

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

На правах рукописи



ЗАХАРКО МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

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

02.00.03 – органическая химия

02.00.04 – физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н. проф. О. А. Федорова

к.х.н. доцент П. А. Панченко

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
2.1. Спектральные свойства производных имида нафталевой кислоты	12
2.2. Оптические сенсоры на основе производных нафталимида	22
2.2.1. Катионные сенсоры. Основные механизмы генерации оптического сигнала	22
2.2.2. Оптические сенсоры на анионы	38
2.2.3. Оптические сенсоры на малые молекулы и биологически активные соединения	42
2.3. Системы с направленной доставкой и препараты для флуоресцентной визуализации	46
2.3.1. Системы с направленной доставкой	46
2.3.2. Препараты для флуоресцентной визуализации	52
2.4. Связывание производных 1,8-нафталимида с ДНК	60
2.2.1. Влияние заместителей при имидном атоме азота	63
2.2.2. Влияние заместителей в нафталимидном ядре	68
2.2.3. Взаимодействие бис(нафталимидов) с ДНК	74
2.2.4. Влияние расширения хромофорной системы	75
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	77
3.1. Синтез флуоресцентных красителей на основе 1,8-нафталимида	77
3.1.1. Синтез 4-стирилзамещенных -нафталимидов	78
3.1.2. Синтез 4-пиразолинилзамещенных нафталимидов	84
3.2. Изучение спектрально-люминесцентных свойств N-бутил-4-стирил нафталимидов	91
3.3. Синтез и изучение оптических свойств (бис)хромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и бактериохлорина	103
3.4. Изучение влияния спейсерного фрагмента на эффективность переноса энергии в конъюгатах	115
3.5. Изучение эффективности генерации конъюгатами синглетного кислорода в растворе	118
3.6. Исследование фотодинамической эффективности и флуоресценции	

тераностика на клетках аденокарциномы человека	121
3.7. Изучение фотодинамической активности конъюгатов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	128
3.7.1. Исследования фотодинамической активности <i>in vitro</i>	128
3.7.2. Исследования фотодинамической активности <i>in vivo</i>	129
3.8. Гибридные наночастицы для фотодинамической терапии	132
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	141
4.1. Синтез соединений	145
4.2. Расчет квантовых выходов флуоресценции	174
4.3. Расчет квантовых выходов синглетного кислорода	175
5. ВЫВОДЫ	176
6. ПРИЛОЖЕНИЕ	178
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	209

Список основных сокращений и обозначений

АФК – Активные формы кислорода

ВЗМО – Высшая занятая молекулярная орбиталь

ДМФА – *N,N*-Диметилформаид

ИК – Инфракрасный

ИЭР – Ионизация при электрораспылении

КССВ – Константа спин-спинового взаимодействия

НСМО – Низшая свободная молекулярная орбиталь

РСА – Рентгеноструктурный анализ

ТГФ – Тетрагидрофуран

ТСХ – Тонкослойная хроматография

УФ – Ультрафиолетовый

ФДТ – Фотодинамическая терапия

ФС – Фотосенсибилизатор

ЭА – Электроноакцепторный

ЭД – Электронодонорный

ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

AIEE – *англ.*, Aggregation-induced Emission Enhancement, усиление эмиссии, вызванное агрегацией

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

D – Оптическая плотность

EET – *англ.*, Efficiency of Energy Transfer, эффективность переноса энергии

FRET – *англ.*, Förster Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии по механизму Ферстера

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

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

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

PET – *англ.*, Photoinduced Electron Transfer, фотоиндуцированный перенос электрона

TICT– *англ.*, Twisted Intramolecular Charge Transfer, «скрученное» состояние с переносом заряда

I – Интенсивность флуоресценции

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

k – Константа скорости

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

n – Показатель преломления

T – Температура в шкале Цельсия

τ – Время жизни флуоресценции; время; время задержки

δ – Химический сдвиг

ε – Диэлектрическая проницаемость; Коэффициент экстинкции

λ – Длина волны

ρ – Плотность

φ – Квантовый выход флуоресценции; квантовый выход изомеризации

$\Delta\nu$ – Стоксов сдвиг

1. ВВЕДЕНИЕ

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

На сегодняшний день ФДТ является одним из наиболее щадящих и эффективных методов лечения онкологических заболеваний [1]. Метод фотодинамической терапии основан на введении пациенту раствора вещества-фотосенсибилизатора (ФС), способного избирательно накапливаться в опухолевых клетках, а при облучении светом определенной длины волны генерировать активные формы кислорода, воздействие которых приводит к деструкции опухоли [1,2]. Часть энергии поглощенного света фотосенсибилизатор испускает в виде флуоресценции, что позволяет определять локализацию опухоли в организме, однако собственные флуоресцентные характеристики фотосенсибилизаторов часто не отвечают требованиям эффективной диагностики.

Большинство ФС характеризуются невысокими значениями Стоксова сдвига, что затрудняет выделение флуоресцентного сигнала на фоне рассеянного света возбуждения при флуоресцентной навигации [3, 4]. Кроме того, генерация активных форм кислорода и флуоресценция являются конкурентными процессами для молекулы ФС в возбужденном состоянии. В связи с вышесказанным разработка препаратов, совмещающих в себе свойства терапевтического (фотосенсибилизатор) и диагностического (флуорофор) агентов является актуальной задачей. Подход к созданию таких бифункциональных агентов носит название «Тераностика» (греч. *thera(peia)* — забота, уход, лечение и *(diag)nostikos* — способный распознавать). На рисунке 1 показан принцип работы препарата-тераностика, который представляет собой (бис)хромофорную систему, функциональные фрагменты которой связаны посредством спейсера. Сочетание в одной молекуле двух фотоактивных компонентов позволяет проводить избирательно лечение или диагностику опухоли, варьируя длину волны возбуждения.

Большой вклад в развитие данного направления внесен группой Р. Пандея, занимающейся разработкой тераностиков на основе цианиновых красителей. Благодаря наличию длинной цепи сопряженных метиновых групп, цианиновые красители обладают поглощением в ближней ИК-области [5-8]. К недостаткам подобных систем можно отнести невысокую фотостабильность, а также низкие значения Стоксова сдвига (около 25 нм). В научной литературе описано несколько примеров конъюгатов фталоцианиновых фотосенсибилизаторов с флуоресцентными родаминовыми красителями [9,10] и BODIPY [11,12], которые отличаются более высокой фотостабильностью по сравнению с цианиновыми хромофорами, однако также демонстрируют небольшую разницу длин волн поглощения и флуоресценции. Основной проблемой, с которой сталкиваются ученые при разработке (бис)хромофорных систем, является возможность реализации между хромофорами процесса переноса энергии, ухудшающего или флуоресцентные характеристики флуорофора или фотосенсибилизатора. Поэтому на сегодняшний день поиск способов минимизации переноса энергии является актуальной научной задачей.

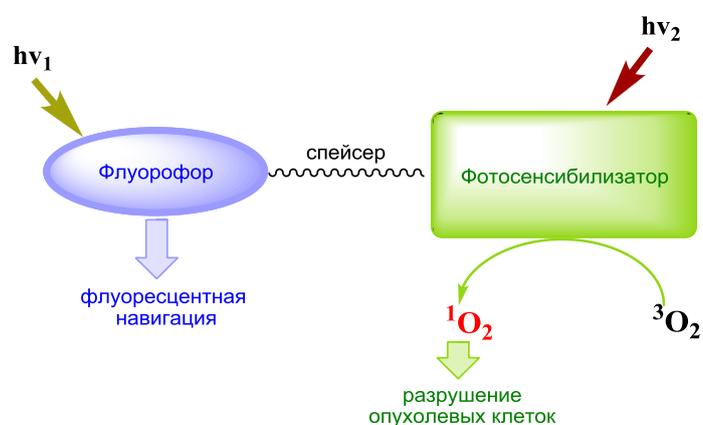


Рисунок 1 - Принцип работы конъюгата

В рамках данной работы в качестве потенциальных тераностиков для ФДТ рассматриваются конъюгаты фотосенсибилизатора бактериохлорина и флуоресцентных красителей на основе производных 1,8-нафталимида. Хромофорная система 1,8-нафталимида является популярной оптической платформой для создания на ее основе оптических отбеливателей и красителей для полимерных волокон [13-15], электролюминесцентных материалов [15,16], флуоресцентных маркеров [17-19] и сенсоров для биологических исследований [20,

21]. Высокая фотостабильность флуорофоров на основе нафталимида, большие значения Стоксова сдвига (более 150 нм в растворителях высокой полярности), а также относительная простота химической модификации делают люминофоры на основе 1,8-нафталимида перспективными кандидатами и для применения в качестве флуоресцентных компонентов препаратов-тераностиков для ФДТ. В качестве компонента, отвечающего за терапевтические свойства конъюгата, был выбран фотосенсибилизатор второго поколения, относящийся в группе бактериохлоринов, для которых характерно наличие полосы поглощения в ближней ИК-области, относительно низкая кожная и темновая токсичность, а также быстрое выведение из организма [22].

Цель работы. Целью данной работы является создание препарата-тераностика для применения в фотодинамической терапии рака. Идея работы заключается в объединении в одной молекуле двух функциональных фрагментов: фотосенсибилизатора бактериохлорина и нафталиimidного флуорофора, избирательное возбуждение каждого из которых позволит получать терапевтический эффект или проводить диагностику опухоли. Разработка подобных систем является комплексной задачей, которая включает в себя: синтез флуорофоров, модифицированных функциональными группами, для дальнейшей сшивки с фотосенсибилизатором; подробное изучение оптических свойств каждого из компонентов (бис)хромофорной системы в растворе; анализ фотофизических процессов, происходящих в конъюгате при фотовозбуждении и влияния на них структуры спейсера, а также рассмотрение влияния флуорофора на фотодинамические характеристики исходного ФС.

Научная новизна.

В настоящей работе предложены методы синтеза неописанных ранее производных 4-стирил- и 4-пиразолинил-1,8-нафталимида, содержащих различные алифатические заместители при имидном атоме азота нафталимида.

Изучено влияние природы растворителя на спектральные характеристики 4-стирилнафталимидов и их склонность к образованию скрученных возбужденных состояний, для которых характерна безызлучательная релаксация.

В литературе описано ограниченное число примеров (бис)хромофорных систем для фотодинамической терапии. В рамках данной работы впервые получены и исследованы конъюгаты нафталимидных флуорофоров и фотосенсибилизатора бактериохлорина, а также показано, что конъюгация нафталимидных красителей с фотосенсибилизатором не снижает фотодинамической эффективности последнего.

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

Практическая ценность.

Предложены подходы к синтезу неописанных ранее производных 4-стрил- и 4-пиразолинил-1,8-нафталимида, содержащих при имидном атоме азота следующие спейсерные группы: азидоэтил, (азидоэтил)нонаэтиленгликоль и мотив капроновой кислоты. Полученные флуорофоры являются удобными компонентами для синтеза на их основе конъюгатов с фотосенсибилизаторами, содержащими пропаргильные или амино-группы.

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

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

Предложен синтез 4-пиразолинил замещенного производного нафталимида, модификация которым (совместно с фотосенсибилизатором) ап-конверсионных наночастиц позволяет проводить флуоресцентную диагностику без сопутствующего токсического действия на клетки, что важно для практического применения подобных систем.

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

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

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

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

учёный» (Москва, 2014); X, XII, XIII, XIV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, Россия, 2014, 2016, 2017, 2018).

Структура работы. Диссертационная работа общим объемом 233 страницы состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов и содержит 63 схемы, 21 таблицу и 108 рисунков. Список литературы включает 204 наименования.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Настоящий литературный обзор посвящен рассмотрению примеров использования производных 1,8-нафталимида для разработки препаратов биомедицинского назначения. На сегодняшний день опубликовано несколько обзоров, посвященных исследованию фотохимических превращений производных 1,8-нафталимида [23], достижениям в создании катионных [24] и анионных [25] сенсоров на их основе, рассмотрению процессов агрегации [26], связывания производных нафталимида с ДНК [27, 17] и разработке реагентов для флуоресцентной визуализации [20].

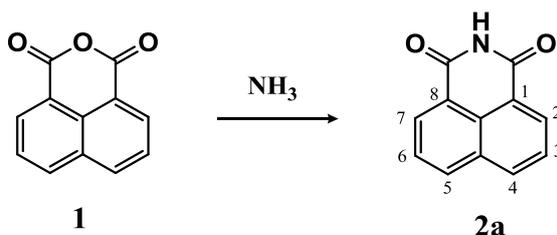
Структура данного литературного обзора включает в себя четыре раздела, в первом из которых будет приведено краткое рассмотрение спектральных свойств производных 1,8-нафталимида. Во втором разделе описаны принципы дизайна оптических сенсоров, основные механизмы генерации оптического отклика на ионы и малые молекулы, приведены примеры сенсорных устройств, показавших эффективную работу *in vitro* и *in vivo*. Третий раздел посвящен изучению последних достижений в области функционализации оптических устройств на основе производных нафталимида направляющими группами (обеспечивающими накопление в тех или иных органеллах клетки), а также применения нафталиimidных флуорофоров в качестве флуоресцентных меток в системах направленной доставки лекарственных препаратов. Заключительный раздел обзора включает в себя рассмотрение способности некоторых производных нафталимида связываться с ДНК – свойства, лежащего в основе разработки многих химиотерапевтических препаратов.

2.1. Спектральные свойства производных имида нафталево́й кислоты

Молекулярная система 1,8-нафталимида **2a** относится к числу наиболее эффективных флуорофоров, что делает его производные широко востребованными в различных областях науки и техники. Нафталиimid - имид 1,8-нафталево́й кислоты, был впервые получен в конце XIX в. голландскими химиками А. Бером и В. А. ван Дорпом нагреванием нафталево́го ангидрида **1** с концентрированным раствором аммиака (схема 2) [28]. И сегодня классическим методом синтеза

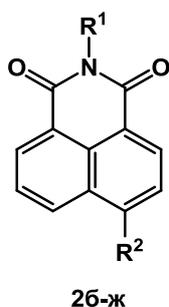
производных нафталимида является реакция нафталевого ангидрида с аминами, с её помощью был получен широкий круг *N*-замещенных производных. В промышленности нафталевый ангидрид получают окислением аценафтена – одного из продуктов фракционирования каменноугольной смолы [29], таким образом, получение прекурсоров для синтеза производных 1,8-нафталимида хорошо отработано и имеет надежную сырьевую базу.

Схема 2



Нафталимиды, не содержащие заместителей в нафталиновом ядре, демонстрируют две полосы поглощения в электронных спектрах [30]. Так 1,8-нафталимид **2a** (схема 2) и *N*-метил-1,8-нафталимид **2б** (схема 3) характеризуются коротковолновой полосой поглощения в области 230 нм, которая является полосой переноса заряда с нафталинового фрагмента на С=О-группы (рисунок 1), а так же более длинноволновой полосой, располагающейся в области 330-345 нм и связанной с переходом $\pi \rightarrow \pi^*$ типа [31]. Модификация нафталимидного ядра путем введения заместителей в 3 или 4 положение не только открывает возможности введения различных функциональных фрагментов (пришивка рецепторных или фармакофорных групп), но и оказывает значительное влияние на электронные свойства молекулы, позволяя получать производные с широким спектром фотофизических и спектральных свойств.

Схема 3



- 2б** ($R^1 = H, R^2 = H$)
- 2в** ($R^1 = H, R^2 = Cl$)
- 2г** ($R^1 = H, R^2 = NO_2$)
- 2д** ($R^1 = H, R^2 = NMe_2$)
- 2е** ($R^1 = H, R^2 = SMe$)
- 2ж** ($R^1 = Et, R^2 = NH_2$)

Введение в 4-ое положение нафталимида атома хлора, обладающего слабым $+M$ -эффектом, при переходе от **2б** к **2в** приводит к небольшому батохромному смещению максимума поглощения [32]. В случае 4-нитрозамещенного **2г** длинноволновый сдвиг максимумов поглощения и люминесценции также связан с процессом переносом заряда, но уже с карбонильных групп нафталимида на нитрогруппу, обладающую сильным $-M$ эффектом, при этом наблюдается значительное уменьшение квантового выхода люминесценции, связанное с увеличением вероятности интеркомбинационной конверсии синглетного возбужденного состояния в триплетное [33].

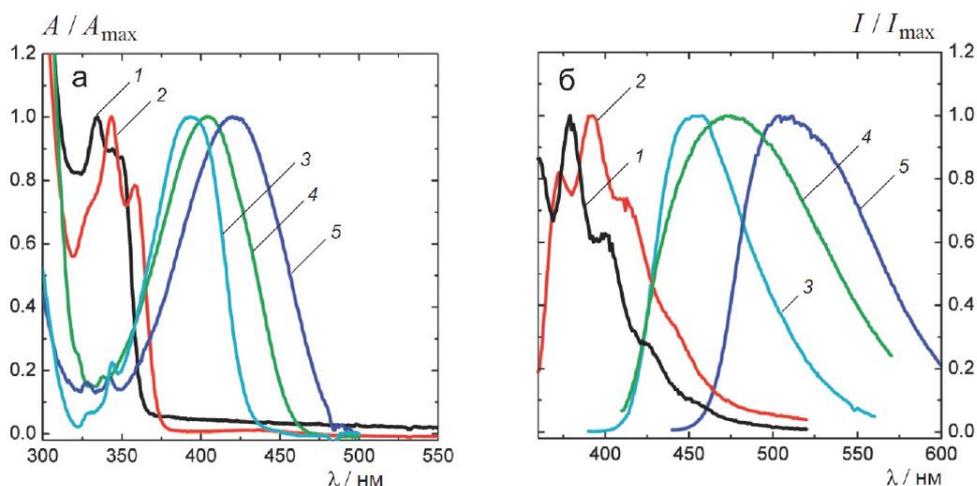


Рисунок 1 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) соединений **2б** (1), **2в** (2), **2г** (3), **2д** (4) и **2е** (5) в дихлорметане. Концентрация растворов ~ 0.3 ммоль / л [32]

Введение в 4-е положение нафталинового ядра заместителей, обладающих $+M$ -эффектом приводит к появлению в спектрах поглощения длинноволновых полос, связанных с переносом заряда с донорного заместителя на дикарбоксиимидную группировку нафталимида, и обычно сопровождается увеличением квантового выхода флуоресценции. Соединение **2е**, содержащее диметиламиногруппу в 4-ом положении нафталимидного ядра демонстрирует батохромное смещение длинноволновой полосы поглощения на 80-90 нм по сравнению с незамещенным нафталимидом **2а** и обладает интенсивной люминесценцией. Это свойство делает аминопроизводные нафталимида крайне привлекательными для разработки на их основе флуоресцентных сенсоров, примеры которых будут рассмотрены в разделе 2.2.

Соединение **2ж** обладает широкими полосами поглощения и флуоресценции, расположенными в области 430 нм и 530 нм (метанол), соответственно (рисунок 2) [34, 25]. Природа растворителя оказывает значительное влияние не только на положение максимумов поглощения и эмиссии производных нафталимида, но и на квантовые выходы флуоресценции. Так 4-аминопроизводное **2ж** интенсивно флуоресцирует в малополярных дихлорметане и хлороформе, однако в воде люминесценция **2ж** не столь интенсивна (рисунок 2). Так, например, для 4-аминопроизводного **2и** квантовые выходы флуоресценции при переходе от малополярных ТГФ и диоксана к метанолу снижается от 0.86, 0.76 до 0.48, соответственно [35].

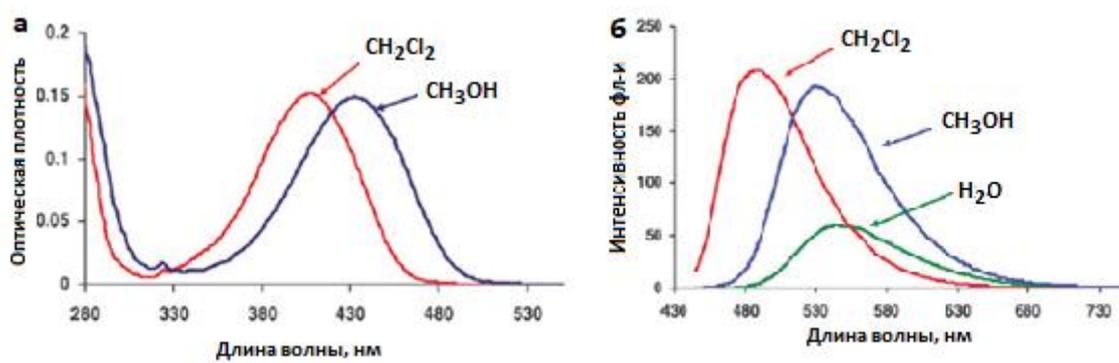


Рисунок 2 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) соединения **2ж** в дихлорметане (красная линия), метаноле (синяя линия) и воде (зеленая линия) [25]

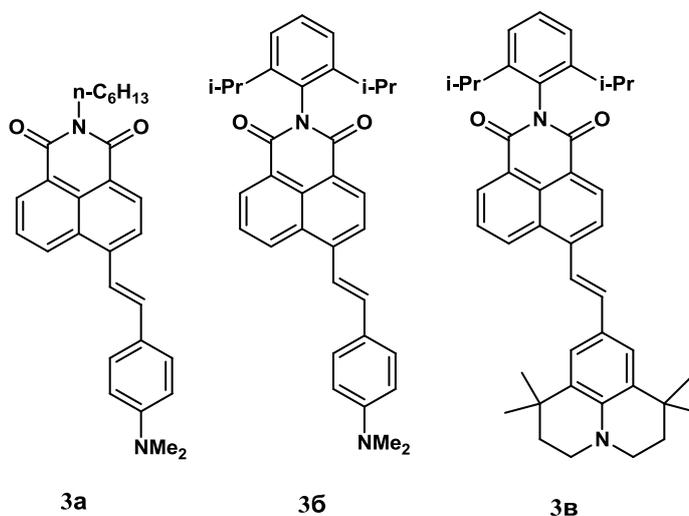
Возбужденное состояние нафталимидного ядра обладает электроноакцепторным характером [36], что приводит к склонности производных нафталимида образовывать эксимеры и эксиплексы, а также комплексы с переносом заряда с π -донорными ароматическими субстратами, в частности с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот [37], или же выступать в качестве акцепторного компонента в процессе фотоиндуцированного переноса электрона [38]. Вышеназванные свойства производных нафталимида широко используются при разработке флуоресцентных сенсоров и химиотерапевтических препаратов, действие которых основано на взаимодействии с ДНК. Примеры таких систем будут рассмотрены в разделах 2.2. и 2.4.

Для применения флуорофоров в биологических и медицинских исследованиях важно, чтобы максимумы их поглощения и люминесценции располагались в

длинноволновой области спектра. Примеры производных нафталимида, удовлетворяющих этому условию, в литературе немногочисленны. В данном литературном обзоре будут рассмотрены несколько примеров углубления окраски нафталимидных красителей за счет введения в 4-е положение нафталимидного ядра ароматических и гетероциклических заместителей.

Нафталимиды **3а-в** (схема 4), содержащие стироловый заместитель с электронодонорной аминогруппой в *para*-положении фенильного ядра были синтезированы в рамках работы [39] для применения в качестве компонентов электролюминесцентных устройств. В абсорбционных спектрах поглощения **3а-в** наблюдаются полосы переноса заряда, расположенные в области 440-470 нм, при этом наиболее длинноволновым поглощением и люминесценцией обладает соединение **3в**, так как содержит заместитель с наиболее выраженными ЭД свойствами (в хлороформе $\lambda_{\max} = 471$ нм, 479 нм и 511 нм для **3а**, **3б** и **3в**, соответственно).

Схема 4



Для соединений **3а-в**, как и для большинства хромофоров с переносом заряда, характерна значительная сольватохромия. На рисунке 3 проиллюстрирован батофлорный сдвиг полос испускания **3в**, при переходе от циклогексана к ацетону максимум люминесценции смещается в красную область почти на 200 нм. В таблице 1 приведены основные спектральные характеристики **3а** в растворителях различной полярности.

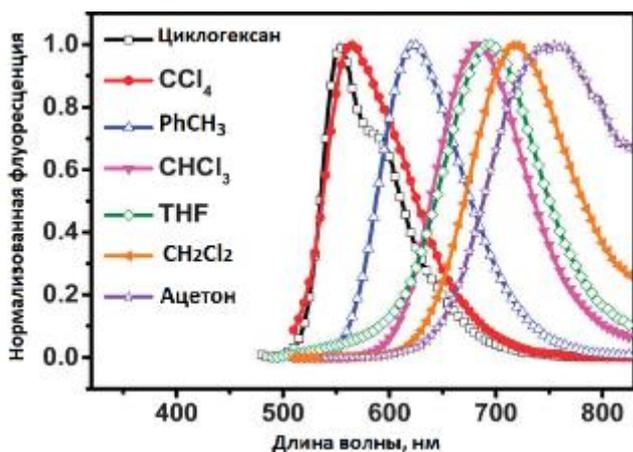


Рисунок 3 - Нормализованные спектры флуоресценции **3в** в растворителях различной полярности [39]

Соединение **3а** в растворителях средней полярности флуоресцирует с высокими квантовыми выходами, при переходе же к более полярному ацетону эффективность эмиссии резко снижается, что авторы работы объясняют повышением эффективности релаксации путем внутренней конверсии при уменьшении энергетической щели между ВЗМО и НСМО красителя.

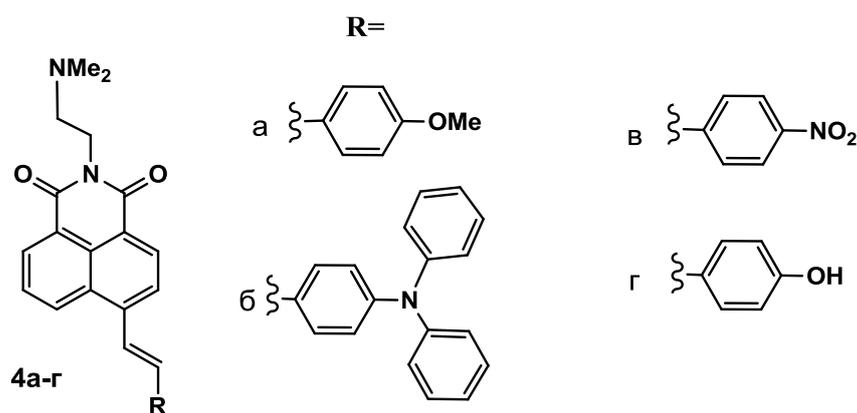
Таблица 1– Спектральные характеристики соединения **3а** в растворителях различной полярности

Растворитель	λ_{\max}^{abs} , нм	λ_{\max}^{fluor} , нм	ϕ^{fluor}
Циклогексан	440	514	0.22
Толуол	461	580	0.42
Хлороформ	471	634	0.62
ТГФ	466	655	0.59
Дихлорметан	470	669	0.51
Ацетон	464	698	0.08

Авторами работы [40] была получена серия 4-стирилзамещенных нафталимидов **4а-г** (схема 5). Интересно, что на положение полос в спектрах поглощения **4а-г** полярность растворителя оказывает слабое влияние (максимум поглощения **4а** смещается от 406 до 417 нм при переходе от толуола к метанолу), это означает, что молекулы **4а-г** в основном состоянии обладают относительно небольшим дипольным моментом и слабо стабилизируются за счет сольватации. Спектры флуоресценции **4а-г** при переходе от толуола к метанолу смещаются bathochromно на 88, 111, 13 и 90 нм, соответственно. С помощью уравнения Липперта-Матаги (подробно рассматривается в разделе 3.2.1 данной работы) были вычислены изменения дипольных моментов молекул **4а-г** при переходе в возбужденное состояние ($\Delta\mu$). Значения $\Delta\mu$ составили 16.8, 20.9 и 16.5 Д для **4а**, **б** и

г, соответственно, в то время как для **4в** были вычислены два значения $\Delta\mu$ для протонных (11.8Д) и апротонных растворителей (15.2Д). Полученные значения подтверждают, что при фотовозбуждении в молекулах **4а,б,г** происходит эффективный процесс переноса заряда, в результате которого дипольный момент молекулы существенно возрастает. Спектральные характеристики **4в** слабо зависят от полярности растворителя, так как в стироловый фрагмент **4в** введена электроноакцепторная нитрогруппа, затрудняющая перенос заряда в системе.

Схема 5



Соединение **4а** флуоресцирует с высокими квантовыми выходами как в полярных, так и к малополярных растворителях. Напротив, эмиссия **4б-г** тушится в полярных средах ($\phi^{fluor} = 0.52$ (**4а**), <0.01 (**4б**), 0.11 (**4в**), 0.13 (**4г**) в метаноле). Было обнаружено, что соединение **4в** обладает люминесценцией в твердом виде (рисунок 4), это явление авторы объясняют усилением эмиссии, вызванным агрегацией (англ. AIEE – Aggregation-induced Emission Enhancement). Усиление эмиссии при агрегации характерно для флуорофоров, для которых в растворе эффективной является безызлучательная релаксация возбужденного состояния за счет вращения вокруг одной из связей в молекуле. Так как в твердом виде вращение становится невозможным, то возрастает вероятность излучательной релаксации.

Производное нафталимида **4в** характеризуется низкой эффективностью люминесценции в растворе (наибольший квантовый выход для **4в** наблюдается в хлороформе – 0.15), однако для него была обнаружена способность к формированию флуоресцентных наночастиц при протонировании. На рисунке 5в

представлены спектры флуоресценции **4в** в смесях ТГФ и 10мкмоль/л раствора соляной кислоты. Интенсивность эмиссии существенно возрастает при добавлении к ТГФ 25% (об.) раствора кислоты, в этих условиях **4в** формирует наночастицы сферической формы размерами 5-20 нм. Протонированная форма **4в** представляет собой амфифильную частицу, способную образовывать мицеллоподобные наночастицы, обладающие АИЕЕ-свойством. Стоит отметить, что в смесях ТГФ/вода соединение **4в** не образует мицеллы и не демонстрирует разгорания флуоресценции, таким образом эффект АИЕЕ характерен именно для протонированной форма молекулы.

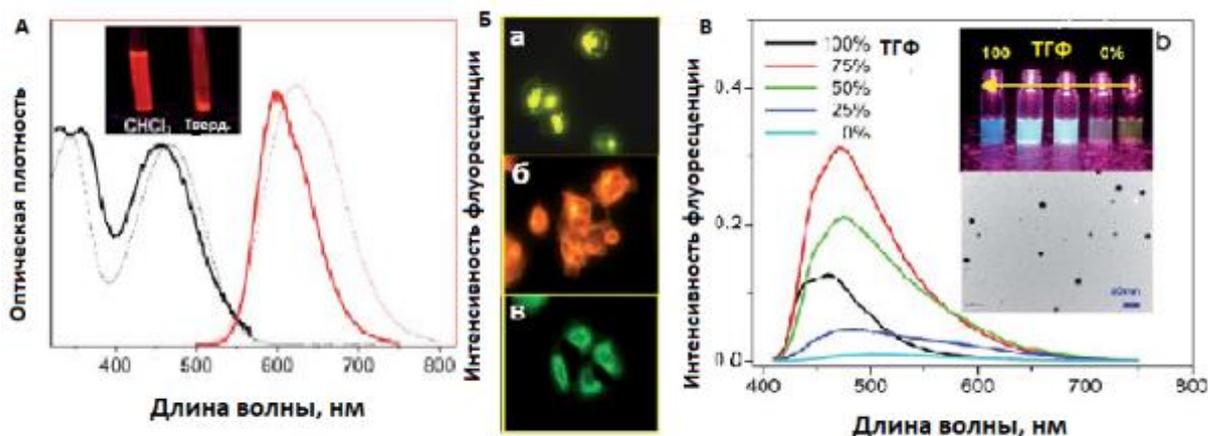


Рисунок 4 – А) Спектры поглощения (черный) и флуоресценции (красный) **4б** в хлороформе (пунктир) и в твердом виде (сплошные линии); Б) Изображения клеток линии MCF-7, инкубированных с растворами **4а-в**: а-**4а**, б-**4б**, в-**4в**; В) Спектры флуоресценции **4в** в смесях ТГФ с 10мкмоль/л раствором HCl в различных соотношениях по объему, возбуждение 400 нм. Над графиками: фото растворов под УФ-облучением, а также изображения наночастиц, полученных в смеси ТГФ/раствор HCl 25/75 (об./об.), шкала 50 нм [40]

Авторами работы [40] было установлено, что соединения **4а-в** способны проникать через мембрану клеток линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и накапливаться в цитоплазме. С помощью конфокального флуоресцентного микоскопа были получены изображения клеток (рисунок 4а-в), инкубированных с растворами красителей (10мкмоль/л) в течение 4 часов. Все три исследованных соединения проявили способность флуоресцировать в клетках, что может быть вызвано несколькими причинами: микроокружение, в которое попадают флуорофоры в клетке обладает невысокой полярностью или красители

подвергаются агрегации и флуоресценция их связана с АИЕЕ-эффектом. Для объяснения эмиссии **4в** в клетках авторы предполагают возможность протонирования молекул в цитоплазме, а также в лизосомах, рН которых, как известно, слабокислый.

В работах [41,42] описаны 4-пиразолинил производные нафталимида **5а-в** (схема 6), поглощение которых значительно смещено в красную область относительно 4-амино- и 4-метилтианафталимида **2ж** и **2е**. Так, соединение **5в** характеризуется поглощением в области 495 нм и максимумом люминесценции 665 нм в ацетоне [42]. Длинноволновое поглощение **5в** объясняется значительной поляризацией молекулы вследствие стягивания электронной плотности с атома азота пиррольного типа (N(1) на схеме 6) на остаток нафталимида, обладающий выраженными электроноакцепторными свойствами. Пиразолинил производные нафталимида **5а-в** относятся к флуорофорам ICT-типа, их максимумы поглощения и люминесценции должны претерпевать батохромное смещение при переходе к полярным средам.

Схема 6

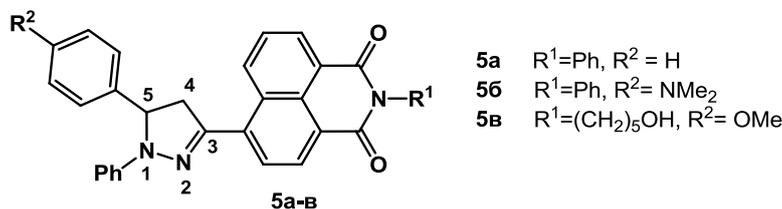


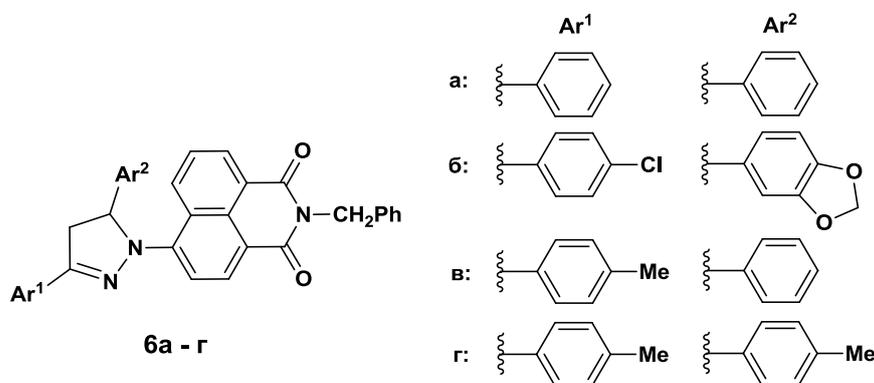
Таблица 2 - Спектральные характеристики соединений **5а,б** в ацетонитриле.

Соединение	λ_{\max}^{abs} , нм	λ_{\max}^{fluor} , нм	ϕ^{fluor}
5а	490	682	0.18
5б	484	670	0.002

Как видно из данных таблицы 2 положение максимумов поглощения и флуоресценции для производных **5а** и **5б** различается незначительно. Это связано с тем, что диметиламиногруппа в *para*-положении фенильного кольца **5б** не находится в сопряжении с π -системой красителя и ее ЭД свойства слабо влияют на перенос заряда, протекающий в молекуле при фотовозбуждении. Однако заместитель в *para*-положении фенильного ядра оказывает существенное влияние

на квантовый выход флуоресценции пиразолинил производных. Значительное снижение эффективности люминесценции при переходе от **5a** к **5b** объясняется переносом электрона с донорной диметиламиногруппы на нафталиimidный остаток при фотовозбуждении.

Схема 7



На схеме 7 представлены соединения **6a-г**, в которых пиразольный атом азота пиразолинильного остатка входит в сопряжение с ароматической системой нафталимида [43]. Из спектральных характеристик хромофоров **6a-г**, приведенных в таблице 3 видно, что максимумы поглощения и люминесценции гипсохромно смещены относительно производных пиразолинилнафталимида **5a,б**, что объясняется меньшим числом сопряженных связей в хромофорной системе **6a-г** за счет исключения из нее пиридинового атома азота пиразолинильного фрагмента. На положение полос поглощения и флуоресценции заместители в фенильных кольцах **6a-г** оказывают слабое влияние за счет того, что ароматические заместители пиразолинильного кольца не находятся в сопряжении в нафталиimidном остатке.

Таблица 3 – Спектральные характеристики **6a-г** в ТГФ

Соединение	6a	6б	6в	6г
λ_{\max}^{abs} , нм	525	525	533	537
λ_{\max}^{fluor} , нм	460	458	463	465

Таким образом, анализ литературы, посвященной спектральным свойствам некоторых производных 1,8-нафталимида, показал, что для производных нафталимида, содержащих электронодонорные заместители в 4-м положении нафталинового ядра характерно наличие в спектрах поглощения длинноволновой

полосы переноса заряда. На спектральные характеристики флуорофоров с переносом заряда существенное влияние оказывает природа растворителя. Благодаря наличию максимума поглощения в длинноволновой области спектра, для применения в качестве агентов для флуоресцентной визуализации наиболее перспективными флуорофорами являются 4-стирилпроизводные нафталимида, в предварительных исследованиях продемонстрировавшие способность проникать через клеточные мембраны, а также 4-пиразолинил-замещенные нафталимида, присоединенные к нафталиimidному остатку через атом С(3) пиразолинильного фрагмента, так как они обладают длинноволновой красной люминесценцией.

2.2. Флуоресцентные сенсоры на основе производных 1,8-нафталимида

Качественное и количественное распознавание катионов в водных растворах на сегодняшний день является актуальной задачей экологии, а также медицинской и биологической химии. При этом пристальное внимание исследователей направлено на разработку калориметрических и флуоресцентных сенсорных систем, так как современный уровень развития методов оптической спектроскопии позволяет проводить высокочувствительный анализ быстро и относительно просто [44,45].

2.2.1. Катионные сенсоры. Основные механизмы генерации оптического сигнала

Молекулярные устройства, способные при связывании с субстратом изменять свои оптические характеристики, носят название оптических хемосенсоров [46]. В состав таких устройств входят два функциональных фрагмента, объединенных в одну молекулу с помощью спейсера: рецептор, представляющий собой ионофорную группу, селективно связывающуюся с аналитом в растворе, а также флуорофор – сигнальный элемент сенсора, изменение параметров люминесценции которого позволяет получать информацию о связывании. В зависимости от того, составляют ли рецептор и флуорофор единую сопряженную π -систему или разобщены посредством спейсера, различают два основных механизма генерации оптического отклика [21,47]: PET-механизм (*англ.*, Photoinduced Electron Transfer, механизм с фотоиндуцированным переносом электрона) и ICT-механизм (*англ.англ.*, Intramolecular Charge Transfer, внутримолекулярный перенос заряда).

РЕТ – механизм. Компоненты сенсора, функционирующего по принципу РЕТ, разобщены в основном электронном состоянии посредством спейсера, в роли которого может выступать, например, цепочка из нескольких метиленовых групп. Фотовозбуждение флуоресцентного компонента системы приводит к переходу электрона с ВЗМО флуорофора на НСМО (см. рисунок 5). Принадлежность орбитали тому или иному компоненту сенсора определялась распределением электронной плотности). В случае катионных сенсоров рецептор обычно является электронодонором, что делает возможным перенос электрона (РЕТ) с ВЗМО рецептора на однократно занятую ВЗМО флуорофора в возбужденном состоянии, в результате его флуоресценция тушится. Связывание с катионом приводит к тому, что энергия ВЗМО рецептора становится ниже чем ВЗМО флуорофора, что делает реализацию РЕТ-процесса невозможной и приводит к разгоранию флуоресценции сигнального компонента. Производные 1,8-нафталимида активно применяются в качестве флуоресцентных компонентов РЕТ-сенсоров, так как нафталимидное ядро обладает электроноакцепторными свойствами в S_1 -возбужденном состоянии [48].

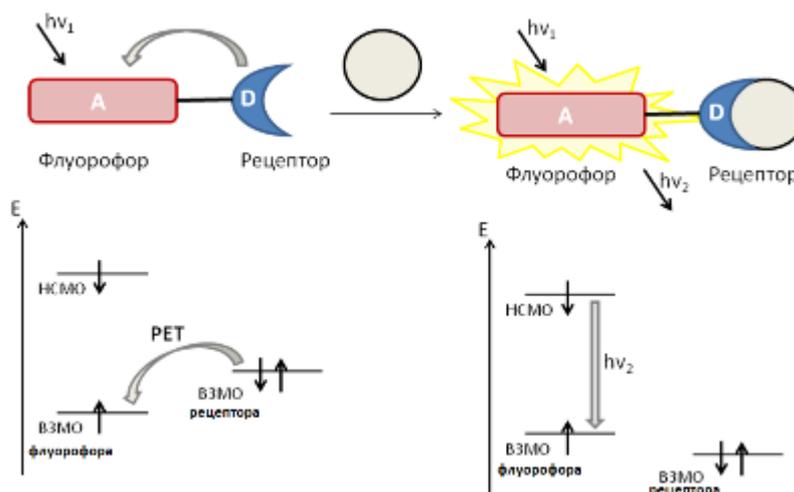


Рисунок 5 –Принципиальная схема РЕТ-сенсора для распознавания катионов. Катион изображен в виде шарика

ICT-механизм. Для реализации ICT-процесса необходимо, чтобы один или несколько атомов рецептора входили в состав сопряженной π -системы флуорофора. В качестве сенсоров данного типа чаще всего используются хромофоры, содержащие ЭД и ЭА группы разных концах π -системы, при фотовозбуждении происходит перенос электронной плотности между донорной и

акцепторной частями молекулы. При связывании рецептора с катионом происходит уменьшение/увеличение энергии, необходимой для переноса электронной плотности, что выражается в гипсохромном/батохромном смещении полос поглощения флуорофора, и соответствующем изменении его флуоресцентных характеристик (рисунок 6).

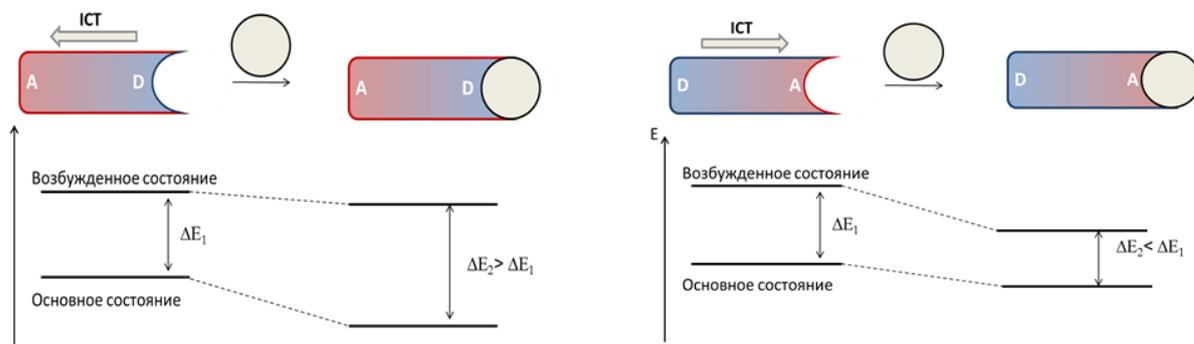
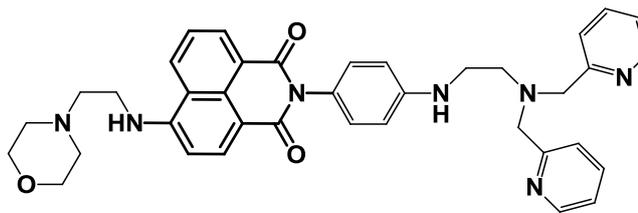


Рисунок 6 – Энергетическая диаграмма, объясняющая спектральные сдвиги при связывании катионов ICT-сенсором. а) ЭД заместитель в структуре флуорофора входит в состав рецептора; б) ЭА заместитель в структуре флуорофора входит в состав рецептора

Таким образом, в общем случае аналитическим сигналом РЕТ-сенсоров служит разгорание или тушение флуоресценции, а сенсоров ICT-типа смещение максимумов поглощения и эмиссии при связывании с катионом. Однако, существуют молекулярные системы, в которых одновременно реализуются оба механизма генерации оптического сигнала, примеры подобных молекул будут рассмотрены ниже.

Сенсор для определения содержания катионов цинка в лизосомах, содержащий два РЕТ-донорных фрагмента **7** был (схема 8) описан в работе [49]. Рецепторная часть молекулы представлена *N,N*-бис(2-пиридилметил)этилендиамином, присоединенным к нафталиimidному флуорофору через жесткий по структуре фенильный фрагмент, который обеспечивает высокую чувствительность флуорофора к координации рецептора. В четвертое положение нафталинового ядра был введен остаток морфолина, который играет роль не только направляющей группы, обеспечивающей накопление сенсора в лизосомах, но и второго донорного фрагмента, перенос электрона которого приводит к тушению флуоресценции нафталимида.

Схема 8



7

В интервале рН=7.0-10.0 соединение **7** демонстрирует малоинтенсивную флуоресценцию с квантовым выходом равным $\varphi^{fluor}=0.009$, что указывает на тушение эмиссии в результате переноса электрона с морфолинового и анилинового атомов азота заместителей. При снижении рН раствора от 7.0 до 4.0 наблюдается постепенное разгорание флуоресценции лиганда, связанное с протонированием морфолинового фрагмента ($\varphi^{fluor}=0.022$ при рН=5, рисунок 7а). Комплекс **7** с цинком флуоресцирует интенсивнее свободного лиганда ($\varphi^{fluor}=0.049$, рН=7.0-10.0). В диапазоне рН от 7.4 до 4.0 комплекс флуоресцирует в 5.5 раз интенсивнее свободного лиганда (так при рН=5.0 $\varphi^{fluor}=0.121$ для **7**+Zn²⁺ и 0.022 для **7**, рисунок 7а,б), что авторы объясняют подавлением в комплексе процессов переноса электрона как с морфолинового фрагмента в результате протонирования, так и с рецептора в результате связывания с катионом. С помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии было показано, что сенсор **7** действительно локализуется в лизосомах клеток линии MCF-7 и позволяет детектировать в них катионы цинка.

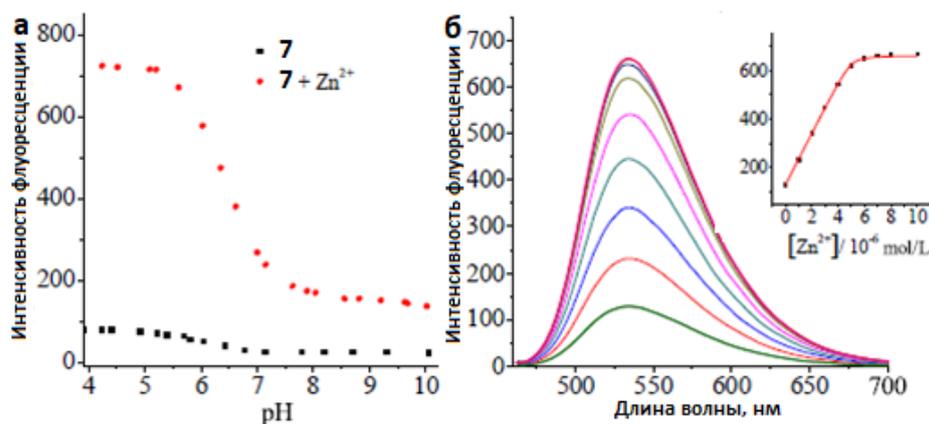
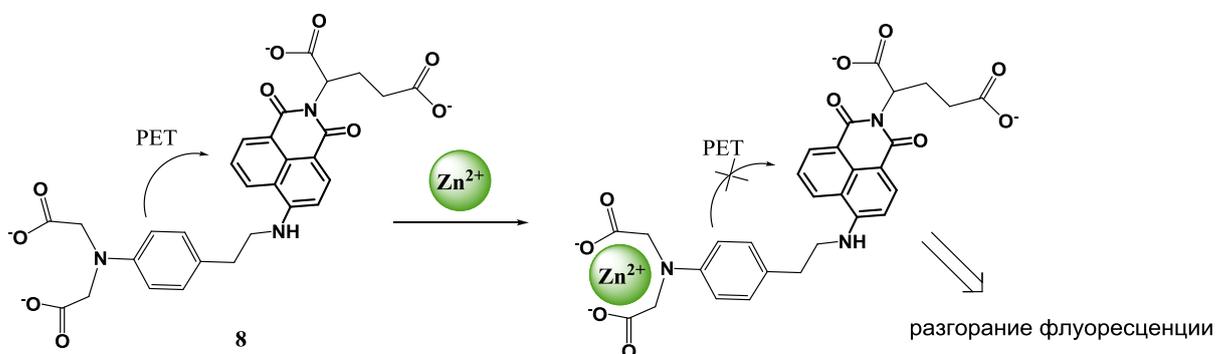


Рисунок 7 - а) Изменение интенсивности флуоресценции растворов **7** (черные точки) и комплекса **7**+Zn²⁺ в воде (0.5% ДМСО) в зависимости от рН; б) Спектры флуоресценции **7** (5μмоль/л) при добавлении Zn²⁺, возбуждение 450 нм, рН=5.0. В правом верхнем углу – разгорание флуоресценции **7** при увеличении концентрации Zn²⁺ в растворе от 0 до 1·10⁻⁵ моль/л [49]

РЕТ-сенсор на катионы цинка **8** (схема 9) на основе 4-амино-1,8-нафталимида, содержащего иминодиуксусную кислоту в качестве комплексона, был получен Лиу и сотр. [50]. Флуоресценция свободного лиганда **8** блокируется вследствие переноса электрона с атома азота рецепторного фрагмента, однако при связывании с цинком наблюдается разгорание флуоресценции (в 20 раз при добавлении 6 эквивалентов Zn^{2+}). Комплексон обладает высоким сродством к катиону цинка ($K_d = 2.4 \cdot 10^{-5} M$), связыванию не мешает присутствие в растворе других металлов. Испытания на клеточной линии HeLa показали, что молекула сенсора **8** способна проникать через клеточную мембрану и не проявляет цитотоксичности в концентрации ниже 40 мкМ.

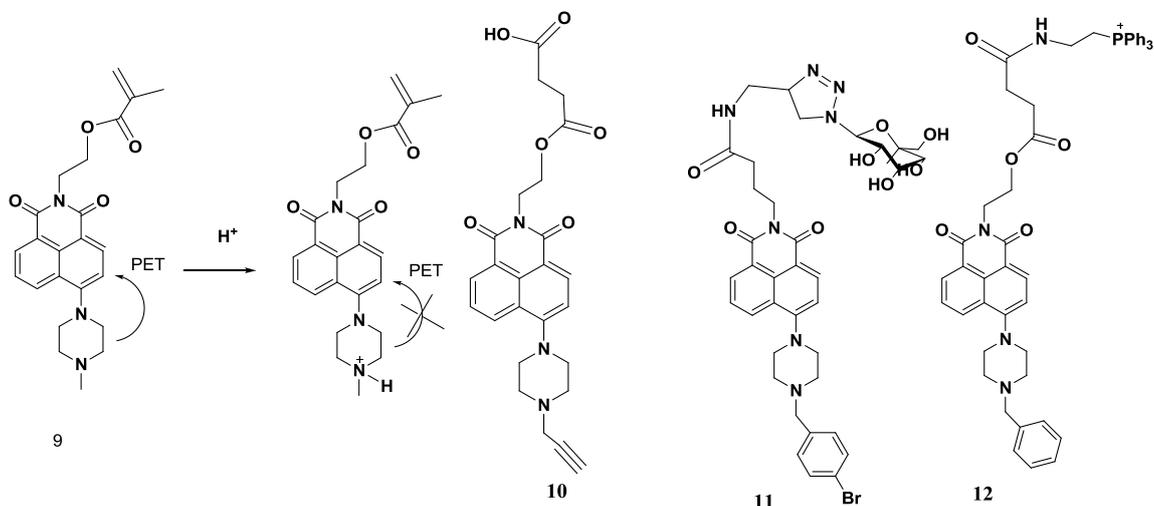
Схема 9



Ряд флуоресцентных рН-сенсоров **9-12** на основе 4-пиперазинзамещенных нафталимида разработан авторами статей [51-54] (схема 10). Данные рН-сенсоры имеют одинаковый рецептор (пиперазиновый фрагмент в 4-м положении нафталимидного ядра), но содержат различные функциональные фрагменты при имидном атоме азота. В структуру соединения **9** введен метакрилатный фрагмент, открывающий возможность полимеризации сенсора и создания тонких пленок для анализа рН вне клеток, **10** содержит остаток янтарной кислоты для дальнейшей иммобилизации на наночастицах. Сенсор **11** содержит фрагмент галактозы, облегчающий проникновение **11** в клетку путем эндоцитоза и накопление в лизосомах, а соединение **12** содержит положительно заряженную трифенилфосфониевую группу, обеспечивающую доставку в митохондрии. Флуоресценция соединений **9-12** в щелочной и основной среде тушится в результате переноса электрона с электроноизбыточного заместителя. Протонирование атома азота пиперазинового цикла блокирует РЕТ-процесс, что

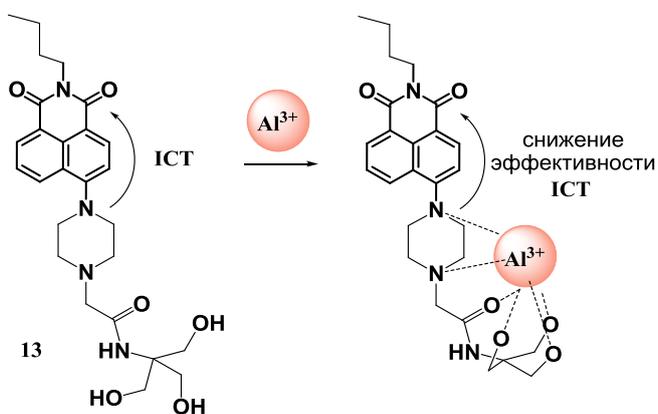
приводит к разгору флуоресценции. Значения рKa сенсоров составляют 6.83, 6.47, 6.73, 6.18, соответственно, рабочие диапазоны значений показателей кислотности среды находятся в пределах рН 4.5-7.5.

Схема 10



Разработка флуоресцентных ICT-сенсоров на базе оптической платформы 1,8-нафталимида чаще всего предполагает включение электронодонорных заместителей в четвертом положении нафталинового ядра в состав рецепторного фрагмента сенсора. Так 4-пиперазин замещенное производное нафталимида **13** (схема 11) предложено авторами работы [55] для определения катионов алюминия в метаноле. Координация атома азота, электронная пара которого донирована в ароматическую систему, с катионом Al^{3+} приводит к ослаблению его донорных свойств и снижению эффективности переноса заряда при фотовозбуждении хромофорной системы, что выражается в коротковолновом сдвиге полос поглощения и флуоресценции сенсора (рисунок 8).

Схема 11



Разгорание флуоресценции **13** при связывании с Al^{3+} авторы связывают с блокированием безызлучательных путей релаксации возбужденного состояния молекулы в результате формирования жёсткого по структуре комплекса с катионом алюминия (так называемым «CHEF-эффектом» англ. Chelation Enhanced Fluorescence – усиление флуоресценции в результате хелатирования). В метаноле константа связывания составляет $7.6 \cdot 10^4 M^{-1}$. Соединение **13** обратимо связывает катионы алюминия с высокой селективностью по отношению к катионам других металлов в водных растворах, что открывает перспективы для его дальнейшего применения в экологическом анализе.

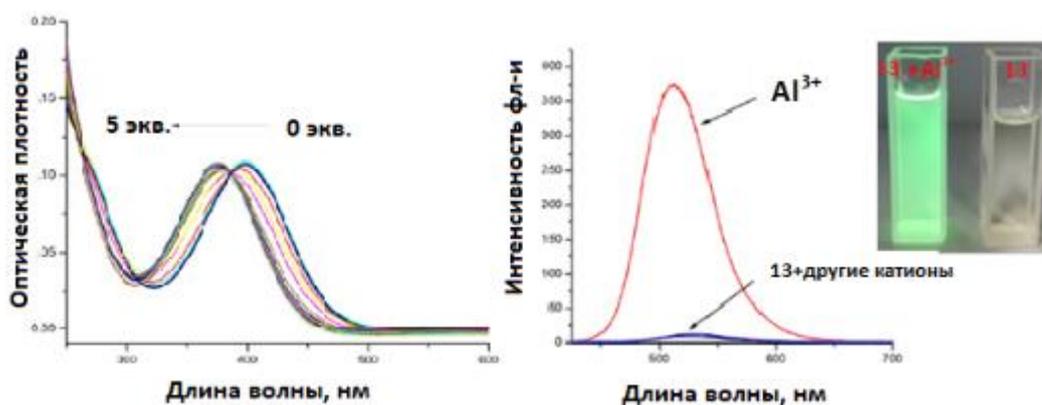
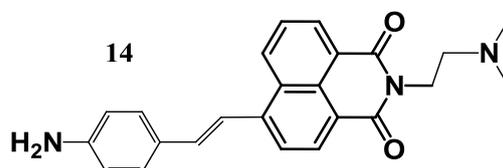


Рисунок 8 – а) Изменения в спектрах поглощения соединения **13** при добавлении Al^{3+} (растворитель-метанол, концентрация лиганда 10 мкмоль/л); б) Разгорание флуоресценции лиганда **21** в метаноле в присутствии 5 эквивалентов катионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} и Al^{3+} , фото кювет с раствором лиганда в присутствии/отсутствии катионов Al^{3+} [55]

Структура флуоресцентного рН-сенсора **14** (схема 12) содержит два центра связывания, протонирование которых вызывает спектральные изменения различной природы [56]. Соединение **14** является хромофором ICT-типа, так как содержит аминостириловый заместитель с сильно выраженными электронодонорными свойствами, находящийся в сопряжении с карбонильными группами фрагмента нафталимида. Коротковолновая полоса в спектре поглощения **14** (310-330 нм) соответствует локальным $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам, более длинноволновый пик располагается в области 460-470 нм и является полосой переноса заряда. При постепенном снижении рН от 6.0 до 3.0 в смеси ДМСО – вода (v/v = 3:1) первой протонированию подвергается более основная диметиламиногруппа ($pK_a=4.81$),

выполняющая в системе роль PET-донора. Этот процесс приводит к разгоранию флуоресценции сенсора. Связывание же с протоном ICT-донора, аминогруппы, приводит к резкому снижению эффективности переноса заряда в системе, что влечёт за собой гипсохромных сдвиг полос поглощения и флуоресценции (рисунок 9).

Схема 12



Соединение **14** обладает низкими квантовыми выходами флуоресценции в полярных растворителях, а в водных растворах подвергается агрегации. При этом исследования сенсорных свойств **14** *in vitro* показали, что оно проникает через мембрану клеток путем эндоцитоза и демонстрирует интенсивную флуоресценцию в клетках, что авторы работы объясняют так называемым АИЕ-эффектом (Aggregation Induced Emission –англ., эмиссия, вызванная агрегацией).

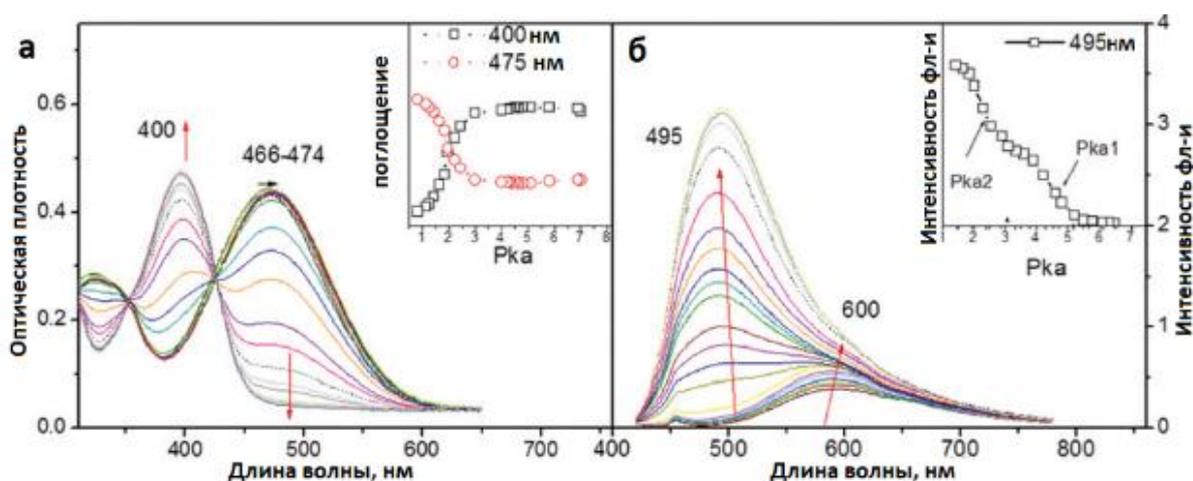


Рисунок 9 – Изменения в спектрах поглощения и флуоресценции **14** в ДМСО/Н₂О=3/1 (об./об.) при изменении рН среды, длина волны возбуждения 400 нм [56]

FRET-механизм. Безызлучательный перенос энергии фотовозбуждения по механизму Ферстера (FRET, Förster resonance energy transfer) в настоящее время является одним из фотофизических процессов, наиболее часто используемых при разработке оптических сенсоров [47]. Интерес к применению FRET-процесса обусловлен его высокой чувствительностью к фотофизическим параметрам бис(хромофорной) молекулярной системы, а кроме того к возможности создания на его основе ратиометрических сенсорных устройств. Ратиометрический метод

основан на измерении интенсивности флуоресценции на различных длинах волн, соотношение которых изменяется в зависимости от концентрации аналита [57]. Такой подход представляет практический интерес для применения в биологических системах, в частности для проведения анализов *in vitro* и *in vivo*, так как не требует определения точной концентрации сенсора в исследуемом объекте и обеспечивает внутреннюю калибровку физических параметров среды (температуре, вязкости, полярности и др.).

FRET-процесс является результатом диполь-дипольного взаимодействия между двумя фотоактивными фрагментами (рисунок 10). Эффективность и скорость переноса энергии по механизму Ферстера между хромофорами (донором Д и акцептором А) зависит от нескольких параметров: расстояния между фотоактивными фрагментами (от 10 до 100 Å), взаимной ориентации дипольных моментов флуорофоров, а также интеграла перекрывания спектра флуоресценции Д и поглощения А [58, 59]. Применение FRET-процесса для разработки сенсорных устройств основано на изменении эффективности переноса энергии в результате увеличения/уменьшения степени перекрывания спектров поглощения и эмиссии Д и А, расстояния между ними, а также за счет ускорения или ингибирования процессов, конкурентных FRET-взаимодействию.

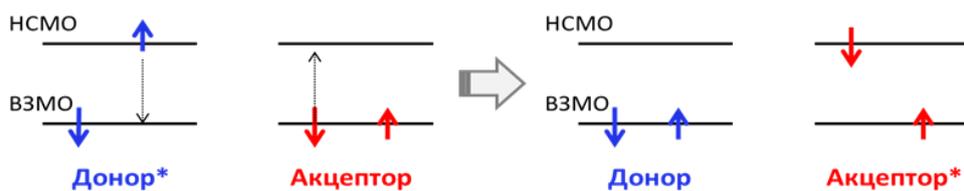
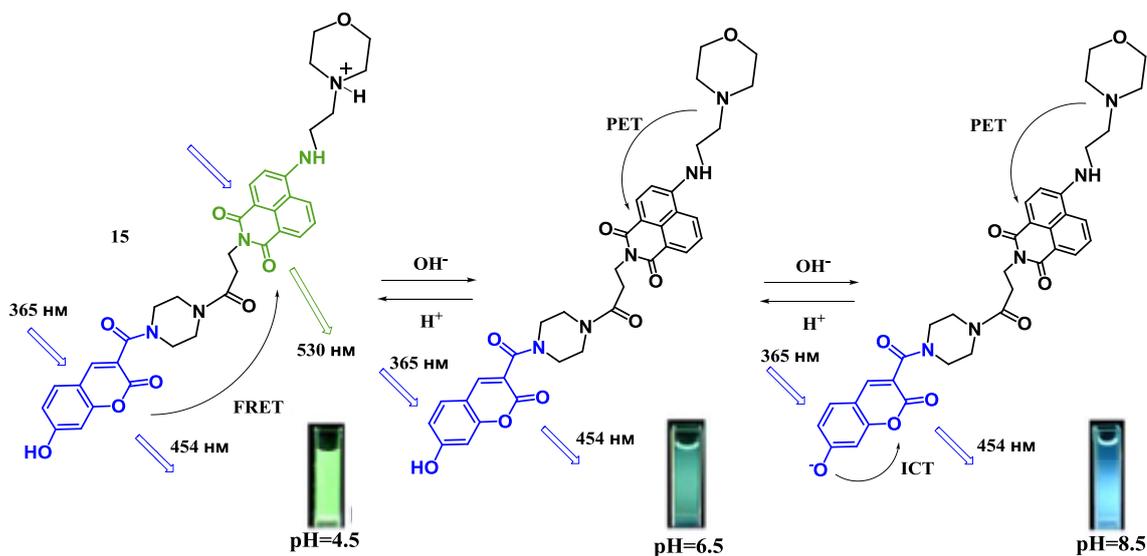


Рисунок 10 – Принцип FRET-процесса

Флуоресцентный сенсор **15** (схема 13) для определения pH лизосом, механизм отклика которой основан на комбинации ICT, PET и FRET-процессов, описана в работе [60]. Авторами предложена интересная стратегия по разработке структуры ратиометрического сенсора, которая заключается в использовании FRET-пары флуорофоров, каждый из которых содержит функциональный фрагмент, позволяющий контролировать процессы переноса заряда или электрона в зависимости от кислотности среды. Оптические платформы нафталимида и кумарина были выбраны в качестве донорного и акцепторного компонентов FRET-

пары. Такое сочетание хромофоров часто используется для создания ионофорных систем, так как спектры флуоресценции производных кумарина часто имеют значительное перекрытие со спектрами поглощения 4-аминозамещенных нафталимида, и, кроме того, оба соединения являются эффективными люминофорами и обладают высокой фотостабильностью.

Схема 13



Спектр поглощения пробы **15** в нейтральной среде (рН=7.4) представляет собой суперпозицию абсорбционных спектров кумаринового ($\lambda_{\max} = 400$ нм) и нафталимидного ($\lambda_{\max} = 430$ нм) хромофоров, что указывает на отсутствие их взаимодействия в основном состоянии (рисунок 11а). В кислой среде (при рН=4.5) морфолиновый фрагмент молекулы протонирован, в системе реализуется процесс переноса энергии: при фотовозбуждении кумаринового хромофора ($\lambda_{\text{возб.}} = 380$ нм) можно наблюдать появление интенсивной зеленой люминесценции 4-аминонафталимида ($\lambda_{\max} = 530$ нм, рисунок 11б). В системе **15** перенос энергии реализуется не с 100% эффективностью, при рН 4.5 помимо интенсивной полосы при 530 нм наблюдается слабое свечение в области 454 нм, соответствующее эмиссии кумарина (рисунок 11б). Повышение рН среды до 6.5 вызывает падение интенсивности полосы с максимумом 530 нм и проявление лишь слабого голубого свечения с максимумом 454 нм. Данные спектральные изменения свидетельствуют об исчезновении протонированной формы морфолина и блокировке излучательной релаксации нафталимида в результате переноса электрона. Дальнейшее повышение

pH среды до 8.5 вызывает батохромное смещение полос поглощения сенсора, что свидетельствует о депротонировании гидроксильной группы кумарина. Появление отрицательного заряда на атоме кислорода значительно усиливает его электронодонорные свойства, в результате чего повышается эффективность ИСТ-процесса в системе и приводит к росту интенсивности флуоресценции кумарина.

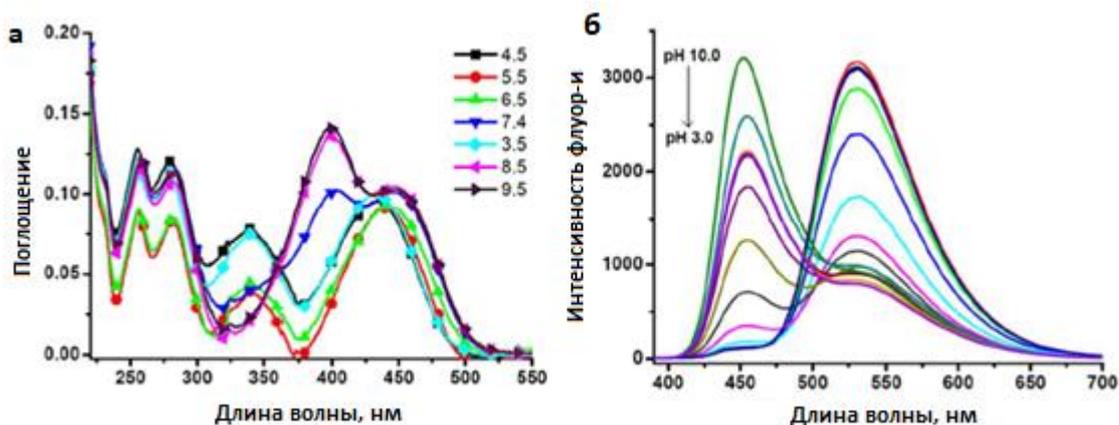
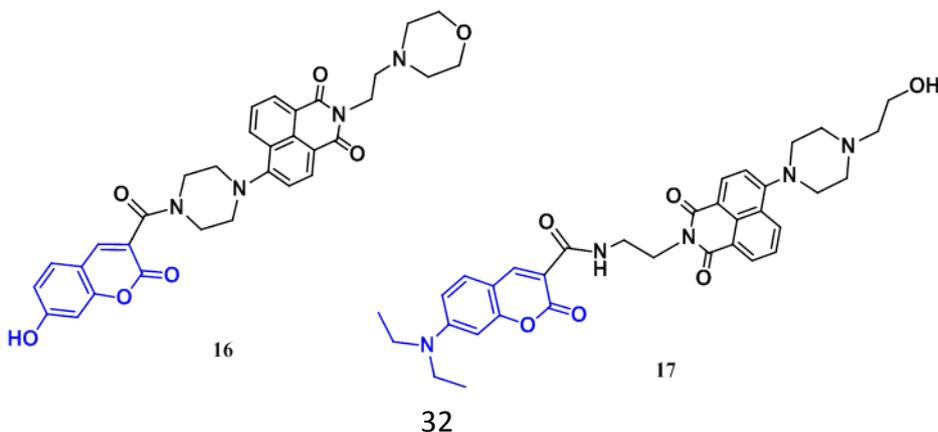


Рисунок 11 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) растворов pH-сенсора **15** в буферном растворе Бриттона-Робинсона (5% MeOH) при различных значениях pH. Концентрация соединения 23.5мкмоль/л, длина волны возбуждения 380 нм [60]

Таким образом, при повышении значений pH от кислой (4.5) до щелочной (8.5) реакции среды наблюдается изменение соотношения интенсивностей полос флуоресценции с максимумами 454 нм и 530 нм, связанное с изменением эффективностей процессов переноса заряда и электрона в системе. Зависимость отношения интенсивностей люминесценции I_{530}/I_{454} оказалась линейной в интервале pH 4.0-6.5, а I_{454}/I_{530} в интервале pH 6.0-8.0. Перспективность сенсора **15** для практического применения была продемонстрирована на примере мониторинга химически индуцированных изменений pH в клетках линии HeLa.

Схема 14



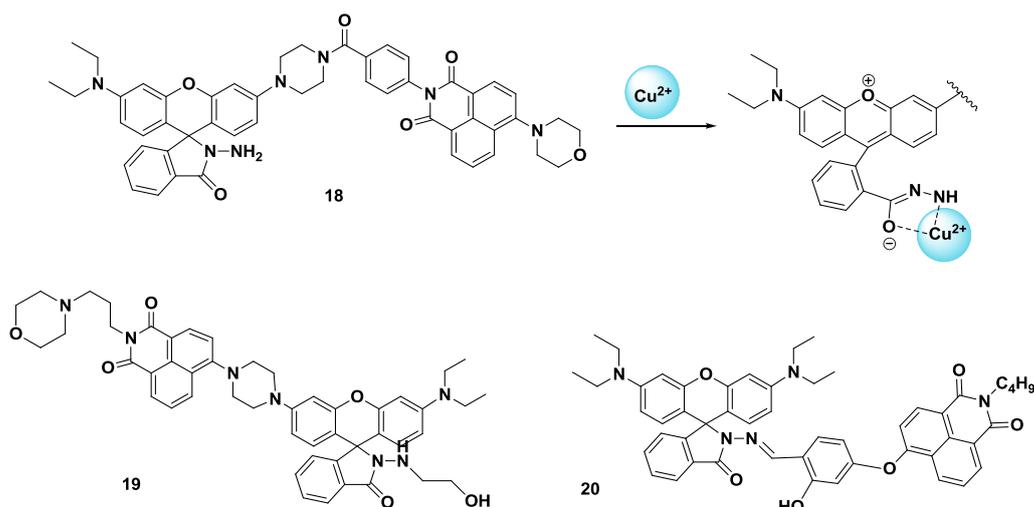
Флуоресцентные ратиометрические рН-пробы на основе FRET-пары нафталимида и кумарина **16** и **17** (схема 14) описаны в работах [61, 62]. Принцип их функционирования основан на изменении эффективности переноса энергии в результате блокировки PET-процесса при повышении кислотности среды. Использование нескольких фотофизических процессов для генерации оптического отклика пробы позволяет добиться широкого диапазона рабочих значений рН: от 5.0 до 11.0 для пробы **16**, от 4.0 до 10.0 для **17**. В эти интервалы укладываются стандартные значения рН лизосом (4.5-5.0), а также нормальные физиологические значения рН цитоплазмы (6.4-7.4). Испытания соединений **16** и **17** на клетках линии HeLa показали, что **16** избирательно накапливается в лизосомах благодаря наличию морфолинового фрагмента, **16** и **17** не проявляют токсического действия в исследованных концентрациях (10 мкмоль/л и 5 мкмоль/л, соответственно) и позволяют проводить мониторинг рН в условиях *in vitro*.

Широкие возможности для дизайна рН-сенсоров, а также проб на катионы металлов открывает использование родаминовых красителей в качестве акцепторных компонентов FRET-пар [63-65]. Катиониндуцированное раскрытие спиролактаманного цикла родаминов приводит к образованию окрашенной формы, участвующей в процессе переноса энергии. В работах [66, 67] описаны флуоресцентные сенсоры на катионы меди **18** и **19**, в спиролактаманый компонент которых введен рецепторный фрагмент гидразина (схема 15). Стоит отметить, что разработка эффективных проб на катион меди является непростой задачей в связи с тем, что эмиссия множества флуорофоров тушится в результате взаимодействия с парамагнитным атомом меди [68].

Возбуждение нафталиimidного хромофора соединений **18** и **19** в смеси полярных растворителей вода/ацетонитрил приводит к появлению пика его флуоресценции с максимумом 540 нм (рисунок 12а), так как родаминовый краситель находится преимущественно в неокрашенной спиро-форме и осуществление переноса энергии в данном случае невозможно. При связывании **18** и **19** с катионом меди происходит образование открытой формы родамина В, поглощающей в области 500-560 нм, эта область перекрывается широкой полосой эмиссии нафталиimidного компонента (450-650 нм). Таким образом, в комплексе с

катионом выполняется условие осуществления FRET-процесса, что приводит к появлению аналитического сигнала – полосы флуоресценции с максимумом 570 нм, что соответствует эмиссии родаминового компонента пары (рисунок 12б). Соединения **18** и **19** являются высокочувствительными и селективными пробами для ратиометрической детекции катионов меди в лизосомах (предел обнаружения 18 нмоль/л и 1.45 нмоль/л, соответственно).

Схема 15



Конъюгат нафталимида и родамина **20** также позволяет колориметрически при образовании «открытой» амидной формы родамина и спектрофлуориметрически детектировать ионы Cu^{2+} в растворе и *in vitro* с пределом обнаружения 0.018 мкмоль/л [69].

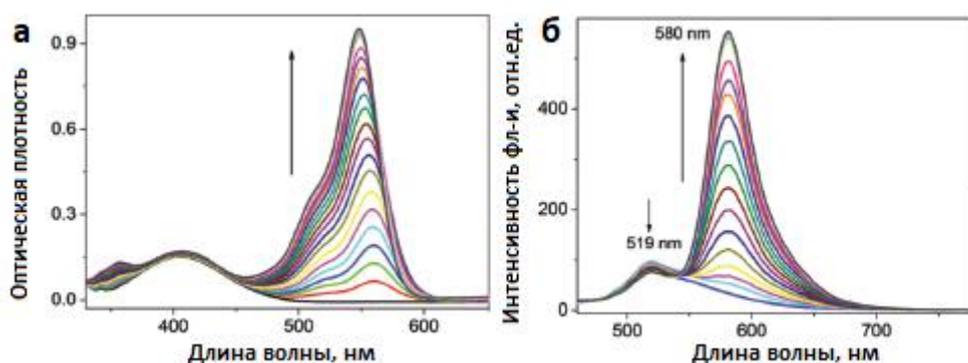
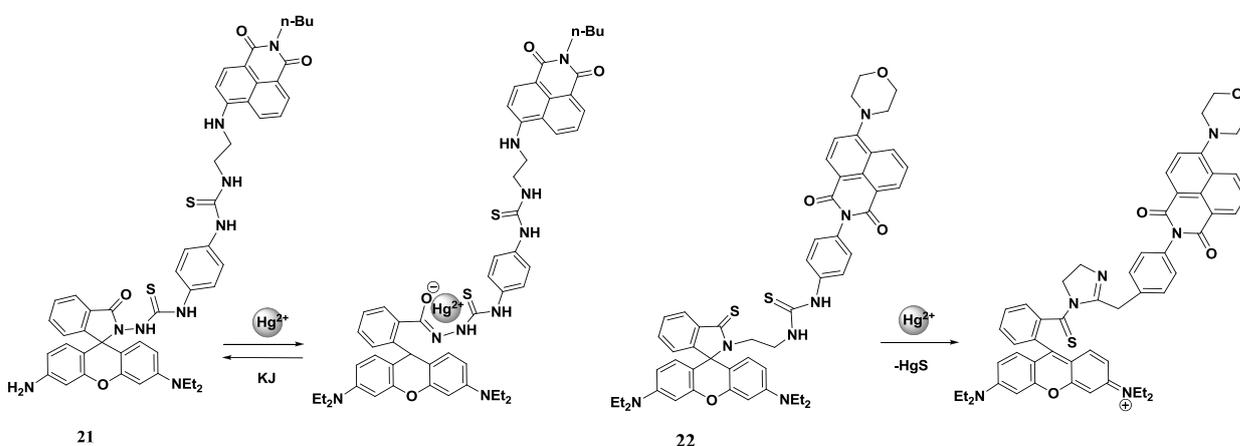


Рисунок 12 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **19** ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}=2/1$, 11 мкмоль/л - (а) и 5.5 мкмоль/л - (б)) при увеличении концентрации ионов Cu^{2+} в растворе [67]

FRET-пары нафталимида и родамина В **21** и **22** (схема 16), содержащие тиомочевинные фрагменты, обеспечивающие аффинность к катионам ртути, были

получены авторами работ [70,71]. Принцип работы ратиометрических проб основан на катион-индуцированном раскрытии спиралактамного цикла родамина, сопровождающемся повышением эффективности переноса энергии в системе. Интересно, что в случае молекулы **37** связывание Hg^{2+} необратимо, так как сопровождается реакцией десульфуривания и циклизации тиомочевинного фрагмента, непосредственно связанного с родаминовым хромофором, в то время как комплекс соединения **36** высвобождает катион под действием йодида калия и демонстрирует обратное переключение флуоресценции при выпадении йодида ртути в осадок

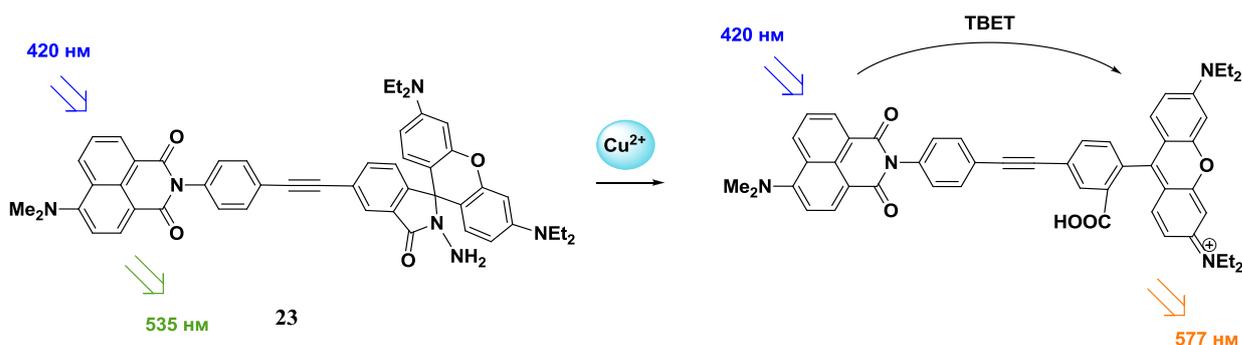
Схема 16



ТВЕТ-механизм. Как упоминалось выше, перенос энергии по Ферстеру требует отсутствия π -сопряжения между компонентами (бис)хромофорной системы в основном состоянии и перекрывания спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора. Существует также иной механизм передачи энергии электронного возбуждения – перенос энергии через связи (ТВЕТ, *англ.* Through-bond Energy Transfer), который реализуется в системе их двух фотоактивных фрагментов, связанных между собой π -сопряженным спейсером, в которой один из хромофоров в некоторой степени выведен из сопряжения за счет скрученной конформации молекулы [72]. ТВЕТ-процесс обладает отличительными особенностями, которые делают его привлекательным инструментом для создания биосенсоров [73]. В частности, данный механизм не ограничен условием перекрывания спектров эмиссии донора и поглощения акцептора, что не только расширяет спектр хромофоров-потенциальных компонентов ТВЕТ-систем, но и

позволяет получать системы с гораздо более высокими значениями псевдо-Стоксова сдвига, чем это было бы возможно в рамках FRET-механизма. Этот факт крайне важен, так как различие в длинах волн возбуждающего и испускаемого света напрямую влияет на контрастность получаемых изображений при флуоресцентной детекции. Кроме того, частичное перекрывание π -орбиталей донора и акцептора в ТВЕТ-системах делает оба компонента чувствительными к окислительно-восстановительным процессам. Как правильно, константы скорости переноса энергии через связи превышают константы переноса энергии по Ферстеру и ТВЕТ-процесс протекает с большей эффективностью [72,73]. Флуоресцентный ТВЕТ-сенсор **23** (схема 17) на основе 4-диметиламинонафталимида и родамина В, позволяющий детектировать катионы меди в водных растворах описан в работе [74].

Схема17



В отсутствие ионов Cu^{2+} фрагмент родамина находится в «закрытой» спиро-форме, в результате чего π перенос энергии в системе невозможен и при фотовозбуждении нафталимидного фрагмента в спектре наблюдается соответствующая ему полоса флуоресценции с максимумом 535 нм (рисунок 13).

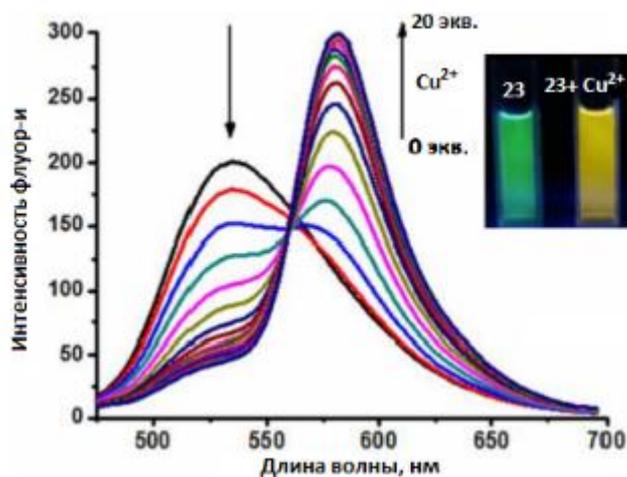
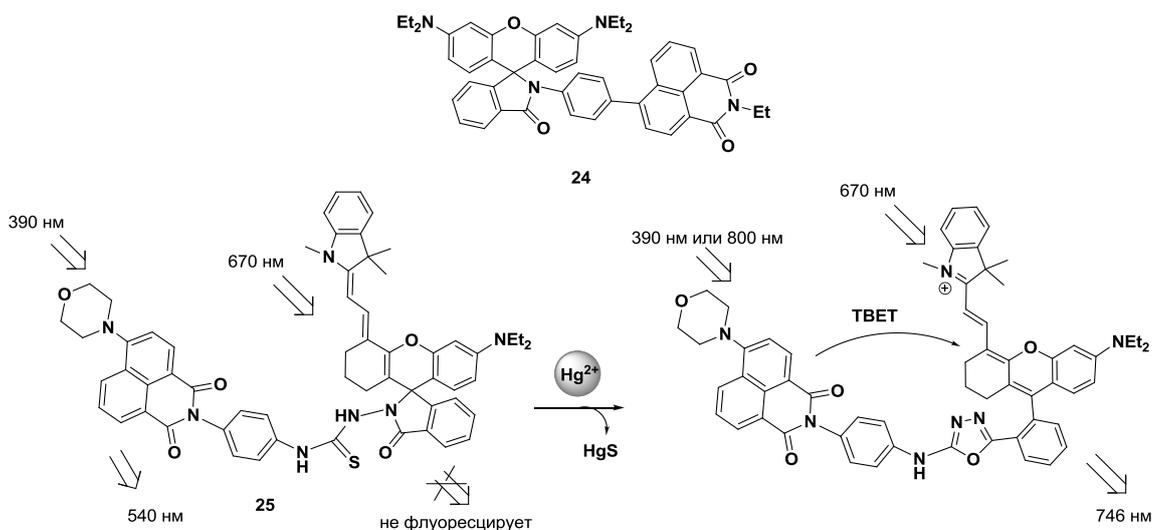


Рисунок 13 - Спектры флуоресценции **23** (5мкмоль/л, MeCN:H₂O=20:1, Tris-HClpH=7.4) при добавлении катионов Cu²⁺ в раствор, длина волны возбуждения 420 нм. На фото: флуоресценция растворов свободного лиганда **23** и **23** в присутствии Cu²⁺ [74].

основании того, что торсионный угол между фрагментами нафталимида и родамина в структуре соединения **23**, оптимизированной с помощью квантово-химических расчетов, составляет 5°, однако, они не исключают возможность одновременной реализации и ТВЕТ и FRET-процессов. Эффективность работы сенсора *invitro* была исследована на клетках линии MCF7, было показано, что **23** проникает через клеточную мембрану, не проявляет значимой цитотоксичности и позволяет детектировать ионы меди с пределом обнаружения 3.77·10⁻⁷ моль/л.

При добавлении катионов меди в раствор наблюдается появление открытой формы родамина, играющего роль ТВЕТ-акцептора в системе. Данный процесс сопровождается падением интенсивности полосы на 535 нм и появления пика флуоресценции родамина в области 577 нм. Эффективность переноса энергии в системе составляет 81.3%, авторы работы делают вывод о ТВЕТ-природе этого процесса на

Схема 18



Селективные ТВЕТ-хемосенсоры **24** и **25** (схема 18) для обнаружения катионов ртути в водных растворах были описаны авторами работ [75, 76]. Флуоресцентный отклик **24** и **25** обусловлен катион-индуцированным раскрытием спиролактаманного цикла, которое в случае **25** сопровождается реакцией десульфуризации, что делает связывание с катионом необратимым. Хромофорная система родаминового компонента соединения **25** за счет введения сопряженного индолинового фрагмента демонстрирует длинноволновую флуоресценцию ($\lambda_{\max} = 746$ нм, EtOH:H₂O=1:1, об./об.), кроме того 4-морфолинилнафталин обладает свойством двухфотонного поглощения, что позволяет возбуждать молекулу сенсора в области 800 нм. Возможность работы в инфракрасном диапазоне спектра делает пробу **25** перспективным кандидатом для работы в клеточных средах.

2.2.2. Флуоресцентные сенсоры на анионы

Связывание и количественное определение анионов представляет интерес в связи с их важной ролью в природе и жизнедеятельности организмов. Количество известных к настоящему времени комплексонов на катионы значительно превышает число разработанных на сегодня эффективных анионных рецепторов. Это связано в первую очередь с более сложной геометрией анионов по сравнению с катионами, а также часто невысокой плотностью заряда анионных частиц, что требует продуманного дизайна структуры молекул-хозяев и введения множества центров связывания для обеспечения эффективного комплексообразования [77]. Дизайн же сенсорных устройств на анионы представляет собой еще более трудную задачу, так как для их практического применения важна способность связывать анионы и генерировать оптический отклик в водных растворах, где анионы часто сольватированы и существуют в различных формах в зависимости от pH среды. Для преодоления энергетических затрат, связанных с десольватацией аниона при комплексообразовании, необходимо наличие в структуре рецептора множества центров связывания с субстратом посредством водородных, электростатических, гидрофобных взаимодействий, точное соответствие пространственного расположения этих центров геометрии детектируемого аниона для обеспечения селективности связывания. Немаловажной является и конформационная жесткость,

предорганизованность рецептора [78]. Несмотря на то, что в настоящее время существует достаточно много селективных рецепторов на различные типы анионов, большинство из них способны работать только в органических растворителях или труднодоступны синтетически, поэтому разработка высокоселективных, чувствительных, экономически и синтетически доступных сенсоров на анионы в настоящее время является одной из важных задач супрамолекулярной химии.

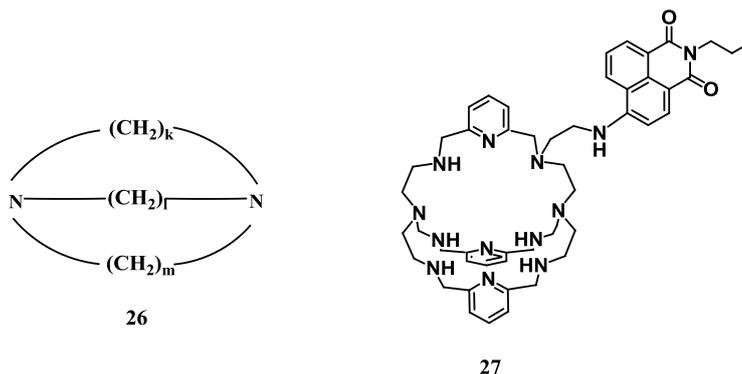
Основные подходы к дизайну анионных сенсоров аналогичны тем, что используются при детектировании катионов – это создание систем «рецептор-флуорофор», работающих по РЕТ и/или ICT-механизму [46]. Основная сложность при дизайне флуоресцентных сенсоров на анионы заключается в преобразовании события связывания рецептора с анионом в оптический сигнал, так как большинство анионов, являясь электроноизбыточными молекулами, тушат флуоресценцию сенсора за счет эффекта переноса электрона [79,80], в то время как разгорание флуоресценции является наиболее предпочтительным сигналом, ввиду того, что оно обычно характеризуется большими значениями оптического отклика и соотношением «сигнал/шум».

Одними из наиболее эффективных и доступных синтетически полидентантных систем являются полиаммонийные криптанды, впервые синтезированные в 1968 году Парком и Симмонсом **26** (схема 19) [81]. Они представляют собой «молекулы-корзины», которые в свободном виде являются основаниями и склонны к координации ионов металлов внутри полости. В кислой среде, будучи частично или полностью протонированными, азакриптанды становятся способны связываться с анионами посредством электростатических взаимодействий и водородных связей [82]. Таким образом, сенсоры, содержащие азакриптандные рецепторы, являются рН-зависимыми.

Влияние рН и концентрации анионов в растворе на оптические характеристики производных азакриптантов было обнаружено Кзарником и сотрудниками в 1989 году [83], однако дальнейшие детальные исследования не проводилось. Только в последние годы в литературе начинают появляться примеры изучения анион-селективных хемосенсоров на основе аза-макроциклов,

построенных по принципу «рецептор-спейсер-флуорофор». Так, совсем недавно группой Е. Катаева были получены криптанд **27** (схема 19), модифицированный флуоресцентным красителем на основе нафталимида. Согласно данным потенциометрического титрования, при рН=3.6 константы связывания для соединения **27** с сульфат ионом достигают значения 10^7 M^{-1} [84], при этом наблюдается разгорание флуоресценции сенсора.

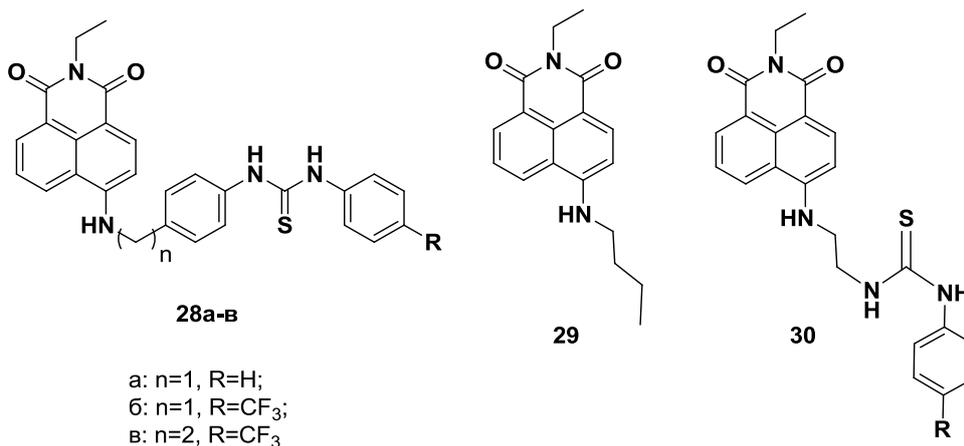
Схема 19



В области химии анионных сенсоров на основе нафталимида одними из лидеров являются исследовательские группы Т. Гуннлаугссона и Ф. Гейла [85-88]. В работе [85] описаны сенсоры на AsO^- и H_2PO_4^- и F^- ионы **28а-в** и **30** (схема 20), содержащие тиомочевинные рецепторные группы и функционирующие по РЕТ-принципу. Флуоресценция **28а-в** и **30** тушится при координации с ионом за счет повышения эффективности РЕТ-процесса. Спектры поглощения соединений **28а-в** практически не изменяются при повышении концентрации ацетат- и дигидрофосфат-анионов в растворе, а степень тушения флуоресценции зависит от строения заместителя в 4-м положении нафталимидного ядра. Наибольшая степень тушения флуоресценции наблюдается для молекулы **28б**, что связано с наличием электроноакцепторной трифторметильной группы в пара-положении фенильного кольца, что увеличивает кислотность NH-протона тиомочевинного остатка, а также меньшим числом метиленовых звеньев в спейсере по сравнению с **28в**. Значения логарифмов констант комплексообразования $\lg K_{1:1}$ составили 2.9 ± 0.1 для **28а** и 3.4 ± 0.1 для **30**. Различие в значениях констант связано с наличием в структуре молекулы **30** аминогруппы, расположенной близко к тиомочевинному сайту, которая служит дополнительным центром связывания. При добавлении к

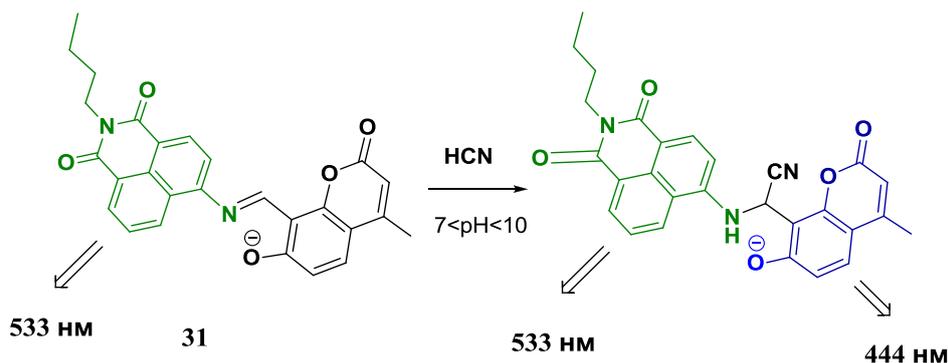
растворам лигандов ионов F^- наблюдается изменение окраски растворов с желтой на пурпурную. Подобные изменения связаны с депротонированием аминогруппы в 4-м положении нафталимидного фрагмента, что было подтверждено ЯМР-титрованием модельного соединения **29**: при добавлении двукратного избытка фторид-иона к лиганду наблюдалось появление триплета в протонном ЯМР спектре в области 16 м.д., что авторы относят к сигналу частицы (HF_2^-) .

Схема 20



Большинство сенсоров, предложенных исследователями на сегодня, являются сенсорами на отличающийся высокой основностью фторид-ион [89-91]. При этом примеры сенсорных молекул для определения биологически важных анионов (хлорид, сульфаты, фосфаты) встречаются в литературе редко.

Схема 21



Я. Ширазиши и сотр. разработали ратиометрический сенсор **31** (схема 21) для определения высокотоксичного цианид-аниона на основе π -сопряженных хромофорных систем нафталимида и кумарина [92]. Фотовозбуждение **31** сопровождается внутримолекулярным переносом заряда с донорного кумаринового

фрагмента на нафталимидное ядро и приводит к появлению полосы эмиссии в области 543 нм. Цианид-анион способен вступать в реакцию нуклеофильного присоединения с иминовым мостиком сенсора **31**, что вызывает нарушение сопряжения между хромофорами. Разобщение нафталимидного и кумаринового хромофоров приводит к появлению в спектрах флуоресценции второй полосы с максимумом 444 нм, соответствующей эмиссии кумарина, в то время как полоса флуоресценции нафталимидного остатка практически не изменяется при добавлении цианид-иона в раствор. Соотношение интенсивностей флуоресценции I_{444}/I_{543} линейно зависит от концентрации цианид-иона в смеси вода/ацетонитрил (1/1, об./об.) при pH=7.0, что позволяет детектировать CN^- с пределом обнаружения 1.9 мкмоль/л (ПДК $_{CN^-}$ = 1.8 мкмоль/л в питьевой воде). Существенным недостатком системы **31** является ее низкая растворимость в воде, авторы работы провели клеточные испытания полученного сенсора, однако использование ДМФА в качестве растворителя привело к созданию чрезвычайно токсичных для клеток условий эксперимента.

2.2.3. Флуоресцентные сенсоры на малые молекулы и биологически активные соединения

Авторами работы [93] были получены конъюгаты нафталимида и 2-нитроимидазола **32a** и **33a** (схема 22), являющиеся ратиометрическими флуоресцентными сенсорами на нитроредуктазы – ферменты, служащие для восстановления ароматических нитрогрупп, избыток которых в клеточной среде может служить маркером восстановительного стресса. Являясь результатом нарушения окислительно-восстановительного дисбаланса в клетке, восстановительный стресс служит предвестником множества заболеваний, в том числе сердечной недостаточности, болезни Альцгеймера или развития опухолевого процесса. При взаимодействии с нитроредуктазами сенсоры **32a** и **33a** подвергаются восстановительному распаду, образуя соответствующие 4- и 3-аминопроизводные **32a** и **33a**.

Схема 22

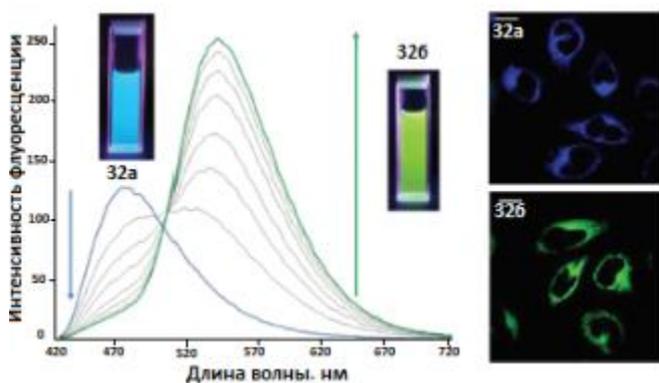
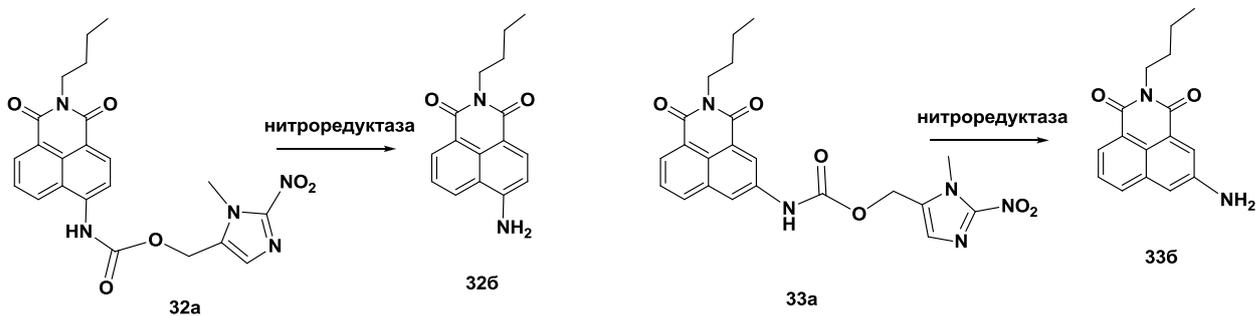


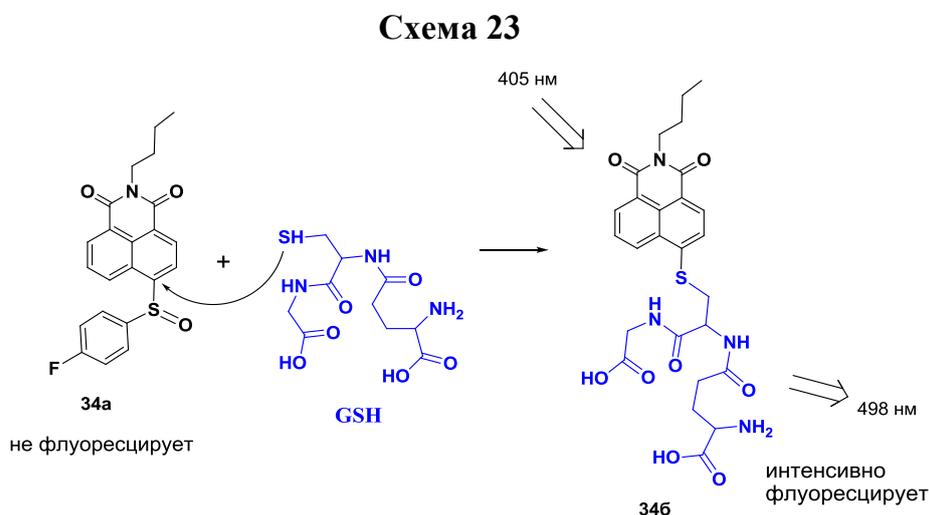
Рисунок 14 - Изменения в спектрах флуоресценции соединения **32** при добавлении раствора нитроредуктазы (10мкмоль/л, фосфатный буфер (ДМСО 0.5%) pH=7.4, $\lambda_{\text{возб.}} = 345$ нм). Флуоресценция **32a** и **32b** в клетках HeLa, детекция 425-475 нм для **32a** и 525-575 нм для **32b** [93].

как расположение заместителя в *meta*-положении к карбонильным группам менее благоприятно для переноса заряда в системе, чем в случае *para*-изомера [93]. В экспериментах на клетках линии HeLa с химически индуцированным восстановительным стрессом была продемонстрирована способность **32a** проникать внутрь клеток, не попадая в ядро, и образовывать 4-аминопроизводное **32b**, обладающее зеленой люминесценцией (рисунок 14).

Хемосенсор **34a** для определения трипептида глутатиона (GSH, схема 23), биомаркера онкологических заболеваний, был разработан на основе сульфоксидного производного нафталимида [94]. Связь между атомом серы и электронодефицитным атомом углерода в 4-м положении нафталинового ядра

Превращение амидной группы в amino- значительно повышает ее электронодонорные свойства, что приводит к увеличению эффективности ИСТ-процесса и батохромному смещению максимумов эмиссии аминопроизводных по сравнению с конъюгатами **32a** и **33a** (рисунок 14). Стоит отметить, что 3-аминопроизводные флуоресцируют менее интенсивно по сравнению с 4-замещенными производными, так

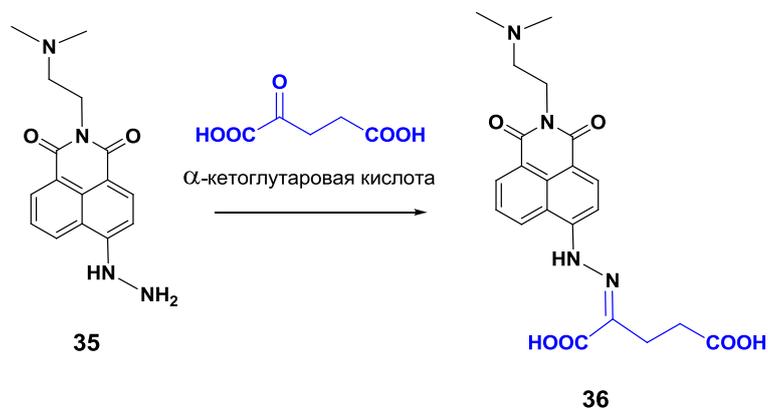
является достаточно слабой в виду незначительного перекрывания $3p$ -орбитали серы и $2p$ -орбитали атома углерода, это облегчает нуклеофильное замещение сульфоксидного остатка соединения **34a**SH-группой глутатиона. Исходное соединение **34a** практически не флуоресцирует ($\phi^{fluor} = 0.0054$) в фосфатном буфере с $pH=7.4$ (биомиметические условия), в то время как в результате взаимодействия с аналитом наблюдается значительное разгорание флуоресценции продукта **346** ($\phi^{fluor} = 0.21$). Предел обнаружения глутатиона с применением сенсора **34a** составил 25 нмоль/л. По результатам испытаний **34a** на клеточной линии HepG2 было показано, что соединение успешно проходит через клеточную мембрану и позволяет с высокой чувствительностью определять концентрации глутатиона внутри клеток.



Флуоресцентный сенсор **35** (схема 24) на аминокетоглутаровую кислоту, потенциальный биомаркер миелоидной лейкемии, был предложен Пенгом и сотр. [95]. Флуоресценция **35** тушится в результате переноса электрона с остатка гидразина. Взаимодействие аминогруппы сенсора с карбонильной группой кетоглутаровой кислоты приводит к образованию основания Шиффа **36**, в котором перенос электрона с атома азота невозможен, в результате чего наблюдается разгорание флуоресценции раствора. Было показано, что **35** селективно реагирует с кетоглутаровой кислотой в присутствии аминокислотами, входящих в состав белков, а также различными дикарбонильными соединениями и активными формами кислорода, присутствие которых в клетках могло бы затруднить анализ. Из рассмотренных соединений только пируват натрия и фенилпуриновая кислота

вызвали слабое разгорание флуоресценции **35**. Сенсор **35** позволяет определять концентрацию кетоглутаровой кислоты в сыворотке крови человека.

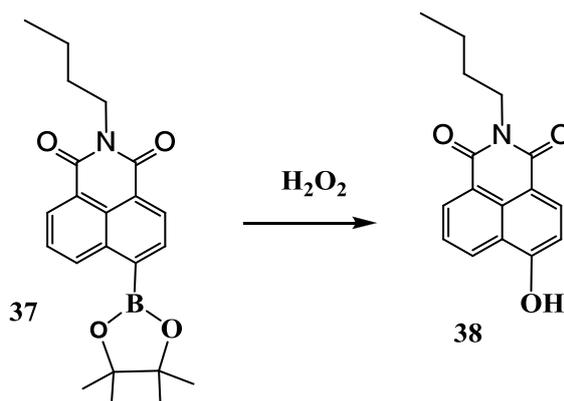
Схема 24



В последние десятилетия в научной литературе появился большой объем исследований, направленных на разработку флуоресцентных сенсоров для детекции активных форм кислорода (АФК). Под АФК понимают синглетный кислород, а также небольшие молекулы, обладающие высокой реакционной способностью благодаря наличию неспаренного электрона на внешней электронной оболочке: пероксид водорода, супероксид анион, гидроксил-радикал и др. Такие частицы способны окислять протеины, липиды и молекулы ДНК. Повышенная продукция АФК приводит к окислительному стрессу – состоянию, которое связывают с развитием многих патологических процессов, в том числе развитием диабета, неврологических и онкологических заболеваний [96].

Группой Ч. Лиу был предложен хемодозиметр **37** (схема 25) для детекции ацетилхолина, действие которого основано на определении количеств перекиси водорода, выделяющейся при окислении аналита ферментом холиноксидазой [97]. Сенсорная молекула представляет собой N-бутилнафталимид, содержащий в четвертом положении боратную группу. Эфиры борной кислоты подвергаются гидролитическому расщеплению под действием нуклеофильной частицы H₂O₂ с образованием интенсивно флуоресцирующего 4-гидроксиафталимиды **38**. Другие примеры флуоресцентных сенсоров на АФК будут рассмотрены в разделе 2.3.

Схема 25



Анализ материала, приведенного в данном разделе, позволяет заключить, что на сегодняшний день производные нафталимида активно применяются в качестве флуоресцентных компонент сенсорных устройств, которые способны работать в водных и клеточных средах. На базе структуры 1,8-нафталимида разработано множество ион-чувствительных молекул, в которых реализуются разнообразные фотофизические процессы: перенос заряда, энергии и электрона, вызывающая разгорание флуоресценции и др. На сегодня наиболее востребованными для практического применения являются ратиометрические сенсорные устройства, как системы с внутренней калибровкой, а также сенсоры, обладающие двухфотонным поглощением, так как они открывают возможности для работы в терапевтическом окне прозрачности биологических тканей. Дальнейшее развитие данной области исследований направлено на разработку систем направленной доставки препаратов, которые позволяют визуализировать биологически важные соединения в определенных типах клеток и их органеллах.

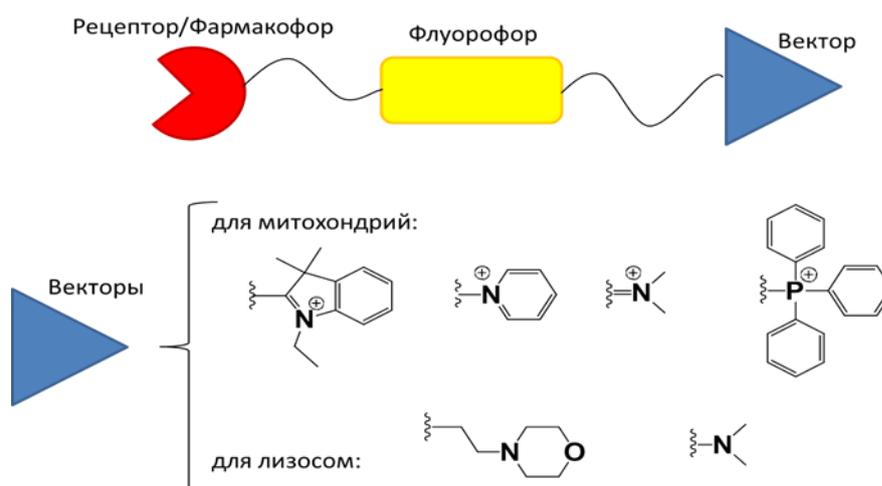
2.3. Флуоресцентные сенсоры с направленной доставкой и препараты для флуоресцентной визуализации

2.3.1. Флуоресцентные сенсоры с направленной доставкой

Разработка препаратов для флуоресцентной визуализации требует создания систем, способных проникать через клеточную мембрану и накапливаться в тех или иных клеточных структурах. На сегодняшний день выявлен набор векторных групп и транспортных белков, введение которых в молекулу обеспечивает ее избирательное накопление в органеллах: ядре, митохондриях, лизосомах,

комплексе Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме [98]. Кроме того, активно развиваются стратегии направленной доставки флуоресцентных маркеров и лекарственных средств в опухолевые клетки. Опухолевые клетки склонны к быстрому делению, для осуществления которого им необходимы большие количества углеводов как источников энергии и фолатов – кофакторов, участвующих в процессе репликации ДНК, по сравнению с нормальными клетками [99]. Ковалентная пришивка фрагментов фолиевой кислоты и глюкозы позволяет улучшать растворимость препаратов в воде, способность проникать сквозь клеточные мембраны, а также повышать избирательность их накопления в опухолевых клетках [100]. В рамках данного раздела будут рассмотрены некоторые примеры химической модификации флуоресцентных сенсоров векторными группами, описанные в литературе за последние 5 лет. Принцип дизайна подобных молекул представлен на схеме 26.

Схема 26

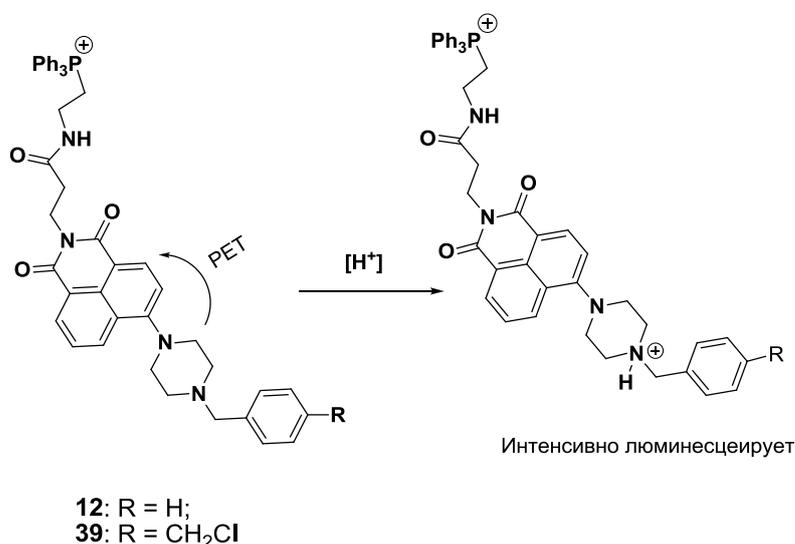


Такие системы включают в себя три функциональных компонента: векторную группу, выполняющую функцию направленной доставки; рецепторный фрагмент, обеспечивающих связывание с аналитом в случае разработки сенсорных устройств, или фармакофорную группу, молекулу-контейнер для инкапсуляции лекарства при создании терапевтических агентов; флуорофор, служащий сигнальной компонентой молекулы и позволяющий с помощью изменения оптических характеристик визуализировать распределение препарата в клетках, а также отслеживать процессы связывания с аналитом или высвобождения лекарственной

формы [101]. Производные нафталимида часто используются в качестве флуоресцентных маркеров при разработке систем направленной доставки [20].

Митохондрии – это органониды эукариотических клеток, основной функцией которых является синтез АТФ. В процессе клеточного дыхания мембрана митохондрий приобретает отрицательный электрический потенциал, поэтому для успешного проникновения через мембрану и накопления в митохондриях флуорофоры связывают с положительно заряженными липофильными фрагментами, такими как катион трифенилфосфина, метилпиридиния, катион индолия и др.

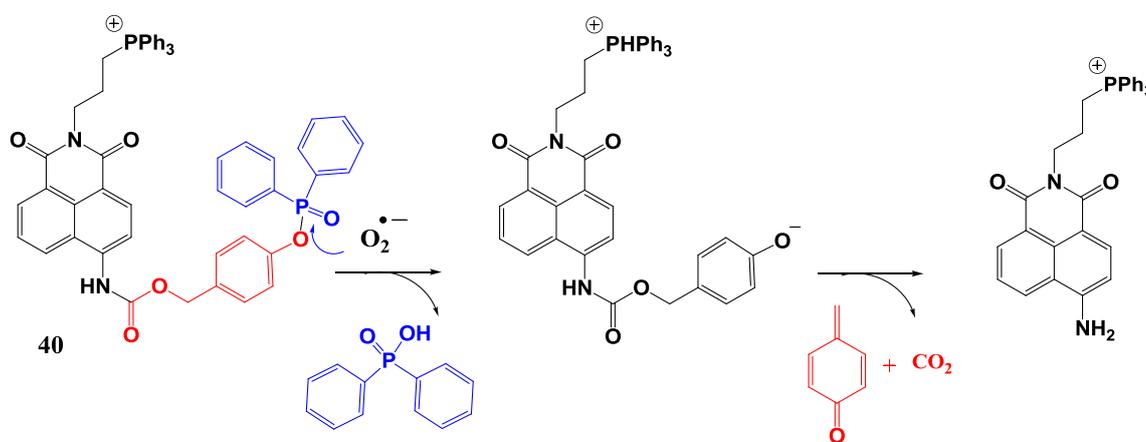
Схема 27



Флуоресцентные зонды для измерения рН среды внутри митохондрий **12** и **39** (схема 27), что позволяет отслеживать физиологические процессы в живых клетках и связанные с этими изменениями, описаны в работе [54]. Соединения **12** и **39** для определения рН на основе нафталимида и пиперазина функционализированы положительно заряженной трифенилфосфониевой группой для транспорта молекулы внутрь митохондрий. Молекула **39** также содержит фрагмент бензилхлорида для фиксации молекулы сенсора в результате реакции нуклеофильного замещения с тиолами, входящими в состав митохондриальных протеинов. Соединения **12** и **39** являются РЕТ-сенсорами: в щелочной среде их флуоресценция подавляется в результате переноса электрона с пиперазинового заместителя на нафталимид (схема 35), при понижении рН среды атом азота

пиперазина подвергается протонированию, что приводит к блокировке РЕТ-процесса. При изменении рН среды от 11 до 2 наблюдается разгорание флуоресценции **12** в области 525 нм в 21 раз. Соединение **12** демонстрирует значение pK_a 6.18 ± 0.049 и позволяет надежно определять значение рН среды в интервале от 5 до 7.5. Кроме того, по результатам испытаний **39** на клетках линии HeLa авторами работы было показано, что сенсор **39** не обладает цитотоксичностью и может быть использован для визуализации митохондрий и количественного измерения рН.

Схема 28



В работе [102] описан ратиометрический ICT-сенсор на основе нафталимида **40** (схема 28), позволяющий детектировать супероксид анион в митохондриях. Предлагаемый авторами работы механизм взаимодействия аниона с рецептором представлен на схеме 36. Первоначально в результате нуклеофильной атаки супероксидного анион-радикала от молекулы сенсора отщепляется дифенилфосфинатный заместитель, затем самопроизвольно отщепляется молекула 4-метилциклогекса-2,5-диенона и углекислого газа с образованием интенсивно флуоресцирующего 4-аминонафталимида, что сопровождается появлением эмиссионной полосы в при 540 нм в спектре (рисунок 15а). Зависимость логарифма отношения интенсивности флуоресценции на длине волны 540 нм к интенсивности пика с максимумом 475 нм от концентрации супероксид аниона оказалась линейной, что позволяет проводить количественное определение детектируемого иона в растворе. Соединение **40** проявило высокую селективность к $O_2^{\cdot -}$ иону по сравнению с другими АФК, биотиолами (цистеином, гомоцистеином, глутатионом)

и некоторыми биологически важными ионами (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , HSO_3^- , SO_3^{2-}).

Эффективность работы сенсора **40** была протестирована *in vivo* не только на клетках линий A549 cells, HepG2 cells и RAW264.7, но и на живом организме – ракообразном *Daphniamagna* (рисунок 15б). По результатам испытаний было показано, что соединение является биосовместимым флуоресцентным сенсором, позволяющим определять содержание супероксид-иона в митохондриях живых клеток.

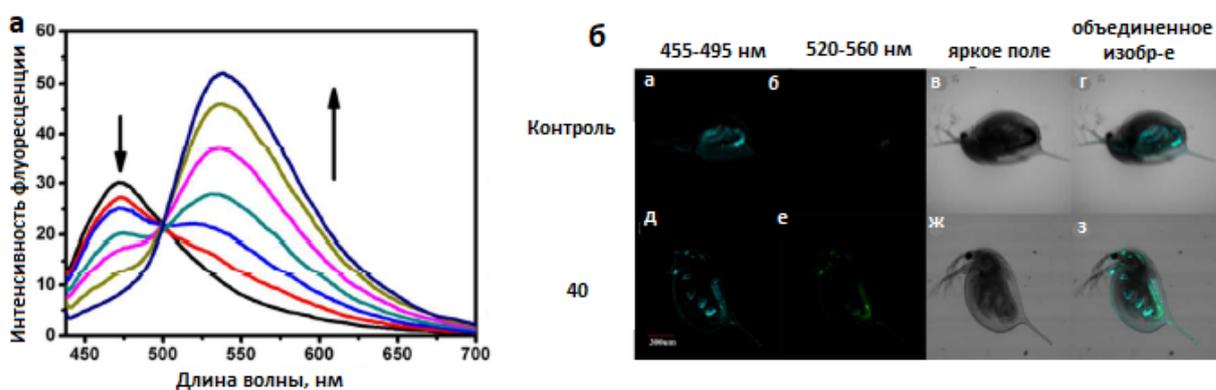
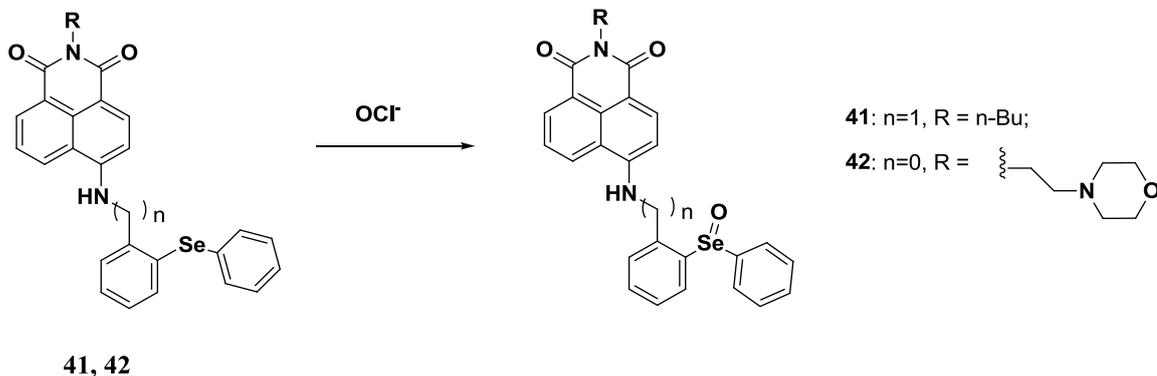


Рисунок 15 – а) Изменения в спектрах флуоресценции раствора **40** (20мкмоль/л, HEPES-буфер/ДМСО=1/1, рН=7.4, $\lambda_{\text{возб.}}$ =415нм); б) *in vivo* изображения организма *Daphniamagna*. а-г: инкубированного с раствором **40** (2мкмоль/л) в течение 2ч при 25°C; д-е: инкубированного с раствором **40** с предварительно химически индуцированным воспалительным процессом (что вызывает повышения концентрации супероксид аниона до микромолярной) [104]

Флуоресцентные сенсоры для детекции гипохлорид-аниона **41** и **42** (схема 29) на основе селенсодержащих производных нафталимида описаны в работах [8,9]. Интересно, что авторы работы [103] объясняют оптический отклик сенсора в рамках теории PET-процесса, в то время как в работе [104] PET-механизм отвергается в связи его несоответствия результатам квантово-химических расчетов. Авторы предполагают, что молекула **41** релаксирует безызлучательно за счет вращения рецепторного фрагмента вокруг связи с аминогруппой в нафталимидном ядре. В результате окисления атома селена гипохлорит ионом кручение в молекуле становится затруднено, что приводит к росту интенсивности флуоресценции молекулы **41**. Сенсор **42**, в структуру которого введен фрагмент морфолина для обеспечения селективного накопления в лизосомах, не показал

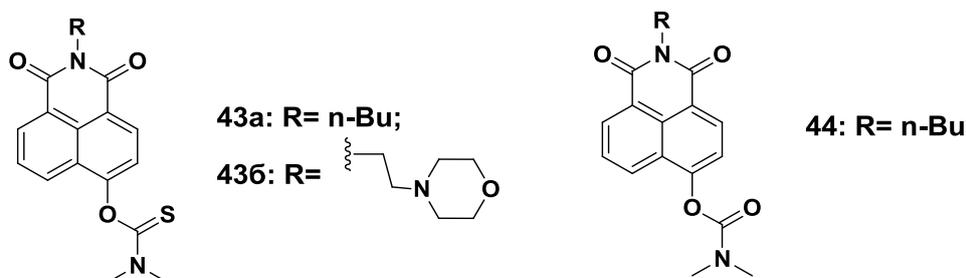
удовлетворительных результатов по визуализации ClO^- , что авторы работы связывают с тем, что предел обнаружения сенсора превышает концентрацию гипохлорит иона в лизосомах клеток, использованных в эксперименте. Соединение же **41** проявило себя как эффективный агент для визуализации гипохлорита в исследованиях на клеточных культурах и мышах.

Схема 29



Б. Жу и сотр. был получен флуоресцентный сенсор на гипохлорит ион **43a** (схема 30), работа которого основана на взаимодействии тиокарбаматной группировки с частицей Cl^+ , образующейся при разложении молекулы хлорноватистой кислоты [105]. Продуктом такого взаимодействия по предположению авторов является депротонированная форма *N*-бутил-4-гидроксиафталимида, интенсивно флуоресцирующая в области 547 нм. Карбаматное производное **44** не взаимодействует с HOCl . Соединение **43a** обладает необычайно низким пределом обнаружения гипохлорит-иона – 7.6 пмоль/л. В клеточных испытаниях была продемонстрирована способность его аналога, соединения **43б**, содержащего морфолиновый фрагмент, проникать в лизосомы, а также визуализировать эндогенную HOCl в опухолях на мышах.

Схема 30

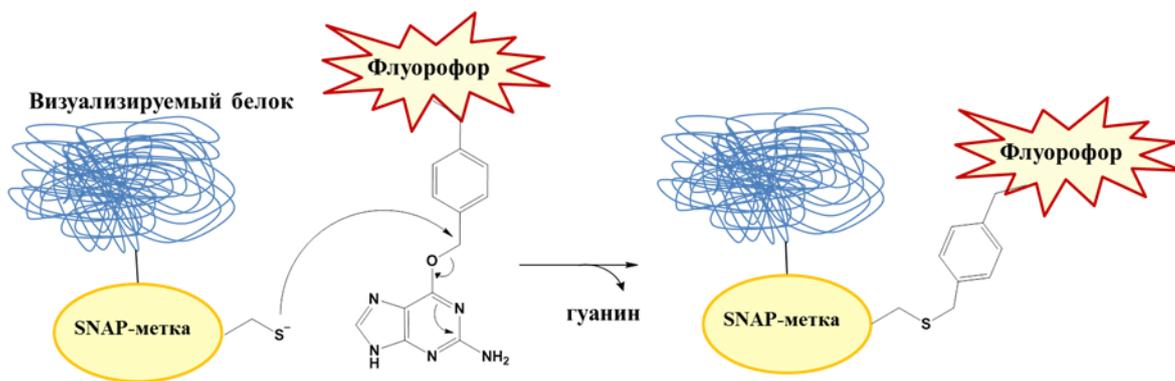


2.3.2. Препараты для флуоресцентной визуализации

Нобелевская премия 2008 года по химии была присуждена О. Симомура, М. Чалфи и Р. Цяню за открытие и разработку методов использования зеленого флуоресцентного белка (GFP – *англ.*, Green Fluorescent Protein) [106]. Расшифровка нуклеотидной последовательности, а также установление гена, кодирующего синтез GFP, позволили проводить внедрение этого гена в клетки различных организмов, добиваясь экспрессии тех или иных белков, помеченных GFP. Данная процедура позволяет проводить флуоресцентную визуализацию отдельных белков клетки, отслеживать их расположение в живых клетках и происходящие с ними изменения. На сегодняшний день открыто множество флуоресцентных белков и их использование является важнейшим инструментом биологически исследований [107]. Однако флуоресцентные белки часто характеризуются невысокими квантовыми выходами флуоресценции, а также быстрым фотообесцвечиванием при воздействии лазерного излучения. Эти недостатки позволяет преодолеть подход, заключающийся в экспрессии белка, представляющего интерес для изучения, соединенного с белком-маркером, который сам по себе не является люминофором, но содержит функциональные группы для пришивки флуоресцентных красителей.

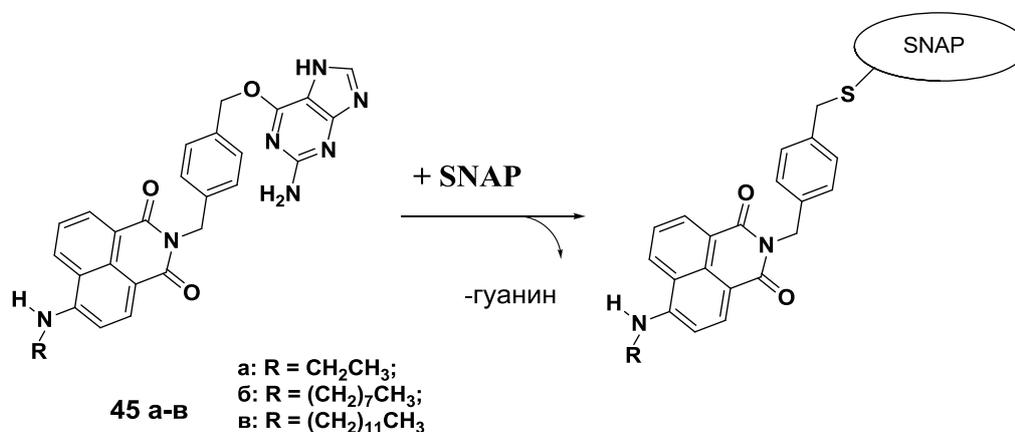
В рамках данного раздела будут рассмотрены примеры использования нафталиimidных красителей в качестве флуоресцентных компонент SNAP-меток для белков. SNAP-метка представляет собой белок, полученный направленной модификацией человеческого фермента O^6 -алкилгуанин-ДНК-трансферазы, отвечающего за репарацию гуаниновых фрагментов ДНК. SNAP-белок способен взаимодействовать с фрагментом O^6 -бензилгуанина, при этом происходит образование ковалентной связи между бензильной и меркаптогруппой с выделением молекулы гуанина (схема 31). Введение остатка бензилгуанина в структуру флуоресцентных красителей позволяет проводить селективную пришивку к SNAP-метке.

Схема 31



Авторами работы [108] были получены флуоресцентные красители на основе 4-аминонафталимида **45а-в** (схема 32), содержащие бензилгуаниновые фрагменты для связывания со SNAP-меткой. Длина алкильного заместителя при атоме азота 4-аминонафталимида оказывает влияние на скорость реакции красителя с меткой. Так константа скорости реакции соединения **45а** с меткой составила $\sim 2031.7 \pm 63.7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, для **45б** снизилась до $165.2 \pm 6.0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, а реакция **45в** была настолько медленной, что константу рассчитать не удалось. Авторы предполагают, что алкильные заместители занимают гидрофобные полости SNAP-белка, тем самым затрудняя взаимодействие бензилгуанинового сайта со SH-группой. Краситель **45а** при сшивке с меткой демонстрирует разгорание флуоресценции в 12 раз, что связано с изменением микроокружения красителя на более гидрофобное в результате ковалентного связывания с белком, а также с высвобождением гуанинового фрагмента, который способен тушить флуоресценцию 4-аминонафталимида в результате PET-процесса.

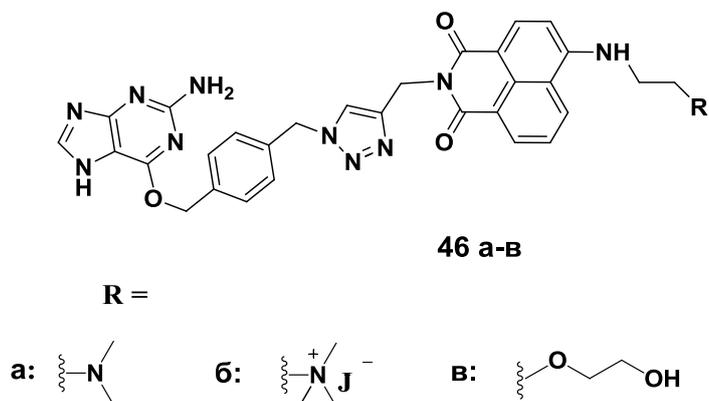
Схема 32



Скорость реакции красителя **45a** с меткой превышает скорости взаимодействия с белками-метками многих коммерчески доступных флуоресцентных красителей. Клеточные испытания показали, что краситель легко проникает через клеточную мембрану и может применяться для метки белков в митохондриях и ядре клеток без стадии промывки клеточных сред от раствора красителя, так как наблюдаемое разгорание флуоресценции при связывании со SNAP-белком достаточно для обеспечения приемлемого соотношения сигнал/шум.

Ч. Вангом и сотр. были разработаны флуоресцентные метки **46a-в** (схема 33)[109], которые благодаря способности к двухфотонному поглощению могут давать флуоресцентный отклик при возбуждении светом с длиной волны, соответствующей ближней ИК области (860 – 890 нм).

Схема 33



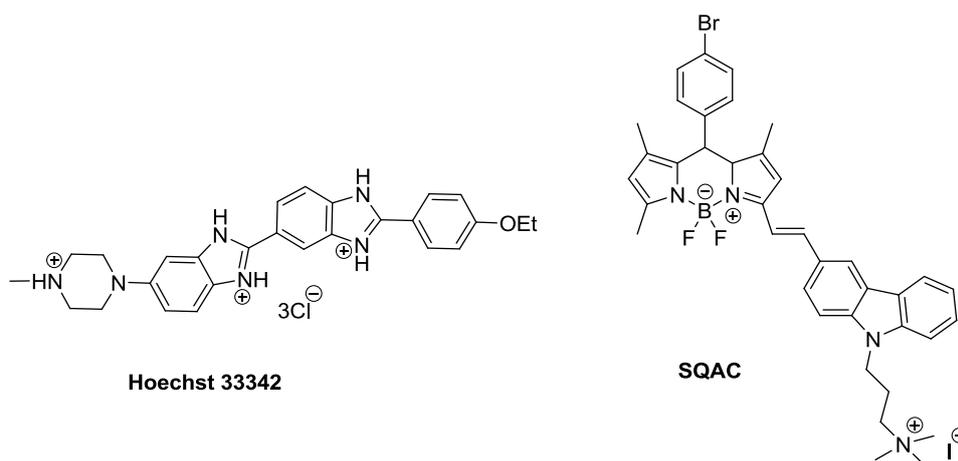
При связывании со SNAP-меткой для **46a-в** наблюдается гипсохромное смещение максимумов поглощения и флуоресценции (таблица 6), а также значительное увеличение квантовых выходов флуоресценции, что, по-видимому, связано со снижением полярности микроокружения красителей. Все три соединения показали эффективное связывания с меткой *in vitro* и на клетках бактерий, однако только соединение **46в** продемонстрировало селективное связывание со SNAP-белком в клетках млекопитающих, что авторы связывают с тем, что молекулы **46a** и **46б** не способны проникать через мембраны клеток.

Таблица 4– Спектральные свойства красителей **46а-в** и их меченых SNAP-белком форм (обозначены как 46-SNAP)

Соединение	$\lambda_{\text{max}} \text{ погл. (нм)}$	$\lambda_{\text{max}} \text{ флуор. (нм)}$	$\epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$	$\phi \text{ флуор.}$
46а	439	536	6440	0.035
46а-SNAP	438	525	9380	0.326
46б	443	529	6940	0.038
46б-SNAP	430	523	14290	0.264
46в	451	532	5180	0.032
46в-SNAP	446	533	13000	0.366

Применение красителей, обладающих свойством двухфотонного поглощения, привлекательно для проведения одновременной флуоресцентной визуализации нескольких типов клеточных структур. Спектры двухфотонного поглощения большинства органических красителей-люминофоров характеризуются наличием широких полос на границе видимой и ИК-области спектра (650 – 900нм) [110], что позволяет ИК излучением с одной длиной волны перевести в возбужденное состояние сразу несколько красителей-люминофоров. Применение светофильтров помогает разделить флуоресцентные отклики и получить многоцветное изображение.

Схема 34



Авторы работы [111] проводили инкубацию клеток линии COS-7, в митохондриях которых содержался SNAP-меченный белок, с красителем **46в** (5мкмоль/л, 1 час), а затем с коммерчески доступными красителями Ноеchst 33342 (0.5 мкмоль/л) и SQAC (5мкмоль/л, 2 мин.). Структуры вышеназванных красителей

представлены на схеме 34. Hoechst 33342 является производным бензимидазола, этот флуоресцентный краситель обладает способностью проникать в ядро клетки и связываться с ДНК (по типу укладывания в малую борозку), комплекс красителя с ДНК поглощает свет в УФ-области (355 нм), при этом испуская синюю флуоресценцию (460-490 нм), позволяя визуализировать клеточное ядро[112]. Флуорофор SQAC представляет собой производное BODIPY, обладающее высокой фотостабильностью, свойством двухфотонного поглощения и длинноволновой флуоресценцией (602 нм) [113]. SQAC применяется в качестве флуоресцентного маркера для клеточных мембран. После инкубации клетки подвергались облучению импульсным лазером и длиной волны 850 нм (для **46в** и SQAC) и 760 нм (для Hoechst 33342). Детекция флуоресценции с использованием соответствующих светофильтров и наложение изображений позволило получить трехцветное изображение клеток, в которых клеточные структуры окрашены в различные цвета (рисунок 16).

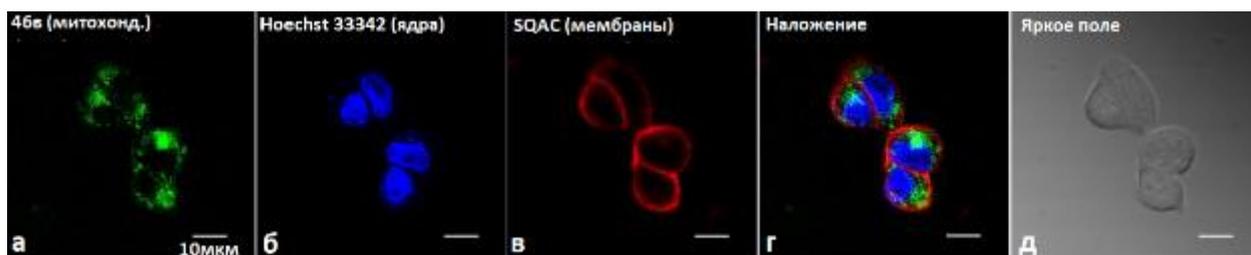


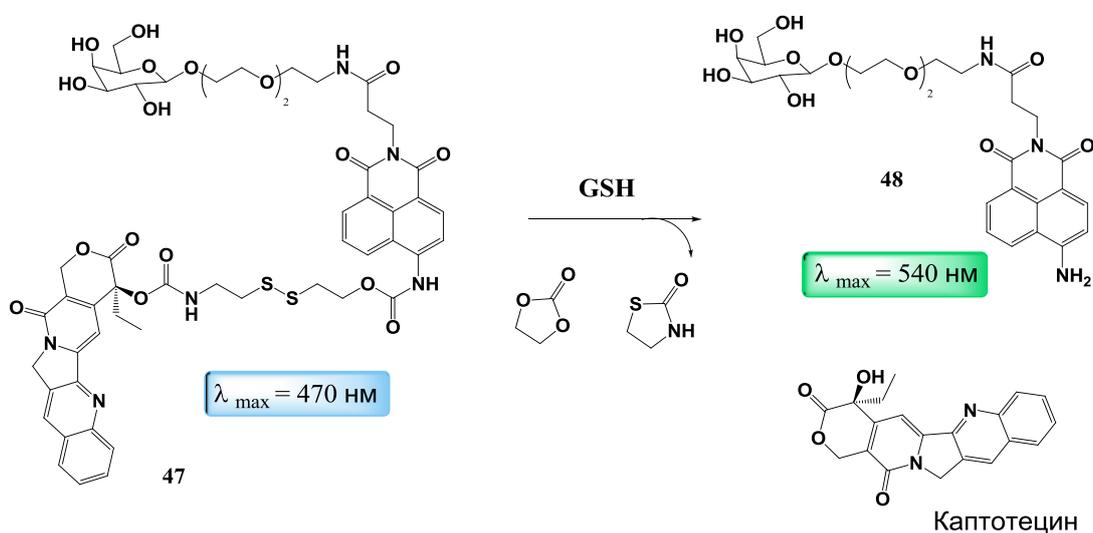
Рисунок 16 – Изображения клеток COS-7, инкубированных с красителями **46в**, Hoechst 33342 и SQAC: а) светофильтр 520-560 нм – для красителя **46в**, изображение митохондрий; б) светофильтр 460-500 нм – для красителя Hoechst 33342, изображение ядер; в) светофильтр 575-630 нм – для SQAC, изображение клеточных мембран; г) суперпозиция изображений а, б и в; д) изображение клеток в белом свете [111]

Значительный прогресс в развитии методов флуоресцентной визуализации, а также успехи в области исследования возникновения и развития патологических процессов в организме на молекулярном уровне привели к возникновению нового направления в медицине, которое носит название «тераностика» (неологизм от слов «терапия» и «диагностика») [114]. Этот новый подход заключается в разработке препаратов, объединяющих в себе функции диагностического и терапевтического агентов, что позволяет существенно увеличить эффективность

лечения. Люминофоры на основе производных нафталимида нашли применение в тераностике в качестве флуоресцентных маркеров.

В работе [115] описана молекулярная система **47** для направленной доставки химиотерапевтического препарата каптотецина (схема 35). Структура соединения **47** помимо самого каптотецина включает в себя несколько функциональных фрагментов: спейсер, содержащий дисульфидный мостик, подвергающийся расщеплению под действием пептида глутатиона (GSH) в опухолевых клетках; остаток галактозы, служащий для доставки в клетки гепатоаденомы и производное 4-аминонафталимида **48** для флуоресцентной визуализации процесса высвобождения активной формы лекарства.

Схема 35



Авторы работы показали, что при добавлении раствора GSH к раствору **47** наблюдается bathochромный сдвиг максимума поглощения от 370 нм до 430 нм, что соответствует поглощению 4-аминопроизводного нафталимида. Флуоресценция сенсора практически не изменяется в широком диапазоне pH среды (рисунок 17а), однако, при добавлении к **47** раствора глутатиона наблюдается значительное разгорание флуоресценции пробы при pH выше 5. Таким образом, соединение **47** подходит для флуоресцентной визуализации высвобождения каптоцецина, так как pH опухолевых клеток имеет значение около 6.4. Кроме того авторами работы была продемонстрировано отсутствие взаимодействия конъюгата **47** с различными аминокислотами (рисунок 17б). Биотиолы цистеин, дитиотретиол и гомоцистеин

вызвали разгорание флуоресценции **47** аналогично глутатиону, однако авторы сочли, что данные взаимодействия можно не учитывать в виду того, что концентрация GSH превышает концентрацию остальных тиолов в клетках более чем на два порядка.

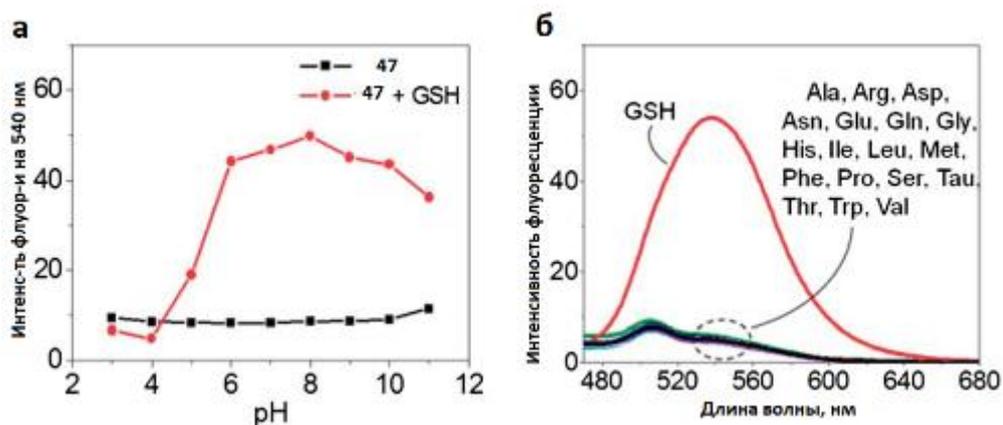
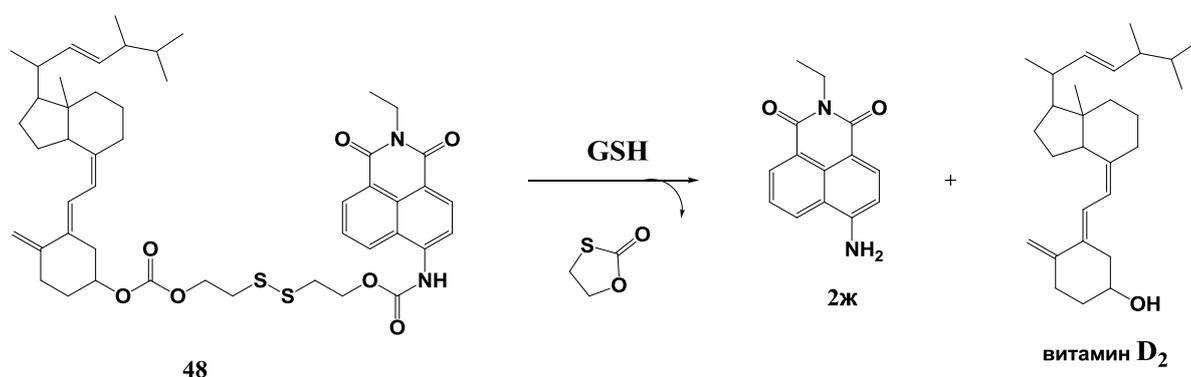


Рисунок 17 –а) Интенсивность флуоресценции растворов **47** (10мкмоль/л) и **47**+GSH (5экв.) при различных значениях pH среды; б) Спектры флуоресценции растворов **47** (10мкмоль/л), **60**+GSH (5экв.) и смесей **60** с различными аминокислотами (1 экв.). Спектры зарегистрированы в фосфатном буфере, $\lambda_{\text{возб.}} = 430 \text{ нм}$ [115]

Клеточные исследования полученного препарата **47** показали, что он эффективно проникает в клетки путем эндоцитоза и накапливается в лизосомах. Фрагмент аминафталимида позволяет проводить эффективный мониторинг высвобождения каптотецина, однако каптотецин не проявил терапевтического действия, что связано с его гидролизом лизосомальными ферментами.

Схема 36



Препарат **48** (схема 36) для визуализации доставки и высвобождения витамина **D₂** под действием глутатиона был разработан группой Х. Жанга [116].

Колориметрический и флуоресцентный отклик пробы **48** также основан на образовании в растворе интенсивно люминесцирующего 4-аминопроизводного нафталимида **2ж** при добавлении к раствору глутатиона (рисунок 18). В течение 30 минут после добавки раствора GSH флуоресценция **48** выходит на плато и позволяет с высокой точностью определить концентрацию глутатиона в растворе, с пределом обнаружения 1.98 мкмоль/л. Клеточные испытания соединения **48** показали, что препарат позволяет успешно визуализировать процесс высвобождения витамина D₂ в клетках, при этом противоопухолевая эффективность витамина против клеток линии HeLa сохраняется.

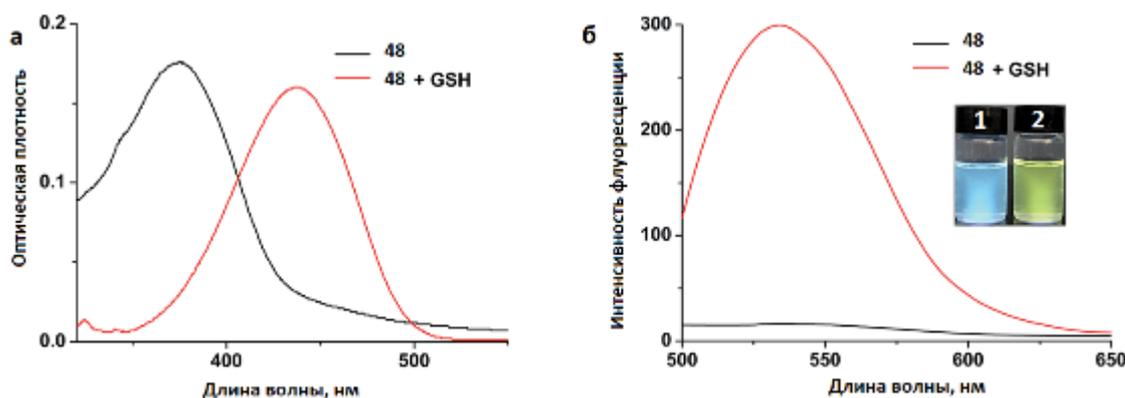


Рисунок 18 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) растворов соединения **48** (10мкмоль/л, фосфатный буфер/ ДМСО=40/60, рН=7.4) до и после добавления GSH (20экв). Фото растворов **48** до (1) и после (2) добавления глутатиона [114]

Разработка флуоресцентных меток для белковых молекул, а также реагентов для визуализации доставки лекарственных препаратов является относительно новым направлением науки, стоящем на пересечении физической, органической и биологической химии. Создание таких систем связано с решением целого комплекса научных задач и требует участия специалистов различных отраслей химии. Однако, в случае успеха в руках ученых оказываются тонко настроенные молекулярные системы, способные визуализировать отдельные химические превращения внутри клеток, проводить мониторинг доставки и высвобождения лекарств и даже следить за теми или иными участками ДНК в процессах деления. Люминофоры на основе 1,8-нафталимида перспективны с точки зрения применения в качестве флуоресцентных маркеров в биологии, так как позволяют с помощью относительно простых

химических превращений получать производные с широким диапазоном спектральных свойств. Большинство из рассмотренных в разделах 2.3. и 2.4. систем проявляет хорошую биосовместимость, а также показывает способность эффективно работать в клеточных средах.

2.4. Связывание производных 1,8-нафталимида с ДНК

На способность некоторых малых молекул образовывать комплексы с ДНК направлено пристальное внимание исследователей, занимающихся разработкой противоопухолевых, противогрибковых и противомикробных препаратов. Это связано с тем, что в результате связывания с лигандом нуклеиновые кислоты часто претерпевают значительные изменения структуры. Кроме того, происходит блокировка специфических сайтов связывания с ферментами. В результате ингибируются или полностью подавляются процессы репликации и транскрипции ДНК, что приводит к гибели клеток [117].

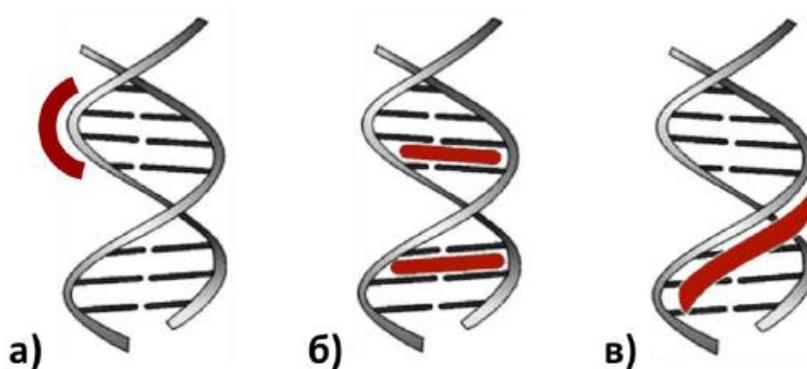


Рисунок 19 – Схематичное изображение типов связывания малых молекул с двуцепочечной ДНК: а) неспецифическое внешнее связывание; б) интеркаляция; в) укладывание в бороздку

Существует несколько типов нековалентного связывания молекул с двуцепочечной ДНК [118,119]:

1) Внешнее связывание (рис.19а). Реализуется в результате электростатического взаимодействия лиганда с сахарно-фосфатным остовом ДНК, является самым слабым и неспецифичным из всех типов;

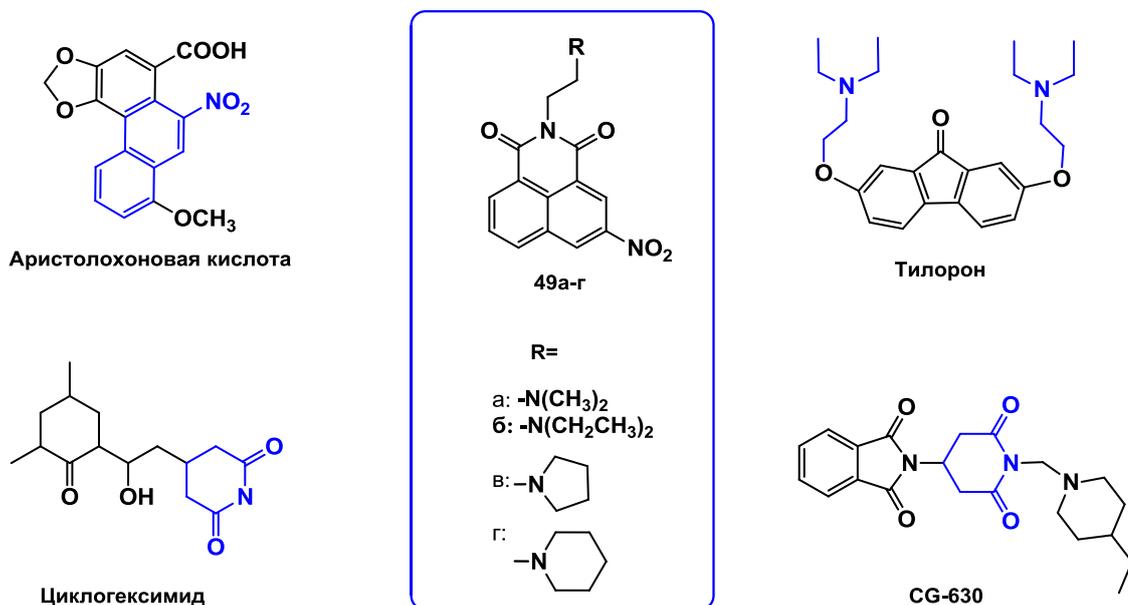
2) Интеркаляция (рис.19б). Характерна для лигандов планарного строения, так как заключается во встраивании лиганда в плоскость между парами азотистых оснований ДНК. Обусловлена гидрофобными, Ван-дер-ваальсовыми силами и

перераспределением зарядов. Большинство интеркаляторов относится к сильно поляризованным или положительно заряженным плоским ароматическим системам.

3) Укладывание в бороздку (рис.19в). Осуществляется за счет взаимодействия лиганда с концевыми функциональными группами азотистых оснований, выступающих в бороздки ДНК. Характерна для конформационно подвижных лигандов, способных встраиваться в изгиб спирали.

В зависимости от строения лигандов, а также последовательности нуклеотидов в ДНК, возможно образование комплексов с более чем одним типом связывания [117]. Определение типа связывания лигандов с ДНК является не простой задачей, для ее решения используют совокупность теоретических и экспериментальных физико-химических методов: квантово-химические расчеты, электронную абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию, циклическую вольтамперометрию, электрофорез, вискозиметрию, спектроскопию кругового дихроизма и др. [120].

Схема 37



Разработка противоопухолевых препаратов на основе производных нафталимида была начата в 70-х годах XX в. группой М. Брана [121]. Авторами работы [122] была синтезирована серия производных нафталимида **49а-г**, в структуре которых сочетались несколько функциональных фрагментов соединений, уже исследованных на предмет связывания с нуклеиновыми

кислотами и проявившими высокую биологическую активность (схема 37): остаток β-нитронафталина от аристоклоновой кислоты, глутаримидный цикл, встречающийся в структурах циклогесимида и CD-603 (производного талидомида), а также алифатическую цепочку, содержащую высокоосновную диалкиламино группу от противовирусного препарата тилорон.

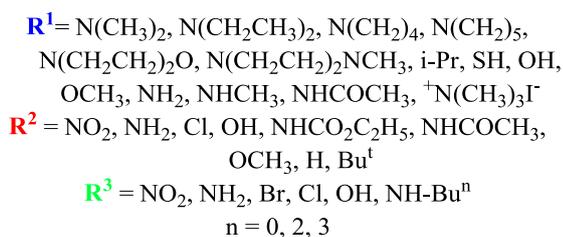
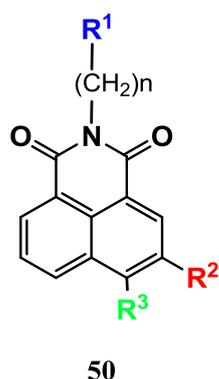
Изучение противоопухолевой активности соединений **49а-г** на клетках линии HeLa выявило, что соединения **49а** и **49в** проявляют более выраженные цитостатические свойства¹ (см таблицу 5), чем препарат сравнения 6-меркаптопурин, применяемый в клинической практике в качестве противоопухолевого средства и иммунодепрессанта.

Таблица 5 - Цитотоксическая активность соединений **49а-г**

Соединение	49а	49б	49в	49г	6-меркаптопурин
ИК ₅₀ ² мкг/мл (HeLa)	0.15	2.5	0.30	2.00	2.90

Впоследствии М. Браной и сотр. из коммерчески доступного 3-нитронафталяного ангидрида было синтезировано более 70 производных общей формулы **50** (схема 38), отличающихся природой функциональных групп R² и R³ в нафталиновом ядре, основной группы R¹ и длиной алифатической цепочки при имидном атоме азота.

Схема 38



Сравнение цитостатических свойств всех полученных соединений выявило следующие закономерности: снижение основности концевой аминогруппы

¹ Цитостатические свойства – способность нарушать процессы роста, деления и развития клеток, в том числе злокачественных, инициируя гибель клеток в результате апоптоза.

² ИК₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования – показатель концентрации вещества, необходимой для ингибирования биологического процесса на 50%.

(уменьшение числа алкильных групп при атоме азота, ацилирование, замена на гидроксид- или меркаптогруппы, кватернизация третичного атома азота *N*-алкильной группы) приводит к снижению цитостатического эффекта. Наибольшей эффективностью обладают соединения, содержащие две метиленовые группы в алифатической части молекулы. Введение функциональных групп в положение 3 нафталимидного ядра является более предпочтительным по сравнению с 2 и 4, что авторы работы связывают с тем, что нитрогруппа в 3 положении может принимать компланарное положение с имидным циклом, интеркалирующим в ДНК, и таким образом становится более предпочтительной для связывания по сравнению с нитрогруппой в положении 4 или 2, где она располагается под углом к плоскости ароматической системы нафталимида [123]. Важным результатом большой работы, проделанной М. Браной и сотр. является создание первого противоопухолевых препаратов ДНК-интеркаляторов на основе нафталимида **49a** (амонафида, *англ.* Amonafide, схема 4). Препарат **49a** выбыл на третьем этапе клинических испытаний для лечения миелоидной лейкемии, так как показал чуть меньшую эффективность в сравнении со стандартной терапией [124].

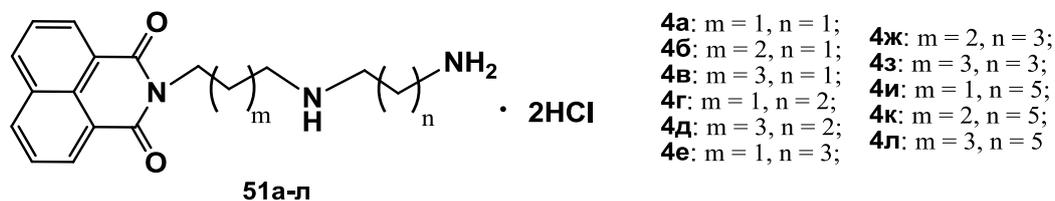
2.4.1. Влияние заместителей при имидном атоме азота на эффективность связывания с ДНК

Ключевым процессом в ходе деления клетки является репликация молекулы ДНК. Это сложный процесс, катализируемый множеством ферментов. На первом этапе репликации происходит изменение топологии молекулы ДНК под действием ДНК-топоизомераз. Эти ферменты подвергают цепи ДНК разрыву, образуются промежуточные ковалентно связанные комплексы топоизомеразы-ДНК, а после перемещения концов разорванной цепи в пространстве целостность молекулы восстанавливается. Топоизомеразы I вносят одностранные разрывы в ДНК, топоизомеразы II- двустранные [125]. Топоизомеразы являются молекулами-мишенями для целого класса химиотерапевтических препаратов, так называемых ингибиторов топоизомераз. Действие этих препаратов основано на том, что в отсутствие топоизомераз восстановление целостности ДНК становится невозможным, в результате чего наблюдается гибель клетки. Предполагается, что

амонафид стабилизирует комплекс топоизомеразы II с ДНК, препятствуя процессу обратной сшивки [126]. Было обнаружено, что близкие по строению соединения, не содержащие при имидном атоме азота цепочки с основной аминогруппой не вызывают стабилизации вышеназванного комплекса, что авторы работы объясняют взаимодействием аминогруппы ДНК-интеркаляторов с активным центром фермента, таким образом указывая на образование тройного комплекса топоизомеразы II-ДНК-интеркалятор. Тот факт, что цитостатическую эффективность проявили только соединения с двумя метиленовыми группами в алифатической части, указывает на точное соответствие такой структуры полости ДНК и расстоянию до сайта связывания с ферментом.

В научной литературе существует большой массив работ, посвященных модификации нафталимидой платформы по различным положениям с целью получения новых биологически активных препаратов. В данном обзоре будут рассмотрены основные закономерности влияния природы и расположения заместителей на связывание производных нафталимида с ДНК.

Схема 39



Тианом и сотр. было изучено связывание с ДНК и противораковая активность производных **51а-л** (схема 6), содержащих различные по длине аммонийные цепочки при имидном атоме азота [127]. Соединения с большим числом метиленовых звеньев **51к** и **51л** показали более низкие значения IC_{50} на клеточных линиях K562, HCT116 и QSG-7701, чем остальные производные. Цитотоксическую активность **51е** в отношении клеток линии рака толстой кишки HCT116 оказалась сопоставима с амонафидом, кроме того соединение продемонстрировало селективность к клеткам линии QSG-7701 и было выбрано авторами для изучения связывания с ДНК как наиболее перспективное. Связывание **51е** с ДНК сельди было изучено методами спектрофотометрического и флуориметрического титрования, результаты представлены на рисунке 20.

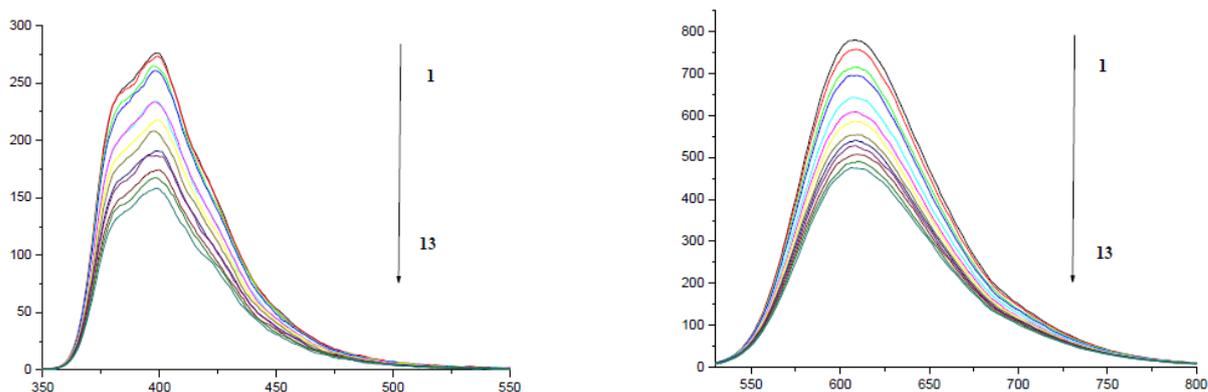


Рисунок 20 –а) спектры поглощения соединения **51e** ($8 \cdot 10^{-5}$ моль/л, буфер Tris–HCl, pH = 7.4) при увеличении концентрации ДНК сельди в растворе от 0 до $13.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; б) спектры флуоресценции комплекса ДНК-БЭ (концентрации компонентов $13.7 \cdot 10^{-6}$ моль/л) при увеличении концентрации **51e** в растворе (Tris–HCl, pH=4) от 0 до $120 \cdot 10^{-6}$ моль/л) [127]

При увеличении концентрации ДНК в растворе, содержащем **51e**, наблюдается снижение оптической плотности (рисунок 20а). Авторы работы объясняют этот эффект тем, что при интеркаляции нафталимида его пустая*–орбиталь частично заполняется электронами азотистых оснований ДНК, что приводит к уменьшению вероятности $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода и проявлению гипохромного эффекта. Для доказательства процесса интеркаляции авторы провели конкурентное спектрофлуориметрическое титрование с использованием бромида этидия (БЭ). Бромид этидия – хорошо изученный ДНК-интеркалятор, комплекс которого с ДНК обладает интенсивной флуоресценцией [128]. Как видно из рисунка 20б, при добавлении в раствор комплекса БЭ – ДНК интеркалятора **51e**, происходит постепенное вытеснение бромида этидия из комплекса, приводящее к тушению флуоресценции раствора. Авторами было показано, что от **51e** связывается с ДНК по типу интеркаляции, основной вклад во взаимодействие вносят водородные и Ван-дер-Ваальсовы связи. Введение аммонийных заместителей не препятствует процессу интеркаляции, но от числа метиленовых звеньев в них зависит биологическая активность. В своей недавней работе [129] Тиан и сотр. представили структуры комплексов соединений **51a-в**, полученные с помощью молекулярного докинга *in silico* (рисунок 21), которые позволяют заключить, что интеркаляция не является единственным типом связывания **51a-в** с

ДНК, в комплексах также наблюдается укладывание аммонийной цепочки в малую бороздку.

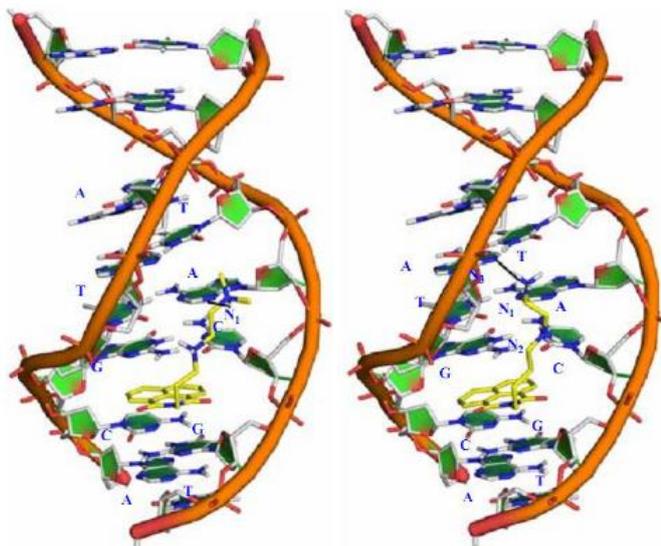
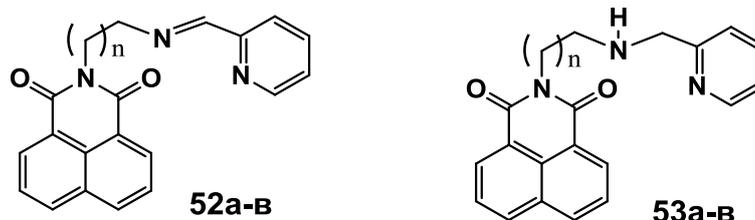


Рисунок 21 – Структуры комплексов соединений **51a**, **51б**, **51в** с ДНК, полученные методом молекулярного докинга *in silico*[129]

Присоединение пиридинового цикла к алифатическому заместителю при имидном атоме азота нафталимидного ядра приводит к изменению типа связывания с ДНК. В работе [130] описано получение, исследование биологической активности серии соединений **52a-в** и **53a-в** (схема 40). Из всех исследованных веществ наиболее перспективными соединениями серии оказались **52a** и **53в**, проявившие антипролиферативную активность против опухолевых клеток линий A549 и MCF-7, сопоставимую с амонафидом (IC_{50} : 6.53 мкМ и 6.30 мкМ для **52a** и 5.67 мкМ, 5.71 мкМ для **53в**, соответственно). С помощью флуоресцентной микроскопии была показана способность быстро проникать через клеточную мембрану и накапливаться в ядре клеток и цитоплазме (рисунок 22).

Схема 40



а: n=1, б: n=3, в: n=5

Соединение **52a** в ходе конкурентного титрования с бромидом этидия не показало вытеснения последнего из комплекса с ДНК тимуса теленка, это означает, что **52a** является менее эффективным интеркалятором, чем ЭБ. Соединение же **53в** вытесняет ЭБ в ходе конкурентного титрования, расчетное значение константы связывания с ДНК на **53в** составляет $3.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ – порядок константы указывает на проявление неспецифического связывания **53в** с ДНК, авторы предполагают, что соединение укладывается в малую бороздку ДНК [130]. Механизм биологического действия **52a** и **53в** не был установлен, авторами работы не было обнаружено ингибирующего действия на ключевые ферменты (полимеразу, топоизомеразы I и II), участвующие в процессе деления клеток.

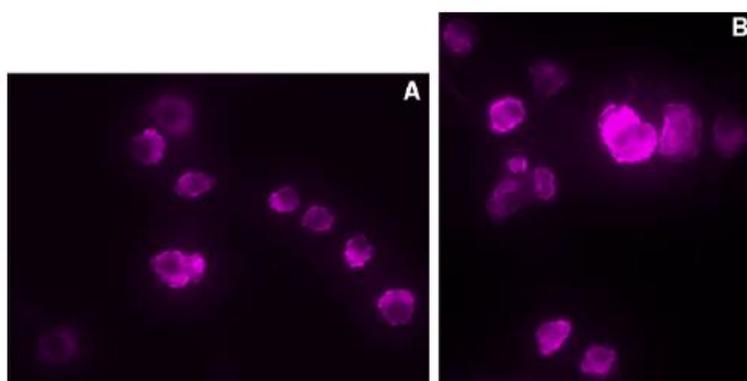
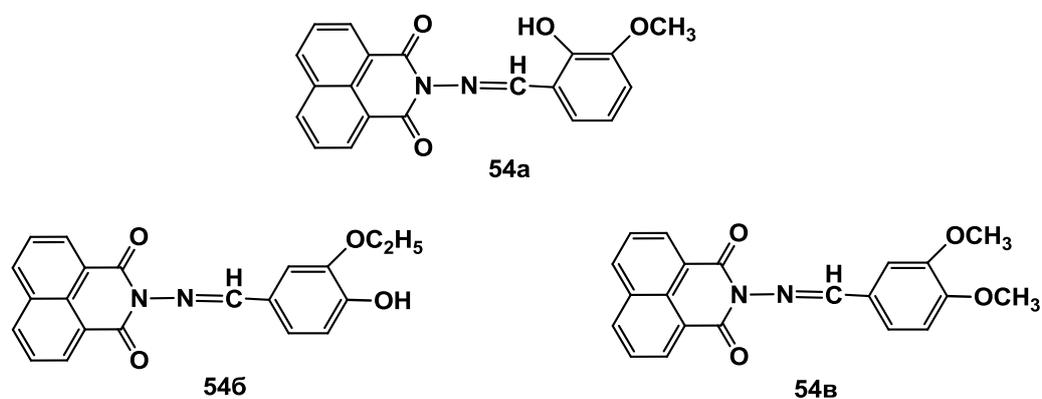


Рисунок 22 – Изображения клеток линии A549, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, через два часа после обработки растворами соединений **52a** (а), **53в** (б), 30мMоль/л [129]

Основания Шиффа **54a-в** (схема 41) интеркалируют в ДНК тимуса теленка, а также демонстрируют противомикробную и антиоксидантную активность, однако константы связывания данных соединений имеют невысокие значения: $2.25 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1}$, $3.33 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1}$, $2.25 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1}$ [131].

Схема 41

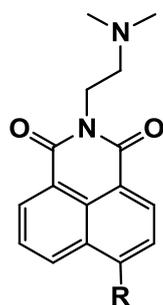


Обобщая информацию данного подраздела, можно сделать вывод о том, что введение жестких ароматических фрагментов в заместители при имидном атоме азота негативно сказывается на прочности связывания производных нафталимида с ДНК, введение высокоосновных аминогрупп является более предпочтительным для создания противоопухолевых препаратов.

2.4.2. Влияние заместителей в нафталимидном ядре на эффективность связывания с ДНК

Вангом и сотр. было изучено влияние введения пиперазиновых и пиперидиновых заместителей в 4-м положении нафталимидного ядра на прочность связывания с ДНК тимуса телят и биологическую активность [132]. Была синтезирована серия соединений **55а-д**. Из пяти соединений серии пиперидин-содержащие соединения **55в-д** (схема 42) продемонстрировали более высокую цитотоксическую активность в отношении линий раковых клеток HeLa и A549 по сравнению с амонафидом. Однако константы связывания с ДНК оказались выше для пиперазиновых производных **55а** и **55б** (таблица 6), благодаря наличию второго атома азота, усиливающего электростатические взаимодействия в комплексе. Авторы работы заключают, что в данном случае прочность связывания с ДНК не является превалирующим фактором, определяющим биологическую активность.

Схема 42



R=

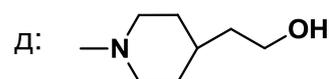
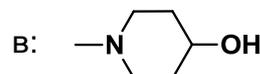
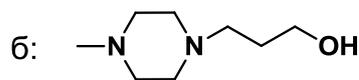


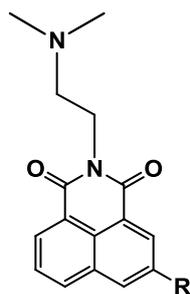
Таблица 6 – Цитотоксическая активность и константы связывания с ДНК соединений 55а-в

Соединение	IC ₅₀ (мкмоль/л)				К (·10 ⁶ моль/л)
	HeLa	MCF-7	SGC-7901	A549	
55а	>50	22.68 ± 0.08	11.84 ± 0.58	5.01 ± 0.09	2.72
55б	10.96 ± 0.15	>50	21.32 ± 0.04	2.19 ± 0.09	3.41
55в	5.03 ± 0.15	>50	6.80 ± 0.18	4.90 ± 0.04	0.92
55г	3.33 ± 0.02	13.89 ± 0.01	4.70 ± 0.42	0.73 ± 0.13	0.79
55д	5.48 ± 0.15	11.88 ± 0.03	3.93 ± 0.36	1.65 ± 0.04	0.47
Амонафид(49а)	4.36 ± 0.13	8.02 ± .03	5.32 ± 0.20	1.59 ± 0.07	-

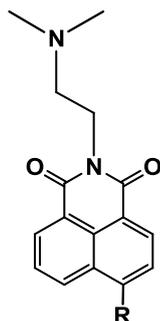
Интеркаляция соединений **55в-д** сопровождается значительным разгоранием флуоресценции, что авторы объясняют снижением образования нефлуоресцентного скрученного состояния с переносом заряда (ТИСТ-состояния, *англ.* Twisted Intramolecular Charge Transfer) после встраивания молекулы между парами оснований ДНК, что связано с затруднением вращения пиперазинового фрагмента относительно плоскости нафталимидного ядра. Наличие ТИСТ-эффекта наряду с цитотоксическими свойствами соединений **55в-д** делает их привлекательными для создания на их основе бифункциональных препаратов для флуоресцентной визуализации и терапии онкологических заболеваний.

В работах [133] и [134] была исследована способность связываться с ДНК 3-замещенных аналогов амонафида **56а-к** (схема 43), а также 4-замещенных производных нафталимида **57 а-л** (схема 43). В исследованиях была затронута важная проблема, с которой связаны препятствия для практического применения малых молекул, способных интеркалировать в ДНК – это низкая специфичность связывания. Из-за малого размера молекулы оказываются способны проникать между любыми парами азотистых оснований ДНК, что приводит к высокой токсичности. Дизайн молекул, демонстрирующих высокие константы связывания с ДНК, но при этом распознающих определенные последовательности нуклеиновых кислот, на сегодня является наиболее актуальной задачей в области разработки химиотерапевтических препаратов для практического применения [121].

Схема 43



56 а-к



57 а-л

R=

а: H; б: NO₂; в: CH₃;
г: Cl; д: Br; е: I;
ж: OH; з: NH(CH)(CH₃)₂;
и: NHCOCH₃; к: Ph; л: NH₂

Наиболее часто в литературе встречаются примеры изучения интеркаляции производных нафталимида с ДНК тимуса телят (*англ.* calfthimus DNA, CtDNA) и ДНК молок сельди (*англ.* herringsperm DNA), что связано с доступностью биоматериалов для их получения и относительной дешевизной. Однако из-за огромного количества сайтов связывания получить информацию о специфичности взаимодействия интеркалятор ДНК невозможно. В работах [133] и [134] способность производных нафталимида избирательно связываться с теми или иными участками ДНК и РНК была исследована на относительно коротких цепочках нуклеотидов с известной последовательностью.

В таблице 7 представлены результаты эксперимента по плавлению (денатурации) следующих олигонуклеотидов в присутствии и отсутствии интеркаляторов **56а-к**: 5'-d(АТАТАТАТАТАТ)2-3' (**А**), 5'-d(АТАТАТГАТАТА)-3'/5'-(ТАТАТСАТАТАТ)-3' (**В**), 5'-d(АТАТАГТАТАТА)-3'/5'-(ТАТАТАСТАТАТ)-3' (**С**), 5'-d(ГТААТАТТАС)2-3' (**Д**), 5'-d(ГСГСГСГС)2-3' (**Е**), 5'-d(ГТССГСГГАС)2-3' (**Ф**), 5'-d(ГТССГТССГГАС)-3'/5'-(ГТССГАСГГАС)-3' (**Г**), 5'-r(ГСГСГСГС)2-3' (**Н**), 5'-r(ГУССГСГГАС)2-3' (**И**) и 5'-d(СГАТСГ)2-3' (**Ж**). Повышение температуры плавления олигонуклеотидов, вызванные добавлением лиганда ($\Delta T_{пл}$) свидетельствуют о том, что лиганд посредством интеркаляции стабилизирует их дуплексную структуру по отношению к денатурации на отдельные цепи.

В общем случае введение электроакцепторной группы в 3-положение нафталимидного ядра повышает аффинность лигандов к фрагментам ДНК и РНК любого строения. Так среднее значение $\Delta T_{пл}$ для электродефицитных структур

56а, 56г, 56д и 56е составляет 6.5 °С, а для **3а, 56в** и **56ж-к**, содержащих донорные заместители – 4.8 °С [133].

Таблица 7 - Значения $\Delta T_{пл}$ (°С) комплексов нафталимидов **56 а-к** и амонафида (**3а**) с ДНК и РНК олигонуклеотидами

Соед-е	А	В	С	Д	Е	Ф	Г	Н	Ж	Среднее знач.
3а - амонафид	Н/С	14.6	10.1	11.6	16.9	5.1	Н/С	1.1	1.0	9.7
56а	Н/С*	19.4	11.6	8.1	8.7	5.6	Н/С	Н/С	Н/С	8.9
56б	Н/С	17.2	11.7	12.6	14.3	13.3	5.0	1.8	2.2	12.4
56в	Н/С	5.1	Н/С	Н/С	3.2	2.7	Н/С	Н/С	Н/С	1.8
56г	Н/С	7.0	Н/С	4.5	6.3	1.1	Н/С	Н/С	Н/С	3.2
56д	Н/С	13.9	10.8	6.3	9.5	6.0	Н/С	1.6	2.0	7.8
56е	Н/С	8.4	1.7	4.4	2.5	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С	2.8
56ж	Н/С	14.7	5.7	4.4	1.6	1.6	2.2	Н/С	Н/С	5.0
56з	Н/С	16.4	Н/С	7.3	7.9	Н/С	2.1	Н/С	1.1	5.6
56и	Н/С	8.8	4.7	8.6	4.6	5.6	Н/С	Н/С	Н/С	5.4
56к	Н/С	1.3	5.8	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С	Н/С	1.2
Среднее значение	Н/С	11.5	5.6	6.2	6.9	3.7	Н/С	Н/С	Н/С	

*Н/С – нет связывания. Для расчета средних значений использовались данные для нуклеотидов **В-Г**.

Наиболее эффективным интеркалятором среди **56а-к** является соединение **3а** (амонафид), для которого среднее значение $\Delta T_{пл}$ составляет 12.4°С, в то время как соединения **56к** и **56в** демонстрируют наиболее слабую стабилизацию дуплексов. Как видно из таблицы 5, одно и то же производное нафталимида с разными типами дуплексов дает широкий диапазон значений $\Delta T_{пл}$, что может объясняться повышенным сродством лиганда к тем или иным азотистым основаниям. В этом случае лиганд будет в первую очередь связываться с определенным мотивом цепи, а затем занимать оставшиеся для связывания сайты. При этом стабилизация цепей, где нуклеотид с нужным основанием отсутствует, очевидно, будет слабее. Вторая причина различий в $\Delta T_{пл}$ может заключаться в том, что одна и та же нуклеотидная последовательность, связанная с лигандом, расположенная в конце или в середине дуплекса может в разной степени стабилизировать его структуру. Интересно, что

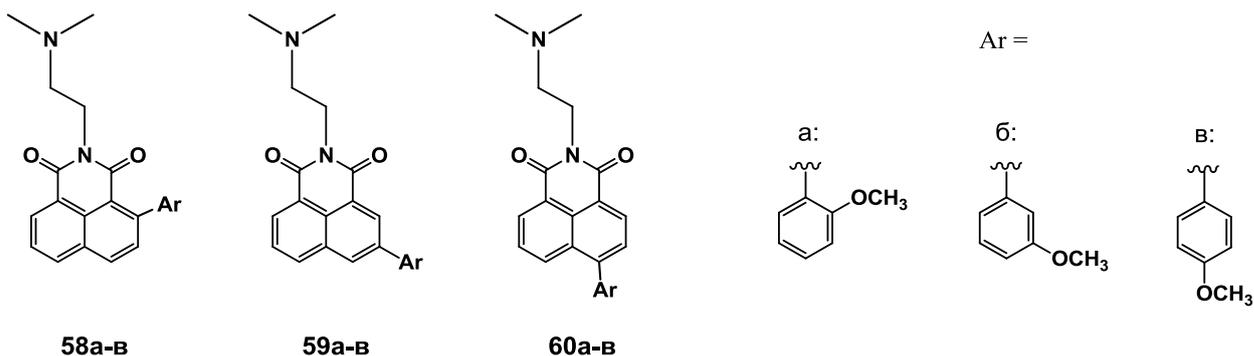
ни одно из исследованных соединений не связывается с последовательностью А-Т (дуплекс А). При этом для каждого дуплекса существует свой набор наиболее эффективно связывающихся с ним соединений: **56б** и **3а** для **D** и **E**, **56б** и **56д** для **F**. Дуплексы **H** и **I** являются мотивами РНК, соответствующими по последовательности ДНК-мотивам **E** и **F**. В целом, все исследованные соединения гораздо слабее взаимодействуют с олигонуклеотидами РНК, чем ДНК.

Так как основным типом взаимодействий, реализующихся при интеркаляции, является стекинг-взаимодействие, наличие в структуре лиганда групп, способных принимать компланарное положение относительно его π -системы является важным фактором: так, для нитрозамещенного **56б** $\Delta T_{пл. ср} = 12.4^\circ\text{C}$, а для соединения с метильной группой **56в**, которая не может расположиться строго в одной плоскости с нафталиновым ядром, $\Delta T_{пл. ср.} = 1.8^\circ\text{C}$. Объемный заместитель также препятствует эффективной интеркаляции: $\Delta T_{пл. ср.}$ для йод-замещенного **56е** - 2.8°C . В случае соединения **56к**, по-видимому, и размер заместителя и его ориентация относительно ароматической системы отрицательно сказываются на эффективности интеркаляции.

Производные нафталимида, замещенного по 4 положению, **57а-л**, демонстрируют похожие закономерности связывания с олигонуклеотидами [134]. Для них так же не наблюдается связывания с А-Т последовательностями и низкое сродство к РНК-структурам. В целом, 4-замещенные нафталимида менее эффективно стабилизируют дуплексные структуры ДНК и РНК по сравнению с 3-замещенными (средние значения $\Delta T_{пл.}$ для нитро- и аминзамещенных: 5.4°C и 5.3°C , соответственно).

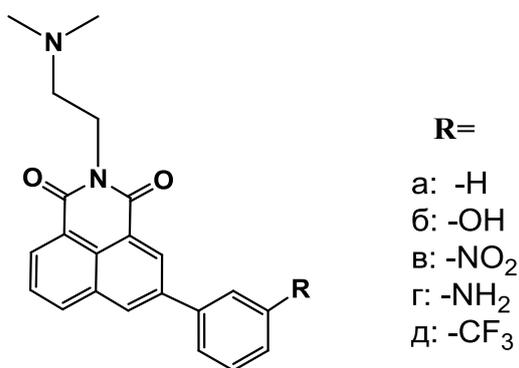
Влияние положения заместителя в нафталимидном ядре и его природы на биологическую активность производных нафталимида было рассмотрено группой испанских ученых на примере серии соединений **58а-в**, **59а-в**, **60а-в** (схема 44) [135]. Как видно из таблицы 6, только 3-арилзамещенные производные показали высокую антипролиферативную активность, что подтверждает сделанные ранее выводы о том, что замещение по 3-му положению предпочтительно для разработки эффективных противоопухолевых препаратов.

Схема 44



Варьирование природы заместителя в ароматическом кольце на примере соединений **61a-д** (схема 45), выявило, что соединения с электроноакцепторными группами в целом обладают более высокой токсичностью против клеток линии SKBr-3, чем амонафид (таблица 8). Наличие же функциональных групп, являющихся донорами водородной связи (**61б**, **61г**) приводит к снижению антипролиферативной активности. Метокси- производное **59б** показало максимальную цитотоксичность против линии SKBr-3.

Схема 45



61 а-д

Таблица 8 - Антипролиферативная активность соединений **58-61** на клеточной линии SKBr-3.

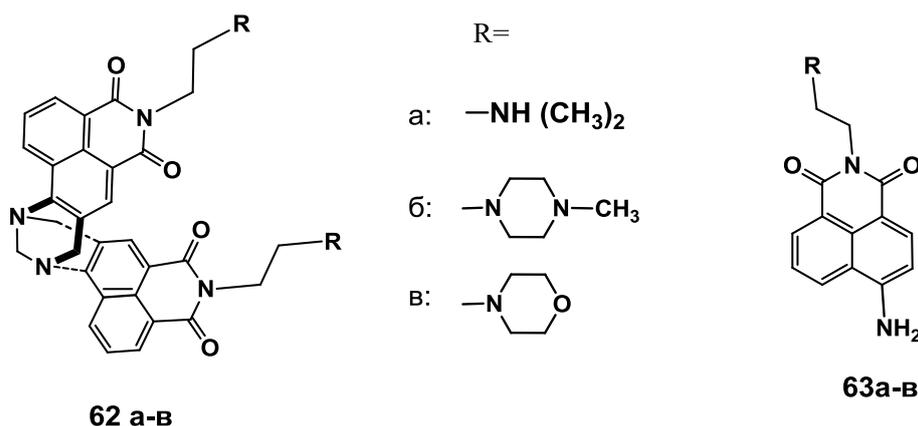
Соединение	IC ₅₀ , мкмоль/л SKBr-3	Соединение	IC ₅₀ , мкмоль/л SKBr-3	Соединение	IC ₅₀ , мкмоль/л SKBr-3
58a	24.0±4.1	59в	1.5±0.3	61б	4.4±0.8
58б	>30	60a	>30	61в	1.2±0.4
58в	>30	60б	>30	61г	14.2±2.4
59a	11.9±3.1	60в	27.6±3.1	61д	1.2±0.3
59б	0.3±0.1	61a	0.8±0.1	Амонафид	7.4±0.9

Авторы работы полагают, что соединения **61a-d** также как и амонафид связываются с ДНК по типу интеркаляции, а по механизму биологического действия относятся к ингибиторам топоизомеразы II. Наличие ароматических колец с функциональными группами повышает прочность комплекса с ДНК по сравнению с амонафидом за счет дополнительных стекинг-взаимодействий и водородных связей, тем самым повышает биоактивность соединений.

2.4.3. Взаимодействие бис(нафталимидов) с ДНК

Тип связывания бис(нафталимидных) молекул с ДНК определяется длиной и подвижностью спейсера, соединяющего ароматические фрагменты. Так, например, при использовании в качестве спейсера хирального основания Трегера (соединения **62a-в**, схема 46), жестко фиксирующего положение нафталимидов в пространстве, при связывании с ДНК наблюдается интеркаляция одного из фрагментов и залегание в бороздку другого [136]. В условиях физиологического значения кислотности среды (pH=7.4) молекулы **62a** и **62б** протонированы (pKa составляют 8.7, 8.2 и 6.0 для **62a-в**, соответственно), они связываются с ДНК посредством сильных электростатических взаимодействий и демонстрируют высокие константы связывания с ДНК тимуса теленка на уровне 10^6 моль⁻¹, их значения в несколько раз превышают константы связывания соответствующих мононафталимидов **63a-в**.

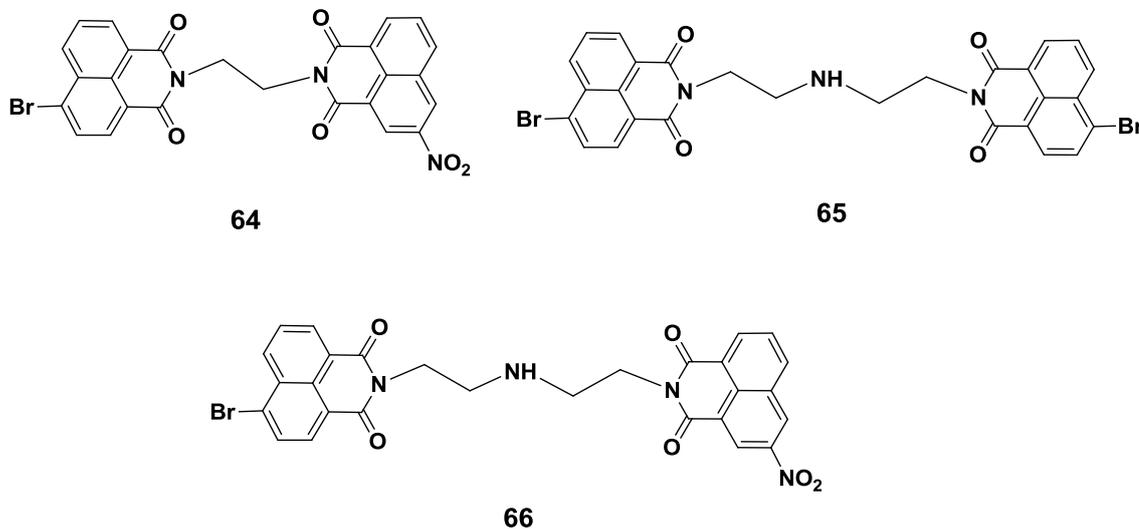
Схема 46



Бис(нафталимиды) **64-66** (схема 47) имеют гибкий спейсерный фрагмент, который позволяет обоим ароматическим остаткам интеркалировать в молекулу ДНК, в то время как спейсер располагается вдоль большой бороздки спирали [137]. Соединение **64**, имеющее короткий спейсер, создающий стерические трудности для

одновременной интеркаляции двух нафталиimidных фрагментов, обладает наименьшей константой связывания: константы связывания соединений **64**, **65** и **66** составляют $3.48 \cdot 10^4$ моль⁻¹, $5.53 \cdot 10^4$ моль⁻¹, $4.98 \cdot 10^4$ моль⁻¹, соответственно.

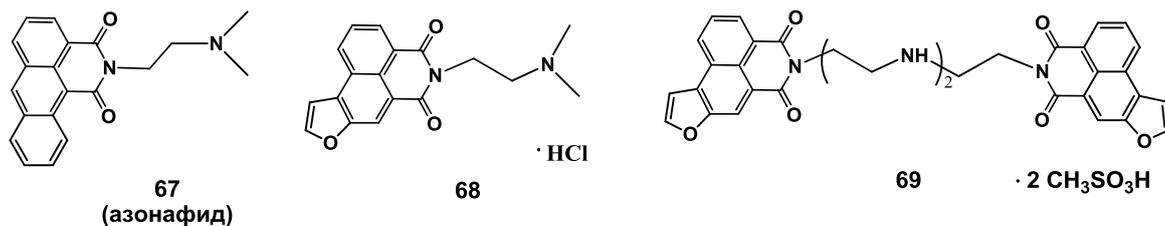
Схема 47



2.4.4. Влияние аннелирования ароматических и гетероароматических фрагментов на эффективность связывания с ДНК

Как было показано на примере препарата азнафида (соединение **67**, схема 15), введение дополнительного ароматического кольца в структуру нафталиimidного хромофора приводит к получению производных, обладающим еще более высокой цитотоксичностью, связанной с аффиностью к ДНК [138]. Байли и сотр. было изучено влияние присоединения к структуре амонафида фуранового цикла на биологическую активность и эффективность связывания с ДНК [139]. Соединение **68** (схема 48) продемонстрировало селективность к цитозин-гуаниновым (Ц-Г) сайтам по сравнению с аденин-тиминными (А-Т): константа связывания с Ц-Г-мотивом оказалась в 3 раза выше чем с А-Т (таблица 9). Для бис(нафталиimidного) производного **69** (схема 48) было найдено, что константы связывания выше по сравнению с мономером на 3 порядка.

Схема 48



Авторы работы связывают селективность к Ц-Г сайтам с наличием фуранового кольца, атом кислорода которого образует водородные связи с аминогруппами гуанина, расположенными в малой бороздке.

Таблица 9 - Константы связывания **68-69** с нуклеотидами [А-Т]₄ и [Г-Ц]₄.

Соединение	нуклеотид	К _{св} (М ⁻¹)
68	[А-Т] ₄	4.6·10 ⁴
	[Г-Ц] ₄	1.38·10 ⁵
69	[А-Т] ₄	1.44·10 ⁷
	[Г-Ц] ₄	1.83·10 ⁸

В качестве заключения по результатам анализа литературы, посвященной связыванию производных 1,8-нафталимида с ДНК, можно сделать следующие выводы об оптимальной структуре потенциальных комплексонов: 1) наличие высокоосновной концевой amino-группы в заместителе при имидном атоме азота принципиально важно для эффективного связывания; 2) замещение нафталимида по 3-му положению является предпочтительным по сравнению с 4-м; 3) расширение хромофорной системы нафталимида за счет введения дополнительных ароматических колец позволяет повысить константы связывания с ДНК на несколько порядков; 4) большинство производных нафталимида не связывается с А-Т сайтами ДНК, однако данной селективности не достаточно для разработки эффективных химиотерапевтических препаратов. Приоритетной является задача разработки систем, обладающих селективностью по отношению к определенным последовательностям нуклеиновых кислот.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

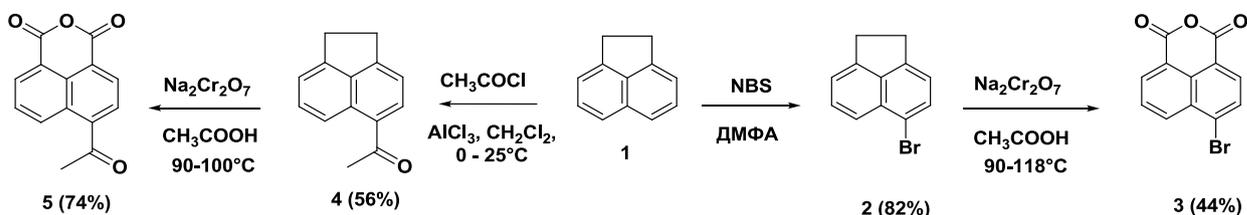
При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [138-141].

Важными параметрами для выбора потенциального флуорофора для флуоресцентной диагностики являются: наличие длинноволнового максимума поглощения в оптических спектрах, эффективная люминесценция, высокая фотостабильность и значительное различие длин волн возбуждающего и излучаемого света. Большинство производных нафталимида отличается значительной фотостабильностью и высокими значениями Стоксова сдвига. Как показал литературный обзор (раздел 2.1), введение электронодонорных заместителей в четвертое положение нафталимидного ядра приводит к появлению длинноволновых полос поглощения, обусловленных переносом заряда с заместителя на дикарбоксиимидную группировку нафталимида, а также сопровождается повышением квантового выхода флуоресценции. Так, введение пиразолинильного фрагмента в 4-е положение нафталимида позволяет получать хромофоры, максимум флуоресценции которых располагается в области 670-680 нм [41, 42]. Известно, что 4-стирилзамещенные производные нафталимида могут быть использованы как флуоресцентные маркеры и сенсоры для клеток [40,56], так как обладают способностью проникать через клеточную мембрану и интенсивно люминесцировать в клеточной среде. Кроме того, производные нафталимида, замещенные по 4-му положению в целом показывают более низкую цитотоксичность по сравнению с 3-замещенными. Поэтому для разработки флуоресцентных навигаторов для ФДТ нами были выбраны 4-пиразолинил- и 4-стирилнафталимиды, содержащие при имидном атоме азота различные спейсерные группы для дальнейшей пришивки фотосенсибилизатора.

Классическая схема синтеза N-замещенных нафталимида включает в себя стадии электрофильного замещения аценафтена по ароматическому ядру, окисление и последующее имидирование производных нафталевого ангидрида первичными аминами [142]. Основным сырьем для промышленного производства производных 1,8-нафталимида служит аценафтен – один из продуктов

фракционирования каменноугольной смолы [143]. В рамках данной работы в качестве промежуточных продуктов для получения целевых флуорофоров на основе нафталимида нами были использованы 4-бром и 4-ацетилнафталевый ангидриды, полученные по схеме 1.

Схема 1



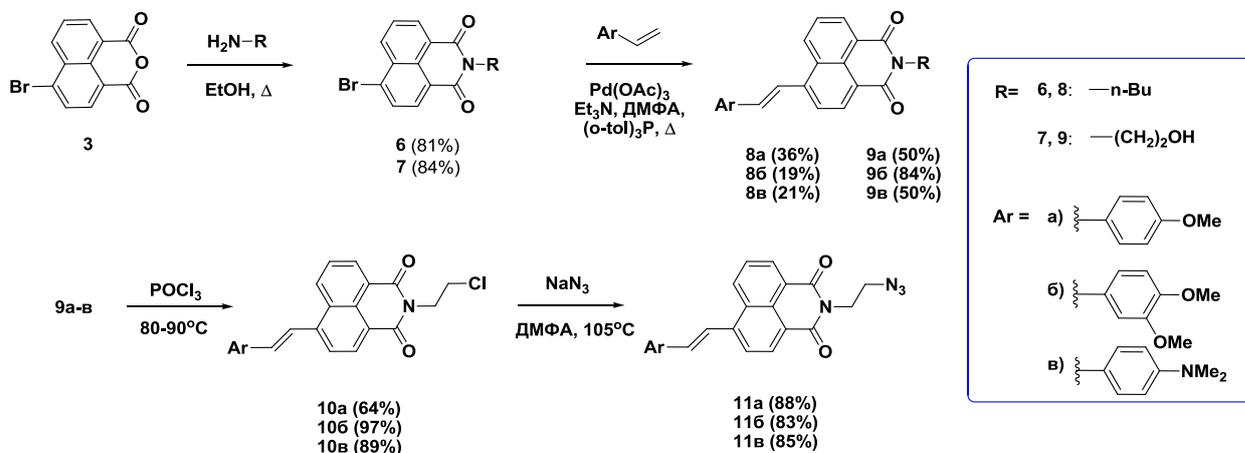
Бромирование аценафтена **1** N-бромсукцинимидом проводилось при комнатной температуре в среде ДМФА, выход целевого продукта составил 82%. Окисление 4-бромацетнафтена **2** проводилось кипячением с двуводным бихроматом натрия в ледяной уксусной кислоте в течение 5 часов. Очистка 4-бромнафталевого ангидрида **3** осуществлялась методом переосаждения: продукт растворяли при кипячении в 10% растворе гидроксида натрия, удаляли не растворившиеся примеси горячим фильтрованием, а затем подкисляли фильтрат соляной кислотой до pH=3-4. Фильтрование выпавшего осадка и перекристаллизация его из ледяной уксусной кислоты приводили к получению 4-бромнафталевого ангидрида с выходом 44%. Стоит отметить, что для перевода производных 1,8-нафталиндикарбоновой кислоты в форму внутреннего ангидрида применялась перекристаллизация из уксусной кислоты или сушка при температуре не менее 100°C [142].

3.1.1. Синтез 4-стирилзамещенных нафталимидов

В данном разделе приведен синтез N-бутил- и N-азидоэтил- производных нафталимида (**8a-в** и **11a-в**, схема 2), содержащих в четвертом положении нафталимидного ядра стироловые заместители с метокси-, диметиламино- и двумя метокси-группами. Производные 4-стирил-N-бутил-нафталимида **8a-в** были описаны ранее в работе [144], в которой приведено исследование Z,E-фотоизомеризации данных соединений. С использованием описанной методики по схеме 2 нами был проведен синтез N-бутил-производных **5a-в** для подробного изучения спектрально-оптических свойств данных флуорофоров и заключения о

том, являются ли они перспективными платформами для дальнейшей разработки на их основе препаратов-тераностиков.

Схема 2



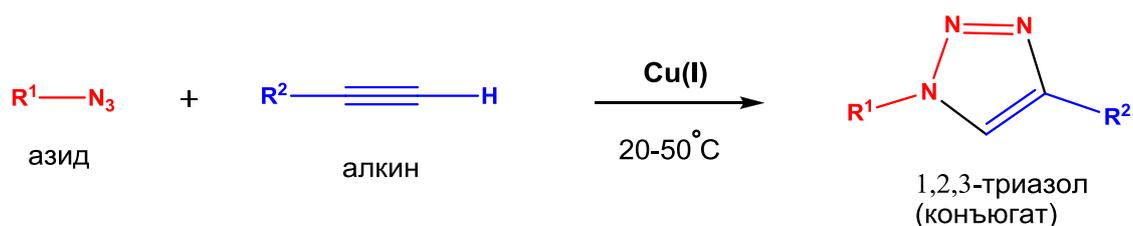
Амидирование 4-бромнафталяного ангидрида **3** проводили кипячением в этаноле в присутствии полуторакратного избытка соответствующего амина в течение 6 часов. После охлаждения реакционной массы до комнатной температуры продукты **6** и **7** выпадают из реакционной массы в виде игольчатых кристаллов.

Арилгалогениды **6** и **7** вводили в реакцию Хека с соответствующими производными стирола. Синтез проводили в типичных для данного типа реакции условиях: с использованием в качестве предшественника палладиевого катализатора соли Pd(OAc)₂ (1.2 мол.%), трифенилфосфина в качестве лиганда (5.5 мол.%) и триэтиламина как основания [145, 146]. Сочетание проводили в среде ДМФА при температуре 105°C, продукты **8a-в** и **9a-в** получены с умеренными выходами, что согласуется с литературными данными для подобного типа субстратов [147, 40, 56] и может быть связано с наличием донорных метокси- и диметиламино-групп в составе стиролов, в то время как для реакции Хека наиболее предпочтительными являются электронодефицитные алкены.

Для проведения ковалентной сшивки фотосенсибилизатора и нафталимидных флуорофоров была выбрана реакция медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения. Данный тип реакций относится к так называемым «клик-процессам» и часто используется в современном органическом синтезе, так как протекает с высокой скоростью и селективностью в мягких условиях [147].

Ковалентная сшивка молекул, несущих азидидную и алкиновую функциональные группы, проходит по механизму 1,3-диполярного циклоприсоединения, в результате образуется конъюгат, представляющий собой 1,4-замещенное производное 1,2,3-триазола (схема 3). На сегодняшний день в литературе описано множество вариантов условий реакции азид-алкинового кросс-сочетания, катализируемого солями меди [147,148]. Важным достоинством реакций данного типа является возможность их проведения в растворителях различной природы: полярных и неполярных, протонных и апротонных, в двухфазных смесях растворителей, а также в водных смесях [149]. Для проведения реакции в органическом растворителе наиболее широко используется катализ CuI, CuBr или CuOAc в присутствии оснований (NEt₃, DIPEA). При использовании смесей ТГФ, ДМСО, ДМФА, t-BuОНс водой возможно применение солей меди (II) как предкатализаторов в присутствии восстановительного агента (обычно аскорбата натрия). В рамках данной работы для проведения клик-реакции использовалось пропаргил-производное бактериохлорина, так как процедура выделения из биомассы и дальнейшей химической модификации фотосенсибилизатора хорошо отработана и позволяет в несколько стадий с использованием мягких условий синтеза ввести в его структуру C≡C-группу (схема получения пропаргил-производного бактериохлорина приведена в разделе 3.3.)

Схема 3



Для осуществления клик-реакции по схеме 3 были получены стироловые производные нафталимида, содержащие азидную группу в алифатическом заместителе при имидном атоме азота нафталимида. Замена гидроксильной группы соединений **9а-в** на азидную (схема 2) проводилась через стадию получения хлор-производных **10а-в** действием оксихлорида фосфора по адаптированным из литературы методикам [150, 151]. Заключительной стадией синтеза стало проведение реакций **10а-в** с азидом натрия в среде ДМФА, протекавших с

высокими выходами. Соединения **11а-в** были выделены в виде *E*-изомеров, на что указывают константы спин-спинового взаимодействия протонов при двойной связи в спектрах ^1H -ЯМР ($J_{\text{H-H}}=16.0$ Гц, см. раздел 4.1.). Следует отметить, что проведение реакции **9в** с тионилхлоридом в хлороформе привело к осмолению реакционной массы. Взаимодействие же **9б** с бромидом фосфора в присутствии пиридина в среде ДМФА/ CHCl_3 не привело к образованию целевого бром-производного. Структура соединения **9а** была подтверждена с помощью метода рентгеноструктурного анализа (рисунок 1). Двугранный угол C9-C10-C15-C16 в структуре **9а** составляет 8.4° , что близко к значению, полученному для *N*-бутилпроизводного **8а** (10.8°) в работе [144] (см. Таблицы П1 и П2 в приложении).

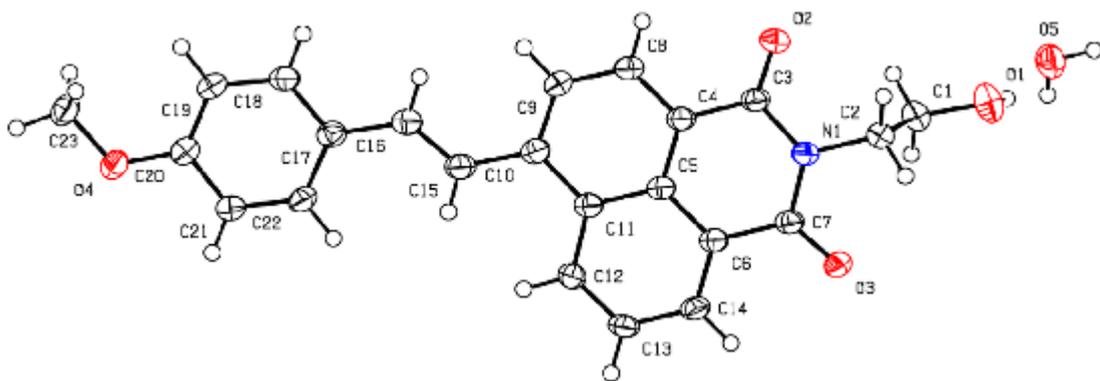


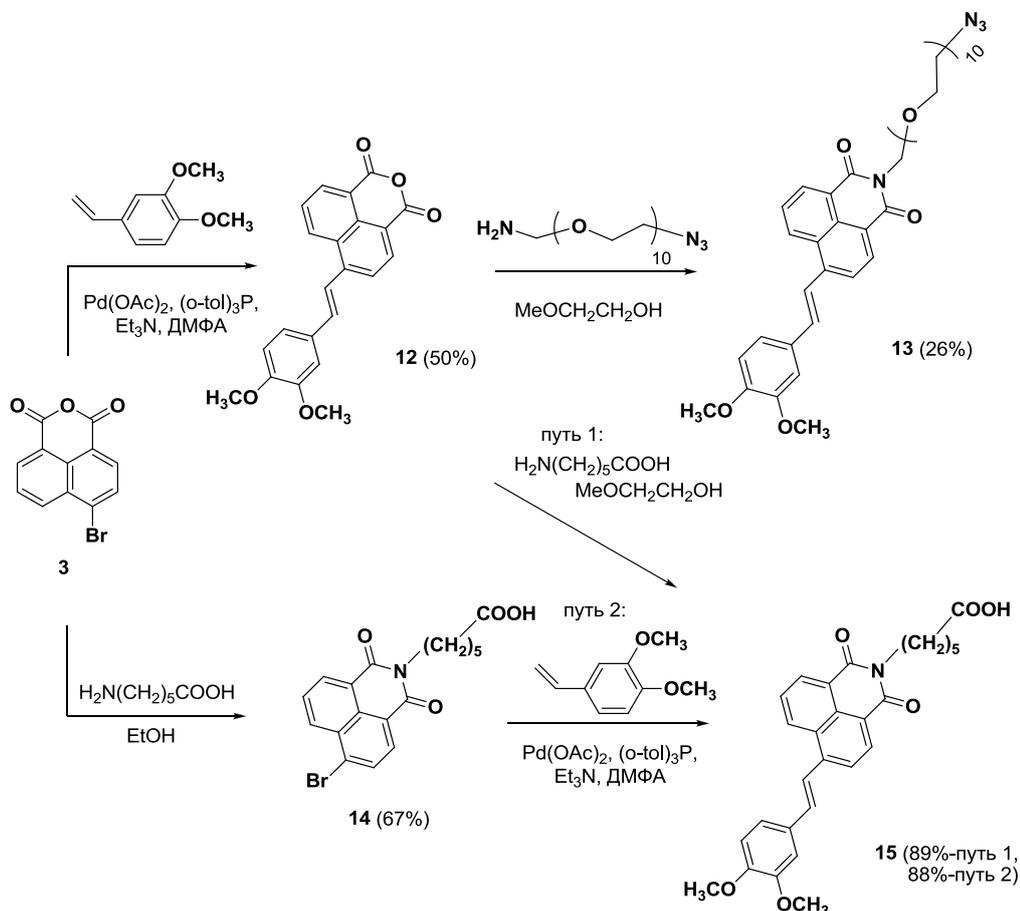
Рисунок 1 – Общий вид стирилнафталимида **9а** ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний с вероятностью 50%

На оптические характеристики (бис)хромофорных систем могут влиять процессы, происходящие после фотовозбуждения хромофоров, в частности, процесс резонансного переноса энергии (RET), который может отрицательно сказаться на интенсивности флуоресценции нафталимидного фрагмента. Так как эффективность RET-процесса зависит от расстояния между хромофорами, в рамках данной работы были получены производные нафталимида, содержащие различные спейсерные группы.

Одной из стратегий по повышению растворимости и биодоступности лекарственных препаратов является введение в их молекулы полиэтиленгликольных (ПЭГ) фрагментов [152]. С целью увеличения расстояния между хромофорами в конъюгате, а также получения водорастворимого (за счет

наличия большого числа гидрофильных групп) тераностика, нами был получен нафталимидный флуорофор **13** (схема 4), содержащий полигликолевый спейсер при имидном атоме азота.

Схема 4



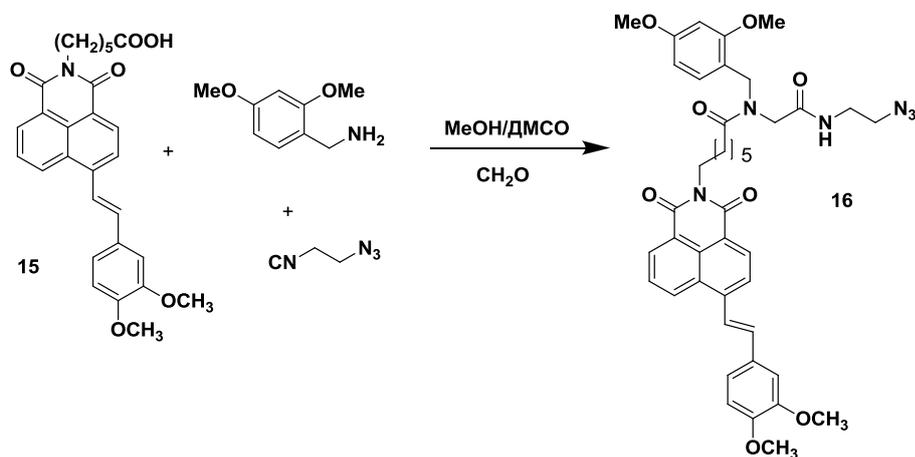
Нафталевый ангидрид **12**, содержащий стироловый заместитель в 4-м положении нафталимидного ядра был получен по реакции Хека в вышеописанных условиях. Имидирование ангидрида **12**-(2-аминоэтил)-*O'*-(2-азидоэтил)нонаэтиленгликолем проводилось кипячением в среде 2-метоксиэтанола, что связано с низкой растворимостью исходного ангидрида в этиловом спирте. Целевой продукт в виде желтого масла, растворимого в воде и других полярных растворителях, очищали методом колоночной хроматографии.

В структуру 4-стирилнафталевого ангидрида **12** был также введен фрагмент 6-аминогексановой кислоты для дальнейшего введения пептидного спейсера по реакции Уги. Наличие спейсерного фрагмента, содержащего амидные связи, должно позволить повысить сродство конъюгата в биомолекулам [153]. Нами было

опробовано два пути синтеза соединения **15**, содержащего при имидном атоме азота мотив гексановой кислоты, различающихся последовательностью проведения реакции Хека и имидирования (*путь 1* и *путь 2* на схеме 4). *Путь 1* позволяет упростить синтетическую процедуру в случае, если необходимо получить производные 3,4-диметокси-4-стирилнафталимида с различными спейсерными группами, позволяя получить их в одну стадию из исходного ангидрида **12**. Кроме того, в рамках *пути 1* спейсерный фрагмент вводится в молекулу флуорофора на заключительной стадии синтеза, что важно при наличии в спейсере малоустойчивых групп (например, в случае азидной группы в соединении **13**). Однако оптимальным из рассмотренных методов является *путь 2*, так как он обеспечивает больший суммарный выход продукта по двум стадиям, а также позволяет использовать меньшие количества 3,4-диметоксистирола – более дорогого реагента по сравнению с аминокетановой кислотой.

Соединение **15** с карбоксильной группой в составе заместителя при имидном атоме азота использовалось в реакции Уги с целью получения продукта **16** (схема 5). Данная стадия синтеза проводилась Зарезиным Д., сотр. кафедры Органической химии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Схема 5



Реакция Уги представляет собой четырехкомпонентную конденсацию изоцианида, карбонильного соединения, амина и неорганической или органической кислоты [154]. Сегодня реакции этого типа широко используются в комбинаторной химии для синтеза биологически активных соединений, так как позволяют в одну стадию в мягких условиях и с использованием доступных исходных реагентов

получать большое разнообразие продуктов, по строению подобных пептидам [155]. Для синтеза **16** использовался следующий порядок проведения реакции: к смеси 1.2 экв. диметоксибензиламина и формальдегида (1.2 экв.) в метаноле прибавляли раствор кислоты **15** (1 экв.) в ДМСО и 1.2 экв. изоцианида, реакционную смесь выдерживали в течение 1 дня при комнатной температуре, продукт очищали методом колоночной хроматографии.

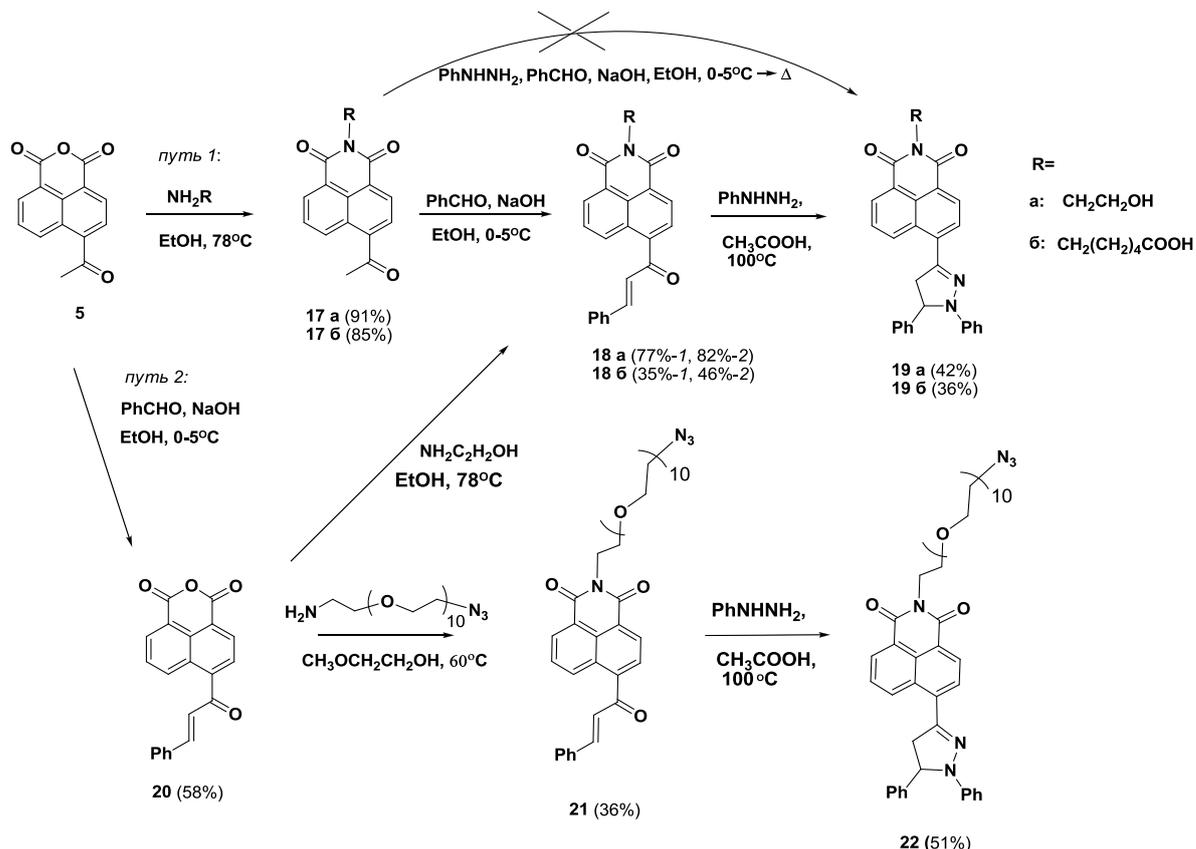
3.1.2. Синтез 4-пиразолинилзамещенных нафталимидов

Синтез 4-пиразолинилзамещенных красителей на основе нафталимида, содержащих при имидном атоме азота алкильные цепочки с азидной и карбоксильной группами представлен на схеме 6. Амидирование 4-ацетилнафталевого ангидрида проводилось по литературным методикам путем кипячения этаноламином или аминоксесановой кислотой в этаноле (*путь 1*, схема 6). Циннамоилпроизводные **18а,б** были получены в результате кротоновой конденсации ацетилзамещенных **17а,б** и бензальдегида в щелочной среде. Реакция проводилась с использованием небольшого избытка бензальдегида (1.2 экв.) в атмосфере аргона. Использовали следующий порядок проведения реакции: к перемешиваемой смеси исходного кетона и бензальдегида в этаноле при охлаждении на ледяной бане до 0-5°C прибавляли 10% (масс.) раствор NaOH, после чего продолжают выдержку при комнатной температуре. Такая последовательность позволяет избежать протекания побочной реакции Канницаро, продукты которой (бензальдегид и бензойная кислота) были обнаружены в ¹H ЯМР спектре в случае добавления бензальдегида к перемешиваемой смеси кетона **17б** и 10% NaOH в этаноле при комнатной температуре.

Для получения соединения **18а,б** был испробован второй синтетический путь (*путь 2*, схема 6), отличающийся последовательностью проведения стадий амидирования и конденсации с бензальдегидом. Суммарные выходы по двум стадиям для обоих соединений оказались выше для *пути 1* (для **18а**: *путь 1*: $0.91 \cdot 0.77 = 0.70$, *путь 2*: $0.82 \cdot 0.58 = 0.48$; для **18б**: *путь 1*: $0.85 \cdot 0.35 = 0.30$, *путь 2*: $0.58 \cdot 0.46 = 0.27$). Это связано с невысоким выходом кротоновой конденсации с

участием 4-ацетилнафталевого ангидрида, в которой он может вступать в реакцию самоконденсации или под действием воды претерпевать превращение в форму дикарбоновой кислоты, которая обладает меньшей реакционной способностью в следствие слабых акцепторных свойств кислотных групп по сравнению в ангидридными.

Схема 6



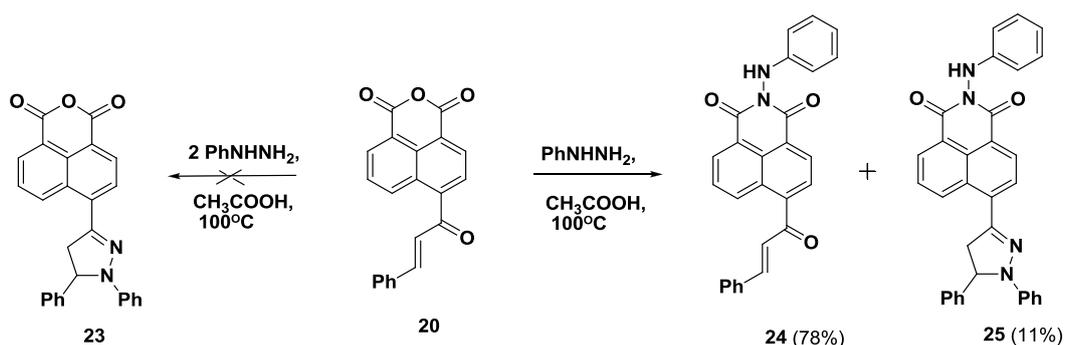
Для получения пиразолинил-производных **19a** и **19b** соответствующие циннамоилпроизводные **18a** и **18b** кипятили с двукратным избытком фенилгидразина в ледяной уксусной кислоте с инертной атмосферой в течение 11 часов. В качестве альтернативного метода синтеза **19a** был испробован одностадийный способ его получения из соединения **17a**, по методике, описанной в литературе для получения 1,3,5-трифенил-4,5-дигидропиразола [156]. Прибавление смеси кетона **17b**, бензальдегида и фенилгидразина в этаноле к смеси этанола и 10% (масс.) раствора NaOH при охлаждении и последующее кипячение реакционной массы в течение 3-х часов не привело к образованию целевого продукта реакции. Анализ методом ТСХ в системе PhH/EtOH=5:1 показал наличие

в реакционной смеси исходных соединений и одного неокрашенного в видимой области продукта реакции, предположительно, представляющего собой гидразон бензальдегида.

С целью изучения влияния длины спейсерного фрагмента на эффективность переноса энергии по схеме 6 был получен 4-пиразолинил-замещенный нафталимид **22**, содержащий спейсер из 10 остатков гликоля. Амидирование 4-циннамоилнафталевого ангидрида проводили в среде 2-метоксиэтанола при нагревании до 60°C в связи с низкой растворимостью **20** в этиловом спирте. Для получения продукта **22** стадию введения полигликолевого спейсера, содержащего склонную к разложению азидную группу, планировалось проводить последней (как в случае соединения **13**), исходя из соединения **23** (схема 7).

В литературе описан способ получения 4-пиразолинил-замещенного нафталевого ангидрида **23** при кипячении циннамоилнафталевого ангидрида **20** с двукратным избытком фенилгидразина в течение 4х часов в уксусной кислоте [142]. При воспроизведении данной методики из реакционной массы была выделена смесь N-аминофенильного производного **22**, непрореагировавшего циннамоилпроизводного **20**, а также N-фениламино-4-пиразолинил-нафталимида **25** (схема 7), спектры ¹H ЯМР фракций, полученных при разделении смеси методом колоночной хроматографии приведены на рисунке П1 в приложении.

Схема 7



Нами было опробовано проведение синтеза по данной методике с использованием эквивалентного количества фенилгидразина и выдержки при нагревании до 55°C. ¹H ЯМР спектр осадка, полученного после разбавления реакционной смеси представлен на рисунке 2.

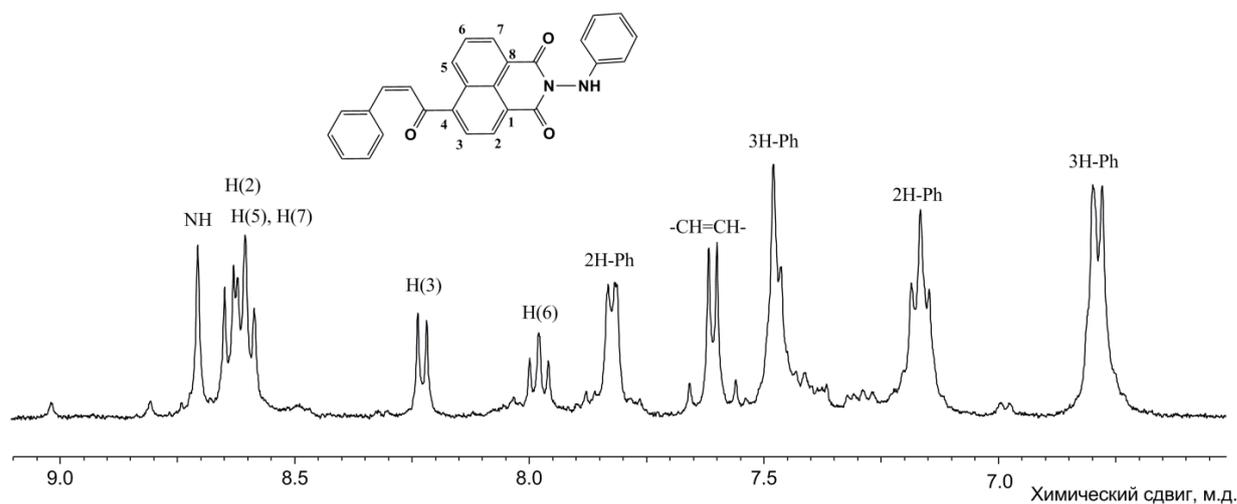
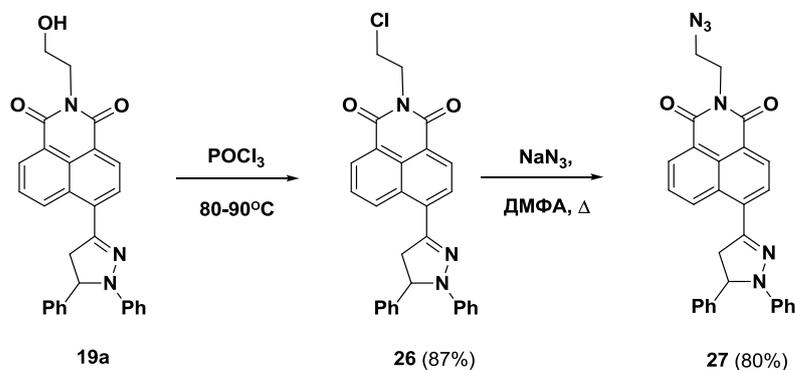


Рисунок 2 – Спектр ^1H ЯМР соединения **22** в ДМСО- d_6

Наличие сигналов двойной связи циннамоильного фрагмента (дублеты в области 7.58, 7.64 м.д., КССВ = 15.9 Гц), двух наборов сигналов, соответствующих монозамещенным фенильным ядрам, а также и сигнала протона при атоме азота в области 8.7 м.д. свидетельствуют об образовании в ходе реакции продукта амидирования циннамоилнафталяевого ангидрида – соединения **22**. Следует заключить, что при кипячении соединения **21** с фенилгидразином стадия имидирования протекает быстрее, чем конденсация фенилгидразина с циннамоильном фрагменту.

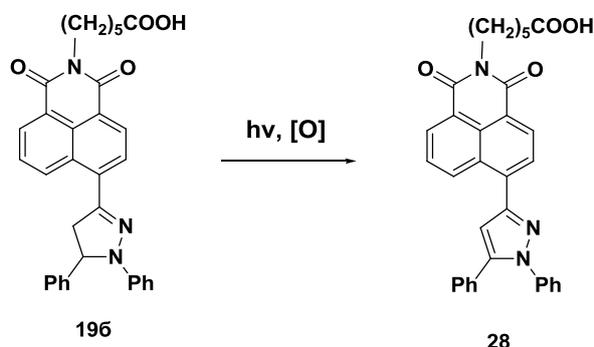
Замещение гидроксильной группы в алифатической части молекулы **19a** на азидную (схема 8) проводилось через промежуточное получение хлорпроизводного **26** действием избытка оксихлорида фосфора при 80-90°C. В результате взаимодействия **26** с азидом натрия в ДМФА был получен целевой флуорофор **27**.

Схема 8



В ходе синтеза соединения **196** была обнаружена побочная реакция фотоокисления пиразолинильного заместителя в 4-м положении нафталимидного ядра до пиразольного (соединение **28**, схема 9).

Схема 9



Подобные превращения ранее были описаны в литературе для пиразолинил-производных кумарина, хинолина и 1,3-дифенилпиразолинов [156-159]. Реакция фотоокисления пиразолинильных производных кумарина протекает необратимо в насыщенных кислородом бензоле, метаноле, циклогексане и четыреххлористом углероде. Авторы работы [159] полагают, что окисление арил-пиразолинов в насыщенных кислородом растворах бензола, метанола, циклогексана и четыреххлористого углерода может протекать в результате фотосенсибилизации образования синглетного кислорода. Однако окисление пиразолинов возможно и в бескислородных условиях. Как было обнаружено В.Г. Травенем и сотр., эффективная фотоараматизация арил- и гетарилпиразолинов возможна в присутствии избытка четыреххлористого углерода в результате переноса электрона с возбужденной молекулы красителя на CCl_4 [156].

Нами был проведен фотохимический эксперимент по мониторингу процесса окисления пиразолинил-нафталимида **196** в хлороформе, изменения в спектрах поглощения раствора при облучении полным светом ртутной лампы представлены на рисунке 3. Соединение **196** было выделено в виде осадка после проведения конденсации **186** с фенилгидразином в ледяной уксусной кислоты, очистка проводилась перекристаллизацией из этанола, полученный продукт содержал 5 мол.% примеси окисленной формы (анализ по спектру 1H ЯМР).

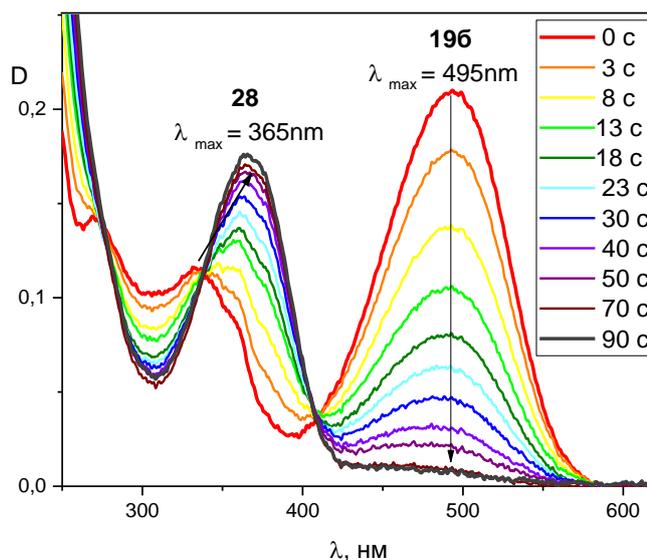


Рисунок 3– а) Спектры поглощения соединения **196** в хлороформе ($c=1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) при облучении полным светом ртутной лампы в течение 3, 8, 13, 18...90 секунд соответственно

В спектр поглощения 4-пиразолинилнафталимида **196** наблюдаются две полосы – интенсивная полоса с максимумом 495 нм, а также более коротковолновая в области 330 нм (красная линия на рисунке 3). При облучении светом ртутной лампы наблюдается снижение оптической плотности раствора в области 495 нм и появление новой полосы поглощения с максимумом 365 нм (черная линия на рисунке 3). Данный процесс можно наблюдать и невооруженным глазом при больших концентрациях **196** в хлороформе - окраска раствора на свету изменяется с интенсивно красной на бледно-желтую.

Наличие в абсорбционных спектрах, полученных в результате фотохимического эксперимента, изобестической точки свидетельствует о том, что в растворе существует только два типа поглощающих соединений, а значит, 4-пиразол замещенный нафталимид **28** является единственным продуктом окисления **196** в растворе.

Фотоокисление соединения **196** сопровождается значительными изменениями в спектрах поглощения и флуоресценции. В таблице 1 представлены спектральные характеристики флуорофоров **196** и **28**, полученные после разделения их смеси методом ВЭЖХ (смесь соединений **196** и **28** была выделена после попытки очистки продукта **196** методом колоночной хроматографии).

Таблица 1 – Спектральные свойства флуорофоров **196** и **28** в ацетонитриле

Соединение	$\lambda_{\text{max}}^{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{max}}^{\text{фл}}$, нм	$\phi^{\text{фл}}$
196	495	684	0.071
28	365	486	0.49

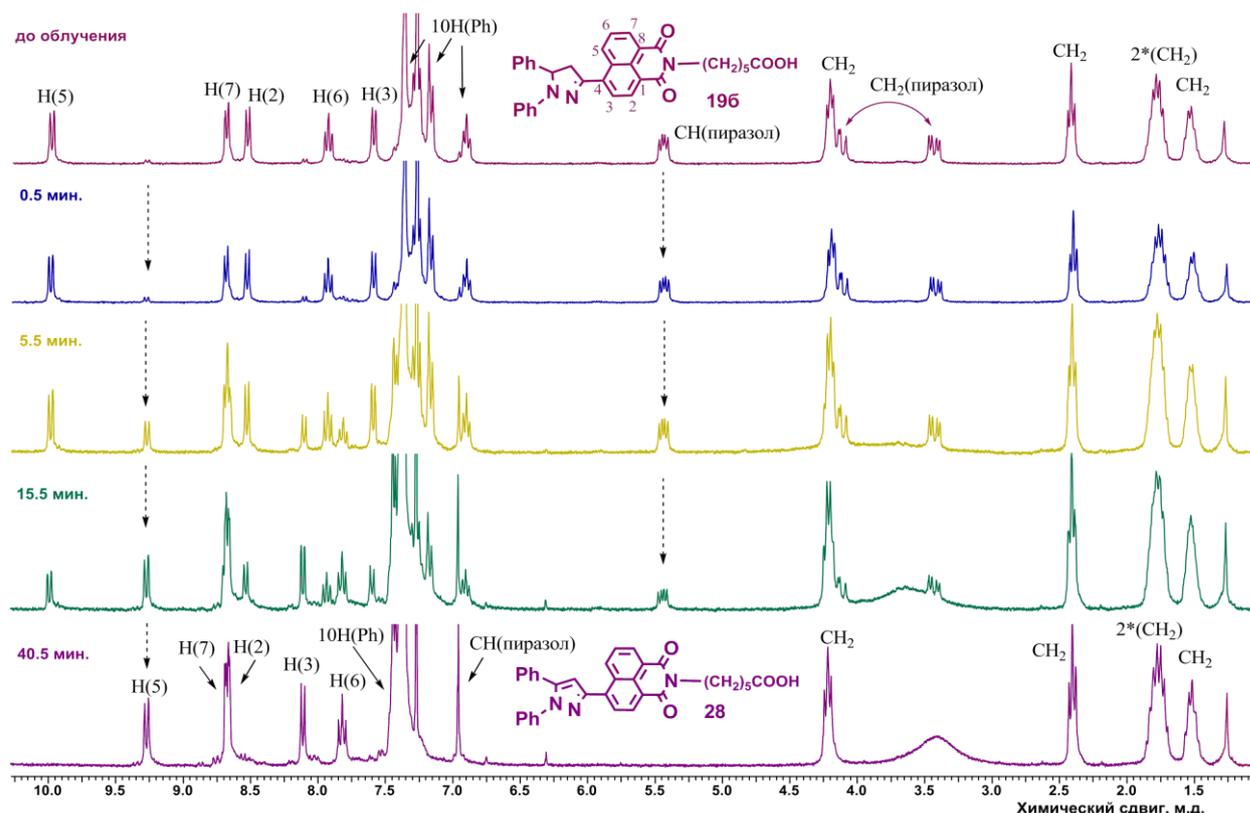


Рисунок 4 – ¹H-ЯМР спектры соединения **196** после облучения полным спектром ртутной лампы в течение 0.5 мин, 5.5 мин, 15.5 мин, 40.5 мин, соответственно. Растворитель – CDCl₃, концентрация вещества в ампуле $7.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л

Протекание процесса окисления **196** в растворе хлороформа было подтверждено в ходе ЯМР-эксперимента. Облучение раствора **196** в дейтерохлороформе проводилось в ЯМР-ампуле полным светом ртутной лампы, результаты эксперимента представлены на рисунке 4. Изменения в протонных спектрах **196** при окислении легко проследить по исчезновению сигналов СН- и СН₂-групп пиразолильного фрагмента (5.48, 4.17 и 3.46 м.д., соответственно) и значительному смещению Н(5) и Н(3) протонов нафталиimidного ядра в сильное и в слабое поле, соответственно. Кроме того, в протонном спектре наблюдается появление узкого синглета с химическим сдвигом 7.02 м.д., принадлежащего СН-группе пиразола. Сигналы фенильных заместителей, а также метиленовых групп

алифатического остатка при имидном атоме азота нафталимида практически не сдвигаются.

Для подтверждения химической природы изменений, происходящих с пиразолинил-замещенными нафталимида в растворе, соединение **196** было подвергнуто окислению бихроматом калия в среде ледяной уксусной кислоты. Продукт **28** был очищен методом колоночной хроматографии и охарактеризован с помощью методов ЯМР, масс-спектрологии, элементного анализа. Стоит отметить, что сигналы протонного спектра, полученного после 40.5 мин облучения полностью соответствуют сигналам протонов соединения **28**, полученного по реакции окисления **196** бихроматом калия. Отнесение сигналов протонов в спектрах **196** и **28** проводилось с использованием двумерных методик ^1H COSY, HSQC и HMBC.

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

При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [138, 139].

Как показал литературный обзор, нафталимиды, содержащие в 4-м положении нафталинового ядра электронодонорные заместители, являются флуорофорами ICT-типа. На положение полос в спектрах поглощения и люминесценции подобного типа хромофоров оказывает значительное влияние природа растворителя, так в растворителях высокой полярности обычно наблюдается углубление окраски хромофоров. В тоже время при переходе к таким растворителям как вода или спирт может наблюдаться значительное снижение квантовых выходов флуоресценции красителей, обусловленное повышением вероятности безызлучательной релаксации при уменьшении энергетической щели между ВЗМО и НСМО. Изучение влияния растворителя на оптические характеристики красителей является важным этапом подбора красителей для биологических исследований, так как длинноволновое поглощение, высокие значения Стоксова сдвига и эффективная люминесценция являются параметрами, определяющими перспективность применения флуорофора в области флуоресцентной визуализации.

В рамках данной работы спектральные свойства 4-стирил-нафталимидных

хромофоров были подробно изучены на примере N-бутилнафталимидов **8a-в** (схема 2). Свойства 4-пиразолинилзамещенных производных нафталимида детально не рассматривались, так как они достаточно подробно описаны в литературе (см. раздел 2.1).

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

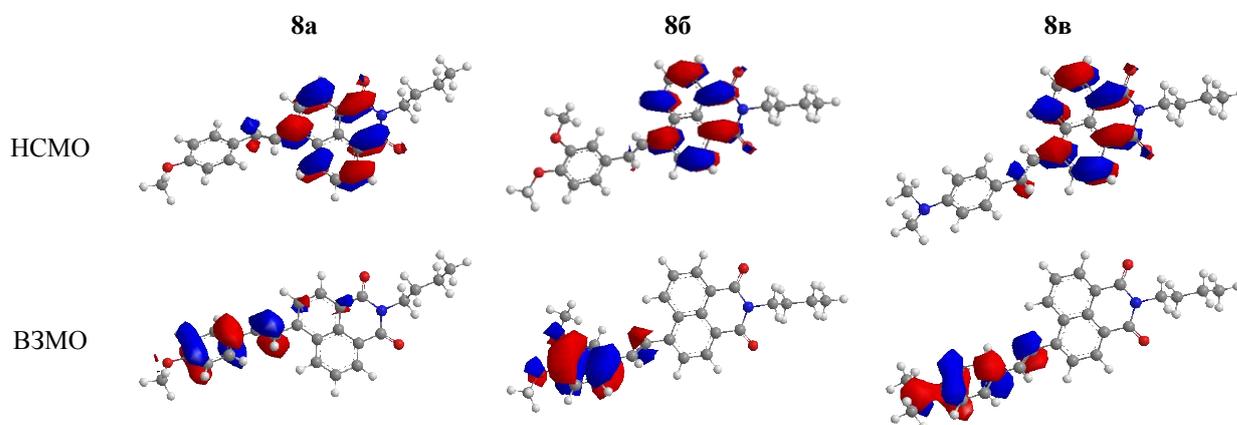


Рисунок 5 – Распределение электронной плотности в граничных орбиталях ВЗМО и НСМО соединений **8a**, **8б** и **8в**. Данные получены в результате расчета методом РМ6

На рисунке 6 в качестве примера приведены спектры поглощения и флуоресценции **7a-в** в этилацетате. Усиление ЭД характера заместителя в 4-м положении при переходе от метокси- к диметокси-, а затем к диметиламиностирилнафталимиду вызывает значительный батохромный и батофлорный сдвиги в оптических спектрах, что объясняется сближением уровней S_0 и S_1 и повышением эффективности образования ICT-состояния (состояния с переносом заряда). Соединения **7a-в** обладают высокими значениями Стоксова сдвига в полярных растворителях и длинноволновой флуоресценций в видимой области спектра, что указывает на потенциальную возможность их практического использования в качестве флуоресцентных красителей для биохимических исследований.

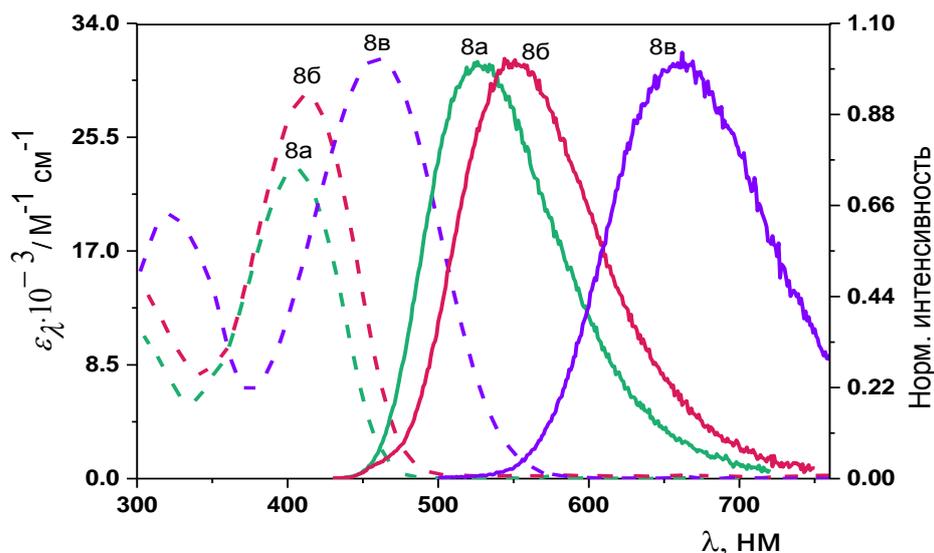


Рисунок 6 – Спектры поглощения (пунктирные линии) и нормализованные спектры испускания флуоресценции соединений **8а**, **8б** и **8в** в этилацетате

Для изучения влияния природы растворителя на оптические свойства **8а-в** были записаны спектры поглощения и флуоресценции **8а-в** в 15-ти растворителях различной полярности, измерены значения Стоксовых сдвигов ($\Delta\tilde{\nu}$), квантовых выходов флуоресценции (φ^{fl}) и времен жизни возбужденных состояний (τ). Данные приведены в таблице 2.

По данным табл.2 можно сделать вывод о том, что для стироловых производных нафталимида **7а-в** характерны значительные сольватохромия и сольватофлуорохромия. Так при переходе к более полярным и склонным к образованию водородных связей растворителям наблюдается смещение максимумов поглощения ($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$) и флуоресценции ($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$) красителей в красную область, а также увеличение значения Стоксова сдвига.

Таблица 2 – Данные ЭСП и флуоресцентные характеристики соединений **8a-в** в различных растворителях при 20 °С³

	Растворитель	ε	$\lambda_{\max}^{\text{abs}} / \text{нм}$	$\varepsilon_{\lambda} \cdot 10^{-3} / \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\lambda_{\max}^{\text{fl}} (\lambda_{\text{exc}}) / \text{нм}$	$\Delta\bar{\nu} / \text{см}^{-1}$	ϕ^{fl}	$\tau / \text{нс}$
Соединение 8a	Пропиленкарбонат	65.0	411	22,1	579 (370)	7060	0.33	2.51
	Диметилсульфоксид	46.7	419	23,1	589 (420)	6775	0.41	3.05
	Ацетонитрил	37.5	407	22,8	570 (365)	7087	0.33	2.35
	Ацетон	20.7	408	23,9	557 (400)	6556	0.28	2.10
	3-Метилбутанон-2	16.1	409	22,9	549 (400)	6235	0.25	1.95
	4-Метилпентанон-2	13.1	409	21,9	544 (435)	6008	0.24	1.80
	1,2-Диметоксиэтан	7.2	408	22,7	544 (350)	6127	0.26	1.85
	Этилацетат	6.0	407	23,2	527 (365)	5716	0.25	1.45
	Диэтиловый эфир	4.3	403	23,5	504 (365)	5034	0.21	1.08
	Циклогексан	1.9	400	21,8	450 (365)	2903	0.33	1.02
	Метанол	32.7	412	23,2	603 (350)	7629	0.79	2.67
	Этанол	24.6	414	23,7	588 (350)	7206	0.57	2.87
	<i>n</i> -Бутанол	17.5	416	22,2	577 (350)	6765	0.44	2.62
	<i>n</i> -Гексанол	13.3	414	22,7	585 (350)	7002	0.44	2.53
<i>n</i> -Деканол	8.1	415	21,8	568 (350)	6491	0.41	2.48	
Соединение 8б	Пропиленкарбонат	65.0	419	30,2	610 (400)	7530	0.51	3.06
	Диметилсульфоксид	46.7	428	28,0	620 (400)	7181	0.40	3.15
	Ацетонитрил	37.5	412	28,3	606 (380)	7770	0.43	3.80
	Ацетон	20.7	414	28,5	592 (350)	7204	0.50	4.02
	3-Метилбутанон-2	16.1	416	28,2	579 (370)	6767	0.51	3.83
	4-Метилпентанон-2	13.1	416	27,4	574 (370)	6559	0.54	3.70
	1,2-Диметоксиэтан	7.2	416	28,1	574 (360)	6617	0.50	3.43
	Этилацетат	6.0	412	28,6	551 (400)	6064	0.41	3.13
	Диэтиловый эфир	4.3	409	30,1	523 (360)	5389	0.42	2.08
	Циклогексан	1.9	407	24,9	461 (400)	2999	0.27	1.29
	Метанол	32.7	417	29,2	638 (390)	8307	0.040	0.33
	Этанол	24.6	419	28,1	621 (400)	7763	0.16	1.22
	<i>n</i> -Бутанол	17.5	421	27,8	619 (400)	7598	0.30	2.04
	<i>n</i> -Гексанол	13.3	420	27,0	605 (390)	7281	0.47	2.81
<i>n</i> -Деканол	8.1	421	26,7	578 (400)	6452	0.57	3.20	
Соединение 8в	Пропиленкарбонат	65.0	474	30,7	755 (469)	8077	0.021	0.27
	Диметилсульфоксид	46.7	485	32,1	776 (480)	7732	0.019	0.29
	Ацетонитрил	37.5	461	31,7	743 (400)	8186	0.032	0.38
	Ацетон	20.7	467	31,3	721 (400)	7639	0.092	1.05
	3-Метилбутанон-2	16.1	467	31,0	705 (400)	7183	0.18	1.90
	4-Метилпентанон-2	13.1	466	29,8	695 (400)	6979	0.25	2.56
	1,2-Диметоксиэтан	7.2	463	30,0	689 (400)	6992	0.19	1.68
	Этилацетат	6.0	460	31,4	660 (425)	6588	0.38	3.65
	Диэтиловый эфир	4.3	455	32,4	608 (510)	5628	0.36	3.03
	Циклогексан	1.9	446	27,9	511 (450)	2852	0.21	0.88
	Метанол	32.7	470	27,9	746 (430)	7872	0.0063	0.025
	Этанол	24.6	475	29,3	736 (470)	7555	0.019	0.082
	<i>n</i> -Бутанол	17.5	476	26,6	750 (470)	7675	0.037	0.20
	<i>n</i> -Гексанол	13.3	475	27,8	702 (470)	6632	0.13	0.44
<i>n</i> -Деканол	8.1	474	28,5	668 (470)	6083	0.15	1.05	

Значительное влияние растворителя на оптические характеристики **8a-v** позволило оценить изменение дипольного момента молекул при переходе в возбужденное состояние, используя уравнение Липперта-Матаги (1) [160, 161]:

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{\text{abs}} - \tilde{\nu}_{\text{fl}} = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca^3} \left[\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] + \text{const} \quad (1)$$

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2)$$

В представленных выражениях (1) и (2): $\Delta\tilde{\nu}$ – Стоксов сдвиг, см^{-1} ; $\tilde{\nu}_{\text{abs}}$, $\tilde{\nu}_{\text{fl}}$ – волновые числа, соответствующие максимумам в спектрах поглощения и флуоресценции соответственно, см^{-1} ; μ_e и μ_g – дипольные моменты растворенного вещества в возбужденном и основном состоянии соответственно, $\text{см}^{5/2} \cdot \text{г}^{1/2} \cdot \text{с}^{-1}$ ($1\text{Д} = 1.000 \cdot 10^{-18} \text{ см}^{5/2} \cdot \text{г}^{1/2} \cdot \text{с}^{-1}$); h – постоянная Планка, эрг·с ($h = 6.626 \cdot 10^{-27}$ эрг·с); c – скорость света, см/с ($c = 2.998 \cdot 10^{10}$ см/с); a – эффективный радиус полости Онзагера, см (радиус полости, внутри которой находится флуорофор); ε и n – диэлектрическая проницаемость и показатель преломления растворителя соответственно, Δf – ориентационная поляризуемость растворителя. Уравнение (2) приведено в системе единиц СГСЭ.

В качестве значения радиуса полости Онзагера для расчётов была принята половина расстояния между атомом азота или кислорода, находящегося в пара-положении по отношению к двойной связи стирилового заместителя, и атомом кислорода наиболее удаленной от С(4)-заместителя карбонильной группы, подобно тому, как это было сделано для 4-замещенных нафталимида в работах [34, 162]. Указанное расстояние было определено по результатам квантово-химических расчетов соединений **8a-v** методом РМ6 (MOPAC 2012). Значения a для исследуемых флуорофоров составили 6.85 Å (1a), 6.80 Å (1б) и 6.89 Å (1в).

Значения параметра Δf для использованных нами протонных и апротонных растворителей и соответствующие им величины стоксовых сдвигов для соединений **8a-v** представлены на рисунке 7. В рассматриваемых случаях как протонные, так и апротонные растворители демонстрировали хорошую линейную корреляцию (коэффициенты корреляции выше 0.95 для всех случаев). По значению тангенсов

углов наклона прямых на рисунке 7а-в были определены изменения дипольных моментов при переходе в возбужденное состояние. Рассчитанные величины ($\mu_e - \mu_g$) составили 20.78, 21.96 и 22.95 Д для **8а**, **8б** и **8в** соответственно.

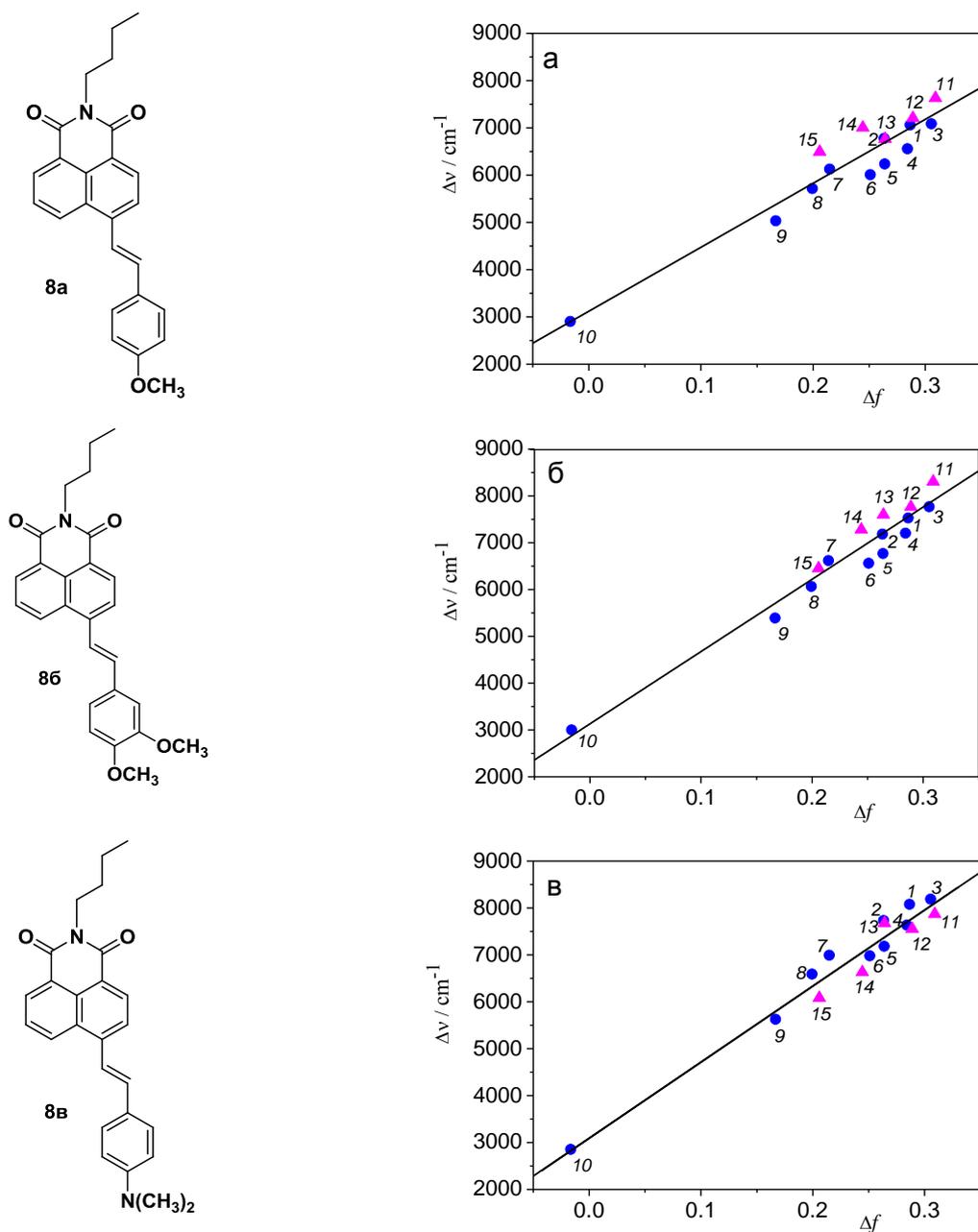


Рисунок 7 – Зависимость Стоксова сдвига от функции полярности растворителя для соединений **8а** (а), **8б** (б), **8в** (в). Прямые соответствуют линейной корреляции между указанными параметрами. Аппроксимация данных осуществлялась методом наименьших квадратов, коэффициенты корреляции составляют 0.955, 0.974 и 0.978 для **8а**, **8б** и **8в**, соответственно. Обозначения растворителей: 1 – пропиленкарбонат, 2 – диметилсульфоксид, 3 – ацетонитрил, 4 – ацетон, 5 – 3-метилбутанон-2, 6 – 4-метилпентанон-2, 7 – 1,2-диметоксиэтан, 8 – этилацетат, 9 – диэтиловый эфир, 10 – циклогексан, 11 – метанол, 12 – этанол, 13 – *n*-бутанол, 14 – *n*-гексанол, 15 – *n*-деканол

Известно, что величина 4.8 Д соответствует дипольному моменту, возникающему при разделении единичных зарядов на расстояние 1 Å. Следовательно, изменение дипольного момента молекул **8a**, **8б** и **8в** при возбуждении на 20.78, 21.96 и 22.95 Д соответствует разделению единичных зарядов на 4.33, 4.58 и 4.78 Å. Подобный характер перераспределения электронной плотности при поглощении света свидетельствует об образовании возбужденных состояний с переносом заряда и согласуется со значениями ($\mu_e - \mu_g$), полученными в работах [162-165] для производных нафталимидов, содержащих различные ЭД группы в 4-м положении нафталимидного ядра.

Квантовый выход флуоресценции соединений **8a-в** при варьировании природы растворителя изменяется по-разному. В случае **8a** и **8б** эффективность излучательной дезактивации приближенно одинакова как в полярных, так и в неполярных растворителях, в то время как для **8в** рост полярности растворителя и его протонодонорных свойств вызывает тушение флуоресценции (Таблица 2). Аналогичный характер зависимости прослеживается и для значений времен жизни возбужденных состояний. Для более полного понимания природы процессов, происходящих при фотофосбуждении **8a-в**, были проанализированы спектры поглощения возбужденных состояний флуорофоров. С использованием системы импульсных лазеров, обеспечивающих последовательное возбуждение растворов красителей монохроматическим излучением с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения нафталимидного хромофора, и последующее возбуждению белым светом, происходящее с временной задержкой, были получены карты поглощения возбужденных состояний **8a-в**, представленные на рисунке 8. Карты представляют собой двумерные спектры, одна из осей которых отражает время задержки между импульсами, другая – разность оптических плотностей возбужденного и основного состояний красителей. Положительный сигнал (красная область) соответствует поглощению возбужденного состояния **8a-в**, отрицательный (синяя область) соответствует или вынужденной эмиссии или так называемому «выцветанию» основного состояния хромофора.

На рисунке 8a представлена карта поглощения возбужденных состояний соединения **8a** в циклогексане. Отрицательный сигнал в области 425-500 нм имеет

выраженную колебательную структуру и напоминает стационарный спектр флуоресценции **8a** в циклогексане (см. рисунок П2 в приложении). Данный отрицательный сигнал можно отнести к стимулированной эмиссии локального возбужденного (ЛВ) состояния нафталимида **7a**, обладающего относительно жесткой планарной геометрией. Такой же характер локальных возбужденных состояний можно предположить и для хромофоров **8б** и **8в**, так как для них наблюдаются подобные сигналы стимулированной эмиссии в циклогексане (см. рисунок П3 в приложении).

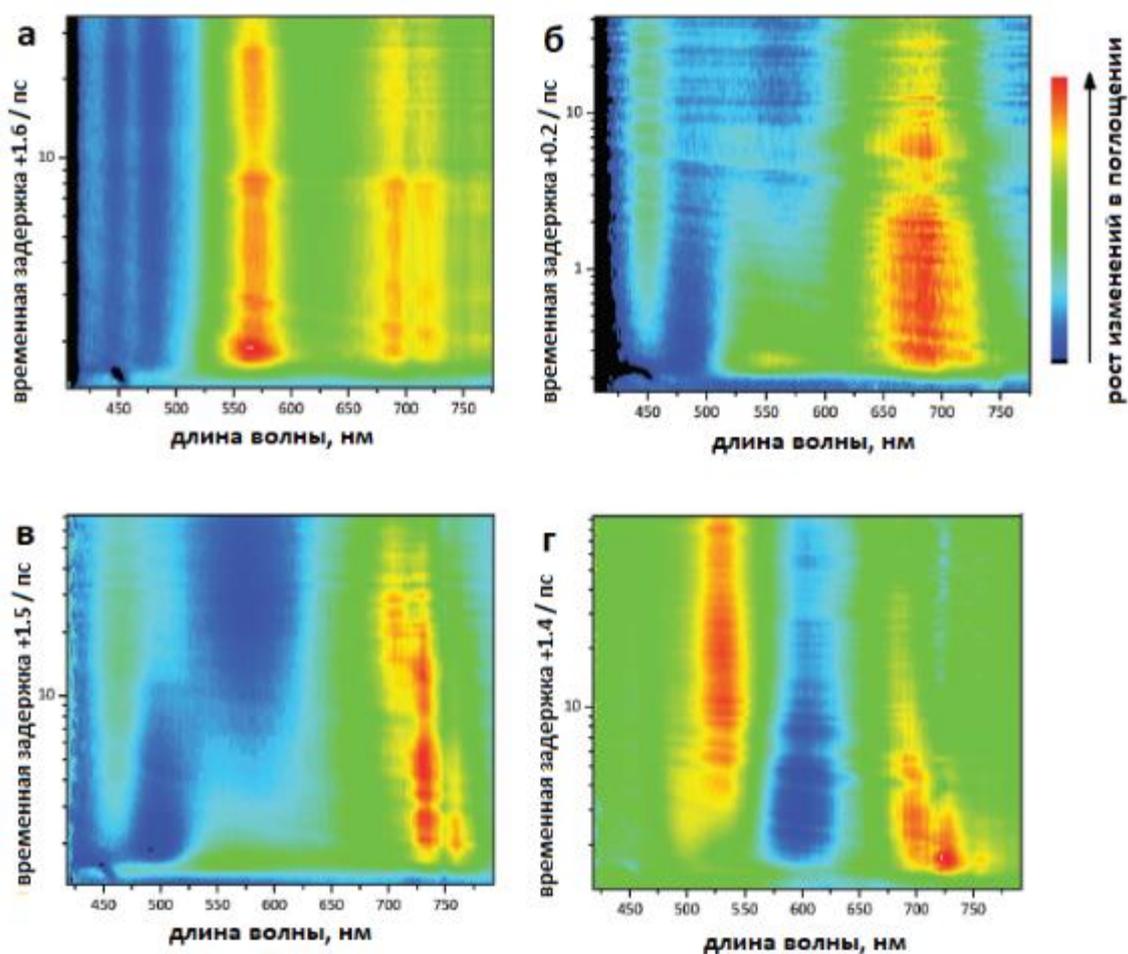


Рисунок 8 – Спектрально-временные карты поглощения возбужденных состояний **8a-в**: а) **8a** в циклогексане; б) **8a** в диэтиловом эфире; в) **8б** в диэтиловом эфире; г) **8в** в диэтиловом эфире. Для визуализации кинетики процессов в логарифмической шкале добавлены искусственные временные задержки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

При переходе от циклогексана к более полярному растворителю – диэтиловому эфире (рисунок 8б-г) в спектрах поглощения возбужденных состояний всех трех соединений появляется новый отрицательный сигнал,

смещенный в красную область спектра (575-600 нм). Появление такого сигнала означает наличие более низкого по энергии возбужденного состояния. Для флуорофоров ICT-типа, содержащих стильбеновый фрагмент, возможно существование дополнительного пути дезактивации локально-возбужденного состояния (помимо флуоресценции, внутренней конверсии и интеркомбинационной конверсии). Этот путь заключается в образовании «скрученного» состояния с переносом заряда (TICT, *англ.* Twisted Intramolecular Charge Transfer), обладающего большим дипольным моментом и неплоской геометрией [166]. Данная модель предполагает существование двух энергетических минимумов на потенциальной поверхности возбужденного состояния: первый минимум соответствует локально возбужденному состоянию с квазиплоским расположением π -системы и донорной группы ($\text{Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4-$ в случае **8в**); второй – состоянию с переносом заряда с донорной на акцепторную группу с квазиперпендикулярным расположением π -системы и донорной группы. В рамках модели TICT образование «скрученного» состояния с переносом заряда включает две стадии: перенос заряда и последующий поворот донора относительно остальной части молекулы. Модель TICT была предложена для описания двухполосной флуоресценции 4-*N,N*-диметиламинобензонитрила [167, 168], однако в большинстве случаев TICT-состояния релаксируют безызлучательно и их образование снижает квантовый выход и время затухания флуоресценции [166].

Возможность образования скрученных состояний согласуется с характером распределения ВЗМО и НСМО хромофоров (рисунок 5). График зависимости энергии возбужденного состояния S_1 хромофора **8а** от угла поворота вокруг σ -связи C10-C15 для растворителей различной полярности также подтверждает возможность образования TICT-состояний (рисунок 9а). В неполярном растворителе ($\epsilon=1$) изменение угла от 0° до 90° ведет к повышению энергии первого возбужденного состояния, в то время как в полярном ($\epsilon=20$) растворителе она достигает максимума при 40° , а затем быстро спадает с увеличением угла. Этот эффект объясняется стабилизацией TICT-состояния в полярных средах.

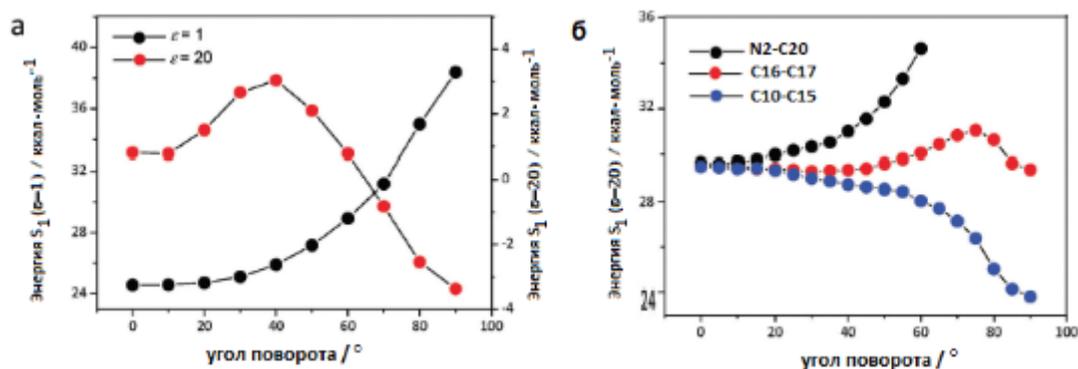


Рисунок 9 – Зависимость энергии возбужденного состояния S_1 от угла поворота вокруг связи: а) для **8а** при повороте вокруг связи C10-C15; б) для **8в** при повороте вокруг связей NMe₂-C20 (черные точки), C16-C17 (красные точки); C10-C15 (синие точки). Нумерация атомов углерода представлена на рисунке 1

Для нафталимидов **8а-в** можно предположить несколько способов формирования скрученного состояния. Так, для соединения **8в** вращение может происходить не только вокруг связи C10-C15 (поворот нафталимидного фрагмента), но и вокруг связи C16-C17 (поворот фенильного кольца), а также вокруг связи NMe₂-C20 (поворот диметиламино-группы). Для выявления наиболее вероятного пути формирования скрученного состояния были построены зависимости энергии S_1 -состояния от угла поворота вокруг вышеназванных связей (рисунок 9б) в полярном растворителе. Как видно из рисунка 9б, как поворот фенильного фрагмента, так и нафталимидного могут приводить к образованию ТИСТ-состояния, однако в случае поворота вокруг связи C10-C15 образование ТИСТ-состояния более энергетически выгодно. Поворот аминогруппы приводит к увеличению энергии возбужденного состояния, поэтому его можно исключить. Таким образом, можно заключить, что наиболее вероятно формирование ТИСТ-состояния за счет поворота нафталимида вокруг связи C10-C15, так как этот процесс приводит к наиболее низкому по энергии скрученному возбужденному состоянию. Кроме того, в случае поворота фенильного кольца вокруг связи C16-C17 существует барьер потенциальной энергии, который необходимо преодолеть для вращения, что требует большего времени для реализации.

Анализ кинетики поглощения возбужденных состояний **8а** и **8б** показал, что характеристические времена исчезновения сигналов локального возбужденного

состояния (τ_1) и появления поглощения ТИСТ-состояний (τ_2) имеют близкие значения в различных растворителях (таблица 3). Как и ожидалось, увеличение полярности растворителя приводит к повышению скорости образования скрученных состояний. Небольшое различие в значениях τ_1 и τ_2 можно объяснить тем, что время τ_1 в некоторой степени зависит от динамической сольватации скрученной молекулы, которая приводит к батохромному смещению полосы поглощения ТИСТ-состояния во временной шкале карты поглощения возбужденных состояний. Эффекты динамической сольватации легко обнаруживаются в полярных растворителях с низкой вязкостью (например, в ацетонитриле).

В спектрах поглощения возбужденных состояний **8a** и **8б** в диэтиловом эфире (рисунок 8б,в) была обнаружена интересная особенность: остаточные сигналы локальных возбужденных состояний не тушатся за время жизни ТИСТ-состояний. Это позволяет предположить существование квази-равновесия между скрученной и планарной структурами возбужденного состояния, что может быть связано с относительно небольшой энергетической щелью между ЛВ и ТИСТ-состояниями при слабой сольватации в диэтиловом эфире. Сравнение карт для **8б** и **8в** показывает, что доля локального возбужденного состояния для **8б** ниже, чем для **8a**, это связано с большим дипольным моментом молекулы, а значит и большей энергией сольватации ее возбужденного состояния.

Таблица 3– Характеристические времена исчезновения сигнала локального возбужденного состояния (τ_2) и появления сигналов ТИСТ-состояния (τ_1) в спектрах поглощения возбужденных состояний **8a** и **8б** в различных растворителях.

Растворитель	8a		8б	
	τ_1 / пс	τ_2 / пс	τ_1 / пс	τ_2 / пс
Диэтиловый эфир	1.90	2.20	2.32	2.13
1,2-диметоксиэтан	1.23	1.46	1.10	0.83
Ацетонитрил	0.14	0.14	-*	0.14

*- не определено, так как полоса ТИСТ-состояния перекрывается положительным сигналом поглощения возбужденного состояния.

В спектрально-временной карте поглощения возбужденных состояний соединения **8в** (рисунок 8г) наблюдаются значительные отличия от карт **8а** и **8б**. Для **8в** не наблюдается образования планарного скрученного состояния. Фотовозбуждение **8в** напрямую приводит к формированию возбужденного состояния со скрученной геометрией, о чем свидетельствует появление в длинноволновой области отрицательной полосы стимулированной эмиссии ТИСТ-состояния без временной задержки после импульса. Полученные данные хорошо согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа, полученными для структур **8а-в** в работе [144]. Двугранные углы связей C9-C10-C15-C6 для **8а-в** составляют 10.8° , 1.6° и 32.5° , соответственно, что указывает на предорганизацию молекулы **8в** для быстрого формирования ТИСТ-состояния при фотовозбуждении. Стоит отметить, что скрученное состояние **8в** более полярно, чем **8а** и **8б**, так как аминогруппа проявляет более сильные ЭД свойства, чем метоксигруппы. В эксперименте этот факт отражался в проявлении динамической сольватации ТИСТ-состояния, в результате которой полоса эмиссии при 600 нм имеет уклон в область длинных волн. Кроме того в области 720 нм наблюдается отрицательный сигнал. По-видимому, скрученное состояние **8в** обладает широкой полосой эмиссии, которая частично перекрывается положительным сигналом поглощения возбужденного состояния.

Подтверждение существования двух излучательных состояний для **8а-в** также были получены из графиков зависимости квантовых выходов флуоресценции (ϕ^{fl}) **8а-в** от времени жизни возбужденного состояния (τ), построенных по данным таблицы 2 (рисунок П4 в Приложении). Из графиков видно, что увеличение времени жизни возбужденного состояния (при замене растворителя) приводит к повышению квантового выхода флуоресценции **8а-в**. При этом константа скорости излучательной релаксации k_r , равная отношению ϕ^{fl}/τ , поддерживается постоянной для большинства апротонных растворителей. Хорошая линейная корреляция между значениями ϕ^{fl} и τ наблюдалась для большинства использованных апротонных растворителей, за исключением циклогексана и толуола (а также диэтилового эфира для **8а** и **8б**), что указывает на формирование в указанных

растворителях второго излучательного состояния, обладающего другим значением k_r .

Как было отмечено в разделе 3.1.1., стироловые проводные нафталимида **8a-в** были выделены в виде *E*-изомеров. Однако, при облучении светом красители **8a-в** способны подвергаться изомеризации, в результате которой образуются *Z*-изомеры. Данный процесс подробно изучен в работах [144, 169]. Авторами было показано, что в неплоской структуре *Z*-изомера сопряжение между арильным и нафталиimidным фрагментами молекул в значительной степени сохраняется, что объясняет сходство оптических свойств *E*- и *Z*-изомеров **8a-в**. При рассмотрении возможности применения стироловых производных **8a-в** в качестве флуоресцентных навигаторов влиянием изомеризации на оптические свойства флуорофоров можно пренебречь.

Таким образом, в растворителях более полярных, чем диэтиловый эфир, локальные возбужденные состояния молекул **8a-в** формируют ТИСТ-состояния с меньшей энергией, которые могут релаксировать как посредством флуоресценции так и безызлучательно. Соединение **8в** формирует ТИСТ-состояние более эффективно, так как молекулы **8в** предорганизована к скручиванию, а кроме того 4-*N,N*-диметиламино- стироловый заместитель, обладая наибольшим ЭД эффектом, способствует образованию скрученного состояния наиболее выгодного по энергии.

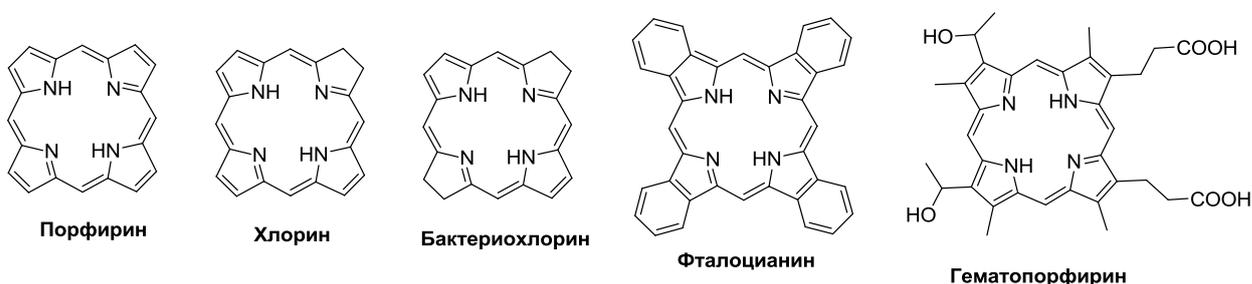
3.3. Синтез и изучение оптических свойств (бис)хромофорных систем на основе 1,8-нафталимида и бактериохлорина

При подготовке данного раздела использованы собственные публикации автора [170-172].

Развитие фотодинамической терапии тесно связано с разработкой препаратов-фотосенсибилизаторов на основе порфиринов. В основе структуры порфириновых соединений лежит ароматический макроцикл, состоящий из 4-х пиррольных колец, соединенных метиновыми мостиками (схема 10). Сегодня в медицинской практике активно используются фотосенсибилизаторы первого поколения на основе производных гематопорфирина IX – Фотофрин (США, Канада), Фотосан (Германия), НРD (Китай), Фотогем (Россия) [173]. Недостатком данных препаратов

является невысокая интенсивность поглощения в длинноволновой полосе, расположенной в области 635-640 нм, а также значительное поглощение биологических тканей в данной спектральной области [174, 175]. В настоящее время активно ведутся разработки ФС на основе гидрированных аналогов порфирина - хлорина и бактериохлорина (схема 10), обладающих поглощением в более длинноволновой области по сравнению с порфиринами, а также бензоилированных производных-фталоцианинов, которые характеризуются высокой интенсивностью поглощения и значительным смещением полосы в ИК-область спектра.

Схема 10

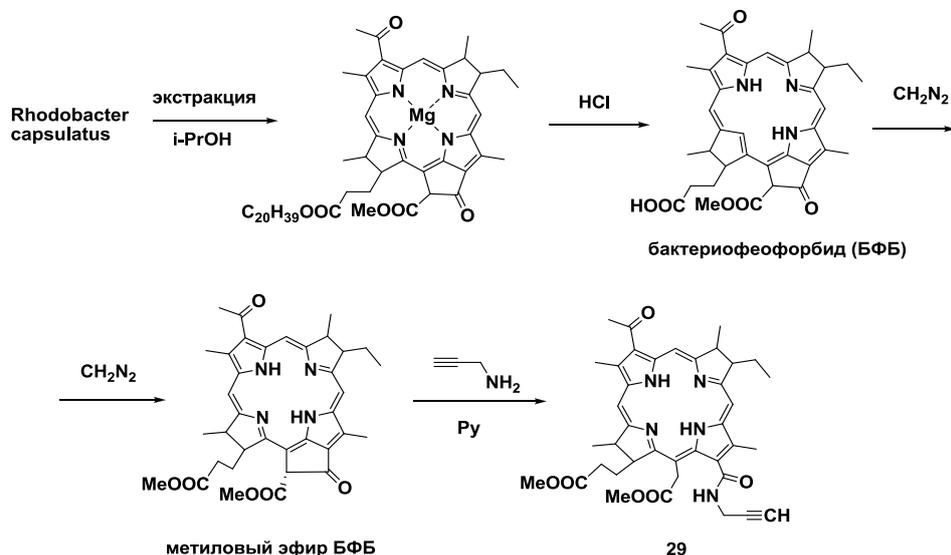


В качестве фотосенсибилизирующего компонента конъюгатов нами было выбрано производное фотосенсибилизатора 2-го поколения бактериохлорина (соединение **29** на схеме 11). В абсорбционных спектрах производных бактериохлорина помимо полосы *Soret*, расположенной в области 400 нм, наблюдается интенсивная длинноволновая полоса поглощения с максимумом 750 нм, которая попадает в терапевтическое окно прозрачности биологических тканей - диапазон длин волн, поглощение которых тканями минимально (600-1200 нм) [176]. Кроме того, производные бактериохлорина характеризуются низкой темновой токсичностью, быстрым выведением из организма и невысокой кожной фототоксичностью [177].

Синтез пропаргильного производного бактериохлорина **29** представлен на схеме 11. Получение прекурсора соединения **29** – метилового эфира бактериофеофорбида (БФБ) – проводится по описанным в литературе методикам [178]. На первом этапе синтеза бактериохлорофилла выделяют из биомассы пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* экстракцией изопропиловым спиртом. Бактериохлорофилла подвергается деметаллированию под действием соляной

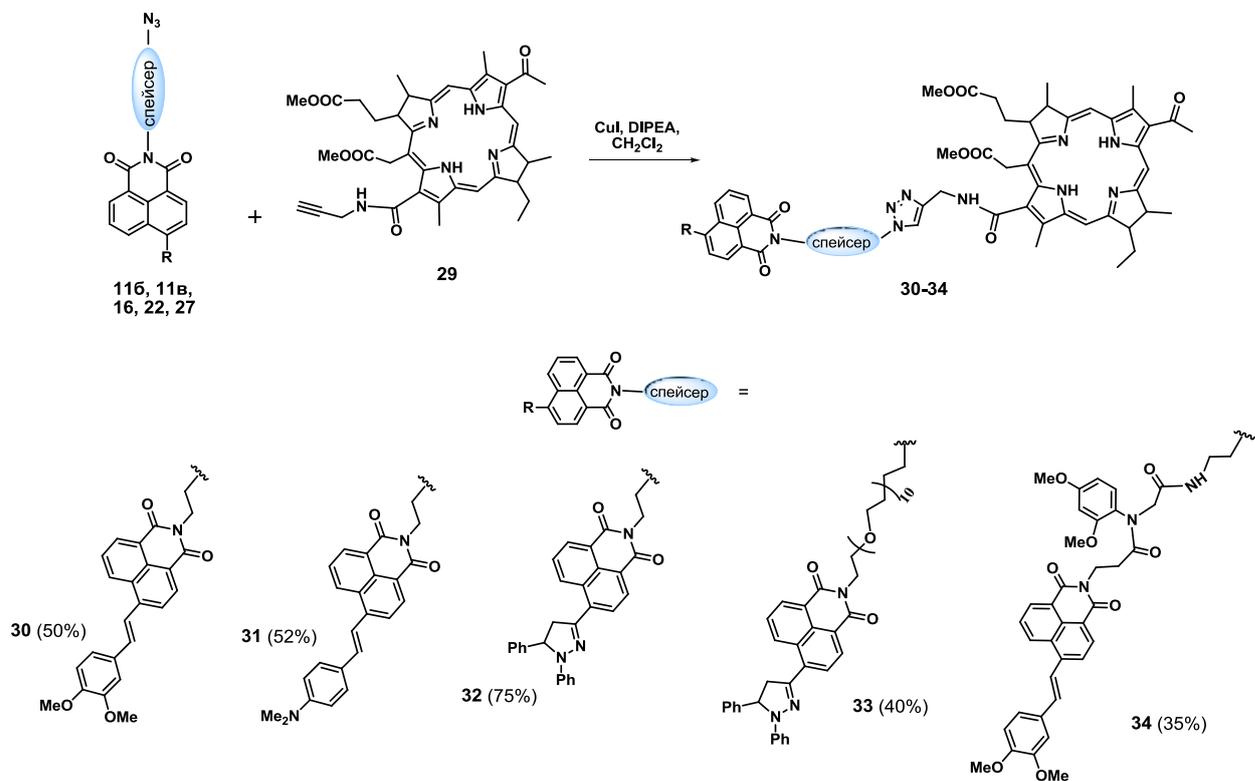
кислоты, что приводит к получению бактериофеофориды, который затем алкилируют диазометаном. Пропаргильную группу вводят в метиловый эфир бактериофеофорбида действием пропаргиламина в пиридине.

Схема 11



Синтез соединения **29** и конъюгатов бактериохлорофиллина с нафталимидами **30-34** по реакции азид-алкинового циклоприсоединения, представленный на схеме 12, был проведен сотрудником кафедры ХТБАС МИТХТ Притыковым Д.А.:

Схема 12



Конъюгаты бактериохлоина и производных нафталимида представляют собой (бис)хромофорные системы, в которых между двумя фотоактивными компонентами могут происходить такие фотофизические процессы как перенос энергии и/или электрона, образование эксиплексов. Вышеназванные процессы могут значительно повлиять на принципиально важные для применения в области ФДТ параметры: эффективность генерации фотосенсибилизаторами синглетного кислорода и интенсивность флуоресценции флуорофора.

Как уже упоминалось в разделе 2.3, перенос энергии по механизму Ферстера в (бис)хромофорной системе может происходить при выполнении условия перекрытия спектра флуоресценции донорного компонента системы (в нашем случае нафталимидного флуорофора) со спектром поглощения акцептора. На рисунке 10 представлено взаимное расположение абсорбционного спектра пропаргилабактериохлорина **29** и спектров флуоресценции нафталимидов **9б**, **9в**, **19а**. (Здесь и в дальнейшем для изучения оптических свойств нафталимидных флуорофоров были использованы гидрокси-производные (**9б**, **9в**, **19а**) или *N*-бутил замещенные (**8б**, **8в**, схема 2).

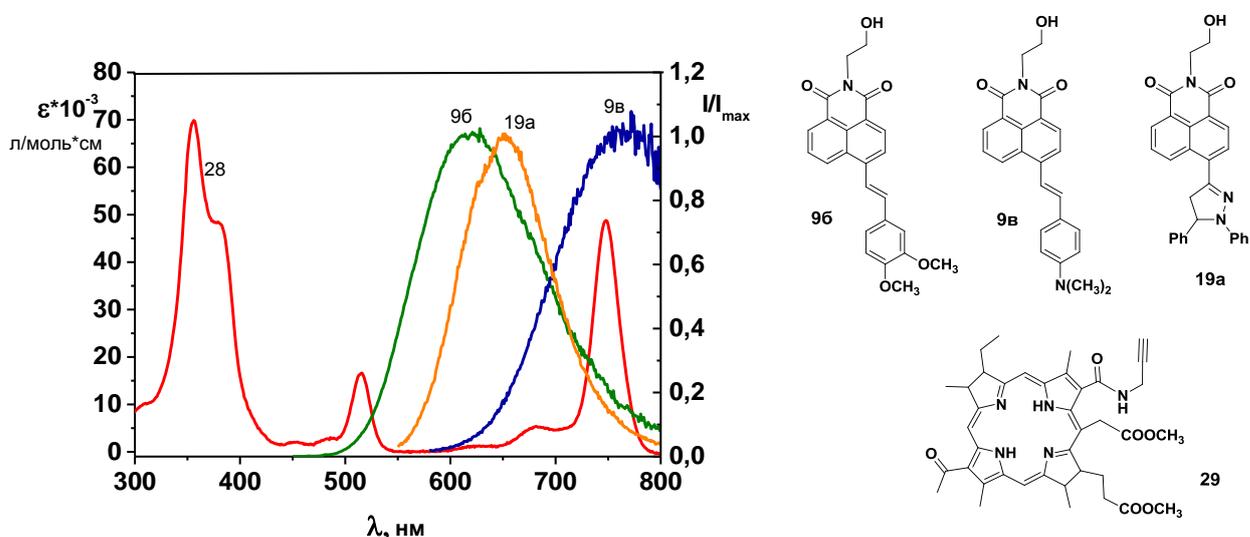


Рисунок 10 – Спектры поглощения бактериохлорина **29** и нормализованные спектры флуоресценции нафталимидных красителей **9б**, **9в**, **19а** в ацетонитриле

Как видно из рисунка 10, между спектром поглощения **29** и широкими полосами испускания нафталимидных красителей наблюдается частичное перекрытие даже в случае соединений **9в** и **19а**, максимумы люминесценции которых расположены в области минимального поглощения бактериохлорина. В

связи с наличием перекрытия полос флуоресценции красителей и поглощения фотосенсибилизатора при возбуждении конъюгатов в максимум поглощения нафталимидных компонент можно ожидать появления как флуоресценции самих нафталимидов, так и реализации процесса переноса энергии возбуждения на бактериохлориновый хромофор.

Результаты экспериментов по изучению флуоресцентных характеристик конъюгатов **30-32** (схема 12) показали, что во всех (бис)хромофорных системах с высокой эффективностью реализуется процесс резонансного переноса энергии. Далее будут подробно рассмотрены оптические характеристики конъюгатов на примере соединения **31**, спектры поглощения и люминесценции соединений **30** и **32** приведены на рисунках П5 и П6 в приложении)

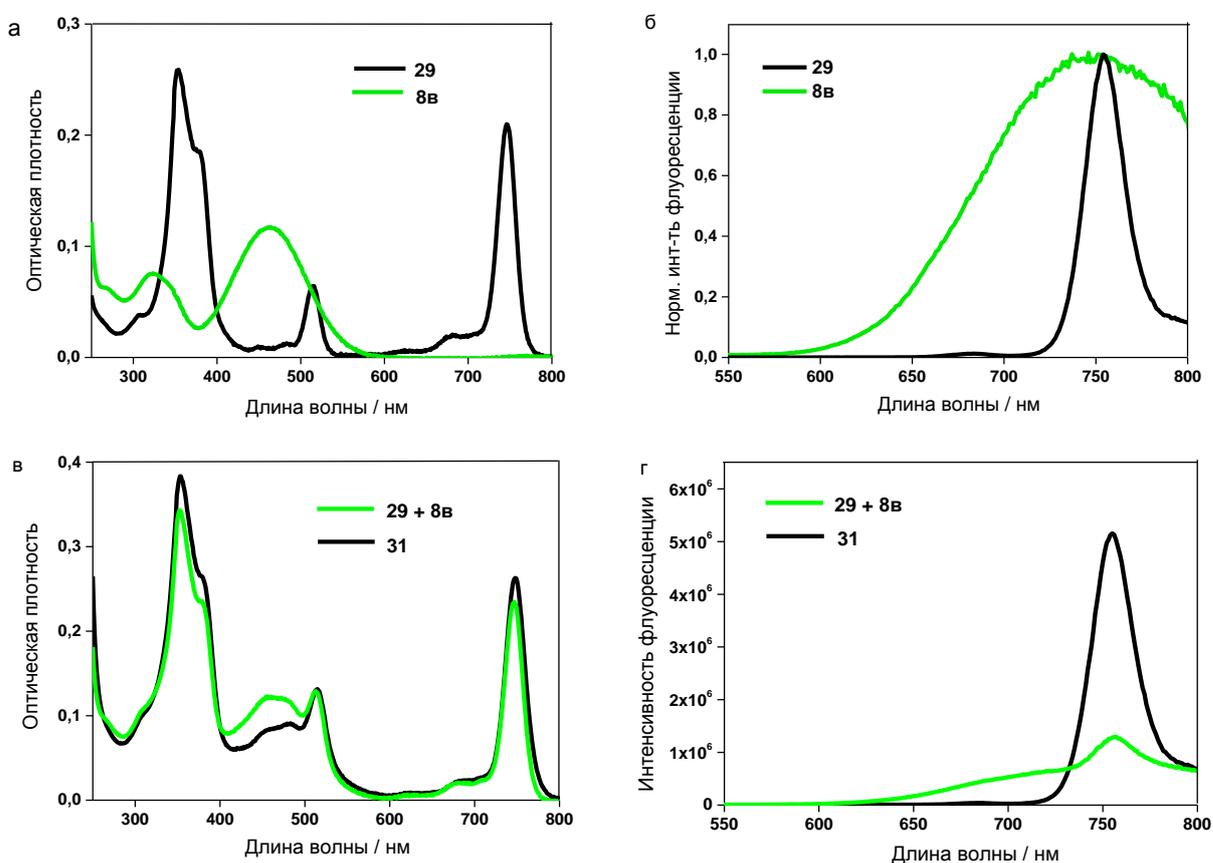


Рисунок 11 –Электронные спектры поглощения (а, в) и флуоресценции (б, г) соединений **8в**, **29**, **31** и эквимольярной смеси **29** и **8в** (обозначено **29+8в**) в ацетонитриле. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** – 490нм, для **29** – 515 нм. Концентрация всех соединений - $4.7 \cdot 10^{-6}$ М

На рисунке 11 представлены электронные спектры поглощения и флуоресценции соединений **8в**, **29**, **31** и эквимольярной смеси **29** и **8в**. Спектр

поглощения конъюгата **31** в высокой степени похож на спектр эквимольной смеси **29** и **8в** (рис. 11в), что указывает на слабое взаимодействие хромофоров в основном состоянии. Максимум поглощения нафталимидного хромофора в составе конъюгата претерпевает незначительное батохромное смещение относительно спектра индивидуального красителя **8в**, что можно объяснить акцепторным влиянием триазольного фрагмента, появление которого в структуре конъюгата приводит к усилению ICT-процесса по сравнению с N-бутилнафталимидом **8в**. Максимумы флуоресценции красителя и бактериохлорина расположены в области 760 нм (рисунок 11б), однако спектр флуоресценции красителя представляет собой более широкую полосу, попадающую в ИК-область (рисунок 11б). В случае эквимольной смеси (рисунок 11в,г) возбуждение в области 490 нм, которое поглощается в основном красителем, приводит к появлению широкой полосы эмиссии, по форме похожей на спектр флуоресценции индивидуального красителя, однако с небольшим острым пиком с максимумом 760 нм, который соответствует флуоресценции бактериохлорина за счет прямого фотовозбуждения.

При облучении конъюгата, в котором два фотоактивных компонента связаны ковалентно, светом с длиной волны 460 нм наблюдаемый спектр флуоресценции резко отличается от спектра эквимольной смеси: в области 760 нм проявляется узкий пик флуоресценции, что соответствует флуоресценции свободного бактериохлорина, в то время как флуоресценция нафталимидного красителя тушится полностью (рисунок 11б). Это свидетельствует о том, что нафталимидный флуорофор после перехода в возбужденное состояние принимает участие в быстром безызлучательном процессе. Наиболее вероятно протекание в системе внутримолекулярного переноса энергии с донорного нафталимидного фрагмента на акцептор - бактериохлорин. Похожая спектральная картина наблюдается для конъюгатов **30** и **32**: флуоресценция нафталимидных фрагментов также тушится в результате безызлучательного переноса энергии на бактериохлорин (рисунки П5 и П6 Приложения), а также для **31** в биологических жидкостях – сыворотке крови кролика и растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА), см. рисунки П7 и П8 в Приложении.

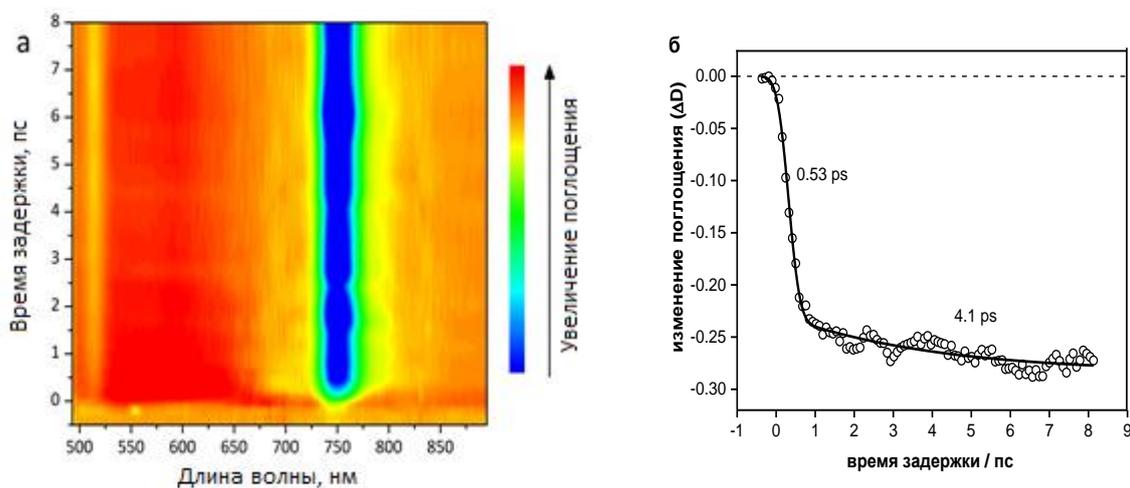


Рисунок 12 – а) спектрально-временная карта поглощения возбужденных состояний соединения **31**; б) кинетика поглощения соединения **31** на длине волны 750 нм

Природа фотофизических процессов, происходящих в конъюгате **31** при фотовозбуждении, была изучена при помощи метода время-разрешенной спектроскопии поглощения возбужденных состояний. В спектрально-временной карте, представленной на рисунке 12а, можно наблюдать отрицательный сигнал, максимум которого расположен в области 750 нм. Так как именно в этой области расположена полоса поглощения бактериохлоринового хромофора (см. рисунок 11а), отрицательный сигнал можно отнести к выцветанию основного состояния бактериохлорина, что указывает на переход фрагментов ФС в возбужденное состояние. Вклад вынужденной эмиссии в сигнал при 750 нм можно оценить с помощью значения излучательного времени жизни хромофора τ_r (времени жизни возбужденного состояния, в случае, если излучение является единственным путем его дезактивации). Значение τ_r рассчитывается как отношение времени жизни синглетного возбужденного состояния хромофора к квантовому выходу флуоресценции и для бактериохлорина составляет $2\text{нс} / 0.030 = 67\text{ нс}$. Высокое значение времени жизни излучательного состояния приводит к тому, что константа скорости излучения бактериохлорна мала ($k_r = 1 / \tau_r$), и вынужденная эмиссия является маловероятным процессом в случае конъюгата **31**. Положительный сигнал в области 500-680 нм, по-видимому, соответствует поглощению S_1 -состояний обоих хромофоров. В области 750 нм этот сигнал может так же иметь ненулевую интенсивность и снижаться при увеличении времени задержки, что объясняет

проявление на рисунке 12б все более и более отрицательного сигнала даже по истечении 4.1 пс – характеристического времени релаксации возбужденного состояния бактериохлорина.

Важно, что появление отрицательной полосы происходит с некоторой временной задержкой после фотовозбуждения системы в максимум поглощения нафталимидного флуорофора. По временному профилю на длине волны 750 нм (рисунок 12б) было вычислено характеристичное время процесса перехода фотосенсибилизатора в возбужденное состояние, которое составило 0.53 пс. Можно заключить, что фрагмент 4-стирилнафталимида после возбуждения 490 нм переходит в возбужденное состояние, участвующее в быстром безызлучательном процессе, которым, вероятнее всего, является перенос энергии на бактериохлорин. Константы скорости RET-процесса можно вычислить по формуле (3) [179]:

$$k_{RET} = \frac{1}{\tau_{RET}} = \frac{1}{0.53 \cdot 10^{-12}} = 1.89 \cdot 10^{12} \text{с}^{-1} \quad (3)$$

Чтобы рассчитать эффективность процесса переноса энергии в системе необходимо сравнить скорость RET-процесса со скоростью релаксации нафталимидного флуорофора в отсутствие акцептора, которое рассчитывается из значения времени жизни флуоресценции по формуле (4). Для расчета использовалось значение времени жизни флуорофора **8в** в ацетонитриле (Таблица 2).

$$k_r + k_{nr} = \tau_{D,0}^{-1} = \frac{1}{0.38 \cdot 10^{-9}} = 2.63 \cdot 10^9 \text{с}^{-1} \quad (4)$$

Таким образом, безызлучательный процесс в конъюгате **31** протекает на три порядка быстрее, чем релаксация донора в отсутствие акцептора, а эффективность RET-процесса, которая рассчитывается как отношение констант скоростей RET к сумме констант скоростей всех процессов, протекающих в системе по формуле (5) близка к единице:

$$\Phi_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_r + k_{nr}} = 0.999 \quad (5)$$

Таким образом, по результатам время-разрешенного эксперимента было показано, что в (бис)хромофорной системе **31** с высокой эффективностью (99.9%) протекает процесс резонансного переноса энергии.

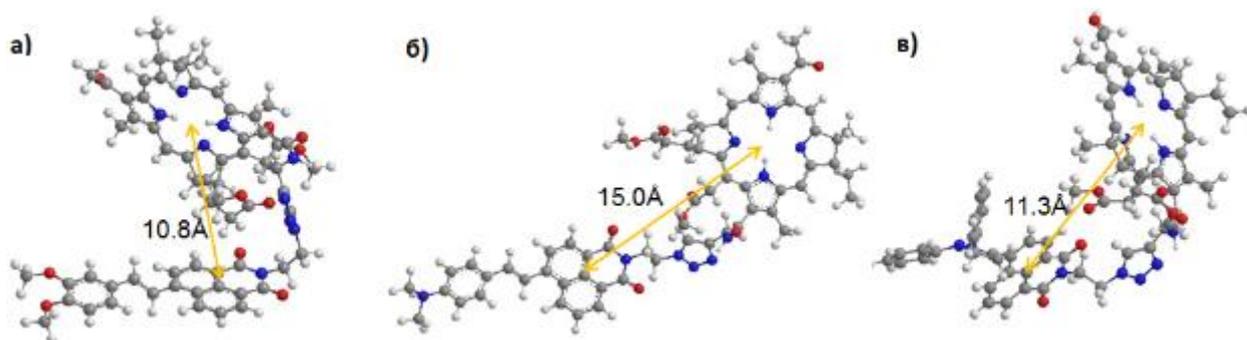


Рисунок 13 – Геометрия молекул конъюгатов **30** (а), **31** (б), **32** (в), оптимизированная методом РМ6

Эффективность переноса энергии в конъюгатах также была оценена на основании теоретических расчетов в рамках резонансно-индуктивной модели Ферстера. Для расчета теоретической эффективности переноса энергии и констант скорости RET-процесса в конъюгатах **29-31** использовались соотношения (6) и (7)[179]:

$$EET_{RET} = \frac{k_{RET}}{k_{RET} + (\tau_D^{-1})} \quad (6)$$

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (7)$$

где τ_D – время жизни возбужденного состояния хромофора донора (нафталимид) в отсутствие акцептора (бактериохлорин) и r – расстояние между донором и акцептором. В качестве параметра τ_D использовалось время жизни флуоресценции флуорофоров **8a-в** в ацетонитриле (Таблица 2). Расстояние между донором и акцептором (r) было найдено путем оптимизации геометрии молекул с помощью метода РМ6 (рисунок 13). R_0 – критический радиус Ферстера (расстояние между хромофорами, на котором эффективность переноса энергии равна 50%) [179]. Для расчета R_0 использовалось соотношение:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \phi_D^n}{128 \pi^2 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (8)$$

где κ^2 – ориентационный фактор (принимается равным 2/3 для случайной ориентации хромофоров в пространстве в результате вращательной диффузии), ϕ_D^n – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, n – показатель преломления среды, N_A – постоянная Авогадро ($N_A = 6.02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹). Интеграл в

выражении (3) определяет величину перекрытия нормализованного спектра излучения донора $F_D(\lambda)$ и поглощения акцептора $\varepsilon_A(\lambda)$. Результаты расчетов теоретической эффективности переноса энергии представлены в таблице 4:

Экспериментальные значения переноса энергии в конъюгате **30** было оценено по формуле (9):

$$EET_{RET} = 1 - \frac{\varphi_D^f}{\varphi} \quad (9),$$

где φ^f и φ^f / φ_D^f - квантовые выходы хромофора-донора в присутствии и в отсутствие акцептора соответственно [179].

Таблица 4 – Спектральные свойства и характеристики переноса энергии для конъюгатов **30-32**, пропаргил-производного бактериохлорина **29** и нафталимидов **86**, **8в** и **19а** по сравнению с эквимольными смесями (обозначены **86+29**, **8в+29**, **19а+29**) отдельных компонентов конъюгатов в ацетонитриле

Соед-е	φ^{fluor}	λ_{max}^{fluor} ($\lambda_{возб}$)', нм	$R_0, \text{Å}$	$r, \text{Å}$	Интеграл перекрыт. ^a , $M^{-1} \cdot M^{-1} \cdot nm^4$	$k_{FRET}(\text{теор.}),$ s^{-1}	EET, %	
							Теор.	Эксп.
29	0.030	758 (515)	-	-	-	-	-	-
86	0.210	618 (420)	-	-	-	-	-	-
86+29	0.19	618 (420)	-	-	-	-	-	-
30	0.034	755 (420)	39.58	10.8	$1.0 \cdot 10^{15}$	$6.26 \cdot 10^{11}$	99.96	99.95
8в	0.006	773 (460)	-	-	-	-	-	-
8в+29	0.0075	755 (460)	-	-	-	-	-	-
31	0.023	755 (460)	12.96	15.0	$4.4 \cdot 10^{15}$	$1.07 \cdot 10^{11}$	97.63	99.9 ^b
19а	0.071	651 (490)	-	-	-	-	-	-
19а+29	0.0088	651, 755 (490)	-	-	-	-	-	-
32	0.028	755(490)	30.88	11.3	$6.8 \cdot 10^{14}$	$4.45 \cdot 10^{11}$	99.79	-*

*- определение значения эффективности переноса энергии затруднено.

^aРассчитано из спектров поглощения бактериохлорина **28** и флуоресценции соединений **76**, **7б** и **19а**.

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

Как видно из таблицы 4, квантовый выход эквимольной смеси **86** и **29** близок по значению к квантовому выходу индивидуального красителя **86**, так как бактериохлорин практически не поглощает свет в области 420 нм. При этом квантовый выход конъюгата **30** при фотовозбуждении нафталимида снижается в результате переноса энергии по сравнению с **86** в 6 раз и приближается по значению к эффективности флуоресценции бактериохлорина **29**. Квантовые выходы флуоресценции конъюгатов **31** и **32** также близки к значению φ^{fluor} соединения **29**. Перенос энергии в конъюгатах **30-32** реализуется с эффективностью близкой к 100%.

Для соединения **31** также была получена спектрально-временная карта поглощения возбужденных состояний с наносекундным разрешением по шкале времени (рисунок 14а). Сечения карты по горизонтали представляют собой спектры поглощения возбужденного состояния с фиксированным временем задержки (рисунок 14б). В спектре, полученном сразу же после возбуждения (задержка 0 нс), наблюдается широкая полоса поглощения S_1 -возбужденного состояния бактериохлорина в области 400-650 нм (в неё могут вносить вклад несколько переходов S_1-S_n), данная полоса появляется в результате переноса энергии в нафталиimidного хромофора. На карте также наблюдаются отрицательные сигналы с максимумами 515 и 700 нм, относящиеся к выцветанию основного состояния бактериохлорина. По графику кинетики поглощения на 600 нм (рисунок 14в) можно заключить, что молекулы из S_1 -состояния релаксируют за 2 нс, превращаясь в долгоживущие частицы, предположительно триплеты. Таким образом, спектр поглощения при временной задержке 40 нс (рисунок 13б) отражает поглощение возбужденного состояния T_1 .

Было обнаружено, что на время жизни T_1 -состояния бактериохлорина значительное влияние оказывает присутствие кислорода в растворе. В то время как в дегазированном растворе наблюдается моноэкспоненциальная кинетика поглощения возбужденного состояния с характеристическим временем 19 мкс (τ_T),

в случае раствора, насыщенного воздухом, наблюдается время жизни триплетного состояния 0.355 нс ($\tau_T^{O_2}$) (рисунок 14в,г). Значительная разница во временах жизни триплетов свидетельствует о том, что энергия возбуждения передается от фотосенсибилизатора молекулам кислорода, что приводит к образованию в растворе синглетного кислорода и ФС в основном состоянии.

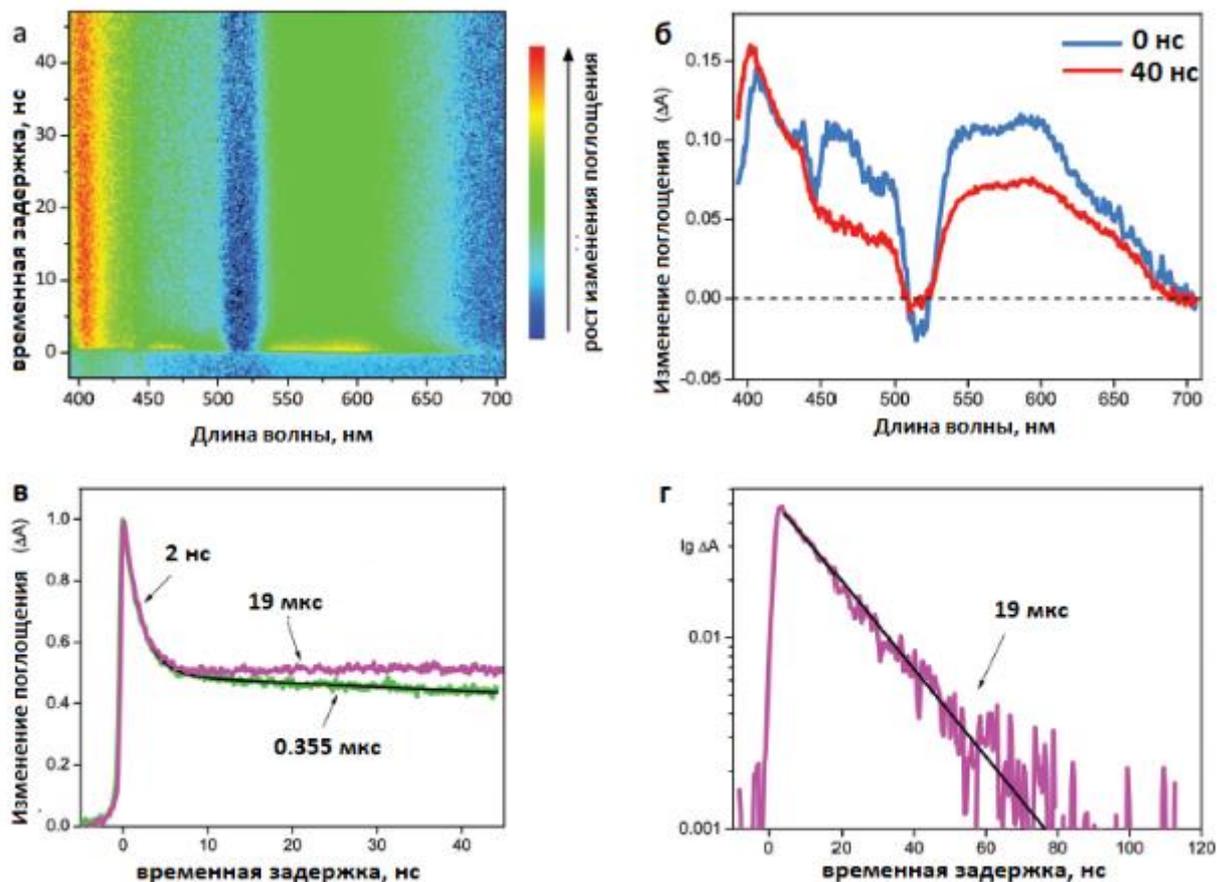


Рисунок 14 – Для **31** в ацетонитриле: а) Спектрально-временная карта с наносекундным разрешением по времени; б) Спектры поглощения возбужденного состояния при временах задержки 0 нс и 40 нс; в и г) Кинетика поглощения возбужденного состояния в области 600 нм в присутствии (розовая линия) и отсутствии (зеленая линия) кислорода в растворе, черная линия-экспоненциальное приближение. Длина волны возбуждения 440 нм, отрицательный сигнал на карте вызван присутствием фильтра, отсекающего сигнал импульса возбуждения.

Эффективность переноса энергии между триплетными состояниями бактериохлорина и кислорода была рассчитана по формуле (10):

$$\Phi_{RET2} = 1 - \frac{\tau_T^{O_2}}{\tau_T} \quad (10)$$

Значение эффективности переноса энергии составило 0.981, что указывает на то, что бактериохлорин в составе конъюгата **31** служит эффективным фотосенсибилизирующим агентом и генерирует синглетный кислород с высоким квантовым выходом.

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

При подготовке данного раздела использована собственная публикация автора [58].

Константа скорости переноса энергии обратно пропорциональна расстоянию между хромофорами r в шестой степени (см. формулу (7)). Поэтому одним из наиболее эффективных способов снижения эффективности переноса энергии в системе является удлинение спейсера между хромофорами [180, 181].

Геометрия конъюгата **33**, содержащего полигликолевый спейсерный фрагмент, была оптимизирована в программном комплексе MOPAC с использованием методом PM6 (рисунок 15). Расчетное значение расстояния между хромофорами в конъюгате составило 48.0 Å. С использованием значения критического радиуса Фёрстера (см. таблицу 4) нами была оценена теоретическая эффективность переноса энергии в конъюгате **33** с использованием формулы (11), она составила 6.5%.

$$EET_{RET} = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (11)$$

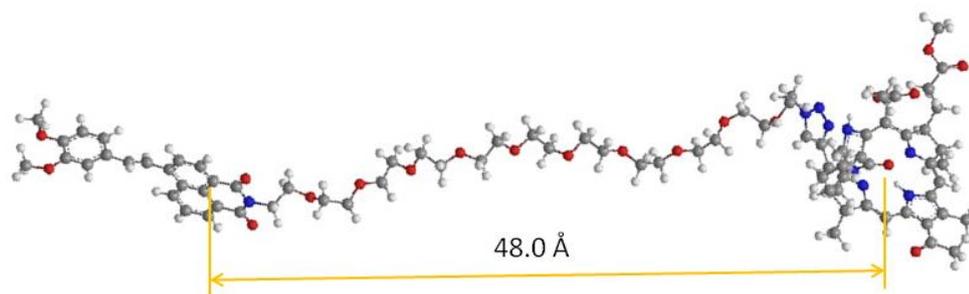


Рисунок 15 – Геометрия конъюгата **33**, оптимизированная методом PM6

На рисунке 16 представлены электронные спектры поглощения и флуоресценции соединений **19a**, **29**, **32**, **33** (схема 12) и эквимольной смеси **29** и

19a. В состав конъюгата **33** был введен полигликолевый спейсер для увеличения расстояния между хромофорами.

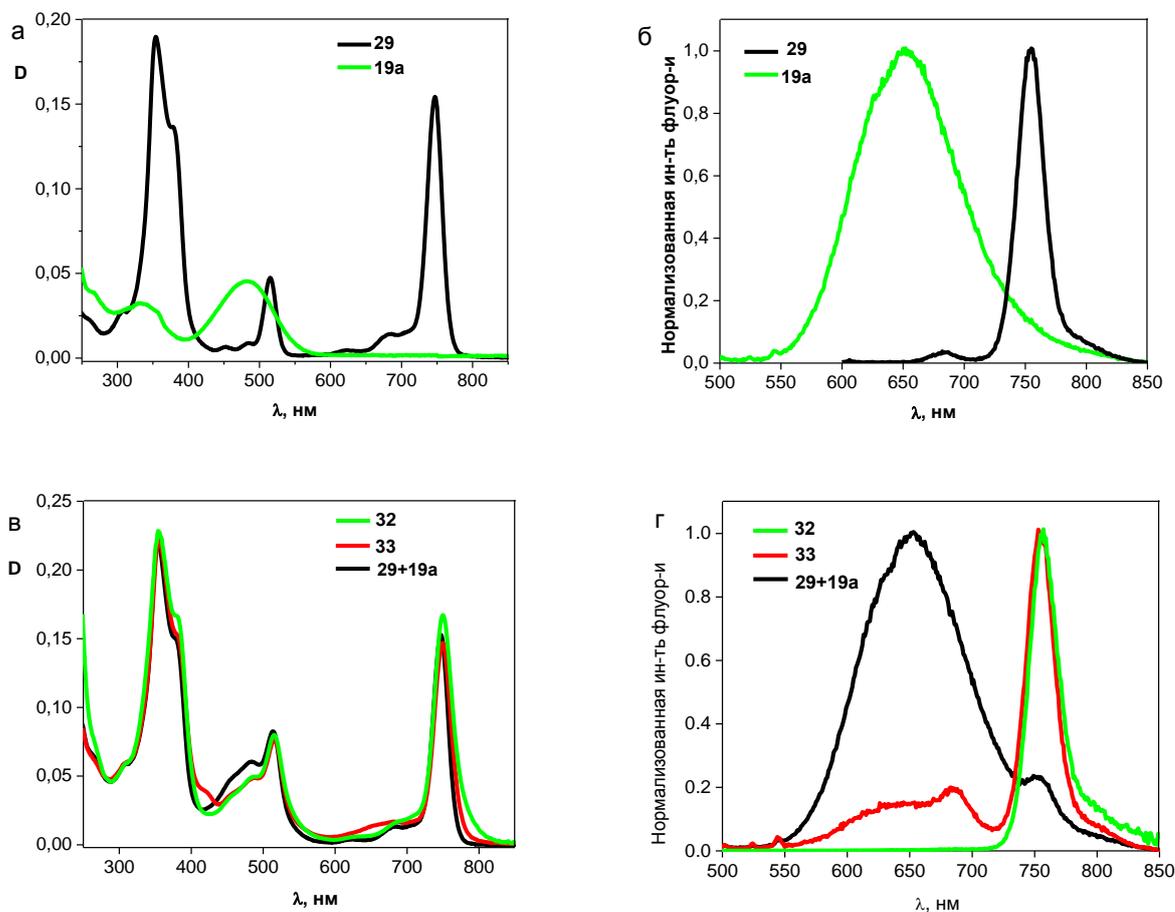


Рисунок 16 – Электронные спектры поглощения (а, в) и флуоресценции (б, г) соединений **19a**, **29**, **32**, **33** и эквимольной смеси **19a** и **29** (обозначено **29+19a**) в ацетонитриле. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** – 470 нм, для **29**– 515 нм. Концентрация всех соединений $5 \cdot 10^{-6}$ М

В случае эквимольной смеси (рис.16в,г) возбуждение в области 470 нм, которое поглощается в основном нафталимидным красителем (рисунок 16а), приводит к появлению широкой полосы эмиссии, соответствующей спектру флуоресценции индивидуального красителя (рисунок 16б) с небольшим пиком в области 760 нм, который соответствует флуоресценции бактериохлорина. При облучении **32** и **33** светом с длиной волны 470 нм наблюдается узкий пик флуоресценции с максимумом 760 нм, что отвечает флуоресценции бактериохлорина, в то время как флуоресценция нафталимидного красителя тушится (рисунок 16г). Однако в случае конъюгата **33**, в котором два фотоактивных

фрагмента разделены полигликолевым спейсером, флуоресценция красителя тушится не полностью, в данной молекуле процесс внутримолекулярного переноса энергии протекает менее эффективно по сравнению с конъюгатом **32**. Эффективность переноса энергии в конъюгате **32** была оценена с использованием значений времен жизни нафталидного хромофора **19a** в присутствии и отсутствии акцептора по формуле (7) и составила: $1 - (0.065 \text{ нс}/0.93 \text{ нс}) = 0.93$ (93%).

Существенное различие значений эффективности RET-процесса, полученных из теоретических и экспериментальных данных, может быть объяснено тем, что для полигликолевого спейсера конъюгата **33** в растворе преобладает скрученная конформация, обеспечивающая эффективное сближение хромофоров в пространстве. Для снижения эффективности переноса энергии необходимо вводить в состав конъюгатов спейсер, имеющий более жесткую структуру в растворе.

Изучение резонансного переноса энергии в конъюгатах проводилось с использованием ацетонитрила в качестве растворителя, однако при введении в организм, конъюгаты могут взаимодействовать с компонентами биологических жидкостей, поэтому оптические свойства красителя **19a**, бактериохлорина **29** и конъюгатов **32** и **33** были исследованы также в растворе бычьего сывороточного альбумина и сыворотке крови кролика. Результаты эксперимента приведены в разд. 6. Приложение (рисунки П9–П11 в Приложении), они демонстрируют, что перенос энергии в конъюгатах **31** и **32** эффективно протекает и в биологических средах.

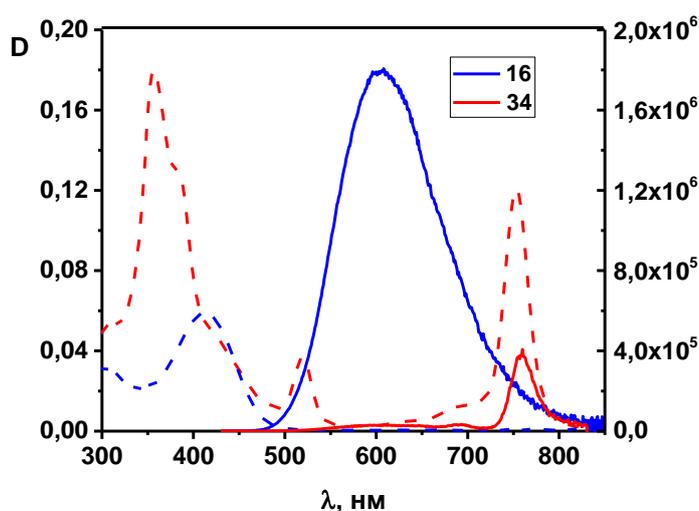


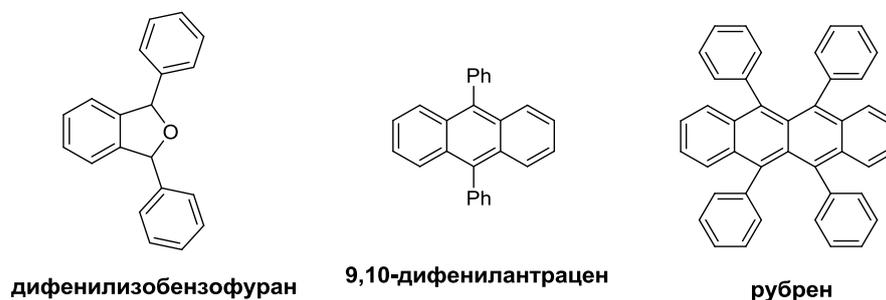
Рисунок 17 – спектры поглощения (пунктирные линии) и флуоресценции конъюгата **34** и красителя **16** в ацетонитриле

На рисунке 17 представлены спектры поглощения и флуоресценции конъюгата **34** и красителя **16** в ацетонитриле при возбуждении в области 420 нм. Флуоресценция нафталиimidного хромофора в составе конъюгата эффективно тушится, что указывает на реализацию переноса энергии в системе (квантовые выходы флуоресценции для **16** и **34** составили 34.4 и 1.7%, соответственно). Кроме того конъюгат **34** продемонстрировал слабую флуоресценцию в растворе бычьего сывороточного альбумина (см. рисунок П12 в Приложении).

3.5. Изучение эффективности генерации конъюгатами синглетного кислорода в растворе

Квантовый выход синглетного кислорода является одним из важнейших параметров, определяющих эффективность потенциального тераностика [182]. Наиболее простым подходом к его определению для реализации на практике является метод химической ловушки [183]. Он основан на добавлении к раствору фотосенсибилизатора ловушек синглетного кислорода - органических соединений, способных мгновенно и количественно реагировать с частицами $^1\text{O}_2$, образуя при этом только продукты, не мешающие спектрофотометрическому определению концентрации неокисленной ловушки в растворе. В литературе описано множество примеров подобных молекул [182, 183], к ним относятся изображенные на схеме 14 производные 9,10-замещенного антрацена, дифенилизобензофуран, рубрен и др.

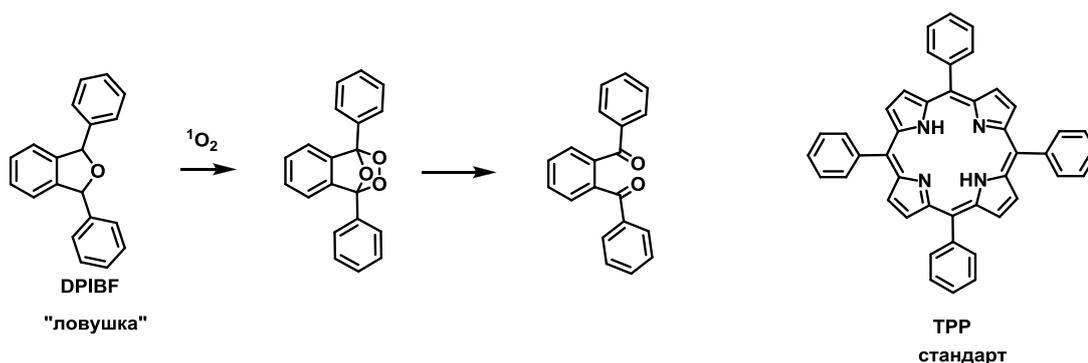
Схема 14



Для определения квантовых выходов генерации синглетного кислорода полученных срамках данной работы конъюгатов мы использовали дифенилизобензофуран (DPIBF), окисление которого синглетным кислородом

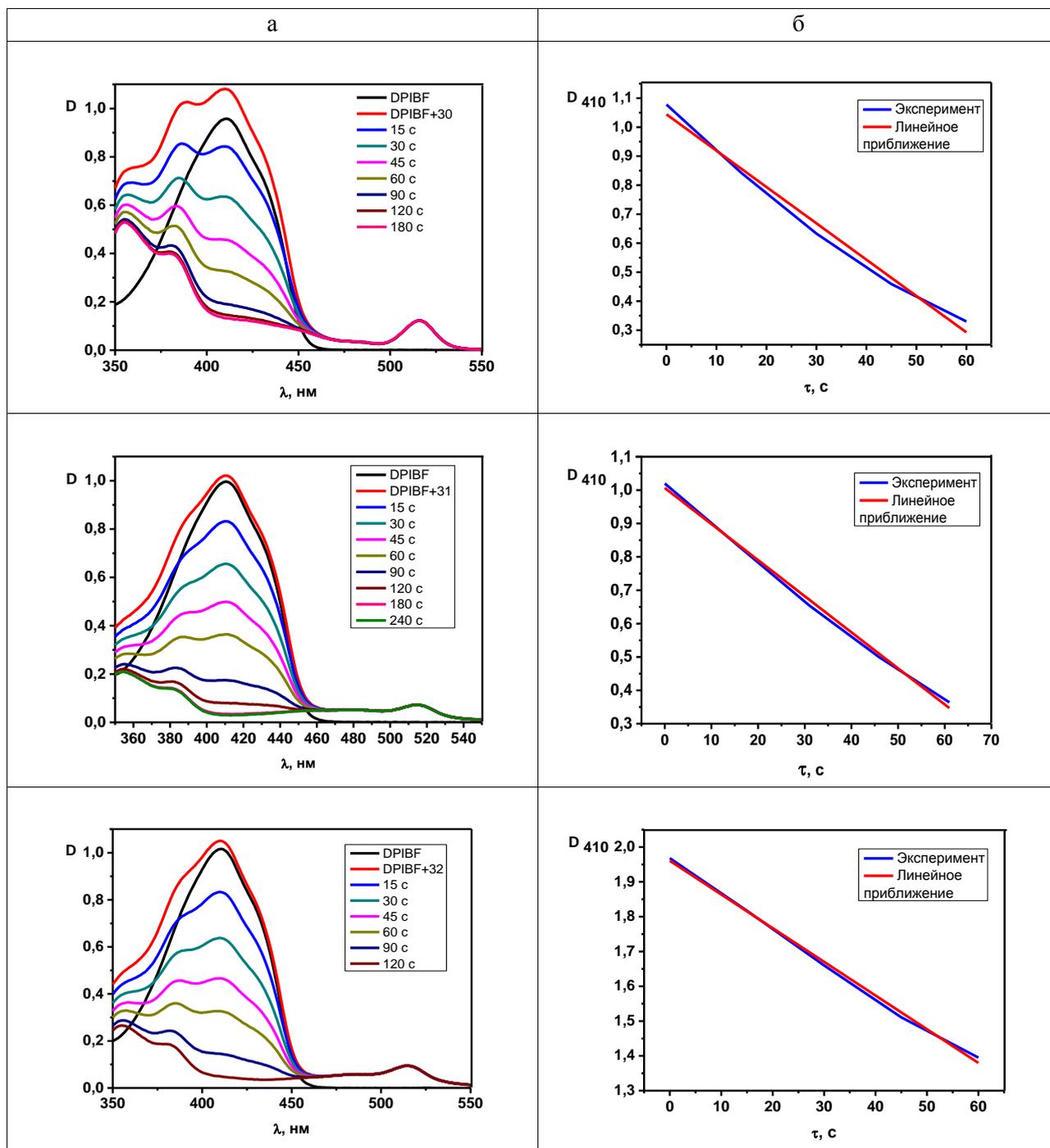
изображено на схеме 15 [184]. Кратковременное облучение фотосенсибилизатора в максимум его поглощения приводит к образованию в растворе, содержащем ловушку, синглетного кислорода, взаимодействие которого с DPIBF сопровождается падением оптической плотности в области 410 нм, что связано с окислением ловушки до неокрашенного эндопероксида (рисунок 15). Проведение эксперимента со стандартом, для которого известен квантовый выход синглетного кислорода, позволяет рассчитать этот параметр и для исследуемого фотосенсибилизатора. В качестве стандарта нами был использован тетрафенилпорфирин (TPP, ϕ_{1O_2} (ацетон) = 0.7, рисунок 22 [185, 186]), один из максимумов поглощения которого совпадает с пиком поглощения бактериохлорина, расположенного в области 510-520 нм, что позволило нам возбуждать образцы стандарта и исследуемых фотосенсибилизаторов светом одинаковой длины волны.

Схема 15



В таблице 5 приведены спектры поглощения растворов фотосенсибилизаторов **30-32** в ацетоне, содержащих ловушку DPIBF, зарегистрированные после кратковременного облучения кювет с интенсивно перемешиваемым раствором светом с длиной волны 510 нм и соответствующие им графики зависимости оптической плотности растворов на длине волны 410 нм от времени облучения ($D(\tau)$). Изменения в спектрах поглощения соединений **29**, **33** и **34**, стандарта TPP, а также конъюгатов **33** и **34** приведены на рисунках П14–П15 Приложения.

Таблица 5 – а) электронные спектры поглощения растворов тераностиков **30-32** и DPIBF, полученные после 0, 15, 30...300 секунд облучения в области 510 нм. Растворитель - ацетон. Концентрация ловушки - $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$; б) линейный участок графика зависимости оптической плотности соответствующего раствора на длине волны 410 нм от времени облучения ($D(\tau)$): экспериментальные данные-синяя линия, аппроксимированная прямая – красная линия.



Представленные в таблице 6 значения квантовых выходов позволяют сделать важный вывод о том, что пришивка к молекуле бактериохлорина нафталимидных флуорофоров в случае **30-33** не приводит к снижению эффективности генерации

фотосенсибилизатором синглетного кислорода. Для конъюгата **34** эффективность генерации синглетного кислорода оказалась самой низкой из рассмотренных соединений, это можно связать с наличием в спейсерном фрагменте **34** фенильного ядра с двумя метоксигруппами, обладающими ЭД-свойствами, что повышает вероятность окисления самих молекул конъюгата под действием выделяющихся в растворе активных форм кислорода.

Таблица 6 - Квантовые выходы генерации синглетного кислорода фотосенсибилизаторов **29-34** в ацетоне

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

Стоит отметить, что при облучении растворов нафталиimidных красителей светом с длиной волны 510 нм в присутствии ловушки наблюдалось лишь незначительное снижение оптической плотности в области 410 нм (см.рисунок П13 Приложения).

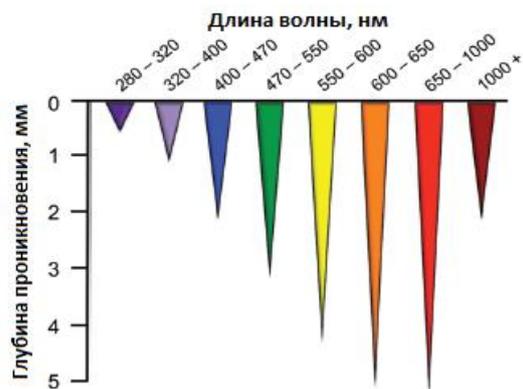
3.6. Исследование фотодинамической эффективности и флуоресценции тераностика на клетках аденокарциномы человека

При подготовке данного раздела использована собственная публикация автора [170].

Результаты клеточных исследований конъюгата **30** предоставлены А.А. Игнатовой и д.б.н. А.В. Феофановым (ИБХ РАН) [170].

С помощью метода флуоресцентной спектроскопии на сегодняшний день возможно проводить визуализацию процессов протекающих в клетках, измерять концентрации веществ-биомаркеров патологических процессов. В приложении к ФДТ флуоресцентная визуализация помогает определять локализацию очагов опухоли и отслеживать эффективность лечения. Методы оптической визуализации открывают широкие возможности для исследования биологических объектов, однако, требуют использования флуорофоров, удовлетворяющих определенным требованиям.

а



б

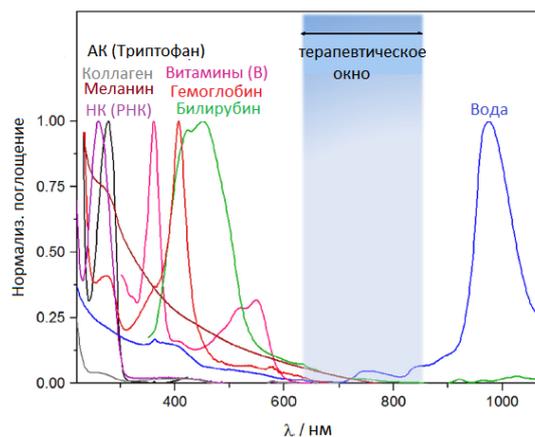


Рисунок 18 – а) глубина проникновения света различных длин волн через кожу [186]; б) спектры поглощения биологически важных пигментов и фототерапевтическое окно прозрачности биотканей [188]

На рисунке 18а схематично изображена глубина проникновения световых волн через кожу [187]. Наиболее глубоко в кожу способны проникать лучи ближнего ИК-диапазона, кроме того, важным требованием является расположение максимума поглощения красителя в области оптической прозрачности биологических тканей, то есть в области 650-850 нм, где минимально собственное поглощение компонентов крови (рисунок 18б) [188]. Поэтому наиболее перспективными для практического применения являются флуорофоры, обладающие поглощением именно в этой области.

В связи с тем, что процесс переноса энергии эффективно протекает во всех синтезированных в рамках данной работы конъюгатах, для проведения клеточных исследований был выбран конъюгат **30** как самый перспективный для применения в области флуоресцентной диагностики, так как входящий в его состав диметиламиностирилнафталимидный краситель обладает наиболее длинноволновым поглощением.

В рамках клеточных испытаний конъюгата **30** с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа были получены изображения клеток линии A549 (аденокарцинома легких человека), инкубировавшихся с раствором **30** (2 мкмоль/л) в течение 3 часов, а затем подвергнутых фотовозбуждению монохроматическим излучением лазера на длине волны 488 нм (рисунок 19а-г).

Облучение клеток проводилось в два этапа: на первом этапе было применено низкоинтенсивное лазерное излучение, подобное тому, что используется для целей флуоресцентной диагностики (рисунок 19а,б); на втором использовалось высокоинтенсивное излучение, применяемое для достижения терапевтического эффекта (рисунок 19в,г). На рисунке 19д,е представлены спектры флуоресценции конъюгата **30** в клетках до и после высокоинтенсивного облучения.

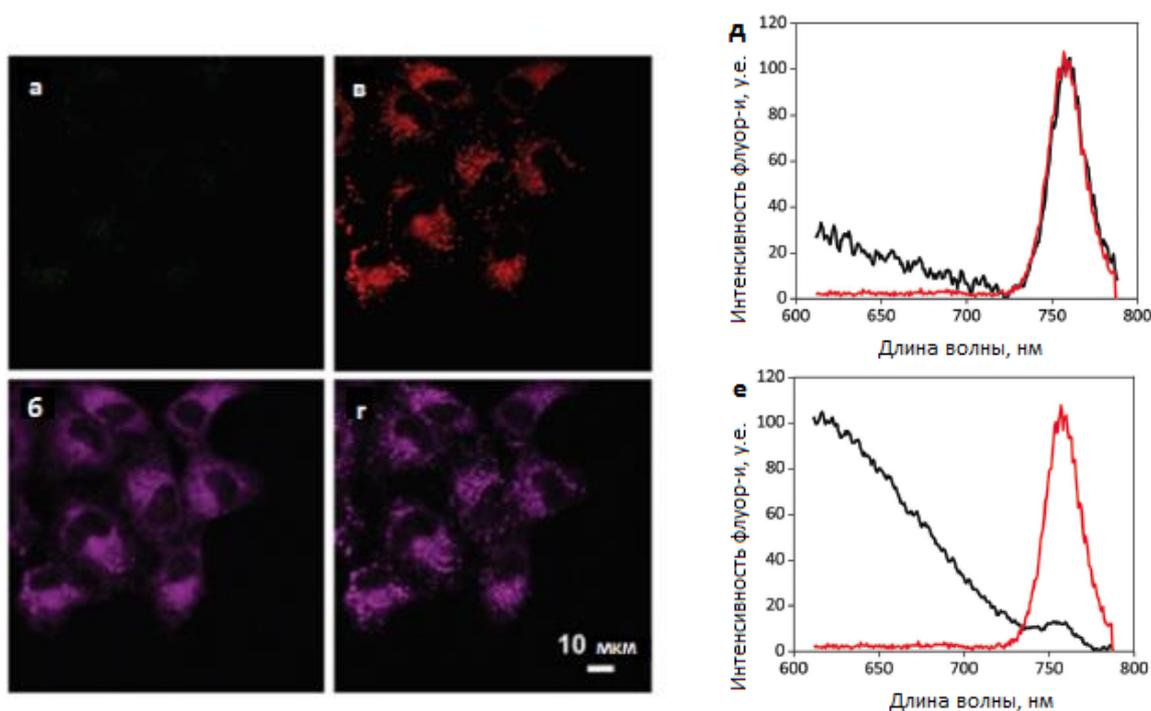


Рисунок 19 – Снимки конфокального флуоресцентного микроскопа: а и в – детекция флуоресценции в области 550-650 нм (краситель); б и г – детекция >730нм (бактериохлорин). а и б – до продолжительного и интенсивного облучения лазером; в и г– после продолжительного облучения клеток лазером в области 488нм; д и е – спектры флуоресценции конъюгата **30** в клетках при возбуждении 488 нм до (д) и после (е) длительного высокоинтенсивного облучения лазером. Красная линия на рис.13 д, е – спектр флуоресценции бактериохлорина **28** в 1%-м водном растворе солюбилизатора Chremophore EL

При кратковременном низкоинтенсивном облучении клеток в область поглощения красителя флуоресценции самого красителя (рисунок 19а) не наблюдалось, но интенсивно флуоресцировал бактериохлорин (рисунок 19б). Это наблюдение подтверждает, что перенос энергии с нафталимидного флуорофора на фотосенсибилизатор происходит и внутри клеток. В спектрах флуоресценции на

рис. 16д наблюдается сигнал в области 760 нм, что соответствует люминесценции бактериохлорина.

После высокоинтенсивного облучения клеток на изображении, соответствующем детекции 550-650 нм (рис. 19в), можно наблюдать проявление флуоресцентного изображения клеток, а в спектре флуоресценции образца появляется широкий пик (600-730 нм), при этом интенсивность люминесценции на 750 нм значительно снижается. Данные спектральные эффекты свидетельствуют о фотообесцвечивании бактериохлоринового фрагмента, вероятно, под действием синглетного кислорода. При облучении в максимум поглощения флуорофора (488 нм) энергия возбуждения эффективно передается с нафталимида на акцептор-бактериохлорин, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала последнего (760 нм), а также образованию в системе активных форм кислорода. При длительном высокоинтенсивном облучении в клетках наблюдается фотодинамический эффект – разрушение компонентов клеток, а также самого бактериохлоринового хромофора под действием АФК (об этом дополнительно свидетельствует гранулярное распределение флуоресцирующих областей в клетках после интенсивного облучения). Частичное разрушение акцепторных фрагментов конъюгатов приводит к проявлению собственной флуоресценции нафталиimidного красителя.

Максимум флуоресценции нафталиimidного хромофора в клеточной среде располагается в области 600 нм, то есть сдвинут гипсохромно относительно полосы люминесценции красителя в ацетонитриле. Используя данные таблицы 2, можно сделать вывод о том, что полярность микроокружения, в котором находятся молекулы конъюгата, в клетках сравнима с полярностью диэтилового эфира ($\epsilon = 4.3$, $\lambda_{\max}^{\text{fl}} = 608$ нм). В клетках также наблюдается резонансный перенос энергии с нафталиimidного хромофора на бактериохлорин. Сдвиг полос поглощения и люминесценции *N,N*-диметиламиностирилового хромофора в коротковолновую область так же наблюдался в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА) и в сыворотке крови кролика (см. рисунки П7 и П8 в Приложении). В биологических средах люминесценция нафталиimidного красителя также эффективно тушится.

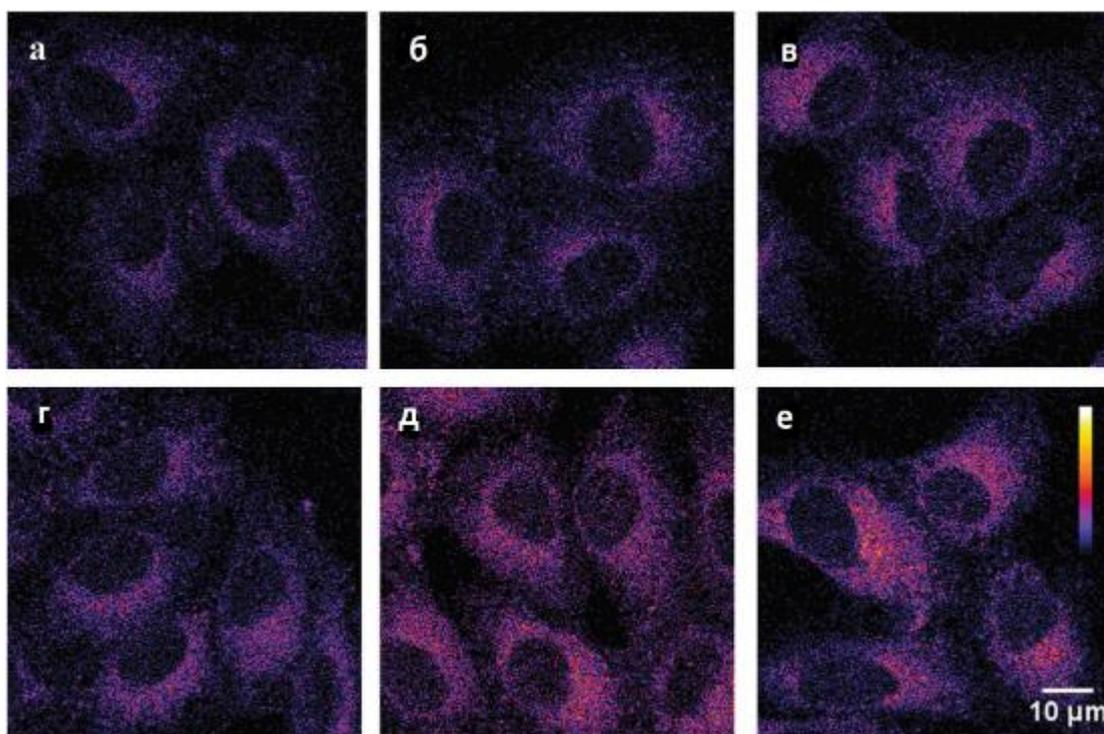


Рисунок 20 – Снимки конфокального флуоресцентного микроскопа, демонстрирующие распределение конъюгата **31** в клетках линии A549 (возбуждение 514нм, детекция флуоресценции >730нм). Клетки инкубировались с растворами 2мкмоль/л (а, г), 4 мкмоль/л (б, д) и 8мкмоль/л (в, е) в течение 1 часа (а-в) и 3 часов (г-е)

На рисунке 20 представлены изображения клеток, инкубированных с растворами **31** различных концентраций в течение 1 и 3 часов. Распределение флуоресцирующих областей в клетках свидетельствует о том, что конъюгат способен проникать внутрь клеток A549 и распределяться в цитоплазме, не попадая в ядро. При повышении концентрации раствора конъюгата от 4мкмоль/л до 8 мкмоль/л и увеличении времени инкубации интенсивность флуоресценции увеличивается умеренно, что позволяет предположить, что при концентрациях раствора выше 4 мкмоль/л и выдержке в течение 3х часов наступает насыщение внутриклеточной среды раствором **31**.

При возбуждении фотосенсибилизатора конъюгат **30** проявляет фотодинамическую активность по отношению к клеткам линии A549 (рисунок 21). При облучении в области длинноволнового максимума поглощения бактериохлорина, наблюдается гибель 90% клеток при концентрации конъюгата 0.7 ммоль/л. В исследованных концентрациях (<8 мкмоль/л) конъюгат не проявляет токсичности для клеток без фотовозбуждения.

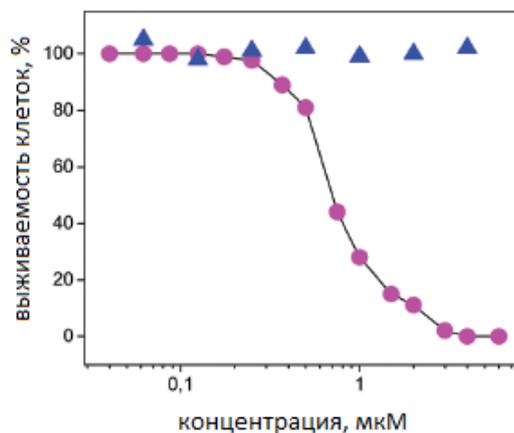


Рисунок 21 – Зависимость выживаемости клеток линии A549 от концентрации **BChl-NI** (круги): клетки инкубировались в растворе конъюгата 3ч, затем облучались светом, выживаемость определялась через 3 ч после облучения. Контрольная линия (треугольники) инкубировалась в растворе конъюгата в течение 6 ч без облучения

Способность конъюгата **31** образовывать активные формы кислорода в клетках была доказана с использованием реагента для определения окислительного стресса – 2'-7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата DCFH-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, рисунок 22). DCFH-DA является не флуоресцирующим производным кумарина, способным проникать через клеточную мембрану благодаря невысокой полярности молекулы [189]. Попадая внутрь клетки, оно подвергается реакции деацетилирования под действием клеточных ферментов эстераз с образованием также не флуоресцирующего продукта H_2DCF (рисунок 22). Молекулы H_2DCF чувствительны к присутствию в клетке активных форм кислорода, вступая с ними в реакцию окисления, они образуют продукт DCF, обладающий интенсивной зеленой флуоресценцией. Таким образом появление флуоресцентного отклика в области 530 нм при возбуждении красителя светом с длиной волны 485 нм служит доказательством образования АФК в клетках.

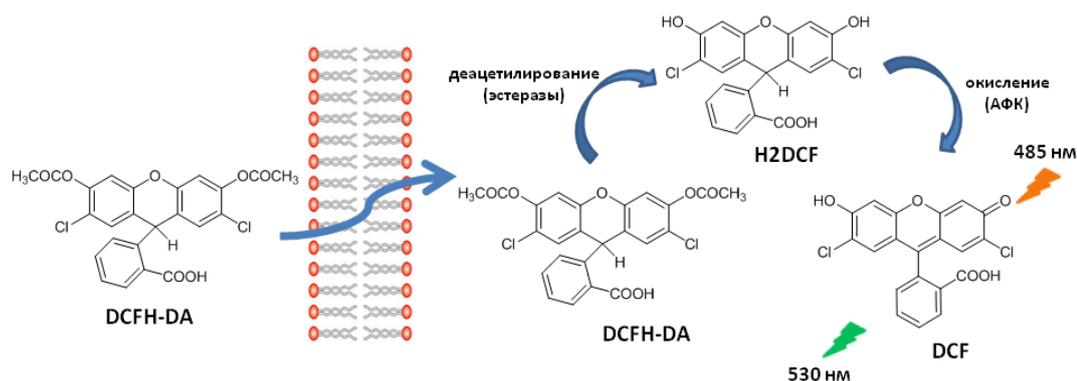


Рисунок 22 – Принцип генерации оптического отклика реагентом DCFH-DA

На рисунке 23 представлены изображения клеток линии A549, доказывающее образование конъюгатом **31** активных форм кислорода в клетках. После облучения клеток, инкубированных с растворами **31** и реагента DCFH-DA, красным светом (рисунок 23в,е), наблюдается интенсивная зеленая люминесценция окисленной формы - соединения DCF, а также испускание нафталиimidного компонента конъюгата (600-650 нм). В контрольных экспериментах, при инкубации клеток только с реагентом DCFH-DA (рисунок 23а,г) и только с конъюгатом **31** (рисунок 23б,д) появления флуоресценции DCF не наблюдалось.

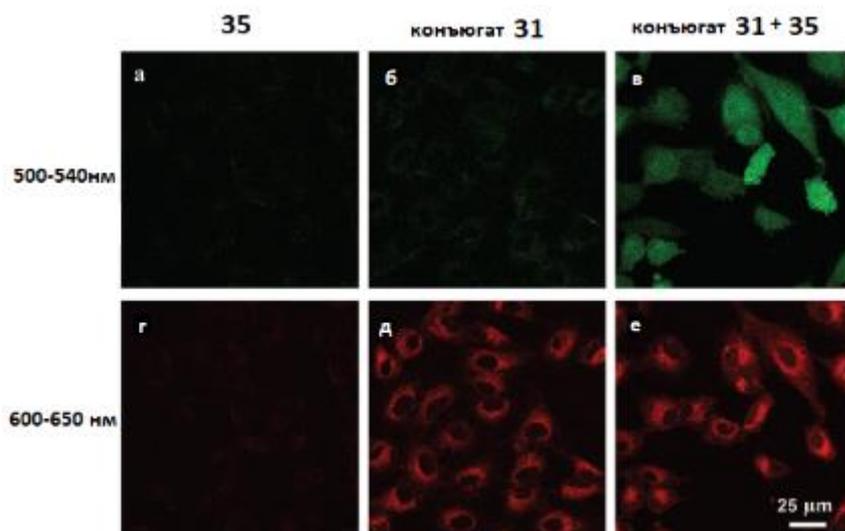


Рисунок 23 – Снимки клеток A549, полученные с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа: детекция 500-540 нм, соответствует области флуоресценции DCFH-DA (а-в), детекция 600-650 нм, соответствует флуоресценции нафталиimidного хромофора в конъюгате **31** (г-е). а,г – клетки инкубировались с DCFH-DA, но без **31** и облучались красным светом; б,д – клетки инкубировались с **31**, но без DCFH-DA и облучались красным светом; в,е – инкубация с DCFH-DA и **31** и облучение красным светом

Таким образом, соединение **30** является эффективным терапевтическим агентом для ФДТ, при этом флуоресценция в длинноволновой области спектра (760 нм) может быть использована для фотодиагностики *in vivo*, а флуоресценция нафталимидного компонента конъюгата может быть использована для исследования на клеточных культурах, так как большинство конфокальных флуоресцентных микроскопов обладают невысокой чувствительностью в диапазоне 700-900 нм.

3.7. Изучение фотодинамической эффективности конъюгатов *in vitro* и *in vivo*

Результаты исследований предоставлены сотрудниками МНИОИ им. П.А. Герцена Плотниковой Е.А., Плютинской А.Д. и Морозовой Н.Б.

3.7.1. Исследования фотодинамической эффективности *in vitro*

Для проведения испытаний эффективности конъюгатов *in vitro* использовали культуру клеток саркомы мягких тканей мыши S37; варьировали концентрацию от 20 до $2 \cdot 10^4$ нМ, время инкубации клеток до облучения составило 2 часа. Использовали растворы конъюгатов **30-32** и бактериохлорина **29** в 10% (об.) солюбилизатора кремофора.

Облучение проводили галогеновой лампой с широкополосными фильтрами: КС-19 ($\lambda \geq 720$ нм). Плотность мощности составляла 21.0 ± 1.0 мВт/см², световая доза – 10 Дж/см². Время инкубации клеток с исследуемым соединением до облучения составило 2 часа. После воздействия светом клетки инкубировались в стандартных условиях 24 – 28 часов. Оценка выживаемости клеток проводилась визуально и колориметрическим методом с использованием МТТ – теста через 24 часа после внесения бактериохлорина **29**, его конъюгатов и красителей. Критерием оценки цитотоксического эффекта являлась величина ИК₅₀ [190]. Результаты изучения фотодинамической активности тераностиков, а также красителей на основе нафталимида представлены в таблице 7.

Наиболее высокую фотоиндуцированную активность в отношении клеток саркомы S37 проявляет бактериохлорин **29** и конъюгаты **30** и **31** – для этих соединений значения ИК₅₀ сопоставимы. Значения ИК₅₀ для **32** в 6-7 раз превышают ИК₅₀ соединений **29-31**, таким образом, конъюгат **32** проявил

наименьшую фотодинамическую активность из исследованных соединений. Флуорофоры на основе нафталимида **9б**, **9в** и **19а** (схемы 2 и 6) не обладают фотоиндуцированной активностью.

Таблица 7 – Фотоиндуцированная активность и пропаргила бактериохлорина **29**, конъюгатов **30-32** и флуорофоров **9б**, **9в** и **19а** на клеточной линии S37. Облучение проводили галогеновой лампой через широкополосный фильтр КС-19 ($\lambda \geq 720$ нм)

Соединение	ИК ₅₀ , нМ	
	Время инкубации до облучения	Контроль без облучения
	2 часа	
29	64 ± 2	7900 ± 250
30	74 ± 3	4390 ± 140
31	65 ± 2	5000 ± 210
32	430 ± 5	8640 ± 170
9б	15980 ± 350	18925 ± 480
9в	13100 ± 200	14600 ± 220
19а	12100 ± 410	12800 ± 410
Бактериосенс	80 ± 10 (оптимальное время инкубации до облучения 4 часа)	3500 ± 90
Бактериопурпурин имид (БПИ)	200 ± 20 (оптимальное время инкубации до облучения 4 часа)	20000 ± 130

При сравнении ИК₅₀ исследуемых соединений и бактериохлоринов, на основе которых разработаны препараты Бактериосенс [191] и БПИ, показано, что фотоиндуцированная активность **29** и конъюгатов **30** и **31** соизмерима с активностью Бактериосенса, и выше, чем активность бактериопурпуринимида.

3.7.2. Исследования фотодинамической эффективности *in vivo*

Фотодинамическая эффективность соединений **29-32** была исследована на мышцах саркомой мягких тканей S37 на 7-8 сутки роста опухоли. С целью определения времени максимального накопления **29-32** исследовали их распределение в опухолевой, окружающей ткани и основных внутренних органах в течение 24 часов методом локальной флуоресцентной спектроскопии. Соединение **29** и его конъюгаты **30-32** вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг, рассчитанной по активному веществу (пропаргилу бактериохлорина). Для оценки биораспределения

использовали лазерную установку для флуоресцентной диагностики и контроля за ФДТ «ЛЭСА 06»: длина волны генерации излучения 632 нм. Результаты исследования биораспределения **29** и **31** представлены в таблицах 8 и 9. Данные столбца «контроль» соответствуют фоновой флуоресценции, зарегистрированной после введения мышам физиологического раствора, содержащего 10% (об.) кремофора без фотосенсибилизатора.

По данным таблиц 8 и 9 можно сделать вывод о том, что максимальное накопление **29** и **30** в опухоли наблюдается через 1 час после внутривенного введения их растворов мышам. Высокое содержание фотосенсибилизаторов регистрируется также в органах, выполняющих выделительные функции – почках, печени и селезенке. Однако в ходе исследования выведения **29** и **30** из организма мышей было показано, что по истечению 24 часового периода после введения, из печени, почек и селезенки удаляется 90%, 100% и 100% соединения **29** и 90%, 50% и 75% соединения **30**, соответственно. Биораспределение **30** и **32** в организме мышей с опухолью S37 также было исследовано, в нем прослеживаются аналогичные закономерности.

Таблица 8– Биораспределение **29**. Возбуждение 632 нм. Опухолевая модель S37

Органы	Сроки измерения (время после введения раствора)				Контроль (фон)
	15 минут	1 час	2 часа	24 часа	
Опухоль	4.5±1.1	7.0±2.0	5.6±2.1	2.4±0.3	2.6±0.3
Кожа	1.3±0.1	2.1±0.8	2.7±0.4	1.2±0.1	1.2±0.2
Мышца	4.2±0.5	4.1±0.6	4.3±0.5	3.6±0.4	2.9±0.5
Печень	24.0±5.8	16.3±0.5	11.9±0.7	9.3±0.5	7.7±0.4
Почки	19.3±3.8	16.9±0.9	12.5±1.7	7.4±0.6	7.4±0.8
Селезенка	17.2±2.2	13.9±0.9	12.2±1.8	8.4±0.9	9.0±1.6
Кровь	47.3±2.2	17.4±0.6	12.8±0.2	10.2±0.3	6.0±1.2
Опухоль/кожа	3.5±0.2	3.3±0.1	2.1±0.1	2.0±0.2	-

Таблица9 - Биораспределение конъюгата **31** . Возбуждение 632 нм. Опухолевая модель S37

Органы	Сроки измерения (время после введения раствора)				Контроль (фон)
	15 минут	1 час	2 часа	24 часа	
Опухоль	6.1±2.3	7.5±2.0	4.5±0.2	3.5±1.0	2.6±0.3
Кожа	1.4±0.1	1.7±0.3	1.9±0.4	2.4±1.0	1.2±0.2
Мышца	2.6±0.3	4.2±0.3	6.7±0.8	4.8±1.8	2.9±0.5
Печень	29.5±1.9	32.5±2.4	24.6±0.7	10.0±0.6	7.7±0.4
Почки	15.2±1.5	15.8±0.9	17.0±1.0	12.2±0.8	7.4±0.8
Селезенка	23.9±2.6	20.7±3.3	18.2±1.9	12.7±1.4	9.0±1.6
Кровь	77.2±4.8	36.4±9.4	12.4±0.3	8.7±0.3	6.0±1.2
Опухоль/кожа	4.4	4.4	2.4	1.5	-

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности **29-32** (таблица 10) проводилось на мышах с саркомой мягких тканей S37 на 7 сутки роста опухолей (объем опухолей 121±4 мм). Растворы **29-32** вводили внутривенного в дозах 5.0 мг/мл по пропаргилу бактериохлорина, облучение проводилось через 1 час после введения, так как именно в это время была определена максимальная концентрация фотосенсибилизаторов в опухоли (таблицы 8,9). Использовалось облучения светодиоидным источником красного света 759±18 нм, плотность мощности 100мВт/см², плотность энергии 150 Дж/см². По данным таблицы 10 можно сделать вывод о том, что все исследованные фотосенсибилизаторы проявляют высокую фотодинамическую эффективность. Пришивка нафталиimidного хромофора к бактериохлорину не оказывает негативного влияния на эффективность терапии в случае конъюгатов **30** и **31**, для случая конъюгата **32** наблюдается небольшое снижение эффективности по сравнению с остальными соединениями.

Таблица 10 – Результаты исследования противоопухолевой эффективности 29-32 на мышах с опухолью с S37

Образец	Торможение роста опухоли, %							УПЖ ⁴ , %	КИ ⁵ , %
	Время после облучения, сутки								
	5	7	9	12	14	16	20		
29	100	100	100	99	93	86	79	83	67
30	100	100	100	97	93	87	72	85	67
31	100	100	100	98	96	90	83	88	67
32	100	100	95	95	93	88	69	83	67

Таким образом, в ходе исследований фотодинамической эффективности фотосенсибилизаторов **29-32**, проведенных *in vitro* и *in vivo* было показано, что соединения **29-30** являются эффективными терапевтическими агентами, эффективность которых сопоставима с препаратом Бактериосенс, успешно прошедшим стадию доклинической оценки фотодинамической эффективности.

3.8. Гибридные наночастицы для фотодинамической терапии

При подготовке данного раздела использована собственная публикация автора [192].

Хорошо известно, что большинство органических люминофоров испускает люминесценцию большей длины волны, чем поглощенное излучение, то есть обладает положительным Стоксовым сдвигом [193]. В связи со значительным прогрессом, достигнутым в последние десятилетия в области разработки лазеров, генерирующих сверхкороткие импульсы, активно развивается раздел оптики, изучающий нелинейные оптические процессы, возникающие в люминофорах под действием излучения высокой интенсивности. Одним из таких процессов является апконверсионная люминесценция (англ. Upconversion) – процесс преобразования нескольких фотонов более низкой энергии (или большей длины волны) в один

⁴ УПЖ – увеличение продолжительности жизни животных по отношению к контрольной группе.

⁵ КИ – критерий излеченности – процент животных, у которых на 90 сутки после проведения терапии не возникло рецидива опухоли.

фотон более высокой энергии (короткой длины волны)[194]. Данный процесс привлекает внимание ученых, работающих в области флуоресцентной визуализации, так как позволяет получать флуоресцентный отклик в видимой области, используя для возбуждения излучение ИК-области спектра, которое характеризуется наибольшей глубиной проникновения в биологические ткани. Разработка апконверсионных наночастиц является одним из наиболее перспективных направлений в развитии препаратов для флуоресцентной визуализации [187, 195-196]. Такие частицы представляют собой наночастицы инертного неорганического материала, допированного редкоземельными элементами, благодаря присутствию которых реализуется процесс ап-конверсии энергии поглощенного излучения [194].

Нашими коллегами из Университета Валенсии (группой проф. J. Perez-Prieto) были получены наночастицы тетрафториттриата натрия (NaYF_4), допированные трехвалентными лантанидами (эрбием, иттербием и тулием). Принцип ап-конверсии проиллюстрирован на рисунке 24. Ион иттербия поглощает световое излучение на длинах волн 975-980 нм, его возбужденное состояние способно выступать в роли донора энергии в процессе переноса энергии на ионы эрбия и тулия, в результате чего в ионах Er^{3+} и Tm^{3+} реализуются переходы электронов на энергетические уровни, соответствующие их возбужденным состояниям. Возбужденные состояния эрбия и тулия релаксируют до основного с испусканием фотонов большей энергии, чем исходное возбуждающее излучение [194].

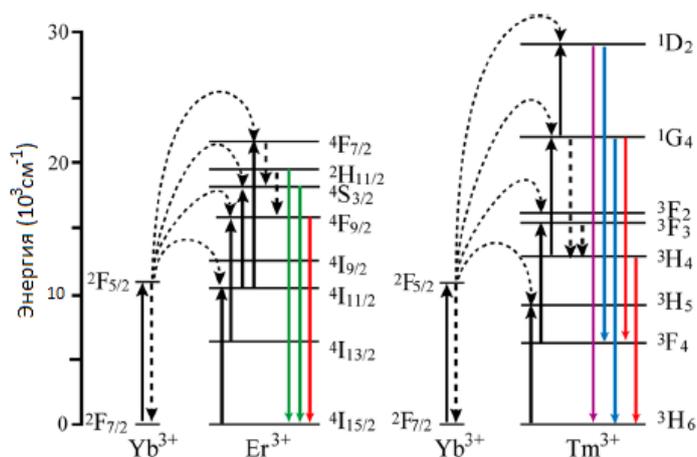


Рисунок 24 – Механизм апконверсии энергии возбуждающего света на примере пар ионов Yb^{3+} и Er^{3+} ; Yb^{3+} и Tm^{3+} [194]

Использование фотосенсибилизаторов для фотодиагностики в ФДТ всегда сопровождается сопутствующим токсическим действием на опухолевые клетки, так как большую часть энергии возбуждения эффективный ФС расходует на генерацию АФК. Актуальной задачей является разработка препаратов, позволяющих проводить диагностику без сопутствующей токсичности, так как интенсивность света, применяемая для визуализации, гораздо ниже необходимой для получения терапевтического эффекта, и в некоторых случаях сопутствующая токсичность может спровоцировать рост опухоли.

Идея применения таких частиц для ФДТ состоит в реализации процесса переноса энергии с апконверсионной наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ на фотосенсибилизатор для генерации $^1\text{O}_2$ при возбуждении первой ИК-светом, в то время как более коротковолновый канал будет служить для возбуждения только нафталимидного флуорофора для получения флуоресцентного отклика (рисунок 25). Для реализации серии фотофизических процессов на поверхности наночастицы необходимо чтобы флуорофор, фотосенсибилизатор и частица $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ подходили друг другу по оптическим характеристикам.

Полученные в рамках работы [192] гибридные наночастицы NaYF_4 , допированные ионами иттербия, эрбия и туллия при возбуждении светом с длиной волны 975 нм в результате эффективно протекающего процесса ап-конверсии демонстрируют узкие пики люминесценции с максимумами 475 нм, 520 нм, 540 нм, 650 и 808 нм (рисунок 26а). В качестве фотосенсибилизатора для пришивки на поверхность $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ нами был выбран N-аминобактериопурпуринимид **35** (рисунок 25), длинноволновый пик поглощения которого перекрывается с флуоресценцией частицы в области 808 нм (рисунок 20) [144, 180], что делает возможным перенос энергии между этими компонентами. В качестве флуорофора было использовано производное 4-пиразолинил-замещенного нафталимида **196**, содержащее концевую карбоксильную группу, характеризующийся широким спектром поглощения в области 490 нм и оранжевой люминесценцией с максимумом 637 нм.

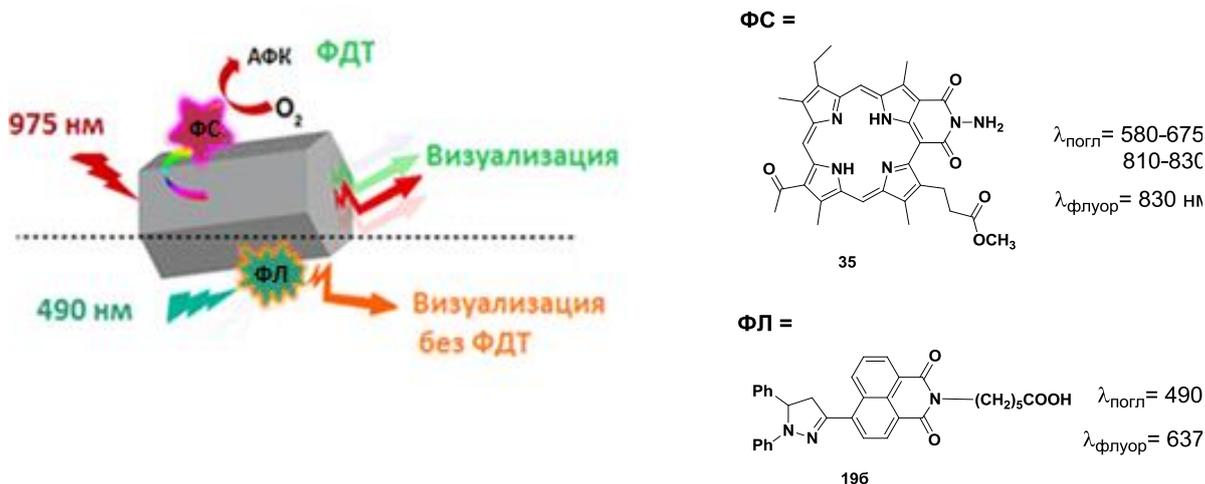


Рисунок 25 – Принцип работы гибридной наночастицы для ФДТ и структурные формулы фотосенсибилизатор аминобактериопурпуринамида **35** и флуорофора, иммобилизованных на поверхности частиц

Для изучения влияния иммобилизации на поверхности частиц на оптические свойства фотоактивных компонентов были получены наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$, модифицированные только молекулами соединения **35** (далее $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\mathbf{35}$) и только красителем **196** (далее $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}$). Гибридные наночастицы, на поверхности которых были иммобилизованы молекулы красителя **196** и фотосенсибилизатора **35** в дальнейшем обозначаются как $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$. С использованием значения коэффициентов молярной экстинкции **196** и **35** в ацетонитриле, было установлено, что на поверхности одной наночастицы в среднем располагается 325 молекул соединения **196** и 5789 молекул **35**.

Из представленных на рисунке 26а,б спектров флуоресценции видно, что возбуждение раствора частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}$ и $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{35}$ в области 975 нм приводит к снижению интенсивности зеленой люминесценции эрбия и тулия в области 520-550 нм (на 80% и 55%, соответственно) по сравнению с немодифицированными частицами $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ и появление низкоинтенсивных полос в области 550-600 нм (рис. 20а) и 830 нм (рисунок 26б), соответствующих полосам испускания флуорофоров **196** и **35**. Данный спектральный эффект свидетельствует о том, что на поверхности частиц реализуется перенос энергии фотовозбуждения не только на фотосенсибилизатор **35**, он и на молекулы нафталимидного красителя.

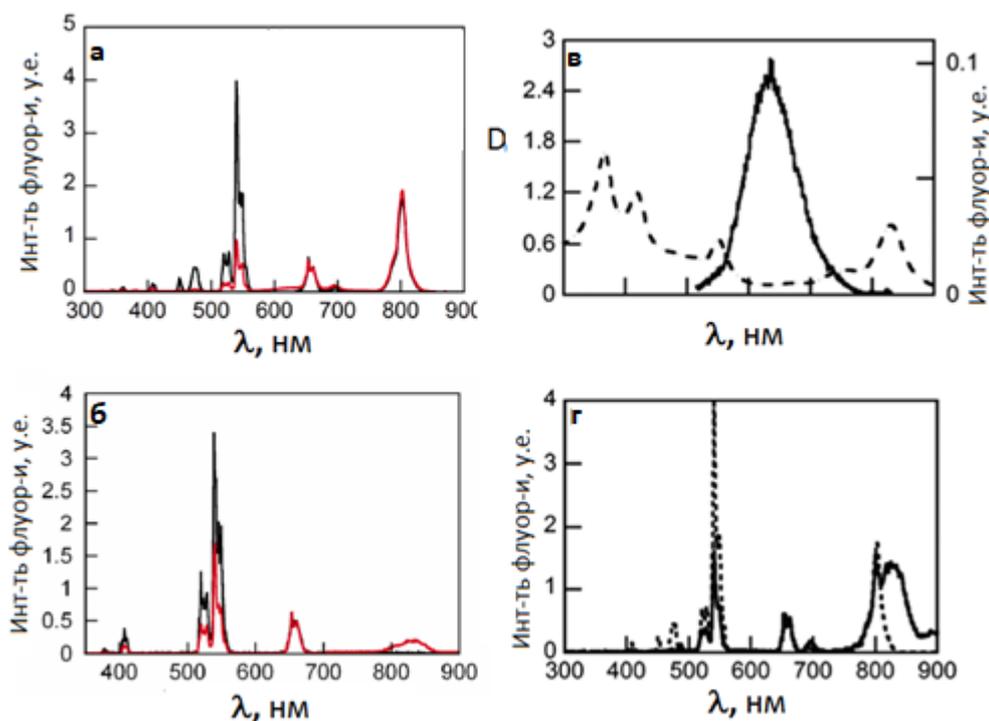


Рисунок 26 –Спектры флуоресценции частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}$ (а) $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\mathbf{35}$ (б) - красные линии и не модифицированных частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ – черные линии при возбуждении 975 нм; в) Спектр поглощения (пунктирная линия) и флуоресценции при возбуждении 490 нм наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$; г) Нормализованные спектры флуоресценции наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ (пунктир) и $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ при возбуждении 975 нм. Концентрация частиц в растворе 1г/л, растворитель – ацетонитрил

При облучении частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ светом с длиной волны 975 нм (рисунок 26г) также наблюдается тушение люминесценции в зеленой области спектра (на 40%) и появление интенсивной полосы флуоресценции с максимумом 830 нм, что соответствует испусканию N-аминобактериохлорина. Интересно, что интенсивность флуоресценции пурпуринимида при облучении гибридной частицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ значительно более высока, чем при облучении частиц без флуорофора $\mathbf{196}$ $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{35}$. Это связано с тем, что на поверхности частиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ реализуется сразу несколько процессов переноса энергии. Фотовозбуждение иттрия (975 нм) переносится на ионы эрбия и тулия, от них передается молекулам фотосенсибилизатора и флуорофора, при этом фотовозбуждение флуорофора сопровождается последующим переносом энергии на ФС, что приводит к разгоранию его флуоресценции. Таким образом, флуорофор

196 выступает в роли «антенны», усиливающей эмиссию фотосенсибилизатора при возбуждении частиц в области 975 нм.

Возбуждение наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ в области 490 нм (рис.26в) приводит к появлению в спектре флуоресценции широкой полосы с максимумом 637 нм, соответствующей нафталимидному флуорофору. Это свидетельствует, что нежелательный процесс переноса энергии с нафталимида на фотосенсибилизатор в определенной мере подавляется на поверхности наночастиц. Интеграл перекрывания спектров флуоресценции нафталимидного флуорофора и поглощения N-аминобактериопурпинимида составляет значительную величину - $8.79 \cdot 10^{14} \text{M}^{-1} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{нм}^4$. Критический радиус Ферстера, то есть расстояние, на котором эффективность переноса энергии между хромофорами составляет 50% для рассматриваемой пары хромофоров составляет 31Å , в то время как средний размер наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196}/\mathbf{35}$ составляет 23 нм (230Å). Можно предположить, что в случае неравномерного распределения молекул **196** и **35** по поверхности наночастиц процесс переноса энергии будет эффективно протекать не для всех пар флуорофоров, остальные же за счет неполного переноса энергии будут обеспечивать флуоресцентный отклик в области 637 нм.

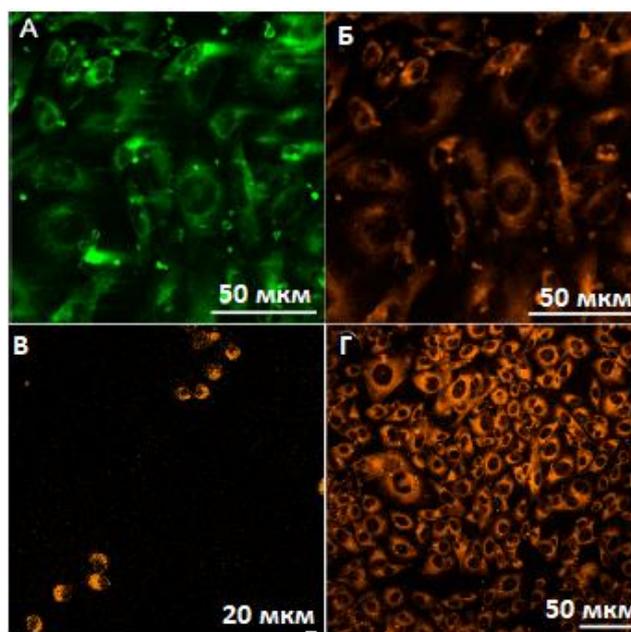


Рисунок 27 – Снимки клеток SH-SY5Y: А - $\lambda_{\text{возб.}}=975$ нм, детекция 515-518нм; Б - $\lambda_{\text{возб.}}=975$ нм, детекция 590-650нм; В- $\lambda_{\text{возб.}}=880$ нм, детекция 590-650нм ; Г - $\lambda_{\text{возб.}}=488$ нм, детекция 570-670нм

На рисунке 27 представлены изображения клеток, инкубированных с раствором наночастиц (100мкг/мл), полученные с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа. Возбуждение клеток светом с длиной волны 975 нм приводит к испусканию как самих частиц (рисунок 27а), так и нафталимидного фрагмента в результате частичного переноса энергии него (рисунок 27б). Нафталимидный хромофор напрямую может быть возбужден светом с длиной волны 488нм (рисунок 27г), кроме того, было обнаружено, что **196** обладает свойством двухфотонного поглощения. Это позволяет использовать ИК-лазер с длиной волны излучения 880нм для возбуждения нафталимидных фрагментов на поверхности частиц (рисунок 27в) и проведения флуоресцентной диагностики без сопутствующего терапевтического эффекта, так как частицы прозрачны в области 880 нм (рисунок 27а).

Фотодинамическая эффективность наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}/\mathbf{196/35}$ была исследована на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Выживаемость клеток оценивалась с использованием набора флуоресцентных красителей (LIVE/DEAD Kit), в состав которого входит краситель кальцеин (рисунок 28), который, находясь в форме тетраацетата, способен проникать через клеточную мембрану и подвергаться деацетилированию под действием клеточных ферментов эстераз, превращаясь в интенсивно флуоресцирующий продукт (принцип работы кальцеина аналогичен ранее рассмотренному для DCFH-DA на рисунке 22). Вторым компонентом набора служит этидиум гомодимер-1 (EtD-1), который является высокоэффективным комплексом для ДНК. Молекулы EtD-1 не способны проникать через мембраны клеток, однако, при разрушения клеточных мембран, они образуют комплекс с ДНК, обладающий интенсивной красной люминесценцией [197]. Таким образом, использование данного набора индикаторов помогает отличить живые клетки от погибших по окраске – зеленой флуоресценцией будут обладать живые клетки, красной – разрушенные. На рисунке 28 представлены результаты исследования терапевтического эффекта наночастиц на клетках.

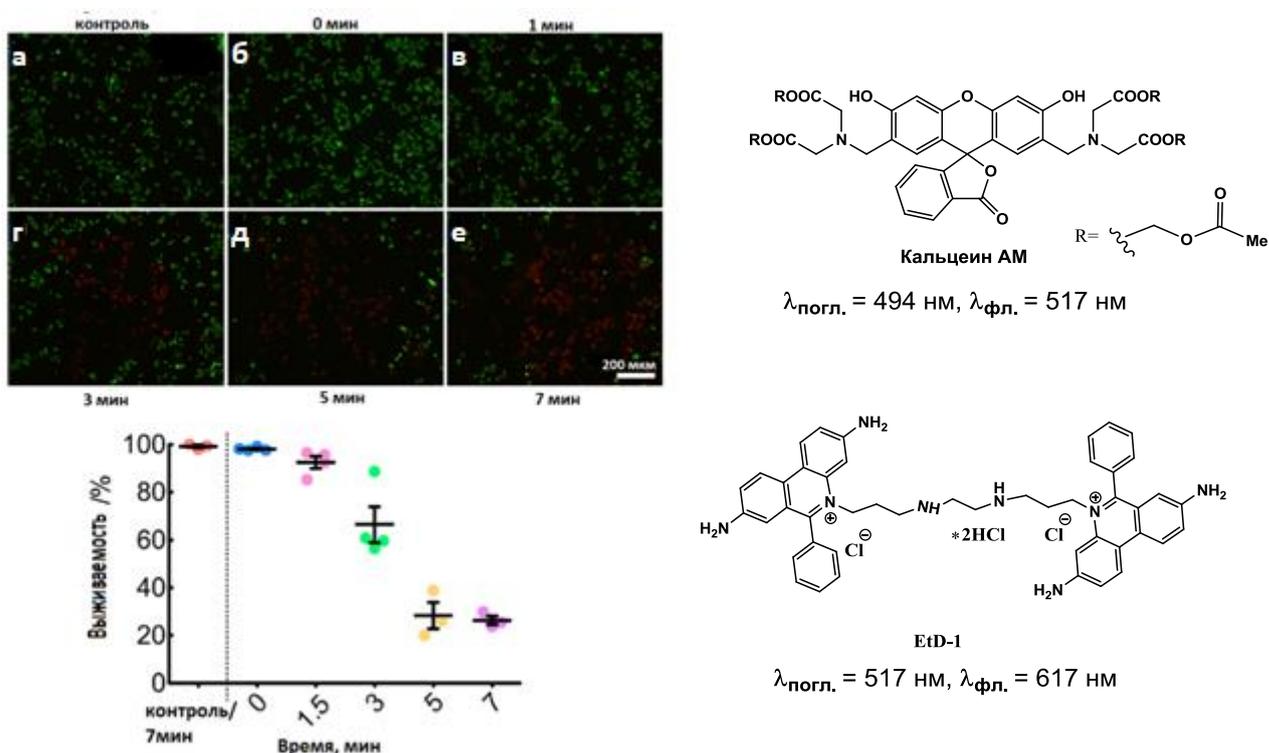


Рисунок 28 – Результаты изучения выживаемости клеток линии SH-SY5Y с использованием флуоресцентных индикаторов (кальцеин, EtD-1): зеленые клетки – живые, красные-разрушенные. а) контроль – облучение клеток светом 975 нм в течение 7 мин (плотность мощности 20.75 мВт/см², доза облучения 8.7 Дж/см²); б-е) клетки инкубировались с раствором наночастиц (100мкг/мл) и облучались в течение 0, 1.5, 3, 5 и 7 минут, соответственно. На графике представлена зависимость выживаемости клеток в процентах от времени облучения

Клетки инкубировали в растворе с концентрацией частиц 100мкг/л в течение 4 часов, а затем проводили облучение лазером с длиной волны 975 нм (плотность мощности 20.75 мВт/см², доза 8.7 Дж/см²). После 7 минут облучения выживаемость клеток составила 26.33%, что говорит о фотодинамической эффективности частиц NaYF₄:Yb,Er,Tm/196/35 на клетках линии SH-SY5Y. Выживаемость клеток в контрольном эксперименте (облучение в течение 7 мин. без предварительной инкубации с раствором тераностика) составила 99.18%, что позволяет надежно связать полученный эффект с фотодинамическим действием исследованных наночастиц. Наногибриды проявили темную токсичность при 24-часовой инкубации при концентрациях выше 500мкг/мл, для экспериментов использовался раствор 100 мкг/мл.

Таким образом, гибридные наночастицы, функционализированные N-аминобактериопуринимидом и флуорофором 196 являются эффективными

тераностиками, они позволяют проводить как флуоресцентную визуализацию опухолевых клеток без сопутствующего токсического эффекта, так и фотодинамическую терапию с одновременной флуоресцентной навигацией.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C были зарегистрированы на ЯМР-спектрометрах Bruker Avance 300, Bruker Avance 400, Bruker Avance 500, Bruker Avance 600. Использовали растворы образцов в дейтерированных хлороформе, диметилсульфоксиде и дихлорметане. Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C определялись с точностью 0.01 м. д. относительно остаточных сигналов растворителей и пересчитывались к внутреннему стандарту (TMS), КССВ измерялись с точностью 0.1 Гц. Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах проводилось с использованием двумерных методик ^1H COSY, HSQC/HMQC и HMBC с импульсными полевыми градиентами. Нумерация атомов, использованная для описания ^1H и ^{13}C ЯМР спектров синтезированных соединений, приведена на соответствующих структурных формулах в разделе 4.1.

Спектры ЯМР при УФ облучении были зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance 300 при температуре 17°C. Для эксперимента использовался раствор соединения **196** в дейтерированном хлороформе с концентрацией $7.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Облучение проводилось использованием полного спектра ртутно-ксеноновой короткодуговой лампы высокого давления (Oriel, 1000 Вт).

Температуры плавления определялись в капиллярах на приборе «Mel-tempII» и не корректировались.

Элементный анализ был проведен в лаборатории микроанализа ИНЭОС им. А. Н. Несмеянова РАН.

ИК-спектры были сняты на Фурье спектрометре «Magna IR» (Nicolet). Съемка на пропускание, таблетки KBr при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Контроль за ходом реакции и индивидуальностью полученных соединений осуществлялся методом ТСХ на пластинках Sorbfil UV-254 (тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ) и DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (фирма Merck). Колоночная хроматография проводилась с использованием силикагеля Kieselgel 60, размер частиц 40 - 60 мкм (Acros Organics) и нейтрального оксида алюминия (Acros Organics, Brockmann I, 50-200 мкм) в системах растворителей: бензол – этиловый спирт, петролейный эфир – этилацетат, метиловый спирт-хлористый метилен, метиловый спирт-хлороформ.

Разделение смеси красителей **196** и **28** проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Dionex с использованием колонки BONDAPAC C18 (19×150 мм), изократическое элюирование смесью растворителей MeCN/H₂O/MeOH = 70/20/10 (об.).

Масс-спектры электронного удара были записаны на приборе Finnigan Polaris Q (ионная ловушка). Энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Образцы соединений в виде 1 масс. % раствора в CH₂Cl₂ или CHCl₃ (0.2 мкл) загружались в кварцевые микроампулы, которые вставлялись в обогреваемый наконечник штанги прямого ввода. Съемка термомасс-спектрограмм осуществлялась в процессе ступенчатого (через 50°C) нагрева ампул от 50 до 150°C. Перед проведением нагрева образцов в том же диапазоне температур обычно снималась термомасс-спектрограмма пустой ампулы, подтверждающая отсутствие каких-либо загрязнений ампулы и штанги.

Масс-спектры в условиях химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД) регистрировали в режиме полного сканирования масс положительных ионов на тандемном динамическом масс-спектрометре Finnigan LCQ Advantage (США), оборудованным масс-анализатором с октапольной ионной ловушкой, насосом MS Surveyor, автосамплером Surveyor, генератором азота Schmidlin-Lab (Германия) и системой сбора и обработки данных с использованием программы X Calibur версии 1.3 фирмы Finnigan. Распыляющий и вспомогательный газ азот с потоками 70/10. Температура испарителя 400°C. Температура трансферного капилляра 150°C, напряжение поля между иглой и противозлектродом 5.0 кВ. Образцы вводили в ионный источник со шприцевого ввода со скоростью потока ацетонитрила 350 мкл/мин через инжектор Reodyne с петлей на 5 мкл.

Электронные спектры поглощения измерялись на двухканальном спектрофотометре Varian-Cary 5G, спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре FluoroLog-3-221 при температуре 20 ± 1°C. Наблюдаемая флуоресценция детектировалась под прямым углом относительно пучка возбуждения. Спектры флуоресценции были скорректированы по отношению к чувствительности измеряющего фотоэлектронного умножителя. Для снятия

спектров поглощения и флуоресценции использовались спектроскопически чистые растворители фирм Aldrich и Acros.

Спектры флуоресценции с временным разрешением измерены на системе состоящей из спектрографа Chromex 250, соединенного с искровой камерой Hamamatsu 5680, оснащенной модулем быстрой развертки M5676 с временным разрешением 2 пс. Импульсы, возбуждающие флуоресценцию, генерировали при помощи параметрического генератора света, который накачивался фундаментальным излучением фемтосекундной лазерной системы Ti-сапфир Femtopower Compact Pro. Все значения времен жизни возбужденных состояний получены при использовании деполяризованного света возбуждения. Максимальная энергия импульса возбуждения флуоресценции не превышала 100 нДж, средняя мощность составила 0.1 мВт, частота повторения импульсов 1кГц. Пучок возбуждения диаметром 0.1 мм фокусировали на кварцевую кювету ($l = 10$ мм). Анализ кинетики флуоресценции проводился подбором кривых методом наименьших квадратов Левенберга – Марквардта с использованием решения дифференциальных уравнений, описывающих поведение одного возбужденного состояния во времени без учета изменения заселенности основного состояния. Ошибка расчета времени жизни не превышала 1%. Времена накопления флуоресценции в экспериментах не превышало 90с.

Дифференциальные спектры поглощения возбужденных состояний с фемтосекундной временной разрешающей способностью измерены на установке, состоящей из фемтосекундной лазерной системы Ti-сапфир Femtopower Compact Pro, параметрического генератора света Topas-C, двухканального оптоволоконного спектрометра AvaSpec-2048-USB2, AvantesBV и построенной силами лаборатории оптического монтажа, включающего разную оптику, оптические узлы и нелинейные кристаллы. Разрешающая способность системы 40 фс. Пучок возбуждения фокусировали на проточную кварцевую кювету ($l = 2$ мм). Измерение спектров, цифровая обработка измеренных сигналов, а также автоматизированное управление экспериментом проводилось при помощи разработанной в лаборатории компьютерной программы на языке программирования LabView.

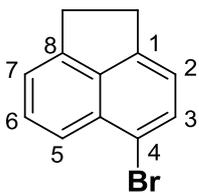
Запись спектров флуоресценции с временным разрешением была произведена на оборудовании лаборатории Центра оптической молекулярной и радиочастотной физики Университета Бордо 1 и Национального центра научных исследований (CNRS) Франции.

Квантово-химические расчеты были проведены в программном комплексе MOPAC 2009 с использованием полуэмпирического метода PM6. 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 2009. При расчетах принималось, что растворитель имеет диэлектрическую проницаемость равную $\epsilon = 40$ и показатель преломления n , такой, что $n^2 = 2$.

Аценафтен, ацетилхлорид, 4-бромнафталевый ангидрид, N-бромсукцинимид, этаноламин, бензальдегид, фенилгидразин, триэтиламин, ацетат палладия (II), три (о-толлил) фосфин, 4-метокси-, 3,4-диметокси- и 4-диметиламино-стиролы, оксихлорид фосфора, азид натрия, бихромат натрия (двуводный кристаллогидрат), бихромат калия, концентрированная соляная кислота, гидрокарбонат натрия, карбонат натрия (безводный), гидроксид натрия, гидроксид калия, тионилхлорид, хлорид олова (двуводный кристаллогидрат), 6-аминогексановая кислота, использованные в качестве исходных соединений в синтезе, являются коммерчески доступными реагентами (фирмы Aldrich, Acros и др). Дополнительная очистка отмеченных веществ не проводилась. Использованные в синтетической части работы растворители (ледяная уксусная кислота, этанол, метанол, бензол, хлористый метилен, петролейный эфир, этилацетат, хлороформ, N,N-диметилформамид, 2-метоксиэтанол) при необходимости очищались и абсолютизировались в соответствии со стандартными методиками.

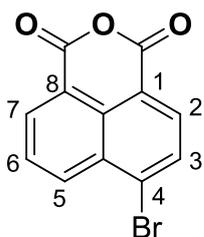
4.1. Синтез соединений

5-бром-1,2-дигидроаценафтилен (4-бромацетафтен)(2)



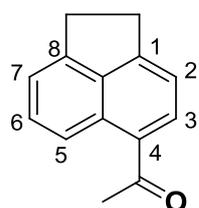
К суспензии 10.0 г (0.065 моль) аценафтена в 35 мл ДМФА при комнатной температуре прикапывают раствор 11.31 г (0.064 моль) N-бромсукцинимида в 35 мл ДМФА. Реакционную массу выдерживают 2 ч с перемешиванием при комнатной температуре, затем выливают на 750 мл воды. Образовавшийся желтый осадок продукта отфильтровывают, промывают водой на фильтре и сушат. Выход 12.42 г (82%). Т. пл. 50 – 52°C (Лит.[198]: т.пл. 51 – 52°C). Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400.13 МГц, 18.9°C, δ / м.д., J / Гц): 3.25 – 3.42 (м, 4Н, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 7.25 (д, 1Н, $J= 7.3$, Н(2)), 7.41 (д, 1Н, $J= 6.4$, Н(7)), 7.58 – 7.68 (м, 2Н, Н(6), Н(5)), 7.73 (д, 1Н, $J= 7.3$, Н(3)).

6-бромбензо[de]изохромен-1,3-дион (4-бромнафталевый ангидрид) (3)



К раствору 12.4 г (0.05 моль) 4-бромаценафтена в 125 мл ледяной уксусной кислоты при 70 °С прибавляют 78 г (0.26 моль) $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в течение 1.5 часов, следя за тем, чтобы температура не поднималась выше 90°C. Затем реакционную массу выдерживают 5 ч при кипении с обратным холодильником, охлаждают до комнатной температуры и выливают на 700 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывают и подвергают очистке переосаждением: кипятят в 500 мл насыщенного раствора соды 15 минут, удаляют не растворившиеся примеси горячим фильтрованием, затем охлаждают фильтрат и подкисляют $\text{HCl}_{\text{конц}}$ до $\text{pH}=3\text{-}4$. Осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из ледяной уксусной кислоты с получением 6.556 г продукта (выход 44%). Т. пл. 218– 220°C (Лит.[145]: т.пл. 218– 220°C). Спектр ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400.13 МГц, 20.6°C, δ / м.д., J / Гц): 8.06 (дд, 1Н, $J= 8.5$, $J= 7.4$, Н(6)), 8.08 (д, 1Н, $J= 7.9$, Н(3)), 8.38 (д, 1Н, $J= 7.9$, Н(2)), 8.60-8.67 (м, 2Н, Н(5), Н(7)).

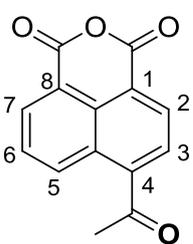
1-(1,2-дигидроаценафтилен-5-ил)этанон (4-ацетилаценафтен) (4)



К раствору 3.12 г (0.023 моль) AlCl_3 в 75.0 мл сухого дихлорметана, охлажденному до 0°C в атмосфере аргона прикапывают раствор CH_3COCl (1.44 мл, 0.020 моль) в 15.0 мл CH_2Cl_2 так, чтобы

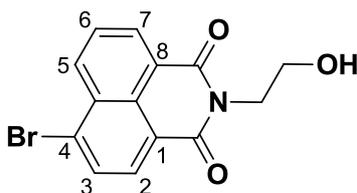
температура смеси не поднималась выше 5-7°C, затем также прикапывают раствор 3.0 г (0.019 моль) аценафтена в 20.0 мл CH₂Cl₂. Реакционную массу выдерживают 2.5ч при перемешивании при комнатной температуре (контроль за полнотой протекания реакции методом ТСХ: SiO₂, PhH/EtOH=10:1), затем выливают на 50 мл льда и добавляют 5-6 мл HCl_{конц.} для разложения комплекса хлорида алюминия с кетоном. Органический слой отделяют в делительной воронке, промывают последовательно: H₂O дист. (20 мл), 5% р-ром NaHCO₃ (2×20 мл) и H₂O дист. (2×20 мл), выдерживают над слоем осушителя MgSO₄. После отгонки растворителя в вакууме водоструйного насоса получают тяжелое масло и подвергают его очистке методом колоночной хроматографии (SiO₂, петр. эфир/этилацетат, градиентное элюирование от 0 до 10% этилацетата). Получено 1.10 г продукта **4** в виде светлого порошка, выход 56 %. Т. пл. = 68 -70°C (лит. [199]: т. пл. 63 - 65°C). Спектр ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400.13 МГц, 20.5°C, δ /м.д., J/ Гц): 2.69 (с, 3H, CH₃), 3.39 (с, 4H, CH₂-CH₂), 7.39 - 7.45 (м, 2H, H(2), H(7)), 7.60 (дд, 1H, H(6), J = 6.8, J = 8.6), 8.25 (д, 1H, H(3), J = 7.4), 8.60 (д, 1H, H(5), J = 8.6).

6-ацетилбензо[de]изохромен-1,3-дион (4-ацетилнафталевый ангидрид)(5)



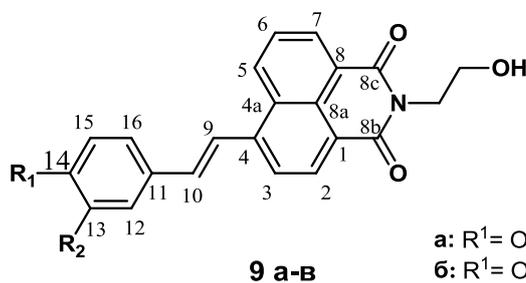
Раствор 1.968 г (0.010 моль) 4-ацетилаценафтена в 60 мл ледяной уксусной кислоты нагревают до 90°C и порциями в течение получаса прибавляют к нему 16.45 г (0.055 моль) Na₂Cr₂O₇·2H₂O. Реакционную массу выдерживают 2 ч при перемешивании с обратным холодильником при 90-100°C, затем выливают на 60 мл льда и отфильтровывают осадок. Для очистки продукта полученный осадок при нагревании до 65°C растворяют в 96 мл воды, содержащей 1.08 г NaOH и 2.90 г NaHCO₃. Если в растворе остались не растворившиеся примеси –удаляют их горячим фильтрованием, затем фильтрат охлаждают до комнатной температуры и подкисляют HCl_{конц.} до pH=3-4. Выпавший светлый осадок отфильтровывают и сушат в вакууме при 80°C с получением 1.78 г продукта **5**, выход 74%. Т. пл. 194 - 196°C (лит. [199]: т. пл. 193 - 195°C). Спектр ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400.13 МГц, 23.6°C, δ/м.д., J/ Гц): 2.81 (с, 3H, -CH₃), 7.99 (дд, 1H, J = 7.4, J= 8.6, H(6)), 8.40 (д, 1H, J = 7.6, H(3)), 8.55 - 8.61 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.87 (д, 1H, J = 8.7, H(5)).

6-бром-2-(2-гидроксиэтил)-1Н-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2Н)-дион (7)



Раствор 0.65 мл (10.80 ммоль) этаноламина в 10.0 мл этилового спирта прикапывают к перемешиваемой суспензии 2.0 г (7.22 ммоль) 4-бромнафталяного ангидрида **2** в 30.0 мл этилового спирта при 60°C. Реакционную массу выдерживают при кипении 6 часов (пока она не станет прозрачной), затем охлаждают до комнатной температуры и отфильтровывают продукт **7** в виде белого порошка, промывают на фильтре чистым этанолом. Получено 1.939 г продукта (84%). Т. пл. 202– 204°C (Лит. [200]: т. пл. 203– 204°C). Спектр ¹Н ЯМР (300.13 МГц, CDCl₃, 21.3 °С, δ / м.д., J / Гц): 2.26 (уш.с., 1Н, -ОН), 3.90– 4.10 (м, 2Н, CH₂), 4.38– 4.58 (м, 2Н, CH₂), 7.82– 7.94 (м, 1Н, Н(6)), 8.07 (д, 1Н, J = 7.8, Н(3)), 8.45 (д, 1Н, J = 7.8, Н(2)), 8.61 (д, 1Н, J = 8.6, Н(7)), 8.68 (д, 1Н, J = 7.0, Н(5)).

Общая методика синтеза фенилзамещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(*E*)-2-фенилэтенил]-1Н-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2Н)-дионов (9а-в)



а: R¹= OMe, R²= H;
б: R¹= OMe, R²= OMe;
в: R¹= N(Me)₂, R²= H

6-бром-2-(2-гидроксиэтил)-1Н-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2Н)-дион (**7**) (1 экв.) добавляют к суспензии катализаторов Pd(OAc)₂, (o-tol)₃Pv смеси растворителей ДМФА и Et₃N, загружают соответствующий стирол (1.2 экв.). Реакцию проводят 10-15 часов при 110°C в атмосфере аргона. По окончании реакции (контроль по ТСХ PhH : EtOH=10:1(об.)) реакционную массу охлаждают до комнатной температуры. Продукт экстрагируют из реакционной массы хлористым метиленом, объединенные экстракты несколько раз промывают водой и оставляют над осушителем (Na₂SO₄, MgSO₄). Затем CH₂Cl₂ отгоняют на роторном испарителе. Продукт очищают методами колоночной хроматографии или перекристаллизации.

Данная методика является адаптацией ранее описанных в литературе методик проведения реакции сочетания по Хеку [145].

**2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-(4-метоксифенил)этенил]-1H-бензо[d,e]изо-
хинолин-1,3(2H)-дион (9a)**

По общей методике синтеза 4-фенилзамещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-фенилэтенил]-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 147) из 500 мг (1.57 ммоль) соединения **7**, 4.3 мг (0.02 ммоль) Pd(OAc)₂, 26.1 мг (0.09 ммоль) (o-tol)₃P, 0.252 мл (1.88 ммоль) 4-метоксистирила, 20.0 мл ДМФА и 3.0 мл Et₃N было получено 0.648 г неочищенного продукта. После очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле градиентным элюированием смесью растворителей хлороформ:метанол (от чистого CHCl₃ до 10:1) и перекристаллизации из метилового спирта (3 мл) было получено 102 мг чистого продукта **9a** (выход 50%). Т. пл. 178 –181 °С. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-d₆, 27 °С, δ / м.д., J / Гц): 3.59– 3.67 (м, 2H, CH₂CH₂OH), 3.82 (с, 3H, -OCH₃), 4.16 (т, 2H, J = 6.3, -CH₂OH), 4.79– 4.86 (м, 1H, -OH), 7.02 (д, 2H, H(13), H(15), J= 8.7), 7.57 (д, 1H, H(10), J=16.0), 7.82 (д, 2H, H(12),H(16), J=8.7), 7.86– 7.94 (м, 1H, H(6)), 8.07 (д, 1H, H(9), J=16.0), 8.21 (д, 1H, H(3), J=8.0), 8.47 (д, 1H, H(7), J=7.8), 8.53 (д, 1H, H(5), J=6.7), 8.99 (д, 1H, H(2), J=8.0). Спектр ¹³C ЯМР (150.93 МГц, ДМСО-d₆, 19.0 °С, δ / м. д.): 42.84 (CH₂CH₂OH), 55.40 (OCH₃), 61.66 (CH₂OH), 114.39 (C(13), C(15)), 120.61 (C(1)), 121.13 (C(9)), 122.78 (C(8)), 123.55 (C(3)), 126.61 (C(6)), 128.57 (C(12), C(16)), 129.02 (C(8a)), 129.31 (C(11)), 129.45 (C(4a)), 130.42 (C(5)), 131.50 (C(2), C(7)), 125.26 (C(10)), 142.22 (C(4)), 160.35 (C(14)), 164.45 (C(8b)), 164.48 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 373 ([M]⁺) (32), 343 (14), 331 (23), 330 (100), 312 (19), 278 (11), 276 (11), 258 (26), 243 (14), 215 (18). Найдено (%): C, 73.98; H, 5.13; N, 3.75. C₂₃H₁₉NO₄. Вычислено (%): C, 73.90; H, 5.20; N, 3.65.

**2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-(3,4 - диметоксифенил)этенил]-1H-
бензо[d,e]изо-хинолин-1,3(2H)-дион (9b)**

По общей методике синтеза 4-фенилзамещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-фенилэтенил]-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр.147) из 0.446 г (1.4

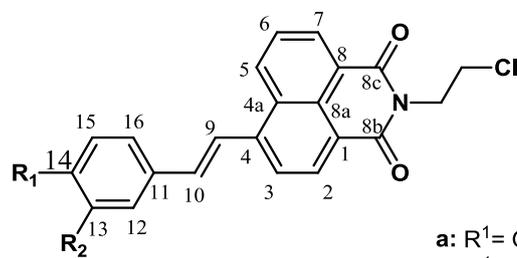
ммоль) соединения **7** и 3.7 мг (0.02 ммоль) Pd(OAc)₂, 23.3 мг (0.08 ммоль) (o-tol)₃P, 0.249 мл (1.68 ммоль) 3,4-диметоксистирола, 18.0 мл ДМФА и 2.7 мл Et₃N было получено 0.600 г неочищенного продукта. После очистки методом колоночной хроматографии на силикагеле смесью растворителей хлористый метилен : метанол=100 : 2 было получено 0.485 г чистого продукта **9б** (84%). Т. пл. 199 – 200°C. Спектр ¹H ЯМР (600.13 МГц, ДМСО-*d*₆, 27°C, δ / м.д., J / Гц): 3.62 – 3.68 (м, 2H, -CH₂OH), 3.82 (с, 3H, -OCH₃ (14)), 3.89 (с, 3H, -OCH₃ (13)), 4.16 (т, J = 6.4, -CH₂CH₂OH), 4.80 (т, 1H, J = 6.0, -OH), 7.02 (д, 1H, H(15), J= 8.3), 7.32 (дд, 1H, H(16), J₁ = 8.3; J₂ = 1.9), 7.51– 7.57 (м, 2H, H(10), H(12)), 7.91 (дд, 1H, H(6), J = 8.7, J = 7.2), 8.08 (д, 1H, H(9), J=16.1), 8.21 (д, 1H, H (3), J= 7.9), 8.48 (д, 1H, H(2), J= 7.9), 8.54 (д, 1H, H(7), J= 7.2), 9.01 (д, 1H, H(5), J= 8.7). Спектр ¹³C ЯМР (150.91 МГц, ДМСО-*d*₆, 30.0°C, δ / м.д.): 41.77 (CH₂CH₂OH), 55.54 (-OCH₃(13)), 55.72 (-OCH₃(14)), 57.80 (CH₂OH), 109.94 (C(12)), 111.67 (C(15)), 120.34 (C(1)), 120.75 (C(9)), 121.72 (C(16)), 122.50 (C(8)), 122.95 (C(3)), 126.78 (C(6)), 128.18 (C(8a)), 128.93 (C(4a)), 129.53 (C(11)), 130.53 (C(2)), 130.71 (C(7)), 130.84 (C(5)), 135.33 (C(10)), 141.41 (C(4)), 149.04 (C(13)), 149.77 (C(14)), 163.32 (C(8b)), 163.61 (C(8c)). ИК-спектр (KBr), см⁻¹: 3498 (ν_{OH}); 2935, 2882 (ν_{CH}); 1690, 1652 (ν_{C=O}). Масс-спектр, m/z (I, %): 404 (16), 403 ([M]⁺) (59), 401 (13), 373 (15), 361 (22), 360 (100), 359 (21), 342 (12), 328 (16), 284 (11). Найдено (%): C, 71.50; H, 5.17; N, 3.34. C₂₄H₂₁NO₅. Вычислено (%): C, 71.45; H, 5.25; N, 3.47.

2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-(4-диметиламинофенил)этинил]-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дион (9в)

По общей методике синтеза 4-фенилзамещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-фенилэтинил]-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 147) из 0.9 г (2.81 ммоль) 6-бром-2-(2-гидроксиэтил)-1H-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-диона (**7**), 7.6 мг (0.03 ммоль) Pd(OAc)₂, 47.0 мг (0.16 ммоль) (o-tol)₃P, 0.517 мл (3.37 ммоль) 4-диметиламиностирола, 30.0 мл ДМФА и 5.4 мл Et₃N было получено 0.678 г неочищенного продукта. Продукт подвергали очистке методом колоночной хроматографии на силикагеле с градиентным элюированием смесью растворителей дихлорметан:метанол (от чистого CH₂Cl₂ до 50:1, об./об.). Получено 0.270 г чистого

продукта (выход 50%). Т. пл. = 217°C с разл. Спектр ^1H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- d_6 , 27.0°C, δ / м.д., J / Гц): 2.99 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.63 (кв, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J_1 = 6.7$, $J_2 = 16.9$), 4.16 (м, 2H, CH_2OH), 4.82 (м, 1H, OH), 6.77 (д, 2H, H(13), H(15), $J = 8.2$), 7.54 (д, 1H, H(9), $J = 16.0$), 7.70 (д, 2H, H(12), H(16), $J = 8.5$), 7.84–7.90 (м, 2H, H(6)), 7.94 (д, 1H, H(10), $J = 16.0$), 8.19 (д, 1H, H(3), $J = 8.5$), 8.44 (д, 1H, H(7), $J = 7.7$), 8.53 (д, 1H, H(5), $J = 7.1$), 8.99 (д, 1H, H(2), $J = 8.5$). Спектр ^{13}C ЯМР (400.13 МГц, ДМСО- d_6 , 27.0°C, δ / м.д.): $\delta = 40.12$ ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 41.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 57.83 (CH_2OH), 112.00 (C(13), C(15)), 117.49 (C(9)), 119.54 (C(1)), 122.21 (C(3)), 122.51 (C(8)), 124.42 (C(11)), 126.57 (C(6)), 128.34 (C(8a)), 128.78 (C(4a)), 128.98 (C(12), C(16)), 130.61 (C(2)), 130.70 (C(7)), 130.78 (C(5)), 135.77 (C(10)), 141.97 (C(4)), 150.76 (C(14)), 163.38 (C(8b)), 163.69 (C(8c)). ИК-спектр (KBr), cm^{-1} : 3489 (ν_{OH}); 2923, 2865 (ν_{CH}); 1695, 1646 ($\nu_{\text{C=O}}$). Масс-спектр, m/z (I , %): 387 (27), 386 (100) $[\text{M}]^+$, 387 (27), 355 (17), 343 (58), 341 (29), 327 (15), 255 (19), 228 (16), 162 (16). Найдено (%): C 74.30, H 5.82, N 7.06. $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$. Вычислено: C 74.59, H 5.74, N 7.25.

Общая методика синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-хлорэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (10а-в)



10 а-в

а: $\text{R}^1 = \text{OMe}$, $\text{R}^2 = \text{H}$;
 б: $\text{R}^1 = \text{OMe}$, $\text{R}^2 = \text{OMe}$;
 в: $\text{R}^1 = \text{N}(\text{Me})_2$, $\text{R}^2 = \text{H}$

Исходное гидроксипроизводное растворяют в избытке POCl_3 при перемешивании в одногорлой колбе с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой. Выдерживают реакционную массу при 80-90°C 1.5 часа. Оксихлорид фосфора отгоняют на роторном испарителе с хлороформом. Продукт очищают методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием хлороформа или дихлорметана в качестве элюента.

**(E)-2-(2-хлорэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-
дион (10a)**

По общей методике синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-хлорэтил)-(4-стирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 150) из 85 мг (0.02 ммоль) соединения **9a** и 2.0 мл POCl₃ было получено 56 мг целевого продукта **10a** (выход 64%). Т.пл. 227 –228°C. Спектр ¹H ЯМР (600.22 МГц, CDCl₃, 18.7°C, δ / м.д., J / Гц): 3.84 – 3.88 (м, 2H, CH₂-Cl), 3.89 (с, 1H, OCH₃), 4.56-4.60 (м, 2H, CH₂CH₂Cl), 6.98 (д, 2H, H(13), H(15), J = 8.5), 7.33 (д, 1H, H(10), J= 15.9), 7.60 (д, 2H, H(12), H(16), J= 8.5), 7.77 (д, 1H, H(9), J= 15.9), 7.80 (т, 1H, H(6), J= 7.9), 7.99 (д, 1H, H(3), J= 7.8), 8.58 – 8.64 (м, 2H, H(2), H(5)), 8.65 д, 1H, H(7), J= 7.1). Спектр ¹³C ЯМР (150.93МГц, CDCl₃, 19.0°C, δ / м.д.): 40.50 (CH₂Cl), 41.25 (CH₂CH₂Cl), 55.42 (OCH₃), 114.43 (C(13), C(15)), 120.61 (C(1)), 121.09 (C(9)), 122.71 (C(8)), 123.63 (C(3)), 126.63 (C(6)), 128.57 (C(12), C(16)), 128.89 (C(8a)), 129.35 (C(11)), 129.58 (C(4a)), 130.48 (C(5)), 131.50 (C(2), C(7)), 135.31 (C(10)), 142.28 (C(4)), 160.39 (C(14)), 163.98 (C(8b)), 164.25 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 393 ([M+2]⁺) (41), 391 ([M]⁺) (100), 356 (23), 329 (50), 328 (21), 312 (15), 298 (16), 258 (23), 215 (16), 149 (13). Найдено (%): C, 70.55; H, 4.75; N, 3.50. C₂₃H₁₈ClNO₃. Вычислено (%): C, 70.50; H, 4.63; N, 3.57.

**(E)-2-(2-хлорэтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-
1,3(2H)-дион (10b)**

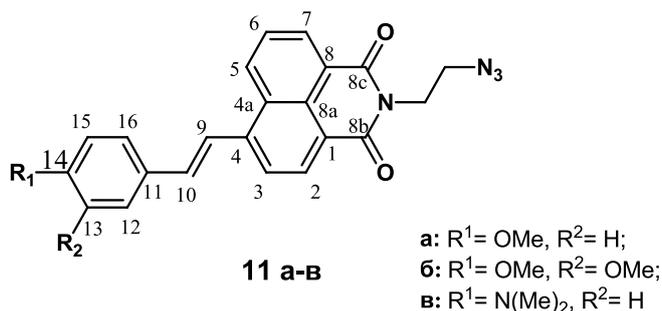
По общей методике синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-хлорэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 150) из 0.192 г (0.46ммоль) соединения **9b** и 3 мл POCl₃ было получено 0.200 г целевого продукта **10b** (выход 97%). Т.пл. 195 –197°C. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-d₆, 27°C, δ / м.д., J / Гц): 3.82 (с, 3H, -OCH₃(14)), 3.84 – 3.96 (м, 5H, -CH₂Cl, -OCH₃(13)), 4.41 (т, 2H, J = 6.8, CH₂CH₂Cl), 7.03 (д, 1H, H(15), J = 8.3), 7.33 (д, 1H, H(16), J₁= 8.3, J₂ = 1.7), 7.52 – 7.62 (м, 2H, H(10), H(12)), 7.90– 7.96 (м, 1H, H(6)), 8.10 (д, 1H, H(9), J = 16.2), 8.23 (д, 1H, H(3), J = 8.0), 8.50 (д, 1H, H(2), J = 8.0), 8.57 (д, 1H, H(7), J = 7.3), 9.04 (д, 1H, H(5), J = 8.0). Спектр ¹³C ЯМР (100.61МГц, ДМСО-d₆, 27.0°C, δ / м.д.):

40.83 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$), 55.58 ($-\text{OCH}_3$ (13)), 55.78 ($-\text{OCH}_3$ (14)), 109.93 (C(12)), 111.69 (C(15)), 119.98 (C(1)), 120.70 (C(9)), 121.89 (C(16)), 122.18 (C(8)), 123.09 (C(3)), 126.95 (C(6)), 128.27 (C(8a)), 129.02 (C(4a)), 129.52 (C(11)), 130.88 (C(2)), 131.09 (C(7)), 131.28 (C(5)), 135.65 (C(10)), 141.86 (C(4)), 149.08 (C(13)), 149.84 (C(14)), 163.25 (C(8b)), 163.54 (C(8c)). ИК-спектр (KBr), cm^{-1} : 2980, 2918 (ν_{CH}); 1690, 1652 ($\nu_{\text{C=O}}$), 795 ($\nu_{\text{C=Cl}}$). Масс-спектр, m/z (I, %): 423 ($[\text{M}+2]^+$) (35), 422 (27), 421 ($[\text{M}]^+$) (100), 386 (14), 359 (28), 328 (20), 312 (15), 284 (22), 273 (17), 202 (16). Найдено (%): C, 68.25; H, 4.69; N, 3.50. $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$. Вычислено (%): C, 68.33; H, 4.78; N, 3.32.

(E)-2-(2-хлорэтил)-6-(4-(диметиламино)стирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (10в)

По общей методике синтеза (E)-2-(2-хлорэтил)-6-(стирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 150) из 151.0 мг (0.39 ммоль) соединения **3в** и 3.0 мл POCl_3 было получено 140 мг целевого продукта **4в** (выход 89%). Т.пл. 187–189°C. Спектр ^1H ЯМР (600.17 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 30.0°C, δ / м.д., J / Гц): 3.00 (с, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.87 (м, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$), 4.41 (м, 2H, CH_2Cl), 6.78 (д, 2H, H(12), H(14), $J = 8.8$), 7.56 (д, 1H, H(10), $J = 16.0$), 7.71 (д, 2H, H(11), H(15), $J = 8.8$), 7.90 (м, 2H, H(6)), 7.95 (д, 1H, H(9), $J = 16.0$), 8.21 (д, 1H, H(3), $J = 8.1$), 8.46 (д, 1H, H(2), $J = 8.1$), 8.55 (д, 1H, H(7), $J = 6.8$), 9.02 (д, 1H, H(5), $J = 7.7$). Спектр ^{13}C ЯМР (600.17 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 30.0°C, δ / м.д.): 40.03 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 40.77 (CH_2Cl), 52.88 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$), 112.13 (C(13), C(15)), 117.51 (C(9)), 119.13 (C(1)), 122.09 (C(3)), 122.30 (C(8), C(11)), 124.42 (C(11)), 126.70 (C(6)), 128.38 (C(8a)), 128.81 (C(4a)), 129.01 (C(12), C(16)), 130.86 (C(2)), 130.97 (C(7)), 131.12 (C(5)), 135.97 (C(10)), 142.32 (C(4)), 149.39 (C(14)), 163.19 (C(8b)), 163.53 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 406 (35) ($[\text{M}+2]^+$), 404 (100) $[\text{M}]^+$, 386 (22), 369 (16), 342 (41), 341 (25), 298 (12), 255 (15), 162 (18), 113 (32). Найдено (%): C, 70.92; H, 5.28; N, 6.85. $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_6$. Вычислено: C, 71.19; H, 5.23; N, 6.92.

Общая методика синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (11a-в)



Исходное хлорпроизводное (1 экв.) смешивают с азидом натрия (5-6 экв.) в ДМФА. Реакционную массу выдерживают с обратным холодильником при 100°C в течение 6 часов. По окончании выдержки реакционную массу разбавляют водой и экстрагируют продукт хлористым метиленом или хлороформом, промывают объединенные органические экстракты водой и оставляют на ночь над слоем осушителя, после чего отгоняют растворитель в вакууме. В случае необходимости дальнейшей очистки хроматографируют полученную смесь на колонке с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы и смеси растворителей CH₂Cl₂/MeOH или CHCl₃/MeOH в качестве элюента.

(E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (11a)

По общей методике синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 153) из 40 мг (0.10 ммоль) соединения **10a**, 32.5 мг (0.50 ммоль) NaN₃ и 2.7 мл ДФМА было получено 35 мг продукта **11a** (выход 88%). Т.пл. = 159°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (600.22 МГц, CDCl₃, 19.6°C, δ / м.д., J / Гц): 3.65–3.71(м, 2H, -CH₂N₃), 3.89 (с, 3H, -OCH₃), 4.42–4.48 (м, 2H, -CH₂-CH₂-N₃), 6.98 (д, 2H, H(13), H(15), J = 8.5), 7.32 (д, 1H, H(10), J = 16.0), 7.60 (д, 2H, H(12), H(16), J = 8.5), 7.76 (д, 1H, H(9), J = 16.0), 7.78–7.82 (м, 1H, H(6)), 7.99 (д, 1H, H(3), J = 7.8), 8.59–8.63 (м, 2H, H(2), H(5)), 8.65 (д, 1H, H(7), J = 7.2). Спектр ¹³C ЯМР (150.93 МГц, CDCl₃, 20.2 °C, δ / м. д.): 38.79 (-CH₂-CH₂-N₃), 48.87 (-CH₂-N₃), 55.40 (-OCH₃), 114.39 (C(13), C(15)), 120.54 (C(1)), 121.01 (C(9)), 122.63 (C(8)), 123.56 (C(3)), 126.61 (C(6)), 128.57 (C(12), C(16)),

128.84 (C(8a)), 129.30 (C(11)), 129.51 (C(4a)), 130.41 (C(5)), 131.47 (C(7), C(2)), 135.24 (C(10)), 142.21 (C(4)), 160.34 (C(14)), 164.06 (C(8b)), 164.33 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 398 ([M]⁺) (17), 370 ([M]⁺- N₂) (37), 368 (32), 353 (37), 352 (100), 343(82), 329 ([M]⁺-CH₂CH₂N₃) (36), 321 (31), 258 (42), 243 (30). Найдено (%): С, 69.19; Н, 4.66; N, 13.43. C₂₃H₁₈N₄O₃. Вычислено (%): С, 69.34; Н, 4.55; N, 14.06.

**(E)-2-(2-азидоэтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1H-бензо [d,e]изохинолин -
1,3(2H)-дион (11б)**

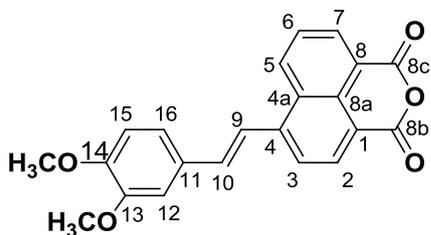
По общей методике синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 153) из 118 мг (0.28 ммоль) хлорпроизводного **10б**, 109 мг (1.68 ммоль) NaN₃ и 5.5 мл ДМФА было получено 0.100 г чистого продукта (выход 83%). Т.пл. = 173°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (600.17 МГц, ДМСО-*d*₆, 30.0 °C, δ / м.д., J / Гц): 3.63 (т, 2H, CH₂N₃, J = 6.2), 3.81 (с, 3H, -OCH₃(14)), 3.89 (с, 3H, -OCH₃(13)), 4.29 (т, 2H, CH₂CH₂N₃, J = 6.2), 7.02 (д, 1H, H(15), J = 8.4), 7.33 (дд, 1H, H(16), J₁ = 2.0; J₂ = 8.4), 7.52– 7.58 (м, 2H, H(10), H(12)), 7.93 (дд, 1H, H(6)), J₁ = 7.3, J₂ = 8.8), 8.08 (д, 1H, H(9), J = 16.0), 8.22 (д, 1H, H(3), J = 7.9), 8.50 (д, 1H, H(2), J = 7.9), 8.58 (д, 1H, H(7), J = 7.3), 9.03 (д, 1H, H(5), J = 8.8). Спектр ¹³C ЯМР (150.91 МГц, ДМСО-*d*₆, 30.0°C, δ / м.д.): 38.50 (CH₂CH₂N₃), 48.29 (CH₂N₃), 55.55 (-OCH₃(14)), 55.73 (-OCH₃(13)), 109.96 (C(12)), 111.68 (C(15)), 119.94 (C(1)), 120.69 (C(9)), 121.79 (C(16)), 122.14 (C(8)), 123.04 (C(3)), 126.88 (C(6)), 128.22 (C(8a)), 128.97 (C(4a)), 129.51 (C(11)), 130.80 (C(2)), 131.01 (C(7)), 131.19 (C(5)), 135.56 (C(10)), 141.78 (C(4)), 149.04 (C(13)), 149.82 (C(14)), 163.29 (C(8b)), 163.59 (C(8c)). ИК-спектр (KBr), см⁻¹: 2956, 2923 (ν_{CH}); 2102 (ν_{N₃}); 1696, 1654 (ν_{C=O}). Масс-спектр, m/z (I, %): 428 ([M]⁺) (26), 400 ([M]⁺- N₂) (51), 382 (34), 373 (100), 342 (40), 298 (35), 273 (31), 227 (21), 213 (20), 202 (36). Найдено (%): С, 67.66; Н, 4.64; N, 13.01. C₂₄H₂₀N₄O₅. Вычислено (%): С, 67.28; Н, 4.71; N, 13.08.

**(E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-(диметиламино)стирил)-1H-бензо[de]изохинолин-
1,3(2H)-дион (11в)**

По общей методике синтеза фенилзамещенных (E)-2-(2-азидоэтил)-6-(4-метоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 153) из 50 мг (0.12

ммоль) хлорпроизводного **10в** и 48 мг (0.74 ммоль) NaN₃ в 3.5 мл ДМФА было получено 43 мг продукта **11в** (выход 85%). Т. пл. 148 – 150°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*₆, 27.0°C, δ / м.д., J / Гц): 3.00 (с, 6H, N(CH₃)₂), 3.61– 3.65 (м, 2H, CH₂N₃), 4.30 (т, 2H, CH₂CH₂N₃, J = 6.4), 6.78 (д, 2H, H(15), H(13), J = 9.0), 7.54 (д, 1H, H(10), J = 15.9), 7.71 (д, 2H, H(12), H(16), J = 9.0), 7.84 – 7.92 (м, 2H, H(6)), 7.92– 7.96 (д, 1H, H(9), J = 15.9), 8.20 (д, 1H, H(3), J = 7.9), 8.46 (д, 1H, H(2), J = 7.9), 8.55 (д, 1H, H(7), J = 6.4), 9.00 (д, 1H, H(5), J = 8.1). Спектр ¹³C ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*₆, 27.0°C, δ / м.д.): 38.53 (CH₂CH₂N₃), 40.05 (N(CH₃)₂), 48.35 (CH₂N₃), 112.02 (C(13), C(15)), 117.44 (C(9)), 119.12 (C(1)), 122.10 (C(3)), 122.31 (C(8)), 124.39 (C(11)), 126.74 (C(6)), 128.39 (C(8a)), 128.83 (C(4a)), 129.04 (C(12), C(16)), 130.90 (C(2)), 131.00 (C(7)), 131.12 (C(5)), 136.03 (C(10)), 142.36 (C(4)), 150.83 (C(14)), 163.35 (C(8b)), 163.69 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 411 (9) [M]⁺, 353 (66), 352 (100), 342 (69), 341 (43), 328 (36), 327 (28), 253 (28), 226 (28), 57 (31). Найдено (%): C 70.17, H 5.22, N 16.98. C₂₄H₂₁N₅O₂. Вычислено (%): C 70.06, H 5.14, N 17.02.

(E)-6-(3,4-диметоксистирил)бензо[de]изохромен-1,3-дион (12)

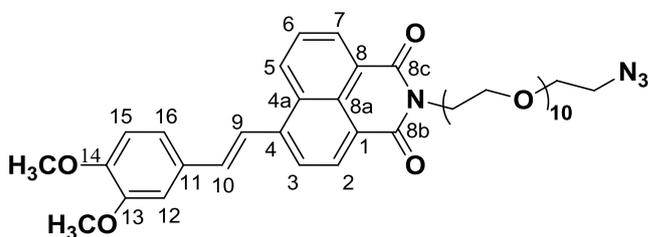


По общей методике синтеза фенил замещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-фенилэтенил]-1Н-бензо[d,e]изохинолин-1,3(2H)-дионов (стр. 152) из 0.25г (0.90 ммоль) 4-бромнафталяного ангидрида, 2.4 мг (0.01 ммоль) Pd(OAc)₂, 0.015 г (0.05 ммоль)

(*o*-tol)₃P, 0.018 мл (1.08 ммоль) 3,4-диметоксистирола, 10 мл ДМФА и 1.1 мл (8.6 ммоль) DIPEA было получено 0.164 г целевого продукта **12**, выход 50%. Очистка продукта проводилась методом колоночной хроматографии (SiO₂, CHCl₃), после чего соединение **12** высушивали в вакууме с использованием сушильного пистолета Фишера при температуре 70°C в течение 2-х часов. Т.пл. = 231°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (400.22 МГц, ДМСО-*d*₆, 19.6°C, δ / м.д., J / Гц): 3.83 (с, 3H, -OCH₃ (14)), 3.90 (с, 3H, -OCH₃ (13)), 7.04 (д, 1H, H(15), J = 8.3), 7.36 (дд, 1H, H(16), J₁ = 8.3, J₂ = 1.8), 7.56 (д, 1H, H(12), J = 1.8), 7.64 (д, 1H, H(10), J = 16.1), 7.97 (дд, 1H, H(6), J₁ = 8.5, J₂ = 7.1), 8.13 (д, 1H, H(9), J = 16.1), 8.28 (д, 1H, H(3), J = 7.9), 8.51 (д,

1H, H(2), $J=7.9$), 8.58 (д, 1H, H(7), $J=7.1$), 9.13 (д, 1H, H(5), $J=8.5$). Спектр ^{13}C ЯМР (150.93 МГц, ДМСО- d_6 , 21.4°C, δ /м.д.): 55.39 (ОСН₃(14)), 55.57 (ОСН₃(13)), 109.73 (C(12)), 111.45 (C(15)), 116.59 (C(1)), 119.14 (C(9)), 120.15 (C(16)), 121.94 (C(8)), 123.02 (C(3)), 127.01 (C(6)), 128.84 (C(8a)), 129.20 (C(4a)), 130.45 (C(11)), 132.05 (C(2)), 132.19 (C(7)), 132.43 (C(5)), 136.19 (C(10)), 142.61 (C(4)), 148.87 (C(13)), 149.80 (C(14)), 160.48 (C(8b)), 160.86 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 361, 360 (100) $[\text{M}]^+$, 329 (8), 301 (11), 286 (12), 285 (48), 273 (22), 245 (12), 213 (11), 202 (18).
Найдено: С 73.36, Н 4.65. С₂₂Н₁₆О₅. Вычислено: С 73.33, Н 4.48.

(E)-2-(32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтил)-6-(3,4-диметоксистирил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (13)

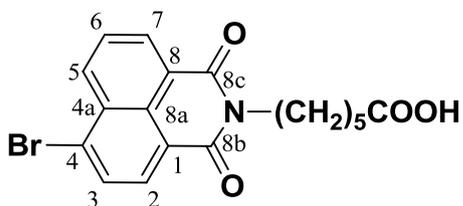


Смесь 0.078 г (0.15 ммоль) полигликоля и 0.044 г (0.15 ммоль) ангидрида **12** в 1.4 мл 2-метоксиэтанола выдерживают 19 часов при кипении. Растворитель

отгоняют в вакууме мембранного насоса, продукт выделяют методом колоночной хроматографии (Al₂O₃, CH₂Cl₂). Получено 40 мг продукта в виде желтого масла, выход 26%. Спектр ^1H ЯМР (500.13 МГц, CDCl₃, 24.9°C, δ /м.д., J / Гц): 3.51–3.88 (м, 40H, (CH₂CH₂O)₁₀), 3.80–3.85 (м, 2H, CH₂CH₂N), 3.94 (с, 3H, -ОСН₃ (14)), 3.99 (с, 3H, -ОСН₃ (13)), 4.44 (т, 2H, CH₂N, $J=6.2$), 6.93 (д, 1H, H(15), $J=8.2$), 7.16–7.22 (м, 2H, H(12), H(16)), 7.29 (д, 1H, H(10), $J=16.0$), 7.74 (д, 1H, H(9), $J=16.0$), 7.80 (дд, 1H, H(6), $J_1=7.3, J_2=8.2$), 7.97 (д, 1H, H(3), $J=7.4$), 8.57 (д, 1H, H(2), $J=7.4$), 8.59 (д, 1H, H(5), $J=8.2$), 8.62 (д, 1H, H(7), $J=7.3$). Спектр ^{13}C ЯМР (125.76 МГц, CDCl₃, 25.1°C, δ / м.д.): 39.05 (CH₂N), 50.66 (CH₂N₃), 56.00 ((ОСН₃)×2), 67.91 (CH₂CH₂N), 70.01 (CH₂), 70.12 (CH₂), 70.54–70.67 ((CH₂)×17), 109.30 (C(12)), 111.28 (C(15)), 120.88 (C(16)), 121.03 (C(1)), 121.45 (C(9)), 123.01 (C(8)), 123.65 (C(3)), 126.57 (C(6)), 128.79 (C(11)), 129.48 (C(4a)), 129.69 (C(5)), 130.12 (C(8a)), 131.19 (C(2)), C(7)), 135.35 (C(10)), 141.77 (C(4)), 149.30 (C(13)), 150.00 (C(14)), 164.05 (C(8b)), 164.29 (C(8c)). Масс-спектр (ХИАД), вычислено, m/z : 868.41; найдено: 886.7

($[M+H_3O]^+$). Найдено: С, 60.68; Н, 6.86; N, 6.55. $C_{44}H_{60}N_4O_{14}$. Вычислено: С, 60.82; Н, 6.96; N, 6.45.

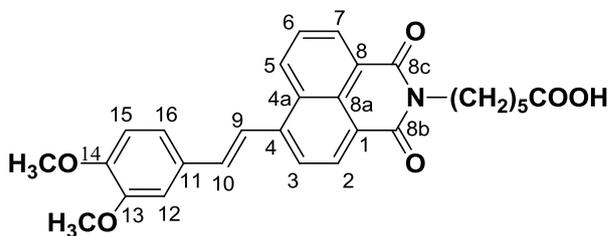
6-(6-бromo-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)гексановая кислота (14)



Смесь 1.5 г (5.41 ммоль) 4-бромнафталяного ангидрида и 0.711 г (5.42 ммоль) 6-аминокапроновой кислоты в 50.0 мл этилового спирта выдерживают при кипении с обратным холодильником до тех пор пока смесь из белой

суспензии не станет прозрачным коричневым раствором (около 4 часов). Реакционную массу охлаждают до комнатной температуры и отфильтровывают выпавший осадок, промывают холодным спиртом на фильтре, сушат. Получено 1.405 г продукта **14**, выход 67%. Т.пл. 159 – 161°C (лит.[201]: т.пл. 161°C). Спектр 1H ЯМР (400.13 МГц, $DMCO-d_6$, 20.9°C, δ /м.д., J / Гц): 1.27 – 1.43 (м, 2H, $CH_2(CH_2)_2COOH$), 1.45 – 1.58 (м, 2H, CH_2CH_2COOH), 1.58 – 1.71 (м, 2H, $CH_2(CH_2)_3COOH$), 2.15 – 2.26 (CH_2COOH), 3.96 – 4.06 (м, 2H, CH_2N), 7.96 – 8.04 (м, 1H, H(6)), 8.23 (д, 1H, H(3), $J=7.9$), 8.35 (д, 1H, H(2), $J=7.9$), 8.51 – 8.62 (м, 2H, H(5), H(7)), 11.99 (уш.с., -OH). Найдено: С, 55.04; Н, 4.20; N, 3.63; $C_{18}H_{16}BrNO_4$. С, 55.40; Н, 4.13; Br, 20.48; N, 3.59.

(E)-6-(6-(3,4-диметоксистирил)-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)гексановая кислота (15)

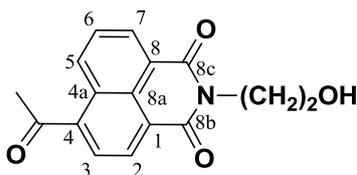


Путь 1: смесь 0.137 г (0.38 ммоль) ангидрида **12** и 0.253 г (1.9 ммоль) 6-аминокапроновой кислоты в 5 мл 2-метоксиэтанола выдерживают при 110-120°C 14 часов. Реакционную массу

разбавляют 5% раствором соляной кислоты (15 мл), отфильтровывают выпавший осадок, промывают на фильтре дистиллированной водой, после чего сушат в пистолете Фишера 2 ч при температуре 60°C. Получено 0.234 г целевого продукта

Х в виде оранжевого порошка, выход 89%. *Путь 2:* по общей методике синтеза 4-фенилзамещенных 2-(2-гидроксиэтил)-6-[(E)-2-фенилэтинил]-1Н-бензо[*d,e*]изохинолин-1,3(2Н)-дионов (стр. 147) из 0.1 г (0.257 ммоль) соединения **14**, 1.0 мг (0.005 ммоль) Pd(OAc)₂, 4.3 мг (0.014 ммоль) (*o*-tol)₃P, 0.046 мл (0.309 ммоль) 4-диметиламиностирола, 4.0 мл ДМФА и 1.5 мл Et₃N было получено 0.103 мг продукта, выход 85% (очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле с градиентным элюированием смесью растворителей хлороформ:метанол (от чистого CHCl₃ до 200:1). Т.пл. = 153°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*₆, 19.5°C, δ /м.д., J/ Гц): 1.30 – 1.43 (м, 1H, CH₂(CH₂)₂COOH), 1.53 – 1.60 (м, 1H, CH₂CH₂COOH), 1.62 – 1.69 (м, 1H, CH₂CH₂N), 2.22 (т, 1H, CH₂COOH, J= 7.3), 3.83 (с, 3H, CH₃(14)), 3.91 (с, 3H, CH₃(13)), 4.05 (т, 2H, CH₂N, J= 7.4), 7.03 (д, 1H, H(15), J= 8.4), 7.33 (д, 1H, H(16), J= 8.4), 7.53 – 7.57 (м, 2H, H(12), H(10)), 7.88 – 7.96 (м, 1H, H(6)), 8.09 (д, 1H, H(9), J= 16.0), 8.22 (д, 1H, H(3), J= 7.8), 8.48 (д, 1H, H(2), J= 7.8), 8.55 (д, 1H, H(7), J= 7.4), 9.02 (д, 1H, H(5), J= 8.6). Спектр ¹³C ЯМР (150.93 МГц, ДМСО-*d*₆, 25.0°C, δ /м.д.): 24.12 (CH₂CH₂COOH), 25.91 (CH₂(CH₂)₂COOH), 27.14 (CH₂COOH), 33.48 (CH₂COOH), 39.79 (CH₂N), 55.43 (OCH₃(14)), 55.60 (OCH₃(13)), 109.78 (C(12)), 111.53 (C(15)), 120.07 (C(1)), 120.61 (C(9)), 121.64 (C(16)), 122.24 (C(8)), 122.87 (C(3)), 126.71 (C(6)), 128.00 (C(8a)), 128.84 (C(4a)), 129.41 (C(11)), 130.51 (C(2)), 130.70 (C(5), C(7)), 135.27 (C(10)), 141.40 (C(4)), 148.92 (C(13)), 149.65 (C(14)), 163.07 (C(8c)), 163.35 (C(8b)), 175.21 (COOH). Масс-спектр, m/z (I, %): 474 (32), 473 (100) [M]⁺, 414 (17), 456 (19), 360 (35), 359 (74), 373 (31), 372 (20), 328 (27), 284 (21). Найдено: С 70.79, Н 5.13. C₂₈H₂₇NO₆. Вычислено: С, 71.02; Н, 5.75.

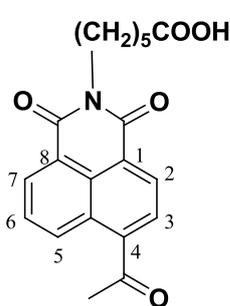
6-ацетил-2-(2-гидроксиэтил)-1Н-бензо[*de*]изохинолин-1,3(2Н)-дион (17a)



Смесь 0.15 мл (2.5 ммоль) этаноламина и 4 мл этилового спирта по каплям прибавляют к раствору 0.40 г (1.7 ммоль) 4-ацетилнафталевого ангидрида в 15 мл этанола при интенсивном перемешивании и температуре 60°C. Затем реакционную массу кипятят около 6 часов до тех пор пока она не станет прозрачной. Контроль за полнотой протекания реакции ведут методом ТСХ. По

окончании выдержки реакционную массу охлаждают до комнатной температуры, отгоняют этиловый спирт в вакууме водоструйного насоса. После очистки продукта методом колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) получено 0.468 г целевого соединения **17a**, выход 91%. Т.пл. = 165 – 167°C. Спектр ^1H ЯМР ($\text{DMCO-}d_6$, 600.17 МГц, 25.0°C, δ / м.д., J / Гц): 2.80 (с, 3H, CH_3), 3.59 – 3.69 (м., 2H, CH_2OH), 4.12 – 4.18 (м, 2H, CH_2N), 4.78 – 4.84 (м, 1H, -OH), 7.89 – 7.97 (м, 1H, H(6)), 8.36 (д., 1H, H(3), $J = 7.8$), 8.48 – 8.58 (м, 2H, H(2), H(7)), 8.82 (д, 1H, H(5), $J = 8.7$). Спектр ^{13}C ЯМР ($\text{DMCO-}d_6$, 150.93 МГц, 20.5°C, δ / м.д.): 30.25 (CH_3), 42.00 (CH_2OH), 57.72 (CH_2N), 122.49 (C(8)), 124.92 (C(1)), 127.70 (C(4a)), 127.97 (C(8a)), 128.53 (C(6), C(3)), 129.59 (C(7)), 130.71 (C(2)), 131.95 (C(5)), 140.10 (C(4)), 162.94 (C(8b)), 163.42 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 252 (16), 241 (16), 240 (100), 238 (21), 222 (51), 210 (13), 238 (21), 194 (12). Найдено: С, 66.45; Н, 4.70; N, 4.88. $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$. Вычислено: С, 67.84; Н, 4.63; N, 4.94.

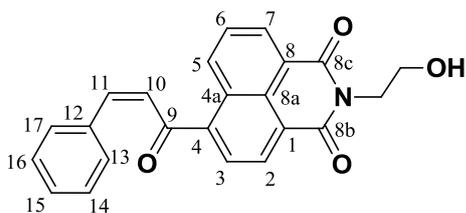
6-(6-ацетил-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)гексановая кислота (17б)



К суспензии 200 мг (0.83 ммоль) соединения **5** 7мл этанола прибавляют 174 мг (1.30 ммоль) 6-аминогексановой кислоты и выдерживают при кипении с обратным холодильником до получения прозрачного раствора. Затем реакционную массу охлаждают до комнатной температуры и отфильтровывают выпавший осадок. После промывки 5% раствором соляной кислоты, водой и этанолом на фильтре получено 250 мг продукта **17б** виде светло-желтого порошка. Выход 85%. Т.пл. 122 – 124°C. Спектр ^1H ЯМР ($\text{DMCO-}d_6$, 500.13 МГц, 25°C, δ / м.д., J / Гц): 1.31 – 1.39 (м, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$), 1.51 – 1.59 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.60 – 1.68 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.21 (т, 2H, $J = 7.3$, CH_2COOH), 2.80 (с, 3H, CH_3), 4.03 (т, 2H, $J = 7.0$, CH_2N), 7.89 – 7.97 (м, 1H, H(6)), 8.37 (д, 1H, $J = 7.6$, H(3)), 8.52 – 8.57 (м, 2H, H(7), H(2)), 8.82 (д, 1H, $J = 8.8$, H(5)). Спектр ^{13}C ЯМР ($\text{DMCO-}d_6$, 125.76 МГц, 25°C, δ / м.д.): 24.21 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 25.99 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$), 27.16 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$), 30.26 (CH_3), 33.50 (CH_2COOH), 40.26 ($\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$), 122.36 (C(8)), 124.78 (C(1)), 127.72

(C(4a)), 127.93 (C(8a)), 128.52 (C(6), C(3)), 129.68 (C(7)), 130.79 (C(2)), 132.03 (C(5)), 140.20 (C(4)), 162.79 (C(8c)), 163.28 (C(8b)), 174.43 (COOH), 201.67 (C=O). Масс-спектр, m/z (I, %): 353 (50) [M]⁺, 294 (44), 253 (30), 252 (41), 240 (76), 238 (59), 225 (42), 224 (100), 222 (57), 153 (23). Найдено: С 67.89, Н 5.32, N 3.92. C₂₀H₁₉NO₅, вычислено: С 67.98, Н 5.42, N 3.96.

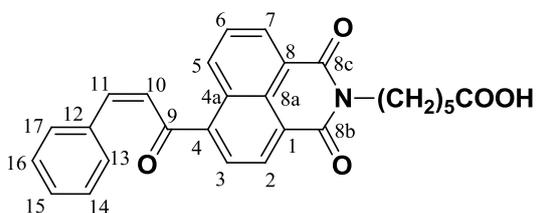
(Z)-2-(2-гидроксиэтил)-6-(3-фенилакролоил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (18a)



Путь 1: Раствор 0.3 г (1.059 ммоль) соединения **17a** в 3.0 мл этилового спирта охлаждают на ледяной бане до 5°C, в атмосфере аргона прибавляют в расткору 0.145 мл (1.377 ммоль) бензальдегида и 0.635 мл раствора NaOH (10% масс.), выдерживают на ледяной бане в течение трех часов. Продукт из реакционной массы экстрагируют хлороформом, очищают методом колоночной хроматографии (SiO₂, CHCl₃/MeOH до 5%), получено 0.271 г продукта **18a**, выход 69%. *Путь 2:* к перемешиваемой суспензии 0.250 г (0.76 ммоль) **120** в 3.5 мл 2-метоксиэтанола добавляют 0.069 мл (1.14 ммоль) этаноламина. Реакционную массу выдерживают при 80°C 6 часов, контроль за полнотой протекания реакции ведут методом ТСХ. По окончании реакции реакционную массу разбавляют 5% раствором соляной кислоты (5мл) и экстрагируют продукт хлороформом (3×10 мл), объединенные экстракты промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод и оставляют на ночь над осушителем MgSO₄. После отгонки растворителя в вакууме водоструйного насоса продукт очищают методом колоночной хроматографии (SiO₂, CHCl₃/MeOH до 3%), продукт получен в виде желтого порошка с выходом 77%. Т. пл. 146 – 148°C. Спектр ¹H ЯМР (600.22 МГц, ДМСО-d₆, 20.1°C, δ / м.д., J/ Гц): 3.65 (кв., 2H, , CH₂OH, J= 6.4), 4.15– 4.23 (м, 2H, CH₂CH₂OH), 4.84– 4.89 (м, 1H, -OH), 7.39– 7.51 (м, 3H, H(14), H(15), H(16)), 7.59 (д, 1H, H(10), J= 16.3), 7.62 (д, 1H, H(9), J= 16.3), 7.81 (д, 2H, H(13), H(17), J= 6.8), 7.91 – 7.96 (м, 1H, H(6)), 8.21 (д, 2H, H(3), J= 7.5), 8.53 – 8.61 (м, 3H, H(2), H(5), H(7)). Спектр ¹³C ЯМР (ДМСО-d₆, 150.93 МГц, 20.5°C, δ / м.д.): 42.00 (CH₂CH₂OH), 57.75

(CH₂OH), 122.64 (C(8)), 124.29 (C(1)), 126.40 (C(10)), 127.60 (C(3)), 127.95 (C(8a)), 128.37 (C(4), C(6)), 129.05 (C(14), C(16)), 129.10 (C(13), C(17)), 129.76 (C(2)), 130.93 (C(5)), 131.26 (C(15)), 131.61 (C(7)), 134.11 (C(12)), 141.52 (C(4)), 147.14 (C(11)), 163.09 (C(8b)), 163.43 (C(8c)), 194.10 (C=O).). Масс-спектр, m/z (I, %): 342 (5), 341 (24), 340 (36), 328 (100), 310 (18), 300 (8), 282 (13), 256 (15), 228 (12), 131 (9).
Найдено: С, 74.09; Н, 4.72; N, 3.70. C₂₃H₁₇NO₄. Вычислено: С, 74.38; Н, 4.61; N, 3.77.

(Z)-6-(1,3-диоксо-6-(3-фенилакролоил)-1Н-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)гексановая кислота (186)

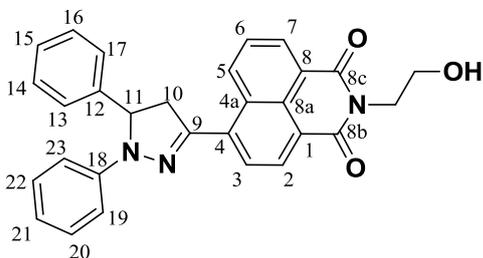


Путь 1: смесь 0.60 г (1.7 ммоль) соединения **176** и 0.23 мл (0.26 ммоль) бензальдегида в 5.5 мл этанола охлаждают на ледяной бане до 0 °С, затем добавляют 1.02 мл 10%-го раствора NaOH. Реакционную массу

выдерживают при интенсивном перемешивании при комнатной температуре около 12 часов. После исчезновения пятна исходного соединения **176** на ТСХ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=20/1, v/v) реакционную массу разбавляют водой и подкисляют 5%-м раствором соляной кислоты до pH=3 и экстрагируют продукт хлороформом (5×20мл). Объединенные экстракты промывают водой (3×20мл) и оставляют на ночь над слоем Na₂SO₄. После фильтрования экстракта от осушителя и отгонки растворителя в вакууме продукт очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, градиентное элюирование CH₂Cl₂/CH₂Cl₂:MeOH (2%)). Получено 265 мг продукта, выход 35%. *Путь 2:* смесь 0.473 г (1.432 ммоль) соединения 20 и 0.254 г (1.937 ммоль) 6-аминогексановой кислоты в 8 мл 2-метоксиэтанола выдерживают 7 часов при 85°С. Реакционную массу разбавляют водой, экстрагируют продукт хлористым метиленом (3×15 мл), объединенные экстракты промывают водой (3×15 мл), отгоняют хлористый метилен в вакууме водоструйного насоса и подвергают продукту очистке методом колоночной хроматографии (SiO₂, градиентное элюирование CH₂Cl₂/CH₂Cl₂:MeOH (1%)), получено 290 мг продукта, выход 46%. Т.пл. 124 – 126°С. Спектр ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 500.13 МГц, 25.0°С, δ / м.д., J/Гц): 1.33 – 1.41 (м, 2H, CH₂(CH₂)₂COOH), 1.51 – 1.61 (м, 2H, CH₂CH₂COOH), 1.61 –

1.71 (м, 2H, CH₂CH₂N), 2.23 (т, 2H, CH₂COOH, $J=7.5$), 4.06 (т, 2H, CH₂N, $J=7.5$), 7.43 – 7.50 (м, 3H, H(14), H(15), H(16)), 7.58 (д, 1H, H(10), $J=16.3$), 7.63 (д, 1H, H(11), $J=16.3$), 7.79 – 7.84 (м, 2H, H(13), H(17)), 7.94 (дд, 1H, H(6), $J_1=7.2$, $J_2=8.4$), 8.20 (д, 1H, H(3), $J=7.5$), 8.54 – 8.58 (м, 2H, H(5), H(7)), 8.59 (д, 1H, H(2), $J=7.5$), 11.99 (уш.с., 1H, COOH). Спектр ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆, 125.76 МГц, 25.0 °С, δ / м.д.): 24.20 (CH₂CH₂COOH), 25.99 (CH₂(CH₂)₂COOH), 27.19(CH₂(CH₂)₃COOH), 33.46(CH₂COOH), 40.07 (CH₂N), 122.51 (C(8)), 124.11 (C(1)), 126.44 (C(10)), 127.55 (C(3)), 127.91 (C(8a)), 128.37 (C(6),C(4a)), 129.03 (C(13),C(14),C(16),C(17)), 129.83 (C(2)), 131.00 (C(5)), 131.24 (C(15)), 131.68 (C(7)), 134.10 (C(12)), 141.63 (C(4)), 147.21 (C(11)), 162.95 (C(8b)), 163.29 (C(8c)), 174.41 (COOH), 194.15 (C=O). Масс-спектр, *m/z* (I, %): 441 (100) [M]⁺, 383 (17), 382 (60), 340 (87), 326 (78), 310 (25), 282 (23), 256 (47), 228 (31), 226 (18). Найдено: С 73.35, Н 5.23, N 3.11. C₂₇H₂₃NO₅. Вычислено: С 73.46, Н 5.25, N 3.17.

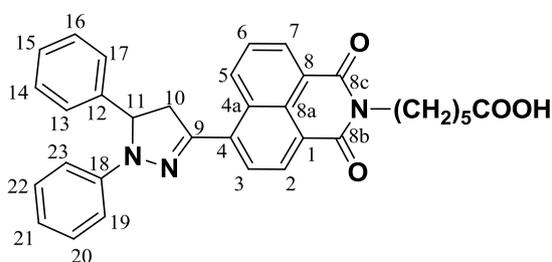
6-(1,5-дифенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил)-2-(2-гидроксиэтил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (19a)



К раствору 0.240 г (0.65 ммоль) халкона **18a** в 3.0 мл ледяной уксусной кислоты в атмосфере аргона прибавляют 130 мкл (1.29 ммоль) фенилгидразина. Реакционную массу нагревают до 100 °С (она становится темно-бородовой) и выдерживают при этой температуре 11 часов. За полнотой протекания реакции следят по ТСХ (Al₂O₃, PhH/CH₃CN=5/1, об./об.), при необходимости добавляют фенилгидразин. По окончании реакции реакцию массу охлаждают до комнатной температуры и разбавляют водой. Выпавший темно-красный осадок отфильтровывают, промывают на фильтре 5%-м раствором соляной кислоты и водой. Продукт очищают с помощью колоночной хроматографии (Al₂O₃, PhH/EtOH-градиентное элюирование от 100% PhH до 40/1, об./об.) и перекристаллизации из ледяной уксусной кислоты. После очистки получено 0.125 г продукта **19a**, выход 42%. Т.пл. = 195 °С с разл. Спектр ¹H ЯМР (600.22 МГц, CDCl₃, 19.0 °С, δ / м.д., J / Гц): 3.44 (дд, 1H, CH₂-пиразол, $J_1=6.5$, $J_2=16.7$), 4.01 (с,

2H, CH₂OH), 4.09 – 4.17 (м, 1H, CH₂-пиразол), 4.49 (с, 2H, CH₂N), 5.45 (дд, 1H, CH-пиразол, $J_1 = 12.6$, $J_2 = 6.5$), 6.91 (т, 1H, H(21), $J = 7.5$), 7.17 (д, 2H, H(19), H(23), $J = 7.4$), 7.22 – 7.32 (м, 3H, H(20), H(22), H(15)), 7.32 – 7.40 (4H, H(17), H(13), H(14), H(16)), 7.61 (д, 1H, H(3), $J = 7.7$), 7.89 – 7.97 (м, 1H, H(6)), 8.55 (д, 1H, H(2), $J = 7.7$), 8.70 (д, 1H, H(7), $J = 6.8$), 10.01 (д, 1H, H(5), $J = 8.4$). Спектр ¹³C ЯМР (CDCl₃, 150.93 МГц, 19.0°C, δ / м.д.): 42.87 (CH₂N), 45.03 (CH₂-пиразол), 62.01 (CH₂OH), 63.53 (CH-пиразол), 113.88 (C(19), C(23)), 120.49 (C(21)), 121.39 (C(1)), 122.40 (C(8)), 125.75 (C(13), C(17)), 126.23 (C(3)), 127.84 (C(6)), 127.98 (C(15)), 128.80 (C(4a)), 129.10 (C(8a)), 129.20 (C(20), C(22)), 129.37 (C(14), C(16)), 130.97 (C(2)), 131.57 (C(7)), 134.83 (C(5)), 135.32 (C(4)), 141.57 (C(12)), 143.37 (C(18)), 145.21 (C(9)), 164.78 (C(8b)), 165.28 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 462 (32) [M+H]⁺, 461 (100) [M]⁺, 459 (13), 429 (16), 418 (52), 417 (38), 416 (55), 384 (27), 340 (15), 180 (16). Найдено: С, 75.25; Н, 4.92; N, 9.01. C₂₉H₂₃N₃O₃. Вычислено: С, 75.47; Н, 5.02; N, 9.10.

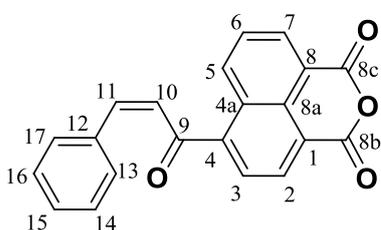
6-(6-(1,5-дифенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил)-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)гексановая кислота (196)



К раствору 250 мг (0.57 ммоль) соединения в 3.0 мл уксусной кислоты добавляют 110 мкл (1.13 ммоль) фенилгидразина и выдерживают 6 часов при 100°C в атмосфере аргона. Затем реакционную массу разбавляют водой и экстрагируют продукт дихлорметаном (3×20 мл), объединенные органические экстракты промывают водой и сушат над Na₂SO₄. После фильтрования экстракта и отгонки растворителя продукт очищают методом колоночной хроматографии (SiO₂, градиентное элюирование CH₂Cl₂/CH₂Cl₂:MeOH (2%)) и перекристаллизации из ледяной уксусной кислоты. Получено 274 мг продукта, выход 36%. Т. пл. = 207°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (DMCO-*d*₆, 400.13 МГц, 21.6°C, δ / м.д., J / Гц): 1.31 – 1.40 (м, 2H, CH₂(CH₂)₂COOH), 1.51 – 1.59 (м, 2H, CH₂CH₂COOH), 1.61 – 1.68 (м, 2H, CH₂(CH₂)₃COOH), 2.20 – 2.23 (м, 2H, CH₂COOH), 3.37 – 3.43 (м, 1H, CH₂-пиразол), 4.02 – 4.08 (м, 2H, CH₂N), 4.23 (дд, 1H, $J = 12.3$, J

= 17.3, CH₂-пиразол), 5.68 (дд, 1H, $J_1 = 6.1$, $J_2 = 12.3$, CH-пиразол), 6.83 (т, 1H, $J = 7.5$, H(21)), 7.15 (д, 2H, $J = 7.9$, H(19), H(23)); 7.29 – 7.23 (м, 3H, H(15), H(20), H(22)), 7.43 – 7.33 (м, 2H, H(16), H(14)), 7.51 – 7.44 (м, 2H, H(17), H(13)); 7.90 (д, 1H, $J = 8.2$, H(3)), 8.03 – 8.07 (м, 1H, H(6)), 8.45 (д, 1H, $J = 8.2$, H(2)), 8.58 (д, 1H, $J = 7.9$, H(7)), 9.92 (д, 1H, $J = 8.4$, H(5)), 11.99 (уш.с, 1H, COOH). Спектр ¹³C ЯМР (ДМСО-*d*₆, 150.93 МГц, 21 °С, δ / м.д.): 24.21 (CH₂CH₂COOH), 26.03 (CH₂(CH₂)₂COOH), 27.24 (CH₂(CH₂)₃COOH), 33.48 (CH₂COOH), 40.04 (CH₂N), 44.50 (CH₂-пиразол), 62.25 (CH-пиразол), 113.59 (C(19), C(23)), 119.87 (C(21)), 121.30 (C(1)), 122.44 (C(8)), 125.48 (C(13), C(17)), 125.94 (C(14), C(16)), 127.39 (C(3)), 127.64 (C(15)), 128.08 (C(6)), 128.21 (C(4a)), 128.32 (C(8a)), 129.14 (C(20), C(22)), 130.36 (C(7)), 130.60 (C(2)), 133.67 (C(5)), 134.17 (C(4)), 142.00 (C(12)), 143.10 (C(18)), 146.33 (C(9)), 162.94 (C(8c)), 163.45 (C(8b)), 174.44 (COOH). Масс-спектр, *m/z* (I, %): 532 (36), 531 (100) [M]⁺, 429 (23), 416 (24), 415 (32). Найдено: С, 74.33;Н, 5.52;N, 8.01.С₃₃Н₂₉Н₃О₄. Вычислено: С, 74.56;Н 5.50;N,7.90

(Z)-6-(3-фенилакролоил)бензо[de]изохромен-1,3-дион (20)

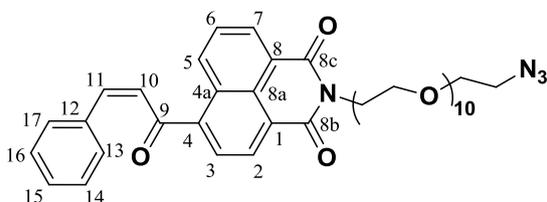


К раствору 0.500г (2.08 ммоль) 4-ацетилнафталяного ангидрида и 0.234 г (5.85 ммоль) NaOH в 6.2 мл воды добавляют 0.250 мл (2.45 ммоль) бензальдегида и выдерживают при комнатной температуре 12 часов. По окончании реакции реакцию массу разбавляют 5%

раствором соляной кислоты до pH=4-5 и экстрагируют продукт хлороформом. Объединенные органические экстракты промывают водой до нейтральной реакции и оставляют над осушителем на ночь. Отфильтровывают осушитель, отгоняют растворитель в вакууме водоструйного насоса и хроматографируют полученную смесь (SiO₂, CHCl₃/MeOH, градиентное элюирование) с получением 0.400 г продукта **20**, выход 58%. Т.пл. = 204°C с разл. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, CDCl₃, 20.9°C, δ / м.д., J / Гц): 7.30 (д, 1H, H(10), H(11), $J = 16.2$), 7.37 – 7.53 (м, 3H, 3H-Ph), 7.54 – 7.66 (м, 3H, CH=C_H, 2H-Ph), 7.85 – 7.93 (м, 1H, H(6)), 8.02 (д, 1H, H(3), $J = 7.5$), 8.63 – 8.75 (м, 3H, H(2), H(5), H(7)). Масс-спектр, *m/z* (I, %): 329 (11),

328 (56)[M]⁺, 327 (100), 256 (23), 255 (13), 228 (17), 226 (14) 153 (8), 125 (7), 103 (10). Найдено: С, 76.75; Н, 3.58. С₂₁Н₁₂О₄. Вычислено: С, 76.82; Н, 3.68.

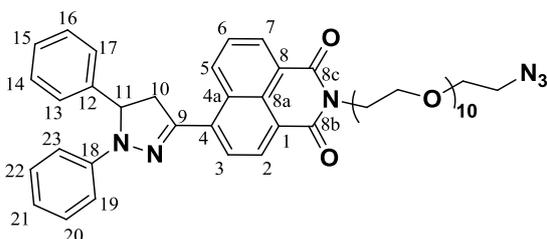
(Z)-2-(32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтил)-6-(3-фенилакролоил)-1Н-бензо[de]изохинолин-1,3(2Н)-дион (21)



Смесь 0.095 г (0.29 ммоль) ангидрида **12** и 0.153 г (0.29 ммоль) *O*-(2-аминоэтил)-*O'*-(2-азидоэтил)нонаэтиленгликоля в 2.7 мл 2-метоксиэтанола выдерживают при 60°C 6 часов. По окончании выдержки растворитель

отгоняют в вакууме мембранного насоса, после чего смесь хроматографируют с получением 87 мг целевого продукта **21** в виде тяжелого светло-желтого масла, выход 36%. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, CDCl₃, 21.0°C, δ /м.д., J/ Гц): 3.30 – 3.41 (м, 2H, CH₂), 3.46 – 3.76 (м, 38H, CH₂), 3.75 – 3.89 (м, 2H, CH₂CH₂N, J = 6.0), 4.36 - 4.48 (м, 2H, CH₂N, J = 6.0), 7.27 (д, 1H, H(11), J = 16.1), 7.36 – 7.44 (м, 3H, H(14), H(15), H(16)), 7.51 – 7.60 (м, 3H, H(10), H(13), H(17)), 7.75 – 7.81 (м, 1H, H(6)), 7.94 (д, 1H, H(3), J = 7.5), 8.54 (д, 1H, H(5), J = 8.6), 8.59 – 8.66 (м, 2H, H(2), H(7)). Спектр ¹³C ЯМР (125.76 МГц, CDCl₃, 25.0°C, δ / м.д.): 39.29(CH₂N), 50.69(CH₂N₃), 67.88 (CH₂CH₂N), 70.05 (CH₂), 70.14 (CH₂), 70.57-70.70 ((CH₂)×17), 122.83 (C(8)), 124.55 (C(1)), 126.27 (C(10)), 126.87 (C(3)), 128.12 (C(6)), 128.71 (C(8a)), 128.78 (C(13), C(17)), 129.02 (C(4a)), 129.18 (C(14), C(16)), 130.11 (C(2)), 131.44 (C(15)), 131.77 (C(7)), 132.09 (C(5)), 134.02 (C(12)), 142.38 (C(4)), 148.08 (C(11)), 163.68 (C(8b)), 164.01 (C(8c)), 194.57 (C=O). Масс-спектр, m/z (I, %): 648 (100) [C₄₂H₅₄N₄O₁₃-(CH₂CH₂O)₇CH₂⁺], 592 (38), 535 (48), 479 (36), 442 (32), 441 (97), 423 (33), 367 (31), 149 (39), 57 (91). Найдено: С, 61.95; Н, 6.68; N, 6.49. С₄₃Н₅₆Н₄О₁₃. Вычислено: С, 61.71; Н, 6.74; N, 6.69

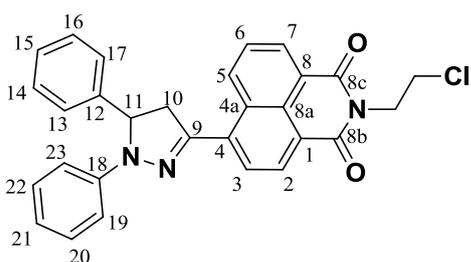
2-(32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтил)-6-(1,5-дифенил-4,5-дигидро-1Н-пиразол-3-ил)-1Н-бензо[de]изохинолин-1,3(2Н)-дион (22)



Соединение **21** (0.100 г, 0.12 ммоль) растворяют в 1.5 мл этилового спирта при небольшом нагревании. Добавляют 0.015 мл

(0.15 ммоль) фенилгидразина и 110 мкл 10% раствора NaOH. Реакционную массу выдерживают при кипении 5 часов. По окончании выдержки и отгонки растворителя смесь хроматографируют на Al₂O₃ с градиентным элюированием от CH₂Cl₂ 100% до CH₂Cl₂/MeOH(1% об.). Продукт **22** в виде темно-красного масла получен с выходом 51%. Спектр ¹H ЯМР (500.13 МГц, CD₂Cl₂, 25.0°C, δ /м.д., J / Гц): 3.35 – 3.40 (м, 2H, CH₂N₃), 3.42 (дд, 1H, C₍₁₂₎H₂-пиразолил, J₁ = 16.9, J₂ = 6.7), 3.48 – 3.68 (м, 38H, CH₂), 3.76 – 2.80 (м, 2H, CH₂CH₂N), 4.14 (дд, 1H, C₍₁₂₎H₂-пиразолин, J₁ = 16.9, J₂ = 12.6), 4.39 (т, 2H, CH₂N, J = 6.2), 5.46 (дд, 1H, C₍₁₁₎H-пиразолин, J₁ = 6.7, J₂ = 12.6), 6.87 (т, 1H, H(21), J = 7.2), 7.17 (д, 2H, H(19), H(23), J = 7.7), 7.24 (д, 2H, H(20), H(22), J = 7.2), 7.34 – 7.49 (м, 5H, H(15), H(13), H(17), H(14), H(16)), 7.63 (д, 2H, H(3), J = 7.8), 7.93 (дд, 1H, H(6), J₁ = 8.6, J₂ = 7.3), 8.51 (д, 1H, H(2), J = 7.8), 8.65 (дд, H(7), J₁ = 7.3, J₂ = 1.1), 10.00 (дд, H(5), J₁ = 8.6, J₂ = 1.1). Спектр ¹³C ЯМР (125.76 МГц, CD₂Cl₂, 25.0°C, δ / м.д.): 39.77 (CH₂CH₂N), 45.61 (C₍₁₂₎H₂-пиразолин), 51.36 (CH₂N₃), 63.95 (C₍₁₁₎H-пиразолин), 68.39 (CH₂N), 70.43 – 71.17 (CH₂×19), 114.38 (C(19), C(23)), 120.76 (C(21)), 122.43 (C(1)), 123.39 (C(8)), 126.45 (C(13), C(17)), 127.03 (C(3)), 128.28 (C(6)), 128.43 (C(15)), 129.36 (C(4a)), 129.51 (C(8a)), 129.65 (C(20), C(22)), 129.79 (C(14), C(16)), 131.03 (C(2)), 131.55 (C(7)), 134.90 (C(5)), 125.49 (C(4)), 142.46 (C(12)), 144.12 (C(18)), 146.25 (C(9)), 164.23 (C(8b)), 164.73 (C(8c)). ИК-спектр (KBr), см-1: 2103 (ν_{N3}); 1698, 1660 (ν_{C=O}). Масс-спектр, m/z (I, %): 519 (6) [C₂₇H₁₈N₃O₂(CH₂CH₂O)₂CH₂⁺], 487 (10) [C₂₇H₁₈N₃O₂CH₂CH₂OCH₂CH₂⁺], 444 (46), 443 (83), 442 (100)[C₂₇H₁₆N₃O₂-CH₂CH₂⁺], 441 (16), 398 (19), 366 (99), 367 (28), 249 (31), 180 (21). Найдено: С, 63.35; Н, 6.67; N, 8.87. С₄₉H₆₂N₆O₁₂. Вычислено: С, 63.48; Н, 6.74; N, 9.07; O, 20.71

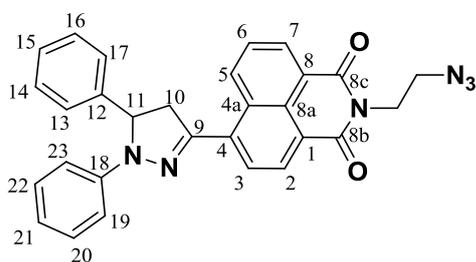
2-(2-хлорэтил)-6-(1,5-дифенил-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (26)



Смесь 0.100 г (0.21 ммоль) исходного гидроксипроизводного **19a** и 2.2 мл POCl₃ выдерживают с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой 2.5 ч при температуре 50°C. По окончании выдержки реакцию

массу выливают на 15 мл льда и экстрагируют продукт хлороформом (3×10 мл),. Объединенные органические экстракты промывают водой до нейтральной реакции промывных вод и оставляют на ночь над осушителем MgSO₄. После удаления осушителя фильтрованием и отгонки хлороформа в вакууме получено 90мг продукта **26**, выход 87%. Т. пл. 59 – 61°С. Спектр ¹H ЯМР (400.13 МГц, ДМСО-*d*₆, 23.1°С, δ/м.д., J/ Гц): 3.35 – 3.48 (м, 1H, CH₂-пиразолин), 3.83 – 3.93 (м, 2H, CH₂Cl), 4.23 (дд, 1H, CH₂-пиразолин, *J*₁ = 16.8, *J*₂ = 12.5), 4.36 – 4.46 (м, 2H, CH₂N), 5.68 (дд, 1H, CH-пиразолин, *J*₁ = 12.5, *J*₂ = 6.1), 6.84 (т, 1H, H(21), *J* = 7.2), 7.16 (д, 2H, H(19), H(23), *J* = 8.0), 7.21 – 7.50 (м, 7H, H(13-15), H(20), H(22)), 7.90 (д, 1H, *J* = 7.8), 8.05 – 8.12 (м, 1H, H(6)), 8.46 (д, 1H, *J* = 7.8, H(2)), 8.60 (д, 1H, H(3), *J* = 8.6, H(7)), 9.93 (д, 1H, H(5), *J* = 8.6). Спектр ¹³C ЯМР (CDCl₃, 150.93 МГц, 25.0°С, δ / м.д.): 38.72 (CH₂N), 41.27 (CH₂Cl), 45.05 (CH₂-пиразолин), 63.59 (CH-пиразолин), 113.91 (C(19), C(23)), 120.51 (C(21)), 121.32 (C(1)), 122.33 (C(8)), 125.87 (C(13), C(17)), 126.21 (C(3)), 127.82 (C(6)), 127.96 (C(15)), 128.81 (C(4a)), 129.08 (C(8a)), 129.19 (C(20), C(22)), 129.41 (C(14), C(16)), 131.20 (C(2)), 131.59 (C(7)), 134.79 (C(5)), 135.34 (C(4)), 141.59 (C(12)), 143.41 (C(18)), 145.20 (C(9)), 163.67 (C(8b)), 164.01 (C(8c)). Масс-спектр, *m/z* (I, %): 481 (27) [M+2]⁺, 480 (23), 479 (45)[M]⁺, 478 (39), 477 (100), 415 (97), 414 (80), 398 (26), 240(38), 180 (67). Найдено: С, 72.50; Н, 4.57; N, 8.68. C₂₉H₂₂ClN₃O₂ Вычислено: С, 72.57; Н, 4.62; N, 8.75.

2-(2-азидоэтил)-6-(1,5-дифенил-4,5-дигидро-1H-пиразолил-3-ил)-1H-бензо[de]изохинолин-1,3(2H)-дион (27)

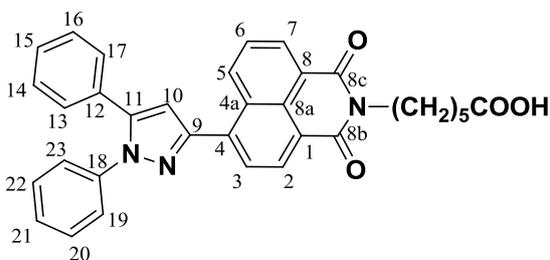


Смесь 0.085 г (0.21 ммоль) хлорпроизводного **26** и 0.068 г (1.05 ммоль) NaN₃ в 3.0 мл ДМФА выдерживают при 100°С 5 часов. По окончании выдержки реакционную массу разбавляют водой и экстрагируют продукт хлороформом (3×10 мл).

Объединенные органические экстракты промывают водой (3×10 мл) и оставляют на ночь над осушителем MgSO₄. После удаления осушителя фильтрованием и отгонки хлороформа в вакууме получено 70 мг продукта **27**, выход 80%. Т. пл. = 70°С с разл. (600.22 МГц, CDCl₃, 18.8°С, δ /м.д., J/ Гц): 3.42 (дд, 1H, CH₂-

пиразолин, $J_1 = 16.6$, $J_2 = 6.8$), 3.63 – 3.75 (м, 2Н, CH_2N_3), 4.13 (дд, 1Н, CH_2 -пиразолин, $J_1 = 16.6$, $J_2 = 12.6$), 4.40 – 4.52 (м, 2Н, CH_2N), 5.45 (дд, 1Н, CH -пиразолин, $J_1 = 12.6$, $J_2 = 6.8$), 6.90 (т, 1Н, Н(21), $J = 7.3$), 7.17 (д, 2Н, Н(19), Н(23), $J = 7.9$), 7.23 – 7.33 (м, 3Н, Н(20), Н(22), Н(15)), 7.33 – 7.46 (м, 4Н, Н(13), Н(17), Н(14), Н(16)), 7.61 (д, 1Н, Н(3), $J = 7.9$), 7.92 – 7.97 (м, 1Н, Н(6)), 8.56 (д, 1Н, Н(2), $J = 7.9$), 8.7 (д, 1Н, Н(7), $J = 8.6$), 10.02 (д, 1Н, Н(5), $J = 8.6$). Спектр ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 150.93 МГц, 18.2°C, δ / м.д.): 38.85 (CH_2N), 45.04 (CH_2 - пиразолин), 48.85 (CH_2N_3), 63.53 (CH -пиразолин), 113.87 (C(19), C(23)), 120.48 (C(21)), 121.31 (C(1)), 122.31 (C(8)), 125.75 (C(13), C(17)), 126.23 (C(3)), 127.97 (C(15)), 127.84 (C(6)), 128.80 (C(4a)), 129.09 (C(8a)), 129.20 (C(20), C(22)), 129.37 (C(14), C(16)), 130.97 (C(2)), 131.55 (C(7)), 134.79 (C(5)), 135.28 (C(4)), 141.57 (C(12)), 144.43 (C(18)), 145.20 (C(9)), 163.86 (C(8b)), 164.35 (C(8c)). Масс-спектр, m/z (I, %): 458 (34) [$\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2^+$], 454 (58), 440 (50), 439 (44), 438 (100), 429 (51) [$\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{CH}_2^+$], 428 (30), 415 (29), 180 (95), 77 (30). Найдено: С, 71.40; Н, 4.47; N, 17.15. $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$. Вычислено: С, 71.59; Н, 4.56; N, 17.27.

6-(6-(1,5-дифенил -1Н-пиразол-3-ил-1,3-диоксо-1Н-бензо[de]изохинолин-2(3Н)-ил)гексановая кислота (28)

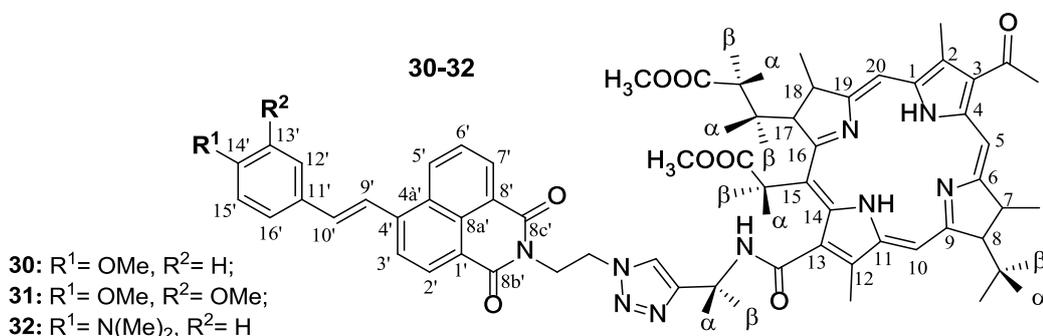


Смесь исходного пиразолинил-производного нафталимида **196** (60 мг, 0.11 ммоль) и бихромата калия (13 мг, 0.05 ммоль) в 3.0 мл ледяной уксусной кислоты кипятят 30 минут с обратным холодильником. Затем реакцию массу выливают в 10 мл ледяной воды и экстрагируют продукт хлористым метиленом (3×10 мл), промывают экстракт дистиллированной водой (2×10 мл) и оставляют над осушителем (Mg_2SO_4). Растворитель отгоняют в вакууме водоструйного насоса и очищают продукт методом колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ - градиентное элюирование от чистого CHCl_3 до 5% MeOH). Продукт получен в виде желтого порошка с выходом 33% (20 мг). Т. пл. 58 – 60°C. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3 , 600.17 МГц, 25.0°C, δ /м.д., J / Гц): 1.47 – 1.55 (м, 2Н, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$), 1.70 – 1.77 (м, 2Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.77 – 1.84 (м 2Н,

CH₂(CH₂)₃COOH), 2.39 (т, 2H, *J* = 6.7, CH₂COOH), 4.18 – 4.24 (м, 2H, CH₂N), 6.94 (с, 1H, СН-пиразол), 7.32-7.46 (м, 10H, Ph), 7.81 (дд, 1H, *J* = 7.3, *J* = 8.7, H(6)), 8.11 (д, 1H, *J* = 7.7, H(3)); 8.64 – 8.68 (м, 2H, H(7), H(2)), 9.28 (д, 1H, *J* = 8.7, H(5)). Спектр ¹³С ЯМР (CDCl₃, 125.76МГц, 25.0°С, δ / м.д.): 24.38 (CH₂CH₂COOH), 26.54 (CH₂(CH₂)₂COOH), 27.71 (CH₂(CH₂)₃COOH), 33.69 (CH₂COOH), 40.15 (CH₂N), 109.01 (СН-пиразол), 122.01 (C(1)), 122.72 (C(8)), 125.29 (2×C(Ph)), 127.14 (C(6)), 127.54 (C(3)), 127.91 (C(Ph)), 128.65 (2×C(Ph)), 128.69 (C(Ph)), 128.81 (2×C(Ph)), 128.94 (C(4)), 129.07 (2×C(Ph)), 129.50 (C(4a)), 130.89 (C(2)), 131.29 (C(7)), 133.49 (C(5)), 137.31 (C(8a)), 139.79 (C(18)), 144.39 (C(12)), 150.40 (C(9)), 164.12 (C(8b)), 164.39 (C(8c)), 178.50 (COOH). Масс-спектр, m/z (I, %): 530 (36), 529 (95) [M]⁺, 512 (23), 470 (48), 430 (22), 429 (77), 415 (100), 414 (46), 398 (24), 180 (55). Найдено: С, 74.82; Н, 5.26; N, 7.86. С₃₃Н₂₇Н₃О₄. Вычислено: С, 74.84; Н, 5.14; N, 7.93.

Конъюгаты бактериохлорина с красителями на основе нафталимида

В описании ЯМР-спектров конъюгатов сигналы, относящиеся к нафталимидному хромофору, отмечены штрихом «'». Для обозначения боковых заместителей бактериохлоринового остатка использованы номера атомов углерода тетрапиррольного кольца, к которым присоединен соответствующий заместитель, и надстрочные индексы «1» и «2», указывающие на первый или второй по счету атом углерода от макроцикла. Сигналам протонов, принадлежащим одной метиленовой группе, но имеющим различные химические сдвиги присвоены надстрочные индексы «α» и «β», не имеющие отношения к расположению протонов в пространстве относительно плоскости макроцикла.



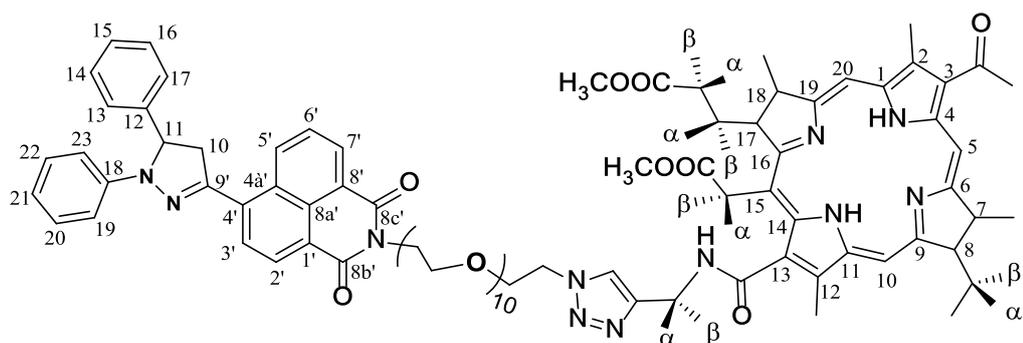
Соединение 30. Т. пл. = 105°C (сразл.). Спектр ^1H ЯМР (500.13 МГц, CD_2Cl_2 , 25°C, δ /м.д., J / Гц): -1.37 (с, 1H, NH-пиррол), -1.34 (с, 1H, NH-пиррол), 1.06 (т, 3H, $\text{H}(8^2)$, $J= 7.3$), 1.61(д, 3H, $\text{H}(18^1)$, $J= 7.2$), 1.64-1.74 (м, 1H, $\text{H}(17^1)$), 1.87 (д, 3H, $\text{H}(7^1)$, $J= 7.2$), 2.00-2.17 (м, 2H, $\text{H}(8^1)$, $\text{H}(17^1)$), 2.17-2.24(м, 1H, $\text{H}(17^2)$), 2.33-2.44 (м, 1H, $\text{H}(8^1)$), 2.50-2.60 (м, 1H, $\text{H}(17^2)$), 3.15 (с, 3H, COCH_3), 3.19 (с, 3H, $\text{CH}_3(12^1)$), 3.56 (с, 3H, $\text{CH}_3(2^1)$), 3.57 (с, 3H, COOCH_3), 3.68 (с, 3H, COOCH_3), 3.88 (с, 3H, $\text{C}(14)\text{OCH}_3$), 3.90 (с, 3H, $\text{C}(13)\text{OCH}_3$), 4.10-4.20 (м, 2H, $\text{H}(8)$, $\text{H}(17)$), 4.21-4.29 (м, 1H, $\text{H}(7)$), 4.29-4.37 (м, 1H, $\text{H}(18)$), 4.52-4.64 (м, 2H, триазол- CH_2CH_2), 4.70-4.78 (м, 2H, триазол- CH_2CH_2), 4.78-4.86 (м, 1H, CH_2NHCO), 4.96-5.04 (м, 1H, CH_2NHCO), 5.06 (д, 1H, $\text{H}(15^1)$, $J= 18.8$), 5.29 (д, 1H, $\text{H}(15^1)$, $J= 18.8$), 6.84 (д, 2H, $\text{H}(15')$, $J= 8.2$), 6.93 – 7.04 (м, 3H, $\text{H}(12')$, $\text{H}(10')$, $\text{H}(16')$), 7.16 (т, 1H, NHCO , $J= 5.4$), 7.42 (д, 1H, $\text{H}(9')$, $J= 16.0$), 7.54-7.65 (м, 2H, $\text{H}(3')$, $\text{H}(6')$), 7.98 (с, 1H, CH-триазол), 8.29 (д, 1H, $\text{H}(2')$, $J= 7.3$), 8.37 (д, 1H, $\text{H}(5')$, $J= 8.3$), 8.41 (д, 1H, $\text{H}(7')$, $J= 7.0$), 8.52 (с, 1H, $\text{H}(10)$), 8.72 (с, 1H, $\text{H}(5)$), 9.28 (с, 1H, $\text{H}(20)$). Спектр ^{13}C ЯМР (125.76 МГц, CD_2Cl_2 , 25°C, δ /м.д., J / Гц): 11.08 ($\text{C}(8^2)$), 12.00 ($\text{C}(12^1)$), 13.99 ($\text{C}(2^1)$), 23.49 ($\text{C}(18^1)$), 23.92 ($\text{C}(7^1)$), 29.83 ($\text{C}(17^1)$), 30.46 ($\text{C}(8^1)$), 31.44 ($\text{C}(17^2)$), 33.54 (CH_3CO), 36.56 (CH_2NHCO), 38.11 ($\text{C}(15^1)$), 40.21 (триазол- CH_2CH_2), 47.20 ($\text{C}(7)$), 48.37 ($\text{C}(18)$), 48.50 (триазол- CH_2CH_2), 51.96 (COOCH_3), 52.69 (COOCH_3), 53.50 ($\text{C}(17)$), 56.38 (OCH_3 -стирил), 56.41 (OCH_3 -стирил), 57.77 ($\text{C}(8)$), 96.83 ($\text{C}(10)$), 98.02 ($\text{C}(5)$), 98.59 ($\text{C}(20)$), 105.19 ($\text{C}(14)$), 109.91 ($12'$), 111.88 ($\text{C}(15')$), 120.65 ($\text{C}(1')$), 121.18 ($\text{C}(9')$), 121.40 ($\text{C}(16')$), 122.81 ($\text{C}(8')$), 123.68 ($\text{C}(3')$), 123.85 (CH-триазол), 126.94 ($\text{C}(6')$), 126.59 ($\text{C}(6')$), 129.08 ($\text{C}(3)$), 129.12 ($\text{C}(8a')$), 129.76 ($\text{C}(11')$), 129.80 ($\text{C}(11)$), 129.93 ($\text{C}(4a')$), 130.77 ($\text{C}(5')$), 131.60 ($\text{C}(2')$), 131.64 ($\text{C}(7')$), 132.27 ($\text{C}(12)$), 132.33 ($\text{C}(2)$), 132.64 ($\text{C}(4)$), 133.91 ($\text{C}(15)$), 134.33 ($\text{C}(13)$), 135.67 ($\text{C}(10')$), 142.36 ($\text{C}(4')$), 144.81 (C^{IV} -триазол), 149.93 ($\text{C}(13')$), 150.78 ($\text{C}(14')$), 163.84 ($\text{C}(8b')$), 164.18 ($\text{C}(19)$), 164.47($\text{C}(8c')$), 165.90 ($\text{C}(9)$), 166.56 ($\text{C}(16)$), 168.75 ($\text{C}(6)$), 169.22(NHCO), 173.89(COOCH_3), 173.94(COOCH_3), 198.76 (CH_3CO).

Соединение 31. Т. пл. = 135°C (с разл.). Спектр ^1H ЯМР (600.13 МГц, CD_2Cl_2 , 23°C, δ /м.д., J / Гц): -1.36 (с, 1H, NH-пиррол), -1.34 (с, 1H, NH-пиррол), 1.06 (т, 3H, $\text{H}(8^2)$, $J= 7.2$), 1.61(д, 3H, $\text{H}(18^1)$, $J= 7.2$), 1.64-1.72 (м, 1H, $\text{H}(17^1)$), 1.87 (д, 3H,

$H(7^1)$, $J=7.3$), 2.01-2.16 (м, 2H, $H(8^1)$, $H(17^1)$), 2.17-2.26 (м, 1H, $H(17^2)$), 2.35-2.42 (м, 1H, $H(8^1)$), 2.52-2.58 (м, 1H, $H(17^2)$), 3.01 (с, 6H, $N(CH_3)_2$), 3.16 (с, 6H, CH_3CO , $CH_3(12^1)$), 3.56 (с, 3H, $CH_3(2^1)$), 3.57 (с, 3H, $COOCH_3$), 3.68 (с, 3H, $COOCH_3$), 4.11-4.19 (м, 2H, $H(8)$, $H(17)$), 4.26 (кв., 1H, $H(7)$, $J=7.3$), 4.29-4.36 (м, 1H, $H(18)$), 4.53-4.67 (м, 2H, триазол- $\underline{CH_2CH_2}$), 4.71-4.80 (м, 2H, триазол- $\underline{CH_2CH_2}$), 4.80-4.84 (м, 1H, $\underline{CH_2NHCO}$), 4.98-5.02 (м, 1H, $\underline{CH_2NHCO}$), 5.06 (д, 1H, $H(15^1)$, $J=19.2$), 5.29 (д, 1H, $H(15^1)$, $J=19.2$), 6.66 (д, 2H, $H(13')$, $H(15')$, $J=8.3$), 7.02 (д, 1H, $H(10')$, $J=15.3$), 7.15-7.17 (м, 1H, $NHCO$), 7.31-7.37 (м, 3H, $H(9')$, $H(12')$, $H(16')$), 7.50-7.60 (м, 1H, $H(6')$), 7.60-7.70 (м, 1H, $H(3')$), 7.98 (с, 1H, CH -триазол), 8.23-8.34 (м, 1H, $H(2')$), 8.38-8.44 (м, 2H, $H(5')$, $H(7')$), 8.52 (с, 1H, $H(10)$), 8.72 (с, 1H, $H(5)$), 9.27 (с, 1H, $H(20)$). Спектр ^{13}C ЯМР (125.76 МГц, CD_2Cl_2 , 25 °С, δ /м.д., J / Гц): 11.08 ($C(8^2)$), 12.41 ($C(12^1)$), 14.00 ($C(2^1)$), 23.49 ($C(18^1)$), 23.89 ($C(7^1)$), 29.85 ($C(17^1)$), 30.43 ($C(8^1)$), 32.11 ($C(17^2)$), 33.54 (CH_3CO), 36.52 ($\underline{CH_2NHCO}$), 38.08 ($C(15^1)$), 40.12 (триазол- $\underline{CH_2CH_2}$), 40.58 ($N(\underline{CH_3})_2$), 47.17 ($C(7)$), 48.38 ($C(18)$), 48.48 (триазол- $\underline{CH_2CH_2}$), 51.95 ($COOCH_3$), 52.68 ($COOCH_3$), 53.55 ($C(17)$), 57.75 ($C(8)$), 96.77 ($C(10)$), 98.03 ($C(5)$), 98.54 ($C(20)$), 105.20 ($C(14)$), 112.46 ($C(13')$, $C(15')$), 117.88 ($C(9')$), 119.72 ($C(1')$), 122.67 ($C(8')$), 122.81 ($C(3')$), 123.86 (CH -триазол), 124.86 ($C(11')$), 126.59 ($C(6')$), 128.84 ($C(3)$), 128.92 ($C(12')$, $C(16')$), 129.01 ($C(8a')$), 129.55 ($C(11)$), 129.83 ($C(4a')$), 130.73 ($C(7')$), 131.49 ($C(5')$), 131.58 ($C(2')$), 132.22 ($C(12)$), 132.33 ($C(2)$), 132.59 ($C(1)$), 133.93 ($C(15)$), 134.34 ($C(13)$), 135.18 ($C(4)$), 136.10 ($C(10')$), 143.02 ($C(4')$), 144.82 ($NHCH_2C$ -триазол), 151.50 ($C(14')$), 163.79 ($C(8b')$), 164.19 ($C(19)$), 164.54 ($C(8c')$), 165.92 ($C(9)$), 166.60 ($C(16)$), 168.69 ($C(6)$), 169.21 ($NHCO$), 173.87 ($COOCH_3$), 173.93 ($COOCH_3$), 198.73 (CH_3CO).

Соединение 32. Т. пл. = 130 °С (с разл.). Спектр 1H ЯМР (600.13 МГц, CD_2Cl_2 , 25 °С, δ /м.д., J / Гц): -1.29 (уш.с., 2H, NH – пиррол), 1.02 – 1.10 (м, 3H, $H(8^2)$), 1.48 (д, 3H, $H(18^1)$, $J=6.9$), 1.52 – 1.78 (м, 1H, $H(17^{1a})$), 1.87 (д, 3H, $H(7^1)$, $J=7.2$), 2.02 – 2.16 (м, 2H, $H(8^{1a})$, $H(17^{1b})$), 2.17 – 2.26 (м, 1H, $H(17^{2a})$), 2.34 – 2.44 (м, 1H, $H(8^{1b})$), 2.50 – 2.58 (м, 1H, $H(17^{2b})$), 2.85 – 2.95 (м, 1H, $H(10^{a'})$), 3.02 – 3.09 (м, 1H, $H(10^{b'})$), 3.18 (с, 6H, CH_3CO , $CH_3(12^1)$), 3.53 – 3.64 (м, 3H, $CH_3(2^1)$), 3.65 (с, 3H, $COOCH_3$), 3.69 (с, 3H, $COOCH_3$), 4.09 – 4.21 (м, 2H, $H(8)$, $H(17)$), 4.21 – 4.36 (м, 1H, $H(7)$, $H(18)$), 4.56

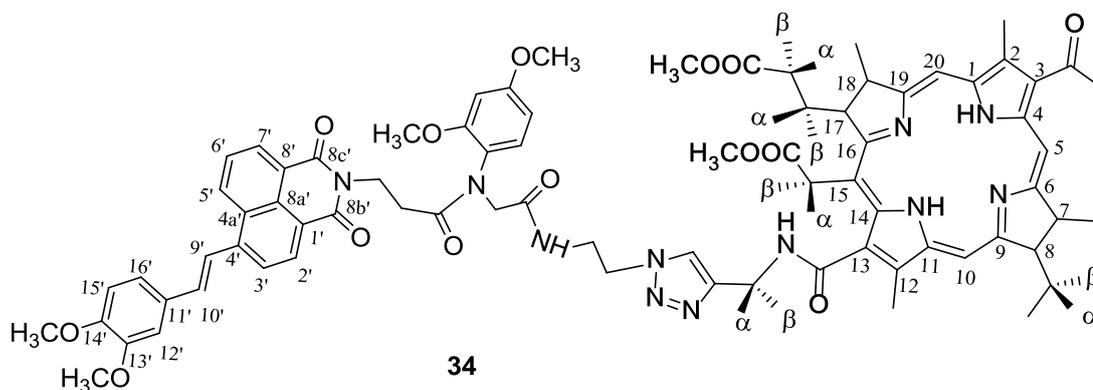
– 4.78 (м, 2H, триазол–CH₂CH₂), 4.79 – 4.90 (м, 3H, триазол – CH₂CH₂, CH₂NHCO), 4.96 – 5.10 (м, 2H, CH₂NHCO, H(15^{2a})), 5.20 – 5.30 (м, 1H, H(15^{2b})), 6.83 (т, 1H, H(21'), *J*= 7.6), 6.94 – 7.06 (м, 2H, H(19'), H(23')), 7.08 (д, 2H, H(20'), H(22'), *J*= 7.6), 7.11 – 7.16 (м, 1H, H(15')), 7.18 – 7.30 (м, 4H, H(14'), H(16'), H(13'), H(17')), 7.73 – 7.81 (м, 1H, H(3')), 7.81 – 7.87(м, 1H, H(6')), 8.03 (с, 1H, CH – триазол), 8.23 – 8.31 (м, 1H, H(2')), 8.49 – 8.61(м, 2H, H(7'), H(10)), 8.75 (с, 1H, H(5)), 9.29 (с, 1H, H(20)), 9.76 – 9.87 (м, 1H, H(5')). Спектр ¹³C ЯМР (150.93 МГц, CD₂Cl₂, 18°C, δ /м.д., *J* / Гц): 10.50, 11.39, 13.46, 23.21, 23.36, 29.07, 30.84, 32.77 (2×C), 35.72, 39.42, 41.93, 47.94, 48.83, 51.34, 52.23, 52.96, 53.41, 56.81, 62.57, 68.58, 70.95, 96.26, 97.18, 98.09, 103.41, 113.76 (2×C), 120.23, 123.55, 124.64, 125.69 (2×C), 127.43, 128.00, 128.44, 128.51, 129.16(2×C), 129.59, 130.75, 131.11, 134.71, 139.22, 140.74, 142.21, 144.18, 169.25, 171.07, 173.42 (2×C), 198.20.



33

Соединение 33. Спектр ¹H ЯМР (600.22 МГц, CD₂Cl₂, 21°C, δ /м.д., *J* / Гц): –1.40 (с, 1H, NH-пиррол), –1.38 (с, 1H, NH-пиррол), 1.04 (т, 3H, H(8²), *J*= 7.3), 1.57 – 1.71 (м, 4H, H(18¹), H(17^{1a})), 1.75 (д, 1H, H(7¹), *J*= 7.3), 1.96 – 2.06 (м, 1H, H(8^{1a})), 2.06 – 2.28 (м, 2H, H(17^{1b}), H(17^{2a})), 2.28 – 2.40 (м, 1H, H(8^{1b})), 2.49 – 2.61 (м, 1H, H(17^{2b})), 3.13 (с, 3H, COCH₃), 3.20 (с, 3H, CH₃(12¹)), 3.42 – 3.76 (м, 50H, CH₃(2¹), CH₂×20 (полигликоль), COOCH₃×2, H(10^{a'})), 3.89 – 3.96 (м, 2H, краситель–CH₂CH₂), 4.05 – 4.19 (м, 2H, H(8), H(17)), 4.21 – 4.37 (м, 3H, H(18), H(7), H(10^{b'}), H(11')), 4.59 – 4.69 (м, 2H, краситель–CH₂CH₂), 4.84 – 4.94 (м, 1H, CH₂NHCO), 4.98 – 5.15 (м, 2H, CH₂NHCO, H(15^{1a})), 5.26 – 5.38 (H(15^{1b})+ CH₂Cl₂), 6.87 (т, 1H, H(21'), *J*= 7.5), 7.01 (д, 2H, H(19'), H(23'), *J*= 8.7), 7.13 – 7.32 (м, 7H, H(15'), H(22'), H(20'), H(17'), H(13'), H(16'), H(14')), 7.44 – 7.55 (м, 1H, H(3')), 7.55 – 7.63 (м, 1H, NHCO), 7.73 – 7.80 (м,

1H, H(6')), 8.08 (с, 1H, СН-триазол), 8.26 – 8.32 (м, 1H, H(2')), 8.44 – 8.52 (м, 2H, H(10), H(7')), 8.73 (с, 1H, H(5)), 9.24 (с, 1H, H(20)), 9.73 (д, 1H, (5'), $J = 7.9$). Спектр ^{13}C ЯМР (150.93 МГц, CD_2Cl_2 , 18°C, δ /м.д., J / Гц): 11.08 (C(8²)), 11.98 (C(12¹)), 14.02 (C(2¹)), 23.48 (C(18¹)), 23.93 (C(7¹)), 29.80 (C(8¹)), 30.43 (C(17¹)), 31.42 (C(17²)), 33.53 (C(Н₃CO)), 36.51 (C(Н₂NHCO)), 38.83 (C(15¹)), 45.03 (C(10')), 46.52 (C(7)), 48.41 (C(18)), 50.83 (краситель-СН₂СН₂O), 52.01 (COOСН₃), 52.72 (COOСН₃), 53.33 (C(17)), 57.65 (C(8)), 63.50 (C(11')), 68.87 – 70.61 (20×C(полигликоль), краситель-СН₂СН₂O), 95.95 (C(10)), 97.53 (C(5)), 98.08 (C(20)), 104.47 (C(14)), 114.29 (C(19'), C(23'), C(15')), 120.77 (21'), 121.64 (C(1')), 123.44 (СН-триазол), 126.28 (C(13'), C(17')), 127.48 (C(3')), 128.08 (C(6')), 128.22 (C(2)), 128.49 (C(4a') или C(8')), 128.75 (C(4a') или C(8')), 129.61 (C(20'), C(22')), 129.70 (C(14'), C(16')), 131.68 (C(11) или C(12)), 131.73 (C(3)), 131.87 (C(11) или C(12)), 132.00 (C(4)), 132.24 (C(2')), 133.09 (C(15), C(13)), 133.87 (C(7')), 134.11 (C(1)), 134.43 (C(8a')), 134.66 (C(5')), 142.31 (C(4')), 141.80 (C(12')), 143.29 (C(18')), 144.28 (C(9')), 145.62 (C^{IV}-триазол), 163.27 (C(19) или C(8c')), 163.25 (C(19) или C(8c')), 164.78 (C(8b')), 165.34 (C(9)), 168.20 (C(6)), 166.24 (C(16)), 169.23 (NHCO), 173/96 (COOСН₃×2), 198.55 (COСН₃)).



Соединение 34. Т. пл. = 100°C (с разл.). Спектр ^1H ЯМР (600.13 МГц, CD_2Cl_2 , 18°C, δ /м.д., J / Гц): -1.70 (с, 1H, NH-пиррол), -1.57 (с, 1H, NH-пиррол), 1.01 (т, 3H, H(8²), $J = 7.3$), 1.45 – 1.64 (м, 4H, NI-СН₂СН₂, СН₂(17¹)), 1.69 (д, 3H, H(18¹), $J = 7.3$), 1.84 – 1.99 (м, 4H, H(8^{1a}), H(7¹)), 2.18 – 2.38 (м, 4H, H(8^{1b}), NI-СН₂СН₂, H(17^{2a})), 2.53 – 2.62 (м, 1H, H(17^{2b})), 3.06 (с, 3H, COСН₃), 3.13 (с, 3H, СН₃(12¹)), 3.42 (с, 3H, СН₃(2¹)), 3.60 (с, 3H, COOСН₃), 3.66 (с, 3H, ОСН₃), 3.69 (с, 3H, ОСН₃), 3.78 (с,

3H, COOCH₃), 3.52 – 3.84 (м, 4H, CH₂CONH, триазол-CH₂CH₂), 3.93 (с, 3H, OCH₃-стирил), 3.94 (с, 3H, OCH₃-стирил), 4.14 – 4.32 (H(8), H(17), H(7), H(18)), 4.50 (т, 2H, триазол-CH₂CH₂), 4.92 (дд, 1H, триазол-CH₂^aNHCO, $J_1= 14.7, J_2= 5.4$), 5.01 – 5.18 (м, 2H, H(15^{1a}), триазол-CH₂^bNHCO, H(15^{1a})), 5.40 – 5.49 (м, 1H, H(15^{1b})), 6.22 – 6.37 (м, 3H, H(21'), H(10')), H(19')), 6.36 – 6.52 (м, 2H, H(22')), H(3')), 6.70 (с, 1H, H(12')), 6.75 (д, 1H, H(16'), $J= 8.2$), 6.78 – 6.86 (м, 2H, H(9'), NHCO)), 6.89 (д, 1H, H(15'), $J= 8.2$), 7.08 – 7.14 (м, 1H, H(6')), 7.55 (д, 1H, H(5'), $J= 7.6$), 7.58 (д, 1H, H(2'), $J= 7.1$), 7.98 (с, 1H, CH-триазол), 8.04 (д, 1H, H(7'), $J= 7.0$), 8.21 (с, 1H, H(10)), 8.33 (т, 1H, NHCO, $J= 5.0$), 8.66 (с, 1H, H(5)), 9.27 (с, 1H, H(20)). Спектр ¹³C ЯМР (150.93 МГц, CD₂Cl₂, 19°C, δ /м.д., J / Гц): 11.09 (C(8²)), 11.98 (C(12¹)), 14.01 (C(2¹)), 23.54 (C(18¹)), 23.85 (C(7¹)), 24.98 (NI-CH₂), 29.76 (C(17¹)), 30.18 (C(8¹)), 31.45 (C(17²)), 32.46 (NI-CH₂CH₂), 33.46 (CH₃CO), 36.65 (CH₂NHCO), 37.82 (C(15¹)), 39.71 (CHCONH), 46.96 (C(7)), 47.42 (триазол-CH₂CH₂), 48.61 (C(18)), 50.08 (триазол-CH₂CH₂), 52.01 (COOCH₃), 52.73 (COOCH₃), 53.66 (C(17)), 55.75 (OCH₃-стирил), 55.80 (OCH₃-стирил), 56.34 (OCH₃), 56.38 (OCH₃), 57.54 (C(8)), 96.09 (C(10)), 98.07 (C(5)), 98.47 (C(21'), C(19')), 98.92 (C(20)), 104.37 (C(22')), 105.14 (C(14)), 109.57 (12'), 111.71 (C(15')), 116.61 (C(17')), 120.12 (C(1')), 121.07 (C(16')), 122.46 (C(3')), C(8')), 124.55 (CH-триазол), 126.24 (C(6')), 128.00 (C(4a'), C(1)), 128.29 (C(8a')), 128.54 (C(2)), 129.41 (C(7')), 129.62 (C(11')), 129.99 (C(9')), 130.24 (C(13), C(15)), 130.37 (C(2')), 130.65 (C(5')), 132.03 (C(3)), 132.43 (C(12)), 133.87 (C(4)), 134.03 (C(11)), 134.26 (C(10')), 140.55 (C(4')), 145.06 (NHCH₂C-триазол), 149.68 (C(13')), 150.52 (C(14')), 158.98 (C(20')), 161.38 (C(18')), 163.22 (C(19)), 164.13 (C(8c')), 164.24 (C(8b')), 165.91 (C(9)), 166.81 (C(16)), 168.25 (C(6)), 169.49 (NHCO), 170.04 (NHCO), 174.02 (2*COOCH₃), 174.67 (NIC₂H₂CH₂CONH), 198.42 (COCH₃).

4.2. Расчет квантовых выходов флуоресценции

Квантовые выходы флуоресценции определялись в насыщенных растворах при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ по отношению к стандарту – кумарину 481 в ацетонитриле ($\varphi^{\text{fluor}} = 0.08$) [202]. Для расчета квантовых выходов использовалась следующая формула [179]:

$$\varphi^{\text{fluor}} = \varphi_{\text{R}}^{\text{fluor}} \cdot \frac{S \cdot (1 - 10^{-A_{\text{R}}}) \cdot n^2}{S_{\text{R}} \cdot (1 - 10^{-A}) \cdot n_{\text{R}}^2}$$

где φ^{fluor} и $\varphi_{\text{R}}^{\text{fluor}}$ – 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.

4.3. Расчет квантовых выходов синглетного кислорода

Для определения квантового выхода синглетного кислорода методом химической ловушки [184] были использованы свежеприготовленные растворы тетрафенилпорфирина (TRP), дифенилизобензофурана (DPIBF), бактериохлорина и конъюгатов в ацетоне. Облучение смеси исследуемого соединений и ловушки (DPIBF) проводили в кварцевой кювете ($l = 1\text{ см}$) в спектрофлуориметре Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Japan) с использованием ксеноновой лампы в качестве источника света. Образцы облучались светом с длиной волны 510 нм, оптическую плотность ловушки детектировали по спектрам поглощения раствора, полученным на спектрофотометре Varian Cary 5G на длине волны 410 нм.

Квантовый выход синглетного кислорода исследованных образцов определяли по следующей формуле [203]:

$$\Phi = \Phi_{\text{стФС}} \cdot \frac{V_{(\text{иссФС})}}{V_{(\text{стФС})}} \cdot \frac{1 - 10^{-A_{\text{стФС}}}}{1 - 10^{-A_{\text{иссФС}}}}, \text{ где:}$$

$A_{\text{ст ФС}}$ – оптическая плотность, приходящаяся на фотосенсибилизатор-стандарт (TRP) на длине волны возбуждения.

$A_{\text{иссФС}}$ – оптическая плотность, приходящаяся на исследуемый фотосенсибилизатор на длине волны возбуждения.

$V_{(\text{иссФС})} / V_{(\text{стФС})}$ – тангенс угла наклона линейного участка графика зависимости оптической плотности ловушки (DPIBF) от времени засветки.

$\Phi_{\text{стФС}}$ – квантовый выход синглетного кислорода фотосенсибилизатора-стандарта в использованном для проведения эксперимента растворителе. По литературным данным [204] для тетрафенилпорфирина в ацетоне значение $\Phi_{\text{стФС}}$ составляет 0.68 ± 0.03 .

5. ВЫВОДЫ

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

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

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

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

5. Показано, что конъюгация нафталимидных красителей с фотосенсибилизатором не снижает фотодинамической эффективности последнего: (бис)хромофорные системы сохраняют способность проникать в клетки, демонстрируют низкую темновую токсичность и высокую фотодинамическую эффективность в клеточных испытаниях и опытах *in vivo*.

6. ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица III - Основные кристаллографические данные и параметры уточнения структуры **9a**.

	9a
Брутто формула	$C_{23}H_{21}NO_5 \cdot H_2O$
Молекулярная масса	391.41
T, K	120.15
Кристаллическая система	орторомбическая
Пространственная группа	<i>Pbca</i> , Z=8
a, Å	7.56360(10)
b, Å	15.6863(2)
c, Å	31.5600(5)
α , °	90
β , °	90
γ , °	90
V, Å ³	3744.43(9)
$d_{\text{выч}}$, г·см ⁻³	1.389
μ , см ⁻¹	0.806
F(000)	1648.0
2 θ_{max} , °	5.6 to 132.638
Число измеренных отражений	29522
Число независимых отражений (R_{int})	3277 [$R_{\text{int}} = 0.0231$, $R_{\text{sigma}} = 0.0114$]
Количество уточняемых параметров	263
R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0398, wR2 = 0.1112
R indexes [all data]	R1 = 0.0420, wR2 = 0.1132
GOF	1.059
Остаточная электронная плотность, e·Å ⁻³ ($d_{\text{min}}/d_{\text{max}}$)	0.34/-0.27

Таблица П2 – Торсионные углы в структуре 9a (нумерация атомов представлена на рисунке 1)

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
O1	C1	C2	N1	-176.78 (13)	C8	C4	C5	C6	179.77 (14)
O2	C3	C4	C5	179.17 (15)	C8	C4	C5	C11	-0.4 (2)
O2	C3	C4	C8	-0.8 (2)	C8	C9	C10	C11	-0.8 (3)
O4	C20	C21	C22	-179.23 (15)	C8	C9	C10	C15	179.46 (16)
N1	C3	C4	C5	-0.7 (2)	C9	C10	C11	C5	-0.5 (2)
N1	C3	C4	C8	179.38 (14)	C9	C10	C11	C12	178.85 (15)
C2	N1	C3	O2	0.3 (2)	C9	C10	C15	C16	-8.4 (3)
C2	N1	C3	C4	-179.90 (13)	C10	C11	C12	C13	-179.73 (14)
C2	N1	C7	O3	-1.6 (2)	C10	C15	C16	C17	179.13 (15)
C2	N1	C7	C6	178.51 (13)	C11	C5	C6	C7	178.95 (13)
C3	N1	C2	C1	-89.03 (16)	C11	C5	C6	C14	-1.1 (2)
C3	N1	C7	O3	175.32 (14)	C11	C10	C15	C16	171.85 (15)
C3	N1	C7	C6	-4.6 (2)	C11	C12	C13	C14	-1.2 (2)
C3	C4	C5	C6	-0.2 (2)	C12	C13	C14	C6	1.7 (2)
C3	C4	C5	C11	179.63 (13)	C14	C6	C7	O3	3.6 (2)
C3	C4	C8	C9	179.11 (15)	C14	C6	C7	N1	-176.45 (14)
C4	C5	C6	C7	-1.2 (2)	C15	C10	C11	C5	179.28 (14)
C4	C5	C6	C14	178.73 (14)	C15	C10	C11	C12	-1.4 (2)
C4	C5	C11	C10	1.1 (2)	C15	C16	C17	C18	-172.91 (16)
C4	C5	C11	C12	-178.31 (13)	C15	C16	C17	C22	7.2 (3)
C4	C8	C9	C10	1.5 (3)	C16	C17	C18	C19	-179.85 (15)
C5	C4	C8	C9	-0.9 (3)	C16	C17	C22	C21	179.44 (15)
C5	C6	C7	O3	-176.42 (14)	C17	C18	C19	C20	0.6 (2)
C5	C6	C7	N1	3.5 (2)	C18	C17	C22	C21	-0.4 (2)
C5	C6	C14	C13	-0.5 (2)	C18	C19	C20	O4	178.81 (15)
C5	C11	C12	C13	-0.4 (2)	C18	C19	C20	C21	-0.7 (2)
C6	C5	C11	C10	-179.10 (13)	C19	C20	C21	C22	0.3 (2)
C6	C5	C11	C12	1.5 (2)	C20	C21	C22	C17	0.2 (3)
C7	N1	C2	C1	88.06 (16)	C22	C17	C18	C19	0.0 (2)
C7	N1	C3	O2	-176.63 (15)	C23	O4	C20	C19	-9.0 (2)
C7	N1	C3	C4	3.2 (2)	C23	O4	C20	C21	170.55 (15)
C7	C6	C14	C13	179.44 (14)					

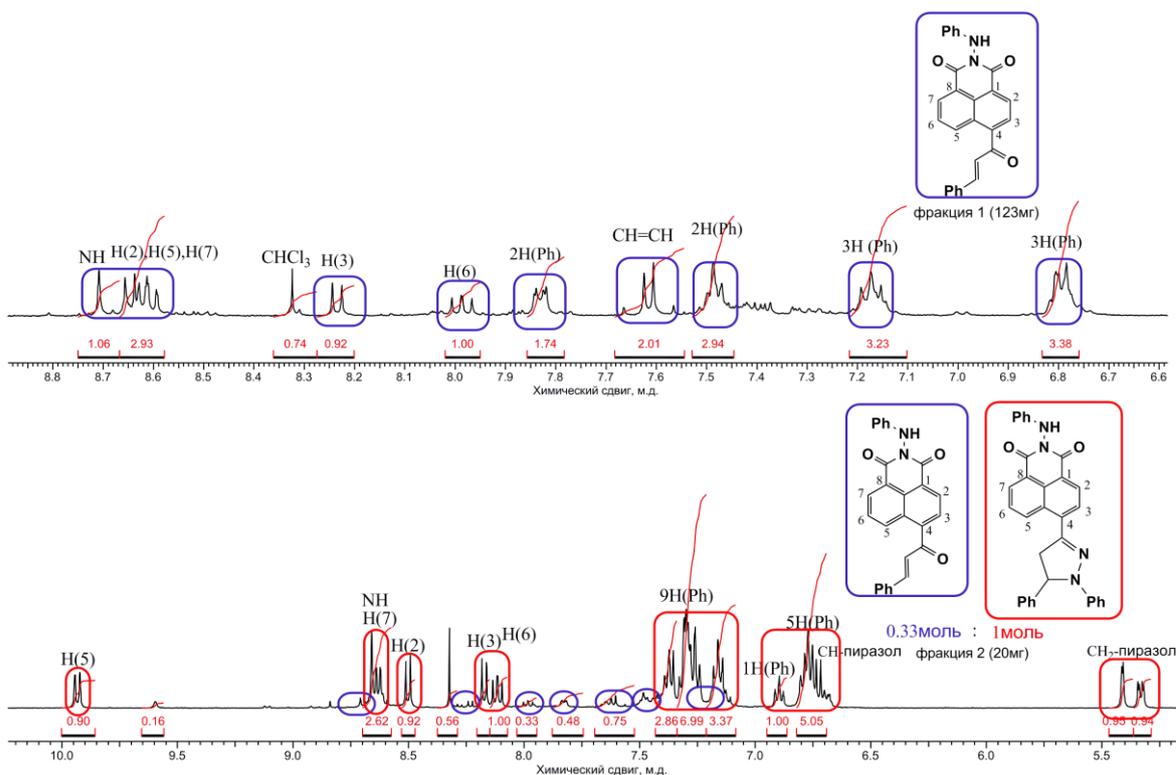


Рисунок П1 – Ароматическая область спектров ^1H ЯМР фракций, полученных при разделении смеси, полученной после реакции соединения **20** с двукратным избытком фенилгидразина. Растворитель – $\text{dms}\text{-}d_6$.

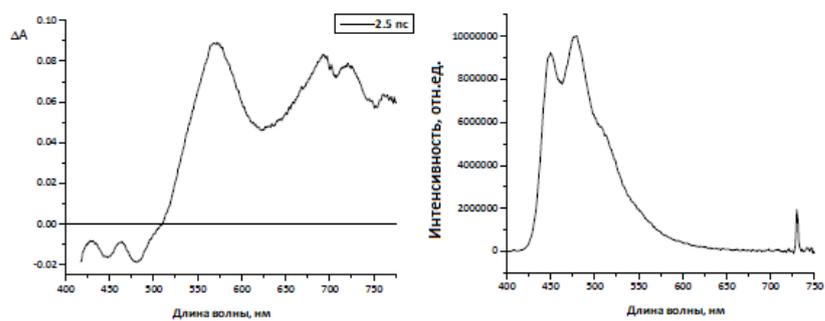


Рисунок П2 - Спектр поглощения возбужденного состояния при временной задержке 2.5 пс (слева) и стационарный спектр флуоресценции (справа) **8a** в циклогексане.

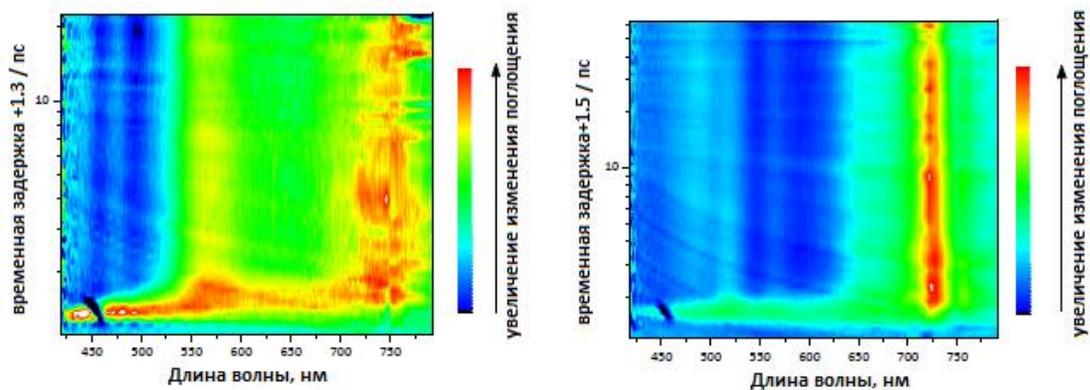


Рисунок ПЗ – Спектрально-временные карты поглощения возбужденных состояний **8б** (слева) и **8в** (справа) в циклогексане.

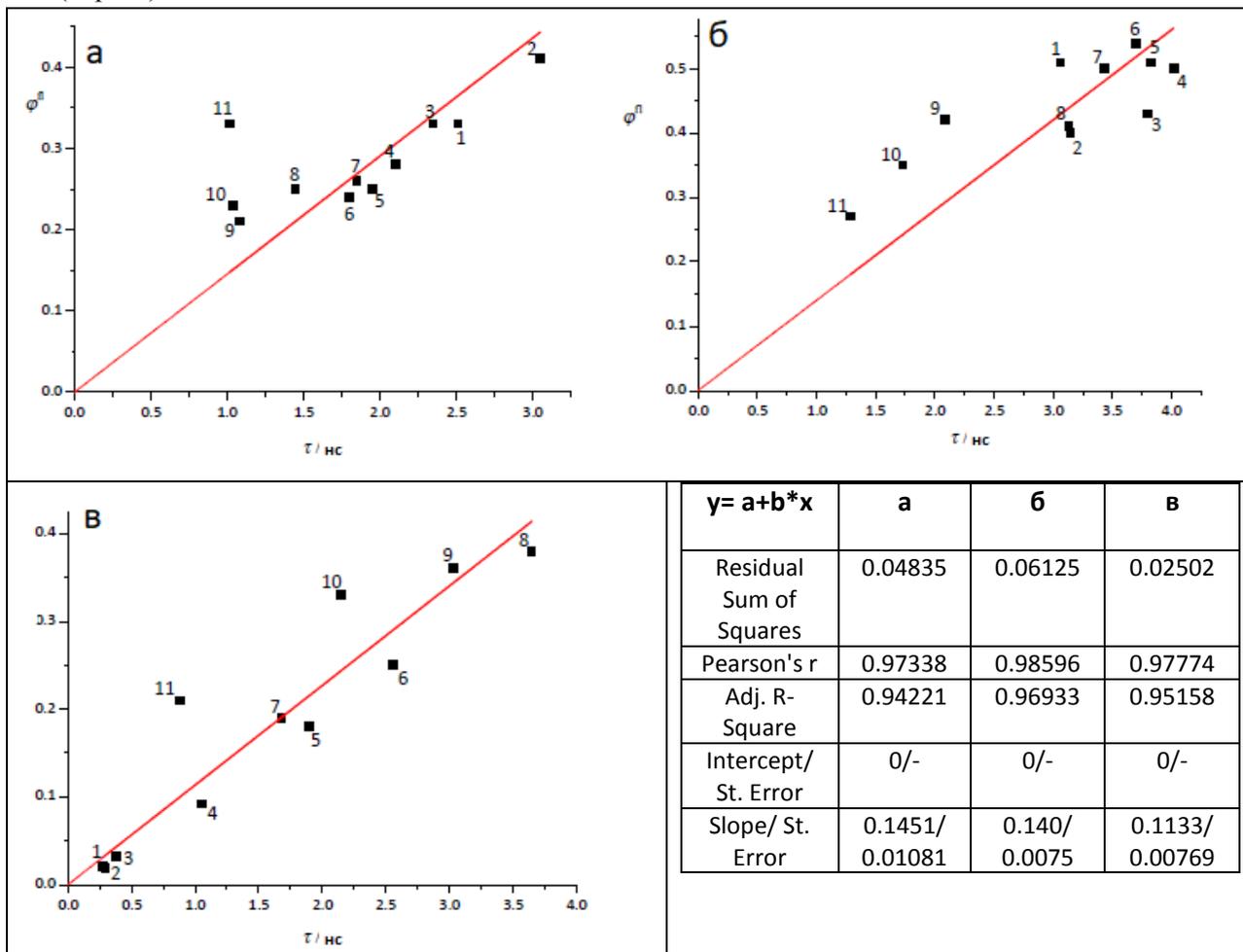


Рисунок П4–Графики зависимости квантовых выходов флуоресценции от времени жизни возбужденного состояния **8а-в**. Нумерация растворителей соответствует таблице 2. Прямые линии соответствуют линейризации методом наименьших квадратов, параметры, полученные из расчета, приведены в таблице.

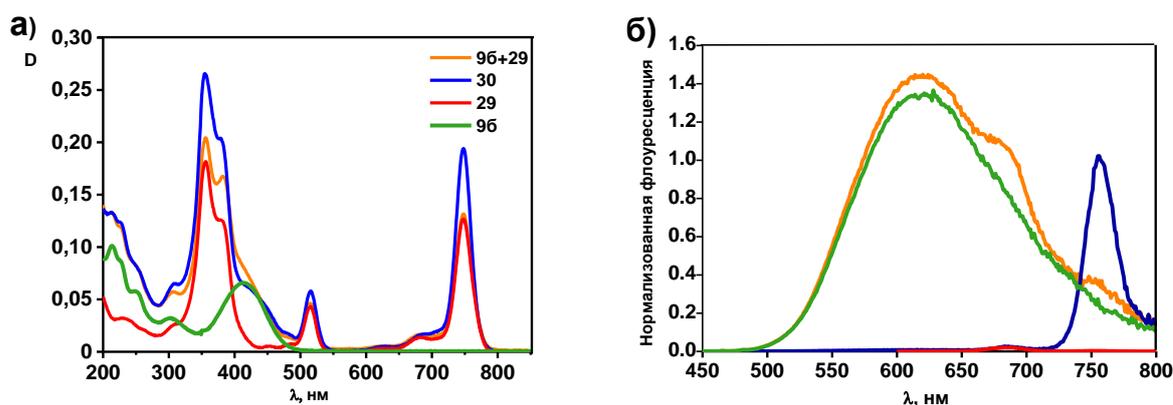


Рисунок П5 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции(б) **96**, **29**, **30** и эквимольной смеси **96** и **29**. Растворитель-ацетонитрил, концентрация всех соединений $2.6 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** - 420 нм, для **29** - 515 нм.

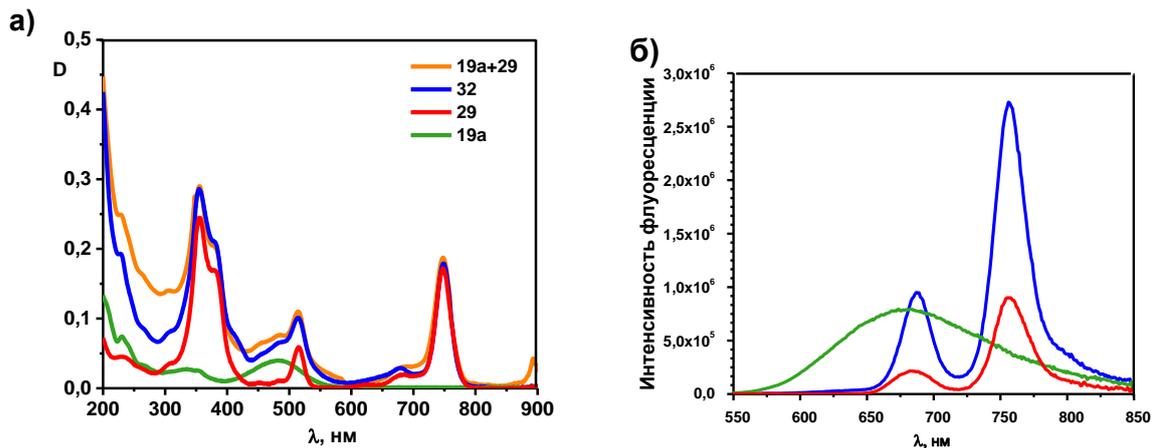


Рисунок П6 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции(б) **19а**, **29**, **32** и эквимольярной смеси **19а** и **29**. Растворитель-ацетонитрил, концентрация всех соединений $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** - 490 нм, для **29** - 515 нм.

а

б

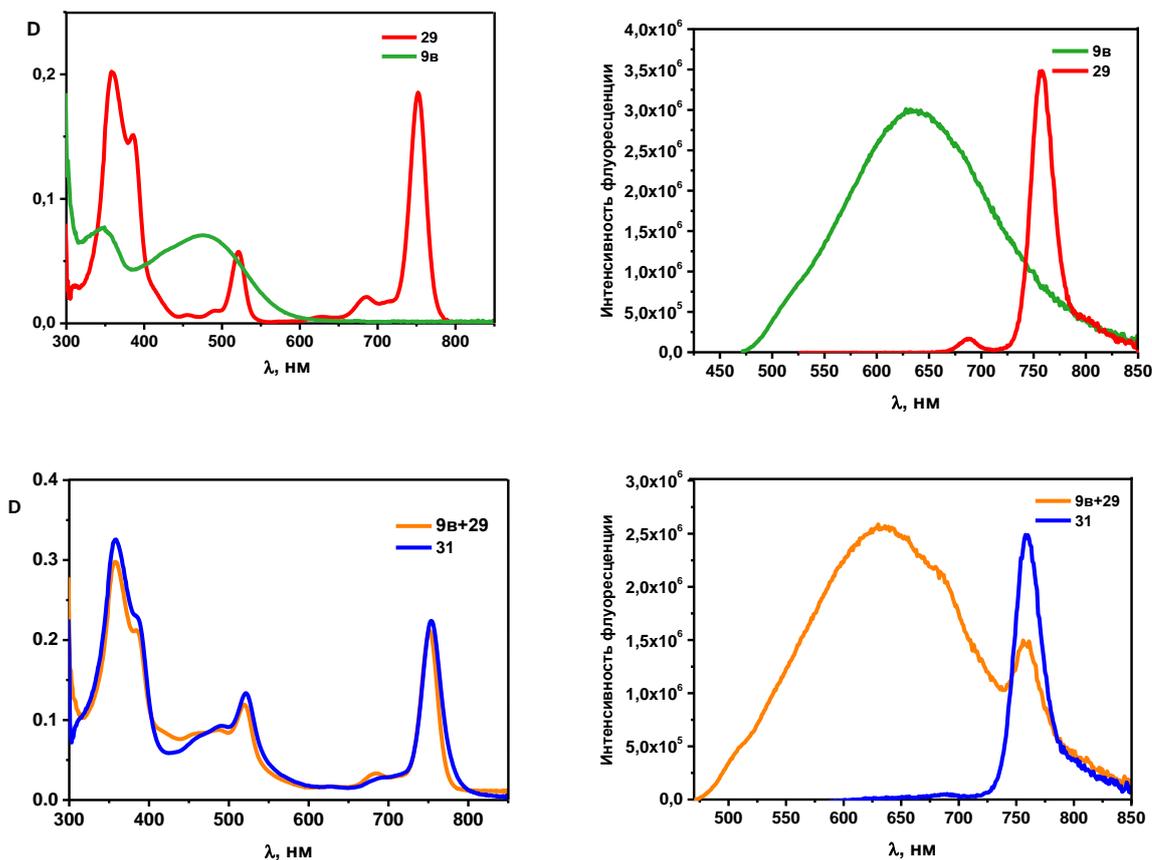


Рисунок П7 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **9в**, **29**, **31** и эквимольярной смеси **9в** и **29** в 10%-м водном растворе БСА. Концентрация всех соединений $4.7 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** - 460 нм, для **29** - 515 нм.

а

б

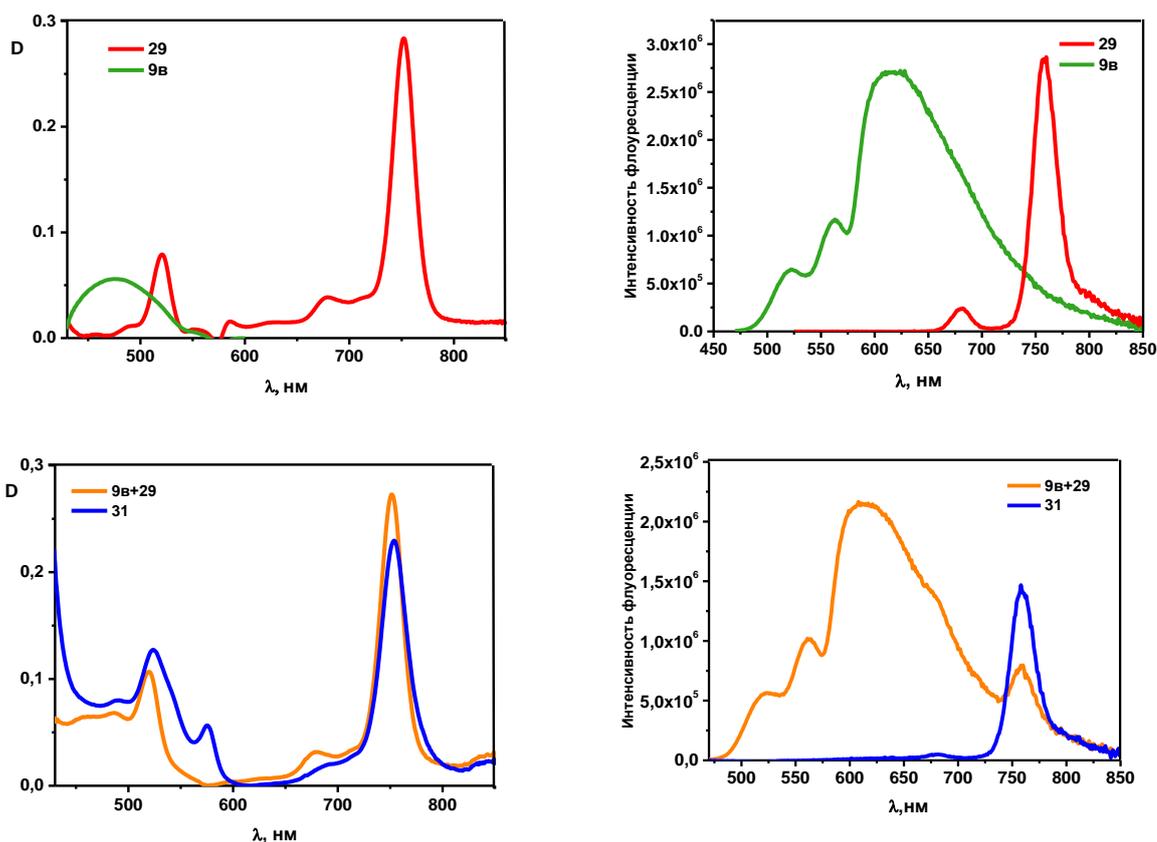


Рисунок П8 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **9в**, **29**, **31** и эквимольарной смеси **9в** и **29** в сыворотке крови кролика. Концентрация всех соединений $4.7 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** - 460 нм, для **29** - 515 нм.

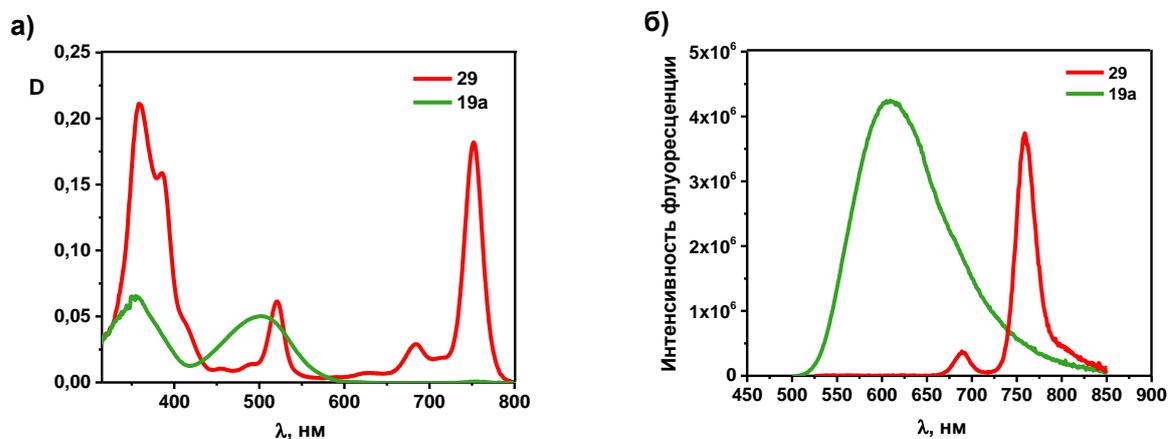


Рисунок П9 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **19а** и **29** в в 10%-м водном растворе БСА. Длина волны возбуждения для **19а** - 470 нм, для **29** - 515 нм.

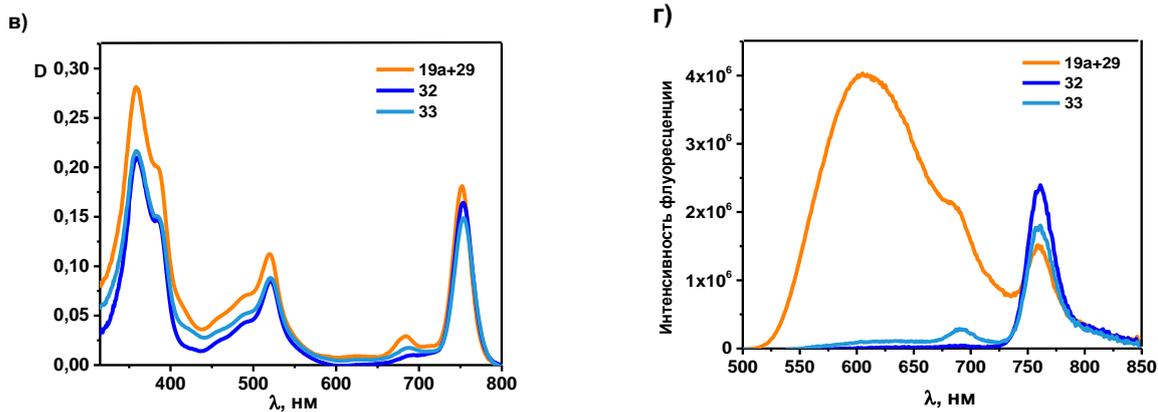


Рисунок П10 - Спектры поглощения (в) и флуоресценции (г) эквимольной смеси **19а** и **29**, а также конъюгатов **32** и **33** в 10%-м водном растворе БСА. Длина волны возбуждения 490 нм.

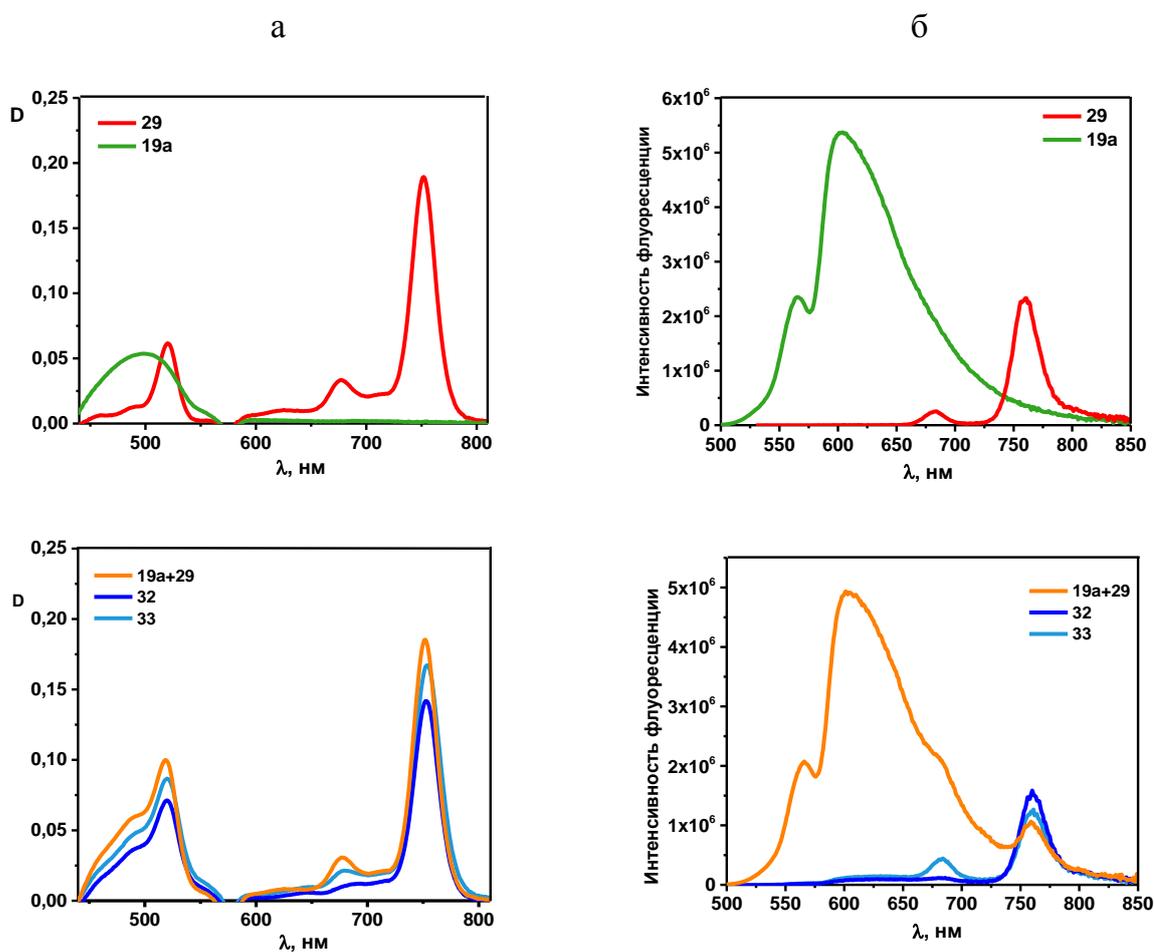


Рисунок П11 - Спектры поглощения (а,в) и флуоресценции (б,г) **19а**, **29**, **32**, **33** и эквимольной смеси **19а** и **29** в сыворотке крови кролика. Длина волны возбуждения для всех соединений кроме **29** - 490 нм, для **29** - 515 нм.

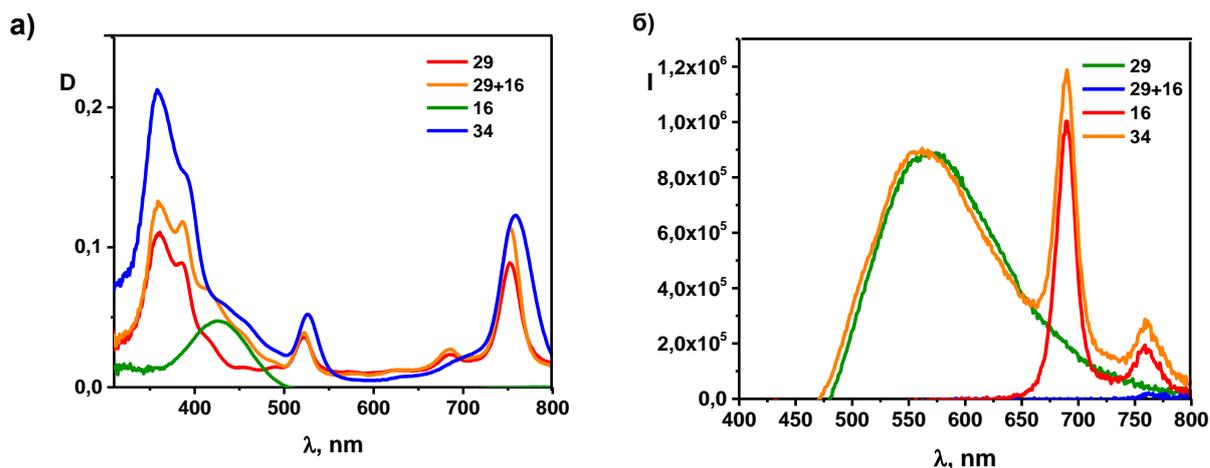


Рисунок П12 - Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) **16** и **29**, **34** и эквимольной смеси(**16+29**) в в 10%-м водном растворе БСА, концентрация соединений $2.6 \cdot 10^{-6}$ М Длина волны возбуждения 420 нм.

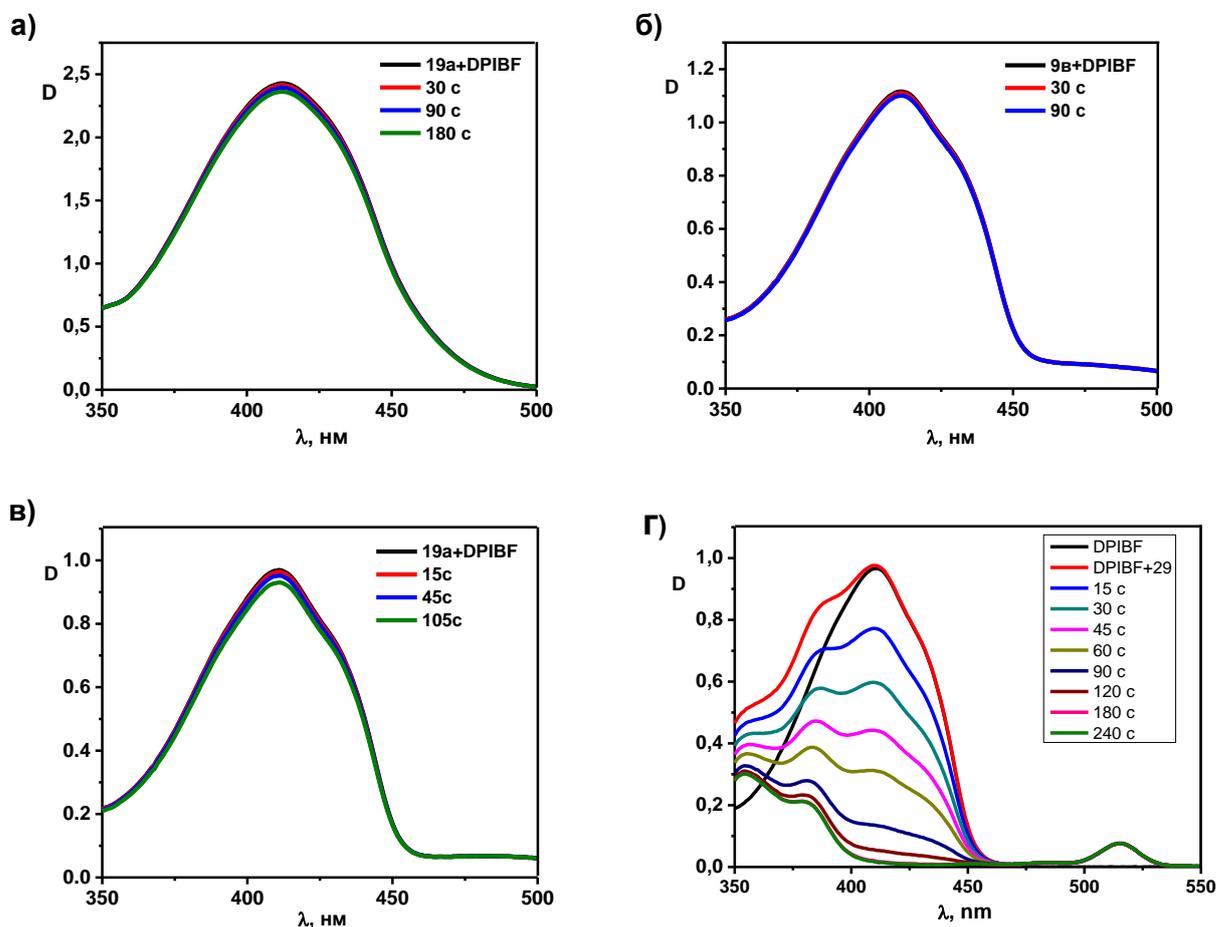


Рисунок П13 - Изменения в спектрах поглощения смесей соединений **9б**, **9в**, **19а**, **29** и ловушки синглетного кислорода DPIBF ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в ацетоне после облучения светом с длиной волны 510 нм.

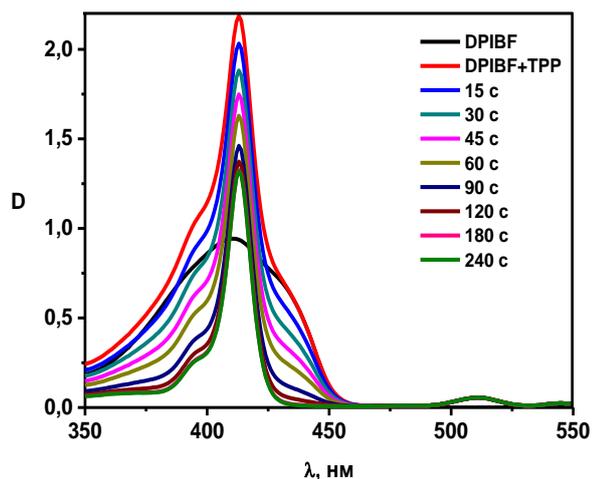


Рисунок П14 - Изменения в спектрах поглощения смесей тетрафенилпорфирина (TPP) и ловушки синглетного кислорода DPIBF ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в ацетоне после облучения светом с длиной волны 510 нм.

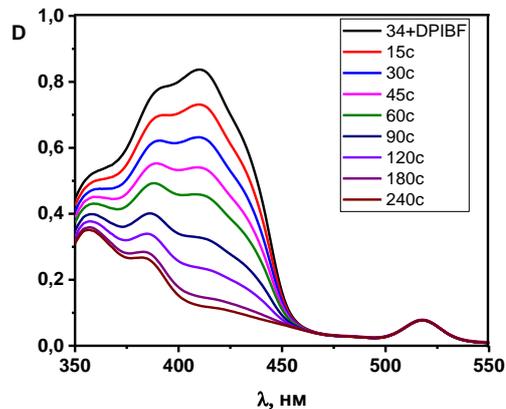
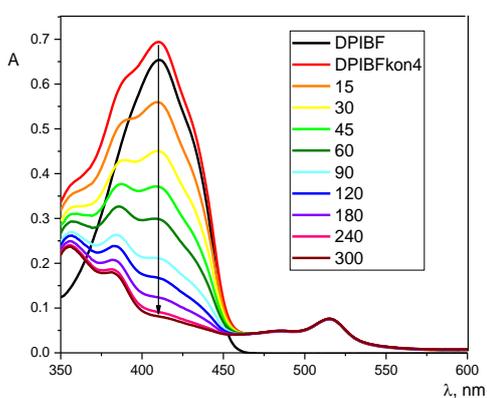


Рисунок П15 - Изменения в спектрах поглощения смесей соединений **33**, **34** и ловушки синглетного кислорода DPIBF ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в ацетоне после облучения светом с длиной волны 510 нм.

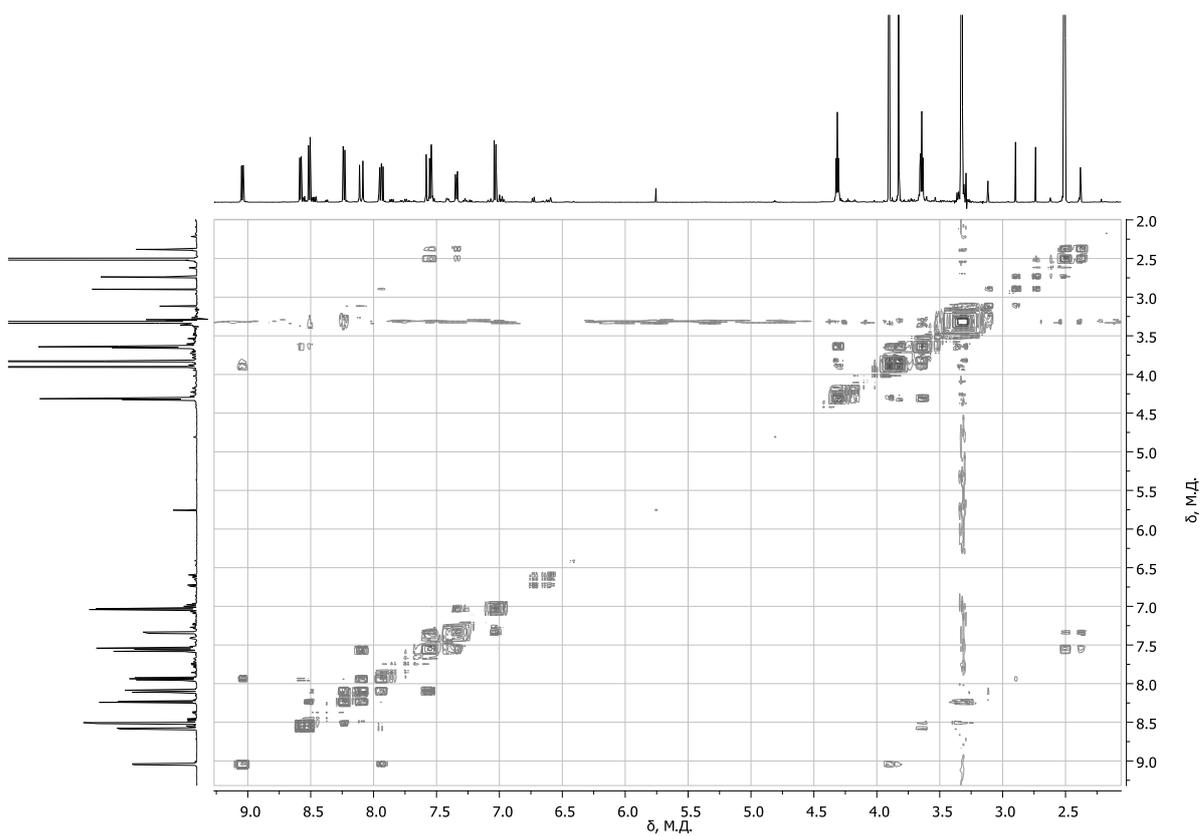


Рисунок П16 – Спектр ¹H-COSY соединения **116** в ДМСО-*d*₆

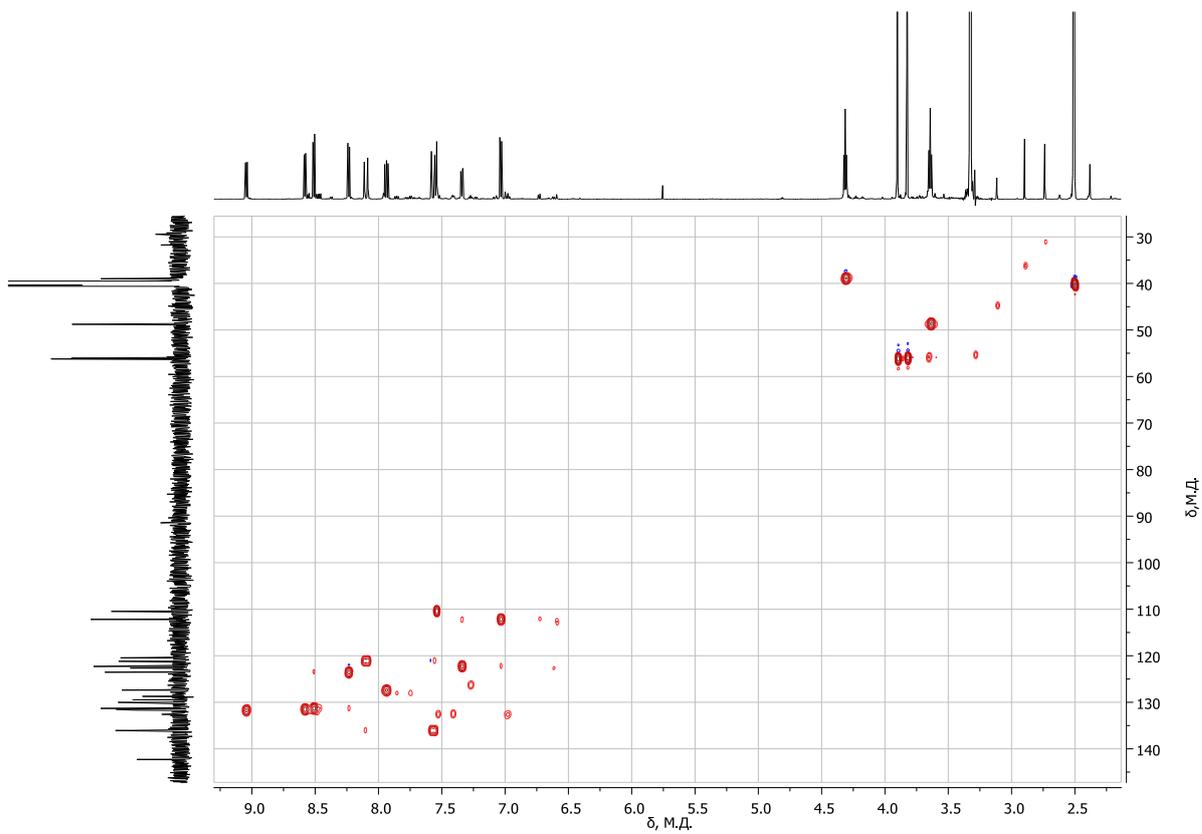


Рисунок П17 – Спектр HSQC соединения **116** в ДМСО-*d*₆

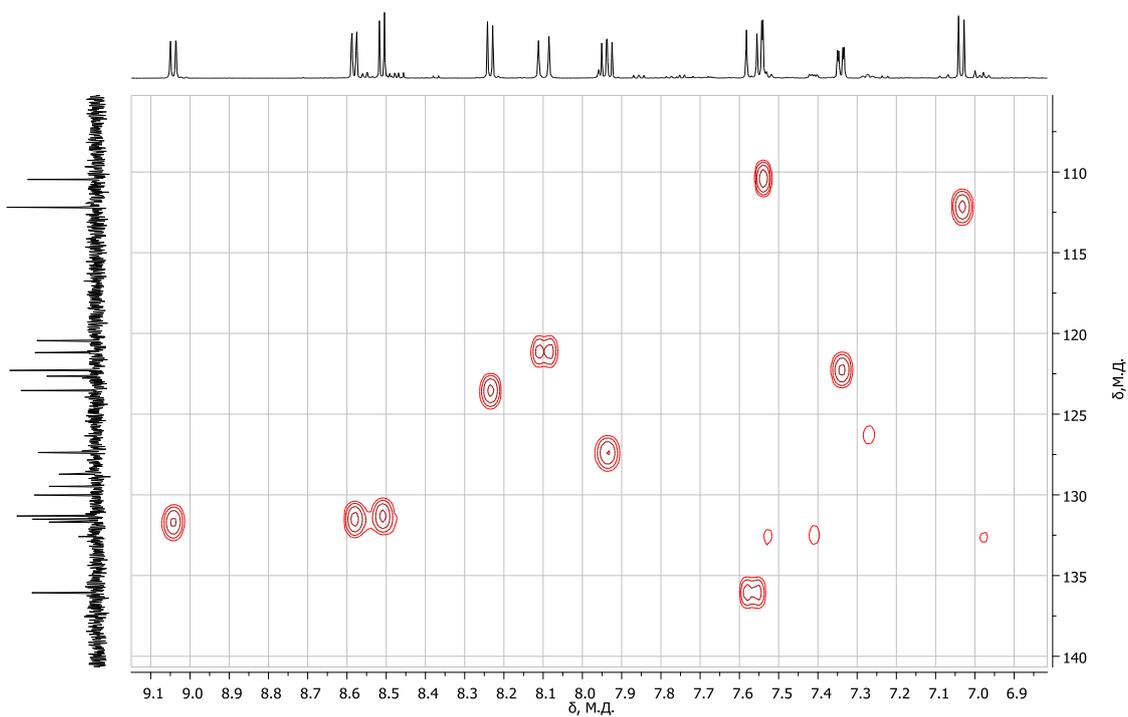


Рисунок П18 – Область ароматических протонов спектра HSQC соединения **116** в ДМСО- d_6

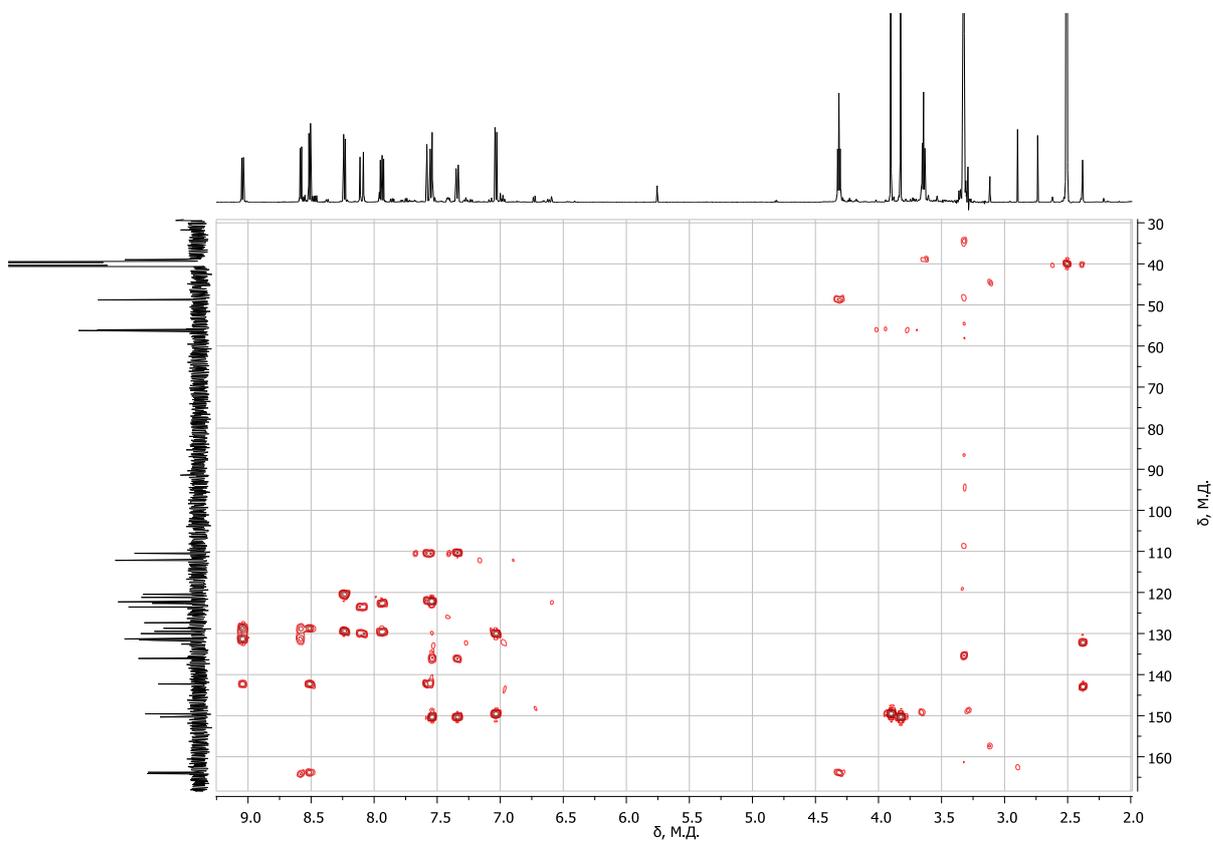


Рисунок П19 – Спектр HMBC соединения **116** в ДМСО- d_6

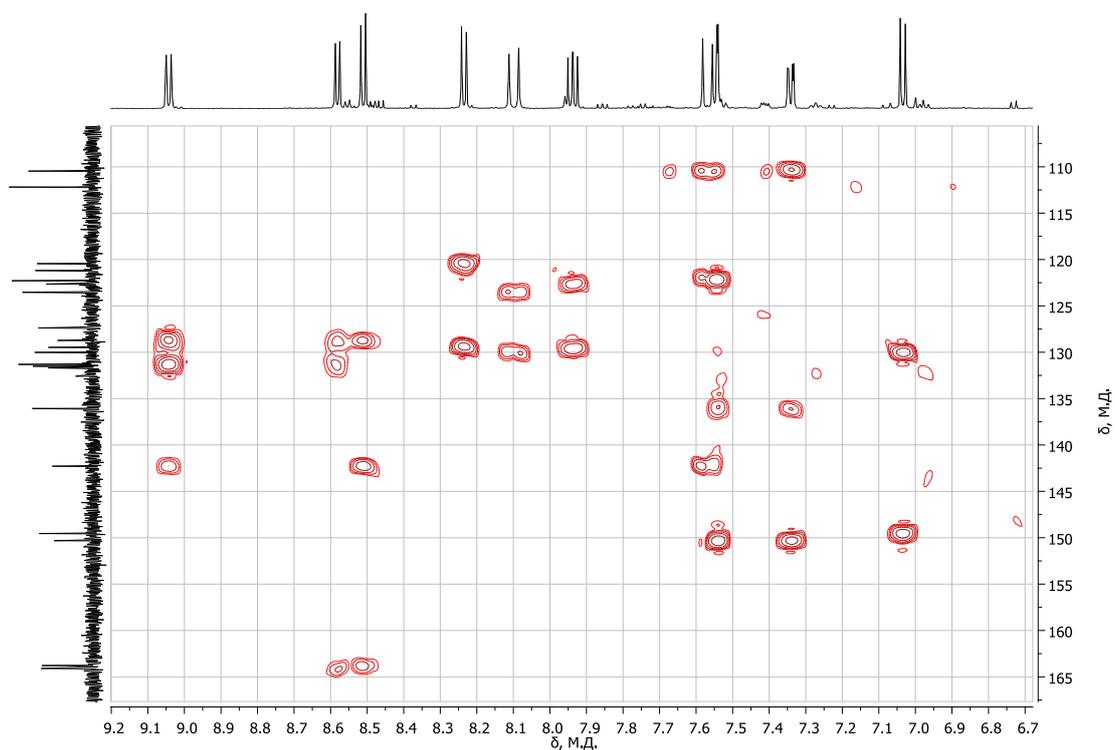


Рисунок П20 – Область ароматических протонов спектра НМВС соединения **116** в ДМСО- d_6

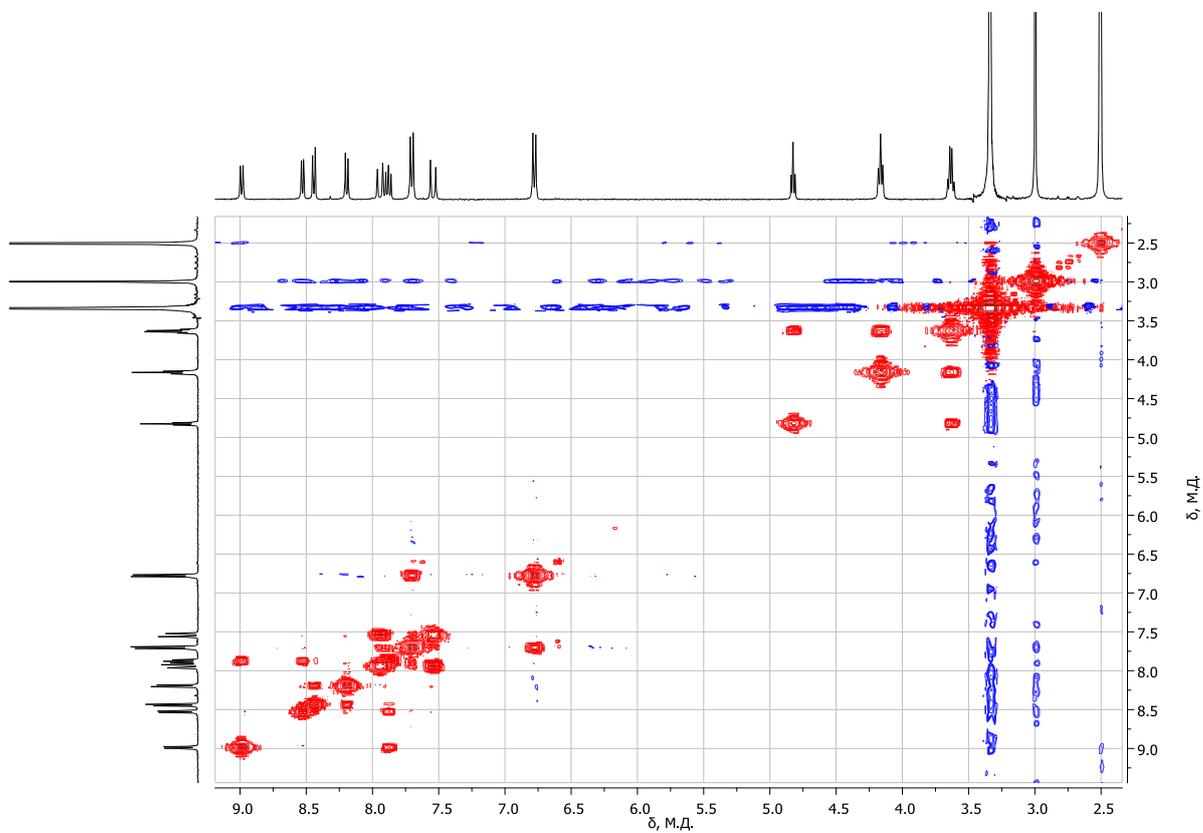


Рисунок П21 – Спектр ^1H -COSY соединения **9b** в ДМСО- d_6

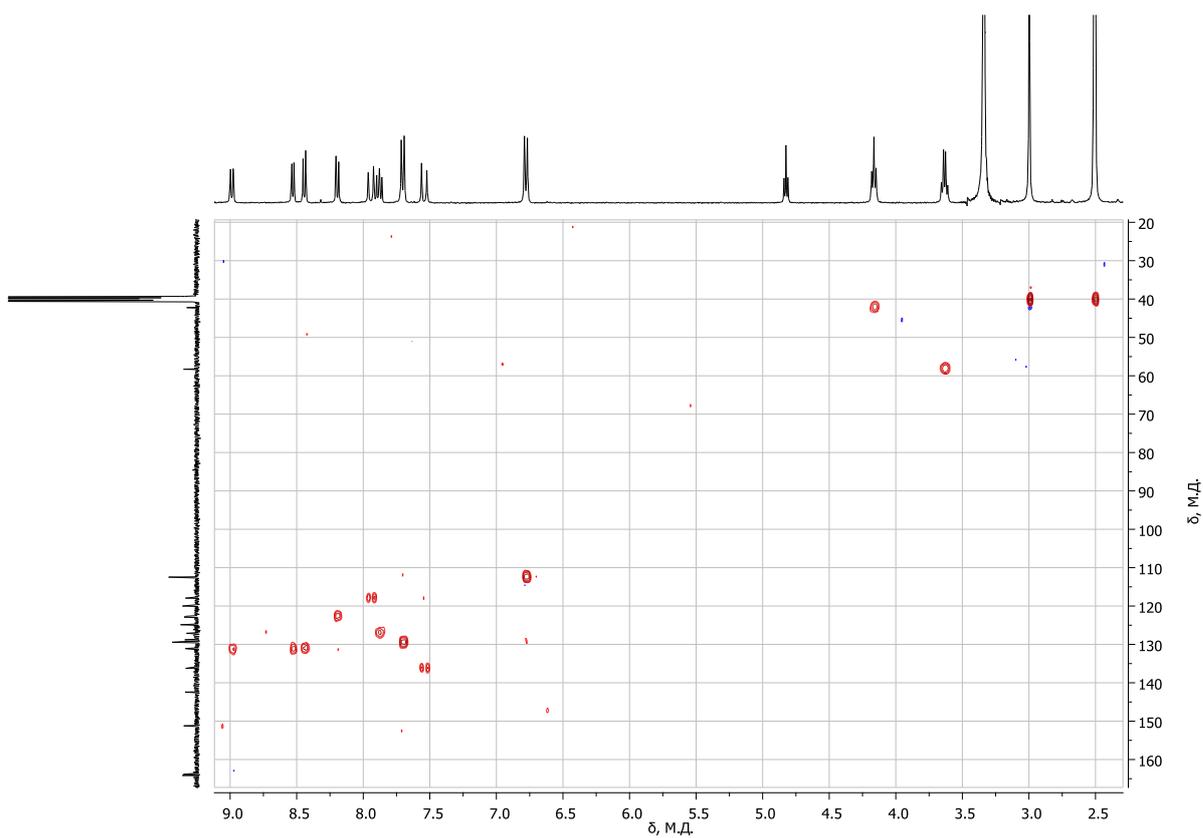


Рисунок П22 – Спектр HSQC соединения **9в** в ДМСО- d_6

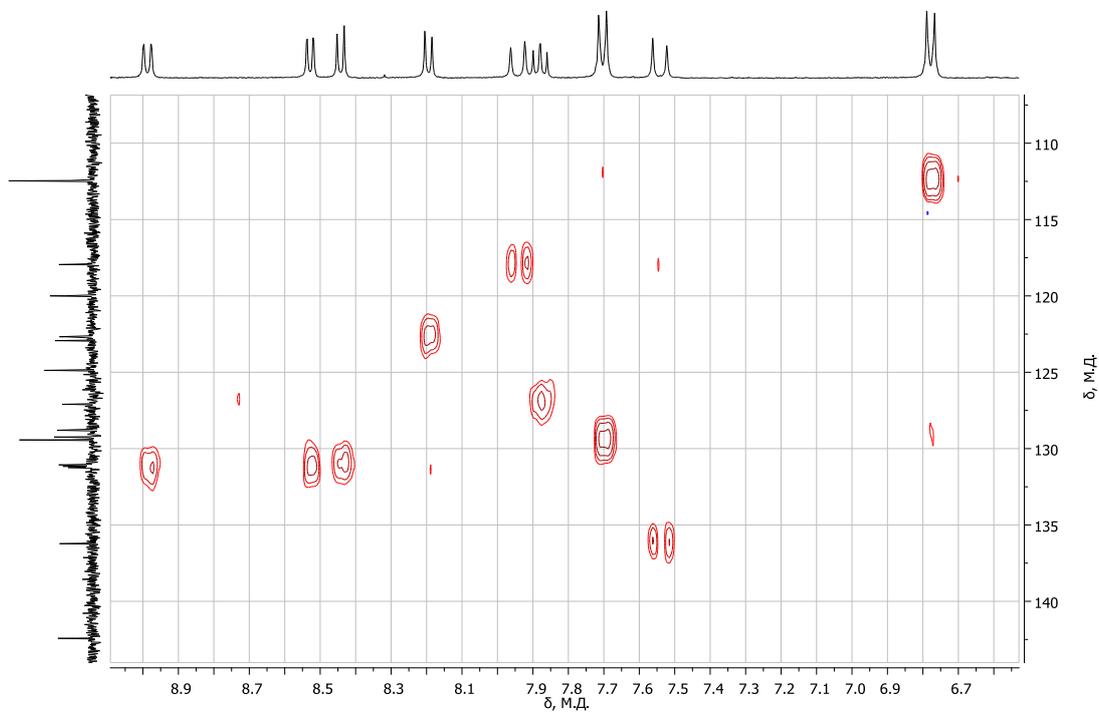


Рисунок П23 – Область ароматических протонов спектра HSQC соединения **9в** в ДМСО- d_6

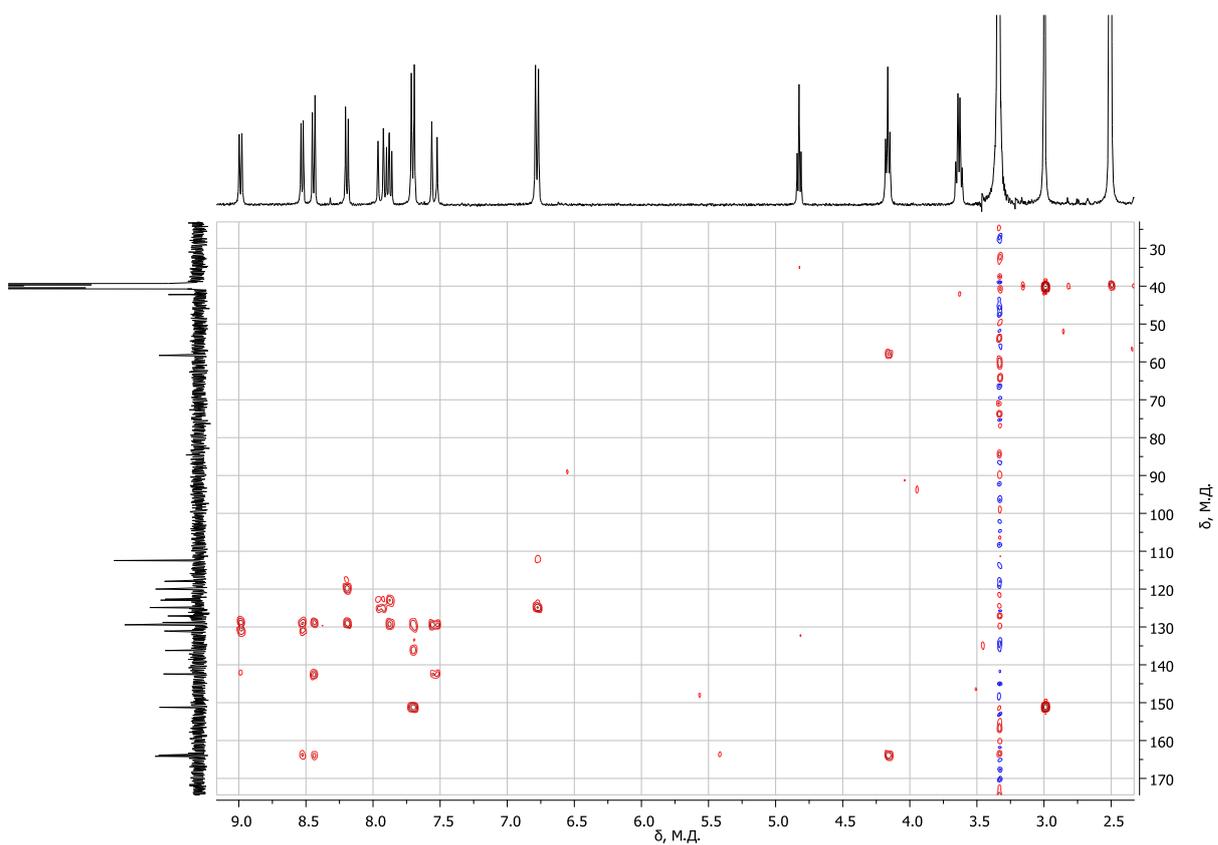


Рисунок П24 – Спектр НМВС соединения **9в** в ДМСО- d_6

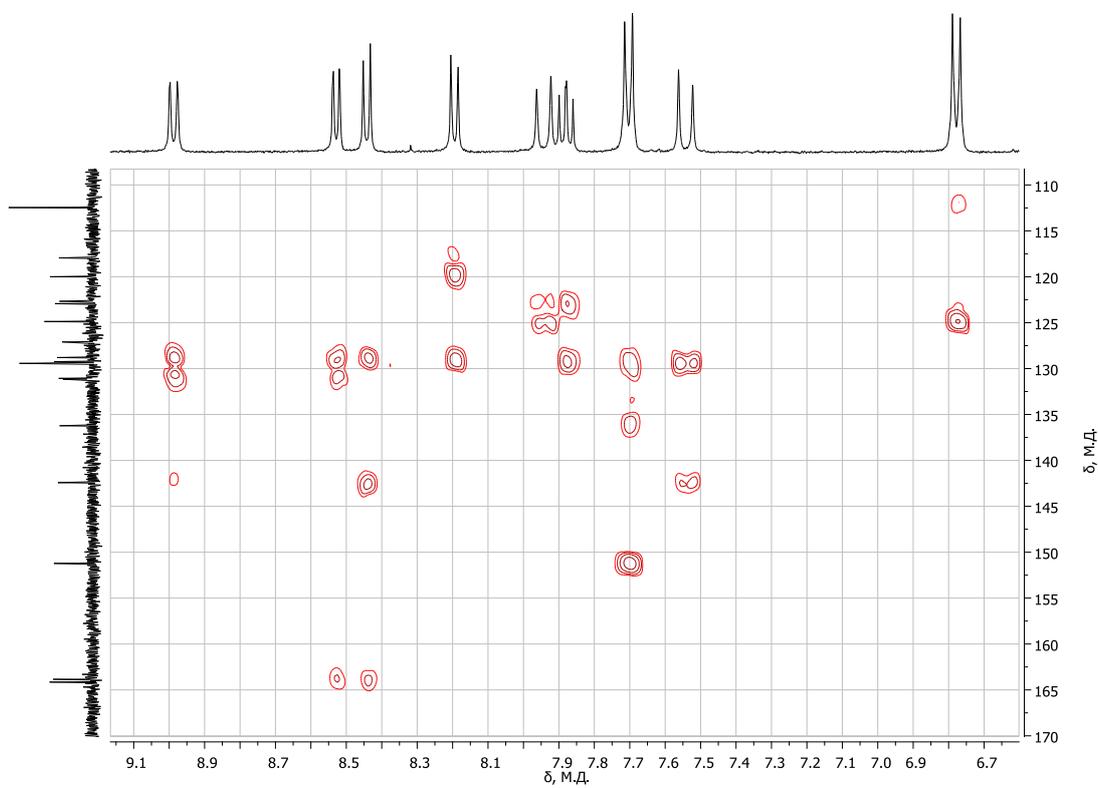


Рисунок П25 – Область ароматических протонов спектра НМВС соединения **9в** в ДМСО- d_6

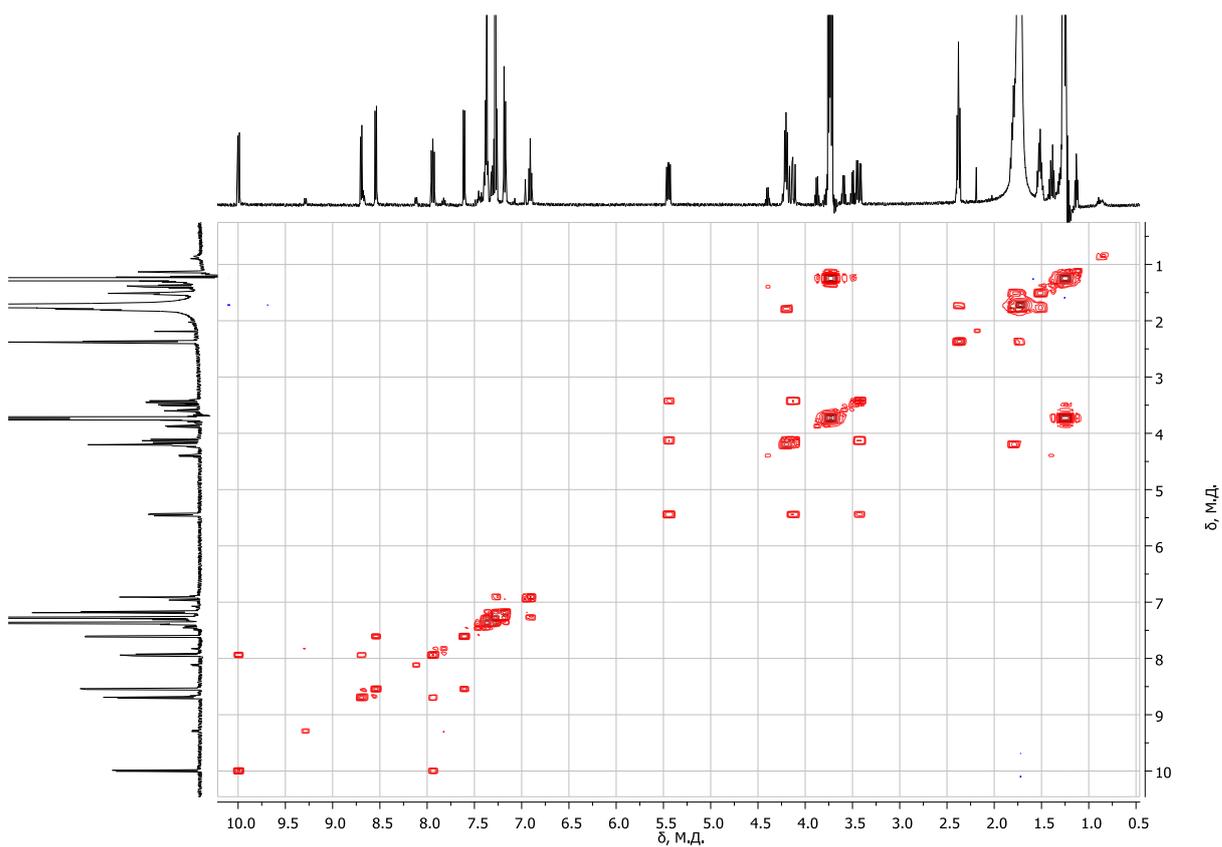


Рисунок П26 – Спектр ^1H -COSY соединения **19a** в ДМСО- d_6

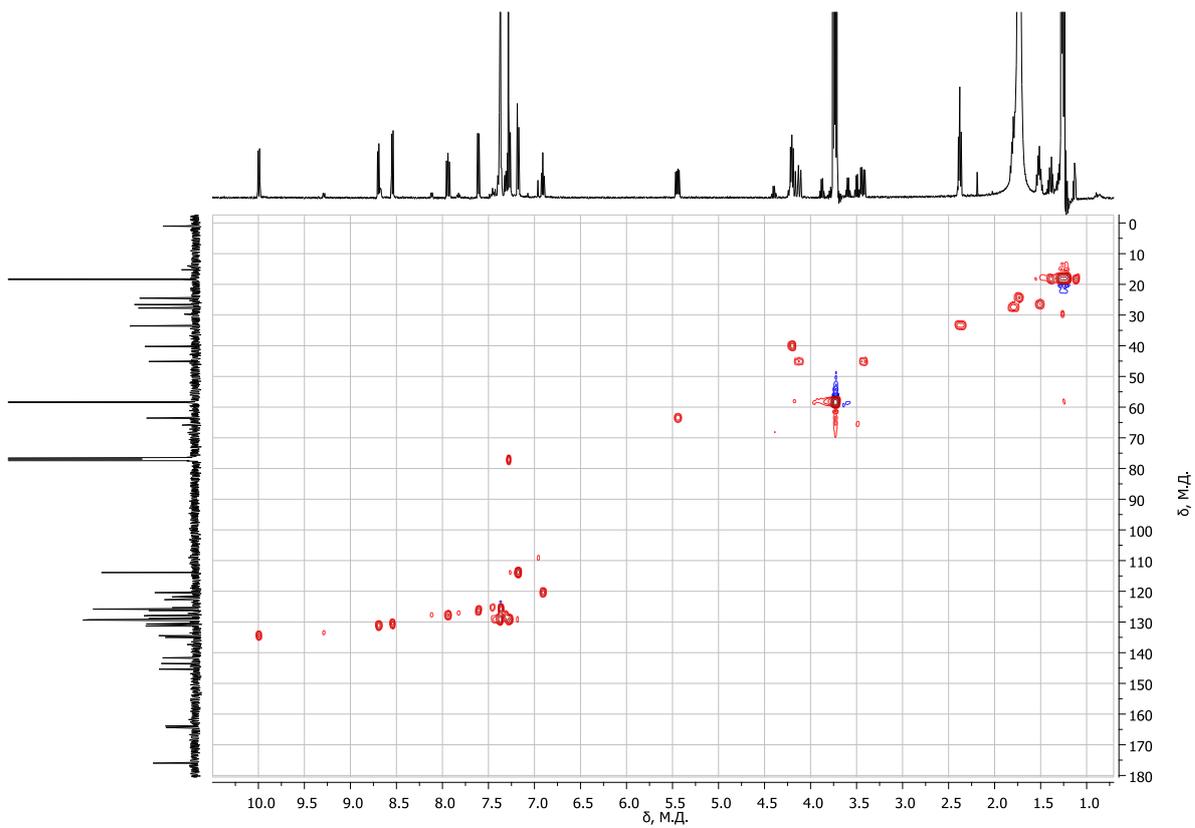


Рисунок П27 – Спектр HSQC соединения **19a** в ДМСО- d_6

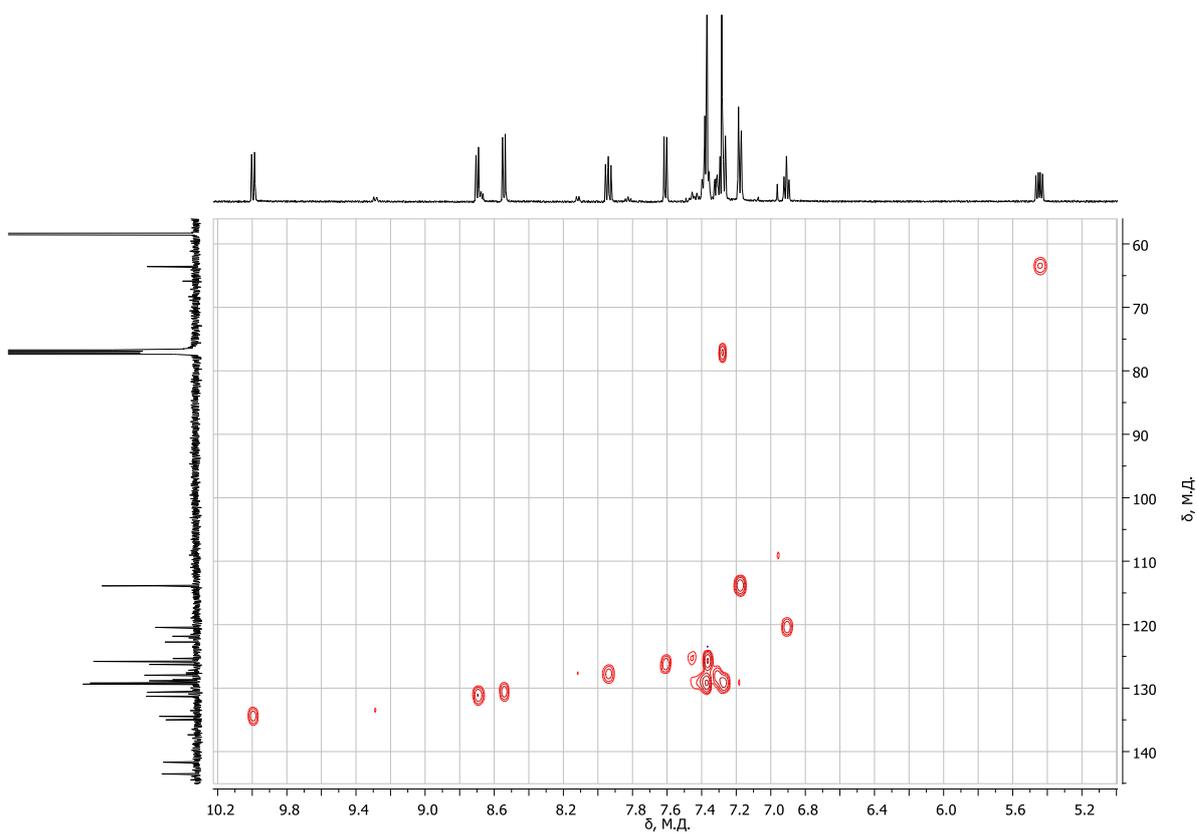


Рисунок П28 – Область ароматических протонов спектра HSQC соединения **19a** в ДМСО-*d*₆

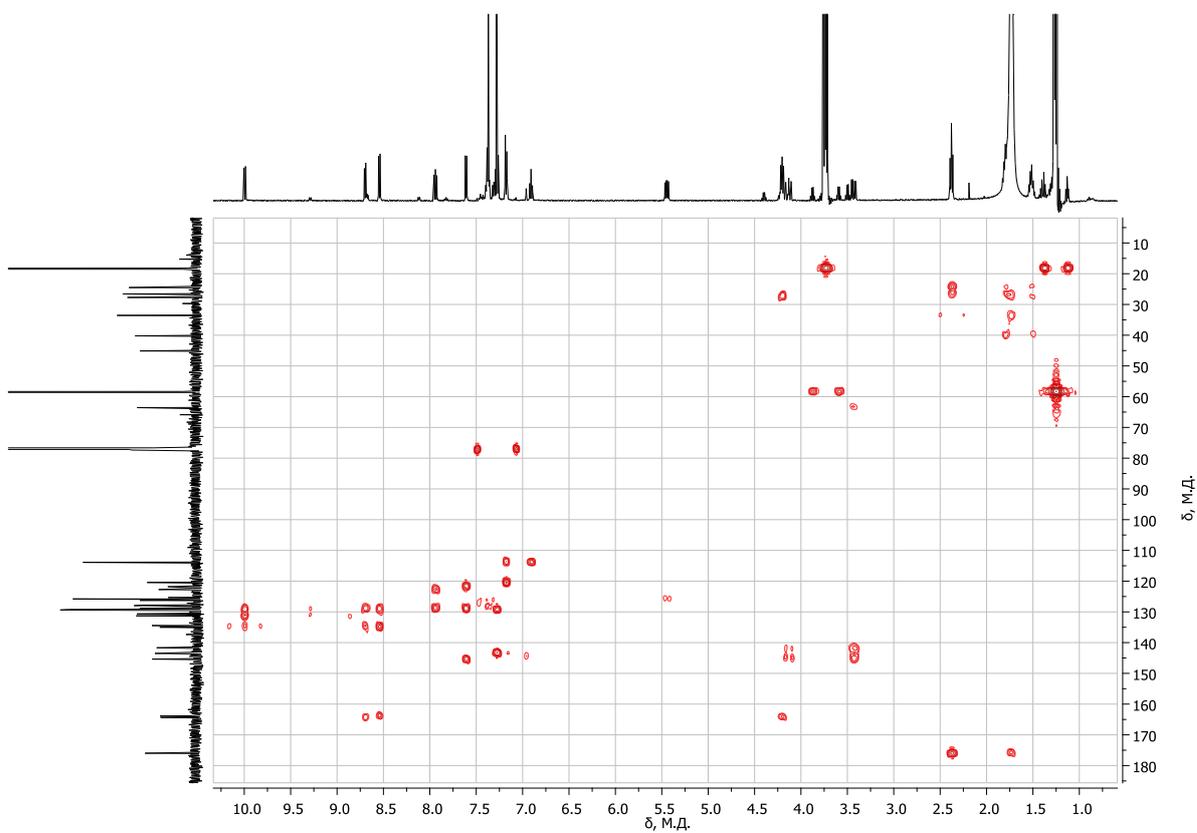


Рисунок П29 – Спектр HMBC соединения **19a** в ДМСО-*d*₆

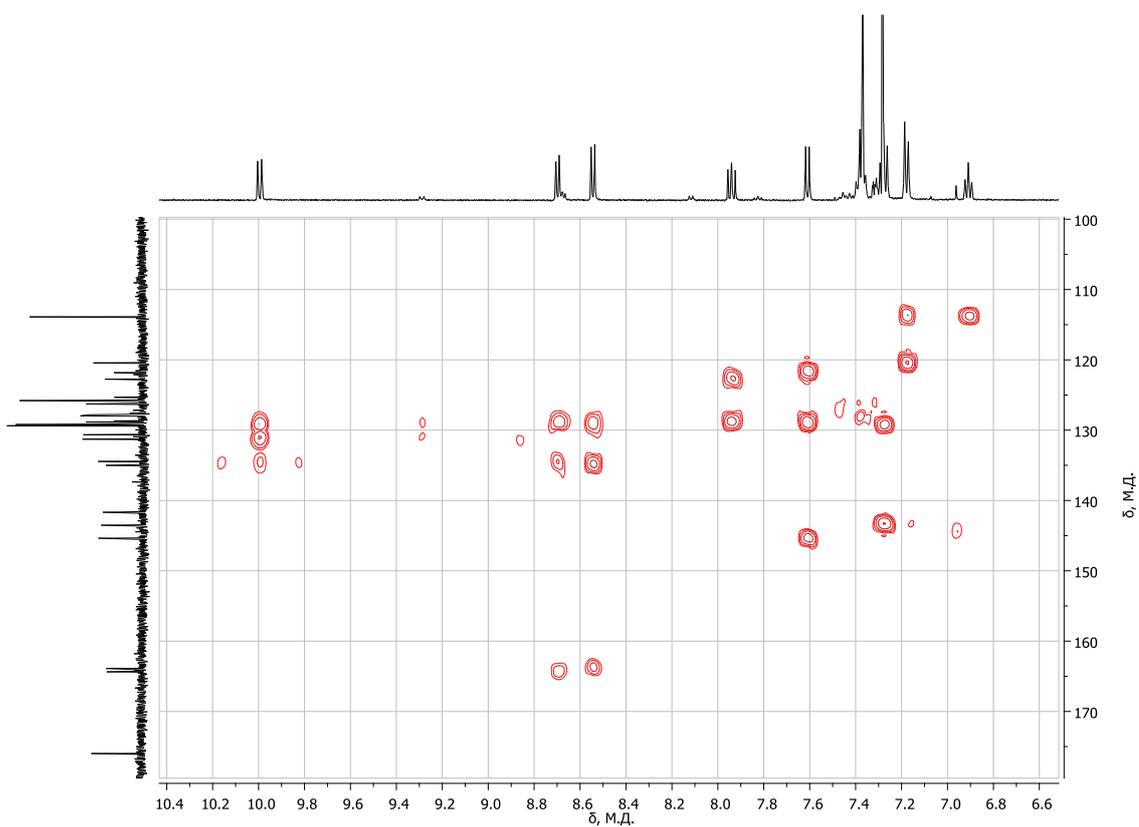


Рисунок П30 – Область ароматических протонов спектра НМВС соединения **19a** в ДМСО- d_6

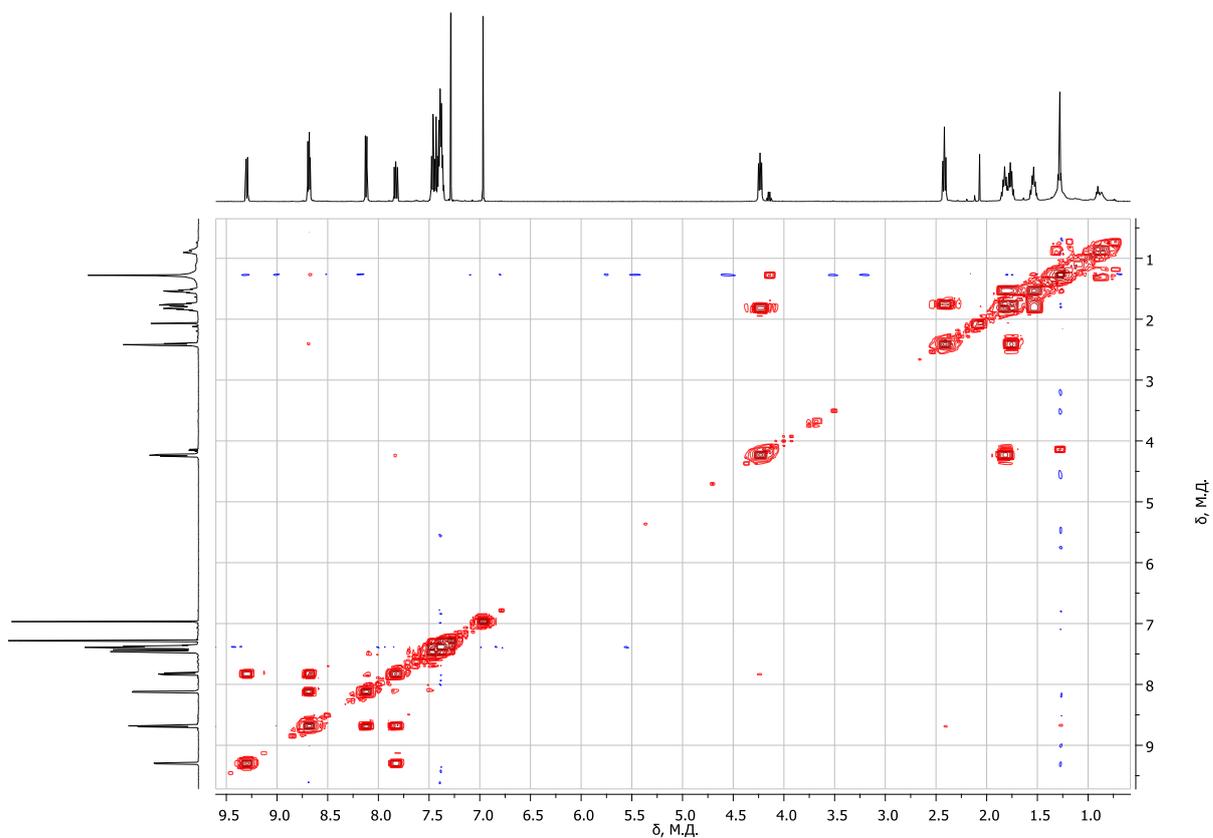


Рисунок П31 – Спектр ^1H -COSY соединения **28** в CDCl_3

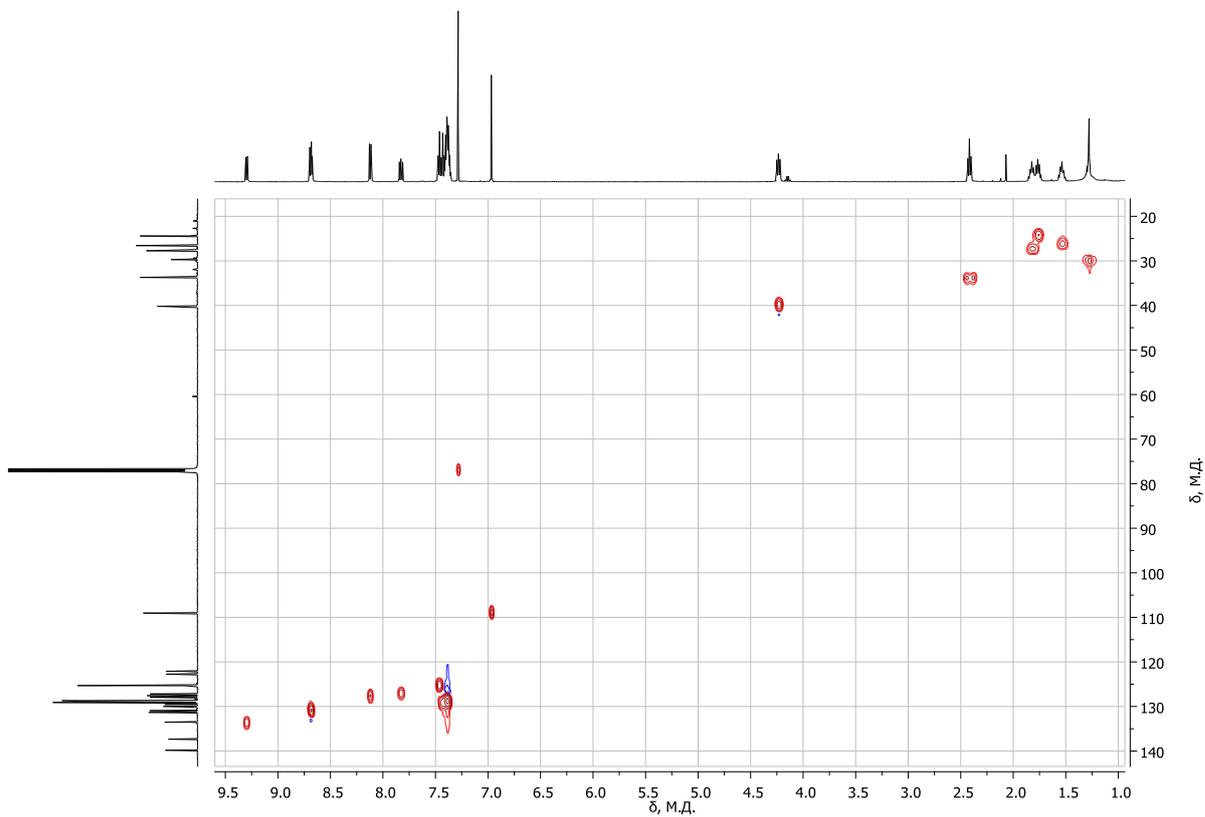


Рисунок П32 – Спектр HSQC соединения **28** в $CDCl_3$

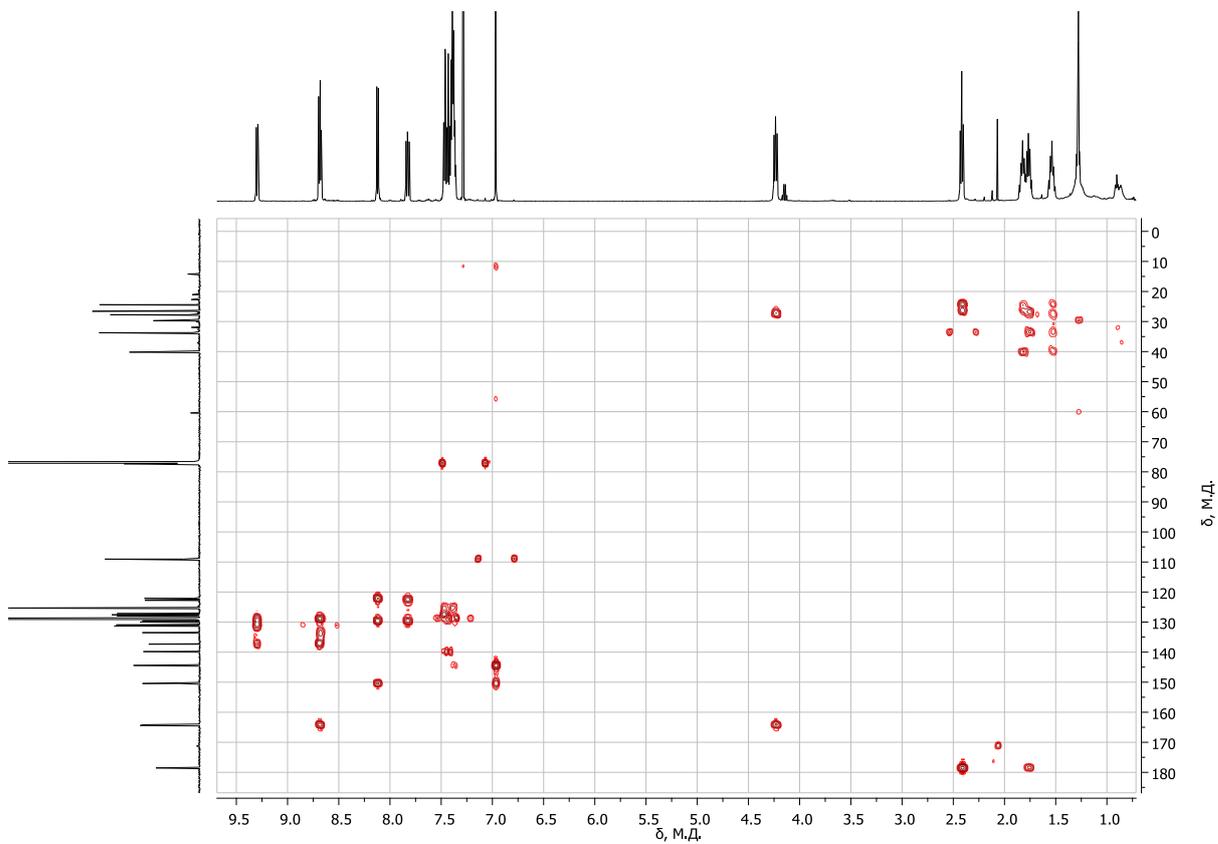


Рисунок П33 – Спектр HMBC соединения **28** в $CDCl_3$

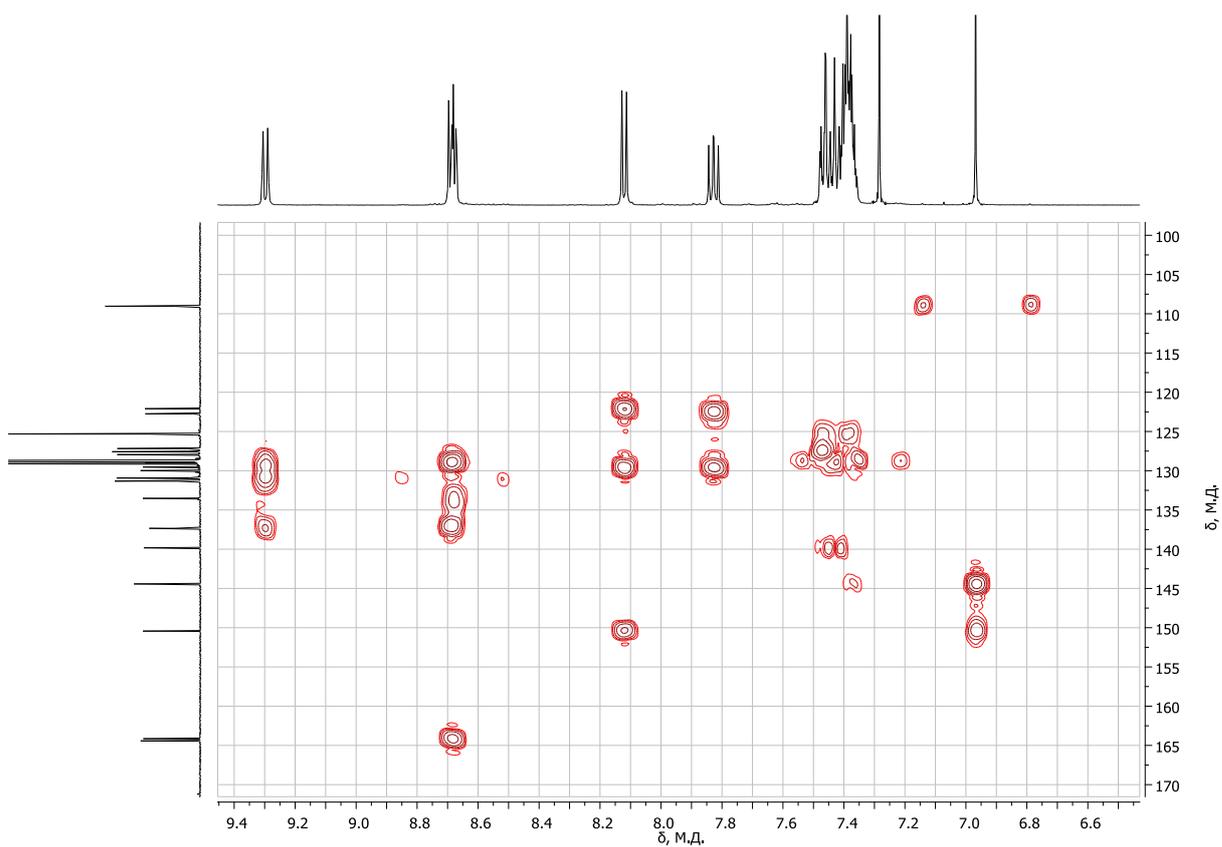


Рисунок ПЗ4 – Область ароматических протонов спектра НМВС соединения **28** в CDCl_3

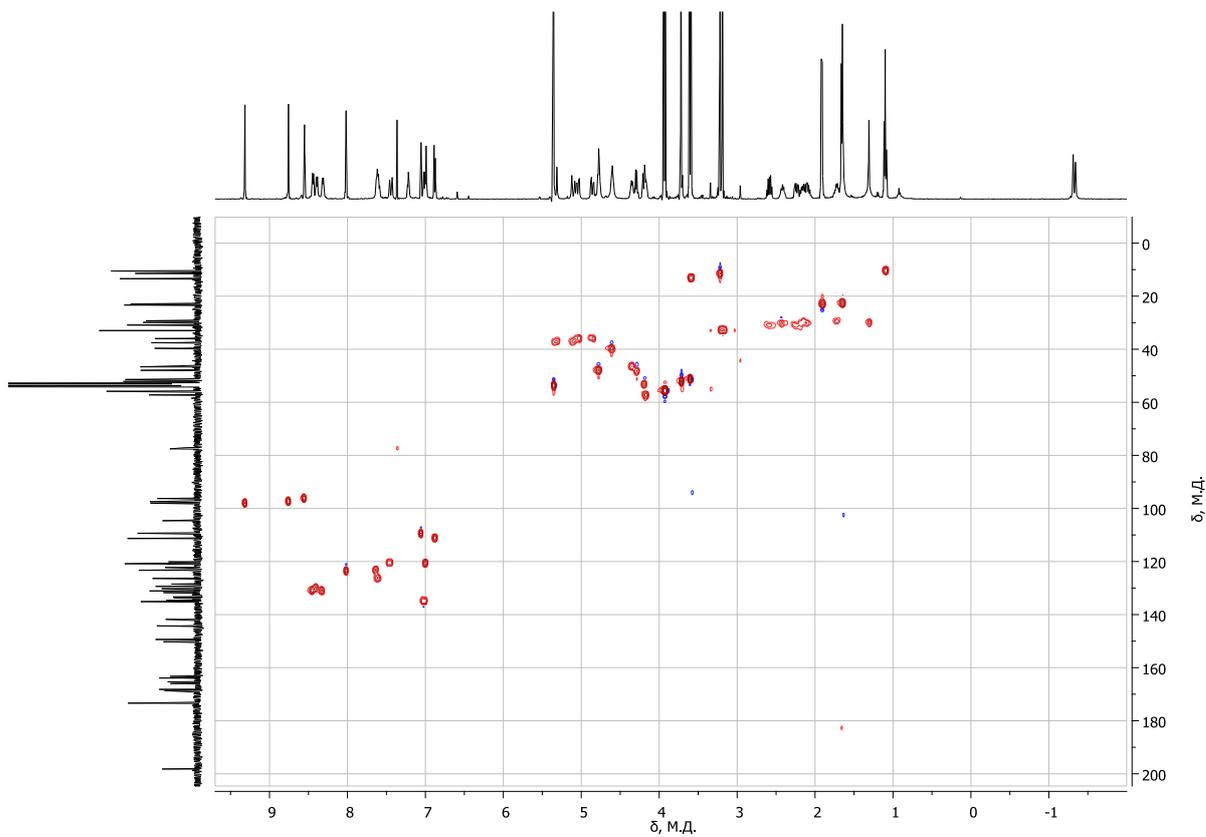


Рисунок ПЗ5– Спектр HSQC соединения **30** в CD_2Cl_2

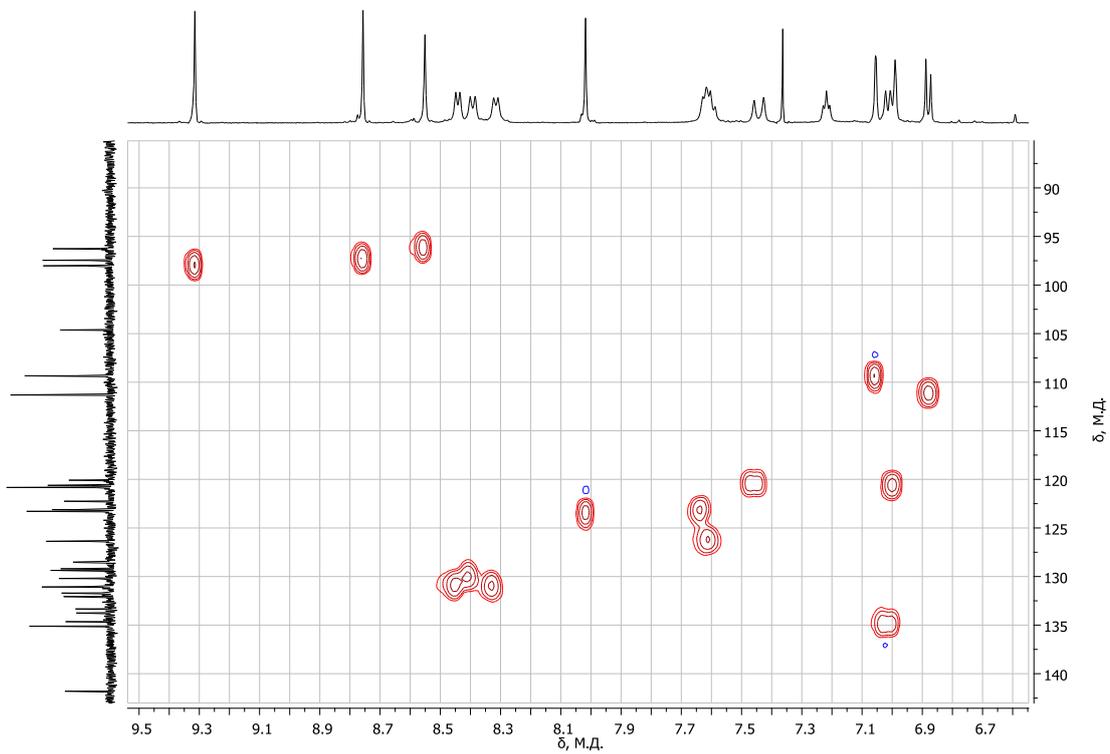


Рисунок ПЗ6 – Область ароматических протонов спектра HSQC соединения **30** в CD_2Cl_2

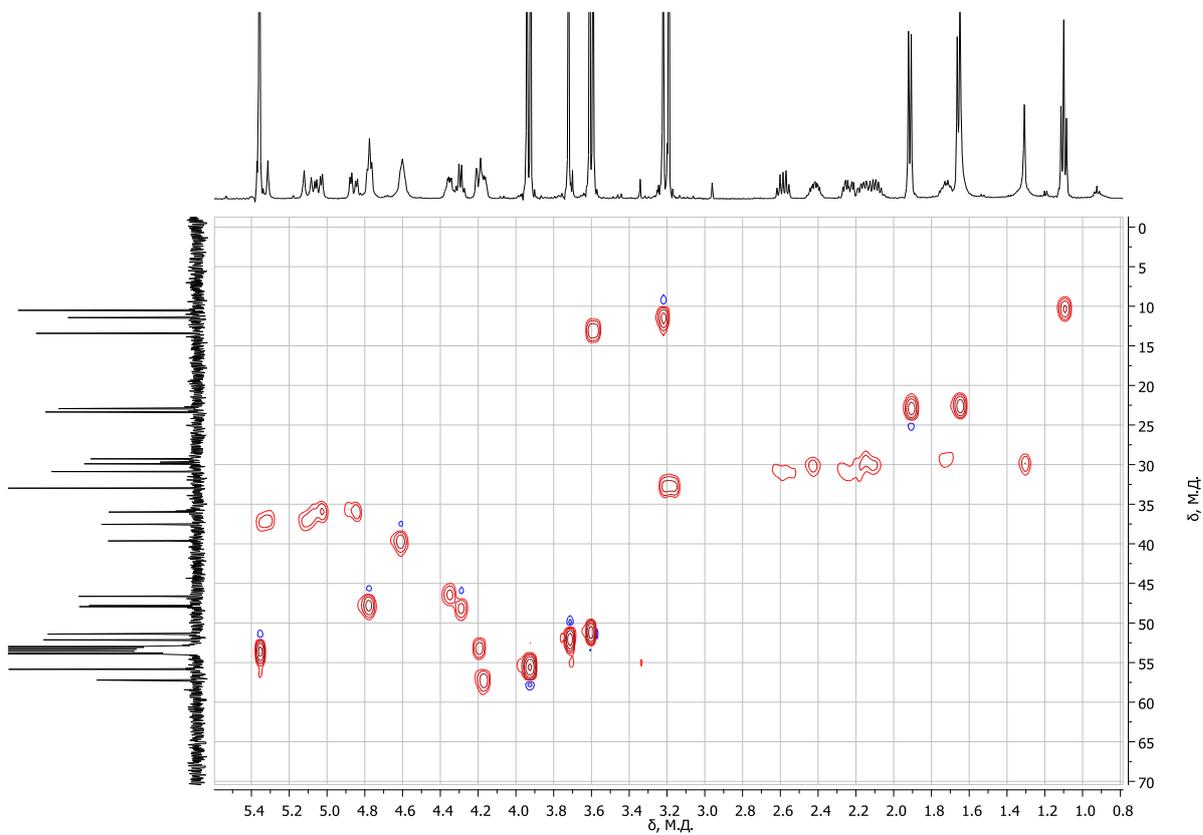


Рисунок ПЗ7 – Область алифатических протонов спектра HSQC соединения **30** в CD_2Cl_2

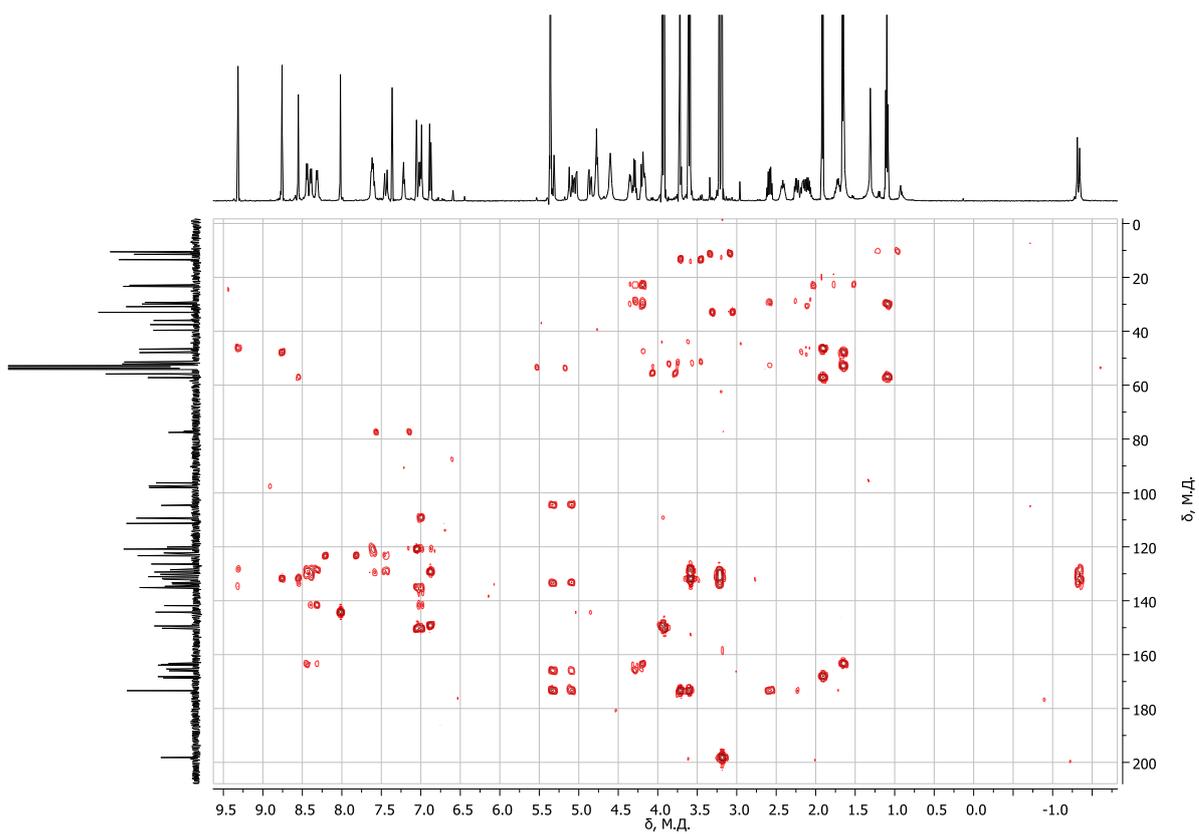


Рисунок П38 – Спектр НМВС соединения **30** в CD_2Cl_2

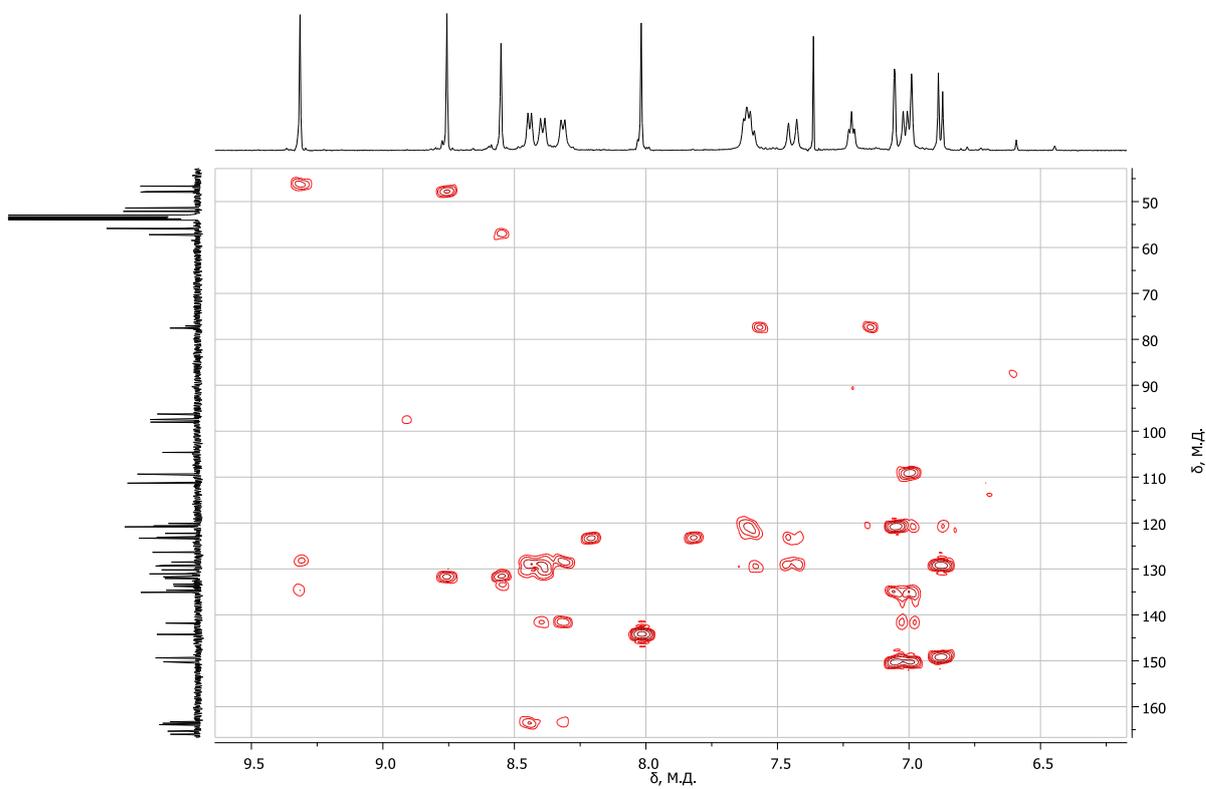


Рисунок П39 – Ароматическая область спектра НМВС соединения **30** в CD_2Cl_2

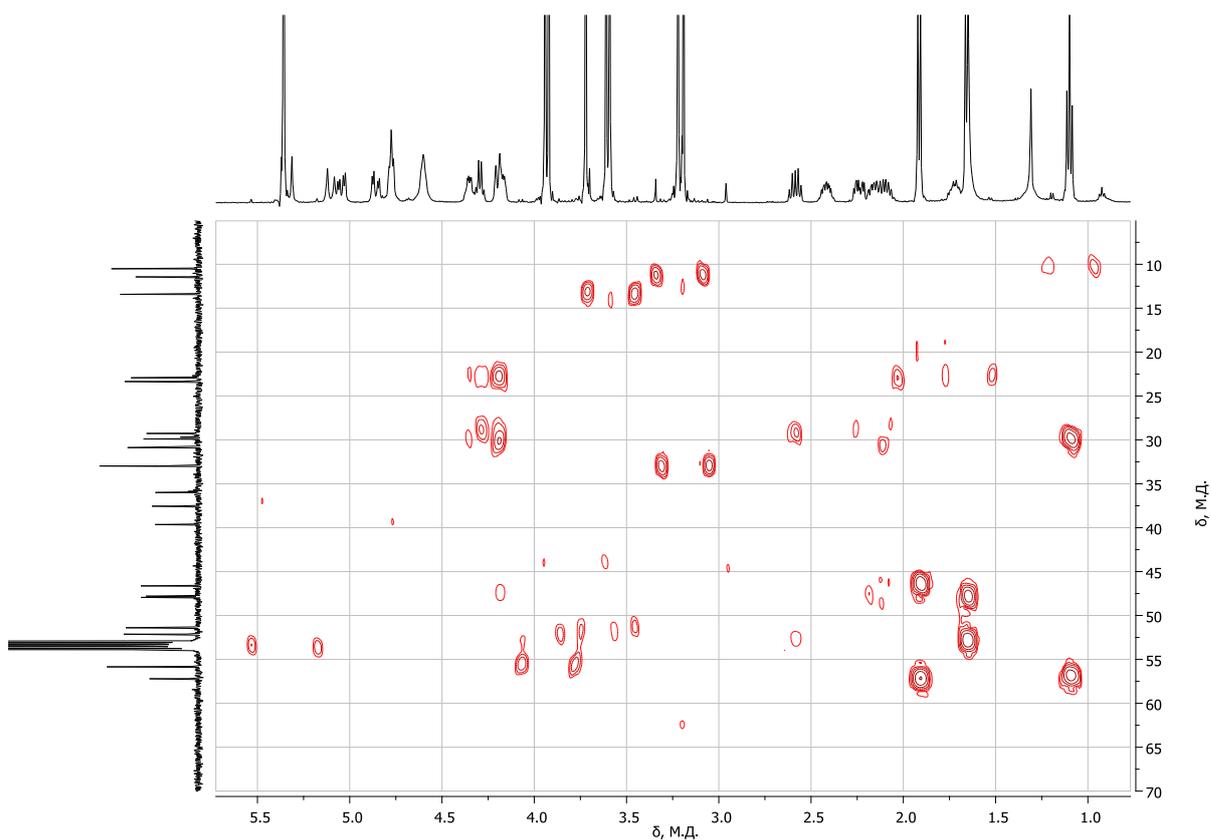


Рисунок П40 – Алифатическая область спектра НМВС соединения **30** в CD₂Cl₂

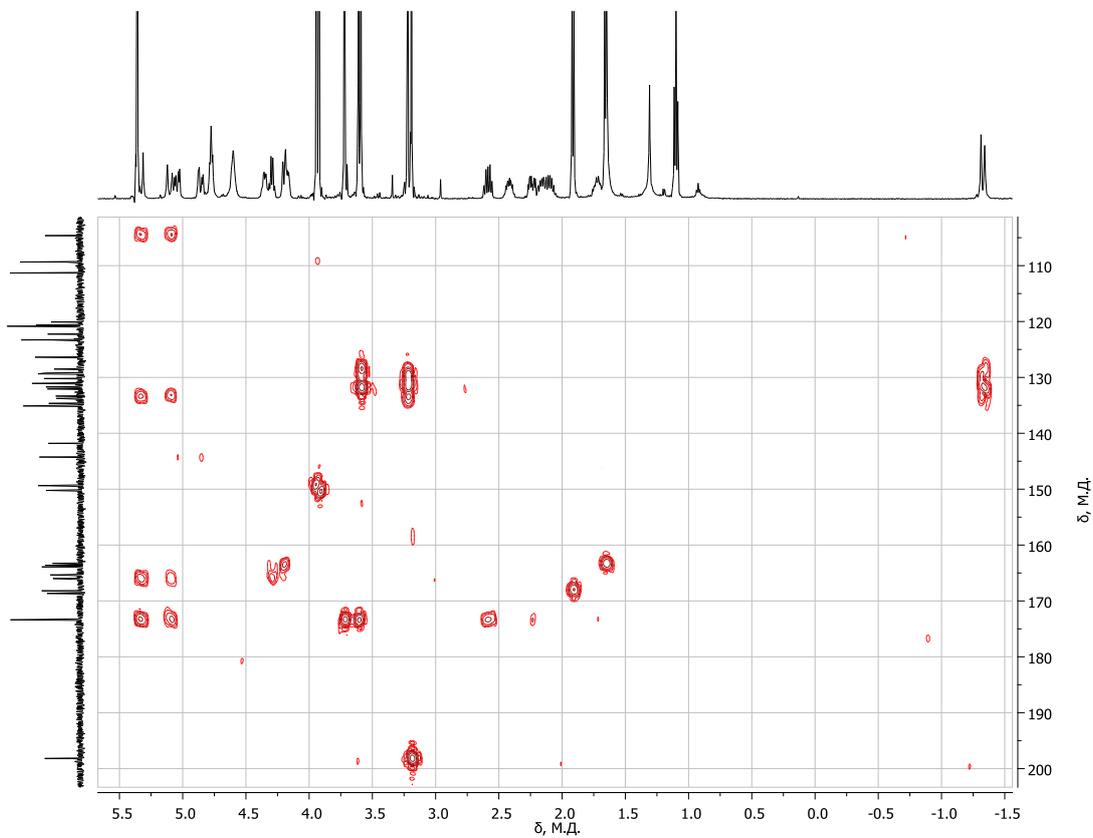


Рисунок П41 – Алифатическая область спектра НМВС соединения **30** в CD₂Cl₂

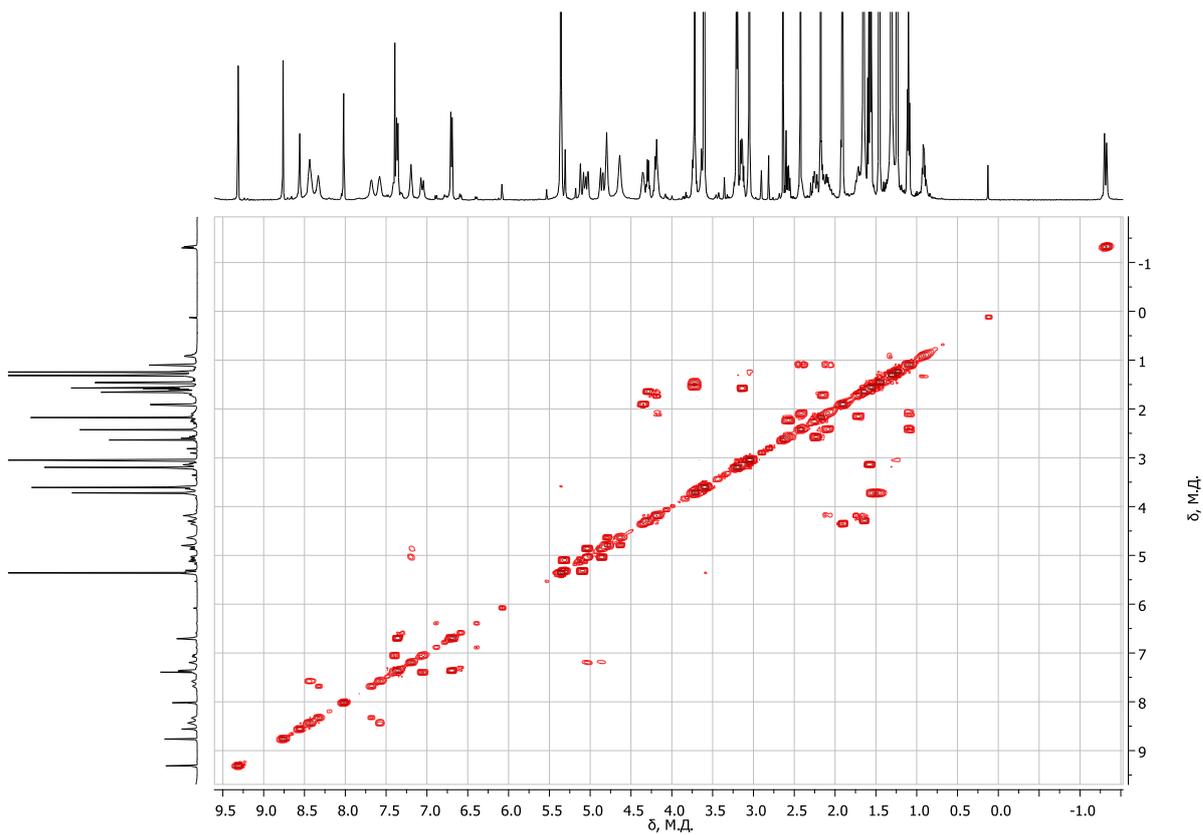


Рисунок П42 – Спектр COSY соединения **31** в CD_2Cl_2

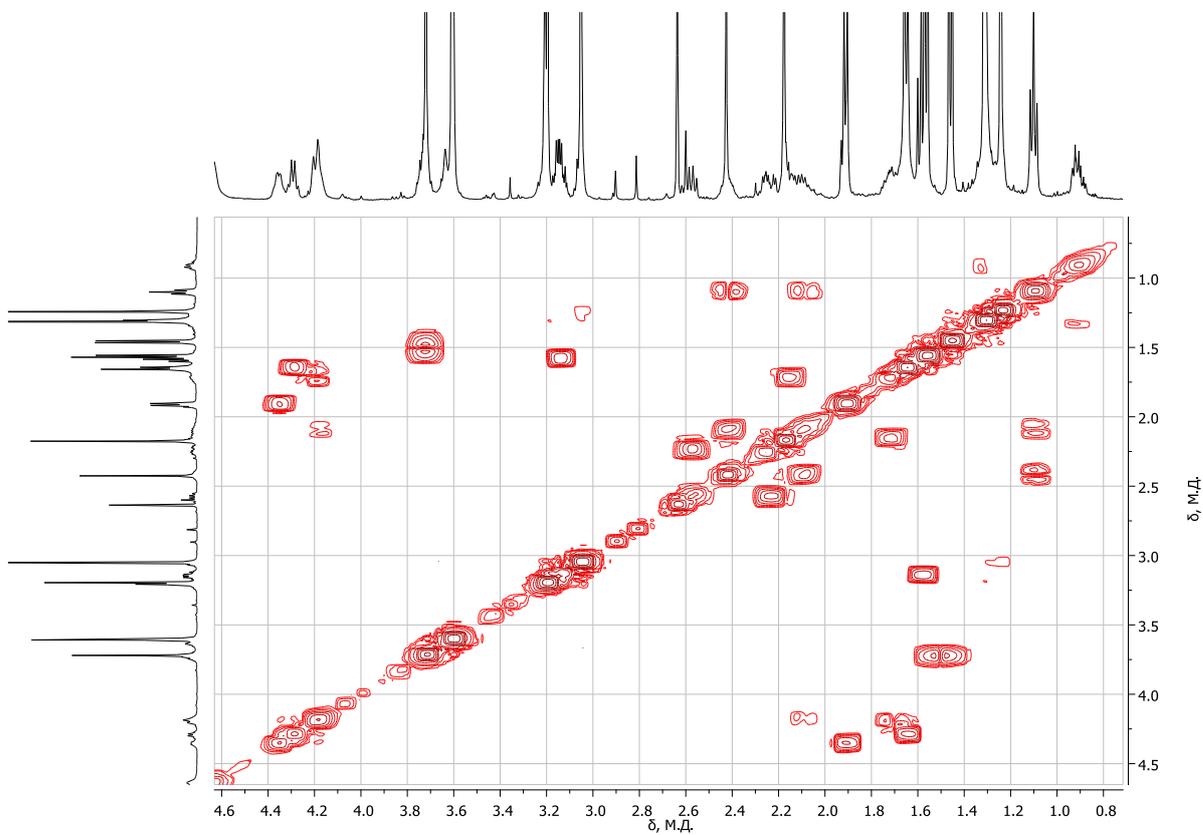


Рисунок П43 – Область алифатических протонов спектра COSY соединения **31** в CD_2Cl_2

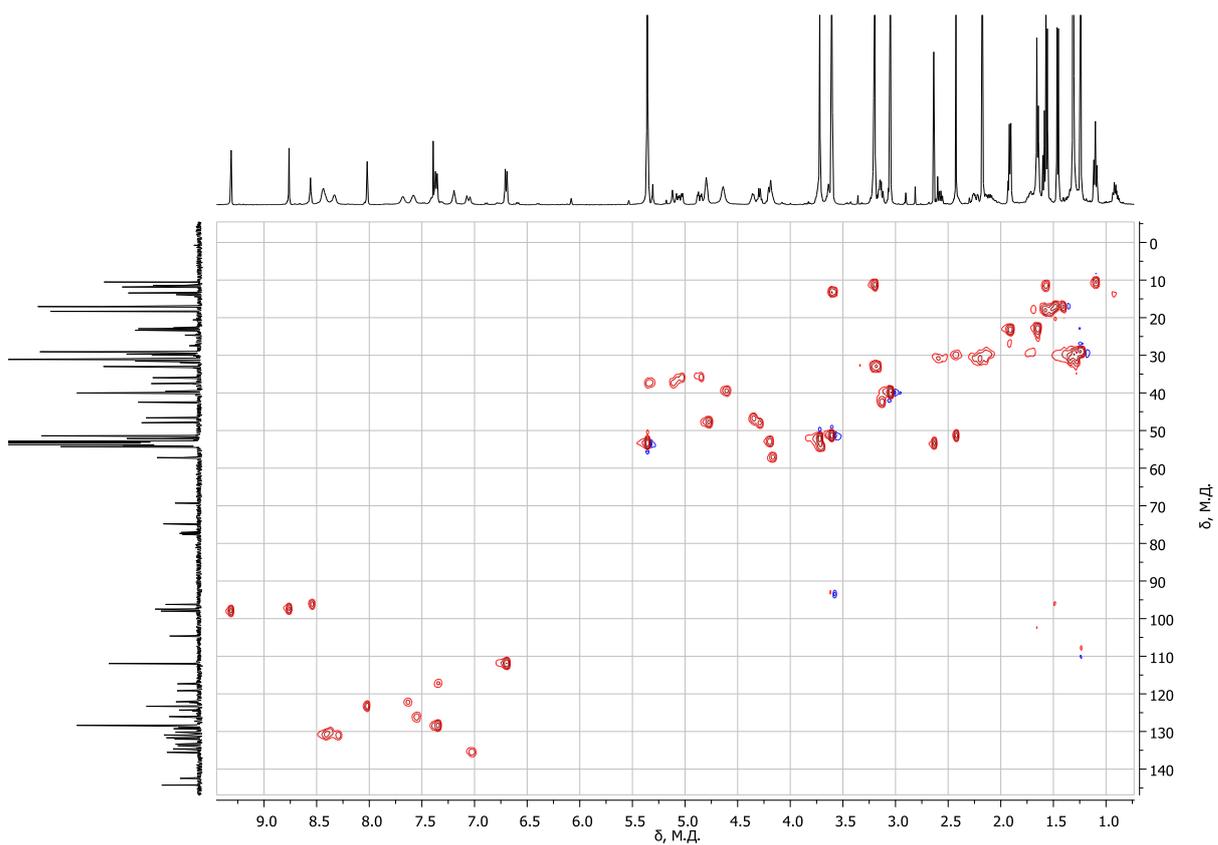


Рисунок П44 – Спектр HSQC соединения **31** в CD_2Cl_2

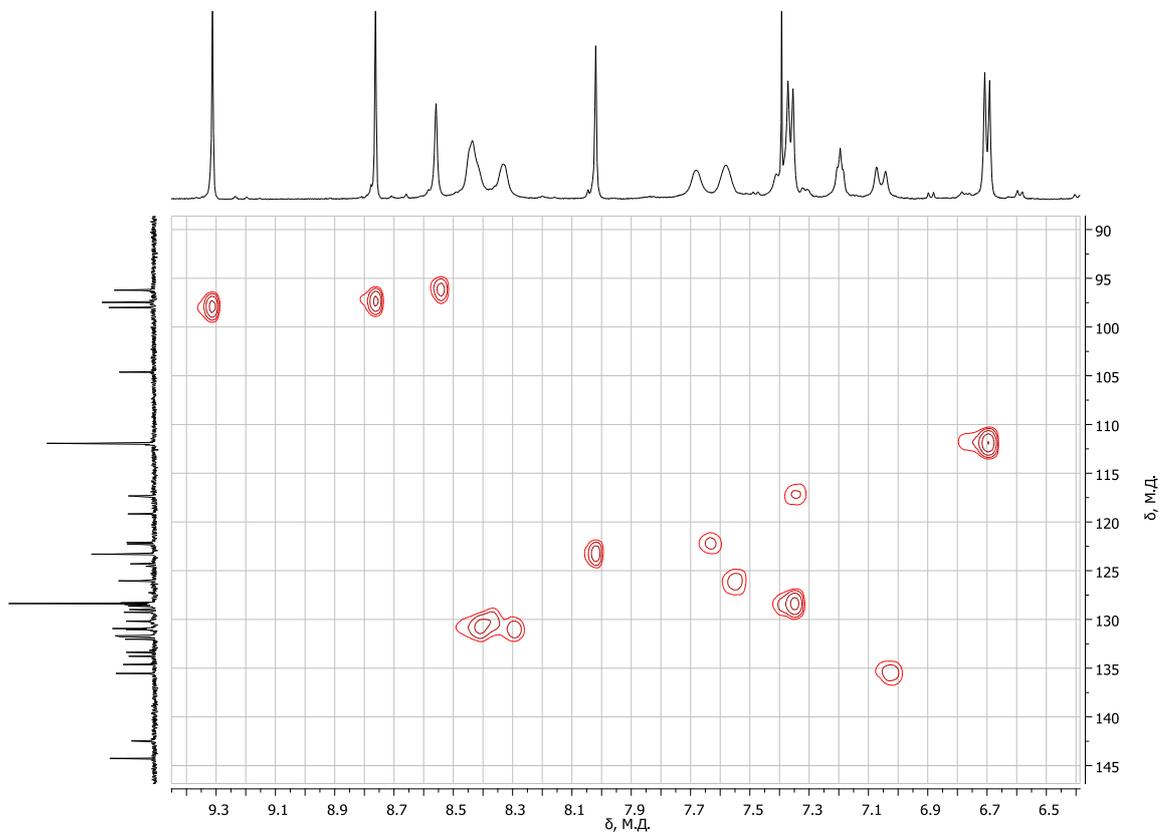


Рисунок П45 – Ароматическая область спектра HSQC соединения **31** в CD_2Cl_2

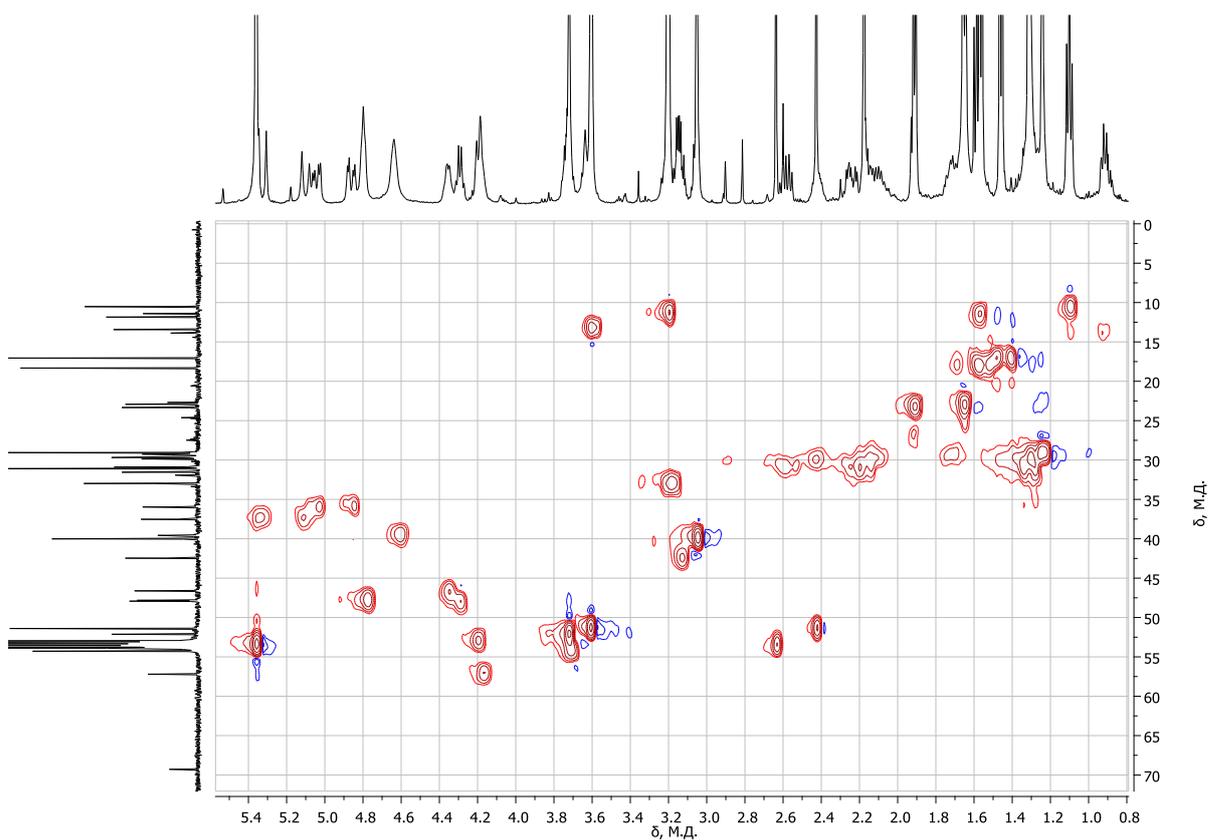


Рисунок П46 – Алифатическая область спектра HSQC соединения **31** в CD_2Cl_2

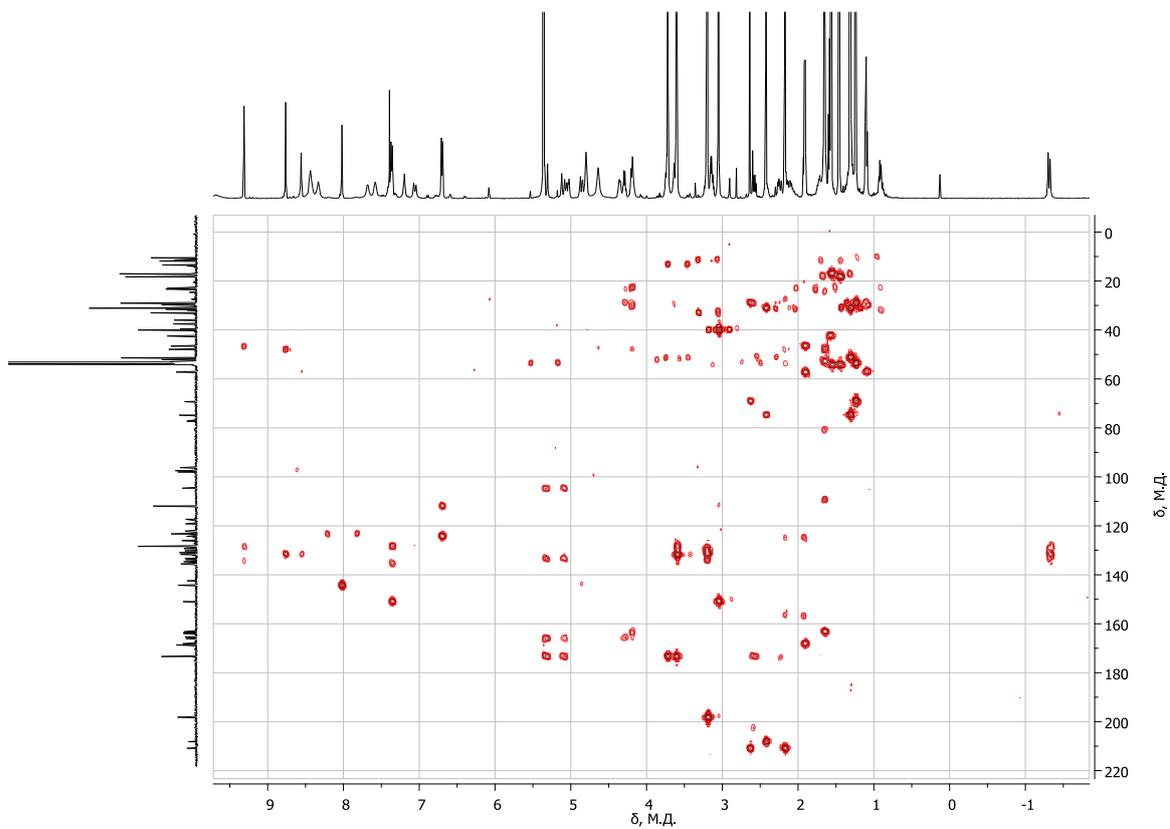


Рисунок П47 – Спектр HMBC соединения **31** в CD_2Cl_2

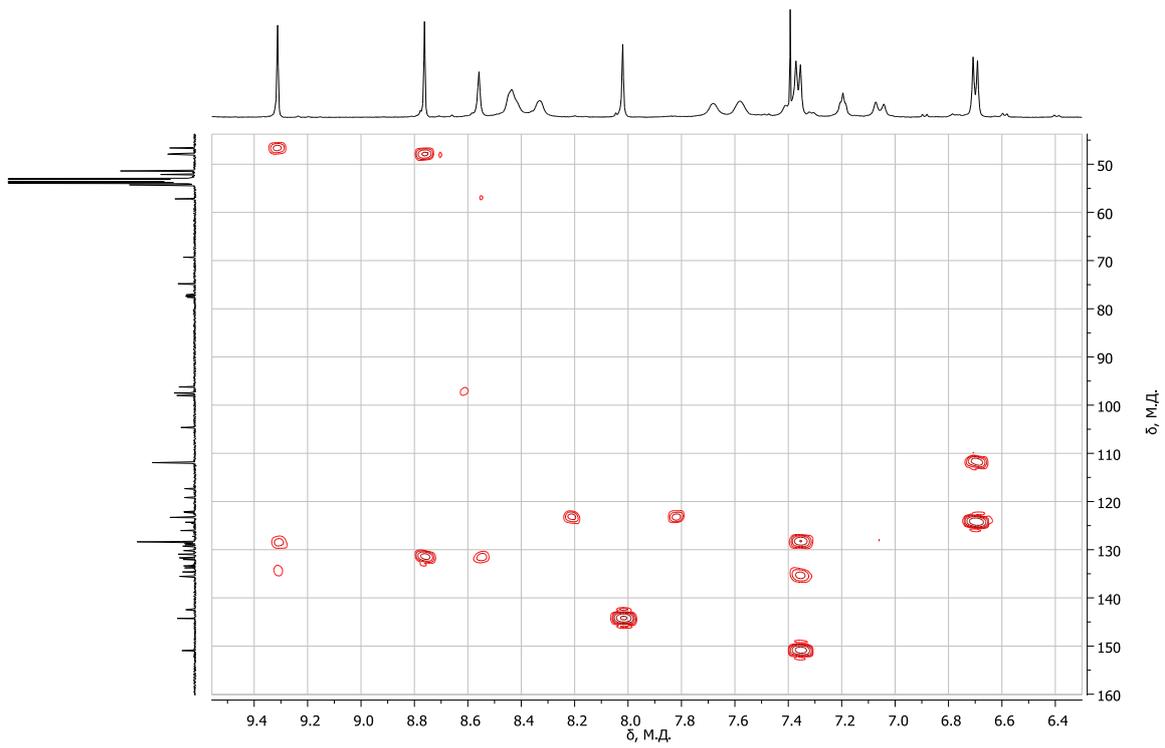


Рисунок П48 – Ароматическая область спектра НМВС соединения **31** в CD_2Cl_2

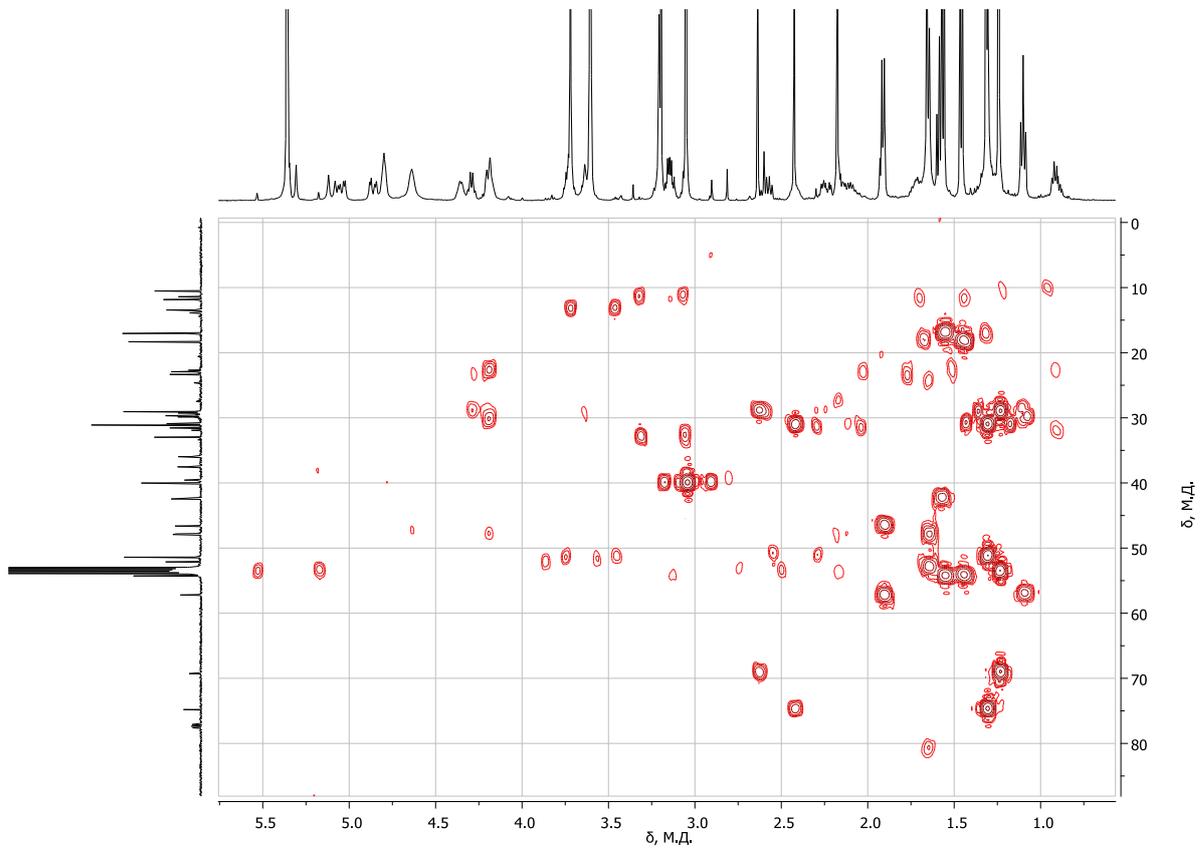


Рисунок П49 – Алифатическая область спектра НМВС соединения **31** в CD_2Cl_2

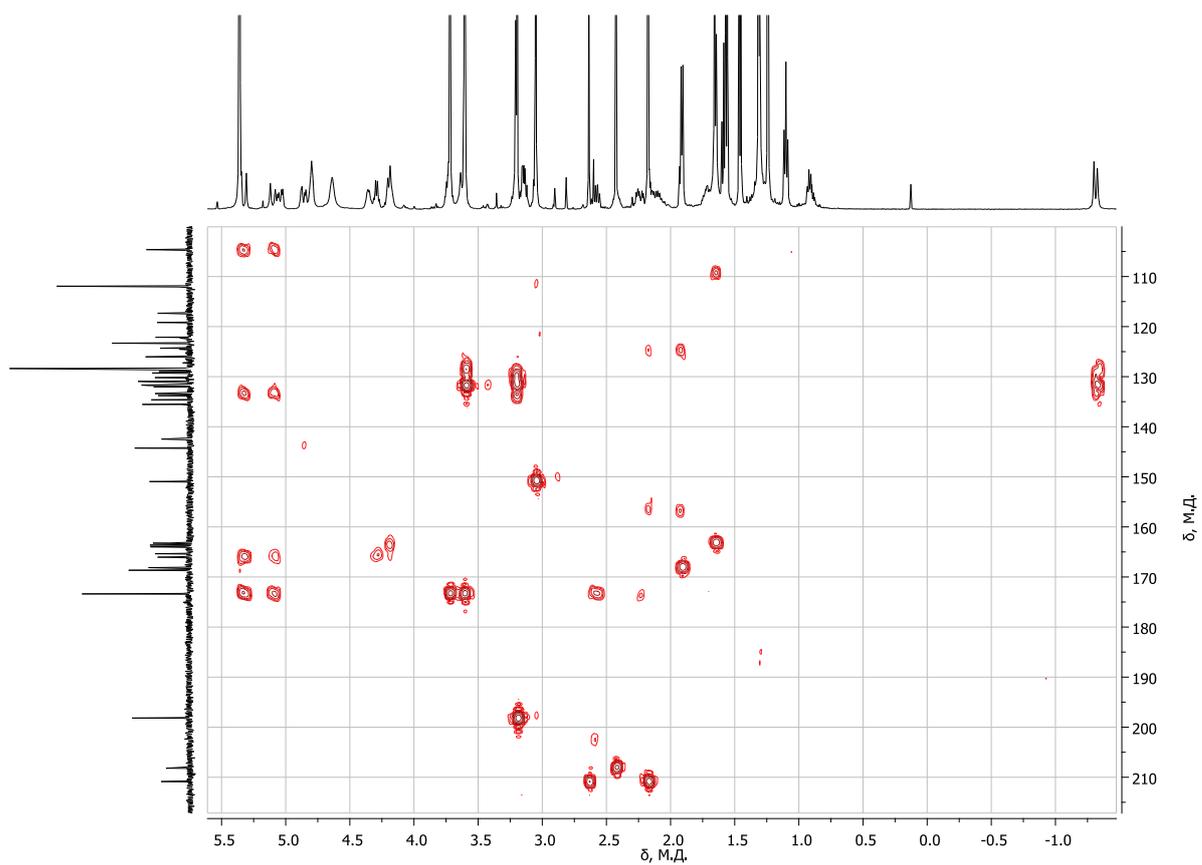


Рисунок П50 – Алифатическая область спектра HMBC соединения **31** в CD_2Cl_2

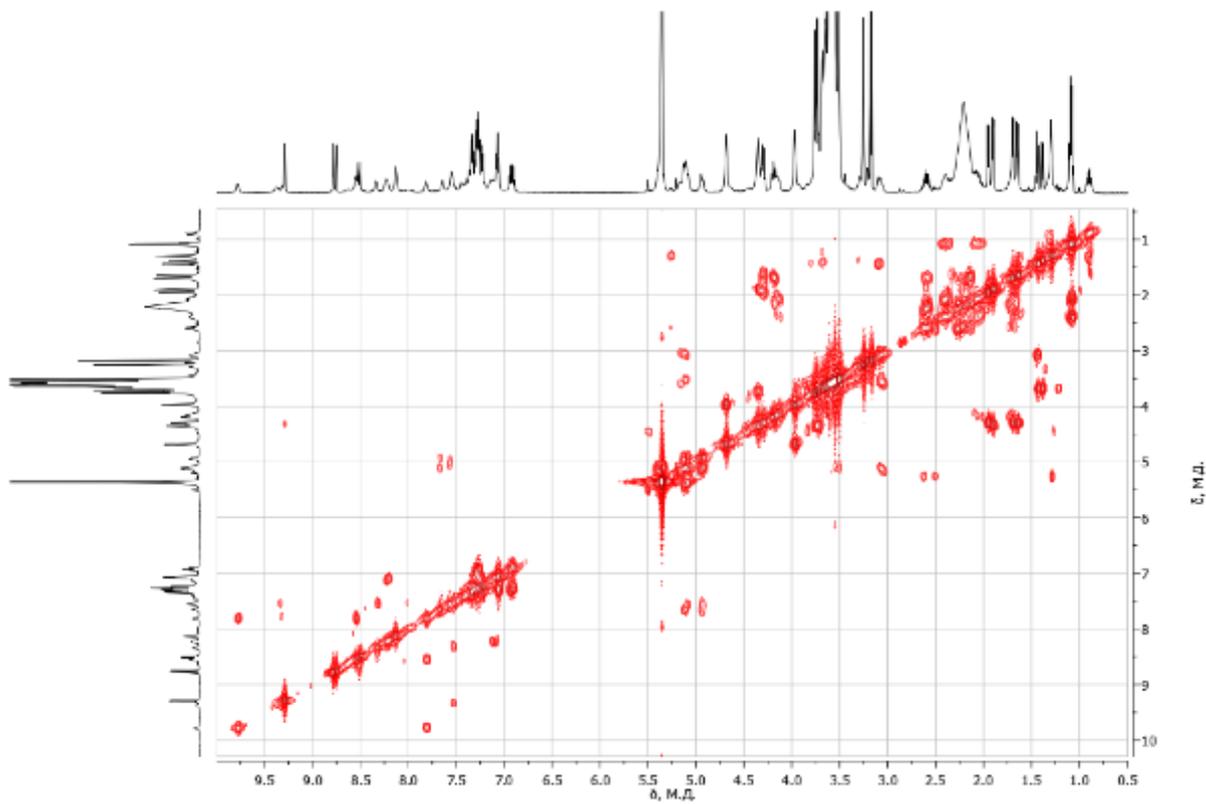


Рисунок П51 – Спектр COSY соединения **33** в CD_2Cl_2

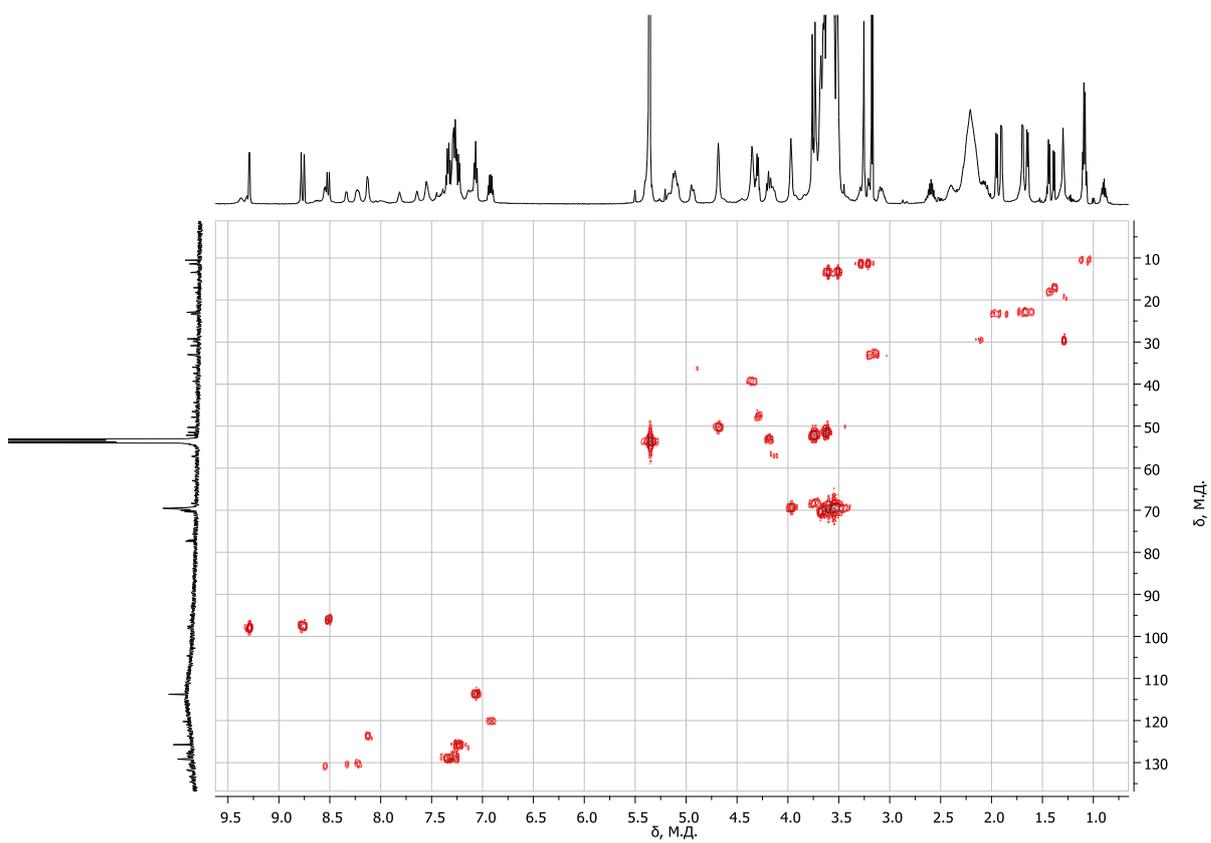


Рисунок П52 – Спектр HSQC соединения **33** в CD_2Cl_2

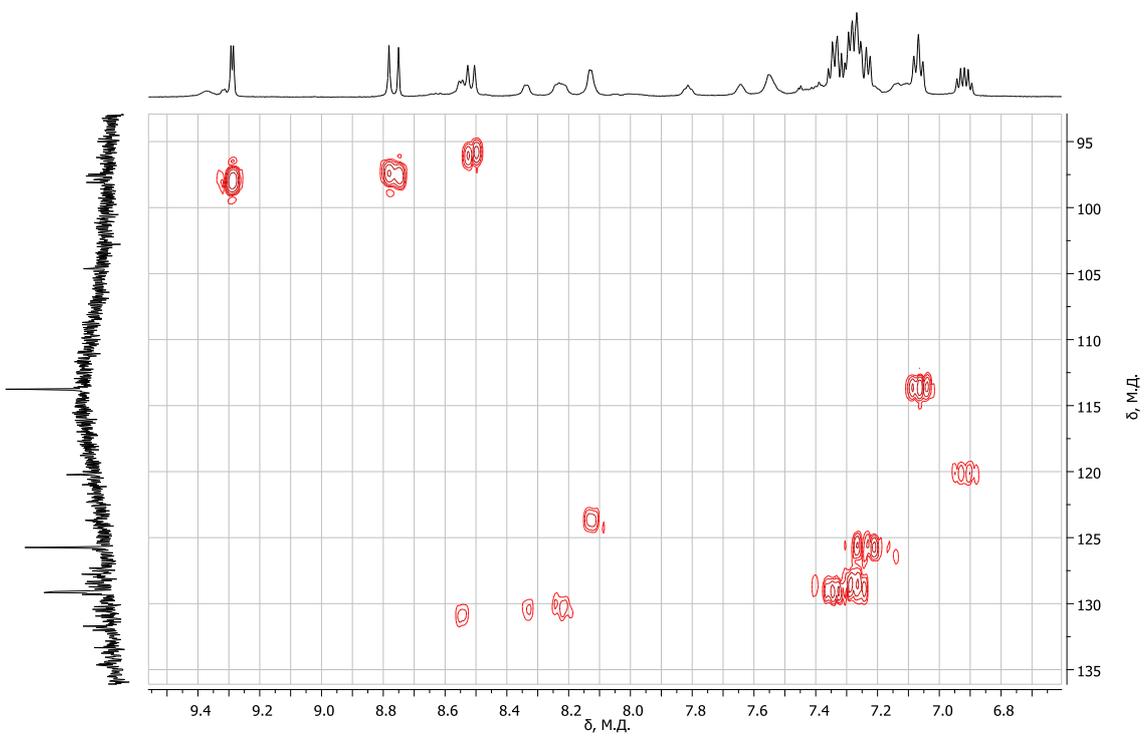


Рисунок П53 – Ароматическая область спектра HSQC соединения **33** в CD_2Cl_2

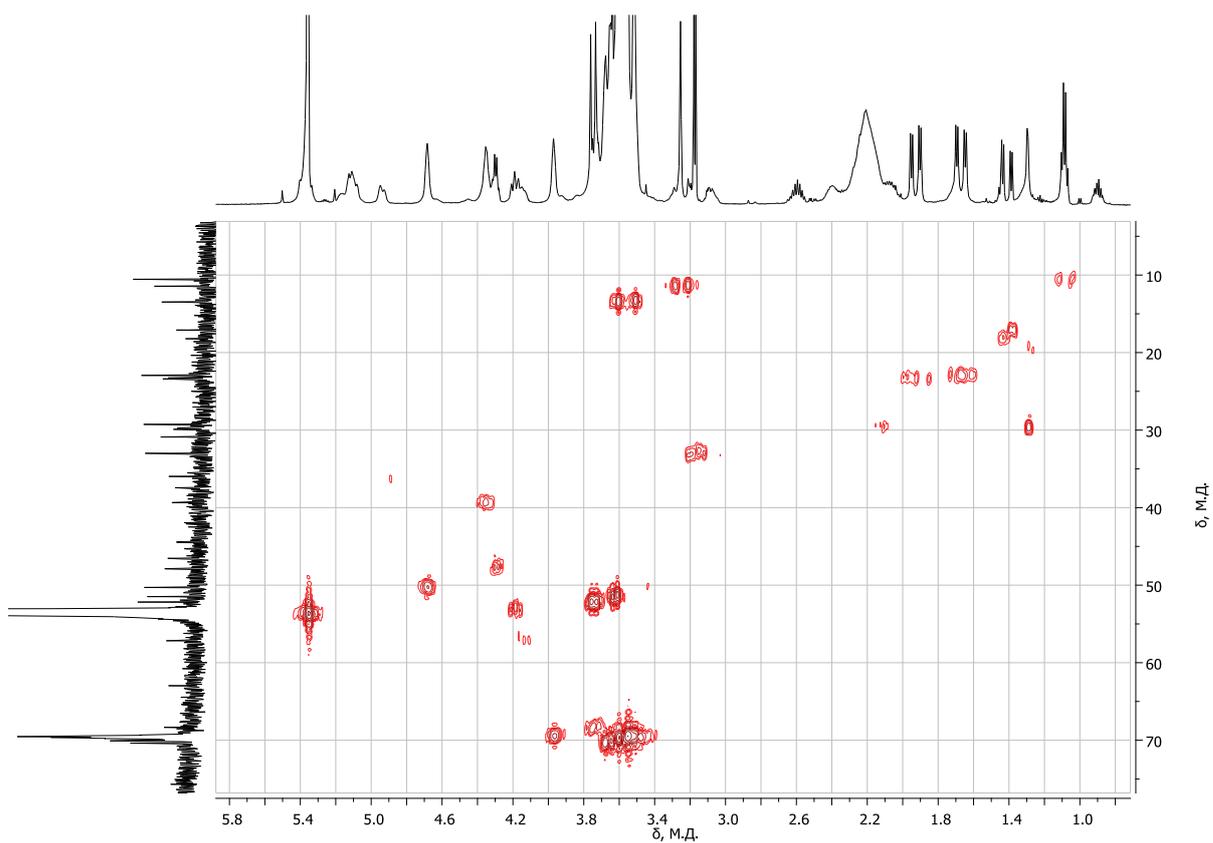


Рисунок П54 – Алифатическая область спектра HSQC соединения **33** в CD_2Cl_2

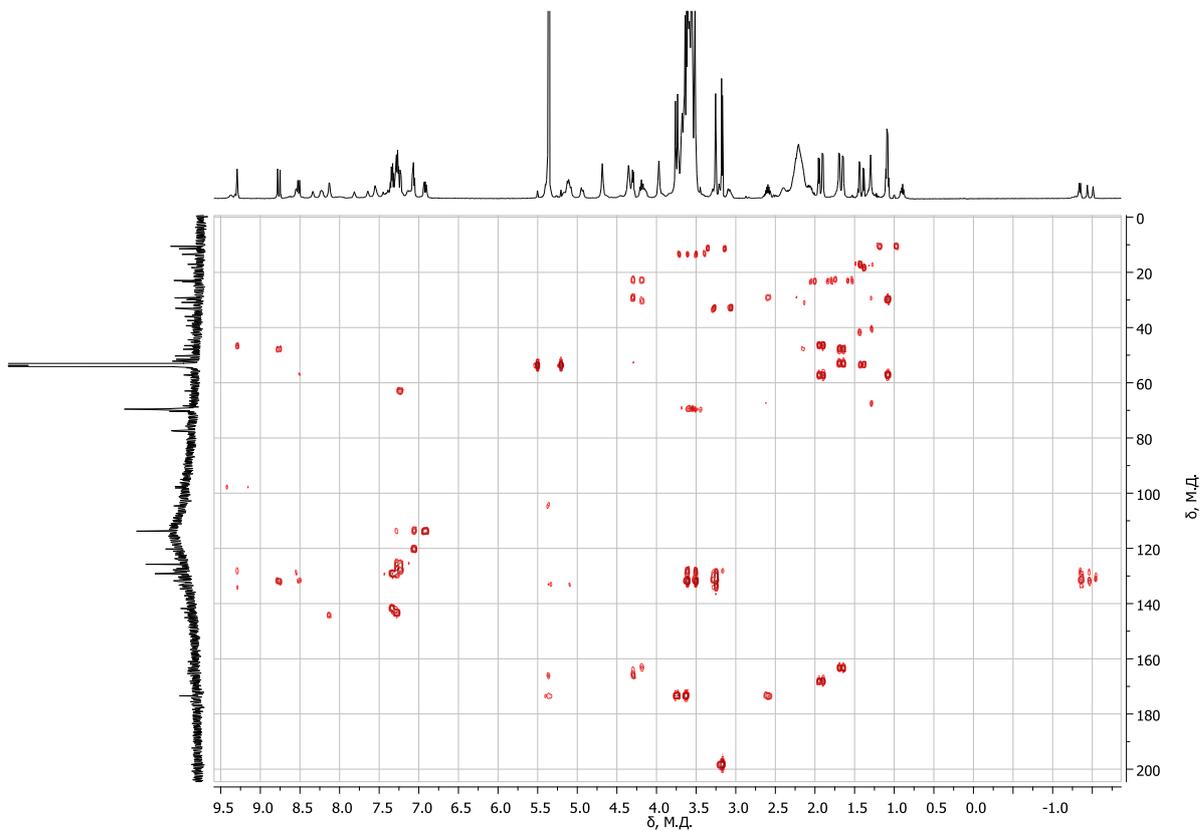


Рисунок П55 – Спектр HMBC соединения **33** в CD_2Cl_2

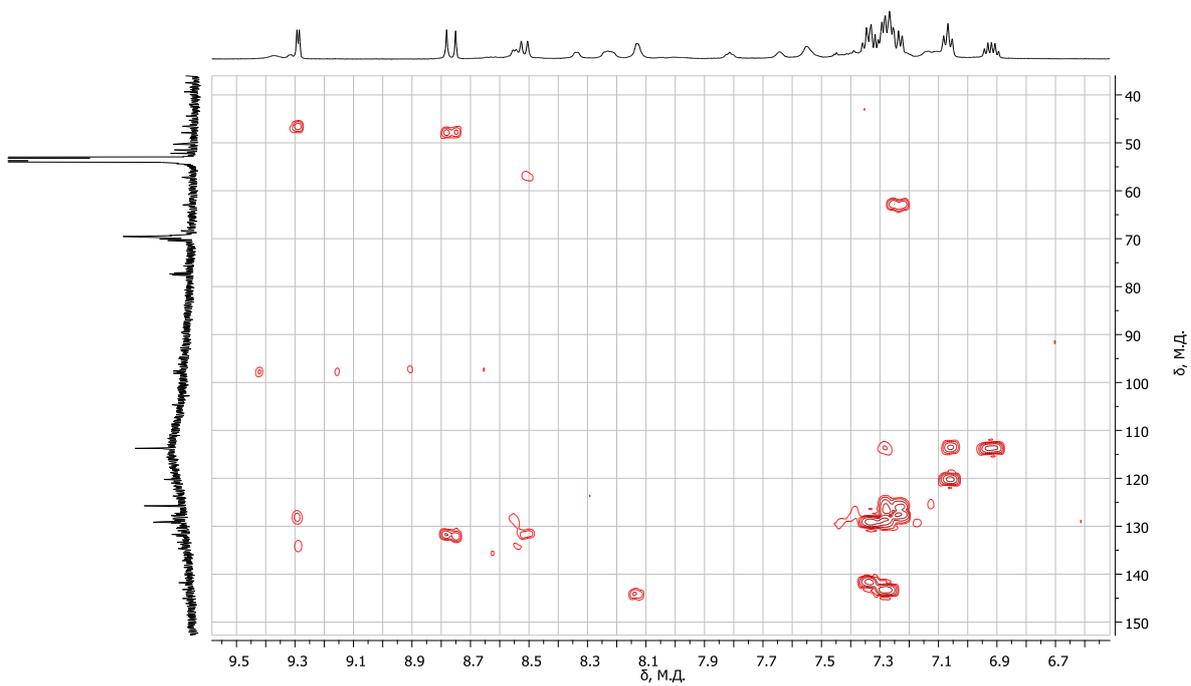


Рисунок П56 – Спектр НМВС соединения **33** в CD_2Cl_2 , ароматическая область.

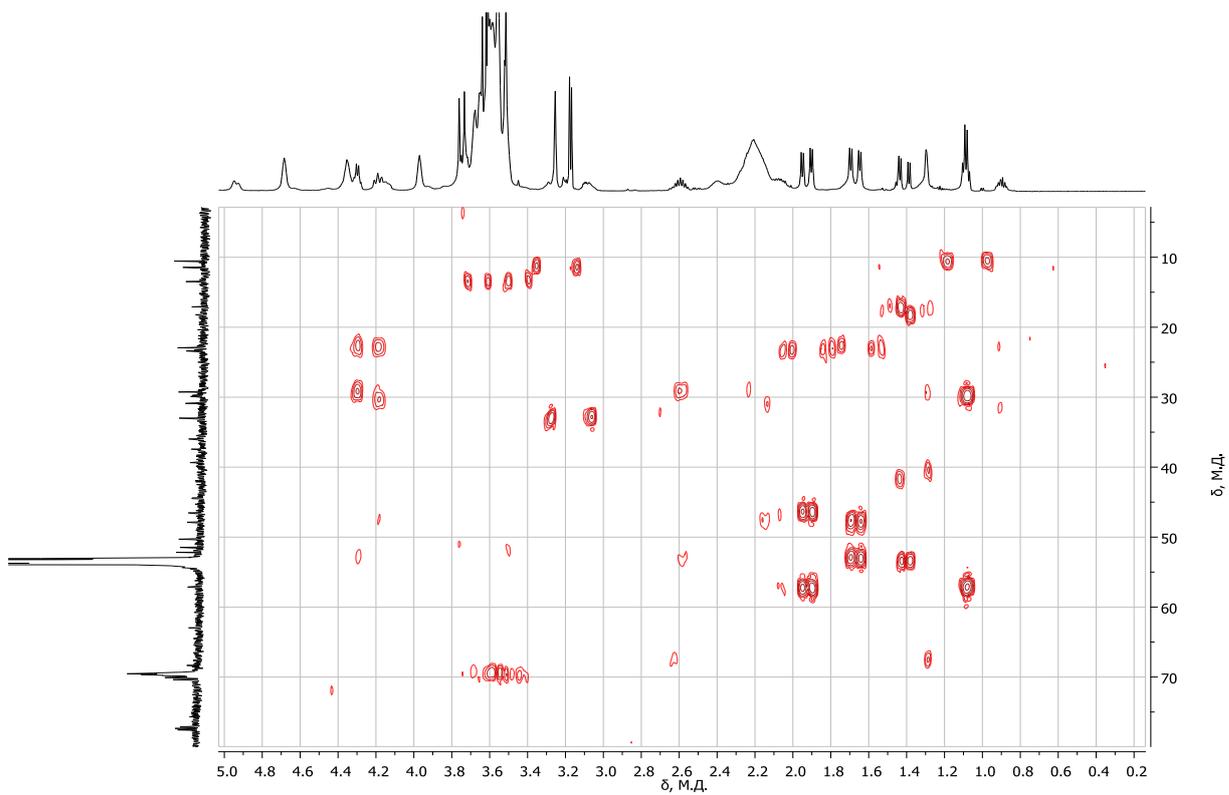


Рисунок П57 – Спектр НМВС соединения **33** в CD_2Cl_2 , алифатическая область

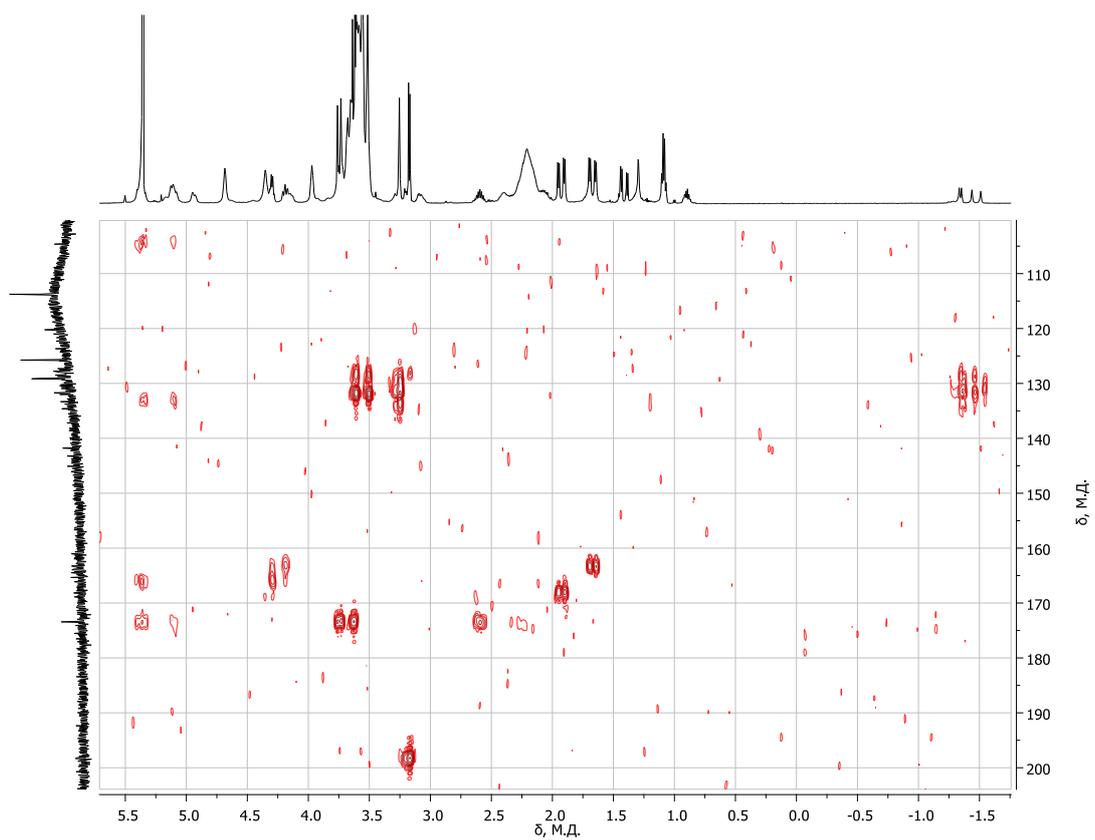


Рисунок П58 – Спектр НМВС соединения 33 в CD₂Cl₂, алифатическая область.

7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allison R.R., Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms // *Clin. Endosc.* – 2013. – Vol. 46. – P. 24-29.
2. Agostinis P., Berg K. K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., David Kessel D., Korbek M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61. – P. 250-281.
3. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruziyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J.-C., Vigny P. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6 // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – Vol. 79. – P. 172-188.
4. Sharonov G.V., Karmakova T.A., Kassies R., Pljutinskaya A.D., Grin M.A., Refregiers M., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F., Maurizot J.-C., Vigny P., Otto C., Feofanov A.V. Cycloimide bacteriochlorin p derivatives: Photodynamic properties and cellular and tissue distribution // *Free Radical Biol. Med.* – 2006. – Vol. 40. – P. 407-419.
5. James N.S., Cheruku R.R., Missert J.R., Sunar U., Pandey R.K. Measurement of cyanine dye photobleaching in photosensitizer cyanine dye conjugates could help in optimizing light dosimetry for improved photodynamic therapy of cancer // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – P. 1842-1853.
6. James N.S., Joshi P., Ohulchansky T.Y., Chen Y., Tabaczynski W., Durrani F., Shibata M., Pandey R.K. Photosensitizer (PS)-cyanine dye (CD) conjugates: impact of the linkers joining the PS and CD moieties and their orientation in tumor uptake and photodynamic therapy (PDT) // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 122. – P. 770-785.
7. Williams M.P.A., Ethirajan M., Ohkubo K., Chen P., Pera P., Morgan J, White III W.H., Shibata M., Fukuzumi S., Kadish K.M., Pandey R.K. Synthesis, photophysical, electrochemical, tumor-imaging and phototherapeutic properties of purpurinimide-N-substituted cyanine dyes joined with variable lengths of linkers // *Bioconjugate Chem.* – 2011. – Vol. 22. – P. 2283-2295.
8. James N.S., Ohulchansky T.Y., Chen Y., Joshi P., Zheng X., Goswami L.N., Pandey R.K. Comparative tumor imaging and PDT efficacy of HPPH conjugated in the

mono- and di-forms to various polymethine cyanine dyes: Part – 2 // *Theranostics*. – 2013. – Vol. 3. – Is. 9. – P. 703-718.

9. Derkacheva V.M., Mikhalenko S.A., Solov'eva L.I., Alekseeva V.I., Marinina L.E., Savina L.P., Butenin A.V., Luk'yanets E.A. Phthalocyanines and related compounds: XLIV. Synthesis of conjugates of phthalocyanines with rhodamines // *Russ. J. Gen. Chem.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1117-1125.

10. Kuznetsova N., Makarov D., V. Derkacheva V., Savvina L., Alerseeva V., Marinina L., Slivka L., Kaliya O., Lukyanets E. Intramolecular energy transfer in rhodamine–phthalocyanine conjugates // *J. Photochem. Photobiol., A*. – 2008. – Vol. 200. – P. 161-168.

11. Yanik H., Go'ksel M., Yes-ilot S., Durmus M. Novel phthalocyanine–BODIPY conjugates and their photophysical and photochemical properties // *Tetrahedron Lett.* – 2016. – Vol. 57. – P. 2922-2926.

12. Go'l C., Malkoç M., Yes-ilot S., Durmus M. Novel zinc(II) phthalocyanine conjugates bearing different numbers of BODIPY and iodine groups as substituents on the periphery // *Dyes Pigm.* – 2014. – Vol. 111. – P. 81-90.

13. Patrick L.G.F., A. Whiting A. Synthesis of some polymerisable fluorescent dyes // *Dyes and Pigments*. – 2002. – Vol. 55. – P. 123-132.

14. Stolarski R. Fluorescent naphthalimide dyes for polyester fibres // *Fibres & textiles in Eastern Europe*. – 2009. – Vol. 17. – No. 2 (73) . – P. 91-95.

15. Xiao L. X., Chen Z. J., Qu B., Luo J. X., Kong S., Gong, Q.H., Kido J.J. Recent Progresses on Materials for Electrophosphorescent Organic Light-Emitting Devices // *Adv. Mater.* – 2011. – Vol. 23. – P. 926-952.

16. Chen S., Zeng P., Wang W., Wang X., Wu Y., Lina P., Peng Z. Naphthalimide–arylamine derivatives with aggregation induced delayed fluorescence for realizing efficient green to red electroluminescence // *J. Mater. Chem. C*. – 2019. – Vol. 7. – P. 2886-2897.

17. Banerjee S., Veale E.B., Phelan C.M., Murphy S.A., Tocci G.M., Gillespie L.J., Frimannsson D.O., Kelly J.M., Gunnlaugsson T. Recent advances in the development of 1,8-naphthalimide based DNA targeting binders, anticancer and fluorescent cellular imaging agents // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 1601-1618.

18. Singh N., Srivastava R., Singh A., Singh R.K. Synthesis and Photophysical studies on naphthalimide derived fluorophores as markers in drug delivery // *J. Fluoresc.* – 2016. – Vol.26. – P. 1431-1438.
19. Mao Y., Liu K., Chen L., Cao X., Yi T. A programmed DNA marker based on bis(4-ethynyl-1,8-naphthalimide) and three-methane-bridged thiazole orange // *Chem. Eur. J.* – 2015. – Vol. 21. – P. 16623-16630.
20. Jia X., Yanga Y., Xu Y., Qian Q. Naphthalimides for labeling and sensing applications // *Pure Appl. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – P. 1237-1246.
21. Aderinto S.O., Imhanria S. Fluorescent and colourimetric 1, 8-naphthalimide-appended chemosensors for the tracking of metal ions: selected examples from the year 2010 to 2017 // *Chem. Pap.* – 2018. – Vol. 72. – Is.8. – P. 1823-1851.
22. Patel N., Pera P., Joshi P., Dukh M., Tabaczynski W.A., Sifers K.E., Kryman M., Cheruku R.R., Durrani F., Missert J.R., Watson R., Ohulchanskyy T.Y., Tracy E.C., Baumann H., Pandey R.K. Highly effective dual-function near-infrared (NIR) photosensitizer for fluorescence imaging and photodynamic therapy (PDT) of cancer // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59. – P.9774-9787.
23. Oelgemöller M., Kramer W. H. Synthetic photochemistry of naphthalimides and related compounds // *Photochem. Photobiol. C.* – 2010. – Vol. 11. – P. 210-244.
24. Panchenko P.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu V. Fluorescent and colorimetric chemosensors for cations based on 1,8-naphthalimide derivatives: design principles and optical signalling mechanisms // *Russian Chemical Reviews.* – 2014. – Vol. 83. – P.155-182.
25. Duke R. M., Veale E. B., Pfeffer F. M., Kruger P. E., Gunnlaugsson T. Colorimetric and fluorescent anion sensors: an overview of recent developments in the use of 1,8-naphthalimide-based chemosensors // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – P. 3936-3953.
26. Gopikrishna P., Meher N., Iyer P. K. Functional 1,8-Naphthalimide AIE/AIEEgens: Recent Advances and Prospects // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – Vol.10. – P.12081-12111.

27. Tandon R., Luxami V., Kaur H., Tandon N., Paul K. 1,8-Naphthalimide: A Potent DNA Intercalator and Target for Cancer Therapy // *Chem. Rec.* – 2017. – Vol.17. – P. 1-39.
28. Behr A., van Dorp W.A. Ueber Acenaphten und Naphtalsäure // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* – 1873. – Vol.6. – P.263.
29. Дашевский М.М. Аценафтен // *Изд. Химия, Москва, 1966, 450с.*
30. Manna A., Chakravorti S. Charge Transfer in 1,8-Naphthalimide: A Combined Theoretical and Experimental Approach // *Photochem. Photobiol.* – 2010. – Vol. 86. – P. 47-54.
31. Белайц И. Л., Нурмухаметов Р. Н., Шигорин Д. Н. Природа электронных полос и строение молекул α -нафтойной кислоты, нафталевого ангидрида и нафталимида // *Журн. физ. химии.* – 1969. – Т. 43. – № 4. – С. 869-874.
32. Kucheryavy P., Li G., Vyas S., Hadad C., Glusac K. D. Electronic Properties of 4-Substituted Naphthalimides // *J. Phys. Chem. A.* – 2009. – Vol. 113. – P. 6453-6461.
33. Patsenker L. D., Artyukhova Y. Ye. Molecular structure and spectral properties of thionaphthalimides // *J. Mol. Struc.* – 2003. – Vol. 655. – P. 311-320.
34. Saha S., Samanta A. Influence of the structure of the amino group and polarity of the medium on the photophysical behavior of 4-amino-1,8-naphthalimide derivatives // *J. Phys. Chem. A.* – 2002. – Vol.106. – P.4763-4771.
35. Gao Y. Q., Marcus R. A. Theoretical Investigation of the Directional Electron Transfer in 4-Aminonaphthalimide Compounds // *J. Phys. Chem. A.* – 2002. – Vol. 106. – P. 1956-1960.
36. Gao Y. Q., Marcus R. A. Theoretical Investigation of the Directional Electron Transfer in 4-Aminonaphthalimide Compounds // *J. Phys. Chem. A.* – 2002. – Vol. 106. – P. 1956-1960.
37. Saito I., Takayama M., Sugiyama H., Nakatani K. Photoinduced DNA Cleavage via Electron Transfer: Demonstration That Guanine Residues Located 5' to Guanine Are the Most Electron-Donating Sites // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – Vol. 117. – P. 6406-6407.
38. Cho D. W., Fujitsuka M., Sugimoto A., Majima T. Intramolecular Excimer Formation and Photoinduced Electron-Transfer Process in Bis-1,8-Naphthalimide Dyads

Depending on the Linker Length // *J. Phys. Chem. A.* – 2008. – Vol. 112. – P. 7208-7213.

39. Luo S., Lin J., Zhou J., Wang Y., Xingyuan Liu X., Huang Y., Lu Z., Hu C. Novel 1,8-naphthalimide derivatives for standard-red organic light-emitting device applications // *J. Mater. Chem. C.* – 2015. – Vol.3. – P. 5259-5267.

40. Lin H.-H., Chan Y.-C., Chen J.-W., Chang C.-C. Aggregation-induced emission enhancement characteristics of naphthalimide derivatives and their applications in cell imaging // *J. Mater. Chem.* – 2011. – Vol. 21. – P. 3170-3177.

41. Bian B., Ji S.-J., Shi H.-B. Synthesis and fluorescent property of some novel bischromophore compounds containing pyrazoline and naphthalimide groups // *Dyes and Pigment.* – 2008. – Vol.76 – P. 348-352.

42. Kirilova E.M.,Kalnina I. 3-Isopropoxyloxy-6-morpholino-2-phenylphenalen-1-one as lipophilic fluorescent probe for lymphocyte investigations // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 160. – P. 1744-1751.

43. Rurack K., Resch-Genger U.,Bricks J.L., Spieles M. Cation-triggered ‘switching on’ of the red/near infra-red (NIR) fluorescence of rigid fluorophore–spacer–receptor ionophores // *Chem. Commun.* – 2000. – Vol. 21. – P. 2103-2104.

44. Massoud T.F., Gambhir S.S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light // *Genes Dev.* – 2003. – Vol.17. – P. 545-80.

45. de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunlaugsson T., Huxley A. J. M., McCoy C. P., Rademache J. T., Rice T. E. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches // *Chem. Rev.* – 1997. – Vol.97. – P. 1515-1566.

46. Callan J.-F., de Silva A.P., Magri D.C. Luminescent sensors and switches in the early 21st century // *Tetrahedron.* – 2005. –Vol.61. – P.8551-8588.

47. Formica M., Fusi V., Giorgi L., Micheloni M. New fluorescent chemosensors for metal ions in solution // *Coord. Chem. Rev.* – 2012. –Vol.256. – P.170-192.

48. de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Habib-Jiwan J.-L., McCoy C. P., Rice T. E., Soumillion J.-P. New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Excited State // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1995. – Vol. 34. – P. 1728-1731.

49. Duan H. , Dinga Y., Huang C., Zhua W., Wangc R., Xu Y. A lysosomal targeting fluorescent probe and its zinc imaging in SH-SY5Y human neuroblastoma cells // *Chin. Chem.Let.* – 2019. – Vol.30. – P. 55-57.
50. Liu D.-Y., Qi J., Liu X.-Y., He H.-R., Chen J.-T., Yang G.-M. 4-Amino-1,8-naphthalimide-based fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for Zn²⁺ imaging in living cells // *Inorganic Chemistry Communications.* – 2014. – Vol.43. – P.173-178.
51. Tian Y., Su F., Weber W., Nandakumar V., Shumway B.R., Jin Y., Zhou X., Holl M.R., Johnson R.H., Meldrum D.R. A series of naphthalimide derivatives as intra and extracellular pH sensors // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – P. 7411-7422.
52. He Y., Li Z., Ji Q., Shi B., Zhang H., Wei L., Yu M. Ratiometric fluorescent detection of acidic pH in lysosome with carbon nanodots // *Chinese Chemical Letters.* – 2017. – Vol. 28. – P. 1969-1974.
53. Fu Y., Zhang J., Wang H., Chen J.-L., Zhao P., Chen G.-R., He X.-P. Intracellular pH sensing and targeted imaging of lysosome by a galactosyl naphthalimide-piperazine probe // *Dyes and Pigments.* – 2016. – Vol. 133. – P. 372-379.
54. Lee M.H., Park N., Yi C., Han J.H., Hong L.H., Kim K.P., Kang D.H., Sessler J.L., Kang C., Kim J.S. Mitochondria-Immobilized pH-Sensitive Off-On Fluorescent Probe // *J. Am. Chem. Soc.* . – 2014. – Vol. 136. – P. 14136-14142.
55. Kang L., Xing Z.-Y., Ma X.-Y., Liua Y.-T., Yu Zhang Y. A highly selective colorimetric and fluorescent turn-on chemosensor for Al³⁺ based on naphthalimide derivative // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2016. – Vol. 167. – P. 59-65.
56. Chen J.-W., Chen C.-M., Chang C.-C. A fluorescent pH probe for acidic organelles in living cells // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol. 15. – P. 7936-7943.
57. Lee M.H., Kim J.S., Sessler J.L. Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – Vol.44. – P. 4185-4191.
58. Dos Remedios C.G., Moens P.D.J. Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling

the problem of the unknown orientation factor // *J. Struct. Biol.* – 1995. – Vol. 115. – P.175-85.

59. Lakowicz J. R. *Principles of fluorescent spectroscopy*. Third Edition. – New York: Springer Science+Business Media, 2006. – 954 p.

60. Dong B., Song X., Wang C., Kong X., Tang Y., Lin W. Dual-site Controlled and Lysosome-targeted ICT-PET-FRET Fluorescent Probe for Monitoring pH Changes in Living Cells // *Anal. Chem.* – 2016. – Vol. 88. – P. 4085-4091.

61. Luo W., Jiang H., Tang X., Liu W. A reversible ratiometric two-photon lysosome-targeted probe for real-time monitoring of pH changes in living cells // *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – Vol.5. –P. 4768-4773.

62. Zhou X., Su F., Lu H., Senechal-Willis P., Tian Y., Johnson R.H., Meldrum D.R. An FRET-based ratiometric chemosensor for in vitro cellular fluorescence analyses of pH // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – P.171-180.

63. Wena J., Xia P., Zheng Z., Xu Y., Li H., Liu F., Sun S. Naphthalimide-rhodamine based fluorescent probe for ratiometric sensing of cellular pH // *Chin. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 28. – P. 2005-2008.

64. Mahato P.,Saha S., Suresh E., Di Liddo R.,Parnigotto P.P.,Conconi M.T., Kesharwani M.K.,Ganguly B., Amitava Das A. Ratiometric Detection of Cr³⁺ and Hg²⁺ by a Naphthalimide- Rhodamine Based Fluorescent Probe // *Inorg. Chem.* – 2012. – Vol. 51. – P. 1769-1777.

65. Cai Q., Yu T.,Zhu W., XuY., Qian X. A Turn-on Fluorescent Probe for Tumor Hypoxia Imaging in Living Cells // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol.51. – P. 14739-14741.

66. Tang J., Ma S., Zhang D., Liu Y., Zhao Y., Ye Y. Highly sensitive and fast responsive ratiometric fluorescent probe for Cu²⁺ based on a naphthalimide-rhodamine dyad and its application in living cell imaging // *Sensors and Actuators B: Chemical.* – 2016. – Vol. 236. – P. 109-115.

67. Liu C.,Jiao X., He S., Zhao L., Zeng X. A highly selective and sensitive fluorescent probe for Cu²⁺ based on a novel naphthalimide–rhodamine platform and its application in live cell imaging // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol.15. – P. 3947-3954.

68. Xu Z., Han S.J., Lee C., Yoon J., Spring D.R. Development of off-on fluorescent probes for heavy and transition metal ions // *Chem. Commun.* – Vol. 2010. – Vol. 46. – P. 1679-1681.
69. Yu C., Chena L., Zhang J., Li J., Liu P., Wang W., Yan B. “Off-On” based fluorescent chemosensor for Cu^{2+} in aqueous media and living cells // *Talanta.* – 2011. – Vol. 85. – P. 1627-1633.
70. Wang C., Di Zhang D., Huang X., Ding P., Wang Z., Zhao Y, Ye Y. A ratiometric fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on FRET and its application in living cells // *Sensors and Actuators B.* – 2014. – Vol. 198. – P. 33-40.
71. Song J., Huai M., Wang C., Xu C., Zhao Y., Ye Y. A new FRET ratiometric fluorescent chemosensor for Hg^{2+} and its application in living EC 109 cells // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2015. – Vol. 139. – P. 549-554.
72. Fan J., Hu M., Zhan P., Peng X. Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: construction and applications in ratiometric sensing // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 29-43.
73. Wang C., Zhang D., Huang X., Ding P., Wang Z., Zhao Y., Ye Y. A fluorescence ratiometric chemosensor for Fe^{3+} based on TBET and its application in living cells // *Talanta.* – 2014. – Vol. 128. – P.69-74.
74. Fan J., Zhan P., Hu M., Sun W., Tang J., Wang J., Sun S., Song F., Peng X. A Fluorescent Ratiometric Chemodosimeter for Cu^{2+} Based on TBET and Its Application in Living Cells // *Organic Letters.* – 2013. – Vol.15. – P. 492-495.
75. Kumar M., Kumar N., Bhalla V., Singh H., Sharma P. R., Kaur T. Naphthalimide Appended Rhodamine Derivative: Through Bond Energy Transfer for Sensing of Hg^{2+} Ions // *Org. Lett.* – 2011. – Vol.13. – P.1422-1425.
76. Yao S.-K., Ying Qian Y., Qi Z.-Q. , Lu C.-Q., Cui Y.-P. A smart two-photon fluorescent platform based on desulfurization–cyclization: a phthalimide-rhodamine chemodosimeter for Hg^{2+} NIR emission at 746 nm and through-bond energy transfer // *New J. Chem.* – 2017. – Vol. 41. – P. 13495-13503.
77. Beer P.D., Gale Ph.A. Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2001. – Vol.40. – P. 486-516.

78. Gale Ph.A. Anion receptor chemistry // *Chem. Commun.* – 2011. – Vol. 47. – P. 82-86.
79. Gunnlaugsson T., Glynn M., Tocci G.M., Kruger P.E., Pfeffer F.M. Anion recognition and sensing using luminescent and colorimetric sensors // *Coord. Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 250. – P. 3094-3117.
80. Gunnlaugsson T., Ali H.D.P., Glyn M.N., Kruger P.E., Hussey G.M., Pfeffer F.M., dos Santos C.M.G., Tierney J. Fluorescent photoinduced electron transfer (PET) sensors for anions; from design to potential application // *J. Fluoresc.* – 2005. – Vol.15. – P. 287-299.
81. Park C.H., Simmons H.E. Macrobicyclic amines. III. Encapsulation of halide ions by in,in-1,(k + 2)-diazabicyclo[k.l.m.]alkane ammonium ions // *JACS.* – 1968. – Vol.90. – P. 2431-2432.
82. Amendola V., Bergamaschi G., Miljkovic A. Azacryptands as molecular cages for anions and metal ions // *Supramolecular Chemistry.* – 2017. – Vol. 30. – P. 1-7.
83. Huston M.E., Akkaya E.U., Czarnik A.W. Chelation enhanced fluorescence detection of non-metal ions // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – Vol. 111. – P. 8735-8737.
84. Mittapalli R.R., Namashivaya S.S.R., Oshchepkov A.S., Kuczyn'ska E., Kataev E.A. Design of anion-selective PET probes based on azacryptands: the effect of pH on binding and fluorescence properties // *Chem. Commun.* – 2017. – Vol. 53. – P. 4822-4825.
85. Gunnlaugsson T., Kruger P.E., Lee T.C., Parkesh R., Pfeffer F.M. Hussey G.M. Dual responsive chemosensors for anions: the combination of fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) and colorimetric chemosensors in a single molecule // *Tetrahedron Letters.* – 2003. – Vol. 44. – P. 6575-6578.
86. Berry S.N., Soto-Cerrato V., Howe E.N.W., Clarke H.J., Mistry I., Tavassoli A., Chang Y.-T., Perez-Tomas R., Gale P.A. Fluorescent transmembrane anion transporters: shedding light on anionophoric activity in cells // *Chem Sci.* – 2016. – Vol.7. – P.5069-5077.
87. Wu D., Sedgwick A.C., Gunnlaugsson T., Akkaya E.U., Yoon J., James T.D. Fluorescent chemosensors: the past, present and future // *Chem. Soc. Rev.* – 2017. – Vol. 46. – P.7105-7123.

88. Gale P.A., Caltagirone C. Anion sensing by small molecules and molecular ensembles // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – Vol.44. – P. 4212-4227.
89. Feng G., Geng L., Wang T., Li J., Yu X., Wang Y., Li Y., Xie D. Fluorogenic and chromogenic detection of biologically important fluoride anion with schiff-bases containing 4-amino-1,8-naphthalimide unit // *Journal of Luminescence.* – 2015. – Vol. 167. – P.65-70.
90. Zheng X.,Zhu W., Liu D., Ai H., Huang Y., Lu Z. Highly Selective Colorimetric/Fluorometric Dual-Channel Fluoride Ion Probe, and Its Capability of Differentiating Cancer Cells // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2014. – Vol.6. – P. 7996-8000.
91. Zhu X., Wang J., Zhang J. 1, Chen Z., Zhang H., Zhang X.Imaging of Fluoride Ion in Living Cells and Tissues with a Two-Photon Ratiometric Fluorescence Probe // *Sensors (Basel).* – 2015. – Vol.1. – P. 1611-1622.
92. Shiraishi Y., Hayashi N., Nakahata M., Sakai S., Hirai T. Naphthalimide-coumarin conjugate: ratiometric fluorescent receptor for self-calibrating quantification of cyanide anions in cells // *RSC Adv.* – 2017. – Vol.7. – P. 32304-32309.
93. Ao X., Bright S.A., Taylor N.C., Elmes R.B.P. 2-Nitroimidazole based fluorescent probes for nitroreductase; monitoring reductive stress in cellulose // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol. 15. – P. 6104-6108.
94. Jiang Y., Cheng J., Yang C., Hu Y., Li J., Han Y., Zang Y., Xin L. X. An ultrasensitive fluorogenic probe for revealing the role of glutathione in chemotherapy resistance // *Chem. Sci.* – 2017. – 8. – P. 8012-8018.
95. Kang Y., Fan J., Jin Q., Shia C., Dua J., Peng X. A α -KA fluorescent probe for discrimination of blood cancer serum // *Chinese Chemical Letters.* – 2017. – Vol. 28. – Is. 10. – P. 1991-1993.
96. Li Z., Xu X., Leng X., He M., Wang J., Cheng S., Wu H. Roles of reactive oxygen species in cell signaling pathways and immune responses to viral infections // *Arch Virol.* – 2017. – Vol. 162. – P.603-610.
97. Liu C., Shen Y., Yin P., Li L., Liu M., Zhang Y., Li H., Yao S. Sensitive detection of acetylcholine based on a novel boronate intramolecular charge transfer fluorescence probe // *Analytical Biochemistry.* – 2014. – Vol. 465. – P. 172-178.

98. Sakhrani NM, Padh H. Organelle targeting: third level of drug targeting // *Drug Des Devel Ther.* – 2013. – Vol. 7. – P.585-99.
99. Calvaresi E.C., Hergenrother P.J. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer // *Chem. Sci.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2319-2333.
100. Calatrava-Perez E., Bright S.A., Achermann S., Moylan C., Senge M.O., Veale E.B., Williams D.C., Gunnlaugsson T., Scanlan E.M. Glycosidase Activated Release of Fluorescent 1,8-Naphthalimide Probes for Tumor Cell Imaging from Glycosylated 'Pro-probes' // *Chem. Commun.* –2016. –Vol.52. – P.13086-13089.
101. Ren M., Zhou K., He L., Lin W. Mitochondria and lysosome-targetable fluorescent probes for HOCl: recent advances and perspectives // *J. Mater. Chem. B.* – 2018. – Vol. 6. – P. 1716-1733.
102. Zhang Z., Fan J., Zhao Y., Kang Y., Du J., Peng X. A Mitochondria-accessing Ratiometric Fluorescent Probe for Imaging Endogenous Superoxide Anion in live cells and *Daphnia magna* // *ACS Sens.* –2018. –Vol.3. –P. 735-741.
103. Lou Z., Li P., Pana Q., Han K. A reversible fluorescent probe for detecting hypochloric acid in living cells and animals: utilizing a novel strategy for effectively modulating the fluorescence of selenide and selenoxide // *Chem. Commun.* –2013. – Vol.49. –P. 2445-2447.
104. Qu Z., Ding J., Zhao M., Li P. Development of a selenide-based fluorescent probe for imaging hypochlorous acid in lysosomes // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* – 2014. – Vol. 299. – P.1-8.
105. Grabowski Z.R., Rotkiewicz K. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures // *Chem. Rev.* –2003. – Vol.103. – P.3899-4031.
106. Zhu B., Li P., Shu W., Wang X., Liu C., Wang Y., Wang Z., Wang Y., Tang B. Highly Specific and Ultrasensitive Two-photon Fluorescence Imaging of Native HOCl in Lysosomes and Tissues Based on Thiocarbamate Derivatives // *Anal. Chem.* –2016. – Vol.88. – P.12532-12538.
107. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein // *Journal of Microscopy.* – 2005. – Vol. 217. – P. 3-15.

108. Xue L., Karpenko I.A., Hiblot J., Johnsson K. Imaging and manipulating proteins in live cells through covalent labeling // *Nat Chem Biol.* – 2015. – Vol. 11. – P. 917-923.
109. Qiao Q., Liu W., Chen J., Zhou W., Yin W., Miao L., Cui J., Xu Z. A naphthalimide-derived fluorogenic probe for SNAP-Tag with a fast record labeling Rate // *Dyes and Pigments.* – 2017. – Vol.147. – P. 327-333.
110. Makarov N.S., Drobizhev M., Rebane A. Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range // *Optics Express* 2008 Vol. 16, No. 6 / P. 4029-4047.
111. Wang C., Song X., Xiao Y. SNAP-tag based subcellular proteins labeling and fluorescent imaging with naphthalimides // *ChemBioChem.* – 2017. – Vol.18. – P. 1762-1769.
112. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. Супрамолекулярные агенты для тераностики // *Биоорганическая химия.* – 2015. – Т. 41. – № 5. – С. 539-552.
113. Dongbang S., Jeon H.M., Lee M.H., Shin W.S., Kwon J.K., Kang C., Kim J.S. Camptothecin delivery into hepatoma cell line by galactose-appended fluorescent drug delivery system // *RSC Adv.* – 2014. – Vol. 4. – P.18744-18748.
114. Zhang H., Fang Z. A novel glutathione-triggered theranostic prodrug for anticancer and imaging in living cells // *RSC Adv.* – 2018. – Vol.8. – P.11419-11423.
115. Strekowski L., Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: An overview // *Mutation Research.* – 2007. – Vol. 623. – P. 3-13.
116. Palchaudhuri R., Hergenrother P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2007. – Vol.6. – P. 497-503
117. Blackburn G.M., Gait M.J., Loakes D., Williams D.M. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* 3rd Edition The Royal Society of Chemistry 2006 P. 342-350.
118. Sirajuddin M., Ali S., Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2013. – Vol. 124. – P. 1-19.
119. Braña M.F., Castellano J.M., Jimenez A., Llombart A., Rabadan F.P., Roldan M., Roldan C., Santos A., Vazquez D. Synthesis, cytostatic activity and mode of action

- of a new series of imide derivatives of 3-nitro-1 α naphthalic acid // *Curr. Chemother.* – 1978. – Vol. 2. – P. 1216-1217.
120. Braña M.F., Sanz A.M., Castellano J.M., Roldán C.M, Roldan C. Synthesis and cytostatic activity of benzo(de)isoquinolin1,3-diones// *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* – 1981. – Vol. 16. – P. 207-212.
121. Braña M.F., Ramos A. Naphthalimides as Anticancer Agents: Synthesis and Biological Activity // *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents.* – 2001. – Vol.1. – P.237-255.
122. Stone R.M., Mazzola E., Neuberg D., Allen S.L., Pigneux A., Stuart R.K., Wetzler M., Rizzieri D., Erba H.P., Damon L., Jang J.-H., Tallman M.S., Warzocha K., Masszi T., Sekeres M.A., Egyed M., Horst H.-A., Selleslag D., Solomon S.R., Venugopal P., Lundberg A.S., Powell B. Phase III Open-Label Randomized Study of Cytarabine in Combination With Amonafide L-Malate or Daunorubicin As Induction Therapy for Patients With Secondary Acute Myeloid Leukemia // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 1252-1257.
123. Nitiss J.L., Soans E., Rogojina A., Seth A., Mishina M. Topoisomerase Assays // *Curr Protoc Pharmacol.* – 2012. – Chapter 3:Unit 3.3.
124. Hsiang Y-H. Jiang J.B., Liu L.F. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by amonafide and its structural analogs // *Mol. Pharmacol.* – 1989. – Vol.36. – P. 371-376.
125. Tian Z.-Y., Li J.-H., Li Q., Zang F.-L., Zhao Z.-H., Wang Ch.-J. Study on the Synthesis, Biological Activity and Spectroscopy of Naphthalimide-Diamine Conjugates // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19. – P. 7646-7668.
126. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures // *Exp. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 35. – P. 527-533
127. Tian Z., Huang Y., Zhang Y., Song, L., Qiao Y., Xu X., Wang, C. Spectroscopic and molecular modeling methods to study the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and DNA // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2016. – Vol. 158. – P. 1-15.

128. Seliga R., Pilatova M., Sarissky M., Veglasky V., Walko M., Mojzis J. Novel naphthalimide polyamine derivatives as potential antitumor agents // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – Vol. 40. – P. 4129-4137.
129. Nayab P.S., Pulaganti M., Chitta S. K., Abid M., Uddin R. Evaluation of DNA Binding, Radicals Scavenging and Antimicrobial Studies of Newly Synthesized N-Substituted Naphthalimides: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations // *Journal of Fluorescence.* – 2015. – Vol. 25. – P. 1905-1920.
130. Wang K.-R., Qian F., Sun Q., Cui-Lan Ma C.-L., Rong R.-X., Cao Z.-R., Wang X.-M., Li X.-L. Substituent Effects on Cytotoxic Activity, Spectroscopic Property, and DNA Binding Property of Naphthalimide Derivatives // *Chem. Biol. Drug. Des.* – 2016. – Vol.87. – P. 664-672.
131. Johnson Ch. A., Hudson G.A., Hardebeck L.K.E., Jolley E.A., Ren Yi, Lewis M., Znosko B.M. Effect of Intercalator Substituent and Nucleotide Sequence on the Stability of DNA- and RNA-Naphthalimide Complexes // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol.23. – P. 3586-3591.
132. Jolley E.A., Hardebeck L.K.E., Ren Yi, Adams M.S., Lewis M., Znosko B.M. The effects of varying the substituent and DNA sequence on the stability of 4-substituted DNA-naphthalimide complexes// *Biophysical Chemistry.* – 2018. – Vol.239. – P.29-37.
133. Quintana-Espinoza P., García-Luis Ángel Amesty J., Martín-Rodríguez P., Lorenzo-Castrillejo I., Ravelo A.G., Fernández-Pérez L., Machí F., Estévez-Braun A. Synthesis and study of antiproliferative, antitopoisomerase II, DNA-intercalating and DNA-damaging activities of aryl-naphthalimides // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21. – P. 6484-6495.
134. Veale E.B., Gunnlaugsson T. Synthesis, Photophysical, and DNA Binding Studies of Fluorescent Tröger's Base Derived 4-Amino-1,8-naphthalimide Supramolecular Clefts // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol.75. – P.5513-5525.
135. Rong R.-X., Sun Q., Ma C.-L., Chen B., Wang W.-Y., Wang Z.-A., Wang K.-R., Cao Z.-R., Li X.-L. Development of novel bis-naphthalimide derivatives and their anticancer properties// *Med. Chem. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 679-685.

136. Sami S. M., Dorr R. T., Alberts D. S., Remers W. A. 2-Substituted 1,2-dihydro-3H-dibenz[de,h]isoquinoline-1,3-diones. A new class of antitumor agent // *J. Med. Chem.* – 1993. – Vol. 36. – P. 765-770.
137. Bailly C., Carrasco C., Joubert A., Bal C., Wattez N., Hildebrand M.-P., Lansiaux A., Colson P., Houssier C., Cacho M., Ramos A., Braña M.F. Chromophore-Modified Bisnaphthalimides: DNA Recognition, Topoisomerase Inhibition, and Cytotoxic Properties of Two Mono- and Bisfuronaphthalimides // *Biochemistry* . – 2003. – Vol. 42. – P.4136-4150.
138. Панченко П.А., Архипова А.Н., Захарко М.А., Г. Йонушаускас Г., Федоров Ю.В., О.А. Федорова О.А. Синтез и спектральные свойства флуоресцентных красителей на основе производных 4-стирил-1,8-нафталимида // *Изв. АН. Сер. Хим.* – 2016. – № 10. – С. 2444-2450.
139. Panchenko P.A., Arkhipova A.N., Zakharko M.A., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V., Arkhipov D.E., Jonusauskas G. Controlling photophysics of styrylnaphthalimides through ICT, fluorescence and E,Z-photoisomerization interplay // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 19. – P. 1244-1256.
140. Захарко М.А., Сергеева А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез 4-стирилзамещенных 1,8-нафталимида для применения в качестве флуоресцентных навигаторов в фотодинамической терапии онкологических заболеваний // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2014. – Т. 28. – №10. – С. 49-51.
141. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез новых стироловых производных 1,8-нафталимида // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2016. – Т. 30. – №11. – С. 33-35.
142. Красовицкий Б. М., Афанасиади Л. М. Препаративная химия органических люминофоров. – Харьков: Фолио, 1997. – 208 с.
143. Дашевский М.М. Аценафтен // *Изд. Химия, Москва, 1966, 450с.*
144. Сергеева А.Н. Синтез и исследование флуоресцентных гибридных систем на основе 1,8-нафталимида // *Диссертация.* – 2015. – С. 169.
145. Heck R.F., Nolley J.P. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides // *J. Org. Chem.* – 1972. – Vol. 37. – No. 14. – P. 2320-2321.

146. Wu W., Wu W., Ji S., Guo H., Song P., Han K., Chi L., Shao J., Zhao J. Tuning the emission properties of cyclometalated platinum(II) complexes by intramolecular electron-sink/arylethynylated ligands and its application for enhanced luminescent oxygen sensing // *J. Mater. Chem.* – 2010. – Vol.43. – P. 9775-9786.
147. L.Liang, D. Astruc. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview // *Coord. Chem. Rev.* – 2011. – Vol. 255. – P. 2933-2945.
148. Singh M.S., Chowdhury S., Koley S.. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade // *Tetrahedron.* – 2016. – Vol. 72. – P. 5257-5283.
149. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides // *J. Org. Chem.* – 2002. – Vol. 67. – P.3057-3064.
150. Mukherjee A., Hazra S., Dutta S., Muthiah S., Mondhe D.M., Sharma P.R., Singh S.K., Saxena A.K., Qazi G.N., Sanyal U. Antitumor efficacy and apoptotic activity of substituted chloroalkyl 1H-benz[de]isoquinoline-1,3-diones: a new class of potential antineoplastic agents // *Invest. New Drugs.* – 2011. – Vol. 29. – P. 434-442.
151. Zhan W., Wu W., Hua J., Jing Y., Meng F., Tian H. Photovoltaic properties of new cyanine–naphthalimide dyads synthesized by ‘Click’ chemistry // *Tetrahedron Letters.* – 2007. – Vol. 48. – Is.14. – P.2461-2465.
152. Milla P., F. Dosio F., Cattel L.. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery // *Curr. Drug Metab.* – 2012. – Vol.13. – P. 105-119.
153. Tesauro D., Accardo A., Diaferia C., Milano V., Guillon J., Ronga L., Rossi F. Peptide-based drug-delivery systems in biotechnological applications: recent advances and perspectives // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – P. 351-372.
154. Миронов М.А., Бабаев Е.В. Параллельная реакция Уги в студенческих практикумах Урала и Москвы // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)* . – 2009. – Т. LIII. – № 5. – С. 133-139.
155. Simila S.T.M., Martin S.F. Applications of the Ugi reaction with ketones // *Tetrahedron Letters.* – 2008. – Vol. 49. – P. 4501-4504.

156. Traven V.F., Ivanov I.V. New reaction of photoaromatization of aryl and hetarylpyrazolines // *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* – 2008. – Vol. 57. – No. 5. – P. 1063-1069.
157. Evans N.A. Dye-sensitized photooxidation of some substituted 1,3-diphenyl-2-pyrazolines // *Aust. J. Chem.* – 1975. – Vol. 28. – P. 433-437.
158. Traven V.F., Ivanov I.V., Pavlov A.S., Manaev A.V., Voevodina I.V., Barachevskii V.A. Quantitative photooxidation of 4-hydroxy-3-pyrazolinylcoumarins to pyrazolyl derivatives // *Mendeleev Commun.* – 2007. – Vol. 17. – P. 345-346
159. Mella M., Fagnoni M., Viscardi G., Savarino P., Elisei F., Albini A. On the photochemical behavior of some diarylpyrazolines // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* – 1997. – Vol. 108. – P. 143-148.
160. Lippert Von E. Spektroskopische Bestimmung des Dipolomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singluettzustand // *Z. Electrochem.* – 1957. – Vol. 61. – P. 962-975.
161. Mataga N., Kaifu Y. Koizumi M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipole moments of excited molecules // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1956. – Vol. 29. – P. 465-470.
162. Demets G. J.-F., Triboni E.R., Alvarez E.B., Arantes G. M., Filho P. B., Politi M. J. Solvent influence on the photophysical properties of 4-methoxy-N-methyl-1,8-naphthalimide // *Spectrochim. Acta A.* – 2006. – Vol.63. – P. 220-226.
163. Li Z., Yang Q., Chang R., Ma G., Chen M., Zhang W. N-heteroaryl-1,8-naphthalimide fluorescent sensor for water: molecular design, synthesis and properties // *Dyes Pigm.* – 2011. – Vol. 88. – P. 307-314.
164. Дмитрук С. Л., Дружинин С. И., Минакова Р. А., Бедрик А. И., Ужинов Б. М. Безызлучательная дезактивация возбужденных молекул 4-аминонафталимидов // *Изв. АН, Сер. Хим.* – 1997. – № 12. – С. 2140-2144
165. Медных Ю. А., Манаев Ю. А., Волчков В. В., Ужинов Б. М. Влияние конфигурации аминогруппы на эффективность флуоресценции производных 4-аминонафталимида // *Журн. общ. химии.* – 2004. – Т. 74. – Вып. 11. – С. 1858-1863.
166. Rettig W. Photoinduced charge separation via twisted intramolecular charge-transfer states // *Top. Curr. Chem.* – 1994. – Vol. 169. – P. 253-299.

167. Rettig W., Lippert E. Twisting relaxation and dual fluorescence of p-N,N-dialkylaminobenzonitriles // *J. Mol. Struct.* – 1980. – Vol. 61. – P. 17-22.
168. Parusel A. B. J. Excited state intramolecular charge transfer in N,N-heterocyclic-4-aminobenzonitriles: a DFT study // *Chem. Phys. Lett.* – 2001. – Vol. 340. – P. 531-537.
169. Arkhipova A.N., Panchenko P.A., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Relationship between the photochromic and fluorescent properties of 4-styryl derivatives of N-butyl-1,8-naphthalimide // *Mendeleev Commun.* – 2017. – Vol. 27. – P. 53-55.
170. Panchenko P.A., Grin M.A., Fedorova O.A., Zakharko M.A., Pritmov D.A., Mironov A.F., Arkhipova A.N., Fedorov Yu.V., Jonusauskas G., Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Ignatova A.A., Feofanov A.V. Novel Bacteriochlorin–Styrylnaphthalimide Conjugate for Simultaneous Photodynamic Therapy and Fluorescence Imaging // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol.19. – P. 30195-30206.
171. Захарко М.А., Архипова А.Н., Панченко П.А., Федорова О.А. Синтез и исследование оптических свойств конъюгата бактериохлорина и красителя на основе нафталимида для комбинированной фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики рака // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2017. – Т. 31. – №12. – С. 45-47.
172. Захарко М.А., Панченко П.А., Федорова О.А. Изучение влияния природы спейсерной группы на эффективности переноса энергии в конъюгатах бактериохлорина и нафталимида // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2018. – Т. 32. – №5. – С. 76-78.
173. Миронов А.В. Фотодинамическая терапия рака - новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // *Соросовский образовательный журнал.* – 1996. – №8. – С. 32-40.
174. Лукьянец Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика.* – 2013. – № 3. – С. 3-16.
175. Pandey R.K., James N.S., Chen Y., Missert J., Sajjad M. Bifunctional agents for imaging and therapy // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol.635. – P.223-259.
176. Грин М.А. Синтез модифицированных природных хлорофиллов и изучение их свойств для бинарных методов терапии в онкологии: Дис. канд. хим. наук. – М., 2010. – 264 с.

177. Drogat N., Gady C., Granet R., Sol V. Design and synthesis of water-soluble polyaminatedchlorins and bacteriochlorins *e* with near-infrared absorption // *Dyes and Pigments*. – 2013. – Vol. 98. – P. 609-614.
178. Drogat N., Gady C., Granet R., Sol V. Design and synthesis of water-soluble polyaminatedchlorins and bacteriochlorins *e* with near-infrared absorption // *Dyes and Pigments*. – 2013. – Vol. 98. – P. 609-614.
179. Lakowicz J. R. Principles of fluorescent spectroscopy. – New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 1999. – 725 p.
180. Panchenko P.A., Sergeeva A.N., Fedorova O.A., Fedorov Y.V., Reshetnikov R.I., Schelkunova A.E., Grin M.A., Mironov A.F., Jonusauskas G. Spectroscopical study of bacteriopurpurinimide–naphthalimide conjugates for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. – 2014. – Vol. 133. – P. 140–144.
181. Williams M.P.A., Ethirajan M., Ohkubo K., Chen P., Pandey R.K. Synthesis, Photophysical, electrochemical, tumor-imaging, and phototherapeutic properties of purpurinimide-N-substituted cyanine dyes joined with variable lengths of linkers// *Bioconjugate Chem*. – 2011. – Vol.22. – P. 2283-2295.
182. Красновский А.А. Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии: Монография: В 2-х т.: Т. 1 / Под ред. А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова. – М.: МАКС Пресс, 2015. – 448 с.
183. Ovechkin A.S., Kartsova L.A. Methods for the detection and determination of singlet oxygen // *J. Analyt. Chem*. —2015. —Vol. 70. — № 1. — P. 1-4.
184. Spiller W., Kliesch H., Wöhrle D., Hackbarth S., Röder B., Schnurpfeil G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions // *J. Porphyr. Phthalocyanines*. — 1998. —Vol. 2. — P. 145-158.
185. Krasnovsky A.A. Jr., Kozlova A.S., Roumbal Ya.V. Photochemical investigation of the IR absorption bands of molecular oxygen in organic and aqueous environment // *Photochem. Photobiol. Sci*. — 2012. — Vol.11. — P. 988-997.
186. Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. – 1993. – Vol. 22. – P. 113-262.

187. Ruggiero E., Alonso-de Castro S., Habtemariam A., Salassa L. Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: new opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry // Dalton Trans. – 2016. – Vol.45. – P.13012-13020.
188. Dabrowski J.M., Pucelik B., Regiel-Futyra A., Brindell M., Mazuryk O., Kyzioł A., Stochel G., Macyk W., Arnaut L.G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers // Coord. Chem. Rev. – 2016. – Vol. 325. – P. 67-101.
189. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. Evaluation of the Probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress // Chem. Res. Toxicol. – 1992. – Vol. 5. – P.227-231.
190. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012, С. 657-671.
191. Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Плютинская А.Д., Страмова В.О., Воронцова М.С., Панкратов А.А., Якубовская Р.И., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., каприн А.Д. Доклиническое изучение препарата «Бактериосенс», предназначенного для фотодинамической терапии злокачественных новообразований, в том числе рака предстательной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 55-64.
192. Francés-Soriano L., Zakharko M.A., González-Béja M., Panchenko P.A., Herranz-Pérez V., Pritmov D.A., Grin M.A., Mironov A.F., García-Verdugo J.M., O.A. Fedorova O.A., Pérez-Prieto J. Anano hybrid for photodynamic therapy and fluorescence imaging tracking without therapy // Chem. Mater. – 2018. – Vol.30. – P. 3677-3682.
193. Valeur B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. – Weinheim: Wiley-VCH, 2006. – 387 p.
194. Zhou J., Liu Q., Feng W., Su Y., Fuyou Li F. Upconversion luminescent materials: advances and applications // Chem. Rev. – 2015. – Vol.115. – P. 395-465.

195. Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy // *Chem. Rev.* – 2016. – Vol.116. – P. 2826-2885.
196. González-Béja M., Liras M., Francés-Soriano L., Voliani V., Herranz-Pérez V., Duran-Moreno M., Garcia-Verdugo J.M., Alarcon E.I., Scaiano J.C., Pérez-Prieto J. NIR excitation of upconversion nanohybrids containing a surface grafted Bodipy induces oxygen-mediated cancer cell death // *J. Mater. Chem. B.* – 2014. – Vol.2. – P. 4554-4563.
197. Papadopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N., Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* – 1994. – Vol. 177. – P. 101-111 .
198. Qin J.-C., Yan J., Wang, B., Yang Z.-Y. Rhodamine-naphthalene conjugate as a novel ratiometric fluorescent probe for recognition of Al^{3+} // *Tetrahedron Letters.* – 2016. – Vol. 57. – Is.17. – P.4327-4330.
199. Zhu W., Yao R., Tian H. Synthesis of novel electro-transporting emitting compounds // *Dyes Pigm.* – 2002. – Vol. 54. – P. 147-154.
200. Niu C.-G., Guan A.-L., Zeng G.-M., Yun-Guo Liu Y.-G., Huang G.-H., Gao P.-F., Gui X.-Q. A ratiometric fluorescence halide sensor based on covalently immobilization of quinine and benzothioxanthene // *Analytica Chimica Acta.* – 2005. – Vol. 547. – P. 221-228.
201. Hamilton G. R. C., Fullerton L., McCaughan B., Donnelly R.F., Callan J.F. A ratiometric fluorescent hydrogel sensor for zinc(II) based on a two fluorophore approach // *New Journal of Chemistry.* – 2014. – Vol. 38. – Is. 7. – P. 2823-2830.
202. Nad S., Kumbhakar M., Pal H. Photophysical Properties of Coumarin-152 and Coumarin-481 Dyes: Unusual Behavior in Nonpolar and in Higher Polarity Solvents // *J. Phys. Chem. A.* – 2003. – Vol.107. – P. 4808-4816.
203. Renschler C. L., Harrah L. A. Determination of quantum yields of fluorescence by optimizing the fluorescence intensity // *Anal. Chem.* – 1983. – Vol. 55. – P. 798-800.
204. Bulgakov R.A., Kuznetsova N.A., Dolotova O.V., Shevchenko E.N., Plyutinskaya A.D., Kaliya O.L., Nyokong T. Covalent Conjugates of Ammine and Diamine Platinum(II) with Zinc(II) Octacarboxyphthalocyanine // *Macroheterocycles.* – 2012. – Vol.5. – P. 350-357.