

На правах рукописи

ПЕРЕВОЗЧИКОВА ПОЛИНА СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ФОТОАКТИВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ ДЛЯ
БИОМОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМЕНА И ГЕТЕРОСТИЛЬБЕНА**

1.4.3. – Органическая химия

1.4.4. – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н., проф. Федорова О.А.
к.х.н. Черникова Е.Ю.

Москва – 2026

Оглавление

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
2.1 Фотохромные соединения с <i>E,Z</i> -изомеризацией.....	17
2.1.1 Азобензолы.....	17
2.1.2 Стильбены.....	24
2.1.3 Геми-индигоиды.....	29
2.1.4 Гидразоны.....	32
2.2 Фотохромные соединения с электроциклизацией/циклораспадом	34
2.2.1 Диарилэтены.....	34
2.2.2 Дигидропирены	39
2.2.3 Фульгиды и фульгимиды	42
2.2.4 Донорно-акцепторные аддукты Стенхауса	45
2.3 Фотохромные соединения с разрывом С-О связи	48
2.3.1 Спиропираны и спирооксазины	48
2.3.2 Хромены.....	53
2.4 Фотохромные соединения с циклоприсоединением/циклораспадом.....	55
2.4.1 Антрацены	55
2.4.2 Стильбены.....	58
2.5 Заключение.....	61
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	62
3.1 Синтез производных хромена и их конъюгатов	65
3.2 Синтез гетеростильбенов и их конъюгатов	69
3.3 Синтез производных хинолизиния и их конъюгатов.....	73
3.4 Изучение фотохромных свойств производных хромена 9-11 и их конъюгатов	76
3.4.1 Изучение фотохромных свойств производных хромена 9-11	76
3.4.2 Изучение фотохромных свойств конъюгатов 2, 3	88
3.5 Изучение комплексообразования конъюгатов 2, 3 с ДНК и СВ[7]	91
3.6 Изучение фотохимических и фотофизических свойств гетеростильбенов 12-15 и конъюгатов 4-8	102
3.6.1 Изучение фотохимических и фотофизических свойств гетеростильбенов 12-15	102
3.6.2 Изучение фотохимических и фотофизических свойств конъюгатов 4-8	108
3.7 Изучение комплексообразования производных 12-17, 19 и их конъюгатов с ДНК	113

3.7.1 Изучение комплексообразования производных 12-17, 19 с ДНК оптическими методами	113
3.7.2 Изучение комплексообразования конъюгатов 4-8 с ДНК оптическими методами	119
3.7.3 Изучение комплексообразования конъюгата 8 с ДНК методом ЯМР спектроскопии	123
3.8 Изучение фототоксичности производных хинолизиния 16, 17, 19 и конъюгата 8	131
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	139
4.1 Синтез соединений	141
4.2 Определение констант скорости термической релаксации.....	173
4.3 Расчет спектра поглощения <i>Z</i> -изомера.....	174
4.4 Расчет квантовых выходов реакции <i>E,Z</i> -фотоизомеризации	175
4.5 Расчет квантовых выходов флуоресценции.....	176
4.6 Изучение взаимодействия лигандов с ДНК, СВ[7] и определение констант устойчивости комплексов	177
4.7 Изучение комплексообразования с помощью спектроскопии ЯМР	178
4.8 Расчет квантового выхода образования синглетного кислорода.....	178
4.9 Изучение фотоиндуцированного разрушения ДНК с помощью гель-электрофореза.....	179
4.10 Клеточные исследования	180
5. ВЫВОДЫ	182
6. ПРИЛОЖЕНИЕ	184
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	212
8. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	233

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – Активные формы кислорода

АП-ДНК – Апуриновая/апиримидиновая дезоксирибонуклеиновая кислота

БИК – Ближний инфракрасный

БСА – Бычий сывороточный альбумин

ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

д – Дублет

ДМСО – Диметилсульфоксид

ДМФА – *N,N*-Диметилформамид

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗФ – Закрытая форма

ИК – Инфракрасный

ИКД – Индуцированный круговой дихроизм

ИЭР – Ионизация при электрораспылении

КД – Круговой дихроизм

КССВ – Константа спин-спинового взаимодействия

ЛД – Линейный дихроизм

м – Мультиплет

МАЛДИ – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

м.д. – Миллионная доля

ОФ – Открытая форма

РНК – Рибонуклеиновая кислота

с – Синглет

т – Триплет

тт – Тимус теленка

ТМС – Триметилсилан

ТСА – Тромбин-связывающие аптамеры

ТСХ – Тонкослойная хроматография

ТСА – Тромбин-связывающий аптамер

УФ – Ультрафиолетовый

ФДТ – Фотодинамическая терапия

ФСС – Фотостационарное состояние

ФЭУ – Фотоэлектронный умножитель

ЦБ – Циклобутан

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

A – Оптическая плотность; Аденин; Предэкспоненциальный множитель

AIE – *англ.*, Aggregation-induced emission, эмиссия, вызванная агрегацией

CB[n] – Кукурбит[n]урил

CD – Циклодекстрин

CF – Закрытая форма

COSY – *англ.*, Correlation Spectroscopy, двумерная гомоядерная корреляционная спектроскопия

C – Молярная концентрация; Цитозин

DAPI – *англ.*, 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole, синий флуоресцентный краситель

DASA – *англ.*, Donor-Acceptor Stenhouse adduct, Донорно-акцепторные аддукты Стенхауса

DIPEA – Диизопропилэтиламин

de novo – *лат.* «с самого начала»

E_a – Энергия активации

EC_{50} – Полумаксимальная эффективная концентрация

G – Гуанин

FRET – *англ.*, Forster resonance energy transfer, резонансный перенос энергии по Ферстеру

G4 – G-квадруплекс

GSH – Глутатион

HMBC – *англ.*, Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy, двумерная гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей

HSQC – *англ.*, Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy, гетероядерная корреляционная спектроскопия через одну химическую связь

I – Интенсивность

h – Постоянная Планка

ICT – *англ.*, Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда

IC_{50} – Концентрация полумаксимального ингибирования

in situ – *лат.* «на месте», в том месте, где происходит, без перемещения в специальную среду

in vitro – *лат.* «в стекле», в искусственных условиях вне организма

in vivo – *лат.* «в (на) живом», в условиях эксперимента на живом организме

J – Константа спин-спинового взаимодействия; Интеграл перекрытия спектра поглощения хромофора-акцептора и спектра флуоресценции хромофора-донора

k – Константа скорости релаксации

k_B – Постоянная Больцмана

K – Константа устойчивости комплекса

L – Лиганд

M – Единица измерения концентрации (моль/л)

MeGr – *англ.*, Methyl green, метиловый зеленый

MIC – Минимальная ингибирующая концентрация

МОРАС – Компьютерная программа, используемая в вычислительной химии и предназначенная для реализации полуэмпирических алгоритмов квантовой химии

m/z – Отношение массы к заряду (в масс-спектрах)

n – Показатель преломления

NOESY – *англ.*, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера

PBS – *англ.*, Phosphate-buffered saline, натрий-фосфатный буфер

R – Универсальная газовая постоянная

RESOLFT – *англ.*, Reversible saturable optical linear fluorescence transitions, обратимые насыщенные оптические флуоресцентные переходы

RET – *англ.*, Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии

ROESY – *англ.*, Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, Ядерная спектроскопия в вращающейся рамке с эффектом Оверхаузера

S – Площадь под спектральной кривой

T – Температура; Тимин

TBAB – Бромид тетрабутиламмония

TBE – *англ.*, Tris-Borate-EDTA, трис-боратный буферный раствор

ТС – Трансоид-цис

TICT – *англ.* Twisted Intramolecular Charge Transfer, Внутримолекулярный перенос заряда, приводящий к скрученному состоянию с переносом заряда

TMRE – *англ.*, TetraMethylRhodamine Ethyl ester, этиловый эфир тетраметилродамина

TOCSY – *англ.*, TOfal Correlation Spectroscopy, Ядерная спектроскопия полной корреляции

ТТ – Трансоид-транс

α – Содержание E- или Z- изомера в фотостационарном состоянии

$\Delta H^\ddagger$ – Изменение энтальпии активации

$\Delta S^\ddagger$ – Изменение энтропии активации

δ – Химический сдвиг

ε – Диэлектрическая проницаемость; Коэффициент экстинкции

λ – Длина волны

$\lambda_{\text{погл}}$ – Длина волны максимума поглощения

$\lambda_{\text{фл}}$ – Длина волны максимума флуоресценции

$\lambda_{\text{возб}}$ – Длина волны возбуждения

$\lambda_{\text{обл}}$ – Длина волны облучения

$\tau_{1/2}$ – Время жизни

φ – Квантовый выход

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Разработка селективных терапевтических агентов остается одной из приоритетных задач современной медицины и биофармацевтики. Основным недостатком большинства классических лекарственных препаратов заключается в низкой избирательности их действия и системной токсичности, что может приводить к повреждению здоровых тканей и развитию серьезных побочных эффектов. Оптимальной стратегией для решения данной проблемы является адресная доставка неактивного предшественника, или пролекарства, к биологической мишени с его последующей локальной активацией. Формирование активной формы препарата в целевом месте действия может быть вызвано различными внешними стимулами, включая электрохимический потенциал, изменение pH, свет и присутствие окислителей [1]. В этом контексте именно облучение светом обладает значительными преимуществами над альтернативными способами активации, так как позволяет обеспечить гибкую настройку энергии и интенсивности воздействия, а также высокий временной и пространственный контроль биологической активности. Данный подход стал отправной точкой для формирования фотофармакологии, которая за последнее десятилетие превратилась в динамично развивающуюся область, направленную на разработку фотоуправляемых лекарственных препаратов на основе фотоотщепляемых защитных групп, фотопереклюателей и фотосенсибилизаторов [2–4].

Синтетические фотопереклюатели, или фотохромные соединения, известны уже много лет, но их ценность для биологии и медицины была систематически изучена лишь недавно [5–9]. По мере того, как устанавливались фотофизические, фармакодинамические и фармакокинетические свойства фотопереклюателей, они стали применяться к широкому спектру биологических мишеней [10, 11]. К ним относятся трансмембранные белки, включая ионные каналы и рецепторы, связанные с G-белками, растворимые белки, киназы и протеазы, а также липидные мембраны и нуклеиновые кислоты. ДНК традиционно выступает приоритетной мишенью для многих лекарственных препаратов, в частности химиотерапевтических агентов, так как является носителем генетической информации и контролирует протекание базовых механизмов жизнедеятельности клеток [12]. Таким образом, разработка фотоуправляемых лигандов, нацеленных на ДНК, с пространственным и временным контролем взаимодействия между ними, является одним из перспективных подходов для преодоления недостаточной селективности действия существующих лекарственных средств и резистентности к ним.

Степень разработанности темы исследования

Концепция управления различными биологическими процессами с помощью света, сформировавшаяся на стыке фотохимии, супрамолекулярной химии и биологии, на сегодняшний день является одним из активно развивающихся научных направлений. С развитием

фотофармакологии фотопереключатели стали рассматриваться как инструмент для направленной модификации биологически активных молекул с целью высокоточного управления их терапевтическими свойствами с помощью света. К этому моменту было открыто множество классов фотохромных соединений и детально изучены их фотофизические и фотохимические характеристики. Тем не менее, широкое внедрение таких систем в биологические исследования имеет ряд ограничений. Наиболее распространенные фотопереключатели на основе азобензола демонстрируют низкую стабильность в клеточной среде из-за их восстановления под действием глутатиона [13]. В то же время свойства большинства других известных классов фотохромов исследованы преимущественно в органических растворителях, тогда как при переходе в водный раствор их фотофизические и фотохромные характеристики могут претерпевать существенные изменения. Одновременно с этим наблюдается тенденция к созданию более сложных полифункциональных систем, которые помимо фотопереключения могли бы обеспечивать адресную доставку или визуализацию в рамках одной молекулы [14]. Данные факторы обуславливают необходимость поиска и разработки новых фотоактивных систем, способных сочетать в себе достаточную растворимость в воде, биосовместимость и стабильность в биологической среде с сохранением своих фотоуправляемых свойств.

Цели и задачи работы

Целью данного диссертационного исследования является разработка фотоактивных низкомолекулярных лигандов для ДНК, а также бифункциональных конъюгатов на их основе. Задачами данной работы стали:

1. Синтез моно-хромофоров – производных хромена, гетероциклических аналогов стильбена на основе азотсодержащих гетероциклов и их полициклических фотопродуктов.
2. Разработка методов синтеза конъюгатов на основе полученных фотохромных соединений и стирилового красителя.
3. Изучение фотохимических свойств полученных фотохромных соединений как в свободном виде, так и в составе конъюгатов.
4. Изучение взаимодействия полученных моно- и бис-хромофорных систем с ДНК различными физико-химическими методами.
5. Изучение возможности протекания фотохромных превращений в присутствии нуклеиновой кислоты и оценка влияния фотохромного фрагмента на комплексообразование.
6. Изучение фототоксичности производных хинолизиния и их конъюгатов в растворе и во внутриклеточной среде.

Научная новизна

В настоящем диссертационном исследовании разработаны методы синтеза ранее не описанных производных 2,2-дифенил-2*H*-хромена, гетероциклических аналогов стильбена и производных хинолизиния на основе хинолина, изохинолина и пиридина. Впервые синтезированы конъюгаты полученных производных с 4-диметиламиностирилпиридиновым красителем.

Впервые было обнаружено, что длина бромалкокси-заместителя и концентрация 2,2-дифенил-2*H*-хроменов оказывают значительное влияние на их фотохромные свойства и содержание открытых форм в фотостационарном состоянии. Показано, что длина алкильного линкера в конъюгатах производных хромена со стириловым красителем влияет на устойчивость тройного комплекса с ДНК и кукурбит[7]урилом.

Показано, что гетероциклические аналоги стильбена на основе хинолина, изохинолина и пиридина могут подвергаться внутримолекулярной фотоциклизации *in situ* в присутствии ДНК с образованием эффективных интеркаляторов ДНК. Обнаружено, что образующиеся под действием света производные хинолизиния могут вызывать фотоиндуцированные повреждения ДНК даже в анаэробных условиях за счет генерации активных форм кислорода.

В работе впервые изучены конъюгаты гетеростильбенов и производных хинолизиния со стириловым красителем. Показано, что ДНК-связывающие свойства сохраняются при переходе от моно-хромофоров к бис-хромофорным системам. При этом, фотосенсибилизирующие свойства исходных производных хинолизиния и их конъюгатов остаются сопоставимыми и сохраняются как в водном растворе, так и в клеточной среде.

Теоретическая и практическая значимость работы

Вкладом в развитие фундаментальных представлений о фотохромных соединениях стало установление влияния длины и природы алкокси-заместителя, а также концентрации 2,2-дифенил-2*H*-хроменов на механизм фотохромного превращения. Синтезированные в работе гетероциклические аналоги стильбена подвергаются фотоциклизации в присутствии ДНК, что позволяет использовать их в качестве фотоуправляемых лигандов для контроля комплексообразования с нуклеиновыми кислотами. Производные хинолизиния благодаря способности вызывать фотоиндуцированное повреждение ДНК в анаэробной среде полезны в качестве основы для агентов фотодинамической терапии, эффективных в условиях гипоксии. Сохранение ДНК-комплексообразующих свойств и сопоставимая эффективность генерации активных форм кислорода позволяют рассматривать конъюгаты производных хинолизиния со стириловым красителем как перспективную платформу для создания тераностических агентов.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология и методы диссертационного исследования основаны на анализе литературных данных, разработке методов синтеза из коммерчески доступных реагентов. Наряду со стандартными методами препаративной органической химии в работе были использованы методы органической фотохимии – фотооблучение растворов гетеростильбенов в фотореакторе с контролем за ходом реакции методами оптической спектроскопии и ВЭЖХ. Полученные соединения были подробно охарактеризованы с использованием физико-химических методов анализа, включая спектроскопию ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C , в том числе двумерную, масс-спектрометрию и элементный анализ. Фотофизические, фотохимические и комплексообразующие свойства синтезированных лигандов изучались с помощью оптической электронной спектроскопии поглощения и испускания, спектроскопии кругового дихроизма и спектроскопии ЯМР, гель-электрофореза и исследований *in vitro* на клетках НСТ116.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработка методов синтеза ранее не описанных моно-хромофорных систем на основе 2,2-дифенил-2*H*-хромена, гетероциклических аналогов стильбена и производных хинолизиния, а также их конъюгатов с 4-диметиламиностирилпиридиновым красителем.
2. Влияние длины бромалкокси-заместителя в 2,2-дифенил-2*H*-хроменах и их концентрации на смещение фотохромного превращения в сторону преимущественного образования одной из двух открытых форм.
3. Использование конъюгатов производных хромена со стириловым красителем в системах адресной доставки к ДНК.
4. Гетероциклические аналоги стильбена на основе хинолина, изохинолина и пиридина как фотоуправляемые лиганды для ДНК.
5. Производные хинолизиния как основа для разработки агентов для фотодинамической терапии, а их конъюгаты со стириловым красителем как перспективная платформа для создания фотоуправляемых полифункциональных терапевтических агентов.

Личный вклад автора

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

Благодарности

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №19-53-18010\19, РНФ № 19-43-04127, 19-73-20187, 21-73-20158 и 21-73-20158-П.

Автор выражает особую благодарность д.х.н. Федоровой О.А., д.х.н. Федорову Ю.В., к.х.н. Черниковой Е.Ю., к.х.н. Никитиной П.А., к.х.н. Устимовой М.А., к.х.н. Сайфутяровой А.Э., Гнездилову В.Д. за участие в постановке экспериментов и обсуждении полученных результатов на разных этапах работы; д.х.н. Годовикову И.А. за проведение ЯМР-исследований с ДНК; к.х.н. Щукиной А.А., к.х.н. Поляковой А.С. за регистрацию масс-спектров; Чмелюк Н.С., к.х.н. Пахомову А.А., д.х.н. Абакумову М.А. за проведение клеточных исследований.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных в работе результатов следует из надежного установления структур синтезированных в работе соединений совокупностью физико-химических методов анализа; отсутствия противоречий между выводами, сделанными в результате выполнения работы, и известными литературными данными; экспертной оценки рецензентов высокоцитируемых журналов, в которых были опубликованы результаты данной работы.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 5 статей (в научных изданиях, рекомендованных ВАК) и 10 тезисов докладов. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: I-я Всероссийская конференция «Актуальные вопросы фотоуправляемых и фармакологически активных соединений» (Москва, Россия, 2025); IX Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия, 2025); Всероссийская конференция по люминесценции LUMOS-2024 (Москва, Россия, 2024); «New Emerging Trends in Chemistry» Conference (NewTrendsChem-2023) (Ереван, Армения, 2023); Всероссийская конференция с международным участием «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии» (Санкт-Петербург, Россия, 2023); Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней» (Сочи, Россия, 2022); XXV Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием) (Нижний Новгород, Россия, 2022); Всероссийская конференция «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней» (Сочи, Россия, 2021); The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021); Открытый конкурс-конференция научно-исследовательских работ по химии элементоорганических соединений и полимеров «ИНЭОС OPEN CUP» (Москва, Россия, 2021).

Объем и структура работы

Диссертация общим объемом 234 страницы состоит из вводной части, содержащей общую характеристику работы, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов, приложения, списка литературы, списка основных сокращений и обозначений, списка публикаций автора по теме диссертации и содержит 52 схемы, 18 таблиц, 194 рисунка. Список литературы включает 260 наименований (с учетом собственных публикаций автора). Нумерация схем, рисунков, уравнений, таблиц и соединений в разделах 2 (Литературный обзор) и 3 (Обсуждение результатов) принята отдельной.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Несмотря на значительные достижения медицинской химии, одной из ключевых задач современной фармакологии остается преодоление недостаточной селективности действия биологически активных соединений. Многие лекарственные препараты проявляют активность независимо от локализации в организме и времени воздействия, что увеличивает риск развития различных побочных эффектов и системной токсичности. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы стала фотофармакология, которая за последнее десятилетие превратилась в активно развивающееся междисциплинарное направление на стыке органической химии, фотохимии и медицины. Главное преимущество этой области заключается в возможности активации препарата только в необходимом месте действия, что позволяет снизить его токсичность и частоту нежелательных реакций. Кроме того, применение света в качестве внешнего стимула для контроля над различными функциями имеет большое преимущество по сравнению с другими элементами управления, так как его легко настраивать по энергии и интенсивности, он имеет неинвазивный характер, чаще всего является безвредным и простым в применении [2].

Для использования в фотофармакологии молекула препарата должна содержать светочувствительный фрагмент, который будет вызывать контролируемые изменения в структуре и/или свойствах, приводящие к переключению биологической активности. В этом контексте в настоящее время выделяют три основных направления: фотодинамическую терапию (ФДТ), введение фотолabileльных защитных групп и использование фотопереклюателей. В первом случае в качестве светочувствительного компонента используются фотосенсибилизаторы, активация светом которых приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), приводящих к гибели клеток. Два основных пути механизма ФДТ, типы коммерчески используемых фотосенсибилизаторов, а также последние достижения в этой области были подробно представлены в недавних обзорах [15–18].

В отличие от ФДТ, другие два направления фотофармакологии на данный момент не внедрены в широкую клиническую практику, но находятся на стадии активных исследований и разработок. Введение в структуру лекарственного препарата фотолabileльных, или фотоотщепляемых, защитных групп может приводить к подавлению его фармакологических свойств. Облучение светом вызывает необратимый разрыв связи между препаратом и защитной группой, тем самым восстанавливая активность исходной молекулы. Среди наиболее часто используемых защитных фрагментов выделяют кумарины, *o*-нитробензилы, фенацилы, арилсульфоновые эфиры, аминок-1,4-бензохиноны и другие [19, 20]. Так как этот метод фотоуправления биологической активностью является необратимым, то одним из ключевых требований к нему является чистое снятие защиты с образованием биологически безопасных

побочных продуктов, не вызывающих дополнительных нежелательных эффектов. Разработка препаратов с фотолabileльными защитными группами и их исследования для фотофармакологии представлены в обзорах [19, 21–23].

Третий подход основан на использовании молекулярных фотопереключателей, т.е. фотохромов [24]. Они представляют собой особый класс соединений, в которых под действием света происходят как электронные, так и структурные обратимые изменения, приводящие к образованию различных фотопродуктов с отличающейся активностью в отношении желаемых биологических мишеней. В зависимости от стабильности фотоиндуцированных частиц фотохромные соединения разделяют на молекулы Т-типа, обратная реакция в которых протекает при комнатной температуре, и на Р-типа, фотопродукт которых является термически стабильным и может возвращаться в первоначальную форму только под действием света.

При разработке оптимальной структуры фотопереключаемого лиганда для применения в фотофармакологии желательным условием является повышение его активности именно в фотоиндуцированном, или метастабильном, состоянии. При этом, эффективное фотоуправление биологическими процессами достигается при максимально возможной разнице в фармакологической активности между исходной формой и фотопродуктом. Для придания веществам фотопереключаемых характеристик чаще всего используются несколько стратегий [25]. Прежде всего, этого можно добиться расширением структуры известного биологически активного соединения. Как правило, фотопереключатель вводят либо в качестве продолжения уже имеющейся ароматической системы в молекуле (Рис. 1, А), либо путем замещения боковых групп (Рис. 1, Б и В). Фотоуправляемый ингибитор химотрипсина на основе азобензола является первым примером синтеза и фотопереключения свойств низкомолекулярного биологически активного соединения [26].

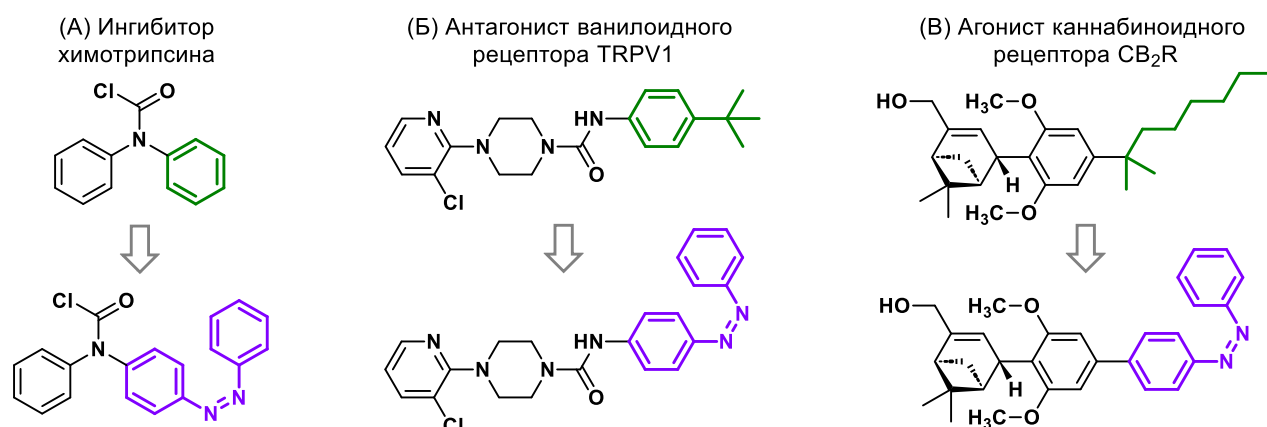


Рисунок 1 – Структуры биологически активных соединений и их фотоуправляемые аналоги в активной форме [26–28].

Другим распространенным подходом в молекулярном дизайне лекарственных препаратов является биоизостерическое замещение [29]. В этом случае отдельные фрагменты биологически активных соединений заменяются на структурно или электронно сходные аналоги, называемые

биоизостеры. В контексте фотофармакологии замена на фотоактивные биоизостеры позволяет осуществлять оптический контроль над терапевтическим действием биологически активных соединений. Биоизостерическая замена может быть проведена как в основном молекулярном ядре препарата (Рис. 2, А), так и в периферических фрагментах (Рис. 2, Б), однако в последнем случае модификация будет оказывать менее выраженное влияние на исходную эффективность соединения [25]. Помимо удлинения или биоизостерического замещения уже известных лекарственных препаратов, фотоуправляемые молекулы могут быть созданы *de novo*. Как правило, сюда относятся фармакологически активные соединения, разработанные с нуля с помощью компьютерного моделирования или самими учеными-химиками [25].

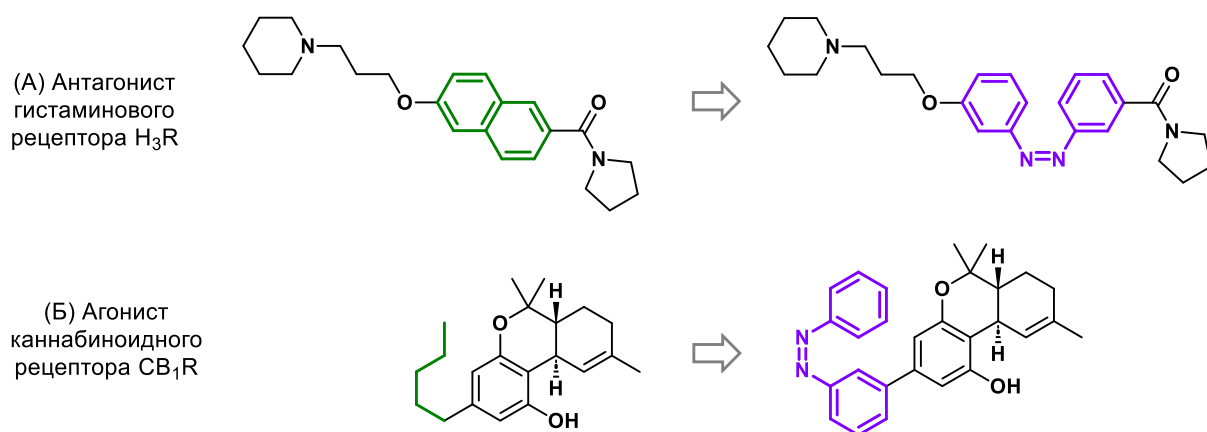


Рисунок 2 – Структуры биологически активных соединений и их фотоуправляемые аналоги в активной форме [30, 31].

Стоит отметить, что фотофармакология охватывает широкий спектр биологических мишеней, среди которых нуклеиновые кислоты, ионные каналы, рецепторы, связанные с G-белками, транспортеры, ферменты, элементы цитоскелета, белки, липидные мембраны и др. [32]. На текущий момент представлены работы по исследованию свойств фотоуправляемых лигандов не только *in vitro*, но и *in vivo* [10]. В обзоре [11] подробно описаны примеры молекул, потенциально применимых для лечения заболеваний человека, включая мишени, локализованные как в поверхностно расположенных и легкодоступных тканях и органах, так и в глубоких, доступ к которым возможен только через хирургический разрез или эндоскопически. Важные достижения были достигнуты в области фотоконтролируемой терапии онкологических заболеваний, диабета, неврологических заболеваний, фотоуправляемой противомикробной терапии и др. [33–37].

Для применения в этой области фотопереклюатели должны соответствовать нескольким ключевым требованиям [13]. В первую очередь, фотореакция должна происходить достаточно эффективно, а различия в активности препарата до и после облучения должны быть максимальными. Также соединение должно быть растворимо в воде и устойчиво в биологических средах. Для обратимых фотопереклюателей необходимо, чтобы они могли

выдерживать последовательные циклы облучения светом без видимого разложения. При этом желательно, чтобы используемая длина волны находилась в красной или ближней инфракрасной (ИК) области для увеличения глубины проникновения света и снижения повреждения тканей. Так как многие известные фотохромные соединения активируются ультрафиолетовым (УФ) светом, для смещения максимума поглощения в более длинноволновую область традиционно используют химическую модификацию их структуры. Кроме того, решить проблему вредного для живых тканей УФ света можно с помощью использования ап-конверсионных наночастиц (Рис. 3). Эта стратегия позволяет поглощать множество фотонов ближнего ИК диапазона с последующим испусканием фотона с более высокой энергией, приводящего к протеканию фотохромной реакции, что было показано, например, в работах [38] и [39]. Также активно ведется разработка различных эффективных устройств (Рис. 3), позволяющих доставлять свет глубоко в ткани, на основе оптических волокон, биоразлагаемой электроники, имплантируемых светодиодов и беспроводных оптических жидкостных устройств [40–43]. Таким образом, с развитием технологий проблема ограничений при выборе длины волны становится все менее непреодолимой, что позволит фотохромным соединениям найти более широкое применение в фотофармакологии.

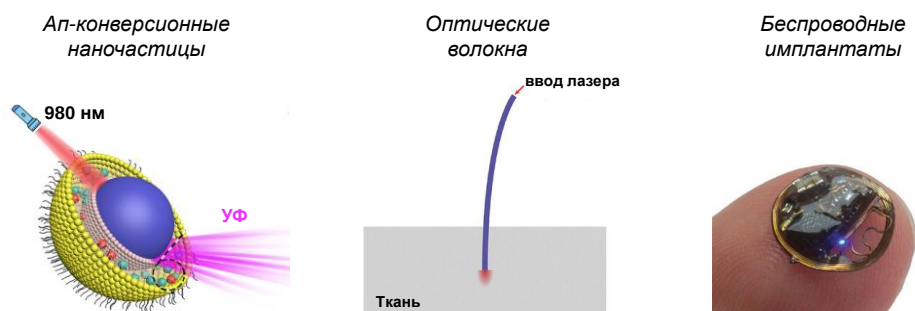


Рисунок 3 – Ап-конверсионные наночастицы, оптические волокна и беспроводные имплантаты для фотофармакологии (адаптировано из [39, 40]).

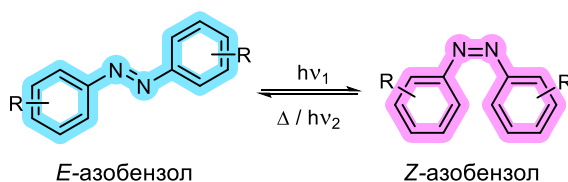
Настоящий литературный обзор посвящен основным классам фотохромных органических соединений, которые используются в биологических и медицинских исследованиях и являются перспективными для применения в фотофармакологии. Структура обзора включает в себя четыре раздела, каждый из которых посвящен фотохромам с определенным типом фотохимической реакции. В первом разделе будут описаны фотохромные соединения на основе *E,Z*-изомеризации. Второй раздел будет посвящен соединениям, фотохромная реакция которых включает в себя электроциклизацию и циклораспад. В третьем разделе приведены фотохромные молекулы, которые подвергаются разрыву С-О связи. Заключительный раздел обзора включает в себя рассмотрение фотохромных производных на основе межмолекулярного циклоприсоединения и циклораспада.

2.1 Фотохромные соединения с *E,Z*-изомеризацией

2.1.1 Азобензолы

Азосоединения впервые были открыты в середине 1800-х годов [44] и на протяжении многих лет являлись важным классом синтетических красителей. Было разработано огромное разнообразие азокрасителей, изучено влияние структурных изменений, количества азогрупп и положения заместителей с целью получения красителей с желаемым цветом или оттенком. Однако в 1937 году в журнале *Nature* английский ученый G. Hartley сообщил о трудностях, возникших при исследовании растворимости азобензола с использованием фотометрического метода [45]. После многочисленных экспериментов его группа пришла к выводу, что отсутствие воспроизводимости результатов измерений поглощения под воздействием света свидетельствует об обратимом образовании *Z*-азобензола (Схема 1). С тех пор многочисленные исследования сделали азосоединения одним из наиболее популярных и хорошо изученных классов фотопереклюателей благодаря простоте синтеза, эффективности изомеризации и высокой фотостабильности.

Схема 1



Спектры *E*- и *Z*-изомеров азобензола различны, но имеют области перекрывания. Незамещенный *E*-азобензол имеет интенсивную полосу поглощения около 320 нм, отвечающую за π - π^* переход, и слабую полосу около 440 нм, относящуюся к n - π^* переходу. Облучение УФ светом приводит к переходу от термодинамически стабильной *E*-формы к метастабильному *Z*-изомеру, что сопровождается гипсохромным сдвигом π - π^* полосы и усилением n - π^* перехода. Восстановление исходного *E*-изомера протекает либо термически в темноте, либо с помощью облучения видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 450$ нм). В результате такого фотохромного перехода происходит не только модификация структуры азобензола, но и значительные изменения в дипольном моменте молекулы ($\Delta\mu = \sim 3$ Д) и в расстоянии между концевыми атомами углерода в *пара*-положении бензольных колец ($\sim 3,5$ Å). Благодаря этим различиям между двумя формами азобензола получили широкую популярность для применения в качестве фотопереклюателей в различных областях, в том числе в фотофармакологии, обеспечивая модуляцию активности лекарственных средств под действием света. Кроме того, известно, что процессы изомеризации происходят в пикосекундном масштабе времени, что значительно быстрее, чем большинство биологических процессов [46].

Эффективность протекания *E,Z*-изомеризации зависит от выбранной длины волны облучения и достигает максимума в том случае, когда исходный изомер максимально поглощает свет, а продукт фотореакции имеет минимальную оптическую плотность. Это позволяет достичь максимального содержания фотопродукта в фотостационарном состоянии (ФСС), что напрямую влияет на точность и отношение сигнал/шум фотопереключения в биологических системах. Например, введение алкокси-заместителей в *para*-положение бензольных колец азосоединений вызывает эффективное разделение π - π^* полос *E*- и *Z*- изомеров, что приводит к 90% содержанию фотопродукта в обоих направлениях реакции [47]. Значительное разделение полос поглощения, отвечающих за π - π^* переходы, может быть достигнуто за счет одновременного введения электронодонорных и электроноакцепторных заместителей в *para*-положения бензольных колец [48], замещения всех четырех *орто*-положений атомами фтора [49] или метокси-группами [50] или наличия в структуре мостикового фрагмента с образованием производных диазоцинов [51].

Процессы гибридизации и плавления ДНК являются ключевым этапом важных биологических процессов, в том числе репликации, амплификации и транскрипции нуклеиновых кислот [52]. Они также лежат в основе ДНК-нанотехнологий, в которых отдельные наноразмерные компоненты образуют прочные жесткие структуры за счет спаривания оснований нуклеиновых кислот высокоспецифичным и программируемым способом. Поэтому контроль над сборкой/разборкой ДНК с помощью внешнего стимула является многообещающим подходом, который может служить для запуска широкого спектра биологических и нанотехнологических процессов. Как правило, плавление ДНК контролируется изменением температуры раствора, что препятствует применению в областях, где требуется постоянная температура или термочувствительные системы, и затрудняет реализацию *in vivo*. Поэтому в работе [53] авторы предложили осуществлять контроль над этим процессом с помощью фоточувствительных производных гуанидиния **1** и **2**, содержащих азобензольный фрагмент (Рис. 4).

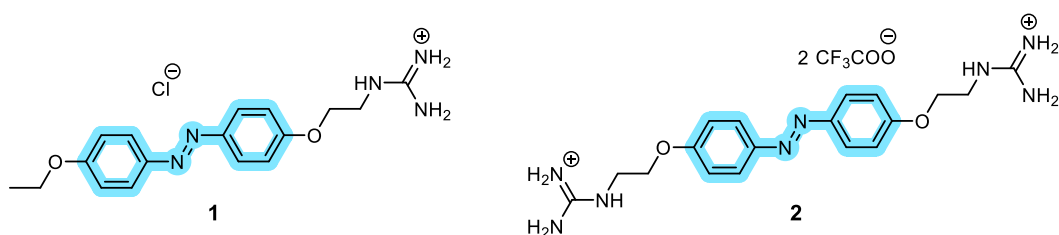


Рисунок 4 – Структуры производных гуанидиния **1** и **2**.

Оба соединения демонстрируют сильное сродство к ДНК тимуса теленка (ДНК-тт) и коротким олигонуклеотидам как до, так и после облучения УФ светом за счет наличия положительно-заряженных фрагментов, что было показано с помощью абсорбционной спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма (КД) и линейного дихроизма (ЛД). При этом, производное **2** интеркалирует между парами оснований, что сильно стабилизирует

двойную спираль и значительно повышает ее температуру плавления ($\Delta T_{пл} = +22^\circ\text{C}$), чего не наблюдалось в случае соединения **1** ($\Delta T_{пл} = 0^\circ\text{C}$) (Рис. 5). При УФ облучении *E,Z*-изомеризация вызывает вытеснение структуры **2** из сайтов связывания, что приводит к значительному снижению температуры плавления. Авторы также показали, что наблюдаемое фотоуправляемое поведение при плавлении является очень устойчивым, не зависит от последовательности нуклеотидов и применимо в широком диапазоне концентраций и ионной силы [53]. Кроме того, соединение **2** также было полезно при создании супрамолекулярных кристаллов на основе гуанозинмонофосфата с фотообратимой сборкой и фотопереключаемой флуоресценцией [54].

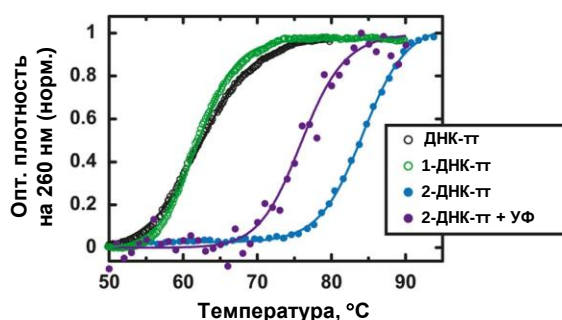


Рисунок 5 – Профили термической денатурации ДНК-тТ (40 μM в 10 мМ Трис-буфере, pH = 7,4) в присутствии соединений **1** и **2** (20 μM) до или во время облучения УФ светом (адаптировано из [53]).

Похожие производные азобензола **3-4**, замещенные полиаминными цепочками, также были изучены в отношении интеркаляции ДНК и изменения ее температуры плавления в зависимости от облучения светом (Рис. 6) [55]. Стоит отметить, что замещение *орто*-положений атомами фтора в этом случае сдвигает максимумы поглощения обоих изомеров в видимую область, что позволяет обеспечивать контроль над плавлением ДНК с полным исключением УФ облучения в отличие от соединений **1** и **2**.

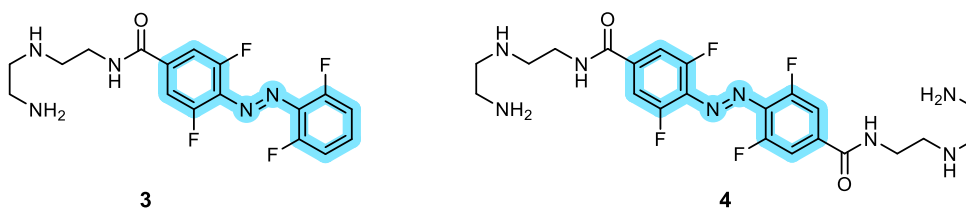


Рисунок 6 – Структуры производных азобензола **3** и **4**.

Не только ДНК, но и РНК является ключевой биологической мишенью при разработке новых терапевтических средств [56, 57]. Она играет важную роль в широком спектре клеточных процессов, в том числе в реализации генетической информации, доставке аминокислот и регулировании работы генов. По этой причине ведется активная разработка методов модифицирования нуклеиновых кислот для контроля структуры и свойств РНК с помощью внешнего воздействия. Фотохромные соединения могут быть включены в структуру нуклеиновой кислоты с помощью различных синтетических подходов, таких как присоединение

к нуклеозидам, введение фотохрома в фосфатный остов или замена нуклеозида на линкер, содержащий фотопереклюатель [58–60]. Среди перечисленных методов наиболее привлекательным считается модификация оснований, так как он минимально нарушает фосфодиэфирный остов и совместим с твердофазным синтезом, что позволяет эффективно и точно размещать фотохромные фрагменты в олигонуклеотидах.

В работах [61, 62] были предложены нуклеозиды **5-8**, модифицированные азобензольным фрагментом, для обратимого контроля над транскрипцией и трансляцией РНК (Рис. 7). Производное цитидина **5** как самостоятельно, так и в составе олигонуклеотида, при облучении УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм) подвергается *E,Z*-изомеризации, что было подтверждено данными абсорбционной спектроскопии, ЯМР и ВЭЖХ. При этом *E*-**5** оказывает минимальное влияние на транскрипцию, но после активации светом происходит обратимый конформационный переход, который переводит модифицированный нуклеотид в неактивное состояние и блокирует процесс синтеза РНК [61].

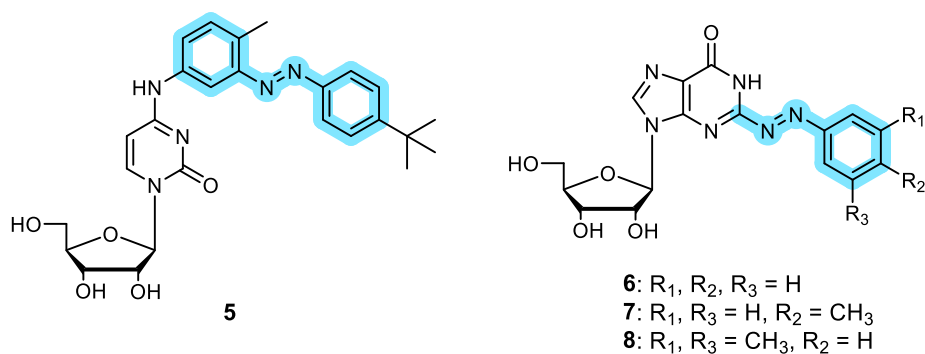


Рисунок 7 – Нуклеозиды **5-8**, модифицированные азобензолом.

Производные гуанозина **6-8** (Рис. 7) были изучены в качестве фотоуправляемых ингибиторов трансляции мРНК в эмбрионах рыб данио-рерио. В этом случае синтез белков на базе мРНК подавлялся для *E*-изомеров **6-8**, а облучение УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 370$ нм) приводило к восстановлению протекания трансляции. Для производного *Z*-**7** этот эффект оказался наиболее выраженным: экспрессия белка была восстановлена на 76% по сравнению с эмбрионами, которым вводили немодифицированную мРНК. Ухудшение результатов для соединений **6** и **8** авторы связывают с различиями в скорости термической *E,Z*-изомеризации [62]. Таким образом, даже незначительные структурные изменения могут оказывать большое влияние на потенциальную активность исследуемых соединений.

Если переходить к неканоническим структурам ДНК, то одной из приоритетных мишеней среди них являются четырехцепочечные нуклеиновые кислоты, обогащенные гуанином, которые называются G-квадруплексы (G4) (Рис. 8). К текущему моменту доказано, что G4-структуры участвуют в важных биологических процессах, таких как репликация ДНК и регуляция теломеразы, они обнаруживаются в промоторных областях онкогенов, геномах вирусов человека

и простейших паразитов. Поэтому избирательное воздействие на G4 с помощью низкомолекулярных лигандов показывает многообещающий терапевтический эффект как в клеточных моделях, так и в целых организмах [63–65].

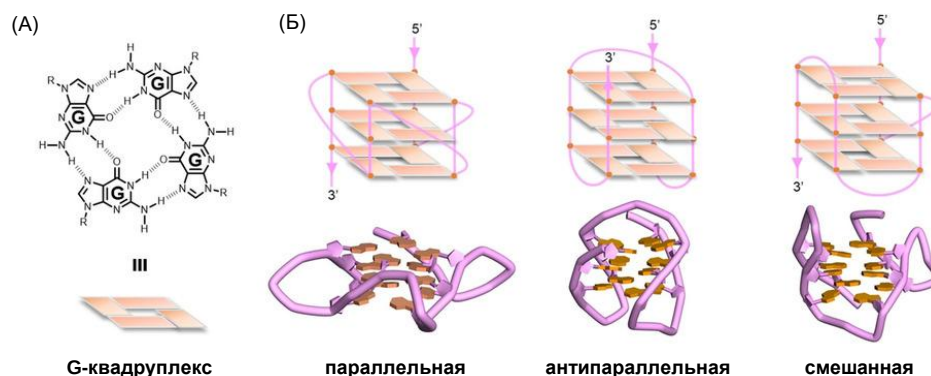


Рисунок 8 – Структура G4 (A) и схематические изображения типичных конформаций (B) (адаптировано из [65]).

Использование фотохромных структур в качестве лигандов для квадруплексов также открывает перспективы для дистанционного управления свойствами G4 в биологической среде. В этом отношении была синтезирована серия производных азобензола **9-12** (Рис. 9), содержащих в качестве направляющих заместителей фрагменты пиперидина, морфолина, триметиламина и пиридина [66, 67].

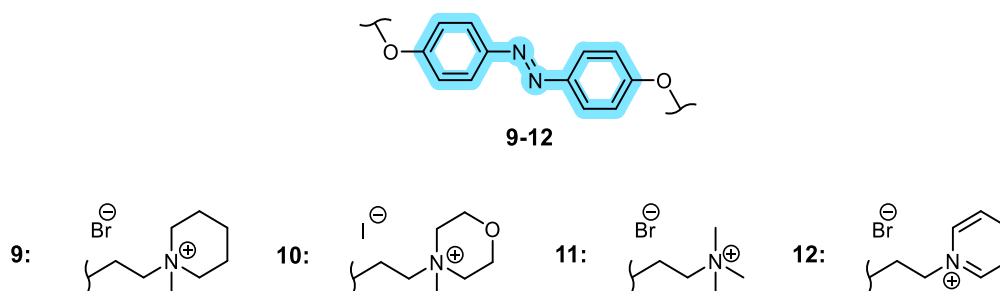


Рисунок 9 – Структуры азобензолов **9-12**.

С помощью абсорбционной спектроскопии, спектроскопии КД и гель-электрофореза авторы показали, что соединение **9** в *E*-форме индуцирует образование квадруплексов, при этом облучение УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 350$ нм) и переход в *Z*-форму вызывают раскручивание G4. Кроме того, сборка/разборка G4 может осуществляться как минимум десять раз без заметной фотодеструкции производного **9**. Но, к сожалению, фотоуправление образованием квадруплекса для **9** оказалось невозможным в присутствии катионов металлов, что значительно ограничивает его применение в физиологических условиях [66].

В отличие от **9**, структуры **10-12** (Рис. 9) продемонстрировали возможность фотопереключения в среде, богатой ионами калия. При облучении УФ/видимым светом они способны обратимо преобразовывать исходную смешанную конформацию G4 в антипараллельную форму. Влияние заместителей в этом случае также оказалось значительным:

в случае соединений **11** и **12** обратимость конформационного перехода G4 была не настолько полной, как для производного **10** [67].

В работе [68] группа под руководством М. Carmen Galan в качестве лиганда для G4 предложила использовать циклическое производное азобензола **13** (Рис. 10). Оказалось, что **13** избирательно нацелен на G4 последовательности LTR-III вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). При этом полностью обратимая фотоизомеризация в физиологических условиях приводит к 50-кратной разнице в константе связывания для *E*- и *Z*- изомеров, что было продемонстрировано с помощью абсорбционной и КД спектроскопий.

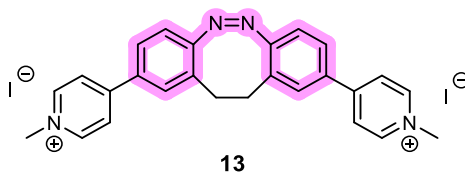


Рисунок 10 – Структура циклического производного **13**.

Также в настоящее время активно ведутся разработки по приданию фотоуправляемых свойств различным антибактериальным препаратам. Целенаправленное пространственно-временное воздействие светом на активность антибиотика может привести к более эффективному и точному лечению, предотвратить накопление активного вещества в окружающей среде, а также снизить бактериальную резистентность. Синтетический антибиотик триметоприм (Рис. 11) активен против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий и широко используется в клинической практике против инфекций мочевыводящих и дыхательных путей. В работе [69] были синтезированы фотоактивные аналоги триметоприма **14** и **15**, содержащие азобензольный фрагмент (Рис. 11). Соединения **14**, **15** продемонстрировали заметное снижение минимальной ингибирующей концентрации при переходе от *E*- к *Z*-форме в присутствии бактерий *Escherichia coli* CS1562. Несмотря на то, что для производного **15** изомеризация происходила недостаточно эффективно (соотношение изомеров в ФСС составило 1:1), разница в антибактериальной активности изомеров до и после облучения светом была более, чем в 8 раз. Кроме того, авторы продемонстрировали возможность обратимого управления ингибирующей концентрацией *in situ* путем попеременного включения зеленого и фиолетового света. Использование азобензольного фрагмента для управления антибактериальной активностью было успешно продемонстрировано и на примере других антибиотиков, например, ципрофлоксацина [36, 70], норфлоксацина [71, 72], грамицидина [73] и тироцидина [74]. Кроме того, азосоединения с другими видами фармакологической активности, включая противовирусную, противовоспалительную, противораковую и др., были подробно представлены в недавнем обзоре итальянских коллег [75].

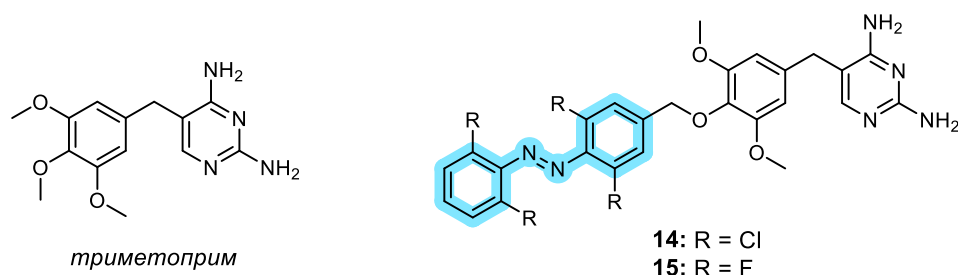


Рисунок 11 – Триметоприм и его фотоактивные аналоги **14**, **15**.

На текущий момент представлен лишь один фотопереключаемый лекарственный препарат на основе азобензола, который дошел до фазы клинических испытаний, это производное **16** (BENAQ/KIO-301) (Рис. 12). Он был разработан в 2017 году [76] для восстановления зрительной функции сетчатки у пациентов с хориоидермией и ретинопатией и зарекомендовал себя лучше ранее протестированных аналогов. При облучении видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 420$ нм) Z-форма открывает потенциал-зависимые ионные каналы, приводя к появлению импульса и передаче сигнала в мозг о наличии света. Перевод в E-форму в темноте способствует блокировке каналов, в результате чего происходит отключение передачи сигналов. Производное **16** может поддерживать зрительные реакции сетчатки в течение почти 1 месяца после однократной инъекции, при этом он избирательно воздействует на дегенерированную сетчатку, не оказывая существенного влияния на здоровые области сетчатки. В 2022 году компания Kioqa Pharmaceutical Inc. начала исследование I/II фазы с повышением дозы для оценки безопасности, в ходе которого **16** вызвал положительные терапевтические эффекты, что открывает путь для дальнейшего развития фотофармакологии.

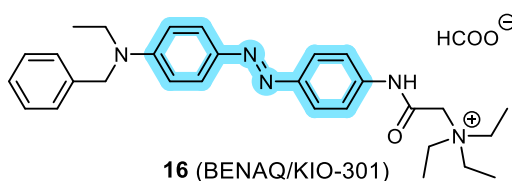
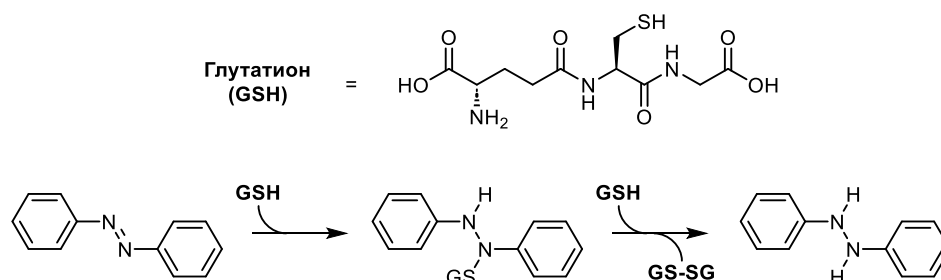


Рисунок 12 – Препарат BENAQ/KIO-301.

Для того, чтобы и азобензолы, и другие фотохромные соединения, нашли широкое распространение в качестве терапевтических препаратов, они должны отвечать нескольким требованиям. В первую очередь необходимо, чтобы в фотостационарном состоянии количество фотопродукта составляло не менее 90%, при этом разница в эффективности между двумя различными изомерами должна быть как можно выше. Кроме того, фотохромы должны выдерживать последовательные циклы фотопереключения без видимого разложения, а также должны быть растворимы и стабильны в водной и биологической среде. В этом отношении азобензолы демонстрируют недостаточную стабильность *in vitro*, так как могут подвергаться необратимому восстановлению внутриклеточным глутатионом (GSH) до гидразобензола (Схема 2). Скорость восстановления можно замедлить подбором заместителей или стерическими

препятствиями, но это, в свою очередь, может ухудшать фотохимические свойства азобензолов, что в результате ставит задачу поиска оптимального баланса между клеточной стабильностью и фотоуправляемостью [13].

Схема 2



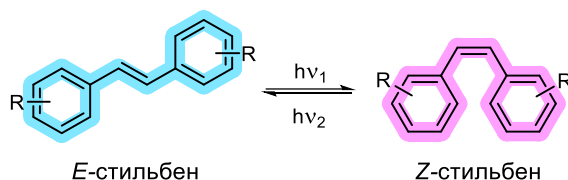
Как обсуждалось ранее, ключевым требованием для медицинских и биологических исследований является длина волны облучения фотохромов, которая в идеальном случае должна находиться в красной или ближней ИК области, так как УФ облучение вызывает неспецифическую фототоксичность и обладает плохим проникновением в ткани. Прежде всего, этого можно добиться за счет увеличения π -сопряжения в хромофорной системе фотохрома, но в случае азосоединений это приведет к перекрыванию π - π^* и n - π^* полос поглощения, что будет затруднять селективное переключение между двумя изомерами. Введение электронодонорных и электроноакцепторных заместителей также позволяет значительно сдвинуть максимум поглощения в видимую область, но это может привести к очень быстрой термической релаксации в полярных растворителях [77]. Увеличения времени жизни фотоиндуцированного изомера наряду с батохромным сдвигом максимума поглощения можно добиться путем замены одного или обоих бензольных колец азосоединений на гетероароматический фрагмент, что также активно используется в современных исследованиях [78–80].

2.1.2 Стильбены

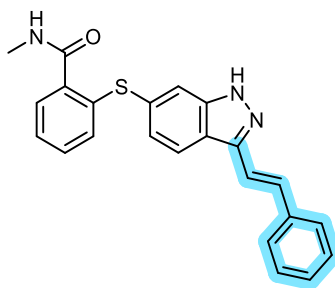
Стильбены структурно тесно связаны с азосоединениями и обладают схожей фотохимией, но вместо азофрагмента содержат алкеновую группу (Схема 3). Под воздействием света они подвергаются *E,Z*-изомеризации вокруг двойной связи, механизм которой был подробно изучен [81]. Незамещенный *E*-стильбен имеет максимум поглощения около 290 нм, отвечающий за π - π^* переход. При облучении происходит снижение интенсивности длинноволновой полосы поглощения с одновременным гипсохромным сдвигом, что обусловлено меньшей планарностью и нарушением сопряжения в образующемся *Z*-изомере. В отличие от азобензола, *Z*-стильбен в большинстве случаев термодинамически стабилен, поэтому термическая *Z,E*-изомеризация при комнатной температуре незначительна и возврат в исходное состояние возможен только при облучении светом с другой длиной волны. Одним из недостатков такой системы, объясняющих меньший интерес к их *E,Z*-изомеризации по сравнению с азобензолами, является значительное

перекрывание полосы поглощения *Z*-стильбена с более интенсивной полосой *E*-формы. Это затрудняет селективное возбуждение каждого из изомеров и существенно ограничивает эффективность фотоуправления. В связи с этим примеры фотоуправляемых лигандов для биологии и медицины на основе изомеризации стильбенов в литературе встречаются гораздо реже, чем для азобензолов.

Схема 3



При этом такой структурный фрагмент встречается во множестве одобренных лекарственных препаратов, например, в противоопухолевом средстве Тамоксифен, а также в Циннаризине и Флунаризине, применяемых при нарушениях мозгового кровообращения. Однако их фармакологическая активность не была оценена с точки зрения фотохромных свойств и различий в терапевтическом действии между двумя изомерами. В связи с этим в работе [82] была изучена ингибирующая активность протеинкиназы для *Z*-изомера одобренного противоопухолевого препарата Акситиниба **17** (Inlyta®, Pfizer) (Рис. 13). Авторы показали, что ингибирующая активность **17** в *E*-форме ($IC_{50} = 19$ нМ) почти в 43 раза выше, чем у соответствующего *Z*-изомера ($IC_{50} = 817$ нМ). Несмотря на то, что переключение биологической активности с *E*- на *Z*- в водном растворе оказалось невозможным из-за конкурирующего необратимого [2+2]-циклоприсоединения, была показана возможность полного восстановления ингибирующих свойств при облучении *Z*-**17** *in vitro* ($\lambda_{обл} = 385$ нм), открывая перспективы для фотоконтролируемой активации Акситиниба с минимизацией побочных эффектов препарата. На основании полученных результатов авторы отмечают необходимость проведения биологических исследований подобных соединений исключительно в темноте для предотвращения неконтролируемой изомеризации, а также подчеркивают целесообразность скрининга уже одобренных лекарственных препаратов для выявления их возможной фотоактивности.



17 (Акситиниб / Inlyta®, Pfizer)

Рисунок 13 – Противоопухолевый препарат Акситиниб.

Аналогично азобензолам, стильбены также успешно применяются для модификации олигонуклеотидов с целью регулирования гибридизации ДНК. В работе [83] было синтезировано три фотохромных нуклеозида **18-20** (Рис. 14) и изучена их *E,Z*-изомеризация в составе олигонуклеотидов различной длины. Исследуемые соединения продемонстрировали быструю и эффективную *E,Z*-изомеризацию: облучение светом ($\lambda_{\text{обл}} = 370$ нм для **18**, 410 нм для **19** и 420 нм для **20**) в течение 5 минут по данным ВЭЖХ обеспечивало конверсию 63-86%, а обратный переход приводил к образованию *E*-изомеров в количестве 77-94% при облучении более высокоэнергетичным светом ($\lambda_{\text{обл}} = 254$ нм для **18**, 290 нм для **19** и 310 нм для **20**). При этом, все изомеры проявили высокую термическую стабильность вплоть до 80°C.

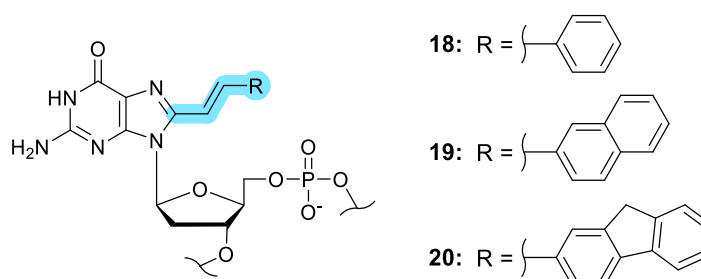


Рисунок 14 – Нуклеозиды на основе стильбенов **18-20**.

E,Z-переход в дуплексах, содержащих до трех фотохромных нуклеозидов, приводил к диссоциации двойной спирали при комнатной температуре по данным спектроскопии КД, а обратная фотоизомеризация приводила к восстановлению дуплексной структуры. Более того, авторы отмечают, что *E,Z*-изомеризация производных **18-20** сопровождается резким снижением интенсивности флуоресценции (Рис. 15), что позволяет использовать их в качестве молекулярных маркеров для мониторинга функциональных нуклеиновых кислот [83].

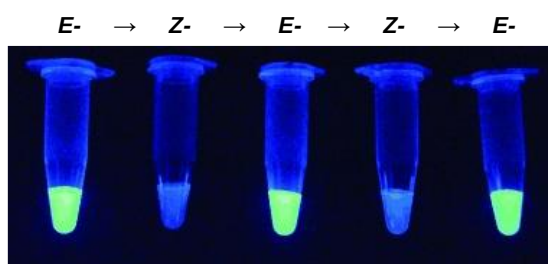
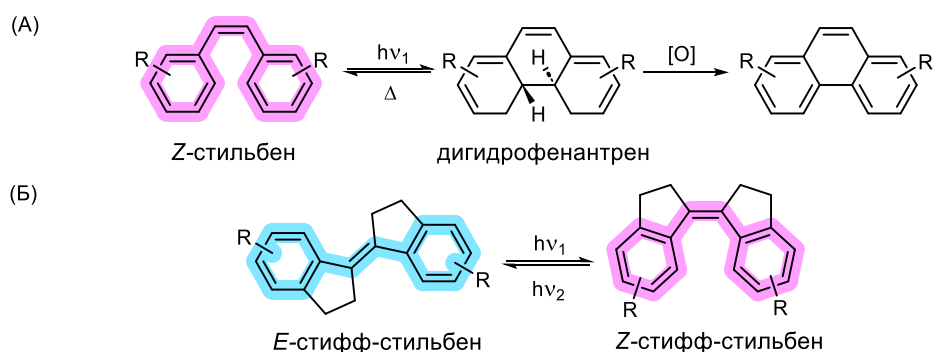


Рисунок 15 – Изменение флуоресценции производного **18** в составе олигонуклеотида при попеременном облучении УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 370/254$ нм) (адаптировано из [83]).

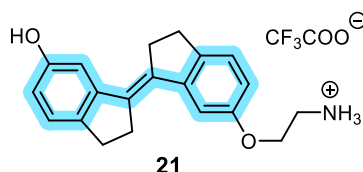
Позднее нуклеозид **20** также включили в состав аптамеров для обратимого фотопереключения G-квадруплексов [84]. В *E*-форме модифицированный олигонуклеотид образует G4, который связывается с тромбином – ключевым ферментом, участвующим в свертывании крови – и блокирует его активность. Переход в *Z*-изомер приводит к диссоциации квадруплекса и восстановлению активности фермента. Также аналогичные фрагменты применялись для обратной регуляции трансляции мРНК, экспрессии генов и переключения между различными формами ДНК [85–87].

Одним из важных недостатков этой фотохромной системы считается склонность *Z*-стильбена подвергаться обратимому 6π-электроциклическому замыканию кольца с образованием дигидрофенантрена, который, в свою очередь, может необратимо окисляться с образованием поликонденсированной кольцевой структуры (Схема 4, А), что ограничивает их применение в качестве многократных переключателей. В связи с этим большое внимание исследователей привлекают аналоги стильбена с конденсированным пятичленным кольцом (Схема 4, Б), известные как жесткие стильбены или стифф-стильбены (от англ. *stiff-stilbene*). Как и классические стильбены, стифф-стильбены характеризуются простотой синтеза, высоким квантовым выходом фотоизомеризации и отличной термической стабильностью *Z*-изомера. Но в отличие от них, жесткие стильбены гораздо более устойчивы и не подвергаются конкурирующим типам фотохимических превращений помимо *E,Z*-изомеризации. Кроме того, их максимум поглощения сдвинут в длинноволновую область по сравнению с обычными стильбенами, что обусловлено их жесткой планарной структурой, обеспечивающей эффективное перекрывание орбиталей и усиление π-π*-перехода.

Схема 4



В работе [88] было предложено amino-производное стифф-стильбена **21** для разработки фоточувствительных регуляторных РНК (Рис. 16). Соединение **21** быстро и эффективно изомеризуется при облучении светом с $\lambda_{\text{обл}} = 342$ нм, при этом *E*-форма связывает РНК-аптамер примерно в 100 раз сильнее, чем *Z*-изомер. Различие в сродстве к нуклеиновой кислоте позволило авторам управлять экспрессией генов, ингибируя трансляцию при связывании с *E*-**21** и восстанавливая экспрессию белка после облучения импульсом света, что было подтверждено экспериментами *in vitro* и *in vivo*. При этом было отмечено, что незамещенные аналоги производного **21**, в том числе классические стильбены, не оказывали аналогичного влияния на РНК.

Рисунок 16 – Производное стифф-стильбена **21**.

Производное **22** было разработано в качестве фотопереключаемого мостика, предназначенного для введения в состав ДНК-шпильки (Рис. 17) [89]. Включение **22** в нуклеотидную последовательность не оказало влияния на возможность образования вторичной структуры ДНК. Облучение УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 312 \text{ нм}$) приводило к эффективному образованию *Z*-изомера, вызывая значительную дестабилизацию шпильки. Это проявлялось в снижении температуры плавления ДНК на 6°C по сравнению с исходным состоянием, что позволяет осуществлять фотоуправление над термодинамической стабильностью дуплекса и гибридизацией ДНК. В отличие от азобензолов, для которых характерна быстрая термическая релаксация, система на основе стифф-стильбена **22** является бистабильной и открывает новые возможности для применения таких фотохромных систем.

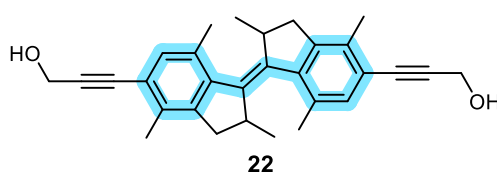
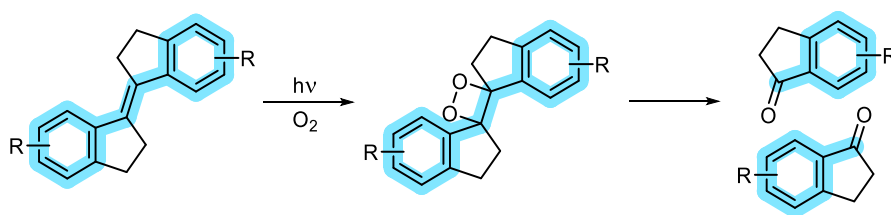


Рисунок 17 – Производное стифф-стильбена **22**.

Несмотря на то, что стифф-стильбены характеризуются высокой стабильностью и отсутствием побочных фотохромных превращений по сравнению с классическими стильбенами, в литературе встречается несколько примеров окисления таких соединений при облучении светом [90, 91]. Присоединение кислорода по двойной связи приводит к образованию эндо-пероксида и последующей необратимой фрагментации (Схема 5), что тоже ограничивает их применение в качестве обратимых фотопереключателей.

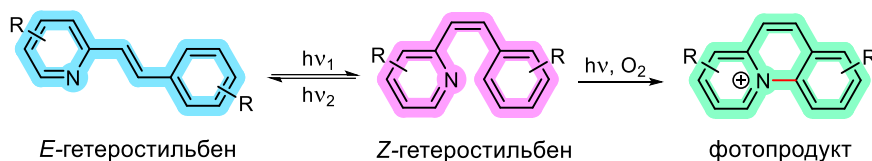
Схема 5



Несмотря на необратимость окисления *Z*-изомеров стильбенов, данный процесс нашел применение в биологических и медицинских исследованиях. Было обнаружено, что облучение гетероциклических аналогов стильбена с атомом азота в *орто*-положении относительно двойной связи приводит к образованию сложных полиароматических производных хинолизиния (Схема 6). Образующиеся положительно-заряженные фотопродукты проявляют высокое сродство к связыванию с ДНК в отличие от исходных стильбенов, что позволяет использовать их в качестве фотоуправляемых лигандов однократного действия [92]. При этом данная реакция протекает региоспецифично с образованием единственного фотопродукта с новой C-N связью [93]. К тому же, благодаря интеркалирующим свойствам образующиеся фотопродукты могут обладать

цитотоксичностью в отношении раковых клеток [94]. Таким образом, кажущийся недостаток стильбенов может быть использован как инструмент для эффективной генерации биологически активных соединений *in situ* из исходных неактивных гетеростильбенов.

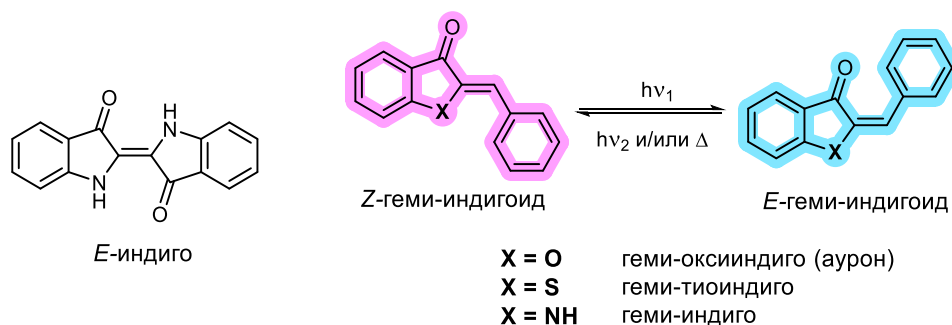
Схема 6



2.1.3 Геми-индигоиды

Геми-индигоиды представляют собой несимметричные ароматические соединения, принадлежащие к семейству индигоидов, и включают в себя фрагмент красителя индиго, соединенный со стильбеновым фрагментом через центральную двойную связь (Схема 7). Сам индиго непригоден для использования в качестве фотопереклювателя из-за эффективной релаксации возбужденного состояния через перенос протона с атома азота на карбонильную группу [95]. Алкилирование, ацилирование или арилирование решает эту проблему [8], однако время жизни фотоиндуцированной формы в этом случае достаточно низкое, что ограничивает его применение в фотофармакологии. Введение стильбенового фрагмента позволяет достигнуть термически стабильного при комнатной температуре фотостационарного состояния, при этом индигоидная структура обеспечивает поглощение в видимой области спектра обоих изомеров, что открывает широкие перспективы применения для этого класса фотохромных соединений. Они получили название геми-индиго, а их тио- и окси- аналоги известны как геми-тиоиндиго и геми-оксииндиго соответственно (Схема 7).

Схема 7



По сравнению с более распространенными фотохромами на основе азобензола, гемииндигоиды остаются относительно малоизученным классом, несмотря на их уникальные фотофизические свойства. Прежде всего, термодинамически стабильной для них является *Z*-форма, которая при облучении видимым светом переходит в метастабильное *E*-состояние. Термическое протекание обратной *E,Z*-изомеризации обычно происходит очень медленно из-за относительно высокого барьера реакции (>27 ккал/моль). Также гемииндигоиды

характеризуются высокой жесткостью, контролируемыми геометрическими изменениями при переключении и отличной фотостабильностью в течение многих циклов. Благодаря простоте синтеза и легким методам функционализации они являются доступными и универсальными фоточувствительными инструментами для широкого круга применений, что подробно было рассмотрено в недавнем обзоре [96].

Геми-оксииндиго, или ауруны, представляют собой природные флавоноидные пигменты, распространенные в цветах и плодах растений. Они обладают широким спектром биологической активности, включая противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную и многие другие. Несмотря на ценные фармакологические свойства, их применение в качестве фотохромных систем в литературе практически отсутствует, в отличие от геми-индиго и геми-тиоиндиго [96].

Оптические и фотохимические свойства геми-индиго практически нечувствительны к влиянию растворителей, за исключением полярных протонных сред, которые способствуют снижению эффективности фотохромизма и тушению флуоресценции [97]. Содержание фотоиндуцированного изомера в ФСС обычно превышает 81% [98], при этом в водных растворах этот показатель снижается до >72% [99]. Функционализация атома азота индоксильного фрагмента алкильными или арильными группами выравнивает термодинамическую стабильность обоих изомеров, в результате чего время жизни каждого из состояний может увеличиваться до нескольких тысяч лет при комнатной температуре [100]. Кроме того, это также способствует батохромному сдвигу полос поглощения, увеличению фотостабильности и более высоким квантовым выходам фотореакции [101].

Подавляющее большинство исследований геми-индиго посвящено изучению их фотохромных свойств в органических растворителях, тогда как работы по фотопереключению в водной среде и взаимодействию с биомолекулами к настоящему моменту немногочисленны. Одним из таких примеров является производное **23** (Рис. 18), разработанное в качестве лиганда для РНК ВИЧ 1 типа [102]. Облучение водного раствора *Z*-**23** видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 470$ нм) приводит к образованию *E*-изомера, содержание которого в ФСС составило 80%, а обратная реакция протекает при облучении светом с $\lambda_{\text{обл}} = 590$ нм. Оба изомера сохраняют способность связываться с РНК, демонстрируя батохромные сдвиги полос поглощения ($\Delta\lambda_{\text{полгл}} = 15$ нм для *Z*-**23** и *E*-**23**), при этом время жизни *E*-**23** увеличилось с ~11 до 51 часа в присутствии нуклеиновой кислоты. Несмотря на то, что сродство к связыванию с РНК не изменялось при переходе между двумя изомерами, эффект фотопереключения четко прослеживался при регистрации спектров флуоресценции: добавление РНК вызывает многократное увеличение интенсивности испускания *Z*-**23**, которое обратимо тушится при облучении раствора видимым светом (Рис. 18). Такая

фотоуправляемая флуоресценция делает производное **23** перспективным кандидатом для мониторинга биологических систем и протекающих в них динамических процессов.

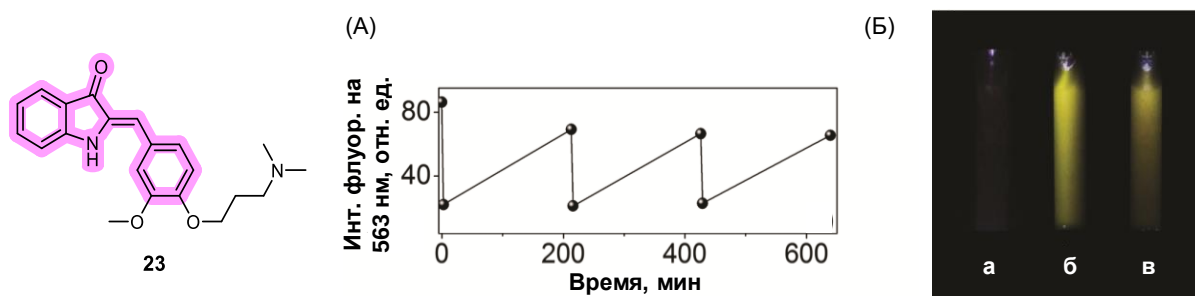


Рисунок 18 – Геми-индиго **23**. (А) Фотопереключение флуоресценции **23** в присутствии РНК ВИЧ 1 типа. (Б) Флуоресценция **23** (а) и **23** в присутствии РНК ВИЧ 1 типа до (б) и после (в) облучения. $\lambda_{\text{обл}} = 470$ нм для прямой, 590 нм для обратной реакций. Адаптировано из [102].

Серосодержащие аналоги геми-индиго – геми-тиоиндиго – в свою очередь, проявляют выраженный сольватохромизм: увеличение полярности растворителя вызывает батохромные сдвиги полос поглощения и флуоресценции, а также снижает эффективность *Z,E*-фотоизомеризации [103]. Сильные электронодонорные группы, такие как $-\text{NH}_2$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, в стильбеновом фрагменте обеспечивают более высокий квантовый выход *Z,E*-изомеризации и ускоренную термическую релаксацию по сравнению с более слабыми донорными заместителями [104]. Кроме того, электроноакцепторные группы в *meta*-положении относительно атома серы увеличивают скорость *Z,E*-изомеризации в отличие от электронодонорных заместителей в том же положении [105].

Группой немецких ученых под руководством О. Thorn-Seshold была разработана обширная серия производных геми-тиоиндиго с целью изучения их антимитотической активности, то есть способности подавлять процесс клеточного деления [106, 107]. Соединения, способные связываться с глобулярным белком тубулином, ингибируют его димеризацию в микротрубочки цитоскелета, что нарушает нормальное протекание митоза, вызывая апоптоз раковых клеток. Наиболее выдающиеся результаты были достигнуты для производных **24** и **25** (Рис. 19). Геми-тиоиндиго **24** подвергается *Z,E*-изомеризации при облучении видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 450$ нм) с образованием 65% *E*-**24** в ФСС. Обратная фотореакция протекала достаточно эффективно при облучении светом 505 нм с образованием 95% *Z*-**24**. Биологические исследования на линии клеток рака шейки матки HeLa показали, что EC_{50} для исходной *Z*-формы в 4 раза ниже, чем для фотоиндуцированного изомера (1 μM для *Z*-**24** и 4 μM для *E*-**24**) [106].

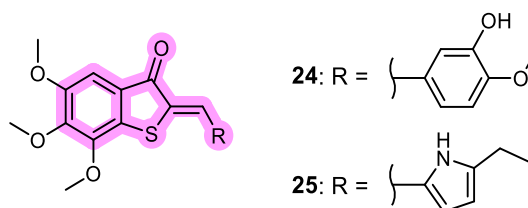


Рисунок 19 – Геми-тиоиндиго **24**, **25**.

Введение пиррольного фрагмента в случае соединения **25** приводит к более эффективному разделению полос поглощения для *Z*- и *E*- изомеров, что обусловлено появлением внутримолекулярной водородной связи N-H...O=C в *E*-форме. Это позволило достичь 89% содержания *E*-**25** в ФСС при облучении 440 нм (Рис. 20, А). В отличие от **24**, именно *E*-**25** проявил большую антимитотическую активность: IC₅₀ для него составила 4,5 мМ, в то время как для *Z*-**25** она оказалась >50 мМ (Рис. 20, Б) [107]. Несмотря на полученные результаты, авторы отмечают, что такие производные требуют улучшения своих характеристик, а именно повышения растворимости в воде. Оптические исследования для них проводились в растворе ДМСО-PBS (75:25), что привело к заметным расхождениям в фотохромных характеристиках при переходе с раствора на клетки. Достаточная растворимость в воде является важным фактором не только для предсказуемости фотохромных свойств и биораспределения, но и для предотвращения нежелательного [2+2]-циклоприсоединения в агрегированном состоянии, которое возможно для таких производных.

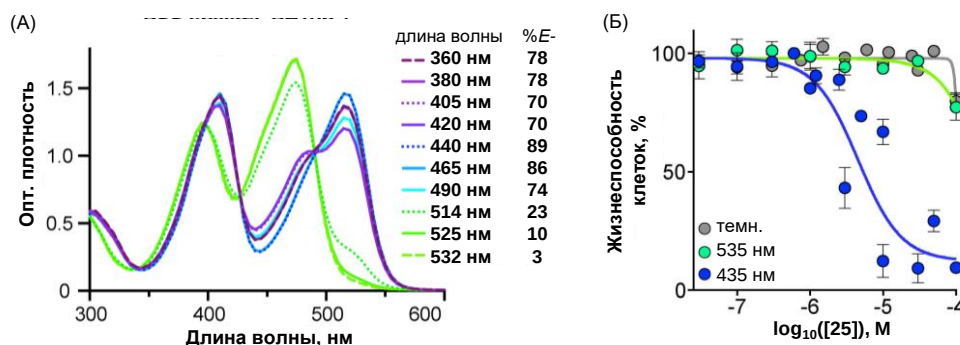
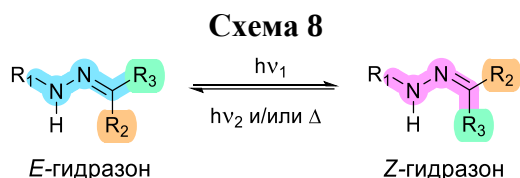


Рисунок 20 – (А) Спектры поглощения ФСС для соединения **25** в CH₃CN и их состав при облучении различными длинами волн, полученный с помощью ВЭЖХ. (Б) Жизнеспособность клеточной линии HeLa при инкубации с соединением **25** до и после облучения. Адаптировано из [107].

2.1.4 Гидразоны

Гидразоны представляют собой класс фотохромных соединений, содержащие в своей структуре характерный фрагмент C=N-N (Схема 8). *E,Z*-изомеризация вокруг двойной связи помимо облучения светом может также быть инициирована изменением pH или добавлением катионов металлов [108–110].

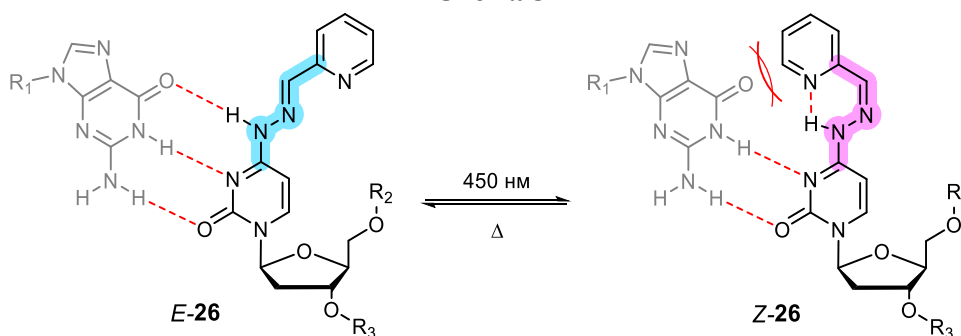


Одним из недостатков таких систем для применения в фотофармакологии является быстрая термическая релаксация фотоиндуцированной формы после прекращения облучения. Успешным решением этой проблемы стало введение в структуру гидразона в качестве

заместителя R_3 акцепторов водородной связи, например, пиридина или карбонильной группы, что позволяет значительно стабилизировать метастабильное состояние за счет образования внутримолекулярной водородной связи [111]. Такой подход позволяет создавать бистабильные фотопереклюатели с большим временем жизни, в некоторых случаях достигая нескольких тысяч лет [112].

Гидразоны аналогично другим фотохромам были успешно интегрированы в состав нуклеозидов с целью создания фотопереклюаемых цепей ДНК. Пиридин-замещенный гидразон **26** вводили в 4 положение цитидина таким образом, чтобы в исходной *E*-форме сохранялись комплементарные водородные связи с гуанидином (Схема 9) [113]. Облучение видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 450 \text{ нм}$) приводило к накоплению *Z*-изомера, в котором предпочтительным является образование внутримолекулярной водородной связи с пиридиновым фрагментом. Это вызывает нарушение комплементарности внутри нуклеотидной последовательности, что препятствует распознаванию этого участка ДНК-полимеразой и ингибирует репликацию ДНК. При этом обратной *Z,E*-изомеризации не происходило по меньшей мере в течение 1 часа при нагреве до 37°C , а через 24 часа содержание *Z*-изомера снизилось с 89% до 53%. Относительно хорошая термическая стабильность фотоиндуцированной формы, а также использование биосовместимого синего света в качестве источника воздействия делают эту систему пригодной для воздействия на ДНК-белковые взаимодействия и регулирования синтеза ДНК во время репликации генов.

Схема 9



В фотофармакологии фотохромные соединения привлекают внимание не только как самостоятельные молекулы с управляемой биологической активностью, но и как компоненты в составе более сложных систем, где они могут модулировать свойства других биологически активных соединений. В работе [114] для доставки доксорубина к опухолевым клеткам были разработаны наночастицы, модифицированные гидразоном **27** (Рис. 21). В процессе синтеза производное **27** было выделено в виде смеси изомеров (*Z/E* = 8/2), при этом значительное преобладание *Z*-изомера было обусловлено стабилизирующим действием внутримолекулярных водородных связей. Кроме того, введение $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ группы в структуру гидразона **27** приводит к его интенсивной флуоресценции в *Z*-форме, которая снижается при переходе в *E*-изомер (Рис.

21) [115]. Это свойство позволило не только визуализировать накопление наночастиц в клетках, но и установить их внутриклеточное распределение. *Z,E*-изомеризация, вызванная облучением светом с $\lambda_{\text{обл}} = 450$ нм, приводила к расширению наночастиц и высвобождению доксорубина в клетки. Это также сопровождалось тушением флуоресценции гидразона **27**, что может служить внутренним индикатором количества высвобожденного лекарственного средства. Несмотря на необратимость исследуемой системы из-за отсутствия обратной *E,Z*-изомеризации и разрушения самоорганизующейся структуры, она может обеспечивать пространственно-временной контроль высвобождения лекарственных препаратов, тем самым повышая их эффективность.

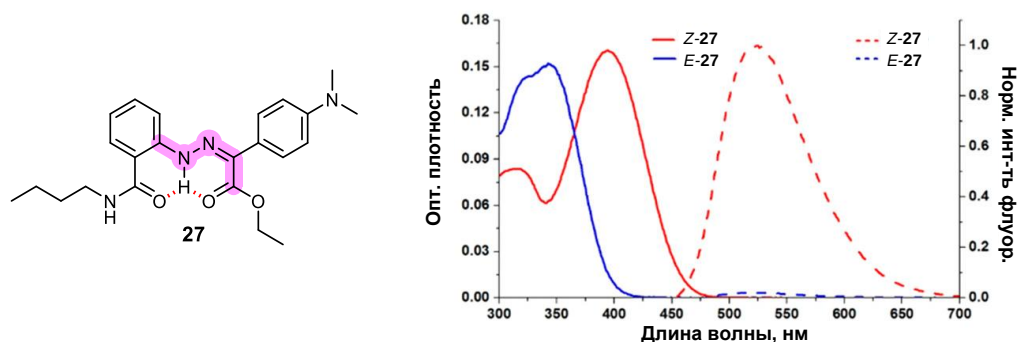


Рисунок 21 – Гидразон **27** и спектры поглощения и флуоресценции для *Z*- и *E*-изомеров в толуоле (адаптировано из [115]).

Помимо света было обнаружено, что изомеризацию гидразонов может вызывать и наличие других катализаторов. Коллегами из Канады на примере соединений **28** и **29** (Рис. 22) было показано, что при попадании в клеточную среду происходит инициирование их изомеризации глутатионом [116]. При этом время достижения термического *E,Z*-равновесия и соотношение изомеров варьируются в зависимости от структуры производных. В растворе для гидразона **28** в присутствии глутатиона равновесие наступает через 15 мин с соотношением изомеров *E/Z*- 35/65, в то время как для **29** оно устанавливается спустя 30 минут с одинаковым содержанием обеих форм. Таким образом, при разработке гидразонов для фотофармакологии и изучении их биологической активности необходимо учитывать не только фотоизомеризацию, но и изомеризацию, катализируемую клеточными компонентами.

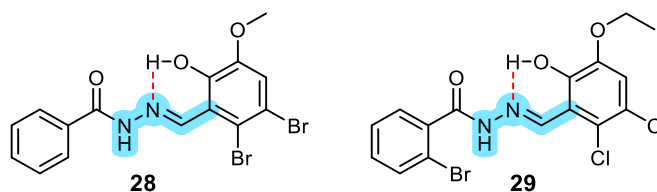


Рисунок 22 – Структура гидразонов **28** и **29**.

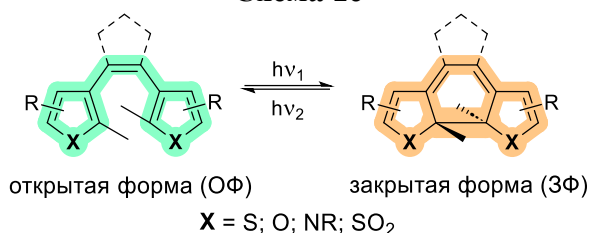
2.2 Фотохромные соединения с электроциклизацией/циклораспадом

2.2.1 Диарилэтены

Диарилэтены представляют собой второй по популярности, после азобензолов, класс фотохромных соединений и относятся к фотохромам Р-типа. По своей структуре они похожи на

стильбены и состоят из двух арильных групп, соединенных между собой этиленовым фрагментом, которые образуют гексатриеновую систему (Схема 10). В качестве арильных фрагментов чаще всего используются производные тиофена, но также встречаются примеры и с другими (гетеро)ароматическими системами, что позволяет настраивать свойства фотопереклюателя или обеспечивать дополнительные функции. Связь C=C обычно служит мостиком и замещается стерически объемными заместителями, чтобы избежать конкурирующей *Z,E*-изомеризации. Помимо мостиковой структуры диарилэтены содержат метильные группы в *орто*-положении к двойной связи, что предотвращает необратимое окисление, которое наблюдается в случае производных стильбена.

Схема 10

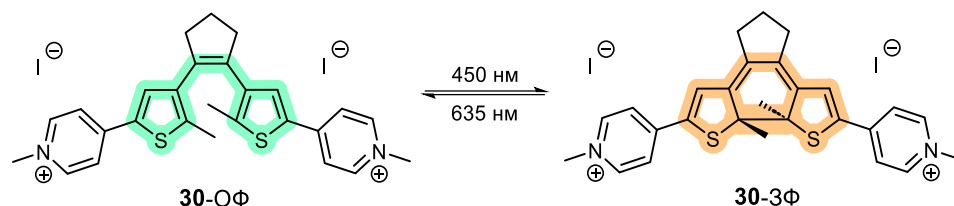


Облучение диарилэтенов светом приводит к протеканию 6 π -электроциклизации с образованием циклогексадиенового фрагмента, в результате чего гибкая открытая форма (ОФ) превращается в более жесткую закрытую (ЗФ), имеющую более глубокую окраску благодаря увеличению π -системы (Схема 10). Закрытая форма является стабильной и не возвращается спонтанно к своему исходному состоянию, а обратная реакция раскрытия цикла обычно инициируется облучением другой длиной волны и протекает количественно. Конротаторный механизм протекания электроциклизации делает термическое раскрытие цикла запрещенным согласно правилам Вудворда-Хоффмана для многих производных на основе 5-членных гетероциклов [117, 118]. Однако для диарилэтенов на основе бензола и пиридина или при введении сильных электронодонорных заместителей термическая стабильность снижается, что может приводить к циклораспаду при повышенной температуре [117].

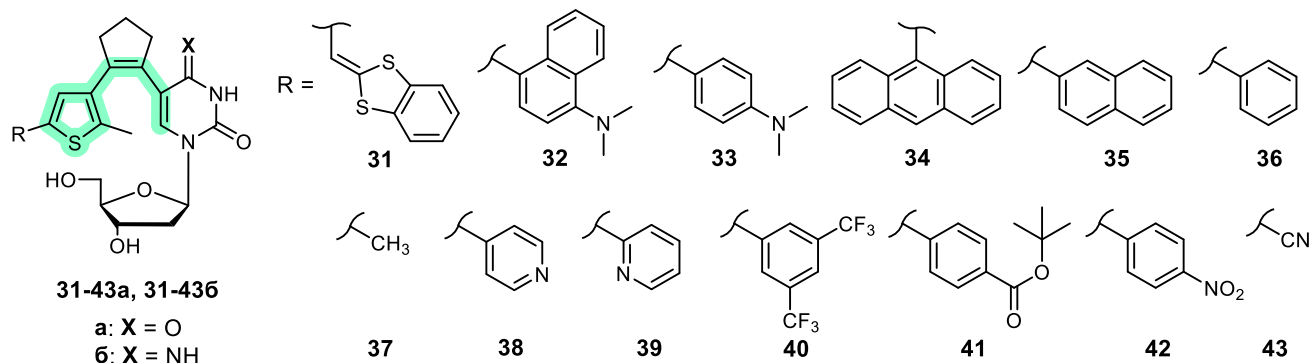
В работе [119] был разработан диарилэтен **30** для связывания с G-квадруплексами (Схема 11). Фотохромные свойства производного **30** сохранялись при проведении исследований в физиологических условиях (фосфатный буфер, pH 7,4), закрытие и раскрытие цикла происходило при попеременном переключении света с $\lambda_{\text{обл}} = 450$ нм и 635 нм, соответственно. При изучении аффинности к нуклеиновым кислотам наблюдалась значительная селективность лиганда по отношению к G4 по сравнению с дуплексной ДНК, что было доказано с помощью изменения температуры плавления в отсутствии и присутствии **30**. Однако различия в связывании между **30**-ОФ и **30**-ЗФ были минимальны, что авторы связывают со снижением термической стабильности **30**-ЗФ и протеканием обратной реакции при температурах близких к температуре плавления G4 (около 70°C). Анализ цитотоксичности на клеточной линии HeLa выявил более чем

двухкратную разницу в цитотоксичности между двумя формами ($IC_{50} = 23 \mu M$ для **30-ОФ** и $10 \mu M$ для **30-ЗФ**), что указывает на потенциальную возможность использования G4-лигандов в качестве основы для новых фотофармакологических агентов.

Схема 11



Модификация олигонуклеотидов фотохромными фрагментами на основе диарилэтенон также достаточно активно используется благодаря их бистабильности и возможности фотопереключения с помощью видимого света. В работе [120] было проведено обширное исследование фотохромных свойств серии диарилэтенон на основе 2'-дезоксигуанидина **31-43а** и 2'-дезокситидина **31-43б** (Рис. 23). Варьирование электронодонорных и электроакцепторных заместителей, а также увеличение π -системы позволило оценить влияние электронных эффектов на ключевые фотохимические и фотофизические параметры. Максимум поглощения диарилэтенон на основе цитидина **31-43б** в большинстве случаев был смещен в красную область относительно уридиновых аналогов **31-43а** с тем же заместителем R ($\Delta\lambda_{\text{полг}} = 2-45 \text{ нм}$). Для всех производных при облучении УФ светом ($\lambda_{\text{обл}} = 310-340 \text{ нм}$) в смеси этанол-вода наблюдалось протекание электроциклизации за исключением антрацен-замещенных диарилэтенон **34а** и **34б**. Для производных **31а,б**, **32а,б** и **33а,б**, содержащих в качестве заместителей электронодонорные фрагменты, оказались характерны необратимость раскрытия цикла и низкая устойчивость к фотодеградации. В совокупности, серия производных цитидина **31-43б** продемонстрировала более плохие фотохромные характеристики по сравнению с производными уридина **31-43а**. В этом случае батохромный сдвиг максимума поглощения не обеспечил желаемой комбинации фотохромных свойств для биологического применения, при этом аналогичная картина наблюдалась и для других производных диарилэтена [121].

Рисунок 23 – Нуклеотиды **31-43** на основе производных диарилэтена.

Для синтеза фотохромных олигонуклеотидов на основе полученных результатов были выбраны производные-лидеры **39a** и **41a**. Было показано, что фотохромизм сохранялся в обоих случаях, однако количество закрытой формы, образующейся при облучении УФ светом, снизилось на 17-20% при переходе к олигонуклеотидам, что объясняется различиями в пространственном и электронном окружении диарилэтен. Включение этих фрагментов в состав промотора T7 для инициации транскрипции РНК не оказало значительного влияния на его активность. Однако после облучения светом скорость транскрипции снижалась в 1,7-2,4 раза, что указывает на ингибирование активности промотора и возможность фоторегуляции с помощью исследуемых производных [120].

Для фоторегуляции активности антибактериального препарата норфлоксацина было разработано производное **44** (Рис. 24) [122]. Введение стирилпиридиниевого фрагмента в структуру диарилэтена позволило сдвинуть полосу поглощения в красную область, увеличить растворимость в воде, а также обеспечить направленное воздействие на бактериальные мембраны за счет электростатических взаимодействий. Фотоциклизация производного **44** протекала при облучении синим светом ($\lambda_{\text{обл}} = 460\text{-}470$ нм) и достигала ФСС уже через 14 секунд. Закрытая форма соединения **44** при этом подвергалась обратному раскрытию цикла при облучении ближним инфракрасным (БИК) светом ($\lambda_{\text{обл}} = 730\text{-}740$ нм) в течение 4 минут. Исследования бактериальной активности показали, что открытая форма **44** (МИС = 2 мкг/мл) проявляет в 4 раза более высокую активность в отношении грамотрицательных бактерий *E.coli* по сравнению с закрытой формой (МИС = 8 мкг/мл). Таким образом, используя низкие дозы **44** после облучения синим светом, которые безопасны для здоровых клеток, можно облучать целевые места действия препарата биосовместимым БИК светом для ингибирования роста бактерий, что будет обеспечивать более безопасное и пространственно-временное контролируемое лечение организмов. Еще несколько примеров использования диарилэтен для переключения антибактериальной активности было представлено в обзоре [123].

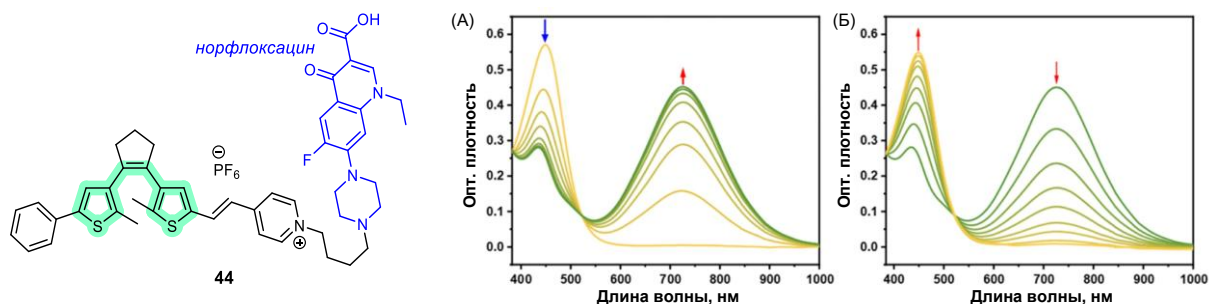


Рисунок 24 – Норфлоксацин, модифицированный диарилэтенем **44**, и изменения его спектров поглощения в CH_2Cl_2 (20 мМ) при попеременном облучении синим светом (А) и БИК светом (Б). Адаптировано из [122].

Диарилэтены также были изучены в отношении проявления цитотоксических свойств, индуцированных воздействием света. Для исследования механизма фотоцитотоксичности были

разработаны производные **45-47**, содержащие тиазольные и/или тиофеновые фрагменты (Рис. 25) [124]. Переключение между двумя состояниями во всех случаях проводилось путем попеременного переключения света с $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм и 546 нм. С помощью конкурентного титрования с бромистым этидием, известным интеркалирующим флуоресцентным красителем, было показано, что закрытые формы соединений **45-47** вытесняют стандарт из сайтов связывания ДНК, что свидетельствует об их интеркаляции между парами оснований. При этом с исходными открытыми формами такого эффекта не наблюдалось, что связано с их гибкой объемной структурой по сравнению с жесткими плоскими закрытыми формами.

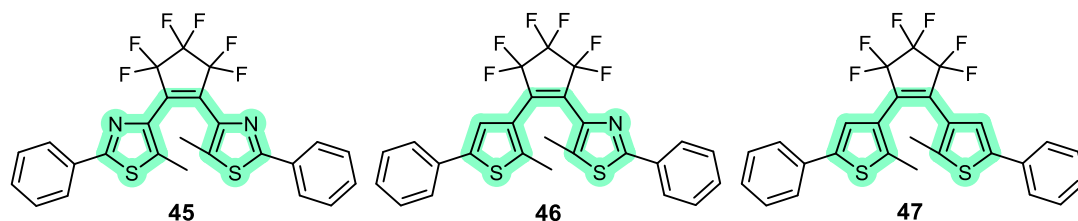


Рисунок 25 – Структуры диарилэтен **45-47**.

Исследования фотоцитотоксичности показали, что при облучении светом 365 нм и 436 нм соединение **47** не токсично по отношению к клеточной линии HeLa ни в одной из форм, также, как и открытые формы соединений **45** и **46**. При этом, закрытые формы **45** и **46** привели к гибели клеток при облучении синим светом ($\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм), что свидетельствует о влиянии тиазольного фрагмента на запуск клеточного апоптоза. Стоит отметить, что облучение более длинноволновым зеленым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 546$ нм) не вызывало аналогичных эффектов. Исключив генерацию активных форм кислорода (АФК) в этих экспериментах, авторы пришли к выводу, что возможный механизм гибели клеток обусловлен многократными реакциями электроциклизации-циклораспада [124].

В литературе также представлено большое количество примеров использования диарилэтен в качестве компонентов сложных полифункциональных систем. В работе [125] был синтезирован диарилэтен **48**, содержащий в качестве концевых заместителей молекулы дифениламино-замещенного стирилового красителя (Рис. 26). Данный краситель известен своей превосходной агрегационно-индуцированной эмиссией (AIE, от англ. aggregation-induced emission), а также способностью генерировать АФК [126]. Превращения между открытой и закрытой формами диарилэтена **48** осуществлялись путем последовательного облучения УФ светом и светом с $\lambda_{\text{обл}} = 660$ нм без видимой фотодегradации в течение 7 циклов, при этом раскрытие цикла также сопровождалось значительным увеличением интенсивности флуоресценции.

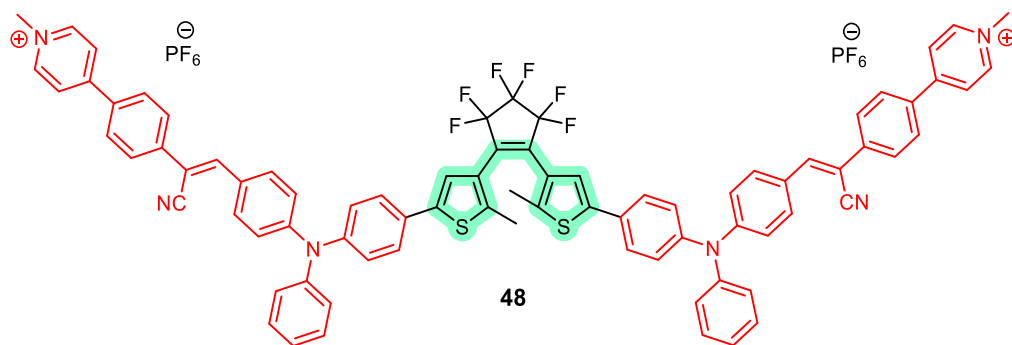


Рисунок 26 – Диарилэтен **48**, модифицированный стироловым красителем.

Было обнаружено, что открытая форма **48** обладает гораздо более эффективной генерацией АФК, чем исходный дифениламино-замещенный стироловый краситель и коммерческий фотосенсибилизатор бенгальский розовый, в то время как закрытая форма **48** эту способность утрачивала. С помощью экспериментов *in vivo* было смоделировано хирургическое удаление опухоли с помощью наночастиц, модифицированных закрытой формой диарилэтена **48**. Флуоресцентная визуализация обеспечивала высокоточное определение границ опухоли, включая выявление остаточных очагов, которые трудно различить при стандартной хирургической визуализации (Рис. 27). В то же время генерация АФК приводила к иммуногенной гибели опухолевых клеток, что сопровождалось подавлением роста и метастатических опухолей. Таким образом, диарилэтен **48** проявил себя как универсальный фотоуправляемый агент, предоставляющий новые подходы для точной мультимодальной визуализации и лечения [125].



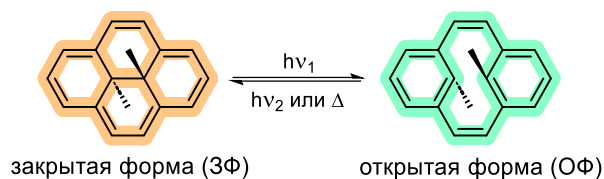
Рисунок 27 – Изображения флуоресцентного сигнала ортотопических опухолей 4Т1 в присутствии наночастиц, модифицированных диарилэтенем **48**, до и после операции во время облучения (адаптировано из [125]).

2.2.2 Дигидропирены

Дигидропирены представляют собой относительно новый тип фотохромных соединений, которые относятся к семейству диарилэтенов. Исходная плоская закрытая форма состоит из большой сопряженной π -системы, которая в зависимости от заместителей обеспечивает поглощение в видимой и БИК области спектра. Две центральные метильные группы, как и в случае диарилэтенов, защищают ядро от необратимого окисления. Под воздействием света закрытая форма подвергается раскрытию цикла с образованием метастабильной открытой формы (Схема 12). Этот процесс сопровождается обесцвечиванием и является обратимым как

термически, так и при облучении более короткими длинами волн, благодаря чему дигидропирены относятся к фотоперекллючателям Т-типа с отрицательным фотохромизмом.

Схема 12



Оптические и фотохромные свойства дигидропиренов сильно зависят от окружающей среды. С увеличением полярности растворителя происходит не только батохромный сдвиг полосы поглощения, но также значительно снижаются квантовый выход фотореакции, термическая стабильность открытой формы, а также устойчивость к фотодеградации. Учитывая эти особенности, а также сложность синтеза таких производных, дигидропирены не получили широкого распространения в фотофармакологии. Однако в последнее время они привлекают все больше внимания благодаря возможности активации БИК светом, что значительно труднее реализовать для большинства других фотохромов.

Примеры использования дигидропиренов в отношении нуклеиновых кислот в литературе немногочисленны. Одним из них является производное **49** (Рис. 28), которое было разработано в качестве фотоуправляемого фрагмента рибозим — молекул РНК, способных катализировать химические реакции в организме, выполняя тем самым функции ферментов и регулируя синтез белков [127]. Превращение между закрытой и открытой формами **49** происходило достаточно эффективно при облучении видимым светом и УФ светом. В присутствии микромолярных концентраций дигидропирена **49** исследуемая РНК проявляла в 900 раз меньшую каталитическую активность при переходе от закрытой формы в открытую, что позволяет осуществлять контроль экспрессии генов при переключении светом.

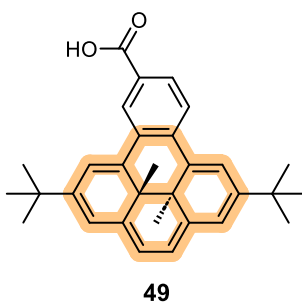
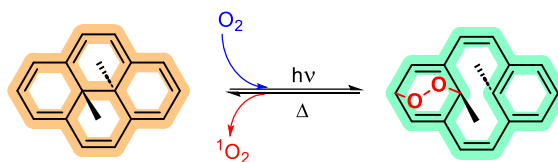


Рисунок 28 – Структура дигидропирена **49**.

Предполагается, что характерная низкая фотостабильность дигидропиренов обусловлена высокой реакционной способностью бирадикального промежуточного продукта, который на воздухе генерирует производное эндопероксида (Схема 13). Существуют примеры стабилизации этой реакции и, как следствие, повышения устойчивости к фотодеградации, например, путем инкапсулирования дигидропиренов в различные полости [128], однако именно эта особенность

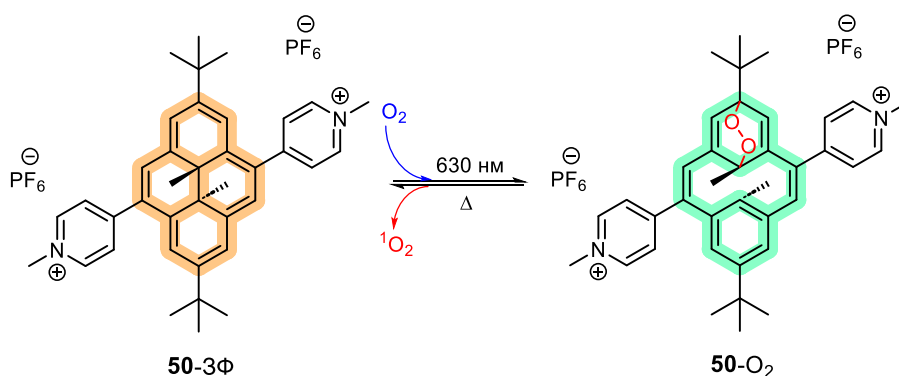
открыла возможности для создания на их основе агентов для фотодинамической терапии (ФДТ). Образующийся эндопероксид способен термически высвобождать синглетный кислород, что придает дигидропиренам способность хранить, доставлять и высвобождать эту активную форму в целевом месте действия.

Схема 13



В работе [129] был синтезирован дигидропирен **50** и изучены его фотохромные характеристики. При облучении **50** в аэробных условиях светом с $\lambda_{\text{обл}} > 630$ нм наблюдалось образование эндопероксида **50-O₂** (Схема 14), содержание которого составило $>98\%$. Наличие электроноакцепторных пиридиниевых заместителей в ядре не только существенно повышает эффективность фотохромной реакции с точки зрения скорости раскрытия цикла, но и, по-видимому, создает предпосылки для захвата и последующего высвобождения кислорода, так как образование эндопероксида из незамещенного диметилдигидропирена протекает с низким выходом. Нагрев раствора **50-O₂** до 35°C приводил к восстановлению исходного спектра поглощения **50-3Ф** в течение нескольких часов, что доказывает обратимость процесса связывания кислорода. С помощью ЯМР мониторинга в присутствии ловушки $^1\text{O}_2$ было показано, что его высвобождение протекает количественно с выходом около 85% . Однако все эксперименты в этом случае проводились в органических растворителях, поэтому необходимо дальнейшее изучение данного процесса в водной среде.

Схема 14



Для оценки цитотоксичности в раковых клетках в работе [130] был предложен бис-платиновый (II) комплекс дигидропирена **51** (Рис. 29). Образование эндопероксида **51-O₂** наблюдалось при облучении красным светом ($\lambda_{\text{обл}} > 630$ нм) в присутствии воздуха, при этом квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ составил 38% . Восстановление исходного дигидропирена происходило в течение 48 часов при комнатной температуре, однако наблюдалось также

образование некоторых побочных продуктов окисления. Цитотоксические свойства как закрытой формы **51**, так и эндопероксида **51-O₂** в отношении клеточной линии меланомы человека А-375 оказались сопоставимыми: IC₅₀ составила 53 μ М и 56 μ М, соответственно. Однако клеточные исследования выявили существенные различия в проникновении каждой из форм в клетки. Большая часть молекул дигидропирена **51** накапливается в цитоплазме клеток А-375, в то время как эндопероксид **51-O₂** преимущественно проникает в ядро, что было подтверждено экспериментами по колокализации с ядерным красителем Хехст 33342. Высвобождение ¹O₂ в клетках было также продемонстрировано с использованием 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) – стандартного флуоресцентного зонда, который проявляет выраженную флуоресценцию только при взаимодействии с АФК (Рис. 29). Несмотря на отсутствие данных о возможности генерации эндопероксида **51-O₂** *in situ* непосредственно в клетках, данная работа открывает новые перспективы применения дигидропиренов в фотофармакологии.

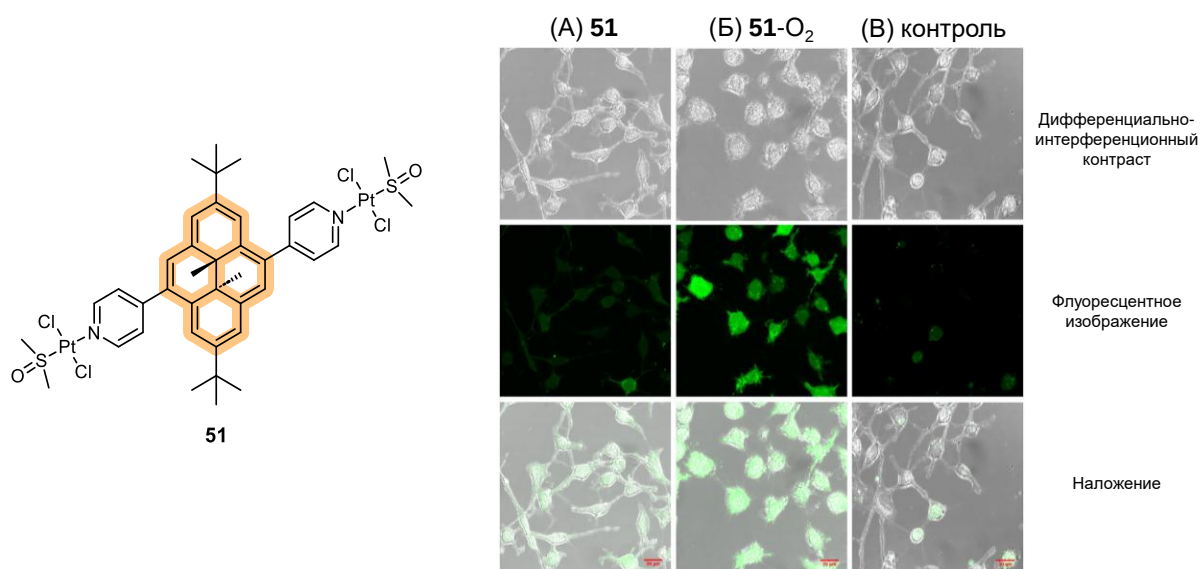


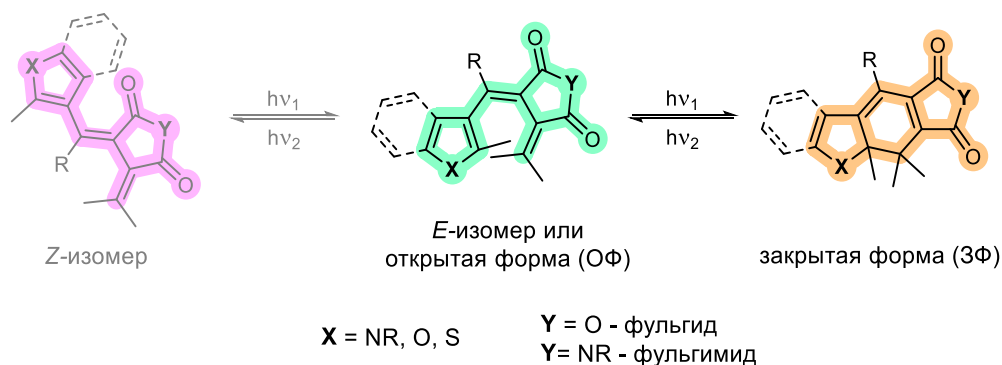
Рисунок 29 – Бис-платиновый (II) комплекс дигидропирена **51** и визуализация высвобождения ¹O₂ на клетках А-375 с использованием DCFH-DA в качестве внутриклеточного зонда АФК. Метка масштаба 20 мкм. Адаптировано из [130].

2.2.3 Фульгиды и фульгимиды

Фульгиды и фульгимиды представляют собой еще один класс фотохромных соединений, которые подвергаются обратимой 6 π -электроциклизации с образованием закрытой формы (Схема 15). В отличие от диарилэтанов, одна часть этих производных может представлять собой практически любой (гетеро)ароматический фрагмент, например, бензол, фуран, пиразол, пиррол, индол, тиофен, тиазол или оксазол. Второй кольцевой структурой является либо янтарный ангидрид (Y = O) с образованием фульгида, либо сукцинимид (Y = NR) для построения фульгимида. При этом заместитель R в мостиковой части играет немаловажную роль. Как для фульгидов, так и фульгимидов было синтезировано большое разнообразие производных и было обнаружено, что небольшие заместители в этом положении, например -CH₃, способствуют

протеканию конкурирующей *Z,E*-изомеризации, что может снижать содержание закрытой формы. В то время как с более крупными заместителями, такими как изопропил, *трет*-бутил или циклическими группами, изомеризация не происходит из-за стерических трудностей [131].

Схема 15



Переход от фульгида к соответствующему фульгимиду чаще всего не изменяет фотохимические свойства, однако их полоса поглощения подвергается батохромному сдвигу. Закрытая форма приобретает сильную окраску из-за увеличения π -системы и поглощает в видимом диапазоне около 450-550 нм в случае фульгидов и до 600 нм для фульгимидов. И те, и другие производные чаще всего являются термически очень стабильными и не подвергаются обесцвечиванию в течение нескольких дней при 50°C. Однако термическая стабильность, как и в случае диарилэтенов, несколько снижается в случае производных на основе бензола из-за более высокой степени ароматичности. Также они менее липофильны, чем диарилэтены, благодаря наличию полярного янтарного ангидрида или сукцинимиды в структуре. Поэтому этот класс фотохромов, как правило, лучше растворим в полярных органических растворителях и в водных растворах, чем многие производные диарилэтенов, и не требуют дополнительной функционализации, однако известны случаи гидролиза фульгидов в водной среде [132].

Сиртуины представляют собой семейство специализированных белков-ферментов, которые регулируют жизненно важные клеточные процессы, включая обмен веществ и восстановление ДНК в результате воспаления или старения. Также они участвуют в эпигенетической регуляции и патогенезе ряда онкологических и нейродегенеративных заболеваний, поэтому являются перспективной мишенью для многих лекарственных препаратов. В качестве ингибиторов сиртуинов немецкими коллегами была разработана серия фульгимидов **52-54** с различными заместителями в индольном фрагменте (Рис. 30) [133]. Циклизация производных **52-54** происходит при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 400$ нм с образованием 19-32% закрытой формы в буферном растворе. При этом для **52** и **54** они были стабильны при 37°C в течение более 4 часов в отличие от **53**, закрытая форма которого подвергалась разложению, в связи с чем биологические исследования для него не проводились. Раскрытие цикла во всех случаях происходило также фотохимически при облучении $\lambda_{\text{обл}} = 590$ нм.

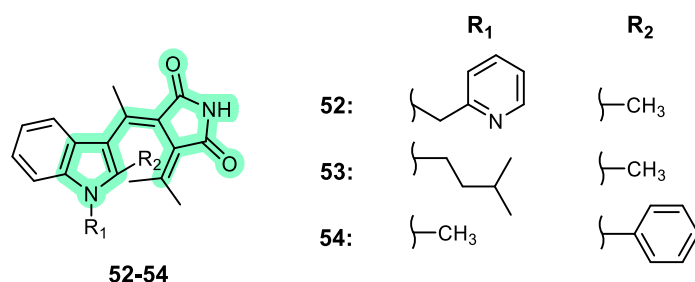


Рисунок 30 – Структура фульгимидов **52-54**.

Для соединения **52** ингибирующая активность закрытой формы оказалась в 1,5 раза ниже, чем открытой. При этом, в случае соединения **54** фенильная группа во 2-ом положении, нетипичная для классических фульгимидов, должна была обеспечить более выраженную разницу в активности за счет существенных пространственных различий между двумя формами. Действительно, для открытой формы **54** не удалось добиться ингибирования 50% сиртуина даже при максимальной концентрации 500 μM , тогда как после облучения IC_{50} составила 29,6 μM , что делает его потенциальным модулятором сиртуинов, управляемым с помощью видимого света в качестве внешнего стимула [133].

Рецепторы, сопряженные с G-белками, в том числе дофаминовые рецепторы, являются перспективным направлением исследований, так как их дисфункция связана с многочисленными расстройствами центральной нервной системы, включая болезнь Паркинсона, шизофрению и болезнь Хантингтона. В работе [134] была синтезирована серия фульгимидов, содержащих в своей структуре фрагменты замещенных пиперазинов, известных дофаминовых лигандов; наиболее перспективные производные **55** и **56** представлены на Рис. 31.

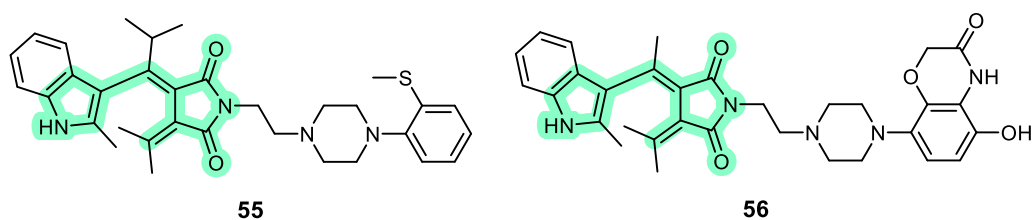


Рисунок 31 – Структуры фульгимидов **55** и **56**.

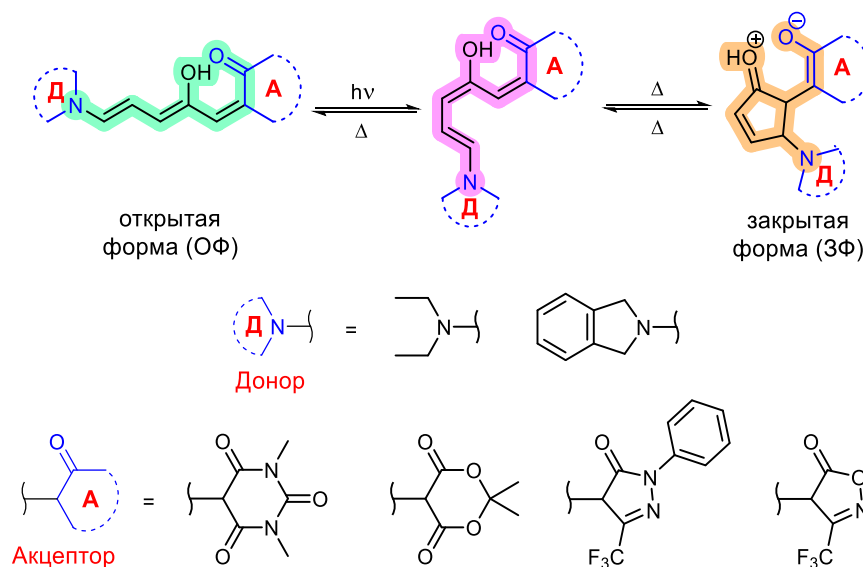
Облучение светом $\lambda_{\text{обл}} = 410 \text{ нм}$ приводило к замыканию цикла в обоих случаях, при этом содержание закрытой формы составило 81-86%. Возвращение в исходное состояние активировалось светом $\lambda_{\text{обл}} = 530 \text{ нм}$, и оба производных выдерживали как минимум 6 циклов без видимого разложения. Производное **55** в закрытой форме оказалось в 2 раза более эффективным для активации дофаминового рецептора $\text{D}_{2\text{S}}$ по сравнению с исходным состоянием (100 нМ, $E_{\text{макс}} = 25\%$ для **55-ОФ** и 45% для **55-ЗФ**). При этом для **56** наблюдалось 4-кратное увеличение активности при более низкой концентрации (1 нМ, $E_{\text{макс}} = 10\%$ для **56-ОФ** и 40% для **56-ЗФ**). Благодаря своим фотофизическим и биологическим свойствам, соединение **56**

представляет собой перспективный инструмент для активации фармакологически важных дофаминовых рецепторов.

2.2.4 Донорно-акцепторные аддукты Стенхауса

Донорно-акцепторные аддукты Стенхауса (DASA, от англ. Donor-Acceptor Stenhouse adduct) представляют собой довольно молодой класс фотопереклюателей, отрицательный фотохромизм которых был впервые описан в 2014 году [135, 136]. Химическая структура DASA включает в себя электронодонорный и электроноакцепторный фрагменты, соединенные между собой триеновым π -мостиком (Схема 16). Как правило, в качестве донорных частей используются диалкиламины, вторичный анилин или замещенные индолы, а в качестве акцепторных – кислота Мельдрума, 1,3-диметилбарбитуровая кислота и их структурно родственные аналоги.

Схема 16

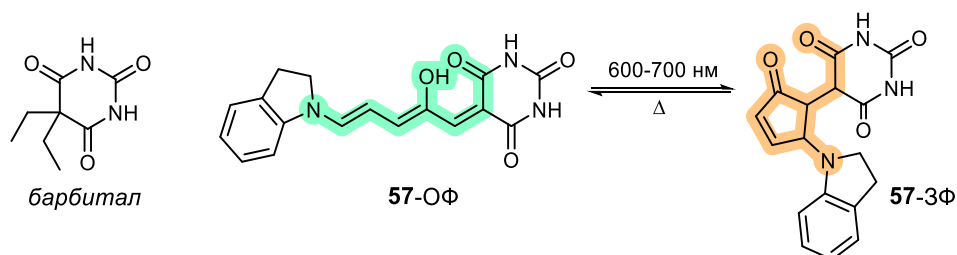


Основная полоса поглощения сильно окрашенной открытой формы DASA обусловлена внутримолекулярным переносом заряда и находится в диапазоне от 450 до 700 нм в зависимости от заместителей и растворителя. Облучение инициирует протекание *E,Z*-изомеризации, за которой следуют термическое вращение вокруг одинарной связи и заключительная 4 π -электроциклизация с образованием бесцветной закрытой цвиттер-ионной формы. Гидроксильная группа в триеновом мостике играет решающую роль на стадии циклизации, так как без нее DASA показывают только неселективную *E,Z*-изомеризацию нескольких двойных связей без замыкания цикла. Возврат к открытой форме осуществляется термически в течение нескольких минут или часов [137].

Учитывая, что одним из распространенных акцепторных фрагментов, используемых в DASA, является барбитуровая кислота, было важно проверить, сохраняется ли ее фармакологическая активность, аналогичная той, которую проявляют препарат барбитал и его

аналоги. Лекарственные средства этой серии, как правило, воздействуют на рецепторы γ -масляной кислоты в головном мозге, оказывая снотворное и седативное действие [138]. В работе [139] были изучены фотохромные свойства и биологическая активность производного **57**, содержащего в своей структуре барбитуровую кислоту (Схема 17). Оказалось, что в водном растворе DASA **57** подвергается спонтанному и необратимому превращению из открытой формы в закрытую, так как цвиттер-ионная форма значительно стабилизируется в полярных растворителях, что препятствует фотопереключению и в целом характерно для этого класса соединений [137]. Применение инкапсулирующего агента β -циклодекстрина (β -CD), который является нетоксичным, обеспечивает улучшенную растворимость в воде и широко используется в системах доставки лекарственных препаратов [140], позволило значительно стабилизировать открытую форму **57** в воде. При этом обратимое фотохромное превращение производного **57** осуществлялось даже в присутствии 10% β -CD, что открывает путь к использованию DASA в физиологических средах. Что касается его биологического действия, то было обнаружено, что **57**-ОФ значительно увеличивает частоту нейронной активности культивируемых нейронов в структурах мозга. Получить сопоставимые данные по активности для закрытой формы **57** не удалось, так как β -CD сам по себе вызывал заметное изменение нейронной активности. Тем не менее, обратимость фотопереключения DASA в водной среде с применением подходов супрамолекулярной химии расширяет возможности применения таких производных в биологии.

Схема 17



Выраженные изменения геометрии молекулы и ее полярности при фотопревращениях делают DASA перспективными объектами для реализации широкого спектра применений. В частности, известны примеры их использования для функционализации полимерных материалов и поверхностей, а также в качестве хемосенсоров и систем для фотопереключения смачиваемости, что было подробно рассмотрено в обзоре [137]. Что касается фотофармакологии, то применение DASA преимущественно представлено сложными системами, обеспечивающими фотоиндуцированное высвобождение действующих лекарственных препаратов. В работе [141] в качестве подобной системы были предложены мицеллы блок-сополимера на основе поли(этиленгликоль)метилового эфира метакрилата в качестве гидрофильного блока и полимера с боковыми фотохромными фрагментами **58** (Рис. 32, Б). Образующиеся мицеллы загружали эллиптицином (Рис. 32, А), известным противоопухолевым препаратом, который действует как

ингибитор топоизомеразы II и блокирует деление раковых клеток. В водном растворе при облучении мицелл зеленым светом ($\lambda_{\text{обл}} = 530 \text{ нм}$) наблюдалось уменьшение полосы поглощения DASA на 518 нм, свидетельствующее о переходе в закрытую форму **58-3Ф** и сопровождающееся высвобождением эллиптицина (Рис. 32, В). В темноте происходило постепенное восстановление открытой формы, однако при загрузке эллиптицином оптическая плотность после термической релаксации составила лишь 25% от исходного значения. Тем не менее, высвобождение лекарственного средства в темноте существенно замедлялось, что указывает на возможность фотоуправления этим процессом. Эта система продемонстрировала работоспособность и при переходе к клеточной линии рака молочной железы MCF-7. Однако в контрольном образце в темноте наблюдалось некоторое высвобождение эллиптицина, что свидетельствует о низкой стабильности мицелл в клеточной среде и указывает на необходимость дальнейшей оптимизации системы.

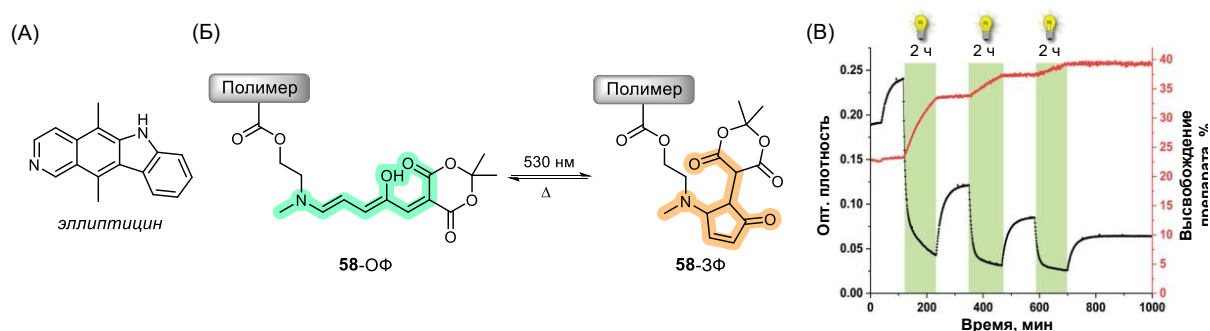
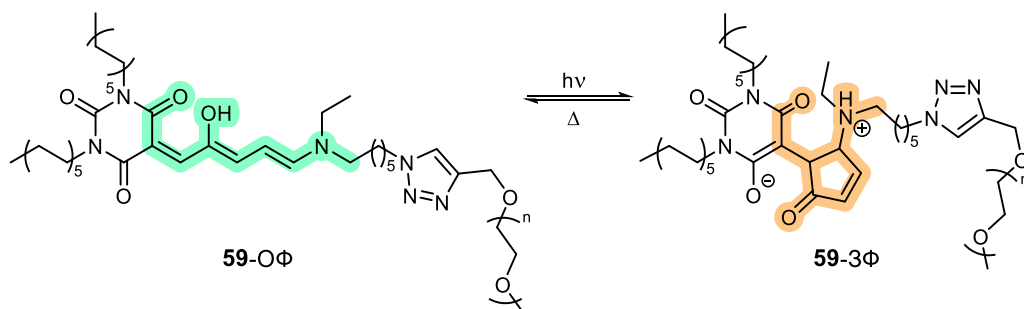


Рисунок 32 – (А) Структура эллиптицина. (Б) Фотохромная реакция производного **58**. (В) Оптическая плотность мицелл с **58**, нагруженных эллиптицином, на 518 нм и высвобождение эллиптицина в воде при 37°C в течение 3 циклов облучения зеленым светом (Адаптировано из [141]).

Производное DASA **59** на основе барбитуровой кислоты (Схема 18) также использовалось в составе мицелл для реализации системы адресной доставки лекарств [142]. Соединение **59** не проявляло цитотоксического действия по отношению к клеткам MCF-7 ни до, ни после облучения. В то же время для фотохромных мицелл на его основе, нагруженных противоопухолевым препаратом паклитакселом, после облучения видимым светом жизнеспособность клеток оказывалась сопоставимой с показателем для клеток, обработанных только лекарственным средством, что указывает на эффективное высвобождение препарата. Важно отметить, что клетки, инкубированные с мицеллами, содержащими паклитаксел, но не подвергавшиеся облучению светом, продемонстрировали значительно меньшую клеточную гибель. Таким образом, предложенный подход демонстрирует принципиальное преимущество фотоуправляемой доставки лекарственных препаратов, позволяющей снизить их побочные эффекты. Еще несколько аналогичных примеров использования DASA в системах адресной доставки представлены в работах [143] и [144].

Схема 18

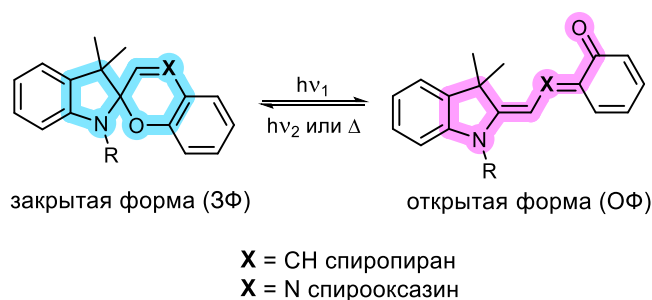


2.3 Фотохромные соединения с разрывом С-О связи

2.3.1 Спиропираны и спирооксазины

Спиропираны представляют собой один из классических классов фотохромных соединений, которые впервые были описаны учеными Y. Hirshberg и E. Fisher в 1954 году [145]. Молекулы спиропиранов построены из индолинового и пиранового фрагментов, которые связаны между собой общим атомом углерода, образуя спироциклическую систему (Схема 19). Спирооксазины представляют собой родственный спиропиранам класс, получивший широкое распространение с 1980-х годов [146], и отличаются наличием оксазинового гетероциклического фрагмента.

Схема 19

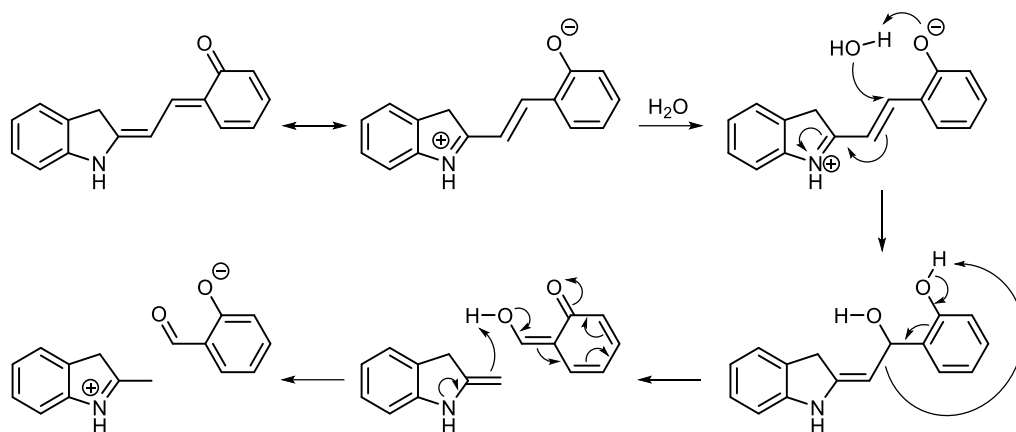


Исходная бесцветная закрытая форма под действием УФ света подвергается фотоиндуцированному π -электроциклическому раскрытию цикла с разрывом С-О связи и образованием открытой плоской мероцианиновой формы (Схема 19). Это превращение вызывает значительные изменения в электронной структуре, распределении заряда и полярности молекулы, что приводит к резкому увеличению поглощения видимого света. Закрытие цикла может быть инициировано облучением видимым светом или увеличением температуры. Фотохромное превращение спиропиранов помимо облучения светом может активироваться целым рядом других стимулов, включая изменение pH, температуры, растворителя или добавление катионов, что делает их перспективными кандидатами для широкого спектра применений и было подробно описано в обзоре [147].

Использование спиропиранов в водной среде может сопровождаться значительным смещением равновесия в сторону раскрытия цикла из-за стабилизации цвиттер-ионной формы,

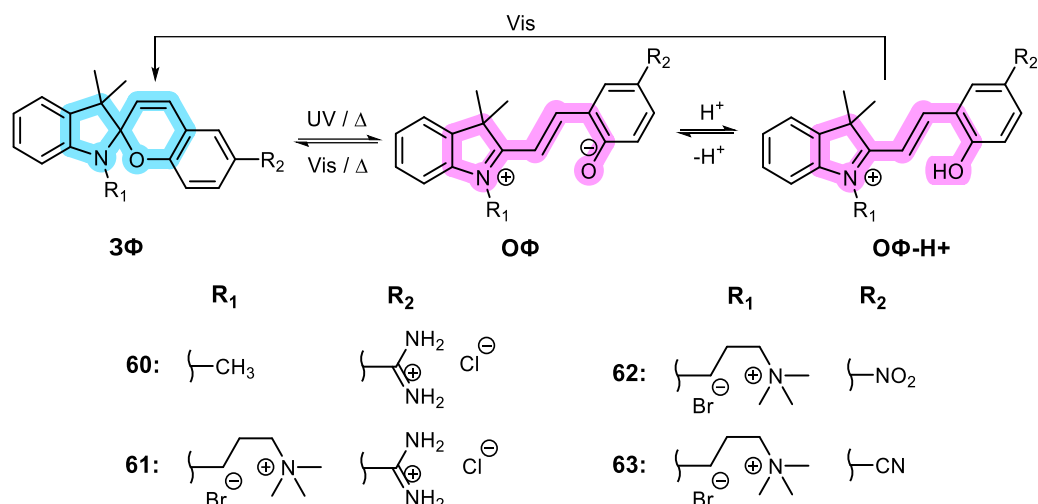
приводя к отрицательному фотохромизму. Это также может приводить к агрегации за счет диполь-дипольных взаимодействий и π - π -стэкинга, что дополнительно стабилизирует открытую форму и препятствует ее эффективному замыканию. В то же время открытая форма может подвергаться гидролизу по двойной связи с образованием соответствующего альдегида и основания Фишера (Схема 20) [148]. Эту проблему удастся решить протонированием фенольного атома кислорода, так как протонированная форма характеризуется повышенной устойчивостью к деградации. Спирооксазины, напротив, более устойчивы к гидролизу, но термическая релаксация открытой формы для них происходит достаточно быстро [8].

Схема 20



Так как открытая форма спиропиранов характеризуется плоской вытянутой структурой, в отличие от исходной объемной формы, это свойство может быть использовано для фотоуправления взаимодействием с нуклеиновыми кислотами, в частности для контроля над интеркаляцией. В работах [149–151] были синтезированы производные **60-63** в качестве потенциальных лигандов для ДНК, чье сродство к связыванию может переключаться с помощью облучения светом (Схема 21). Положительно заряженные фрагменты играют важную роль при разработке таких соединений, так как обеспечивают первичные электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК. В свою очередь, электроноакцепторные заместители в спиропиранах приводят к повышению термической стабильности открытых мероцианиновых форм, что важно при разработке лигандов для ДНК [152]. В водном растворе для производных **60-61** наблюдалось постепенное самопроизвольное раскрытие цикла за счет большей стабилизации мероцианиновой формы в полярной среде. В случае **60** равновесие устанавливалось в течение 5 часов и содержание открытой формы составило 80%, при этом в случае **61** доля открытой формы была около 15%. В то же время для производных **62** и **63** термического раскрытия цикла не наблюдалось.

Схема 21



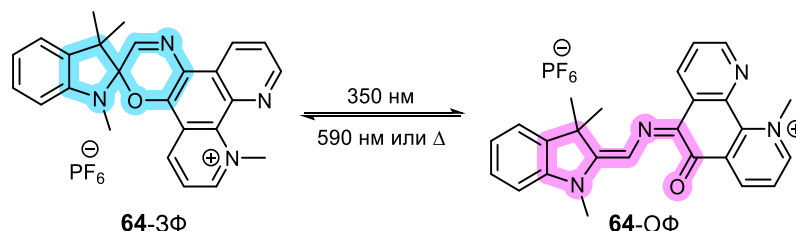
Добавление ДНК к закрытым формам всех производных **60-63** не приводило к значительным изменениям в спектрах поглощения, что свидетельствует об отсутствии выраженных взаимодействий с нуклеиновой кислотой. При этом, увеличение концентрации ДНК в растворах спиропиранов **60-62** при pH = 9 после УФ облучения вызывало постепенный красный сдвиг полос поглощения, что указывает на включение открытой формы **60-62** в структуру ДНК, в отличие от **63**, для которого изменения спектров не наблюдались. Наиболее выраженный батохромный сдвиг был обнаружен для **61-ОФ**, что свидетельствует о существенном увеличении сродства к нуклеиновой кислоте за счет наличия дополнительного положительного заряда в структуре лиганда. Интересно, что титрование при pH = 7 приводило к постепенному образованию протонированных форм **60-63-ОФ·Н⁺** (Схема 21), при этом константы связывания их комплексов с ДНК оказались в 35-66 раз выше, чем для комплексов непротонированных открытых форм. С помощью спектроскопии ЛД было доказано, что взаимодействие открытых и протонированных форм с ДНК происходит с помощью интеркаляции. Таким образом, структура спиропиранов, природа заместителей и общее количество положительных зарядов в молекуле могут существенно влиять на способность комплексообразования. При этом открытую форму можно деактивировать с помощью видимого света, что позволяет регулировать равновесие связывания с ДНК [149–151].

Производное **62** (Схема 21) также было изучено в отношении РНК-связывающих свойств [153]. Повышенный уровень экспрессии эндогенных РНК свидетельствует о запуске противовирусных механизмов иммунитета, а также служит биомаркером прогрессирования заболевания или ответа на терапию. Поэтому РНК-связывающие лиганды могут использоваться для диагностики различных дегенеративных и аутоиммунных заболеваний. Как и в случае с ДНК, взаимодействие с РНК наблюдалось только для открытой формы **62**, при этом было обнаружено предпочтение к связыванию с CG-парами оснований. Также открытая форма спиропирана **62**

показала возможность количественной оценки уровня экспрессии РНК в клетках колоректальной карциномы человека НСТ116 после обработки противоопухолевым препаратом. Таким образом, спиропираны могут быть использованы в качестве простого спектрального инструмента для диагностики заболеваний человека на основе экспрессии эндогенной РНК.

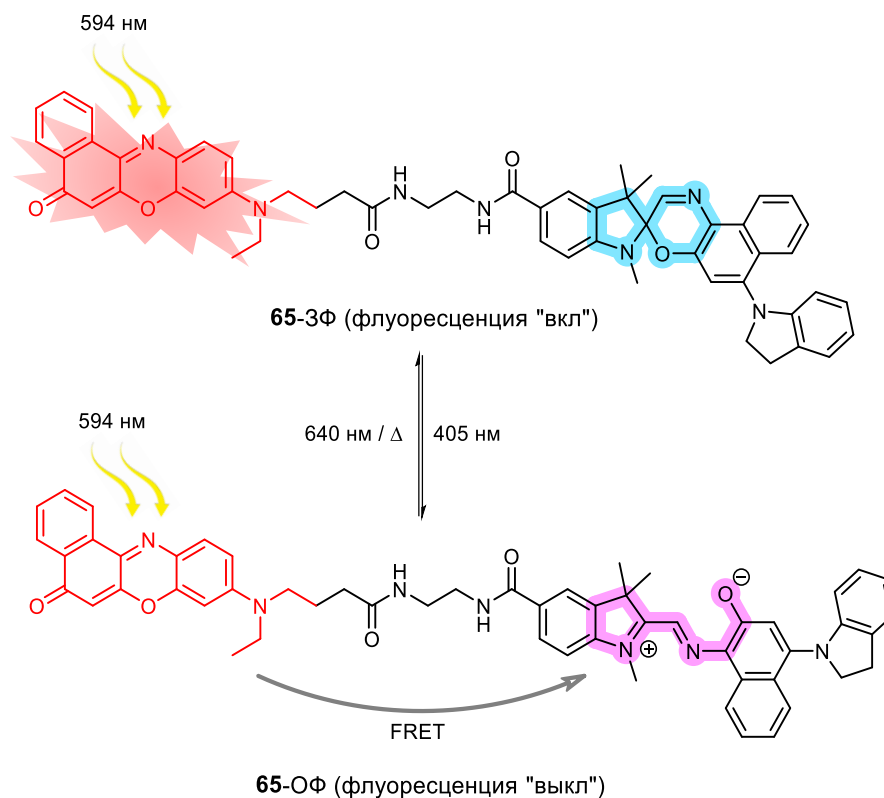
В работе [154] был разработан спирооксазин **64** (Схема 22), содержащий фрагмент фенантролина, который известен своей способностью к интеркаляции между парами оснований ДНК. Открытая форма спирооксазина **64** образуется при облучении УФ светом в течение 20 секунд и остается стабильной в течение 10 минут при комнатной температуре, тогда как при нагревании до 40°C обратное закрытие цикла происходит за 5 секунд. Кроме того, полоса поглощения **64**-ЗФ тянется вплоть до 450 нм, что позволяет осуществлять фотоперехлечение исключительно видимым светом. Оптическая спектроскопия, спектроскопия КД и конкурентное титрование с известным интеркалятором подтвердили способность открытой формы спирооксазина **64** интеркалировать ДНК, при этом для закрытой формы значительных изменений в спектрах не наблюдалось. Несмотря на несколько сниженную константу устойчивости комплекса **64**-ОФ-ДНК по сравнению с типичными интеркаляторами, а также достаточно низкую термическую стабильность образующейся открытой формы, это один из немногих примеров генерации комплекса *in situ* в присутствии ДНК.

Схема 22



Спирооксазины также используются для разработки низкомолекулярных обратимо переключаемых флуоресцентных красителей для микроскопии RESOLFT (обратимые насыщенные оптические флуоресцентные переходы, *от англ.* reversible saturable optical linear fluorescence transitions). Этот метод позволяет визуализировать биологические структуры с высоким разрешением до нескольких нанометров, одновременно контролируя, какие именно флуорофоры находятся в включенном или выключенном состоянии. Это существенно снижает фоновый шум, повышает контраст изображения и делает микроскопию RESOLFT удобным инструментом для высокоточных исследований клеточных структур, белковых взаимодействий и динамики живых систем [155]. Бис-хромофорная система **65** (Схема 23) построена на основе сольватохромного красителя Нильского красного, который широко используется для флуоресцентной детекции липидов, лизосом и других похожих органелл [156].

Схема 23

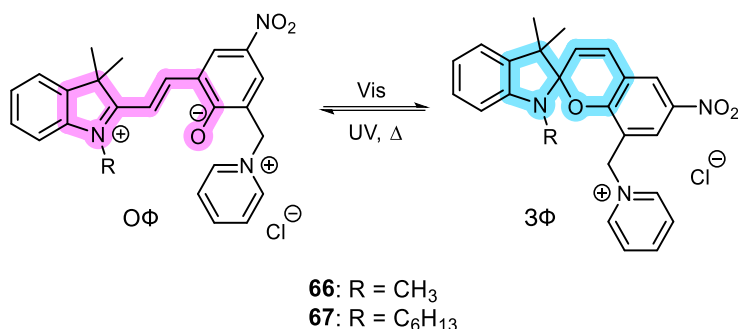


Флуоресценцией красителя можно обратимо управлять с помощью фотопереключаемого тушителя, в данном случае спирооксазина, за счет резонансного переноса энергии по Ферстеру (FRET, *от англ.* Forster resonance energy transfer). Такой перенос возможен благодаря значительному перекрытию полосы испускания Нильского красного и полосы поглощения открытой мероцианиновой формы спирооксазина. В результате, система переключается между ярким «включенным» состоянием, когда спирооксазин находится в закрытой форме и FRET не реализуется, и темным «выключенным» состоянием, когда открытая форма спирооксазина эффективно тушит флуоресценцию красителя за счет переноса энергии. С помощью **65** удалось визуализировать синтетические липидные везикулы различного состава с увеличением разрешения примерно в 2,5 раза по сравнению с конфокальной микроскопией. Кроме того, за счет сильной сольватохромной чувствительности красителя было реализовано ратиометрическое детектирование, позволяющее исследовать полярность мембраны и степень упорядоченности липидного бислоя ниже дифракционного предела [156]. Аналогичные бис-хромофорные системы на основе спирооксазинов и других коммерческих флуоресцентных красителей представлены в работах [157, 158].

Смещение равновесия в сторону мероцианиновой формы спиропиранов в воде вызвало значительный интерес для применения в клеточных исследованиях. В работе [159] были синтезированы спиропираны **66** и **67**, отличающиеся друг от друга длиной алкильного заместителя при атоме азота индола (Схема 24). Исследуемые спиропираны в водном растворе

были стабильны в виде открытой формы, ее содержание при этом достигало практически 100%. Облучение видимым светом ($\lambda_{\text{обл}} > 550$ нм) приводит к переходу в бесцветную закрытую форму.

Схема 24



Клеточные исследования на линии HeLa показали, что открытая форма оставалась нетоксичной при концентрации 200 μM , тогда как облучение видимым светом, приводящее к переходу в закрытую форму, снизило выживаемость клеток до 4%. В отличие от **67**, спиропиран **66** не проявил изменений цитотоксичности ни до, ни после облучения. Оказалось, что механизм цитотоксического действия обусловлен повреждением клеточной мембраны за счет образования бислоя амфифильного спиропирана **67** на ее поверхности. Поэтому нетоксичность **66** объясняется его высокой гидрофильностью в обеих формах и, как следствие, неспособностью образовывать самоорганизующиеся структуры. Таким образом, баланс гидрофобности и гидрофильности спиропиранов до и после облучения является важным фактором при разработке соединений, приводящих к гибели клеток путем повреждения клеточной мембраны.

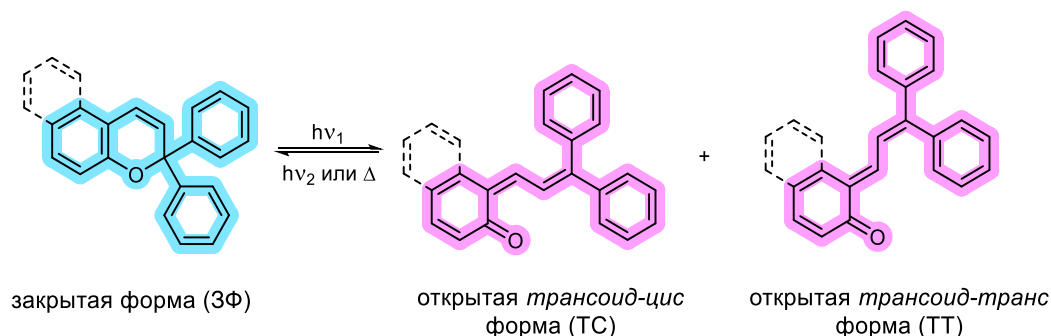
Большинство примеров использования спиропиранов в биологии и медицине опирается на их фотохромные превращения, индуцируемые изменением pH. Описаны случаи детекции внутриклеточных компонентов, включая глутатион, цистеин и гомоцистеин [160], а также мониторинга pH в митохондриях и лизосомах [161, 162]. Также известны примеры использования спиропиранов для распознавания G4-квадруплексов [163, 164]. Однако все эти примеры не задействуют свет в качестве внешнего стимула и поэтому остаются за рамками настоящего обзора.

2.3.2 Хромены

Бензо- и нафтопираны, или хромены, аналогично спиропиранам являются фотохромами Т-типа и подвергаются 6 π -электроциклическому раскрытию пиранового фрагмента (Схема 25). Облучение бесцветной закрытой формы УФ светом приводит к разрыву С-О связи с образованием открытых *трансoid-цис* (ТС) и *трансoid-транс* (ТТ) форм, которые поглощают в видимой области спектра. ТС-форма, как правило, термически нестабильна и легко превращается в закрытую форму в темноте в течение нескольких секунд, что сделало хромены популярным каркасом для разработки фотохромных офтальмологических линз. При этом, ТТ-изомер является

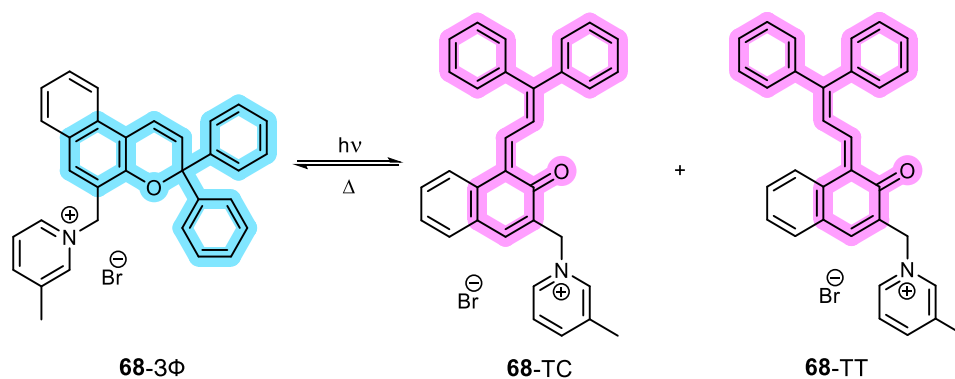
более стабильным и его время жизни в зависимости от заместителей и растворителя может достигать нескольких лет [165]. Также закрытие цикла из обеих форм может осуществляться с помощью облучения видимым светом.

Схема 25



Хромены нашли широкое применение в самых различных областях, включая разработку фотохромных полимерных материалов и гелей, молекулярных сенсоров, электронных устройств и т.д., что было подробно описано в обзоре [166]. Вместе с тем, число исследований, посвященных их взаимодействию с биомолекулами, существенно уступает аналогичным работам со спиропиранами и спирооксазинами. Среди немногочисленных примеров едва ли не единственным является производное **68** (Схема 26), содержащее в своей структуре положительно заряженный фрагмент для обеспечения первичных электростатических взаимодействий с ДНК [167].

Схема 26



С помощью оптической спектроскопии было показано, что под действием УФ облучения хромен **68** подвергается раскрытию цикла с образованием открытых форм. Однако время жизни фотоиндуцированных изомеров при комнатной температуре было очень низким, и они очень быстро возвращались в первоначальную форму. Незначительные изменения в спектрах поглощения **68-ЗФ** при добавлении больших избытков ДНК свидетельствуют об отсутствии сильных взаимодействий с нуклеиновой кислотой. Облучение хромена в присутствии ДНК, в свою очередь, приводило к появлению характерных полос поглощения в видимой области спектра. При этом, скорость термического обесцвечивания снизилась примерно на два порядка,

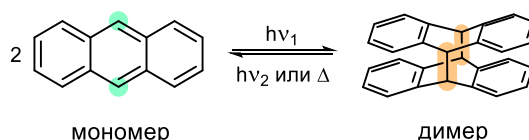
что свидетельствует о встраивании лиганда в структуру ДНК, в результате чего закрытие цикла становится более затрудненным [167].

2.4 Фотохромные соединения с циклоприсоединением/циклораспадом

2.4.1 Антрацены

Антрацены представляют собой полициклические органические соединения, обладающие интенсивной синей флуоресценцией, благодаря чему их используют в качестве сенсорных молекул для ДНК и РНК [168]. Кроме того, в возбужденном состоянии молекула антрацена может взаимодействовать с другой молекулой, в результате чего происходит перициклическая реакция [4+4]-циклоприсоединения с образованием двух новых ковалентных связей, формирующих фотодимер (Схема 27). Димеризация незамещенного антрацена происходит под воздействием УФ облучения с $\lambda_{\text{обл}} > 350$ нм, при этом фотодимер распадается на исходные мономеры при облучении более короткими длинами волн ($\lambda_{\text{обл}} < 300$ нм) или при нагревании.

Схема 27



Наряду с фотохимическими свойствами антрацены обладают структурными особенностями типичных интеркаляторов ДНК, а именно плоской полициклической структурой и расширенной π -системой. Тем не менее, низкая растворимость в воде остается существенным ограничением их использования в фотофармакологии, которое обычно преодолевают введением гидрофильных заместителей или применением аналогов антрацена с повышенной водорастворимостью. В работе [169] была изучена возможность фотоиндуцированного высвобождения лигандов ДНК из димеров производных антрацена и бензо[*b*]хинолизиния **69-72** (Рис. 33), мономеры которых известны своим сродством к связыванию нуклеиновых кислот.

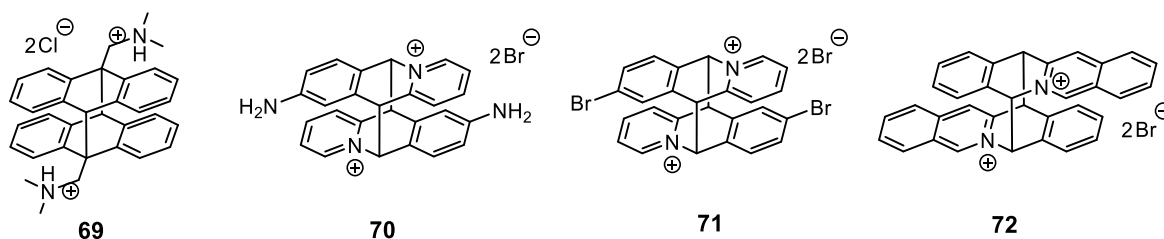


Рисунок 33 – Структуры димеров **69-72**.

Димеры **69-71** не проявляют выраженного взаимодействия с нуклеиновой кислотой, о чем свидетельствуют незначительные изменения полос поглощения и КД в присутствии ДНК. Однако при облучении ($\lambda_{\text{обл}} = 315$ нм для **70, 71** и 275 нм для **69**) растворов димеров **69-71** в ДНК наблюдалось протекание циклораспада, который сопровождался увеличением длинноволновой полосы поглощения (Рис. 34). Образующиеся мономеры встраиваются между парами оснований

ДНК, что наглядно видно по изменениям в спектрах КД, которые характерны для интеркаляторов. При этом, циклораспад антрацена **69** как в присутствии ДНК, так и в водном растворе происходил очень медленно и не завершился даже спустя 5 часов облучения. Это может быть вызвано низкой растворимостью мономера в воде, что приводит к образованию агрегатов за счет π -стэкинга и, как следствие, мгновенной димеризации при стационарном облучении [169].

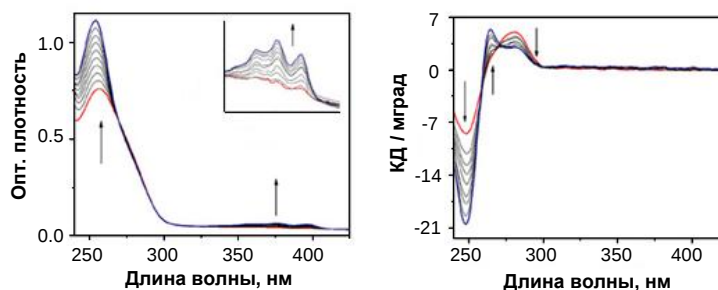


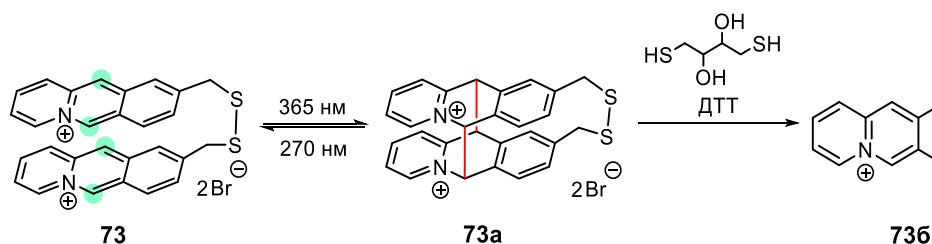
Рисунок 34 – Фотометрический и поляризметрический мониторинг фотохимического образования мономера из димера **69** (25 μM) в присутствии ДНК-тт (50 μM), $\lambda_{\text{обл}} = 275$ нм, $\tau_{\text{обл}} = 4,5$ ч (адаптировано из [169]).

Неожиданным оказалось, что димер **72** сам взаимодействует с ДНК, демонстрируя появление отрицательного сигнала индуцированного КД. Дополнительные исследования доказали, что один из фрагментов хинолизиния в димере **72** расположен между парами оснований. Однако, учитывая стерически нагруженную димерную структуру, этот способ связывания представляет собой лишь частичную интеркаляцию. При облучении 315 нм в этом случае также наблюдалось образование интеркалирующего мономера. Таким образом, этот подход потенциально может быть использован для управления ДНК-связывающими лигандами с помощью света. Однако возможность выключения связывания с ДНК, то есть обратного образования димеров **69-72** в присутствии ДНК, не была продемонстрирована [169].

ДНК-связывающие свойства мономеров **70** и **71** также были объединены с окислительно-восстановительной активностью дисульфидных связей с получением потенциального пролекарства бис-бензохинолизиния **73** (Схема 28) [170]. Дисульфиды при попадании в клеточную среду в условиях гипоксии подвергаются расщеплению под воздействием восстанавливающих агентов, что может приводить к изменению реакционной способности лиганда по отношению к биологическим мишеням. Кроме того, в случае **73** дисульфидный мостик также обеспечивает предорганизацию двух фрагментов, способствуя более эффективному внутримолекулярному [4+4]-циклоприсоединению, скорость которого в 240 раз превышает скорость межмолекулярного циклоприсоединения аналогичных производных. Облучение УФ светом производного **73** приводит к образованию смеси из трех фотопродуктов, основным из которых является димер **73a**, его содержание составило 74% (Схема 28). Также наблюдалось образование димера «голова-к-хвосту» (18%) и димера с расщепленным дисульфидным мостиком (8%). Все фотопродукты были термически стабильны в водном

растворе вплоть до 55°C. Облучение смеси более жестким УФ светом приводило к циклораспаду с образованием исходного **73** с небольшим содержанием **736** и некоторых других побочных продуктов.

Схема 28



Было показано, что исходный лиганд **73** взаимодействует с ДНК в смешанном режиме связывания: один фрагмент бензохинолизиния интеркалирует между парами оснований, в то время как второй располагается в бороздке. Фотопродукт **73a** демонстрирует только слабую неспецифическую ассоциацию вдоль фосфатного остова, что подтверждает отсутствие значительных изменений в спектрах поглощения. Добавление к димеру **73a** дитиотреитола (ДТТ) в качестве восстанавливающего агента приводило к образованию мономера **736**, который проявляет свойства типичного интеркалятора. Последовательность дезактивации и активации ДНК-связывающих свойств полностью воспроизводилась и *in situ* в присутствии ДНК (Рис. 35), что позволяет использовать этот подход для создания переключаемых пролекарств с двойным режимом действия [170].

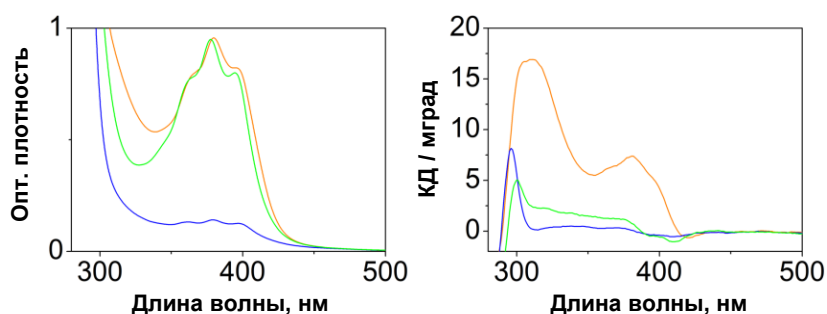
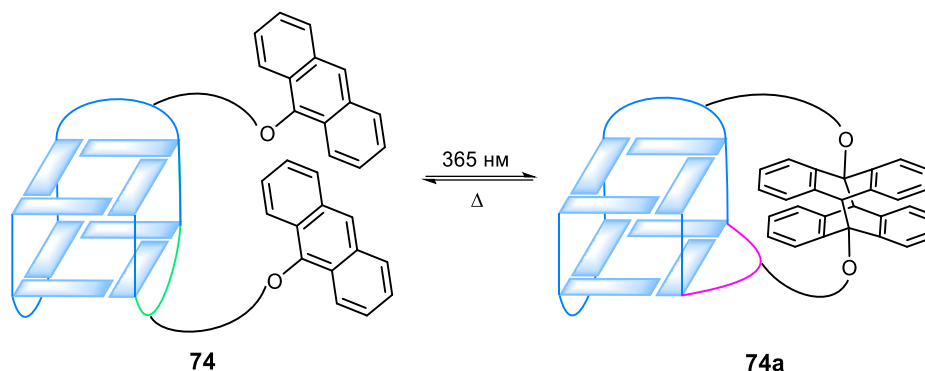


Рисунок 35 – Спектры поглощения и КД соединения **73** (50 μM) с ДНК-тТ (500 μM) до облучения (оранжевый), после облучения ($\lambda_{\text{обл}} = 365\text{ nm}$, 4 мин, синий) и последующей обработки ДТТ (2 мМ, 37°C, 5 ч, зеленый) в фосфатном буфере (pH = 7,8). Адаптировано из [170].

Антрацены также используются для ковалентной модификации различных биологических мишеней. В работе [171] был разработан тромбин-связывающий аптамер G4 **74** (Схема 29), который был функционализирован двумя производными антрацена. Тромбин является ключевым белком, который участвует в процессе свертывания крови в месте повреждения кровеносного сосуда. Тромбин-связывающие аптамеры (ТСА) приводят к подавлению этого процесса и используются в качестве препаратов для лечения заболеваний, связанных с нарушениями свертываемости крови. Однако применение антикоагулянтов сопряжено с рисками

общего снижения свертывающей способности, что обуславливает интерес к динамическим системам, обеспечивающим локальную регуляцию с помощью внешнего стимула.

Схема 29



Было показано, что модификация аптамера двумя фрагментами антрацена не препятствует его связыванию с тромбином и результаты были сопоставимы с данными для нефункционализированного аптамера (Рис. 36). В то же время протекание [4+4]-циклоприсоединения приводит к сильному искажению третичной структуры, что сопровождается потерей способности взаимодействовать с белком и, как следствие, активацией его свойств (Рис. 36). Последующая термическая обработка восстанавливает ингибирующие свойства аптамера, что демонстрирует возможность обратимого переключения системы [171]. Похожие примеры ковалентной модификации производными антрацена также представлены в работах [172–174].

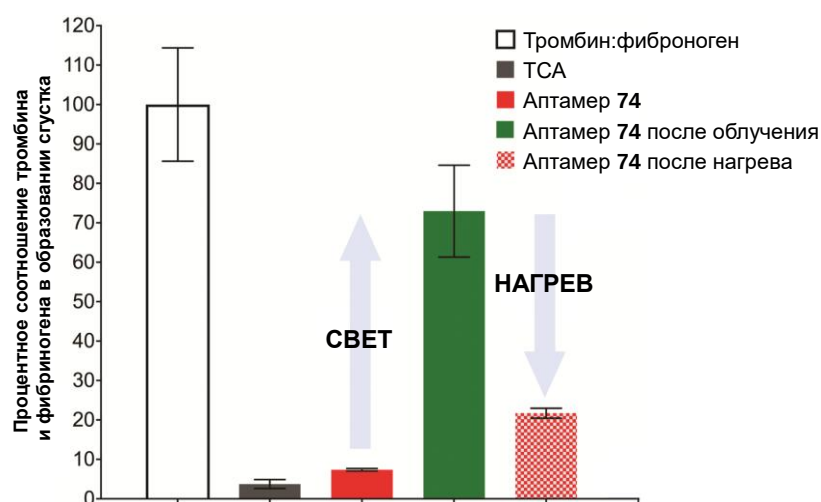


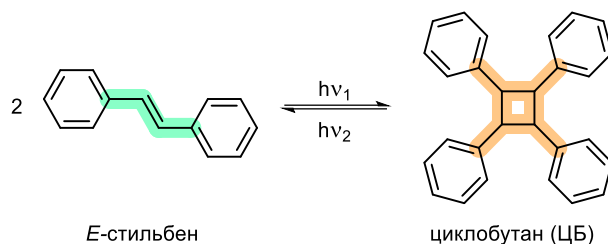
Рисунок 36 – Результаты теста Клаусса через 40 минут после добавления тромбина (1 мМ) к фибриногену в отсутствие аптамера, в присутствии TCA (1 мМ) и аптамера 74 (1 мМ). Данные представлены как разность УФ светопропускания на 450 нм и нормализованы по контролю без аптамера. Адаптировано из [171].

2.4.2 Стильбены

Стильбены под действием света, помимо *E,Z*-изомеризации, могут подвергаться [2+2]-циклоприсоединению с образованием производных циклобутана (Схема 30). Несмотря на то, что это достаточно известный процесс [175], в литературе представлено немного примеров

использования этой реакции для фотоуправления биологическими мишенями. Циклоприсоединение требует близкого пространственного расположения двух молекул и, как правило, реализуется либо при высокой концентрации стильбена в растворе, либо за счет предорганизации молекул в димерные структуры. Тем не менее, различия в оптических характеристиках, а также выраженные пространственные изменения до и после облучения могут существенно влиять на свойства соединений, что открывает перспективы для применения таких систем в фотофармакологии.

Схема 30



Апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты представляют собой наиболее распространенные повреждения ДНК, при которых происходит потеря пурина или пиримидина в нуклеотидной последовательности в результате спонтанного гидролиза N-гликозидной связи или химического воздействия. Их эффективное восстановление с помощью ферментов может происходить не только в здоровых, но и в раковых клетках, что снижает терапевтическое действие противоопухолевых препаратов, механизм действия которых включает алкилирование или окисление оснований ДНК. В связи с этим особый интерес вызывает разработка подходящих лигандов, которые способны ингибировать активность основных ферментов за счет специфического связывания с AP-сайтами. Для этого была разработана серия стильбенов **75-79** (Рис. 37) на основе 1,8-нафтиридина [176], производные которого ранее уже продемонстрировали высокую аффинность и селективность к AP-сайтам за счет образования водородных связей с противоположным основанием [177, 178].

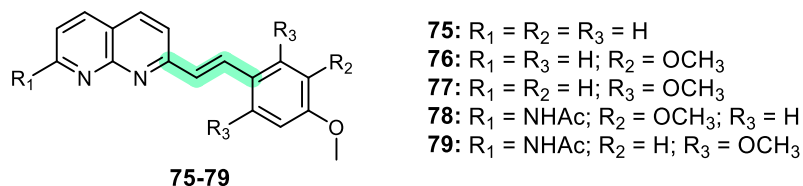


Рисунок 37 – Структуры стильбенов 75-79.

Было показано, что стильбены **75-79** преимущественно связываются с AP-ДНК, при этом по отношению к обычной ДНК наблюдались незначительные взаимодействия. Производное **76** продемонстрировало самое сильное сродство к связыванию, поэтому было выбрано в качестве лидера для дальнейших исследований. Под действием света ($\lambda_{обл} = 420$ нм) **76** подвергается [2+2]-циклоприсоединению с образованием циклобутана «голова-к-хвосту» (Рис. 38), который терял

способность к связыванию с АР-сайтами. Важно отметить, что реакция была обратима, что позволяет регенерировать активные лиганды *in situ* при облучении в присутствии АП-ДНК. Основным ограничением такой системы является необходимость использования УФ света для осуществления циклораспада ($\lambda_{\text{обл}} = 315$ нм), который может привести к нежелательному повреждению других клеточных компонентов. Однако данный подход представляет перспективную основу для разработки фотоуправляемых лигандов АП-ДНК, биоактивность которых можно модулировать светом с пространственным и временным контролем [176].

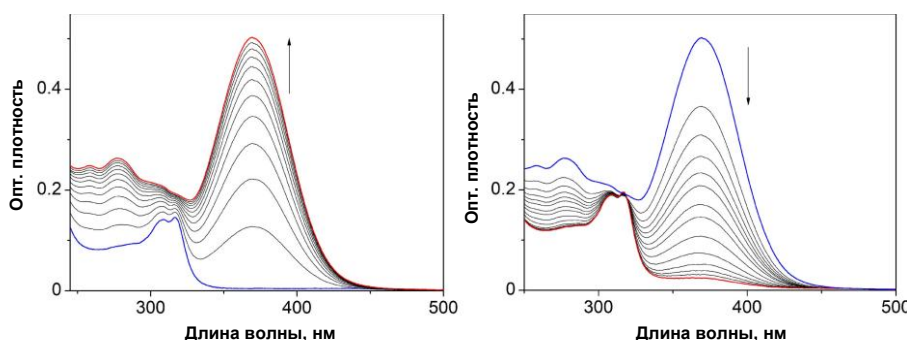


Рисунок 38 – Фотометрический мониторинг фотоциклораспада с образованием **76** ($\lambda_{\text{обл}} = 315$ нм) и последующим его фотоциклоприсоединением ($\lambda_{\text{обл}} = 420$ нм). Адаптировано из [176].

Для обеспечения предорганизации молекул стильбена с целью предпочтительного протекания циклоприсоединения в работе [179] были предложены производные **80-83** на основе хинолизиния (Рис. 39), склонные к димеризации за счет диполь-дипольных взаимодействий и π -стэкинга. С помощью оптических методов было обнаружено, что лиганды **80-83** взаимодействуют с ДНК через интеркаляцию, при этом повышение концентрации **80-82** приводило к образованию агрегатов, укладывающихся вдоль бороздки.

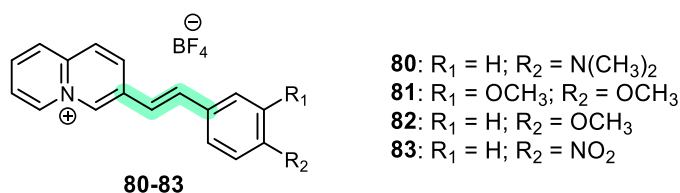


Рисунок 39 – Структуры стильбенов **80-83**.

Протекание $[2+2]$ -циклоприсоединения при облучении светом в ацетонитриле наблюдалось только для производных **81** ($\lambda_{\text{обл}} = 420\text{-}470$ нм) и **83** ($\lambda_{\text{обл}} > 395$ нм), при этом с помощью ^1H ЯМР спектроскопии было доказано образование цикlobутанов через промежуточную стадию *E,Z*-изомеризации. Стильбен **82** подвергался только *E,Z*-изомеризации при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 420\text{-}470$ нм, в то время как для amino-замещенного производного **80** фотохимические реакции полностью отсутствовали ($\lambda_{\text{обл}} = 520\text{-}535$ нм). С помощью смены растворителя с ацетонитрила на воду удалось получить цикlobутан из стильбена **82**. Фотопродукт **81-ЦБ** продемонстрировал слабое связывание с ДНК за счет поверхностного расположения лиганда на внешней границе молекулы, что позволяет одному или двум

ароматическим фрагментам укладываться около бороздки нуклеиновой кислоты. Таким образом, можно осуществлять контроль над способом взаимодействия с ДНК с помощью облучения различными длинами волн [179].

2.5 Заключение

Как следует из литературного обзора, современные разработки в области фотохромных соединений подчеркивают их растущий потенциал для использования в фотофармакологии, где они могут обеспечивать пространственный и временной контроль над биологической активностью препаратов под действием света. Фотофармакология представляет собой междисциплинарное направление, которое может произвести революцию в биологии и медицинский химии. В фундаментальных исследованиях использование светочувствительных соединений позволяет управлять активностью различных биомолекул с уникальной пространственно-временной точностью. Для биомедицины это может предоставить передовые инструменты для изучения механизмов действия лекарственных препаратов и минимизации побочных эффектов традиционной фармакологической терапии.

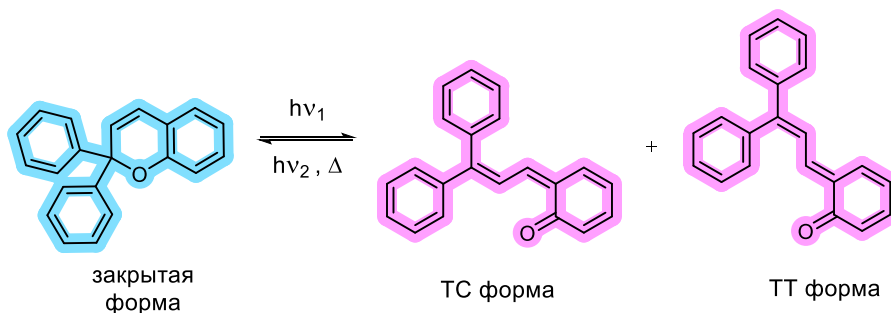
Как правило, внедрение фотопереключаемых фрагментов в структуру уже известных препаратов часто приводит к значительным различиям в биологической активности между фотоизомерами, что подтверждает практическую ценность такого подхода. При этом, стратегия дизайна фотопереключателей *de novo* остается относительно слабо изученной и представляет собой важное направление для дальнейших исследований. В то же время наблюдается тенденция к созданию сложных полифункциональных систем, сочетающих в себе фотохромные фрагменты с известными лекарственными препаратами или флуоресцентными метками, обеспечивая одновременную доставку, визуализацию и активацию лигандов. При этом, несмотря на значительный прогресс, включая некоторые успешные примеры исследований *in vitro*, все еще сохраняются проблемы фотостабильности фотохромов в водной среде, их биосовместимости, а также выбора подходящих условий активации светом. Поэтому разработка новых фотоактивных лигандов и их конъюгатов с функциональными молекулами является актуальной научной проблемой.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ¹

При подготовке данного раздела диссертации были использованы собственные публикации автора [180–184].

Как следует из литературного обзора, фотохромные соединения обладают значительным потенциалом для использования в фотофармакологии, где они могут обеспечивать высокий временной и пространственный контроль над биологической активностью под действием света. Среди многочисленных терапевтических мишеней особый интерес представляет молекула ДНК, так как она отвечает за фундаментальные генетические процессы в клетке и служит ключевой целью для многих лекарственных препаратов [12, 185, 186]. В связи с этим поиск новых фотоуправляемых органических лигандов для нуклеиновых кислот является актуальной задачей при разработке новых терапевтических агентов. В данной работе в качестве фотохромов были выбраны производные хромена, которые при облучении подвергаются обратимому раскрытию цикла с образованием двух открытых форм (Схема 1). Несмотря на то, что они активно применяются в качестве компонентов фотохромных линз, пленок и покрытий, примеров фотоуправляемых лигандов для биомолекул на их основе в литературе представлено довольно мало. При этом, хромены обладают достаточно перспективными фотохромными характеристиками для применения в фотофармакологии. Во-первых, максимумы поглощения исходного и фотоиндуцированного состояния бензопиранов значительно отличаются, что позволяет осуществлять практически полный переход в открытые формы, в отличие, например, от азобензолов. Кроме того, ТТ-форма хроменов характеризуется высокой стабильностью и может быть достаточно устойчива в течение долгого времени, что также важно для биологического применения. Открытые формы хроменов обладают плоской сопряженной структурой в отличие от объемной закрытой формы, что тоже может быть полезно для фотоуправления взаимодействием с ДНК.

Схема 1

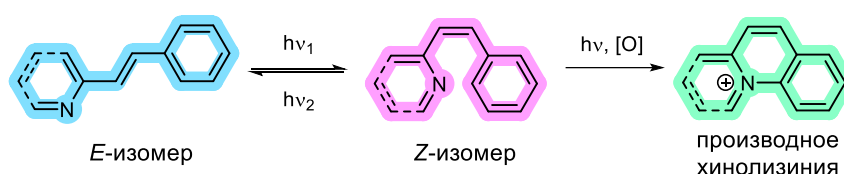


Другим типом фотохромных соединений, используемых в настоящей работе, стали гетероциклические аналоги стильбена на основе азотсодержащих гетероциклов (Схема 2). Под действием света они подвергаются *E,Z*-изомеризации, а более продолжительное облучение

¹ Нумерация соединений, схем и рисунков отличается от нумерации в Литературном обзоре.

приводит к электроциклизации и последующему окислению с получением производных хинолизиния. Образующиеся фотопродукты обладают положительным зарядом и плоской сопряженной структурой, что придает им способность к эффективной интеркаляции между парами оснований ДНК. Среди различных стратегий воздействия на ДНК именно интеркаляция является особенно эффективным подходом в противоопухолевой терапии, так как этот процесс вызывает конформационные изменения в дуплексе ДНК, что в конечном итоге может нарушать ее функциональность [187]. Поэтому разработка новых интеркаляторов для ДНК является приоритетной задачей в поиске лекарств, особенно с целью преодоления резистентности к существующим препаратам. Несмотря на необратимость фотореакции, кардинальные различия в ДНК-связывающих свойствах между исходным гетеростильбеном и его фотопродуктом делают этот класс соединений перспективным для локальной фотоактивации биологически активной формы препарата в целевой области воздействия.

Схема 2



Кроме того, в настоящее время наблюдается значительный интерес к созданию сложных полифункциональных систем, структура и применение которых разрабатываются для одновременного или последовательного выполнения нескольких функций одной молекулой. В этом контексте, сочетание терапевтических и диагностических функций в одной структуре соответствует популярному подходу – тераностике. Флуоресцентная диагностика является ценным инструментом в разработке новых терапевтических агентов, поскольку позволяет визуализировать и контролировать их распределение в тканях, оценивать эффективность действия при связывании с клеточными мишенями и отслеживать нарушение клеточных жизненных процессов. Таким образом, агенты для тераностики обеспечивают визуализацию с контролируемым терапевтическим эффектом, позволяя одновременно отслеживать и лечить патологии с минимальным воздействием на здоровые ткани [14].

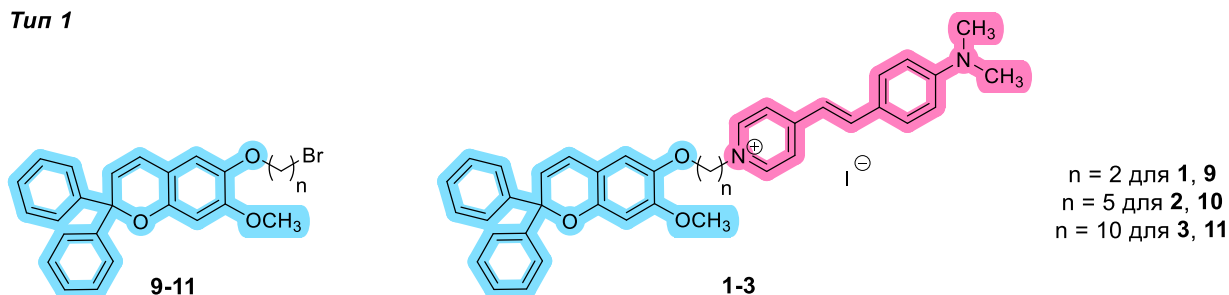
В связи с этим в данной работе планировалась разработка бифункциональных конъюгатов фотохромных соединений со стириловыми красителями, которые активно используются в качестве агентов для биовизуализации. Из литературы известно, что диметиламиностирилпиридин обладает значительным сродством к связыванию с биомолекулами, демонстрируя при этом многократное увеличение интенсивности флуоресценции [188]. Кроме того, благодаря своему катионному фрагменту он может служить вектором для селективной локализации в митохондриях. Такая адресная доставка также полезна для терапии, так как митохондрии играют ключевую роль в энергетическом метаболизме и

регуляции апоптоза [189]. При этом, хромофорные системы фотохромных компонентов, хроменов и гетеростильбенов, были выбраны не случайно. Их спектр поглощения должен отличаться от спектра поглощения выбранного стирилового красителя для обеспечения независимой активации светом каждого из компонентов бис-хромофорных систем.

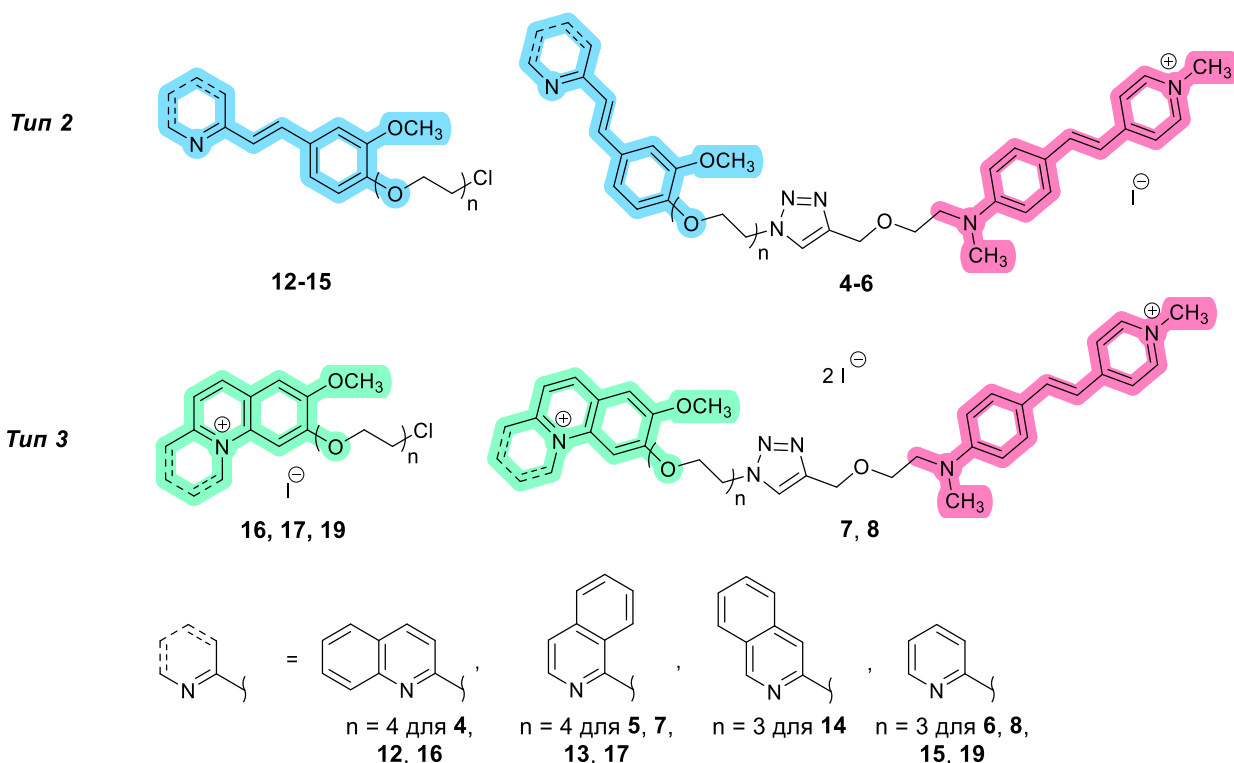
На основании вышесказанного, объекты исследования, предложенные в данной работе, были разделены на 3 типа исходя из структурных особенностей:

1. Производные хромена с различной длиной алкокси-заместителя **9-11** и их конъюгаты со стирильным красителем **1-3**. Длина алкокси-заместителя может оказывать влияние на фотохромные свойства производных хромена, а также на комплексообразующие свойства полученных конъюгатов.

Тип 1



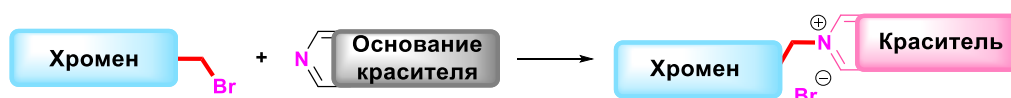
2. Гетеростильбены на основе пиридина, хинолина и изохинолина **12-15**, их полициклические фотопродукты **16, 17, 19** и их конъюгаты со стирильным красителем **4-8**. Незначительные структурные изменения, такие как варьирование гетероциклического фрагмента, могут оказывать значительное влияние на свойства фотопродуктов, в том числе на их биологическую активность, как ранее было показано на серии производных бензотиазола [94].



3.1 Синтез производных хромена и их конъюгатов

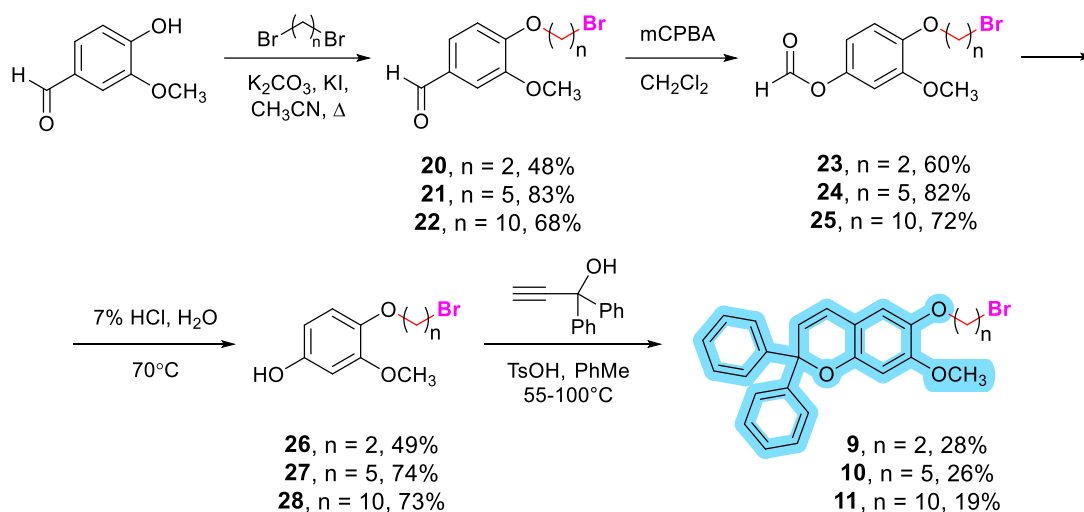
Для получения конъюгатов типа 1 с производными 2,2-дифенил-2*H*-хромена был предложен метод, в котором связывание двух хромофорных систем происходит на последнем этапе синтеза с помощью реакции кватернизации (Схема 3). Данный подход предполагает предварительное получение галоген-замещенных производных хромена и диметиламиностирилпиридина в качестве целевых прекурсоров для формирования конъюгатов.

Схема 3



Производные хромена **9-11**, отличающиеся друг от друга длиной алкокси-заместителя, были синтезированы в соответствии со Схемой 4. Варьирование длины линкера может оказать существенное влияние на фотохромизм хроменов, а также на комплексообразующие свойства их конъюгатов. Кроме того, введение электронодонорных заместителей в 6-ое и 7-ое положения бензопиранового кольца должно привести к большей стабильности открытых форм по сравнению с незамещенным хроменом [190].

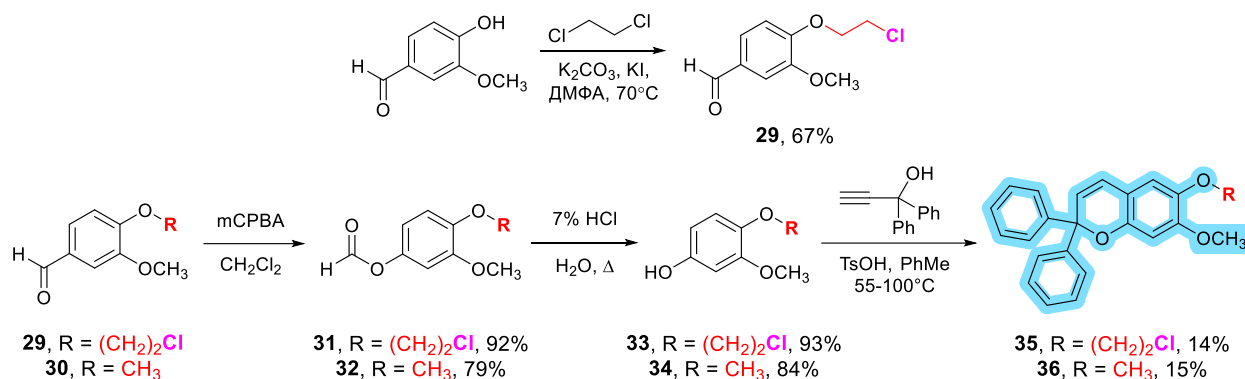
Схема 4



На первом этапе осуществлялось введение алкильной цепочки с помощью *O*-алкилирования ванилина 1,2-дибромэтаном, 1,5-дибромпентаном или 1,10-дибромдеканом. Затем проводили окисление по Байеру-Виллигеру замещенных бензальдегидов **20-22** *m*-хлорнадбензойной кислотой в хлористом метиле в инертной атмосфере с получением соответствующих сложных эфиров **23-25**. На следующем этапе полученные производные нагревали в водном растворе 7%-ной соляной кислоты с получением продуктов гидролиза **26-28** с выходами 49-74%. Хромены **9-11**, в свою очередь, были синтезированы по стандартной методике [166] взаимодействием замещенных фенолов **26-28** с 1,1-дифенилпропаргиловым спиртом в кислой среде в толуоле. После завершения реакции продукты очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением хроменов **9-11** с выходами 19-28%.

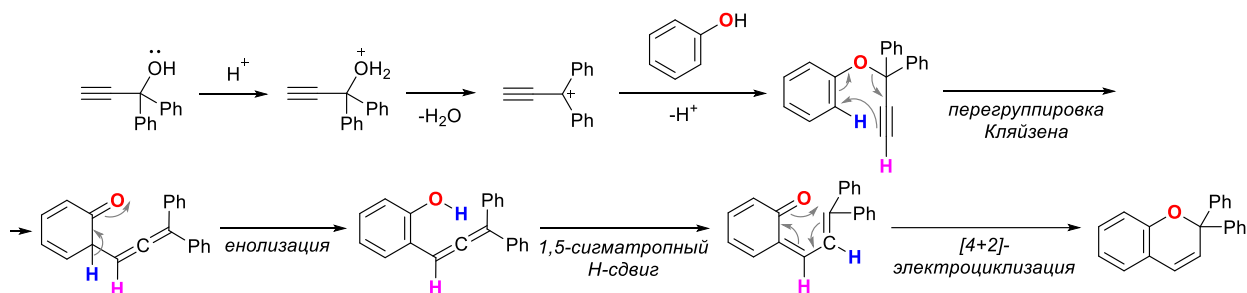
Для оценки влияния атома брома на фотохромные свойства целевых хроменов было решено синтезировать также производные хромена **35** и **36** аналогичным способом. В качестве исходных веществ использовались 4-(2-хлорэтокси)-3-метоксибензальдегид **29**, полученный *O*-алкилированием ванилина 1,2-дихлорэтаном, и коммерчески доступный 3,4-диметоксибензальдегид **30** (Схема 5). Хромены **35**, **36** были получены из соответствующих фенолов **33**, **34** и 1,1-дифенилпропаргилового спирта с выходами около 15%.

Схема 5



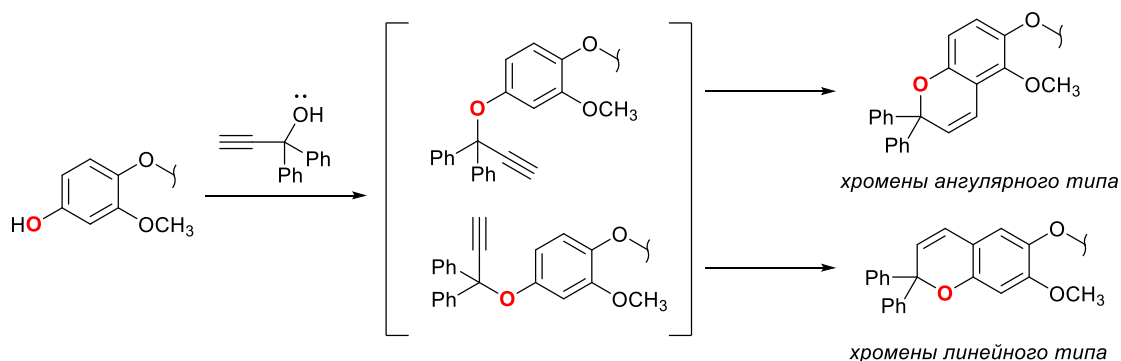
Взаимодействие фенолов с дифенилпропаргильовым спиртом протекает по механизму, представленному на Схеме 6. На первом этапе происходит *O*-аклирование, в результате которого образуется арилпропаргильовый эфир. Далее он подвергается перегруппировке Кляйзена с последующей енолизацией. Затем вследствие 1,5-сигматропного сдвига атома водорода и электроциклизации образуется конечный продукт бензопирановой структуры. Такой многостадийный характер процесса является причиной относительно низкого выхода целевых продуктов, так как требует последовательного осуществления множества превращений для образования хромена.

Схема 6



Кроме того, стадией, определяющей успешность протекания реакции, является образование в реакционной массе арилпропаргильового эфира, вступающего в последующую перегруппировку Кляйзена. На этом этапе возможно получение двух типов продуктов: циклизация может пройти с образованием хроменов линейного и ангулярного типов (Схема 7).

Схема 7



Сигналы протонов в ароматической области спектра ^1H ЯМР для всех полученных хроменов были идентичны, для примера на Рис. 1 приведен фрагмент спектра для производного **10**. В спектре ^1H ЯМР наблюдается наличие двух синглетов при δ 6,71 и 6,65 м.д., которые были отнесены к протонам в положениях 5 и 8. Сигналы в виде двух дублетов при δ 6,20 и 6,62 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) $J = 9,8$ Гц были отнесены к протонам Н-3 и Н-4 соответственно. На основании этого можно сделать вывод о том, что из фенолов **26-28** и **33**, **34** образуются хромены линейного типа. Образованию ангулярного изомера могут препятствовать пространственные трудности, связанные с близко расположенной метокси-группой. Оставшиеся сигналы в ароматической области относятся к протонам фенильных колец: протоны в *o*-положениях проявляются в виде дублета с химическим сдвигом 7,47 м.д., а протоны в *m*- и *p*-положениях проявляются в виде двух триплетов при δ 7,33 и 7,25 м.д.

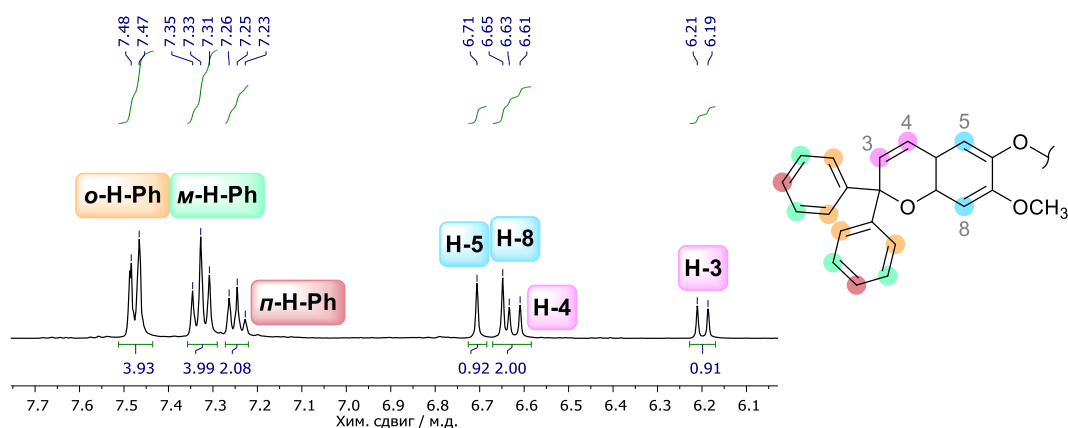
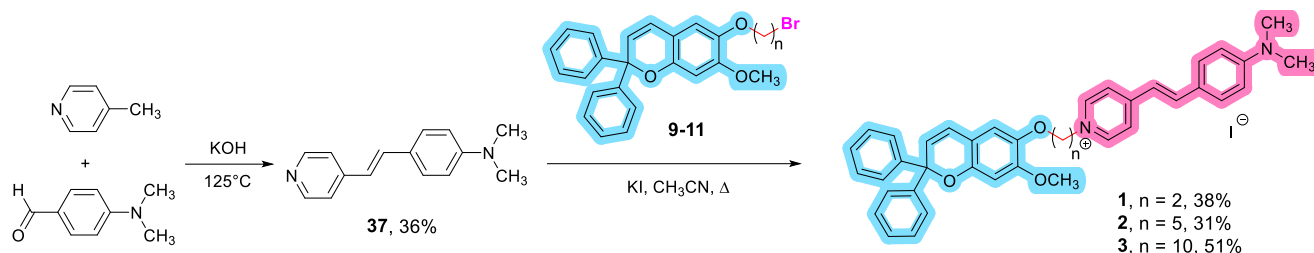


Рисунок 1 – ^1H ЯМР спектр производного хромена **10** в ацетоне- d_6 (ароматическая область).

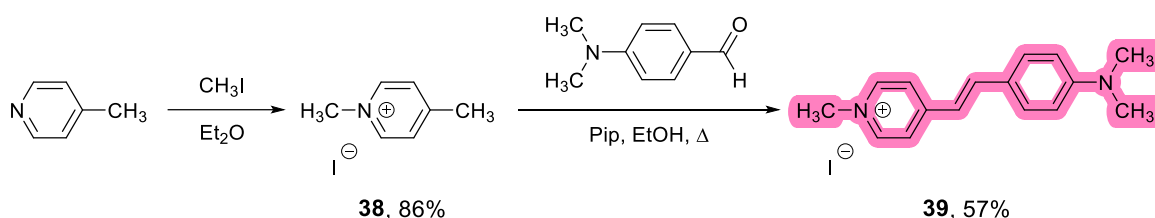
На следующем этапе полученные производные **9-11** вводили в реакцию кватернизации производного **37**, предварительно полученного спеканием 4-(диметиламино)бензальдегида и 4-пиколина в присутствии щелочи по литературной методике [191] (Схема 8). Кватернизация осуществлялась в присутствии йодида калия при кипячении в ацетонитриле с получением конъюгатов **1-3** с умеренными выходами.

Схема 8



Кроме того, для сравнения спектральных и комплексообразующих свойств конъюгатов **1-3** был синтезирован стирильный краситель **39** (Схема 9) [192]. На первом этапе 4-пиколин кватернизовали йодметаном с образованием йодида 1,4-диметилпиридиния **38**. Затем полученный продукт **38** вводили в конденсацию Кневенагеля с 4-(диметиламино)бензальдегидом с получением целевого красителя **39**.

Схема 9



Новые соединения были идентифицированы и охарактеризованы с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, элементного анализа и масс-спектрометрии. Образование конъюгатов сопровождалось сдвигом протонов у терминального атома углерода алкильной цепи, а также протонов стирильного красителя за счет увеличения электроноакцепторных свойств атома азота пиридинового фрагмента. Например, для конъюгата **3** сигнал протонов Н-к сместился с 3,49 до 4,30 м.д., тогда как химические сдвиги остальных протонов хроменого фрагмента практически не изменились (Рис. 2). При этом, практически все протоны стирилпиридина при образовании конъюгата сдвигаются в слабое поле на $\Delta\delta = 0,13\text{-}0,37$ м.д.

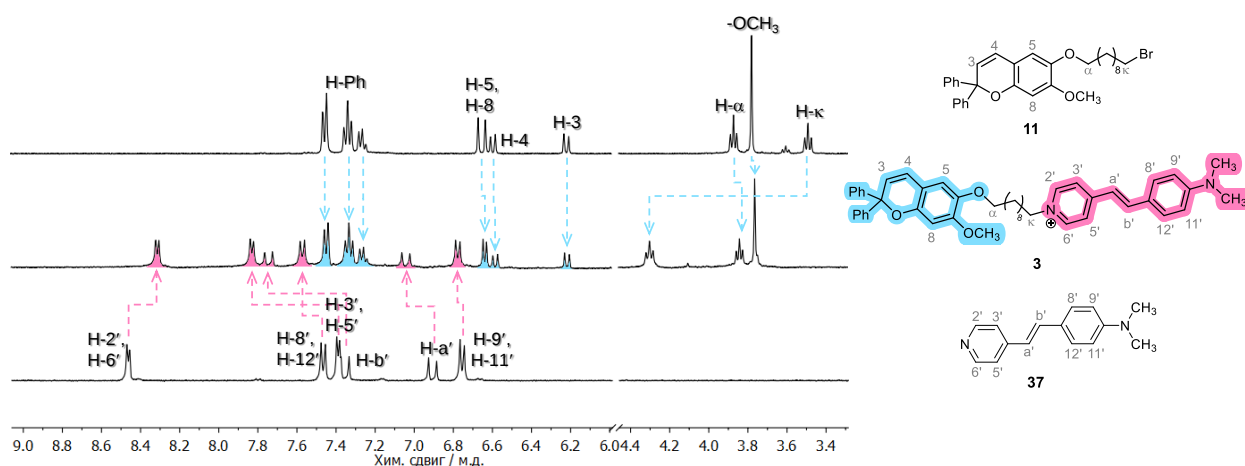
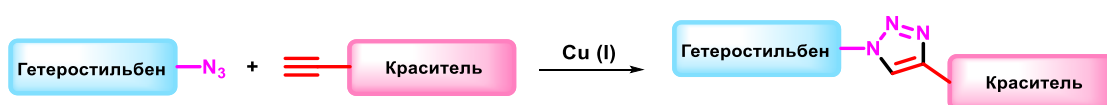


Рисунок 2 – Фрагменты ^1H ЯМР спектров хромена **11**, производного **37** и конъюгата **3** в CD_3CN .

3.2 Синтез гетеростильбенов и их конъюгатов

Для получения конъюгатов типа 2 с производными гетеростильбена в качестве фотохромных фрагментов был предложен метод, в котором связывание двух хромофорных систем происходит на последнем этапе синтеза с помощью азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого солями одновалентной меди (Схема 10). Образующийся в ходе реакции триазольный фрагмент стабилен в биологической среде и может повышать эффективность связывания конъюгатов с ДНК за счет водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий [193]. Данный способ предполагает предварительное получение гетеростильбенов, содержащих азидную группу, а также стирилового красителя с пропаргильной группой.

Схема 10



В качестве фотохромных фрагментов были выбраны гетероциклические аналоги стильбена **12-15** на основе хинолина, изохинолина и пиридина. Электронодонорные заместители в фенильном кольце гетеростильбенов приводят к более эффективной фотоциклизации [93]. Полиэтиленгликолевый линкер, в свою очередь, должен не только достаточно разобщать два хромофора в структуре конъюгатов, но и способствовать повышению их растворимости в воде [8], что важно для исследований в биологической среде.

Стирилзамещенные хинолин **41** и изохинолин **42** синтезировали в соответствии со Схемой 11. На первом этапе введение полиэтиленгликолевой цепи осуществлялось *O*-алкилированием ванилина двухкратным избытком 1-хлор-2-{2-[2-(2-хлорэтокс)этокс]этокс}этана в присутствии карбоната калия и йодида калия. На следующем этапе проводили конденсацию Кневенагеля полученного производного **40** с 2-метилхинолином или 1-метилизохинолином при кипячении в толуоле в присутствии пиперидина и уксусной кислоты с получением гетеростильбенов **12** и **13**. На последней стадии осуществлялось замещение хлора на азидную группу с помощью азидата натрия.

Что касается гетеростильбенов на основе других гетероциклов, то в этом случае протоны метильной группы 2-пиколина и 3-метилизохинолина обладают меньшей кислотностью по сравнению с 2-метилхинолином и 1-метилизохинолином [194], поэтому они не вступают в конденсацию Кневенагеля в вышеупомянутых условиях. В связи с этим для получения пиридин-замещенного гетеростильбена был предложен альтернативный метод синтеза (Схема 12). На первом этапе проводили метилирование 2-пиколина йодметаном с получением кватернизованного гетероцикла **43**. Это приводит к повышению электроноакцепторных свойств атома азота, что увеличивает кислотность протонов метильной группы и, как следствие,

облегчает последующую конденсацию Кневенагеля с замещенным бензальдегидом **40**. Затем полученный стирильный краситель **44** вводили в реакцию деметилирования при нагревании в *N,N*-диметиланилине для получения гетеростильбена **45**. Однако в этих условиях наблюдалось протекание побочной реакции кватернизации *N,N*-диметиланилина терминальным атомом хлора с последующим деметилированием с образованием продукта **45a** (Схема 12), структура которого была доказана с помощью ^1H ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии (Рис. П1²).

Схема 11

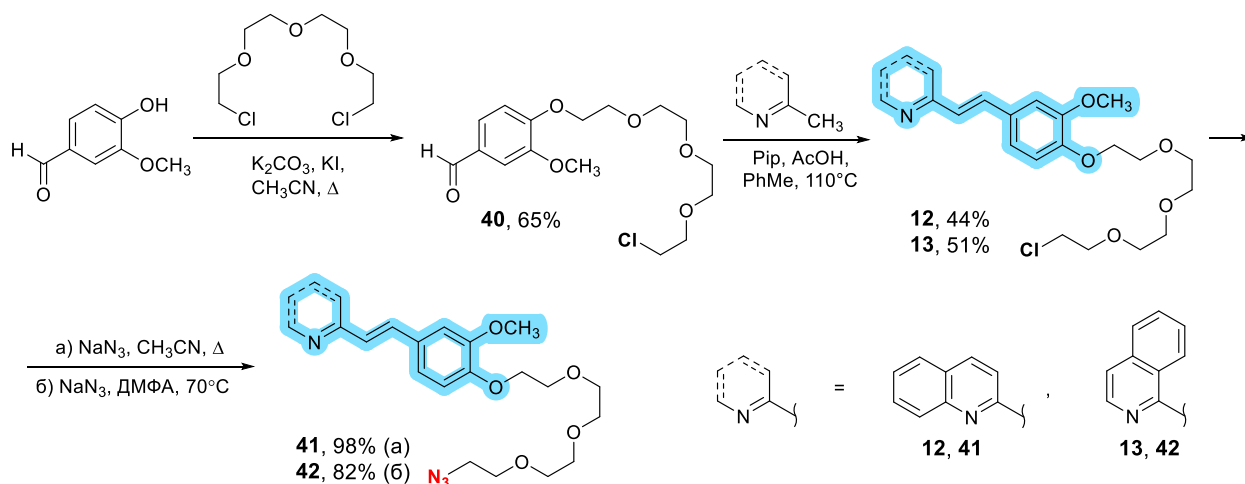
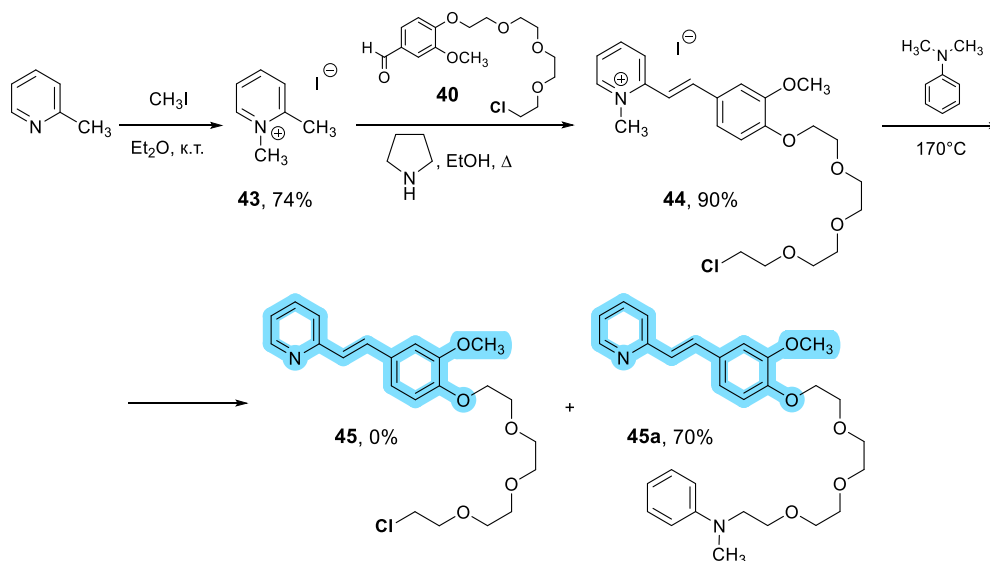


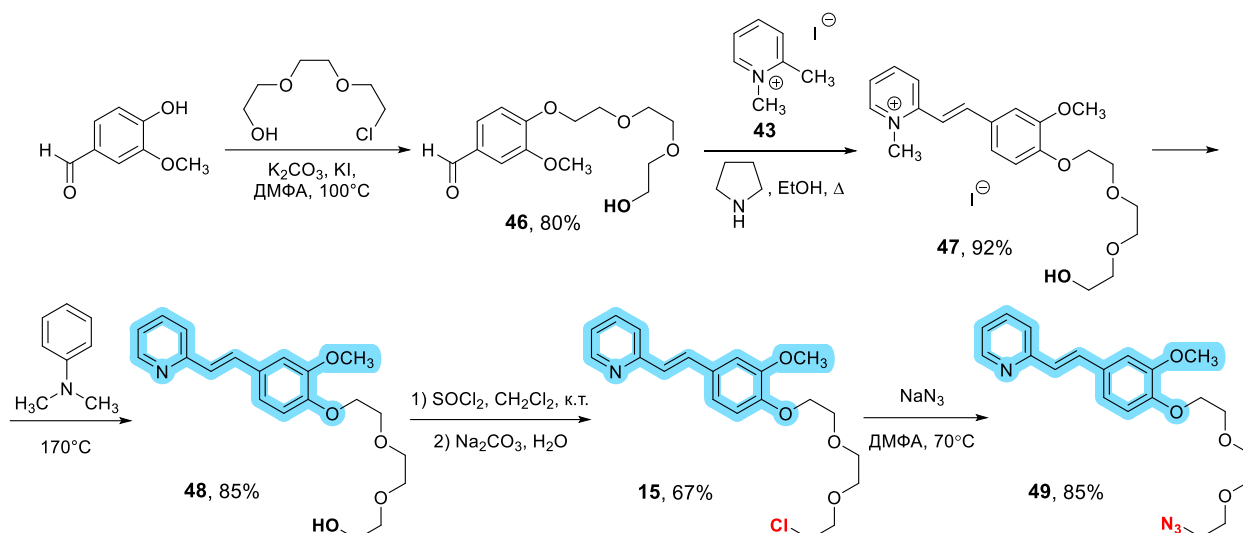
Схема 12



Протеканию побочной реакции способствуют высокая температура процесса, а также большой избыток деметилирующего агента. Проведение реакции в других условиях с использованием трифенилфосфина при кипячении в ДМФА [195] также не привело к получению целевого продукта. Поэтому была предложена альтернативная схема синтеза с использованием ОН-замещенного бензальдегида **46** (Схема 13).

² Буква «П» в нумерации рисунка указывает на то, что рисунок размещен в Приложении.

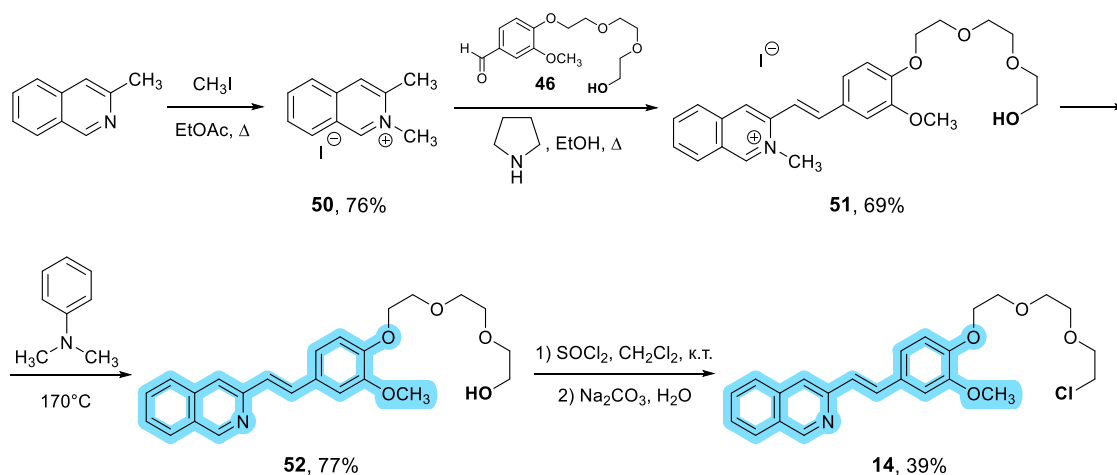
Схема 13



Производное **46** было получено *O*-алкилированием ванилина 2-[2-(2-хлорэтокс)этокс]этан-1-олом в присутствии карбоната калия и йодида калия в ДМФА. Дальнейшая конденсация Кневенагеля с соединением **43** и последующее деметилирование привели к получению ОН-замещенного гетеростильбена **48**. Гетеростильбен с азидной группой **49** был далее получен в две стадии через промежуточное получение Cl-замещенного гетеростильбена **15** (Схема 13).

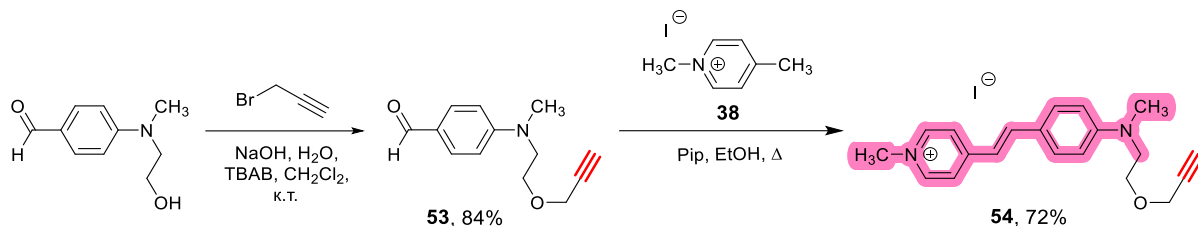
Гетеростильбен на основе 3-метилизохинолина **14** был синтезирован по аналогичной схеме через получение промежуточного стирилового красителя **51** с последующим деметилированием (Схема 14).

Схема 14



Стириловый краситель с терминальной тройной связью **54** был получен в соответствии со Схемой 15. На первом этапе 4-[(2-гидроксиэтил)(метил)амино]бензальдегид *O*-алкилировали пропаргил бромидом методом межфазного катализа в присутствии бромид тетрабутиламмония (ТВАВ). Полученный замещенный бензальдегид **53** вводили в конденсацию Кневенагеля с йодидом 1,4-диметилпиридиния **38** с получением стирилового красителя **54** с выходом 72%.

Схема 15



Заключительным этапом синтеза конъюгатов **4-6** являлась клик-реакция, которую проводили в присутствии основания DIPEA и каталитических количеств CuSO_4 с аскорбатом натрия для генерации Cu(I) *in situ* либо каталитических количеств CuI (Схема 16). Полученные конъюгаты **4-6** были охарактеризованы с помощью совокупности физико-химических методов анализа. В ^1H ЯМР спектре наблюдаются сигналы протонов при двух двойных связях (H-a, H-b, H-a', H-b') с константами спин-спиновой взаимодействия $J = 16,0$ Гц, что свидетельствует о *E*-форме обоих фрагментов в молекуле (Рис. 3).

Схема 16

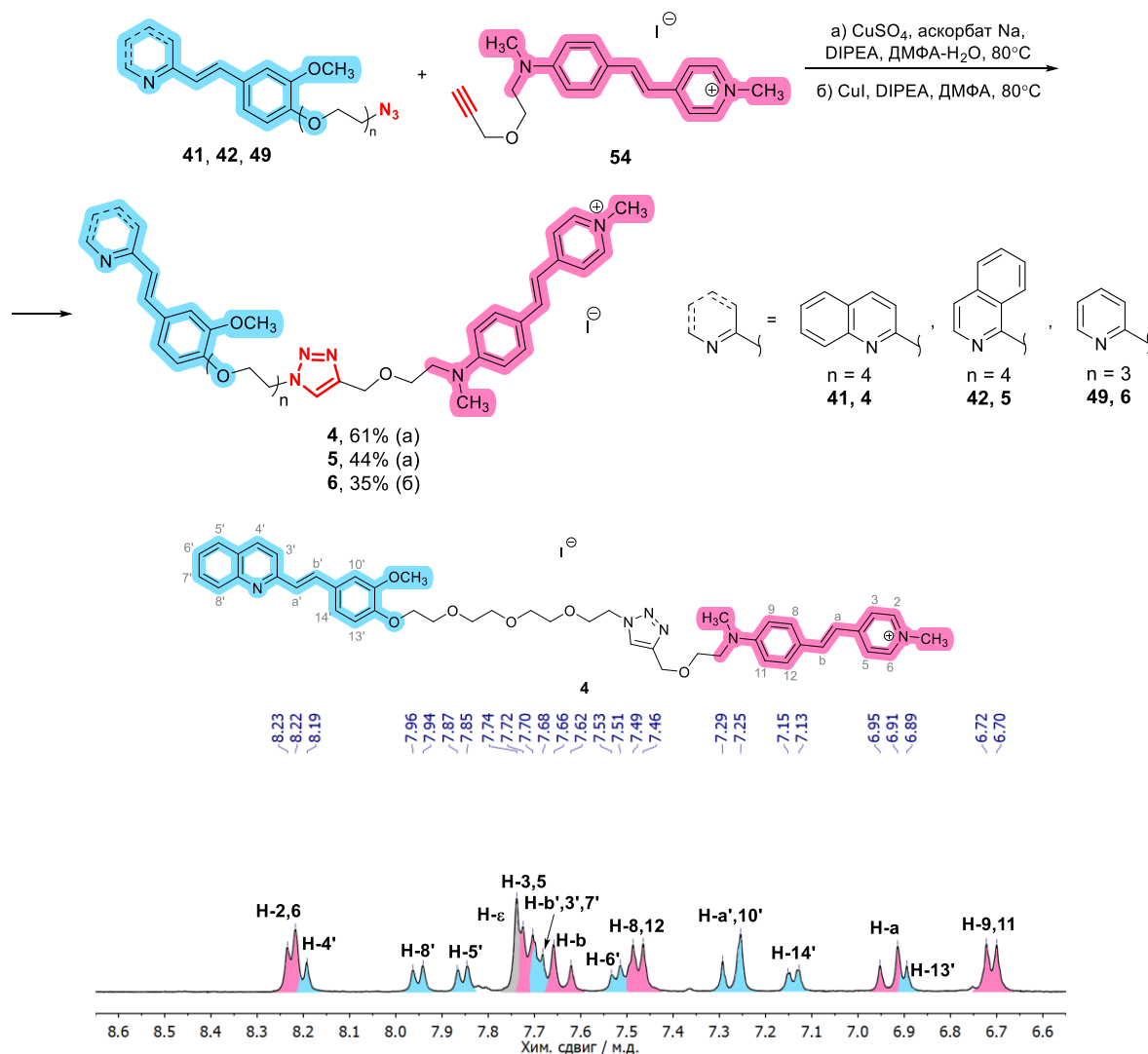
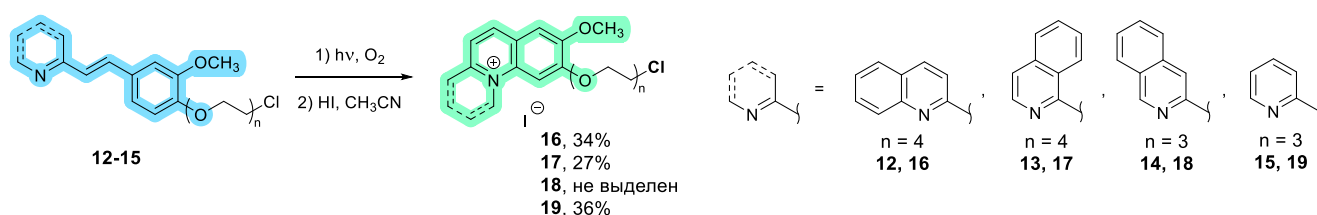


Рисунок 3 – ^1H ЯМР спектр (аром. обл.) конъюгата **4** в CD_3CN .

3.3 Синтез производных хинолизиния и их конъюгатов

Для синтеза конъюгатов типа 3 с производными хинолизиния было решено также использовать клик-реакцию. Для этого требуется предварительное получение поликонденсированных фотопродуктов, получаемых из гетеростильбенов **12-15**, с последующим введением в их структуру азидной группы. На первом этапе производные хинолизиния **16**, **17** и **19** были получены с помощью фотоциклизации гетеростильбенов **12-15** в ацетонитриле (Схема 17). Фотохимические свойства гетеростильбенов и протекание этой реакции будут подробно рассмотрены в разделе 3.6.1.

Схема 17



Для последующего введения азидной группы прежде всего были протестированы условия проведения реакции, ранее использованные для гетеростильбенов. Однако нагревание раствора производного **19** в ДМФА с азидом натрия привело к образованию нового продукта, структура которого значительно отличается от исходного хинолизиния **19**, что отчетливо видно в спектре 1H ЯМР выделенной смеси (Рис. 4).

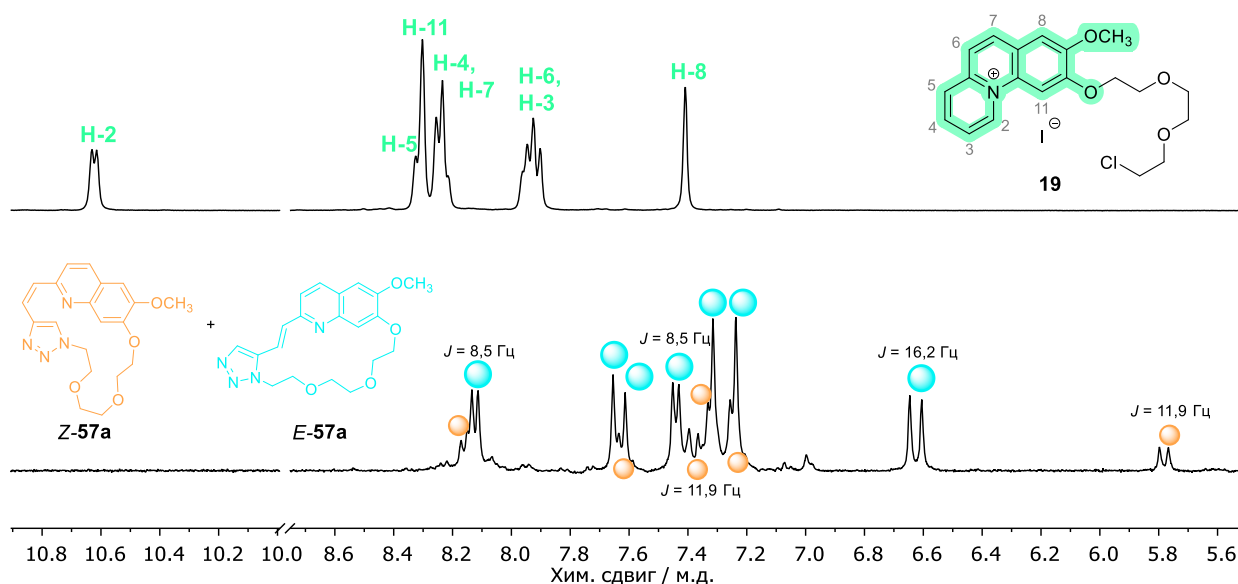
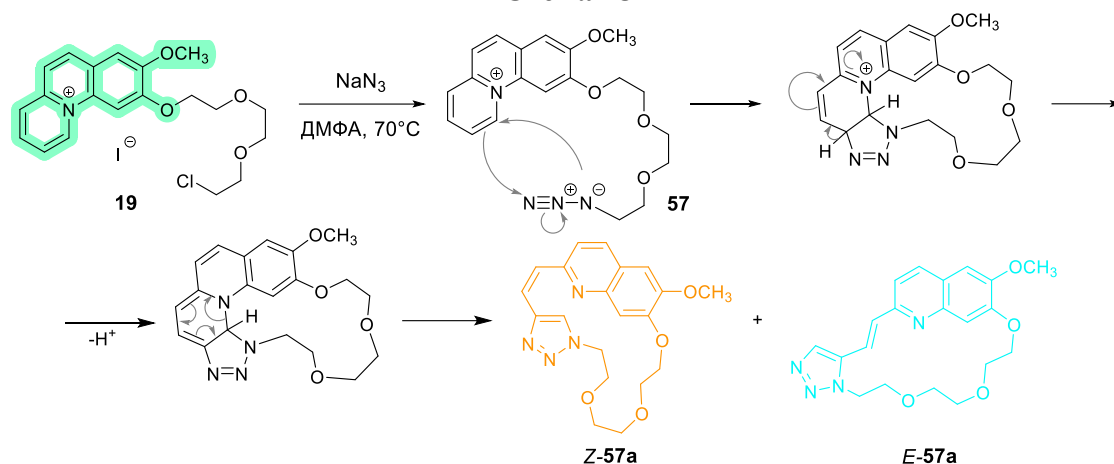


Рисунок 4 – 1H ЯМР спектры производного **19** и смеси двух продуктов **E-57a** и **Z-57a**, выделенных после нагревания с азидом натрия в ДМФА (аромат. обл., CD_3CN).

Анализ данных спектров 1H - 1H COSY и 1H - 1H NOESY, а также масс-спектра образующихся продуктов позволил предположить, что в данных условиях происходит нуклеофильное замещение на азидную группу с последующим внутримолекулярным

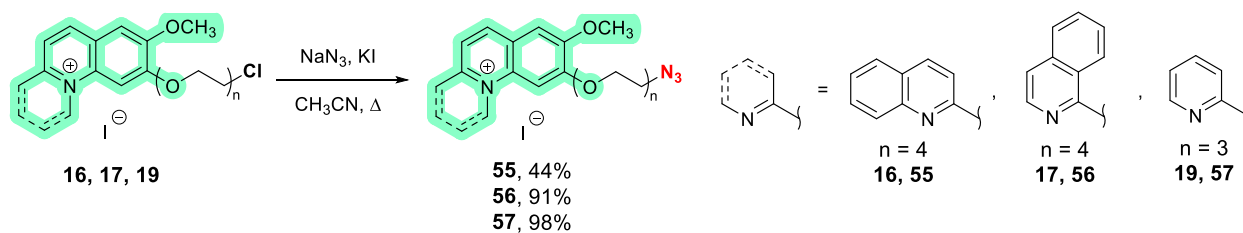
циклоприсоединением и электроциклическим раскрытием цикла с образованием смеси двух изомеров *E*-57a и *Z*-57a. Предполагаемый механизм реакции, составленный на основе похожих примеров из литературы [196], приведен на Схеме 18.

Схема 18



В связи с этим для селективного получения целевого продукта в качестве растворителя было решено использовать ацетонитрил, который, в отличие от ДМФА, должен в меньшей степени сольватировать переходное состояние и, как следствие, снижать вероятность протекания конкурентной внутримолекулярной циклизации. Проведение реакции с азидом натрия в присутствии йодида калия при кипячении в ацетонитриле позволило получить желаемые промежуточные продукты 56 и 57 с количественным выходом (Схема 19). В случае производного 55 на основе хинолина выход продукта оказался несколько ниже, так как из-за его структурных особенностей не удалось добиться полного подавления побочной реакции.

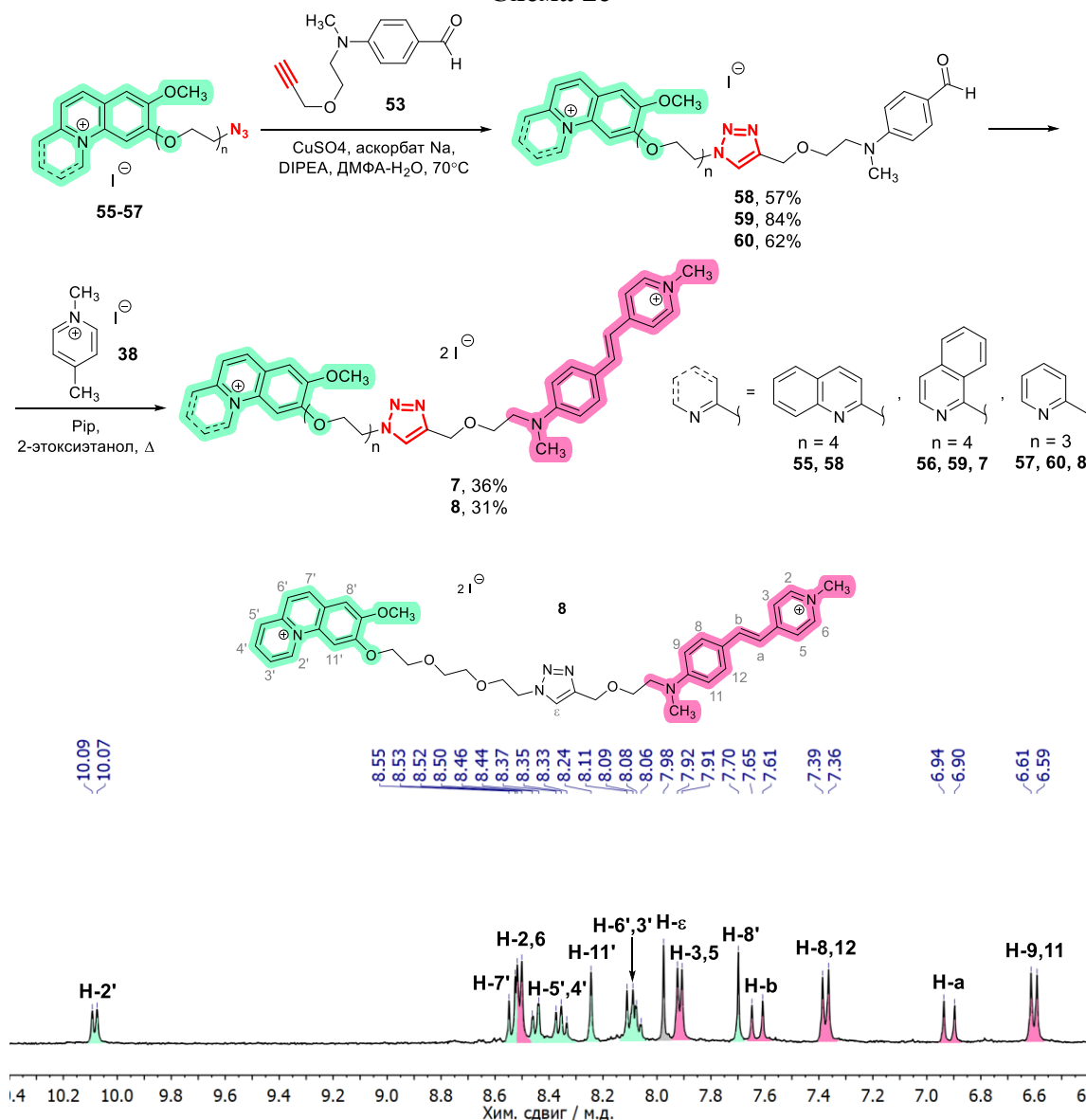
Схема 19



Заключительным этапом синтеза конъюгатов типа 3 стала клик-реакция между полученными азидами 55-57 и стириловым красителем 54, синтезированным ранее. Однако целевые продукты не удалось выделить в индивидуальном виде стандартными методами препаративной органической химии из-за близких значений R_f конъюгатов и стирилового красителя, а также из-за их схожей растворимости в органических растворителях. Поэтому был предложен альтернативный путь синтеза, представленный на Схеме 20. Отличие заключается в проведении азид-алкинового циклоприсоединения производных 55-57 не со стириловым красителем 54, а с его прекурсором 53 с образованием промежуточных продуктов 58-60 с выходами 57-84%. Затем на последней стадии осуществлялась конденсация Кневенагеля с

образованием второй хромофорной системы в структуре конъюгатов, что позволило избежать трудностей в выделении целевых продуктов **7**, **8**, которые были охарактеризованы физико-химическими методами анализа (Рис. 5). Подобрать условия синтеза конъюгата из производного **58** не удалось, так как этот процесс сопровождался деструкцией исходных соединений. Анализ реакционной массы с помощью масс-спектрометрии показал отсутствие сигналов как целевого конъюгата, так и исходных производных на фоне формирования множественных нецелевых продуктов неустоявшегося строения.

Схема 20

Рисунок 5 – ^1H ЯМР спектр (аром. обл.) конъюгата **8** в CD_3OD .

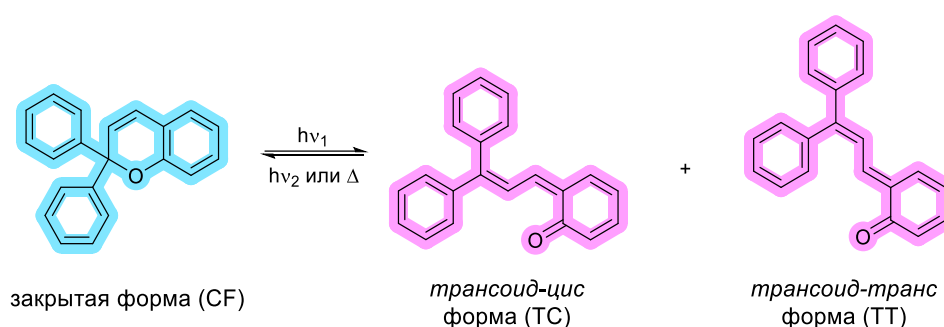
Таким образом, в ходе работы были разработаны оптимальные методы синтеза производных 2,2-дифенил-2*H*-хромена, гетероциклических аналогов стильбена и производных хинолизины на основе хинолина, изохинолинов и пиридина, а также их конъюгатов со стироловым красителем. Структуры всех полученных соединений были доказаны с помощью методов спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии и элементного анализа.

3.4 Изучение фотохромных свойств производных хромена 9-11 и их конъюгатов

3.4.1 Изучение фотохромных свойств производных хромена 9-11

Как следует из литературного обзора, хромены относятся к фотохромам Т-типа и подвергаются 6 π -электроциклическому раскрытию пиранового фрагмента (Схема 21). Облучение бесцветной закрытой формы (CF) УФ светом приводит к разрыву С-О связи с образованием открытых *трансoid-цис* (ТС) и *трансoid-транс* (ТТ) форм, которые поглощают в видимой области спектра. ТС-форма, как правило, термически нестабильна и легко превращается в закрытую форму в темноте в течение нескольких секунд, в то время как ТТ-изомер является более стабильным и его время жизни в зависимости от заместителей и растворителя может достигать нескольких лет.

Схема 21



Закрытые формы исследуемых хроменов **9-11** в ацетонитриле бесцветны и характеризуются полосой поглощения в области 325 нм. При облучении светом ртутной лампы высокого давления в сочетании с УФ-фильтром, пропускающим преимущественно свет с $\lambda_{\text{обл}} = 313$ и 365 нм, бесцветные растворы **9-11** становятся оранжевыми, а в спектрах поглощения появляются две новые широкие полосы поглощения около 395 и 470 нм, которые относятся к сопряженным открытым мероцианиновым формам (Рис. 6, П2 и П3).

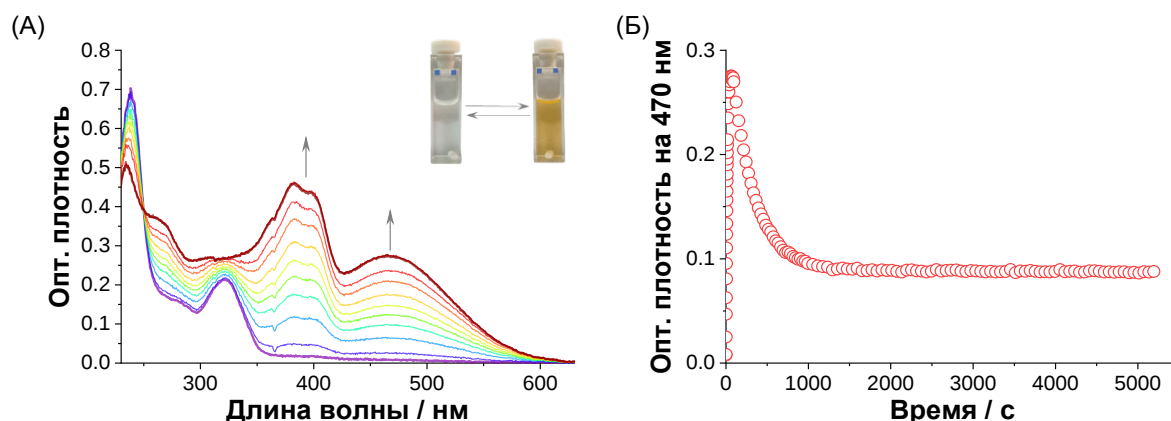


Рисунок 6 – (А) Изменение спектров поглощения хромена **9** при УФ-облучении в течение 100 секунд. (Б) Изменение оптической плотности хромена **9** на 470 нм при облучении и последующей термической релаксации. $C_9 = 4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN .

После прекращения облучения наблюдалось изменение окраски растворов за счет темновой релаксации открытой формы хроменов в закрытую. За реакцией обесцвечивания открытых форм в темноте следили по изменению интенсивности длинноволновых максимумов поглощения во времени (Рис. 6, Б; П2, Б и П3, Б). Для всех исследуемых производных кинетика темновой релаксации открытых форм описывается биэкспоненциальной зависимостью:

$$A = A_0^{TC} \cdot e^{-k_{TC}t} + A_0^{TT} \cdot e^{-k_{TT}t} \quad (1)$$

где ТС и ТТ – открытые формы хромена, CF – закрытая форма хромена, $k_{ТС}$ и $k_{ТТ}$ – константы скоростей последовательных этапов процесса обесцвечивания, A_0^{TC}, A_0^{TT} – первоначальное поглощение для каждой формы в начале обратной реакции. Полученные кинетические характеристики приведены в Таблице 1.

На основании полученных данных исходный быстрораспадающийся компонент с периодом полураспада ($\tau_{1/2}$) около 3-6 мин был отнесен к термической обратной реакции $ТС \rightarrow CF$. Что касается второго компонента, то по данным оптической спектроскопии нам не удалось с приемлемой точностью измерить кинетику медленной релаксации. Однако по данным ЯМР можно утверждать, что константа скорости обратной реакции $ТТ \rightarrow (ТС) \rightarrow CF$ составляет менее 10^{-4} с^{-1} для соединений **9**, **11** и значительно меньше 10^{-5} с^{-1} для хромена **10** при комнатной температуре. В спектре ^1H ЯМР хромена **10** сигналы ТТ-формы наблюдались даже через 4 дня после прекращения облучения.

Таблица 1 – Кинетические и термодинамические характеристики термической релаксации хроменов **9-11**, **35** и **36** в CH_3CN .

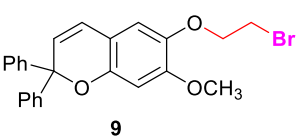
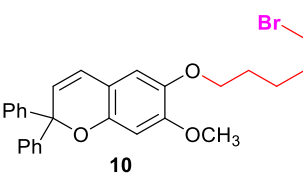
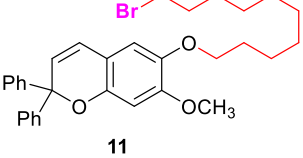
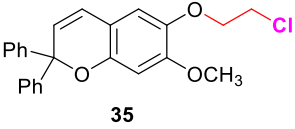
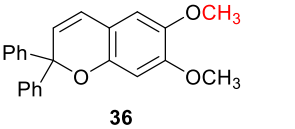
Соединение	T / K	$k(ТС \rightarrow CF) [\text{с}^{-1}]$	$\tau_{1/2} / \text{с}$	$\lg A_{298}$	E_a [кДж моль $^{-1}$]	$\Delta H^\ddagger$ [кДж моль $^{-1}$]	$\Delta S^\ddagger$ [Дж К $^{-1}$ моль $^{-1}$]
 9	298	$3,65 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-5}$	180	9,56	$68,5 \pm 0,2$	$65,9 \pm 0,2$	$-70,4 \pm 0,8$
	308	$9,46 \cdot 10^{-3} \pm 7 \cdot 10^{-5}$	73				
	318	$2,11 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	32				
	323	$3,12 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	22				
 10	298	$1,96 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-6}$	360	9,88	$71,8 \pm 0,1$	$69,3 \pm 0,1$	$-63,9 \pm 0,4$
	308	$5,80 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-5}$	120				
	318	$1,26 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	55				
	323	$1,89 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	37				
 11	298	$1,98 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	360	8,75	$65,3 \pm 0,1$	$62,8 \pm 0,1$	$-85,4 \pm 0,4$
	308	$5,83 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-5}$	120				
	318	$1,20 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	60				
	323	$1,51 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	46				

Таблица 1 – Продолжение.

 35	298	$3,48 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	200	—	—	—	—
 36	298	$2,26 \cdot 10^{-3} \pm 7 \cdot 10^{-6}$	307	—	—	—	—

Для получения более детальной информации о термической релаксации открытых форм хроменов **9-11** было исследовано влияние температуры на скорость их обесцвечивания. Кинетику обратной реакции **9-11** изучали при четырех температурах: 298, 308, 318 и 323 К (Таблица 1). Как и ожидалось, с ростом температуры наблюдалось увеличение константы скорости термического обесцвечивания, что отчетливо видно по изменению наклона кинетических кривых (Рис. 7, А; П4, А и П5, А). Из наклона графика Аррениуса (зависимость $\ln(k)$ от $1/T$ (2); Рис. 7, Б; П4, Б и П5, Б) были определены энергии активации процесса термической релаксации и предэкспоненциальный множитель для реакции $ТС \rightarrow CF$. Энтальпия и энтропия реакции были получены из уравнения Эйринга-Поляни (3) (Рис. 7, В; П4, В и П5, В):

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A, \quad (2)$$

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}, \quad (3)$$

где E_a – энергия активации, A – предэкспоненциальный множитель, k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка, $\Delta S^\ddagger$ – изменение энтропии активации, $\Delta H^\ddagger$ – изменение энтальпии активации, а R – универсальная газовая постоянная.

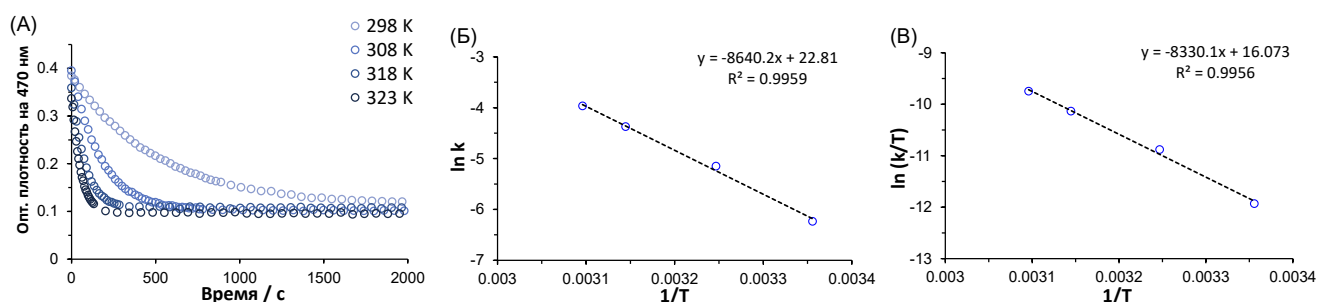


Рисунок 7 – (А) Кинетические кривые термического обесцвечивания производного **10** при различных температурах. (Б) График Аррениуса для производного **10**. (В) График Эйринга для производного **10**.

Как видно из Таблицы 1, константы скорости термической релаксации имеют определенную зависимость от длины алкокси-заместителя, расположенного в 6 положении бензопиранового фрагмента хроменов **9-11**. Было обнаружено, что ТС-изомеры хроменов **10, 11** более стабильны, чем ТС изомер хромена **9**, о чем свидетельствует их большее время жизни. На энергию активации длина алкильной цепи влияет незначительно, и ее значение находится в

пределах от 65 до 72 кДж моль⁻¹. Что касается энтропии активации, то она во всех случаях отрицательна, что указывает на более упорядоченную структуру переходного состояния по сравнению с открытой формой. Значения предэкспоненциального множителя, составляющие около 10^9 - 10^{10} , хорошо согласуются с достаточно низкой энтропией активации в случае мономолекулярной реакции и позволяют предположить, что конфигурация переходного состояния обладает существенно более высокой жесткостью с ограничением свободы вращения по сравнению с исходным состоянием. В целом, увеличение числа атомов углерода в цепи существенно не влияет на термодинамические параметры, свидетельствуя о том, что термическая релаксация ТС-изомера протекает одинаково для всех исследуемых хроменов.

На следующем этапе была изучена обратимость фотоиндуцированной изомеризации хроменов **9-11** при комнатной температуре, а также их устойчивость к воздействию светом. Сначала растворы хроменов в ацетонитриле облучали УФ-светом до достижения фотостационарного состояния (ФСС). Затем для полного обесцвечивания и восстановления исходных спектров поглощения закрытой формы хроменов использовали облучение светом с $\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм. Фотохимическая релаксация для всех соединений завершалась через 35-55 минут. Зависимость интенсивности длинноволновой полосы поглощения 470 нм от времени облучения приведена на Рис. 8. Повторение циклов облучения УФ-видимым светом показывает, что воспроизводимость процессов окрашивания/обесцвечивания снижается в ряду **10** > **9** > **11**. К концу 10-го цикла оптическая плотность в $\lambda_{\text{макс}}$ в ФСС снизилась примерно на 5%, 10% и 12% для **10**, **9** и **11** соответственно, что указывает на небольшую фотодеградацию соединений при облучении УФ-видимым светом.

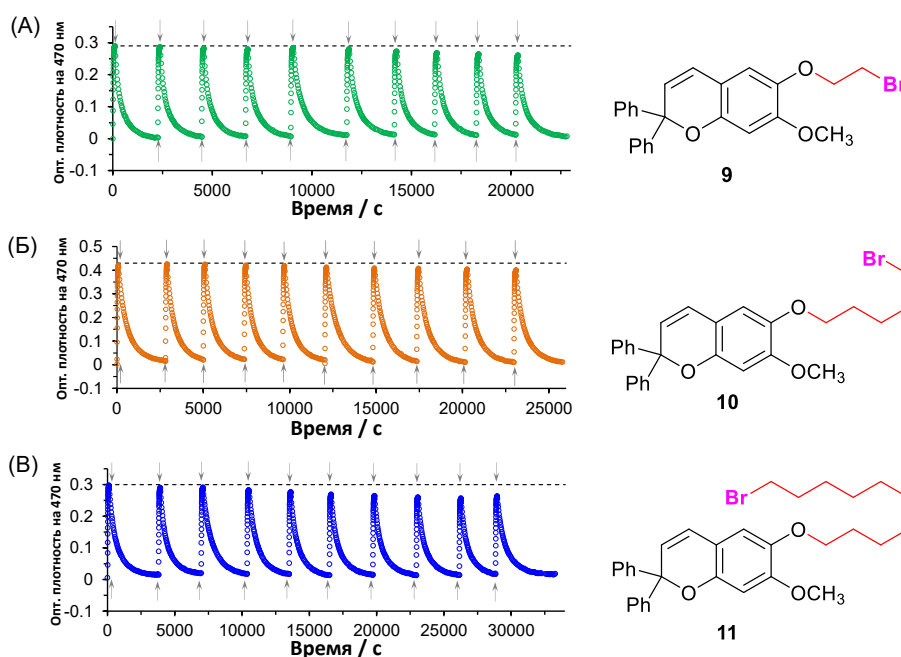


Рисунок 8 – Изменения оптической плотности хроменов **9-11** ($C = 4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) на 470 нм при попеременном облучении УФ-светом в течение 100 с ($\uparrow$) и видимым светом в течение 45 мин ($\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм, $\downarrow$).

Фотохромное поведение и процесс термического обесцвечивания хроменов **9-11** далее были проанализированы с помощью ЯМР спектроскопии с целью получить необходимую информацию о количестве, структуре открытых форм и механизме фотохромной реакции. Соотнесение химических сдвигов протонов в открытых формах было сделано с помощью экспериментов ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^1H NOESY. Сигналы протонов открытых форм для всех исследуемых соединений очень похожи друг на друга благодаря идентичной структуре хроменового ядра, что облегчает их отнесение. Образцы хроменов **9-11**, **35** и **36** в ацетонитриле- d_3 облучали УФ светом в кварцевых кюветах толщиной 2 мм и затем переносили в ампулу для регистрации спектров ЯМР.

Спектры ^1H ЯМР хромена **10**, полученные до и после облучения УФ светом в течение 10-1280 секунд, представлены на Рис. 9. На основании полученных данных видно, что соединение **10** подвергается раскрытию бензопиранового кольца с образованием двух новых наборов сигналов, относящихся к смеси ТС и ТТ изомеров вместе с исходной закрытой формой CF. Продукт, образующийся на первом этапе, был отнесен к ТС-форме благодаря характерным сигналам с КССВ $J_{3,4} = 12,1$ Гц при δ 6,74 м.д. (Н-4) и δ 8,57 м.д. (Н-3), последний из которых значительно смещается в слабое поле из-за дезэкранирующего влияния близко расположенной карбонильной группы. Протоны циклогексадиенового кольца Н-5 и Н-8 проявляются при δ 5,91 м.д. и δ 5,71 м.д. в виде синглетов. Протоны второго продукта, а именно ТТ-изомера, отличаются и демонстрируют сигналы в виде синглетов при δ 5,66 м.д. (Н-8) и δ 6,59 м.д. (Н-5), а также в виде дублетов при δ 7,44 м.д. (Н-3) и при δ 7,21 м.д. (Н-4) с КССВ $J = 12,8$ Гц, что соответствует *s-транс*-конформации аллилиденового звена [197]. Протоны фенильных колец обоих изомеров перекрываются и проявляются при δ 7,2-7,5 м.д. В ФСС конверсия CF в открытые формы составила 65%, включая 29% ТС и 36% ТТ. Следует отметить, что использование УФ-фильтра при облучении привело к более высокой конверсии исходного хромена **10** в открытые изомеры (65% против 39%) и значительному ускорению раскрытия цикла по сравнению с облучением светом с $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (Рис. П6).

Аналогичное поведение наблюдается и для хромена **11** с более длинным алкильным заместителем (Рис. П7), однако соотношения между исходной закрытой формой и фотопродуктами отличаются. Сигналы, соответствующие открытым формам, достигают максимума через 11,2 минут облучения УФ светом, что указывает на достижение ФСС, при котором образуется смесь CF (21%), ТС (18%) и ТТ (61%).

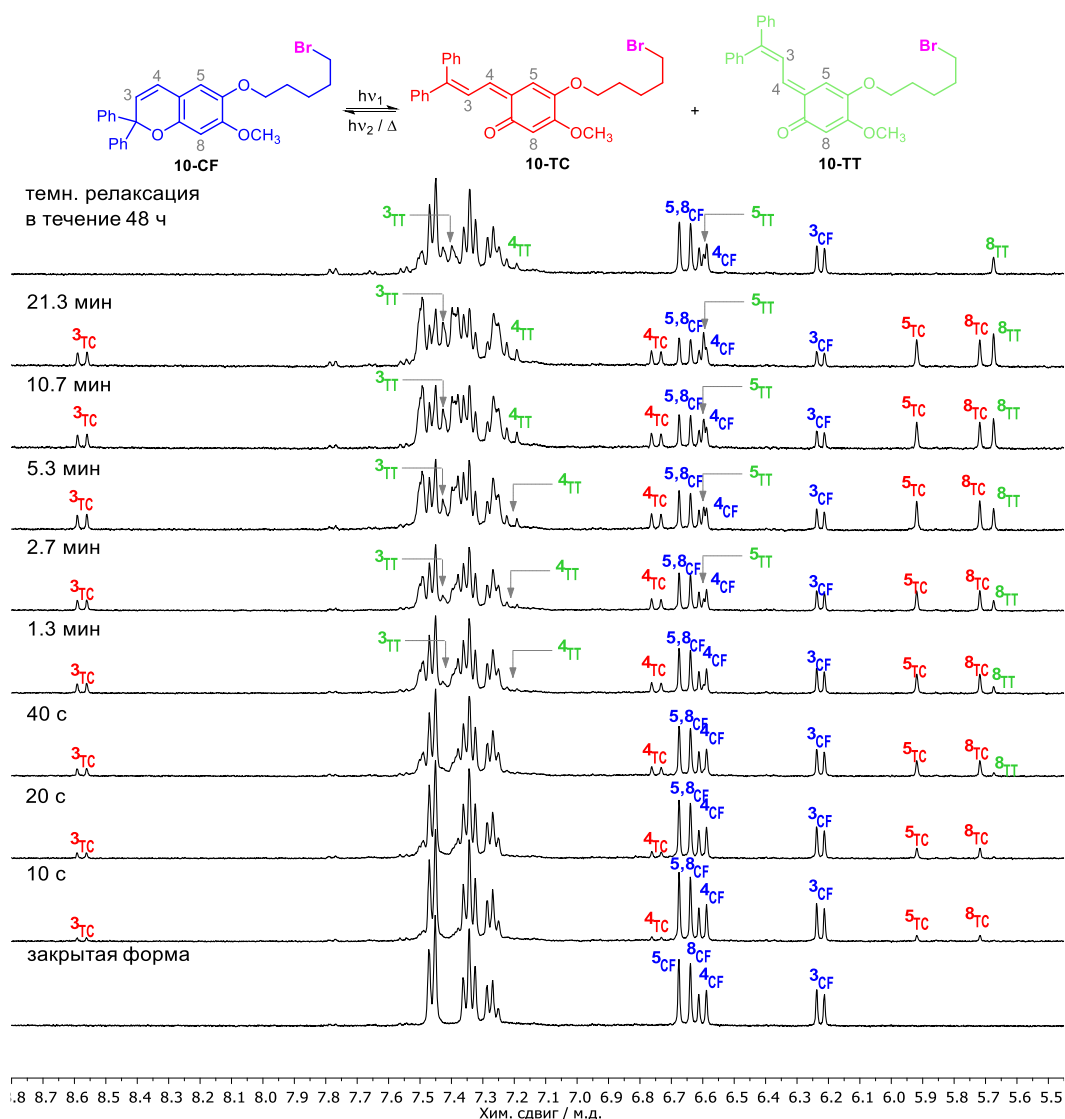


Рисунок 9 – Наблюдение фотохромизма хромена **10** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, CD₃CN) методом ¹H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения показано слева). Верхний спектр зарегистрирован во время термической релаксации облученного раствора.

В отличие от поведения хроменов **10** и **11**, облучение раствора хромена **9** в ацетонитриле-*d*₃ приводит к значительному преобладанию сигналов, относящихся к ТТ-изомеру (Рис. 10). Сравнение интегральных интенсивностей соответствующих сигналов в ФСС показало, что содержание ТТ-формы составляет 86% при незначительном количестве форм CF (9%) и ТС (5%). Следует отметить, что ТТ был преобладающим изомером открытой формы даже при очень коротком времени облучения (3-9 секунд). Заметные сигналы протонов ТС-изомера в спектре ¹H ЯМР были обнаружены через 9 секунд облучения, и их процентное содержание практически не менялось в течение эксперимента. Таким образом, по данным ЯМР, за цвет раствора в стационарных условиях фотолиза в случае хромена **9** практически полностью отвечает ТТ-изомер.

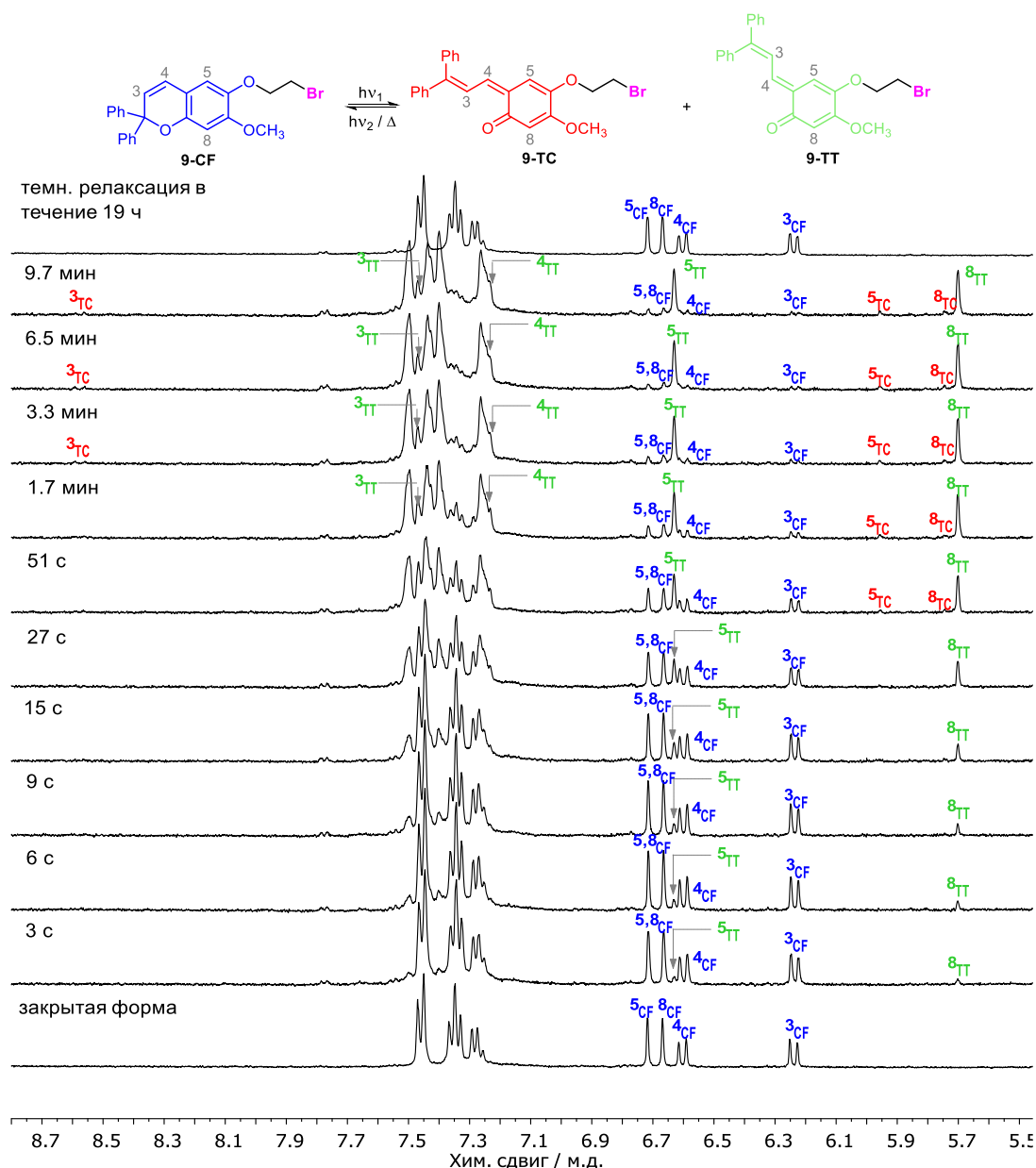


Рисунок 10 – Наблюдение фотохромизма хромена **9** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ M, CD_3CN) методом 1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения показано слева). Верхний спектр зарегистрирован после термической релаксации облученного раствора.

На основании профилей концентраций, измеренных при облучении УФ-светом, были предложены вероятные механизмы фотохромной реакции для каждого случая. Мониторинг образования фотопродуктов показал, что скорости накопления ТС- и ТТ-изомеров в ходе раскрытия цикла различны и зависят от длины алкильной цепи. Из Рис. 11, А легко заметить, что ТТ-изомер хромена **9** образуется сразу при облучении светом и его процентное содержание преобладает над ТС-формой в любой точке облучения, даже в начальном интервале времени. При этом, заметного количества ТТ-изомера не наблюдалось в течение первых 24-40 секунд при фотолизе хроменов **10** и **11** (Рис. 11, Б и В). Другими словами, ТТ-форма производных **10** и **11** начала проявляться в спектре 1H ЯМР только после того, как в растворе накопилось достаточное количество ТС-изомера (около 20%). Такое поведение соответствует общепринятой схеме

превращения закрытой формы в открытую за счет двухфотонного поглощения с последовательным образованием наиболее стабильных изомеров $CF \rightarrow TC \rightarrow TT$. Очевидно, концентрационный профиль хромена **9** отличается от хроменов **10** и **11** и во всех отношениях напоминает кинетику параллельных реакций первого порядка с одновременным и независимым образованием продуктов реакции ($CF \rightarrow TC$; $CF \rightarrow TT$). Мы предположили, что отсутствие последовательного образования изомера TT из TC приводит к высокому содержанию TT -изомера в ФСС: 86% для **9** против 36% и 61% для **10** и **11**, соответственно.

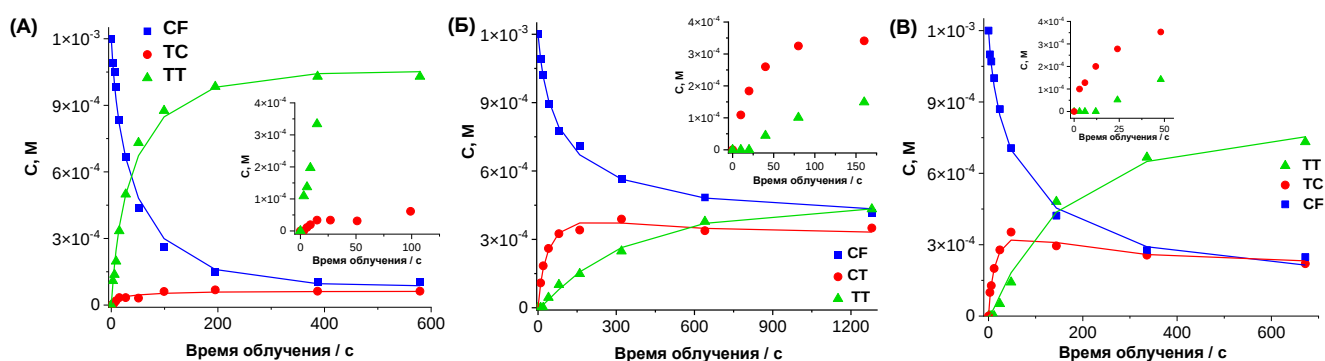


Рисунок 11 – Зависимость концентрации изомеров CF , TC и TT от времени в ацетонитриле- d_3 при облучении УФ-светом по данным 1H ЯМР: (А) для хромена **9**; (Б) для хромена **10**; (В) для хромена **11**. На вставках показано изменение концентрации изомеров TC и TT в начальный период облучения.

На основании полученных данных следует отметить, что фотохромное поведение хроменов сильно зависит от их концентрации. По данным абсорбционной спектроскопии, TC -изомер значительно преобладает в ФСС в разбавленном растворе среди всех хроменов (Рис. 6, П2 и П3). Однако данные ЯМР показали, что для концентрированного раствора основным фотопродуктом является TT -изомер. Мы предполагаем, что при высокой концентрации могут возникать некоторые межмолекулярные взаимодействия с образованием более сложных систем, например, димеров, способных более эффективно переходить в TT -форму. Возможность образования димерных структур также была подтверждена расчетами РМ7 (МОРАС 2016) (Рис. 12). В то же время в случае хроменов **10** и **11** это наблюдается в меньшей степени, так как образование значительного количества димеров в этом случае может быть затруднено из-за более длинной гибкой алкильной цепи.

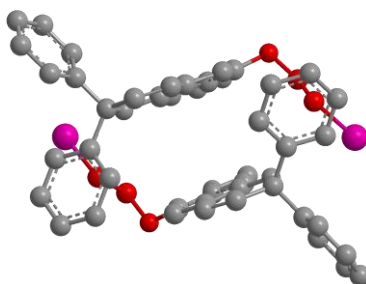


Рисунок 12 – Оптимизированная структура (РМ7, МОРАС) димерной структуры хромена **9** и рассчитанная энтальпия его образования: -104,44 ккал/моль. Атомы брома каждой молекулы хромена **9** расположены вблизи дифенильных фрагментов.

Для оценки влияния брома на формирование димерных структур и содержание ТС- и ТТ-форм в ФСС далее были изучены хромен **35**, представляющий собой хлорзамещенный аналог хромена **9**, и диметоксизамещенный хромен **36**, который не содержит в своей структуре атома галогена. В оптических исследованиях не было обнаружено существенных различий в фотохромном поведении хроменов **35** и **36** по сравнению с хроменами **9-11** (Рис. 13, Таблица 1). При этом, в спектрах ^1H ЯМР для диметоксипроизводного **36** (Рис. П8) на первом этапе наблюдалось образование ТС-формы с постепенным накоплением ТТ-изомера, что отличается от поведения хромена **9**. В ФСС соотношение форм составило 53% CF, 17% ТС и 30% ТТ.

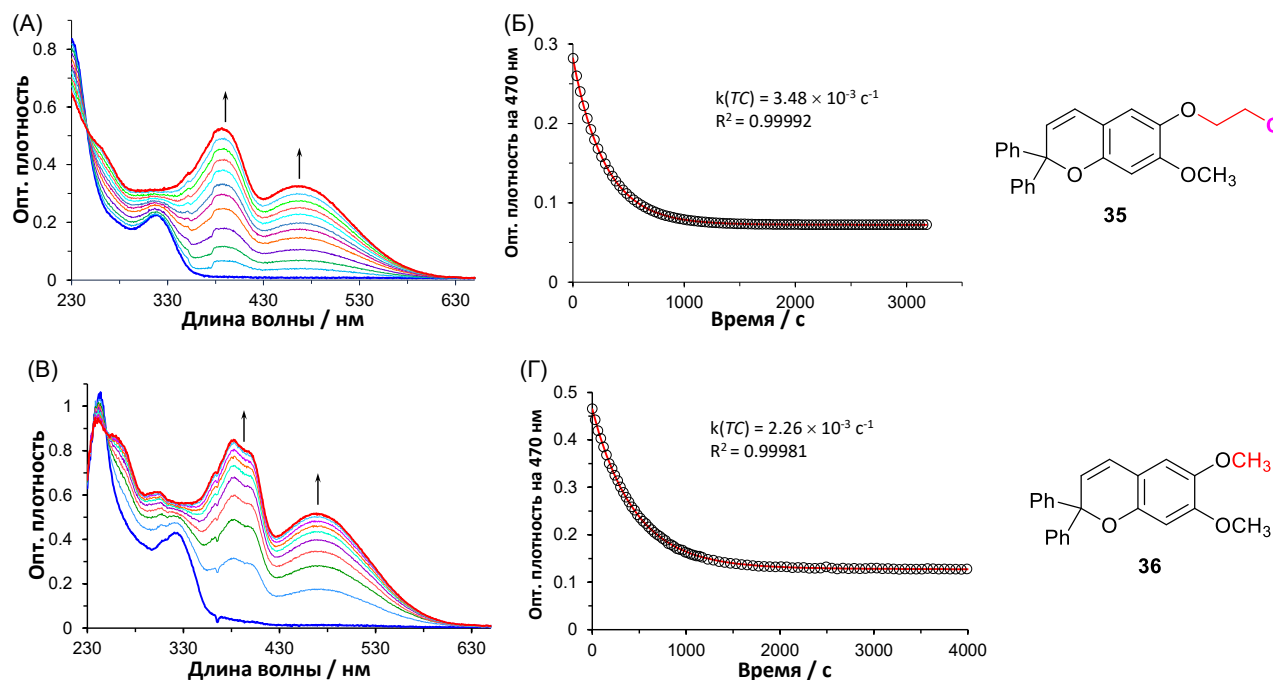


Рисунок 13 – (А, В) Изменение спектров поглощения хроменов **35** и **36** при УФ-облучении в течение 90 и 120 секунд, соответственно. (Б, Г) Изменение оптической плотности хроменов **35** и **36** на 470 нм при термической релаксации. Во всех случаях: $C = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, CH_3CN .

Что касается хлорзамещенного хромена **35**, то в этом случае облучение УФ светом также приводило к первоначальному образованию в растворе ТС-изомера, что сопровождалось появлением характерных сигналов в ^1H ЯМР спектрах (Рис. П9). Появление сигналов ТТ-формы наблюдалось через 30-60 секунд от начала облучения, когда в растворе накопилось более 20% ТС-изомера. Соотношение форм в ФСС составило 41% CF, 23% ТС и 36% ТТ. Полученные данные свидетельствуют о различном поведении в концентрированных растворах хроменов **35**, **36** и хромена **9**, для которого преобладает ТТ-форма в ФСС, и о прямом влиянии атома брома на протекание фотохромных превращений.

Внешнее микроокружение также может оказывать влияние на межмолекулярные взаимодействия, сольватацию молекул и, следовательно, на фотохимическое поведение хроменов. Замена ацетонитрила, например, на толуол в качестве растворителя может привести к более эффективной сольватации неполярных молекул хромена в закрытой форме. Кроме того,

это также может препятствовать образованию межмолекулярных связей с соседними молекулами. По данным оптической спектроскопии фотохромное поведение хромена **9** в толуоле аналогично исследованиям в ацетонитриле (Рис. П10). Однако исследования ^1H ЯМР показали, что в концентрированном растворе молекулярный состав смеси в ФСС в толуоле сильно отличается (Рис. 14). В ФСС конверсия CF в открытые формы в толуоле составила 54%, включая 13% ТС и 41% ТТ. Значительное снижение процентного содержания изомера ТТ (86%→41%) и увеличение процентного содержания изомера ТС (5%→13%) указывают на изменение механизма реакции в сторону фотохимического поведения хроменов **10** и **11**. Другими словами, уменьшение межмолекулярного взаимодействия в толуоле снижает вероятность образования ТТ-изомера.

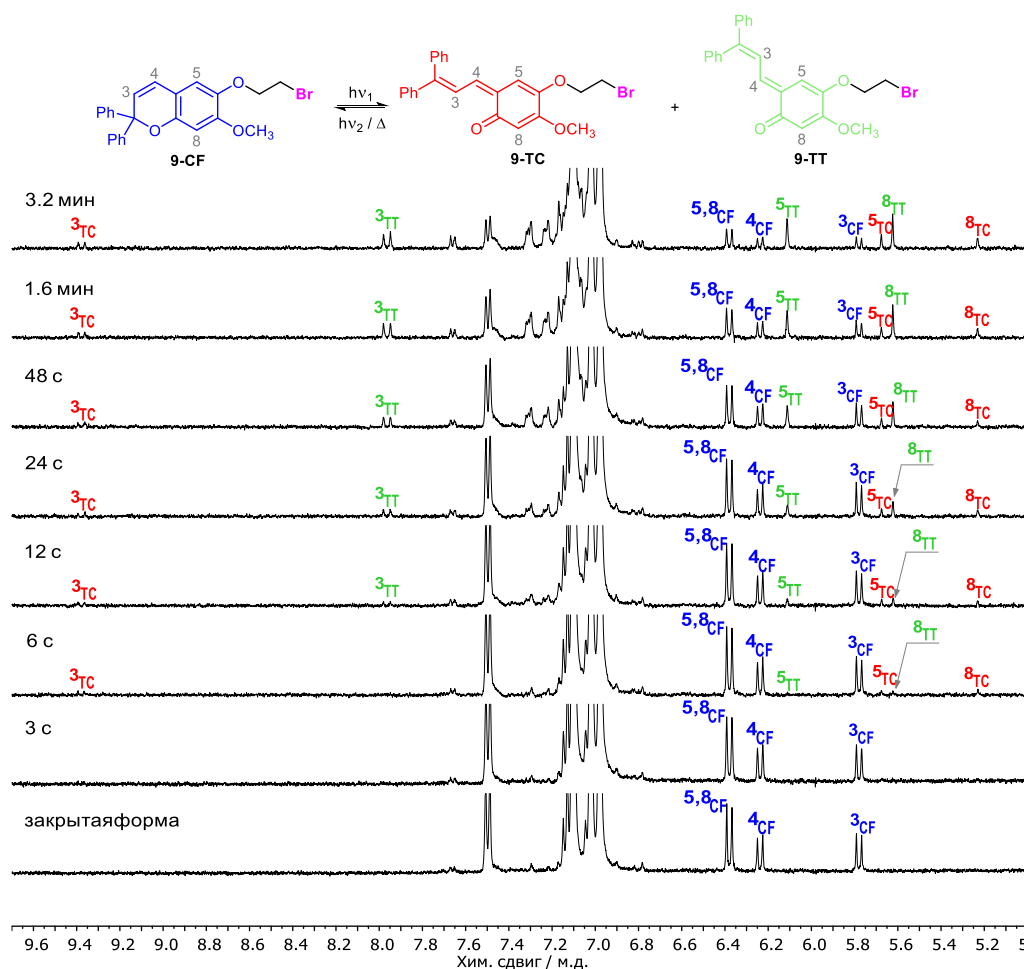


Рисунок 14 – Наблюдение фотохромизма хромена **9** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, толуол- d_8) методом ^1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения указано слева).

В настоящее время в литературе представлено несколько моделей механизма раскрытия цикла хроменов, общей чертой которых является последовательное образование открытых форм [166, 198]. Небольшие различия в представленных моделях в основном связаны со способом перехода молекул из возбужденного состояния в основное *цис*-состояние. Альтернативный подход, предполагающий, что ТС- и ТТ-изомеры образуются из возбужденного состояния закрытой формы параллельно друг другу, был предложен А. Чибисовым [199], но этот вариант

не получил широкого распространения. Таким образом, с учетом возможного образования димеров возможны два пути протекания фотореакции исследуемых хроменов в концентрированном растворе: А) путь однофотонного возбуждения для превращения CF→ТС или CF→ТТ (Рис. 15, А); и Б) путь двухфотонного возбуждения для превращения CF→ТС→ТТ (Рис. 15, Б). При реализации первого варианта соотношение концентраций ТС- и ТТ-изомеров при облучении раствора должно быть постоянным и определяется соотношением квантовых выходов ϕ_1 и ϕ_2 , что и наблюдается в случае хромена **9**. При реализации второй схемы соотношение концентраций ТС- и ТТ-форм на начальной стадии облучения должно быть выше, так как образование ТТ-изомера требует предварительного образования ТС-формы, что меньше согласуется с экспериментом для хромена **9**.

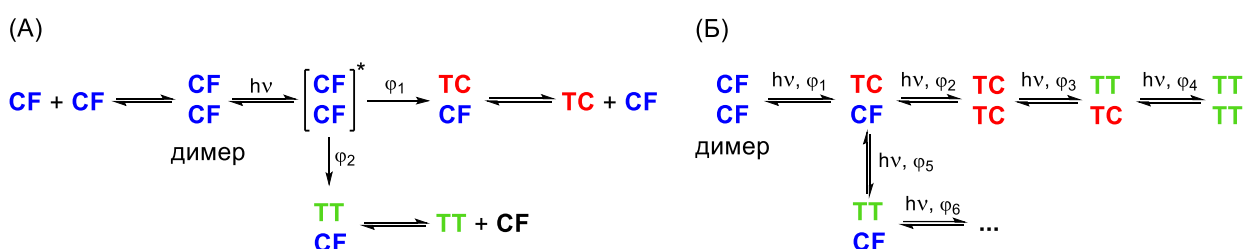


Рисунок 15 – Предполагаемые схемы параллельного (А) и последовательного (Б) образования ТС- и ТТ-изомеров хроменов в димерах. Для каждого димера подразумевается равновесие мономер-димер.

Мы предполагаем, что оба механизма фотореакции имеют право на существование, но для хромена **9** может преобладать однофотонный процесс. Недавно группой J. Abe была выдвинута привлекательная гипотеза о пути однофотонного возбуждения для превращения CF→ТТ [200]. Согласно их версии, промежуточный ТС-изомер может образовываться не только в основном состоянии молекулы, но и в колебательном «горячем» возбужденном состоянии (Рис. 16). В свою очередь, энергетический барьер для образования ТТ-изомера может быть преодолен благодаря избыточной колебательной энергии. В результате ТТ-изомер образуется из основного состояния исходной молекулы хромена при поглощении всего одного фотона. Учитывая эти факты, мы предположили, что для молекулы **9** с компактной структурой может быть реализовано образование ТТ-изомера с помощью однофотонного поглощения. С увеличением длины алкокси-заместителя в молекуле хромена избыточная колебательная энергия распределяется по большему числу связей с образованием более «холодного» возбужденного состояния. В результате вероятность однофотонной генерации ТТ-изомера уменьшается, в то время как процент ТС-изомера в основном состоянии увеличивается, что согласуется с данными спектров ^1H ЯМР для **10** и **11**.

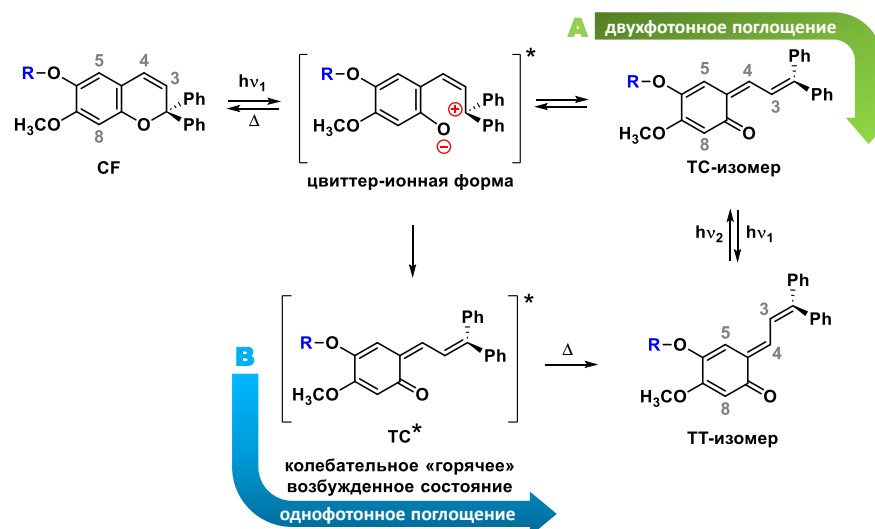


Рисунок 16 – Предполагаемый механизм фотохромной реакции хроменов после возбуждения УФ светом.

3.4.2 Изучение фотохромных свойств конъюгатов 2, 3

На следующем этапе была изучена возможность осуществления фотохромных превращений хроменов в составе конъюгатов со стирильным красителем. Конъюгаты **2**, **3** характеризуются полосами поглощения при 477 нм в ацетонитриле, которые аналогичны максимуму поглощения стирильного красителя **39** (Рис. 17). Наблюдаемая полоса поглощения объясняется внутримолекулярным переносом заряда от электронодонорной диметиламиногруппы стирильного фрагмента на акцепторный пиридиновый фрагмент. Незначительный красный сдвиг на 7 нм в максимуме поглощения конъюгатов **2**, **3** в отличие от стирильного красителя **39**, вероятно, связан с изменением окружения красителя за счет близости гидрофобной алкильной цепи и хроменого фрагмента. Полоса хроменого фрагмента в конъюгатах **2**, **3** проявляется в области 330 нм, но частично перекрывается с коротковолновой полосой стирильного красителя **39** (Рис. 17).

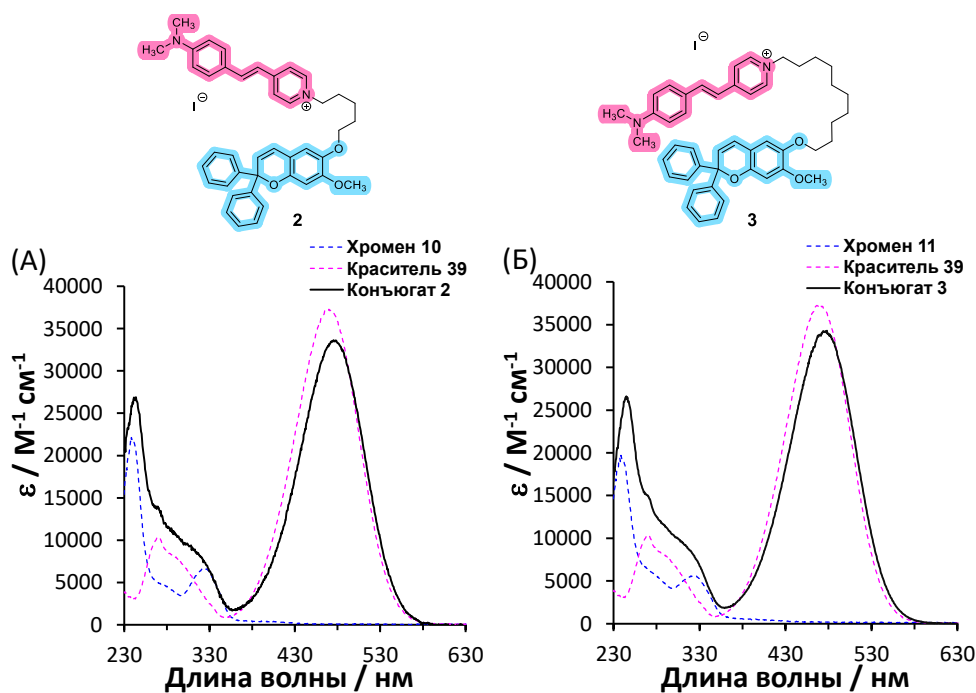


Рисунок 17 – Спектры поглощения конъюгатов **2** (А) и **3** (Б) и их исходных соединений **10**, **11** и **39** в CH₃CN.

При смене растворителя с ацетонитрила на воду в растворе образуются межмолекулярные агрегаты, о чем свидетельствует появление в спектре поглощения максимума в области 420 нм, интенсивность которого растет с увеличением концентрации конъюгатов (Рис. 18, А). Повышение температуры, как и ожидалось, способствует постепенному снижению концентрации агрегатов (Рис. 18, Б).

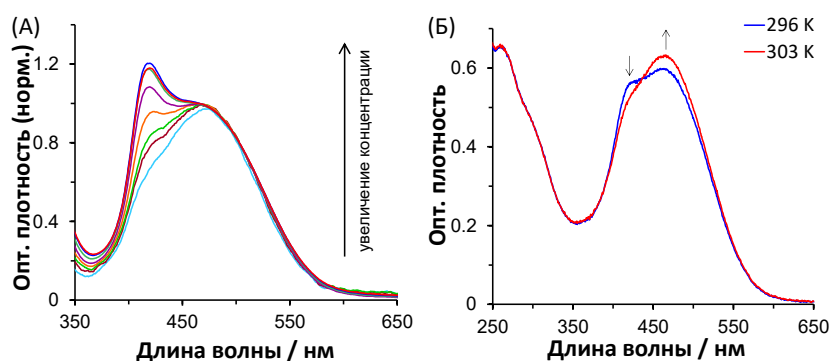


Рисунок 18 – (А) Нормализованные спектры поглощения конъюгата **3** в воде различной концентрации ($3 \cdot 10^{-6}$ – $7 \cdot 10^{-5}$ М). (Б) Спектры поглощения конъюгата **3** ($C_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ М) в воде при различных температурах.

Облучение УФ светом ацетонитрильных или водных растворов конъюгатов **2**, **3** вызывает увеличение оптической плотности в видимой области спектра, что характерно для образующихся мероцианиновых форм хрома (Рис. 19, П11). При этом, спектр поглощения практически полностью возвращался в исходное состояние в течение 2-4 часов после прекращения облучения в отличие от исходных хроменов.

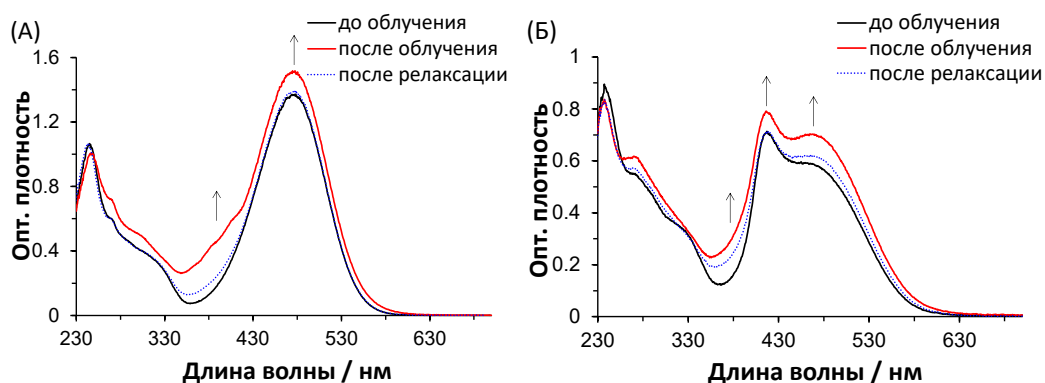


Рисунок 19 – Изменение спектров поглощения **3** ($4 \cdot 10^{-5}$ М) в ацетонитриле (А) и в воде (Б) до и после облучения УФ светом.

Раскрытие бензопиранового цикла в конъюгатах также было доказано с помощью ЯМР-спектроскопии. Облучение конъюгатов вызывало появление в ^1H ЯМР спектре сигналов открытых форм, интенсивность которых менялась с увеличением продолжительности облучения (Рис. 20, П12). ФСС было достигнуто через 8 минут после начала облучения, при этом соотношение форм в растворе составило 51% CF, 21% TC, 28% TT для конъюгата **2** и 46% CF, 18% TC, 36% TT для конъюгата **3**. Сопоставляя полученные данные с конверсией исходных хроменов (65% для хромена **10**, 79% для хромена **11**), можно заметить, что эффективность фотохромной реакции при переходе к конъюгатам несколько снижается. Это можно объяснить частичным поглощением УФ-излучения стироловым красителем, который в составе конъюгатов выступает в роли внутреннего оптического фильтра, тем самым снижая интенсивность света, доступного для возбуждения хромена. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что присоединение к хроменам второй молекулы не препятствует

протеканию в них фотохромных превращений, но приводит к меньшим выходам образующихся открытых форм и снижает их время жизни.

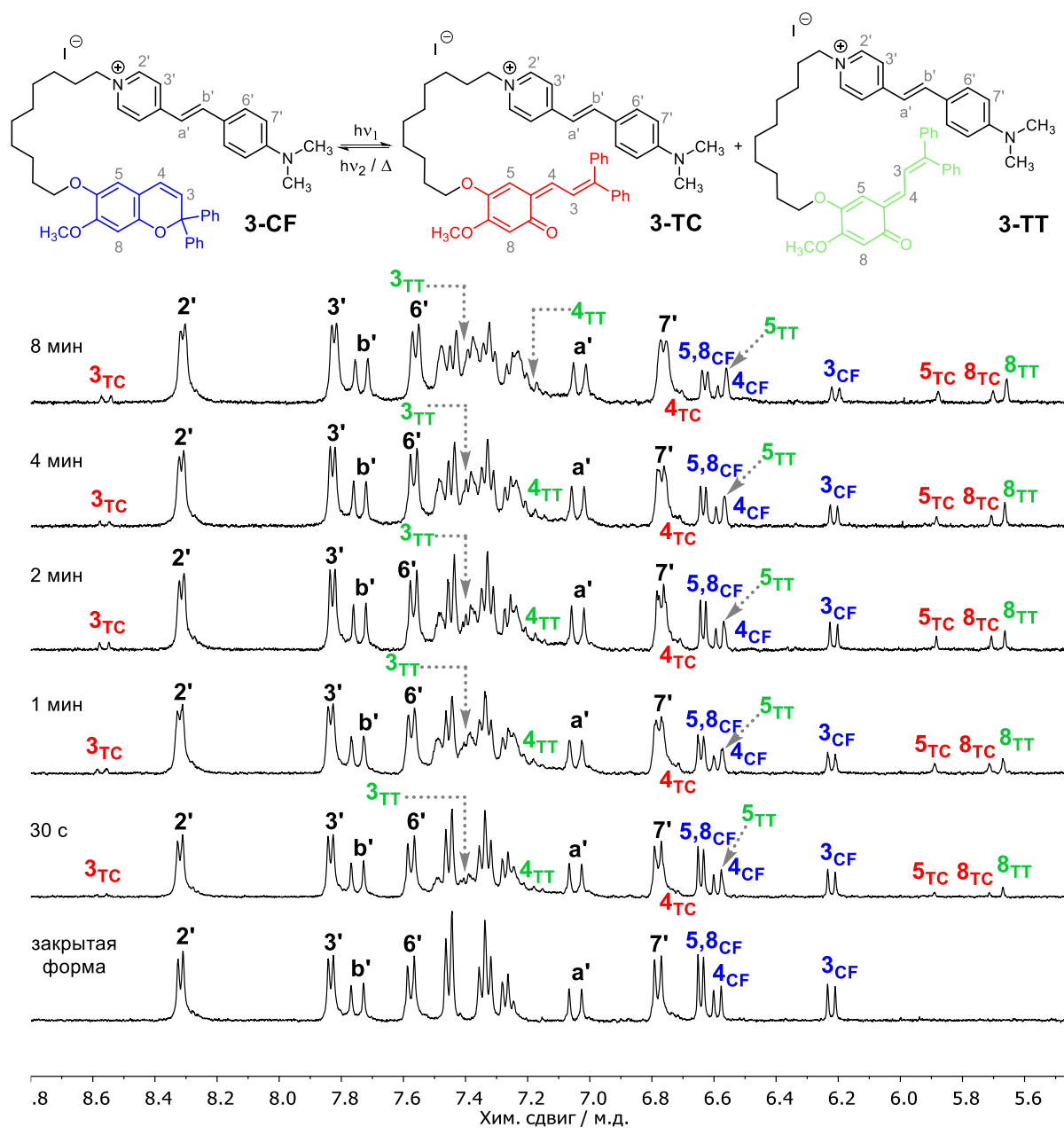


Рисунок 20 – Наблюдение фотохромизма конъюгата **3** ($C = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М, CD₃CN) методом ¹H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения показано слева).

3.5 Изучение комплексообразования конъюгатов 2, 3 с ДНК и СВ[7]

На следующем этапе были изучены комплексообразующие свойства полученных конъюгатов **2**, **3** по отношению к ДНК тимуса теленка (ДНК-тт). Взаимодействие изучалось с помощью абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий, а также с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД).

При постепенном добавлении ДНК в раствор конъюгатов в обоих случаях в спектрах поглощения наблюдалось разрушение агрегатов с умеренным смещением полосы поглощения в красную область относительно свободных лигандов ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = 10$ нм для **2** и $\Delta\lambda_{\text{макс}} = 15$ нм для **3**) (Рис. 21, П13, Таблица 2), что указывает на переход молекулы из полярного водного раствора в более гидрофобную среду ДНК. При большом избытке нуклеиновой кислоты ($C_{\text{ДНК}}/C_{2,3} > 20$) наблюдался гиперхромный эффект, что указывает на взаимодействие конъюгатов с ДНК [201].

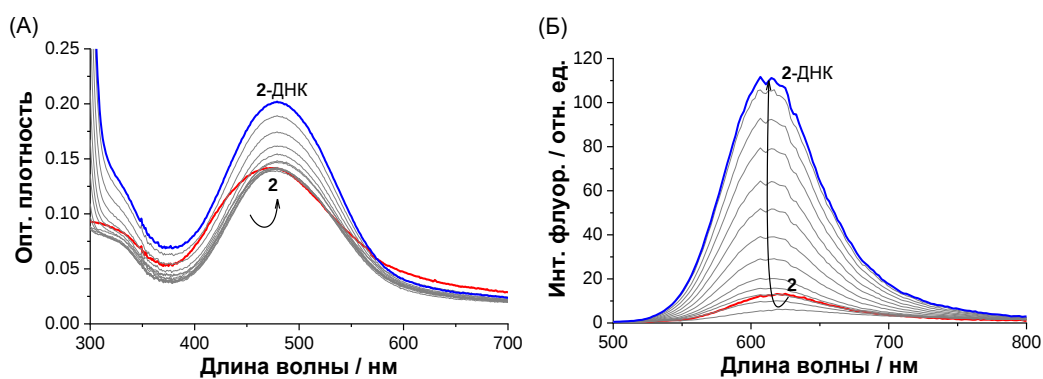
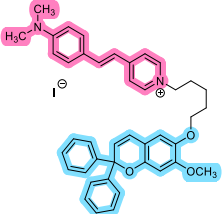
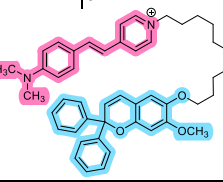


Рисунок 21 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **2** при добавлении ДНК-тт ($C_2 = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 0 - 1 \cdot 10^{-3}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0) с 2% об. CH_3CN ; $\lambda_{\text{возб}} = 453$ нм).

Что касается спектров флуоресценции, то свободные конъюгаты обладают достаточно низкими квантовыми выходами (Таблица 2), так как основным путем релаксации возбужденного состояния стирловых красителей является образование скрученных состояний с внутримолекулярным переносом заряда (TICT, от англ. Twisted Intramolecular Charge Transfer). Взаимодействие конъюгатов **2**, **3** с ДНК приводит к подавлению безызлучательных TICT-состояний и, как следствие, увеличению интенсивности флуоресценции в 10 раз с одновременным синим сдвигом максимума эмиссии с 620 нм для **2** и 626 нм для **3** до 613 нм (Рис. 21, П13, Таблица 2). Наблюдаемые изменения аналогичны поведению стирлового красителя **39** при добавлении ДНК [202]. Значительно меньшие квантовые выходы флуоресценции конъюгатов **2**, **3** по сравнению со стирловым красителем **39** в комплексах с ДНК могут быть связаны с их достаточно объемной структурой, которая приводит к другому расположению молекул лиганда в ДНК. По-видимому, краситель **39** залегает в структуре нуклеиновой кислоты таким образом, что внутримолекулярные вращения диметиламинофенильного фрагмента ограничены в большей степени, чем в случае конъюгатов, и, следовательно, способствуют более интенсивной флуоресценции. Данные флуориметрического титрования были обработаны с

использованием программного обеспечения SpecFit/32 (Рис. П14, П15), в результате чего были рассчитаны логарифмы констант связывания комплексов состава 1:1: $\lg K_{11} = 3,38 \pm 0,02$ для **2** и $\lg K_{11} = 3,71 \pm 0,03$ для **3**.

Таблица 2 – Оптические характеристики свободных лигандов и лигандов в присутствии ДНК-тт.

Лиганд (L)	$\lambda_{\text{погл}} / \text{нм}$		$\lambda_{\text{фл}} / \text{нм}$		$\frac{I_{\text{макс}}}{I_0}$	$\Phi_{\text{фл}} / \%$		$\lg K^a$
	L	L-ДНК	L	L-ДНК		L	L-ДНК	
2 	470	480	620	613	10	0,3 ^б	2,3 ^б	$3,38 \pm 0,02$ (1:1)
3 	420, 470	485	626	613	10	0,2 ^б	1,6 ^б	$3,71 \pm 0,03$ (1:1)
39 	448 ^в	491 ^в	615 ^в	615 ^в	60 ^в	0,3 ^в	6,2 ^в	$3,51$ (1:1) ^в
^а Рассчитаны с использованием программы SpecFit/32. ^б Относительно кумарина 6 в этаноле. ^в Данные взяты из литературы [202].								

Далее для более глубокого понимания способа связывания лиганд-ДНК были проведены исследования с помощью спектроскопии КД. Это чувствительный оптический метод, используемый для определения специфического способа связывания и обнаружения конформационных изменений в биомолекулах при добавлении органических лигандов [203]. ДНК-тт в физиологических условиях существует преимущественно в виде правозакрученной двойной спирали, или В-формы. Спектр КД этой формы представляет собой бифазный сигнал: положительная полоса на 275 нм характеризует π - π -стэкинг-взаимодействия между парами оснований, а отрицательная полоса при 245 нм отвечает за спиральную структуру нуклеиновой кислоты. В этом отношении изменения формы и/или интенсивности сигналов КД, включая сигнал индуцированного КД (ИКД), могут быть использованы для определения интеркаляции или связывания с бороздкой.

Исследуемые соединения **2**, **3** и **39** оптически неактивны, поэтому не демонстрируют никаких сигналов в спектрах КД (Рис. П16). Однако их добавление в раствор ДНК приводит к развитию слабой отрицательной полосы в области поглощения лигандов (Рис. 22), что обычно характерно для интеркаляторов [204]. Следует отметить, что стирильный краситель **39** не оказывает существенного влияния на вторичную структуру ДНК, в то время как конъюгаты **2**, **3** вызывают уменьшение стэкинга между парами оснований, а также нарушение спиральности ДНК. Изменение вторичной структуры может быть вызвано большим размером конъюгатов,

которые содержат объемный хромоновый фрагмент в отличие от небольшой молекулы стирилового красителя.

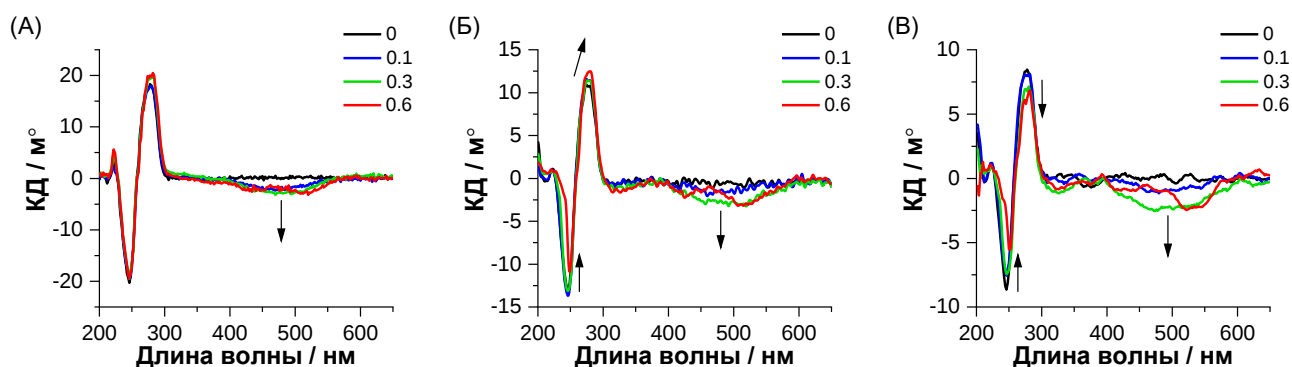


Рисунок 22 – Спектры кругового дихроизма ДНК-тт ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М для **39**, $7 \cdot 10^{-5}$ М для **2**, $5 \cdot 10^{-5}$ М для **3**) в отсутствие и в присутствии лигандов **39** (А), **2** (Б) и **3** (В) при различном соотношении лиганд-ДНК: 0; 0,1; 0,3; 0,6. Во всех случаях: фосфатный буфер (рН 7,0) с 2% об. CH_3CN .

Несмотря на то, что краситель **39** является хорошо известным лигандом для ДНК и обычно рассматривается как залегающий в малую бороздку, в литературе не представлено достоверных данных в пользу того или иного способа связывания этого красителя с ДНК. В литературе есть данные спектрофотометрического и флуориметрического титрования [188], которые коррелируют с нашими результатами. Также в этой работе приведены данные спектроскопии КД, в которых не было обнаружено спектральных изменений, на основании чего был сделан вывод о слабом взаимодействии красителя с ДНК, при этом способ связывания не обсуждался. Мы предполагаем, что взаимодействие красителя **39**, т.е. интеркаляция или связывание с малой бороздкой, может варьироваться в зависимости от последовательности ДНК, а также от сольватации молекулы, что наблюдается, например, в случае DAPI, известного лиганда для ДНК [205].

Для определения конкретного способа связывания исследуемых соединений с ДНК было проведено конкурентное титрование со стандартными лигандами, для которых известен способ взаимодействия с ДНК. Если стандарт вытесняет исследуемое соединение из комплекса с ДНК, что будет сопровождаться спектральными изменениями, то способ взаимодействия исследуемых лигандов можно считать аналогичным стандарту. В качестве стандартов для залегания в большую и малую бороздки обычно используются Метиловый зеленый (MeGr) и Хехст33258. Как видно из Рис. 23 и П17, их добавление к комплексам конъюгатов с ДНК не приводит к изменениям длинноволновой полосы поглощения 2-ДНК и 3-ДНК, что исключает эти способы связывания.

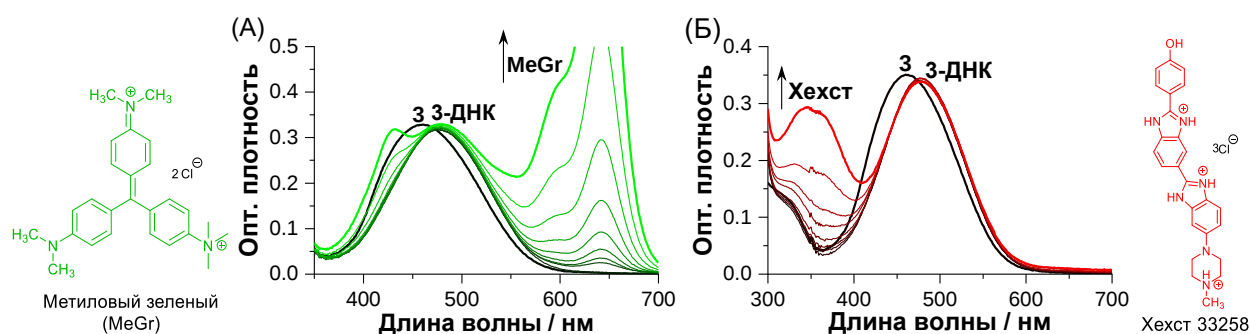


Рисунок 23 – Спектрофотометрическое титрование комплекса 3-ДНК-тт стандартами MeGr (А) и Хехстом (Б) ($C_3 = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{MeGr}} = 0 - 4,3 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{Хехст}} = 0 - 1,3 \cdot 10^{-5}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN).

Что касается интеркаляции, то подобные эксперименты обычно проводятся с бромистым этидием как с известным интеркалятором ДНК, но в нашем случае его нежелательно использовать из-за перекрывания его полос поглощения и флуоресценции с исследуемыми соединениями. В связи с этим было решено использовать производное бензо[4,5]тиазоло[3,2-*a*]хинолиния **61** (Рис. 24, А), подходящее по максимумам поглощения и испускания и интеркалирующее между парами оснований ДНК с $\lg K_{11} = 4,60 \pm 0,03$ [94]. Постепенное добавление соединения **61** к комплексам 2-ДНК, 3-ДНК и 39-ДНК приводило к снижению интенсивности флуоресценции (Рис. 24, Б и П18), что доказывает интеркаляционный режим связывания для всех изучаемых лигандов.

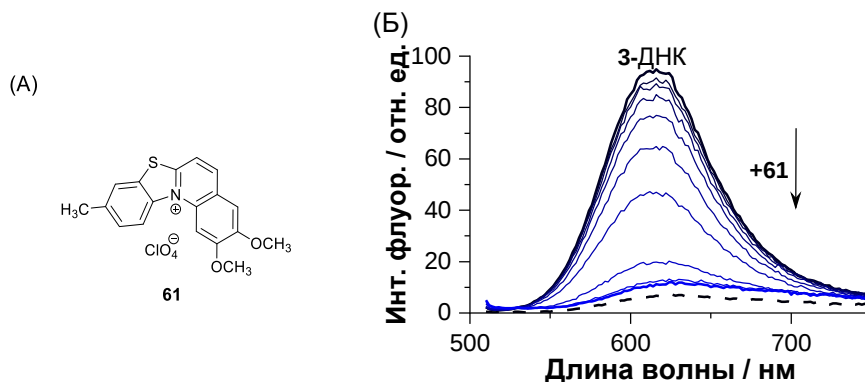


Рисунок 24 – (А) Структура производного бензо[4,5]тиазоло[3,2-*a*]хинолин-12-ия **61**. (Б) Флуориметрическое титрование комплекса 3-ДНК-тт интеркалятором **61** ($C_3 = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{61} = 0 - 2,5 \cdot 10^{-4}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN , $\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм).

Пунктирной линией обозначен спектр флуоресценции свободного конъюгата **3**.

Так как конъюгаты **2**, **3** содержат два fotocувствительных фрагмента, на следующем этапе была изучена их стабильность при облучении в присутствии ДНК. Как известно, краситель **39** при облучении светом не подвергается *E,Z*-изомеризации, так как основным каналом релаксации возбужденного состояния является образование ТИСТ-состояний. Однако образование комплекса «хозяин-гость» с макромолекулами ограничивает вращение диметиламинофенильного фрагмента и, следовательно, может способствовать изомеризации при фотовозбуждении. Тем не менее, облучение комплекса **39**-ДНК УФ или видимым светом не

вызвало каких-либо существенных изменений в спектре поглощения (Рис. 25), что указывает на отсутствие *E,Z*-фотоизомеризации в такой системе.

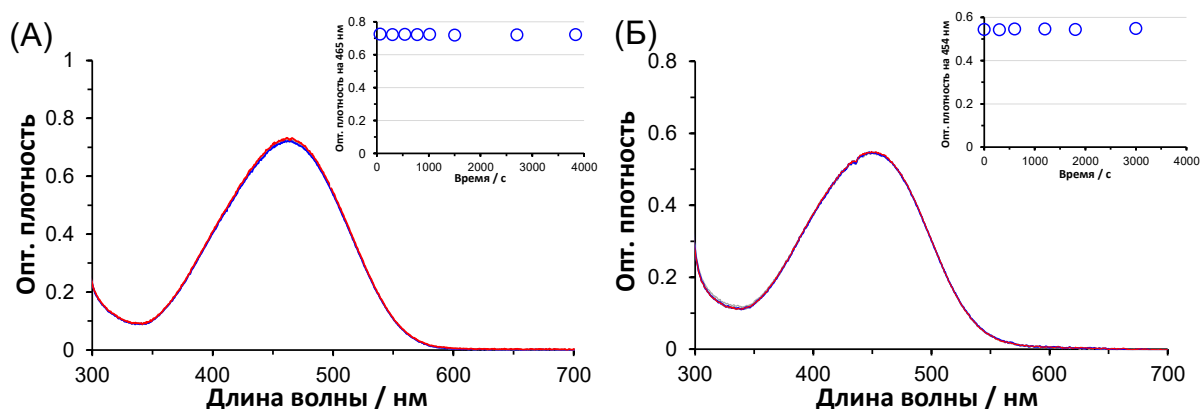


Рисунок 25 – Спектры поглощения комплекса **39**-ДНК-тт во время облучения с $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (А, $C_{39} = 3 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М) и 436 нм (Б, $C_{39} = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М) в течение 1 часа. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0). На вставках показано изменение оптической плотности во времени.

Что касается хроменого фрагмента, то облучение конъюгатов **2** и **3** в присутствии ДНК приводит к увеличению оптической плотности в видимой области спектра, что свидетельствует о протекании фотохромного превращения (Рис. 26, А). Однако в этом случае продолжительное воздействие света (>6 мин.) вызывало фотодеградацию стирилового фрагмента, что сопровождалось уменьшением длинноволновой полосы (Рис. 26, Б). Наблюдаемый эффект может быть вызван возможными радикальными процессами, которые могут происходить в хроменах под действием УФ света [206]. При этом, не было обнаружено существенных различий во времени жизни открытых форм конъюгатов в свободном состоянии и в присутствии ДНК (Таблица 3), что, к сожалению, указывает на отсутствие какого-либо взаимодействия хроменого фрагмента в конъюгатах с нуклеиновой кислотой. Схематическое представление образующихся комплексов конъюгатов **2** и **3** с ДНК представлено на Рис. 27.

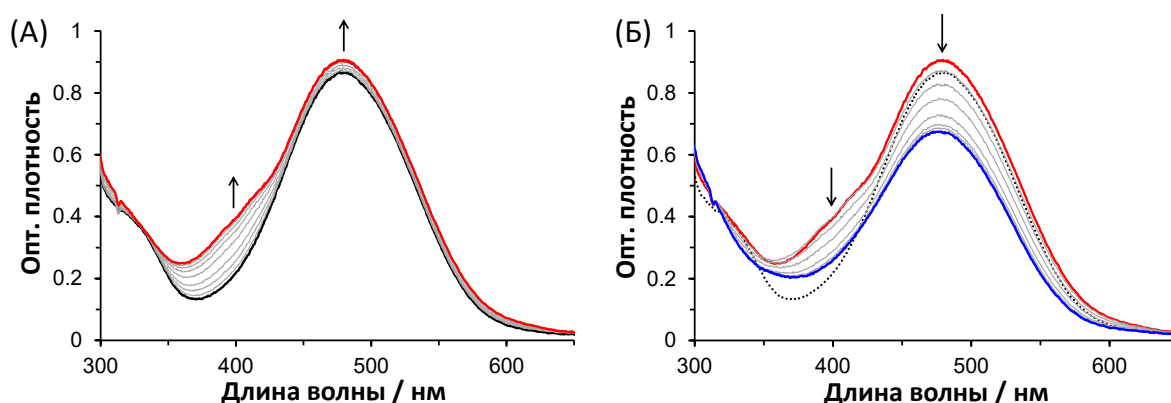


Рисунок 26 – Изменения в спектрах поглощения **3**-ДНК-тт во время облучения $\lambda = 313$ нм в течение 6 минут (А) и более 6 минут (Б) ($C_3 = 3 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М, фосфатный буфер (рН 7,0) с 1% CH_3CN , общее время облучения 100 минут).

Таблица 3 – Кинетические характеристики термической релаксации конъюгатов **2** и **3** в свободном виде и в комплексе с ДНК-тТ.

Образец	k_{TC} / c^{-1}	$\tau_{1/2, TC} / \text{мин}$	k_{TT} / c^{-1}	$\tau_{1/2, TT} / \text{мин}$
2	$4,43 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	3	$1,71 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-6}$	68
2-ДНК	$2,34 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	5	$2,55 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-6}$	45
3	$7,13 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-5}$	16	$4,02 \cdot 10^{-5} \pm 3 \cdot 10^{-6}$	287
3-ДНК	$8,33 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	14	$5,87 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	197

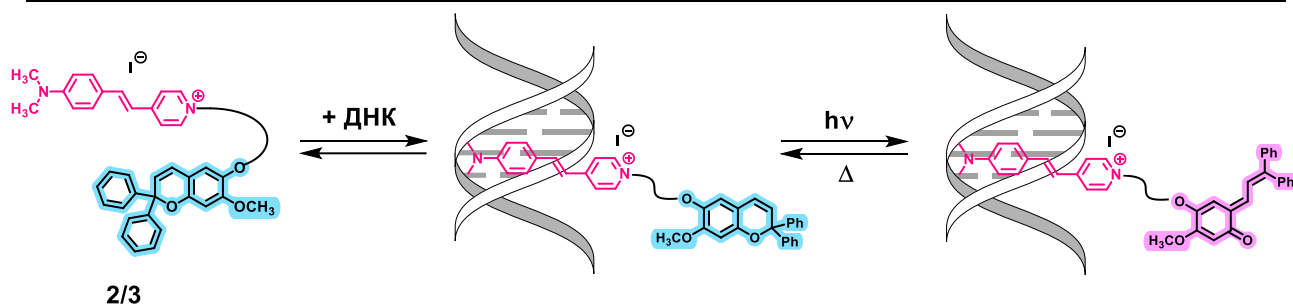


Рисунок 27 – Схематическое представление комплексов конъюгатов **2** и **3** с ДНК-тТ до и после протекания фотохромного превращения.

Тем не менее, соединения, содержащие фрагмент хромена, известны не только своими фотохромными свойствами, но и широким разнообразием биологической активности, включая антимикробную, противовирусную, противораковую и др. [207, 208]. Поэтому на следующем этапе работы представляло интерес протестировать конъюгаты **2**, **3** в системах, пригодных для доставки и контролируемого высвобождения ДНК-таргетных лигандов. В этом контексте одним из привлекательных подходов является инкапсуляция органических лигандов молекулярными контейнерами, такими как кукурбит[*n*]урилы (CB[*n*]) (Рис. 28), которые могут быть полезны для контроля взаимодействия между лекарством и ДНК. Образование комплексов с CB[*n*] позволяет повысить биодоступность препаратов за счет улучшения растворимости и термической стабильности в водной среде, снижения токсичности, а также ограничения внеклеточного накопления лекарств. Кроме того, кукурбитурилы играют ключевую роль не только в изменении свойств лиганда, но и в управлении специфическими функциями и морфологией ДНК. Среди семейства CB[*n*] CB[7] считается наиболее привлекательным для биологического применения благодаря хорошей растворимости в воде и подходящему размеру полости, которая позволяет ему образовывать комплексы «хозяин-гость» с широким кругом органических соединений [209].

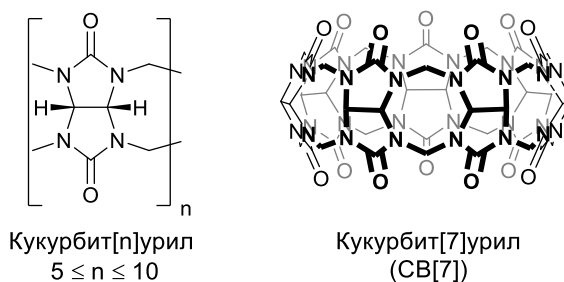


Рисунок 28 – Структура кукурбит[*n*]урилов.

Взаимодействие между конъюгатами **2**, **3** и СВ[7] также было изучено с помощью абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий в фосфатном буфере. Так, добавление СВ[7] в растворы конъюгатов приводило к смещению максимумов поглощения в длинноволновую область ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = 15$ нм для **2** и $\Delta\lambda_{\text{макс}} = 27$ нм для **3**) (Рис. 29, П19). Интенсивность излучения в максимуме флуоресценции увеличилась в 5 и 16 раз для **2** и **3** соответственно, при этом полосы флуоресценции сместились на 16-20 нм в синюю область. Наблюдаемые спектральные изменения свидетельствуют о включении конъюгатов **2**, **3** в гидрофобную полость макроцикла.

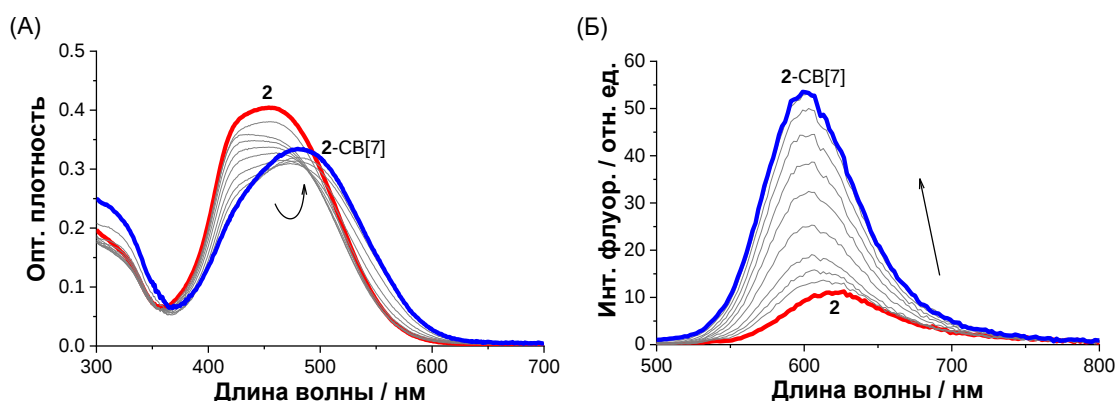


Рисунок 29 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **2** при добавлении СВ[7]. (А) $C_2 = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{СВ}[7]} = 0 - 6 \cdot 10^{-4}$ М; (Б) $C_2 = 5 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{\text{СВ}[7]} = 0 - 3 \cdot 10^{-4}$ М. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% об. CH_3CN , $\lambda_{\text{возб}} = 455$ нм.

По данным спектрофотометрического титрования были рассчитаны константы устойчивости полученных комплексов состава 2:1 и 1:1 (Таблица 4, Рис. П20 и П21). Кроме того, в графиках Жоба, полученных методом изомолярных серий, отсутствуют четкие максимумы (Рис. 30), что доказывает одновременное образование нескольких комплексов с разной стехиометрией.

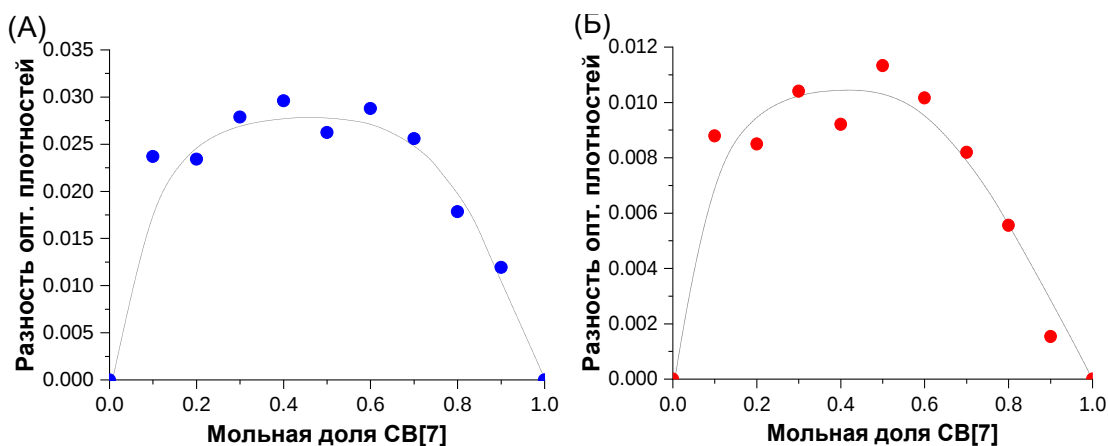
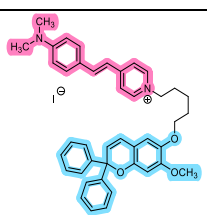
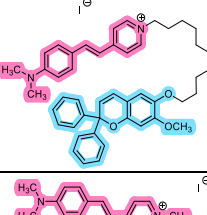
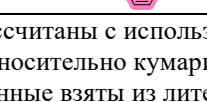
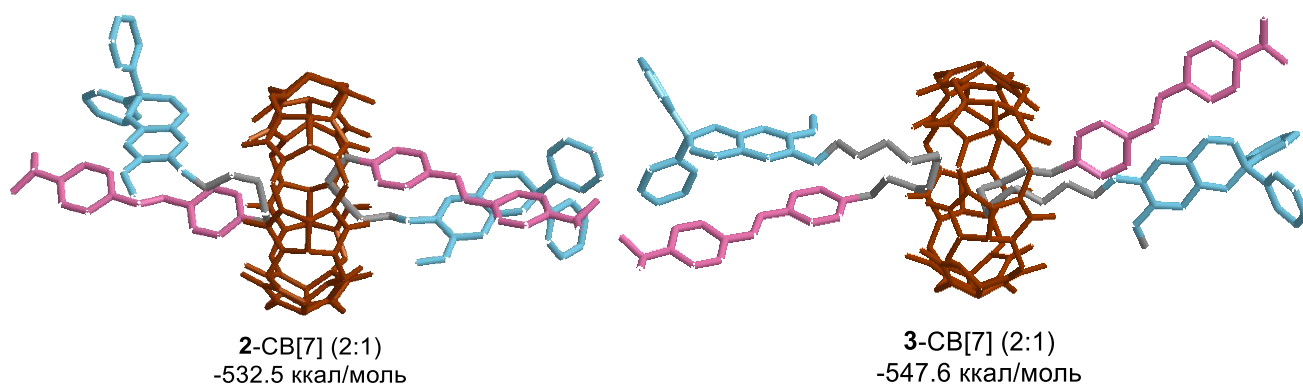


Рисунок 30 – Графики Жоба для комплексов конъюгатов **2** (А) и **3** (Б) с СВ[7], регистрируемые при 460 нм.

Таблица 4 – Оптические характеристики свободных красителей и красителей в присутствии СВ[7].

Лиганд (L)	$\lambda_{\text{погл}} / \text{нм}$		$\lambda_{\text{фл}} / \text{нм}$		$\frac{I_{\text{макс}}}{I_0}$	$\Phi_{\text{фл}} / \%$		$\lg K^a (\text{L:CB}[7])$
	L	L-CB[7]	L	L-CB[7]		L	L-CB[7]	
2 	420, 470	485	620	600	5	0,3 ^б	5,0 ^б	11,75 ± 0,20 (2:1) 5,60 ± 0,14 (1:1)
3 	420, 470	497	626	610	16	0,2 ^б	3,7 ^б	11,03 ± 0,28 (2:1) 5,39 ± 0,12 (1:1)
39 	448 ^в	461 ^в	615 ^в	606 ^в	26 ^в	0,2 ^в	2,7 ^в	4,61 ± 0,06 (1:1) ^в 8,59 ± 0,11 (1:2) ^в
^а Рассчитаны с использованием программы SpecFit/32. ^б Относительно кумарина 6 в этаноле. ^в Данные взяты из литературы [210].								

Мы предположили, что во время первичного взаимодействия гидрофобные алкильные цепи в конъюгатах имеют тенденцию располагаться в неполярной полости СВ[7] с образованием комплексов 2:1, вероятность чего была подтверждена расчетами РМ7 (МОРАС 2016) (Рис. 31). Дальнейшее увеличение концентрации СВ[7] приводит к более выгодному распределению молекул в растворе, т.е. смещению молекулярного контейнера к положительно заряженному фрагменту, что приводит к образованию большего количества комплекса состава 1:1 (Рис. П20, А и П21, А). Рассчитанные спектры поглощения комплексов, полученные на основе данных спектрофотометрического титрования, хорошо согласуются с предложенной схемой (Рис. П20, В и П21, В). Направление сдвига максимума поглощения зависит от типа образующегося комплекса: батохромный сдвиг возникает при взаимодействии СВ[7] с хромофорной частью, а гипсохромный – при взаимодействии с алкильной цепью [211]. Схематическое представление образующихся комплексов конъюгатов **2** и **3** с кукурбит[7]урилом представлено на Рис. 32.

**Рисунок 31** – Оптимизированные структуры (РМ7, МОРАС) комплексов **2**-СВ[7] (2:1) и **3**-СВ[7] (2:1).

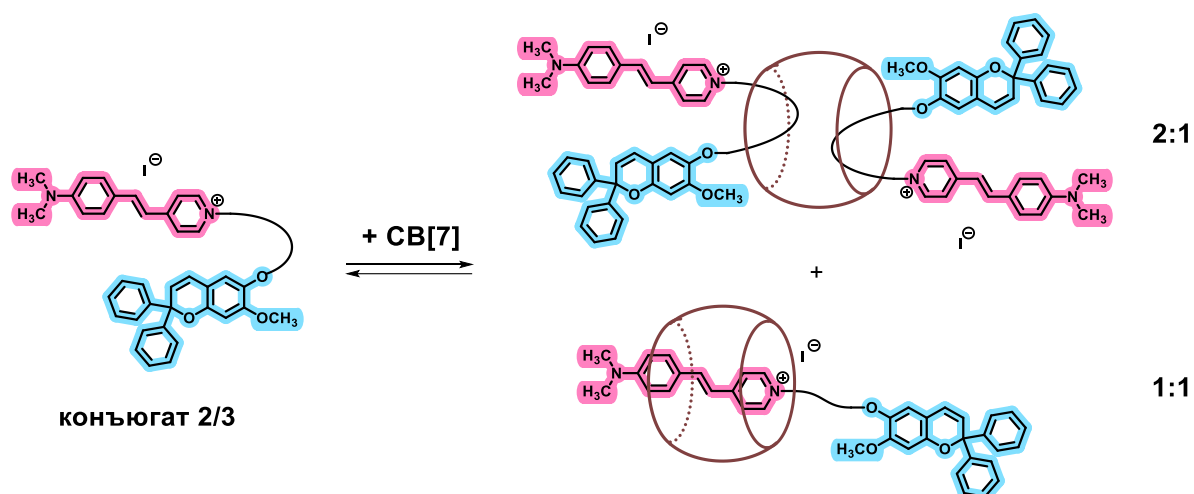


Рисунок 32 – Схематическое представление комплексов конъюгатов 2 и 3 с CB[7].

К сожалению, низкая растворимость конъюгатов 2, 3 в воде не позволила изучить комплексообразование методами ЯМР-спектроскопии. Однако нам удалось подтвердить образование комплексов с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. В масс-спектрах наблюдаются пики молекулярных ионов с m/z 1786,3 и 1856,3 для систем 2-CB[7] и 3-CB[7] соответственно (теоретически рассчитанные m/z 1786,8 и 1856,9 соответственно) (Рис. 33). Наблюдаемые пики молекулярных ионов соответствуют комплексам 1:1, что согласуется с приведенными выше результатами. Отсутствие комплекса 2:1 в спектрах можно объяснить его меньшей термодинамической стабильностью, более того, согласно концентрационным кривым их количество в растворе довольно невелико (Рис. П20, А и П21, А).

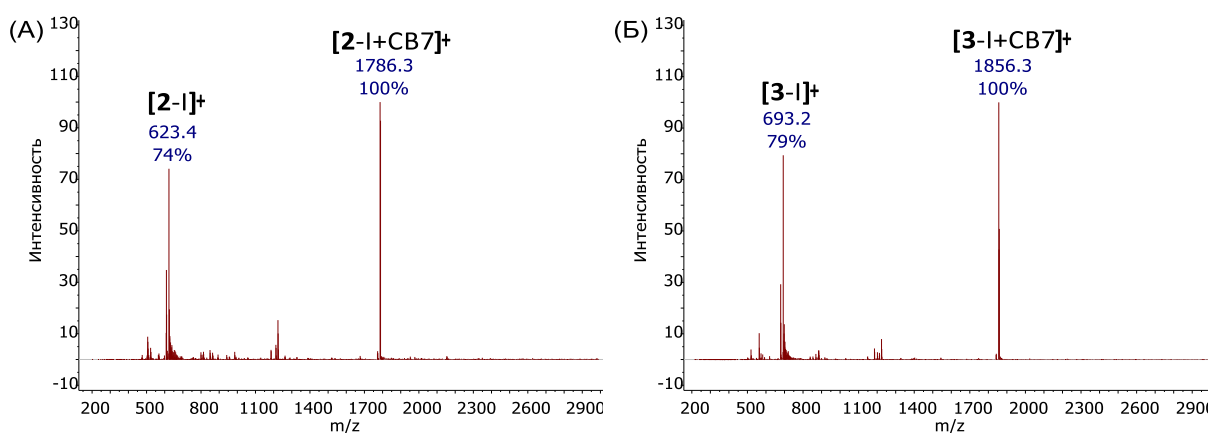


Рисунок 33 – Масс-спектры МАЛДИ 2-CB[7] и 3-CB[7] ($C_{2/3} = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{CB[7]} = 1 \cdot 10^{-4}$ М, H_2O).

На следующем этапе проводились два титровочных эксперимента, чтобы проверить, могут ли конъюгаты, молекулы ДНК и кукурбит[7]урилы образовывать тройные супрамолекулярные ансамбли в растворе. Такая способность бифункциональных конъюгатов образовывать тройные системы может приводить к совершенно новым биологическим свойствам [212]. В первом случае к комплексу лиганд-ДНК постепенно добавляли раствор CB[7] и контролировали изменение спектров поглощения и флуоресценции. Во втором случае исходной точкой была система лиганд-CB[7].

При добавлении СВ[7] к комплексам 2-ДНК или 3-ДНК ($C_{2/3} = 7 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М, содержание комплекса 2-ДНК – 42%, 3-ДНК – 60%), наблюдалось уменьшение оптической плотности с небольшим bathochromным сдвигом полосы ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = 10$ нм) с последующим увеличением поглощения (Рис. П22, А, В). При этом интенсивность флуоресценции сначала снижается и достигает минимума в диапазоне от 11 до 30 экв. СВ[7] для 2 и от 6 до 18 экв. СВ[7] для 3 (Рис. 34, А, В). Затем тенденция изменилась, и интенсивность излучения постепенно увеличилась в 2,5 раза для 2 и в 7 раз для 3 по сравнению с исходной флуоресценцией; спектральные изменения сопровождались гипсохромным сдвигом полосы на 20-24 нм. По изменению спектров поглощения и флуоресценции можно предположить, что система изменяется от комплекса лиганд-ДНК в сторону образования комплекса лиганд-СВ[7]. Эти выводы подтверждаются и тем, что константы устойчивости комплексов конъюгатов с СВ[7] превышают константы с ДНК. Однако при вытеснении лиганда из комплекса конъюгат-ДНК молекулой СВ[7] должно происходить немедленное увеличение интенсивности флуоресценции, так как комплексы 2/3-СВ[7] обладают более интенсивной эмиссией по сравнению с комплексами с ДНК. Таким образом, область, в которой флуоресценция достигает минимума, по-видимому, связана с образованием новой системы – тройного комплекса.

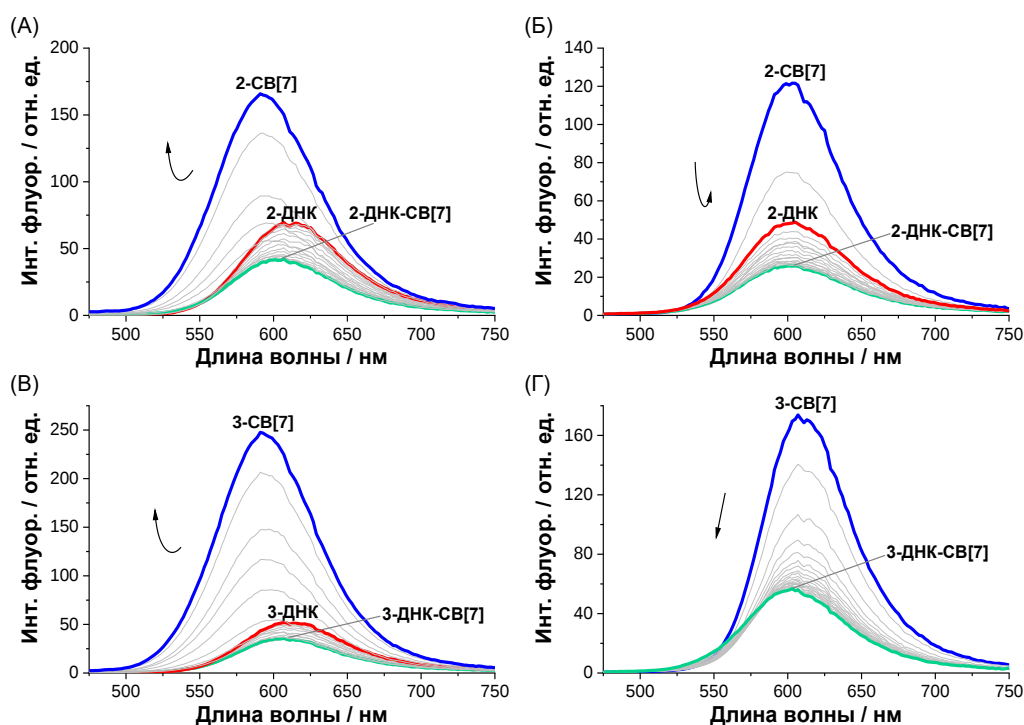


Рисунок 34 – (А, В) Изменение спектров флуоресценции 2/3-ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М) при добавлении СВ[7] от 0 до 92 экв. (Б, Г) Изменение спектров флуоресценции 2/3-СВ[7] ($C_{\text{СВ[7]}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М) при добавлении ДНК от 0 до 116 экв. Во всех случаях: $C_{2/3} = 7 \cdot 10^{-6}$ М, фосфатный буфер (рН 7,0) с 1% CH_3CN , $\lambda_{\text{возб}} = 455$ нм.

При обратном титровании добавление нуклеиновой кислоты к комплексу 2-СВ[7] ($C_2 = 7 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{\text{СВ[7]}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М, содержание комплекса 2-СВ[7] – 87%, 2₂-СВ[7] – 6%) приводило к смещению поглощения в красную область (Рис. П22, Б). При дальнейшем увеличении

концентрации ДНК ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{СВ[7]}} > 1$) наблюдался небольшой сдвиг максимума поглощения в более коротковолновую область. Что касается конъюгата **3** ($C_3 = 7 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{\text{СВ[7]}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М, содержание комплекса **3**-СВ[7] – 92%, **3**₂-СВ[7] – 4%), то в этом случае наблюдается гипсохромный сдвиг полосы поглощения и увеличение оптической плотности при >25 экв. ДНК (Рис. П22, Г). В случае конъюгата **2** интенсивность флуоресценции резко снижалась при добавлении первых аликвот ДНК ($\sim 4,5$ раза при 2-15 экв. ДНК), что указывает на образование тройного комплекса, а затем медленно возрастала без изменения максимума эмиссии (Рис. 34, Б). Полученная полоса флуоресценции по своей интенсивности и максимуму близка к флуоресценции комплекса **2**-ДНК. Однако при добавлении ДНК к **3**-СВ[7] наблюдалось тушение флуоресценции с синим сдвигом ($\lambda_{\text{фл}} = 609$ нм $\rightarrow$ $\lambda_{\text{фл}} = 603$ нм) без последующего увеличения, и полученный спектр не соответствует по своим характеристикам комплексу **3**-ДНК (Рис. 34, Г). Вероятно, более длинная алкильная цепь может облегчить одновременное взаимодействие лиганда как с полостью СВ[7], так и с нуклеиновой кислотой и, следовательно, обеспечить большую стабильность образующегося тройного комплекса.

Что касается структуры образующейся супрамолекулярной триады, то предлагаемая схема комплексообразования представлена на Рис. 35. Вероятнее всего, при добавлении нуклеиновой кислоты к комплексу конъюгат-СВ[7] макроцикл смещается к алкильной цепи, тем самым позволяя стириловому фрагменту взаимодействовать с ДНК. Расчеты РМ7 (МОРАС 2016) показали, что длины алкильной цепи достаточно для локализации СВ[7] не только в конъюгате **3**, но и в **2** с более коротким линкером (Рис. П23).

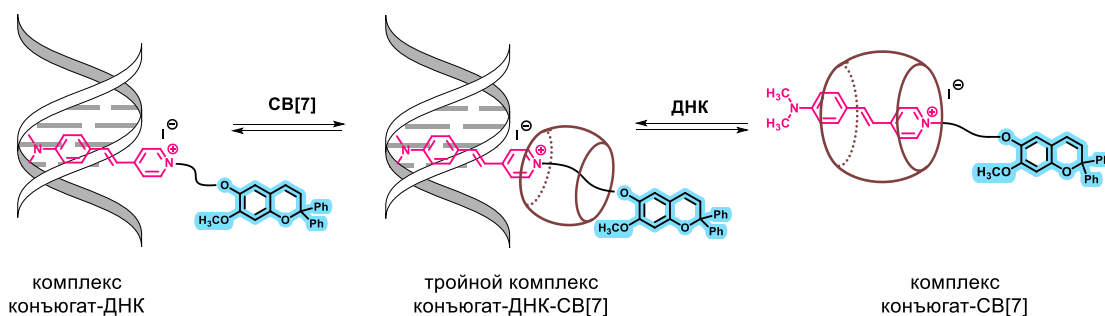


Рисунок 35 – Схематическое представление равновесных процессов, происходящих в растворах бинарных и тройных комплексов.

Таким образом, на примере конъюгатов **2** и **3** была показана возможность осуществления фотохромных превращений хроменов, в том числе в присутствии ДНК. Также в определенном диапазоне концентраций в растворе образуются тройные комплексы между конъюгатами, ДНК и СВ[7]. Изменение концентрации ДНК или СВ[7] позволяет смещать равновесие в сторону образования бинарных либо тройных систем, что демонстрирует возможность осуществления адресной доставки исследуемых лигандов. В то же время более длинная алкильная цепь между стириловым красителем и хроменом в конъюгате **3** обеспечивает большую стабильность образующегося тройного комплекса.

3.6 Изучение фотохимических и фотофизических свойств гетеростильбенов 12-15 и конъюгатов 4-8

3.6.1 Изучение фотохимических и фотофизических свойств гетеростильбенов 12-15

Гетероциклические аналоги стильбена **12-15** в ацетонитриле бесцветны и характеризуются длинноволновой полосой поглощения с максимумами при 327-363 нм (Рис. 36). Наблюдаемая полоса объясняется внутримолекулярным переносом заряда от электронодонорного диметокси-фрагмента к гетероциклической части молекулы, обладающей электроноакцепторными свойствами. Наиболее коротковолное поглощение, как и ожидалось, наблюдается для пиридин-замещенного гетеростильбена **15**, тогда как увеличение сопряженной системы в случае других производных способствует батохромному сдвигу полосы поглощения. Что касается флуоресценции, то для исследуемых соединений характерен Стоксов сдвиг 80-103 нм в ацетонитриле и относительно низкие квантовые выходы флуоресценции (Таблица 5), при этом для соединений **12**, **14** и **15** они существенно снижаются при переходе от ацетонитрила к воде. Производное **13** демонстрирует слабую эмиссию как в ацетонитриле, так и в воде.

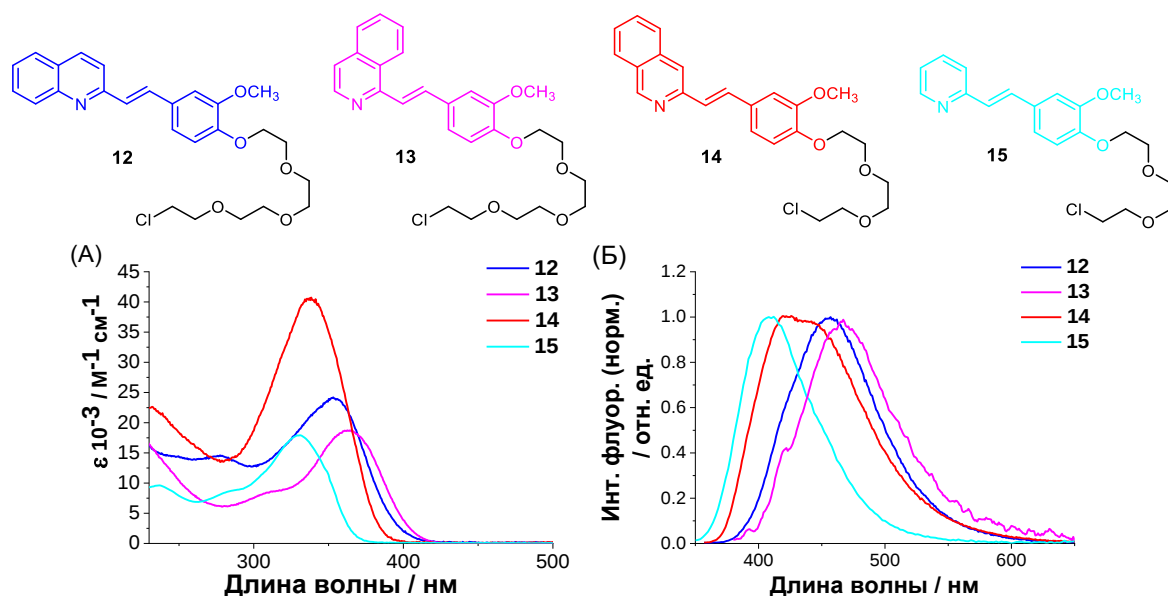


Рисунок 36 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) гетеростильбенов **12-15** в ацетонитриле.

Таблица 5 – Оптические характеристики производных **12-17**, **19**.

Соединение	$\lambda_{\text{погл}}$, нм		α_E/α_Z ^a		$\lambda_{\text{фл}}$, нм		$\phi_{\text{фл}}$, %	
	CH ₃ CN	H ₂ O	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	H ₂ O	CH ₃ CN	H ₂ O
12	353	356	0,13/0,87	60,0/31,2	456	499	9,8 ^б	4,8 ^б
13	363	363	0,11/0,89	55,7/43,7	466	487	0,4 ^б	1,2 ^б
14	336	334	0,28/0,72	35,8/51,6	434	486	10,0 ^б	0,2 ^б
15	330	327	0,30/0,70	57,1/72,9	410	454	1,7 ^б	1,9 ^б
16	440	432	—	—	495	489	23,3 ^г	24,1 ^г
17	410	403	—	—	449	449	41,3 ^б	48,3 ^б
19	390	385	—	—	426	420	39,6 ^б	49,0 ^б

^aСодержание E- и Z- изомеров в ФСС³⁶⁵, полученное с помощью метода Фишера [213].
^бОтносительно кумарина 343 в этаноле.
^вОтносительно бисульфата хинина в 1 н. H₂SO₄.
^гОтносительно кумарина 6 в этаноле.

Для изучения протекания *E,Z*-изомеризации ацетонитрильные растворы производных **12-15** облучали фильтрованным светом ртутной лампы высокого давления, длина волны облучения которого была выбрана исходя из области поглощения гетеростильбенов **12-15** ($\lambda_{\text{обл}} = 313, 365$ или 405 нм). Во всех случаях в спектрах наблюдался гипохромный сдвиг полосы поглощения с небольшим синим сдвигом, что связано с образованием более стерически затрудненного *Z*-изомера (Рис. 37, П24-П27). При этом фотостационарное состояние было достигнуто через 80-350 секунд (при облучении 365 нм). С помощью метода Фишера для всех производных были рассчитаны теоретические спектры поглощения *Z*-изомера (Рис. П28-П31), а также квантовые выходы *E,Z*-изомеризации (Таблица 5). На основании полученных данных основным каналом релаксации возбужденного состояния для исследуемых производных можно считать *E,Z*-изомеризацию, что также коррелирует с низкими квантовыми выходами флуоресценции этих соединений.

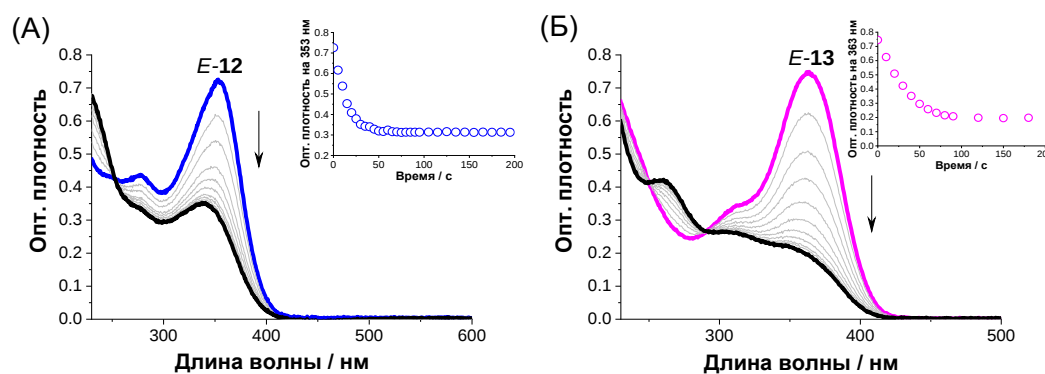


Рисунок 37 – Изменение спектров поглощения соединений **12** (А, $3 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) и **13** (Б, $4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм в течение 3 мин. На вставке показаны изменения оптической плотности во время облучения.

Продолжительное облучение растворов соединений **12-15** нефильтрованным светом ртутной лампы (диапазон длин волн от 297 до 578 нм) приводит к появлению новой полосы поглощения в видимой области спектра с батохромным сдвигом $40\text{-}91$ нм (Рис. 38, П32 и П34). Наблюдаемые изменения указывают на протекание внутримолекулярной электроциклизации с образованием полициклических положительно заряженных фотопродуктов с новой связью C-N (Схема 22). При этом, фотоциклизация быстрее протекает в водном растворе по сравнению с полярным апротонным ацетонитрилом (Рис. 38, П32 и П34). Однако в препаративном масштабе в качестве растворителя было решено использовать ацетонитрил, так как растворимость производных **12-15** в воде недостаточна для обеспечения оптимальных условий фотореакции. К сожалению, в случае 3-замещенного изохинолина **14** фотопродукт **18** не удалось получить с приемлемым выходом, что согласуется с появлением низкоинтенсивной полосы поглощения при облучении нефильтрованным светом (Рис. П33) и вызвано низкой фотостабильностью соединения.

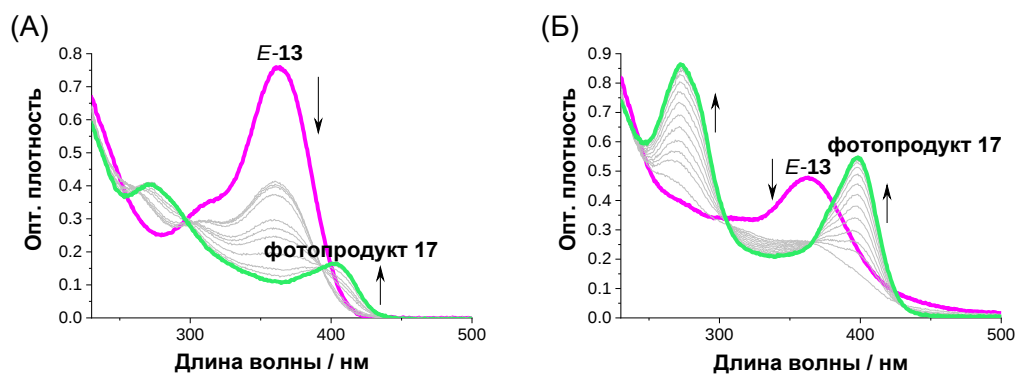
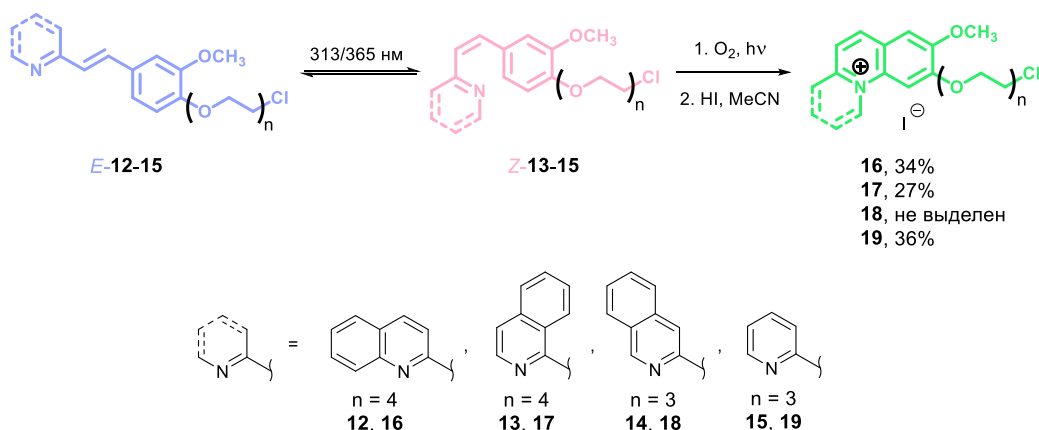


Рисунок 38 – Изменение спектров поглощения соединения **13** при облучении нефилтрованным светом в ацетонитриле (А, 4·10⁻⁵ М, 40 мин) и в воде (Б, 4·10⁻⁵ М, 15 мин).

Схема 22



Для более полного понимания хода фотореакций, а также установления структуры образующихся фотопродуктов, *E,Z*-изомеризация и последующая внутримолекулярная фотоциклизация были изучены методами аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ¹H ЯМР-спектроскопии. Для этого растворы производных **12-15** в ацетонитриле облучали светом λ_{обл} = 365 нм до достижения ФСС, а затем нефилтрованным светом до образования полициклических фотопродуктов. Соотнесение сигналов протонов *Z*-изомеров и производных хинолизиния было сделано с помощью экспериментов ¹H-¹H COSY.

На ВЭЖХ-хроматограммах исходных соединений **12-15** наблюдался один пик, соответствующий *E*-изомеру (Рис. 39, А; ПЗ5, А – ПЗ7, А). При облучении светом λ_{обл} = 365 нм появлялся новый пик, интенсивность которого росла с увеличением продолжительности облучения, что указывает на накопление *Z*-изомера в растворе. В фотостационарном состоянии содержание *Z*-изомеров составило 0,68-0,85, что хорошо коррелирует с данными оптической спектроскопии (Таблица 5). При облучении нефилтрованным светом наблюдалось появление нового пика с большим временем удерживания относительно *E*- и *Z*-изомеров с постепенным снижением концентрации *Z*-изомера, что подтверждает образование полициклической структуры именно из *Z*-формы. Наряду с этим, на ВЭЖХ-хроматограммах соединения **14**, в отличие от соединений **12**, **13** и **15**, наблюдалось не накопление фотопродукта **18**, а разложение

на продукты распада (Рис. ПЗ6), что подтверждает его низкую стабильность при облучении светом.

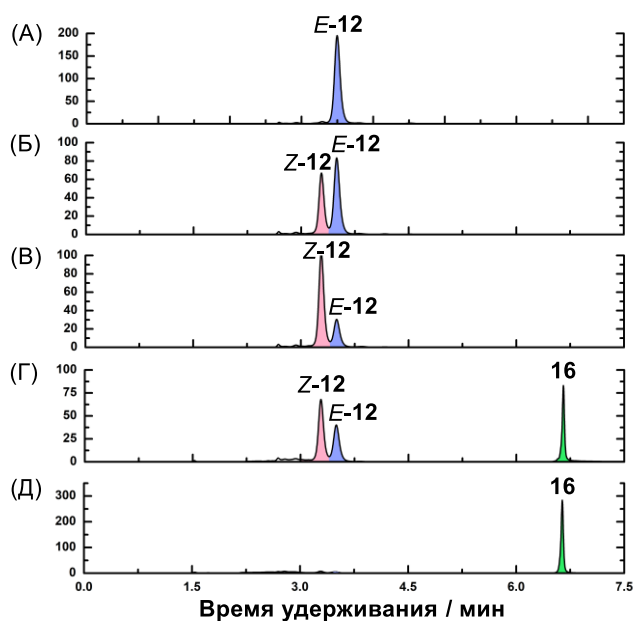


Рисунок 39 – ВЭЖХ-хроматограммы соединения **12**: (А) исходный раствор ($3 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN); (Б) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (12 с); (В) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (60 с); (Г) раствор после облучения нефилтрованным светом (10 мин); (Д) раствор после облучения нефилтрованным светом (40 мин); элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH} = 5:95$.

Спектры ^1H ЯМР соединений **12-15** в CD_3CN , полученные до и после облучения как фильтрованным, так и нефилтрованным светом, представлены на Рис. 40, ПЗ8-П40. Во всех случаях воздействие светом сопровождалось появлением нового набора сигналов. Характерными сигналами *Z*-изомеров являются сигналы протонов при двойной связи с константой спин-спинового взаимодействия около 12,3 Гц; для исследуемых соединений они проявляются в области 6,51-6,98 м.д. Необычно, что в случае производного **Z-14** протонам Н-а и Н-б соответствует сигнал в виде синглета на 6,71 м.д. (Рис. ПЗ9). По-видимому, в этом случае двугранный угол между протонами двойной связи близок к 90 градусам, что в соответствии с уравнением Карплуса должно приводить к минимальному значению КССВ [214]. Также стоит отметить, что при образовании *Z*-изомера, помимо протонов двойной связи Н-а и Н-б, существенному сдвигу в сильное поле подвергаются протоны фенильного кольца ($\Delta\delta = -0,06 \dots -0,95$ м.д.), а химические сдвиги протонов гетероциклической части в большинстве случаев меняются в меньшей степени. Производное **13** практически полностью превратилось в *Z*-изомер по сравнению с производными **12**, **14** и **15**, где содержание *E*-изомера в ФСС было более выраженным, что также коррелирует с его самым низким квантовым выходом флуоресценции среди изучаемых соединений. Это можно объяснить большими различиями в максимумах поглощения *E*- и *Z*-изомеров гетеростильбена **13** (Рис. П29, А), что позволяет *E,Z*-изомеризации происходить более эффективно.

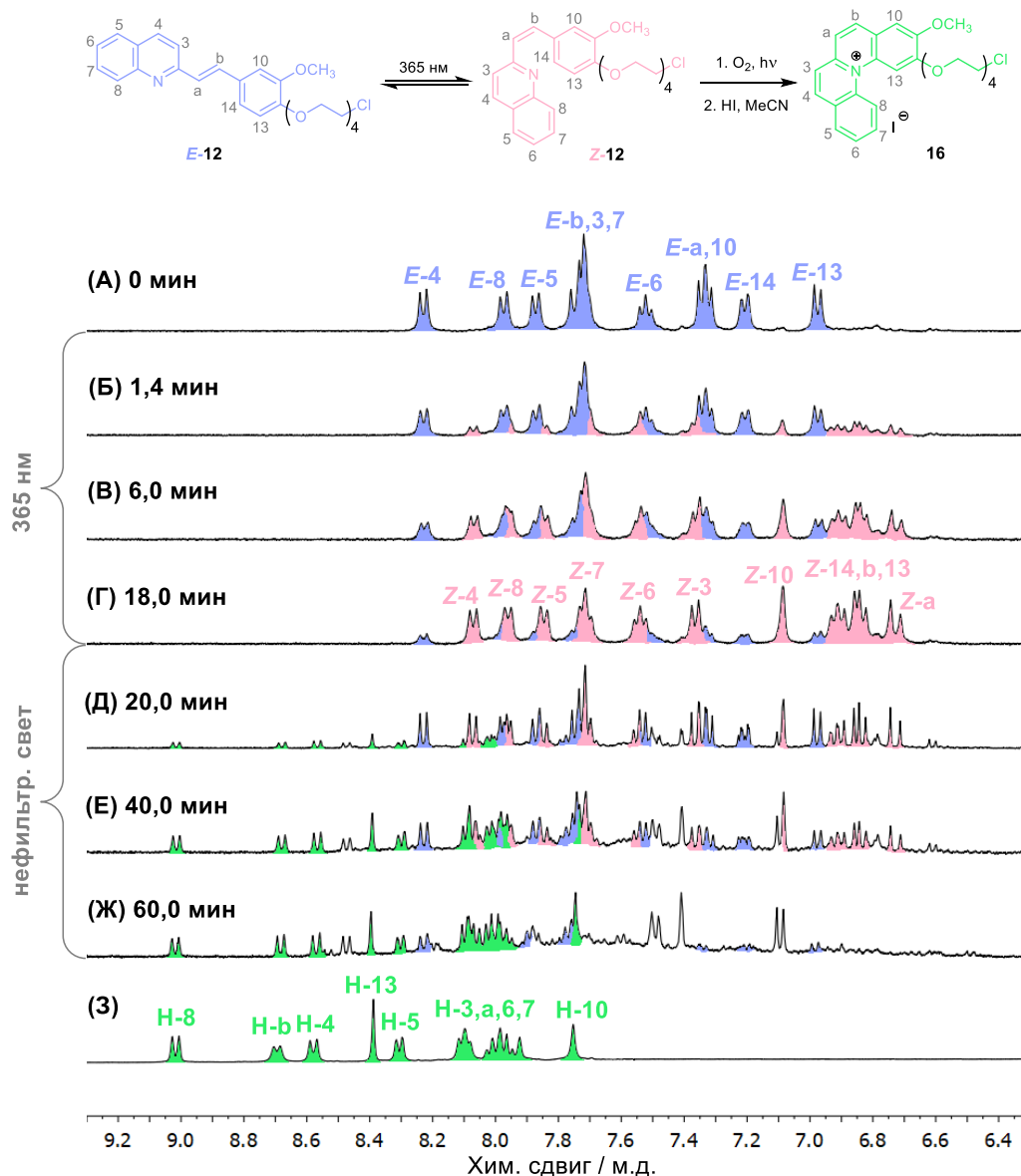


Рисунок 40 – Наблюдение *E,Z*-изомеризации и фотоциклизации соединения **12** ($C = 6 \cdot 10^{-3}$ М, CD₃CN) методом ¹H ЯМР спектроскопии: (Б) – (Г) облучение светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм; (Д) – (Ж) облучение нефилтрованным светом. Общее время облучения показано слева. Нижний спектр (3) зарегистрирован отдельно от выделенного фотопродукта **16**.

Облучение фотостационарной смеси нефилтрованным светом приводило к появлению в спектрах ¹H ЯМР нового набора сигналов в области слабого поля, свидетельствующих об образовании полициклического катиона (Рис. 40, ПЗ8-П40). Кроме того, с первых минут облучения в спектрах также наблюдалось появление сигналов, относящихся к исходному бензальдегиду **40**, что указывает на деградацию гетеростильбенов в процессе фотолиза и объясняет низкие выходы продуктов фотореакции. Образование новой связи C-N происходит со стороны полиэтиленгликолевой цепи, а не со стороны -OCH₃ группы, о чем свидетельствуют сигналы протонов H-13 и H-10 (H-8 и H-11 для производного **15**) в виде двух синглетов, а также исчезновение сигнала, относящегося к протону H-14 (H-12 для производного **15**). В случае производного **14** деградация наблюдалась с первых минут облучения, что сопровождалось

появлением сигналов исходного бензальдегида **46** без появления отчетливых сигналов, относящихся к фотопродукту **18** (Рис. П39). Увеличение продолжительности облучения также не приводило к накоплению целевого производного **18**. По-видимому, фотостабильность гетеростильбена **14** довольно низкая, поэтому его разрушение происходит гораздо быстрее, чем фотоциклизация, из-за чего этот фотопродукт не удалось выделить, как обсуждалось выше.

Таким образом, было показано, что полученные гетеростильбены **12-15** под действием света подвергаются *E,Z*-изомеризации, квантовый выход которой определяет успешность протекания последующей внутримолекулярной фотоциклизации. Для производных **12**, **13** и **15** на основе 2-метилхинолина, 1-метилизохинолина и 2-метилпиридина как в ацетонитриле, так и в водном растворе наблюдается эффективное образование полициклических производных хинолизиния **16**, **17** и **19**. При этом, небольшие структурные различия оказали значительное влияние на фотостабильность соединений. Так, в случае гетеростильбена **14** на основе 3-метилизохинолина фотодеградация под действием света происходит значительно быстрее целевой фотохимической реакции, поэтому выделить фотопродукт на его основе не представляется возможным.

3.6.2 Изучение фотохимических и фотофизических свойств конъюгатов 4-8

Конъюгаты гетеростильбенов со стирильным красителем **4-6** характеризуются двумя полосами поглощения в водном растворе, которые аналогичны максимумам поглощения исходных соединений (Рис. 41, П41 и П42, Таблица 6). Однако полоса внутримолекулярного переноса заряда стирильного красителя **54** в конъюгатах претерпевает небольшой bathochromic shift ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = 16\text{-}25\text{ нм}$), обусловленный изменениями в микроокружении красителя, что также наблюдалось в случае конъюгатов с хроменами **2, 3**.

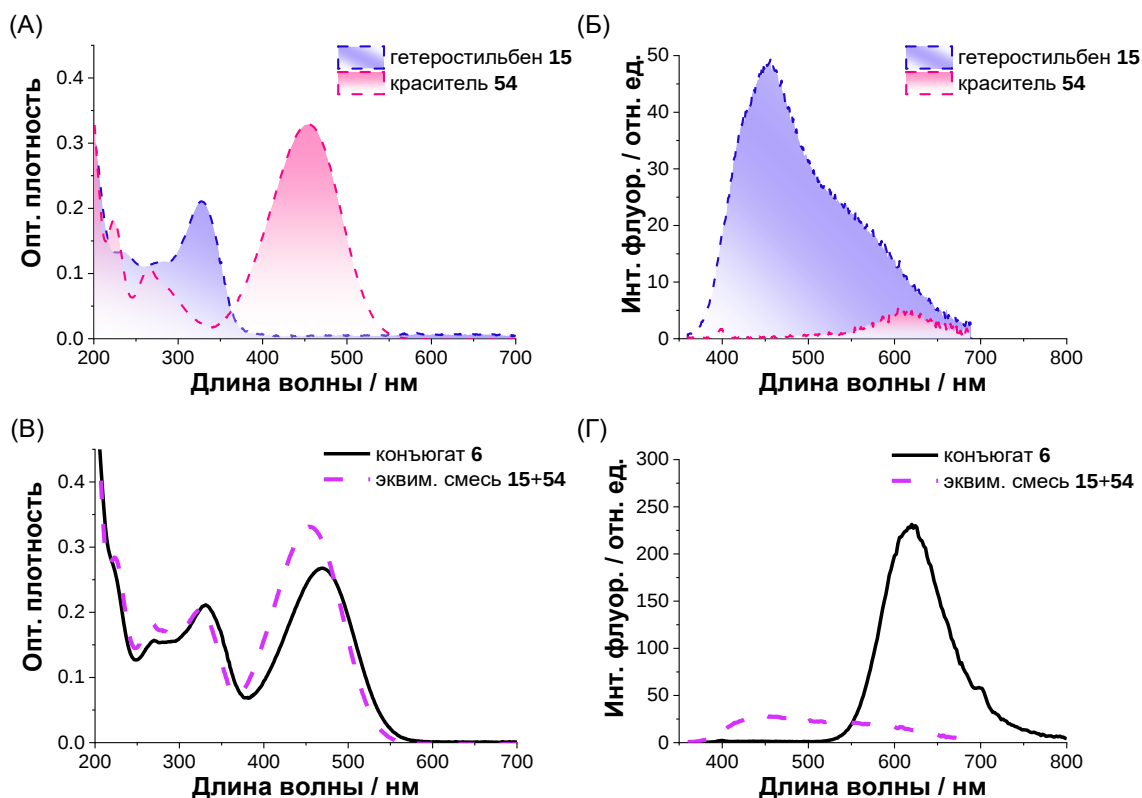
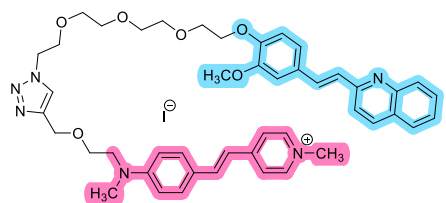
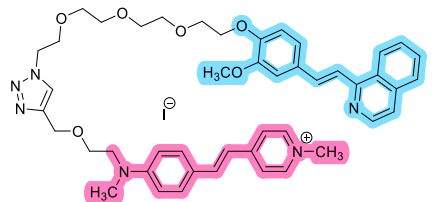
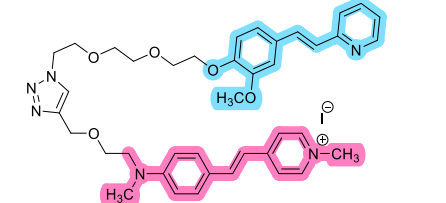


Рисунок 41 – Спектры поглощения (А, В) и флуоресценции (Б, Г) соединений **15, 54, 6** и эквимольной смеси **15+54**. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

При анализе флуоресценции конъюгатов **4-6** было обнаружено, что в спектрах не наблюдаются две отдельные полосы испускания, соответствующие отдельным хромофорам (Рис. 41, Г; П41, Г и П42, Г). Спектр флуоресценции в этом случае характеризуется только одной полосой, соответствующей максимуму стирильного красителя **54**, и, более того, его интенсивность значительно выше, чем в эквимольной смеси соответствующего гетеростильбена и красителя. Анализ интеграла перекрывания $J(\lambda)$ спектров флуоресценции гетеростильбенов, как доноров энергии, и спектра поглощения стирильного красителя **54**, как акцептора энергии (Рис. 42, П43 и П44), а также расстояния между хромофорами в конъюгатах показал, что в этих системах может эффективно происходить резонансный перенос энергии (RET).

Таблица 6 – Оптические характеристики конъюгатов **4-6** и стирилового красителя **54** в воде.

Соединение	$\lambda_{\text{полг}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$\Phi_{\text{фл}}$, %
	364, 479	626	7,2 ^a
	372, 473	621	3,6 ^a
	330, 469	618	3,8 ^b
	454	613	0,5 ^a
^a Относительно кумарина 6 в этаноле.			
^b Относительно бисульфата хинина в 1 н. H ₂ SO ₄ .			

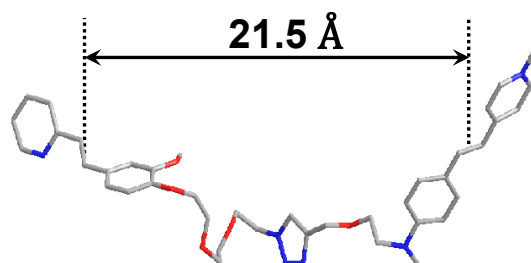
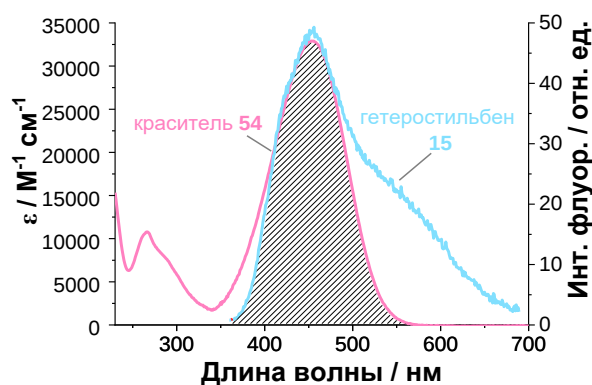


Рисунок 42 – Перекрывание спектра поглощения красителя **54** и спектра флуоресценции гетеростильбена **15** и оптимизированная структура конъюгата **6** (PM7, МОРАС). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0).

Эффективность резонансного переноса энергии Φ_{RET} в конъюгатах **4-6** была рассчитана с использованием уравнения (4):

$$\Phi_{\text{RET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (4)$$

где r – расстояние между донором энергии и акцептором энергии, R_0 – критический радиус Фёрстера, при котором 50% возбужденных доноров деактивируются по пути RET (т.е. $\Phi_{\text{RET}} = 0,5$).

R_0 был рассчитан по уравнению (5):

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-5} \cdot [k^2 \cdot n^{-4} \cdot \varphi_{D,0}^{fl} \cdot J(\lambda)], \quad (5)$$

где k^2 – фактор ориентации, зависящий от взаимного расположения дипольных моментов донора и акцептора (в случае гибкого линкера между хромофорами, обеспечивающего случайную ориентацию доноров и акцепторов за счет вращательной диффузии, его можно принять равным 0,6667); $\varphi_{D,0}^{fl}$ – квантовый выход флуоресценции донора энергии в отсутствие акцептора энергии, n – показатель преломления растворителя, $J(\lambda)$ – интеграл, определяющий степень перекрытия между спектром флуоресценции донора ($F_D(\lambda)$) и спектром поглощения акцептора ($\varepsilon_A(\lambda)$).

Значение $J(\lambda)$ было рассчитано с использованием уравнения (6):

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}, \quad (6)$$

Таким образом, теоретическая эффективность переноса энергии в парах гетеростильбен-стириловый краситель составила 64-89% (Таблица 7). На основании этого можно предположить, что *E,Z*-изомеризация и последующая фотоциклизация в конъюгатах **4-6** будет затруднена.

Таблица 7 – Характеристики RET-пар в воде.

RET пара	$\varphi_{D,0}^{fl}$	$J(\lambda)$	$R_0^6, \text{\AA}$	$r, \text{\AA}$	Φ_{RET}
12-54	0,048	$7,018 \cdot 10^{14}$	$6,247 \cdot 10^8$	20,6	0,89
13-54	0,012	$8,010 \cdot 10^{14}$	$1,782 \cdot 10^8$	21,6	0,64
15-54	0,019	$8,153 \cdot 10^{14}$	$2,873 \cdot 10^8$	21,5	0,74

Действительно, непрерывное облучение раствора конъюгатов фильтрованным светом не приводит к существенным изменениям в спектрах поглощения (Рис. 43, П45), как это было в случае соответствующих гетеростильбенов, что указывает на практически полное отсутствие *E,Z*-изомеризации в этих системах. Перенос энергии как конкурентный процесс подавляет протекание фотохимических реакций в конъюгатах **4-6**, в связи с чем получить конъюгаты с производными хинолизиния напрямую из **4-6**, к сожалению, невозможно.

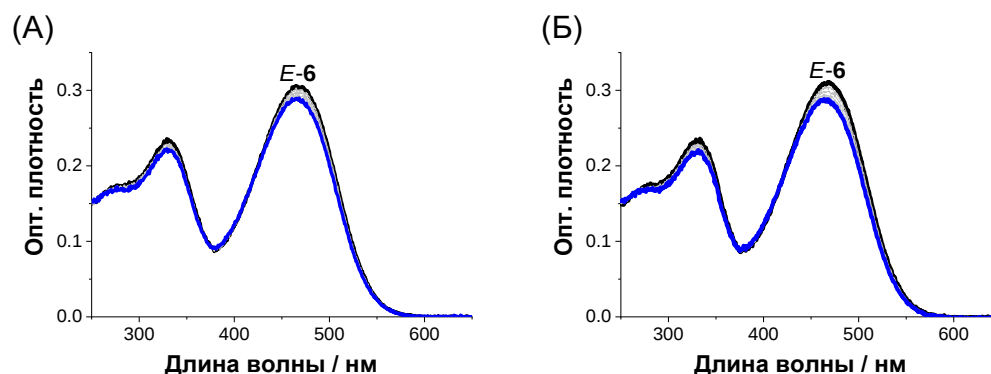


Рисунок 43 – Спектры поглощения конъюгата **6** ($1 \cdot 10^{-5}$ М, H_2O) во время облучения светом 313 нм (А) и 365 нм (Б) в течение 10 минут.

Что касается конъюгатов с производными хинолизиния **7** и **8**, то они также характеризуются двумя полосами поглощения в водном растворе, которые аналогичны максимумам поглощения индивидуальных компонентов (Рис. 44, П46). При анализе спектров флуоресценции, как и ожидалось, наблюдаются две отдельные полосы испускания с максимумами, соответствующими отдельным хромофорам. Однако квантовый выход флуоресценции конъюгатов **7** и **8** (Таблица 8) оказался в несколько раз ниже, чем у исходных производных хинолизиния **17** и **19** (Таблица 5).

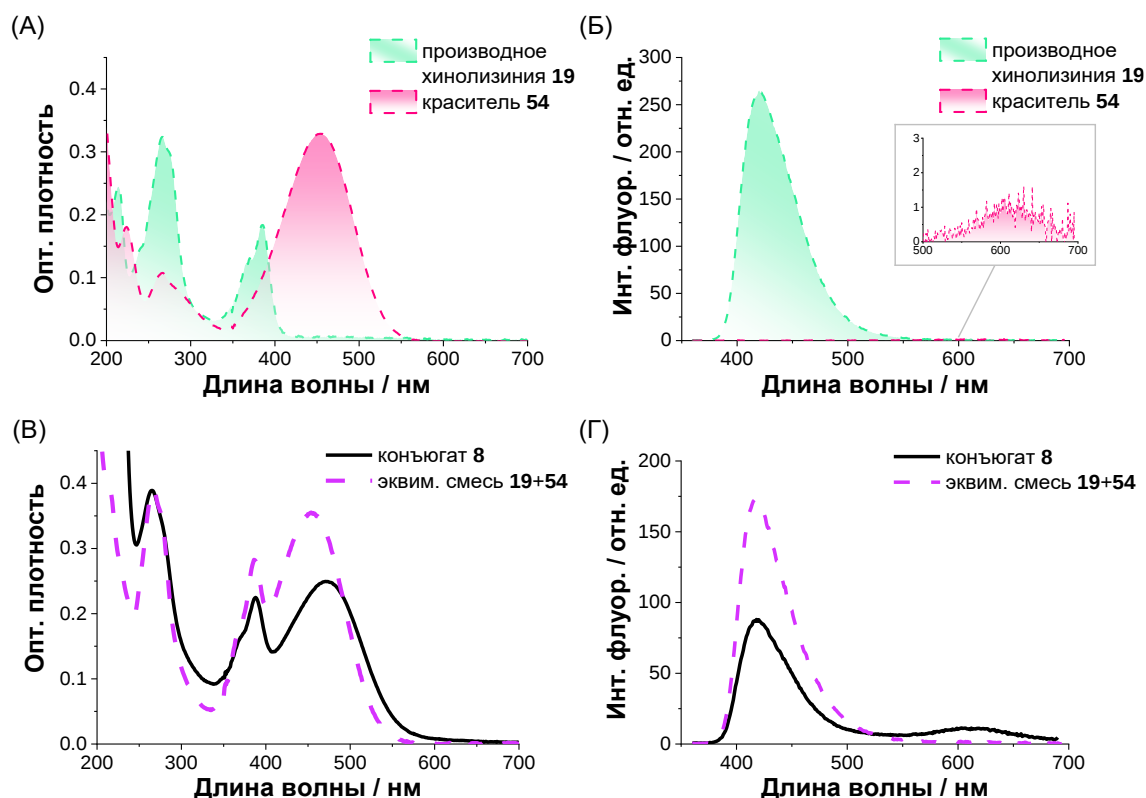


Рисунок 44 – Спектры поглощения (А, В) и флуоресценции (Б, Г) производных **19**, **54**, **8** и эквимольной смеси **19+54**. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

Таблица 8 – Оптические характеристики конъюгатов **7**, **8** в воде.

Соединение	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$\Phi_{\text{фл}}$, %
7 	405, 476	445, 611	4,2 ^a
8 	388, 470	421, 615	3,5 ^a

^aОтносительно кумарина 343 в этаноле.

Оказалось, что в этом случае также возможно эффективное протекание резонансного переноса энергии благодаря перекрыванию спектров флуоресценции производных хинолизиния и спектра поглощения стирилового красителя (Рис. 45, П47, Таблица 9). Перенос энергии как конкурирующий процесс приводит к частичному снижению интенсивности излучения производного хинолизиния в конъюгатах **7** и **8** и снижению его квантового выхода флуоресценции.

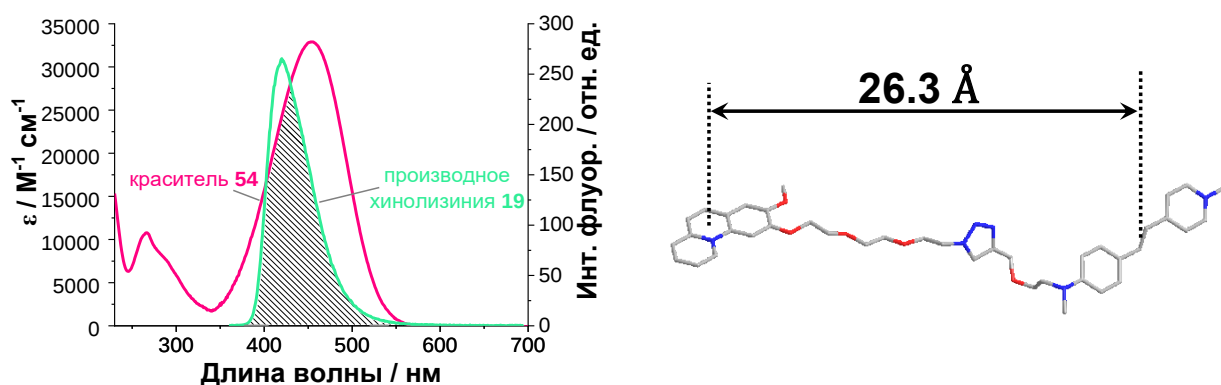


Рисунок 45 – Перекрывание спектра поглощения красителя **54** и спектра флуоресценции производного хинолизиния **19** и оптимизированная структура конъюгата **8** (PM7, МОРАС). Все спектры в фосфатном буфере (pH 7,0).

Таблица 9 – Характеристики RET-пар в воде.

RET пара	$\varphi_{D,0}^{fl}$	$J(\lambda)$	$R_0^6, \text{\AA}$	$r, \text{\AA}$	Φ_{RET}
17-54	0,48	$1,145 \cdot 10^{15}$	$1,019 \cdot 10^{10}$	25,4	0,97
19-54	0,49	$9,539 \cdot 10^{14}$	$8,667 \cdot 10^9$	26,3	0,96

3.7 Изучение комплексообразования производных 12-17, 19 и их конъюгатов с ДНК

3.7.1 Изучение комплексообразования производных 12-17, 19 с ДНК оптическими методами

На следующем этапе гетеростильбены **12-15** и их фотопродукты **16, 17** и **19** были изучены в отношении их ДНК-связывающих свойств с целью выявления различий в их сродстве к связыванию и проверки возможности управления этим взаимодействием с помощью света. При постепенном добавлении ДНК к растворам соединений **12-15** во всех случаях в спектрах поглощения наблюдалось снижение оптической плотности длинноволновой полосы (Рис. 46, П48-П50). Добавление большего избытка ДНК приводило к более существенным изменениям для производных **12** и **13**: в спектрах происходило появление новых полос поглощения и флуоресценции, смещенных батохромно относительно первоначального состояния, при этом их интенсивность увеличивалась с ростом концентрации ДНК (Рис. 46, П48, Таблица 10). Наблюдаемые изменения могут указывать на образование агрегатов при добавлении ДНК к растворам гетеростильбенов. Что касается производного **14**, то характер изменений в этом случае отличается от поведения **12** и **13**, так как в его спектрах флуоресценции полоса испускания сместилась в синюю область при добавлении ДНК (Рис. П49). В случае стирилпиридина **15** изменения в спектрах в целом были значительно менее выражены по сравнению с производными **12** и **13** (Рис. П50), что свидетельствует о влиянии гетероциклического фрагмента на агрегацию в теле ДНК.

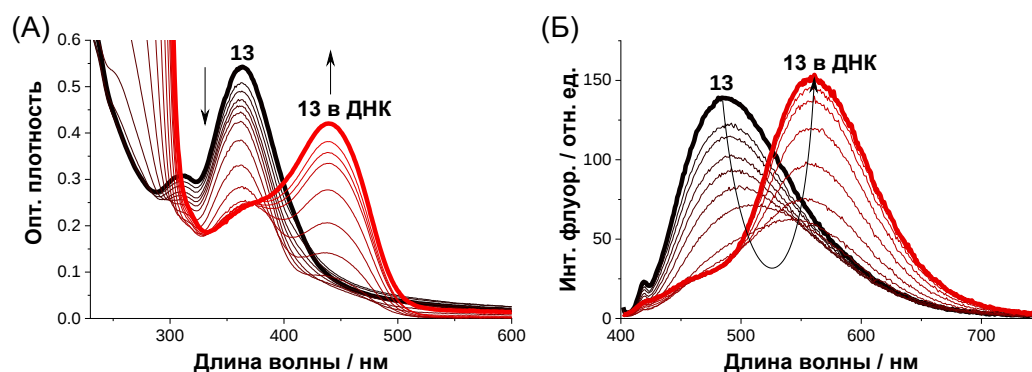
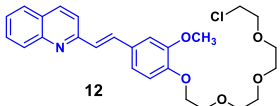
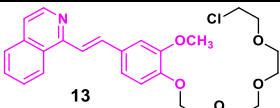
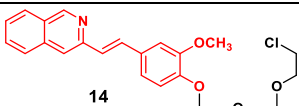
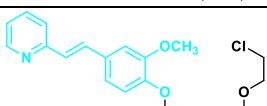


Рисунок 46 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **13** ($4 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК-тТ ($0 - 1,5 \cdot 10^{-3}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN , $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

Согласно литературным данным [215] существуют примеры похожих стирилхинолиновых флуорофоров, используемых для мониторинга вязкости. В связи с этим именно увеличение вязкости раствора при титровании ДНК могло вызвать такие изменения оптических характеристик лигандов. Поэтому далее была изучена чувствительность соединений **12** и **13** к вязкости в водных растворах с различным содержанием глицерина от 0 до 85% (Рис. 47, П51). Так, с увеличением вязкости в спектрах поглощения в обоих случаях наблюдался небольшой батохромный сдвиг в диапазоне 3-6 нм. Интенсивность флуоресценции при этом

увеличилась в 2-4 раза с одновременным гипсохромным сдвигом полосы на 4-17 нм. Как можно заметить, в этих экспериментах не наблюдается появления характерных полос поглощения и флуоресценции, что исключает влияние вязкости при титровании ДНК и указывает на образование ДНК-индуцированных агрегатов в случае исследуемых производных **12** и **13**.

Таблица 10 – Оптические характеристики свободных лигандов **12-15** и лигандов в присутствии ДНК-тт.

Лиганд (L)	$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$		$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$		$\Phi_{\text{фл}}, \%$	
	L	L в ДНК	L	L в ДНК	L	L в ДНК
 12	356	356, 427	499	547	4,8 ^a	5,7 ^b
 13	363	440	487	560	1,2 ^a	3,3 ^b
 14	334	336	461	427	0,2 ^a	0,8 ^a
 15	327	327	454	461	1,9 ^b	1,1 ^b
^a Относительно кумарина 343 в этаноле. ^b Относительно кумарина 6 в этаноле. ^c Относительно бисульфата хинина в 1 н. H ₂ SO ₄ .						

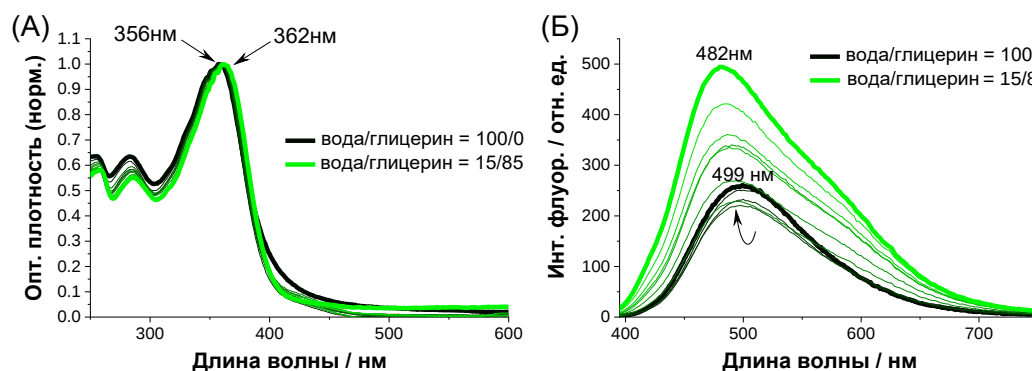


Рисунок 47 – Изменения в спектрах поглощения и флуоресценции соединения **12** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при различной вязкости в системе вода/глицерин (100-0 → 15-85), $\lambda_{\text{возб}} = 382$ нм.

Для подтверждения селективности агрегации в ДНК были также изучены оптические свойства производных **12**, **13** в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Рис. 48, П52). С увеличением концентрации БСА в растворе наблюдался небольшой гиперхромный сдвиг полосы поглощения без изменения максимумов. При этом в спектрах флуоресценции добавление БСА вызывало гипсохромный сдвиг на 14-28 нм с незначительным увеличением интенсивности. Полученные результаты подтверждают селективность агрегации соединений **12** и **13** именно в присутствии ДНК. Стоит отметить, что образование агрегатов незаряженных гетероциклических аналогов стильбена в теле ДНК наблюдалось впервые. Отсутствие сигналов ИКД в спектрах

кругового дихроизма гетеростильбенов **12** и **13** с ДНК (Рис. П53) свидетельствует об агрегации вдоль нуклеотидной последовательности без проникновения лигандов в ДНК (Рис. 49).

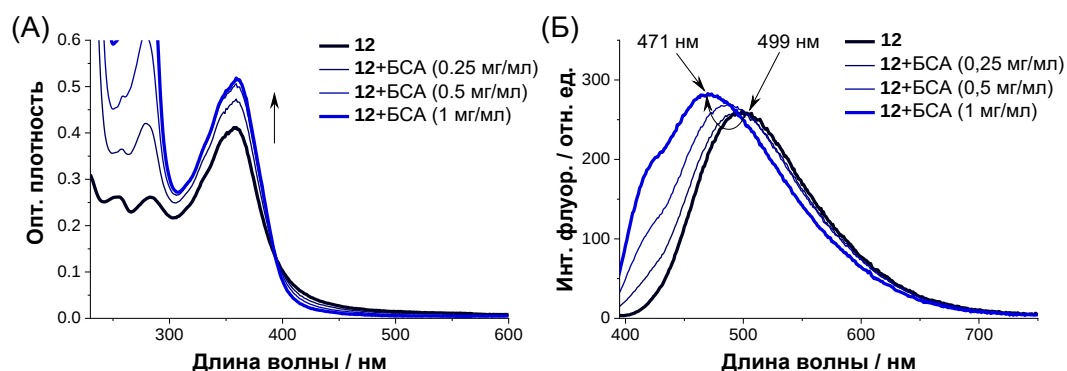


Рисунок 48 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **12** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при различной концентрации БСА (0/0,25/0,5/1 мг/мл). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 382$ нм.

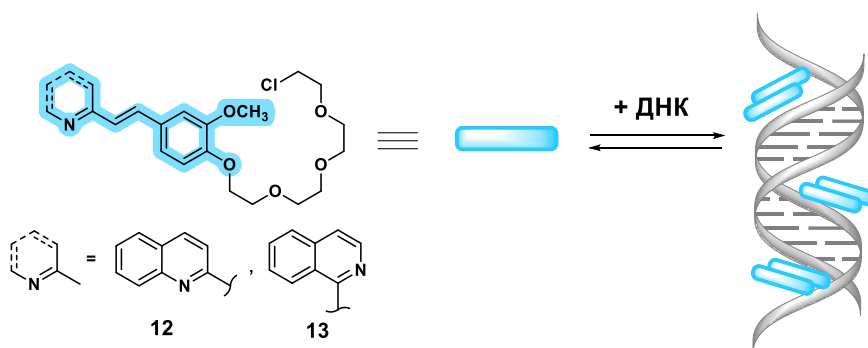


Рисунок 49 – Схематическое представление ДНК-индуцированной агрегации гетеростильбенов **12** и **13**.

Что касается производных хинолизиния **16**, **17** и **19**, то при постепенном добавлении ДНК к их растворам во всех случаях в спектрах поглощения наблюдался гипохромный сдвиг полосы поглощения с последующим батохромным сдвигом и увеличением оптической плотности по сравнению со свободными лигандами (Рис. 50, П54 и П55). Кроме того, увеличение концентрации ДНК приводило к значительному тушению интенсивности флуоресценции в 20-72 раза, что на основании литературных данных может объясняться фотоиндуцированным переносом электронов между парами оснований ДНК и производными хинолизиния [216].

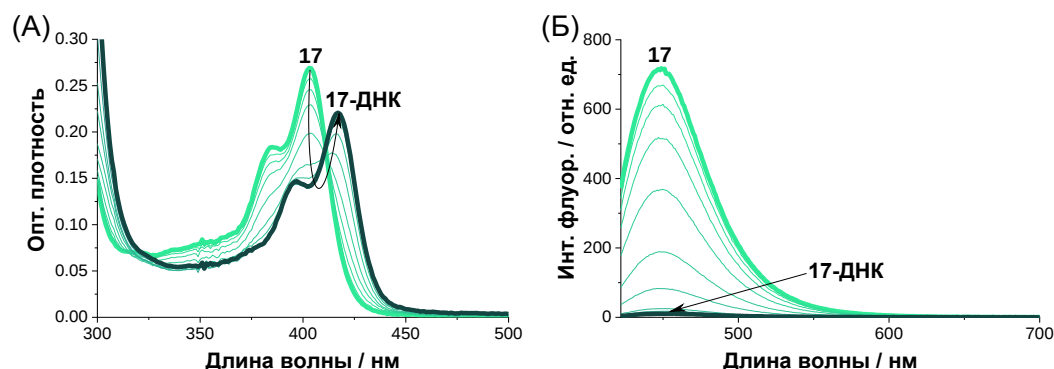
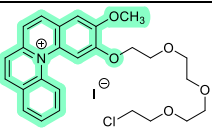
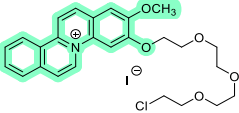
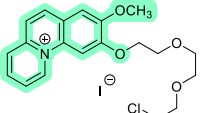


Рисунок 50 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **17** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК-тт (0 – $7,6 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 411$ нм.

На основании данных спектрофотометрического титрования были рассчитаны константы связывания комплексов состава 1:1 (Таблица 11, Рис. П56-П58). Такие полициклические положительно заряженные лиганды обычно демонстрируют интеркаляционный способ связывания с ДНК [217], так как имеют подходящий размер и плоскую сопряженную структуру для встраивания между парами оснований ДНК. Также известно, что типичная константа устойчивости комплекса для интеркаляторов колеблется от 10^3 до 10^6 [218]. Для подтверждения предложенного способа связывания далее был применен поляриметрический метод.

Таблица 11 – Оптические характеристики свободных лигандов **16**, **17** и **19** и лигандов в присутствии ДНК-т.

Лиганд (L)	$\lambda_{\text{погл}}$, нм		$\lambda_{\text{фл}}$, нм		$\frac{I_{\text{макс}}}{I_0}$	$\Phi_{\text{фл}}$, %		lg K ^a
	L	L-ДНК	L	L-ДНК		L	L-ДНК	
16 	432	446	489	494	20	24,1 ^b	2,3 ^b	$4,36 \pm 0,04$ (1:1)
17 	403	417	449	451	72	48,3 ^b	1,1 ^b	$5,16 \pm 0,06$ (1:1)
19 	385	398	420	423	20	49,0 ^b	1,8 ^b	$4,01 \pm 0,07$ (1:1)

^aРассчитаны с использованием программы SpecFit/32.
^bОтносительно кумарина 6 в этаноле.
^вОтносительно кумарина 343 в этаноле.

Производные хинолизиния **16**, **17** и **19** ахиральны, поэтому в их спектрах сигналов КД не наблюдается (Рис. 51). Добавление различных аликвот производного **19** на основе пиридина к ДНК вызывало сильные изменения в ее сигнале КД, а именно, увеличение интенсивности положительного пика при одновременном уменьшении отрицательной полосы (Рис. 51, А). Наблюдаемые изменения указывают на увеличение стэкинга между парами оснований и частичное искажение спиральной структуры ДНК с увеличением концентрации **19**, что наиболее характерно для интеркаляторов. Полученные данные хорошо согласуются с предыдущими исследованиями и типичны для этого класса соединений [94, 219].

Также стоит отметить, что для производного **19** в спектрах отсутствуют сигналы индуцированного КД, что может быть вызвано его слабой чувствительностью к хиральной среде ДНК. Увеличение сопряженной системы при переходе к лигандам на основе хинолина приводит к тому, что при различных мольных соотношениях **16**/ДНК в спектрах появляется слабый отрицательный сигнал ИКД в области 446 нм, что соответствует максимуму поглощения комплекса **16**-ДНК (Рис. 51, Б). Изменения в сигнале ДНК были аналогичны комплексу **19**-ДНК, что также указывает на интеркаляцию исследуемого производного.

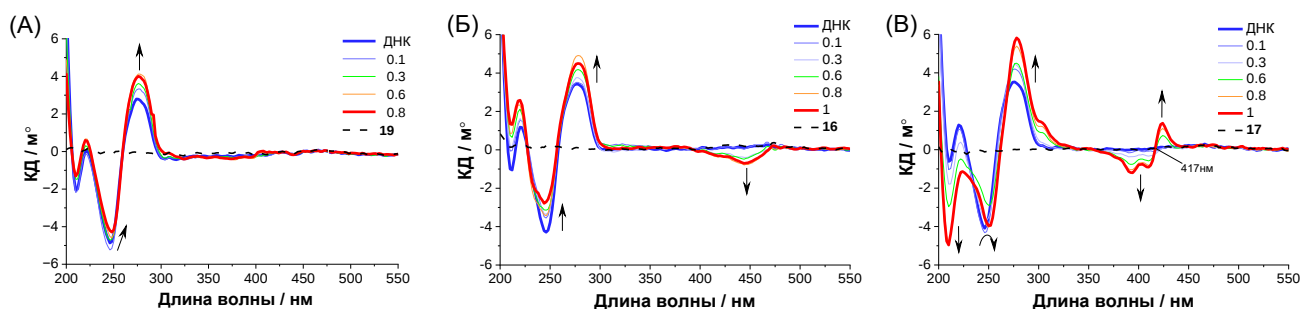


Рисунок 51 – Спектры кругового дихроизма ДНК-тт ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М) в отсутствие и в присутствии соединений **19** (А), **16** (Б) и **17** (В) при различном соотношении лиганд-ДНК: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 и 1. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0). Пунктирной линией показан спектр КД соединений в отсутствие ДНК-тт ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М).

Аналогично, с увеличением концентрации соединения **17** в спектрах КД наблюдалось появление слабого отрицательного сигнала в области поглощения лиганда. Однако при высоких концентрациях лиганда ($C_{17}/C_{\text{ДНК}} > 0,6$) появлялся экситонный сигнал ИКД с изоэллиптической точкой на 417 нм, смещенной в красную область относительно максимума поглощения **17** ($\Delta\lambda = 14$ нм) (Рис. 51, В). Вероятно, с увеличением концентрации **17** молекулы начинают располагаться не только между парами оснований, но и в малой бороздке ДНК, благодаря чему становится возможной агрегация в структуре ДНК [220]. В то же время большие изменения происходят и в сигнале самой ДНК. Добавление **17** вызывало постепенное увеличение отрицательности полос при 210 и 245 нм, а также увеличение интенсивности положительной полосы при 275 нм. Изменения, происходящие в спектрах КД, указывают на модификацию вторичной структуры ДНК, а именно на постепенный переход от В- к А-форме [221, 222]. На основании всех полученных результатов можно сказать, что исследуемые производные **16**, **17** и **19** взаимодействуют с нуклеиновой кислотой преимущественно путем интеркаляции (Рис. 52). При этом, добавление аннелированного ароматического кольца приводит к более выраженным изменениям в структуре ДНК при комплексообразовании, а увеличение концентрации для лиганда **17** приводит к смешанному типу взаимодействия.

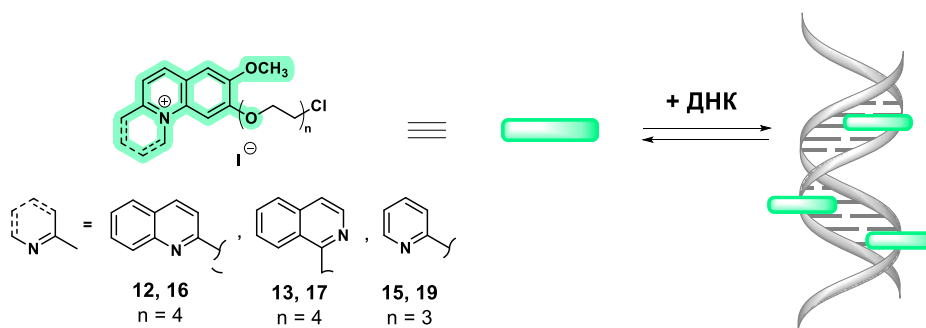


Рисунок 52 – Схематическое представление комплексов производных хинолизиния **16**, **17** и **19** с ДНК.

На следующем этапе были проведены эксперименты по изучению возможности образования фотопродуктов непосредственно в присутствии ДНК, что позволит использовать

эти соединения в качестве потенциальных фотоуправляемых лигандов для ДНК. Для этого растворы гетеростильбенов **12**, **13** и **15** в ДНК облучали нефилтрованным светом до достижения максимальной конверсии, а ход реакции контролировали с помощью оптических методов (Рис. 53, П59 и П60). Так, постепенное облучение растворов приводило к образованию новой полосы поглощения, максимум которой соответствует комплексам производных хинолизиния с ДНК, а интенсивность флуоресценции уменьшалась с одновременным сдвигом в синюю область. Для производных **12** и **13** в спектрах КД также наблюдалось образование характерных отрицательных сигналов ИКД, соответствующих комплексам **16**-ДНК и **17**-ДНК. Все эти изменения указывают на генерацию фотопродуктов *in situ* и образование комплексов с ДНК при облучении. Стоит отметить, что фотодеградация ДНК начинается через 30 минут после начала облучения нефилтрованным светом, что было показано с помощью спектроскопии КД (Рис. П61). Следовательно, изменения, происходящие в сигнале нуклеиновой кислоты при более коротких временах воздействия, связаны только с образованием фотопродуктов.

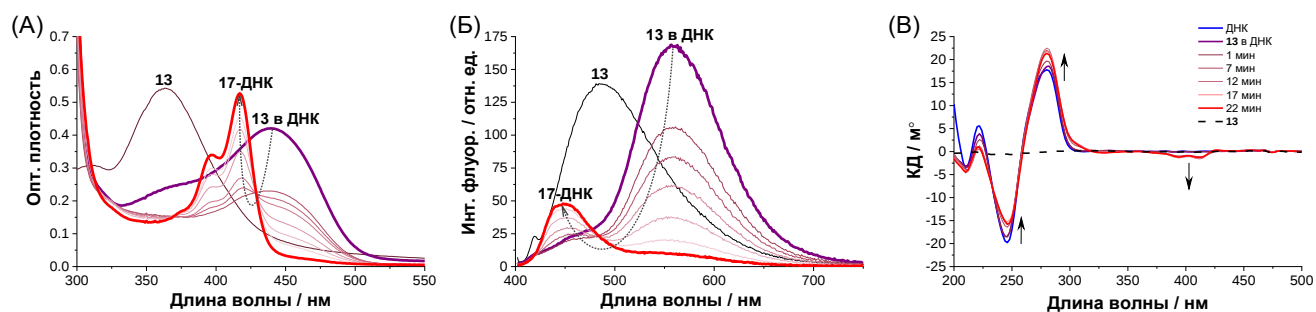


Рисунок 53 – Изменения в спектрах поглощения (А), флуоресценции (Б, $C_{13} = 4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М) и КД (В, $C_{13} = 2,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) раствора **13**-ДНК-тт при облучении нефилтрованным светом в течение 0-22 мин. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

Таким образом, из проведенных исследований видно, что полученные гетеростильбены **12-15** не обладают специфическим сродством к связыванию с молекулой ДНК. Добавление биомолекулы к их растворам в некоторых случаях может вызывать лишь внешнюю ДНК-индуцированную агрегацию вдоль фосфатного остова. При этом, их фотопродукты **16**, **17** и **19**, которые в том числе могут быть получены *in situ* (Рис. 54), эффективно интеркалируют между парами оснований, приводя к нарушениям вторичной структуры нуклеиновой кислоты, что делает их перспективными кандидатами для фотоуправления взаимодействием лиганд-ДНК.

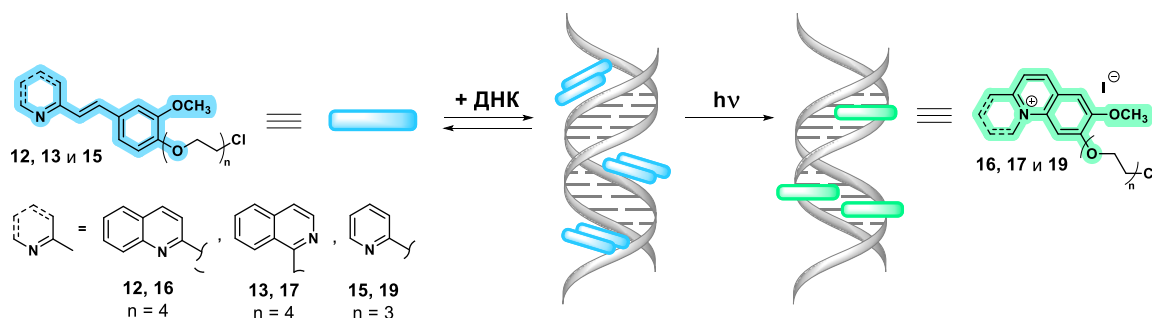


Рисунок 54 – Схематическое представление образования комплексов с ДНК *in situ*.

3.7.2 Изучение комплексообразования конъюгатов 4-8 с ДНК оптическими методами

На следующем этапе были проведены эксперименты по изучению комплексообразования конъюгатов гетеростильбенов **4-6** и производных хинолизиния **7, 8** с ДНК в сравнении с исходными моно-хромоформными соединениями с целью проверки сохранения их ДНК-связывающих свойств при переходе к более сложным бис-хромоформным системам.

При постепенном добавлении ДНК к раствору конъюгата **6** полоса поглощения на 470 нм, относящаяся к стириловому красителю, демонстрирует батохромный сдвиг (Рис. 55, А), аналогично изменениям моно-хромофора **54** при добавлении ДНК (Рис. П62). В свою очередь, полоса поглощения гетеростильбена на 330 нм оставалась практически неизменной, что свидетельствует об отсутствии каких-либо сильных взаимодействий этой части конъюгата **6** с нуклеиновой кислотой. Кроме того, перенос энергии с гетеростильбена на краситель в комплексе с ДНК сохраняется, и при возбуждении на 350 нм наблюдалось постепенное увеличение интенсивности флуоресценции в области 610 нм (Рис. 55, Б).

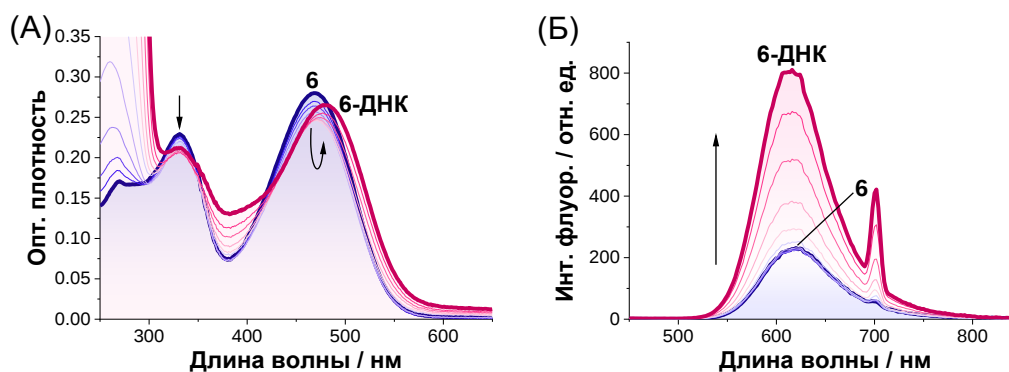


Рисунок 55 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **6** ($1 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК-тт ($0 - 6,3 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

Что касается конъюгатов **4** и **5** на основе хинолина и изохинолина, то в этом случае агрегация, характерная для исходных гетеростильбенов, сохранялась и в случае бис-хромоформных систем. Так, при добавлении ДНК к раствору конъюгата **4** наряду с изменениями полосы поглощения на 470 нм происходит снижение полосы гетеростильбена на 363 нм с последующим появлением нового сигнала в области 440 нм (Рис. 56). При этом в спектрах флуоресценции наблюдается постепенное увеличение интенсивности испускания, что также говорит об образовании комплекса **4**-ДНК. Изменения в спектрах поглощения и флуоресценции конъюгата **5** при добавлении ДНК были аналогичны (Рис. П63). Полная корреляция полученных данных с результатами экспериментов, проведенных с отдельными соединениями **12, 13, 15** и **54**, свидетельствует о сохранении свойств индивидуальных компонентов в бис-хромоформных системах (Рис. 57).

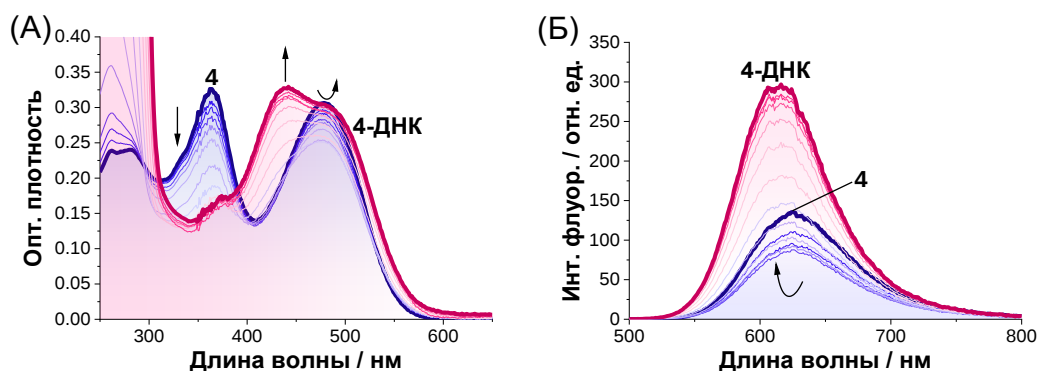


Рисунок 56 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата 4 ($1 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК-тт ($0 - 1,34 \cdot 10^{-3}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм.

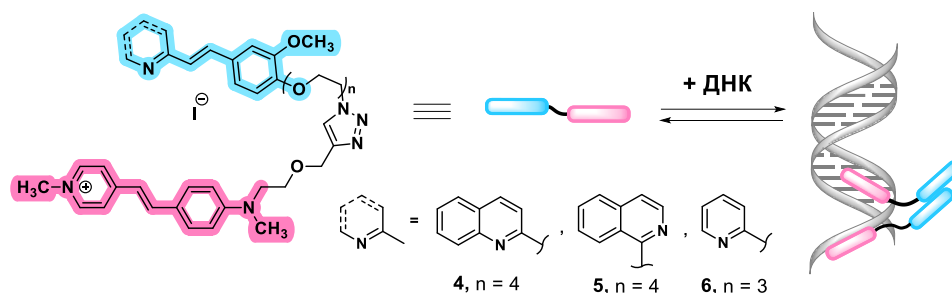


Рисунок 57 – Схематическое представление комплексов конъюгатов 4-6 с ДНК.

В случае конъюгатов на основе производных хинолизиния 7, 8 добавление ДНК вызывало одновременное связывание обоих фрагментов молекулы. Так во всех случаях при увеличении концентрации ДНК в растворе наблюдался сдвиг обеих полос поглощения в красную область (Рис. 58, П64). В спектрах флуоресценции добавление нуклеиновой кислоты вызывало уменьшение полосы, относящейся к производному хинолизиния, с одновременным увеличением интенсивности полосы стирилового красителя. Наблюдаемые оптические отклики аналогичны закономерностям, которые происходят при комплексообразовании отдельных компонентов с ДНК, и свидетельствуют об одновременном взаимодействии обоих фрагментов конъюгата с нуклеиновой кислотой (Рис. 59).

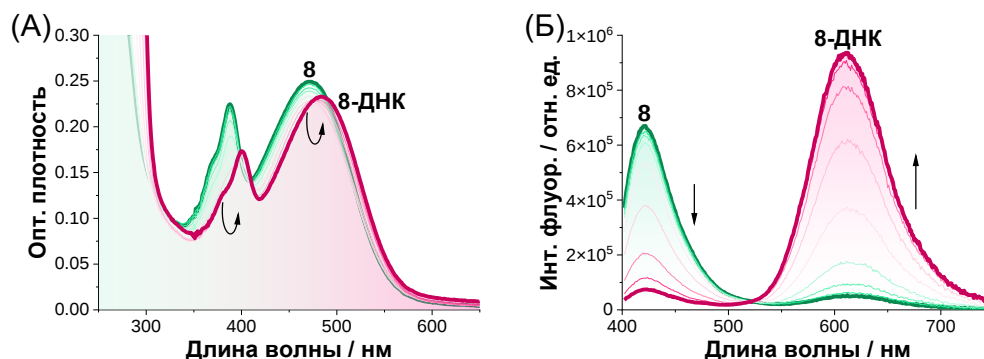


Рисунок 58 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата 8 ($1 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК-тт ($0 - 5,4 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

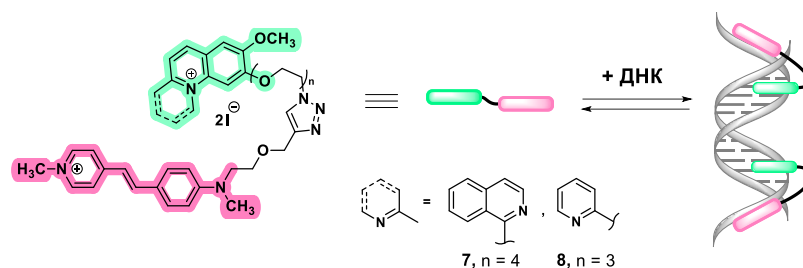


Рисунок 59 – Схематическое представление комплексов конъюгатов **7**, **8** с ДНК.

Данные спектрофотометрического и флуориметрического титрования были обработаны с помощью программного пакета SpecFit/32 (Рис. П65-П70), в результате чего были рассчитаны константы связывания комплексов с использованием модели 1:1 (Таблица 12). Поскольку изменения оптических свойств и полученные константы устойчивости сопоставимы для отдельных хромофоров (Таблица 11) и конъюгатов, можно сделать вывод, что комбинация двух молекул в одну не ухудшает их ДНК-комплексобразующие свойства по сравнению с исходными соединениями.

Таблица 12 – Оптические характеристики лигандов **4-8**, **54** в отсутствии и в присутствии ДНК.

Лиганд (L)	$\lambda_{\text{погл}}, \text{нм}$		$\lambda_{\text{фл}}, \text{нм}$		$I_{\text{макс}}$ I_0	$\Phi_{\text{фл}}, \%$		$\lg K^a$ (лиганд:ДНК)
	L	L-ДНК	L	L-ДНК		L	L-ДНК	
4	364, 479	440, 480	626	616	2	7,2 ^б	13,7 ^б	3,91 ± 0,15 (1:1)
5	372, 473	500	621	611	4	3,6 ^б	5,9 ^б	4,11 ± 0,04 (1:1)
6	330, 469	330, 480	618	614	4	3,8 ^в	13,0 ^б	3,56 ± 0,29 (1:1)
54	454	477	613	610	53	0,5 ^б	17,0 ^б	3,49 ± 0,08 (1:1)
7	405, 476	418, 480	445, 611	450, 611	23, 32	4,2 ^г	5,2 ^г	4,12 ± 0,17 (1:1)
8	388, 470	400, 484	421, 615	424, 611	18, 63	3,5 ^г	10,0 ^б	4,59 ± 0,17 (1:1)

^аРассчитаны с использованием программы SpecFit/32.

^бОтносительно кумарина **6** в этаноле.

^вОтносительно бисульфата хинина в 1 н. H₂SO₄.

^гОтносительно кумарина **343** в этаноле.

Что касается спектроскопии КД, то в случае конъюгата **6** с гетеростильбеном на основе пиридина добавление лиганда к ДНК вызывало появление малоинтенсивной положительной полосы ИКД (Рис. 60, А), что также наблюдалось для исходного красителя **54** (Рис. П71). При

этом, в спектрах КД комплексов 4-ДНК и 5-ДНК произошло изменение сигнала ИКД с положительного на отрицательный (Рис. 60, Б и В). Вероятно, агрегация конъюгатов 4 и 5 на поверхности ДНК за счет гетеростильбеновых фрагментов приводит к изменению ориентации расположения стирлового красителя в комплексе относительно хиральной оси нуклеиновой кислоты, что вызывает другой оптический отклик при поглощении лево- и право-поляризованного света.

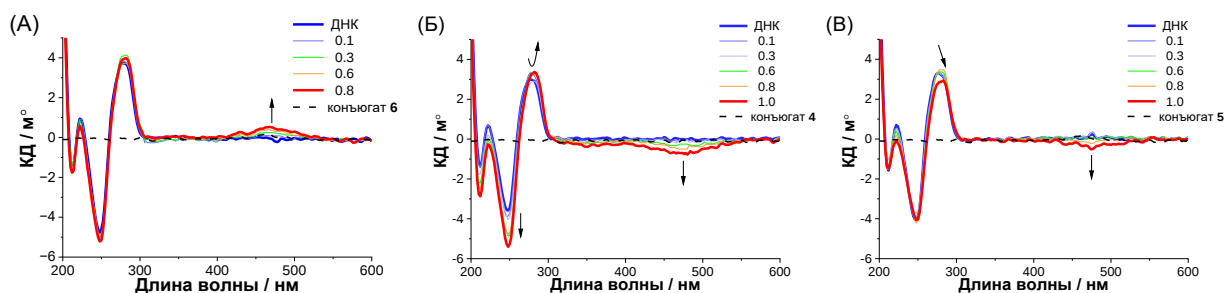


Рисунок 60 – Спектры кругового дихроизма ДНК-тт ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М) в отсутствие и в присутствии соединений 6 (А), 4 (Б) и 5 (В) при различном соотношении лиганд-ДНК: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 и 1. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0). Пунктирной линией показан спектр КД соединений в отсутствие ДНК ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М).

Для конъюгатов производных хинолизиния 7, 8 спектры КД их комплексов с ДНК также суммируют изменения, наблюдаемые для отдельных хромофоров (Рис. 61). При различных молярных соотношениях 7/ДНК и 8/ДНК появлялся положительный сигнал ИКД в области 480 нм, аналогичный сигналу красителя 54. При этом можно заметить, что изменения сигнала КД ДНК были более выраженными по сравнению с конъюгатами 5 и 6 соответствующих гетеростильбенов. В спектрах происходил bathochromic сдвиг положительной полосы ДНК ($\Delta\lambda = 6-9$ нм) с одновременным уменьшением интенсивности и красным сдвигом отрицательной полосы ($\Delta\lambda = 5$ нм). Наблюдаемые изменения указывают на нарушение стэкинга между парами оснований и искажение спиральной структуры, что приводит к частичной дестабилизации В-формы ДНК. Учитывая более выраженные сдвиги в случае конъюгатов 7 и 8, а также большую константу связывания образующихся комплексов по сравнению с отдельными компонентами, можно сделать вывод, что объединение двух фрагментов в одну структуру привело к более сильному сродству к ДНК.

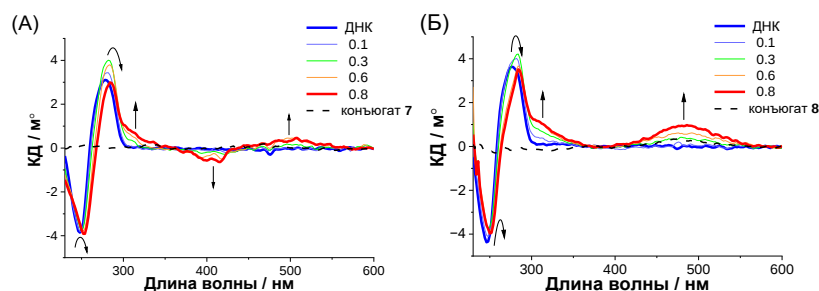


Рисунок 61 – Спектры кругового дихроизма ДНК-тт ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М) в отсутствие и в присутствии конъюгатов 7 (А) и 8 (Б) при различном соотношении лиганд-ДНК: 0; 0,1; 0,3; 0,6 и 0,8. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0). Пунктирной линией показан спектр КД соединений в отсутствие ДНК ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М).

3.7.3 Изучение комплексообразования конъюгата **8** с ДНК методом ЯМР спектроскопии

Спектроскопия ЯМР помогает предоставить более подробную информацию о связывании лигандов с ДНК и охарактеризовать специфические структурные особенности таких комплексов. Додекамер Дрю-Дикерсона ($d[CGCGAATTCGCG]_2$) является хорошо зарекомендовавшей себя, структурно определенной моделью В-формы ДНК, которую можно использовать для определения сайта связывания лигандов методом ЯМР. ^1H ЯМР спектр додекамера представлен на Рис. 62. Расположение лигандов и их специфичность к конкретным парам оснований была изучена на примере конъюгата **8** и его индивидуальных компонентов **19** и **54**. Идентификация сигналов лиганда и ДНК в комплексах проводилась путем сравнения со спектрами отдельных компонентов, а также в соответствии со стандартными протоколами для В-ДНК с помощью скалярной связи в спектрах ^1H - ^1H TOCSY и дипольной связи в спектрах ^1H - ^1H NOESY [223, 224].

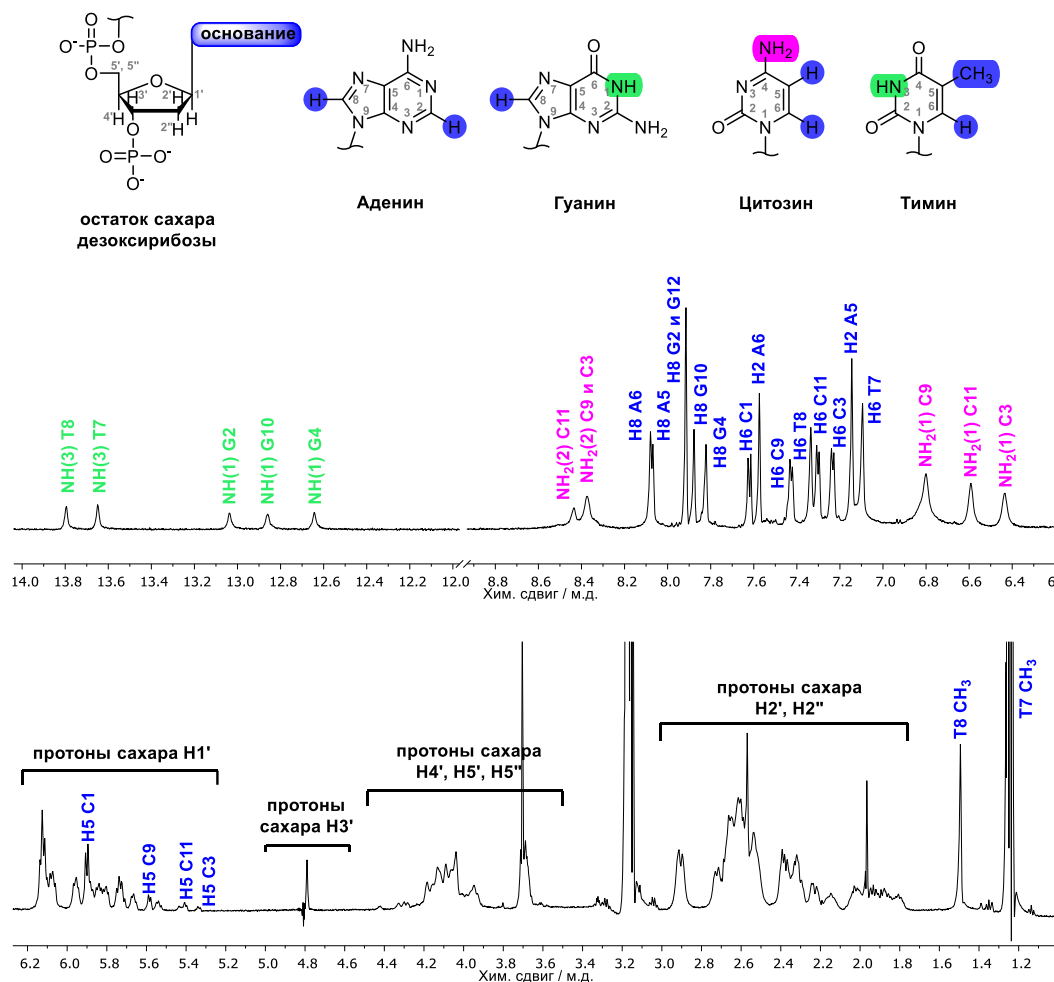


Рисунок 62 – Спектр ^1H ЯМР додекамера Дрю-Дикерсона в фосфатном буфере- D_2O (9:1).

В качестве отправной точки были проанализированы спектры ^1H ЯМР комплексов исходных хромофоров **19** и **54** с ДНК, а затем комплекса конъюгата **8**-ДНК. В спектре ^1H ЯМР смеси производного хинолизиния **19** и ДНК в соотношении 1:1 все сигналы были уширены (Рис. 63), что указывает на протекание динамических процессов в растворе. В ароматической области отчетливо видны сигналы лиганда **19** на 9,43 м.д. (Н-2), 7,98 м.д. (Н-4), 7,69 м.д. (Н-3) и 6,92 м.д.

(H-7, H-8). Сигналы оставшихся протонов перекрываются с сигналами ДНК, поэтому были идентифицированы с помощью анализа кросс-пиков в спектрах ^1H - ^1H TOCSY и NOESY: H-7 (δ 6,92 м.д.) $\leftrightarrow$ H-6 (δ 7,14 м.д.), H-2 (δ 9,43 м.д.) $\leftrightarrow$ H-11 (δ 7,59 м.д.), H-11 (δ 7,59 м.д.) $\leftrightarrow$ H- α (δ 4,18 м.д.) и H- α (δ 4,18 м.д.) $\leftrightarrow$ H- β (δ 3,87 м.д.). Характерные кросс-пики для протонов H-5, H- γ – H- θ и -OCH₃ не удалось обнаружить из-за сильного перекрывания с кросс-пиками ДНК, что исключает точное определение их химических сдвигов.

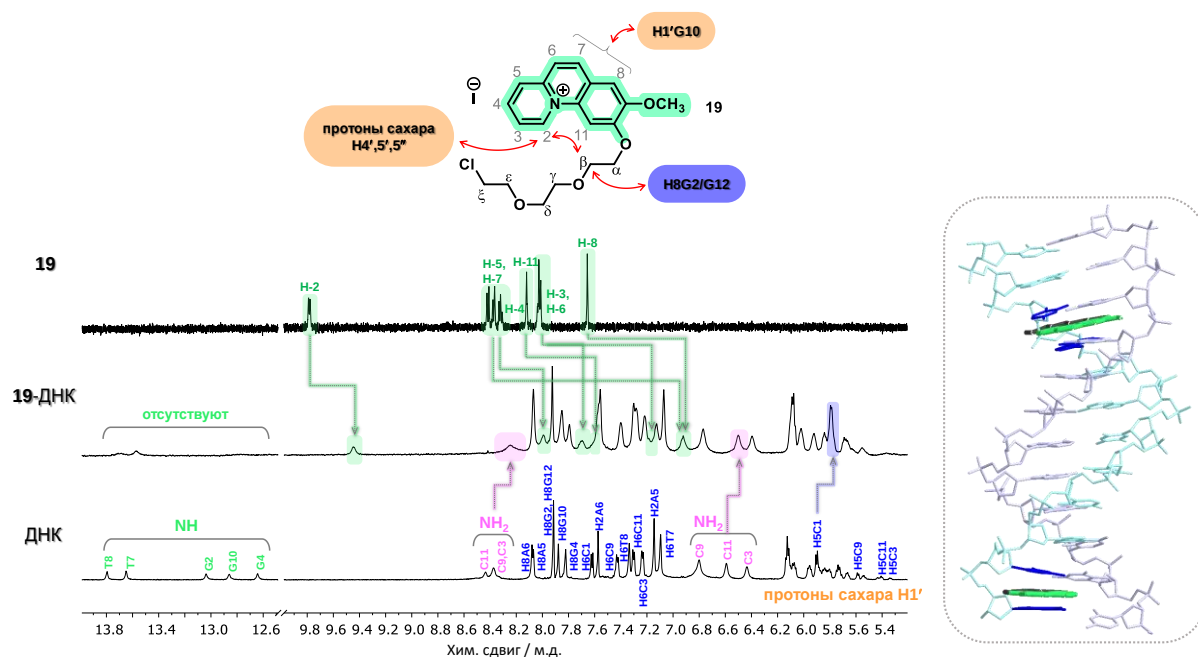


Рисунок 63 – Спектры ^1H ЯМР лиганда **19**, ДНК и ДНК в присутствии **19** в фосфатном буфере- D_2O 9:1 и схематическая визуализация комплекса на основе данных ЯМР.

Что касается сигналов ДНК, комплексообразование с производным **19** приводит к потере сигналов от протонов имино-групп тимина (T7, T8) и гуанина (G2, G4, G10) на 12-14 м.д. (Рис. 63). Это указывает на увеличение расстояния между соседними парами оснований, что приводит к разрыву водородных связей и позволяет протонам быстро обмениваться с растворителем, что типично для интеркаляции [225]. Область NOE кросс-пиков между ароматическими протонами оснований и H1' протонами сахара служит индикатором сохранности пространственной укладки и конформации двойной спирали и традиционно называется областью «отпечатков пальцев». Так, образование комплекса **19** с ДНК приводит к потере NOE кросс-пиков между H1' сахаром и протонами гуанина (G2, G4) и цитозина (C3): H8G2 $\leftrightarrow$ H1'G2 и H1'C3 $\leftrightarrow$ H8G4 (Рис. 64, А, Б). Кроме того, в спектре также отсутствуют корреляции между другими протонами ДНК: NH₂(2)C3 $\leftrightarrow$ H5C3, NH₂(2)C9 $\leftrightarrow$ T8CH₃ и H8G2 $\leftrightarrow$ H5C3. Наблюдаемые результаты указывают на преимущественное внедрение лиганда **19** между основаниями CG, в частности, в области C3-G4. Однако были обнаружены некоторые NOE кросс-пики между протонами лиганда и ДНК: H-7/8 $\leftrightarrow$ H1'G10 и H- β $\leftrightarrow$ H8G2/G12 (Рис. П72). Последнее взаимодействие, а также наличие кросс-пика H- β $\leftrightarrow$ H-2 указывают на расположение лиганда вблизи области C11-G12. Эти данные

указывают на два неэквивалентных типа комплексов с различными сайтами интеркаляции между центральными и терминальными парами оснований C-G (Рис. 63) [226].

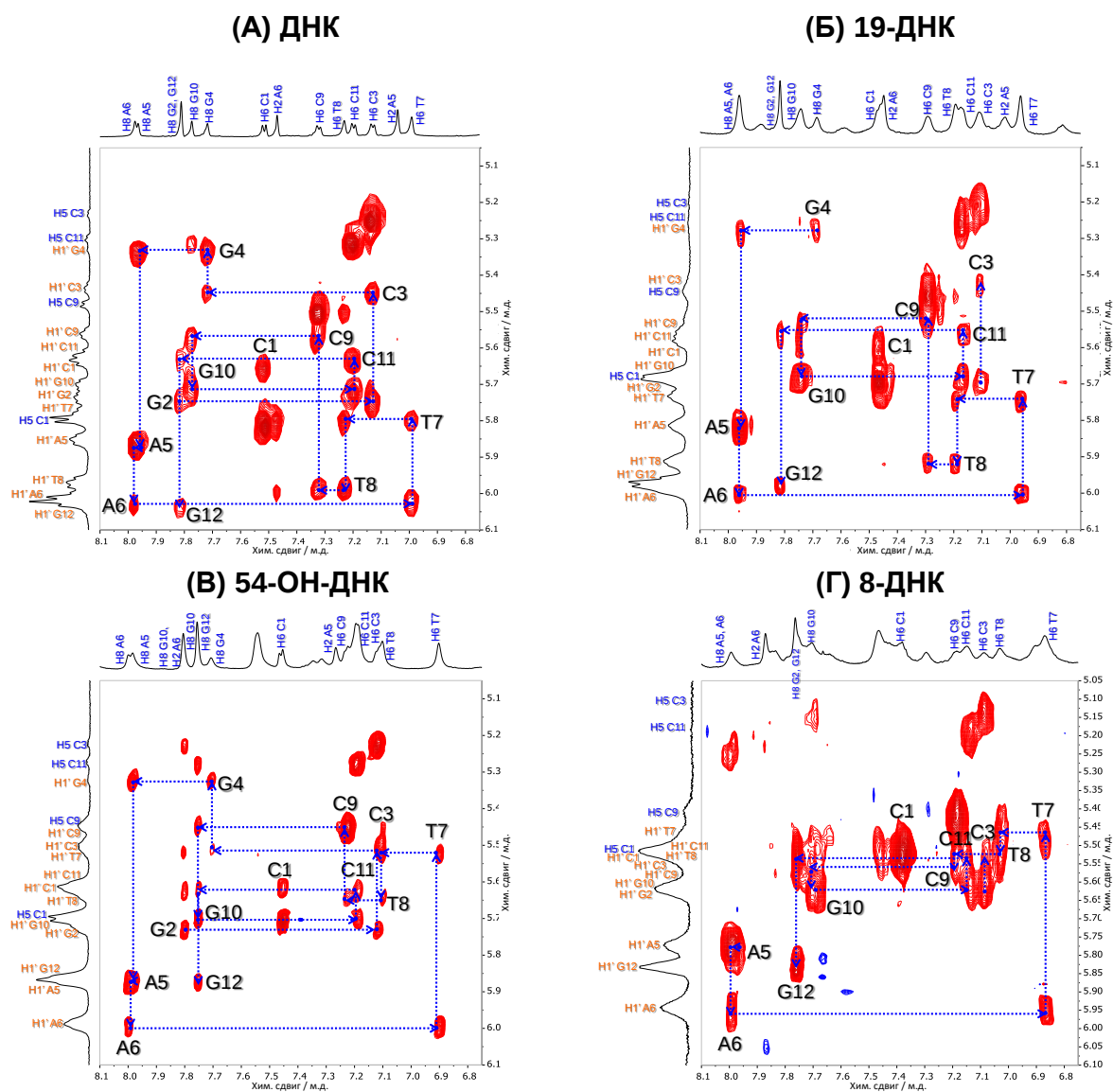


Рисунок 64 — Спектры ^1H - ^1H NOESY (область «отпечатков пальцев») ДНК в свободной форме (А) и в связанном состоянии с лигандами **19** (Б), **54-ОН** (В) и **8** (Г), демонстрирующие последовательную связь оснований в дуплексе В-типа.

Кроме того, интеркаляция также вызывает сдвиг сигналов лиганда в область сильного поля из-за экранирующего эффекта при π - π -стэкинговых взаимодействиях, как это видно на примере всех протонов в комплексе **19**-ДНК (Рис. 65, А). Также стоит отметить, что протоны Н-6, Н-7 и Н-8 лиганда **19** демонстрируют наибольший сдвиг в сильное поле ($\Delta\delta = -0,74 \dots -1,45$ м.д.), поэтому вероятнее всего, эта часть молекулы расположена глубже в структуре ДНК. Корреляции NOE между Н-2 и протонами сахара Н4',5',5'' подтверждают этот факт, показывая, что этот протон направлен в сторону внешней малой бороздки. Такие изменения химических сдвигов также согласуются с литературными данными для интеркаляторов [227]. Таким образом, данные ЯМР подтвердили образование комплекса **19**-ДНК через интеркаляцию с явной специфичностью к области CG.

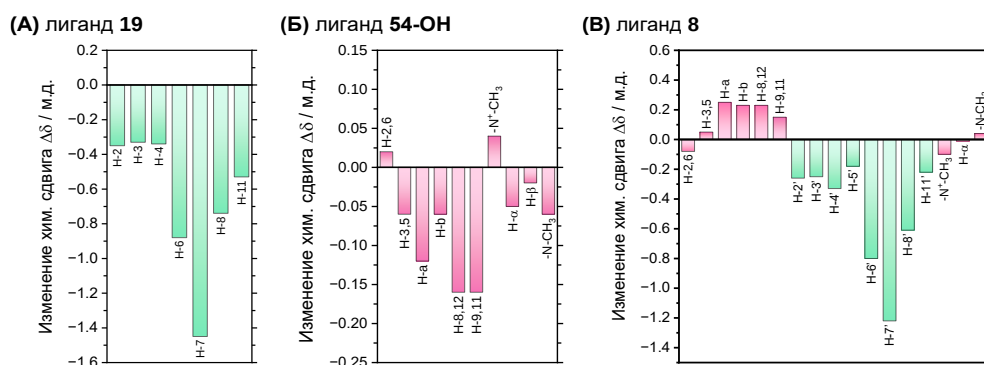


Рисунок 65 – Изменения химических сдвигов ($\Delta\delta$ в м.д.) между свободным лигандом и комплексом лиганд-ДНК для лиганда **19** (А), лиганда **54-ОН** (Б) и лиганда **8** (В).

Для изучения взаимодействия стирилового красителя **54** с ДНК методом ЯМР спектроскопии было решено использовать его более водорастворимый гидроксильный аналог **54-ОН**, синтезированный по описанной в литературе методике [228] (Рис. 66). С помощью анализа ^1H - ^1H TOCSY и NOESY спектров удалось четко идентифицировать сигналы красителя на 8,23 м.д. (H-2,6), 7,63 м.д. (H-3,5), 7,42 м.д. (H-b), 7,28 м.д. (H-8,12), 6,71 м.д. (H-a), 6,62 м.д. (H-9,11), 4,05 м.д. ($-\text{N}^+-\text{CH}_3$), 3,74 м.д. (H- β), 3,49 м.д. (H- α) и 2,94 м.д. ($-\text{N}-\text{CH}_3$). В спектре NOESY комплекса **54-ОН**-ДНК наблюдались межмолекулярные NOE кросс-пики между протонами красителя, которые отсутствовали в спектре свободного лиганда: H-2,6 $\leftrightarrow$ H-a; H-3,5 $\leftrightarrow$ H-8,12; H-3,5 $\leftrightarrow$ H-9,11; H-3,5 $\leftrightarrow$ $-\text{N}^+-\text{CH}_3$; H-b $\leftrightarrow$ H-9,11; H-8,12 $\leftrightarrow$ $-\text{N}-\text{CH}_3$ и H-8,12 $\leftrightarrow$ H- α (Рис. П73). Наблюдаемые корреляции NOE указывают на димеризацию красителя внутри олигонуклеотида, что также наблюдалось и для других стироловых красителей [229].

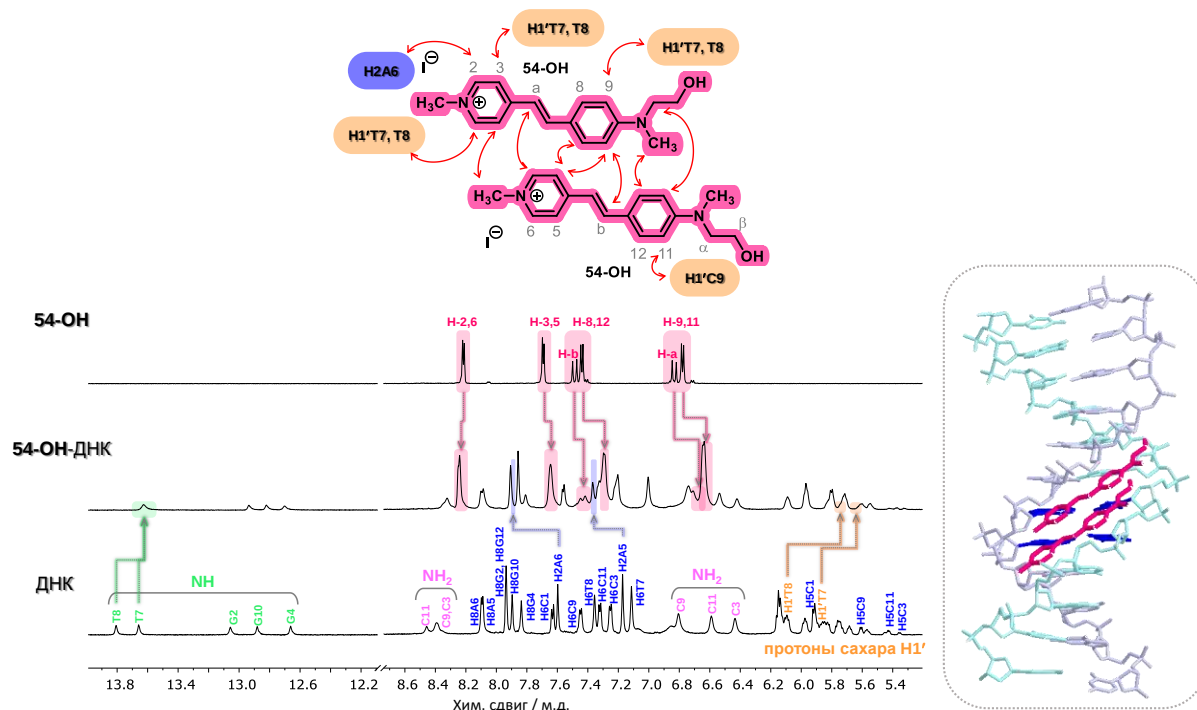


Рисунок 66 – Спектры ^1H ЯМР лиганда **54-ОН**, ДНК и ДНК в присутствии **54-ОН** в фосфатном буфере- D_2O 9:1 и схематическая визуализация комплекса на основе данных ЯМР.

В спектре ^1H ЯМР ДНК добавление красителя **54-ОН** не приводит к исчезновению характерных иминных протонов тимина и гуанина на 12-14 м.д. в отличие от **19** (Рис. 66). Это указывает на то, что олигонуклеотид в этом комплексе сохраняет структуру двойной спирали, что характерно для лигандов, залегающих в бороздку [230]. В области «отпечатков пальцев» наблюдалось снижение интенсивности кросс-пиков $\text{H1}'\text{A6} \leftrightarrow \text{H8A6}$, $\text{H1}'\text{T7} \leftrightarrow \text{H6T8}$ и $\text{H1}'\text{C3} \leftrightarrow \text{H8G4}$ (Рис. 64, В). Кроме того, отсутствовали корреляции между другими протонами ДНК: $\text{NH}(3)\text{T8} \leftrightarrow \text{T8 CH}_3$; $\text{H8A6} \leftrightarrow \text{H6T7}$; $\text{H8A6} \leftrightarrow \text{T7 CH}_3$; $\text{H2A6} \leftrightarrow \text{H1}'\text{A6}$; $\text{H2A6} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T7}$; $\text{H6T8} \leftrightarrow \text{H5C9}$ и $\text{H6T8} \leftrightarrow \text{H6T7}$. Также в комплексе **54-ОН**-ДНК кросс-пики между протонами гуанина, цитозина, тимина и протонами $\text{H4}'$, $\text{H5}'$ и $\text{H5}''$ сахара, образующими внешнюю малую бороздку, значительно менее интенсивные по сравнению со свободной ДНК, тогда как в **19**-ДНК эти взаимодействия сохраняются. Примечательно, что протоны $\text{H4}'$, $\text{H5}'$ и $\text{H5}''$ сахара сместились в область сильного поля примерно на -0,2...-0,5 м.д. при связывании с **54-ОН**, тогда как для **19**-ДНК таких значительных сдвигов не наблюдалось. В то же время наиболее выраженные сдвиги в сторону более сильного поля наблюдались также для протонов $\text{H1}'$ сахара тимина ($\Delta\delta = -0,34$ м.д. для $\text{H1}'\text{T7}$ и $\Delta\delta = -0,27$ м.д. для $\text{H1}'\text{T8}$) с одновременным сдвигом в слабое поле протонов H2 аденина ($\Delta\delta = +0,33$ м.д. для H2A6 и $\Delta\delta = +0,22$ м.д. для H2A5) (Рис. 67). Все эти наблюдения указывают на связывание лиганда преимущественно с парами оснований А-Т. В подтверждение этого предположения были идентифицированы несколько межмолекулярных кросс-пиков NOE между **54-ОН** и ДНК: $\text{H-2,6} \leftrightarrow \text{H2A6}$; $\text{H-2,6} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T8}$; $\text{H-2,6} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T7}$; $\text{H-3,5} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T8}$; $\text{H-3,5} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T7}$; $\text{H-9,11} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T7}$; $\text{H-9,11} \leftrightarrow \text{H1}'\text{T8}$ и $\text{H-9,11} \leftrightarrow \text{H1}'\text{C9}$ (Рис. П73). Важно отметить, что для лигандов, связывающихся с бороздкой ДНК, характерны сдвиги в слабое поле, которые возникают из-за снижения электронной плотности протонов вследствие образования водородных связей [231]. Однако краситель **54-ОН** демонстрирует сдвиги в сильное поле при образовании комплекса (Рис. 65, Б), что объясняется π - π -стэкинг-взаимодействиями внутри димерной упаковки в малой бороздке ДНК. Примечательно, что протоны гуанина и цитозина также показали умеренные сдвиги в сильное поле, поскольку лиганды, связывающиеся с бороздкой, могут оказывать влияние на три соседние пары оснований от места связывания [232].

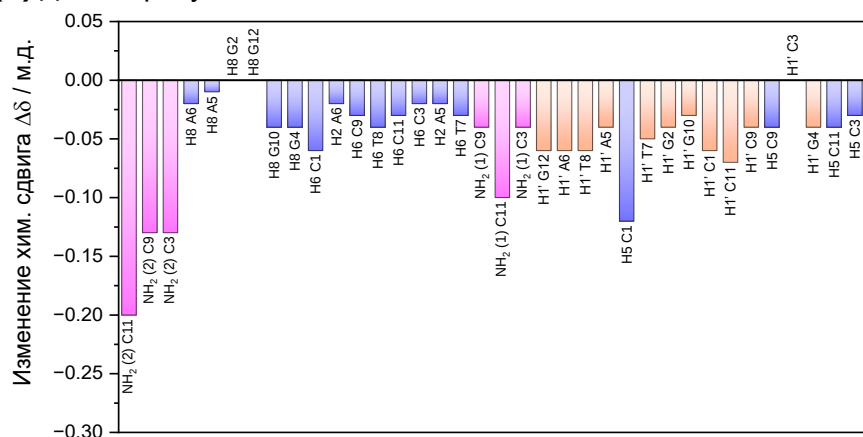
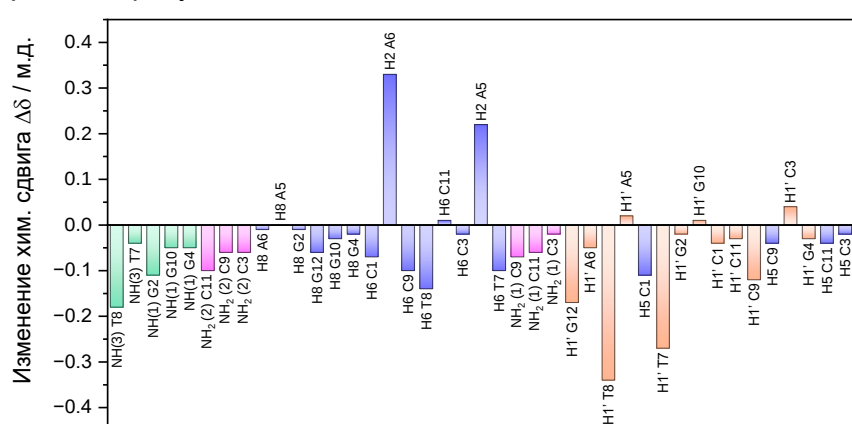
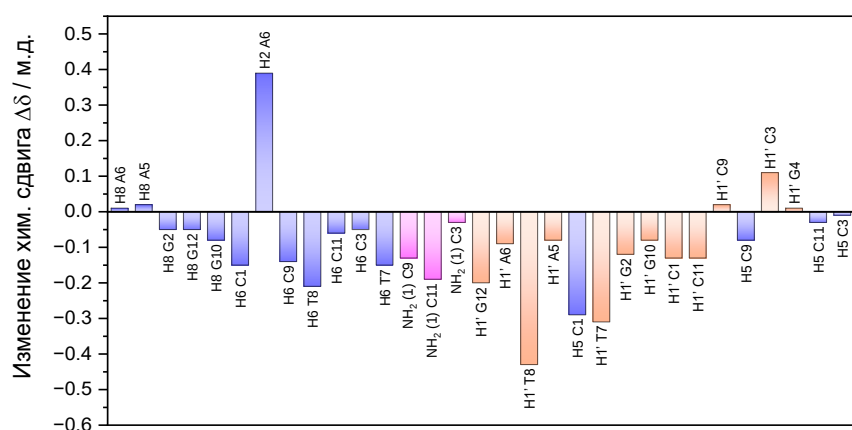
(А) ДНК в присутствии 19**(Б) ДНК в присутствии 54-ОН****(В) ДНК в присутствии 8**

Рисунок 67 – Изменения химических сдвигов ($\Delta\delta$ в м.д.) протонов нуклеотида и сахара H1' между свободным олигонуклеотидом и комплексами **19**-ДНК (А), **54-ОН**-ДНК (Б) и **8**-ДНК (В).

Спектр конъюгата **8** в свободной форме и в комплексе с ДНК представлен на Рис. 68. Видно, что все сигналы сильно уширены из-за комплексообразования с ДНК. Почти все сигналы протонов лиганда перекрываются с сигналами ДНК и были идентифицированы с помощью спектров ^1H - ^1H TOCSY и NOESY. Сигнал протона триазола Н-ε не удалось обнаружить, так как он не проявил характерных кросс-пиков в этих корреляциях ни в свободной, ни в связанной формах. Сигналы алифатических протонов конъюгата **8** также не удалось идентифицировать из-

за сильного перекрывания с протонами сахара, за исключением протонов $-N^+-CH_3$, $H-\alpha$ и $-N-CH_3$, которые были обнаружены с помощью NOE кросс-пиков $H-2,6$ (δ 8,22 м.д.) $\leftrightarrow$ $-N^+-CH_3$ (δ 4,06 м.д.), $H-9,11$ (δ 6,32 м.д.) $\leftrightarrow$ $H-\alpha$ (δ 3,30 м.д.) и $H-9,11$ (δ 6,32 м.д.) $\leftrightarrow$ $-N-CH_3$ (δ 2,73 м.д.) (Рис. П74). Следует отметить, что изменения химических сдвигов при комплексообразовании для фрагмента хинолизиния схожи как для **19**, так и для **8**, и эти сигналы в конъюгате также смещены в сильное поле из-за экранирования от стэкинг-взаимодействий (Рис. 65). При этом, почти все сигналы стирилового красителя в **8** демонстрируют смещение в слабое поле, в отличие от сигналов исходного **54-ОН**. Вероятно, димеризация внутри ДНК затруднена для объемных молекул конъюгата, что приводит к изменениям химических сдвигов, типичным для залегающих в бороздку лигандов.

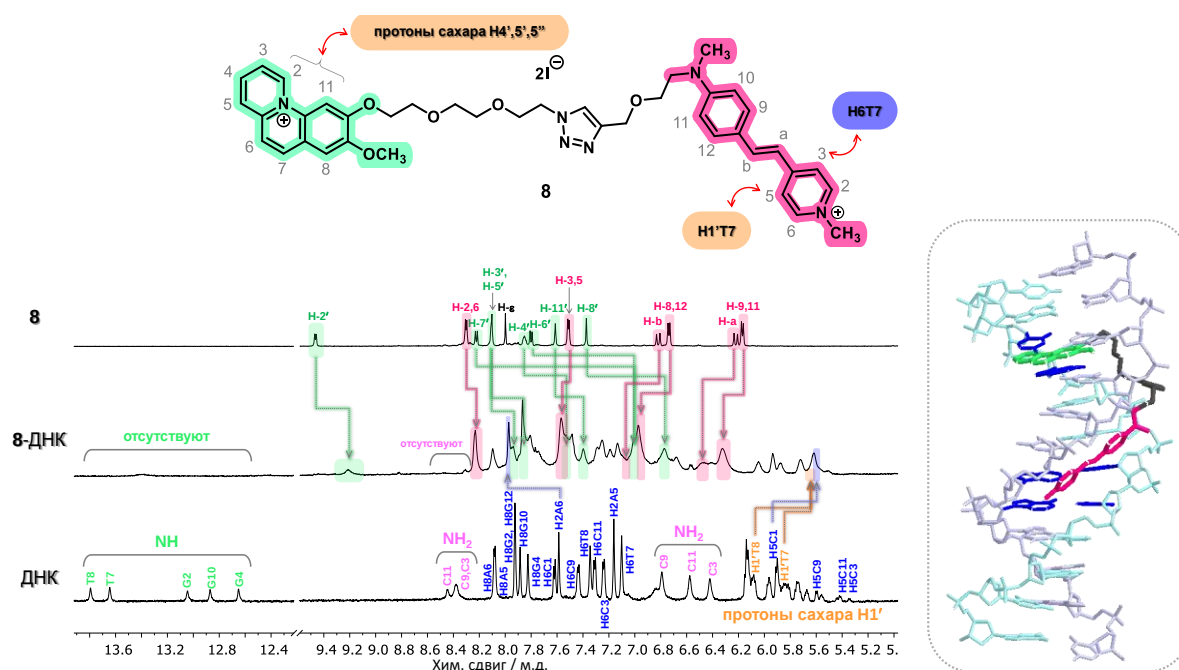


Рисунок 68 — Спектры 1H ЯМР лиганда **8**, ДНК и ДНК в присутствии **8** в фосфатном буфере- D_2O 9:1 и схематическая визуализация комплекса на основе данных ЯМР.

Что касается ДНК, то были идентифицированы почти все сигналы нуклеотидных протонов и протонов $H1'$ сахара, за исключением протонов $H8G4$, $H1'G4$ и $H2A5$, у которых отсутствовали характерные кросс-пики. Кроме того, связывание с **8** привело к исчезновению сигналов иминных протонов тимина и гуанина (Рис. 68), что указывает на интеркаляцию лиганда, аналогично производному **19**. Однако сигналы аминных протонов цитозина $NH_2(2)C3$, $NH_2(2)C9$ и $NH_2(2)C11$ также исчезли, что предполагает большую дестабилизацию пар оснований CG конъюгатом. Область $H1'$ протонов сахара изменилась аналогично красителю **54-ОН**, при этом протоны $H1'T8$ и $H1'T7$ также продемонстрировали наибольшие изменения химических сдвигов среди всех $H1'$ протонов (Рис. 67). Стоит отметить, что область «отпечатков пальцев» значительно изменилась для **8** по сравнению со свободной ДНК и комплексами **19**-ДНК, **54-ОН**-

ДНК (Рис. 64). Комплексообразование привело к исчезновению кросс-пиков $H8G2 \leftrightarrow H1'G2$, $H1'C3 \leftrightarrow H8G4$, $H8G4 \leftrightarrow H1'G4$ и $H1'G4 \leftrightarrow H8A5$. Выраженные изменения в области «отпечатков пальцев» ДНК указывают на значительные конформационные изменения при добавлении **8**, что также согласуется с данными спектроскопии КД (Рис. 61), которые обсуждались ранее. Кроме того, были обнаружены корреляции NOE между протонами стирилового фрагмента в конъюгате **8** и протонами ДНК: $H3,5 \leftrightarrow H6T7$; $H3,5 \leftrightarrow H1'T7$; $H3,5 \leftrightarrow H4'$, $H5'$, $H5''$ и $H9,11 \leftrightarrow H4'$, $H5'$, $H5''$ (Рис. П74). Что касается фрагмента хинолизиния, то удалось идентифицировать кросс-пики между протонами $H2'$, $H11'$ и протонами сахара $H4'$, $H5'$, $H5''$, как и в случае с **19**. Также наблюдалось снижение интенсивности NOE кросс-пиков между протонами гуанина, цитозина и тимина и протонами сахара $H4'$, $H5'$, $H5''$, как и в случае с **54-ОН**.

Таким образом, связывание ДНК с **8** вызывает спектральные изменения, которые эффективно сочетают в себе характерные паттерны поведения его отдельных компонентов, а именно интеркаляцию производного **19** и связывание с бороздкой красителя **54-ОН**. Более того, специфичность к связыванию каждого из фрагментов сохраняется при переходе от отдельных молекул к конъюгату: производное хинолизиния интеркалирует между парами CG, в то время как стироловый краситель связывается с малой бороздкой AT вблизи тиминов T7/T8.

3.8 Изучение фототоксичности производных хинолизиния **16**, **17**, **19** и конъюгата **8**

Как известно из литературного обзора, механизм внутримолекулярной фотоциклизации включает в себя промежуточное образование производного дигидрофенантрена из *Z*-изомера с последующим его окислением (Схема 6 в разделе 2.1.2). В нашей лаборатории ранее было обнаружено, что такие соединения при облучении способны генерировать активные формы кислорода (АФК), которые действуют как окислители дигидрофенантрена, тем самым мгновенно ускоряя реакцию, что позволяет классифицировать ее как автокаталитическую [233]. В связи с этим на следующем этапе было решено изучить производные **16**, **17** и **19** с точки зрения генерации синглетного кислорода и их потенциального использования в качестве фотосенсибилизаторов.

Квантовые выходы генерации синглетного кислорода определяли по описанной методике [234]. Чаще всего она основана на мониторинге хода реакции синглетного кислорода с химической ловушкой с образованием устойчивых продуктов, концентрацию которых можно измерить спектрофотометрически. В качестве ловушки синглетного кислорода использовали йодид калия в присутствии молибдата аммония, а в качестве стандарта для сравнения с исследуемыми соединениями использовали хорошо известный фотосенсибилизатор эозин Y [235]. Водные растворы **16**, **17** и **19** в присутствии KI облучали светом с $\lambda_{\text{обл}} = 432$ нм, 403 нм и 385 нм соответственно. Изменения в спектрах поглощения отслеживали в области 351 нм, что соответствует максимуму поглощения KI₃, который образуется из KI при взаимодействии с синглетным кислородом (Рис. 69, П75 и П76). Квантовые выходы генерации синглетного кислорода составили 2% для **16** и <1% для **17** и **19**.

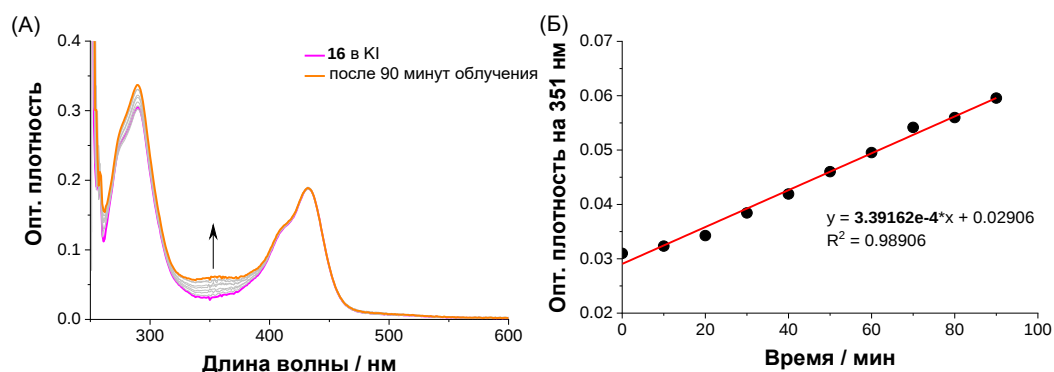


Рисунок 69 — Изменение спектров поглощения (А) производного хинолизиния **16** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в присутствии KI при облучении монохроматическим светом ($\lambda_{\text{обл}} = 432$ нм) и зависимость оптической плотности KI₃ от времени облучения.

На следующем этапе была изучена возможность фотоиндуцированного повреждения плазмидной ДНК pBR322 в присутствии исследуемых производных **16**, **17** и **19** с использованием электрофореза в агарозном геле. Плазмида pBR322 существует в суперспиральной форме, которая под воздействием различных агентов, в том числе фотосенсибилизаторов, может подвергаться одноцепочечному разрыву с образованием открытой кольцевой формы или

двухцепочечному разрыву с образованием линейной формы (Рис. 70) [236]. Эти формы отличаются подвижностью в агарозном геле благодаря своему размеру, поэтому их образование можно четко наблюдать на электрофореграммах.

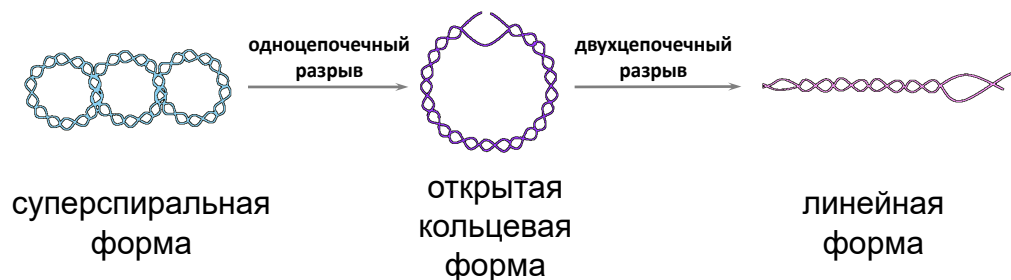


Рисунок 70 – Возможные формы плазмидной ДНК pBR322.

На первом этапе растворы производных хинолизиния с плазмидной ДНК облучали фильтрованным светом ртутной лампы (436 нм, 1,0 мВт/см² для **16**; 405 нм, 0,7 мВт/см² для **17**) или светодиодами (395 нм, 5,2 мВт/см² для **19**) с увеличением времени облучения. Во всех случаях наблюдалось постепенное фотоиндуцированное повреждение pBR322 с образованием линейной и небольшого количества открытой кольцевой форм (Таблица 13, Рис. 71). После 30 мин облучения содержание исходной формы плазмидной ДНК составило 40-41% для **16** и **17**, тогда как после 135 мин облучения было повреждено около 90-97% pBR322. При этом, облучение светодиодами привело к разрыву 87% ДНК в присутствии **19** уже через 27 минут облучения. Стоит отметить, что при облучении плазмиды в отсутствие исследуемых соединений такого разрушения не наблюдалось (см. линию 12 в Таблице 13 или последний столбец на Рис. 71), что указывает на прямое воздействие производных **16**, **17** и **19** на повреждение ДНК.

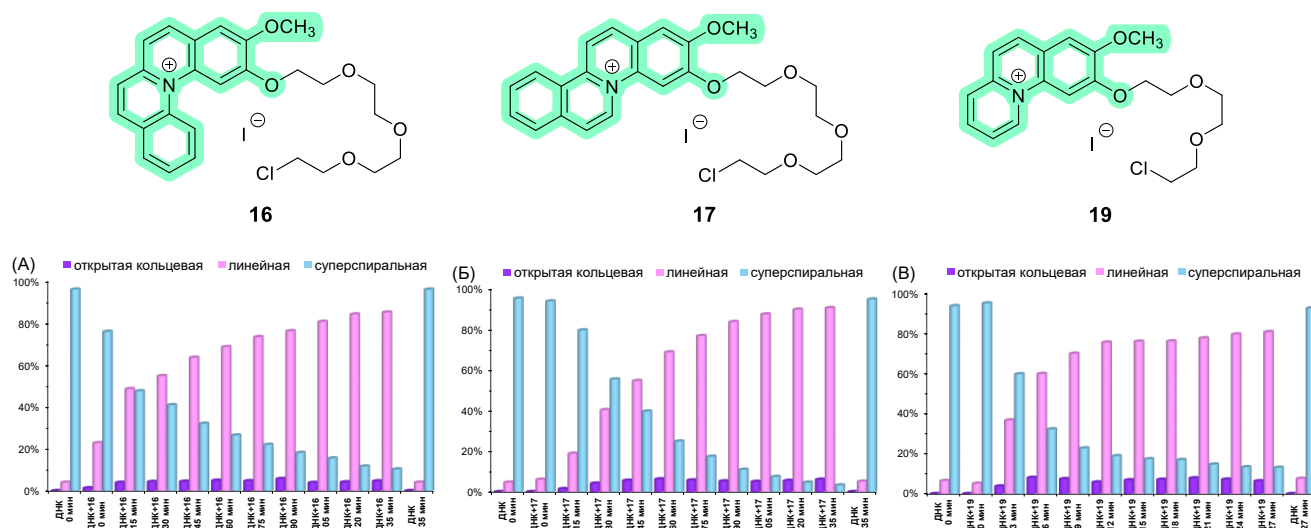
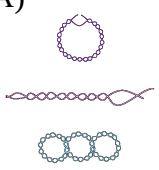
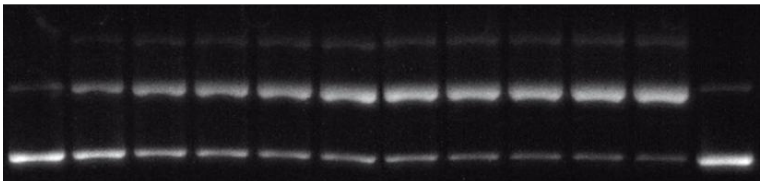
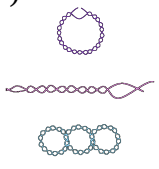
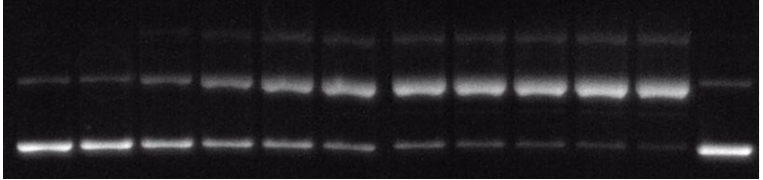
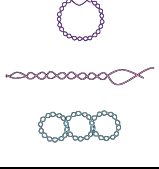
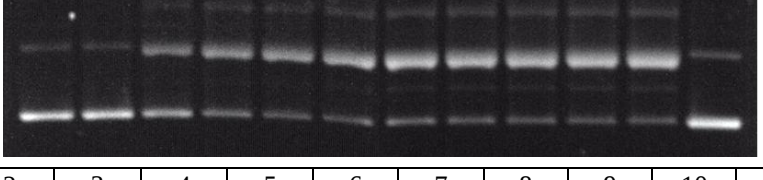


Рисунок 71 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей **16**-ДНК (А), **17**-ДНК (Б) и **19**-ДНК (В) при различном времени облучения. Графики построены на основе данных из Таблицы 13.

Таблица 13 – Электрофореграммы фоторазрушения рBR322 в присутствии **16** (А), **17** (Б) и **19** (В) в зависимости от времени облучения. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30 \text{ мкг/мл}$, $\lambda_{\text{обл}} = 436 \text{ нм}$ для **16**, 405 нм для **17**, 395 нм для **19**.

(А)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{16}/10^{-5}, \text{ М}$	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
время обл., мин	0	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	135
откр. кольц., %	0,0	1,3	3,9	4,3	4,5	4,9	4,7	5,7	3,9	4,2	4,6	0,0
линейная, %	4,0	22,8	48,6	54,7	63,5	68,6	73,3	76,1	80,6	84,1	85,1	4,0
суперспираль, %	96,0	75,9	47,5	40,9	32,0	26,5	22,0	18,1	15,5	11,7	10,3	96,0

(Б)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{17}/10^{-5}, \text{ М}$	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
время обл., мин	0	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	135
откр. кольц., %	0,0	0,0	1,5	4,2	5,6	6,3	5,7	5,3	5,0	5,5	6,1	0,0
линейная, %	4,7	6,1	18,9	40,4	54,7	68,8	76,9	83,8	87,5	89,9	90,6	5,1
суперспираль, %	95,3	93,9	79,6	55,5	39,7	24,9	17,4	11,0	7,4	4,6	3,3	94,9

(В)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{19}/10^{-5}, \text{ М}$	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
время обл., мин	0	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	27
откр. кольц., %	0,0	0,0	3,8	8,1	7,4	5,8	6,8	7,1	7,8	7,2	6,4	0,0
линейная, %	6,5	5,1	36,6	59,8	69,9	75,4	75,9	76,0	77,5	79,4	80,6	7,6
суперспираль, %	93,5	94,9	59,6	32,2	22,7	18,8	17,3	16,9	14,7	13,4	13,0	92,4

Увеличение концентрации лигандов при фиксированном времени облучения, как и ожидалось, привело к более эффективному разрушению плазмиды (Рис. П77, П78, Таблица П1). Так, 60% повреждения рBR322 для производных **16** и **17** было достигнуто при облучении в течение 15 мин раствора с концентрацией лиганда $>1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Примечательно, что увеличение концентрации лигандов в растворе приводит к разрыву плазмиды на 6-11% даже без облучения. Кроме того, на примере соединения **16** было показано, что изменение видимого света на ультрафиолетовый ($436 \text{ нм} \rightarrow 313 \text{ нм}$) приводит к снижению эффективности разрушения плазмиды (Таблица П2, Рис. П79). Таким образом, для эффективного образования АФК

предпочтительно возбуждать полосу внутримолекулярного переноса заряда производных хинолизиния.

Помимо оптических исследований, возможность образования полициклических катионов *in situ* была также продемонстрирована с помощью гель-электрофореза. Для этого растворы гетеростильбенов **12** и **13** облучали светом ртутной лампы >320 нм в присутствии плазмидной ДНК. По данным электрофореза (Рис. 72, Таблица ПЗ) видно, что на первом этапе суперспиральная форма ДНК не претерпевает никаких изменений, так как в это время в растворе происходит *E,Z*-изомеризация. Однако при длительном облучении (>30 мин для **12** и >40 мин для **13**), когда в растворе накапливается достаточное количество полициклического фотопродукта, ДНК начинает разрушаться с образованием открытой кольцевой и линейной форм. Было показано, что в данном случае свет вызывал лишь 2% повреждения ДНК в отсутствие лигандов (см. линию 12 в Таблице ПЗ или последний столбец на Рис. 72), поэтому наблюдаемые изменения подтверждают образование полициклических катионов в присутствии ДНК.

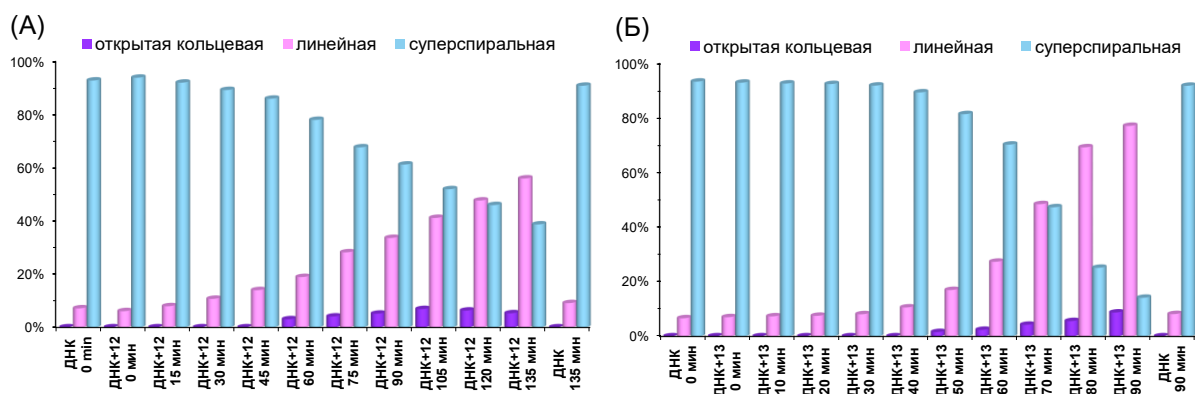
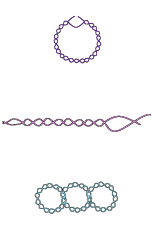


Рисунок 72 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей **12**-ДНК (А) и **13**-ДНК (Б) при облучении светом с $\lambda_{\text{обл}} > 320$ нм. Графики построены на основе данных из Таблицы ПЗ.

Принимая во внимание тот факт, что квантовые выходы генерации синглетного кислорода для исследуемых производных хинолизиния **16**, **17** и **19** крайне низки, а разрывы ДНК по данным электрофореза происходят достаточно эффективно, мы предположили, что механизм повреждения ДНК может включать не генерацию $^1\text{O}_2$, а образование свободных или ионных радикалов. В связи с этим для исключения влияния кислорода были проведены эксперименты по облучению растворов с ДНК как в обычной, так и в инертной атмосфере на примере производных **16** и **17** (Рис. 73, Таблица 14). По данным электрофореграмм видно, что через 40 минут облучения в анаэробных условиях разрушение ДНК составило 98-99% для обоих лигандов против 74% в атмосферных условиях. По-видимому, энергия, передаваемая молекулярному кислороду при образовании $^1\text{O}_2$ в условиях окружающей среды, в инертной атмосфере идет на генерацию радикалов, благодаря чему увеличивается процент повреждения ДНК. Полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что фотоиндуцированное разрушение ДНК в присутствии производных хинолизиния происходит главным образом за счет образования

радикалов. Это позволяет использовать их в качестве агентов ФДТ типа I, которые актуальны для лечения в условиях гипоксии, что является характерной особенностью большинства солидных опухолей.

Таблица 14 – Электрофореграммы фоторазрушения рВR322 в присутствии лигандов **16** и **17** в атмосферных и анаэробных условиях. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $C_{16/17} = 3 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм для **16**, 405 нм для **17**, время облучения – 40 мин.

	1	2	3	4	5	6
						
линия	1	2	3	4	5	6
лиганд	–	–	16	16	17	17
условия	атм.	Ar	атм.	Ar	атм.	Ar
откр. кольц., %	0,0	0,0	7,2	11,2	4,1	5,0
линейная, %	1,6	3,4	60,9	86,8	65,1	94,4
суперспираль, %	98,0	95,8	27,3	1,6	26,2	0,4

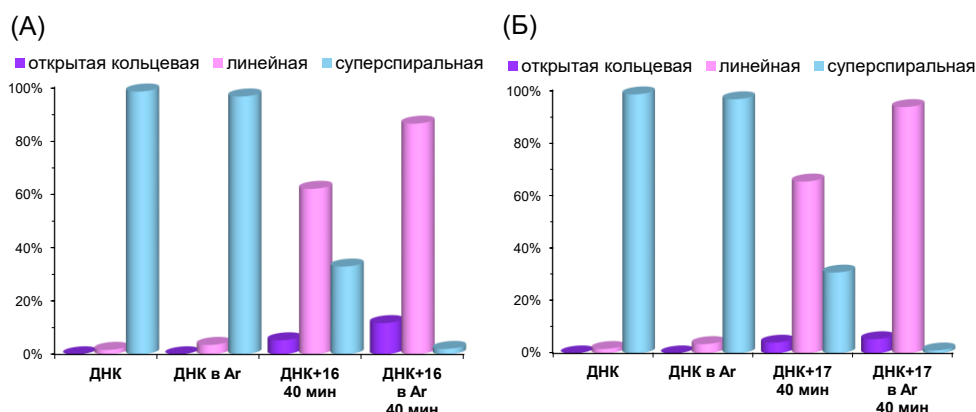


Рисунок 73 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей **16**-ДНК (А) и **17**-ДНК (Б) в атмосферных и анаэробных условиях. Графики построены на основе данных из Таблицы 14.

Далее перед нами стояла задача проверить, повлияет ли присутствие дополнительной функциональной молекулы, а именно стирилового красителя, на фототоксические свойства производных хинолизиния в составе конъюгатов. Для этой цели была изучена возможность фотоиндуцированного повреждения плазмиды рВR322 на примере конъюгата **8**.

Раствор конъюгата **8** с плазмидной ДНК облучали светодиодами (395 нм, 5,2 мВт/см²) с увеличением времени облучения (Рис. 74, Таблица 15). В этом случае также наблюдалось постепенное фотоиндуцированное повреждение рВR322 с образованием линейной формы и небольшого количества открытой кольцевой формы. Через 27 минут воздействия светом было повреждено 66% плазмиды, тогда как в случае исходного производного **19** разрушение составило

87% при том же времени облучения. Снижение эффективности повреждения в случае конъюгата **8** может быть обусловлено частичным переносом энергии от производного хинолизиния на стирильный краситель (Таблица 9). Таким образом, можно считать, что добавление другой молекулы к производным хинолизиния не оказывает значительного влияния на их фотоцитотоксическое действие в отношении плазмидной ДНК, и эффективность повреждения ДНК для **8** остается сопоставимой, несмотря на одновременный перенос энергии.

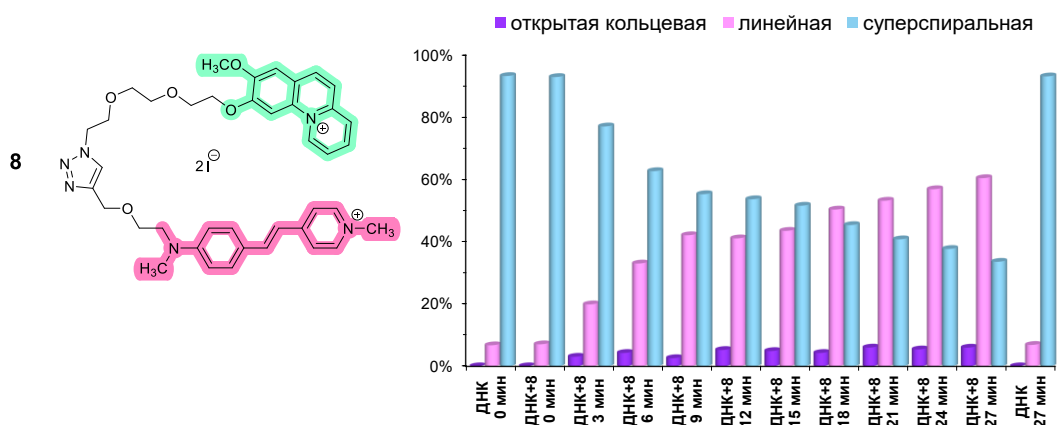


Рисунок 74 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смеси **8**-ДНК при различном времени облучения. График построен на основе данных из Таблицы 15.

Таблица 15 – Электрофореграммы фоторазрушения pBR322 в присутствии **8** в зависимости от времени облучения. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $\lambda_{\text{обл}} = 395$ нм.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_8/10^{-5}$, М	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
время обл., мин	0	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	27
откр. кольц., %	0,0	0,0	3,1	4,3	2,6	5,2	4,9	4,3	6,0	5,4	6,0	0,0
линейная, %	6,7	7,1	19,9	33,0	42,1	41,1	43,5	50,4	53,2	56,9	60,4	6,9
суперспираль, %	93,3	92,9	77,1	62,7	55,3	53,7	51,6	45,4	40,8	37,7	33,6	93,1

На заключительном этапе были проведены клеточные исследования³ визуализации и фотоцитотоксичности на линии колоректальной карциномы человека НСТ116 на примере соединений **19**, **54** и **8**. Фотодинамическая терапия представляет значительный интерес для лечения различных типов рака, включая те, которые не поддаются стандартным протоколам. Это неинвазивная и целенаправленная терапия, так как воздействию света подвергаются только участки опухоли, что приводит к минимальному повреждению нормальных органов и тканей. Одним из ограничений ФДТ является низкая светопропускаемость тканей, что делает ее

³ Экспериментальные данные получены в ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Чмелюк Н.С. и д.х.н., проф. Абакумовым М.А.

непригодной для всех типов рака. В свою очередь, колоректальный рак благодаря своей локализации является одним из тех типов рака, которые могут поддаваться лечению ФДТ [237–239].

Исследование внутриклеточной локализации показало, что производное хинолизиния **19**, как и ожидалось, демонстрирует низкую флуоресценцию в клеточной среде, поэтому определить его локализацию в клетках не представляется возможным. В то же время для стирилового красителя **54** и конъюгата **8** наблюдался яркий флуоресцентный сигнал (Рис. 75) со значительной колокализацией с митохондриальным трекером TMRE в клетках HCT116 (коэффициенты Мандерса 0,7-0,9). Таким образом, можно заметить, что стирильный краситель в составе конъюгата выступает в качестве векторной молекулы, способствуя локализации бис-хромофорной системы в митохондриях.

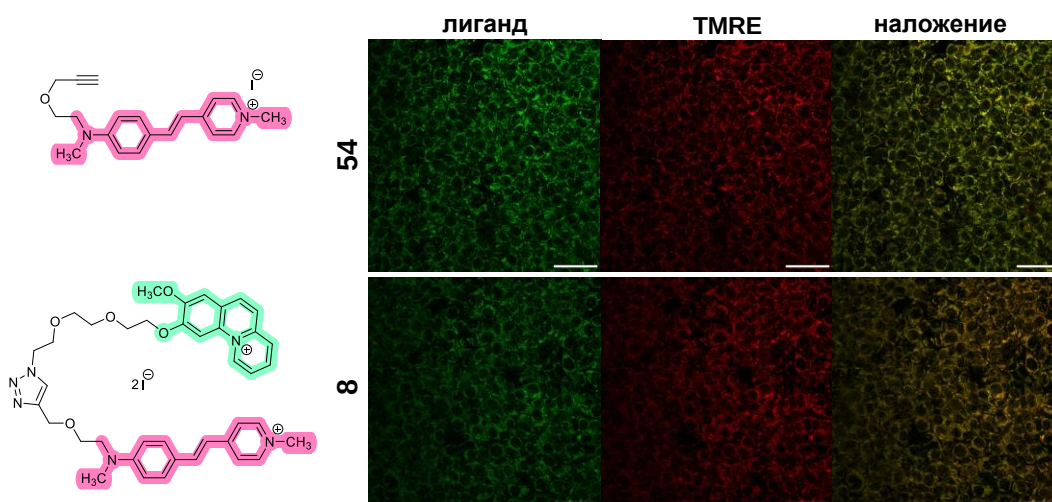


Рисунок 75 – Флуоресцентная визуализация и колокализация соединений **54** и **8** с митохондриальным трекером TMRE в клетках HCT116. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, возбуждение 488 нм, эмиссия 600/40 нм, $C = 1$ мкМ. TMRE: возбуждение 561 нм, эмиссия 600/40 нм. Метка масштаба 50 мкм.

Помимо гель-электрофореза фототоксичность соединений **19** и **8** была также показана с помощью клеточных исследований. Генерация АФК на клеточной линии HCT116 была продемонстрирована с помощью набора для анализа клеточных АФК, содержащего краситель Deep Red (Abcam). Краситель Deep Red проникает в клетки и при взаимодействии с АФК, особенно с супероксидами и гидроксильными радикалами, начинает демонстрировать интенсивную флуоресценцию, что можно наблюдать с помощью флуоресцентной микроскопии.

Сами соединения не проявляют значительной токсичности в широком диапазоне концентраций, в то время как облучение значительно снижает жизнеспособность клеток (Рис. 76). Стоит отметить, что используемый свет ($\lambda_{\text{обл}} = 395$ нм) снижает жизнеспособность клеток относительно контроля примерно на 30% при длительном воздействии. Полученные данные согласуются с литературными данными для фотосенсибилизаторов различных типов,

возбуждаемых коротковолновым светом [240, 241]. Тем не менее, значительного увеличения образования АФК во время облучения клеток в отсутствие соединений обнаружено не было (Рис. 76, Б, контроль), что может быть связано с различными факторами, включая функционирование собственных антиоксидантных систем клетки. При этом, в присутствии **19** или **8** облучение вызывает значительное образование АФК (Рис. 76, Б), что приводит к гибели клеток и снижению IC_{50} (Рис. 76, В). Таким образом, оба соединения одинаково эффективны в образовании АФК и снижении выживаемости клеток после облучения. В связи с этим конъюгация производных хинолизиния со стироловым красителем не приводит к ухудшению их фотосенсибилизирующих свойств, что может стать перспективной платформой для разработки фотоуправляемых полифункциональных терапевтических агентов.

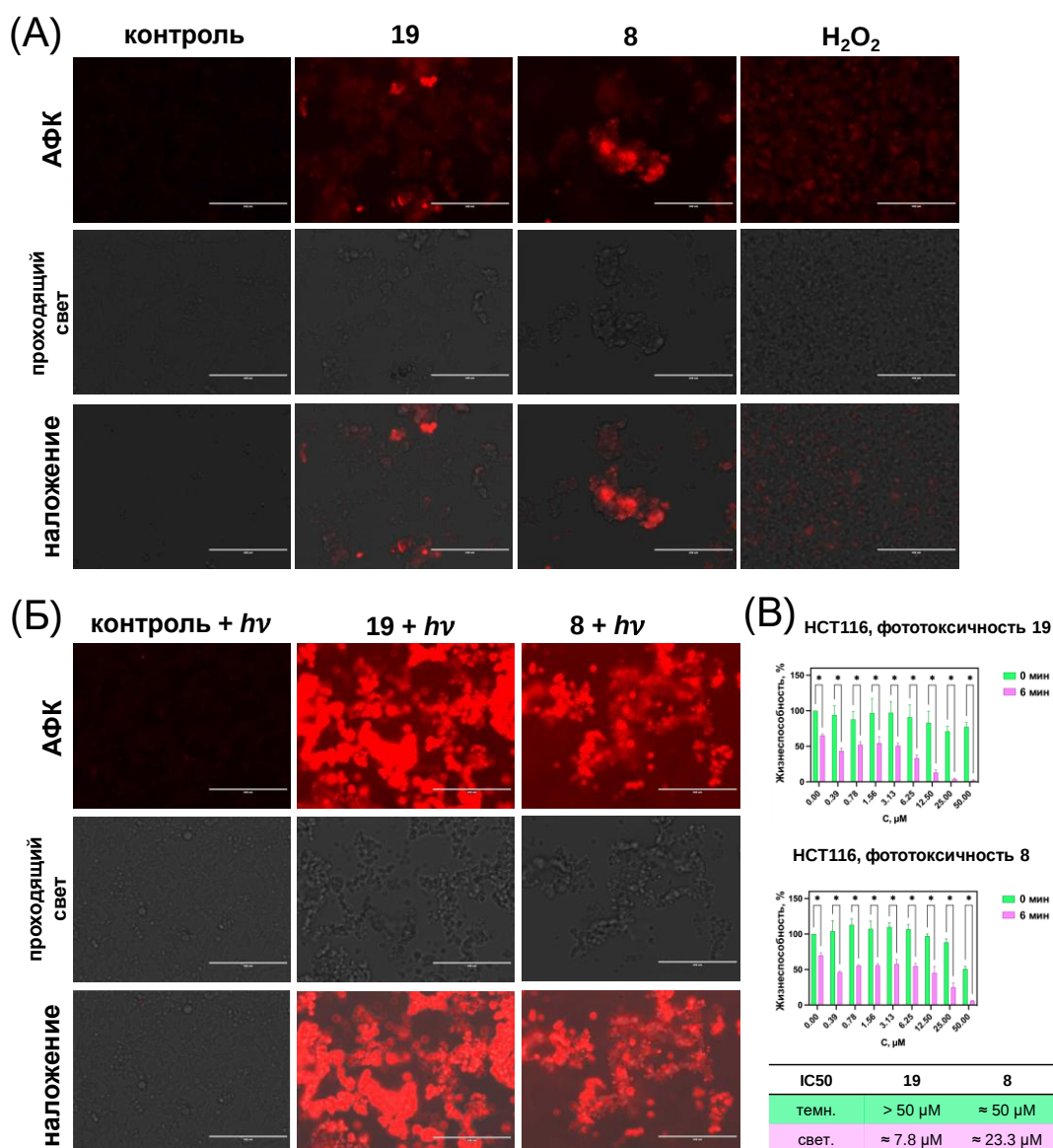


Рисунок 76 – Клетки НСТ116, инкубированные **19** и **8** (25 μM), до (А) и после (Б) облучения светом ($\lambda_{обл} = 395$ нм) в течение 6 мин. Красный флуоресцентный сигнал – набор для обнаружения АФК, эпифлуоресцентная микроскопия, возбуждение 635/18 нм, эмиссия 692/40 нм. Метка масштаба 200 мкм. (В) Фотоцитотоксичность **19** и **8** для клеток НСТ116.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были зарегистрированы на спектрометрах Bruker Avance 300, Bruker Avance 400, Bruker Avance 600 и Varian Inova 400 с использованием ампул диаметром 5 мм. Химические сдвиги для ядер ^1H и ^{13}C определялись с точностью 0,01 и 0,1 м.д. относительно остаточных сигналов растворителя и пересчитаны к внутреннему стандарту (TMC). Значения констант спин-спинового взаимодействия определялись с точностью 0,1 Гц. В качестве растворителей использовались $\text{DMCO-}d_6$, CD_3CN , CDCl_3 , ацетон- d_6 , CD_3OD , D_2O , толуол- d_8 . Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовались двумерные методики gs-HSQC, gs-HMBS и gs-COSY с импульсными полевыми градиентами. Для структурных отнесений были использованы фазочувствительная gs-NOESY или gs-ROESY 2D-методики.

Контроль за ходом реакций, хроматографической очисткой и индивидуальностью полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC- Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ производства фирмы «Macherey-Nagel» и DC-Alufolien Aluminium oxide 60 F₂₅₄ neutral производства фирмы «Merck». В качестве проявителя использовалась УФ лампа. Колоночная хроматография осуществлялась с использованием силикагеля Silicagel 60 с размером частиц 0,045-0,100 мм и нейтрального оксида алюминия Brockmann I с размером частиц 50-200 мкм производства фирмы «Acros Organics» с использованием флеш-хроматографа Biotage Isolera Prime.

Температуры плавления измерялись в капиллярах на приборе Mel-temp II и не корректировались. Элементный анализ был проведен на элементном анализаторе Carlo Erba 1108 в лаборатории микроанализа ИНЭОС им. А. Н. Несмеянова РАН. Масс-спектры с ионизацией электронным ударом (метод ЭУ) были получены с использованием прибора Finnigan Polaris Q (ионная ловушка). Энергия ионизирующих электронов составляла 70 эВ. Масс-спектры с ионизацией электрораспылением (метод ИЭР) были получены с использованием масс-спектрометра Shimadzu LCMS-2020 High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer с квадрупольным детектором, температурой линии десольватации/термического блока 250/400°C и напряжением ионизации 4,5 кВ. Оптимальная скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Для снятия спектров использовались растворы исследуемых соединений в ацетонитриле, метаноле и воде с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ М. Расчет изотопного состава комплексов производился с помощью Molecular Weight Calculator (Matthew Monroe, Version 6.37). Масс-спектры МАЛДИ были получены с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF MS Shimadzu Biotech AXIMA Confidence в режиме рефлектрона. Ионизация осуществлялась азотным лазером (337 нм) с энергией, немного превышающей пороговое значение для образования ионов. В качестве матрицы использовалась α -циано-4-гидроксикоричная кислота.

Фотолиз проводили облучением разбавленных растворов светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 (120 Вт) или в фотореакторе с погружной ртутной лампой (125 Вт). Отдельные линии, а также области спектра ртутной лампы были выделены с помощью стеклянных фильтров из стандартного набора цветных оптических стекол (313 нм; 365 нм; УФ фильтр с областью пропускания от 270 до 380 нм; 405 нм; 436 нм). Интенсивность света измерялась с помощью измерителя мощности Nova P/N 7Z01500, оснащенного датчиком измерения тепловой мощности/энергии 3A-FS P/N 7Z02628.

Анализ смесей методом аналитической ВЭЖХ проводился на хроматографе Dionex Ultimate 3000 UHPLC с использованием аналитической колонки Диасфер-С18, 110 Å, 7 мкм, 4,6×250 мм при скорости потока 1,0 мл/мин. Очистка соединений с помощью препаративной ВЭЖХ осуществлялась с использованием хроматографа Azura Pilot PREP LC 100 LPG и колонки Eurospher II 100-10 C18 250×20 мм при скорости потока 15 мл/мин. В качестве элюента использовались смеси ацетонитрила, метанола и воды.

Электронные спектры поглощения измерялись на двухканальном спектрофотометре Varian Cary 300. Регистрация спектров электронного поглощения при непрерывном облучении образцов при перемешивании проводилась с помощью высокоскоростного оптоволоконного спектрометра «AvaSpec-2048-USB2, Avantes BV». Для определения кинетических и термодинамических характеристик термической релаксации анализировалась кинетика изменений поглощения длинноволновой полосы при различных температурах в полной темноте. Сканирующий свет, необходимый для регистрации спектра поглощения, отключался между измерениями, время его воздействия на раствор во время записи спектра составляло менее 1 с на 1 спектр. Температура поддерживалась постоянной с помощью жидкостного термостата MLW U8, соединенного с держателем ячейки через водоблок MCW-NBMAX (Swiftech).

Спектры флуоресценции были зарегистрированы на спектрофлуориметрах Varian Cary Eclipse и FluoroLog-3-221 при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в кварцевых кюветах ($l = 10$ мм). Наблюдаемая флуоресценция детектировалась под прямым углом относительно пучка возбуждения. Измеренные спектры флуоресценции были скорректированы по отношению к чувствительности измеряющего фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Для снятия спектров поглощения и флуоресценции использовались спектроскопически чистые растворители фирм Aldrich, J.T.Baker и Acros. Приготовление растворов и все эксперименты с фоточувствительными соединениями проводились в темной комнате при красном свете.

Спектры кругового дихроизма были зарегистрированы на автоматическом записывающем дихрографе СКД-2МУФ и спектрометре Biologic MOS-500 при помещении исследуемых растворов в кварцевые кюветы ($l = 10, 2$ или 1 мм).

Квантово-химические расчеты были проведены в программном комплексе MOPAC 2016 с использованием полуэмпирического метода PM7. Конфигурационное взаимодействие включало 8 высших занятых и 8 низших вакантных молекулярных орбиталей. Итерационная процедура продолжалась до тех пор, пока разница в энергии молекулы для двух соседних итераций не стала превышать 0,01 ккал/моль. Влияние природы растворителя учитывалось в соответствии с моделью COSMO (COnductorlikeScreeningMOdel), встроенной в MOPAC 2016.

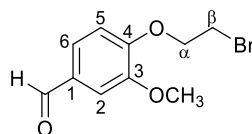
Исходные реагенты 1,2-дибромэтан, 1,5-дибромпентан, 1,10-дибромдекан, 1,2-дихлорэтан, йодметан, 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этанол, 1-хлор-2-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)этан, пропаргил бромид, ванилин, 3,4-диметоксибензальдегид, 4-диметиламинобензальдегид, 4-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)бензальдегид, 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ол, карбонат калия, карбонат натрия, гидроксид калия, гидроксид натрия, хлорид натрия, диизопропилэтиламин, 4-пиколин, 2-пиколин, 2-метилхинолин, 1-метилизохинолин, 3-метилизохинолин, пиперидин, пирролидин, соляная кислота, уксусная кислота, *n*-толуолсульфокислота, йодоводородная кислота, тионил хлорид, *m*-хлорнадбензойная кислота, азид натрия, йодид калия, бромид тетрабутиламмония, сульфат меди(II), йодид меди(I), аскорбат натрия, сульфат натрия, сульфат магния являются коммерчески доступными препаратами (фирмы Aldrich, Acros и др) и были использованы без дополнительной очистки. Использувавшиеся растворители ДМФА, ацетонитрил, хлористый метилен, толуол, этанол, *N,N*-диметиланилин, 2-этоксиэтанол, этилацетат, гексан, диэтиловый эфир, метанол, хлороформ, этилацетат также являются коммерчески доступными.

4.1 Синтез соединений

Общая методика O-алкилирования ванилина с получением соединений 20-22

Смесь ванилина (2,50 ммоль), соответствующего дигалогенпроизводного (1,2-дибромэтан для **20**, 1,5-дибромпентан для **21** или 1,10-дибромдекан для **22**) (5,00 ммоль), карбоната калия (3,75 ммоль) и йодида калия (0,25 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) кипятили с хлоркальциевой трубкой в течение длительного времени (64-98 часов). После охлаждения осадок отфильтровывали и промывали хлороформом на фильтре. Фильтрат упаривали в вакууме, полученное масло очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, элюент: хлороформ).

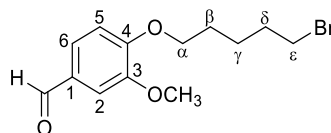
4-(2-Бромэтокси)-3-метоксибензальдегид (20)



По общей методике *O*-алкилирования из ванилина (3,80 г, 0,0250 моль), 1,2-дибромэтана (9,40 г, 0,0500 моль), карбоната калия (5,18 г, 0,0375 моль) и йодида калия (0,42 г, 0,0025 моль) получено соединение **20** (3,10 г, 48%) в виде желтого масла, которое со временем

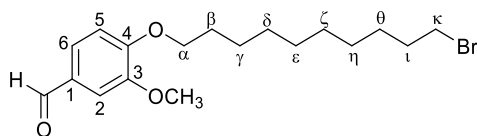
кристаллизуется в белый осадок. Т. пл. 65-67°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 9,85 (с, 1H, CHO), 7,43-7,48 (м, 2H, H-6, H-2), 7,01 (д, J = 7,8 Гц, 1H, H-5), 4,44 (т, 2H, H- α), 3,96 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,73 (т, 2H, H- β) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 190,9 (CHO), 152,9 (C-4), 150,5 (C-3), 130,8 (C-1), 126,4 (C-6), 112,3 (C-5), 109,8 (C-2), 68,7 (C- α), 56,1 ($-\text{OCH}_3$), 28,2 (C- β) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$ (%): вычислено С, 46,36; Н, 4,28; найдено С, 45,84; Н, 4,01. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 258,0; найдено 258,1 [20]⁺.

4-(5-Бромпентилокси)-3-метоксибензальдегид (21)

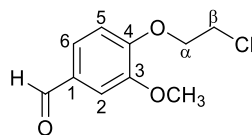


По общей методике *O*-алкилирования из ванилина (3,80 г, 0,0250 моль), 1,5-дибромпентана (11,50 г, 0,0500 моль), карбоната калия (5,18 г, 0,0375 моль) и йодида калия (0,42 г, 0,0025 моль) получено соединение **21** (6,24 г, 83%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 9,87 (с, 1H, CHO), 7,43-7,48 (м, 2H, H-6, H-2), 6,98 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-5), 4,14 (т, 2H, H- α), 3,95 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,47 (т, 2H, H- ϵ), 1,97 (к, 4H, H- β , H- δ), 1,68 (к, 2H, H- γ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 191,0 (CHO), 154,0 (C-4), 149,8 (C-3), 130,0 (C-1), 126,8 (C-6), 111,4 (C-5), 109,2 (C-2), 68,8 (C- α), 56,0 ($-\text{OCH}_3$), 33,5 (C- ϵ), 32,4 (C- δ), 28,1 (C- β), 24,7 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$ (%): вычислено С, 51,84; Н, 5,69; найдено С, 51,68; Н, 5,68. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 300,0; найдено 300,0 [21]⁺.

4-(10-Бромдецилокси)-3-метоксибензальдегид (22)



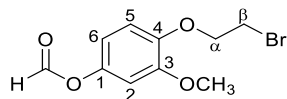
По общей методике *O*-алкилирования из ванилина (760 мг, 5,0 ммоль), 1,10-дибромдекана (3000 мг, 10,0 ммоль), карбоната калия (1035 мг, 7,5 ммоль) и йодида калия (83 мг, 0,5 ммоль) получено соединение **22** (1260 мг, 68%) в виде прозрачного масла, которое со временем кристаллизуется в бежевый осадок. Т. пл. 55-57°C. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9,84 (с, 1H, CHO), 7,54 (дд, J = 8,2, 2,0 Гц, 1H, H-6), 7,39 (с, 1H, H-2), 7,17 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-5), 4,07 (т, 2H, H- α), 3,84 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,52 (т, 2H, H- κ), 1,71-1,80 (м, 4H, H- β , H- ι), 1,26-1,45 (м, 12H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ , H- η , H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 191,8 (CHO), 154,1 (C-4), 149,7 (C-3), 129,9 (C-1), 126,6 (C-6), 112,5 (C-5), 110,1 (C-2), 68,9 (C- α), 56,0 ($-\text{OCH}_3$), 35,7 (C- κ), 32,7 (C- ι), 29,3 (C- β), 29,3 (C- δ), 29,1 ($-\text{CH}_2-$), 28,9 ($-\text{CH}_2-$), 28,5 ($-\text{CH}_2-$), 28,0 (C- θ), 25,9 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{BrO}_3$ (%): вычислено С, 58,22; Н, 7,33; найдено С, 57,87; Н, 7,31. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 370,1; найдено 370,1 [22]⁺.

4-(2-Хлорэтокси)-3-метоксибензальдегид (29) [242]

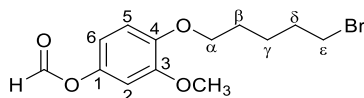
Смесь ванилина (500 мг, 3,3 ммоль), 1,2-дихлорэтана (5,2 мл, 65,7 ммоль), карбоната калия (2271 мг, 16,4 ммоль) и йодида калия (55 мг, 0,3 ммоль) в ДМФА (20 мл) перемешивали при 70°C с хлоркальциевой трубкой в течение 24 ч. После завершения реакции избыток 1,2-дихлорэтана упаривали в вакууме, оставшуюся суспензию выливали на лед. Отделившееся масло экстрагировали диэтиловым эфиром (3×30 мл) и этилацетатом (4×30 мл). Органические экстракты объединяли, промывали водой (3×30 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из диэтилового эфира. Белое твердое вещество, выход 67% (473 мг), т. пл. 59-60°C (лит. т.пл. 60-61°C [242]). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ = 9,87 (с, 1H, CHO), 7,40-7,51 (м, 2H, H-6, H-2), 6,99 (д, J = 7,8 Гц, 1H, H-5), 4,36 (т, 2H, H-α), 3,94 (с, 3H, -OCH₃), 3,89 (т, 2H, H-β) м.д.

Общая методика окисления по Байеру-Виллигеру с получением соединений 23-25, 31, 32

Соединения **20-22**, **29**, **30** (0,3 ммоль) растворяли в хлористом метиле (5 мл), после чего к раствору добавляли *м*-хлорнадбензойную кислоту (0,6 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 3-16 ч реакционную смесь промывали 10%-ным водным раствором Na₂CO₃ (10 мл). Органический слой отделяли и сушили над безводным MgSO₄, растворитель упаривали в вакууме. Полученные продукты использовали на следующем этапе без дополнительной очистки.

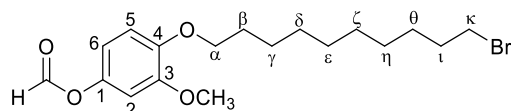
4-(2-Бромэтокси)-3-метоксифенил формат (23)

По общей методике окисления по Байеру-Виллигеру из соединения **20** (1,30 г, 0,005 моль) и *м*-хлорнадбензойной кислоты (1,70 г, 0,010 моль) получено соединение **23** (0,83 г, 60%) в виде желтого масла, которое со временем кристаллизуется. Т. пл. 62-64°C. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ = 8,29 (с, 1H, OCHO), 6,93 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-5), 6,67-6,71 (м, 2H, H-2, H-6), 4,32 (т, 2H, H-α), 3,86 (с, 3H, -OCH₃), 3,66 (т, 2H, H-β) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ = 159,5 (OCHO), 150,6 (C-3), 145,7 (C-1), 144,7 (C-4), 115,4 (C-5), 112,7 (C-6), 106,0 (C-2), 69,7 (C-α), 56,2 (-OCH₃), 28,9 (C-β) м.д. Элементный анализ для C₁₀H₁₁BrO₄ (%): вычислено C, 43,66; H, 4,03; найдено C, 43,32; H, 4,11. Масс-спектр (ЭУ), *m/z*: вычислено 274,0; найдено 245,9 [23-28]⁺.

4-(5-Бромопентилокси)-3-метоксифенил формат (24)

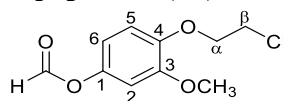
По общей методике окисления по Байеру-Виллигеру из соединения **21** (6,00 г, 0,02 моль) и *м*-хлорнадбензойной кислоты (6,90 г, 0,04 моль) получено соединение **24** (5,18 г, 82%) в виде коричневого масла, которое со временем кристаллизуется. Т. пл. 83-85°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 8,31 (с, 1H, OCH=O), 6,88 (д, J = 8,9 Гц, 1H, H-5), 6,67-6,70 (м, 2H, H-2, H-6), 4,03 (т, 2H, H- α), 3,87 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,46 (т, 2H, H- ϵ), 1,85-1,98 (м, 4H, H- β , H- δ), 1,65 (к, 2H, H- γ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 159,7 (OCH=O), 150,1 (C-3), 146,7 (C-1), 143,7 (C-4), 113,3 (C-5), 112,4 (C-6), 105,6 (C-2), 69,2 (C- α), 56,1 ($-\text{OCH}_3$), 33,6 (C- ϵ), 32,5 (C- δ), 28,4 (C- β), 24,8 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BrO}_4$ (%): вычислено С, 49,23; Н, 5,40; найдено: С, 49,23; Н, 5,18. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 316,0; найдено 288,0 [24-28]⁺.

4-(10-Бромдецилокси)-3-метоксифенил формиат (25)



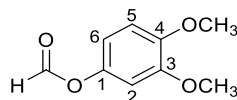
По общей методике окисления по Байеру-Виллигеру из соединения **22** (490 мг, 1,3 ммоль) и *м*-хлорнадбензойной кислоты (460 мг, 2,6 ммоль) получено соединение **25** (360 мг, 72%) в виде желтого масла, которое со временем кристаллизуется. Т. пл. 36-38°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 8,31 (с, 1H, OCH=O), 6,88 (д, J = 9,2 Гц, 1H, H-5), 6,67-6,69 (м, 2H, H-2, H-6), 4,02 (т, 2H, H- α), 3,87 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,43 (т, 2H, H- κ), 1,81-1,91 (м, 4H, H- β , H- ι), 1,32-1,46 (м, 12H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ , H- η , H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 159,7 (OCH=O), 150,1 (C-3), 146,8 (C-1), 143,5 (C-4), 113,0 (C-5), 112,4 (C-6), 105,5 (C-2), 69,4 (C- α), 56,1 ($-\text{OCH}_3$), 34,1 (C- κ), 32,8 (C- ι), 29,4 (C- β), 29,4 (C- δ), 29,3 ($-\text{CH}_2-$), 29,1 ($-\text{CH}_2-$), 28,7 ($-\text{CH}_2-$), 28,2 (C- θ), 25,9 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{BrO}_4$ (%): вычислено С, 55,82; Н, 7,03; найдено С, 55,48; Н, 6,84. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 386,1; найдено 358,1 [25-28]⁺.

4-(2-хлорэтокс)-3-метоксифенил формиат (31)



По общей методике окисления по Байеру-Виллигеру из соединения **29** (473 мг, 2,2 ммоль) и *м*-хлорнадбензойной кислоты (762 мг, 4,4 ммоль) получено соединение **31** (470 мг, 92%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 8,28 (с, 1H, OCH=O), 6,91 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-5), 6,65-6,70 (м, 2H, H-2, H-6), 4,25 (т, 2H, H- α), 3,85 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,82 (т, 2H, H- β) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 159,6 (OCH=O), 150,7 (C-3), 145,9 (C-1), 144,7 (C-4), 115,4 (C-5), 112,7 (C-6), 106,1 (C-2), 70,0 (C- α), 56,2 ($-\text{OCH}_3$), 41,8 (C- β) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_4$ (%): вычислено С, 52,08; Н, 4,81; найдено С, 52,15; Н, 4,88.

3,4-диметоксифенил формиат (32) [243]

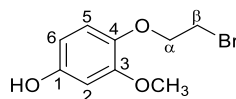


По общей методике окисления по Байеру-Виллигеру из соединения **30** (500 мг, 3 ммоль) и *m*-хлорнадбензойной кислоты (1039 мг, 6 ммоль) получено соединение **32** (435 мг, 79%) в виде желтоватого твердого вещества. Т. пл. 46-48°C, лит. т. пл. 48-50°C [243]. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 8,32 (с, 1H, OCH=O), 6,88 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-5), 6,75-6,69 (м, 2H, H-2, H-6), 3,91 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,89 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$) м.д.

Общая методика гидролиза с получением соединений **26-28**, **33**, **34**

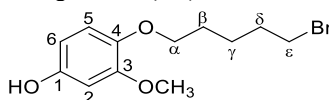
Соединения **23-25**, **31**, **32** (0,2 ммоль) перемешивали в 7%-ном водном растворе соляной кислоты (6 мл) при 70-75°C в течение 3 ч (для **26-28**) или кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч (для **33**, **34**). Затем охлаждали до комнатной температуры, продукт экстрагировали хлористым метилом (2×10 мл). Органические фракции объединяли и сушили над безводным MgSO_4 , после чего растворитель упаривали в вакууме. Полученные продукты использовали на следующем этапе без дополнительной очистки.

4-(2-Бромэтокси)-3-метоксифенол (**26**)

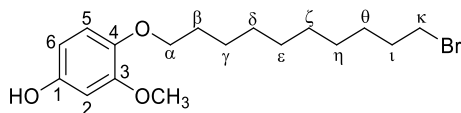


По общей методике гидролиза из соединения **23** (210 мг, 0,8 ммоль) получено соединение **26** (93 мг, 49%) в виде коричневого твердого вещества. Т. пл. 54-56°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 6,84 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-5), 6,49 (д, J = 2,9 Гц, 1H, H-2), 6,34 (дд, J = 8,6, 2,9 Гц, 1H, H-6), 4,27 (т, 2H, H- α), 3,84 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,63 (т, 2H, H- β) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 151,5 (C-1), 151,3 (C-3), 141,3 (C-4), 117,6 (C-5), 106,2 (C-6), 100,9 (C-2), 70,7 (C- α), 55,9 ($-\text{OCH}_3$), 29,3 (C- β) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrO}_3$ (%): вычислено C, 43,75; H, 4,49; найдено C, 43,52; H, 4,57. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 246,0; найдено 246,0 [**26**] $^+$.

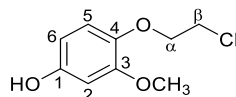
4-(5-Бромопентилокси)-3-метоксифенол (**27**)



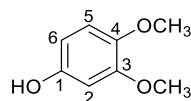
По общей методике гидролиза из соединения **24** (380 мг, 1,2 ммоль) получено соединение **27** (260 мг, 74%) в виде коричневого твердого вещества. Т. пл. 79-81°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 6,76 (д, J = 8,8 Гц, 1H, H-5), 6,47 (д, J = 2,8 Гц, 1H, H-2), 6,33 (дд, J = 8,8, 2,8 Гц, 1H, H-6), 3,96 (т, 2H, H- α), 3,82 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,43 (т, 2H, H- ϵ), 1,79-1,97 (м, 4H, H- β , H- δ), 1,59-1,66 (м, 2H, H- γ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 150,7 (C-1), 150,6 (C-3), 142,2 (C-4), 115,2 (C-5), 106,0 (C-6), 100,8 (C-2), 69,9 (C- α), 55,8 ($-\text{OCH}_3$), 33,7 (C- ϵ), 32,5 (C- δ), 28,5 (C- β), 24,8 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$ (%): вычислено C, 49,84; H, 5,93; найдено C, 49,72; H, 5,91. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 288,0; найдено 288,0 [**27**] $^+$.

4-(10-Бромдецилокси)-3-метоксифенол (28)

По общей методике гидролиза из соединения **25** (360 мг, 0,9 ммоль) получено соединение **28** (240 мг, 73%) в виде коричневого твердого вещества. Т. пл. 42-44°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 6,73 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-5), 6,45 (д, J = 2,9 Гц, 1H, H-2), 6,31 (дд, J = 8,6, 2,9 Гц, 1H, H-6), 3,92 (т, 2H, H- α), 3,80 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,40 (т, 2H, H- κ), 1,74-1,85 (м, 4H, H- β , H- ι), 1,28-1,44 (м, 12H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ , H- η , H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 150,6 (C-1), 150,2 (C-3), 142,6 (C-4), 114,8 (C-5), 105,9 (C-6), 100,8 (C-2), 70,2 (C- α), 55,9 ($-\text{OCH}_3$), 34,1 (C- κ), 32,8 (C- ι), 29,4 (C- β), 29,4 (C- δ), 29,3 ($-\text{CH}_2-$), 29,3 ($-\text{CH}_2-$), 28,7 ($-\text{CH}_2-$), 28,2 (C- θ), 25,9 (C- γ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{BrO}_3$ (%): вычислено С, 56,83; Н, 7,57; найдено С, 56,97; Н, 7,45. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 358,1; найдено 358,1 [**28**] $^+$.

4-(2-хлорэтокс)-3-метоксифенол (33)

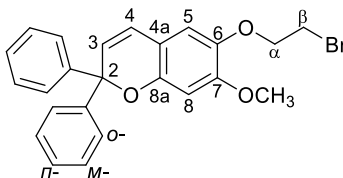
По общей методике гидролиза из соединения **31** (450 мг, 1,95 ммоль) получено соединение **33** (369 мг, 93%) в виде коричневого твердого вещества. Т. пл. 51-53°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 6,82 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-5), 6,47 (д, J = 2,6 Гц, 1H, H-2), 6,32 (дд, J = 8,6, 2,6 Гц, 1H), 4,20 (т, 2H, H- α), 3,83 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,78 (с, 2H, H- β) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ (%): вычислено С, 53,35; Н, 5,47; найдено С, 53,21; Н, 5,52.

3,4-диметоксифенол (34) [243]

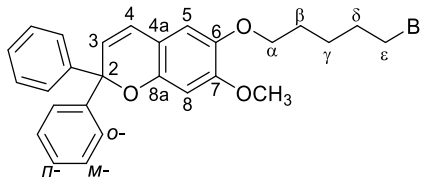
По общей методике гидролиза из соединения **32** (432 мг, 2,4 ммоль) получено соединение **34** (308 мг, 84%) в виде желтоватого твердого вещества. Т. пл. 78-80°C, лит. т. пл. 80-82°C [243]. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 6,75 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-5), 6,50 (д, J = 2,8 Гц, 1H, H-2), 6,36 (дд, J = 8,6, 2,8 Гц, 1H, H-6), 3,87 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,85 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$) м.д.

Общая методика получения хроменов 9-11, 35, 36

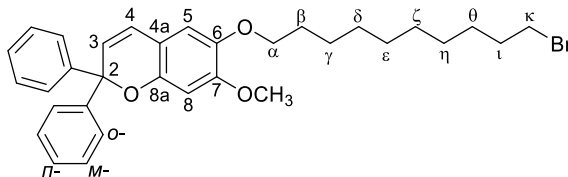
Замещенные фенолы **26-28**, **33**, **34** (0,80 ммоль) и 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ол (0,80 ммоль) растворяли в толуоле (10 мл) при 55-58°C. Затем добавляли *n*-толуолсульфокислоту (0,08 ммоль). Смесь перемешивали при этой температуре в течение 2,5 часов, а затем при кипении толуола в течение еще 4 часов. После этого растворитель упаривали в вакууме, и продукт очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , элюент: хлороформ).

6-(2-бромэтоксид)-7-метокси-2,2-дифенил-2H-хромен (9)

По общей методике из соединения **26** (270 мг, 1,1 ммоль), 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ола (230 мг, 1,1 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (19 мг, 0,1 ммоль) получено соединение **9** (133 мг, 28%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 7,47 (д, J = 8,0 Гц, 4Н, *o*-Н-Ph), 7,33 (т, J = 7,5 Гц, 4Н, *m*-Н-Ph), 7,25 (т, J = 7,5 Гц, 2Н, *n*-Н-Ph), 6,77 (с, 1Н, Н-5), 6,67 (с, 1Н, Н-8), 6,63 (д, J = 9,8 Гц, 1Н, Н-4), 6,21 (д, J = 9,8 Гц, 1Н, Н-3), 4,21 (т, 2Н, Н- α), 3,82 (с, 3Н, -OCH $_3$), 3,66 (т, 2Н, Н- β) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, Ацетон- d_6): δ = 152,6 (C-7), 149,2 (C-8a), 146,4 (2C-Ph), 143,1 (C-6), 129,0 (*m*-4C-Ph), 128,3 (*n*-2C-Ph), 127,7 (*o*-4C-Ph), 127,6 (C-3), 124,0 (C-4), 115,7 (C-5), 114,5 (C-4a), 102,7 (C-8), 83,2 (C-2), 71,4 (C- α), 56,4 (-OCH $_3$), 31,3 (C- β) м.д. Элементный анализ для C $_{24}$ H $_{21}$ BrO $_3$ (%): вычислено С, 65,91; Н, 4,84; найдено С, 66,18; Н, 4,89. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 436,1; найдено 436,1 [**9**] $^+$.

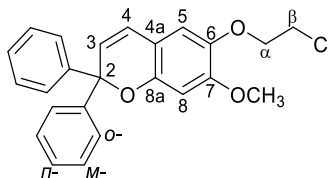
6-[(5-Бромопентил)окси]-7-метокси-2,2-дифенил-2H-хромен (10)

По общей методике из соединения **27** (230 мг, 0,80 ммоль), 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ола (170 мг, 0,80 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (14 мг, 0,08 ммоль) получено соединение **10** (100 мг, 26%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 7,48 (д, J = 8,0 Гц, 4Н, *o*-Н-Ph), 7,33 (т, J = 7,5 Гц, 4Н, *m*-Н-Ph), 7,26 (т, J = 7,5 Гц, 2Н, *n*-Н-Ph), 6,72 (с, 1Н, Н-5), 6,66 (с, 1Н, Н-8), 6,64 (д, J = 10,2 Гц, 1Н, Н-4), 6,22 (д, J = 10,2 Гц, 1Н, Н-3), 3,89 (т, 2Н, Н- α), 3,81 (с, 3Н, -OCH $_3$), 3,52 (т, 2Н, Н- ϵ), 1,90-1,94 (м, 2Н, Н- ϵ), 1,72-1,77 (м, 2Н, Н- β), 1,58-1,64 (м, 2Н, Н- γ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 Гц, CD $_3$ CN): δ = 151,8 (C-7), 147,9 (C-8a), 146,3 (2C-Ph), 144,0 (C-6), 129,1 (*m*-4C-Ph), 128,4 (*n*-2C-Ph), 127,7 (C-3), 127,5 (*o*-4C-Ph), 124,3 (C-4), 114,4 (C-4a), 113,0 (C-5), 102,5 (C-8), 82,9 (C-2), 70,2 (C- α), 56,5 (-OCH $_3$), 35,2 (C- ϵ), 33,3 (C- δ), 29,2 (C- β), 25,5 (C- γ) м.д. Элементный анализ для C $_{27}$ H $_{27}$ BrO $_3$ (%): вычислено С, 67,64; Н, 5,68; найдено С, 67,92; Н, 5,84. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 478,1; найдено 478,0 [**10**] $^+$.

6-(10-бромдецилокси)-7-метокси-2,2-дифенил-2H-хромен (11)

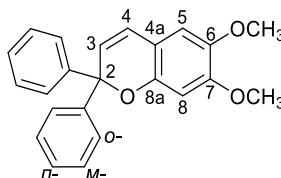
По общей методике из соединения **28** (300 мг, 0,84 ммоль), 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ола (180 мг, 0,84 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (14 мг, 0,08 ммоль) получено соединение **11** (85 мг, 19%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 7,47 (д, J = 7,8 Гц, 4Н, *o*-Н-Ph), 7,33 (т, J = 7,5 Гц, 4Н, *m*-Н-Ph), 7,25 (т, J = 7,5 Гц, 2Н, *n*-Н-Ph), 6,70 (с, 1Н, Н-5), 6,64 (с, 1Н, Н-8), 6,62 (д, J = 9,5 Гц, 1Н, Н-4), 6,20 (д, J = 9,5 Гц, 1Н, Н-3), 3,87 (т, 2Н, Н- α), 3,80 (с, 3Н, -OCH $_3$), 3,49 (т, 2Н, Н- κ), 1,81-1,88 (м, 2Н, Н- ι), 1,67-1,74 (м, 2Н, Н- β), 1,44-1,49 (м, 4Н, Н- γ , Н- θ), 1,29-1,39 (м, 8Н, Н- δ , Н- ϵ , Н- ζ , Н- η) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD $_3$ CN): δ = 151,7 (C-7), 147,8 (C-8a), 146,3 (2C-Ph), 144,1 (C-6), 129,1 (*m*-4C-Ph), 128,4 (*n*-2C-Ph), 127,6 (C-3), 127,5 (*o*-4C-Ph), 124,3 (C-4), 114,4 (C-4a), 112,9 (C-5), 102,5 (C-8), 82,8 (C-2), 70,3 (C- α), 56,5 (-OCH $_3$), 35,4 (C- κ), 33,5 (C- ι), 30,1 (C- β), 30,0 (C- δ), 30,0 (-CH $_2$ -), 29,9 (-CH $_2$ -), 29,3 (-CH $_2$ -), 28,7 (C- θ), 26,6 (C- γ) м.д. Элементный анализ для C $_{32}$ H $_{37}$ BrO $_3$ (%): вычислено С, 69,94; Н, 6,79; найдено С, 69,78; Н, 6,54. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 548,2; найдено 548,3 [**11**] $^+$.

6-(2-хлорэтокси)-7-метокси-2,2-дифенил-2Н-хромен (35)



По общей методике из соединения **33** (369 мг, 1,8 ммоль), 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ола (379 мг, 1,8 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (35 мг, 0,2 ммоль) получено соединение **35** (97 мг, 14%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (300 МГц, Ацетон- d_6): δ = 7,47 (д, J = 7,0 Гц, 4Н, *o*-Н-Ph), 7,33 (т, J = 7,4 Гц, 4Н, *m*-Н-Ph), 7,26 (т, J = 7,2 Гц, 2Н, *n*-Н-Ph), 6,77 (с, 1Н, Н-5), 6,67 (с, 1Н, Н-8), 6,64 (д, J = 9,7 Гц, 1Н, Н-4), 6,22 (д, J = 9,7 Гц, 1Н, Н-3), 4,16 (т, 2Н, Н- α), 3,80-3,84 (м, 5Н, Н- β , -OCH $_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, Ацетон- d_6): δ = 152,6 (C-7), 149,3 (C-8a), 146,6 (2C-Ph), 143,1 (C-6), 129,0 (*m*-4C-Ph), 128,2 (*n*-2C-Ph), 127,7 (*o*-4C-Ph), 127,6 (C-3), 124,2 (C-4), 115,9 (C-5), 114,5 (C-4a), 102,8 (C-8), 83,1 (C-2), 71,7 (C- α), 56,4 (-OCH $_3$), 43,9 (C- β) м.д. Элементный анализ для C $_{24}$ H $_{21}$ ClO $_3$ (%): вычислено С, 73,37; Н, 5,39; найдено С, 73,21; Н, 5,44. Масс-спектр (ЭУ), m/z : вычислено 392,1; найдено 392,3 [**35**] $^+$.

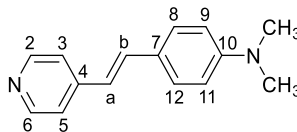
6,7-диметокси-2,2-дифенил-2Н-хромен (36) [244]



По общей методике из соединения **34** (305 мг, 1,98 ммоль), 1,1-дифенилпроп-2-ин-1-ола (412 мг, 1,98 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (38 мг, 0,198 ммоль) получено соединение **36** (102 мг, 15%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD $_3$ CN): δ = 7,46 (д, J = 7,5 Гц, 4Н, *o*-Н-Ph), 7,34 (т, J = 7,5 Гц, 4Н, *m*-Н-Ph), 7,26 (т, J = 7,3 Гц, 2Н, *n*-Н-Ph), 6,67 (с, 1Н, Н-5), 6,63 (с, 1Н, Н-8),

6,61 (д, $J = 9,8$ Гц, 1H, H-4), 6,22 (д, $J = 9,8$ Гц, 1H, H-3), 3,78 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,70 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$) м.д.

(E)-N,N-диметил-4-(2-(пиридин-4-ил)винил)анилин (37) [191]

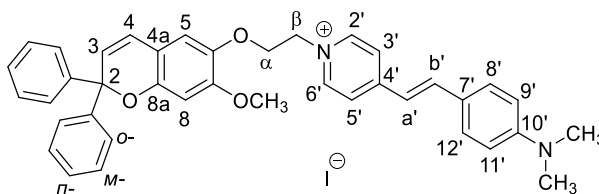


Смесь 4-пиколина (260 мкл, 2,68 ммоль), 4-диметиламинобензальдегида (200 мг, 1,34 ммоль) и гидроксида калия (80 мг, 1,42 ммоль) выдерживали при 125°C при перемешивании в течение 2 часов. Затем реакционную массу охлаждали и добавляли 10 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой и этилацетатом, высушивали. Желтое твердое вещество, выход 36% (108 мг), т. пл. 241-243°C (лит. т.пл. 245-246°C [191]). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): $\delta = 8,46$ (д, $J = 5,9$ Гц, 2H, H-2, H-6), 7,47 (д, $J = 8,6$ Гц, 2H, H-8, H-12), 7,39 (д, $J = 5,9$ Гц, 2H, H-3, H-5), 7,35 (д, $J = 16,5$ Гц, 1H, H-b), 6,91 (д, $J = 16,5$ Гц, 1H, H-a), 6,75 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H, H-9, H-11), 2,97 (с, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) м.д.

Общая методика получения конъюгатов 1-3

Смесь производного хромена **9-11** (0,1 ммоль), стирилового красителя **37** (0,1 ммоль) и йодида калия (0,1 ммоль) в ацетонитриле (6 мл) кипятили с хлоркальциевой трубкой в течение 40 часов. После охлаждения реакционную массу фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Полученный осадок кипятили в этилацетате, затем отфильтровывали и высушивали.

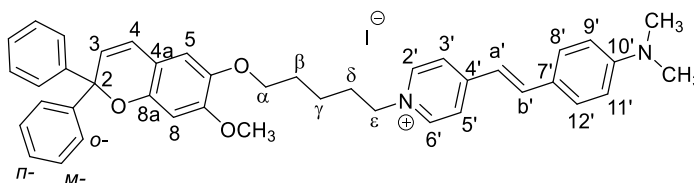
(E)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(2-((7-метокси-2,2-дифенил-2H-хромен-6-ил)окси)этил)пиридин-1-ий йодид (1)



По общей методике из производного хромена **9** (54 мг, 0,12 ммоль), стирилового красителя **37** (28 мг, 0,12 ммоль) и йодида калия (20 мг, 0,12 ммоль) получено соединение **1** (30 мг, 38%) в виде красного твердого вещества. Т. пл. = 178-180°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): $\delta = 8,43$ (д, $J = 6,8$ Гц, 2H, H-2', H-6'), 7,85 (д, $J = 6,8$ Гц, 2H, H-3', H-5'), 7,77 (д, $J = 15,9$ Гц, 1H, H-b'), 7,59 (д, $J = 8,7$ Гц, 2H, H-8', H-12'), 7,42 (д, $J = 7,3$ Гц, 4H, *o*-H-Ph), 7,32 (т, $J = 7,3$ Гц, 4H, *m*-H-Ph), 7,25 (т, 2H, *n*-H-Ph), 7,06 (д, $J = 15,9$ Гц, 1H, H-a'), 6,78 (д, $J = 8,7$ Гц, 2H, H-9', H-11'), 6,68 (с, 1H, H-5), 6,62 (с, 1H, H-8), 6,57 (д, $J = 9,7$ Гц, 1H, H-4), 6,22 (д, $J = 9,7$ Гц, 1H, H-3), 4,63 (т, 2H, H- β), 4,28 (т, 2H, H- α), 3,70 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,04 (с, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): $\delta = 156,0$ (C-4'), 153,6 (C-10'), 152,4 (C-7), 149,4 (C-8a), 146,1 (2C-Ph), 144,8 (C-2', C-6'), 143,9 (C-6), 142,5 (C-b'), 131,4 (C-8', C-12'), 129,2 (*m*-4C-Ph), 128,5 (*n*-2C-Ph), 128,1 (C-3), 127,5 (*o*-4C-Ph), 123,8 (C-4), 123,5 (C-7'), 123,1 (C-3', C-5'), 117,7 (C-a'), 115,8 (C-5), 114,6 (C-4a), 113,0 (C-9', C-

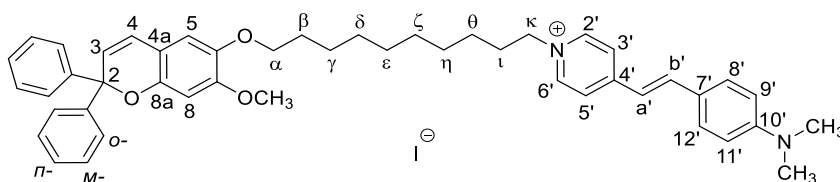
11'), 102,7 (C-8), 83,1 (C-2), 70,1 (C- α), 60,5 (C- β), 56,6 (-OCH₃), 40,3 (-N(CH₃)₂) м.д. Элементный анализ для C₃₉H₃₇N₂O₃I (%): вычислено С, 66,10; Н, 5,26; N, 3,95; найдено С, 65,92; Н, 5,38; N, 3,91. Масс-спектр (ИЭР) раствора **1** в CH₃CN, *m/z*: вычислено 581,3; найдено 581,4 [1-I]⁺.

(Е)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(5-(7-метокси-2,2-дифенил-2Н-хромен-6-илокси)пентил)пиридиinium йодид (2)



По общей методике из производного хромена **10** (50 мг, 0,1 ммоль), стирилового красителя **37** (24 мг, 0,1 ммоль) и йодида калия (17 мг, 0,1 ммоль) получено соединение **2** (23 мг, 31%) в виде красного твердого вещества. Т. пл. = 154-156°C. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN): δ = 8,36 (д, *J* = 6,5 Гц, 2H, H-2', H-6'), 7,82 (д, *J* = 6,5 Гц, 2H, H-3', H-5'), 7,75 (д, *J* = 15,9 Гц, 1H, H-b'), 7,58 (д, *J* = 8,8 Гц, 2H, H-8', H-12'), 7,45 (д, 4H, *o*-H-Ph), 7,33 (т, 4H, *m*-H-Ph), 7,26 (т, 2H, *n*-H-Ph), 7,04 (д, *J* = 15,9 Гц, 1H, H-a'), 6,77 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-9', H-11'), 6,66 (с, 1H, H-5), 6,63 (с, 1H, H-8), 6,59 (д, *J* = 9,6 Гц, 1H, H-4), 6,22 (д, *J* = 9,6 Гц, 1H, H-3), 4,35 (т, 2H, H- ϵ), 3,87 (т, 2H, H- α), 3,75 (с, 3H, -OCH₃), 3,04 (с, 6H, -N(CH₃)₂), 1,95-2,00 (м, 2H, H- β), 1,70-1,77 (м, 2H, H- δ), 1,43-1,48 (м, 2H, H- γ) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 155,7 (C-4'), 153,6 (C-10'), 151,8 (C-7), 148,0 (C-8a), 146,3 (2C-Ph), 144,0 (C-2', C-6'), 143,9 (C-6), 143,7 (C-b'), 131,4 (C-8', C-12'), 129,2 (*m*-4C-Ph), 128,5 (*n*-2C-Ph), 127,8 (C-3), 127,5 (*o*-4C-Ph), 124,3 (C-7'), 123,5 (C-3', C-5'), 123,5 (C-4), 117,7 (C-a'), 114,5 (C-4a), 113,1 (C-5), 113,0 (C-9', C-11'), 102,6 (C-8), 82,9 (C-2), 70,0 (C- ϵ), 60,8 (C- α), 56,6 (-OCH₃), 40,3 (-N(CH₃)₂), 31,3 (C- δ), 29,2 (C- β), 23,3 (C- γ) м.д. Элементный анализ для C₄₂H₄₃N₂O₃I (%): вычислено С, 67,20; Н, 5,77; N, 3,73; найдено С, 66,83; Н, 5,71; N, 3,76. Масс-спектр (ИЭР) раствора **2** в CH₃CN, *m/z*: вычислено 623,3; найдено 623,5 [2-I]⁺.

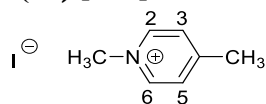
(Е)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-(10-(7-метокси-2,2-дифенил-2Н-хромен-6-илокси)децил)пиридиinium йодид (3)



По общей методике из производного хромена **11** (59 мг, 0,1 ммоль), стирилового красителя **37** (24 мг, 0,1 ммоль) и йодида калия (17 мг, 0,1 ммоль) получено соединение **3** (42 мг, 51%) в виде красного твердого вещества. Т. пл. = 141-143°C. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN): δ = 8,32 (д, *J* = 6,9 Гц, 2H, H-2', H-6'), 7,83 (д, *J* = 6,9 Гц, 2H, H-3', H-5'), 7,75 (д, *J* = 16,3 Гц, 1H, H-b'), 7,58 (д, *J* = 8,8 Гц, 2H, H-8', H-12'), 7,45 (д, *J* = 7,7 Гц, 4H, *o*-H-Ph), 7,34 (т, 4H, *m*-H-Ph), 7,26 (т, 2H, *n*-H-Ph), 7,05 (д, *J* = 16,3 Гц, 1H, H-a'), 6,78 (д, *J* = 8,8 Гц, 2H, H-9', H-11'), 6,65 (с, 1H, H-5), 6,63 (с, 1H,

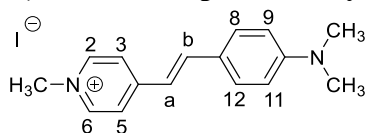
H-8), 6,59 (д, $J = 9,7$ Гц, 1H, H-4), 6,22 (д, $J = 9,7$ Гц, 1H, H-3), 4,31 (т, 2H, H-к), 3,85 (т, 2H, H-α), 3,77 (с, 3H, -OCH₃), 3,04 (с, 6H, -N(CH₃)₂), 1,78 (т, 2H, H-ι), 1,64-1,71 (м, 2H, H-β), 1,27-1,40 (м, 12H, H-γ, H-δ, H-ε, H-ζ, H-η, H-θ) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (100 МГц, CD₃CN): δ = 155,7 (C-4'), 153,5 (C-10'), 151,8 (C-7), 147,8 (C-8a), 146,3 (2C-Ph), 144,1 (C-2', C-6'), 144,0 (C-6), 143,7 (C-b'), 131,3 (C-8', C-12'), 129,2 (*m*-4C-Ph), 128,5 (*n*-2C-Ph), 127,7 (C-3), 127,5 (*o*-4C-Ph), 124,3 (C-7'), 123,6 (C-3', C-5'), 123,5 (C-4), 117,7 (C-a'), 114,5 (C-4a), 113,0 (C-5), 113,0 (C-9', C-11'), 102,6 (C-8), 82,9 (C-2), 70,4 (C-κ), 61,0 (C-α), 56,6 (-OCH₃), 40,3 (-N(CH₃)₂), 31,6 (C-ι), 30,1 (C-β), 29,9 (-CH₂-), 29,9 (-CH₂-), 29,8 (-CH₂-), 29,5 (-CH₂-), 26,7 (C-γ), 26,5 (C-θ) м.д. Элементный анализ для C₄₇H₅₃N₂O₃I (%): вычислено С, 68,77; Н, 6,51; N, 3,41; найдено С, 68,81; Н, 6,49; N, 3,36. Масс-спектр (ИЭР) раствора **3** в CH₃CN, *m/z*: вычислено 693,9; найдено 693,6 [3-I]⁺.

1,4-диметилпиридин-1-иум йодид (**38**) [245]



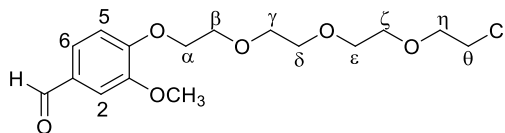
Смесь 4-пиколина (1.95 мл, 0.02 моль) и йодметана (3.74 мл, 0.06 моль) в диэтиловом эфире (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 часов. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре диэтиловым эфиром и высушивали. Бежевое твердое вещество, выход 86% (4.06 г), т. пл. 147-149°C (лит. т. пл. 148-150°C [245]). ¹H ЯМР (400 Гц, ДМСО-*d*₆): δ = 8,82 (д, 2H, H-2, H-6), 7,95 (д, 2H, H-3, H-5), 4,27 (с, H, -N⁺CH₃), 2,59 (с, 3H, -CH₃) м. д. Элементный анализ для C₇H₁₀NI (%): вычислено С 35,77, Н 4,29, N 5,96; найдено С 35,66, Н 4,42, N 5,85.

(*E*)-4-(4-(диметиламино)стирил)-1-метилпиридин-1-иум йодид (**39**) [192]



Смесь 1,4-диметилпиридин-1-иум йодида **38** (80 мг, 0,34 ммоль) и 4-(диметиламино)бензальдегида (51 мг, 0,34 ммоль) в абсолютированном этиловом спирте (7 мл) нагревали до полного растворения. Затем в реакционную массу добавляли пиперидин (33 мкл, 0,34 ммоль) и перемешивали при кипении с хлоркальциевой трубкой в течение 15 часов. Далее растворитель упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием градиентного элюирования (хлористый метилен → хлористый метилен/метанол 65:35). Красное твердое вещество, выход 57% (71 мг), т. пл. 255-257°C. ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O): δ = 8,42 (д, $J = 6,3$ Гц, 2H, H-2, H-6), 7,90 (д, $J = 6,3$ Гц, 2H, H-3, H-5), 7,75 (д, $J = 16,1$ Гц, 1H, H-b), 7,66 (д, $J = 8,7$ Гц, 2H, H-8, H-12), 7,11 (д, $J = 16,1$ Гц, 1H, H-a), 6,94 (д, $J = 8,7$ Гц, 2H, H-9, H-11), 4,20 (с, 3H, -N⁺CH₃), 3,01 (с, 6H, -N(CH₃)₂) м.д.

4-(2-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-метоксибензальдегид (40)

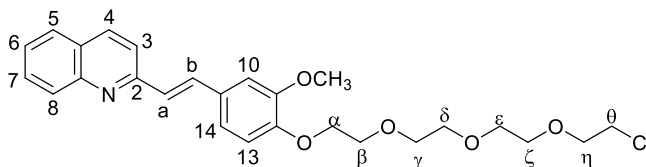


Смесь ванилина (913 мг, 6,0 ммоль), 1-хлор-2-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)этана (2080 мг, 9,0 ммоль), карбоната калия (1244 мг, 9,0 ммоль) и йодида калия (100 мг, 0,6 ммоль) кипятили в ацетонитриле (30 мл) с хлоркальциевой трубкой в течение 52 ч. После охлаждения остаток отфильтровывали и промывали хлороформом на фильтре. Фильтрат упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO_2 с использованием градиентного элюирования (гексан $\rightarrow$ гексан/этилацетат 30:70) с получением производного бензальдегида **40**. Светло-желтое масло, выход 65% (1352 мг). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): δ = 9,82 (с, 1H, CHO), 7,41 (дд, J = 8,1, 1,9 Гц, 1H, H-6), 7,38 (д, J = 1,9 Гц, 1H, H-2), 6,99 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-5), 4,25 (т, 2H, H- α), 3,89-3,93 (м, 5H, H- β , $-\text{OCH}_3$), 3,71-3,75 (м, 4H, H- η , H- θ), 3,58-3,68 (м, 8H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 191,0 (CHO), 153,9 (C-4), 149,9 (C-3), 130,3 (C-1), 126,7 (C-6), 111,9 (C-5), 109,3 (C-2), 71,4 (C- η), 71,0 (C- ζ), 70,7 (C- ϵ), 70,7 (C- δ), 70,6 (C- γ), 69,4 (C- β), 68,5 (C- α), 56,0 ($-\text{OCH}_3$), 42,8 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClO}_6$ (%): вычислено С, 55,41; Н, 6,69; найдено С 54,98; Н, 6,83. Масс-спектр (ИЭР) раствора **40** в CH_3CN , m/z : вычислено 346,1; найдено 369,2 [**40**+Na] $^+$.

*Общая методика конденсации Кневенагеля с получением гетеростильбенов **12**, **13***

Раствор замещенного бензальдегида **40** (0,6 ммоль), 2-метилхинолина (для **12**, 0,6 ммоль) или 1-метилизохинолина (для **13**, 0,6 ммоль), пиперидина (0,6 ммоль для **12**; 1,8 ммоль для **13**) и уксусной кислоты (0,7 ммоль для **12**; 2,5 ммоль для **13**) в толуоле (3 мл) перемешивали при кипении в течение 17 ч (для **12**) и 29 ч (для **13**) в атмосфере аргона. Затем растворитель упаривали в вакууме, и продукт выделяли методом колоночной хроматографии на SiO_2 с использованием градиентного элюирования (гексан $\rightarrow$ гексан/этилацетат 65:35 для **12**; хлористый метилен $\rightarrow$ хлористый метилен/ацетонитрил 95:5 для **13**).

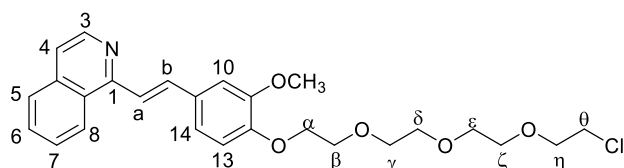
(E)-2-(4-(2-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)хинолин (12)



По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **40** (200 мг, 0,58 ммоль), 2-метилхинолина (78 мкл, 0,58 ммоль), пиперидина (57 мкл, 0,58 ммоль) и уксусной кислоты (40 мкл, 0,69 ммоль) получено соединение **12** (119 мг, 44%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 8,22 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-4), 7,97 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-8), 7,86 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-5), 7,70-7,75 (м, 3H, H-b, H-7, H-3), 7,52 (т, 1H, H-6), 7,33 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-a), 7,32 (д, J = 1,8 Гц,

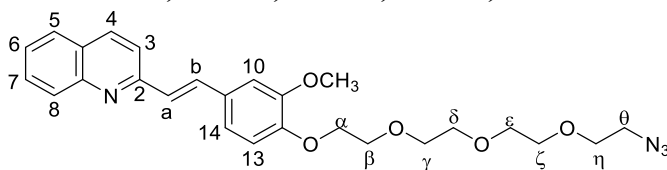
1H, H-10), 7,19 (дд, $J = 8,3, 1,8$ Гц, 1H, H-14), 6,96 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, H-13), 4,13 (т, 2H, H-α), 3,90 (с, 3H, -OCH₃), 3,79 (т, 2H, H-β), 3,68 (т, 2H, H-η), 3,62-3,66 (м, 4H, H-θ, H-ζ), 3,56-3,60 (м, 6H, H-γ, H-δ, H-ε) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 157,2 (C-2), 150,6 (C-11), 150,2 (C-12), 149,2 (C-8a), 137,3 (C-4), 135,0 (C-b), 130,8 (C-9), 130,7 (C-7), 129,8 (C-8), 128,7 (C-5), 128,2 (C-4a), 127,9 (C-a), 127,0 (C-6), 122,1 (C-14), 120,7 (C-3), 114,0 (C-13), 110,8 (C-10), 71,9 (C-η), 71,3 (C-ζ), 71,2 (C-ε), 71,1 (C-γ, C-δ), 70,2 (C-β), 69,1 (C-α), 56,4 (-OCH₃), 44,4 (C-θ) м.д. Элементный анализ для C₂₆H₃₀ClNO₅ (%): вычислено С, 66,17; Н, 6,41; N, 2,97; найдено С, 66,04; Н, 6,52; N, 2,93. Масс-спектр (ИЭР) раствора **12** в CH₃OH, m/z : вычислено 471,2; найдено 494,4 [**12**+Na]⁺ (100%), 510,4 [**12**+K]⁺ (42%).

(E)-1-(4-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)-3-метоксистирил)изохинолин (13)



По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **40** (200 мг, 0,58 ммоль), 1-метилизохинолина (77 мкл, 0,58 ммоль), пиперидина (171 мкл, 1,73 ммоль) и уксусной кислоты (139 мкл, 2,43 ммоль) получено соединение **13** (139 мг, 51%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN): δ = 8,56 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H, H-8), 8,49 (д, $J = 5,6$ Гц, 1H, H-3), 8,02 (д, $J = 15,5$ Гц, 1H, H-a), 7,94 (д, $J = 15,5$ Гц, 1H, H-b), 7,89 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H, H-5), 7,73 (т, 1H, H-6), 7,67 (т, 1H, H-7), 7,62 (д, $J = 5,6$ Гц, 1H, H-4), 7,41 (д, $J = 1,8$ Гц, 1H, H-10), 7,27 (дд, $J = 8,3, 1,8$ Гц, 1H, H-14), 6,97 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, H-13), 4,14 (т, 2H, H-α), 3,93 (с, 3H, -OCH₃), 3,79 (т, 2H, H-β), 3,69 (т, 2H, H-η), 3,62-3,66 (м, 4H, H-θ, H-ζ), 3,56-3,60 (м, 6H, H-γ, H-δ, H-ε) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 155,5 (C-1), 150,6 (C-11), 150,2 (C-12), 143,4 (C-3), 137,7 (C-4a), 136,2 (C-b), 131,2 (C-9), 131,0 (C-6), 128,2 (C-7), 128,2 (C-5), 127,4 (C-8a), 125,6 (C-8), 122,3 (C-14), 121,9 (C-a), 120,5 (C-4), 114,0 (C-13), 111,3 (C-10), 71,9 (C-η), 71,3 (C-ζ), 71,2 (C-ε), 71,1 (C-γ, C-δ), 70,3 (C-β), 69,2 (C-α), 56,5 (-OCH₃), 44,4 (C-θ) м.д. Элементный анализ для C₂₆H₃₀ClNO₅ (%): вычислено С, 66,17; Н, 6,41; N, 2,97; найдено С, 66,29; Н, 6,58; N, 3,02. Масс-спектр (ИЭР) раствора **13** в CH₃OH, m/z : вычислено 471,2; найдено 472,4 [**13**+H]⁺ (83%), 494,4 [**13**+Na]⁺ (100%).

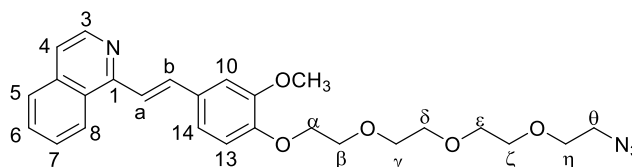
(E)-2-(4-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)-3-метоксистирил)хинолин (41)



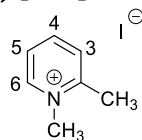
Смесь соединения **12** (111 мг, 0,235 ммоль) и азид натрия (46 мг, 0,706 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) перемешивали при кипении в атмосфере аргона в течение 25 часов. Далее растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли хлористый метилен и отфильтровывали

от неорганических солей. Фильтрат упаривали в вакууме с получением продукта **41**. Желтое масло, выход 98% (110 мг). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 8,20 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-4), 7,99 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-8), 7,84 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-5), 7,70-7,74 (м, 3H, H-b, H-7, H-3), 7,50 (т, J = 8,1 Гц, 1H, H-6), 7,32-7,37 (м, 2H, H-a, H-10), 7,17 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-14), 6,92 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-13), 4,10 (т, 2H, H- α), 3,90 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,77 (т, 2H, H- β), 3,59-3,62 (м, 10H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ , H- η), 3,38 (т, 2H, H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 157,0 (C-2), 150,3 (C-11), 149,8 (C-12), 148,6 (C-8a), 137,6 (C-4), 135,3 (C-b), 131,0 (C-9), 130,8 (C-7), 129,3 (C-8), 128,7 (C-5), 128,2 (C-4a), 127,5 (C-a), 127,1 (C-6), 122,3 (C-14), 120,6 (C-3), 114,0 (C-13), 111,0 (C-10), 71,0 (C- ζ), 70,8 (C- γ , C- δ , C- ϵ), 70,3 (C- β), 69,9 (C- η), 69,0 (C- α), 56,6 ($-\text{OCH}_3$), 51,4 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ (%): вычислено C, 65,26; H, 6,32; N, 11,71; найдено C, 65,22; H, 6,38; N, 11,70. Масс-спектр (ИЭР) раствора **41** в CH_3OH , m/z : вычислено 478,2; найдено 479,2 [**41**+H] $^+$ (100%), 501,2 [**41**+Na] $^+$ (25%).

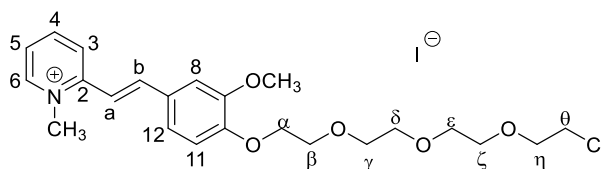
(E)-1-(4-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)изохинолин (42)



Смесь соединения **13** (88 мг, 0,19 ммоль) и азид натрия (61 мг, 0,93 ммоль) в ДМФА (5 мл) перемешивали при 70°C в атмосфере аргона в течение 25 часов. Далее реакционную массу разбавляли водой, после чего экстрагировали хлористым метиленом (3×20 мл). Органические экстракты объединяли, промывали водой (2×30 мл) и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель упаривали в вакууме с получением продукта **42**. Желтое масло, выход 82% (73 мг). ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 8,61 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-8), 8,51 (д, J = 5,5 Гц, 1H, H-3), 8,15 (д, J = 15,4, 1H, H-a), 8,04 (д, J = 15,4 Гц, 1H, H-b), 7,93 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-5), 7,75 (т, J = 7,5 Гц, 1H, H-6), 7,65-7,69 (м, 2H, H-4, H-7), 7,53 (д, J = 2,0 Гц, 1H, H-10), 7,32 (дд, J = 8,3 Гц, 2,0 Гц, 1H, H-14), 7,04 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-13), 4,20 (т, 2H, H- α), 3,94 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,86 (т, 2H, H- β), 3,69-3,71 (м, 4H, H- ζ , H- η), 3,62-3,69 (м, 6H, H- γ , H- δ , H- ϵ), 3,38 (т, 2H, H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, Ацетон- d_6): δ = 155,4 (C-1), 151,0 (C-11), 150,5 (C-12), 143,4 (C-3), 137,8 (C-4a), 136,5 (C-b), 131,4 (C-9), 130,8 (C-6), 128,1 (C-7), 128,0 (C-5), 127,4 (C-8a), 125,5 (C-8), 122,4 (C-14), 121,5 (C-a), 120,2 (C-4), 114,5 (C-13), 111,7 (C-10), 71,5 (C- ζ), 71,4 (C- γ , C- δ), 71,2 (C- ϵ), 70,7 (C- η), 70,3 (C- β), 69,2 (C- α), 56,4 ($-\text{OCH}_3$), 51,4 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ (%): вычислено C, 65,26; H, 6,32; N, 11,71; найдено C, 65,19; H, 6,34; N, 11,68. Масс-спектр (ИЭР) раствора **42** в CH_3OH , m/z : вычислено 478,2; найдено 479,2 [**42**+H] $^+$ (82%), 501,2 [**42**+Na] $^+$ (100%).

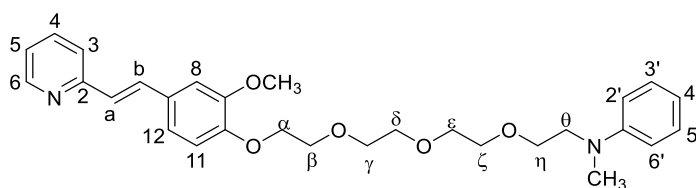
1,2-диметилпиридин-1-иум йодид (43) [246]

Смесь 2-пиколина (1,98 мл, 0,02 моль) и йодметана (3,74 мл, 0,06 моль) в диэтиловом эфире (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре диэтиловым эфиром и высушивали. Бежевое твердое вещество, выход 74% (3,48 г), т. пл. 227-229°C (лит. т. пл. 230°C [246]). ^1H ЯМР (300 Гц, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 8,96 (д, J = 6,3 Гц, 1H, H-6), 8,46 (т, J = 8,1 Гц, 1H, H-4), 8,03 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-3), 7,94 (т, J = 6,3 Гц, 1H, H-5), 4,22 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 2,77 (с, 3H, $-\text{CH}_3$) м. д. Элементный анализ для $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NI}$ (%): вычислено С, 35,77; Н, 4,29; N, 5,96; найдено С, 35,77; Н, 4,36; N, 6,07.

(E)-2-(4-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)-3-метоксистирил)-1-метилпиридин-1-иум йодид (44)

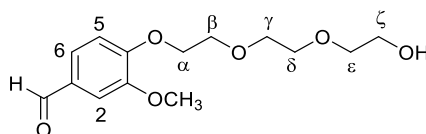
Смесь 1,2-диметилпиридин-1-иум йодида **43** (68 мг, 0,29 ммоль) и соединения **40** (100 мг, 0,29 ммоль) в абсолютированном этиловом спирте (10 мл) перемешивали до полного растворения. Далее в реакционную массу добавляли пирролидин (24 мкл, 0,29 ммоль) и перемешивали при кипении в течение 3 часов, затем при комнатной температуре в течение 15 часов. Растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли этилацетат. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре этилацетатом и диэтиловым эфиром, высушивали. Желтое твердое вещество, выход 90% (148 мг), т. пл. 124-126°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ = 9,04 (д, J = 5,9 Гц, 1H, H-6), 8,31 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-3), 8,22 (т, J = 7,8 Гц, 1H, H-4), 7,71 (д, J = 16,1 Гц, 1H, H-b), 7,65 (д, J = 6,9 Гц, 1H, H-5), 7,44 (д, J = 16,1 Гц, 1H, H-a), 7,42 (с, 1H, H-8), 7,34 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-12), 6,86 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-11), 4,60 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 4,19 (т, 2H, H- α), 3,99 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,90 (т, 2H, H- β), 3,62-3,76 (м, 10H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ , H- η), 3,59 (т, 2H, H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ = 153,5 (C-2), 151,1 (C-10), 149,4 (C-9), 145,2 (C-6), 145,0 (C-b), 143,7 (C-4), 127,7 (C-7), 125,5 (C-3), 124,4 (C-5, C-12), 114,0 (C-a), 112,4 (C-11), 111,3 (C-8), 71,2 ($-\text{CH}_2-$), 70,8 ($-\text{CH}_2-$), 70,6 ($-\text{CH}_2-$), 70,6 ($-\text{CH}_2-$), 70,5 ($-\text{CH}_2-$), 69,4 (C- β), 68,4 (C- α), 57,2 ($-\text{OCH}_3$), 47,9 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$), 42,9 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClINO}_5\text{I}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (%): вычислено С, 46,05; Н, 5,88; N, 2,33; обнаружено С, 45,55; Н, 5,44; N, 2,51. Масс-спектр (ИЭР) раствора **44** в CH_3CN , m/z : вычислено 436,2; найдено 436,2 [**44-I**] $^+$.

(E)-N-(2-(2-(2-(2-(2-метокси-4-(2-(пиридин-2-ил)винил)фенокси)этокс)этокс)этил)-N-метиланилин (45a)



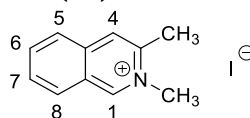
Соединение **44** (49 мг, 0,086 ммоль) в *N,N*-диметиланилине (0,6 мл, 4,721 ммоль) перемешивали при 170°C в течение 3 часов в атмосфере аргона. Затем реакционную массу охлаждали и очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием градиентного элюирования (гексан/этилацетат 97:3 → 0:100) с получением продукта **45a**. Светло-желтое масло, выход 70% (30 мг). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN): δ = 8,55 (д, *J* = 4,2 Гц, 1H, H-6), 7,71 (т, *J* = 7,6 Гц, 1H, H-4), 7,60 (д, *J* = 16,1 Гц, 1H, H-b), 7,42 (д, *J* = 7,6 Гц, 1H, H-3), 7,25 (с, 1H, H-8), 7,12-7,25 (м, 5H, H-5, H-12, H-a, H-3', H-5'), 6,93 (д, *J* = 8,3 Гц, 1H, H-11), 6,71 (д, *J* = 8,1 Гц, 2H, H-2', H-6'), 6,61 (т, *J* = 7,2 Гц, 1H, H-4'), 4,11 (т, 2H, H-α), 3,87 (с, 3H, -OCH₃), 3,77 (т, 2H, H-β), 3,46-3,60 (м, 12H, H-γ, H-δ, H-ε, H-ζ, H-η, H-θ), 2,91 (с, 3H, -NCH₃) м.д. Масс-спектр (ИЭР) раствора **45a** в CH₃CN, *m/z*: вычислено 492,3; найдено 493,4 [**45a**+H]⁺ (26%), 515,4 [**45a**+Na]⁺ (100%).

4-(2-(2-(2-гидроксиэтокс)этокс)этокс)-3-метоксибензальдегид (46) [247]



2-(2-(2-Хлорэтокс)этокс)этанол (440 мг, 2,61 ммоль) добавляли к смеси ванилина (376 мг, 2,47 ммоль), карбоната калия (513 мг, 3,71 ммоль) и йодида калия (42 мг, 0,25 ммоль) в ДМФА (23 мл) и перемешивали с хлоркальциевой трубкой при 100°C в течение 12 ч. После окончания реакции смесь разбавляли насыщенным водным раствором NH₄Cl (64 мл) и экстрагировали хлористым метиленом (3×60 мл). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl (100 мл), водой (100 мл) и сушили над Na₂SO₄. Затем растворитель упаривали в вакууме, продукт выделяли методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием градиентного элюирования (хлористый метилен → хлористый метилен/метанол 96:4). Желтое масло, выход 80% (560 мг). ¹H ЯМР(400 МГц, CDCl₃): δ = 9,80 (с, 1H, CH₂O), 7,40 (дд, *J* = 8,1, 1,9 Гц, 1H, H-6), 7,36 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H, H-2), 6,96 (д, *J* = 8,1 Гц, 1H, H-5), 4,23 (т, 2H, H-α), 3,85-3,93 (м, 5H, H-β, -OCH₃), 3,74-3,63 (м, 6H, H-γ, H-δ, H-ε), 3,57 (т, 2H, H-ζ) м.д.

2,3-диметилизохинолин-2-иум йодид (50) [248]

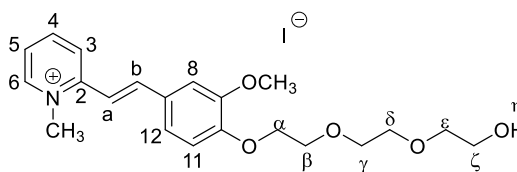


Смесь 3-метилизохинолина (600 мг, 4,2 ммоль) и йодметана (522 мкл, 8,4 ммоль) в этилацетате (30 мл) перемешивали при кипении в течение 9 ч. Затем охлаждали до комнатной температуры, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и диэтиловым эфиром. Бежевое твердое вещество, выход 76% (906 мг), т. пл. 222-224°C (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ = 10,03 (с, 1H, H-1), 8,44 (с, 1H, H-4), 8,39 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-8), 8,16-8,23 (м, 2H, H-5, H-6), 7,98 (т, 1H, H-7), 4,38 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 2,83 (с, 3H, CH_3) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NI}$ (%): вычислено С, 46,34; Н, 4,24; N, 4,91; найдено С, 46,21; Н, 4,39; N, 4,93.

Общая методика конденсации Кневенагеля с получением соединений 47, 51

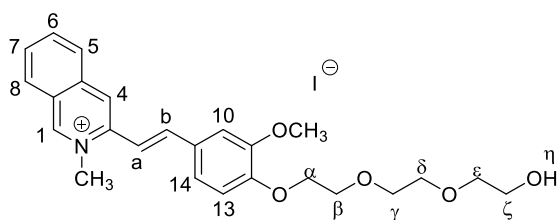
Смесь 1,2-диметилпиридин-1-иум йодида **43** (для **47**, 0,3 ммоль) или 2,3-диметилизохинолин-2-иум йодида **50** (для **51**, 0,3 ммоль) и замещенного бензальдегида **46** (0,3 ммоль) в абсолютированном этиловом спирте (10 мл) перемешивали до полного растворения. Далее в реакционную массу добавляли пирролидин (0,3 ммоль) и перемешивали при кипении в течение 3 часов, затем при комнатной температуре в течение 15 часов. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре холодным этиловым спиртом и диэтиловым эфиром, высушивали.

(E)-2-(4-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)-1-метилпиридин-1-иум йодид (47)



По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **46** (710 мг, 2,5 ммоль), 1,2-диметилпиридин-1-иум йодида **43** (587 мг, 2,5 ммоль) и пирролидина (205 мкл, 2,5 ммоль) получено соединение **47** (1153 мг, 92%) в виде желтого твердого вещества, т. пл. 144-146°C. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ = 8,86 (д, J = 6,3 Гц, 1H, H-6), 8,43-8,49 (м, 2H, H-3, H-4), 7,91 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-b), 7,86 (тд, J = 6,2, 2,7 Гц, 1H, H-5), 7,50 (д, J = 2,1 Гц, 1H, H-8), 7,46 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-a), 7,38 (дд, J = 8,4, 2,0 Гц, 1H, H-12), 7,10 (д, J = 8,4 Гц, 1H, H-11), 4,60 (т, 1H, H- η), 4,36 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 4,16 (т, 2H, H- α), 3,87 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,77 (т, 2H, H- β), 3,60-3,62 (м, 2H, H- γ), 3,53-3,56 (м, 2H, H- δ), 3,47-3,50 (м, 2H, H- ζ), 3,42 (т, 2H, H- ϵ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6): δ = 152,8 (C-2), 150,7 (C-10), 149,1 (C-9), 145,8 (C-6), 143,9 (C-4), 143,3 (C-b), 127,9 (C-7), 124,4 (C-3, C-5), 123,5 (C-12), 114,9 (C-a), 112,8 (C-11), 111,0 (C-8), 72,3 (C- ϵ), 70,0 (C- γ), 69,8 (C- δ), 68,8 (C- β), 68,0 (C- α), 60,2 (C- ξ), 55,9 ($-\text{OCH}_3$), 46,0 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{INO}_5 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (%): вычислено С, 49,42; Н, 5,73; N, 2,74; найдено С, 49,08; Н, 5,50; N, 2,84. Масс-спектр (ИЭР) раствора **47** в CH_3OH , m/z : вычислено 374,2; найдено 374,3 [**47-I**] $^+$.

**(E)-3-(4-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)-2-метил
изохинолин-2-иум йодид (51)**

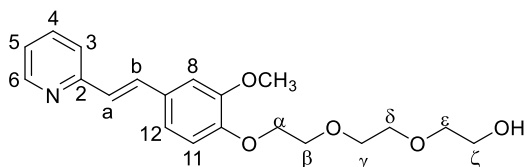


По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **46** (399 мг, 1,4 ммоль), 2,3-диметилизохинолин-2-иум йодида **50** (400 мг, 1,4 ммоль) и пирролидина (115 мкл, 1,4 ммоль) получено соединение **51** (536 мг, 69%) в виде желтого твердого вещества, т. пл. 153-155°C. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ = 10,03 (с, 1H, H-1), 8,92 (с, 1H, H-4), 8,39 (д, J = 8,4 Гц, 1H, H-8), 8,25 (д, J = 8,4 Гц, 1H, H-5), 8,19 (т, J = 7,6 Гц, 1H, H-6), 7,96 (т, J = 7,6 Гц, 1H, H-7), 7,71 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-b), 7,57 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-a), 7,48 (с, 1H, H-10), 7,34 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-14), 7,09 (д, J = 8,1 Гц, 1H, H-13), 4,62 (т, 1H, H- η), 4,52 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 4,15 (т, 2H, H- α), 3,88 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,78 (т, 2H, H- β), 3,61 (т, 2H, H- γ), 3,56 (т, 2H, H- δ), 3,49 (т, 2H, H- ζ), 3,43 (т, 2H, H- ϵ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6): δ = 151,2 (C-1), 149,9 (C-12), 149,2 (C-11), 144,4 (C-3), 139,7 (C-b), 137,8 (C-4a), 136,7 (C-6), 130,5 (C-7), 129,9 (C-8), 128,5 (C-9), 127,0 (C-5), 125,9 (C-8a), 122,5 (C-14), 121,7 (C-4), 115,7 (C-a), 112,9 (C-13), 110,7 (C-10), 72,4 (C- ϵ), 70,0 (C- γ), 69,8 (C- δ), 68,9 (C- β), 68,0 (C- α), 60,3 (C- ζ), 55,9 ($-\text{OCH}_3$), 46,6 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{NO}_5\text{I}$ (%): вычислено С, 54,45; Н, 5,48; N, 2,54; найдено С, 54,12; Н, 5,65; N, 2,70. Масс-спектр (ИЭР) раствора **51** в CH_3OH , m/z : вычислено 424,2; найдено 424,4 [**51**-I] $^+$.

*Общая методика деметилирования с получением соединений **48**, **52***

Соединение **47** (для **48**, 1 ммоль) или **51** (для **52**, 1 ммоль) перемешивали при 170°C в N,N -диметиланилине (55 ммоль) в атмосфере аргона в течение 3 часов. После охлаждения до комнатной температуры продукт выделяли из реакционной массы методом колоночной хроматографии на SiO_2 с использованием градиентного элюирования (гексан/этилацетат 97:3 $\rightarrow$ 0:100).

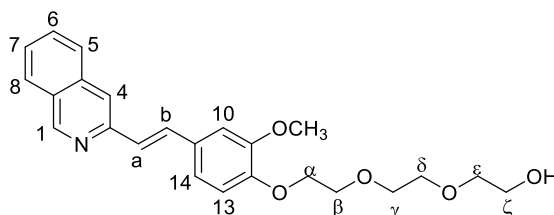
(E)-2-(2-(2-(2-метокси-4-(2-(пиридин-2-ил)винил)фенокси)этокси)этокси)этан-1-ол (48)



По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **47** (571 мг, 1,2 ммоль) и N,N -диметиланилина (8 мл, 63,0 ммоль) получено соединение **48** (351 мг, 85%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 8,55 (д, J = 4,6 Гц, 1H, H-6), 7,73 (тд, J = 7,7, 1,9 Гц, 1H, H-4), 7,67 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-6), 7,46 (д, J = 7,7) Гц, 1H, H-3), 7,33 (д, J = 2,1 Гц, 1H, H-8), 7,15-7,21

(м, 3H, H-5, H-12, H-a), 7,01 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, H-11), 4,18 (т, 2H, H- α) 3,91 (с, 3H, -OCH₃), 3,86 (т, 2H, H- β), 3,70 (т, 2H, H- γ), 3,62-3,66 (м, 4H, H- ζ , H- δ), 3,55 (т, 2H, H- ϵ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, Ацетон- d_6): $\delta = 156,8$ (C-2), 150,7 (C-9), 150,4 (C-6), 149,9 (C-10), 137,3 (C-4), 133,1 (C-b), 131,2 (C-7), 127,1 (C-a), 122,7 (C-3), 122,6 (C-5), 121,6 (C-12), 114,3 (C-11), 111,0 (C-8), 73,4 (C- ϵ), 71,3 (C- γ), 71,0 (C- δ), 70,2 (C- β), 69,2 (C- α), 61,8 (C- ζ), 56,3 (-OCH₃) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_5 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (%): вычислено С, 62,16; Н, 7,30; Н, 3,62; найдено С, 62,20; Н, 7,35; Н, 4,01. Масс-спектр (ИЭР) раствора **48** в CH_3OH , m/z : рассчитано 359,2; найдено 360,2 [**48**+H]⁺ (16%), 382,2 [**48**+Na]⁺ (100%).

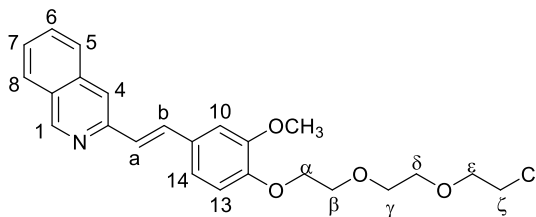
(E)-2-(2-(2-(4-(2-(изохинолин-3-ил)винил)-2-метоксифенокси)этокси)этокси) этан-1-ол (52)



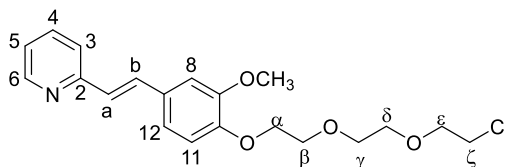
По общей методике конденсации Кневенагеля из соединения **51** (527 мг, 1 ммоль) и *N,N*-диметиланилина (6,7 мл, 55 ммоль) получено соединение **52** (302 мг, 77%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): $\delta = 9,24$ (с, 1H, H-1), 8,02 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, H-8), 7,88 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H, H-5), 7,77 (д, $J = 15,8$ Гц, 1H, H-b), 7,72 (т, 1H, H-6), 7,69 (с, 1H, H-4), 7,59 (т, $J = 7,3$ Гц, 1H, H-7), 7,29-7,33 (м, 2H, H-a, H-10), 7,18 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, H-14), 6,96 (д, $J = 8,3$ Гц, 1H, H-13), 4,14 (т, 2H, H- α), 3,90 (с, 3H, -OCH₃), 3,80 (т, 2H, H- β), 3,66 (т, 2H, H- γ), 3,58-3,61 (м, 4H, H- ζ , H- δ), 3,50 (т, 2H, H- ϵ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): $\delta = 153,6$ (C-1), 150,7 (C-3), 150,5 (C-11), 149,6 (C-12), 137,5 (C-4a), 132,3 (C-b), 131,7 (C-6), 131,5 (C-9), 128,8 (C-8a), 128,7 (C-8), 127,9 (C-7), 127,6 (C-5), 127,4 (C-a), 121,5 (C-14), 119,2 (C-4), 114,1 (C-13), 110,9 (C-10), 73,3 (C- ϵ), 71,3 (C- δ), 71,0 (C- γ), 70,2 (C- β), 69,1 (C- α), 61,9 (C- ζ), 56,4 (-OCH₃) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (%): вычислено С, 70,40; Н, 6,65; N, 3,42; найдено С, 70,02; Н, 6,74; N, 3,39. Масс-спектр (ИЭР) раствора **52** в CH_3OH , m/z : рассчитано 409,2; найдено 410,4 [**52**+H]⁺.

Общая методика получения соединений **14**, **15**

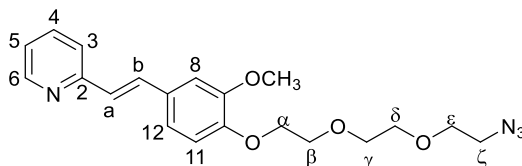
Раствор соединения **48** (для **15**, 1 ммоль) или **52** (для **14**, 1 ммоль) и тионилхлорида (80 ммоль) в хлористом метиле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 7 дней. После завершения реакции растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли 10%-ный водный раствор Na_2CO_3 (100 мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 (3×40 мл). Органические экстракты объединяли и сушили над Na_2SO_4 , после чего растворитель упаривали в вакууме. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ (C18, ацетонитрил-метанол = 5:95 для **14**) или методом колоночной хроматографии на SiO_2 с использованием градиентного элюирования (хлористый метиле → хлористый метиле/метанол 98:2 для **15**).

(E)-3-(4-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)изохинолин (14)

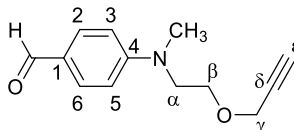
По общей методике из соединения **52** (270 мг, 0,7 ммоль) и тионилхлорида (3,8 мл, 52,8 ммоль) получено соединение **14** (110 мг, 39%) в виде бежевого твердого вещества, т. пл. 68-70°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 9,23 (с, 1H, H-1), 8,01 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-8), 7,87 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-5), 7,76 (д, J = 15,8 Гц, 1H, H-b), 7,71 (т, J = 7,6 Гц, 1H, H-6), 7,68 (с, 1H, H-4), 7,59 (т, J = 7,6 Гц, 1H, H-7), 7,32-7,28 (м, 2H, H-a, H-10), 7,17 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-14), 6,95 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-13), 4,13 (т, 2H, H- α), 3,89 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,79 (т, 2H, H- β), 3,72 (т, 2H, H- ϵ), 3,62-3,67 (м, 6H, H- ζ , H- γ , H- δ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 153,6 (C-1), 150,7 (C-3), 150,6 (C-11), 149,7 (C-12), 137,5 (C-4a), 132,3 (C-b), 131,7 (C-6), 131,4 (C-9), 128,8 (C-8a), 128,7 (C-8), 127,9 (C-7), 127,6 (C-5), 127,3 (C-a), 121,5 (C-14), 119,2 (C-4), 114,1 (C-13), 110,9 (C-10), 71,9 (C- ϵ), 71,3 (C- δ), 71,2 (C- γ), 70,3 (C- β), 69,2 (C- α), 56,4 ($-\text{OCH}_3$), 44,40 (C- ζ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{Cl}$ (%): вычислено C, 67,36; H, 6,12; N, 3,27; найдено C, 67,29; H, 6,24; N, 3,22. Масс-спектр (ИЭР) раствора **14** в CH_3CN , m/z : вычислено 427,2; найдено 428,2 [**14**+H] $^+$ (28%), 450,2 [**14**+Na] $^+$ (100%).

(E)-2-(4-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)пиридин (15)

По общей методике из соединения **48** (157 мг, 0,44 ммоль) и тионилхлорида (2,54 мл, 35,00 ммоль) получено соединение **15** (111 мг, 67%) в виде коричневого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6): δ = 8,55 (д, J = 4,2 Гц, 1H, H-6), 7,75 (т, J = 7,7 Гц, 1H, H-4), 7,69 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-b), 7,48 (д, J = 7,7 Гц, 1H, H-3), 7,32 (с, 1H, H-8), 7,15-7,22 (м, 3H, H-5, H-12, H-a), 7,00 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-11), 4,18 (т, 2H, H- α), 3,90 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,84 (т, 2H, H- β), 3,74-3,76 (м, 2H, H- ζ), 3,66-3,71 (м, 6H, H- γ , H- ϵ , H- δ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, Ацетон- d_6): δ = 156,8 (C-2), 150,9 (C-9), 150,4 (C-6), 150,1 (C-10), 137,3 (C-4), 133,2 (C-b), 131,1 (C-7), 127,0 (C-a), 122,7 (C-3), 122,6 (C-5), 121,6 (C-12), 114,4 (C-11), 111,1 (C-8), 72,0 (C- ϵ), 71,4 (C- γ), 71,2 (C- δ), 70,4 (C- β), 69,3 (C- α), 56,2 ($-\text{OCH}_3$), 44,0 (C- ζ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{Cl}$ (%): вычислено C, 63,57; H, 6,40; N, 3,71; найдено C, 63,12; H, 6,71; N, 3,83. Масс-спектр (ИЭР) раствора **15** в CH_3OH , m/z : вычислено 377,1; найдено 378,2 [**15**+H] $^+$ (57%), 400,2 [**15**+Na] $^+$ (100%).

(E)-2-(4-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-3-метоксистирил)пиридин (49)

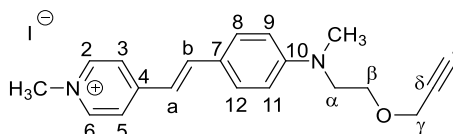
Смесь соединения **15** (119 мг, 0,32 ммоль) и азид натрия (102 мг, 1,57 ммоль) в ДМФА (5 мл) перемешивали при 70°C в атмосфере аргона в течение 32 часов. Далее реакционную массу разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали хлористым метиленом (3×50 мл). Органические экстракты объединяли, промывали водой (2×30 мл) и сушили над безводным Na₂SO₄. Растворитель упаривали в вакууме с получением продукта **49**. Желтое масло, выход 85% (103 мг). ¹H ЯМР (400 МГц, Ацетон-*d*₆): δ = 8,55 (д, *J* = 4,9 Гц, 1H, H-6), 7,72 (тд, *J* = 7,7, 1,8 Гц, 1H, H-4), 7,67 (д, *J* = 15,9 Гц, 1H, H-b), 7,45 (д, *J* = 7,7 Гц, 1H, H-3), 7,32 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H, H-8), 7,12-7,22 (м, 3H, H-5, H-12, H-a), 7,00 (д, *J* = 8,3 Гц, 1H, H-11), 4,18 (т, 2H, H-α), 3,90 (с, 3H, -OCH₃), 3,85 (т, 2H, H-β), 3,65-3,72 (м, 6H, H-γ, H-δ, H-ε), 3,39 (т, 2H, H-ξ) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, Ацетон-*d*₆): δ = 156,8 (C-2), 150,8 (C-9), 150,4 (C-6), 150,1 (C-10), 137,3 (C-4), 133,2 (C-b), 131,0 (C-7), 127,0 (C-a), 122,7 (C-3), 122,5 (C-5), 121,5 (C-12), 114,3 (C-11), 110,9 (C-8), 71,4 (C-γ), 71,1 (C-δ), 70,7 (C-ε), 70,3 (C-β), 69,2 (C-α), 56,1 (-OCH₃), 51,4 (C-ζ) м.д. Элементный анализ для C₂₀H₂₄N₄O₄ (%): вычислено C, 62,49; H, 6,29; N, 14,57; найдено C, 62,33; H, 6,45; N, 14,52. Масс-спектр (ИЭР) раствора **49** в CH₃OH, *m/z*: вычислено 384,2; найдено 385,3 [**49**+H]⁺ (43%), 407,2 [**49**+Na]⁺ (100%).

4-(метил(2-(проп-2-ин-1-илокси)этил)амино)бензальдегид (53)

80% раствор пропаргил бромида (243 мкл, 2,18 ммоль) по каплям добавляли к перемешиваемой смеси 4-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)бензальдегида (300 мг, 1,67 ммоль), 33% водного раствора NaOH (400 мкл) и ТВАВ (54 мг, 0,17 ммоль) в хлористом метиле (6 мл) при комнатной температуре. Полученную реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней. Далее смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали хлороформом (3×20 мл), органические экстракты объединяли, сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием градиентного элюирования (гексан → гексан/этилацетат 90:10). Желтое масло, выход 84% (306 мг). ¹H ЯМР (400 МГц, Ацетон-*d*₆): δ = 9,71 (с, 1H, -CHO), 7,70 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-2, H-6), 6,85 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-3, H-5), 4,18 (д, *J* = 2,4 Гц, 2H, H-γ), 3,69-3,76 (м, 4H, H-α, H-β), 3,11 (с, 3H, -NCH₃), 2,96 (т, *J* = 2,4 Гц, 1H, H-ε) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, Ацетон-*d*₆): δ = 190,0 (-CHO), 154,5 (C-4), 132,5 (C-2), 132,2 (C-6), 126,3 (C-1), 112,0 (C-3), 111,9 (C-5), 80,7 (C-δ), 76,0 (C-ε), 68,0 (C-β), 58,8 (C-γ), 52,3 (C-α), 39,4 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₁₃H₁₅NO₂

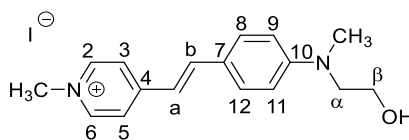
(%): вычислено C, 71,87; H, 6,96; N, 6,45; найдено C, 71,72; H, 6,81; N, 6,52. Масс-спектр (ИЭР) раствора **53** в CH₃OH, *m/z*: вычислено 217,1; найдено 218,1 [**53**+H]⁺.

(E)-1-метил-4-(4-(метил(2-(проп-2-ин-1-илокси)этил)амино)стирил)пиридин-1-иум йодид (54)



Смесь 1,4-диметилпиридин-1-иум йодида **38** (254 мг, 1,08 ммоль) и замещенного бензальдегида **53** (235 мг, 1,08 ммоль) в абсолютном этиловом спирте (15 мл) нагревали до полного растворения. Затем в реакционную массу добавляли пиперидин (107 мкл, 1,08 ммоль) и перемешивали при кипении с хлоркальцевой трубкой в течение 28 часов. Далее растворитель упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂ с использованием градиентного элюирования (хлористый метилен → хлористый метилен/метанол 50:50). Фракцию, содержащую продукт, упаривали в вакууме, полученный осадок кипятили в этилацетате в течение 2 часов, отфильтровывали и высушивали. Красное твердое вещество, выход 72% (339 мг), т. пл. 150-152°C. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ = 8,50 (д, *J* = 6,8 Гц, 2H, H-2, H-6), 7,97 (д, *J* = 6,8 Гц, 2H, H-3, H-5), 7,83 (д, *J* = 16,0 Гц, 1H, H-b), 7,60 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-8, H-12), 7,08 (д, *J* = 16,0 Гц, 1H, H-a), 6,81 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,21 (с, 3H, -N⁺CH₃), 4,16 (д, *J* = 2,4 Гц, 1H, H-γ), 3,74 (т, *J* = 5,3 Гц, 2H, H-β), 3,67 (т, *J* = 5,3 Гц, 2H, H-α), 3,09 (с, 3H, -NCH₃), 2,83 (т, *J* = 2,4 Гц, 1H, H-ε) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃OD): δ = 155,9 (C-4), 152,9 (C-10), 145,1 (C-2, C-6), 144,0 (C-b), 131,7 (C-8, C-12), 124,1 (C-7), 123,6 (C-3, C-5), 117,8 (C-a), 113,1 (C-9, C-11), 80,7 (C-δ), 76,0 (C-ε), 68,6 (C-β), 59,2 (C-γ), 52,7 (C-α), 47,3 (-N⁺CH₃), 39,4 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₂₀H₂₃N₂OI·0,5H₂O (%): вычислено C, 54,19; H, 5,46; N, 6,32; найдено C, 54,18; H, 5,56; N, 6,38. Масс-спектр (ИЭР) раствора **54** в CH₃OH, *m/z*: вычислено 307,2; найдено 307,2 [**54**-I]⁺.

(E)-4-(4-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)стирил)-1-метилпиридин-1-иум йодид (54-ОН)



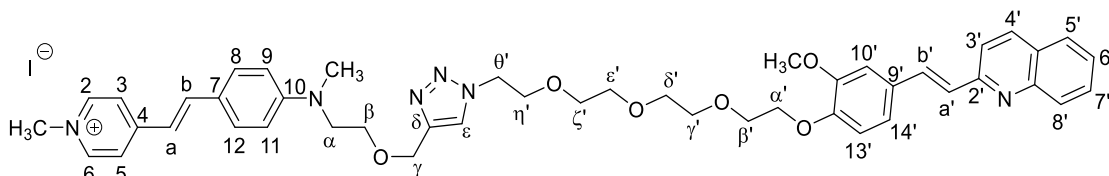
Смесь 1,4-диметилпиридин-1-иум йодида **38** (141 мг, 0,6 ммоль) и 4-((2-гидроксиэтил)(метил)амино)бензальдегида (108 мг, 0,6 ммоль) в абсолютном этиловом спирте (15 мл) перемешивали до полного растворения. Затем в реакционную массу добавляли пиперидин (59 мкл, 0,6 ммоль) и перемешивали при кипении с хлоркальцевой трубкой в течение 28 часов. Далее растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли этилацетат и кипятили в течение 4 часов для удаления непрореагировавших исходных реагентов. Осадок отфильтровывали и высушивали. Красное твердое вещество, выход 95% (227 мг), т. пл. 176-

178°C (разл.). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ = 8,44 (д, J = 6,5 Гц, 2H, H-2, H-6), 7,92 (д, J = 6,5 Гц, 2H, H-3, H-5), 7,76 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-b), 7,56 (д, J = 8,8 Гц, 2H, H-8, H-12), 7,02 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-a), 6,78 (д, J = 8,8 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,16 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 3,75 (т, 2H, H- β), 3,57 (т, 2H, H- α), 3,09 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3OD): δ = 155,8 (C-4), 153,0 (C-10), 145,1 (C-2, C-6), 143,9 (C-b), 131,7 (C-8, C-12), 124,0 (C-7), 123,6 (C-3, C-5), 117,7 (C-a), 113,0 (C-9, C-11), 60,2 (C- β), 55,2 (C- α), 47,3 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$), 39,5 ($-\text{NCH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{OI}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (%): вычислено С, 49,29; Н, 5,60; N, 6,76; найдено С, 49,64; Н, 5,84; N, 7,14. Масс-спектр (ИЭР) раствора **54-ОН** в CH_3OH , m/z : вычислено 269,3, найдено 269,2 [**54-ОН-I**] $^+$.

Общая методика получения конъюгатов **4**, **5**

Смесь гетеростильбена **41** (для **4**, 0,14 ммоль) или **42** (для **5**, 0,10 ммоль), стирилового красителя **54** (0,10 ммоль), аскорбата натрия (0,02 ммоль), диизопропилэтиламина (0,2 ммоль) в смеси ДМФА: H_2O (4:1, 10 мл) перемешивали до полного растворения. Далее в реакционную массу вносили сульфат меди(II) (0,01 ммоль) и перемешивали при 70°C в инертной атмосфере в течение 60 часов. После завершения реакции растворитель упаривали в вакууме. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 с использованием градиентного элюирования (ацетонитрил $\rightarrow$ ацетонитрил/метанол 75:25).

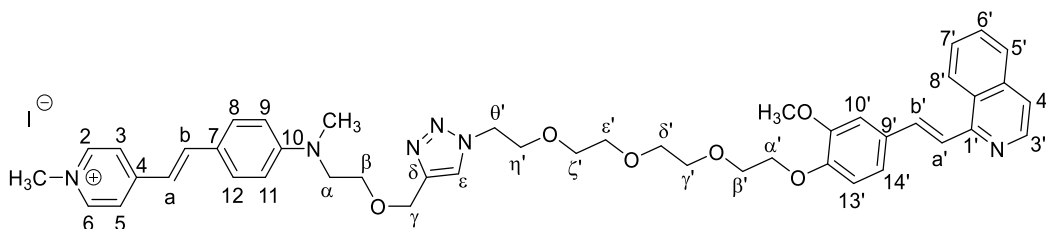
4-((E)-4-((2-((1-(2-(2-(2-(2-метокси-4-((E)-2-(хинолин-2-ил)винил)фенокси)этокси)этокси)этокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)этил)(метил)амино)стирил)-1-метилпиридин-1-иум йодид (4**)**



По общей методике из гетеростильбена **41** (125 мг, 0,26 ммоль), стирилового красителя **54** (84 мг, 0,19 ммоль), аскорбата натрия (8 мг, 0,04 ммоль), диизопропилэтиламина (62 мкл, 0,38 ммоль) и сульфата меди(II) (5 мг, 0,02 ммоль) получен конъюгат **4** (107 мг, 61%) в виде красного твердого вещества, т. пл. 64-66°C. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN): δ = 8,23 (д, J = 6,9 Гц, 2H, H-2, H-6), 8,20 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-4'), 7,95 (д, J = 8,8 Гц, 1H, H-8'), 7,86 (д, J = 8,2 Гц, 1H, H-5'), 7,67-7,76 (м, 6H, H- ϵ , H-3, H-5, H-b', H-3', H-7'), 7,64 (д, J = 15,4 Гц, 1H, H-b), 7,52 (т, 1H, H-6'), 7,48 (д, J = 8,8 Гц, 2H, H-8, H-12), 7,27 (д, J = 15,7 Гц, 1H, H-a'), 7,25 (с, 1H, H-10'), 7,14 (дд, J = 8,3, 1,4 Гц, 1H, H-14'), 6,93 (д, J = 15,4 Гц, 1H, H-a), 6,90 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-13'), 6,71 (д, J = 8,8 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,53 (с, 2H, H- γ), 4,45 (т, 2H, H- θ'), 4,08 (т, 2H, H- α'), 4,04 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 3,84 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,79 (т, 2H, H- η'), 3,74 (т, 2H, H- β'), 3,65 (т, 2H, H- β), 3,52-3,60 (м, 10H, H- α , H- ϵ' , H- γ' , H- δ' , H- ζ'), 2,98 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 157,3 (C-2'), 155,3 (C-4), 152,6 (C-10), 150,6 (C-11'), 150,2 (C-12'), 149,2 (C-8a'), 145,4 (C- δ), 144,8 (C-2, C-6), 143,4 (C-

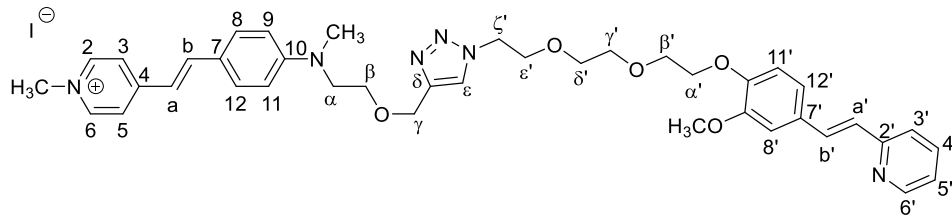
b), 137,3 (C-4'), 135,0 (C-b'), 131,4 (C-8, C-12), 130,8 (C-9'), 130,7 (C-7'), 129,8 (C-8'), 128,7 (C-5'), 128,2 (C-4a'), 127,9 (C-a'), 127,0 (C-6'), 124,9 (C-ε), 123,5 (C-7), 123,3 (C-3, C-5), 122,1 (C-14'), 120,7 (C-3'), 117,6 (C-a), 114,0 (C-13'), 113,0 (C-9, C-11), 111,0 (C-10'), 71,3 (C-ε'), 71,2 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 71,0 (C-ζ'), 70,3 (C-β'), 70,0 (C-η'), 69,2 (C-α'), 68,4 (C-β), 65,1 (C-γ), 56,5 (-OCH₃), 52,5 (C-α), 50,9 (C-θ'), 47,6 (-N⁺CH₃), 39,3 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₄₆H₅₃N₆O₆I·H₂O (%): вычислено С, 59,35; Н, 5,96; N, 9,03; найдено С, 59,13; Н, 6,10; N, 8,92. Масс-спектр (ИЭР) раствора **4** в СН₃ОН, *m/z*: вычислено 785,4; найдено 393,5 [4-I+H]²⁺ (100%), 785,5 [4-I]⁺ (10%).

4-((E)-4-((2-((1-2-2-2-2-4-((E)-2-(изохинолин-1-ил)винил)-2-метоксифенокси)этокси)этокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)этил)(метил)амино)стирил)-1-метилпиридин-1-ийм йодид (5**)**



По общей методике из гетеростильбена **42** (73 мг, 0,153 ммоль), стирилового красителя **54** (66 мг, 0,153 ммоль), аскорбата натрия (6 мг, 0,031 ммоль), диизопропилэтиламина (53 мкл, 0,306 ммоль) и сульфата меди(II) (4 мг, 0,015 ммоль) получен конъюгат **5** (53 мг, 44%) в виде красного твердого вещества, т. пл. 69-71°C. ¹H ЯМР (300 МГц, CD₃CN) δ = 8,52 (д, *J* = 8,3 Гц, 1H, H-8'), 8,48 (д, *J* = 5,6 Гц, 1H, H-3'), 8,23 (д, *J* = 6,8 Гц, 2H, H-2, H-6), 7,96 (д, *J* = 15,5 Гц, 1H, H-a'), 7,88 (д, *J* = 15,5 Гц, 1H, H-b'), 7,87 (д, *J* = 8,2 Гц, 1H, H-5'), 7,66-7,74 (м, 5H, H-ε, H-6', H-3, H-5, H-7'), 7,61 (д, *J* = 5,6 Гц, 1H, H-4'), 7,60 (д, *J* = 16,0 Гц, 1H, H-b), 7,44 (д, *J* = 8,9 Гц, 1H, H-8, H-12), 7,35 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H, H-10'), 7,21 (дд, *J* = 8,3, 1,9 Гц, 1H, H-14'), 6,91 (д, *J* = 8,3 Гц, 1H, H-13'), 6,89 (д, *J* = 16,0 Гц, 1H, H-a), 6,69 (д, *J* = 8,9 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,53 (с, 2H, H-γ), 4,45 (т, 2H, H-θ'), 4,09 (т, 2H, H-α'), 4,04 (с, 3H, -N⁺CH₃), 3,87 (с, 3H, -OCH₃), 3,79 (т, 2H, H-η'), 3,75 (т, 2H, H-β'), 3,63 (т, 2H, H-β), 3,50-3,59 (м, 10H, H-ε', H-α, H-ζ', H-γ', H-δ'), 2,97 (с, 3H, -NCH₃) м.д. ¹³C {¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 155,3 (C-4), 155,1 (C-1'), 152,6 (C-10), 150,6 (C-11'), 150,1 (C-12'), 145,4 (C-δ), 144,9 (C-2, C-6), 143,7 (C-3'), 143,4 (C-b), 137,8 (C-4a'), 136,2 (C-b'), 131,4 (C-8, C-12), 131,3 (C-9'), 131,0 (C-6'), 128,2 (C-5'), 128,1 (C-7'), 127,4 (C-8a'), 125,6 (C-8'), 124,9 (C-ε), 123,5 (C-7), 123,3 (C-3, C-5), 122,2 (C-14'), 121,6 (C-a'), 120,4 (C-4'), 117,6 (C-a), 114,0 (C-13'), 113,0 (C-9, C-11), 111,3 (C-10'), 71,3 (C-ε'), 71,1 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 71,0 (C-ζ'), 70,3 (C-β'), 70,0 (C-η'), 69,2 (C-α'), 68,4 (C-β), 65,0 (C-γ), 56,5 (-OCH₃), 52,5 (C-α), 50,9 (C-θ'), 47,6 (-N⁺CH₃), 39,3 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₄₆H₅₃N₆O₆I·H₂O (%): вычислено С, 59,35; Н, 5,96; N, 9,03; найдено С, 59,22; Н, 6,02; N, 8,99. Масс-спектр (ИЭР) раствора **5** в СН₃ОН, *m/z*: вычислено 785,4; найдено 393,4 [5-I+H]²⁺ (100%), 785,4 [5-I]⁺ (30%).

4-((E)-4-((2-((1-(2-(2-(2-метокси-4-((E)-2-(пиридин-2-ил)винил)фенокси)этокси)этокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)этил)(метил)амино)стирил)-1-метилпиридин-1-ийм йодид (6)



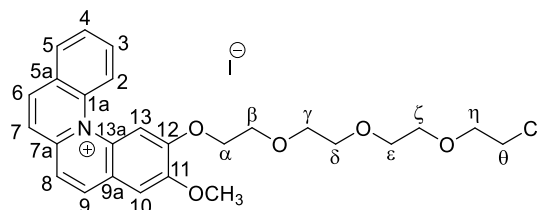
Смесь гетеростильбена **49** (30 мг, 0,078 ммоль), стирилового красителя **54** (34 мг, 0,078 ммоль), йодида меди(I) (3 мг, 0,016 ммоль) и диизопропилэтиламина (54 мкл, 0,312 ммоль) в ДМФА (5 мл) перемешивали при 70°C в инертной атмосфере в течение 35 часов. Далее растворитель упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 с использованием градиентного элюирования (этилацетат $\rightarrow$ этилацетат/метанол 83:17). Красное твердое вещество, выход 35% (23 мг), т. пл. 95-96°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 8,53 (д, J = 4,7 Гц, 1H, H-6'), 8,25 (д, J = 6,8 Гц, 2H, H-2, H-6), 7,76 (д, J = 6,8 Гц, 2H, H-3, H-5), 7,74 (с, 1H, H-ε), 7,73 (т, 1H, H-4'), 7,65 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-b), 7,57 (д, J = 16,1 Гц, 1H, H-b'), 7,48 (д, J = 8,9 Гц, 2H, H-8, H-12), 7,43 (д, J = 7,9 Гц, 1H, H-3'), 7,17-7,21 (м, 2H, H-8', H-5'), 7,13 (д, J = 16,1 Гц, 1H, H-a'), 7,09 (дд, J = 8,3, 1,9 Гц, 1H, H-12'), 6,95 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-a), 6,88 (д, J = 8,3 Гц, 1H, H-11'), 6,71 (д, J = 8,9 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,49 (с, 2H, H-γ), 4,46 (т, 2H, H-ζ'), 4,07 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 4,05 (т, 2H, H-α'), 3,80-3,82 (м, 5H, H-ε', $-\text{OCH}_3$), 3,70 (т, 2H, H-β'), 3,62 (т, 2H, H-β), 3,54-3,58 (м, 6H, H-α, H-γ', H-δ'), 2,98 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 156,6 (C-2'), 155,3 (C-4), 152,6 (C-10), 150,5 (C-9'), 150,2 (C-6'), 149,9 (C-10'), 145,4 (C-δ), 144,9 (C-2, C-6), 143,4 (C-b), 138,1 (C-4'), 133,4 (C-b'), 131,4 (C-8, C-12), 131,0 (C-7'), 126,8 (C-a'), 124,9 (C-ε), 123,5 (C-7), 123,3 (C-3, C-5), 123,0 (C-3', C-5'), 121,8 (C-12'), 117,7 (C-a), 114,1 (C-11'), 113,0 (C-9, C-11), 110,9 (C-8'), 71,2 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 70,3 (C-β'), 70,0 (C-ε'), 69,2 (C-α'), 68,3 (C-β), 65,0 (C-γ), 56,4 ($-\text{OCH}_3$), 52,5 (C-α), 50,9 (C-ζ'), 47,6 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$), 39,3 ($-\text{NCH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_5\text{I}$ (%): вычислено C, 58,68; H, 5,79; N, 10,26; найдено C, 58,52; H, 5,84; N, 10,21. Масс-спектр (ИЭР) раствора **6** в CH_3OH , m/z : вычислено 691,4; найдено 364,4 $[\text{6-I}+\text{H}]^{2+}$ (100%), 691,5 $[\text{6-I}]^+$ (98%).

*Общая методика получения производных хинолизиния **16,17** и **19***

Раствор гетеростильбена **12**, **13** или **15** в CH_3CN (1 ммоль, $C = 1 \cdot 10^{-3}$ М) облучали в кварцевом фотореакторе, оснащенный погружной ртутной лампой высокого давления мощностью 125 Вт, в течение 4-7 мин; реакцию контролировали методом абсорбционной спектроскопии. После достижения максимальной конверсии растворитель упаривали в вакууме. Остаток растворяли в ацетонитриле (1 мл), добавляли HI (2 ммоль) и перемешивали раствор при

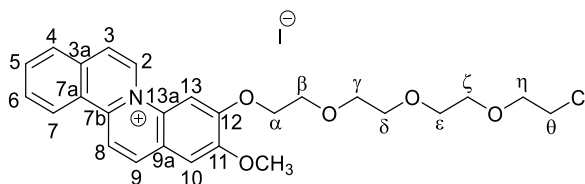
комнатной температуре в течение 2 ч. Далее продукт выделяли из раствора методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 с использованием градиентного элюирования (ацетонитрил $\rightarrow$ ацетонитрил/этанол 85:15).

2-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)-3-метоксихинолино[1,2-*a*]хинолин-13-иум йодид (16)



По общей методике из гетеростильбена **12** (324 мг, 0,69 ммоль) получен продукт **16** (129 мг, 34%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 9,03 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-2), 8,70 (д, J = 8,0 Гц, 1H, H-9), 8,58 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-6), 8,40 (с, 1H, H-13), 8,31 (д, J = 7,2 Гц, 1H, H-5), 8,09-8,12 (м, 2H, H-7, H-8), 7,96-8,03 (м, 2H, H-3, H-4), 7,76 (с, 1H, H-10), 4,34 (т, 2H, H- α), 4,11 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,88 (т, 2H, H- β), 3,52-3,66 (м, 12H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- θ , H- ζ , H- η) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 154,5 (C-12), 152,5 (C-11), 145,2 (C-7a), 140,5 (C-9), 138,6 (C-6), 137,0 (C-1a), 134,5 (C-13a), 132,3 (C-3), 130,9 (C-4), 130,5 (C-5), 129,9 (C-5a), 126,5 (C-9a), 124,3 (C-8), 124,1 (C-2), 122,1 (C-7), 109,0 (C-10), 106,5 (C-13), 71,9 (C- η), 71,5 (C- ζ), 71,1 (C- ϵ), 71,1 (C- γ , C- δ), 70,4 (C- α), 69,8 (C- β), 57,4 ($-\text{OCH}_3$), 44,4 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{ClNI}$ (%): вычислено С, 52,23; Н, 4,89; N, 2,34; найдено С, 52,48; Н, 4,94; N, 2,41. Масс-спектр (ИЭР) раствора **16** в CH_3CN , m/z : вычислено 470,2; найдено 470,2 [**16**-I] $^+$.

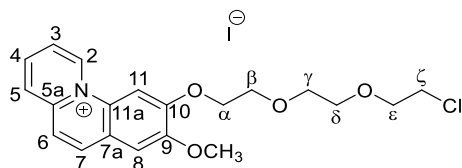
3-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)-2-метоксиизохинолин[2,1-*a*]хинолин-5-иум йодид (17)



По общей методике из гетеростильбена **13** (137 мг, 0,29 ммоль) получен продукт **17** (43 мг, 27%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 9,49 (д, J = 7,7 Гц, 1H, H-2), 8,90 (д, 2H, H-7, H-8), 8,69 (д, J = 9,1 Гц, 1H, H-9), 8,22 (д, J = 7,7 Гц, 1H, H-3), 8,18 (д, J = 7,8 Гц, 1H, H-4), 8,06-8,12 (м, 2H, H-5, H-13), 8,03 (т, J = 7,7 Гц, 1H, H-6), 7,64 (с, 1H, H-10), 4,54 (т, 2H, H- α), 4,03 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,97 (т, 2H, H- β), 3,72 (т, 2H, H- η), 3,58-3,69 (м, 10H, H- θ , H- ζ , H- γ , H- δ , H- ϵ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 156,2 (C-12), 152,8 (C-11), 143,3 (C-7b), 139,6 (C-9), 135,3 (C-5), 133,0 (C-3a), 132,9 (C-13a), 132,2 (C-6), 129,0 (C-4), 127,3 (C-2), 126,9 (C-7), 126,8 (C-7a), 124,4 (C-9a), 123,7 (C-3), 117,1 (C-8), 109,6 (C-10), 100,8 (C-13), 71,9 (C- η), 71,5 (C- ζ), 71,2 (C- ϵ), 71,1 (C- γ , C- δ), 70,8 (C- α), 69,9 (C- β), 57,4 ($-\text{OCH}_3$), 44,4 (C- θ) м.д. Элементный анализ для

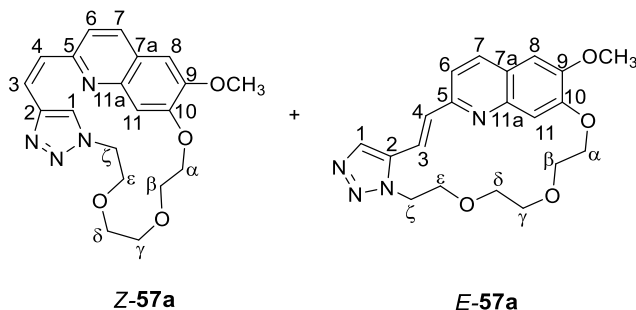
$C_{26}H_{29}O_5ClNI$ (%): вычислено С, 52,23; Н, 4,89; N, 2,34; найдено С, 52,16; Н, 4,98; N, 2,29. Масс-спектр (ИЭР) раствора **17** в CH_3CN , m/z : вычислено 470,2; найдено 470,3 [**17-I**]⁺.

9-(2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этокси)-8-метоксипиридо[1,2-а]хинолин-11-иум йодид (19)



По общей методике из гетеростильбена **15** (174 мг, 0,46 ммоль) получен продукт **19** (84 мг, 36%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 10,62 (д, J = 7,0 Гц, 1H, H-2), 8,30-8,33 (м, 2H, H-5, H-11), 8,21-8,25 (м, 2H, H-4, H-7), 7,90-7,96 (м, 2H, H-6, H-3), 7,41 (с, 1H, H-8), 4,58 (т, 2H, H- α), 3,93 (с, 3H, -OCH₃), 3,89 (т, 2H, H- β), 3,63-3,72 (м, 8H, H- γ , H- δ , H- ϵ , H- ζ) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 154,4 (C-10), 152,3 (C-9), 142,7 (C-5a), 138,3 (C-4), 136,6 (C-7), 135,6 (C-2), 130,6 (C-11a), 128,9 (C-5), 124,6 (C-6), 123,2 (C-7a), 121,3 (C-3), 109,8 (C-8), 101,4 (C-11), 71,9 (C- γ), 71,3 (C- δ , C- ϵ), 71,1 (C- α), 69,9 (C- β), 57,3 (-OCH₃), 44,5 (C- ζ) м.д. Элементный анализ для $C_{20}H_{23}ClNO_4I$ (%): вычислено С, 47,69; Н, 4,60; N, 2,78; найдено С, 47,56; Н, 4,92; N, 2,74. Масс-спектр (ИЭР) раствора **19** в CH_3OH , m/z : вычислено 376,1; найдено 376,3 [**19-I**]⁺.

(4^Z,2Z)-1⁶-метокси-4¹H-7,10,13-триокса-1(2,7)-хинолина-4(4,1)-триазилациклотридекафан-2-ен (Z-57a) и (E)-1⁶-метокси-4¹H-7,10,13-триокса-1(2,7)-хинолина-4(5,1)-триазилациклотридекафан-2-ен (E-57a)



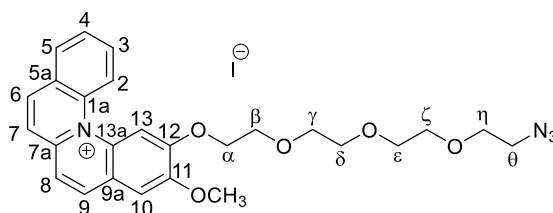
Смесь производного **19** (86 мг, 0.19 ммоль) и азида натрия (61 мг, 0.94 ммоль) в ДМФА (5 мл) перемешивали при 90°C в атмосфере аргона в течение 25 часов. Далее реакционную массу упаривали, к остатку добавляли ацетонитрил и отфильтровывали от неорганических солей на складчатом фильтре, фильтрат упаривали. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 в ацетонитриле с получением смеси **E-57a** и **Z-57a** в соотношении 3:1. Желтое масло, выход 33% (24 мг). ¹H ЯМР (400 МГц, CD_3CN , E :- Z = 3:1): δ = 8,16 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-7, **Z-57a**), 8,12 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-7, **E-57a**), 7,58-7,69 (м, 4H, H-1 от **Z-57a**+**E-57a**; H-6 от **Z-57a**; H-3 от **E-57a**), 7,44 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-6, **E-57a**), 7,38 (д, J = 11,9 Гц, 1H, H-3, **Z-57a**), 7,33 (с, 1H, H-11, **Z-57a**), 7,31 (с, 1H, H-11, **E-57a**), 7,26 (с, 1H, H-8, **Z-57a**), 7,24 (с, 1H, H-8, **E-57a**), 6,63 (д, J = 16,2 Гц, 1H, H-4, **E-57a**), 5,78 (д, J = 11,9 Гц, 1H, H-4, **Z-57a**), 4,28 (т, 4H, H- α , **Z-57a**+**E-57a**), 3,97 (с, 6H, -OCH₃, **Z-57a**+**E-57a**), 3,82 (т, 4H, H- β , **Z-57a**+**E-57a**), 3,59-

3,69 (м, 12Н, Н-γ, Н-δ, Н-ε, **Z-57a+E-57a**), 3,36 (т, 4Н, Н-ζ, **Z-57a+E-57a**) м.д. Масс-спектр (ИЭР) раствора **57a** в CH₃OH, *m/z*: вычислено 382,2; найдено 383,3 [**57a**+H]⁺ (90%), 405,3 [**57a**+Na]⁺ (100%).

Общая методика получения производных хинолизиния 55-57

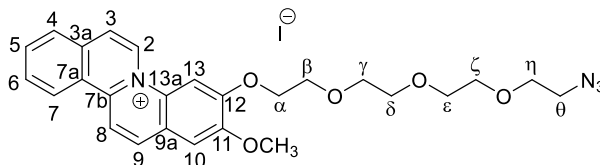
Смесь соединения **16**, **17** или **19** (0,10 ммоль), азидата натрия (0,30 ммоль) и йодида калия (0,02 ммоль) перемешивали при кипячении в ацетонитриле (10 мл) в инертной атмосфере в течение 60 часов. После завершения реакции растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли хлористый метилен и отфильтровывали от неорганических солей. Фильтрат упаривали в вакууме с получением продукта **19**. Продукты **16** и **17** дополнительно очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al₂O₃ с использованием градиентного элюирования (этилацетат → этилацетат/этанол 70:30 для **16**; ацетонитрил → ацетонитрил/этанол 50:50 для **17**).

2-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-метоксихинолино[1,2-а] хинолин-13-иум йодид (**55**)



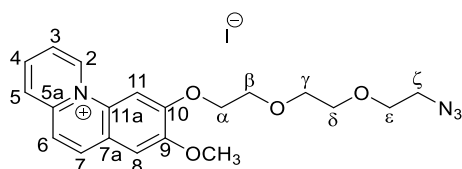
По общей методике из соединения **16** (48 мг, 0,08 ммоль), азидата натрия (16 мг, 0,24 ммоль) и йодида калия (3 мг, 0,02 ммоль) получен продукт **55** (21 мг, 44%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (300 МГц, CD₃CN): δ = 9,02 (д, *J* = 8,9 Гц, 1Н, Н-2), 8,72 (д, *J* = 8,5 Гц, 1Н, Н-9), 8,59 (д, *J* = 8,7 Гц, 1Н, Н-6), 8,38 (с, 1Н, Н-13), 8,33 (дд, *J* = 7,6 Гц, 1,7 Гц, 1Н, Н-5), 8,11-8,15 (м, 2Н, Н-7, Н-8), 7,94-8,04 (м, 2Н, Н-3, Н-4), 7,78 (с, 1Н, Н-10), 4,34 (т, 2Н, Н-α), 4,10 (с, 3Н, -OCH₃), 3,88 (т, 2Н, Н-β), 3,63-3,67 (м, 2Н, Н-η), 3,53-3,59 (м, 8Н, Н-γ, Н-δ, Н-ε, Н-ζ), 3,32 (т, 2Н, Н-θ) м.д. ¹³C{¹H} ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 154,5 (C-12), 152,5 (C-11), 145,2 (C-7a), 140,5 (C-9), 138,6 (C-6), 137,0 (C-1a), 134,5 (C-13a), 132,3 (C-3), 130,9 (C-4), 130,6 (C-5), 129,9 (C-5a), 126,6 (C-9a), 124,3 (C-8), 124,1 (C-2), 122,1 (C-7), 109,1 (C-10), 106,5 (C-13), 71,5 (C-ζ), 71,2 (C-ε), 71,1 (C-γ, C-δ), 70,5 (C-α, C-η), 69,9 (C-β), 57,5 (-OCH₃), 51,5 (C-θ) м.д. Элементный анализ для C₂₆H₂₉N₄O₅I (%): вычислено С, 51,66; Н, 4,84; N, 9,27; найдено С, 51,32; Н, 4,92; N, 9,18. Масс-спектр (ИЭР) раствора **55** в CH₃OH, *m/z*: вычислено 477,2; найдено 477,2 [**55**-I]⁺.

3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-метоксиизохинолин[2,1-а]хинолин-5-иум йодид (**56**)



По общей методике из соединения **17** (54 мг, 0,10 ммоль), азидата натрия (19 мг, 0,30 ммоль) и йодида калия (3 мг, 0,02 ммоль) получен продукт **56** (50 мг, 91%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 9,49 (д, J = 7,5 Гц, 1H, H-2), 8,66 (д, 2H, H-7, H-8), 8,50 (д, J = 9,1 Гц, 1H, H-9), 8,03 (т, J = 7,5 Гц, 2H, H-3, H-4), 7,95 (т, J = 7,4 Гц, 1H, H-5), 7,87 (т, 1H, H-6), 7,84 (с, 1H, H-13), 7,41 (с, 1H, H-10), 4,51 (т, 2H, H- α), 3,93 (т, 2H, H- β), 3,88 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,73 (т, 2H, H- η), 3,67 (т, 2H, H- ζ), 3,56-3,65 (м, 6H, H- γ , H- δ , H- ϵ), 3,32 (т, 2H, H- θ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 155,9 (C-12), 152,3 (C-11), 142,4 (C-7b), 139,3 (C-9), 135,1 (C-5), 132,5 (C-3a), 132,3 (C-13a), 132,1 (C-6), 128,9 (C-4), 127,6 (C-2), 126,7 (C-7), 126,2 (C-7a), 123,9 (C-9a), 123,6 (C-3), 116,8 (C-8), 109,4 (C-10), 100,6 (C-13), 71,5 (C- ζ), 71,3 (C- ϵ), 71,2 (C- γ , C- δ), 70,5 (C- α), 69,8 (C- β , C- η), 57,4 ($-\text{OCH}_3$), 51,5 (C- θ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_5\text{I}$ (%): вычислено С, 51,66; Н, 4,84; N, 9,27; найдено С, 51,44; Н, 4,88; N, 9,23. Масс-спектр (ИЭР) раствора **56** в CH_3OH , m/z : вычислено 477,2; найдено 477,3 [**56-I**] $^+$.

9-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-8-метоксипиридо[1,2-а]хинолин-11-иум йодид (57)



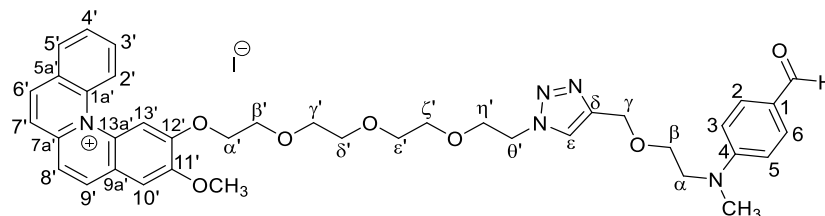
По общей методике из соединения **19** (70 мг, 0,14 ммоль), азидата натрия (27 мг, 0,42 ммоль) и йодида калия (5 мг, 0,03 ммоль) получен продукт **57** (70 мг, 98%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3CN): δ = 10,19 (д, J = 7,1 Гц, 1H, H-2), 8,48 (д, J = 8,8 Гц, 1H, H-7), 8,42 (д, J = 8,5 Гц, 1H, H-5), 8,34 (т, 1H, H-4), 8,15 (с, 1H, H-11), 8,06 (д, J = 8,5 Гц, 2H, H-6, H-3), 7,66 (с, 1H, H-8), 4,57 (т, 2H, H- α), 4,04 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,95 (т, 2H, H- β), 3,62-3,74 (м, 6H, H- γ , H- δ , H- ϵ), 3,37 (т, 2H, H- ζ) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 154,6 (C-10), 152,6 (C-9), 143,2 (C-5a), 138,4 (C-4), 136,9 (C-7), 134,6 (C-2), 130,9 (C-11a), 129,2 (C-5), 124,6 (C-6), 123,8 (C-7a), 121,6 (C-3), 110,2 (C-8), 101,0 (C-11), 71,3 (C- γ , C- δ), 71,0 (C- α), 70,3 (C- ϵ), 69,7 (C- β), 57,5 ($-\text{OCH}_3$), 51,4 (C- ζ) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4\text{I}$ (%): вычислено С, 47,07; Н, 4,54; N, 10,98; найдено С, 47,01; Н, 4,56; N, 10,95. Масс-спектр (ИЭР) раствора **57** в CH_3OH , m/z : вычислено 383,2; найдено 383,1 [**57-I**] $^+$.

Общая методика получения соединений 58-60

Соединение **55**, **56** или **57** (0,10 ммоль), замещенный бензальдегид **53** (0,12 ммоль), аскорбат натрия (0,02 ммоль) и диизопропилэтиламин (0,20 ммоль) растворяли в смеси ДМФА- H_2O (3:1, 5 мл). Далее добавляли сульфат меди(II) (0,01 ммоль) и перемешивали в инертной атмосфере при 70°C в течение 30 часов. После завершения реакции растворитель упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 с

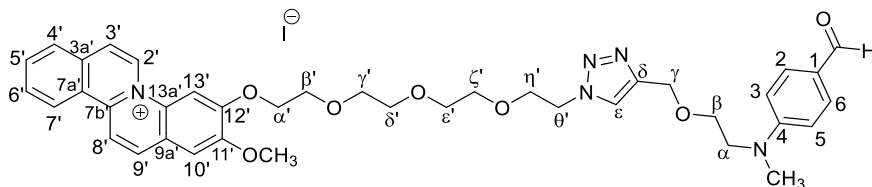
использованием градиентного элюирования (хлористый метилен $\rightarrow$ хлористый метилен/ацетонитрил 82:18 для **58** и **60**; хлористый метилен $\rightarrow$ хлористый метилен/этанол 60:40 для **57**).

2-(2-(2-(2-(2-(4-((4-формилфенил)(метил)амино)этокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)этокси)этокси)этокси)-3-метоксифинолино[1,2-а]хинолин-13-иум йодид (58**)**



По общей методике из соединения **55** (32 мг, 0,057 ммоль), замещенного бензальдегида **53** (12 мг, 0,057 ммоль), аскорбата натрия (2 мг, 0,011 ммоль), диизопропилэтиламина (19 мкл, 0,115 ммоль) и сульфата меди(II) (2 мг, 0,006 ммоль) получен продукт **58** (25 мг, 57%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN): δ = 9,57 (с, 1H, $-\text{CHO}$), 8,97 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-2'), 8,69 (д, J = 8,4 Гц, 1H, H-9'), 8,57 (д, J = 8,6 Гц, 1H, H-6'), 8,31 (с, 1H, H-13'), 8,29 (д, J = 7,6 Гц, 1H, H-5'), 8,08-8,13 (м, 2H, H-7', H-8'), 7,91-8,01 (м, 2H, H-4', H-3'), 7,74 (с, 1H, H-10'), 7,70 (с, 1H, H-ε), 7,54 (д, J = 7,8 Гц, 2H, H-2, H-6), 6,67 (д, J = 7,8 Гц, 2H, H-3, H-5), 4,48 (с, 2H, H-γ), 4,42 (т, 2H, H-θ'), 4,30 (т, 2H, H-α'), 4,04-4,10 (м, 5H, H-η', $-\text{OCH}_3$), 3,84 (т, 2H, H-β'), 3,75 (т, 2H, H-β), 3,63-3,46 (м, 10H, H-α, H-γ', H-δ', H-ε', H-ζ'), 2,96 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 190,7 ($-\text{CHO}$), 154,5 (C-12'), 152,4 (C-4, C-11'), 145,4 (C-δ), 145,2 (C-7a'), 140,5 (C-9'), 138,6 (C-6'), 137,0 (C-1a'), 134,4 (C-13a'), 132,4 (C-3'), 132,3 (C-2, C-6), 130,9 (C-4'), 130,6 (C-5'), 129,9 (C-5a'), 126,5 (C-9a'), 126,1 (C-1), 124,8 (C-ε), 124,3 (C-8'), 124,1 (C-2'), 122,1 (C-7'), 112,1 (C-3, C-5), 109,1 (C-10'), 106,5 (C-13'), 71,5 (C-ε'), 71,1 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 71,0 (C-ζ'), 70,4 (C-α'), 70,0 (C-β'), 69,9 (C-η'), 68,2 (C-β), 65,1 (C-γ), 57,5 ($-\text{OCH}_3$), 52,4 (C-α), 50,8 (C-θ'), 39,4 ($-\text{NCH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_7\text{I}$ (%): вычислено C, 57,01; H, 5,40; N, 8,52; найдено C, 56,83; H, 5,44; N, 8,47. Масс-спектр (ИЭР) раствора **58** в CH_3OH , m/z : вычислено 694,3; найдено 694,4 [**58**] $^+$.

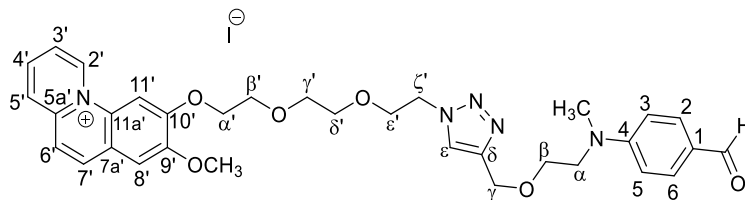
3-(2-(2-(2-(2-(4-((4-формилфенил)(метил)амино)этокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)этокси)этокси)этокси)-2-метоксиизохинолино[2,1-а]хинолин-5-иум йодид (59**)**



По общей методике из соединения **56** (61 мг, 0,11 ммоль), замещенного бензальдегида **53** (29 мг, 0,13 ммоль), аскорбата натрия (4 мг, 0,02 ммоль), диизопропилэтиламина (38 мкл, 0,22 ммоль) и сульфата меди(II) (3 мг, 0,01 ммоль) получен продукт **59** (71 мг, 84%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN): δ = 9,65 (д, J = 7,6 Гц, 1H, H-2'), 9,50 (с, 1H, $-\text{CHO}$), 8,61-8,67 (м, 2H, H-7', H-8'), 8,44 (д, J = 9,0 Гц, 1H, H-9'), 7,90-8,02 (м, 4H, H-3', H-4', H-5', H-13'), 7,85 (т, J

= 7,6 Гц, 1H, H-6'), 7,75 (с, 1H, H-ε), 7,45 (д, $J = 8,9$ Гц, 2H, H-2, H-6), 7,35 (с, 1H, H-10'), 6,57 (д, $J = 8,9$ Гц, 2H, H-3, H-5), 4,52 (т, 2H, H-α'), 4,49 (с, 2H, H-γ), 4,44 (т, 2H, H-θ'), 3,89 (т, 2H, H-β'), 3,83 (с, 3H, -OCH₃), 3,79 (т, 2H, H-η'), 3,66 (т, 2H, H-β), 3,57-3,61 (м, 4H, H-α, H-ε'), 3,51-3,56 (м, 6H, H-γ', H-δ', H-ζ'), 2,89 (с, 3H, -NCH₃) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD₃CN): δ = 190,7 (-CHO), 156,0 (C-12'), 152,5 (C-11'), 152,4 (C-4), 145,4 (C-δ), 142,4 (C-7b'), 139,3 (C-9'), 135,3 (C-5'), 132,6 (C-3a'), 132,5 (C-13a'), 132,3 (C-2, C-6), 132,1 (C-6'), 128,9 (C-4'), 127,5 (C-2'), 126,8 (C-7'), 126,2 (C-7a'), 126,0 (C-1), 124,9 (C-ε), 124,2 (C-9a'), 123,6 (C-3'), 116,8 (C-8'), 112,2 (C-3, C-5), 109,4 (C-10'), 100,7 (C-13'), 71,3 (C-ε'), 71,2 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 71,0 (C-ζ'), 70,4 (C-α'), 69,9 (C-β'), 69,9 (C-η'), 68,2 (C-β), 65,0 (C-γ), 57,4 (-OCH₃), 52,5 (C-α), 50,9 (C-θ'), 39,4 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₃₉H₄₄N₅O₇I (%): вычислено С, 57,01; Н, 5,40; N, 8,52; найдено С, 56,74; Н, 5,52; N, 8,41. Масс-спектр (ИЭР) раствора **59** в CH₃OH, m/z : вычислено 694,3; найдено 694,4 [**59**-I]⁺.

9-(2-(2-(2-(4-((2-((4-формилфенил)(метил)амино)этокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)этокси)этокси)этокси)-8-метоксипиридо[1,2-а]хинолин-11-иум йодид (60**)**

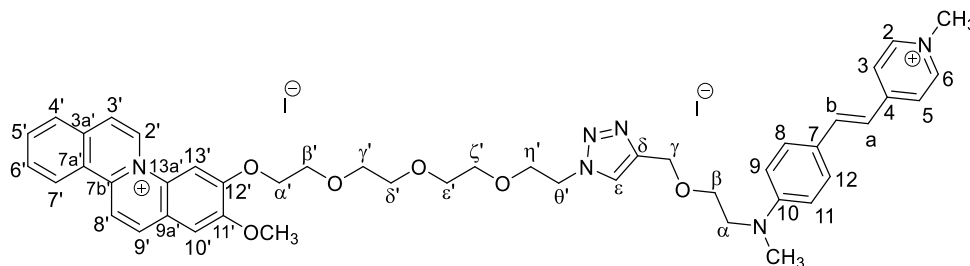


По общей методике из соединения **57** (70 мг, 0,14 ммоль), замещенного бензальдегида **53** (36 мг, 0,17 ммоль), аскорбата натрия (5 мг, 0,03 ммоль), диизопропилэтиламина (48 мкл, 0,28 ммоль) и сульфата меди(II) (3 мг, 0,01 ммоль) получен продукт **60** (62 мг, 62%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ = 9,92 (д, $J = 7,1$ Гц, 1H, H-2'), 9,42 (с, 1H, -CHO), 8,31-8,42 (м, 3H, H-7', H-5', H-4'), 8,00-8,04 (м, 3H, H-6', H-11', H-3'), 7,95 (с, 1H, H-ε), 7,54 (с, 1H, H-8'), 7,45 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H, H-2, H-6), 6,57 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H, H-3, H-5), 4,54 (т, 2H, H-ζ'), 4,52 (с, 2H, H-γ), 4,39 (т, 2H, H-α'), 3,97 (с, 3H, -OCH₃), 3,87-3,90 (м, 4H, H-β', H-ε'), 3,64-3,71 (м, 4H, H-γ', H-δ'), 3,61 (т, 2H, H-β), 3,52 (т, 2H, H-α), 2,93 (с, 3H, -NCH₃) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD₃OD): δ = 192,0 (-CHO), 155,3 (C-4, C-10'), 153,4 (C-9'), 145,7 (C-δ), 143,5 (C-5a'), 138,4 (C-4'), 137,4 (C-7'), 133,9 (C-2'), 133,0 (C-2, C-6), 131,1 (C-11a'), 129,5 (C-5'), 125,9 (C-1), 125,8 (C-ε), 124,9 (C-3'), 124,2 (C-7a'), 121,6 (C-6'), 112,1 (C-3, C-5), 110,0 (C-8'), 100,7 (C-11'), 71,7 (C-γ'), 71,5 (C-δ'), 70,9 (C-α'), 70,3 (C-β', C-ε'), 68,7 (C-β), 65,0 (C-γ), 57,1 (-OCH₃), 52,6 (C-α), 51,4 (C-ζ'), 39,3 (-NCH₃) м.д. Элементный анализ для C₃₃H₃₈N₅O₆I (%): вычислено С, 54,48; Н, 5,26; N, 9,63; найдено С, 54,36; Н, 5,31; N, 9,59. Масс-спектр (ИЭР) раствора **60** в H₂O, m/z : вычислено 600,3; найдено 600,2 [**60**-I]⁺.

Общая методика получения конъюгатов 7, 8

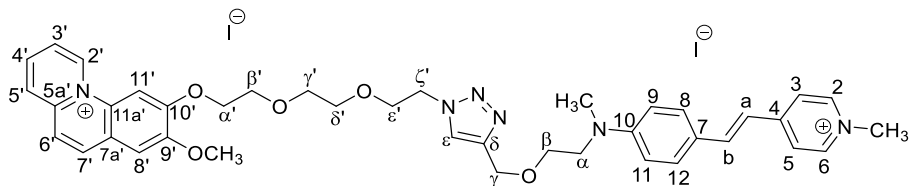
Соединение **59** или **60** (0,10 ммоль) и йодид 1,4-диметилпиридин-1-ия **38** (0,10 ммоль) растворяли в 2-этоксиэтаноле (3 мл) при нагревании. Далее добавляли пиперидин (0,10 ммоль) и перемешивали при кипении с хлоркальцевой трубкой в течение 4-10 часов. После завершения реакции растворитель упаривали в вакууме, остаток очищали методом колоночной хроматографии на нейтральном Al_2O_3 с использованием градиентного элюирования (ацетонитрил $\rightarrow$ ацетонитрил/этанол 80:20).

(E)-2-метокси-3-(2-(2-(2-(2-(4-((2-(метил(4-(2-(1-метилпиридин-1-иум-4-ил)винил)фенил)амино)этокси)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)этокси)этокси)этокси)изохинолино[2,1-a]хинолин-5-иум йодид (7)



По общей методике из соединения **59** (71 мг, 0,09 ммоль), йодида 1,4-диметилпиридин-1-ия **38** (18 мг, 0,08 ммоль) и пиперидина (8 мкл, 0,08 ммоль) получен продукт **7** (27 мг, 36%) в виде красного твердого вещества, т. пл. 62-64°C. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN): δ = 9,81 (д, J = 7,6 Гц, 1H, H-2'), 8,83-8,88 (м, 2H, H-7', H-8'), 8,65 (д, J = 9,3 Гц, 1H, H-9'), 8,27 (д, J = 6,4 Гц, 2H, H-2, H-6), 8,10-8,18 (м, 3H, H-3', H-13', H-4'), 8,02 (т, J = 7,5 Гц, 1H, H-5'), 7,94 (т, J = 7,5 Гц, 1H, H-7'), 7,78 (с, 1H, H-ε), 7,61 (д, J = 6,4 Гц, 2H, H-3, H-5), 7,56 (с, 1H, H-10'), 7,29 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-b), 7,12 (д, J = 8,5 Гц, 2H, H-8, H-12), 6,59 (д, J = 16,0 Гц, 1H, H-a), 6,45 (д, J = 8,5 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,56 (т, 2H, H-α'), 4,54 (с, 2H, H-γ), 4,45 (т, 2H, H-θ'), 4,10 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 3,93-3,98 (м, 5H, $-\text{OCH}_3$, H-β'), 3,79 (т, 2H, H-η'), 3,70 (т, 2H, H-β), 3,57-3,63 (м, 4H, H-α, H-ε'), 3,47-3,53 (м, 6H, H-γ', H-δ', H-ζ'), 2,88 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3CN): δ = 156,0 (C-12'), 155,3 (C-4), 152,6 (C-10), 152,3 (C-11'), 145,4 (C-δ), 144,9 (C-2, C-6), 143,4 (C-b), 142,4 (C-7b'), 139,3 (C-9'), 135,3 (C-5'), 132,6 (C-3a'), 132,3 (C-13a'), 132,1 (C-6'), 131,4 (C-8, C-12), 128,9 (C-4'), 127,5 (C-2'), 126,8 (C-7'), 126,2 (C-7a'), 124,9 (C-ε), 123,9 (C-9a'), 123,7 (C-3'), 123,6 (C-7), 123,3 (C-3, C-5), 117,6 (C-a), 116,9 (C-8'), 113,0 (C-9, C-11), 109,4 (C-10'), 100,7 (C-13'), 71,2 (C-ε'), 71,1 (C-δ'), 71,1 (C-γ'), 71,0 (C-ζ'), 70,4 (C-α'), 69,9 (C-β'), 70,0 (C-η'), 68,3 (C-β), 65,0 (C-γ), 57,4 ($-\text{OCH}_3$), 52,5 (C-α), 50,9 (C-θ'), 39,3 ($-\text{NCH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{I}_2\text{N}_6\text{O}_6$ (%): вычислено C, 53,19; H, 5,05; N, 8,09; найдено C, 53,02; H, 5,11; N, 8,13. Масс-спектр (ИЭР) раствора **7** в CH_3OH , m/z : вычислено 392,2; найдено 392,5 $[\text{7-2I}]^{2+}$.

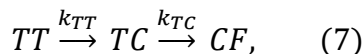
(E)-8-метокси-9-(2-(2-(2-(4-((2-(метил(4-(2-(1-метилпиридин-1-иум-4-ил)винил)фенил)амино)этокс)метил)-1*H*-1,2,3-триазол-1-ил)этокс)этокс)этокс)пиридо[1,2-*a*]хинолин-11-иум йодид (8**)**



По общей методике из соединения **60** (40 мг, 0,06 ммоль), йодида 1,4-диметилпиридин-1-ия **38** (13 мг, 0,06 ммоль) и пиперидина (5 мкл, 0,06 ммоль) получен продукт **8** (16 мг, 31%) в виде красного твердого вещества, т. пл. 86-88°C. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ = 10,08 (д, J = 7,1 Гц, 1H, H-2'), 8,49-8,55 (м, 3H, H-7', H-2, H-6), 8,45 (д, J = 9,5 Гц, 1H, H-5'), 8,36 (т, 1H, H-4'), 8,24 (с, 1H, H-11'), 8,10 (д, J = 8,9 Гц, 1H, H-6'), 8,08 (т, 1H, H-3'), 7,98 (с, 1H, H-ε), 7,92 (д, J = 6,8 Гц, 2H, H-3, H-5), 7,70 (с, 1H, H-8'), 7,63 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-b), 7,38 (д, J = 8,9 Гц, 2H, H-8, H-12), 6,92 (д, J = 15,9 Гц, 1H, H-a), 6,60 (д, J = 8,9 Гц, 2H, H-9, H-11), 4,56 (с, 2H, H-γ), 4,50 (т, 2H, H-ζ'), 4,49 (т, 2H, H-α'), 4,23 (с, 3H, $-\text{N}^+\text{CH}_3$), 4,01 (с, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,94 (т, 2H, H-β'), 3,89 (т, 2H, H-ε'), 3,72 (т, 2H, H-γ'), 3,63-3,68 (м, 4H, H-δ', H-β), 3,54 (т, 2H, H-α), 2,96 (с, 3H, $-\text{NCH}_3$) м.д. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР (101 МГц, CD_3OD): δ = 155,8 (C-4), 155,5 (C-10'), 153,5 (C-9'), 152,7 (C-10), 145,8 (C-δ), 145,2 (C-2, C-6), 143,7 (C-b), 143,6 (C-5a'), 138,3 (C-4'), 137,5 (C-7'), 134,2 (C-2'), 131,4 (C-8, C-12), 131,4 (C-11a'), 129,5 (C-5'), 125,9 (C-ε), 124,9 (C-3'), 124,4 (C-7a'), 123,8 (C-7), 123,5 (C-3, C-5), 121,7 (C-6'), 117,6 (C-a), 112,9 (C-9, C-11), 110,2 (C-8'), 101,0 (C-11'), 71,8 (C-γ'), 71,6 (C-δ'), 71,2 (C-α'), 70,4 (C-β'), 70,3 (C-ε'), 68,9 (C-β), 65,0 (C-γ), 57,2 ($-\text{OCH}_3$), 52,7 (C-α), 51,5 (C-ζ'), 47,3 ($-\text{N}^+\text{CH}_3$), 39,2 ($-\text{NCH}_3$) м.д. Элементный анализ для $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_5\text{I}_2$ (%): вычислено С, 50,86; Н, 4,91; N, 8,90; найдено С, 50,78; Н, 4,99; N, 8,85. Масс-спектр (ИЭР) раствора **8** в H_2O , m/z : вычислено 345,2; найдено 345,3 $[\text{8-2I}]^{2+}$.

4.2 Определение констант скорости термической релаксации

Пренебрегая образованием СС- и СТ-форм при облучении растворов хроменов из-за их низкой стабильности, кинетическую схему процесса термического обесцвечивания открытых форм можно записать следующим образом:



где ТТ и ТС – открытые формы хромена, CF – закрытая форма хромена; k_{TT} и k_{TC} – константы скорости последовательных этапов процесса обесцвечивания.

Применяя стандартную процедуру анализа кинетической модели, можно записать дифференциальные уравнения (8) и (9):

$$\frac{d[TT]}{dt} = -k_{TT}[TT], \quad (8)$$

$$\frac{d[TC]}{dt} = -k_{TC}[TC] + k_{TT}[TT], \quad (9)$$

Решая уравнения (8) и (9) совместно, можно получить выражения для зависимостей концентраций открытых форм от времени (10) и (11):

$$[TT] = [TT]_0 e^{-k_{TT}t}, \quad (10)$$

$$[TC] = [TC]_0 e^{-k_{TC}t} + [TT]_0 \frac{k_{TT}}{k_{TC} - k_{TT}} (e^{-k_{TT}t} - e^{-k_{TC}t}), \quad (11)$$

Подставляя полученные зависимости в выражение закона Ламберта-Бугера-Бера и учитывая свойство аддитивности оптической плотности, получим общее выражение (12) для наблюдаемого изменения интенсивности полос поглощения открытых форм во времени:

$$A = A_0^{TC} e^{-k_{TC}t} + A_0^{TT} e^{-k_{TT}t} + A_0^{TT} \frac{k_{TT}}{k_{TC} - k_{TT}} (e^{-k_{TT}t} - e^{-k_{TC}t}), \quad (12)$$

Легко заметить, что при $k_{TC} \gg k_{TT}$ вид зависимости существенно упрощается:

$$A = A_0^{TC} e^{-k_{TC}t} + A_0^{TT} e^{-k_{TT}t}, \quad (13)$$

Таким образом, общий вид кривой термической релаксации носит биэкспоненциальный характер. Время жизни (период полураспада) для каждой из открытых форм рассчитывалось по формуле (14):

$$\tau_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k}, \quad (14)$$

4.3 Расчет спектра поглощения Z-изомера

Расчёт спектров поглощения Z-изомеров проводили по методу Фишера [213]. Первым этапом было измерение спектра поглощения раствора, содержащего чистый E-изомер лиганда, при заранее известной концентрации C_L . Далее проводили облучение раствора двумя различными длинами волн (313, 365 или 405 нм), приводящее к образованию фотостационарных состояний. Используя предположение, что соотношение квантовых выходов $\phi^{E \rightarrow Z}/\phi^{Z \rightarrow E}$ не зависит от используемой длины волны облучения, на основе спектров поглощения полученных фотостационарных смесей мы определяли долю Z-изомера (α_{365}) при облучении светом с длиной волны $\lambda = 365$ нм, используя следующую формулу (15):

$$\alpha_{365} = \frac{\frac{\Delta_{313}}{D_{313}} - \frac{\Delta_{365}}{D_{365}}}{1 + \frac{\Delta_{313}}{D_{313}} - n \cdot \left(1 + \frac{\Delta_{365}}{D_{365}}\right)}, \quad (15)$$

где Δ_{313} (Δ_{365}) – это разница в оптических плотностях раствора в фотостационарном состоянии (полученном при $\lambda = 313$ нм или $\lambda = 365$ нм соответственно) и исходного раствора чистого E-изомера при соответствующих длинах волн (313 или 365 нм).

Коэффициент n рассчитывался по формуле (16):

$$n = \frac{D_{365}^{313} - D_{365}^E}{D_{365}^{365} - D_{365}^E}, \quad (16)$$

где D_{365}^{313} и D_{365}^{365} – оптические плотности раствора при длине волны 365 нм в фотостационарных состояниях, полученных при облучении $\lambda_{\text{обл}} = 313$ и 365 нм соответственно; D_{365}^E – исходная оптическая плотность чистого E -изомера на длине волны с максимальными оптическими изменениями.

После определения α_{365} оптическую плотность раствора, содержащего только Z -изомер, рассчитывали по выражению (17):

$$D_Z(\lambda) = \frac{D^{365}(\lambda) - (1 - \alpha_{365}) \cdot D_E(\lambda)}{\alpha_{365}}, \quad (17)$$

где $D^{365}(\lambda)$ – спектр раствора, находящегося в фотостационарном состоянии, полученном при облучении $\lambda = 365$ нм.

Затем было вычислено соотношение квантовых выходов реакций прямой ($E \rightarrow Z$) и обратной ($Z \rightarrow E$) фотоизомеризации (18):

$$\frac{\varphi_Z}{\varphi_E} = \frac{(1 - \alpha_{365}) \cdot \varepsilon_E^{365}}{\alpha_{365} \cdot \varepsilon_Z^{365}}, \quad (18)$$

где ε_E^{365} и ε_Z^{365} – молярные коэффициенты экстинкции E - и Z -изомеров соответственно при $\lambda = 365$ нм; d – длина оптического пути (1 см). При расчётах теоретических спектров предполагалось равенство концентраций обоих изомеров, исходя из предположения, что весь исходный E -изомер полностью переходит в Z -форму.

4.4 Расчет квантовых выходов реакции E, Z -фотоизомеризации

Расчет квантовых выходов реакции E, Z -фотоизомеризации проводился по методу, разработанному в нашей лаборатории, на основании экспериментальной зависимости оптической плотности раствора на длине волны облучения от времени облучения. Данный метод учитывает прямую и обратную реакцию фотоизомеризации и основан на численном решении соответствующих дифференциальных уравнений [249]. В расчете также использовалось отношение квантовых выходов обратной и прямой реакции фотоизомеризации, полученное при расчете спектра Z -изомера по методу Фишера [213], при облучении соединений до достижения фотостационарных состояний.

Для обратимой фотохимической реакции $E \rightleftharpoons Z$ выражения для скорости образования веществ E - и Z - можно записать в виде уравнений (19) и (20):

$$\frac{d[E]}{dt} = -\varphi^{E \rightarrow Z} \cdot I_{\text{погл}}^E + \varphi^{Z \rightarrow E} \cdot I_{\text{погл}}^Z, \quad (19)$$

$$\frac{d[Z]}{dt} = +\varphi^{E \rightarrow Z} \cdot I_{\text{погл}}^E - \varphi^{Z \rightarrow E} \cdot I_{\text{погл}}^Z, \quad (20)$$

где $I_{\text{погл}}^E$ и $I_{\text{погл}}^Z$ – количество поглощенных квантов излучения веществом E и Z за время dt ; $\varphi^{E \rightarrow Z}$ и $\varphi^{Z \rightarrow E}$ – квантовые выходы прямой и обратной реакций соответственно; $d[E]$ и $d[Z]$ – изменение числа молекул E и Z за время dt . Количество поглощенных квантов света каждым из веществ можно определить исходя из уравнений (21) – (23):

$$I_{\text{погл}}^E = I_{\text{погл}}^{\Sigma} \cdot \frac{A_E}{A_{\Sigma}}, \quad (21)$$

$$I_{\text{погл}}^Z = I_{\text{погл}}^{\Sigma} \cdot \frac{A_Z}{A_{\Sigma}}, \quad (22)$$

$$I_{\text{погл}}^{\Sigma} = I_0 \cdot (1 - 10^{-A_{\Sigma}}), \quad (23)$$

в которых A_E и A_Z – оптическая плотность вещества E и Z , линейно связанная с $[E]$ и $[Z]$ по закону Ламберта-Бугера-Бэра; A_{Σ} – суммарная оптическая плотность всех компонент ($A_{\Sigma} = A_E + A_Z$), $I_{\text{погл}}^{\Sigma}$ – общее количество поглощенных квантов излучения за время dt , I_0 – интенсивность облучения. Расчет $\varphi^{E \rightarrow Z}$ и $\varphi^{Z \rightarrow E}$ проводился итерационным способом при помощи программы на языке Visual Basic, встроенном в Microsoft Excel. В расчете также использовалось отношение квантовых выходов обратной и прямой реакции фотоизомеризации $\varphi^{E \rightarrow Z}/\varphi^{Z \rightarrow E}$, полученное при расчете спектра Z -изомера по методу Фишера.

4.5 Расчет квантовых выходов флуоресценции

Квантовые выходы флуоресценции определялись в насыщенных воздухом растворах при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Для расчета квантовых выходов использовалась формула (24) [250]:

$$\varphi^{\text{фл}} = \varphi_R^{\text{фл}} \frac{S \cdot (1 - 10^{-A_R}) \cdot n^2}{S_R \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot n_R^2}, \quad (24)$$

где $\varphi^{\text{фл}}$, $\varphi_R^{\text{фл}}$ – квантовые выходы анализируемого раствора и стандарта соответственно, A и A_R – оптическая плотность анализируемого раствора и раствора стандарта соответственно, S и S_R – площадь под кривой спектра флуоресценции анализируемого раствора и раствора стандарта соответственно, n и n_R – показатели преломления растворителей исследуемого вещества и стандартного соединения. В качестве стандарта для расчета квантовых выходов использовался кумарин 343 в этаноле ($\varphi_{\text{фл}} = 0,63$ [251]), кумарин 6 в этаноле ($\varphi_{\text{фл}} = 0,78$ [251]) и бисульфат хинина в 1 н. H_2SO_4 ($\varphi_{\text{фл}} = 0,55$) [252].

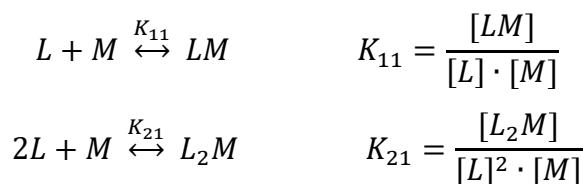
Квантовые выходы флуоресценции комплексов состава (L)·ДНК, (L)·СВ[7] определялись в присутствии избытка ДНК/СВ[7] в растворе лиганда L, при котором степень закомплексованности лиганда составляла 90-95%. Необходимый избыток рассчитывался исходя из известного значения константы устойчивости образующегося комплекса и значения общей аналитической концентрации лиганда в растворе с помощью программы SpecFit/32.

4.6 Изучение взаимодействия лигандов с ДНК, СВ[7] и определение констант устойчивости комплексов

ДНК тимуса телят (Sigma-Aldrich, USA; I типа, полимеризованная натриевая соль) была использована без дополнительной очистки. Кукурбит[7]урил был синтезирован в лаборатории Л. Исаака (Университет Мэрилэнда, США). Для приготовления буферных растворов и спектральных измерений применялась очищенная вода с удельным сопротивлением $\geq 18 \text{ М}\Omega \text{ см}^{-1}$. Фосфатный буфер ($5,8 \cdot 10^{-3} \text{ М Na}_2\text{HPO}_4$, $4,2 \cdot 10^{-3} \text{ М NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0) использовался для титрования лигандов с ДНК и СВ[7]. ДНК тимуса телят растворяли в буферном растворе до получения концентрации 1-2 мг/мл и оставляли при 4°C на ночь. Затем раствор фильтровали через PVDF мембранный фильтр (размер пор 0,45 мкм) для удаления нерастворившегося остатка. Точные концентрации растворов ДНК были определены путем измерения поглощения раствора ДНК в буфере, полученного при разбавлении исходного раствора ДНК (1:20), учитывая, что $\epsilon_{260} = 12824 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ пар оснований [253].

Спектрофотометрические и флуориметрические измерения проводились в кварцевых кюветах ($l = 10 \text{ мм}$) при $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Растворы для анализа готовились непосредственно перед измерениями из стоковых растворов лигандов в ацетонитриле, воде или ДМСО. Чтобы избежать разбавления в процессе титрования, раствор ДНК с концентрацией 1-2 мМ (титрант) содержал лиганд в той же самой концентрации, что и анализируемый раствор. Аликвоты анализируемого раствора помещались в кварцевые кюветы, титрование проводилось с шагом 0,5-2 эквивалента. Время выдерживания образца после каждой добавки, необходимое для установления равновесия, определялось экспериментально по отсутствию временных изменений в спектре поглощения. Титрование завершали, если в спектрах не наблюдалось изменений после добавления как минимум трех алиquot титранта по 2 эквивалента каждая. Приготовление растворов и все эксперименты с фоточувствительными соединениями проводились в темной комнате при красном свете.

Данные спектрофотометрического или флуориметрического титрования далее использовались для определения констант устойчивости комплексов лигандов с ДНК или СВ[7]. В присутствии ДНК или СВ[7] в растворе устанавливается равновесие, характеризуемое константой, и поглощение/флуоресценция раствора определяется равновесными концентрациями участвующих в комплексообразовании частиц. В зависимости от конкретного вида лиганда в расчетах учитывалась возможность образования комплексов по следующим схемам (L – краситель, M – ДНК/СВ[7]):



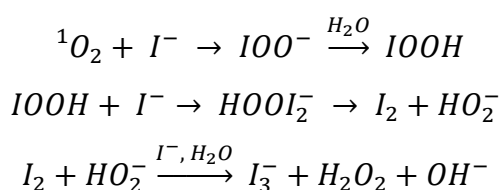
Обработку результатов спектрофотометрического титрования и расчет констант устойчивости комплексов проводили, используя численные методы, в результате которых итерационными приближениями удастся получить необходимые параметры с заданной точностью. Такими возможностями обладает пакет программ SpecFit/32® (Spectrum Software Associates, PMB 361, 197M Boston Post Road, West Marlborough, MA 01752, U.S.A.), с помощью которого были получены усредненные суммарные значения констант устойчивостей комплексов и их электронные спектры поглощения или флуоресценции (зависимость ϵ или I от λ).

4.7 Изучение комплексообразования с помощью спектроскопии ЯМР

Синтетический олигонуклеотид (додекамер Дрю-Дикерсона), дополнительно очищенный методом ВЭЖХ, был приобретен у компании ГенТерра (Россия). В качестве растворителя использовалась смесь фосфатный буфер:D₂O в соотношении 90:10. Спектры ЯМР комплексов лигандов с олигонуклеотидом были записаны на спектрометре Bruker Avance II 600. Соотнесение сигналов в спектрах ¹H ЯМР проводилось с использованием методов ¹H-¹H TOCSY и NOESY 2D ЯМР. Эксперименты ЯМР для комплексов лиганд-олигонуклеотид проводились с использованием градиентной версии импульсной последовательности WATERGATE [254, 255]. Фазочувствительные эксперименты NOESY были записаны с временем смешивания 300 мс. Структура олигонуклеотида для схематической визуализации комплексов на основе данных ЯМР взята из Protein Data Bank (PDB ID: 1BNA) [256].

4.8 Расчет квантового выхода образования синглетного кислорода

Для определения квантового выхода синглетного кислорода методом химической ловушки [234] были использованы свежеприготовленные растворы эозина, иодида калия (KI) и исследуемых соединений в воде. Метод основан на реакции ¹O₂ с йодидом в присутствии молибдата аммония, которая протекает по следующему многоступенчатому механизму [257]:



Приготовление раствора иодида калия. Смесь дигидрофосфата калия (206 мг), молибдата аммония (0,12 мг), иодида калия (607 мг) и 1 М NaOH (0,210 мл) разбавляли в деионизированной воде (30 мл) и доводили до pH = 6,20 ± 0,01. Соответствующее количество исследуемого соединения растворяли в растворе йодида калия до достижения концентрации 2·10⁻⁵ – 3·10⁻⁵ М. Затем 2,5 мл полученного раствора помещали в 10 мм кварцевую кювету и облучали монохроматическим светом ксеноновой лампы ($\lambda_{\text{возб}}$ = 403, 432 или 385 нм) в спектрофлуориметре FluoroLog-3-221 (Horiba Jobin Yvon) в течение 10 мин. Спектр поглощения раствора измеряли сразу после облучения, регистрируя поглощение трийодида на длине волны

351 нм. Общее время облучения составляло 65-120 мин. В качестве стандарта для измерения квантового выхода синглетного кислорода использовали эозин Y ($\varphi_{\Delta} = 57,0\%$ в воде [258]).

Квантовый выход генерации синглетного кислорода исследуемых образцов определяли по уравнению (25):

$$\varphi_{\Delta} = \varphi_{\Delta}^0 \cdot \frac{k_i \cdot (1 - 10^{-A_0})}{k_0 \cdot (1 - 10^{-A_i})}, \quad (25)$$

где φ_{Δ} и φ_{Δ}^0 – квантовые выходы генерации синглетного кислорода исследуемого образца и стандарта, соответственно; A_i и A_0 – оптическая плотность на длине волны возбуждения исследуемого образца и стандарта, соответственно; k_i и k_0 – тангенс угла наклона линейного участка графика зависимости оптической плотности ловушки от времени засветки.

4.9 Изучение фотоиндуцированного разрушения ДНК с помощью гель-электрофореза

Приготовление буфера и растворов. 10× буферный раствор TBE, содержащий 0,89 М трис(гидроксиметил)аминометан, 0,89 М H_3BO_3 и 0,01 М $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ с pH 8,3, готовили из реактивов биохимической чистоты (NeoFroxx, Германия) и деионизированной воды ($\geq 18 \text{ М}\Omega \text{ см}^{-1}$) и хранили при 4°C. Стоковый раствор ДНК получали разбавлением коммерческого раствора плазмиды pBR322 (200 мкг/мл, SibEnzyme, Россия) фосфатным буфером до концентрации 100 мкг/мл и хранили при 4°C. Для окрашивания геля и рабочего буфера использовали стоковый раствор этидиум бромид в воде (2 мг/мл).

Приготовление агарозного геля. Для приготовления геля 210 мг агарозы (ДИА-М, Россия) суспендировали в 10× TBE (3 мл) и деионизированной воде (27 мл), после чего смесь нагревали до полного растворения агарозы. Затем раствор охлаждали до 70°C и добавляли этидиум бромид (15 мкл). Полученный раствор заливали в форму для геля, в которую предварительно установили гребенку для формирования лунок. Гель оставляли для полимеризации при комнатной температуре на 1-2 часа. После удаления гребенки гель переносили в камеру для электрофореза (Biobase), содержащую рабочий буфер (60 мл 10× TBE, 540 мл деионизированной воды) и этидиум бромид (150 мкл).

Подготовка образцов. Для контрольных образцов смешивали pBR322 (100 мкг/мл, 4,8 мкл) и фосфатный буфер (7,2 мкл), а для растворов образцов – pBR322 (100 мкг/мл, 4,8 мкл) и раствор лиганда с заданной концентрацией в фосфатном буфере (7,2 мкл). Образцы облучали в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 2 мм ($\lambda_{\text{обл}} = 436 \text{ нм}$, 1,0 мВт/см² для 16, 405 нм, 0,7 мВт/см² для 17 и 395 нм, 5,2 мВт/см² для 19 и 8).

Проведение гель-электрофореза. Перед внесением в гель к образцам добавляли 4× загрузочный буфер (4 мкл, Евроген, Россия) и тщательно перемешивали. Каждую лунку геля заполняли раствором образца (9 мкл). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 80 В в течение 1,5 часов. После окончания разделения гель извлекали из камеры, помещали на

трансиллюминатор (Квант-М-312Б, Helicon) и фотографировали с использованием системы геле-документирования «Взгляд» (Helicon). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ, интенсивность полос определяли путем интегрирования площадей пиков. Для открытой кольцевой и линейной форм плазмиды значения площадей умножали на 0,8 [259, 260], учитывая меньшую эффективность интеркаляции этидиум бромид в суперспиральную форму плазмиды по сравнению с открытой кольцевой и линейной формами.

4.10 Клеточные исследования

Экспериментальные данные получены в ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) Чмелюк Н.С. и д.х.н., проф. Абакумовым М.А.

Конфокальная визуализация. В исследовании использовали клетки колоректальной карциномы человека HCT116. Клетки высевали в конфокальные чашки Петри диаметром 35 мм (SPL) в количестве $500 \cdot 10^3$ на чашку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем к клеткам в среде HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) добавляли исследуемое соединение в концентрации 1 мкМ и инкубировали клетки в течение 30 мин. После этого клетки дважды промывали, а конфокальные изображения получали на инвертированном микроскопе Nikon Ti2 с масляно-иммерсионным объективом 60×1,25 и конфокальной системой ThorLabs (программное обеспечение LS 3.0 для сканирования и FiJi для обработки изображений). Для исследований колокализации дополнительно использовали краситель TMRE в концентрации 0,13 мкМ. Коэффициент Мандерса рассчитывали для различных участков изображения.

Определение уровня АФК. Клетки HCT116 высевали в чашки Петри диаметром 35 мм (SPL) в количестве $500 \cdot 10^3$ на чашку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем к клеткам в среде HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) добавляли исследуемое соединение в концентрации 25 мкМ и инкубировали в течение 30 мин. После этого клетки дважды промывали. Для обнаружения активных форм кислорода добавляли 1× рабочий раствор красителя ROS Deep Red Stain из набора Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Deep Red Fluorescence, Abcam) и инкубировали в течение 30 мин. Затем клетки облучали светом с длиной волны 395 нм в течение 6 мин. После облучения образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS (Life Technologies) с объективом PlanFluor 20×/0,45. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 50 мкМ H₂O₂.

Оценка цитотоксичности и фототоксичности. Жизнеспособность клеток определяли с использованием набора Promega MTS в соответствии с инструкцией производителя. Клетки HCT116 высевали в 96-луночные планшеты в количестве $8 \cdot 10^3$ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем культуральную среду заменяли на среду, содержащую исследуемые соединения в диапазоне концентраций от 0,39 до 50 мкМ, и инкубировали в течение

48 ч. После этого среду вновь заменяли на среду с реагентом MTS и инкубировали в течение 3-4 ч. Для оценки фототоксичности клетки после 24 ч инкубации с соединениями облучали светом с длиной волны 395 нм в течение 6 мин.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработаны и оптимизированы методы синтеза ранее не описанных производных 2,2-дифенил-2*H*-хромена **9-11** с различной длиной бромалкокси-заместителя, гетероциклических аналогов стильбена **12-15** и производных хинолизиния **16, 17** и **19** на основе хинолина, изохинолина и пиридина, а также их конъюгатов **1-8** с 4-диметиламиностирилпиридиновым красителем.

2. Показано, что длина бромалкокси-заместителя и концентрация хроменов **9-11** играют решающую роль в механизме превращения закрытой формы в открытую, изменяя его от последовательного к одновременному образованию фотопродуктов и увеличению содержания ТТ-изомера в фотостационарной смеси.

3. Показано, что в растворе возможно образование тройных супрамолекулярных систем на основе конъюгатов производных хромена **2** или **3**, ДНК и СВ[7]. Изменяя концентрации макромолекул, можно сдвигать равновесие в сторону образования либо тройных, либо бинарных систем. При этом более длинный алкильный линкер между стириловой и хроменовой частями в конъюгате **3** обеспечивает большую стабильность образующегося тройного комплекса.

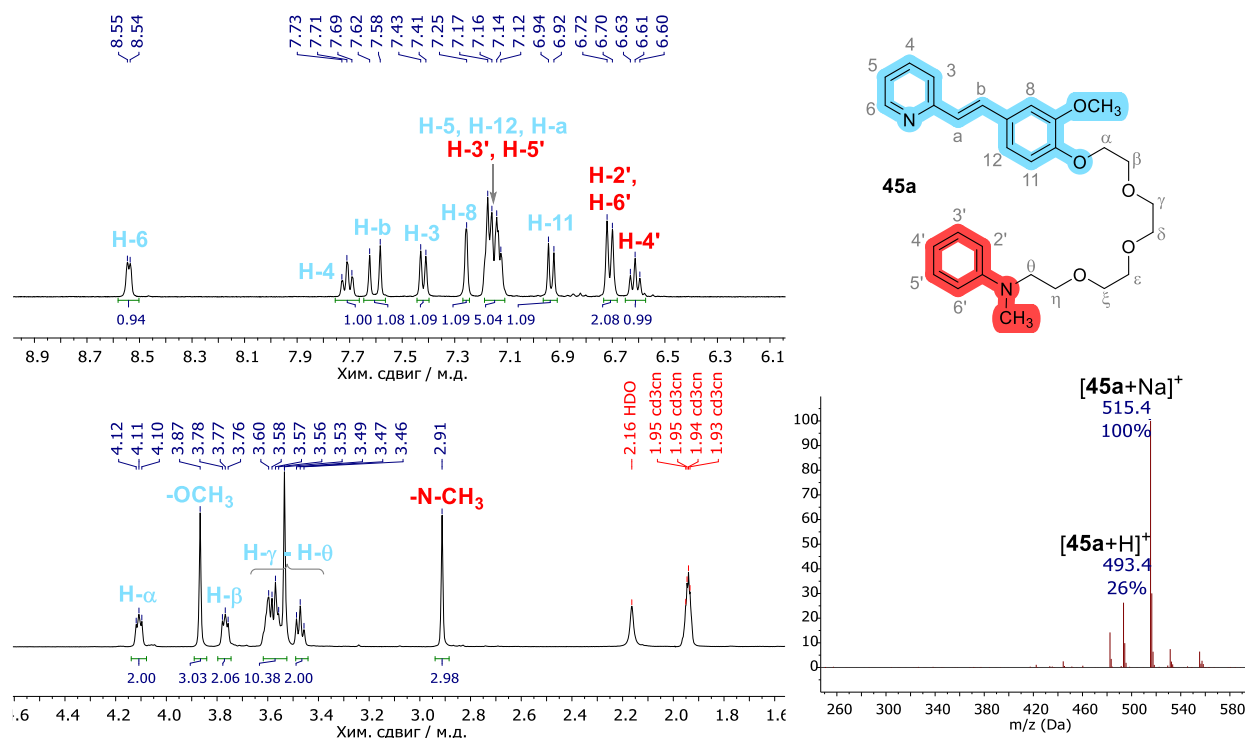
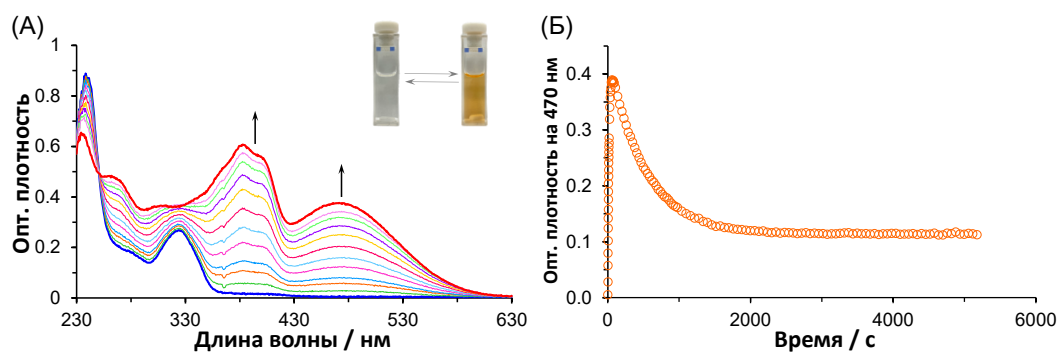
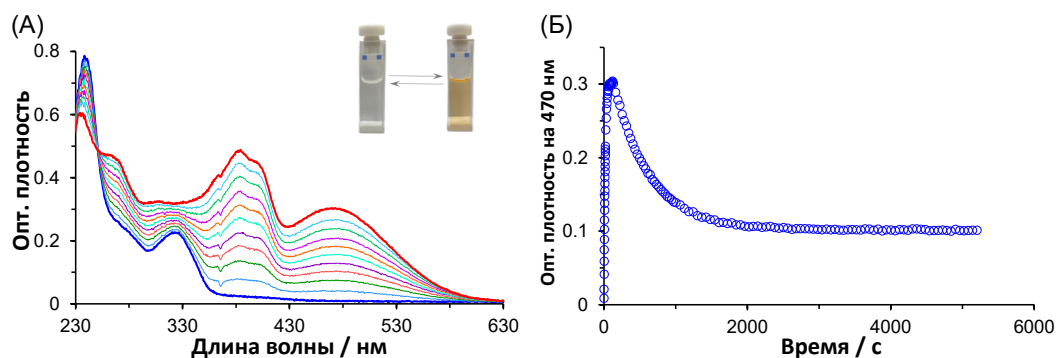
4. Показано, что гетеростильбены **12, 13** и **15** подвергаются внутримолекулярной фотоциклизации *in situ* в присутствии ДНК, что позволяет использовать их в качестве потенциальных фотоуправляемых лигандов для ДНК. Их полициклические фотопродукты **16, 17** и **19** при облучении способствуют фотоиндуцированному разрушению ДНК, даже в анаэробных условиях, что делает их подходящей основой для разработки агентов ФДТ I типа. При этом, ДНК-связывающие свойства исходных моно-хромофоров **12-17** и **19** сохраняются при переходе к бис-хромофорным конъюгатам **4-8**.

5. Показано, что стириловый краситель выполняет роль векторной молекулы в конъюгате **8** с производным хинолизиния, способствуя его проникновению в клетки колоректальной карциномы человека НСТ116 и локализации в митохондриях. При этом, как производное хинолизиния **19**, так и его конъюгат **8** демонстрируют сопоставимую эффективность генерации АФК и снижение выживаемости клеток НСТ116 после облучения, что позволяет считать такие конъюгаты перспективной платформой для разработки фотоуправляемых полифункциональных терапевтических агентов.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертации заключаются в последующем расширении библиотеки фотоуправляемых лигандов для биомолекул. Предложенный синтетический подход к получению бис-хромофорных систем закладывает основу для направленного дизайна бифункциональных конъюгатов с альтернативными хромофорными фрагментами. Это позволит сместить их оптические характеристики в более длинноволновую

область, а также минимизировать конкурентный перенос энергии между хромофорами. Обнаруженная способность производных хинолизиния и их конъюгатов со стироловыми красителями вызывать фотоиндуцированное повреждение ДНК определяет вектор их последующего исследования в системах *in vitro* и *in vivo* для оценки перспектив их применения в качестве тераностических агентов.

6. ПРИЛОЖЕНИЕ

Рисунок П1 – ^1H ЯМР спектр (CD_3CN) и масс-спектр (ИЭР) производного **45a**.Рисунок П2 – (А) Изменение спектров поглощения хромена **10** при УФ-облучении в течение 100 секунд. (Б) Изменение оптической плотности хромена **10** на 470 нм при облучении и последующей термической релаксации. $C_{10} = 4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN .Рисунок П3 – (А) Изменение спектров поглощения хромена **11** при УФ-облучении в течение 100 секунд. (Б) Изменение оптической плотности хромена **11** на 470 нм при облучении и последующей термической релаксации. $C_{11} = 4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN .

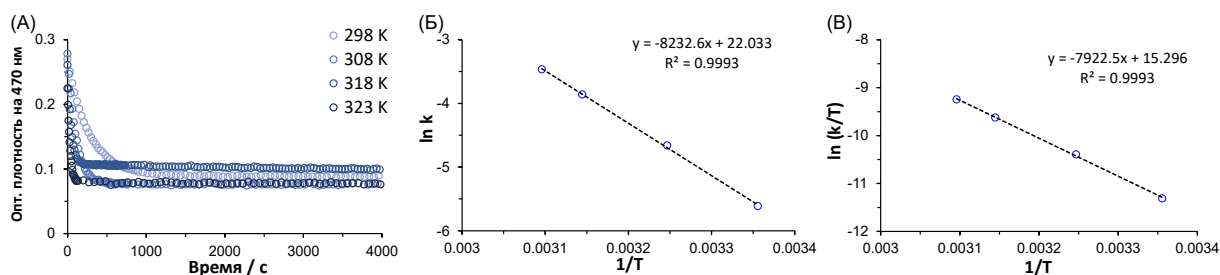


Рисунок П4 – (А) Кинетические кривые термического обесцвечивания производного **9** при различных температурах. (Б) График Аррениуса для производного **9**. (В) График Эйринга для производного **9**.

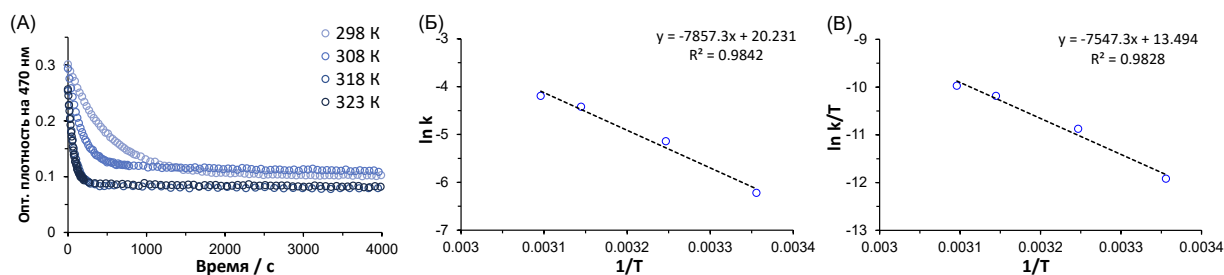


Рисунок П5 – (А) Кинетические кривые термического обесцвечивания производного **11** при различных температурах. (Б) График Аррениуса для производного **11**. (В) График Эйринга для производного **11**.

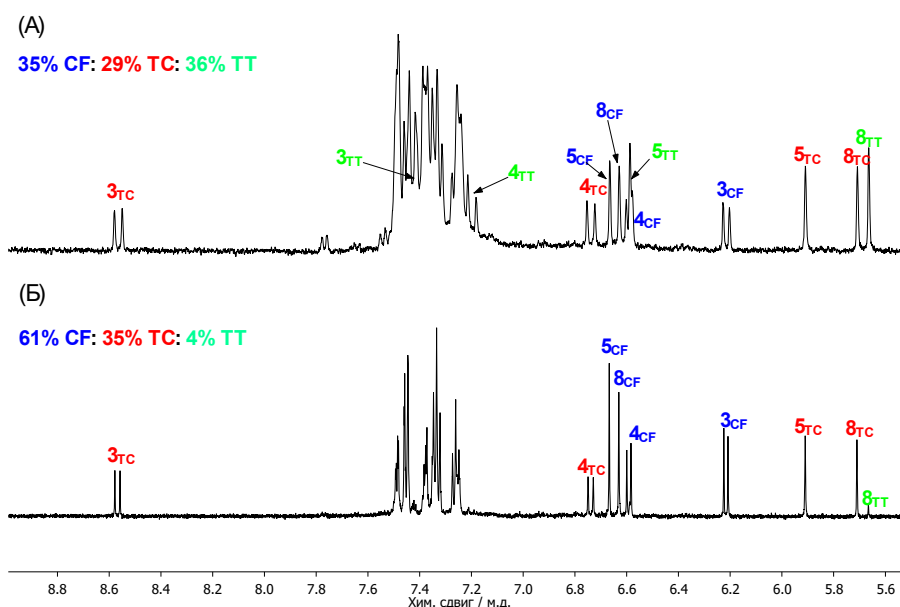


Рисунок П6 – ¹H ЯМР спектр (аром. обл.) хромена **10** в CD₃CN: (А) после облучения с УФ-фильтром в течение 20 минут и (Б) после облучения при $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм в течение 1 часа.

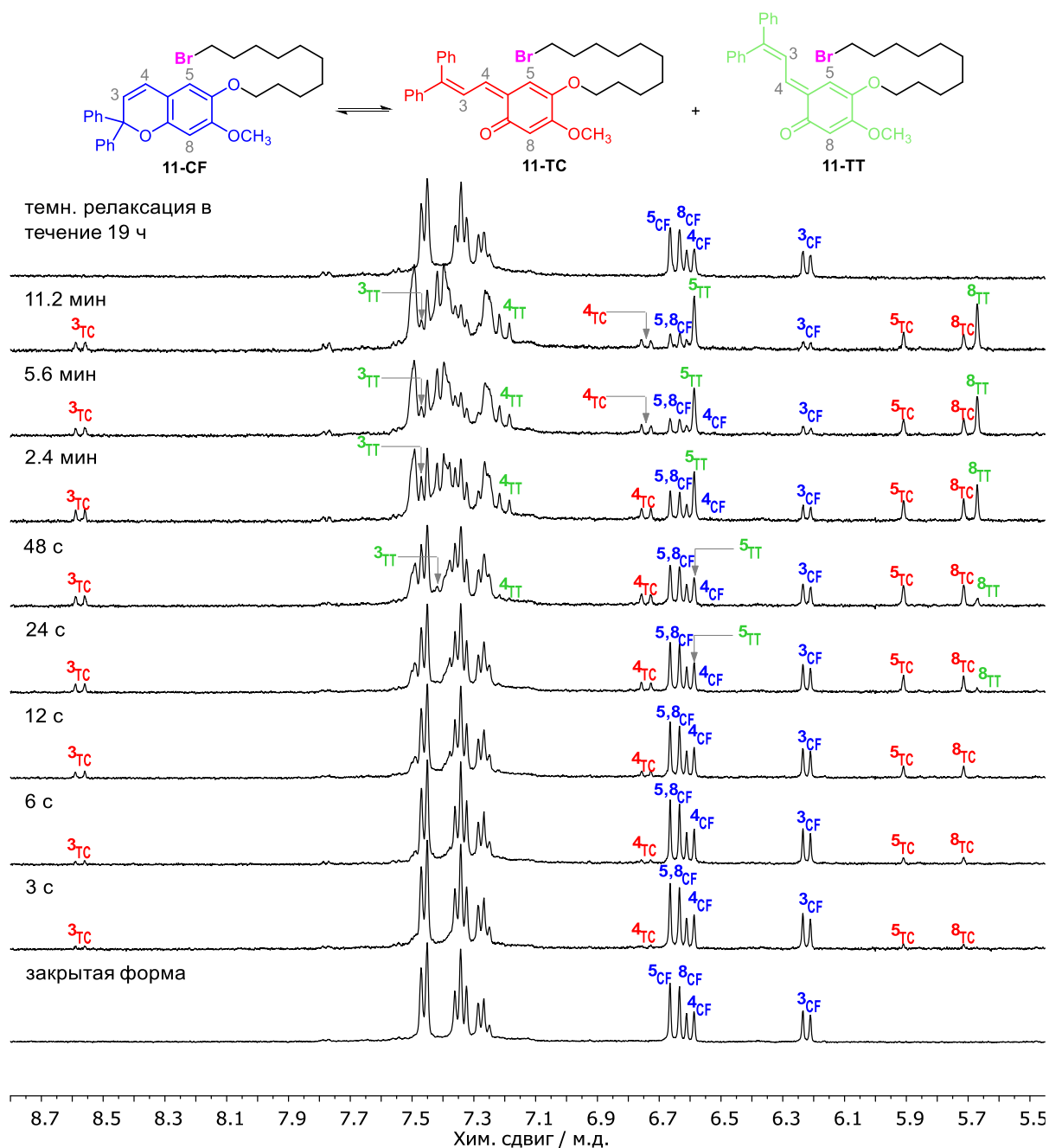


Рисунок П7 – Наблюдение фотохромизма хромена **11** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, CD_3CN) методом 1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения показано слева). Верхний спектр зарегистрирован после термической релаксации облученного раствора.

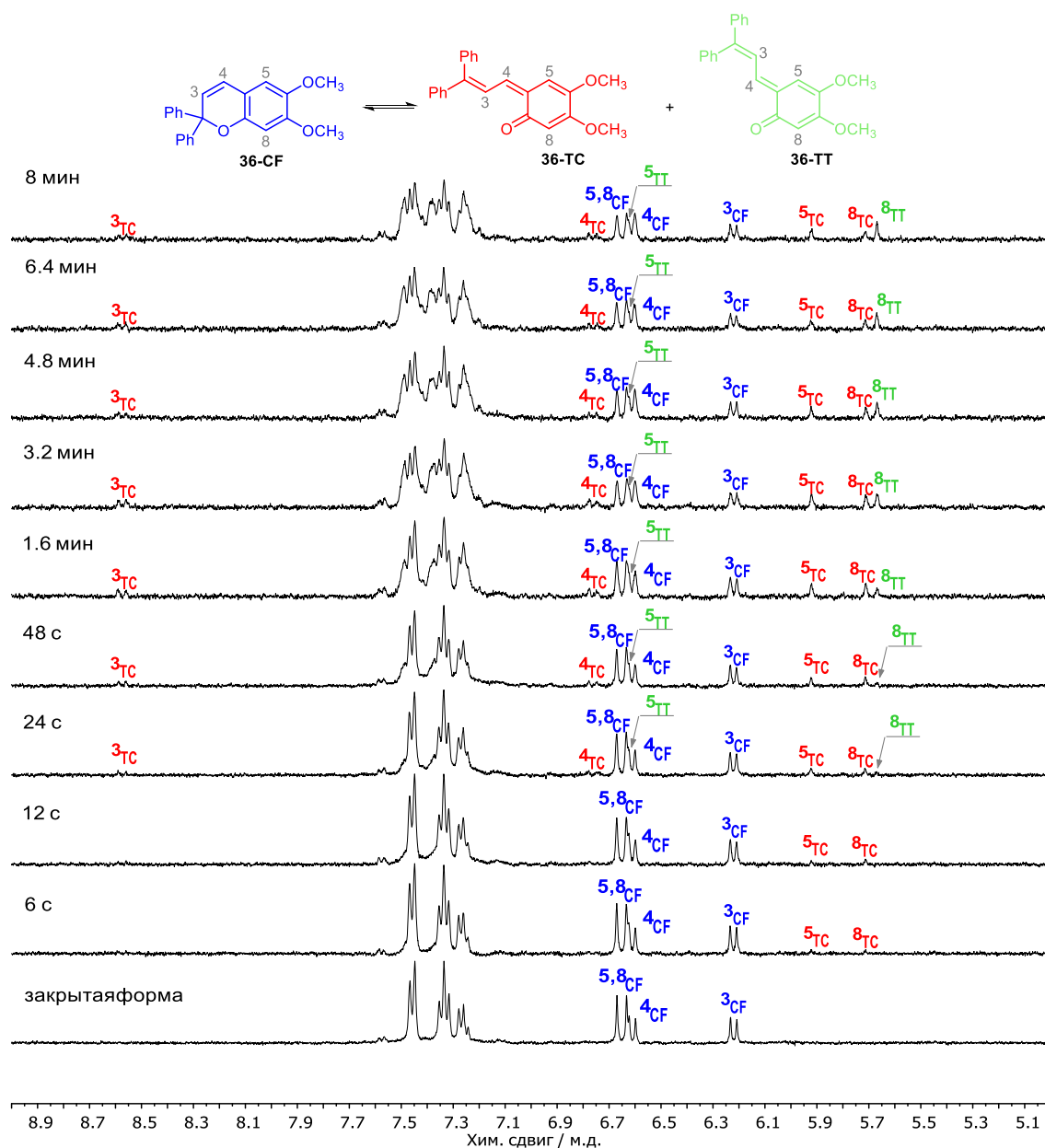


Рисунок П8 – Наблюдение фотохромизма хромена **36** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, CD_3CN) методом 1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения указано слева).

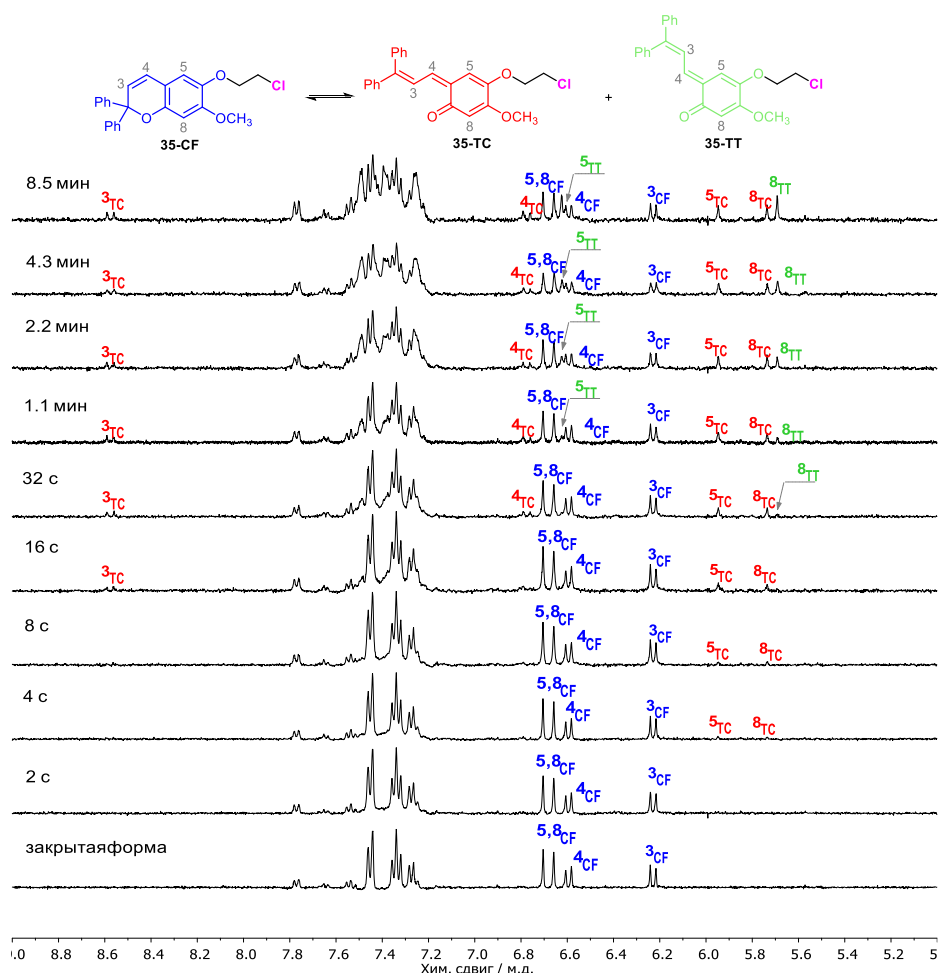


Рисунок П9 – Наблюдение фотохромизма хромена **35** ($C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М, CD_3CN) методом ^1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения указано слева).

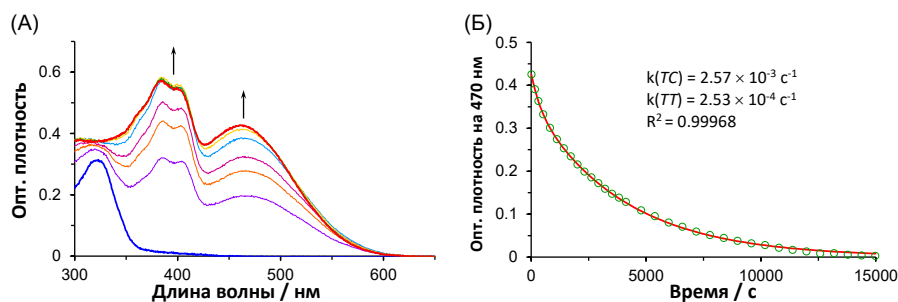


Рисунок П10 – (А) Изменения в спектрах поглощения хромена **9** при УФ-облучении в течение 100 секунд. (Б) Изменения оптической плотности хромена **9** при 470 нм во время термической релаксации. Период полураспада $\tau_{1/2} = 270$ и 2740 секунд был отнесен к термической обратной реакции $\text{TC} \rightarrow \text{CF}$ и $\text{TT} \rightarrow \text{TC}$, соответственно. $C = 4 \cdot 10^{-5}$ М, PhMe.

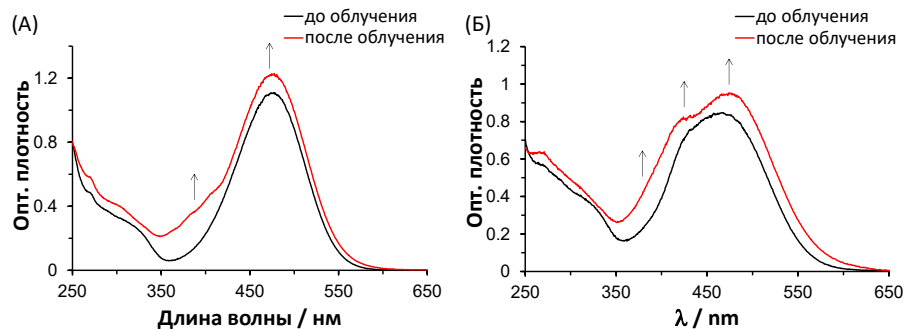


Рисунок П11 – Изменение спектров поглощения конъюгата **2** ($3 \cdot 10^{-5}$ М) в ацетонитриле (А) и в воде (Б) до и после облучения УФ светом.

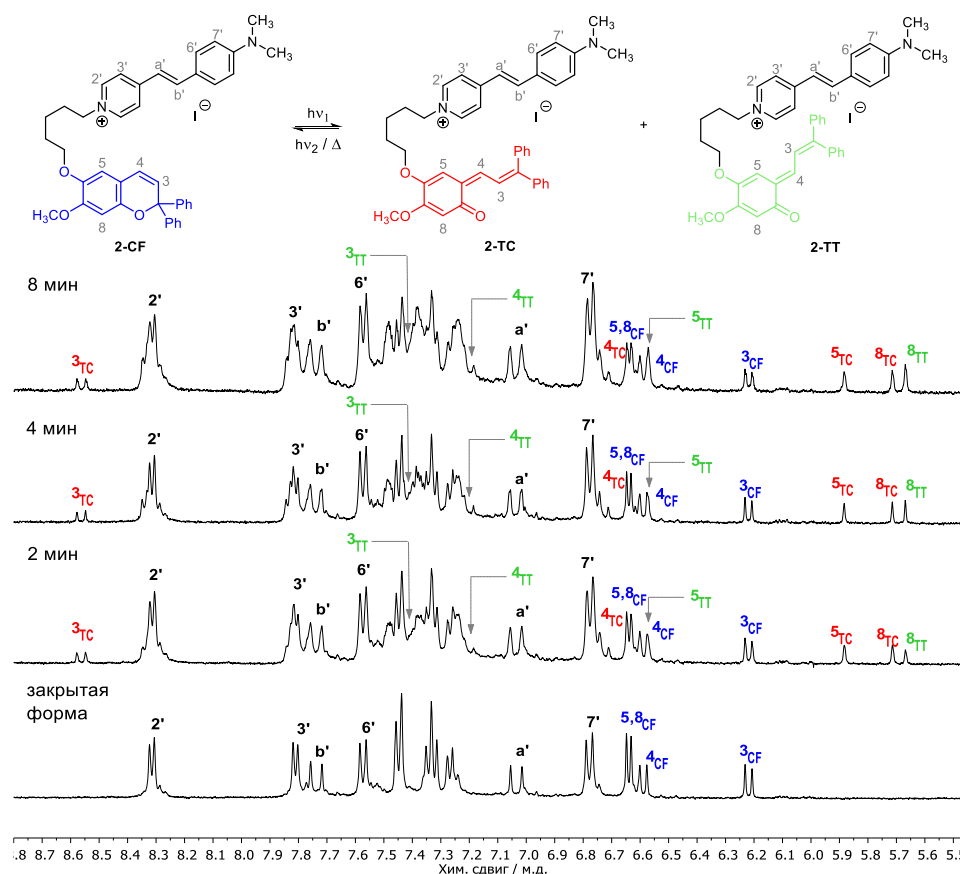


Рисунок П12 – Наблюдение фотохромизма конъюгата **2** ($C = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М, CD_3CN) методом 1H ЯМР спектроскопии (облучение с УФ-фильтром, общее время облучения показано слева).

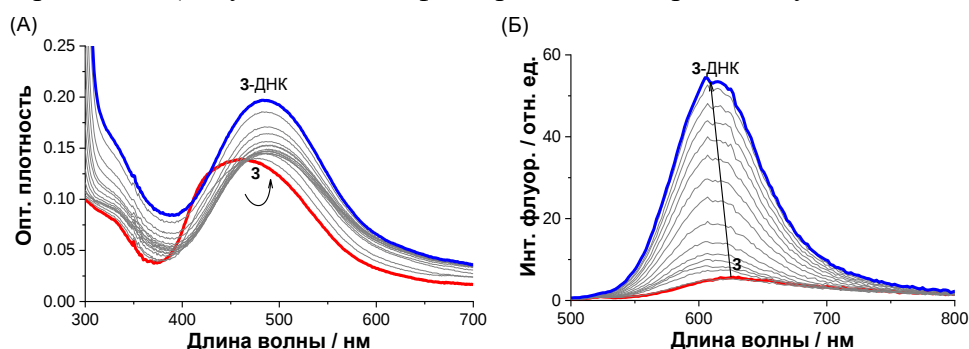


Рисунок П13 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **3** при добавлении ДНК ($C_3 = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{ДНК} = 0 - 1 \cdot 10^{-3}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0) с 2% об. CH_3CN ; $\lambda_{возб} = 443$ нм).

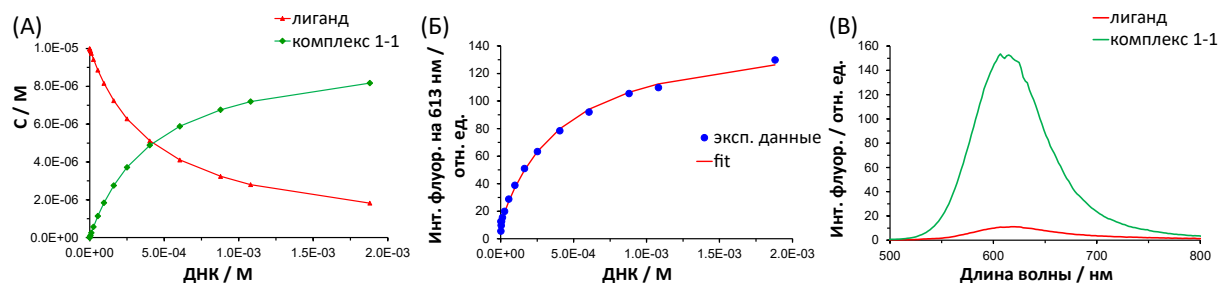


Рисунок П14 – (А) Изменение концентрации конъюгата **2** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменения интенсивности флуоресценции конъюгата **2** при 613 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры флуоресценции конъюгата **2** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

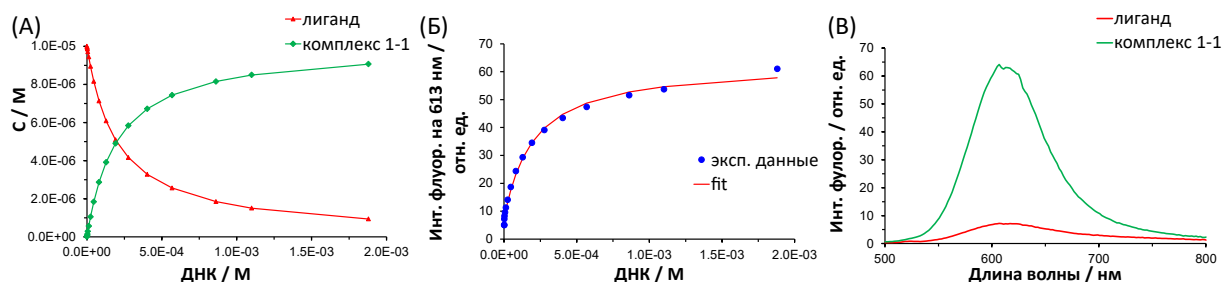


Рисунок П15 – (А) Изменение концентрации конъюгата **3** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменения интенсивности флуоресценции конъюгата **3** при 613 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры флуоресценции конъюгата **3** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

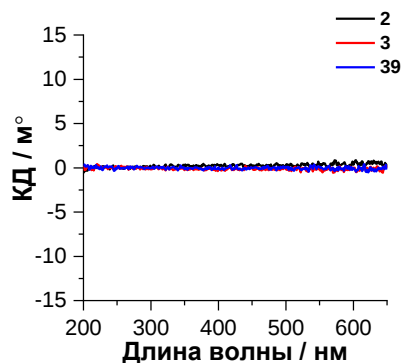


Рисунок П16 – Спектры кругового дихроизма соединений **39**, **2** и **3**.

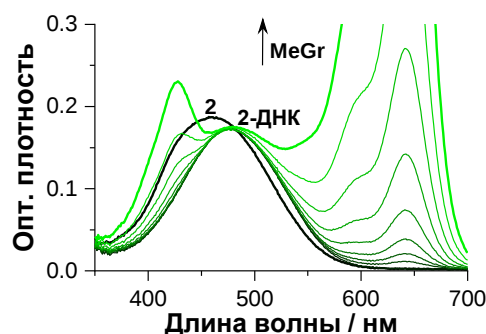


Рисунок П17 – Спектрофотометрическое титрование комплекса **2**-ДНК стандартом MeGr ($C_2 = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{MeGr}} = 0 - 4,3 \cdot 10^{-5}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN).

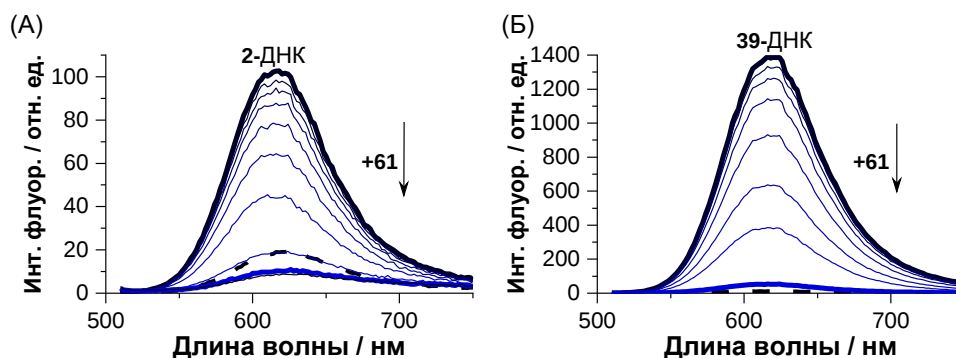


Рисунок П18 – Флуориметрическое титрование комплексов **2**-ДНК (А) и **39**-ДНК (Б) интеркалятором **61** ($C_{2/39} = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{61} = 0 - 2,5 \cdot 10^{-4}$ М в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм). Пунктирной линией обозначен спектр свободных лигандов.

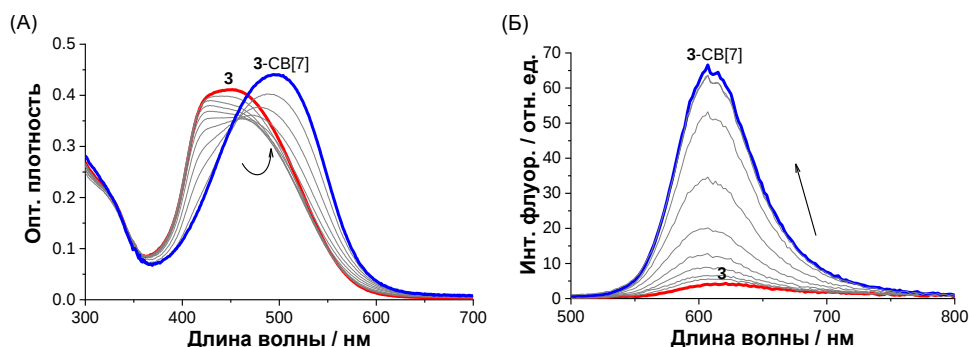


Рисунок П19 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **3** при добавлении СВ[7]. (А) ($C_3 = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{CB[7]} = 0 - 6 \cdot 10^{-4}$ М; (Б) $C_3 = 5 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{CB[7]} = 0 - 3 \cdot 10^{-4}$ М. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN , $\lambda_{exc} = 455$ нм.

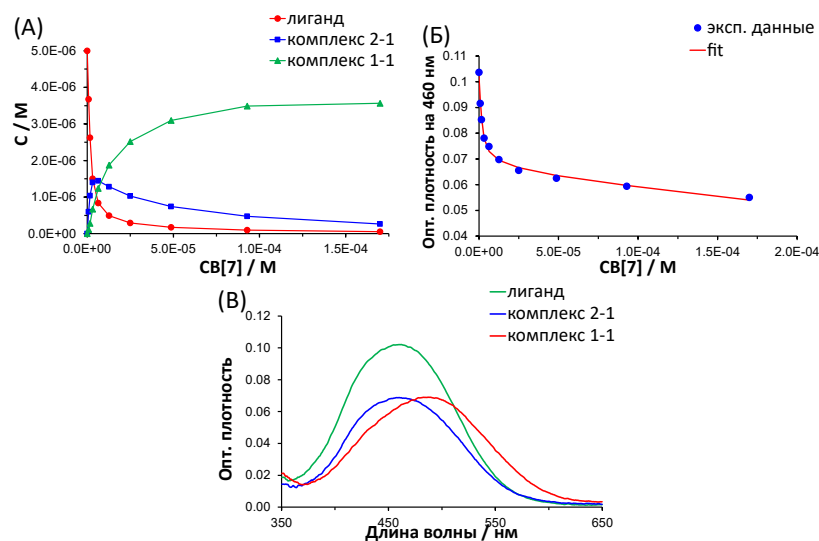


Рисунок П20 – (А) Изменение концентрации конъюгата **2** и его комплексов с СВ[7] 1:1 и 1:2 в зависимости от концентрации СВ[7]. (Б) Изменение оптической плотности конъюгата **2** на 460 нм в зависимости от концентрации СВ[7]. (В) Спектры поглощения конъюгата **2** и его комплексов с СВ[7]. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

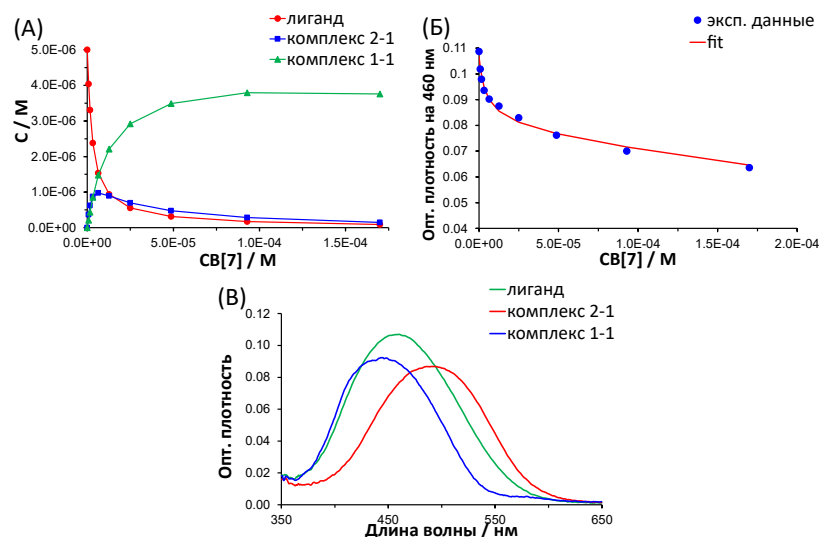


Рисунок П21 – (А) Изменение концентрации конъюгата **3** и его комплексов с СВ[7] 1:1 и 1:2 в зависимости от концентрации СВ[7]. (Б) Изменение оптической плотности конъюгата **3** на 460 нм в зависимости от концентрации СВ[7]. (В) Спектры поглощения конъюгата **3** и его комплексов с СВ[7]. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

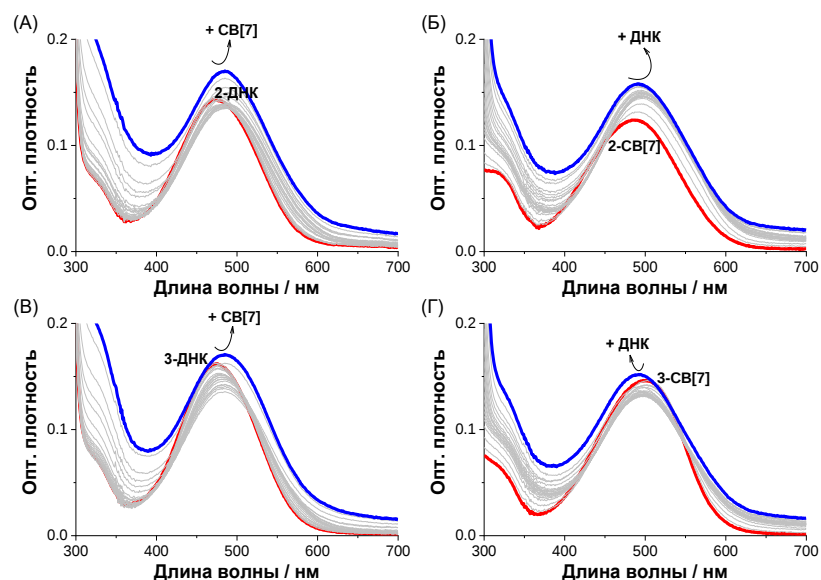


Рисунок П22 – (А, В) Изменение спектров поглощения 2/3-ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М) при добавлении СВ[7] от 0 до 92 экв. (Б, Г) Изменение спектров поглощения 2/3-СВ[7] ($C_{\text{СВ[7]}} = 3 \cdot 10^{-4}$ М) при добавлении ДНК от 0 до 116 экв. Во всех случаях: $C_{2/3} = 7 \cdot 10^{-6}$ М, фосфатный буфер (рН 7,0) с 1% CH_3CN .

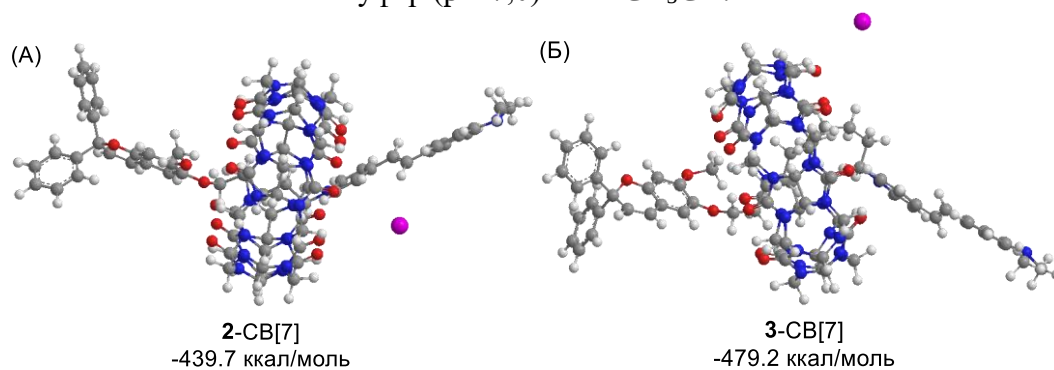


Рисунок П23 – Оптимизированные структуры (PM7, МОРАС) комплексов 2-СВ[7] (А) и 3-СВ[7] (Б), в которых СВ[7] расположен на алкильной цепи, и рассчитанная энтальпия их образования.

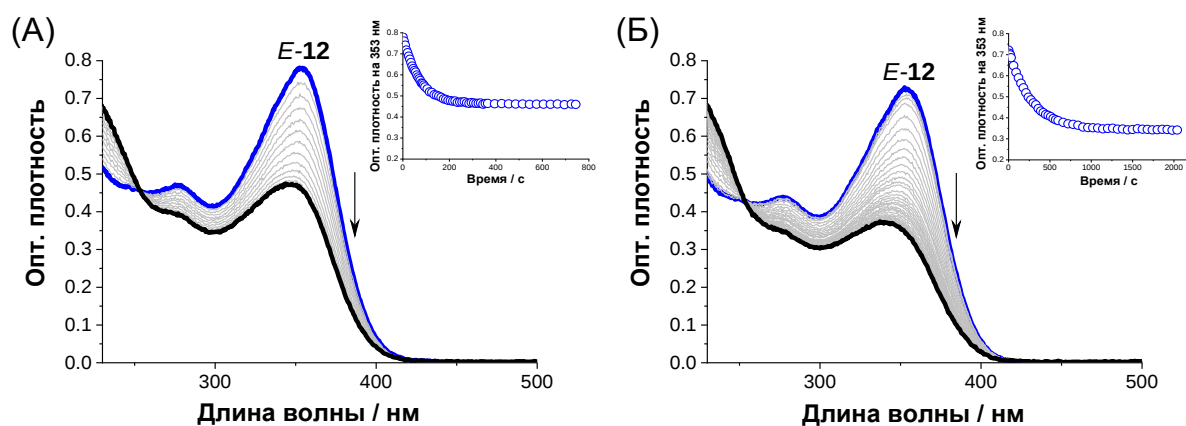


Рисунок П24 – Изменение спектров поглощения гетеростильбена 12 ($3 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (А) и 405 нм (Б). На вставке показаны изменения оптической плотности во время облучения.

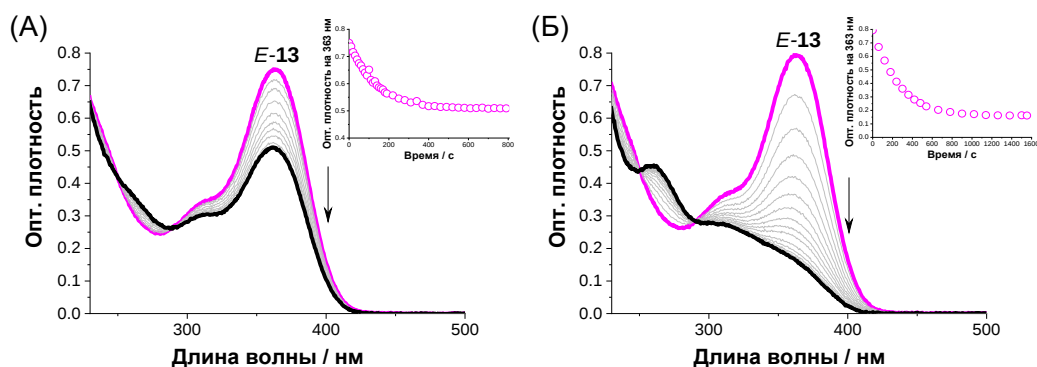


Рисунок П25 – Изменение спектров поглощения гетеростильбена **13** ($4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (А) и 405 нм (Б). На вставке показаны изменения оптической плотности во время облучения.

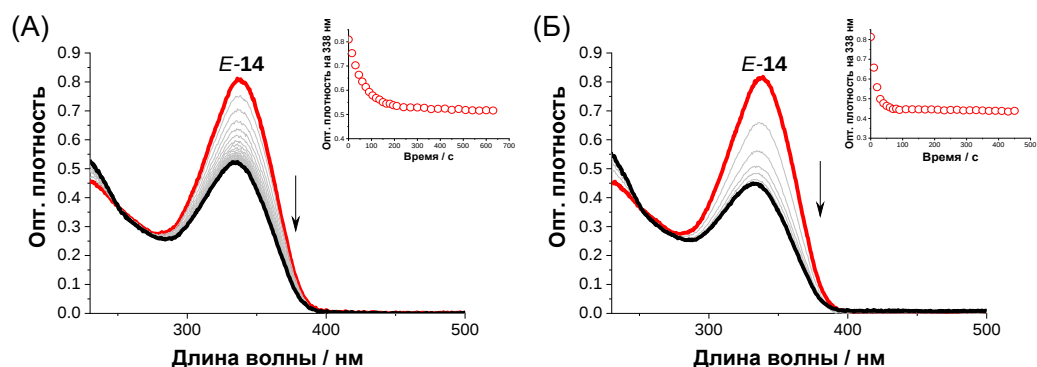


Рисунок П26 – Изменение спектров поглощения гетеростильбена **14** ($2 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (А) и 365 нм (Б). На вставке показаны изменения оптической плотности во время облучения.

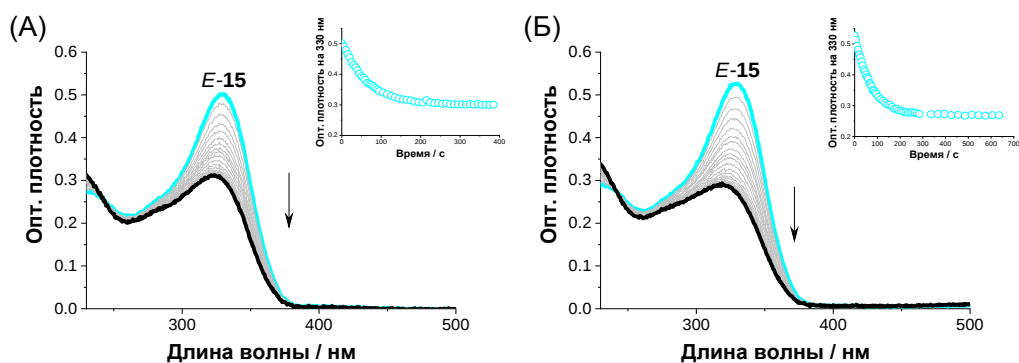


Рисунок П27 – Изменение спектров поглощения гетеростильбена **15** ($3 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN) при облучении светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (А) и 365 нм (Б). На вставке показаны изменения оптической плотности во время облучения.

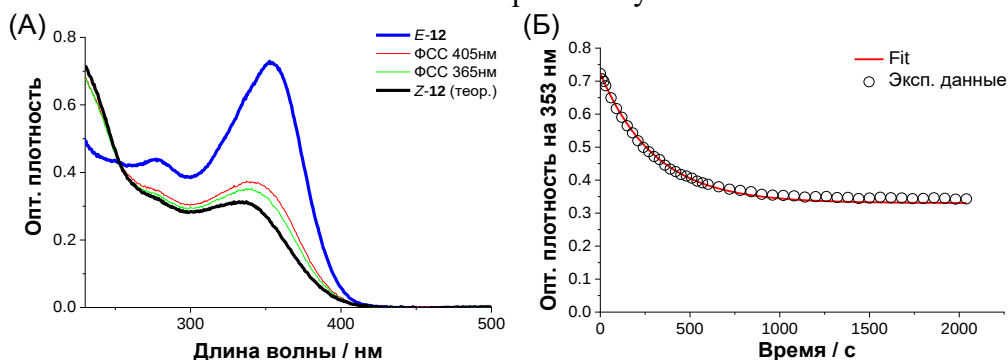


Рисунок П28 – Спектры поглощения *E*-12, FSC_{365} , FSC_{405} и теоретический спектр *Z*-12 (А) и изменение оптической плотности во время облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 405$ нм (Б).

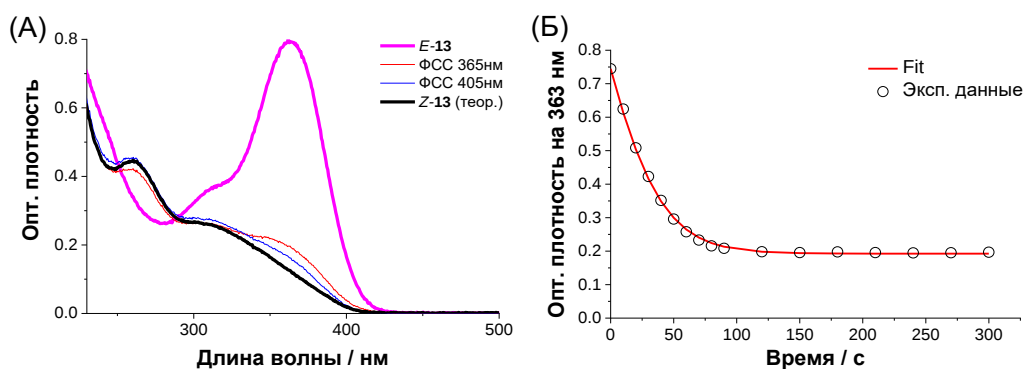


Рисунок П29 – Спектры поглощения *E*-13, ФСС₃₆₅, ФСС₄₀₅ и теоретический спектр Z-13 (А) и изменение оптической плотности во время облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (Б).

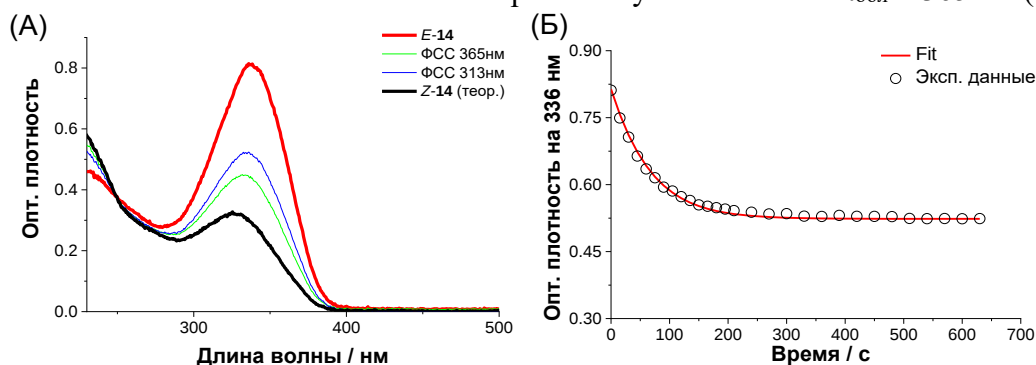


Рисунок П30 – Спектры поглощения *E*-14, ФСС₃₁₃, ФСС₃₆₅ и теоретический спектр Z-14 (А) и изменение оптической плотности во время облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (Б).

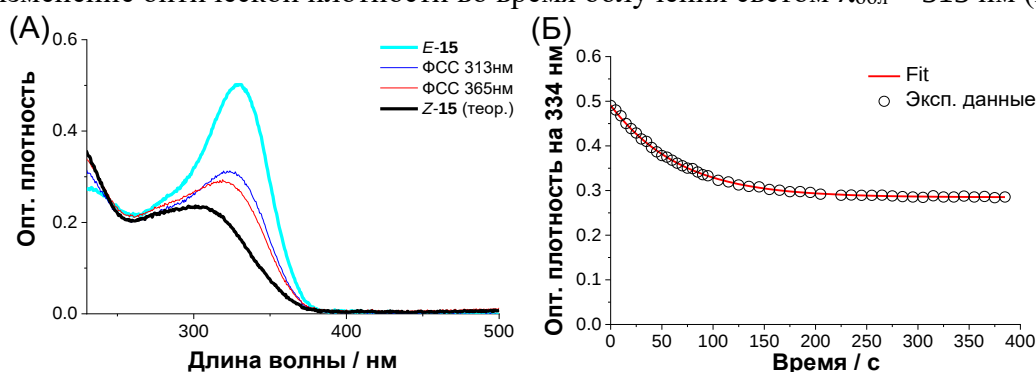


Рисунок П31 – Спектры поглощения *E*-15, ФСС₃₁₃, ФСС₃₆₅ и теоретический спектр Z-15 (А) и изменение оптической плотности во время облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 313$ нм (Б).

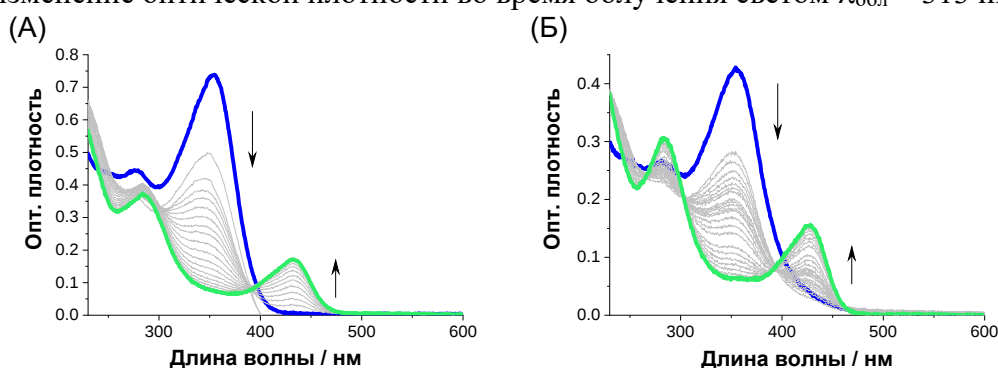


Рисунок П32 – Изменение спектров поглощения соединения 12 при облучении нефльтрованным светом в ацетонитриле (А, 3·10⁻⁵ М, 50 мин) и в воде (Б, 2·10⁻⁵ М, 12 мин).

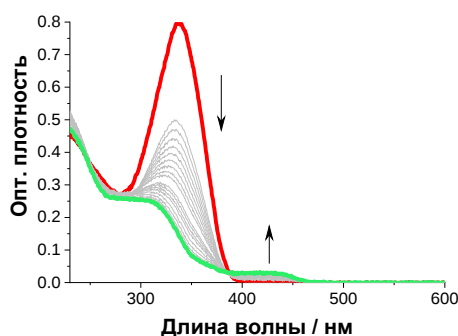


Рисунок П33 – Изменение спектров поглощения соединения **14** при облучении нефитрованным светом в ацетонитриле ($2 \cdot 10^{-5}$ М, 12 мин).

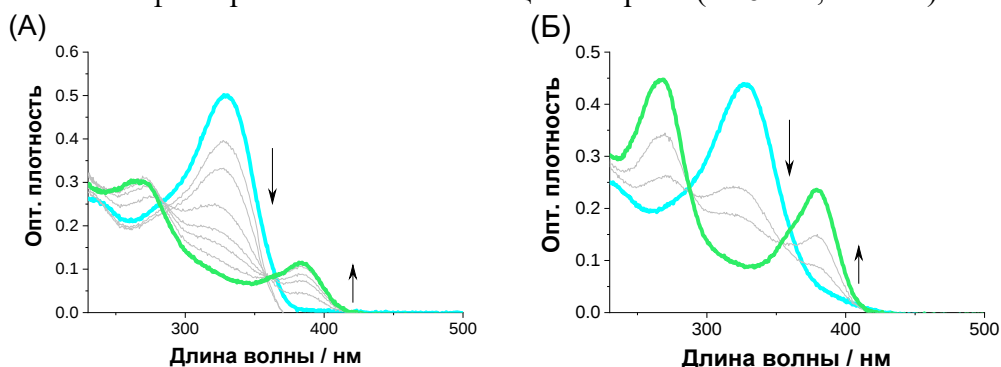


Рисунок П34– Изменение спектров поглощения соединения **15** ($3 \cdot 10^{-5}$ М) при облучении нефитрованным светом в ацетонитриле (А, 41 мин) и в воде (Б, 18 мин).

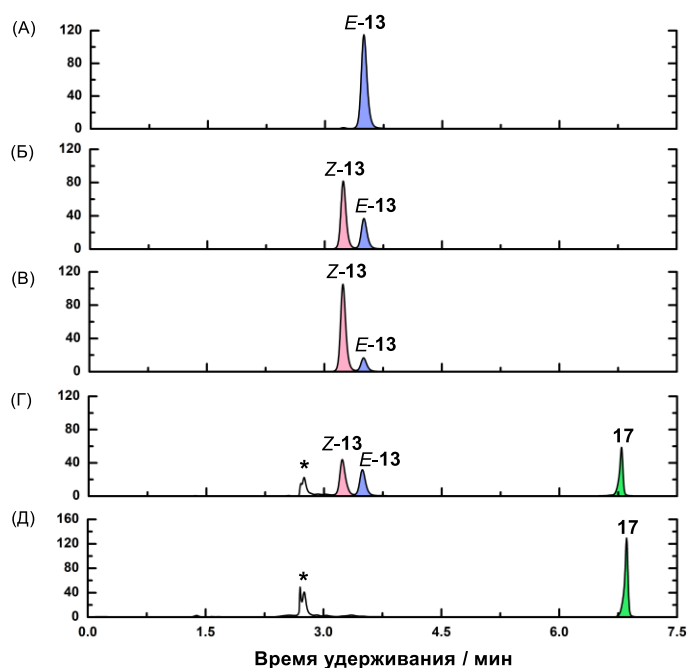


Рисунок П35 – Хроматограммы ВЭЖХ для соединения **13**: (А) исходный раствор ($4 \cdot 10^{-5}$ М, CH_3CN); (Б) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (30 с); (В) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (180 с); (Г) раствор после облучения нефитрованным светом (13 мин); (Д) раствор после облучения нефитрованным светом (40 мин); элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH} = 60:40$. * помечены продукты фотодеградации.

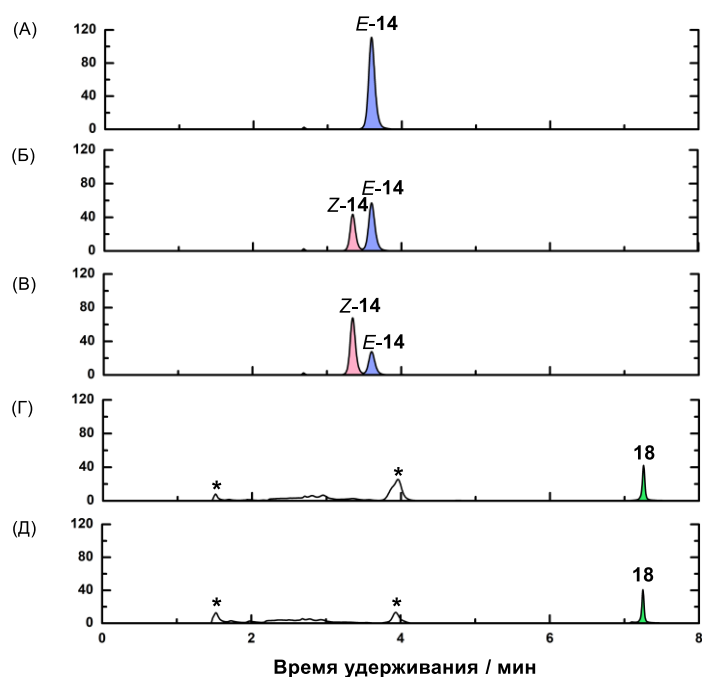


Рисунок ПЗ6 – Хроматограммы ВЭЖХ для соединения **14**: (А) исходный раствор ($2 \cdot 10^{-5}$ M, CH_3CN); (Б) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (14 с); (В) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (120 с); (Г) раствор после облучения нефилтрованным светом (3 мин); (Д) раствор после облучения нефилтрованным светом (13 мин); элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH} = 5:95$. * помечены продукты фотодеградаций.

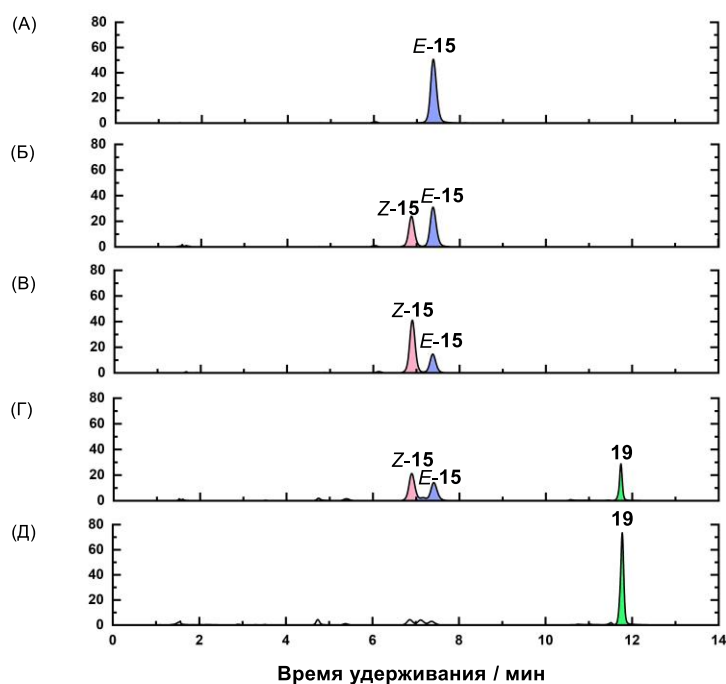


Рисунок ПЗ7 – Хроматограммы ВЭЖХ для соединения **15**: (А) исходный раствор ($2 \cdot 10^{-5}$ M, CH_3CN); (Б) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (35 с); (В) раствор после облучения светом $\lambda_{\text{обл}} = 365$ нм (5 мин); (Г) раствор после облучения нефилтрованным светом (6 мин); (Д) раствор после облучения нефилтрованным светом (18 мин); элюент $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 65:35$.

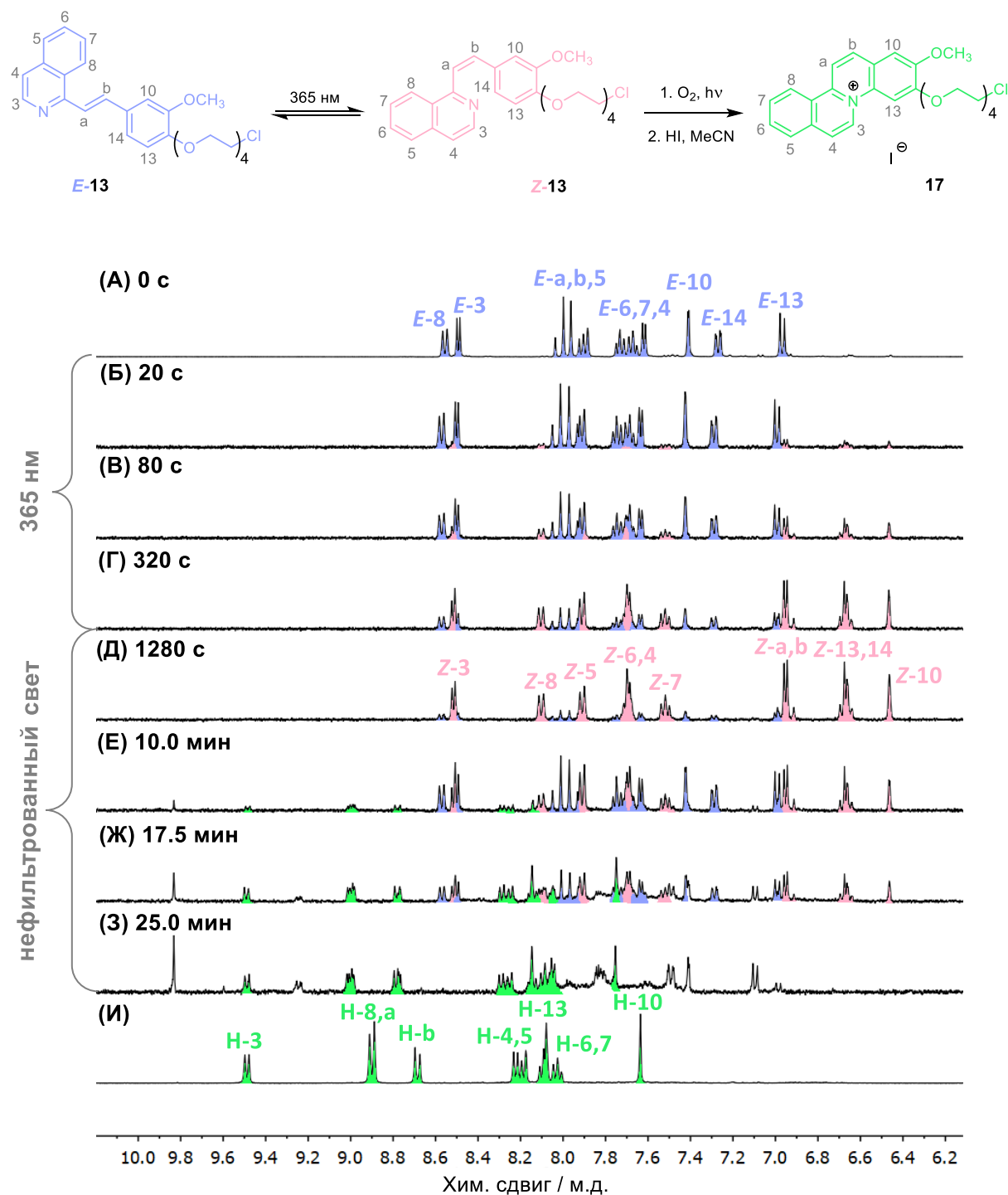


Рисунок ПЗ8 – Наблюдение *E,Z*-изомеризации и фотоциклизации соединения **13** ($C = 2 \cdot 10^{-3}$ M, CD_3CN) методом 1H ЯМР спектроскопии: (Б) – (Г) облучение светом $\lambda_{обл} = 365$ нм; (Д) – (З) облучение нефилтрованным светом. Общее время облучения показано слева. Нижний спектр (И) зарегистрирован отдельно от выделенного фотопродукта **17**.

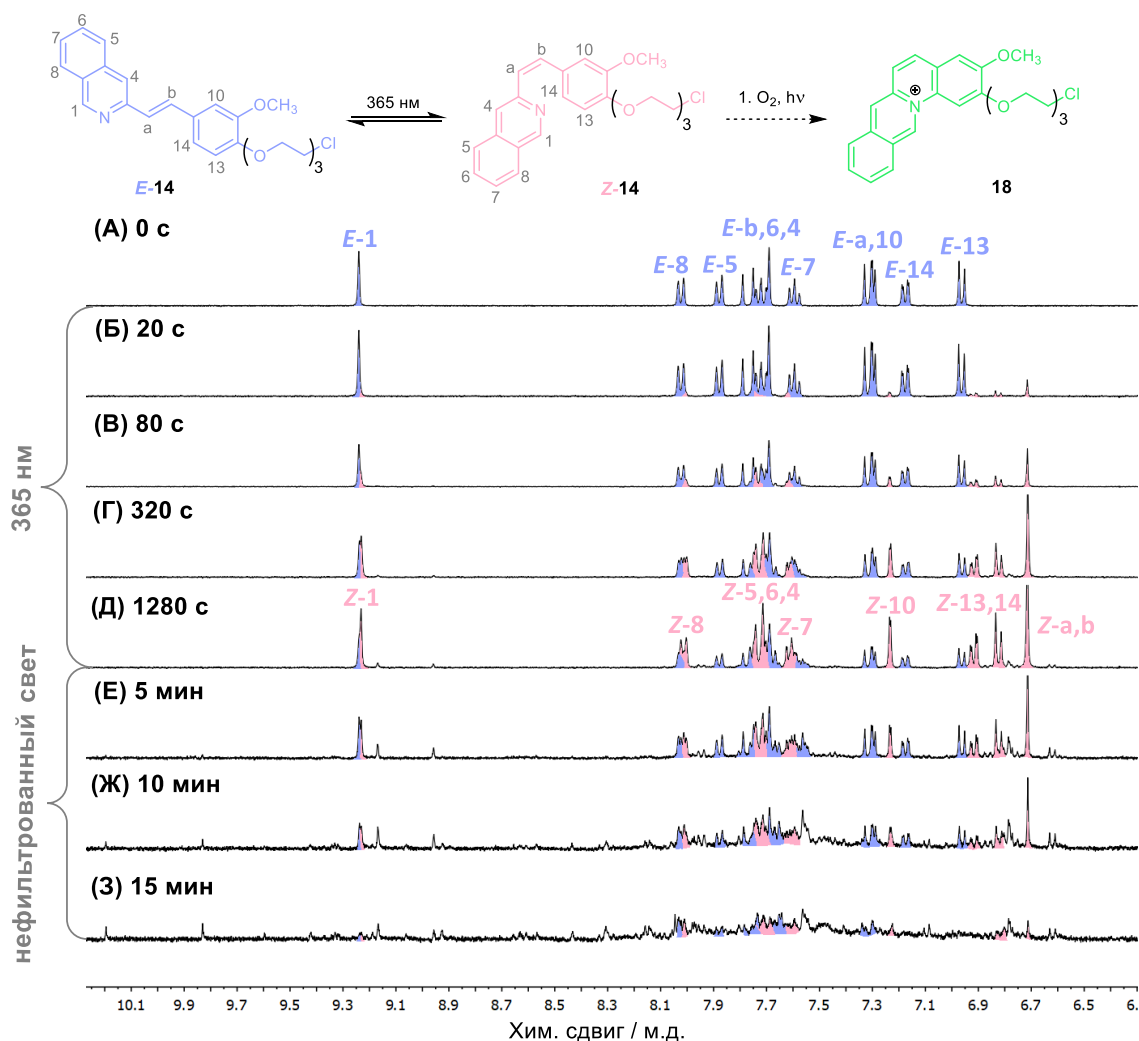


Рисунок ПЗ9 – Наблюдение E/Z -изомеризации и фотоциклизации соединения **14** ($C = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, CD_3CN) методом ^1H ЯМР спектроскопии: (Б) – (Д) облучение светом $\lambda_{\text{обл}} = 365 \text{ nm}$; (Е) – (З) облучение нефилтрованным светом. Общее время облучения показано слева.

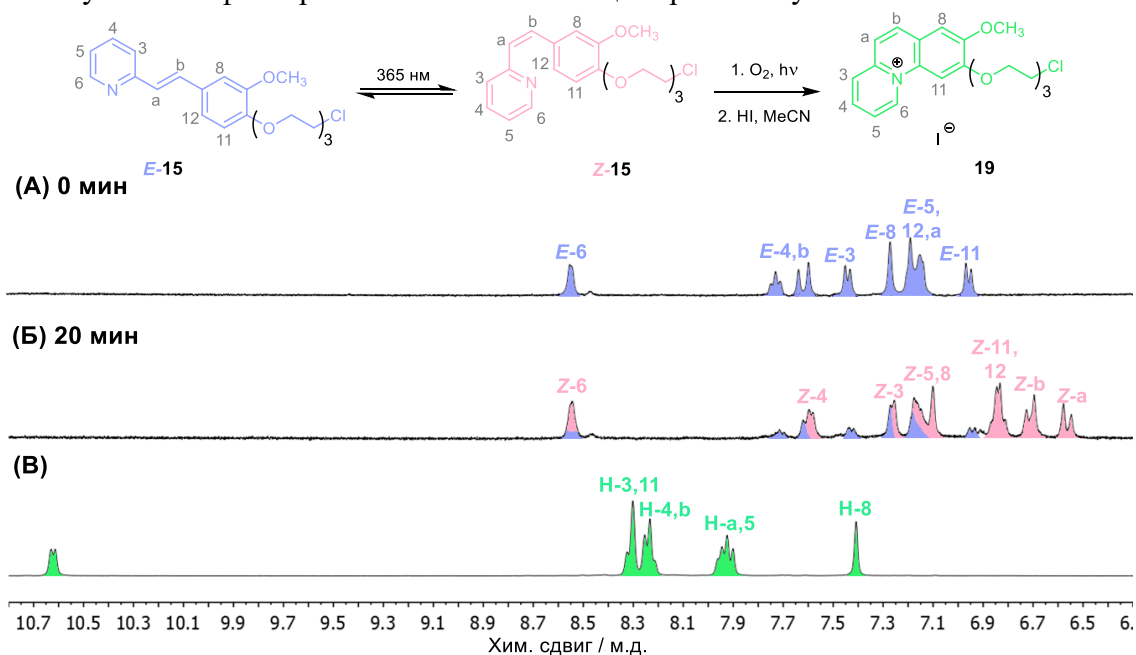


Рисунок П40– ^1H ЯМР спектры в CD_3CN (А) соединения **15** ($C = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$); (Б) фотостационарной смеси **E-15** и **Z-15** (365 nm, 20 мин); (В) соединения **19**.

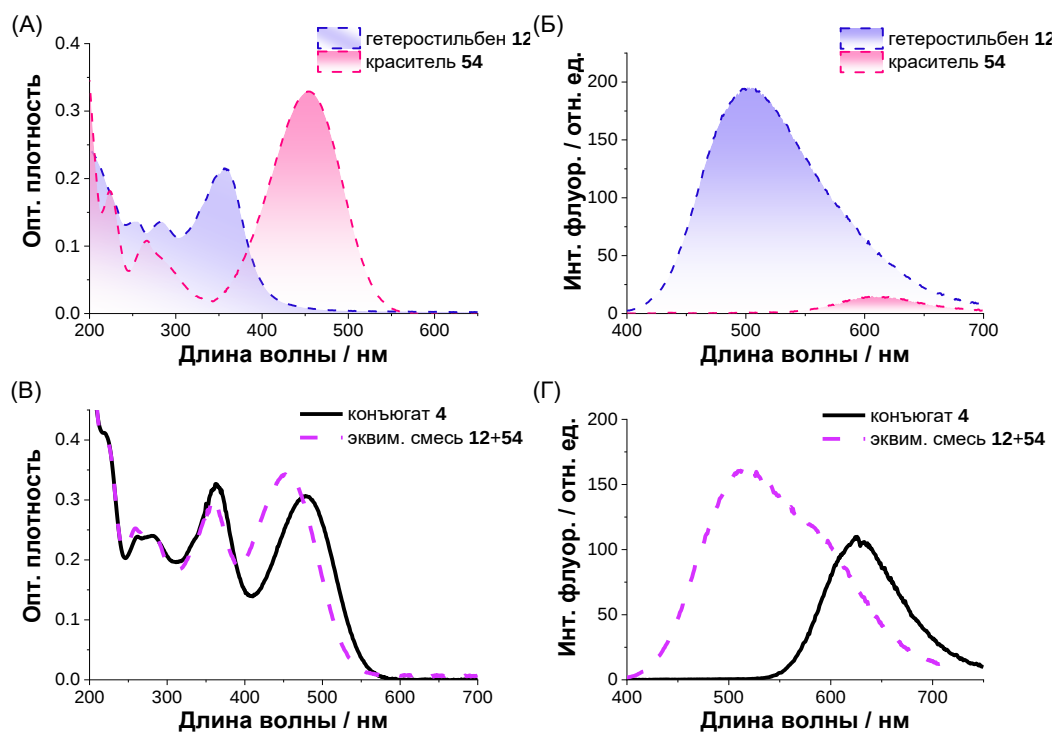


Рисунок П41 — Спектры поглощения (А, В) и флуоресценции (Б, Г) соединений 12, 54, 4 и эквимольярной смеси 12+54. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм.

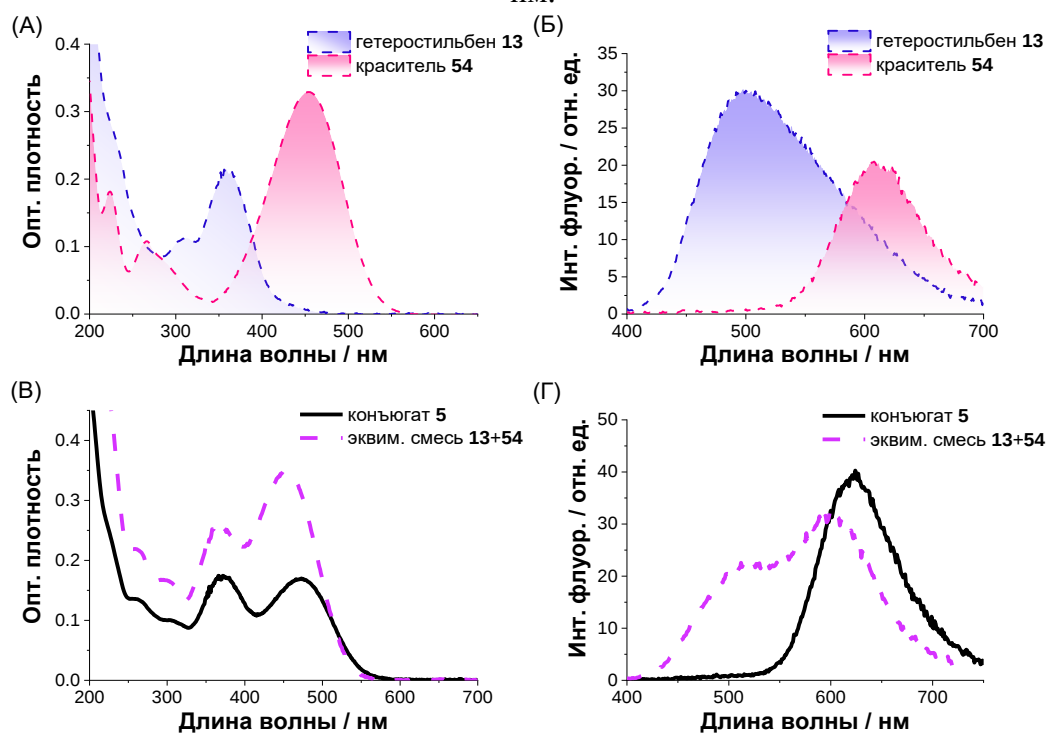


Рисунок П42 — Спектры поглощения (А, В) и флуоресценции (Б, Г) соединений 13, 54, 5 и эквимольярной смеси 13+ 54. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм.

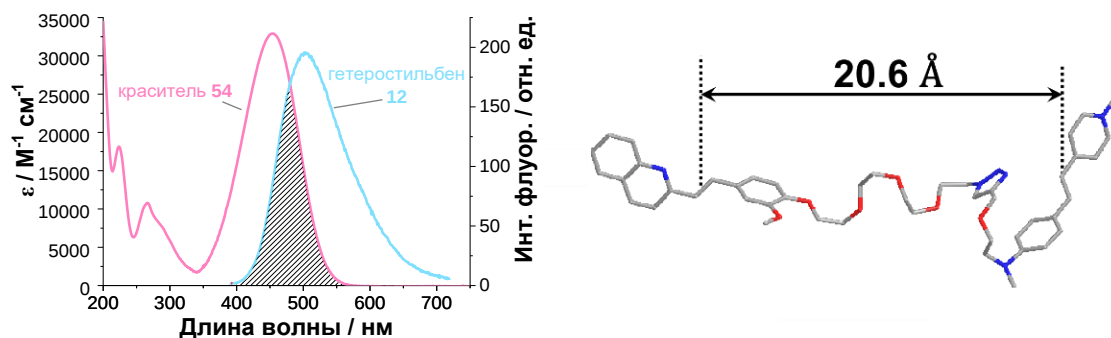


Рисунок П43 – Перекрывание спектра поглощения красителя 54 и спектра флуоресценции гетеростильбена 12 и оптимизированная структура конъюгата 4 (PM7, МОРАС). Все спектры в фосфатном буфере (pH 7,0).

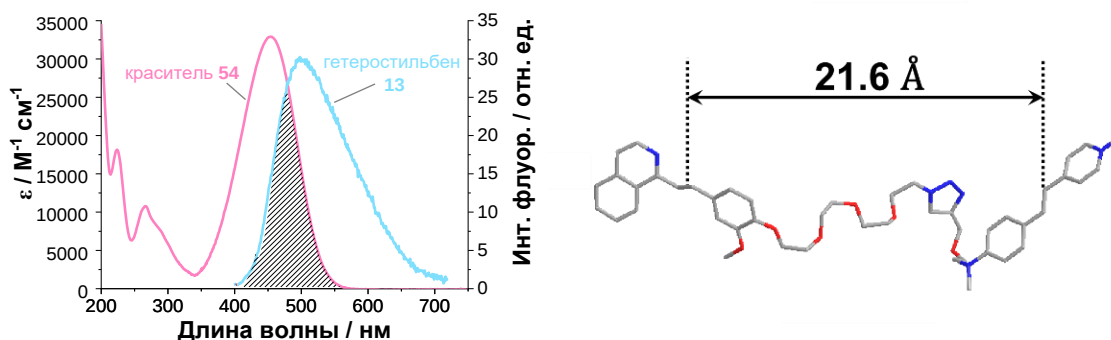


Рисунок П44 – Перекрывание спектра поглощения красителя 54 и спектра флуоресценции гетеростильбена 13 и оптимизированная структура конъюгата 5 (PM7, МОРАС). Все спектры в фосфатном буфере (pH 7,0).

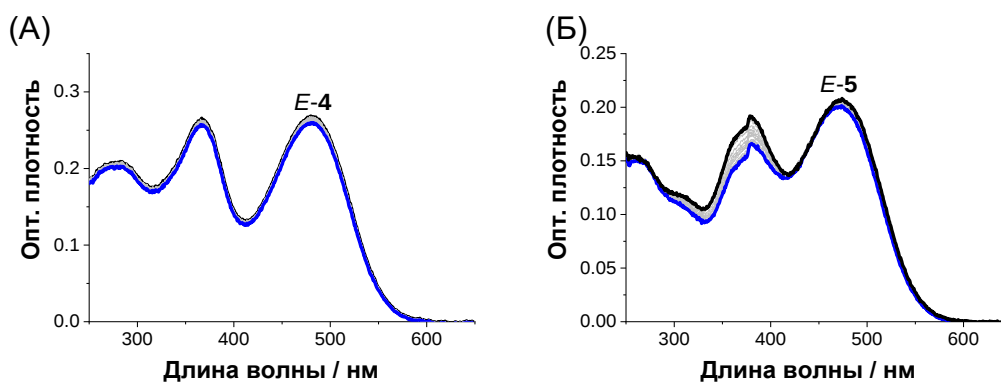


Рисунок П45 — Спектры поглощения конъюгатов 4 и 5 ($1 \cdot 10^{-5}$ M, H_2O) во время облучения светом 365 нм в течение 15 минут.

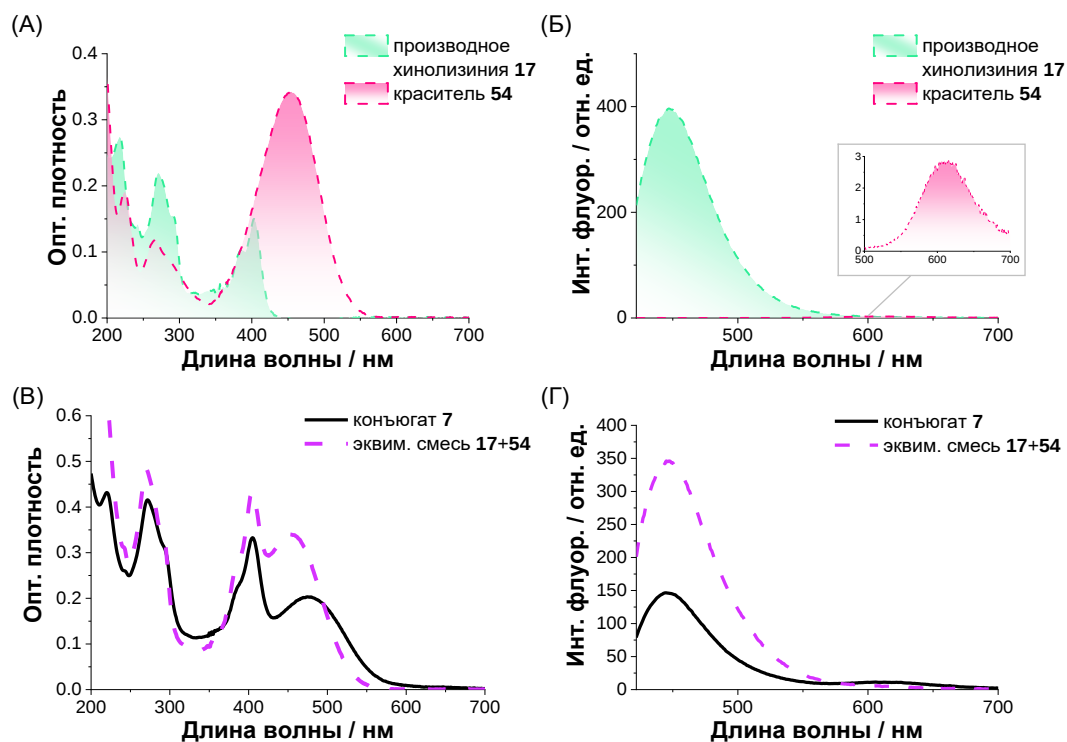


Рисунок П46 – Спектры поглощения (А, В) и флуоресценции (Б, Г) производных 17, 54, 7 и эквимольной смеси 17+54. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $C = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм.

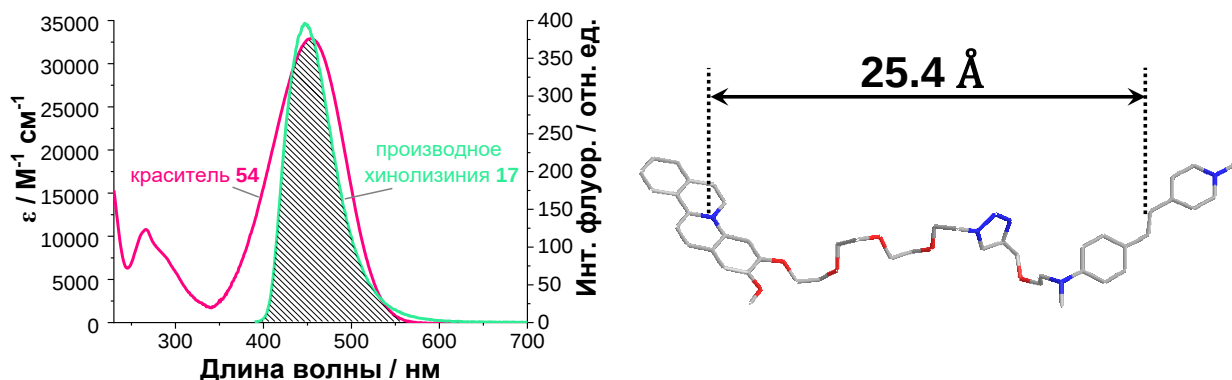


Рисунок П47 – Перекрывание спектра поглощения красителя 54 и спектра флуоресценции производного хинолизиния 17 и оптимизированная структура конъюгата 7 (PM7, MORAC). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0).

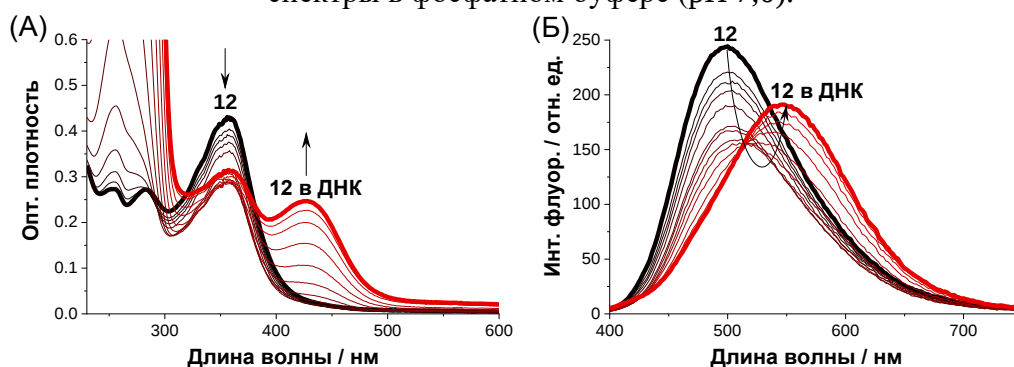


Рисунок П48 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения 12 ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК (0- $1,6 \cdot 10^{-3}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH_3CN , $\lambda_{\text{возб}} = 382$ нм.

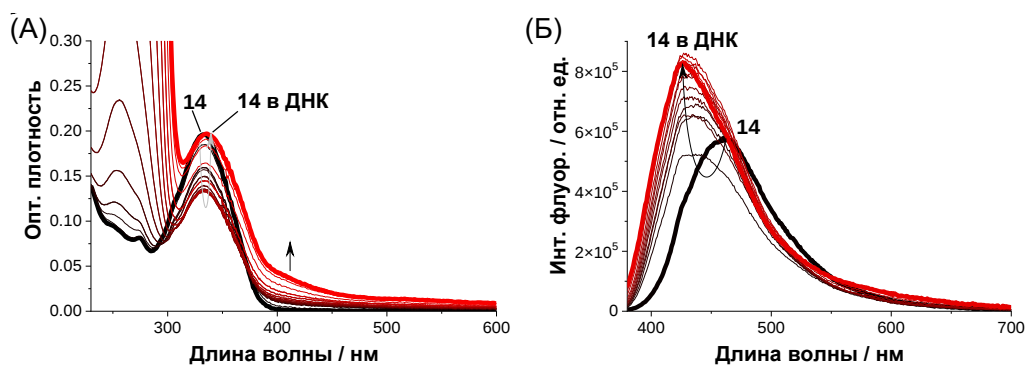


Рисунок П49 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **14** ($8 \cdot 10^{-6}$ М) при добавлении ДНК ($0-1,7 \cdot 10^{-3}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH₃CN, $\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм.

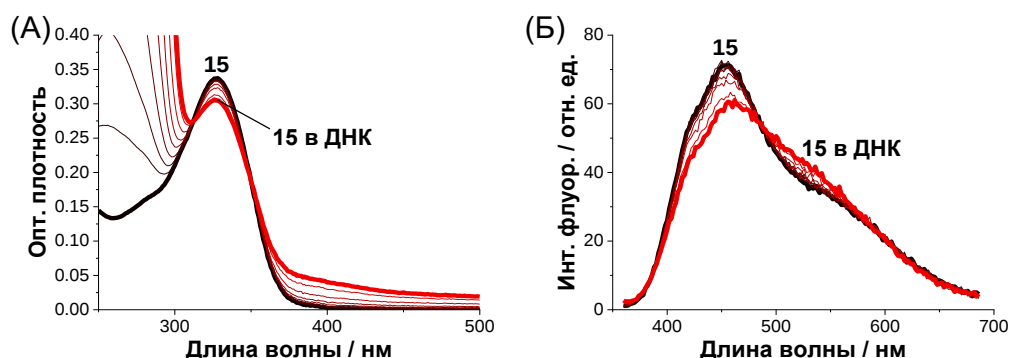


Рисунок П50 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **15** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК ($0-5 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0) с 1% CH₃CN, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

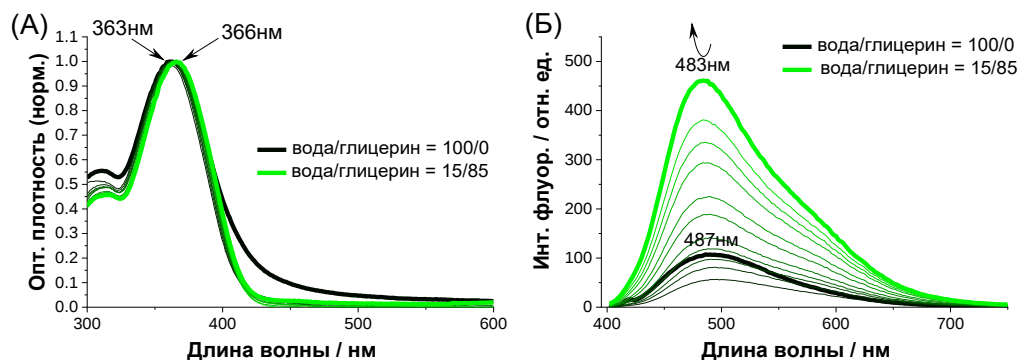


Рисунок П51 – Изменения в спектрах поглощения и флуоресценции соединения **13** ($4 \cdot 10^{-5}$ М) при различной вязкости в системе вода/глицерин (100-0 → 15-85), $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

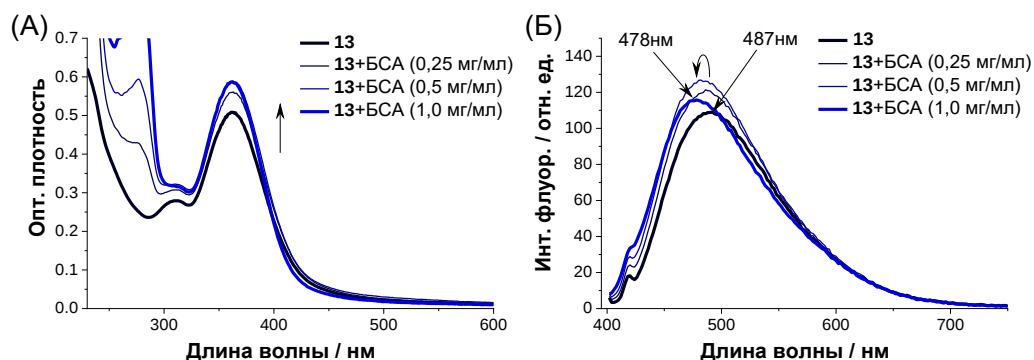


Рисунок П52 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **13** ($4 \cdot 10^{-5}$ М) при различной концентрации БСА (0/0,25/0,5/1 мг/мл). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

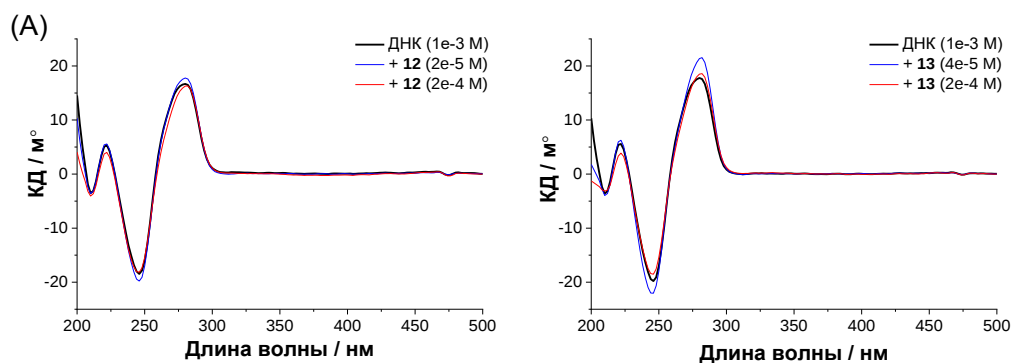


Рисунок П53 – Спектры кругового дихроизма ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) в отсутствие и присутствии соединений **12** (А) и **13** (Б) при различных концентрациях лиганда. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0).

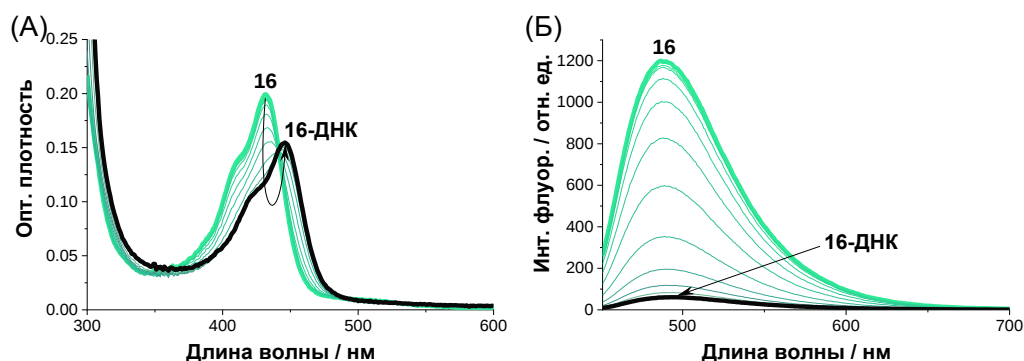


Рисунок П54 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **16** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК (0 – $1,5 \cdot 10^{-3}$ М). Все спектры в буфере ВРЕ (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 441$ нм.

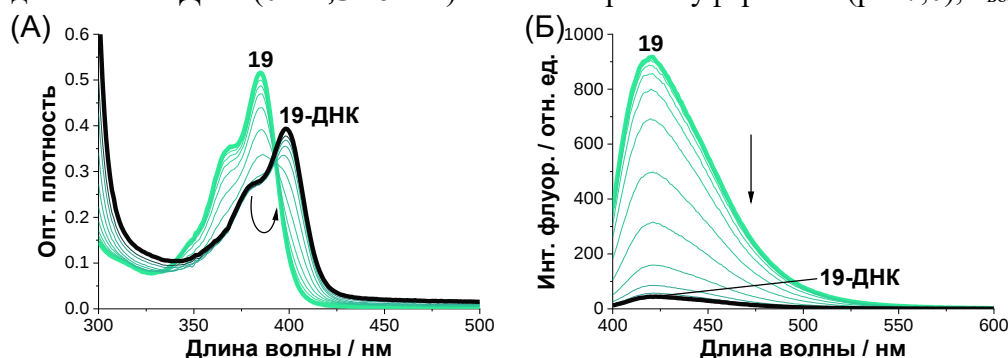


Рисунок П55 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **19** ($3 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК (0 – $9 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в буфере ВРЕ (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 392$ нм.

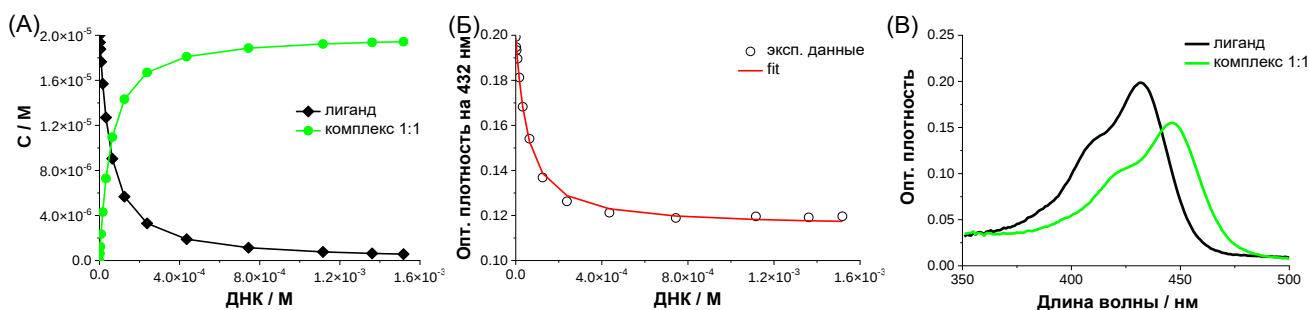


Рисунок П56 – (А) Изменение концентрации лиганда **16** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности лиганда **16** на 432 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения лиганда **16** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

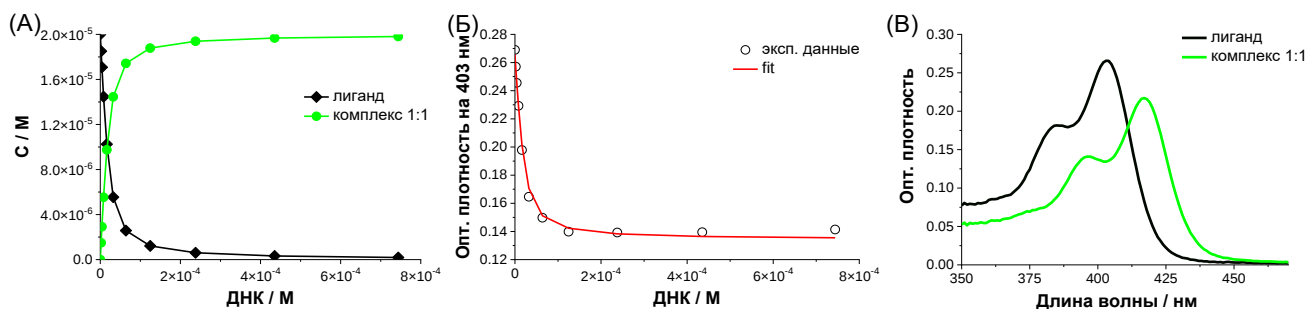


Рисунок П57 – (А) Изменение концентрации лиганда **17** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности лиганда **17** на 403 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения лиганда **17** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

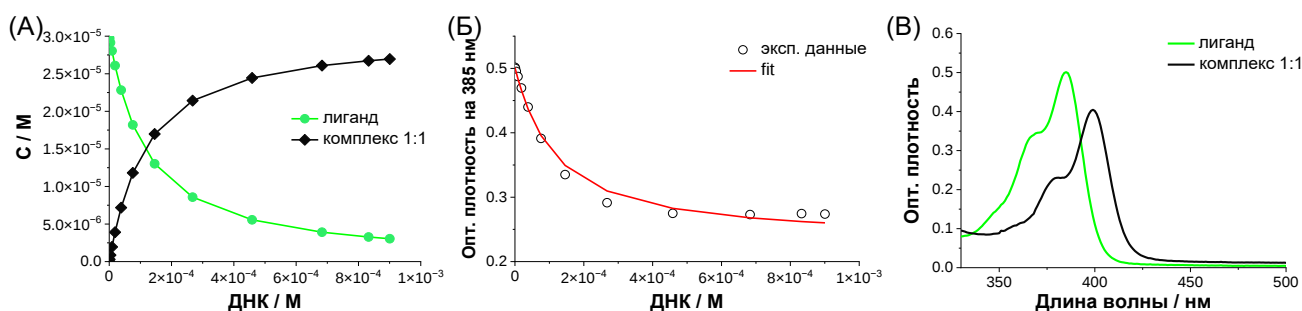


Рисунок П58 – (А) Изменение концентрации лиганда **19** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности лиганда **19** на 385 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения лиганда **19** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

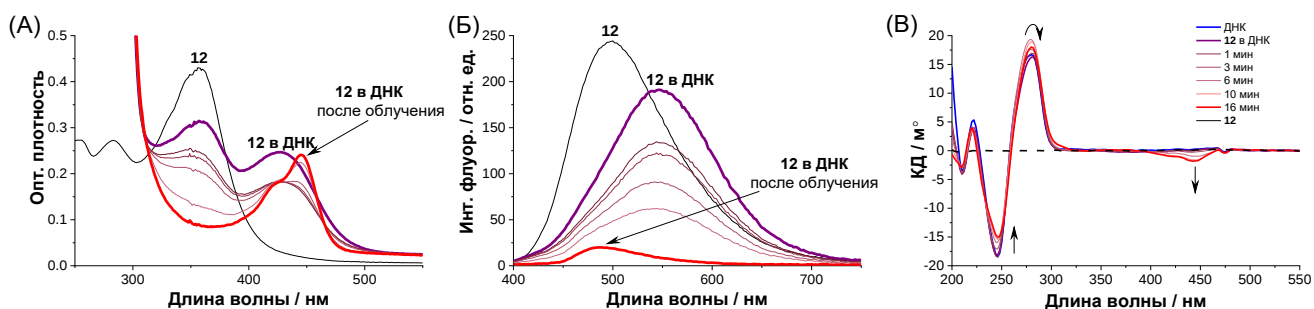


Рисунок П59 – Изменения в спектрах поглощения (А), флуоресценции (Б, $C_{12} = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1,6 \cdot 10^{-3}$ М) и КД (В, $C_{12} = 2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) раствора **12**-ДНК при облучении нефилтрованным светом в течение 0-16 мин. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 382$ нм.

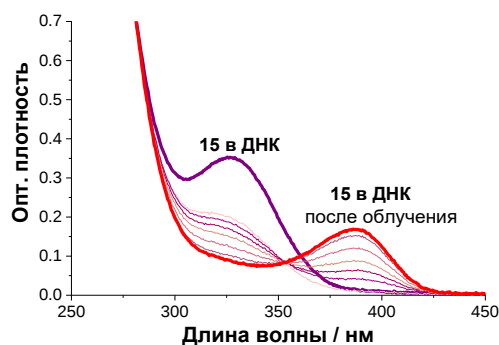


Рисунок П60 – Изменения в спектрах поглощения раствора **15**-ДНК ($C_{15} = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{ДНК}} = 5 \cdot 10^{-4}$ М) при облучении нефилтрованным светом в течение 0-20 мин. Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0).

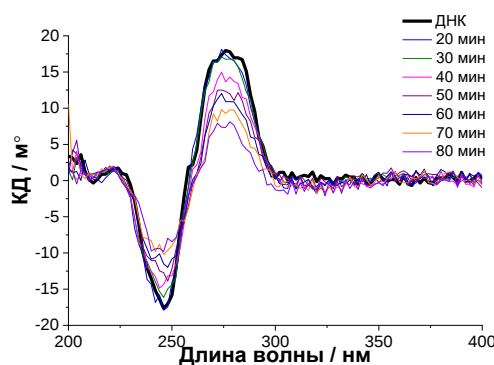


Рисунок П61 – Изменения в спектрах КД ДНК ($1 \cdot 10^{-4}$ М) при облучении нефилтрованным светом в течение 0-80 мин.

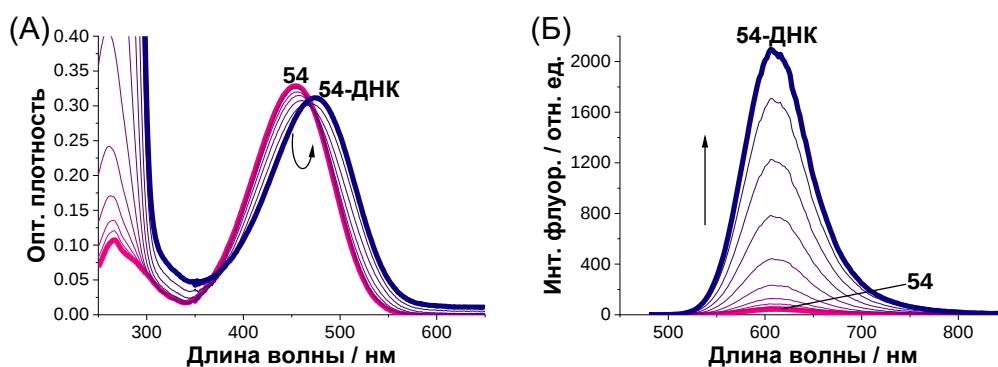


Рисунок П62 – Изменение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) соединения **54** ($1 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК ($0 - 6,3 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в буфере ВРЕ (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм.

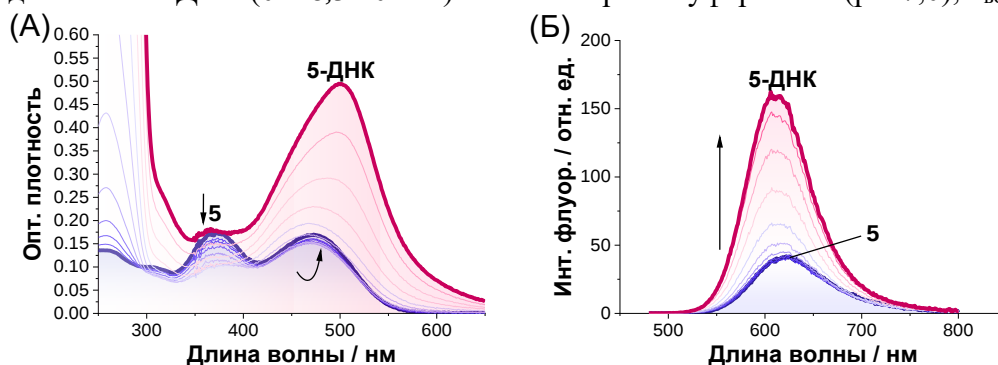


Рисунок П63 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **5** ($1 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК ($0-5,8 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм.

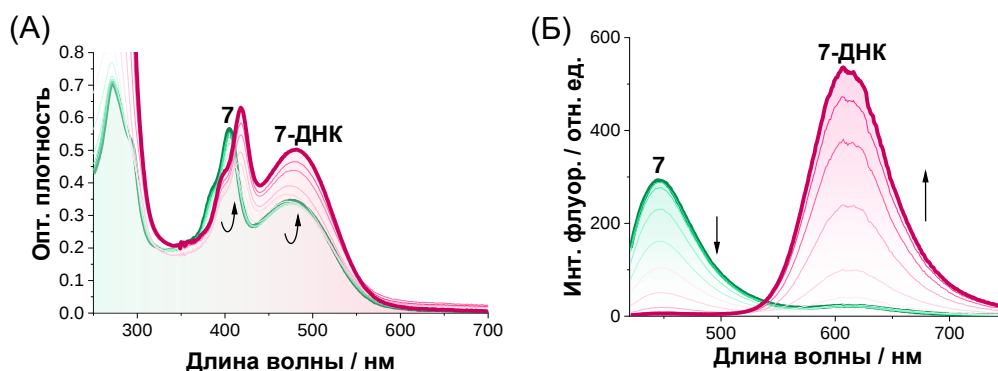


Рисунок П64 – Изменения в спектрах поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **7** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) при добавлении ДНК ($0-5,9 \cdot 10^{-4}$ М). Все спектры в фосфатном буфере (рН 7,0), $\lambda_{\text{возб}} = 411$ нм.

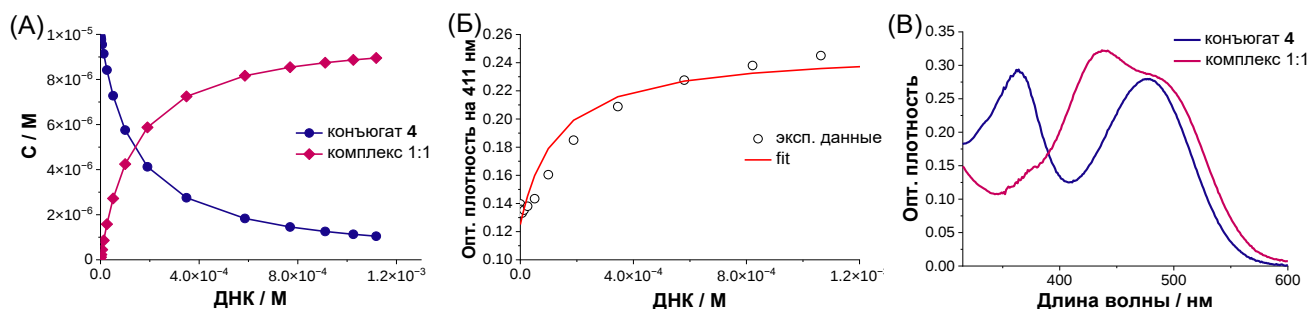


Рисунок П65 – (А) Изменение концентрации конъюгата **4** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности конъюгата **4** на 411 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения конъюгата **4** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

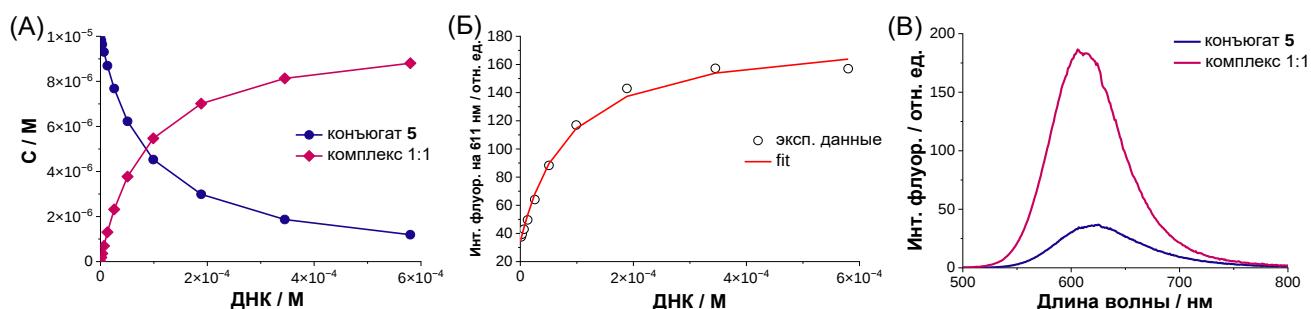


Рисунок П66 – (А) Изменение концентрации конъюгата **5** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение интенсивности флуоресценции конъюгата **5** на 611 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры флуоресценции конъюгата **5** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

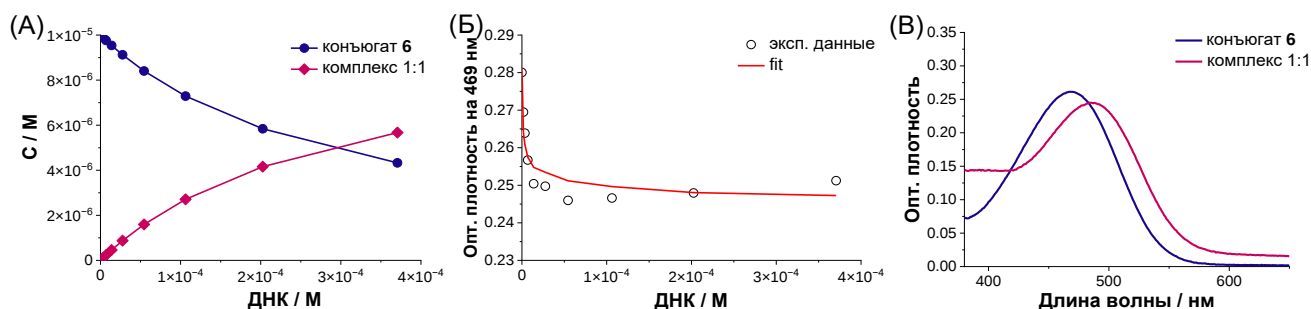


Рисунок П67 – (А) Изменение концентрации конъюгата **6** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности конъюгата **6** на 469 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения конъюгата **6** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

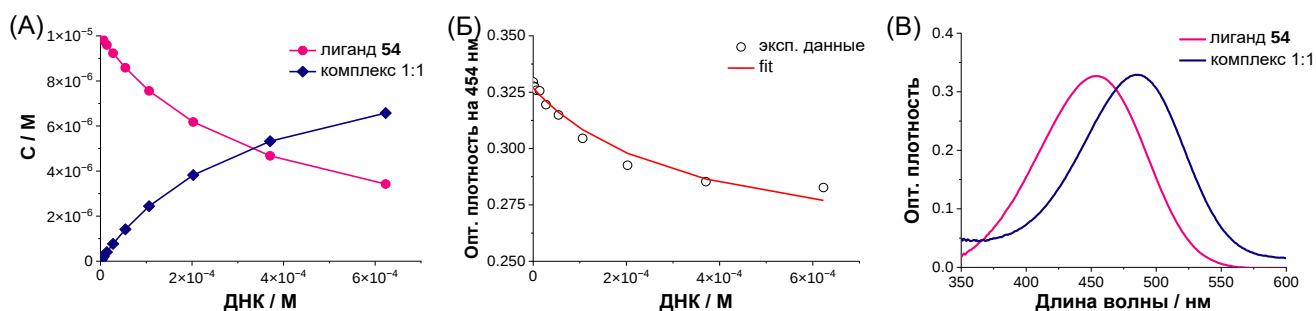


Рисунок П68 – (А) Изменение концентрации лиганда **54** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Изменение опт. плотности лиганда **54** на 454 нм в зависимости от концентрации ДНК. (В) Спектры поглощения лиганда **54** и его комплекса с ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

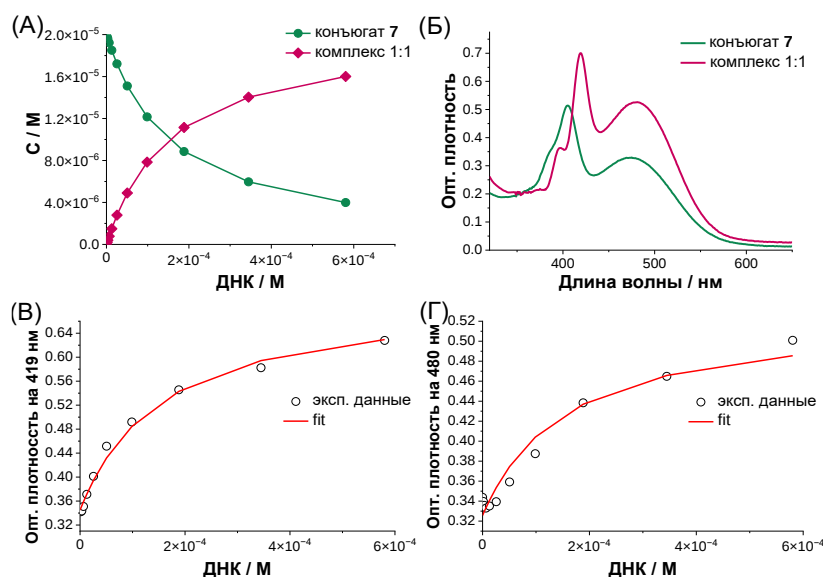


Рисунок П69 — (А) Изменение концентрации конъюгата **7** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Спектры поглощения конъюгата **7** и его комплекса с ДНК. (В, Г) Изменение опт. плотности конъюгата **7** на 419 и 480 нм в зависимости от концентрации ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

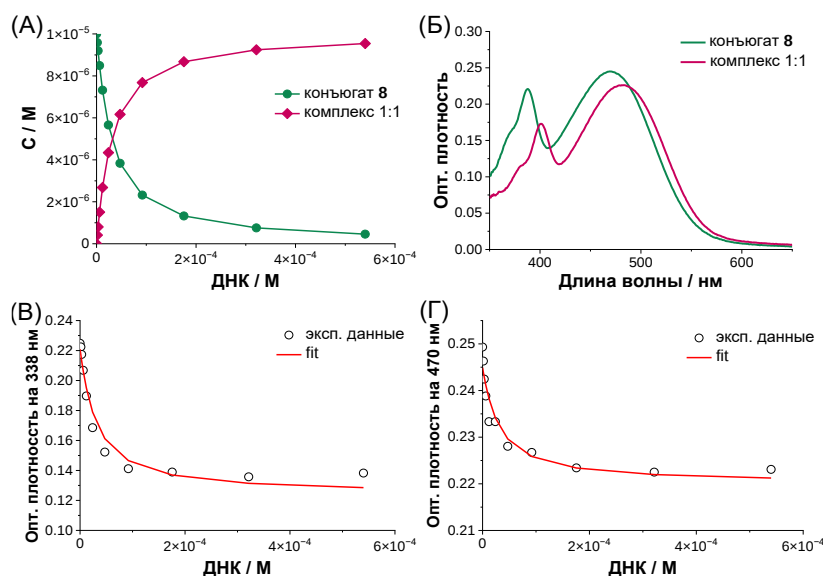


Рисунок П70 — (А) Изменение концентрации конъюгата **8** и его комплекса с ДНК 1:1 в зависимости от концентрации ДНК. (Б) Спектры поглощения конъюгата **8** и его комплекса с ДНК. (В, Г) Изменение опт. плотности конъюгата **8** на 338 и 470 нм в зависимости от концентрации ДНК. Графики получены с использованием программы SpecFit/32.

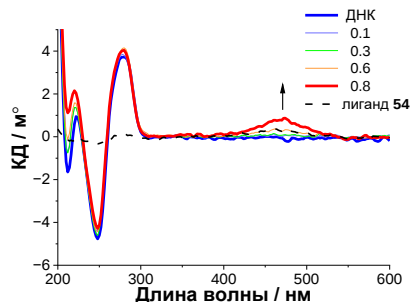


Рисунок П71 — Спектры кругового дихроизма ДНК ($C_{\text{ДНК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ M) в отсутствие и в присутствии лиганда **54** при различном соотношении лиганд-ДНК: 0; 0,1; 0,3; 0,6 и 0,8. Все спектры в фосфатном буфере (pH 7,0). Пунктирной линией показан спектр КД лиганда в отсутствие ДНК ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ M).

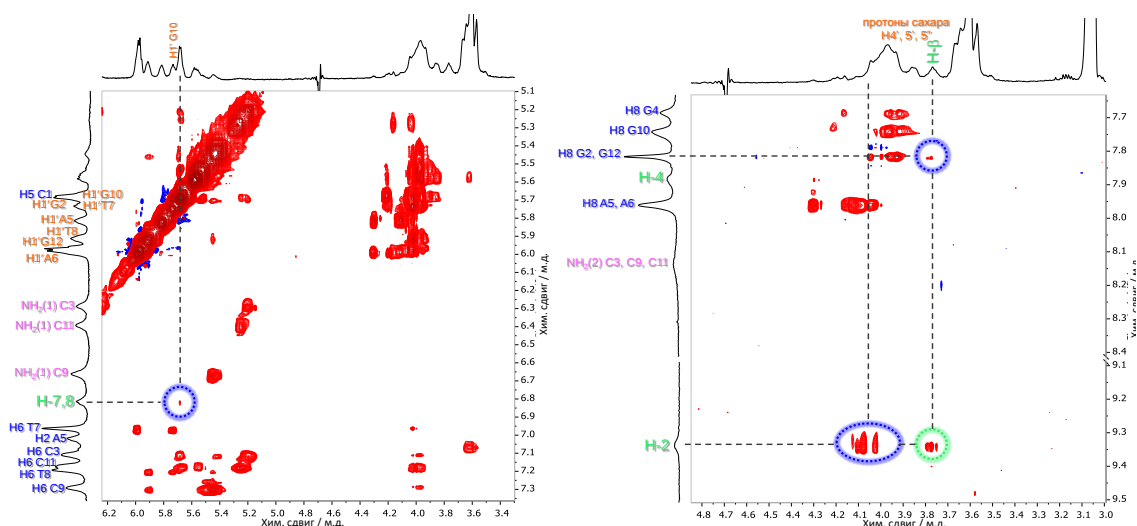


Рисунок П72 – Фрагменты спектра ^1H - ^1H NOESY 19-ДНК. Зеленый кружок: внутримолекулярный кросс-пик NOE (лиганд $\leftrightarrow$ лиганд). Синий кружок: межмолекулярный кросс-пик NOE (лиганд $\leftrightarrow$ ДНК).

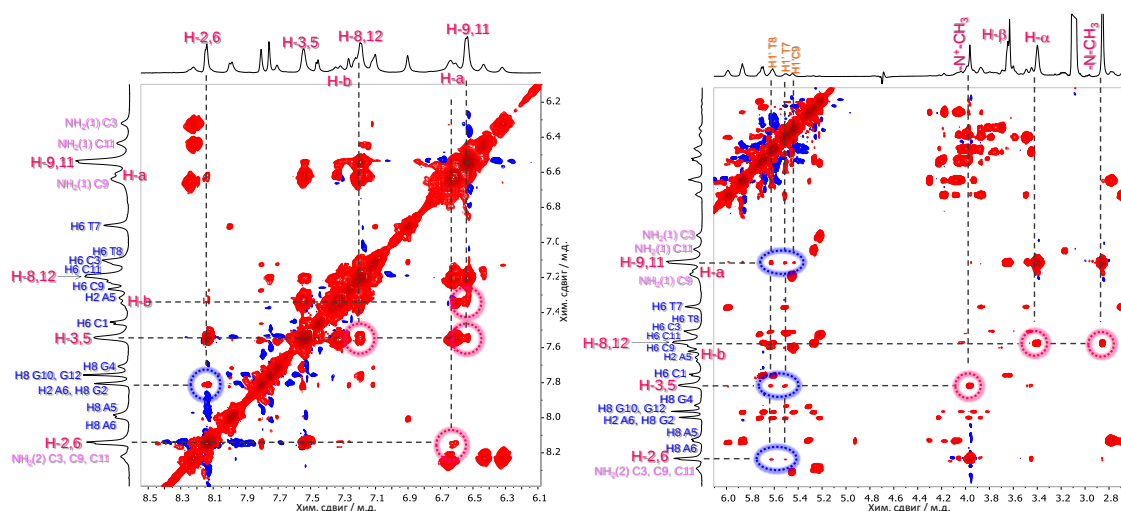


Рисунок П73 – Фрагменты спектра ^1H - ^1H NOESY 54-ОН-ДНК. Розовый кружок: кросс-пик NOE внутри димера (лиганд $\leftrightarrow$ лиганд). Синий кружок: межмолекулярный кросс-пик NOE (лиганд $\leftrightarrow$ ДНК).

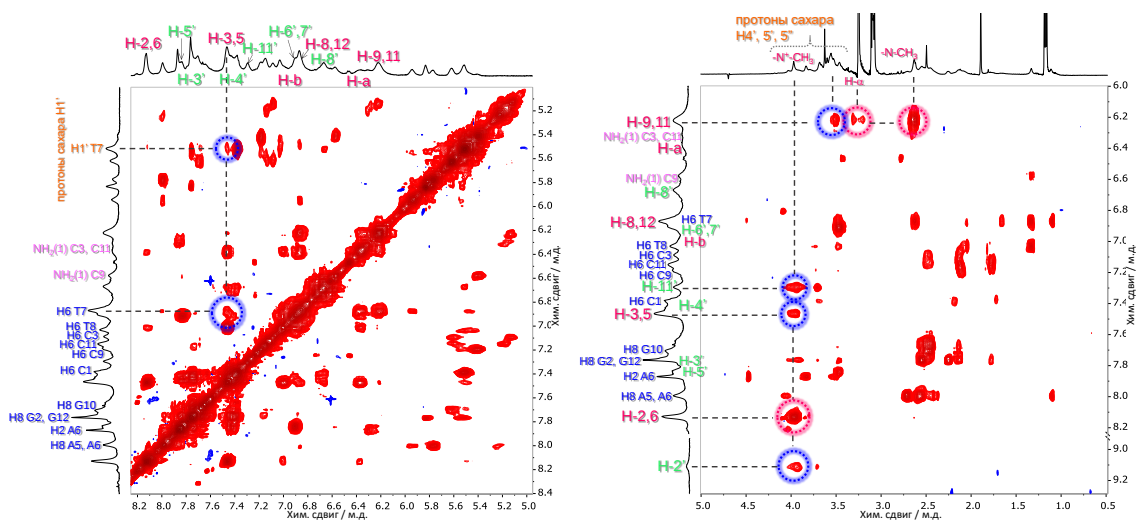


Рисунок П74 – Фрагменты спектра ^1H - ^1H NOESY 8-ДНК. Розовый кружок: внутримолекулярный кросс-пик NOE (лиганд $\leftrightarrow$ лиганд). Синий кружок: межмолекулярный кросс-пик NOE (лиганд $\leftrightarrow$ ДНК).

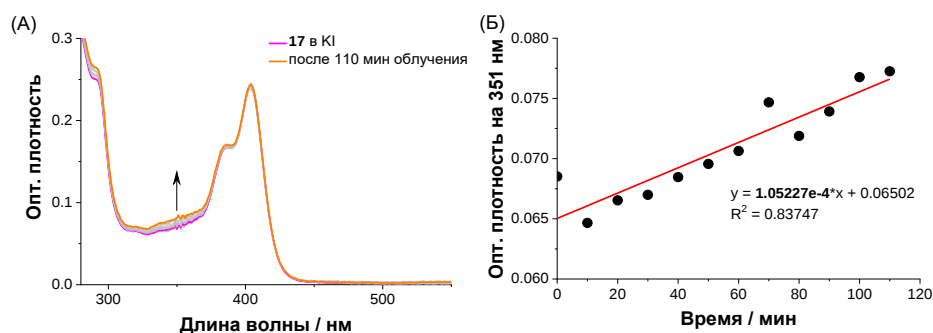


Рисунок П75 – Изменение спектров поглощения (А) производного хинолизиния **17** ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в присутствии KI при облучении монохроматическим светом ($\lambda_{\text{обл}} = 403$ нм) и зависимость оптической плотности KI₃ от времени облучения.

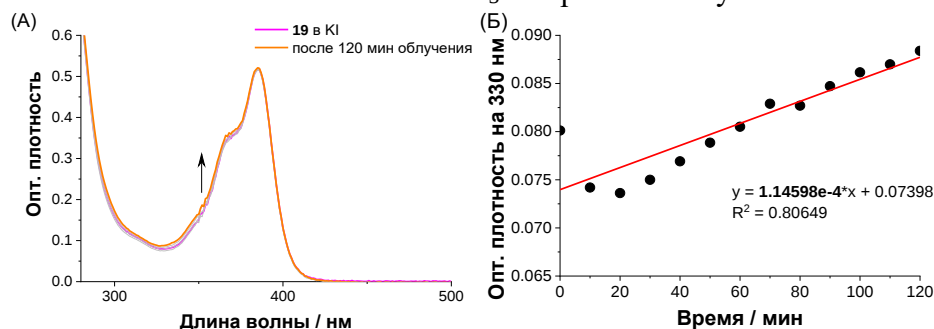


Рисунок П76 – Изменение спектров поглощения (А) производного хинолизиния **19** ($3 \cdot 10^{-5}$ М) в присутствии KI при облучении монохроматическим светом ($\lambda_{\text{обл}} = 385$ нм) и зависимость оптической плотности KI₃ от времени облучения.

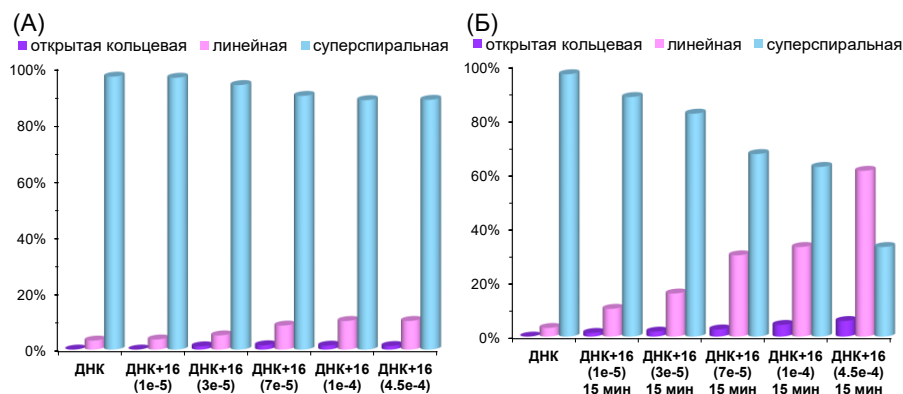


Рисунок П77 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей **16**-ДНК в зависимости от концентрации без облучения (А) и с облучением в течение 15 мин (Б). Графики построены на основе данных из Таблицы П1.

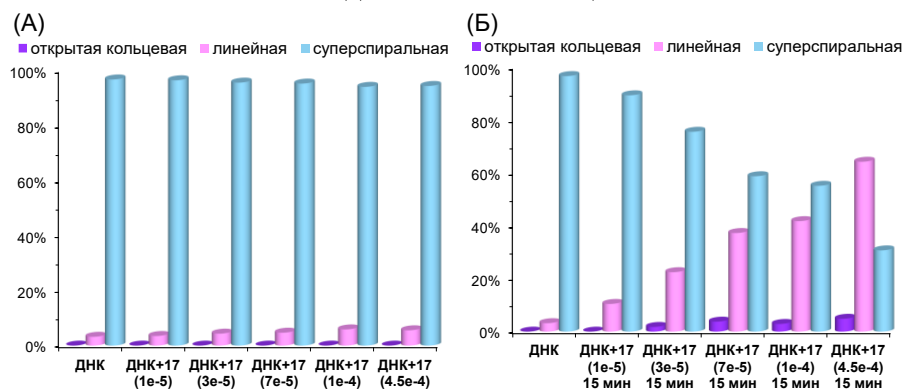
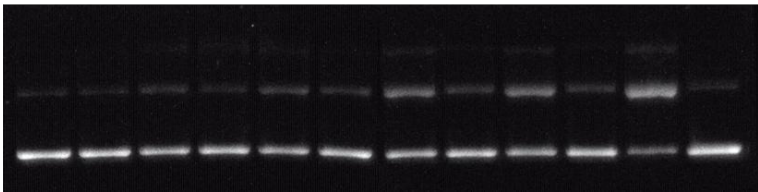


Рисунок П78 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей **17**-ДНК в зависимости от концентрации без облучения (А) и с облучением в течение 15 мин (Б). Графики построены на основе данных из Таблицы П1.

Таблица П1 – Электрофореграммы фоторазрушения рBR322 в присутствии **16** (А) и **17** (Б) в зависимости от концентрации. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм для **16**, 405 нм для **17**.

(А)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12											
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{16}/10^{-5}$, М	0	1	1	3	3	7	7	10	10	45	45	0
время обл., мин	0	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
откр. кольц., %	0,0	0,0	1,4	1,1	1,8	1,5	2,6	1,4	4,3	1,3	5,8	0,0
линейная, %	3,2	3,6	10,3	5,0	15,9	8,5	30,0	10,1	33,1	10,2	61,2	3,8
суперспираль, %	96,8	96,4	88,4	93,8	82,3	90,0	67,4	88,5	62,6	88,6	33,1	96,2

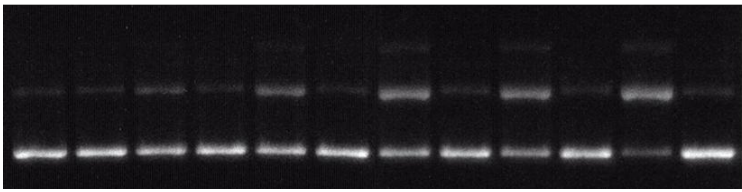
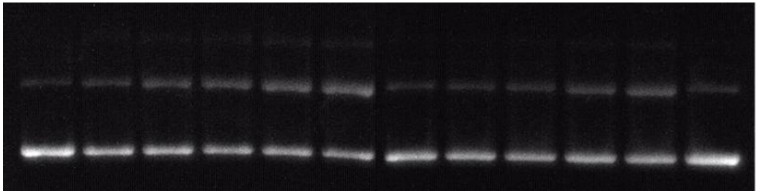
(Б)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12											
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{17}/10^{-5}$, М	0	1	1	3	3	7	7	10	10	45	45	0
время обл., мин	0	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
откр. кольц., %	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	3,8	0,0	2,9	0,0	4,9	0,0
линейная, %	3,2	3,5	10,5	4,4	22,5	4,7	37,4	5,9	41,9	5,6	64,3	3,8
суперспираль, %	96,8	96,5	89,5	95,6	75,7	95,3	58,9	94,1	55,2	94,4	30,8	96,2

Таблица П2 – Электрофореграмма фоторазрушения рBR322 в присутствии **16** в зависимости от облучаемого света. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $\lambda_{\text{обл}} = 436$ нм для линий 2-6 и 313 нм для линий 7-12.

	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12											
												
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{16}/10^{-5}$, М	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
$\lambda_{\text{обл}}$, нм	—	436	436	436	436	436	313	313	313	313	313	313
время обл., мин	0	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	25
откр. кольц., %	0,0	0,0	1,8	2,9	3,1	3,2	0,0	0,0	2,7	2,8	1,4	0,0
линейная, %	3,3	10,0	16,1	22,7	27,0	36,7	6,2	8,7	12,4	16,1	22,5	5,4
суперспираль, %	96,7	90,0	82,1	74,3	69,9	60,1	93,8	91,3	84,8	81,0	76,1	94,6

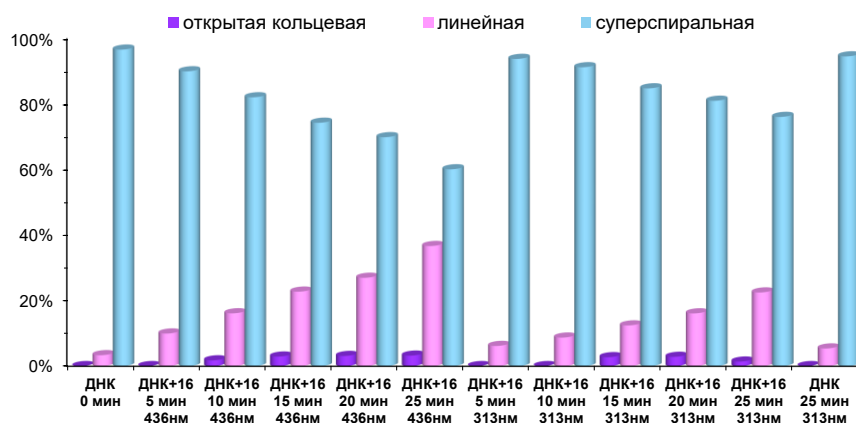


Рисунок П79 – Гистограмма данных гель-электрофореза для смесей 16-ДНК в зависимости от облучения (436 нм для линий 2-6 и 313 нм для линий 7-12). Графики построены на основе данных из Таблицы П2.

Таблица П3 – Электрофореграммы фоторазрушения рBR322 в присутствии 12 (А) и 13 (Б) в зависимости от времени облучения. Во всех случаях: $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, $\lambda_{\text{обл}} > 320$ нм.

(А)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{12}/10^{-5}$, М	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
время обл., мин	0	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	135
откр. кольц., %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	4,1	5,1	6,9	6,3	5,3	0,0
линейная, %	7,1	6,1	7,9	10,7	14,0	18,9	28,2	33,6	41,2	47,7	56,0	9,1
суперспираль, %	92,9	93,9	92,1	89,3	86,0	78,0	67,7	61,2	52,0	46,0	38,7	90,9

(Б)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{13}/10^{-5}$, М	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
время обл., мин	0	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	90
откр. кольц., %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	2,4	4,2	5,6	8,7	0,0
линейная, %	6,6	7,0	7,3	7,5	8,1	10,6	17,0	27,3	48,5	69,3	77,1	8,2
суперспираль, %	93,4	93,0	92,7	92,5	91,9	89,4	81,5	70,3	47,3	25,1	14,1	91,8

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smart molecular probes with controllable photophysical property for smart medicine / X. Kang, Z. Du, S. Yang [et al.] // *Smart Molecules*. – 2024. – Vol. 2. – № 3. – P. e20240033.
2. Conceptual expansion of photomedicine for spatiotemporal treatment methods / P. K. Hashim, A. T. Shaji, A. S. Amrutha, S. Ahmad // *RSC Medicinal Chemistry*. – 2025. – Vol. 16. – № 6. – P. 2360-2372.
3. Velema W. A. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle / W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 6. – P. 2178-2191.
4. Progress of Photoantibiotics in Overcoming Antibiotic Resistance / S. Bhunia, S. M. Box, S. Bera [et al.] // *ChemMedChem*. – 2025. – Vol. 20. – № 4. – P. e202400613.
5. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches / W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2013. – Vol. 113. – № 8. – P. 6114-6178.
6. Cheng H. Recent advances in the use of photochromic dyes for photocontrol in biomedicine / H. Cheng, J. Yoon, H. Tian // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2018. – Vol. 372. – P. 66-84.
7. Xu Y. Visible- and Near-Infrared Light-Driven Molecular Photoswitches for Biological Applications / Y. Xu, Y. Tang, Q. Li // *Advanced Functional Materials*. – 2025. – Vol. 35. – № 22. – P. 2416359.
8. Molecular photoswitches in aqueous environments / J. Volarić, W. Szymanski, N. A. Simeth, B. L. Feringa // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – № 22. – P. 12377-12449.
9. Photoresponsive molecular tools for emerging applications of light in medicine / I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa [et al.] // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – № 43. – P. 11672-11691.
10. Hüll K. In Vivo Photopharmacology / K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner // *Chemical Reviews*. – 2018. – Vol. 118. – № 21. – P. 10710-10747.
11. Emerging Targets in Photopharmacology / M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2016. – Vol. 55. – № 37. – P. 10978-10999.
12. Development of heterocyclic-based anticancer agents: A comprehensive review / M. H. A. Al-Jumaili, E. A. Bakr, M. A. Huessien [et al.] // *Heterocyclic Communications*. – 2025. – Vol. 31. – № 1. – P. 20220179.
13. Coene J. Photopharmacology of Protease Inhibitors: Current Status and Perspectives / J. Coene, S. Wilms, S. H. L. Verhelst // *Chemistry – A European Journal*. – 2024. – Vol. 30. – № 22. – P. e202303999.
14. Szymaszek P. Application of Photoactive Compounds in Cancer Theranostics: Review on Recent Trends from Photoactive Chemistry to Artificial Intelligence / P. Szymaszek, M. Tyszkiewicz-Czochara, J.

Ortyl // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – № 13. – P. 3164.

15. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use / A. Oniszczyk, K. A. Wojtunik-Kulesza, T. Oniszczyk, K. Kasprzak // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2016. – Vol. 83. – P. 912-929.

16. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application / X. Zhao, J. Liu, J. Fan [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – № 6. – P. 4185-4219.

17. Tao J. Targeted photodynamic therapy: enhancing efficacy through specific organelle engagement / J. Tao, Z. Yuan, M. Zhou // *Frontiers in Pharmacology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1667812.

18. Recent Advances in Clinically Used and Trialed Photosensitizers for Antitumor Photodynamic Therapy / L. Chen, Y. Lin, S. Ding [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 22. – № 7. – P. 3530-3541.

19. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy / P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2013. – Vol. 113. – № 1. – P. 119-191.

20. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials / R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 24. – P. 13135-13272.

21. Silva J. M. Light-triggered release of photocaged therapeutics - Where are we now? / J. M. Silva, E. Silva, R. L. Reis // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 298. – P. 154-176.

22. Photocleavable Ortho-Nitrobenzyl-Protected DNA Architectures and Their Applications / M. P. O'hagan, Z. Duan, F. Huang [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2023. – Vol. 123. – № 10. – P. 6839-6887.

23. Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems / M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. – № 11. – P. 3358-3377.

24. Wegner H. A. *Molecular Switches*. Second Edition. Edited by Ben L. Feringa and Wesley R. Browne. Vol. 51 / H. A. Wegner. – John Wiley & Sons, Ltd, 2012. – 2281 p.

25. Rational Design in Photopharmacology with Molecular Photoswitches / P. Kobauri, F. J. Dekker, W. Szymanski, B. L. Feringa // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2023. – Vol. 62. – № 30. – P. e202300681.

26. Kaufman H. Photoregulation of an enzymic process by means of a light-sensitive ligand / H. Kaufman, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger // *Science*. – 1968. – Vol. 162. – № 3861. – P. 1487-1489.

27. Optical control of TRPV1 channels / M. Stein, A. Breit, T. Fehrentz [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 37. – P. 9845-9848.

28. Optical Control of Cannabinoid Receptor 2-Mediated Ca²⁺ Release Enabled by Synthesis of

- Photoswitchable Probes / R. C. Sarott, A. E. G. Viray, P. Pfaff [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 143. – № 2. – P. 736-743.
29. Brown N. Bioisosterism in medicinal chemistry / N. Brown // *Bioisosteres in Medicinal Chemistry* / eds. R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. – Wiley Blackwell, 2012. – Vol. 54. – P. 1-14.
 30. Synthesis and Characterization of a Bidirectional Photoswitchable Antagonist Toolbox for Real-Time GPCR Photopharmacology / N. J. Hauwert, T. A. M. Mocking, D. Da Costa Pereira [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 12. – P. 4232-4243.
 31. Synthesis of Photoswitchable Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Derivatives Enables Optical Control of Cannabinoid Receptor 1 Signaling / M. V. Westphal, M. A. Schafroth, R. C. Sarott [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 50. – P. 18206-18212.
 32. Broichhagen J. A Roadmap to Success in Photopharmacology / J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner // *Accounts of Chemical Research*. – 2015. – Vol. 48. – № 7. – P. 1947-1960.
 33. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death / M. Borowiak, W. Nahaboo, M. Reynders [et al.] // *Cell*. – 2015. – Vol. 162. – № 2. – P. 403-411.
 34. Proteasome inhibitors with photocontrolled activity / M. J. Hansen, W. A. Velema, G. De Bruin [et al.] // *ChemBioChem*. – 2015. – Vol. 16. – № 17. – P. 2053-2057.
 35. Optical control of insulin release using a photoswitchable sulfonylurea / J. Broichhagen, M. Schönberger, S. C. Cork [et al.] // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 5116.
 36. Optical control of antibacterial activity / W. A. Velema, J. P. van der Berg, M. J. Hansen [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2013. – Vol. 5. – № 11. – P. 924-928.
 37. Optical control of acetylcholinesterase with a tacrine switch / J. Broichhagen, I. Jurastow, K. Iwan [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2014. – Vol. 53. – № 29. – P. 7657-7660.
 38. NIR-triggered anticancer drug delivery by upconverting nanoparticles with integrated azobenzene-modified mesoporous silica / J. Liu, W. Bu, L. Pan, J. Shi // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 16. – P. 4375-4379.
 39. Upconverting Nanocarriers Enable Triggered Microtubule Inhibition and Concurrent Ferroptosis Induction for Selective Treatment of Triple-Negative Breast Cancer / J. Zhu, P. Dai, F. Liu [et al.] // *Nano Letters*. – 2020. – Vol. 20. – № 9. – P. 6235-6245.
 40. Metuh P. Recent Advances in Wireless Optoelectronic Biomedical Implants / P. Metuh, P. M. Petersen, Y. Ou // *Laser and Photonics Reviews*. – 2024. – Vol. 18. – № 12. – P. 2300752.
 41. Optical Fibre-Enabled Photoswitching for Localised Activation of an Anti-Cancer Therapeutic Drug / K. A. Palasis, N. A. Lokman, B. C. Quirk [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 19. – P. 10844.
 42. Wireless multi-lateral optofluidic microsystems for real-time programmable optogenetics and photopharmacology / Y. Wu, M. Wu, A. Vázquez-Guardado [et al.] // *Nature Communications*. – 2022.

– Vol. 13. – № 1. – P. 5571.

43. Morstein J. New players in phototherapy: photopharmacology and bio-integrated optoelectronics / J. Morstein, D. Trauner // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2019. – Vol. 50. – P. 145-151.

44. Mitscherlich E. Ueber das Stickstoffbenzid / E. Mitscherlich // *Annalen der Physik*. – 1834. – Vol. 108. – № 15. – P. 225-227.

45. Hartley G. S. The cis-form of azobenzene / G. S. Hartley // *Nature*. – 1937. – Vol. 140. – № 3537. – P. 281.

46. Azobenzene photoswitches for biomolecules / A. Tavassoli, A. D. Hamilton, D. R. Spring [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40. – № 8. – P. 4422-4437.

47. Light-Controlled Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Towards Photopharmacological Chemotherapy / W. Szymanski, M. E. Ourailidou, W. A. Velema [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2015. – Vol. 21. – № 46. – P. 16517-16524.

48. Aryl Azocyclopropeniums: Minimalist, Visible-Light Photoswitches / M. Fink, J. Stäuble, M. Weisgerber, E. M. Carreira // *Journal of the American Chemical Society*. – 2024. – Vol. 146. – № 14. – P. 9519-9525.

49. Ortho-Fluoroazobenzenes: Visible Light Switches with Very Long-Lived Z Isomers / C. Knie, M. Utecht, F. Zhao [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2014. – Vol. 20. – № 50. – P. 16492-16501.

50. Beharry A. A. Azobenzene Photoswitching without Ultraviolet Light / A. A. Beharry, O. Sadoski, G. A. Woolley // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133. – № 49. – P. 19684-19687.

51. Highly efficient reversible Z-E photoisomerization of a bridged azobenzene with visible light through resolved S1($n\pi^*$) absorption bands / R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – Vol. 131. – № 43. – P. 15594-15595.

52. Furst A. L. DNA Hybridization to Control Cellular Interactions / A. L. Furst, S. H. Klass, M. B. Francis // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2019. – Vol. 44. – № 4. – P. 342-350.

53. Photodependent Melting of Unmodified DNA Using a Photosensitive Intercalator: A New and Generic Tool for Photoreversible Assembly of DNA Nanostructures at Constant Temperature / A. Bergen, S. Rudiuk, M. Morel [et al.] // *Nano Letters*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 773-780.

54. Photoswitchable Fluorescent Crystals Obtained by the Photoreversible Coassembly of a Nucleobase and an Azobenzene Intercalator / L. Zhou, P. Retailleau, M. Morel [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2019. – Vol. 141. – № 23. – P. 9321-9329.

55. Reversible Photocontrol of DNA Melting by Visible-Light-Responsive F4-Coordinated Azobenzene Compounds / M. Dudek, M. Deiana, Z. Pokladek [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2018. – Vol. 24. – № 71. – P. 18963-18970.

56. Falese J. P. Targeting RNA with small molecules: from fundamental principles towards the clinic / J. P. Falese, A. Donlic, A. E. Hargrove // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – № 4. – P. 2224-2243.
57. Yu A. M. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges / A. M. Yu, Y. H. Choi, M. J. Tu // *Pharmacological Reviews*. – 2020. – Vol. 72. – № 4. – P. 862-898.
58. Lubbe A. S. Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function / A. S. Lubbe, W. Szymanski, B. L. Feringa // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – Vol. 46. – № 4. – P. 1052-1079.
59. Photochromic Nucleosides and Oligonucleotides / J. Bargstedt, M. Reinschmidt, L. Tydecks [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2024. – Vol. 63. – № 9. – P. e202310797.
60. Tavakoli A. Photochemical modifications for DNA/RNA oligonucleotides / A. Tavakoli, J. H. Min // *RSC Advances*. – 2022. – Vol. 12. – № 11. – P. 6484-6507.
61. Designing Reversible Photoswitching Azobenzene-Modified Nucleotide for Controlling Biological Function / J. Li, J. Du, W. He [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2025. – Vol. 147. – № 25. – P. 21638-21648.
62. Ogasawara S. Duration Control of Protein Expression in Vivo by Light-Mediated Reversible Activation of Translation / S. Ogasawara // *ACS Chemical Biology*. – 2017. – Vol. 12. – № 2. – P. 351-356.
63. Meier-Stephenson V. G4-quadruplex-binding proteins: review and insights into selectivity / V. Meier-Stephenson // *Biophysical Reviews*. – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 635-654.
64. Han Z. G-quadruplex in cancer energy metabolism: A potential therapeutic target / Z. Han, L. Wen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2025. – Vol. 1869. – № 7. – P. 130810.
65. Asamitsu S. Ligand Design to Acquire Specificity to Intended G-Quadruplex Structures / S. Asamitsu, T. Bando, H. Sugiyama // *Chemistry - A European Journal*. – 2019. – Vol. 25. – № 2. – P. 417-430.
66. Conformational switching of G-quadruplex DNA by photoregulation / X. Wang, J. Huang, Y. Zhou [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2010. – Vol. 49. – № 31. – P. 5305-5309.
67. Light-driven conformational regulation of human telomeric G-quadruplex DNA in physiological conditions / X. Xing, X. Wang, L. Xu [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2011. – Vol. 9. – № 19. – P. 6639-6645.
68. Bridged Azobenzene Exhibits Fully Reversible Photocontrolled Binding to a G-Quadruplex DNA/Duplex Junction / J. Ramos-Soriano, Y. J. Jiang, B. Deng [et al.] // *JACS Au*. – 2025. – Vol. 5. – № 8. – P. 3846-3857.

69. Photocontrol of Antibacterial Activity: Shifting from UV to Red Light Activation / M. Wegener, M. J. Hansen, A. J. M. Driessen [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 49. – P. 17979-17986.
70. Ciprofloxacin–Photoswitch Conjugates: A Facile Strategy for Photopharmacology / W. A. Velema, M. J. Hansen, M. M. Lerch [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2015. – Vol. 26. – № 12. – P. 2592-2597.
71. Optical Tuning of Antibacterial Activity of Photoresponsive Antibiotics / X. Fu, J. Yu, N. Dai [et al.] // *ACS Applied Bio Materials*. – 2020. – Vol. 3. – № 8. – P. 4751-4755.
72. Direct Growth Control of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Visible-Light-Responsive Novel Photoswitchable Antibiotics / S. Bhunia, S. K. Jana, S. Sarkar [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2024. – Vol. 30. – № 15. – P. e202303685.
73. Photopharmacological Control of Cyclic Antimicrobial Peptides / Y. Q. Yeoh, J. Yu, S. W. Polyak [et al.] // *ChemBioChem*. – 2018. – Vol. 19. – № 24. – P. 2591-2597.
74. Controlling Antibacterial Activity Exclusively with Visible Light: Introducing a Tetra-ortho-Chloro-Azobenzene Amino Acid / X. Just-Baringo, A. Yeste-Vázquez, J. Moreno-Morales [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2021. – Vol. 27. – № 51. – P. 12987-12991.
75. Azobenzene as Multi-Targeted Scaffold in Medicinal Chemistry / B. De Filippis, A. Della Valle, A. Ammazalorso [et al.] // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – № 24. – P. 5872.
76. Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch / I. Tochitsky, J. Trautman, N. Gallerani [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 45487-.
77. Synthesis and characterization of new push-pull azobenzene. Cis → Trans isomerization kinetic study / G. Bichot, X. Sallenave, R. Métivier, S. Péralta // *Dyes and Pigments*. – 2025. – Vol. 239. – P. 112774.
78. A combinatorial approach to improving the performance of azoarene photoswitches / J. Calbo, A. R. Thawani, R. S. L. Gibson [et al.] // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 15. – № 1. – P. 2753-2764.
79. Tuning Azoheteroarene Photoswitch Performance through Heteroaryl Design / J. Calbo, C. E. Weston, A. J. P. White [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 3. – P. 1261-1274.
80. Crespi S. Heteroaryl azo dyes as molecular photoswitches / S. Crespi, N. A. Simeth, B. König // *Nature Reviews Chemistry* 2019 3:3. – 2019. – Vol. 3. – № 3. – P. 133-146.
81. Density Functional Studies of the Ground- and Excited-State Potential-Energy Curves of Stilbene cis–trans Isomerization / Wen-Ge Han, Timothy Lovell, Tiqing Liu, Louis Noodleman // *ChemPhysChem*. – 2002. – Vol. 3. – № 2. – P. 167-178.
82. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor / D. Schmidt, T. Rodat, L.

Heintze [et al.] // ChemMedChem. – 2018. – Vol. 13. – № 22. – P. 2415-2426.

83. Ogasawara S. Straightforward and reversible photoregulation of hybridization by using a photochromic nucleoside / S. Ogasawara, M. Maeda // Angewandte Chemie - International Edition. – 2008. – Vol. 47. – № 46. – P. 8839-8842.

84. Ogasawara S. Reversible Photoswitching of a G-Quadruplex / S. Ogasawara, M. Maeda // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – Vol. 48. – № 36. – P. 6671-6674.

85. Ogasawara S. Photoresponsive 5'-cap for the reversible photoregulation of gene expression / S. Ogasawara, M. Maeda // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2011. – Vol. 21. – № 18. – P. 5457-5459.

86. Ogasawara S. Control of cellular function by reversible photoregulation of translation / S. Ogasawara // ChemBioChem. – 2014. – Vol. 15. – № 18. – P. 2652-2655.

87. Reversible photoregulation of DNA B-Z transition by a photochromic nucleoside / Y. Liu, C. Zhong, Z. He [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2018. – Vol. 255. – P. 2151-2154.

88. Regulation of mRNA translation by a photoriboswitch / K. A. Rotstan, M. M. Abdelsayed, L. F. M. Passalacqua [et al.] // eLife. – 2020. – Vol. 9. – P. e51737.

89. Photoswitching of DNA Hybridization Using a Molecular Motor / A. S. Lubbe, Q. Liu, S. J. Smith [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Vol. 140. – № 15. – P. 5069-5076.

90. A Photoresponsive Stiff-Stilbene Ligand Fuels the Reversible Unfolding of G-Quadruplex DNA / M. P. O'Hagan, S. Halder, M. Duchi [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2019. – Vol. 58. – № 13. – P. 4334-4338.

91. Ratiometric O₂ sensing based on selective self-sensitized photooxidation of donor-acceptor fluorophores / J. X. Wang, L. Y. Niu, P. Z. Chen [et al.] // Chemical Communications. – 2019. – Vol. 55. – № 49. – P. 7017-7020.

92. DNA-ligand interactions gained and lost: light-induced ligand redistribution in a supramolecular cascade / D. V. Berdnikova, T. M. Aliyev, T. Paululat [et al.] // Chemical Communications. – 2015. – Vol. 51. – № 23. – P. 4906-4909.

93. Regiospecific C–N Photocyclization of 2-Styrylquinolines / E. N. Gulakova, D. V. Berdnikova, T. M. Aliyev [et al.] // Journal of Organic Chemistry. – 2014. – Vol. 79. – № 12. – P. 5533-5537.

94. Photochemical synthesis, intercalation with DNA and antitumor evaluation in vitro of benzo[d]thiazolo[3,2-a]quinolin-10-ium derivatives / A. E. Saifutiarova, Y. V. Fedorov, V. B. Tsvetkov [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2021. – Vol. 115. – P. 105267.

95. Excited-State Proton Transfer in Indigo / J. Pina, D. Sarmento, M. Accoto [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. – 2017. – Vol. 121. – № 10. – P. 2308-2318.

96. Hemiindigoids as Prominent Photoswitch Scaffolds / A. Gernet, L. Tournel, L. M. Balivet [et al.] // ChemPhotoChem. – 2025. – Vol. 9. – № 3. – P. e202400261.

97. Zhao X. Photoinduced excited-state hydrogen bonding strengthening of hemiindigo for the drastically fluorescence quenching in protic solvent and water sensing in aprotic solvent / X. Zhao, S. Yang // *Journal of Luminescence*. – 2020. – Vol. 220. – P. 116993.
98. Hemiindigo: Highly Bistable Photoswitching at the Biooptical Window / C. Petermayer, S. Thumser, F. Kink [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 42. – P. 15060-15067.
99. Berdnikova D. V. Design, synthesis and investigation of water-soluble hemi-indigo photoswitches for bioapplications / D. V. Berdnikova // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 15. – № 1. – P. 2822-2829.
100. Petermayer C. Circular Dichroism Photoswitching with a Twist: Axially Chiral Hemiindigo / C. Petermayer, H. Dube // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 42. – P. 13558-13561.
101. Sacherer M. Diaryl-hemiindigos as visible light, pH, and heat responsive four-state switches and application in photochromic transparent polymers / M. Sacherer, F. Hampel, H. Dube // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 4382.
102. Berdnikova D. V. Visible-range hemi-indigo photoswitch: ON–OFF fluorescent binder for HIV-1 RNA / D. V. Berdnikova // *Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 55. – № 58. – P. 8402-8405.
103. Twisted Hemithioindigo Photoswitches: Solvent Polarity Determines the Type of Light-Induced Rotations / S. Wiedbrauk, B. Maerz, E. Samoylova [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – Vol. 138. – № 37. – P. 12219-12227.
104. Making fast photoswitches faster - Using hammett analysis to understand the limit of donor-acceptor approaches for faster hemithioindigo photoswitches / B. Maerz, S. Wiedbrauk, S. Oesterling [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2014. – Vol. 20. – № 43. – P. 13984-13992.
105. Chemical control of Hemithioindigo-photoisomerization – Substituent-effects on different molecular parts / T. Cordes, T. Schadendorf, K. Rück-Braun, W. Zinth // *Chemical Physics Letters*. – 2008. – Vol. 455. – № 4-6. – P. 197-201.
106. Hemithioindigos for Cellular Photopharmacology: Desymmetrised Molecular Switch Scaffolds Enabling Design Control over the Isomer-Dependency of Potent Antimitotic Bioactivity / A. Sailer, F. Ermer, Y. Kraus [et al.] // *ChemBioChem*. – 2019. – Vol. 20. – № 10. – P. 1305-1314.
107. Pyrrole Hemithioindigo Antimitotics with Near-Quantitative Bidirectional Photoswitching that Photocontrol Cellular Microtubule Dynamics with Single-Cell Precision** / A. Sailer, J. C. M. Meiring, C. Heise [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2021. – Vol. 60. – № 44. – P. 23695-23704.
108. Metal coordination and isomerization of a hydrazone switch / M. L. Croteau, X. Su, D. E. Wilcox, I. Aprahamian // *ChemPlusChem*. – 2014. – Vol. 79. – № 8. – P. 1214-1224.

109. Manipulating liquid-crystal properties using a pH activated hydrazone switch / X. Su, S. Voskian, R. P. Hughes, I. Aprahamian // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 41. – P. 10734-10739.
110. Isomerization Mechanism in Hydrazone-Based Rotary Switches: Lateral Shift, Rotation, or Tautomerization? / S. M. Landge, E. Tkatchouk, D. Benítez [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133. – № 25. – P. 9812-9823.
111. Chaur M. N. Configurational and constitutional information storage: Multiple dynamics in systems based on pyridyl and acyl hydrazones / M. N. Chaur, D. Collado, J. M. Lehn // *Chemistry - A European Journal*. – 2011. – Vol. 17. – № 1. – P. 248-258.
112. Qian H. Photochromic Hydrazone Switches with Extremely Long Thermal Half-Lives / H. Qian, S. Pramanik, I. Aprahamian // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 27. – P. 9140-9143.
113. DNA Functionality with Photoswitchable Hydrazone Cytidine** / S. Mao, Z. Chang, Y. Ying Zheng [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2021. – Vol. 27. – № 32. – P. 8372-8379.
114. Visualizing intracellular particles and precise control of drug release using an emissive hydrazone photochrome / X. Guo, B. Shao, S. Zhou [et al.] // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – № 11. – P. 3016-3021.
115. Solution and Solid-State Emission Toggling of a Photochromic Hydrazone / B. Shao, M. Baroncini, H. Qian [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140. – № 39. – P. 12323-12327.
116. Isomerization of bioactive acylhydrazones triggered by light or thiols / Z. Zhang, G. N. T. Le, Y. Ge [et al.] // *Nature Chemistry* 2023 15:9. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 1285-1295.
117. Theoretical investigation on photochromic diarylethene: A short review / S. Nakamura, S. Yokojima, K. Uchida [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2008. – Vol. 200. – № 1. – P. 10-18.
118. Cycloreversion Reaction of a Diarylethene Derivative at Higher Excited States Attained by Two-Color, Two-Photon Femtosecond Pulsed Excitation / H. Sotome, T. Nagasaka, K. Une [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – № 47. – P. 17159-17167.
119. Visible-light photoswitching of ligand binding mode suggests G-quadruplex DNA as a target for photopharmacology / M. P. O'Hagan, J. Ramos-Soriano, S. Halder [et al.] // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56. – № 38. – P. 5186-5189.
120. Development of High-Performance Pyrimidine Nucleoside and Oligonucleotide Diarylethene Photoswitches / T. Kolmar, S. M. Büllmann, C. Sarter [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2021. – Vol. 60. – № 15. – P. 8164-8173.
121. Molecular Design Strategy toward Diarylethenes That Photoswitch with Visible Light / T.

- Fukaminato, T. Hirose, T. Doi [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136. – P. 9.
122. Near-infrared light-activated switchable antibacterial agent based on dithienylethene photoswitch / Ziyong Li, J. Song, Q. Wang [et al.] // *Chinese Chemical Letters*. – 2026. – Vol. 37. – № 4. – P. 111139.
123. New Trends on Photoswitchable Antibiotics: From Syntheses to Applications / A. Aubert, A. Fayeulle, M. Vayssade [et al.] // *Photocatalysis: Research and Potential*. – 2023. – Vol. 1. – № 2. – P. 10007.
124. Phototunable Cell Killing by Photochromic Diarylethene of Thiazoyl and Thienyl Derivatives / Y. Nakagawa, T. Hishida, K. Sumaru [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 66. – № 8. – P. 5937-5949.
125. Smart One-for-All Agent with Adaptive Functions for Improving Photoacoustic /Fluorescence Imaging-Guided Photodynamic Immunotherapy / H. Gao, X. Qi, J. Zhang [et al.] // *Small Methods*. – 2023. – Vol. 7. – № 5. – P. 2201582.
126. In Vivo Tracking of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Improving Mitochondrial Function in Renal Ischemia-Reperfusion Injury / H. Cao, Y. Cheng, H. Gao [et al.] // *ACS Nano*. – 2020. – Vol. 14. – P. 4026.
127. Reversible Photo-regulation of a Hammerhead Ribozyme Using a Diffusible Effector / H. W. Lee, S. G. Robinson, S. Bandyopadhyay [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 371. – № 5. – P. 1163-1173.
128. Improving Fatigue Resistance of Dihydropyrene by Encapsulation within a Coordination Cage / M. Canton, A. B. Grommet, L. Pesce [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2020. – Vol. 142. – P. 14557-14565.
129. Reactivity of a pyridinium-substituted dimethyldihydropyrene switch under aerobic conditions: self-sensitized photo-oxygenation and thermal release of singlet oxygen / S. Cobo, F. Lafalet, E. Saint-Aman [et al.] // *Chemical Communications*. – 2015. – Vol. 51. – № 73. – P. 13886-13889.
130. Optical modulation of cell nucleus penetration and singlet oxygen release of a switchable platinum complex / Z. Ziani, S. Cobo, N. Berthet, G. Royal // *iScience*. – 2024. – Vol. 27. – № 1. – P. 108704.
131. Lachmann D. Fulgimides as Light-Activated Tools in Biological Investigations / D. Lachmann, R. Lahmy, B. König // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 2019. – № 31-32. – P. 5018-5024.
132. Light-controlled tools / C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2012. – Vol. 51. – № 34. – P. 8446-8476.
133. Photochromic Indolyl Fulgimides as Chromo-pharmacophores Targeting Sirtuins / N. A. Simeth, L. M. Altmann, N. Wössner [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 83. – № 15. –

P. 7919-7927.

134. Photochromic Dopamine Receptor Ligands Based on Dithienylethenes and Fulgides / D. Lachmann, C. Studte, B. Männel [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2017. – Vol. 23. – № 54. – P. 13423-1343.

135. Design and Synthesis of Donor–Acceptor Stenhouse Adducts: A Visible Light Photoswitch Derived from Furfural / S. Helmy, S. Oh, F. A. Leibfarth [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 2014. – Vol. 79. – № 23. – P. 11316-11329.

136. Photoswitching using visible light: A new class of organic photochromic molecules / S. Helmy, F. A. Leibfarth, S. Oh [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 23. – P. 8169-8172.

137. The (photo)chemistry of Stenhouse photoswitches: guiding principles and system design / W. Szymański, B. L. Feringa, M. M. Lerch [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – Vol. 47. – № 6. – P. 1910-1937.

138. López-Muñoz F. Neuropsychiatric Disease and Treatment The history of barbiturates a century after their clinical introduction / F. López-Muñoz, R. Ucha-Udabe, C. Alamo // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2005. – Vol. 1. – № 4. – P. 329-343.

139. Donor–Acceptor Stenhouse Adduct Displaying Reversible Photoswitching in Water and Neuronal Activity / R. Castagna, G. Maleeva, D. Pirovano [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2022. – Vol. 144. – № 34. – P. 15595-15602.

140. Gould S. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review / S. Gould, R. C. Scott // *Food and Chemical Toxicology*. – 2005. – Vol. 43. – № 10. – P. 1451-1459.

141. Visible Light—Responsive Drug Delivery Nanoparticle via Donor–Acceptor Stenhouse Adducts (DASA) / J. E. Yap, L. Zhang, J. T. Lovegrove [et al.] // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2020. – Vol. 41. – № 21. – P. 2000236.

142. Controlled drug release to cancer cells from modular one-photon visible light-responsive micellar system / S. O. Poelma, S. S. Oh, S. Helmy [et al.] // *Chemical Communications*. – 2016. – Vol. 52. – № 69. – P. 10525-10528.

143. Self-assembled micelle responsive to quick NIR light irradiation for fast drug release and highly efficient cancer therapy / Y. Zhang, X. Zhang, W. Chen [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 336. – P. 469-479.

144. Conjugated Polymer Nanoparticles with Appended Photo-Responsive Units for Controlled Drug Delivery, Release, and Imaging / T. Senthilkumar, L. Zhou, Q. Gu [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2018. – Vol. 57. – № 40. – P. 13114-13119.

145. Hirshberg Y. Photochromism and reversible multiple internal transitions in some spiropyrans at low temperatures. Part I / Y. Hirshberg, E. Fischer // *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. – 1954.

– № 0. – P. 297-303.

146. Chu N. Y. C. Photochromism of spiroindolinonaphthoxazine. I. Photophysical properties / N. Y. C. Chu // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1983. – Vol. 61. – № 2. – P. 300-305.
147. A Modern Look at Spiropyrans: From Single Molecules to Smart Materials / A. S. Kozlenko, I. V. Ozhogin, A. D. Pugachev [et al.] // *Topics in Current Chemistry*. – 2023. – Vol. 381. – № 1. – P. 8-.
148. Characterization of the Thermal and Photoinduced Reactions of Photochromic Spiropyran in Aqueous Solution / M. Hammarson, J. R. Nilsson, S. Li [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117. – № 43. – P. 13561-13571.
149. DNA-binding properties of amidine-substituted spiropyran photoswitches / M. Hammarson, J. R. Nilsson, S. Li [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2014. – Vol. 20. – № 48. – P. 15855-15862.
150. Molecular AND-logic for dually controlled activation of a DNA-binding spiropyran / M. Hammarson, J. Andersson, S. Li [et al.] // *Chemical Communications*. – 2010. – Vol. 46. – № 38. – P. 7130-7132.
151. Photoswitched DNA-Binding of a Photochromic Spiropyran / J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. André asson // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 36. – P. 11836-11837.
152. Substituent Correlations Characterized by Hammett Constants in the Spiropyran–Merocyanine Transition / O. Brügger, T. Reichenbach, M. Sommer, M. Walter // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2017. – Vol. 121. – № 13. – P. 2683-2687.
153. Spiropyran as a potential molecular diagnostic tool for double-stranded RNA detection / A. A. Ali, M. Kang, R. Kharbush, Y. Kim // *BMC Biomedical Engineering*. – 2019. – Vol. 1. – № 1. – P. 6-.
154. Photoswitchable DNA-binding properties of a photochromic spirooxazine derivative / H. Ihmels, J. Mattay, F. May, L. Thomas // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2013. – Vol. 11. – № 31. – P. 5184-5188.
155. Sharma R. Recent advances in STED and RESOLFT super-resolution imaging techniques / R. Sharma, M. Singh, R. Sharma // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 231. – № 12. – P. 117715.
156. A Photoswitchable Solvatochromic Dye for Probing Membrane Ordering by RESOLFT Super-resolution Microscopy** / A. T. Frawley, K. G. Leslie, V. Wycisk [et al.] // *ChemPhysChem*. – 2023. – Vol. 24. – № 12. – P. e202300125.
157. Super-resolution RESOLFT microscopy of lipid bilayers using a fluorophore-switch dyad / A. T. Frawley, V. Wycisk, Y. Xiong [et al.] // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – № 33. – P. 8955-8960.
158. Spironaphthoxazine switchable dyes for biological imaging / Y. Xiong, A. Vargas Jentzsch, J. W. M. Osterrieth [et al.] // *Chemical Science*. – 2018. – Vol. 9. – № 11. – P. 3029-3040.
159. Photochemical OFF/ON Cytotoxicity Switching by Using a Photochromic Surfactant with

Visible Light Irradiation / M. Shinohara, Y. Ashikaga, W. Xu [et al.] // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7. – № 7. – P. 6093-6098.

160. Photoswitchable spiropyran molecules for specific sensing of thiols and fluorescent inks / T. Xu, X. Zhang, Q. Wang [et al.] // New Journal of Chemistry. – 2023. – Vol. 47. – № 36. – P. 17103-17109.

161. Near-Infrared Hybrid Rhodol Dyes with Spiropyran Switches for Sensitive Ratiometric Sensing of pH Changes in Mitochondria and Drosophila melanogaster First-Instar Larvae / Y. Zhang, S. Xia, L. Mikesell [et al.] // ACS Applied Bio Materials. – 2019. – Vol. 2. – № 11. – P. 4986-4997.

162. A switchable peptide sensor for real-time lysosomal tracking / L. Chen, J. Wu, C. Schmuck, H. Tian // Chemical Communications. – 2014. – Vol. 50. – № 49. – P. 6443-6446.

163. Avagliano D. Spiropyran Meets Guanine Quadruplexes: Isomerization Mechanism and DNA Binding Modes of Quinolizidine-Substituted Spiropyran Probes / D. Avagliano, P. A. Sánchez-Murcia, L. González // Chemistry - A European Journal. – 2020. – Vol. 26. – № 57. – P. 13039-13045.

164. A spiropyran with low pKa for tracking DNA G-quadruplexes and revealing the dissipation of $\Delta\Psi_m$ with senescence using an in-situ switching strategy / Xinrong Tian, Jin Li, Yanhui Zhang [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2022. – Vol. 359. – № 12. – P. 131618.

165. Helicity as a Steric Force: Stabilization and Helicity-Dependent Reversion of Colored o-Quinonoid Intermediates of Helical Chromenes / J. N. Moorthy, S. Mandal, A. Mukhopadhyay, S. Samanta // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – Vol. 135. – № 18. – P. 6872-6884.

166. Mukhopadhyay A. Phenomenon to functions: Photochromism of diarylpyrans, spectrokinetic properties and functional materials / A. Mukhopadhyay, J. N. Moorthy // Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. – 2016. – Vol. 29. – № 43. – P. 73-106.

167. Influence of DNA-binding on the photochromic equilibrium of a chromene derivative / S. V. Paramonov, V. Lokshin, H. Ihmels, O. A. Fedorova // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2011. – Vol. 10. – № 8. – P. 1279-1282.

168. Anthracene based base-discriminating fluorescent oligonucleotide probes for SNPs typing: Synthesis and photophysical properties / Y. Saito, K. Motegi, S. S. Bag, I. Saito // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 16. – № 1. – P. 107-113.

169. Photoinduced Release of DNA-Binding Ligands from the [4+4] Dimers of Benzo[b]quinolizinium and Anthracene Derivatives / D. V. Berdnikova, J. Heider, H. Ihmels [et al.] // ChemPhotoChem. – 2020. – Vol. 4. – № 7. – P. 520-525.

170. Dohmen C. Switching between DNA binding modes with a photo- and redox-active DNA-targeting ligand / C. Dohmen, H. Ihmels // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2023. – Vol. 21. – № 9. – P. 1958-1966.

171. Light-controlled thrombin catalysis and clot formation using a photoswitchable G-quadruplex DNA aptamer / A. Ali, G. A. Bullen, B. Cross [et al.] // Chemical Communications. – 2019. – Vol. 55.

– № 39. – P. 5627-5630.

172. Photocontrolled Binding and Binding-Controlled Photochromism within Anthracene-Modified DNA / J. Manchester, D. M. Bassani, J. L. H. A. Duprey [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134. – № 26. – P. 10791-10794.

173. Arslan P. Reversible circularization of an anthracene-modified DNA conjugate through bimolecular triplex formation and its analytical application / P. Arslan, A. Jyo, T. Ihara // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2010. – Vol. 8. – № 21. – P. 4843-4848.

174. Anthracene–DNA conjugates as building blocks of designed DNA structures constructed by photochemical reactions / M. Mukae, T. Ihara, M. Tabara, A. Jyo // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2009. – Vol. 7. – № 7. – P. 1349-1354.

175. [2 + 2]-Cycloaddition-derived cyclobutane natural products: structural diversity, sources, bioactivities, and biomimetic syntheses / P. Yang, Q. Jia, S. Song, X. Huang // *Natural Product Reports*. – 2023. – Vol. 40. – № 6. – P. 1094-1129.

176. Schlosser J. Photocontrolled Binding of Styrylnaphthyridine Ligands to Abasic Site-Containing DNA by Reversible [2+2] Cycloaddition and Cycloreversion / J. Schlosser, H. Ihmels // *Chemistry - A European Journal*. – 2024. – Vol. 30. – № 31. – P. e202400423.

177. Dayanidhi P. D. Structural insights into the recognition of DNA defects by small molecules / P. D. Dayanidhi, V. G. Vaidyanathan // *Dalton Transactions*. – 2021. – Vol. 50. – № 17. – P. 5691-5712.

178. Fluorescence Quenching Dynamics of 2-Amino-7-methyl-1,8-naphthyridine in Abasic-Site-Containing DNA Duplexes for Nucleobase Recognition / C. Yang, F. Wang, Q. Zhou [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2023. – Vol. 14. – № 47. – P. 10585-10591.

179. Reversible photoswitching of the DNA-binding properties of styrylquinolinizinium derivatives through photochromic [2 + 2] cycloaddition and cycloreversion / S. Kölsch, H. Ihmels, J. Mattay [et al.] // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2020. – Vol. 16. – № 1. – P. 111-124.

180. Synthesis and Photochromic Properties of a Novel Chromene Derivative / P. S. Perevozchikova, T. M. Aliev, P. A. Nikitina, N. E. Shepel // *INEOS OPEN*. – 2021. – Vol. 4. – № 1. – P. 29-34.

181. DNA-based assemblies with bischromophoric styryl dye-chromene conjugates and cucurbit[7]uril / P. S. Perevozchikova, E. Y. Chernikova, N. E. Shepel [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2023. – Vol. 286. – P. 121971.

182. The Effect of Terminal Bromoalkoxy Substituents on the Photochromism of Functionalized 2H-Chromenes / E. Y. Chernikova, P. S. Perevozchikova, N. E. Shepel [et al.] // *ChemPhotoChem*. – 2023. – Vol. 7. – № 4. – P. e202200268.

183. Quinolino[1,2-a]quinolinium bromide and isoquinolino[2,1-a]quinolinium bromide derivatives as DNA ligands and photocytotoxic agents / P. S. Perevozchikova, E. Y. Chernikova, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2025. – Vol. 461. –

P. 116163.

184. A bifunctional styryl-quinolizinium conjugate with high affinity to DNA and photodynamic activity / P. S. Perevozchikova, Y. V. Fedorov, E. Y. Chernikova [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2027. – Vol. 482. – P. 117539.

185. Minchin S. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids / S. Minchin, J. Lodge // *Essays in Biochemistry*. – 2019. – Vol. 63. – № 4. – P. 433-456.

186. DNA-BINDING and DNA-protecting activities of small natural organic molecules and food extracts / N. Sjakste, N. Djelić, M. Dzintare, L. Živković // *Chemico-Biological Interactions*. – 2020. – Vol. 323. – P. 109030.

187. A Comprehensive Review on Fused Heterocyclic as DNA Intercalators: Promising Anticancer Agents / V. Sharma, M. Gupta, P. Kumar, A. Sharma // *Current Pharmaceutical Design*. – 2020. – Vol. 27. – № 1. – P. 15-42.

188. Fine structural tuning of styryl-based dyes for fluorescence and CD-based sensing of various ds-DNA/RNA sequences / V. Botti, A. Cesaretti, Ž. Ban [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2019. – Vol. 17. – № 35. – P. 8243-8258.

189. Methods to Evaluate Changes in Mitochondrial Structure and Function in Cancer / B. P. Rickard, M. Overchuk, V. A. Chappell [et al.] // *Cancers 2023*, Vol. 15, Page 2564. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 2564.

190. Photochromism of Arylchromenes: Remarkable Modification of Absorption Properties and Lifetimes of o-Quinonoid Intermediates / J. N. Moorthy, P. Venkatakrishnan, S. Samanta, D. K. Kumar // *Organic Letters*. – 2007. – Vol. 9. – № 5. – P. 919-922.

191. Synthesis and Characterization of Donor–Acceptor Chromophores for Unidirectional Electron Transfer / M. F. Pepitone, G. G. Jernigan, J. S. Melinger, O. K. Kim // *Organic Letters*. – 2007. – Vol. 9. – № 5. – P. 801-804.

192. Shiraishi Y. A Hemicyanine-Conjugated Copolymer as a Highly Sensitive Fluorescent Thermometer / Y. Shiraishi, R. Miyamoto, T. Hirai // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24. – № 8. – P. 4273-4279.

193. Recent advances in triazole synthesis via click chemistry and their pharmacological applications: A review / R. Khandelwal, M. Vasava, R. B. Abhirami, M. Karsharma // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2024. – Vol. 112. – P. 129927.

194. Mills W. H. CCCXXVIII. - The reactivity of methyl groups in heterocyclic bases / W. H. Mills, J. L. B. Smith // *Journal of the Chemical Society, Transactions*. – 1922. – Vol. 121. – P. 2724-2737.

195. Covalently linked donor-acceptor cyclometalated platinum(II) complexes. Structure and luminescent properties / C. W. Chan, T. F. Lai, C. M. Che, S. M. Peng // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – Vol. 115. – № 24. – P. 11245-11253.

196. Arenes participate in 1,3-dipolar cycloaddition with in situ-generated diazoalkenes / S. Aggarwal, A. Vu, D. B. Eremin [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2023. – Vol. 15. – № 6. – P. 764-772.
197. NMR investigation of the dyes formed under UV irradiation of some photochromic indeno-fused naphthopyrans / J. Berthet, P. J. Coelho, L. M. Carvalho [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2009. – Vol. 208. – № 2-3. – P. 180-185.
198. The photochemical ring opening reaction of chromene as seen by transient absorption and fluorescence spectroscopy / T. T. Herzog, G. Ryseck, E. Ploetz, T. Cordes // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2013. – Vol. 12. – № 7. – P. 1202-1209.
199. Görner H. Photoprocesses in 2,2-diphenyl-5,6-benzo(2H)chromene / H. Görner, A. K. Chibisov // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2002. – Vol. 149. – № 1-3. – P. 83-89.
200. Control of the Photo-Isomerization Mechanism in 3H-Naphthopyrans to Prevent Formation of Unwanted Long-Lived Photoproducts / S. Brazevic, S. Nizinski, M. Sliwa [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 21. – P. 7825.
201. Thermodynamic and spectrographic studies on the interactions of ct-DNA with 5-fluorouracil and tegafur / X. Xu, D. Wang, X. Sun [et al.] // *Thermochimica Acta*. – 2009. – Vol. 493. – № 1-2. – P. 30-36.
202. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating / M. A. Ustimova, Y. V. Fedorov, V. B. Tsvetkov [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
203. Chang Y. M. Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism / Y. M. Chang, C. K. M. Chen, M. H. Hou // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13. – № 3. – P. 3394-3413.
204. Šmidlehner T. Polarization spectroscopy methods in the determination of interactions of small molecules with nucleic acids – tutorial / T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 14. – № 1. – P. 84-105.
205. Banerjee D. Dynamics in the DNA Recognition by DAPI: Exploration of the Various Binding Modes / D. Banerjee, S. K. Pal // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – № 3. – P. 1016-1021.
206. Alberti A. On the Photodegradation of Some 2H-Chromene Derivatives in Fluid Solution or in Polyurethane Matrix / A. Alberti, M. Campredon, R. Demadrille // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 2011. – Vol. 84. – № 5. – P. 552-561.
207. Biological importance of structurally diversified chromenes / M. Costa, T. A. Dias, A. Brito, F. Proença // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 123. – P. 487-507.
208. Raj V. 2H/4H-Chromenes—A Versatile Biologically Attractive Scaffold / V. Raj, J. Lee // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. – Vol. 8. – P. 548317.

209. Macartney D. H. Encapsulation of Drug Molecules by Cucurbiturils: Effects on their Chemical Properties in Aqueous Solution / D. H. Macartney // *Israel Journal of Chemistry*. – 2011. – Vol. 51. – № 5-6. – P. 600-615.
210. Ткаченко С. В. Супрамолекулярные комплексы моно- и бисстириловых красителей с циклодекстринами и кукурбитурилами: специальности 02.00.03 Органическая химия, 02.00.04 Физическая химия: дисс. ... канд. хим. наук / С. В. Ткаченко. – ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, 2018. – 224 с.
211. Cucurbit[7]uril complexes of crown-ether derived styryl and (Bis)styryl dyes / O. A. Fedorova, E. Y. Chernikova, Y. V. Fedorov [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113. – № 30. – P. 10149-10158.
212. Design and Applications of Bifunctional Small Molecules in Biology / S. R. Boyd, L. Chang, W. Rezende [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2021. – Vol. 1869. – № 1. – P. 140534.
213. Fischer E. The calculation of photostationary states in systems A-B when only A is known / E. Fischer // *Journal of Physical Chemistry*. – 1967. – Vol. 71. – № 11. – P. 3704-3706.
214. Günther H. NMR spectroscopy : basic principles, concepts, and applications in chemistry / H. Günther. – 3rd. – Wiley-VCH, 2013. – 734 p.
215. 2-Styrylquinoline-based two-photon AIEgens for dual monitoring of pH and viscosity in living cells / Y. Dou, J. Liu, F. Zhang [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2019. – Vol. 7. – № 48. – P. 7771-7775.
216. Distance dependence of electron transfer in acridine-intercalated DNA / K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1999. – Vol. 50. – № 1. – P. 18-27.
217. Regiospecific Photocyclization of Mono- and Bis-Styryl-Substituted N-Heterocycles: A Synthesis of DNA-Binding Benzo[c]quinolizinium Derivatives / T. M. Aliyeu, D. V. Berdnikova, O. A. Fedorova [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 2016. – Vol. 81. – № 19. – P. 9075-9085.
218. Sirajuddin M. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry / M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – Vol. 124. – P. 1-19.
219. Photoinduced in situ generation of DNA-targeting ligands: DNA-binding and DNA-photodamaging properties of benzo[c]quinolizinium ions / J. Schlosser, O. Fedorova, Y. Fedorov, H. Ihmels // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2024. – Vol. 20. – № 1. – P. 101-117.
220. Nordén B. Structure of methylene blue–DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy / B. Nordén, F. Tjerneld // *Biopolymers*. – 1982. – Vol. 21. – № 9. – P. 1713-1734.
221. Uma Maheswari P. DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II)

- complexes of modified 1,10-phenanthrolines – effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity / P. Uma Maheswari, M. Palaniandavar // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2004. – Vol. 98. – № 2. – P. 219-230.
222. Baase W. A. Circular dichroism and DNA secondary structure / W. A. Baase, W. C. Johnson // *Nucleic Acids Research*. – 1979. – Vol. 6. – № 2. – P. 797-814.
223. Assignment of the non-exchangeable proton resonances of d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G) using two-dimensional nuclear magnetic resonance methods / D. R. Hare, D. E. Wemmer, S. H. Chou [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – Vol. 171. – № 3. – P. 319-336.
224. Valentina Tereshko G. M. and M. E. A “Hydrat-Ion” Spine in a B-DNA Minor Groove / G. M. and M. E. Valentina Tereshko // *Journal of the American Chemical Society*. – 1999. – Vol. 121. – № 15. – P. 3590-3595.
225. The Butterfly Structure of Leucomethylene Blue Results in Weak Binding to Single- or Double-Stranded DNA / R. H. Batchelor, Y. A. Kaiyum, E. H. P. Chao [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2025. – Vol. 129. – № 47. – P. 12110-12119.
226. Evidence for DAPI intercalation in CG sites of DNA oligomer [d(CGACGTCG)]₂: a ¹H NMR study / E. Trotta, E. D’ambrosio, G. Ravagnan, M. Paci // *Nucleic Acids Research*. – 1995. – Vol. 23. – № 8. – P. 1333-1340.
227. Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex / H. K. Liu, S. J. Berners-Price, F. Wang [et al.] // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2006. – Vol. 45. – № 48. – P. 8153-8156.
228. A series of water-soluble pyridinium derivatives with two-photon absorption in the near infrared region for mitochondria targeting under stimulated emission depletion (STED) nanoscopy / X. Tian, S. Hussain, H. Wang [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2017. – Vol. 147. – P. 90-98.
229. Cucurbit[7]uril-Styryl Dye Complexes for Fluorescent Recognition of DNA and Cell Imaging / E. Y. Chernikova, M. A. Ustimova, Y. V. Fedorov [et al.] // *ChemBioChem*. – 2025. – Vol. 26. – № 9. – P. e202400892.
230. Microscopic Rearrangement of Bound Minor Groove Binders Detected by NMR / M. Rettig, M. W. Germann, M. A. Ismail [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Vol. 116. – № 19. – P. 5620-5627.
231. NMR-Based Rational Drug Design of G:G Mismatch DNA Binding Ligand Trapping Transient Complex via Disruption of a Key Allosteric Interaction / S. Sakurabayashi, K. Furuita, T. Yamada [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2025. – Vol. 147. – № 17. – P. 14254-14269.
232. DNA minor-groove binder Hoechst 33258 destabilizes base-pairing adjacent to its binding site / X. X. Zhang, S. L. Brantley, S. A. Corcelli, A. Tokmakoff // *Communications Biology*. – 2020. – Vol. 3. – № 1. – P. 525-.

233. Mechanism of hydride abstraction in the electrocyclic phototransformation of heterostilbene / A. E. Saifutiarova, Y. V. Fedorov, E. E. Gulakova, O. A. Fedorova // *Mendeleev Communications*. – 2022. – Vol. 32. – № 3. – P. 374-376.
234. Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives / J. Černý, M. Karásková, J. Rakušan, S. Nešpůrek // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2010. – Vol. 210. – № 1. – P. 82-88.
235. ROS conversion promotes the bactericidal efficiency of Eosin Y based photodynamic therapy / B. Fan, W. Peng, Y. Zhang [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2023. – Vol. 11. – № 14. – P. 4930-4937.
236. Hsieh T. chen. Control of DNA structure and function by phytochemicals/DNA interaction: Resveratrol/piceatannol induces Cu²⁺-independent, cleavage of supercoiled plasmid DNA / T. chen Hsieh, H. H. Chao, J. M. Wu // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 147. – P. 212-219.
237. Nompumelelo Simelane N. W. Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of colorectal cancer in vitro and in vivo / N. W. Nompumelelo Simelane, C. A. Kruger, H. Abrahamse // *RSC Advances*. – 2020. – Vol. 10. – № 68. – P. 41560-41576.
238. Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Research / K. Guidolin, L. Ding, H. Yan [et al.] // *Surgical Innovation*. – 2022. – Vol. 29. – № 6. – P. 788-803.
239. Rodrigues J. A. Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: An Update and a Look to the Future / J. A. Rodrigues, J. H. Correia // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 15. – P. 12204.
240. Low-Dose Near-Infrared Light-Activated Mitochondria-Targeting Photosensitizers for PDT Cancer Therapy / W. Wu Klingler, N. Giger, L. Schneider [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 17. – P. 9525.
241. Morpholinoethoxy-Substituted Cationic Metal-Free and Metallo Phthalocyanines: In Vitro Photodynamic Therapy Activities, PDT-Induced ROS Level Measurements, and Cellular Death Mechanism / M. Serhatli, S. Isik, A. Kalkan [et al.] // *ACS Bio & Med Chem Au*. – 2025. – Vol. 5. – № 4. – P. 766-777.
242. Synthesis of 1-Substituted 3-(Chloromethyl)-6-aminoindoline (6-Amino-seco-CI) DNA Minor Groove Alkylating Agents and Structure–Activity Relationships for Their Cytotoxicity / J. B. J. Milbank, M. Tercei, G. J. Atwell [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 42. – № 4. – P. 649-658.
243. New approach for the construction of the coumarin frame and application in the total synthesis of natural products / A. Jerezano, F. Jiménez, M. Del Carmen Cruz [et al.] // *Helvetica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 94. – № 2. – P. 185-198.
244. EP1132449A2. Photochromic compounds in the solid state, process for their preparation and their use in polymeric materials issued 2001 / MALATESTA V., HOBLEY J., GIROLDINI W.,

WIS M. L.

245. Thiophene-based dyes for probing membranes / I. López-Duarte, P. Chairatana, Y. Wu [et al.] // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2015. – Vol. 13. – № 12. – P. 3792-3802.
246. A cationic naphthyl derivative defies the non-equilibrated excited rotamers principle / A. Cesaretti, B. Carlotti, F. Elisei [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 19. – № 7. – P. 5262-5272.
247. Synthesis and evaluation of 1-(4-[18F]fluoroethyl)-7-(4'-methyl)curcumin with improved brain permeability for β -amyloid plaque imaging / I. Lee, J. Yang, J. H. Lee, Y. S. Choe // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2011. – Vol. 21. – № 19. – P. 5765-5769.
248. Direct use of hydroxyl ions as an oxygen source for oxidation of isoquinolinium salts to isoquinolinones in water solution / D. Xu, L. Wang, F. Yao [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2023. – Vol. 47. – № 8. – P. 3921-3927.
249. Шепель Н. Э. Комплексообразующие, спектральные и фотохимические свойства фотохромных бискраун-эфиров: специальность 02.00.04 Физическая химия: дисс. ... канд. хим. наук / Н. Э. Шепель. – ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, 2008. – 171 с.
250. Renschler C. L. Determination of quantum yields of fluorescence by optimizing the fluorescence intensity / C. L. Renschler, L. A. Harrah // *Analytical Chemistry*. – 1983. – Vol. 55. – № 4. – P. 798-800.
251. Reynolds G. A. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers / G. A. Reynolds, K. H. Drexhage // *Optics Communications*. – 1975. – Vol. 13. – № 3. – P. 222-225.
252. Eaton D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement / D. F. Eaton // *Pure and Applied Chemistry*. – 1988. – Vol. 60. – № 7. – P. 1107-1114.
253. Ren J. Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands† / J. Ren, J. B. Chaires // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 49. – P. 16067-16075.
254. Piotto M. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions / M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenář // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1992. – Vol. 2. – № 6. – P. 661-665.
255. Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity / V. Sklenář, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek // *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. – 1993. – Vol. 102. – № 2. – P. 241-245.
256. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. / H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78. – № 4. – P. 2179-2183.
257. Mosinger J. Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement / J. Mosinger, B. Mosinger // *Experientia*. – 1995. – Vol. 51. – № 2. – P. 106-109.

258. Wilkinson F. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution / F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross // *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. – 1993. – Vol. 22. – № 1. – P. 113-262.
259. Quantification of dye-mediated photodamage during single-molecule DNA imaging / M. A. Tycon, C. F. Dial, K. Faison [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – Vol. 426. – № 1. – P. 13-21.
260. Efficient copper-based DNA cleavers from carboxylate benzimidazole ligands / V. A. Barrera-Guzmán, E. O. Rodríguez-Hernández, N. Ortiz-Pastrana [et al.] // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2018. – Vol. 23. – № 7. – P. 1165-1183.

8. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Perevozchikova P.S., Fedorov Y.V., Chernikova E.Y., Godovikov I.A., Chmelyuk N.S., Shilyaeva M.I., Abakumov M.A., Pakhomov A.A., Fedorova O.A. A bifunctional styryl-quinolizinium conjugate with high affinity to DNA and photodynamic activity // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – **2027**. – V. 482. – P. 117539.
2. Perevozchikova P.S., Fedorov Y.V., Chernikova E.Y., Fedorova O.A. Quinolino[1,2-a]quinolinium bromide and isoquinolino[2,1-a]quinolinium bromide derivatives as DNA ligands and photocytotoxic agents // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – **2025**. – V. 461. – P. 116163.
3. Chernikova E.Y., Perevozchikova P.S., Shepel N.E., Fedorova O.A., Fedorov Y.V. The effect of terminal bromoalkoxy substituents on the photochromism of functionalized 2H-chromenes // *ChemPhotoChem* – **2023**. – V. 7, №4. – P. e202200268.
4. Perevozchikova P.S., Chernikova E.Y., Shepel N.E., Fedorova O.A., Fedorov Y.V. DNA-based assemblies with bischromophoric styryl dye-chromene conjugates and cucurbit[7]uril // *Spectrochim. Acta, Part A* – **2023**. – V. 286. – P. 121971.
5. Perevozchikova P.S., Aliev T.M., Nikitina P.A., Shepel N.E. Synthesis and photochromic properties of a novel chromene derivative // *INEOS OPEN* – **2021**. – V. 4, № 1. – P. 29-34.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Перевозчикова П.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Разработка конъюгатов на основе поликонденсированных гетероциклов и стирилового красителя для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики // Актуальные вопросы фотоуправляемых и фармакологически активных соединений. – Москва, Россия, 22-24 октября 2025. – С. 138.
2. Перевозчикова П.С., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Исследование взаимодействия конъюгатов на основе производных хинолизиния и стирилового красителя с ДНК // IX Международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». – Туапсе, Россия, 22-26 сентября 2025. – С. 76.
3. Перевозчикова П.С., Черникова Е.Ю., Федорова О.А., Федоров Ю.В. Трехкомпонентные супрамолекулярные системы на основе бисхромофорных конъюгатов, ДНК и кукурбит[7]урила // Всероссийская конференция по люминесценции LUMOS-2024. – Москва, Россия, 23-26 апреля 2024. – С. 230.
4. Perevozchikova P.S., Chernikova E.Y., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. DNA-based assemblies with bischromophoric styryl dye-chromene conjugates and cucurbit[7]uril // «New Emerging Trends in Chemistry» Conference (NewTrendsChem-2023). – Yerevan, Armenia, 24-28 September 2023. – P. 266.

5. Перевозчикова П.С., Черникова Е.Ю., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Супрамолекулярные ансамбли бисхромофорных конъюгатов с ДНК и кукурбит[7]урилом // Всероссийская конференция с международным участием «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии». – Санкт-Петербург, Россия, 3-6 июля 2023. – С. 204.
6. Перевозчикова П.С., Черникова Е.Ю., Шепель Н.Э., Федорова О.А., Федоров Ю.В. Синтез бифункциональных конъюгатов и исследование их супрамолекулярных комплексов с ДНК и кукурбит[7]урилом // Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней» (WSOC-2022). – Сочи, Россия, 16-21 сентября 2022. – С. 77.
7. Перевозчикова П.С., Черникова Е.Ю., Шепель Н.Э., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Синтез новых производных хромена и изучение влияния длины оксиалкильного заместителя на их фотохромные характеристики // XXV Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием). – Нижний Новгород, Россия, 19-21 апреля 2022. – С. 125.
8. Перевозчикова П.С., Черникова Е.Ю., Шепель Н.Э., Федоров Ю.В., Федорова О.А. Исследование фотохромных характеристик новых производных хромена // Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения: Органическая химия от Марковникова до наших дней» (WSOC-2021). Сочи, Россия, 8-11 октября 2021. – С. 70.
9. Perevozchikova P.S., Chernikova E.Y., Shepel N.E., Fedorov Y.V., Fedorova O.A. Development of photoswitchable ligands for DNA based on chromene derivatives // XII International Conference on Chemistry for Young Scientists “MENDELEEV 2021”. – Saint Petersburg, Russia, 6-10 September 2021. – P. 604.
10. Перевозчикова П.С., Никитина П.А., Шепель Н.Э., Федорова О.А. Синтез новых производных хромена и изучение их фотохимических свойств. // Открытый конкурс-конференция научно-исследовательских работ по химии элементоорганических соединений и полимеров «ИНЭОС OPEN CUP». – Москва, Россия, 17-20 мая 2021. – С. 242.