорофор **II.5a\*** продемонстрировал очень большие значения данного параметра в диоксане (практически 50%, Рисунок 66).



**Рисунок 66.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.5a-e** и **II.5a\*** в различных растворителях.

## Хинолиновые производные



II.6a-e

При переходе к хинолиновым производным **II.6a-e** заметно существенное смещение всех максимумов в более длинноволновую область относительно пиридиновых соединений **II.5a-e** (Таблица 16). При этом стоит отметить, что введение дополнительного сопряженного фенильного кольца в бензилиденный фрагмент оказывает гораздо меньший эффект, чем наращивание ароматической системы во втором положении имидазолана. Также отметим, что соединение **II.6e** продемонстрировало очень слабое поглощение (низкий коэффициент экстинкции), что по всей видимости связано с тем, что в растворах для данного вещества невыгодна плоская сопряженная структура.

Таблица 16. Оптические свойства соединений **II.6a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.6a</b>		Абс.	360 (30)	369 (29)	377 (28)	377 (32)	380 (24)
		Эм.	481	466	462	453	449
<b>II.6b</b>		Абс.	428 (16)	428 (15)	429 (14)	429 (15)	428 (11)
		Эм.	600	570	577	572	570
<b>II.6c</b>		Абс.	454 (20)	447 (18)	444 (22)	441 (20)	442 (10)
		Эм.	592	595	597	590	588
<b>II.6d</b>		Абс.	414 (11)	425 (12)	425 (11)	426 (11)	428 (10)
		Эм.	575	575	568	563	563
<b>II.6e</b>		Абс.	503 (0.7)	514 (0.8)	520 (0.6)	520 (0.8)	522 (0.7)
		Эм.	622	612	600	583	580

Влияние дополнительного цикла в бензилиденном фрагменте флуорофоров **II.6a-e** относительно **II.5a-e** повлекло за собой также и снижение квантового выхода флуоресценции, что особенно заметно для 2-метилимидазолана **II.6a** (Рисунок 67).

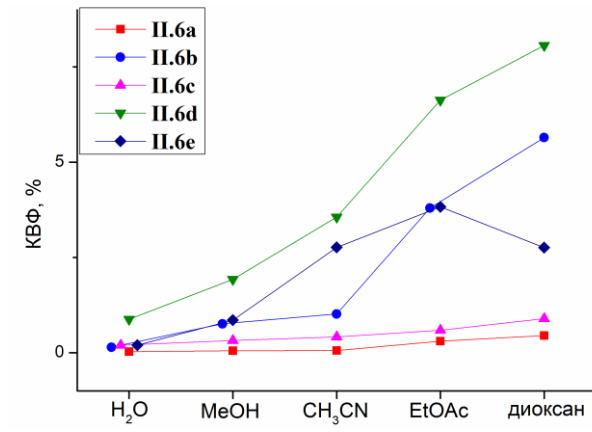
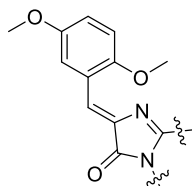


Рисунок 67. Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.6a-e** в различных растворителях.



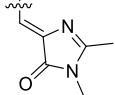
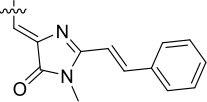
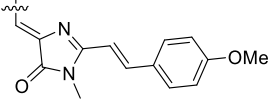
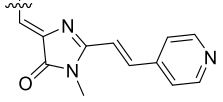
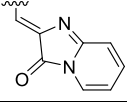
## Диметокси-фенильные производные



II.7a-e

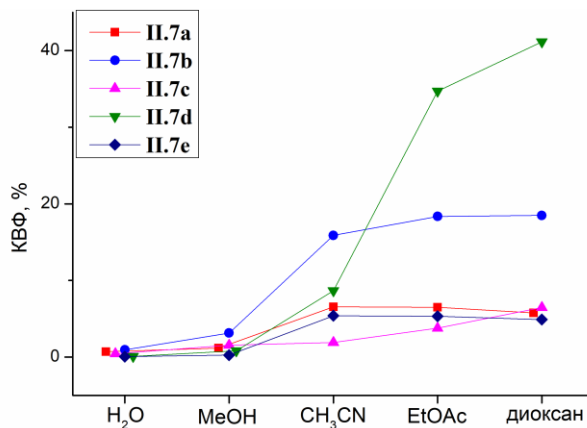
Группа диметоксипроизводных **II.7a-e** продемонстрировала значительный сольватохромизм и большие Стоксовы сдвиги (Таблица 17).

**Таблица 17.** Оптические свойства соединений **II.7a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	EtOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.7a</b>		Абс.	392 (14)	396 (12)	392 (11)	391 (14)	393 (4)
		Эм.	571	541	499	475	472
<b>II.7b</b>		Абс.	455 (15)	445 (14)	443 (14)	441 (16)	445 (10)
		Эм.	581	566	558	560	564
<b>II.7c</b>		Абс.	462 (25)	449 (24)	447 (25)	445 (26)	448 (15)
		Эм.	587	564	565	528	532
<b>II.7d</b>		Абс.	450 (-)*	454 (15)	450 (15)	448 (17)	452 (11)
		Эм.	533	601	582	567	564
<b>II.7e</b>		Абс.	496 (14)	499 (14)	505 (14)	505 (14)	509 (13)
		Эм.	606	550	555	550	554

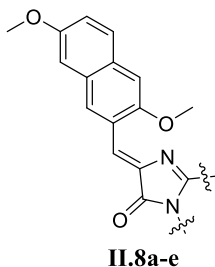
\* - слишком низкая растворимость

Также оказалось, что данные соединения демонстрируют высокие квантовые выходы флуоресценции в полярных апротонных растворителях, однако практически не флуоресцируют в протонных (Рисунок 68).



**Рисунок 68.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.7a-e** в различных растворителях.

## Диметоксинафтильные производные

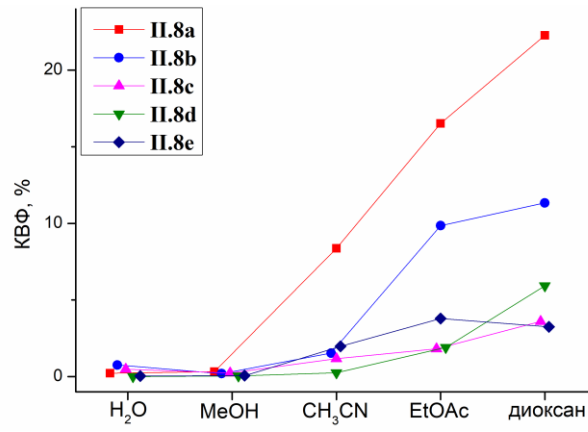


Достаточно парадоксальные оптические свойства продемонстрировали флуорофоры из группы **II.8a-e**. Будучи расширенными на один сопряженный цикл соединениями **II.7a-e**, были бы должны демонстрировать смещение максимумов абсорбции и эмиссии в более длинноволновую область. Однако подобного в явном виде не наблюдалось, а в некоторых случаях происходило даже гипсохромное смещение (Таблица 18). Из этого напрашивается вывод, что введение дополнительного ароматического сопряжения в бензилиденный фрагмент бензилиденимидазолонов не всегда оправдано.

**Таблица 18.** Оптические свойства соединений **II.8a-e** в различных растворителях.

Продукт		H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	EtOAc	диоксан	
<b>II.8a</b>		Абс.	371 (17)	370 (17)	371 (17)	369 (16)	371 (8)
		Эм.	506	600	545	508	504
<b>II.8b</b>		Абс.	439 (18)	434 (16)	438 (18)	438 (19)	439 (12)
		Эм.	596	626	601	560	561
<b>II.8c</b>		Абс.	448 (22)	444 (21)	446 (22)	445 (22)	446 (14)
		Эм.	588	615	577	565	566
<b>II.8d</b>		Абс.	396 (-)	432 (16)	437 (18)	438 (18)	440 (8)
		Эм.	-	584	563	585	575
<b>II.8e</b>		Абс.	467 (9)	498 (10)	509 (6)	509 (9)	512 (3)
		Эм.	610	600	562	556	559

Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.8a-e** (Рисунок 69) также оказались ниже, чем у соединений **II.7a-e**. Обращает на себя внимание тот факт, что флуоресценция исходного **II.8a** значительно превосходит флуоресценцию модифицированных **II.8b-d**.



**Рисунок 69.** Квантовые выходы флуоресценции соединений **II.8a-e** в различных растворителях.

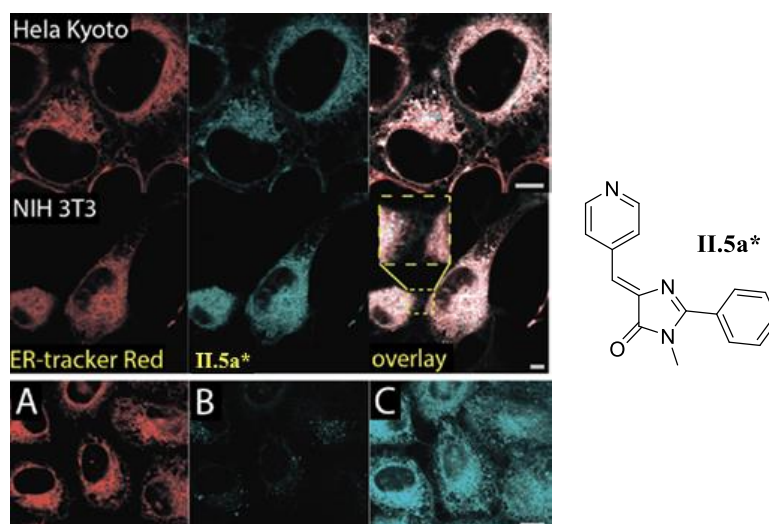
### 3.4. Окрашивание клеточных культур

В ходе дальнейшей работы нашими коллегами из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов, группы молекулярных меток для оптической наноскопии и группы редокс-биологии, была изучена возможность использования созданных соединений для окрашивания клеточных культур.

Для проведения этих опытов были выбраны стабильные вещества с длинноволновыми положениями максимумов и со значительным варьированием КВФ. Исходя из этих критериев мы отбросили метилсульфанильные производные, которые оказались неустойчивыми и обладали очень малой флуоресценцией в видимом диапазоне, а также борированные 5-аминометиленимидазолы. Также не проводились исследования соединений **II.1-8a**, которые обладают слишком коротковолновыми максимумами поглощения.

Было установлено что практически во всех случаях добавление красителей в клеточную среду в концентрации 1-10 мкМ приводит к окрашиванию тех или иных мембран, однако лишь в редких случаях данное окрашивание было селективно.

Первым соединением, продемонстрировавшим эффективное флуоресцентное окрашивание внутриклеточных органелл, оказалось **II.5a\***. Было установлено, что добавление его к клеткам Hela Kyoto и NIH 3T3 приводит к интенсивному окрашиванию эндоплазматического ретикулула. Селективность этого процесса была подтверждена с помощью ко-локализации с коммерческим красителем ER-tracker Red (Рисунок 70).

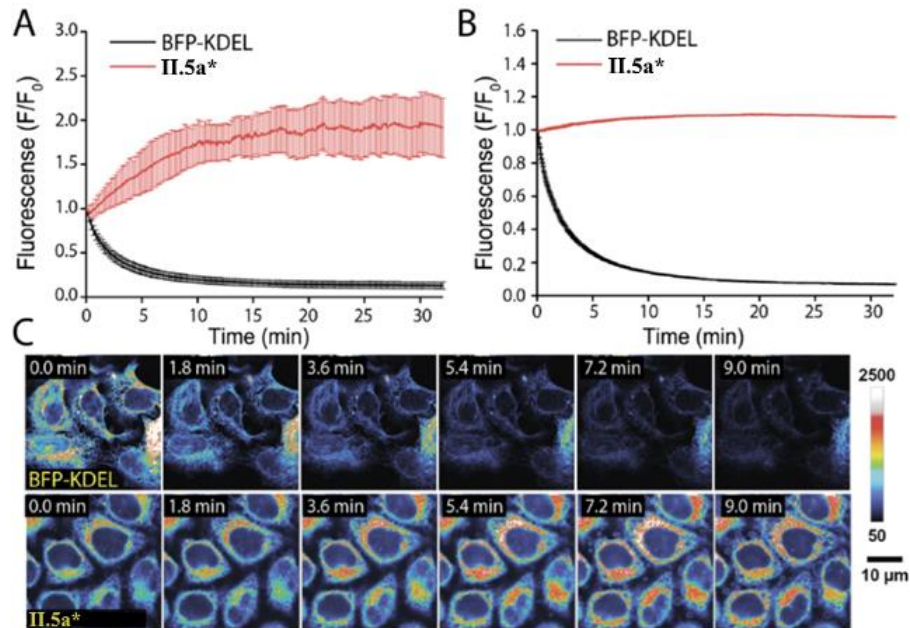


**Рисунок 70.** Конфокальная микроскопия клеток Hela Kyoto и NIH 3T3, окрашенных **II.5a\*** и ER-Tracker Red. Наверху живые клетки, внизу – сразу после обработки формальдегидом (A, B) и после добавления еще одной порции **II.5\*** (C).

Было обнаружено небольшое различие в окрашивании в имеющих ламеллоподии фибробластах NIH 3T3, в которых соединение **II.5a\*** также окрашивает структуры, примыкающие к эндоплазматическому ретикулуму. Предположительно, это самые тонкие или плотные отделы ретикулума, проникновение в которые красителя ER-tracker Red затруднено.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой разветвленную мембранную структуру эукариотов, обеспечивающую внутриклеточные транспортные функции и участвующую в синтезе белков и фосфолипидов.[149,150] Роль данной структуры не до конца выяснена и активно изучается,[151] кроме того, изменения в эндоплазматическом ретикулуме могут свидетельствовать о клеточных патологиях,[152] потому создание новых чувствительных к полярности флуорофоров для меченья данной органеллы может серьезно помочь исследованиям. Большинство существующих соединений для подобных целей, например ER tracker Red и ER tracker Green, не являются чувствительными к микроокружению, так как содержат в своем составе традиционный флуоресцентный краситель и дополнительную часть для связывания со специфическими белками эндоплазматического ретикулума.[153] Это ограничивает их применение, так как количество данных белков может изменяться.

Соединение **II.5a\*** также продемонстрировало очень большую устойчивость в условиях флуоресцентной микроскопии. При сравнительном изучении окрашивания клеток Hela Kyoto данным соединением и локализованным в эндоплазматическом ретикулуме синим флуоресцентным белком BFP-KDEL было выяснено, что тогда как пиридиновый имидазолон не демонстрирует уменьшения флуоресценции при облучении, флуоресценция белкового красителя падала вдвое каждые полторы-две минуты (Рисунок 71). Столь высокая фотостабильность связана с высокой подвижностью флуорофора **II.5a\*** в клеточных мембранах, что позволяет ему постоянно обновлять свое присутствие в целевом объекте. Именно обмен молекул флуорофора между органеллами и окружающим раствором позволяет красителю демонстрировать высокую фотостабильность.[93,148] Более того, данное окрашивание обратимо – замена среды приводит к существенному уменьшению флуоресценции, что можно обратить вспять добавлением новой порции флуорофора.

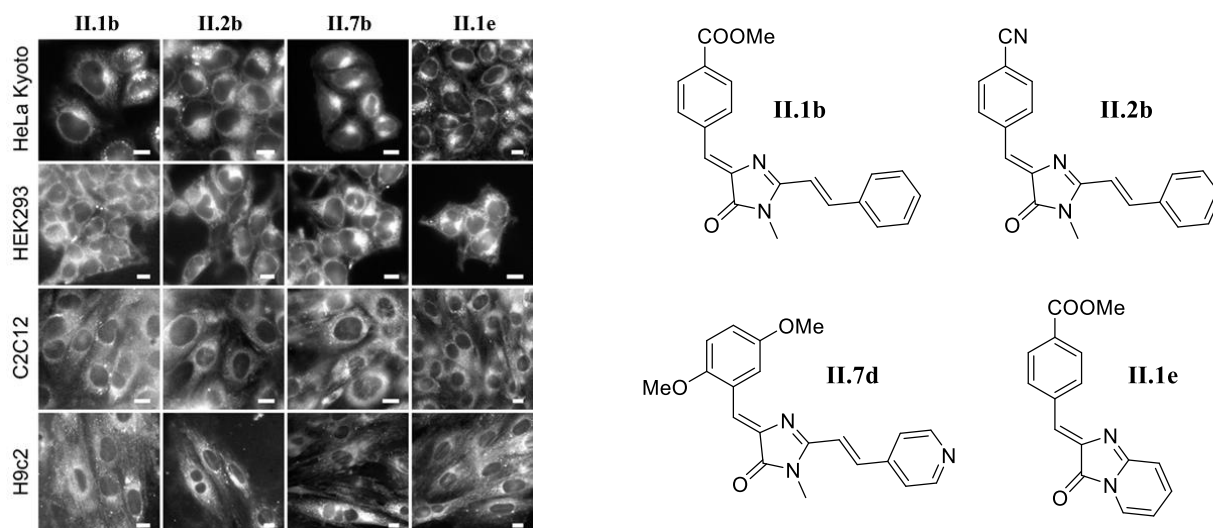


**Рисунок 71.** Фотообесцвечивание клеток HeLa Kyoto, окрашенных **II.5a\*** и белком BFP-KDEL: интенсивность флуоресценции живых (A) и фиксированных (B) клеток; (C) - изображения живых клеток HeLa во время фотообесцвечивания.

Также необходимо подчеркнуть, что флуорофор **II.5a\*** оказался нетоксичен – добавление его в клеточную среду не приводит к гибели клеток в течение по крайней мере 10-12 часов. Но стоит отметить существенный недостаток данного флуоресцентного красителя – достаточно коротковолновый максимум абсорбции, из-за чего необходимо применять разрушительное для живых организмов излучение.

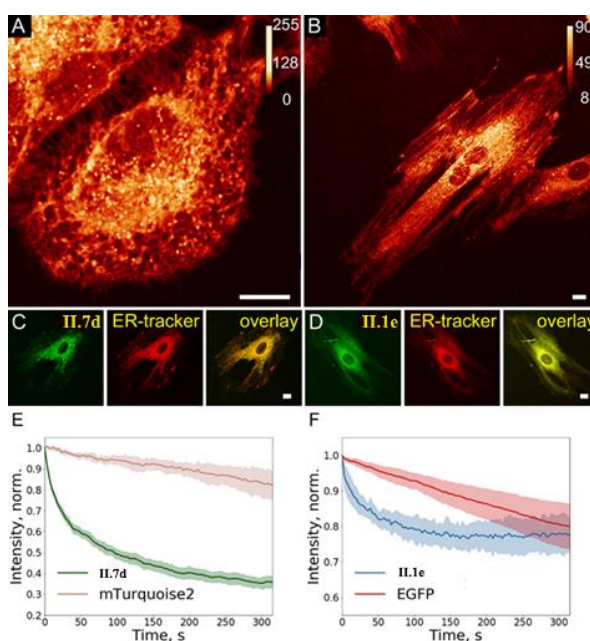
Данного недостатка оказались лишены аналоги хромофора *Kaede*, некоторые из которых также оказались селективны в отношении ЭПР. Такими соединениями стали **II.1b**, **II.1e**, **II.2b** и **II.7d**.

Исследования проводились на линиях клеток HeLa Kyoto, миобластах C2C12, кардиомиобластах H9c2 и модифицированных эмбриональных клетках HEK293. Для них для всех окрашивание оказалось селективно, что было подтверждено ко-локализацией. В клетках HeLa Kyoto и HEK293 было обнаружено контактирование эндоплазматического ретикулума с ядром и периферическими трубками. Кроме того, продольные каналы саркоплазматического ретикулума были обнаружены в миобластах C2C12 и кардиомиобластах H9c2. (Рисунок 72).



**Рисунок 72.** Окрашенные флуорофорами **II.1b**, **II.2b**, **II.7d**, **II.1e** эндоплазматического ретикула в клетках HeLa Kyoto, HEK293, C2C12 и H9c2.

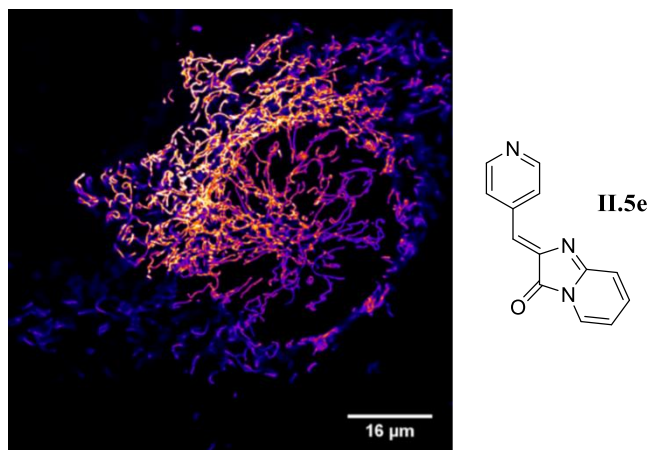
Было показано, что соединения **II.1b** и **II.2b** достаточно быстро обесцвечиваются в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии. Напротив, соединения **II.1e** и **II.7d** продемонстрировали очень яркий и контрастный сигнал, который оказался сопоставимым по фотостабильности с флуоресцентными белками. Используя конфокальную микроскопию, наши коллеги подтвердили высокую селективность и стабильность окрашивания (Рисунок 74).



**Рисунок 73.** Конфокальная микроскопия живых клеток. Окрашенный эндоплазматический ретикулум в клетках HeLa-Kyoto (A) и H9c2 (B). (C) и (D) – сравнение окрашивания **II.7d** и **II.1e** клеток H9c2 по сравнению с ER-tracker Red. (E) и (F) – графики фотостабильности соединений **II.7d** и **II.1e** в клетках HeLa Kyoto по сравнению с флуоресцентными протеинами для окрашивания цитоплазмы mTurquoise2 и EGFP.

Довольно трудно сказать, существует ли какая-то очевидная корреляция между структурой соединений и их способностью селективно окрашивать эндоплазматический ретикулум. По всей видимости селективность данного процесса обусловлена комбинацией оптических свойств и подходящей степени полярности, которая обеспечивает накопление красителя только в целевых мембранах. Красители с избыточной липофильностью окрашивают другие мембраны и образуют флуоресцентные включения, в то время как слишком полярные красители не накапливаются в клетках и демонстрируют низкое отношение сигнал/шум. Стоит отметить, что подобная селективность нехарактерна для производных хромофора GFP.[148]

Соединение **II.5e** также показало способность к флуоресцентному окрашиванию, что было продемонстрировано нашими коллегами. При обработке данным красителем клеток Hela Kyoto, HEK293, а также фибробластов NIH 3T3 и бета-клеток MIN6 наблюдалось селективное интенсивное флуоресцентное окрашивание исключительно митохондрий (Рисунок 74).



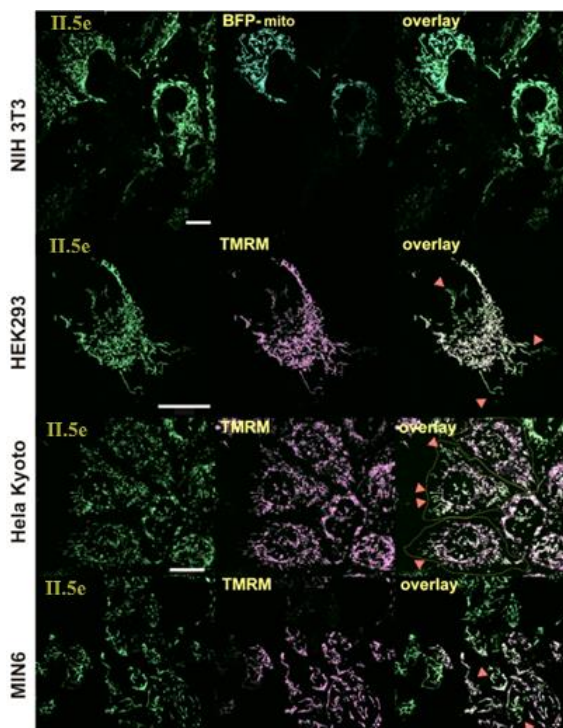
**Рисунок 74.** Окрашивание митохондрий флуорофором **II.5e** в фибробластах NIH 3T3.

В качестве сравнения был использован стандартный флуоресцентный маркер для меченья митохондрий – перхлорат метилового эфира тетраметилродамина (TMRM). Также для подтверждения локализации были использованы клетки, трансфицированные синим флуоресцентным белком BFP-mito. Для сравнения были выбраны именно эти метки, так как они имеют максимумы адсорбции и эмиссии в областях, отличных от **II.5e**.

Митохондрии представляют собой «энергетические станции» клетки, обеспечивая функционирование многих метаболических путей. В зависимости от местоположения, митохондрии имеют различный мембранный потенциал и, соответственно, проявляют различную активность. Краситель TMRM обладает достаточно высокой липофильностью, а, кроме того, заряжен, а потому флуоресцентно окрашивает митохондрии с большим протонным градиентом и, соответственно, большей дыхательной активностью, что, в свою очередь,



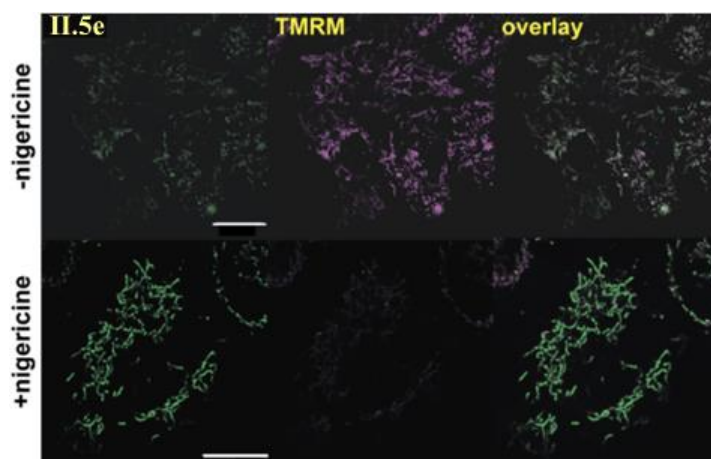
позволяет сравнивать с его помощью активность отдельных митохондрий при помощи флуоресцентной спектроскопии.[154–156] Однако **II.5e** демонстрирует совершенно иной тип окрашивания – добавление его в клеточную среду приводит к равномерному окрашиванию всех митохондрий независимо от их метаболического статуса (Рисунок 75).



**Рисунок 75.** Флуоресцентное окрашивание митохондрий в клетках HeLa Kyoto, HEK293, NIH 3T3, MIN6 флуорофором **II.5e** и флуоресцентными красителями TMRM и BFP-mito.

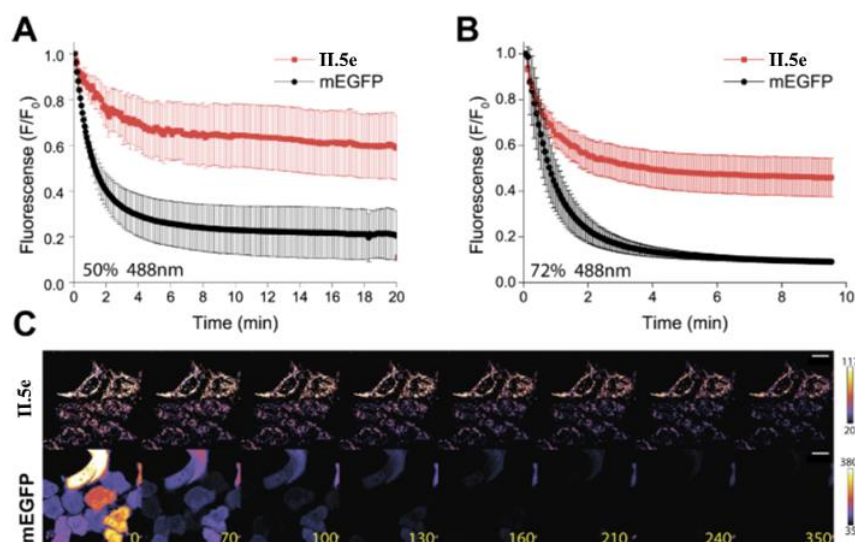
На указанных снимках видно, что митохондрии в дистальной области клеток (отмечены красными треугольниками) более окрашены **II.5e**, так как имеют пониженный мембранный потенциал, тогда как митохондрии в центральной области одинаково эффективно окрашены как **II.5e**, так и TMRM. Более того, явно видно, что некоторые митохондрии более окрашены TMRM в центре и слабее по краям, в то время как **II.5e** окрашивает их равномерно.

Для подтверждения этого предположения был проведен эксперимент с антибиотиком нигерицином (Рисунок 76). Данное вещество, являясь ионофором, удаляет митохондриальный протонный градиент, что приводит к исчезновению сигнала TMRM, однако не влияет на сигнал **II.5e**. Полученные данные позволяют утверждать, что флуорофор **II.5e** можно использовать для окрашивания митохондрий независимо от мембранного потенциала и дыхательной активности.



**Рисунок 76.** Клетки HeLa-Kyoto, обработанные **II.5e**, TMRM и нигерицином.

Скорость окрашивания митохондрий соединением **II.5e** сопоставима с окрашиванием TMRM, однако синтезированный нами флуорофор не требуется дополнительно отмывать, так как в водной среде он демонстрирует незначительную флуоресценцию. Также стоит подчеркнуть, что соединение **II.5e** проявило большую фотостабильность. Например, она значительно превышает фотостабильность белка EGFP (Addgene # 54767) в клетках HeLa Kyoto. Флуоресцентное окрашивание митохондрий посредством **II.5e** оказывается четко различимым в течение десятков минут даже при мощном облучении, что, по всей видимости, связано с постоянным обменом молекул флуорофора между мембранами и окружающей средой (Рисунок 77).



**Рисунок 77.** Обесцвечивание клеток HeLa-Kyoto, окрашенных флуорофором **II.5e** и цитоплазматическим флуоресцентным белком EGFP; (A) – при облучении лазером 488 нм мощностью 50%, (B) – при мощности 72%. (C) – клетки при облучении лазером на мощности 72% (в секундах).

Как можно заметить, установить явную связь между структурой флуорофора и его способностью к окрашиванию того или иного типа органелл невозможно. Поэтому мы решили изучить оптические свойства соединений, проявивших себя как лучшие флуоресцентные красители для органелл, в большем количестве растворителей (Таблица 19).

**Таблица 19.** Оптические свойства соединений **II.1e**, **II.5a\***, **II.5e** и **II.7d** в различных растворителях.

Растворитель	<b>II.1e</b>			<b>II.5a*</b>			<b>II.5e</b>			<b>II.7d</b>		
	Абс.	Эм.	КВФ	Абс.	Эм.	КВФ	Абс.	Эм.	КВФ	Абс.	Эм.	КВФ
Et <sub>2</sub> O	508	559	8.2	376	470	27.3	507	563	2.3	448	542	50.1
EtOAc	508	568	8.8	379	472	18.6	508	569	2.8	448	567	34.7
EtOH	501	582	4.6	377	477	7.3	507	596	1.3	457	598	16.0
MeOH	498	595	1.7	375	482	3.7	502	598	0.9	454	601	0.8
CH <sub>3</sub> CN	508	580	8.9	377	475	4.8	507	572	3.3	450	582	8.7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	509	568	12.2	378	472	16.8	509	572	3.3	456	576	23.4
ДМФА	514	588	10.5	382	481	6.8	513	590	3.3	457	583	10.0
ДМСО	516	595	9.3	383	485	2.4	514	599	3.2	459	593	7.1
H <sub>2</sub> O	495	608	<0.1	366	477	0.7	495	610	0.1	450	533	<0.1
Ацетон	509	567	10.2	378	476	11.2	509	580	3.8	449	577	16.0
ТГФ	512	570	8.8	381	476	43.3	510	573	3.0	451	572	31.2
Пиридин	516	583	9.1	378	483	23.6	515	585	3.7	459	584	18.5
Толуол	513	567	5.9	381	471	53.1	511	573	2.5	457	547	38.3
Диоксан	511	566	6.3	379	471	46.6	509	570	2.5	452	564	41.1

Полученные данные позволили нам рассчитать параметры модели Камлета-Тафта для данных соединений.[10] Эта модель позволяет вводить корреляцию между смещением положений максимумов спектров и такими параметрами растворителя, как кислотность ( $\alpha$ ), основность ( $\beta$ ) и полярность ( $\pi^*$ ).

$$\nu (1/\text{см}) = \nu_0 + \rho\pi^* + a\alpha + b\beta$$

Также недавно мы показали,[148] что эту модель можно успешно применять и для квантового выхода флуоресценции:

$$\text{КВФ} = \text{КВФ}_0 + \rho\pi^* + a\alpha + b\beta$$

В результате математической обработки линейной регрессии с несколькими переменными нами были подсчитаны параметры уравнения Камлета-Тафта для исследованных соединений **II.1e**, **II.5a\***, **II.5e**, **II.7d** (Таблица 20). Благодаря этим данным можно оценить оптические свойства в других растворителях, если известны их свойства.

**Таблица 20.** Сольватохромные спектральные параметры ( $10^3/\text{см}$ ) соединений **II.1e**, **II.5a\***, **II.5e** и **II.7d**.

Соединение		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>p</i>	$\nu_0/\text{КВФ}$	$R^{(*)}$
<b>II.1e</b>	Абс.	0.6	0	-0.3	19.8	0.97
	Эм.	-0.5	-0.5	-1.1	18.4	0.94
	FQY	-7.0	-1.5	-3.0	8.0	0.82
<b>II.5a*</b>	Абс.	0.6	-0.4	-0.1	26.6	0.80
	Эм.	0.0	-0.5	-0.7	21.7	0.91
	FQY	-0.2	-0.2	0.53	0.53	0.79
<b>II.5e</b>	Абс.	0.5	-0.15	-0.2	20.0	0.91
	Эм.	-0.5	-0.6	-1.0	18.0	0.97
	FQY	-2.5	-0.1	-1.1	2.6	0.91
<b>II.7d</b>	Абс.	1.55	0.8	-1.1	22.3	0.89
	Эм.	-2.3	-1.1	-1.4	19.0	0.95
	FQY	-20	-20	-35	58.5	0.90

\* коэффициент детерминации

Кроме того, нами были изучены оптические свойства соединений в алканах. Известно, что их кислотно-основные свойства и полярность крайне невелики и изменение оптических свойств флуорофоров может произойти только из-за значительной разницы в вязкости данных растворителей. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что вязкость среды не оказывает на их оптические свойства совершенно никакого влияния (Таблица 21).

**Таблица 21.** Оптические свойства **II.5e** и **II.7d** в различных алканах.

Растворитель	<b>II.5e</b>			<b>II.7d</b>		
	Абс.	Эм.	КВФ	Абс.	Эм.	КВФ
Гексан	505 (16)	596	1.5	449 (24)	527	31.0
Октан	505 (16)	597	1.5	451 (24)	528	32.2
Додекан	507 (16)	596	1.6	451 (23)	530	33.2
Гексадекан	507 (16)	598	1.5	451 (24)	534	32.8

Вероятно, способность предложенных нами флуорогенов селективно окрашивать ЭПР основана на комбинации флуорогенных свойств и подходящей степени полярности, которая обеспечивает накопление красителя только в мембранах ЭПР. Красители с избыточной липофильностью окрашивают другие мембраны и образуют флуоресцентные капли, в то время как слишком полярные красители не накапливаются в клетках и дают плохое соотношение сигнал/шум.

В тоже время для красителя **II.5e** селективного в отношении митохондрий было выявлено относительно нестандартное поведение – максимальное смещение спектральных

максимумов наблюдалось в наиболее полярных и протонных растворителях (например, в воде). Однако, в отличие от многих других бензилиденимидазолонов, максимальная интенсивность флуоресценции этого вещества наблюдалась в апротонных, но высокополярных средах (например, ДМСО, ДМФА, пиридин и т. д.). Вероятно это свойство и объясняет окрашивание митохондрий, для которых характерно наличие заряда, а следовательно, высокой полярности в мембранах.

## 4. Экспериментальная часть

### 4.1 Материалы и оборудование

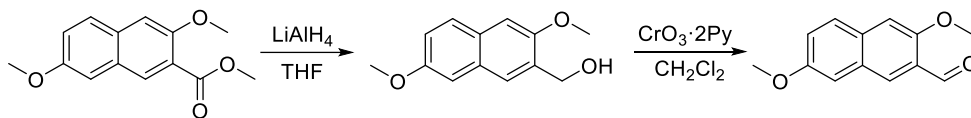
Спектры ЯМР зарегистрированы на приборах Bruker Avance III 800 (снабжен 5-мм СРТХI криодатчиком), Bruker Avance III 700 и Bruker Fourier 300 в ДМСО-d<sub>6</sub> и CDCl<sub>3</sub>, внутренний стандарт - ТМС. Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio. Спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре Agilent Cary Eclipse. Температуры плавления определены на приборе SMP30 и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе LTQ Orbitrap Elite (ThermoFisher Scientific, USA) методом электрораспылительной ионизации (ESI).

Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh). Реактивы Acros Organics и SigmaAldrich применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегнанные растворители фирмы Химмед. Все операции с чувствительными к влаге и кислороду воздуха веществами проводили в атмосфере сухого аргона с использованием стандартной техники Шлэнка.

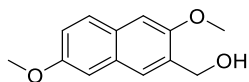
Соединения **II.2a**, **II.3a**,[132] **II.4a**,[157] **II.6a**,[129] гидрохлорид имидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он,[147] метилбензимидазат, метил-4-метоксибензимидазат, метил-4-хлорбензимидазат,[158] метил-4-бромбензимидазат,[159] метил-4-(диметиламино)бензимидазат,[160] метилизоникотинимидазат,[161] 5-(4-(диэтиламино)бензилиден)-2-тиооксоимидазолин-4-он,[162] 5-(4-гидроксибензилиден)-2-тиооксоимидазолин-4-он,[163] 5-бензилиден-3-метил-2-(метилсульфанил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он, 5-(4-метоксибензилиден)-3-метил-2-(метилсульфанил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он [164] были синтезированы по литературным процедурам.

## 4.2. Синтез

### 4.2.1. Синтез 3,7-диметокси-2-нафталальдегида



#### (3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метанол.



492 Мг (2 ммоль) метил-3,7-диметокси-2-нафтоата растворяли в 10 мл сухого ТГФ и охлаждали до 0°C. К полученному раствору при интенсивном перемешивании медленно добавили 152 мг (8 ммоль) алюмогидрида лития. Полученную смесь медленно нагрели до комнатной температуры и перемешивали еще 2 ч. Добавили 100 мл этилацетата, полученный раствор промыли 3 × 30 мл 5% соляной кислотой. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, раствор упарили насухо, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ в качестве элюента.

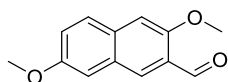
Выход 312 мг (72%), белый порошок, т. пл. 121-124°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.84 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 4.61 (д, *J* = 5.5, 2 H), 5.13 (т, *J* = 5.6, 1 H), 7.08 (дд, *J* = 8.8, 2.5, 1 H), 7.22 (с, 1 H), 7.26 (д, *J* = 2.4, 1 H), 7.71 (д, *J* = 8.8, 1 H), 7.77 (с, 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 55.3, 55.8, 107.4, 107.6, 122.1, 125.3, 128.2, 128.3, 128.7, 132.7, 155.7, 156.2, 189.8.

HRMS (*m/z*) найдено 217.0867 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено 217.0870.

#### 3,7-Диметокси-2-нафталальдегид.



218 Мг (1 ммоль) (3,7-диметоксинафтален-2-ил)метанола растворили в 10 мл дихлорметана, 324 мг (1.5 ммоль) свежеприготовленного CrO<sub>3</sub>·2Py добавили порциями. Полученную смесь перемешивали 12 ч и фильтровали. Раствор упаривали насухо, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ в качестве элюента.

Выход мг (63%), белый порошок, т. пл. 89-91°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.86 (с, 3 H), 3.98 (с, 3 H), 7.28 (дд,  $J = 8.9, 2.4, 1$  H), 7.46 - 7.52 (м, 2 H), 7.82 (д,  $J = 9.0, 1$  H), 8.25 (с, 1 H), 10.47 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  55.3, 55.8, 107.3, 107.6, 122.1, 125.3, 128.2, 128.3, 128.7, 132.7, 155.7, 156.2, 189.8.

HRMS (m/z) найдено 217.0860  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3$ . Вычислено 217.0859.

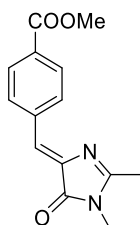


#### 4.2.2. Синтез аналогов хромофора GFP

##### Общая методика А.

Соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль) растворили в 25 мл хлороформа, добавили 0.87 мл (10 ммоль) водного 40% раствора метиламина и 5 г безводного сульфата натрия. Смесь перемешивали 48 ч и фильтровали. Раствор упарили, добавили 1.13 г (7 ммоль) этил((1-метокси)амино)ацетата или 1.45 г (7 ммоль) этил((1-метокси)амино)бензоата и 2 мл метанола. Полученный раствор перемешивали 24 ч и упаривали. Продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформа и этанола в качестве элюента (100:1).

##### Метил-(Z)-4-((1,2-диметил-5-оксо-1,5-дигидро-4Н-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.1a).



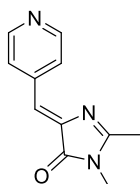
Синтезировано по общей методике А. Выход 619 мг (48%), желтый порошок, т. пл. 162-164°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.39 (с, 3 Н), 3.11 (с, 3 Н), 3.87 (с, 3 Н), 7.01 (с, 1 Н), 8.00 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н), 8.32 (д,  $J = 8.2$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.5, 26.3, 52.2, 122.7, 129.2, 129.8, 131.8, 138.6, 140.6, 165.8, 166.1, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 259.1075 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено 259.1077.

##### (Z)-4-((Пиридин-4-ил)метил)-1,2-диметил-1Н-имидазол-5(4Н)-он (II.5a).



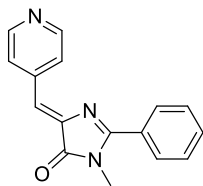
Синтезировано по общей методике А. Выход 792 мг (73%), желтый порошок, т. пл. 175-178°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (800 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.39 (с, 3 Н), 3.11 (с, 3 Н), 6.93 (с, 1 Н), 8.08 (д,  $J = 6.11$ , 2 Н), 8.64 (д,  $J = 5.9$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.5, 26.3, 121.0, 124.9, 140.82, 142.3, 150.0, 167.1, 169.5.

HRMS (m/z) найдено 202.0978 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O. Вычислено 202.0975.

**(Z)-4-((Пиридин-4-ил)метил)-1-метил-2-фенил-1H-имидазол-5(4H)-он (II.5a\*).**



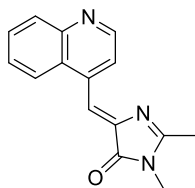
Синтезировано по общей методике А. Выход 923 мг (65%), желтый порошок, т. пл. 190-192°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (с, 3 H), 7.15 (с, 1 H), 7.63 (т, *J* = 7.5, 2 H), 7.69 (т, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.98 (д, *J* = 6.9, 2 H), 8.17 (д, *J* = 5.9, 2 H), 8.68 (д, *J* = 6.2, 2 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 28.8, 123.1, 125.1, 128.5, 128.8, 128.9, 132.0, 140.8, 142.2, 150.1, 165.1, 170.4.

HRMS (m/z) найдено 264.1135 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O. Вычислено 264.1131.

**(Z)-2,3-Диметил-5-(хинолин-4-илметил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.6a).**



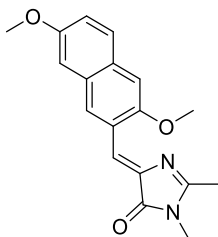
Синтезировано по общей методике А. Выход 1.03 г (82%), желтый порошок, т. пл. 218-220°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.42 (с, 3 H), 3.15 (с, 3 H), 7.65 (с, 1 H), 7.70 (т, *J* = 7.6, 1 H), 7.82 (т, *J* = 7.5, 1 H), 8.08 (д, *J* = 8.4, 1 H), 8.35 (д, *J* = 8.2, 1 H), 8.61 (д, *J* = 4.6, 1 H), 9.00 (д, *J* = 4.4, 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 15.8, 26.7, 119.6, 123.1, 123.4, 126.7, 127.1, 129.3, 130.3, 137.7, 142.4, 148.7, 150.3, 165.7, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 252.1130 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O. Вычислено 252.1131.

**(Z)-5-((3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.8a).**



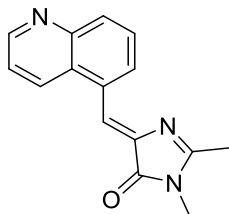
Синтезировано по общей методике А. Выход 1.13 г (73%), желтый порошок, т. пл. 242-244°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.42 (с, 3 H), 3.13 (с, 3 H), 3.87 (с, 3 H), 3.95 (с, 3 H), 7.16 (дд,  $J = 8.8, 2.5, 1$  H), 7.24 (д,  $J = 2.2, 1$  H), 7.34 (с, 1 H), 7.41 (с, 1 H), 7.73 (д,  $J = 8.8, 1$  H), 9.15 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.4, 26.2, 55.2, 55.7, 105.8, 106.5, 117.5, 120.3, 123.8, 128.0, 128.9, 130.2, 131.5, 139.2, 154.0, 156.0, 164.9, 169.8.

HRMS (m/z) найдено 311.1388  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 311.1390.

**(Z)-5-(хинолин-3-илметилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.9a).**

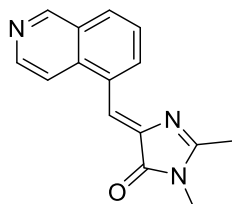


Синтезировано по общей методике А. Выход 427 мг (34%), желтый порошок, т. пл. = 194-197°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.40 (с, 3 H), 3.15 (с, 3 H), 7.63 (дд,  $J = 8.7, 4.1, 1$  H), 7.69 (с, 1 H), 7.88 (т,  $J = 7.9, 1$  H), 8.08 (д,  $J = 8.4, 1$  H), 8.78 (д,  $J = 8.6, 1$  H), 8.94 (д,  $J = 7.1, 1$  H), 8.96 (дд,  $J = 4.0, 1.3, 1$  H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.4, 26.3, 118.1, 122.0, 126.9, 129.1, 130.3, 130.9, 130.9, 131.6, 140.4, 147.8, 150.5, 166.0, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 252.1133  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 252.1131.

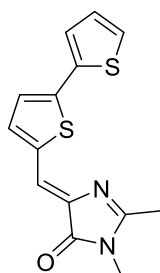
**(Z)-5-(изохинолин-5-илметилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.10a).**

Синтезировано по общей методике А. Выход 527 мг (42%), желтый порошок, т. пл. = 202-205°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.41 (с, 3 H), 3.15 (с, 3 H), 7.64 (с, 1 H), 7.82 (т,  $J = 7.8$ , 1 H), 8.18 - 8.21 (м, 2 H), 8.60 (д,  $J = 5.9$ , 1 H), 9.13 (д,  $J = 7.4$ , 1 H), 9.37 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.2, 26.0, 115.3, 117.6, 126.6, 127.2, 128.9, 129.7, 133.4, 134.5, 140.5, 144.0, 153.0, 163.1, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 252.1132  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}^+$ . Вычислено 252.1131.

**(Z)-5-([2,2'-дитиофен]-5-илметилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.11a).**

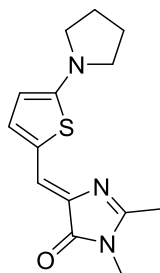
Синтезировано по общей методике А. Выход 547 мг (38%), оранжевый порошок, т. пл. = 212-215°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.36 (с, 3 H), 3.09 (с, 3 H), 7.14 (дд,  $J = 5.1$ , 3.6, 1 H), 7.29 (с, 1 H), 7.36 (д,  $J = 3.8$ , 1 H), 7.47 (дд,  $J = 3.6$ , 1.1, 1 H), 7.59 - 7.61 (м, 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.4, 26.3, 118.8, 124.2, 125.1, 126.7, 128.7, 136.0, 136.3, 143.8, 162.7, 168.8.

HRMS (m/z) найдено 289.0468  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OS}_2^+$ . Вычислено 289.0464.

**(Z)-5-((5-(пирролидин-1-ил)тиофен-2-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.12a).**



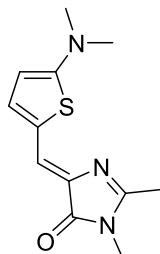
Синтезировано по общей методике А. Выход 481 мг (35%), красный порошок (481 мг, 35%), т. пл. = 246-249°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.99 - 2.03 (м, 4 Н), 2.26 (с, 3 Н), 3.05 (с, 3 Н), 3.34 - 3.36 (м, 4 Н), 5.90 (д,  $J = 4.2$ , 1 Н), 7.11 (с, 1 Н), 7.37 (д,  $J = 4.2$ , 1 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.0, 25.3, 26.1, 50.4, 102.4, 120.6, 122.0, 129.2, 138.8, 155.9, 163.6, 168.3.

HRMS (m/z) найдено 276.1168  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{OS}^+$ . Вычислено 276.1165.

**(Z)-5-((5-(диметиламино)тиофен-2-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.13a).**



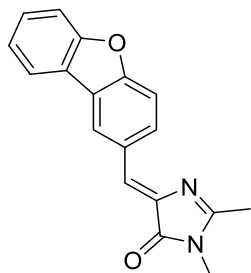
Синтезировано по общей методике А. Выход 249 мг (20%), красный порошок, т. пл. = 222-225°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.27 (с, 3 Н), 3.05 (с, 6 Н), 3.05 (с, 3 Н), 6.01 (д,  $J = 4.2$ , 1 Н), 7.11 (с, 1 Н), 7.37 (д,  $J = 4.2$ , 1 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.0, 26.1, 41.8, 102.9, 121.2, 121.7, 129.7, 138.7, 156.5, 167.3, 168.4.

HRMS (m/z) найдено 250.1006  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OS}^+$ . Вычислено 250.1009.

**(Z)-5-(дибензо[*b,d*]фуран-2-илметилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.14a).**



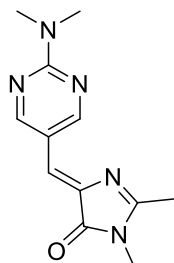
Синтезировано по общей методике А. Выход 0.97 г (67%), желтый порошок, т. пл. = 234-234°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.41 (с, 3 H), 3.13 (с, 3 H), 7.15 (с, 1 H), 7.46 (т,  $J = 7.4$ , 1 H), 7.57 (т,  $J = 7.7$ , 1 H), 7.74 (д,  $J = 8.2$ , 1 H), 7.79 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 8.13 (д,  $J = 7.1$ , 1 H), 8.52 (дд,  $J = 8.7$ , 1.6, 1 H), 8.90 (д,  $J = 1.5$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.4, 26.3, 111.9, 112.1, 121.2, 123.1, 123.5, 124.0, 124.9, 124.7, 128.1, 129.6, 131.6, 138.2, 155.9, 156.1, 164.2, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 291.1125  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 291.1128.

**(Z)-5-((2-(диметиламино)пиримидин-5-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.15a).**

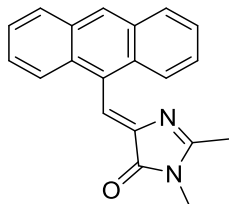


Синтезировано по общей методике А. Выход 894 мг (73%), желтый порошок, т. пл. = 220-223°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3 H), 3.08 (с, 3 H), 3.19 (с, 6 H), 6.87 (с, 1 H), 9.11 (с, 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.2, 26.2, 36.7, 116.5, 120.4, 136.5, 160.4, 160.5, 162.2, 169.1.

HRMS (m/z) найдено 246.1351  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}^+$ . Вычислено 246.1349.

**(Z)-5-(антрацен-9-илметилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (П.16а).**

Синтезировано по общей методике А. Выход 556 мг (37%), желтый порошок, т. пл. = 200-203°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.36 (с, 3 H), 3.16 (с, 3 H), 7.56 - 7.63 (м, 4 H), 7.93 (с, 1 H), 8.13 (т,  $J = 8.4$ , 4 H), 8.68 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.1, 25.9, 125.3, 125.4, 126.0, 126.1, 127.2, 127.8, 128.6, 128.9, 130.7, 143.6, 163.5, 166.5.

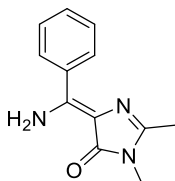
HRMS (m/z) найдено 301.1344  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}^+$ . Вычислено 301.1341.

### 4.2.3. Синтез 5-аминометиленимидазолонов

#### Общая методика В.

3.50 г (10.0 ммоль) *N*-метил-2-((трифенилфосфоранилиден)амино)ацетамида растворили в 50 мл сухого толуола, после чего добавили 1.0 г (10 ммоль) уксусного ангидрида. Полученный раствор перемешивали до полной гомогенизации (около 40 минут). Затем добавили соответствующий имидат (7 ммоль) и 5 г молекулярных сит 4Å. Смесь перемешивали 30 минут при 100°C, после чего охлаждали и фильтровали, полученный раствор упарили. Продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь этилацетат - гексан (1:9) в качестве элюента.

#### (*E*)-5-(амино(фенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (II.17a).



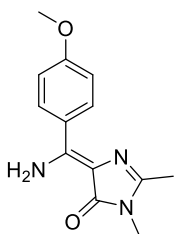
Синтезировано по общей методике В. Выход 220 мг (15%), желтый порошок, т. пл. = 210-213°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.16 (с, 3 H), 3.11 (с, 3 H), 7.51-7.48 (м, 3 H), 7.70 (ушир. с., 1 H), 7.89-7.88 (м, 2 H), 8.66 (ушир. с., 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 14.3, 25.8, 113.6, 127.9, 129.3, 130.2, 133.7, 146.5, 153.1, 168.1.

HRMS (m/z) найдено 216.1132 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. Вычислено 216.1132.

#### (*E*)-5-(амино(4-метоксифенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (II.18a).



Синтезировано по общей методике В. Выход 240 мг (14%), желтый порошок, т. пл. = 221-224°C.

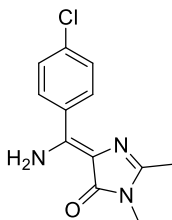
<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ, 2.17 (с, 3 H), 3.11 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 7.05 (д, *J* = 8.9, 2 H), 7.62 (ушир. с., 1 H), 7.97 (д, *J* = 8.9, 2 H), 8.74 (ушир. с., 1 H).



$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.3, 25.8, 55.3, 113.1, 113.4, 125.7, 131.1, 145.8, 155.7, 160.9, 168.0.

HRMS (m/z) найдено 246.1237  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2^+$ . Вычислено 246.1238.

**(E)-5-(амино(4-хлорофенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.19a).**



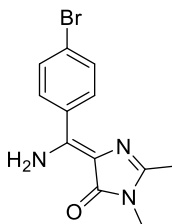
Синтезировано по общей методике **В**. Выход 250 мг (14%), желтый порошок, т. пл. = 168-171°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.17 (с, 3 H), 3.11 (с, 3 H), 7.57 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 7.74 (ушир. с., 1 H), 7.93 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 8.61 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.3, 25.8, 113.8, 128.0, 131.2, 132.4, 134.9, 147.0, 151.4, 168.1.

HRMS (m/z) найдено 250.0739  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{O}^+$ . Вычислено 250.0742.

**(E)-5-(амино(4-бромфенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.20a).**



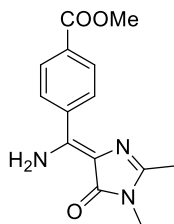
Синтезировано по общей методике **В**. Выход 210 мг (10%), желтый порошок, т. пл. = 162-165°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.17 (с, 3 H), 3.11 (с, 3 H), 7.71 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 7.74 (ушир. с., 1 H), 7.85 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 8.59 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.3, 25.8, 113.8, 123.8, 131.0, 131.4, 132.7, 147.0, 151.5, 168.1.

HRMS (m/z) найдено 294.0235  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrN}_3\text{O}^+$ . Вычислено 294.0237.

**Метил-(Е)-4-(амино(1,2-диметил-5-оксо-1,5-дигидро-4H-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.21a).**



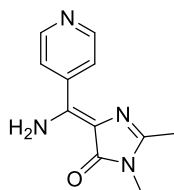
Синтезировано по общей методике **В**. Выход 160 мг (8%), желтый порошок, т. пл. = 181-184°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.17 (с, 3 H), 3.12 (с, 3 H), 3.89 (с, 3 H), 7.80 (ушир. с., 1 H), 8.00 (д,  $J = 8.4$ , 2 H), 8.05 (д,  $J = 8.4$ , 2 H), 8.59 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.3, 25.8, 52.3, 114.2, 128.6, 129.7, 130.7, 138.1, 147.4, 151.4, 165.7, 168.2.

HRMS (m/z) найдено 274.1182  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 274.1186.

**(Е)-5-(амино(пиридин-4-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.22a).**



Синтезировано по общей методике **В**. Выход 120 мг (8%), желтый порошок, т. пл. = 159-162°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.18 (с, 3 H), 3.12 (с, 3 H), 7.83 (дд,  $J = 6.1$ , 1.6, 2 H), 8.72 (дд,  $J = 6.1$ , 1.6, 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.3, 25.9, 114.6, 123.4, 140.9, 148.1, 149.56, 149.58, 168.2.

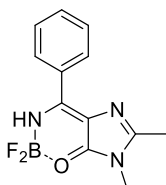
HRMS (m/z) найдено 217.1082  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}^+$ . Вычислено 217.1084.

#### 4.2.4. Синтез борированных 5-аминометиленимидазолонов

##### Общая методика С.

Полученный ранее 5-аминометиленимидазолон (0.3 ммоль) и 0.42 мл (3 ммоль) триэтиламина растворили в 5 мл сухого толуола, добавили 0,22 мл (1.8 ммоль) эфирата трехфтористого бора, полученную смесь перемешивали 2 часа при 100°C. Раствор охладили, добавили 20 мл этилацетата, после чего полученный раствор промывали водой (3×10 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (1×10 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, раствор упарили насухо, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ в качестве элюента.

##### **(E)-5-(((дифторборанил)амино)(фенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.17b).**



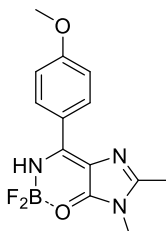
Синтезировано по общей методике С. Выход 54 мг (69%), желтый порошок, т. пл. = 230-233°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.33 (с, 3 H), 3.43 (с, 3 H), 7.59 (т, *J* = 7.5, 2 H), 7.67 (т, *J* = 7.3, 1 H), 8.21 (д, *J* = 7.2, 2 H), 9.51 (с, 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 13.4, 27.9, 112.2, 128.5, 129.7, 130.7, 132.6, 144.1, 157.9, 161.7.

HRMS (*m/z*) найдено 264.1111 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. Вычислено 264.1115.

##### **(E)-5-(((дифторборанил)амино)(4-метоксифенил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.18b).**



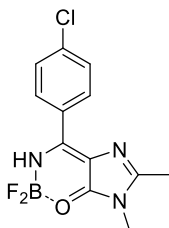
Синтезировано по общей методике С. Выход 31 мг (35%), желтый порошок, т. пл. = 208-211°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3 H), 3.42 (с, 3 H), 3.87 (с, 3 H), 7.15 (д,  $J = 8.9$ , 2 H), 8.39 (д,  $J = 8.9$ , 2 H), 9.29 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  13.3, 27.9, 55.5, 111.9, 114.0, 122.7, 132.0, 143.5, 157.4, 160.4, 162.9.

HRMS (m/z) найдено 294.1223  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$ . Вычислено 294.1220.

**(E)-5-((4-хлорофенил)((дифторборанил)амино)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.19b).**



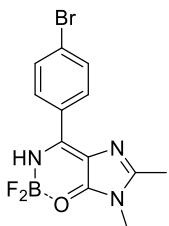
Синтезировано по общей методике С. Выход 30 мг (34%), желтый порошок, т. пл.  $\sim 218^\circ\text{C}$  с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3 H), 3.43 (с, 3 H), 7.69 (д,  $J = 8.6$ , 2 H), 8.26 (д,  $J = 8.6$ , 2 H), 9.56 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  13.4, 27.9, 112.2, 128.7, 129.4, 131.6, 137.6, 144.4, 158.1, 160.2.

HRMS (m/z) найдено 298.0723  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BClF}_2\text{N}_3\text{O}^+$ . Вычислено 298.0725.

**(E)-5-((4-бромфенил)((дифторборанил)амино)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.20b).**



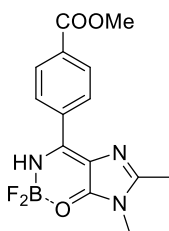
Синтезировано по общей методике С. Выход 50 мг (48%), желтый порошок, т. пл. = 228-230°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3 H), 3.43 (с, 3 H), 7.83 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 8.17 (д,  $J = 8.5$ , 2 H), 9.57 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  13.4, 28.0, 112.2, 126.7, 129.7, 131.6, 131.7, 144.4, 158.1, 160.3.

HRMS (m/z) найдено 342.0217 C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>BBrF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. [M+H]<sup>+</sup>. Вычислено 342.0219.

**Метил-(E)-4-(((дифторборанил)амино)(1,2-диметил-5-оксо-1,5-дигидро-4H-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.21b).**



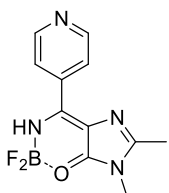
Синтезировано по общей методике С. Выход 61 мг (63%), желтый порошок, т. пл. ~260°C с разл.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.33 (с, 3 H), 3.44 (с, 3 H), 3.91 (с, 3 H), 8.13 (д, *J* = 8.6, 2 H), 8.27 (д, *J* = 8.6, 2 H), 9.68 (ушир. с., 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 13.4, 28.0, 52.5, 112.4, 129.1, 130.0, 132.7, 134.8, 144.8, 158.3, 160.6, 165.5.

HRMS (m/z) найдено 322.1167 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 322.1169.

**(E)-5-(((дифторборанил)амино)(пиридин-4-ил)метил)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.22b).**



Синтезировано по общей методике С. Выход 19 мг (24%), желтый порошок, т. пл. = 178-181°C.

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.34 (с, 3 H), 3.44 (с, 3 H), 8.07 (дд, *J* = 4.5, 1.6, 2 H), 8.84 (д, *J* = 4.5, 1.6, 2 H), 9.78 (ушир. с., 1 H).

<sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 13.4, 28.0, 112.6, 123.1, 137.8, 145.2, 150.2, 158.6, 159.5.

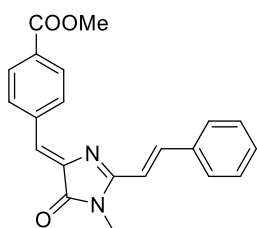
HRMS (m/z) найдено 265.1066 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sup>+</sup>. Вычислено 265.1067.

#### 4.2.5. Синтез аналогов хромофора белка *Kaede*

##### Общая методика D.

Соответствующий 2-метилимидазолон (1 ммоль), альдегид (5 ммоль) и каталитические количества пиперидина (10 мг) смешали в 5 мл сухого пиридина, полученную смесь кипятили в течение 4-24 ч (контроль по ТСХ до исчезновения 2-метилимидазолон). Раствор упаривали насухо, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ-этанол как элюент (100:1).

##### Метил-4-((Z)-(1-метил-5-оксо-2-((E)-стирил)-1,5-дигидро-4H-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.1b).



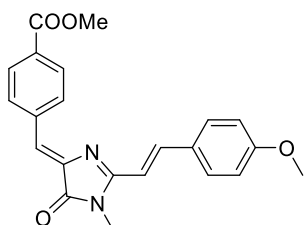
Синтезировано по общей методике D. Выход 138 мг (40%), желтый порошок, т. пл. 115-118°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.88 (с, 3 H), 7.08 (с, 1 H), 7.29 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.45 - 7.52 (м, 3 H), 7.90 (д,  $J = 7.2$ , 2 H), 8.03 (д,  $J = 8.2$ , 2 H), 8.13 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.44 (д,  $J = 8.2$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 52.3, 113.8, 122.7, 128.6, 129.0, 129.3, 129.7, 130.5, 132.1, 135.0, 139.1, 141.3, 141.6, 162.2, 165.9, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 347.1387  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 347.1390.

##### Метил-4-((Z)-(2-(4-метоксистирил)-1-метил-5-оксо-1,5-дигидро-4H-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.1c).



Синтезировано по общей методике D. Выход 145 мг (39%), желтый порошок, т. пл. 173-175°C.

Смесь E- и Z-изомеров (5:4).

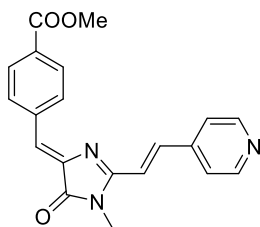
Е-изомер:  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.12 (с, 3 Н), 3.85 (с, 3 Н), 3.88 (с, 3 Н), 7.01 (с, 1 Н), 7.06 (д,  $J = 8.7$ , 2 Н), 7.12 (д,  $J = 15.7$ , 1 Н), 7.87 (м,  $J = 8.7$ , 2 Н), 7.97 - 8.06 (м, 2 Н), 8.10 (д,  $J = 15.7$ , 1 Н), 8.43 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н).

Z-изомер:  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.33 (с, 3 Н), 3.85 (с, 3 Н), 3.88 (с, 3 Н), 6.37 (д,  $J = 12.9$ , 1 Н), 6.99 (д,  $J = 8.7$ , 2 Н), 7.10 (с, 1 Н), 7.20 (д,  $J = 12.9$ , 1 Н), 7.94 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н), 7.97 - 8.06 (м, 2 Н), 8.25 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 52.3, 55.4, 110.9, 114.5, 121.6, 127.7, 129.3, 129.5, 130.5, 131.9, 139.2, 141.4, 141.6, 161.3, 162.4, 165.9, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 377.1493  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ . Вычислено 377.1496.

**Метил-4-((Z)-(1-метил-5-оксо-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-1,5-дигидро-4Н-имидазол-4-илиден)метил)бензоат (II.1d).**



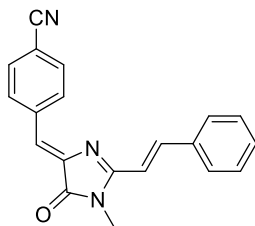
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 107 мг (31%), желтый порошок, т. пл. 162-165°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.88 (с, 3 Н), 7.15 (с, 1 Н), 7.54 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.85 (д,  $J = 5.9$ , 2 Н), 8.03 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н), 8.06 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 8.44 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н), 8.70 (д,  $J = 5.9$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 52.3, 118.5, 122.2, 124.1, 129.3, 130.0, 132.2, 138.5, 138.8, 141.0, 142.0, 150.3, 161.5, 165.8, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 348.1341  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ . Вычислено 348.1343.

**4-((Z)-(1-Метил-5-оксо-2-((E)-стирил)-1,5-дигидро-4Н-имидазол-4-илиден)метил)бензонитрил (II.2b).**



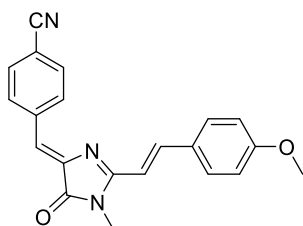
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 94 мг (30%), желтый порошок, т. пл. 228-230°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.30 (с, 3 Н), 7.09 (с, 1 Н), 7.29 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.45 - 7.52 (м, 3 Н), 7.90 (т,  $J = 8.4$ , 4 Н), 8.12 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 8.48 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 111.2, 113.8, 118.9, 121.9, 128.7, 129.0, 130.6, 132.3, 132.4, 134.9, 139.1, 141.8, 162.7, 170.0.

HRMS (m/z) найдено 314.1286  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 314.1288.

**4-((Z)-2-(4-Метоксистирил)-1-метил-5-оксо-1,5-дигидро-4Н-имидазол-4-илиден)метил) бензонитрил (II.2c).**



Синтезировано по общей методике **D**. Выход 216 мг (63%), желтый порошок, т. пл. 218-220°C.

Смесь E- и Z-изомеров (3:1).

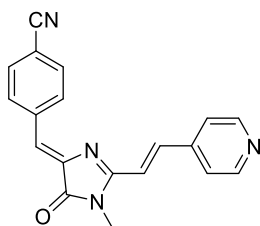
E-изомер (75%):  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.29 (с, 3 Н), 3.84 (с, 3 Н), 7.02 (с, 1 Н), 7.06 (д,  $J = 8.8$ , 2 Н), 7.13 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.84 - 7.88 (м, 2 Н), 7.90 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н), 8.09 (д,  $J = 15.6$ , 1 Н), 8.47 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н).

Z-изомер (25%):  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.12 (с, 3 Н), 3.84 (с, 3 Н), 6.36 (д,  $J = 13.0$ , 1 Н), 7.01 (д,  $J = 8.8$ , 2 Н), 7.12 (с, 1 Н), 7.20 (д,  $J = 13.0$ , 1 Н), 7.84 - 7.88 (м, 2 Н), 8.04 (д,  $J = 8.6$ , 2 Н), 8.32 (д,  $J = 8.4$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.4, 110.8, 110.9, 114.5, 118.9, 120.8, 127.6, 130.6, 132.1, 132.3, 139.2, 141.8, 141.9, 161.4, 162.9, 170.0.

HRMS (m/z) найдено 344.1390  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ . Вычислено 344.1394.

**4-((Z)-2-(1-Метил-5-оксо-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-1,5-дигидро-4Н-имидазол-4-илиден)метил)бензонитрил (II.2d).**





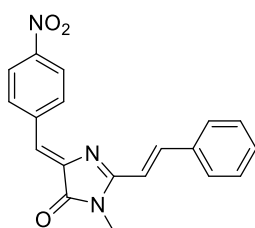
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 91 мг (29%), желтый порошок, т. пл. 250-252°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.31 (с, 3 Н), 7.16 (с, 1 Н), 7.54 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.84 (д,  $J = 5.9$ , 2 Н), 7.92 (м,  $J = 8.4$ , 2 Н), 8.05 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 8.49 (м,  $J = 8.2$ , 2 Н), 8.69 (д,  $J = 5.9$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.7, 111.5, 118.6, 118.8, 122.2, 123.3, 132.4, 132.5, 138.8, 141.6, 141.9, 150.4, 162.1, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 315.1239  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ . Вычислено 315.1240.

**3-Метил-5-((Z)-4-нитробензилиден)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.3b).**



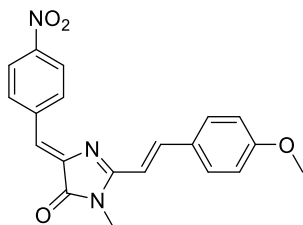
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 230 мг (69%), желтый порошок, т. пл. 240-242°C с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.31 (с, 3 Н), 7.12 (с, 1 Н), 7.30 (д,  $J = 15.9$ , 1 Н), 7.46 - 7.53 (м, 3 Н), 7.90 (д,  $J = 6.7$ , 2 Н), 8.16 (д,  $J = 15.7$ , 1 Н), 8.29 (д,  $J = 9.0$ , 2 Н), 8.56 (д,  $J = 8.7$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 113.7, 121.3, 123.7, 128.7, 129.0, 132.5, 132.7, 140.6, 141.6, 142.3, 147.1, 167.4, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 334.1185  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ . Вычислено 334.1186.

**2-((E)-4-Метоксистирил)-3-метил-5-((Z)-4-нитробензилиден)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.3c).**



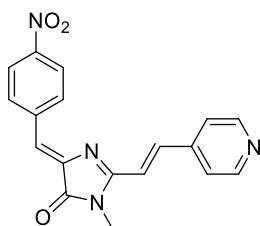
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 312 мг (86%), желтый порошок, т. пл. 208-210°C с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.29 (с, 3 Н), 3.85 (с, 3 Н), 7.04 - 7.09 (м, 3 Н), 7.13 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.87 (д,  $J = 8.6$ , 2 Н), 8.14 (д,  $J = 15.6$ , 1 Н), 8.28 (д,  $J = 9.0$ , 2 Н), 8.55 (д,  $J = 8.8$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.5, 110.8, 114.6, 120.1, 123.7, 127.6, 130.7, 132.6, 141.3, 142.3, 142.5, 146.8, 161.5, 163.5, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 364.1290  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ . Вычислено 364.1292.

**3-Метил-5-((Z)-4-нитробензилиден)-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.3d).**



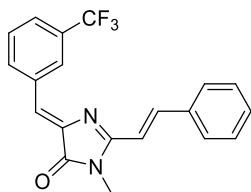
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 107 мг (32%), желтый порошок, т. пл. 258-260-164°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.32 (с, 3 Н), 7.21 (с, 1 Н), 7.56 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 7.84 (д,  $J = 5.7$ , 2 Н), 8.10 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 8.30 (д,  $J = 8.8$ , 2 Н), 8.58 (д,  $J = 8.8$ , 2 Н), 8.70 (д,  $J = 5.7$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.7, 118.5, 122.2, 122.5, 123.7, 132.9, 139.1, 140.8, 141.8, 142.0, 147.2, 150.4, 162.6, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 335.1138  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ . Вычислено 335.1139.

**3-Метил-2-((E)-стирил)-5-((Z)-3-(трифторметил)бензилиден)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.4b).**



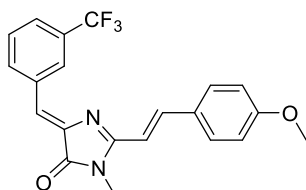
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 163 мг (46%), желтый порошок, т. пл. 138-140°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.30 (с, 3 Н), 7.15 (с, 1 Н), 7.29 (д,  $J = 15.6$ , 1 Н), 7.44 - 7.52 (м, 3 Н), 7.71 (т,  $J = 7.7$ , 1 Н), 7.73 - 7.78 (м, 1 Н), 7.86 (д,  $J = 7.2$ , 2 Н), 8.04 (д,  $J = 15.8$ , 1 Н), 8.64 (д,  $J = 7.8$ , 1 Н), 8.70 (с, 1 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 113.8, 122.4, 124.0 (кв,  $J = 272.1$ ), 125.6 (д,  $J = 3.3$ ), 128.0 (д,  $J = 3.7$ ), 128.4, 128.9, 129.4 (кв,  $J = 31.9$ ), 129.6, 130.3, 134.8, 135.3, 135.4, 140.7, 141.1, 161.8, 169.8.

HRMS (m/z) найдено 357.1206  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$ . Вычислено 357.1209.

**2-(4-Метоксистирил)-3-метил-5-((Z)-3-(трифторметил)бензилиден)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.4c).**



Синтезировано по общей методике **D**. Выход 154 мг (40%), желтый порошок, т. пл. 153-155°C.

Смесь E- и Z-изомеров (5:2).

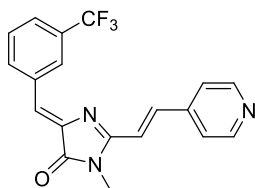
E-изомер:  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.29 (с, 3 H), 3.84 (с, 3 H), 7.05 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 7.09 (с, 1 H), 7.12 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 7.70 (т,  $J = 7.7$ , 1 H), 7.73 (м, 1 H), 7.82 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 8.01 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 8.63 (д,  $J = 7.6$ , 1 H), 8.68 (с, 1 H).

Z-изомер:  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.12 (с, 3 H), 3.80 (с, 3 H), 6.34 (д,  $J = 13.0$ , 1 H), 6.94 (д,  $J = 9.0$ , 2 H), 7.16 (д,  $J = 13.0$ , 1 H), 7.18 (с, 1 H), 7.64 (т,  $J = 7.8$ , 1 H), 7.74 (м, 1 H), 8.04 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 8.42 (д,  $J = 8.0$ , 1 H), 8.57 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 55.3, 111.0, 113.4, 114.5, 121.5, 124.1 (д,  $J = 272.4$ ), 125.5 (д,  $J = 4.0$ ), 127.6, 128.0 (д,  $J = 3.3$ ), 129.4 (д,  $J = 31.8$ ), 129.6, 130.4, 132.5, 135.2, 135.6, 140.9, 141.2, 161.3, 162.1, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 387.1314  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ . Вычислено 387.1315.

**3-Метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-5-((Z)-3-(трифторметил)бензилиден)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.4d).**



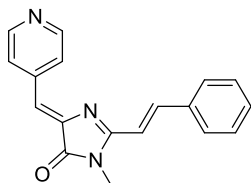
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 117 мг (33%), желтый порошок, т. пл. 170-172°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  7.22 (с, 1 H), 7.53 (д,  $J = 16.0$ , 1 H), 7.71 (т,  $J = 7.8$ , 1 H), 7.75 - 7.78 (м, 1 H), 7.80 (д,  $J = 5.9$ , 2 H), 7.96 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.62 - 8.71 (м, 4 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 118.6, 122.0, 123.8, 123.9 (д,  $J = 272.5$ ), 126.0 (д,  $J = 3.7$ ), 128.3 (кв,  $J = 4.0$ ), 129.5 (д,  $J = 31.9$ ), 129.7, 135.2, 135.5, 138.2, 140.5, 141.7, 150.3, 161.3, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 358.1161  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 358.1162.

**(Z)-4-((Пиридин-4-ил)метилен)-1-метил-2-(E)-стирил-1H-имидазол-5(4H)-он (II.5b).**



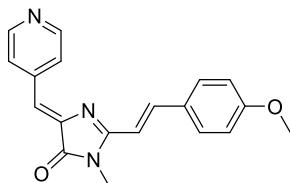
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 115 мг (40%), желтый порошок, т. пл. 201-203°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.33 (с, 3H), 7.13 (с, 1 H), 7.36 (д,  $J = 15.7$ , 1 H), 7.50 - 7.55 (м, 3 H), 7.89 - 7.96 (м, 2 H), 8.29 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.73 (д,  $J = 6.5$ , 2 H), 8.87 (д,  $J = 6.6$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 113.7, 120.9, 125.1, 128.6, 128.9, 130.5, 134.8, 141.2, 142.0, 142.9, 150.0, 162.9, 169.8.

HRMS (m/z) найдено 290.1292  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 290.1288.

**Z)-4-((Пиридин-4-ил)метилен)-1-метил-2-((E)-2-(4-метоксифенил)винил)-1H-имидазол-5(4H)-он (II.5c).**



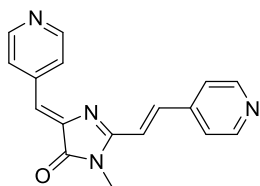
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 81 мг (25%), желтый порошок, т. пл. 223-225°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.32 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 7.07 - 7.11 (м, 3 H), 7.21 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 7.91 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 8.29 (д,  $J = 15.5$ , 1 H), 8.78 (д,  $J = 6.7$ , 2 H), 8.87 (д,  $J = 6.8$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.4, 110.8, 114.5, 119.9, 125.0, 127.6, 130.6, 141.3, 142.1, 143.1, 150.0, 161.4, 163.2, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 320.1394,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ . Вычислено 320.1397.

**(Z)-4-((Пиридин-4-ил)метилден)-1-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-1H-имидазол-5(4H)-он (II.5d).**



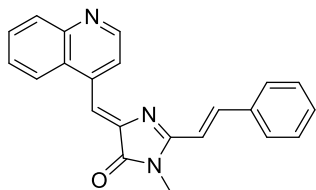
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 132 мг (46%), желтый порошок, т. пл. 255°C с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.31 (с, 3 H), 7.07 (с, 1 H), 7.54(д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.86 (д,  $J = 5.9$ , 2 H), 8.09 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.20(д,  $J = 5.9$ , 2 H), 8.66 - 8.71 (м, 4 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 118.3, 121.9, 122.2, 124.9, 138.9, 140.8, 141.7, 142.5, 149.9, 150.2, 162.2, 169.5.

HRMS (m/z) найдено 291.1244  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}$ . Вычислено 291.1240.

**(Z)-3-Метил-5-(хинолин-4-илметилден)-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.6b).**



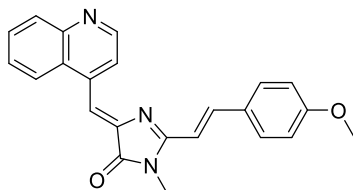
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 278 мг (82%), желтый порошок, т. пл. 218-220°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.34 (с, 3 H), 7.32 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.46 - 7.52 (м, 3 H), 7.68 - 7.73 (м, 2 H), 7.82 (т,  $J = 7.5$ , 1 H), 7.92 (д,  $J = 6.9$ , 2 H), 8.09 (д,  $J = 8.2$ , 1 H), 8.18 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.40 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 8.87 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 9.05 (д,  $J = 4.6$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.7, 113.7, 115.9, 123.2, 126.1, 127.4, 128.8, 129.0, 129.5, 129.9, 130.7, 134.9, 137.6, 142.4, 143.5, 148.3, 150.3, 163.8, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 340.1441  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 340.1444.

**(Z)-2-((E)-4-Метоксистирил)-3-метил-5-(хинолин-4-илметилен)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.6c).**



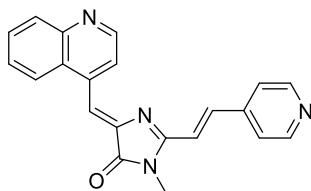
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 195 мг (53%), желтый порошок, т. пл. 205-208°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.33 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 7.06 (м,  $J = 8.6$ , 2 H), 7.16 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 7.64 (с, 1 H), 7.71 (т,  $J = 7.5$ , 1 H), 7.82 (т,  $J = 7.6$ , 1 H), 7.89 (д,  $J = 8.6$ , 2 H), 8.08 (д,  $J = 8.2$ , 1 H), 8.16 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 8.40 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 8.89 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 9.04 (д,  $J = 4.6$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 55.4, 110.8, 114.5, 114.7, 123.1, 123.2, 126.1, 127.3, 127.6, 129.4, 129.9, 130.8, 137.7, 142.6, 143.7, 148.3, 150.4, 161.5, 164.1, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 370.1547  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ . Вычислено 370.1550.

**(Z)-3-Метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-5-(хинолин-4-илметилен)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.6d).**



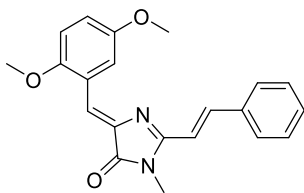
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 54 мг (16%), желтый порошок, т. пл. 225-227°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.36 (с, 3 H), 7.58 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.73 (т,  $J = 7.6$ , 1 H), 7.78 (с, 1 H), 7.84 (т,  $J = 7.5$ , 1 H), 7.86 (д,  $J = 5.5$ , 2 H), 8.08 - 8.13 (м, 2 H), 8.42 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 8.70 (д,  $J = 5.5$ , 2 H), 8.83 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 9.06 (д,  $J = 4.4$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.7, 117.5, 118.5, 120.8, 122.2, 123.3, 123.3, 127.4, 129.5, 129.9, 137.4, 139.3, 141.8, 143.3, 148.3, 150.3, 150.4, 163.2, 169.7.

HRMS (m/z) найдено 341.1394  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$ . Вычислено 341.1397.

**5-((Z)-2,5-Диметоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.7b).**



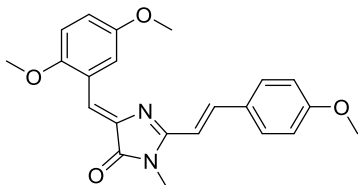
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 132 мг (38%), желтый порошок, т. пл. 185-188°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.29 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 7.00 - 7.05 (м, 2 H), 7.27 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.35 (с, 1 H), 7.44 - 7.50 (м, 3 H), 7.84 (д,  $J = 7.2$ , 2 H), 7.97 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.58 (д,  $J = 2.3$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.3, 56.2, 112.4, 114.1, 116.2, 117.7, 117.9, 123.3, 128.5, 129.0, 130.3, 135.0, 139.1, 140.3, 153.0, 153.2, 160.5, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 349.1543  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 349.1547.

**5-((Z)-2,5-Диметоксибензилиден)-2-((E)-4-метоксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.7c).**



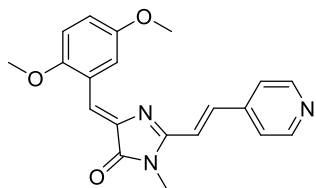
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 227 мг (60%), желтый порошок, т. пл. 178-180°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.27 (с, 3 H), 3.82 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 7.00 - 7.05 (м, 4 H), 7.10 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.31 (с, 1 H), 7.80 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 7.94 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.58 (д,  $J = 2.7$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 55.3, 55.4, 56.1, 111.3, 112.3, 114.5, 116.2, 116.8, 117.6, 123.4, 127.7, 130.3, 139.2, 140.3, 153.0, 153.1, 160.8, 161.1, 170.1.

HRMS (m/z) найдено 379.1651  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ . Вычислено 379.1652.

**5-((Z)-2,5-Диметоксибензильден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.7d).**



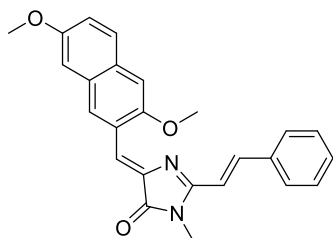
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 261 мг (75%), желтый порошок, т. пл. 218-220°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.82 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 7.05 (с, 2 H), 7.41 (с, 1 H), 7.51 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.79 (д,  $J = 5.7$ , 2 H), 7.90 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 8.53 (с, 1 H), 8.67 (д,  $J = 5.7$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.3, 56.1, 112.4, 116.3, 118.2, 118.8, 119.0, 122.1, 123.0, 137.3, 138.9, 142.0, 150.3, 153.0, 153.4, 159.8, 169.9.

HRMS (m/z) найдено 350.1498  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ . Вычислено 350.1499.

**(Z)-5-((3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метилден)-3-метил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.8b).**



Синтезировано по общей методике **D**. Выход 246 мг (62%), желтый порошок, т. пл. 262-265°C.

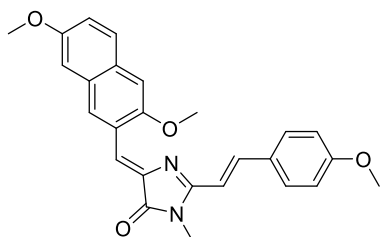
$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.91 (с, 3 H), 3.96 (с, 3 H), 7.14 - 7.20 (м, 1 H), 7.27 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 7.34 (с, 1 H), 7.42 - 7.53 (м, 5 H), 7.73 (д,  $J = 8.8$ , 1 H), 7.93 (д,  $J = 7.2$ , 2 H), 8.22 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 9.37 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.3, 55.7, 105.8, 107.2, 113.8, 117.6, 120.4, 124.3, 128.0, 128.6, 128.9, 129.1, 130.3, 131.9, 135.1, 139.8, 141.1, 154.1, 156.1, 161.1, 170.2.

HRMS (m/z) найдено 399.1701  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 399.1703.



**(Z)-5-((3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метилден)-2-((E)-4-метоксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.8c).**



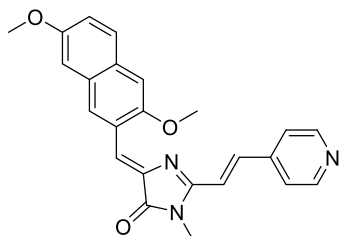
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 255 мг (60%), желтый порошок, т. пл. 223-225°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.31 (ушир. с., 3 H), 3.85 (с, 3 H), 3.92 (с, 3 H), 3.97 (с, 3 H), 7.07 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 7.14 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 7.18 (дд,  $J = 8.9$ , 2.6, 1 H), 7.35 (с, 1 H), 7.44 (с, 1 H), 7.49 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 7.74 (д,  $J = 9.0$ , 1 H), 7.92 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 8.21 (д,  $J = 15.8$ , 1 H), 9.37 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 55.3, 55.4, 55.7, 105.8, 107.2, 111.0, 114.4, 116.6, 120.3, 124.4, 127.9, 128.0, 129.1, 130.2, 130.5, 131.8, 140.0, 141.1, 154.1, 156.1, 161.2, 161.4, 170.2.

HRMS ( $m/z$ ) найдено 429.1806  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ . Вычислено 429.1809.

**(Z)-5-((3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метилден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он (II.8d).**



Синтезировано по общей методике **D**. Выход 133 мг (33%), желтый порошок, т. пл. 195-198°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.34 (с, 3 H), 3.92 (с, 3 H), 3.98 (с, 3 H), 7.20 (дд,  $J = 8.9$ , 2.4, 1 H), 7.37 (с, 1 H), 7.49 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 7.53 - 7.59 (м, 2 H), 7.75 (д,  $J = 9.0$ , 1 H), 7.89 (д,  $J = 5.7$ , 2 H), 8.18 (д,  $J = 16.0$ , 1 H), 8.70 (д,  $J = 5.7$ , 2 H), 9.37 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 55.3, 55.8, 106.0, 107.3, 119.1, 119.2, 120.6, 122.5, 124.1, 128.0, 129.1, 130.5, 132.2, 137.8, 139.6, 143.0, 149.6, 154.2, 156.1, 160.5, 170.0.

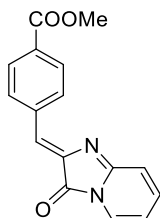
HRMS ( $m/z$ ) найдено 400.1654  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ . Вычислено 400.1656.

#### 4.2.6. Синтез ауриноподобных флуорофоров

##### Общая методика Е.

Раствор гидрохлорида имидазо[1,2-а]пиридин-3(2Н)-она (0.5 г, 2.7 ммоль) в 3 мл трихлорида фосфора кипятили 3 ч в инертной атмосфере, после чего упарили насухо. Остаток растворили в 4 мл свежеперегнанного пиридина, добавили 2 ммоль соответствующего альдегида и 0.5 мл триэтиламина. Полученный раствор перемешивали 1.5 ч, после чего упарили. Остаток растворили в 100 мл хлороформа, промыли 10% водным раствором поташа (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (2 × 50 мл), после чего высушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель упарили, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ в качестве элюента, после чего дополнительно промывали 4 мл диэтилового эфира и сушили в вакууме.

##### Метил-(Z)-4-((3-оксоимидазо[1,2-а]пиридин-2(3Н)-илиден)метил)бензоат (II.1e).



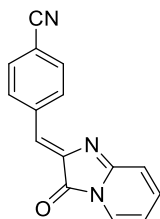
Синтезировано по общей методике Е. Выход 89 мг (16%), красный порошок, т. пл. 183-186°C с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.87 (с, 3 Н), 6.43 (т,  $J = 7.0$ , 1 Н), 7.03 (д,  $J = 9.4$ , 1 Н), 7.21 (с, 1 Н), 7.41 (ддд,  $J = 9.3$ , 6.5, 1.0, 1 Н), 7.78 (д,  $J = 6.9$ , 1 Н), 8.01 (д,  $J = 8.5$ , 2 Н), 8.39 (д,  $J = 8.3$ , 2 Н).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  52.2, 109.9, 118.4, 123.8, 126.7, 129.2, 129.8, 132.1, 139.0, 140.0, 140.0, 157.7, 165.8, 167.1.

HRMS (m/z) найдено 281.0918  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 281.0921.

##### (Z)-4-((3-Оксоимидазо[1,2-а]пиридин-2(3Н)-илиден)метил)бензонитрил (II.2e).



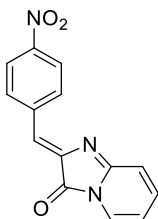
Синтезировано по общей методике Е. Выход 84 мг (17%), красный порошок, т. пл. 210-213°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  6.44 (т,  $J = 6.6$ , 1 H), 7.03 (д,  $J = 9.4$ , 1 H), 7.20 (с, 1 H), 7.43 (ддд,  $J = 9.2, 6.5, 1.1$ , 1 H), 7.79 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), 7.90 (д,  $J = 8.3$ , 2 H), 8.45 (д,  $J = 8.5$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  110.0, 111.1, 118.3, 118.8, 122.7, 126.8, 132.3, 132.3 (2 C), 139.1, 140.4, 140.6, 158.1, 167.1.

HRMS (m/z) найдено 248.0817  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 248.0818.

**(Z)-2-(4-Нитробензилиден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он (II.3e).**



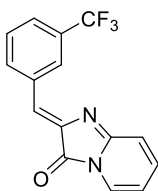
Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 110 мг (15%), темный порошок, т. пл. 255°C с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  6.46 (т,  $J = 6.7$ , 1 H), 7.05 (д,  $J = 9.3$ , 1 H), 7.25 (с, 1 H), 7.46 (ддд,  $J = 9.4, 6.3, 1.2$ , 1 H), 7.81 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), 8.29 (м,  $J = 9.0$ , 2 H), 8.52 (м,  $J = 9.0$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  110.1, 118.2, 121.8, 123.5, 126.7, 132.5, 140.6, 140.9, 141.0, 146.9, 158.4, 167.0.

HRMS (m/z) найдено 368.0719  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ . Вычислено 368.0717.

**(Z)-2-(3-(Трифторметил)бензилиден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он (II.4e).**

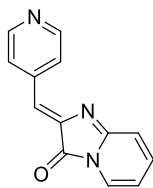


Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 99 мг (17%), красный порошок, т. пл. 175-178°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  6.43 (т,  $J = 6.6$ , 1 H), 7.04 (д,  $J = 9.3$ , 1 H), 7.30 (с, 1 H), 7.40 (ддд,  $J = 9.3, 6.3, 1.1$ , 1 H), 7.70 (т,  $J = 7.8$ , 1 H), 7.73 - 7.76 (м, 1 H), 7.78 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), 8.54 (д,  $J = 7.8$ , 1 H), 8.74 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  109.9, 118.5, 123.7, 124.0 (д,  $J = 272.4$ ), 125.9 (д,  $J = 3.7$ ), 126.6, 128.1 (д,  $J = 3.3$ ), 129.5 (д,  $J = 31.5$ ), 129.7, 135.6, 135.7, 139.6, 139.9, 157.5, 167.0.

HRMS (m/z) найдено 291.0741  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$ . Вычислено 291.0740.

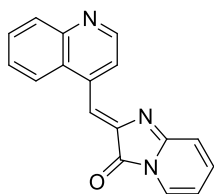
**(Z)-4-(Пиридин-4-илметилиден)-1H-имидазо[1,2-а]пиридин-5(4H)-он (II.5e).**

Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 275 мг (62 %); красный порошок, т. пл. 230 °С с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (800 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  6.44 (т,  $J = 6.6$ , 1 H), 7.02 (д,  $J = 9.3$ , 1 H), 7.10 (с, 1 H), 7.44 (дд,  $J = 8.7, 6.9$ , 1 H), 7.79 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), 8.14 (д,  $J = 5.9$ , 2 H), 8.65 (д,  $J = 5.9$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  110.1, 118.4, 121.8, 125.0, 126.9, 140.8, 141.2, 141.8, 150.1, 158.5, 167.1.

HRMS (m/z) найдено 224.0820  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 224.0818.

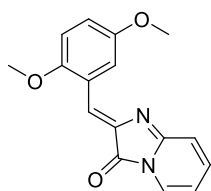
**(Z)-2-(Хинолин-4-илметилден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он (II.6e).**

Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 27 мг (5%), красный порошок, т. пл. 148-151 °С.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  6.68 (д,  $J = 8.2$ , 1 H), 6.72 (ддд,  $J = 6.6, 5.6, 0.8$ , 1 H), 7.07 (с, 1 H), 7.50 (ддд,  $J = 8.4, 7.0, 1.9$ , 1 H), 7.54 - 7.59 (м, 2 H), 7.76 (ддд,  $J = 8.2, 7.0, 1.2$ , 1 H), 8.01 - 8.05 (м, 2 H), 8.07 (д,  $J = 8.0$ , 1 H), 8.85 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 8.86 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  109.9, 114.9, 115.2, 120.5, 124.6, 125.9, 126.6, 129.5, 129.6, 134.8, 137.3, 140.2, 147.2, 148.1, 150.2, 155.3, 165.9.

HRMS (m/z) найдено 274.0974  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ . Вычислено 274.0975.

**(Z)-2-(2,5-Диметоксибензилиден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он (II.7e).**

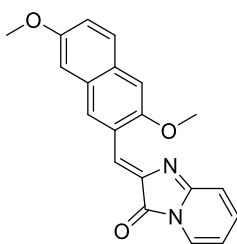
Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 124 мг (22%), красный порошок, т. пл. 180-183°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.76 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.38 - 6.43 (м, 1 H), 6.99 - 7.07 (м, 3 H), 7.35 (ддд,  $J = 9.3, 6.5, 1.0, 1$  H), 7.50 (с, 1 H), 7.76 (д,  $J = 6.9, 1$  H), 8.54 (д,  $J = 2.4, 1$  H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  55.4, 56.1, 109.7, 112.1, 117.4, 117.6, 118.6, 119.2, 123.6, 126.3, 137.9, 138.8, 153.0, 153.3, 156.1, 166.8.

HRMS (m/z) найдено 283.1074  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 283.1077.

**(Z)-2-((3,7-Диметоксинафтален-2-ил)метиленимидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он**  
**(II.8e).**



Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 33 мг (5%), красный порошок, т. пл. 273°C с разл.

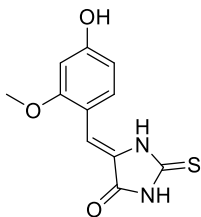
$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.89 (с, 3 H), 3.98 (с, 3 H), 6.44 (т,  $J = 6.4, 1$  H), 7.08 (д,  $J = 9.3, 1$  H), 7.18 (дд,  $J = 8.9, 2.0, 1$  H), 7.27 (д,  $J = 2.1, 1$  H), 7.36 (с, 1 H), 7.40 (т,  $J = 7.7, 1$  H), 7.63 (с, 1 H), 7.74 (д,  $J = 8.8, 1$  H), 7.80 (д,  $J = 6.7, 1$  H), 9.32 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  55.1, 55.7, 105.8, 106.7, 109.7, 118.4, 119.1, 120.5, 124.5, 126.4, 127.9, 129.0, 130.3, 132.2, 138.5, 139.0, 154.1, 156.1, 156.6, 166.8.

HRMS (m/z) найдено 333.1236  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ . Вычислено 333.1234.

#### 4.2.7. Синтез метилсульфанилвинильных имидазолонов

##### **(Z)-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-тиоксо-имидазолидин-4-он.**



В 15 мл уксусной кислоты растворили 0.988 г (6.5 ммоль) 4-гидрокси-2-метоксибензальдегида, 580 мг (5.0 ммоль) 2-тиоксоимидазолин-4-она и 1.76 г (21.5 ммоль) ацетата натрия, полученную смесь кипятили в течение 3 ч и охладили до комнатной температуры. Добавили при интенсивном перемешивании 50 мл воды, выпавший осадок фильтровали, промывали водой (20 мл) и диэтиловым эфиром (10 мл), после чего высушили при пониженном давлении.

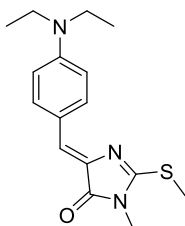
Выход 1.06 г (85%), желтый порошок, т. пл. 265 °С (с разл.).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.81 (с, 3 H), 6.42 (дд,  $J = 8.5, 2.0$ , 1 H), 6.45 (д,  $J = 2.1$ , 1 H), 6.69 (с, 1 H), 7.65 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 10.10 (ушир. с., 1 H), 11.81 (ушир. с., 1 H), 12.17 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  55.6, 99.0, 107.2, 108.0, 112.1, 125.0, 131.5, 159.5, 161.0, 165.9, 177.8.

Найдено, m/z: 249.0337 [M-H]<sup>-</sup>.  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ . Вычислено, m/z: 249.0339.

##### **(Z)-5-(4-(диэтиламино)бензилиден)-3-метил-2-(метилсульфанил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он.**



825 Мг (3.0 ммоль) 5-(4-(диэтиламино)бензилиден)-2-тиоксоимидазолидин-4-она растворили в 30 мл ацетонитрила, добавили 1.70 г (12.0 ммоль) йодметана и 1.66 г (12.0 ммоль) поташа, полученную смесь кипятили 8 ч, охладили, добавили 200 мл этилацетата и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (3 × 50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт очищали методом колоночной хроматографии,

используя хлороформ в качестве элюента. Выход 645 мг (71%), красный порошок, т. пл. 163-165°C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.12 (т,  $J = 7.1$ , 6 H), 2.69 (с, 3 H), 3.06 (с, 3 H), 3.42 (к,  $J = 7.1$ , 4 H), 6.72 (д,  $J = 9.2$ , 2 H), 6.76 (с, 1 H), 8.05 (д,  $J = 8.4$ , 2 H).

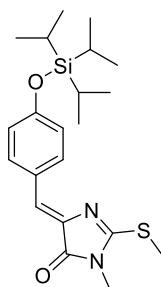
$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.4, 12.5, 26.2, 43.8, 111.1, 120.9, 124.3, 133.9, 134.0, 148.7, 160.9, 168.9.

Найдено,  $m/z$ : 304.1474  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{OS}$ . Вычислено,  $m/z$ : 304.1478.

### Общая методика F.

3.0 Ммоль (Z)-5-(4-гидроксипенцилиден)-2-тиоксоимида-золидин-4-она или (Z)-5-(4-гидрокси-2-метоксибенцилиден)-2-тиоксо-имидазолидин-4-она растворили в 50 мл ТГФ, добавили 0.64 г (3.3 ммоль) триизопропилсилилхлорида, 0.49 г (3.6 ммоль) DIPEA и 10 мг имидазола. Полученный раствор перемешивали 24 ч, упарили, добавили 200 мл этилацетата и промывали насыщенным раствором хлорида натрия ( $3 \times 50$  мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали. Без дальнейшей очистки остаток растворили в 30 мл ацетонитрила, добавили 1.7 г (12.0 ммоль) йодметана и 1.66 г (12.0 ммоль) поташа, полученную смесь кипятили 8 ч, охладили, разбавили 200 мл этилацетата и промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия ( $3 \times 50$  мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ в качестве элюента.

### (Z)-3-метил-2-(метилсульфанил)-5-(4-((триизопропил-силил)окси)бенцилиден)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он.



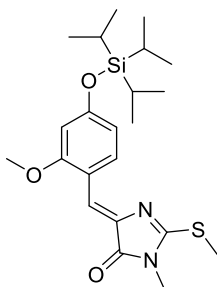
Синтезировано по общей методике F. Выход 820 мг (69%), желтый порошок, т. пл. 160-163 °C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.07 (д,  $J = 7.3$ , 18 H), 1.27 (септет,  $J = 7.3$ , 3 H), 2.72 (с, 3 H), 3.08 (с, 3 H), 6.83 (с, 1 H), 6.94 (д,  $J = 8.7$ , 2 H), 8.16 (д,  $J = 8.8$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.1, 12.5, 17.7, 26.3, 120.0, 122.1, 126.5, 133.8, 136.7, 157.1, 161.7, 170.9.

Найдено,  $m/z$ : 405.2022  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2\text{SSi}$ . Вычислено,  $m/z$ : 405.2027.

**(Z)-5-(2-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензилиден)-3-метил-2-(метилсульфанил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он.**



Синтезировано по общей методике **Ф**. Выход 950 мг (73%), желтый порошок, т. пл. 152-154 °С.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.10 (д,  $J = 7.4$ , 18 H), 1.31 (септет,  $J = 7.5$ , 3 H), 2.71 (с, 3 H), 3.08 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.51 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 6.58 (дд,  $J = 8.5$ , 2.2, 1), 7.15 (с, 1 H), 8.74 (д,  $J = 8.8$ , 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.0, 12.4, 17.6, 26.2, 55.7, 102.9, 112.1, 115.3, 116.2, 133.1, 136.0, 158.8, 159.8, 164.0, 168.9.

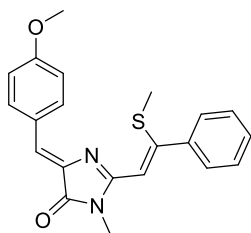
Найдено,  $m/z$ : 435.2129  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSi}$ . Вычислено,  $m/z$ : 435.2132.

#### **Общая методика реакции кросс-сочетания Г.**

В атмосфере аргона смешали 1 ммоль 2-метилсульфанилимидазолон, 2 ммоль алкина, 41 мг (0.05 ммоль)  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 190 мг (1 ммоль) йодида меди (I) и 2.58 г (20 ммоль) DIPEA. Смесь нагревали при 100 °С на масляной бане в течение 12 часов, охладили и отфильтровали. К фильтрату добавили 200 мл этилацетата, раствор промыли насыщенным водным раствором хлорида натрия (3  $\times$  50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали. В случае соединений **II.26-28** промежуточный силилированный продукт без дополнительной очистки растворили в 10 мл ТГФ, добавили 630 мг (2 ммоль)  $\text{Bu}_4\text{NF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и перемешивали 3 часа, затем добавили 100 мл этилацетата, промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (3  $\times$  30 мл), органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали. Конечный продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя хлороформ (в случае соединений **II.23a-c**, **II.24**, **II.25**) или смесь хлороформ - этанол (20:1) (для соединений **II.26-28**) в качестве элюента.



**5-((Z)-4-метоксибензилиден)-3-метил-2-(2-(метилсульфанил)-2-фенилвинил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.23a).**



Синтезировано по общей методике **Г**. Выход 164 мг (45%), желтый порошок, т. пл. 158-160°C.

Z-изомер (34%):  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.02 (с, 3 H), 3.15 (с, 3 H), 3.84 (с, 3 H), 6.41 (с, 1 H), 7.04 (с, 1 H), 7.05 (д,  $J = 8.8$ , 2 H), 7.44 (д,  $J = 7.1$ , 2 H), 7.45 - 7.52 (м, 3 H), 8.37 (д,  $J = 8.6$ , 2 H).

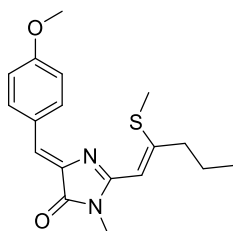
$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  17.0, 26.1, 55.4, 110.2, 113.7, 114.4, 124.7, 127.3, 128.3, 128.7, 133.9, 137.6, 138.7, 157.3, 158.1, 160.8, 169.4.

E-изомер (11%):  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.57 (с, 3 H), 3.19 (с, 3 H), 3.80 (с, 3 H), 6.11 (с, 1 H), 6.74 (с, 1 H), 6.76 (д,  $J = 8.6$ , 2 H), 7.35 (д,  $J = 7.2$ , 2 H), 7.35 - 7.54 (м, 5 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.8, 26.1, 55.2, 105.2, 113.7, 123.8, 127.2, 128.0, 128.1, 128.5, 133.8, 137.5, 138.4, 156.5, 157.1, 160.6, 169.3.

Найдено,  $m/z$ : 365.1318  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ . Вычислено,  $m/z$ : 365.1318.

**5-((Z)-4-метоксибензилиден)-3-метил-2-((Z)-2-(метилсульфанил)пент-1-ен-1-ил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.23b).**



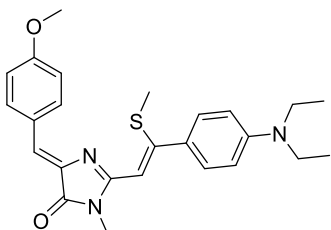
Синтезировано по общей методике **Г**. Выход 207 мг (63%), желтый порошок, т. пл. 141-143 °C.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.01 (т,  $J = 7.3$ , 3 H), 1.61 - 1.66 (м, 2 H), 2.48 (с, 3 H), 2.63 - 2.67 (м, 2 H), 3.12 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 6.34 (с, 1 H), 6.93 (с, 1 H), 7.02 (д,  $J = 9.0$ , 2 H), 8.30 (д,  $J = 8.6$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  13.2, 14.2, 22.6, 25.9, 38.2, 55.2, 114.1, 123.2, 127.3, 133.3, 133.5, 137.7, 157.4, 160.1, 160.4, 169.4.

Найдено,  $m/z$ : 331.1475  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ . Вычислено,  $m/z$ : 331.1475.

**2-((Z)-2-(4-(Диэтиламино)фенил)-2-(метилсульфанил)винил)-5-((Z)-4-метоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.23с).**



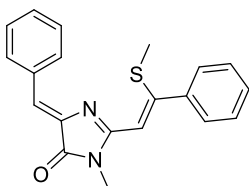
Синтезировано по общей методике **Г**. Выход 48%, красный порошок, т. пл. 161-163 °С.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.04 (т,  $J = 7.0$ , 3 H), 1.13 (т,  $J = 7.0$ , 3 H), 2.74 (с, 3 H), 3.10 (с, 3 H), 3.32 (кв,  $J = 7.0$ , 2 H), 3.42 (кв,  $J = 7.0$ , 2 H), 6.59 (д,  $J = 9.0$ , 1 H), 6.74 (д,  $J = 9.0$ , 1 H), 6.87 (с, 1 H), 7.04 (д,  $J = 11.3$ , 1 H), 7.14 (д,  $J = 18.9$ , 1 H), 7.38 - 7.42 (м, 1 H) 7.42 - 7.50 (м, 4 H), 7.75 (д,  $J = 9.0$ , 1 H), 8.20 - 8.29 (м, 4 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.4, 12.5, 26.3, 26.6, 28.1, 43.5, 43.7, 110.7, 111.2, 121.9, 128.6, 129.6, 131.6, 132.1, 132.3, 134.2, 137.2, 138.3, 139.0, 147.7, 147.9, 166.2, 168.9.

Найдено,  $m/z$ : 436.2050  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ . Вычислено,  $m/z$ : 436.2053.

**5-((Z)-бензилиден)-3-метил-2-((Z)-2-(метилсульфанил)-2-фенилвинил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.24).**



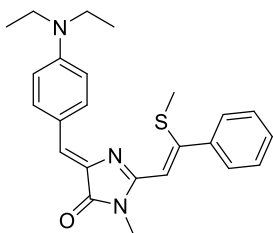
Синтезировано по общей методике **Г**. Выход 184 мг (55%), желтый порошок, т. пл. 158-160 °С.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.45 (с, 3 H), 2.76 (с, 3 H), 7.02 (с, 1 H), 7.22 (д,  $J = 7.4$ , 2 H), 7.25 (с, 1 H), 7.26 (т,  $J = 7.2$ , 1 H), 7.32 (т,  $J = 7.5$ , 2 H), 7.42 - 7.52 (м, 3 H), 8.22 (д,  $J = 6.9$ , 2 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.9, 26.5, 125.8, 127.4, 128.1, 128.3, 128.6, 128.7, 130.5, 130.6, 132.3, 133.6, 134.9, 138.1, 160.7, 169.3.

Найдено,  $m/z$ : 335.1208  $[M+H]^+$ .  $C_{20}H_{19}N_2OS$ . Вычислено,  $m/z$ : 335.1213.

**5-((Z)-4-(диэтиламино)бензилиден)-3-метил-2-((Z)-2-(метилсульфанил)-2-фенилвинил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.25).**



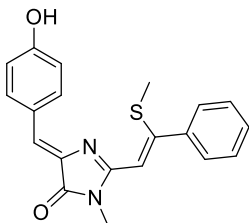
Синтезировано по общей методике **G**. Выход 278 мг (69%), красный порошок, т. пл. 174-176 °С.

$^1H$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.14 (т,  $J = 7.0$ , 6 H), 2.01 (с, 3 H), 3.14 (с, 3 H), 3.44 (к,  $J = 7.0$ , 4 H), 6.39 (с, 1 H), 6.74 (д,  $J = 9.0$ , 2 H), 6.95 (с, 1 H), 7.41 - 7.48 (м, 3 H), 7.48 - 7.53 (м, 2 H), 8.21 (ушир. с., 2 H).

$^{13}C$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.4, 16.7, 25.9, 43.6, 110.6, 111.2, 121.3, 126.4, 128.2, 128.4, 128.5, 134.2, 134.8, 138.8, 148.8, 154.7, 155.2, 169.0.

Найдено,  $m/z$ : 406.1943  $[M+H]^+$ .  $C_{24}H_{28}N_3O_2S$ . Вычислено,  $m/z$ : 406.1948.

**5-((Z)-4-гидоксибензилиден)-3-метил-2-((Z)-2-(метилсульфанил)-2-фенилвинил)-3,5-дигидро-4H-имидазолон-4-он (II.26).**



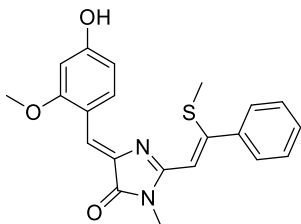
Синтезировано по общей методике **G**. Выход 168 мг (48%), оранжевый порошок, т. пл. 160-162 °С.

$^1H$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.01 (с, 3 H SCH<sub>3</sub>), 3.14 (с, 3 H), 6.41 (с, 1 H), 6.86 (д,  $J = 9.0$ , 2 H), 6.99 (с, 1 H), 7.42 - 7.48 (м, 3 H), 7.51 (д,  $J = 7.4$ , 2 H), 8.25 (д,  $J = 8.2$ , 2 H), 10.11 (с, 1 H).

$^{13}C$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  16.9, 26.0, 110.3, 115.8, 125.3, 125.8, 128.1, 128.2, 128.6, 134.2, 136.8, 138.7, 155.9, 156.5, 157.4, 159.6, 169.3.

Найдено,  $m/z$ : 351.1154  $[M+H]^+$ .  $C_{20}H_{19}N_2O_2S$ . Вычислено,  $m/z$ : 351.1162.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((Z)-2-(метилсульфанил)-2-фенилвинил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.27).**



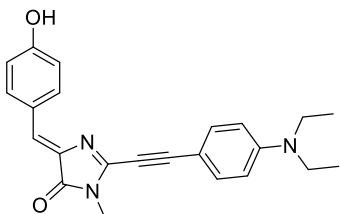
Синтезировано по общей методике **G**. Выход 205 мг (54%), оранжевый порошок, т. пл. 173-175 °С с разл.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.00 (с, 3 H SCH<sub>3</sub>), 3.14 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.39 (с, 1 H), 6.44 - 6.49 (м, 2 H), 6.51 (д. д.,  $J = 8.7, 2.0, 1$  H), 7.32 - 7.38 (м, 2 H), 7.41 - 7.47 (м, 2 H), 7.47 - 7.51 (м, 2 H), 8.98 (д,  $J = 8.8, 1$  H), 10.25 (с, 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  16.8, 26.0, 55.6, 98.6, 108.7, 110.4, 118.5, 127.8, 128.1, 128.3, 128.7, 133.7, 136.0, 138.7, 155.4, 156.2, 160.4, 161.6, 169.4.

Найдено,  $m/z$ : 381.1262 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S. Вычислено,  $m/z$ : 381.1267.

**(Z)-2-((4-(диэтиламино)фенил)этинил)-5-(4-гидроксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (II.28).**



Синтезировано по общей методике **G**. Темно-красный порошок (64 мг, 57%), т. пл. 188-190°С.

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.12 (т,  $J = 7.0, 6$  H), 3.21 (с, 3 H), 3.41 (кв.,  $J = 6.9, 4$  H), 6.73 (д,  $J = 9.0, 2$  H), 6.87 (д,  $J = 8.8, 2$  H), 6.99 (с, 1 H), 7.51 (д,  $J = 8.8, 2$  H), 8.10 (д,  $J = 8.6, 2$  H), 10.24 (ушир. с., 1 H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  27.0, 43.8, 78.4, 102.6, 103.6, 111.3, 115.9, 125.4, 127.4, 134.2, 134.6, 136.4, 146.2, 149.1, 160.1, 168.5.

HRMS ( $m/z$ ) найдено 374.1864 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено 374.1863.

### 4.3. Исследование оптических свойств полученных соединений

Для всех соединений **П.1а-8е** проводились исследования абсорбции и эмиссии в пяти основных растворителях – воде, этаноле, ацетонитриле, этилацетате и диоксане. Расчет квантового выхода флуоресценции проводился в соответствии с литературной методикой.[165] Для соединений **П.1а-П.8а** и **П.6а** в качестве стандарта использовался сульфат хинина дигидрат, для **П.1е- П.8е** – краситель Rhodamine 6G, для всех остальных - Coumarin 153. Все измерения производились для 3-4 различных концентраций (3-20 мкМ). Расчет квантового выхода проводился по формуле

$$\Phi_x = \Phi_{st.} \times \frac{F_x}{F_{st.}} \times \frac{f_x}{f_{st.}} \times \frac{n_x^2}{n_{st.}^2}$$

где  $F$  – площадь под пиком эмиссии,  $f$  фактор абсорбции,  $n$  – показатель преломления,  $\Phi$  – квантовый выход, подпись  $x$  соответствует новому соединению,  $st$  – стандарту. Фактор абсорбции рассчитывается по формуле

$$f = 1 - 10^{-A}$$

где  $A$  – значение абсорбции на длине волны возбуждения.

## 5. Выводы

1) Синтезирована серия новых производных хромофора GFP с различными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Показано, что введение в бензилиденовый фрагмент акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к усилению сольватохромизма и многократному увеличению интенсивности флуоресценции в апротонных средах.

2) Создана серия производных хромофора белка *Kaede* и ауриновых соединений с аналогичными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Показано что данные соединения также демонстрируют достаточно высокий квантовый выход флуоресценции в апротонных средах.

3) Разработаны новые подходы к синтезу 5-аминометилбензилиденимидазолонов и их борированных производных. Показано, что введение аминогруппы не приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии, однако позволяет создать стабилизированные дифторборильным мостиком 5-аминометиленимидазолны, которые демонстрируют интенсивную флуоресценцию и ярко выраженный сольватохромизм.

4) Взаимодействие 2-метилсульфанильных имидазолонов с терминальными ацетиленами приводит к образованию метилсульфанильных аналогов хромофора белка *Kaede*, которые характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.

5) Исследованы оптические свойства новых соединений, определено влияние заместителей на оптические свойства. Выявлены соединения со Стоксовыми сдвигами, превышающими 100 нм, выраженным сольватохромизмом и значительным варьированием квантового выхода флуоресценции (более чем на два порядка) в различных средах, обуславливающим потенциальную флуорогенность.

6) Полученные соединения успешно использованы как селективные маркеры для эндоплазматического ретикулума (**II.1b**, **II.1e**, **II.2b**, **II.5a\***, **II.7d**) и митохондрий (**II.5e**).

## 6. Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.х.н. Баранову Михаилу Сергеевичу за неоценимую помощь и полезные советы на протяжении всего исследовательского процесса. Автор благодарит сегодняшних и бывших сотрудников группы химии гетероциклических соединений за помощь в проведении работы и создание неповторимой рабочей атмосферы. Автор выражает благодарность руководителю лаборатории квантовой фотодинамики химического факультета МГУ к.ф.-м.н. Боченковой Анастасии Владимировне за проведение квантово-механических расчетов. Автор благодарит руководителя лаборатории биофотоники д.б.н. Лукьянова Константина Анатольевича и всех сотрудников за помощь в проведении спектроскопических и биологических экспериментов, а также руководительницу группы редокс-биологии к.б.н. Ермакову Юлию Геннадьевну за неоценимый вклад в исследования окрашивания митохондрий. Автор благодарит коллектив Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии, в том числе к.ф.-м.н. Минеева Константина Сергеевича, за регистрацию спектров ядерного магнитного резонанса.

## 7. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes with Large Solvent-Dependent Stokes Shift // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. Т. 9. № 8. С. 1958–1963.
2. Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A. V. Excited-state locked amino analogues of the green fluorescent protein chromophore with a giant Stokes shift // *RSC Adv.* 2019. Т. 9. № 66. С. 38730–38734.
3. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Pyridine analogue of fluorescent protein chromophore: Fluorogenic dye suitable for mitochondria staining // *Dye. Pigment.* 2019. Т. 170. С. 107550.
4. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core // *Dye. Pigment.* 2020. Т. 177. С. 108258.
5. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Scherbinina S.I., Zasedateleva V. V, Mineev K.S., Baranov M.S. Synthesis of methylsulfanyl analogs of *Kaede* protein chromophore // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. Т. 56. № 3. С. 399–402.
6. Зайцева С.О., Смирнов А.Ю., Зайцева Э.Р., Балеева Н.С., Баранов М.С. Синтез и оптические свойства нового аналога хромофора белка *Kaede* // *Биоорганическая химия*, 2020. Т. 46, № 1. С. 106-109.

### Тезисы докладов на конференциях

1. Смирнов А.Ю. Флуоресцентные красители на основе хромофора *Kaede* белка // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019» - М.: Издательство «Перо», 2019, с. 661.
2. Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю. Получение новых метилтиовинилимидазолоновых красителей–аналогов хромофора флуоресцентного белка *Kaede* // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019» - М.: Издательство «Перо», 2019, с. 556.
3. Смирнов А.Ю., Баранов М.С. Новые флуоресцентные красители на основе хромофора *Kaede* белка // Материалы XXXI Зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". - М.: ИБХ РАН - 2019 г., с. 89.



## 8. Список сокращений и условных обозначений

GFP	Зеленый флуоресцентный белок
Имидазолон	5-бензилиден-3,5-дигидро-4 <i>H</i> -имидазол-4-он
ACQ	aggregation-caused quenching
AIE	aggregation-induced emission
Оксазолон	5-бензилиден-3,5-дигидро-4 <i>H</i> -оксазол-4-он
CuTC	Тиофен-2-карбоксилат меди
EWG	Электронакцепторная группа
КВФ	Квантовый выход флуоресценции
DIPEA	Диизопропилэтиламин
dppf	1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен
TBAF	Фторид тетрабутиламмония
ТГФ	Тетрагидрофуран
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
ЭПР	Эндоплазматический ретикулум
TMRM	перхлорат метилового эфира тетраметилродамина
DMCO	Диметилсульфоксид
TMC	Тетраметилсилан
HRMS	Масс-спектрометрия высокого разрешения

## 9. Список литературы

1. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L. V, Tolbert L.M., Yampolsky I. V, Solntsev K.M. Conformationally Locked Chromophores as Models of Excited-State Proton Transfer in Fluorescent Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 13. С. 6025–6032.
2. Albrecht C. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition, Joseph R. Lakowicz, editor. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. T. 390. № 5. С. 1223–1224.
3. Jablonski A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes // *Nature*. 1933. T. 131. № 3319. С. 839–840.
4. Jabłoński A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren // *Zeitschrift für Phys.* 1935. T. 94. № 1. С. 38–46.
5. Klymchenko A.S. Solvatochromic fluorescent dyes as universal tools for biological research. // *Actual. Chim.* 2012. T. 359. С. 20–26.
6. Loving G.S., Sainlos M., Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. // *Trends Biotechnol.* 2010. T. 28. № 2. С. 73–83.
7. Klymchenko A.S., Mely Y. Chapter Two - Fluorescent Environment-Sensitive Dyes as Reporters of Biomolecular Interactions // *Fluorescence-Based Biosensors* / ed. Morris M.C.B.T.-P. in M.B. and T.S. 2013. T. 113.
8. Wouters F.S., Verveer P.J., Bastiaens P.I.H. Imaging biochemistry inside cells. // *Trends Cell Biol.* 2001. T. 11. № 5. С. 203–211.
9. Kamlet M.J., Abboud J.L., Taft R.W. The solvatochromic comparison method. 6. The .pi.\* scale of solvent polarities // *J. Am. Chem. Soc.* 1977. T. 99. № 18. С. 6027–6038.
10. Kamlet M.J., Abboud J.L.M., Abraham M.H., Taft R.W. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, .pi.\*, .alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation // *J. Org. Chem.* 1983. T. 48. № 17. С. 2877–2887.
11. Klymchenko A.S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications // *Acc. Chem. Res.* 2017. T. 50. № 2. С. 366–375.
12. Kucherak O.A., Didier P., Mely Y., Klymchenko A.S. Fluorene Analogues of Prodan with Superior Fluorescence Brightness and Solvatochromism. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2010. T. 1. № 3. С. 616–620.
13. Niko Y., Didier P., Mely Y., Konishi G., Klymchenko A.S. Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. // *Sci.*

- Rep.* 2016. T. 6. C. 18870.
14. Jin T., García-López V., Chiang P.-T., Kuwahara S., Tour J.M., Wang G. Enhancing Photostability of Fluorescent Dye-Attached Molecular Machines at Air–Glass Interface Using Cyclooctatetraene // *J. Phys. Chem. C.* 2019. T. 123. № 5. C. 3011–3018.
  15. de Silva A.P., Gunaratne H.Q.N., Gunnlaugsson T., Huxley A.J.M., McCoy C.P., Rademacher J.T., Rice T.E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches // *Chem. Rev.* 1997. T. 97. № 5. C. 1515–1566.
  16. Grabowski Z.R., Rotkiewicz K., Rettig W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures // *Chem. Rev.* 2003. T. 103. № 10. C. 3899–4032.
  17. Demchenko A.P., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A.S. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. // *Biophys. J.* 2009. T. 96. № 9. C. 3461–3470.
  18. Lingwood D., Simons K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. // *Sci. (Washington, DC, United States).* 2010. T. 327. № 5961. C. 46–50.
  19. Slavík J. Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1982. T. 694. № 1. C. 1–25.
  20. Chersi A., di Modugno F., Rosanò L. Selective 'in synthesis' labelling of peptides by fluorochromes // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1997. T. 1336. № 1. C. 83–88.
  21. Chersi A., Sezzi M.L., Romano T.F., Evangelista M., Nista A. Preparation and utilization of fluorescent synthetic peptides // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1990. T. 1034. № 3. C. 333–336.
  22. Weber G., Farris F.J. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. // *Biochemistry.* 1979. T. 18. № 14. C. 3075–3078.
  23. Harikumar K.G., Pinon D.I., Wessels W.S., Prendergast F.G., Miller L.J. Environment and mobility of a series of fluorescent reporters at the amino terminus of structurally related peptide agonists and antagonists bound to the cholecystokinin receptor. // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277. № 21. C. 18552–18560.
  24. Hiratsuka T. ATP-induced opposite changes in the local environments around Cys697 (SH2) and Cys707 (SH1) of the myosin motor domain revealed by the prodan fluorescence. // *J. Biol. Chem.* 1999. T. 274. № 41. C. 29156–29163.
  25. Shi J., Boyd A.E., Radic Z., Taylor P. Reversibly bound and covalently attached ligands induce conformational changes in the omega loop, Cys69-Cys96, of mouse acetylcholinesterase. // *J.*

- Biol. Chem.* 2001. T. 276. № 45. C. 42196–42204.
26. Nitz M., Mezo A.R., Ali M.H., Imperiali B. Enantioselective synthesis and application of the highly fluorescent and environment-sensitive amino acid 6-(2-dimethylaminonaphthoyl) alanine (DANA) // *Chem. Commun.* 2002. № 17. C. 1912–1913.
  27. Brea R.J., Vazquez M.E., Mosquera M., Castedo L., Granja J.R. Controlling Multiple Fluorescent Signal Output in Cyclic Peptide-Based Supramolecular Systems. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 6. C. 1653–1657.
  28. Bailey D.M., Hennig A., Uzunova V.D., Nau W.M. Supramolecular tandem enzyme assays for multiparameter sensor arrays and enantiomeric excess determination of amino acids. // *Chem. - A Eur. J.* 2008. T. 14. № 20. C. 6069–6077.
  29. Collot M., Bou S., Fam T.K., Richert L., Mély Y., Danglot L., Klymchenko A.S. Probing Polarity and Heterogeneity of Lipid Droplets in Live Cells Using a Push–Pull Fluorophore // *Anal. Chem.* 2019. T. 91. № 3. C. 1928–1935.
  30. Mes G.F., De Jong B., Van Ramesdonk H.J., Verhoeven J.W., Warman J.M., De Haas M.P., Horsman-Van den Dool L.E.W. Excited-state dipole moment and solvatochromism of highly fluorescent rod-shaped bichromophoric molecules. // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. T. 106. № 22. C. 6524–6528.
  31. Soujanya T., Fessenden R.W., Samanta A. Role of nonfluorescent twisted intramolecular charge transfer state on photophysical behavior of aminophthalimide dyes. // *J. Phys. Chem.* 1996. T. 100. № 9. C. 3507–3512.
  32. Eugenio V.M., Rothman D.M., Imperiali B. A new environment-sensitive fluorescent amino acid for Fmoc-based solid phase peptide synthesis // *Org. Biomol. Chem.* 2004. T. 2. № 14. C. 1965–1966.
  33. Vazquez M.E., Blanco J.B., Imperiali B. Photophysics and biological applications of the environment-sensitive fluorophore 6-N,N-Dimethylamino-2,3-naphthalimide. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. T. 127. № 4. C. 1300–1306.
  34. Loving G., Imperiali B. A Versatile Amino Acid Analogue of the Solvatochromic Fluorophore 4-N,N-Dimethylamino-1,8-naphthalimide: A Powerful Tool for the Study of Dynamic Protein Interactions. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 41. C. 13630–13638.
  35. Dattelbaum J.D., Looger L.L., Benson D.E., Sali K.M., Thompson R.B., Hellinga H.W. Analysis of allosteric signal transduction mechanisms in an engineered fluorescent maltose biosensor. // *Protein Sci.* 2005. T. 14. № 2. C. 284–291.
  36. Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular

- lipid droplets // *J. Cell Biol.* 1985. T. 100. № 3. C. 965–973.
37. Jose J., Burgess K. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. // *Tetrahedron.* 2006. T. 62. № 48. C. 11021–11037.
  38. Cohen B.E., Pralle A., Yao X., Swaminath G., Gandhi C.S., Jan Y.N., Kobilka B.K., Isacoff E.Y., Jan L.Y. A fluorescent probe designed for studying protein conformational change. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. T. 102. № 4. C. 965–970.
  39. Shinotsuka R., Oba T., Mitome T., Masuya T., Ito S., Murakami Y., Kagenishi T., Kodama Y., Matsuda M., Yoshida T., Wakamori M., Ohkura M., Nakai J. Synthesis of quinolyl-pyrrole derivatives as novel environment-sensitive fluorescent probes. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2019. T. 382. C. 111900.
  40. Kwon S., Kwon D.I., Jung Y., Kim J.H., Lee Y., Lim B., Kim I., Lee J. Indolizino[3,2-c]quinolines as environment-sensitive fluorescent light-up probes for targeted live cell imaging // *Sensors Actuators B Chem.* 2017. T. 252. C. 340–352.
  41. Zhou K., Yuan C., Dai B., Wang K., Chen Y., Ma D., Dai J., Liang Y., Tan H., Cui M. Environment-Sensitive Near-Infrared Probe for Fluorescent Discrimination of A $\beta$  and Tau Fibrils in AD Brain. // *J. Med. Chem.* 2019. T. 62. № 14. C. 6694–6704.
  42. Treibs A., Kreuzer F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen // *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1968. T. 718. № 1. C. 208–223.
  43. Loudet A., Burgess K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties // *Chem. Rev.* 2007. T. 107. № 11. C. 4891–4932.
  44. Yee M., Fas S.C., Stohlmeyer M.M., Wandless T.J., Cimprich K.A. A Cell-permeable, Activity-based Probe for Protein and Lipid Kinases // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 32. C. 29053–29059.
  45. Ferguson C.G., Bigman C.S., Richardson R.D., van Meeteren L.A., Moolenaar W.H., Prestwich G.D. Fluorogenic Phospholipid Substrate to Detect Lysophospholipase D/Autotaxin Activity // *Org. Lett.* 2006. T. 8. № 10. C. 2023–2026.
  46. Jiao L., Yu C., Uppal T., Liu M., Li Y., Zhou Y., Hao E., Hu X., Vicente M.G.H. Long wavelength red fluorescent dyes from 3,5-diiodo-BODIPYs // *Org. Biomol. Chem.* 2010. T. 8. № 11. C. 2517–2519.
  47. Rurack K., Kollmannsberger M., Daub J. Molecular Switching in the Near Infrared (NIR) with a Functionalized Boron–Dipyrrromethene Dye // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2001. T. 40. № 2. C. 385–387.
  48. Rurack K., Kollmannsberger M., Resch-Genger U., Daub J. A Selective and Sensitive

- Fluoroionophore for HgII, AgI, and CuII with Virtually Decoupled Fluorophore and Receptor Units // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. T. 122. № 5. C. 968–969.
49. Arbeloa T.L., Arbeloa F.L., Arbeloa I.L., García-Moreno I., Costela A., Sastre R., Amat-Guerri F. Correlations between photophysics and lasing properties of dipyrromethene–BF<sub>2</sub> dyes in solution // *Chem. Phys. Lett.* 1999. T. 299. № 3. C. 315–321.
50. Sunahara H., Urano Y., Kojima H., Nagano T. Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 17. C. 5597–5604.
51. Yu C., Miao W., Wang J., Hao E., Jiao L. PyrrolylBODIPYs: Syntheses, Properties, and Application as Environment-Sensitive Fluorescence Probes. // *ACS Omega.* 2017. T. 2. № 7. C. 3551–3561.
52. Frath D., Didier P., Mély Y., Massue J., Ulrich G. Vectorization and Intracellular Distribution of a Two-Photon-Absorbing, Near-Infrared-Emitting  $\pi$ -Extended Boranil Dye // *ChemPhotoChem.* 2017. T. 1. № 4. C. 109–112.
53. Shao T., Liu T., Liu H., Zhang M., Shen Y., Gao A., Tian X., Zhang Q., Wu J., Tian Y. Identification of fatty liver disease at diverse stages using two-photon absorption of triphenylamine-based BODIPY analogues // *J. Mater. Chem. B.* 2019. T. 7. № 23. C. 3704–3709.
54. Bai Y., Shi X., Chen Y., Zhu C., Jiao Y., Han Z., He W., Guo Z. Coumarin/BODIPY Hybridization for Ratiometric Sensing of Intracellular Polarity Oscillation. // *Chem. - A Eur. J.* 2018. T. 24. № 29. C. 7513–7524.
55. Cao D., Liu Z., Verwilt P., Koo S., Jangjili P., Kim J.S., Lin W. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors // *Chem. Rev.* 2019. T. 119. № 18. C. 10403–10519.
56. Signore G., Nifosi R., Albertazzi L., Bizzarri R. A novel coumarin fluorescent sensor to probe polarity around biomolecules // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009. T. 5. № 6. C. 722–729.
57. Raghavendra U.P., Basanagouda M., Melavanki R.M., Fattepur R.H., Thipperudrappa J. Solvatochromic studies of biologically active iodinated 4-aryloxymethyl coumarins and estimation of dipole moments // *J. Mol. Liq.* 2015. T. 202. C. 9–16.
58. Hessz D., Bojtar M., Mester D., Szakacs Z., Bitter I., Kallay M., Kubinyi M. Hydrogen bonding effects on the fluorescence properties of 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone in water and water-acetone mixtures. // *Spectrochim. Acta, Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. T. 203. C. 96–105.
59. Signore G., Nifosi R., Albertazzi L., Storti B., Bizzarri R. Polarity-Sensitive Coumarins

- Tailored to Live Cell Imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. T. 132. № 4. C. 1276–1288.
60. Ashoka A.H., Ashokkumar P., Kovtun Y.P., Klymchenko A.S. Solvatochromic Near-Infrared Probe for Polarity Mapping of Biomembranes and Lipid Droplets in Cells under Stress // *J. Phys. Chem. Lett.* 2019. T. 10. № 10. C. 2414–2421.
  61. Zwick V., Chatzivasileiou A.-O., Deschamps N., Roussaki M., Simões-Pires C.A., Nurisso A., Denis I., Blanquart C., Martinet N., Carrupt P.-A., Detsi A., Cuendet M. Aurones as histone deacetylase inhibitors: Identification of key features // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. T. 24. № 23. C. 5497–5501.
  62. Shanker N., Dilek O., Mukherjee K., McGee D.W., Bane S.L. Aurones: small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules // *J. Fluoresc.* 2011. T. 21. № 6. C. 2173–2184.
  63. Espinosa-Bustos C., Cortés-Arriagada D., Soto-Arriaza M.A., Robinson-Duggon J., Pizarro N., Cabrera A.R., Fuentealba D., Salas C.O. Fluorescence properties of aurone derivatives: an experimental and theoretical study with some preliminary biological applications // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2017. T. 16. № 8. C. 1268–1276.
  64. Le Droumaguet C., Sourdon A., Genin E., Mongin O., Blanchard-Desce M. Two-Photon Polarity Probes Built from Octupolar Fluorophores: Synthesis, Structure–Properties Relationships, and Use in Cellular Imaging // *Chem. – An Asian J.* 2013. T. 8. № 12. C. 2984–3001.
  65. Pal K., Samanta I., Gupta R.K., Goswami D., Koner A.L. Deciphering micro-polarity inside the endoplasmic reticulum using a two-photon active solvatofluorochromic probe // *Chem. Commun.* 2018. T. 54. № 75. C. 10590–10593.
  66. Pal K., Sharma A., Koner A.L. Synthesis of Two-Photon Active Tricomponent Fluorescent Probe for Distinguishment of Biotin Receptor Positive and Negative Cells and Imaging 3D-Spheroid // *Org. Lett.* 2018. T. 20. № 20. C. 6425–6429.
  67. Pal K., Koner A.L. Rationally Designed Solvatochromic Fluorescent Indoline Derivatives for Probing Mitochondrial Environment // *Chem. – A Eur. J.* 2017. T. 23. № 36. C. 8610–8614.
  68. Feng G., Liu J., Zhang R., Liu B. Cell imaging using red fluorescent light-up probes based on an environment-sensitive fluorogen with intramolecular charge transfer characteristics. // *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)*. 2014. T. 50. № 67. C. 9497–9500.
  69. Li J., Zhu Z., Rong S., Li H., Guo Y., Xue Q., Ding D. A specific environment-sensitive near-infrared fluorescent turn-on probe for synergistic enhancement of anticancer activity of a chemo-drug. // *Biomater. Sci.* 2017. T. 5. № 8. C. 1622–1628.

70. Hu H., Wolstenholme C.H., Zhang X., Li X. Inverted solvatochromic Stokes shift in GFP-like chromophores with extended conjugation // *Chinese J. Chem. Phys.* 2018. T. 31. № 4. C. 599–607.
71. Bose S., Chakrabarty S., Ghosh D. Effect of Solvation on Electron Detachment and Excitation Energies of a Green Fluorescent Protein Chromophore Variant // *J. Phys. Chem. B.* 2016. T. 120. № 19. C. 4410–4420.
72. Ikejiri M., Tsuchino M., Chihara Y., Yamaguchi T., Imanishi T., Obika S., Miyashita K. Design and Concise Synthesis of a Novel Type of Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue // *Org. Lett.* 2012. T. 14. № 17. C. 4406–4409.
73. Huang G.-J., Ho J.-H., Prabhakar C., Liu Y.-H., Peng S.-M., Yang J.-S. Site-Selective Hydrogen-Bonding-Induced Fluorescence Quenching of Highly Solvatofluorochromic GFP-like Chromophores // *Org. Lett.* 2012. T. 14. № 19. C. 5034–5037.
74. Dong J., Solntsev K.M., Tolbert L.M. Solvatochromism of the Green Fluorescence Protein Chromophore and Its Derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. T. 128. № 37. C. 12038–12039.
75. Chatterjee T., Mandal M., Gude V., Bag P.P., Mandal P.K. Strong electron donation induced differential nonradiative decay pathways for para and meta GFP chromophore analogues // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. T. 17. № 32. C. 20515–20521.
76. Demchenko A.P., Tang K.-C., Chou P.-T. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization // *Chem. Soc. Rev.* 2013. T. 42. № 3. C. 1379–1408.
77. Zhao J., Ji S., Chen Y., Guo H., Yang P. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. T. 14. № 25. C. 8803–8817.
78. Yushchenko D.A., Shvadchak V. V, Klymchenko A.S., Duportail G., Mely Y., Pivovarenko V.G. 2-Aryl-3-hydroxyquinolones, a new class of dyes with solvent dependent dual emission due to excited state intramolecular proton transfer. // *New J. Chem.* 2006. T. 30. № 5. C. 774–781.
79. Klymchenko A.S., Pivovarenko V.G., Ozturk T., Demchenko A.P. Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents // *New J. Chem.* 2003. T. 27. № 9. C. 1336–1343.
80. Shynkar V. V, Klymchenko A.S., Duportail G., Demchenko A.P., Mely Y. Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. // *Biochim.*



- Biophys. Acta, Biomembr.* 2005. T. 1712. № 2. C. 128–136.
81. Klymchenko A.S., Stoeckel H., Takeda K., Mely Y. Fluorescent Probe Based on Intramolecular Proton Transfer for Fast Ratiometric Measurement of Cellular Transmembrane Potential. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. T. 110. № 27. C. 13624–13632.
  82. Klymchenko A.S., Oncul S., Didier P., Schaub E., Bagatolli L., Duportail G., Mely Y. Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2009. T. 1788. № 2. C. 495–499.
  83. Shynkar V. V., Klymchenko A.S., Kunzelmann C., Duportail G., Muller C.D., Demchenko A.P., Freyssinet J.-M., Mely Y. Fluorescent Biomembrane Probe for Ratiometric Detection of Apoptosis. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 7. C. 2187–2193.
  84. Strizhak A. V., Postupalenko V.Y., Shvadchak V. V., Morellet N., Guittet E., Pivovarenko V.G., Klymchenko A.S., Mely Y. Two-Color Fluorescent L-Amino Acid Mimic of Tryptophan for Probing Peptide-Nucleic Acid Complexes. // *Bioconjug. Chem.* 2012. T. 23. № 12. C. 2434–2443.
  85. Enander K., Choulier L., Olsson A.L., Yushchenko D.A., Kanmert D., Klymchenko A.S., Demchenko A.P., Mely Y., Altschuh D. A Peptide-Based, Ratiometric Biosensor Construct for Direct Fluorescence Detection of a Protein Analyte. // *Bioconjug. Chem.* 2008. T. 19. № 9. C. 1864–1870.
  86. Postupalenko V.Y., Zamotaiev O.M., Shvadchak V. V., Strizhak A. V., Pivovarenko V.G., Klymchenko A.S., Mely Y. Dual-Fluorescence l-Amino Acid Reports Insertion and Orientation of Melittin Peptide in Cell Membranes. // *Bioconjug. Chem.* 2013. T. 24. № 12. C. 1998–2007.
  87. Yushchenko D.A., Fauerbach J.A., Thirunavukkuarasu S., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. Fluorescent Ratiometric MFC Probe Sensitive to Early Stages of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. T. 132. № 23. C. 7860–7861.
  88. Dziuba D., Postupalenko V.Y., Spadafora M., Klymchenko A.S., Guerineau V., Mely Y., Benhida R., Burger A. A universal nucleoside with strong two-band switchable fluorescence and sensitivity to the environment for investigating DNA interactions. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 24. C. 10209–10213.
  89. Li Y., Zeng L., Zhong C., Dong X., Mao Z., Liu Z., Lv S., Zhang Z., Qin J. A Two-Photon Dye with Favorable Photophysical Properties and Ultrahigh Polarity Sensitivity Designed by Utilizing the Tautomerism of  $\beta$ -Diketone. // *Adv. Opt. Mater.* 2017. T. 5. № 2. C. n/a.
  90. Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and

- flow // *Org. Biomol. Chem.* 2007. T. 5. № 11. C. 1669–1678.
91. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular Rotors: What Lies Behind the High Sensitivity of the Thioflavin-T Fluorescent Marker // *Acc. Chem. Res.* 2012. T. 45. № 9. C. 1548–1557.
  92. Kuimova M.K., Yahioglu G., Levitt J.A., Suhling K. Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 21. C. 6672–6673.
  93. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein // *Science (80-. )*. 2011. T. 333. № 6042. C. 642–646.
  94. Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V, Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. T. 27. C. 64–74.
  95. Karpenko I.A., Niko Y., Yakubovskiy V.P., Gerasov A.O., Bonnet D., Kovtun Y.P., Klymchenko A.S. Push–pull dioxaborine as fluorescent molecular rotor: far-red fluorogenic probe for ligand–receptor interactions // *J. Mater. Chem. C*. 2016. T. 4. № 14. C. 3002–3009.
  96. López-Duarte I., Vu T.T., Izquierdo M.A., Bull J.A., Kuimova M.K. A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells // *Chem. Commun.* 2014. T. 50. № 40. C. 5282–5284.
  97. Dziuba D., Jurkiewicz P., Cebecauer M., Hof M., Hocek M. A Rotational BODIPY Nucleotide: An Environment-Sensitive Fluorescence-Lifetime Probe for DNA Interactions and Applications in Live-Cell Microscopy. // *Angew. Chemie, Int. Ed.* 2016. T. 55. № 1. C. 2.
  98. Kim H.M., Jeong B.H., Hyon J.-Y., An M.J., Seo M.S., Hong J.H., Lee K.J., Kim C.H., Joo T., Hong S.-C., Cho B.R. Two-Photon Fluorescent Turn-On Probe for Lipid Rafts in Live Cell and Tissue // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 13. C. 4246–4247.
  99. Telmer C.A., Verma R., Teng H., Andreko S., Law L., Bruchez M.P. Rapid, Specific, No-wash, Far-red Fluorogen Activation in Subcellular Compartments by Targeted Fluorogen Activating Proteins // *ACS Chem. Biol.* 2015. T. 10. № 5. C. 1239–1246.
  100. Povarova N. V, Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. Red-Shifted Substrates for FAST Fluorogen-Activating Protein Based on the GFP-Like Chromophores // *Chem. – A Eur. J.* 2019. T. 25. № 41. C. 9592–9596.
  101. Povarova N. V, Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I. V, Lukyanov K.A., Mishin A.S. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands // *J. Mater. Chem. C*. 2016. T. 4. № 14. C. 3036–3040.

102. Dal Molin M., Verolet Q., Colom A., Letrun R., Derivery E., Gonzalez-Gaitan M., Vauthey E., Roux A., Sakai N., Matile S. Fluorescent Flippers for Mechanosensitive Membrane Probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. T. 137. № 2. C. 568–571.
103. Lukinavičius G., Umezawa K., Olivier N., Honigmann A., Yang G., Plass T., Mueller V., Reymond L., Corrêa Jr I.R., Luo Z.-G., Schultz C., Lemke E.A., Heppenstall P., Eggeling C., Manley S., Johnsson K. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins // *Nat. Chem.* 2013. T. 5. № 2. C. 132–139.
104. Lukinavičius G., Reymond L., Umezawa K., Sallin O., D'Este E., Göttfert F., Ta H., Hell S.W., Urano Y., Johnsson K. Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging in Living Cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. T. 138. № 30. C. 9365–9368.
105. Park S.J., Juvekar V., Jo J.H., Kim H.M. Combining hydrophilic and hydrophobic environment sensitive dyes to detect a wide range of cellular polarity // *Chem. Sci.* 2020. T. 11. № 2. C. 596–601.
106. Würthner F., Kaiser T.E., Saha-Möller C.R. J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2011. T. 50. № 15. C. 3376–3410.
107. Padalkar V.S., Seki S. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT)-inspired solid state emitters // *Chem. Soc. Rev.* 2016. T. 45. № 1. C. 169–202.
108. He H., Zhang J., Xie Y., Lu Y., Qi J., Ahmad E., Dong X., Zhao W., Wu W. Bioimaging of Intravenous Polymeric Micelles Based on Discrimination of Integral Particles Using an Environment-Responsive Probe. // *Mol. Pharm.* 2016. T. 13. № 11. C. 4013–4019.
109. Okamoto A. ECHO probes: a concept of fluorescence control for practical nucleic acid sensing // *Chem. Soc. Rev.* 2011. T. 40. № 12. C. 5815–5828.
110. Karpenko I.A., Collot M., Richert L., Valencia C., Villa P., Mély Y., Hibert M., Bonnet D., Klymchenko A.S. Fluorogenic Squaraine Dimers with Polarity-Sensitive Folding As Bright Far-Red Probes for Background-Free Bioimaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. T. 137. № 1. C. 405–412.
111. Mei J., Leung N.L.C., Kwok R.T.K., Lam J.W.Y., Tang B.Z. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! // *Chem. Rev.* 2015. T. 115. № 21. C. 11718–11940.
112. Hu F., Liu B. Organelle-specific bioprobes based on fluorogens with aggregation-induced emission (AIE) characteristics // *Org. Biomol. Chem.* 2016. T. 14. № 42. C. 9931–9944.
113. Wang D., Su H., Kwok R.T.K., Hu X., Zou H., Luo Q., Lee M.M.S., Xu W., Lam J.W.Y., Tang B.Z. Rational design of a water-soluble NIR AIEgen, and its application in ultrafast wash-free

- cellular imaging and photodynamic cancer cell ablation // *Chem. Sci.* 2018. T. 9. № 15. C. 3685–3693.
114. Yuan Y., Xu S., Cheng X., Cai X., Liu B. Bioorthogonal Turn-On Probe Based on Aggregation-Induced Emission Characteristics for Cancer Cell Imaging and Ablation // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2016. T. 55. № 22. C. 6457–6461.
115. Pakhomov A.A., Martynov V.I. GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning // *Chem. Biol.* 2008. T. 15. № 8. C. 755–764.
116. Yampolsky I. V, Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Synthesis and properties of the red chromophore of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Kaede and its analogs // *Bioorg. Chem.* 2008. T. 36. № 2. C. 96–104.
117. Phelps D.J., Gaeta F.C.A. A Convenient Synthesis of Glycyl-( $\beta$ -aryl)-dehydroalanines // *Synthesis (Stuttg.)*. 1982. T. 1982. № 03. C. 234–235.
118. Stafforst T., Diederichsen U. Synthesis of Alaninyl and N-(2-Aminoethyl)glycinyl Amino Acid Derivatives Containing the Green Fluorescent Protein Chromophore in Their Side Chains for Incorporation into Peptides and Peptide Nucleic Acids // *European J. Org. Chem.* 2007. T. 2007. № 6. C. 899–911.
119. Hamama W.S., Gouda M.A., Badr M.H., Zoorob H.H. Synthesis of Some New Fused and Binary 1,3,4-Thiadiazoles as Potential Antitumor and Antioxidant Agents // *J. Heterocycl. Chem.* 2013. T. 50. № 4. C. 787–794.
120. Jun E.E. Ueber die Condensation der Hippursäure mit Phtalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd // *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1893. T. 275. № 1. C. 1–8.
121. Lee C.-Y., Chen Y.-C., Lin H.-C., Jhong Y., Chang C.-W., Tsai C.-H., Kao C.-L., Chien T.-C. Facile synthesis of 4-arylidene-5-imidazolinones as synthetic analogs of fluorescent protein chromophore // *Tetrahedron*. 2012. T. 68. № 29. C. 5898–5907.
122. Petersen M., Riber P., Andersen L., Nielsen M. Synthesis and Characterization of Model Compounds for the Neutral Green Fluorescent Protein Chromophore // *Synthesis-stuttgart*. 2007. T. 2007. C. 3635–3638.
123. Hsu Y.-H., Chen Y.-A., Tseng H.-W., Zhang Z., Shen J.-Y., Chuang W.-T., Lin T.-C., Lee C.-S., Hung W.-Y., Hong B.-C., Liu S.-H., Chou P.-T. Locked ortho- and para-Core Chromophores of Green Fluorescent Protein; Dramatic Emission Enhancement via Structural Constraint // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. T. 136. № 33. C. 11805–11812.
124. Baldridge A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka T., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M.

- Inhibition of twisting of a green fluorescent protein-like chromophore by metal complexation // *Chem. Commun.* 2010. T. 46. № 31. C. 5686–5688.
125. McCusker E.O., Scheidt K.A. Enantioselective N-Heterocyclic Carbene Catalyzed Annulation Reactions with Imidazolidinones // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2013. T. 52. № 51. C. 13616–13620.
126. Cornforth J.W., Huang H.T. 144. The condensation of benzamidine with  $\alpha$ -diketones // *J. Chem. Soc.* 1948. № 0. C. 731–735.
127. Devasia G.M. A new method for the synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. // *Tetrahedron Lett.* 1976. T. 17. № 7. C. 571–572.
128. Ekeley J.B., Ronzio A.R. The Action of Aromatic Aldehydes upon the Addition Products Obtained from Aromatic Amidines and Glyoxal // *J. Am. Chem. Soc.* 1935. T. 57. № 7. C. 1353–1356.
129. Baldridge A., Kowalik J., Tolbert L.M. Efficient Synthesis of New 4-Arylideneimidazolin-5-ones Related to the GFP Chromophore by 2+3 Cyclocondensation of Arylideneimines with Imidate Ylides // *Synthesis (Stuttg.)*. 2010. T. 2010. № 14. C. 2424–2436.
130. Lerestif J.M., Bazureau J.P., Hamelin J. Cycloaddition with stabilized imidates as potential azomethines ylides : A new route to 2-imidazoline and 4-yliden-s-imidazolinone // *Tetrahedron Lett.* 1993. T. 34. № 29. C. 4639–4642.
131. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. Synthesis of the chromophores of fluorescent proteins and their analogs // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2013. T. 39. № 3. C. 223–244.
132. Wang Y., Xie H., Pan Y.-R., Ding M.-W. Facile Synthesis of 4-Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones by an Ugi-aza-Wittig Sequence // *Synthesis (Stuttg.)*. 2014. T. 46. № 03. C. 336–342.
133. Gabillet S., Loreau O., Specklin S., Rasalofonjatovo E., Taran F. A Phosphine-Catalyzed Preparation of 4-Arylidene-5-imidazolones // *J. Org. Chem.* 2014. T. 79. № 20. C. 9894–9898.
134. Gong X., Yang H., Liu H., Jiang Y., Zhao Y., Fu H. Simple and Efficient Copper-Catalyzed Approach to 2,4-Disubstituted Imidazolones // *Org. Lett.* 2010. T. 12. № 14. C. 3128–3131.
135. Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J.-J. An Expeditious Synthesis of 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones // *Synthesis (Stuttg.)*. 2005. T. 2005. № 01. C. 25–27.
136. Gosling S., Rollin P., Tatibouët A. Thiohydantoin: Selective N- and S-Functionalization for Liebeskind-Srogl Reaction Study // *Synthesis (Stuttg.)*. 2011. T. 2011. № 22. C. 3649–3660.
137. Kucherak O.A., Richert L., Mely Y., Klymchenko A.S. Dipolar 3-methoxychromones as bright and highly solvatochromic fluorescent dyes. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. T. 14. № 7. C. 2292–2300.

138. Chuang W.-T., Hsieh C.-C., Lai C.-H., Lai C.-H., Shih C.-W., Chen K.-Y., Hung W.-Y., Hsu Y.-H., Chou P.-T. Excited-State Intramolecular Proton Transfer Molecules Bearing o-Hydroxy Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore // *J. Org. Chem.* 2011. T. 76. № 20. C. 8189–8202.
139. Cheng H.-G., Chen H., Liu Y., Zhou Q. The Liebeskind–Srogl Cross-Coupling Reaction and its Synthetic Applications // *Asian J. Org. Chem.* 2018. T. 7. № 3. C. 490–508.
140. Mehta V.P., Sharma A., Van der Eycken E. The First Palladium-Catalyzed Desulfitative Sonogashira-Type Cross-Coupling of (Hetero)aryl Thioethers with Terminal Alkynes // *Org. Lett.* 2008. T. 10. № 6. C. 1147–1150.
141. Arambasic M., Majhail M.K., Straker R.N., Neuhaus J.D., Willis M.C. A rhodium-catalysed Sonogashira-type coupling exploiting C–S functionalisation: orthogonality with palladium-catalysed variants // *Chem. Commun.* 2019. T. 55. № 19. C. 2757–2760.
142. Iwasaki M., Topolovčan N., Hu H., Nishimura Y., Gagnot G., Na nakorn R., Yuvacharaskul R., Nakajima K., Nishihara Y. Palladium-Catalyzed Regio- and Stereoselective Carbothiolation of Terminal Alkynes with Azolyl Sulfides // *Org. Lett.* 2016. T. 18. № 7. C. 1642–1645.
143. Hooper J.F., Chaplin A.B., González-Rodríguez C., Thompson A.L., Weller A.S., Willis M.C. Aryl Methyl Sulfides as Substrates for Rhodium-Catalyzed Alkyne Carbothiolation: Arene Functionalization with Activating Group Recycling // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 6. C. 2906–2909.
144. Chen C., Baranov M.S., Zhu L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zaitseva S.O., Yampolsky I. V., Solntsev K.M., Fang C. Designing redder and brighter fluorophores by synergistic tuning of ground and excited states // *Chem. Commun.* 2019. T. 55. № 17. C. 2537–2540.
145. Chuang W.-T., Chen B.-S., Chen K.-Y., Hsieh C.-C., Chou P.-T. Fluorescent protein red Kaede chromophore; one-step; high-yield synthesis and potential application for solar cells // *Chem. Commun.* 2009. № 45. C. 6982–6984.
146. Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I. V., Baranov M.S. Bioinspired Fluorescent Dyes Based on a Conformationally Locked Chromophore of the Fluorescent Protein Kaede // *European J. Org. Chem.* 2015. T. 2015. № 26. C. 5716–5721.
147. Knott E.B. 275. The colour of organic compounds. Part VIII. A comparison of isomeric dyes from 3 : 7a-diazaindan-1-one and -2-one // *J. Chem. Soc.* 1956. № 0. C. 1360–1364.
148. Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. Red-Shifted Fluorescent Aminated Derivatives of a Conformationally Locked GFP Chromophore // *Chem. – A Eur. J.* 2014. T. 20. № 41. C. 13234–13241.

149. Braakman I., Bulleid N.J. Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. T. 80. № 1. C. 71–99.
150. Fagone P., Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function // *J. Lipid Res.* 2009. T. 50. № Supplement. C. S311–S316.
151. Robinson D.G., Brandizzi F., Hawes C., Nakano A. Vesicles versus Tubes: Is Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport in Plants Fundamentally Different from Other Eukaryotes? // *Plant Physiol.* 2015. T. 168. № 2. C. 393–406.
152. Harding H.P., Ron D. Endoplasmic Reticulum Stress and the Development of Diabetes // *Diabetes.* 2002. T. 51. № suppl 3. C. S455–S461.
153. Hambrock A., Löffler-Walz C., Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides // *Br. J. Pharmacol.* 2002. T. 136. № 7. C. 995–1004.
154. El Baraka M., Deumié M., Viallet P., Lampidis T.J. Fluorescence properties and partitioning behaviour of esterified and unesterified rhodamines // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 1991. T. 62. № 2. C. 195–216.
155. Scaduto Jr. R.C., Grotyohann L.W. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives // *Biophys. J.* 1999. T. 76. № 1. C. 469–477.
156. Floryk D., Houštek J. Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester (TMRM) is Suitable for Cytofluorometric Measurements of Mitochondrial Membrane Potential in Cells Treated with Digitonin // *Biosci. Rep.* 1999. T. 19. № 1. C. 27–34.
157. Baldrige A., Amador A., Tolbert L.M. Fluorescence Turn On by Cholate Aggregates // *Langmuir.* 2011. T. 27. № 7. C. 3271–3274.
158. Schaefer F.C., Peters G.A. Base-Catalyzed Reaction of Nitriles with Alcohols. A Convenient Route to Imidates and Amidine Salts // *J. Org. Chem.* 1961. T. 26. № 2. C. 412–418.
159. Yngve U., Khan T.S., Bergström M., Långström B. Labelling of octreotide using <sup>76</sup>Br-prosthetic groups // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2001. T. 44. № 8. C. 561–573.
160. Zingel V., Elz S., Schunack W. Histamine analogues. 33rd communication: 2-phenylhistamines with high histamine H1-agonistic activity // *Eur. J. Med. Chem.* 1990. T. 25. № 8. C. 673–680.
161. Glushkov R.G., Modnikova G.A., L'vov A.I., Krylova L.Y., Pushkina T. V, Gus'kova T.A., Solov'eva N.P. Synthesis and Antituberculous Activity in vitro of Amidine and Hydrazidine Analogs of Pyrazinamide and Isoniazid // *Pharm. Chem. J.* 2004. T. 38. № 8. C. 420–424.
162. Saxena G., Chaudhary A., Naqvi A., Khan S., Seth D.S. Synthesis, characterization and study of potential reactions of tertiary amino aldehydes. // *Orient. J. Chem.* 2008. T. 24. № 1. C. 347–

351.

163. Mendgen T., Steuer C., Klein C.D. Privileged Scaffolds or Promiscuous Binders: A Comparative Study on Rhodanines and Related Heterocycles in Medicinal Chemistry // *J. Med. Chem.* 2012. T. 55. № 2. C. 743–753.
164. Kadry A.M., Mansour S.A. Studies on 5-arylidene-3-phenyl-2-methylmercaptohydantoins. // *J. Heterocycl. Chem.* 1985. T. 22. № 1. C. 155–157.
165. Würth C., Grabolle M., Pauli J., Spieles M., Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples // *Nat. Protoc.* 2013. T. 8. C. 1535.