

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

---

На правах рукописи

**МЯСНЯНКО Иван Николаевич**

**Производные хромофоров флуоресцентных белков  
как флуорогенные красители для белка FAST**

Специальность 1.4.9 – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель  
к.х.н. Баранов Михаил Сергеевич

Москва – 2021г.

## Содержание

Введение .....	3
Глава 1. Обзор литературы .....	6
1.1. Генетически кодируемые флуоресцентные метки .....	6
1.1.1. Пептиды .....	7
1.1.2. Флуоресцентные белки .....	9
1.1.3. Самомодифицирующиеся и флуороген-активирующие белки .....	13
1.2. Синтез и модификации 4-бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	19
1.2.1. Методы синтеза 4-бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	20
1.2.2. Модификации 4-бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	30
Глава 2. Обсуждение результатов .....	35
2.1. Новые методы синтеза и модификации бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	36
2.1.1. Синтез 4-арилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов с помощью реакции <i>O</i> -алкилирования амидоацетатов .....	36
2.1.2. Синтез циклических амидов 4-арилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов с использованием реакции окисления диоксидом селена .....	42
2.2. Новые флуорогены белка FAST .....	45
2.2.1. Поиск новых флуорогенов для белка FAST среди различных 4-гидроксibenзилиденимидазолонов .....	47
2.2.2. Расширение палитры флуорогенов для белка FAST .....	59
Глава 3. Экспериментальная часть .....	65
3.1. Материалы и оборудование .....	65
3.2. Синтез .....	66
3.2.1. Синтез кетопроизводных 4-бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	66
3.2.2. Синтез имидных производных 4-бензилиден-1 <i>H</i> -имидазол-5(4 <i>H</i> )-онов .....	85
3.2.3. Синтез флуорогенов белка FAST на основе бензилиденимидазолонов .....	95
3.3. Изучение оптических свойств .....	131
3.4. Изучение взаимодействия белка FAST с флуорогенами .....	132
Выводы .....	133
Благодарности .....	134
Список работ, опубликованных по теме диссертации .....	135
Список сокращений и условных обозначений .....	136
Список литературы .....	137

## Введение

Исследование сложных комплексных процессов, происходящих в живых системах, невозможно без детального наблюдения перемещений и взаимодействий биологических молекул. Так как большая часть биологических объектов бесцветна, прямое рассмотрение таких процессов является затруднительным без введения в систему метки. Одним из распространенных методов визуализации вводимых меток является флуоресцентная микроскопия, а в качестве меток при этом используются различные флуорофоры. В настоящее время самой популярной флуоресцентной меткой являются генетически кодируемые флуоресцентные белки семейства GFP. Это особое семейство белков, которые способны поглощать и излучать свет благодаря присутствию внутри белка небольшой молекулы – хромофора. Изменение структуры хромофора приводит к изменению флуоресцентных свойств белка, благодаря чему сейчас доступно множество мутантных вариантов флуоресцентных белков, имеющих самую различную окраску. Однако применение этих белков имеет некоторые ограничения. Образование хромофора требует присутствия кислорода и занимает определенное время. Значительный размер флуоресцентных белков, более 220 аминокислот, может существенным образом нарушить функции меченого биологического объекта. Поэтому работы, направленные на разработку новых методов и совершенствование уже существующих систем флуоресцентного мечения по-прежнему являются важными и актуальными.

Новым типом генетически кодируемых флуоресцентных меток стали так называемые флуороген-активирующие белки. Такие белки сами по себе бесцветны и не содержат хромофорной группы, однако они способны образовывать комплексы с флуорогенами. В свою очередь флуорогены, которые являются низкомолекулярными соединениями, проявляют крайне слабую флуоресценцию в растворах, однако приобретают ее при связывании с целевым объектом – флуороген-активирующим белком. Такая система мечения удачно сочетает в себе достоинства генетически кодируемых меток и химических маркеров, а потому имеет высокий потенциал в практическом применении.

Одним из перспективных флуороген-активирующих белков, созданных на текущий момент, является белок под названием FAST (от англ. Fluorescence-activating and Absorption-Shifting Tag). Этот белок образует флуоресцентные комплексы при взаимодействии с производными 4-гидроксибензилиденроданина. На его основе было разработано множество подходов к флуоресцентному мечению и показана его высокая эффективность в сравнении с классическими флуоресцентными белками. Тем не менее, на данный момент метки, разработанные на основе этого и других флуороген-активирующих белков, существенно ограничены по цветовому разнообразию. В частности, крайне востребованной является

разработка меток, флуоресцирующих в длинноволновой области спектра, где поглощение света биологическими объектами минимально.

Производные хромофоров флуоресцентных белков, имеющие химическую структуру арилиденимидазолонов, являются перспективными кандидатами на роль флуорогенов. Синтезированные в свободном от белка виде, эти вещества зачастую практически нефлуоресцентны в растворах. Однако внутренняя или внешняя фиксация молекулы приводит к значительному росту квантового выхода флуоресценции. Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования зависимости оптических свойств таких соединений от их строения, в результате чего было показано, что введение различных заместителей в такие молекулы позволяет получить вещества с самой разной окраской. Высокое структурное подобие арилиденимидазолонов и 4-гидроксibenзилиденроданинов позволяет предположить, что они могут выступать в роли флуорогенных красителей для белка FAST.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы стало создание новых флуорогенов для белка FAST на основе производных хромофоров флуоресцентных белков. В рамках поставленной цели были определены следующие задачи:

- Разработка новых методов синтеза и модификации производных хромофоров флуоресцентных белков.
- Синтез первичной библиотеки веществ, являющихся потенциальными флуорогенами для белка FAST.
- Проведение скрининга и выявление соединений, демонстрирующих эффективное связывание и увеличение интенсивности флуоресценции при взаимодействии с белком FAST.
- Выявление взаимосвязи между строением веществ, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов.
- Создание расширенной библиотеки соединений на основе выявленных закономерностей, направленное на увеличение цветового разнообразия флуорогенов для белка FAST.
- Проведение скрининга расширенной библиотеки. Выявление наиболее эффективных флуорогенов. Подробное изучение оптических свойств комплексов всех выявленных флуорогенов с флуороген-активирующим белком FAST.
- Определение возможности применения всех выявленных флуорогенов в качестве флуоресцентной метки в живых системах.

В результате проведенной работы, были разработаны новые методы синтеза ранее труднодоступных производных хромофоров флуоресцентных белков, создана большая библиотека потенциальных флуорогенов и выявлены соединения, эффективно взаимодействующие с белком FAST. В результате анализа полученных данных был проведён

синтез расширенной библиотеки соединений и выявлено множество эффективных флуорогенов, имеющих самую разную окраску.

Впервые в данной работе была показана возможность использования производных хромофоров флуоресцентных белков в роли флуорогенов белка FAST. Доступность методов их синтеза и модификаций позволяет легко варьировать оптические свойства их комплексов с белком и тем самым создавать флуоресцентные метки, которые могут быть использованы для многоцветного мечения в живых системах.

Синтез новых соединений осуществлялся с привлечением классических методов органической химии. Строение всех новых соединений было подтверждено с помощью методов  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Оптические свойства соединений и их комплексов были изучены с помощью классических подходов оптической спектроскопии. Нарботка белка FAST и проведение исследований живых объектов с помощью флуоресцентной микроскопии проведено коллегами из Лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов и Группы молекулярных меток для оптической наноскопии ИБХ РАН.

Следующие положения выносятся на защиту:

- Реакция *O*-алкилирования амидоацетатов с помощью солей триэтиоксония может быть использована для синтеза бензилиденимидазолонов, с различными заместителями во втором положении имидазолонового цикла.

- Окисление бензилиденимидазолонов диоксидом селена может быть использовано для создания широкого набора замещенных производных, отличающихся заметным батохромным смещением максимумов абсорбции и эмиссии.

- Производные хромофоров флуоресцентных белков могут быть использованы в качестве перспективных лигандов флуороген-активирующего белка FAST.

Основные результаты работы были доложены на конкурсе молодых ученых в рамках XXXII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020), а также на конкурсе молодых ученых в рамках XXXIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2021). По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Генетически кодируемые флуоресцентные метки

Изучение сложных процессов происходящих внутри живых клеток и организмов невозможно без использования тех или иных меток. Среди известных на данный момент способов мечения особое место занимают флуоресцентные маркеры, применяемые для визуализации с помощью флуоресцентной микроскопии. Благодаря высокой специфичности и чувствительности этот метод визуализации стал самым популярным. Особенно важным этапом в развитии технологии флуоресцентного мечения стало создание генетически кодируемых меток.

Основной принцип работы систем визуализации на основе генетически кодируемых меток заключается в том, что в исследуемый белок встраивается либо сама флуоресцентная метка, либо определенный фрагмент, способный связаться с флуоресцентной меткой.

Генетически кодируемые метки можно разделить на несколько групп. Во-первых, в роли меток могут быть использованы пептиды, которые тем или иным образом могут быть помечены флуоресцентным красителем. Во-вторых, могут применяться флуоресцентные белки, изначально проявляющие флуоресценцию. В-третьих, могут использоваться флуороген-активирующие или самомодифицирующиеся белки, которые требуют применения флуорогенных красителей или других специфических соединений. Среди прочих меток можно также отметить, использование неприродных аминокислот, однако они не получили широкого распространения из-за низкой специфичности, высокого фонового сигнала и трудоемкости при работе с клетками млекопитающих. Поэтому в данном разделе мы подробно остановимся только на первых группах.

### 1.1.1. Пептиды

Введение в аминокислотную последовательность пептидной метки, благодаря ее небольшому размеру, наименьшим образом способно повлиять на формирование и функциональность интересующего белка. Однако сами такие аминокислотные остатки не обладают достаточно интенсивной флуоресценцией, поэтому к встроенному пептиду необходимо присоединить дополнительный светящийся фрагмент. Для решения этой задачи были разработаны разные методы. Первая система мечения была основана на использовании пептида, содержащего четыре остатка цистеина. Этот участок может специфически связываться с мышьяк-содержащим красителем, а именно красителем, в состав которого входит дитиоарселановый фрагмент [1]. Также были разработаны пептиды для нековалентного связывания белков с металл-содержащей флуоресцентной меткой. Два остатка гистидина связывают красители, содержащие никель, а последовательность из четырех остатков аспартата позволяет связывать ионы цинка [2]. Однако такие метки, особенно цистеиновые, из-за наличия распознаваемого фрагмента в нецелевых белках могут приводить к неспецифическому окрашиванию и появлению фоновой флуоресценции.

Повысить селективность мечения пептидов можно при использовании высокоспецифичных ферментов, катализирующих реакции посттрансляционной модификации. Одним из первых ферментов такого типа стал фермент биотинлигаза, который ковалентно связывает биотин с определенным остатком лизина. Биотин в свою очередь может быть помечен окрашенным стрептовидином [3]. Однако более удобным методом стало создание мутантной формы биотинлигазы, которая вместо биотина распознает его аналог, содержащий азидную группу [4]. Азидная группа в свою очередь может быть специфично модифицирована флуоресцентной меткой, содержащей циклооктиновый фрагмент:

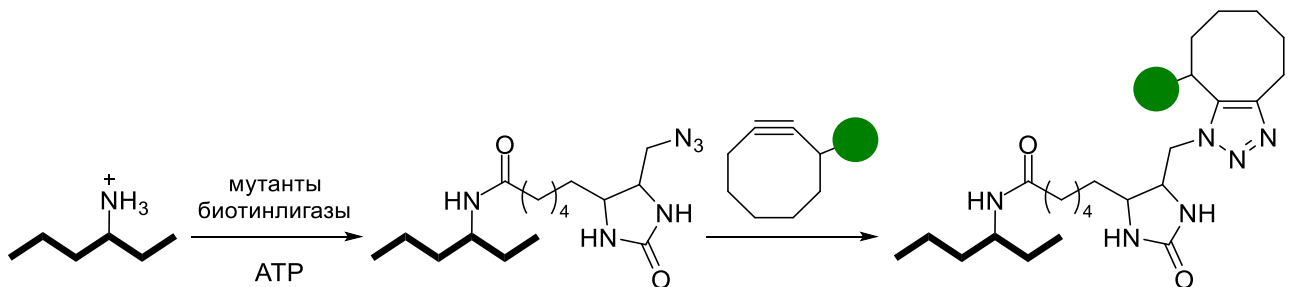


Схема 1.1. Присоединение флуоресцентной метки с использованием производного биотина, содержащего азидогруппу.

Другим ферментом для флуоресцентного мечения пептидов стала лигаза липоевой кислоты. Было установлено, что этот фермент может связывать не только липоевую кислоту, но и азидные производные алифатических карбоновых кислот. Затем был разработан ряд мутантов, позволивших существенно усовершенствовать данную технологию. Мутанты W37V-LpIA и W37I-LpIA ковалентно связывают флуоресцентное производное 7-гидроксикумарина, содержащее карбоксильную группу, с остатком лизина в распознаваемом пептиде [5]. Мутант с заменами в 20-ом, 147-ом и 149-ом положениях способен распознавать карбоксильный аналог резорурфина [6]:

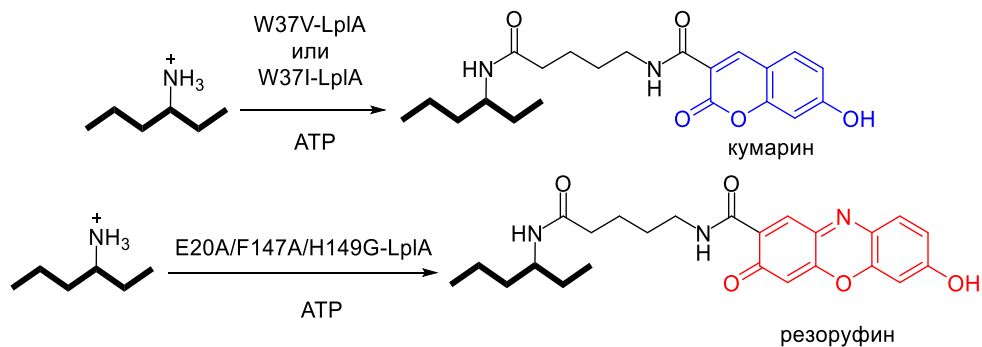


Схема 1.2. Присоединение производных кумарина и резорурфина с использованием мутантов лигазы липоевой кислоты.

При таком способе мечения размер модификаций белка интереса достаточно мал. Тем не менее, необходимость дополнительного введения лигазы, а также проведения процедур отмывки избыточного количества красителя заметно сказываются на свойствах и искажают поведение исследуемого живого объекта, что существенным образом ограничивает применимость таких методов.



### 1.1.2. Флуоресцентные белки

Флуоресцентные белки на данный момент являются основным инструментом визуализации в биологических исследованиях. Эти белки способны автокаталитически в присутствии кислорода формировать хромофор из собственных аминокислот (схема 1.3). Именно хромофор отвечает за способность этих белков поглощать и испускать свет. Процесс образования хромофора практически независим от того в какой системе экспрессируется ген [7,8].

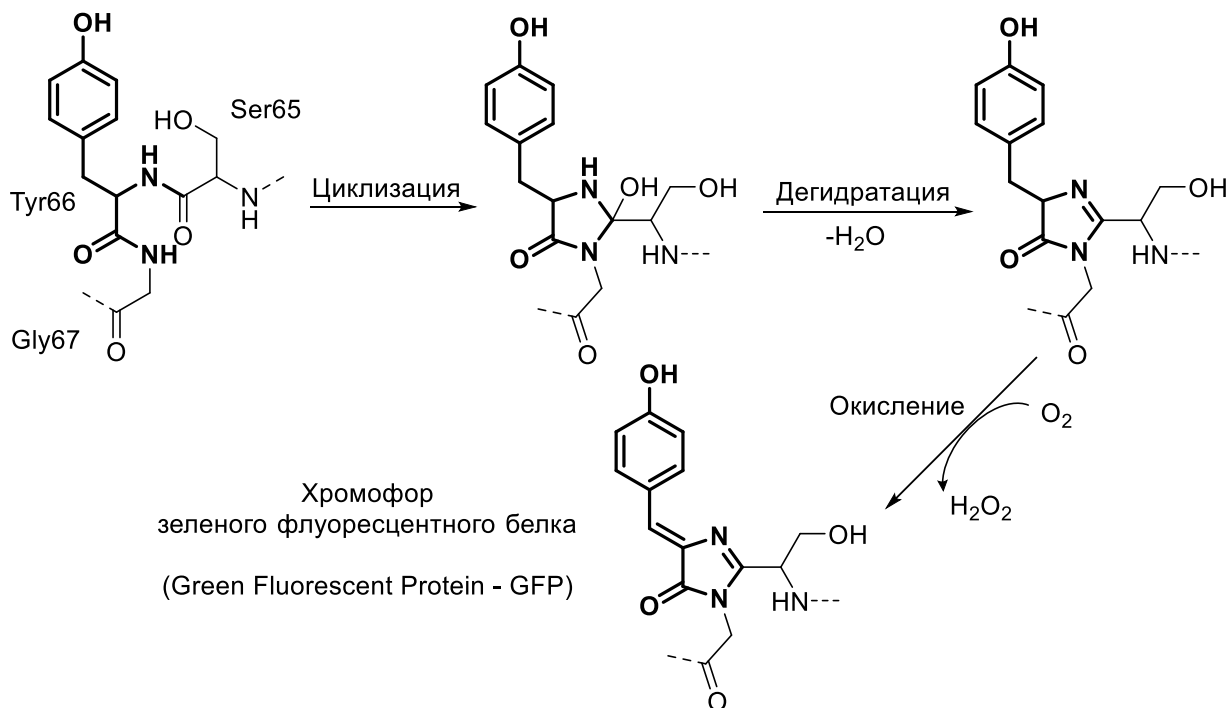


Схема 1.3. Механизм формирования хромофора флуоресцентного белка на примере белка GFP.

Осаму Шимомура в 1962 году в ходе исследований, посвященных биолюминесценции медузы *Aequorea victoria*, выделил первый флуоресцентный белок – Green Fluorescent Protein (GFP, зеленый флуоресцентный белок, схема 1.3) [9]. В 1992 году Дугласом Прашером ген GFP был клонирован [10]. В 1994 году было предложено, использовать белок GFP как генетически кодируемую метку [11,12]. Позднее были получены первые кристаллографические данные GFP, которые прояснили процесс формирования хромофора и влияние окружения на его флуоресцентные свойства [13,14].

Присутствие в 66 положении тирозина позволяет хромофору белка GFP ионизироваться при физиологических значениях pH (схема 1.4). В белке нейтральная и анионная формы хромофора существуют в состоянии равновесия благодаря аминокислотному окружению [15]. При этом спектральные максимумы аниона в сравнении с нейтральной формой заметно смещены в более длинноволновую область:

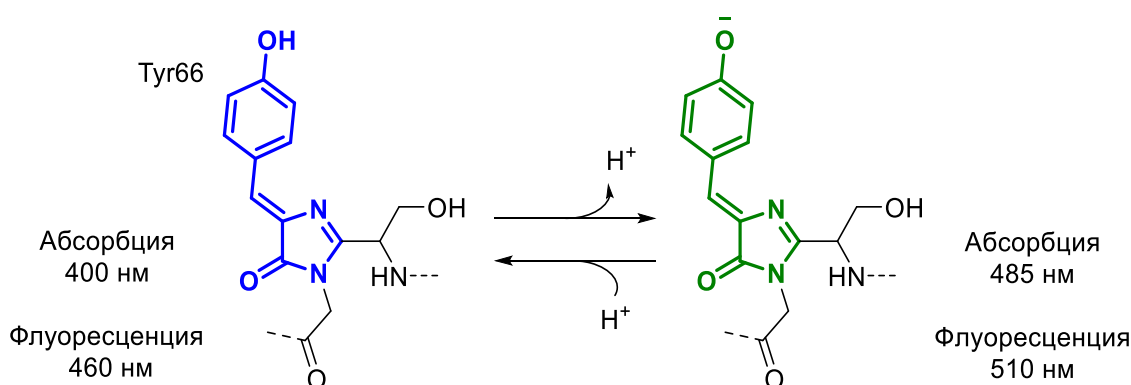


Схема 1.4. Переход хромофора белка GFP от нейтральной формы к анионной.

В лаборатории Роджера Тсьена было исследовано влияние различных мутаций белка GFP на его флуоресцентные свойства [15]. В частности, были изучены мутанты белка GFP, в которых тирозин-66 был заменен на другие ароматические аминокислотные остатки. Введение триптофана, гистидина или фенилаланина привело к заметному гипсохромному смещению флуоресценции (схема 1.5) [16,17]. А замена треонина-203 (аминокислоты из окружения хромофора) на тирозин привела к батохромному сдвигу за счет образования стекинг-взаимодействия с тирозином-66 [14]. В результате были получены мутанты с цветом флуоресценции от синего до желтого:

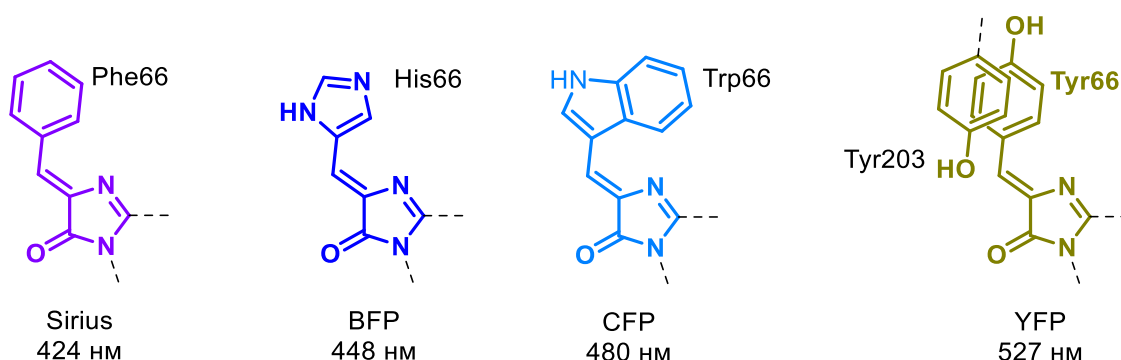


Схема 1.5. Хромофоры мутантов белка GFP (здесь и далее на схемах приведены максимумы флуоресценции).

Красные флуоресцентные белки впервые были получены Михаилом Матцем клонированием из кораллов в 1999 году [18]. Эти белки имеют красную флуоресценцию благодаря более длинной системе сопряжения двойных связей хромофора. Формирование хромофора белка DsRed включает дополнительную стадию окисления N-С $\alpha$ -связи 65-ой аминокислоты с образованием двойной связи (схема 1.6) [19]. А при образовании хромофора белка Kaede эта связь разрывается и гистидин-65 входит в  $\pi$ -систему сопряжения всего хромофора [20]:

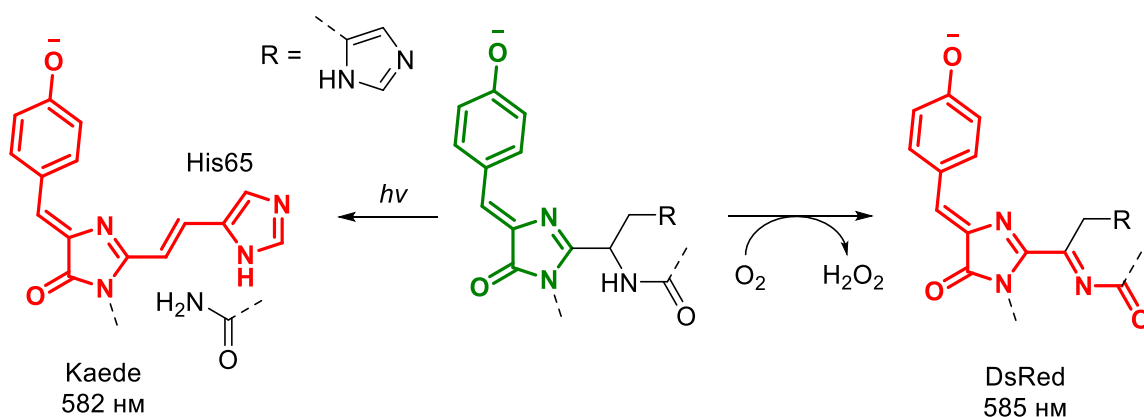


Схема 1.6. Структуры хромофоров белков DsRed и Kaede.

В природе также были обнаружены некоторые модификации белка DsRed. Так в белке zFP538 π-система сопряжения хромофора включает двойную углерод-азотную связь шестичленного гетероцикла (схема 1.7). Последний в свою очередь формируется из лизина-65 [21]. Для белка Kusabira-Orange (KO) характерна циклизация цистеина-65 в дигидротиазол, который также участвует в системе сопряжения двойных связей (схема 1.7) [22]. А в белке asFP595 происходит гидролиз с разрывом основной полипептидной цепи с образованием соответствующего кетона [23]:

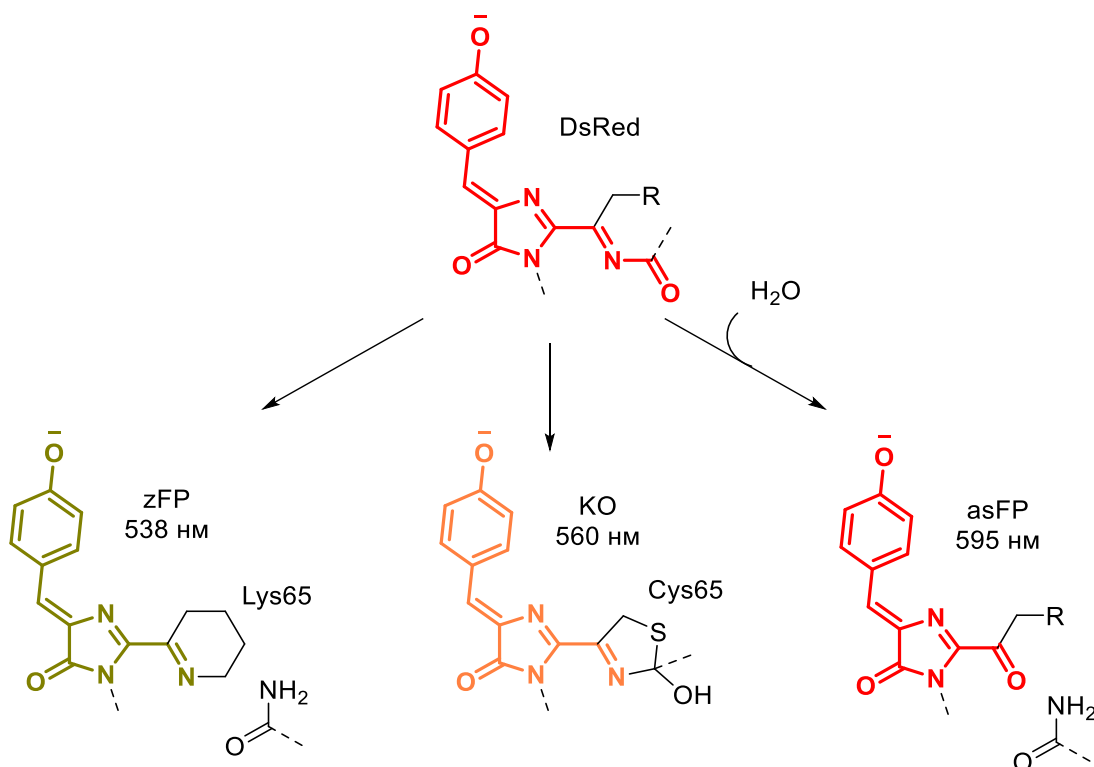


Схема 1.7. Структуры хромофоров природных красных белков.

Замена тирозина-66 в белке DsRed на другие ароматические аминокислоты, как и в случае с белком GFP, приводит к заметному гипсохромному сдвигу флуоресценции. Так были получены синие мутанты mBlueberry и mCherry2-Тур66His [24] и желтый мутант mHoneydew [25] (схема

1.8). Введение в 65 положение треонина, и его последующая циклизация, позволили получить оранжевый мутант mOrange [25]:

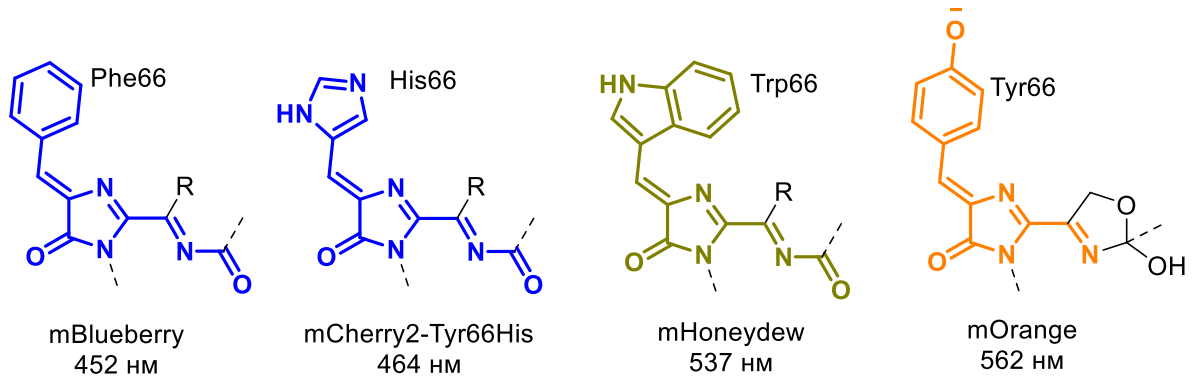


Схема 1.8. Хромофоры мутантов белка DsRed.

Сейчас доступны уже сотни разных мутантных форм флуоресцентных белков с большим цветовым разнообразием. Разработаны системы визуализации для изучения локализации, передвижения, расщепления белков и более сложных процессов в живых клетках и тканях [26–31]. Однако, эта технология имеет некоторые ограничения. Формирование хромофора невозможно без кислорода, что ограничивает применение в анаэробных условиях, а большой размер флуоресцентных белков (около 200 аминокислот) может влиять на функции белка интереса.

### 1.1.3. Самомодифицирующиеся и флуороген-активирующие белки

Самомодифицирующиеся белки представляют собой бесцветные белки, способные ковалентно связываться с низкомолекулярным субстратом, который может быть связан с меткой. Человеческий белок репарации hAGT ( $O^6$ -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы), который при взаимодействии с  $O^6$ -алкилгуанином алкилирует один из своих цистеиновых остатков (схема 1.9), был использован для разработки первой системы мечения на основе самомодифицирующихся белков.

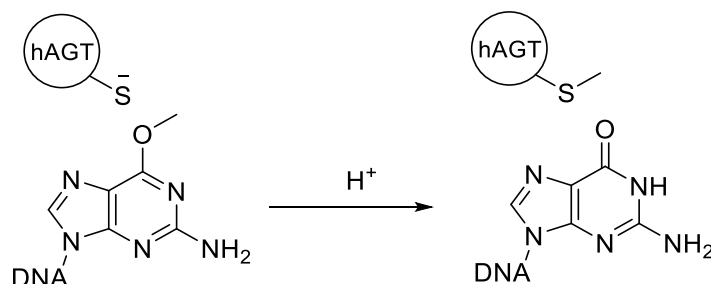


Схема 1.9. Действие  $O^6$ -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы.

Было обнаружено, что этот фермент способен также хорошо реагировать с  $O^6$ -бензилгуанином и с его аналогами, содержащими заместители в бензильном кольце. В результате на основе hAGT была разработана система флуоресцентного мечения [32]:

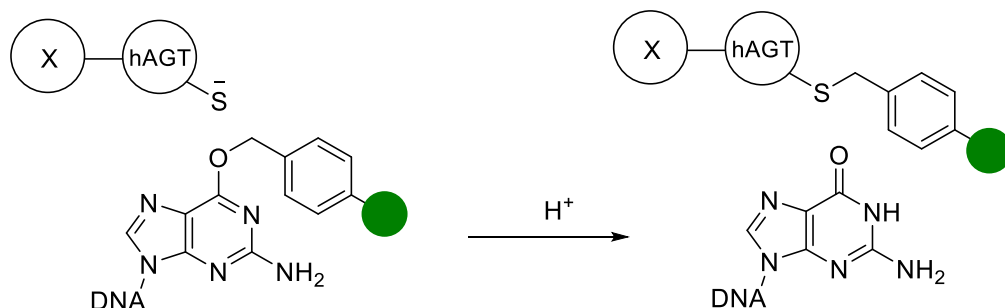


Схема 1.10. Введение флуоресцентной метки с использованием  $O^6$ -бензилгуанина.

Существенным недостатком этой технологии является сильная фоновая флуоресценция, возникающая по причине взаимодействия производных  $O^6$ -бензилгуанина с эндогенными белками репарации. Однако эта проблема была решена путем создания мутантов hAGT, имеющие большее сродство к  $O^6$ -бензилгуанину [33]. Некоторые модификации позволили значительно уменьшить размер встраиваемой метки. Особенно популярными стали мутанты SNAP-tag и CLIP-tag (182 аминокислотных остатка) [34,35]. Мутант CLIP-tag в 100 раз более эффективно реагирует с  $O^2$ -бензилцитозином чем с  $O^6$ -бензилгуанином (субстратом SNAP-tag). Такая ортогональность позволяет использовать обе метки одновременно для многоцветного окрашивания [35]:

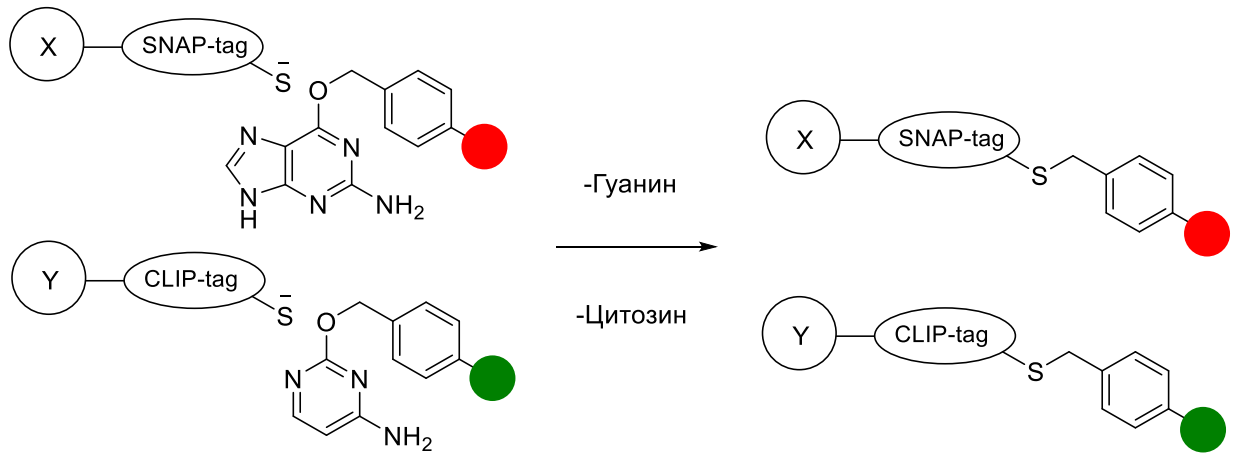


Схема 1.11. Многоцветное мечение при помощи SNAP-tag и CLIP-tag.

Похожая система мечения была разработана на основе бактериальной галогеналкангеназы. Этот фермент распознает хлоралкановый фрагмент и связывает аспарагин-106 с углеводородным остатком. В оригинальном белке этот остаток затем высвобождается под действием гистидина-272 [36]. Замена в 272 положении гистидина на фенилаланин позволила проводить необратимое связывание с алкановым остатком, который в свою очередь может быть связан с флуоресцентной группой (схема 2.9). Разработанная система получила название Halo-tag [37].

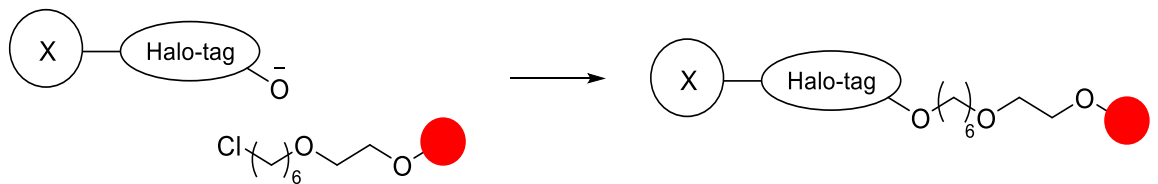


Схема 1.12. Введение флуоресцентной метки с использованием O<sup>6</sup>-бензилгуанина.

Очевидными достоинствами самомодифирующихся белков являются высокая специфичность окрашивания и большой выбор химических флуорофоров. Однако, как и для флуоресцентных белков, главным ограничением для использования является большой размер вводимой метки, который может повлиять на функции интересующего белка. Кроме того, необходимо проводить отмывку избыточного количества красителя.

Флуороген-активирующие белки, как и самомодифирующиеся, сами по себе не флуоресцируют, и для окрашивания целевого объекта необходимо ввести с систему дополнительный цветной фрагмент. Но в отличие от самомодифирующихся белков, эти белки связываются не с флуорофорами, а с флуорогенами. Последние представляют собой вещества, которые в свободном виде имеют слабо выраженные флуоресцентные свойства, но в составе комплекса с белками характеризуются яркой флуоресценцией:

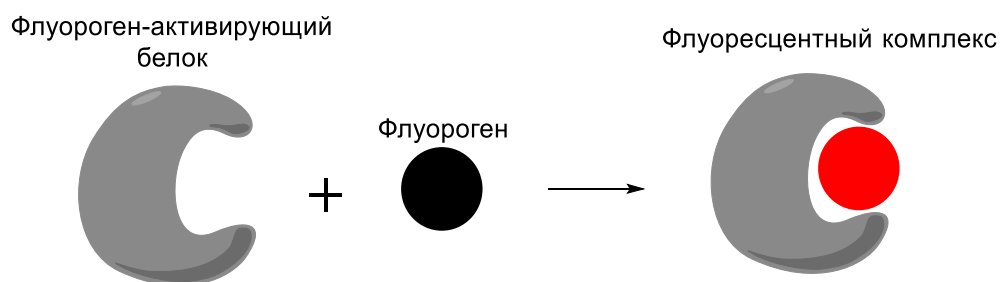


Схема 1.13. Формирование комплекса флуороген-активирующего белка с флуорогеном.

Природный белок Upaг нековалентно связывается с билирубином, в результате чего образуется комплекс с зеленой флуоресценцией [38]. Ряд флуороген-активирующих белков был разработан на основе бактериальных фитохромов. На основе фитохрома DrVphP был получен IFP1.4, который при связывании с биливердином IX $\alpha$  образует комплекс с красной эмиссией [39]. Позже был предложен дальне-красный мутант iRFP [40] и другие разные мутантные формы [41–43]. Однако, флуороген-активирующие белки, сделанные на основе фитохромов, достаточно большие (около 300 аминокислот) и имеют низкий квантовый выход. Кроме того использование белков, имеющих природные лиганды ограничено тем, что нет возможности индуцировать флуоресцентный сигнал в нужный момент.

Первыми неприродными флуорогенами стали малахитовый зеленый (MG-2p) и тиазоловый оранжевый (TO1-2p) (схема 1.14). Флуороген-активирующие белки для них были разработаны на основе одноцепочечных антител (масса меньше 30 кДа) [44]. Образующиеся при связывании комплексы по яркости флуоресцентного сигнала не уступают флуоресцентным белкам, светящимся в том же диапазоне спектра. Позднее был разработан дальнекрасный флуороген SCi1 [45]:

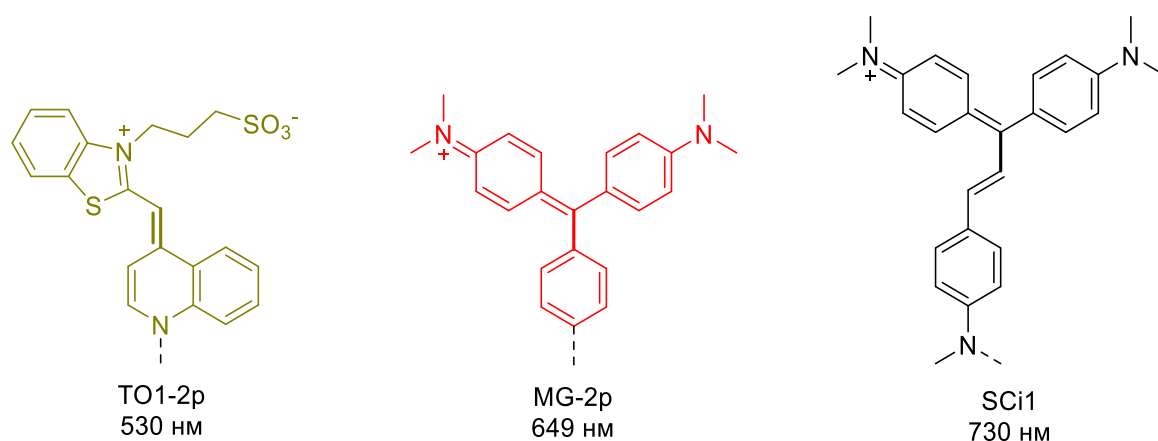


Схема 1.14. Синтетические флуорогены (здесь и далее указаны максимумы флуоресценции комплексов).

В качестве синтетических флуорогенов также были предложены аминопроизводные хромофора белка GFP (схема 1.15). В составе комплекса с мутантами белка В1с семейства липокалинов они флуоресцируют в области 540-640 нм с квантовым выходом около 30% [46,47]. Однако попытки расширить палитру лигандов для мутантов В1с и создать более красные пары белок-флуороген не привели успеху.

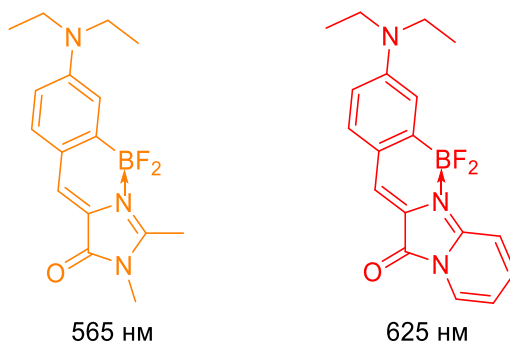


Схема 1.15. Синтетические лиганды для мутантов В1с .

Другим недавно предложенным типом синтетических флуорогенов стали производные 4-гидроксibenзилиденроданина (4-Hydroxybenzylidene Rhodanine – HBR) (схема 1.16). Эти соединения способны нековалентно связываться с белком FAST (массой 14 кДа) – мутантной формой белка РУР (Photoactive Yellow Protein [48]). Процесс формирования комплекса сопровождается не только значительным усилением флуоресцентного сигнала, но и батохромным сдвигом максимумов поглощения и испускания флуорогена на 60-80 нм [49]. Последнее, как и в случае хромофоров флуоресцентных белков, происходит благодаря переходу молекулы в анионную форму за счет белкового окружения:

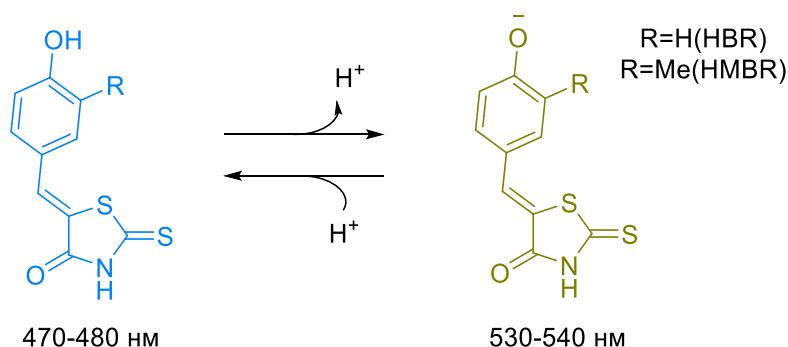


Схема 1.16. Депротонирование 4-гидроксibenзилиденроданина.

Цветовое разнообразие этой метки было расширено созданием более красных пар FAST-флуороген [50]. Новые лиганды отличаются наличием дополнительной метильной группы в бензилиденовом фрагменте или заменой метильных заместителей на метоксигруппы (схема 1.17). Совсем недавно были разработаны мутантные формы белка FAST, которые специфически



связывают разные флуорогены и позволяют проводить многоцветное мечение [51]. Мутант greenFAST селективно формирует комплексы с флуорогеном HMBR, в то время как мутант redFAST имеет высокое сродство с HBR-3,5DOM.

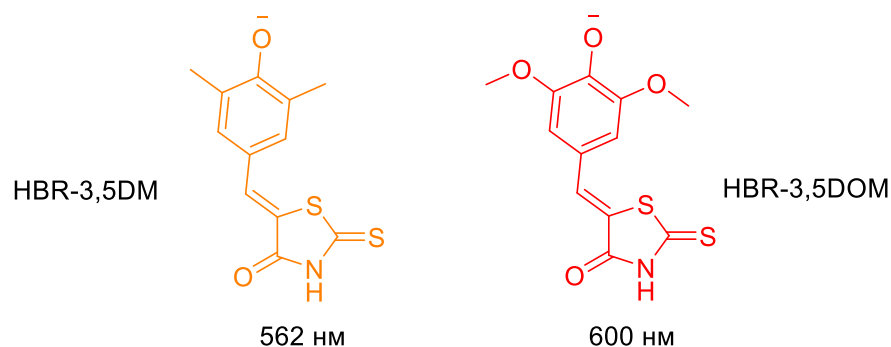


Схема 1.17. Флуорогены белка FAST.

Также недавно был предложен дальнекрасный аналог роданиновых флуорогенов, разработанный на основе HPAR (4-HydroxyPhenylAllylidene Rhodanine) [52]. Это соединение содержит дополнительную двойную связь между бензилиденовым и роданиновым фрагментами, что увеличивает размер  $\pi$ -системы сопряжения и приводит к батохромному сдвигу максимумов поглощения и испускания:

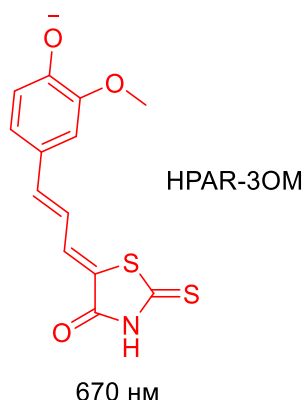


Схема 1.18. Дальнекрасный флуороген белка frFAST.

В составе флуоресцентного комплекса с новой мутантной формой белка FAST – frFAST (far-redFAST) этот флуороген имеет максимум поглощения 555 нм и максимум испускания 670 нм. Такие свойства выделяют предложенную метку среди остальных дальнекрасных, так как обычно они имеют значительно меньший стоксов сдвиг. Однако стоит отметить, что белок frFAST сохраняет способность связывать другие, вышеописанные производные HBR.

Флуороген-активирующие метки являются, пожалуй, наиболее перспективным типом генетически кодируемых меток. Использование флуорогенов позволяет активировать флуоресцентный сигнал в необходимый момент, а отсутствие флуоресценции у свободного

флуорогена исключает необходимость отмывки. Более доступным становится цветовое разнообразие вводимых меток, так как для создания и модификации флуорогенов разработано много разных химических подходов. Кроме того флуороген-активирующие метки имеют достаточно малый размер и в меньшей степени будут оказывать негативное воздействие на исследуемый объект.

## 1.2. Синтез и модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов

Открытие флуоресцентных белков имело большую практическую значимость для современных методов исследования в биологии и медицине. Выделение первого флуоресцентного белка GFP привело к тому, что на данный момент разработаны уже сотни разнообразных мутантных форм, которые являются самыми популярными флуоресцентными метками (подробное описание в разделе 1.1.2. Флуоресцентные белки).

Хромофоры флуоресцентных белков, представляющие собой 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны, и родственные им соединения являются объектом многих исследований. Помимо очевидно важной роли в изучении строения и функций флуоресцентных белков [53,54], они активно используются для создания флуоресцентных и флуорогенных красителей [55–57]. Как следствие развитие химических методов синтеза и модификаций является важным и актуальным направлением. Поэтому в этом разделе рассмотрены подходы к синтезу и структурной модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов и способы оптимизации этих методик.

### 1.2.1. Методы синтеза 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов

Подходы к синтезу производных 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (далее по тексту, имидазолонов) широко представлены в литературе. Можно выделить следующие основные методы: циклизация амидов *N*-ацил дегидроаминокислот (I), конденсация 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с карбонильными соединениями (II), циклоприсоединение оснований Шиффа к имидатам (III) и использование производных азидокоричной кислоты (IV):

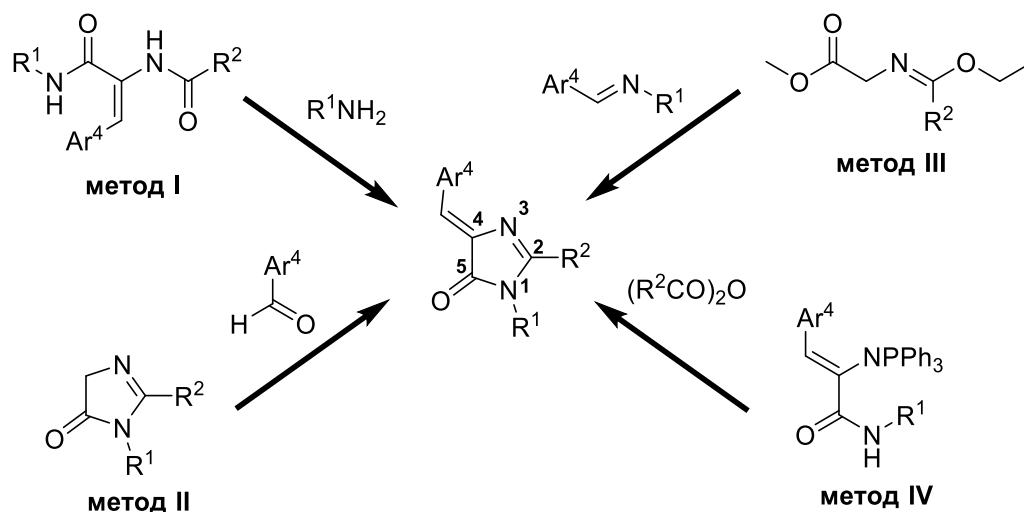


Схема 1.19. Основные подходы к синтезу имидазолонов.

Выбор того или иного синтетического пути естественным образом обусловлен структурными особенностями целевой молекулы. Однако некоторые методы оказались предпочтительнее в литературе благодаря синтетической доступности исходных реагентов, а также простоте и надежности самих методик. Рассмотрим как самые востребованные, так и менее популярные подходы.

#### *Получение имидазолонов из амидов *N*-ацилдегидроаминокислот (Метод I)*

Наиболее распространенным методом синтеза имидазолонов стал подход, основанный на дегидратации амидов *N*-ацилдегидроаминокислот:

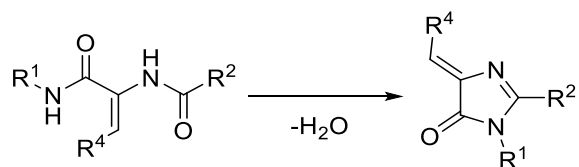
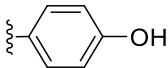
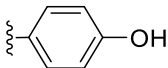
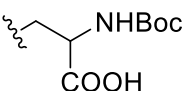
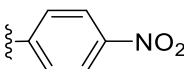



Схема 1.20. Циклизация амидов *N*-ацилдегидроаминокислот.

Исходные амиды легко циклизуются в соответствующие имидазолы, зачастую для проведения реакции достаточно прямого термического воздействия [58–65] (Таблица 1.1). Также это превращение проходит при кислотной активации, для чего в реакционную смесь добавляют

хлорид цинка [66–68], уксусный ангидрид [69,70] или хлорокись фосфора [71–73] (Таблица 1.1). Зачастую в качестве растворителя используют уксусную кислоту [74–83]. Однако, наиболее часто на стадии циклизации амидов применяют основные катализаторы – карбонаты [84–92] и ацетаты щелочных металлов [93–102], третичные амины [103,104], пиридин [105–113] и ДБУ [114,115] (Таблица 1).

Таблица 1.1. Типичные условия циклизации *N*-ацилдегидроаминокислот.

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>4</sup>	Условия
CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		220°C
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , EtOH, кипячение
	CH <sub>3</sub>	Ph	ДБУ, ДМФ, кипячение
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		Et <sub>3</sub> N, ТГФ, кипячение
Ph	Ph	Ph	AcONa, AcOH, кипячение
	Ph	Ph	POCl <sub>3</sub> , ДМФ, 100°C
ОН	Ph	Ph	3N HCl, кипячение

Стоит отметить, что химия исходных *N*-ацилдегидроаминокислот хорошо изучена [116,117], так как они являются удобными прекурсорами для синтеза разнообразных гетероциклических соединений, а также неприродных аминокислот. Основной метод получения представляет собой аминолит 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-оксазол-4-онов (оксазолонов) под действием нуклеофильных реагентов:

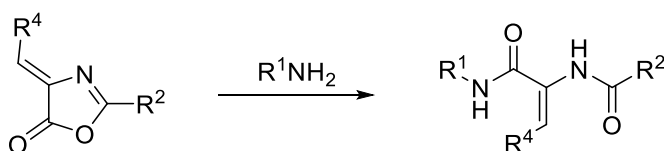


Схема 1.21. Аминолит оксазолонов с образованием амидов *N*-ацилдегидроаминокислот.

Как правило, раскрытие оксазолонового кольца происходит без дополнительной активации и не сопровождается побочными процессами. Реакция проходит при смешивании исходных веществ в различных растворителях (бензол [118–121], гликоли [122,123], спирты [53,124–127],

диоксан [128], диэтиловый эфир [129], тетрагидрофуран [130], вода [115] и уксусная кислота [131,132]), зачастую при комнатной температуре и характеризуется выходами от 60 до 95 %.

Получение *N*-ацилдегидроаминокислот из оксазолонов является самым распространенным и удобным способом не только благодаря легкости самого превращения, но и за счет широкой доступности исходных оксазолонов. Существует большое количество способов их получения и модификации [133]. Основным методом синтеза является реакция Эрленмейера – конденсация карбонильных соединений с производными *N*-ацилглицина:

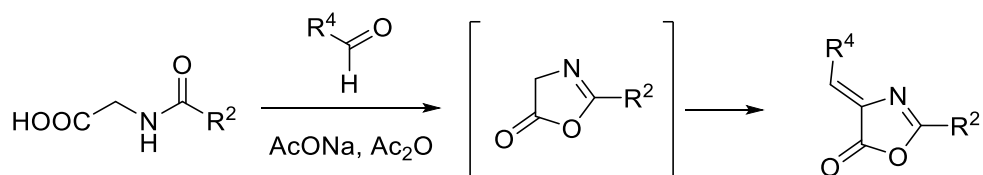
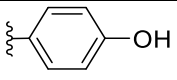
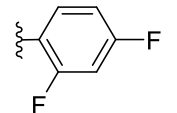
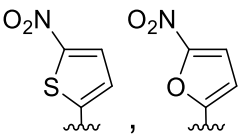


Схема 1.22. Реакция Эрленмейера.

В данном превращении сначала происходит циклизация *N*-ацилглицина, затем следует присоединение карбонильного соединения. Образующийся на первой стадии насыщенный оксазolon, как правило, не выделяется в индивидуальном виде. Смесь ацетата натрия и уксусного ангидрида действует и как конденсирующий, и как дегидратирующий агент [134]. С помощью такой методики было синтезировано большое количество разнообразных соединений [135–138].

Последующее изучение реакции Эрленмейера показало, что выбор других конденсирующих агентов позволяет значительно усовершенствовать реакцию – в качестве карбонильной компоненты можно использовать менее реакционноспособные соединения, кроме того увеличиваются выходы реакции и отмечается отсутствие побочных продуктов:

Таблица 1.2. Некоторые примеры оптимизации реакции Эрленмейера.

<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>4</sup></b>	Конденсирующий агент	Ссылка
Ph		KF/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Ac <sub>2</sub> O	[139]
Ph		Полифосфорная кислота	[140]
Ph	Ar	ДЦК, MW	[141]
Ph		Ионообменная смола	[142]

Дальнейшие исследования показали, что в ряде случаев выделение промежуточного оксазолон в индивидуальном виде и проведение конденсации с карбонильным соединением уже на следующей стадии синтеза оказываются наиболее эффективными. В таком случае в качестве циклизующего агента может быть использован уксусный ангидрид или например хлорформиаты [143,144]. Однако в большинстве работ авторы используют более мягкие агенты, такие как ДЦК и его производные [145–148]. Вторая стадия – стадия конденсации с карбонильным соединением отличается несколько большей вариативностью возможных условий. Реакция может быть проведена при сплавлении исходных компонентов [149], или же в присутствии оснований, например пиридина или триэтиламина [150]. Также известны работы, в которых описывается использование оксида алюминия и ионных жидкостей [151,152]. Крайне эффективным оказалось применение микроволнового облучения [128,153].

Среди альтернативных подходов к синтезу оксазолонов заслуживает упоминания взаимодействие фосфазенов коричных кислот с хлорангидами [154,155]:

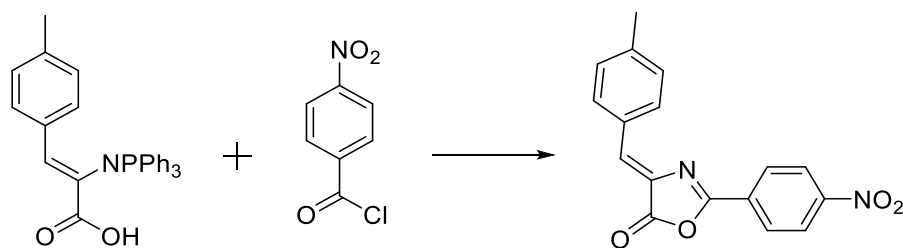


Схема 1.23. Производные коричных кислот в синтезе оксазолонов.

Аналогично тому, как в первом превращении в данном разделе имидазолон образуются из амидов *N*-ацилдегидроаминокислот, оксазолоны могут быть получены из самих *N*-

ацилдегидроаминокислот (Схема 1.24). Дегидратация легко проходит под воздействием мягкого водоотнимающего агента, такого, как ДЦК [156]. Существуют альтернативные варианты: триэтилсилан в трифторуксусной кислоте [157], хлорформаты [158], или упоминающийся в более ранних публикациях уксусный ангидрид [159].

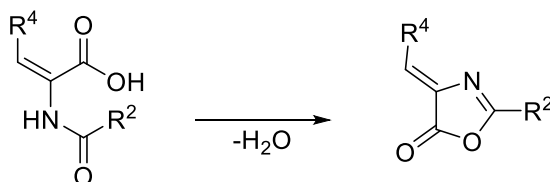


Схема 1.24. Дегидратация *N*-ацилдегидроаминокислот.

Стоит также упомянуть методики с использованием триазолонов [160], азлактонов [161], производных 3-гидрокси-*N*-ациламинокислот [162] и *N*-хлорацетил производных аминокислот [131,163]. Однако все они не получили широкого распространения.

Среди остальных методов получения *N*-ацилдегидроаминокислот стоит выделить еще два направления. Первое из них основано на применении реакции *N*-ацилирования производных дегидроаминокислот. К сожалению, такой подход не нашел широкого распространения из-за агрессивных условий синтеза и крайней неустойчивости исходных соединений [164,165]. Во втором случае уже замещенные по азоту субстраты используются в различных реакциях, ведущих к образованию двойной связи. В рамках данного направления можно отметить следующие реакции: дегидратацию 3-гидроксипроизводных *N*-ациламинокислот [166–169] или элиминирование молекулы HCl от *N*-хлор производных [170]. Еще одним способом сформировать двойную связь является проведение различного типа конденсаций [171–173], включая близкие аналоги реакции Виттига [174,175].

### **Использование 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (Метод II)**

Аналогично рассмотренному выше одному из способов получения арилиден-оксазолонов производные имидазолонов также могут быть получены с помощью конденсации с карбонильной компонентой:

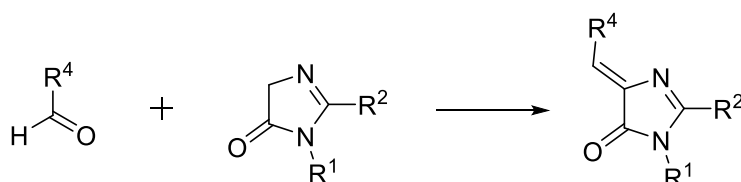


Схема 1.25. Взаимодействие 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с карбонильными соединениями.



Условия такой конденсации чаще предполагают применение основных катализаторов. Так в литературе известны примеры использования гидрокарбоната натрия [176], пиридина и пиперидина [177–181]. Однако для некоторых субстратов реакция успешно протекает при термическом воздействии в отсутствии дополнительных реагентов [182,183].

Было установлено, что в отличие от оксазолонов для синтеза исходных насыщенных имидазолонов использование амидов *N*-ациламинокислот является невыгодным – реакция проходит с низкими выходами и применима для получения лишь некоторых производных [184]. Более эффективной оказалась конденсация эфиров глицина с имидатами [182]:

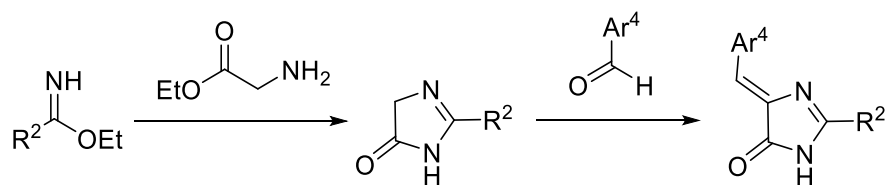


Схема 1.26. Получение производных имидазолона из имидаатов и этилового эфира глицина.

Этот подход не предполагает выделения промежуточного имидазолона из-за его неустойчивости, что позволит сразу получать целевые производные. С другой стороны в некоторых работах отмечалось, что возможно образование побочных продуктов реакции конденсации с имидатами, особенно в присутствии ацетата натрия [185].

Крайне успешным оказалось использование производных азидоуксусной кислоты для получения имидазолонов и их дальнейшей конденсации. Например, фосфазены, получаемые из имидов азидоуксусной кислоты, спонтанно претерпевают внутримолекулярную циклизацию в необходимые насыщенные имидазолы (схема 1.27) [177,186,187]. При использовании этого подхода имидазолы зачастую также не выделяют в индивидуальном виде, и по окончании циклизации сразу добавляют карбонильное соединение [188,189].

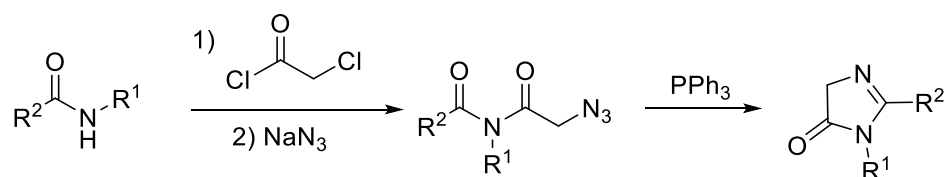


Схема 1.27. Использование производных азидоуксусной кислоты.

В нашей лаборатории недавно был разработан эффективный метод с применением амидов азидоуксусной кислоты:

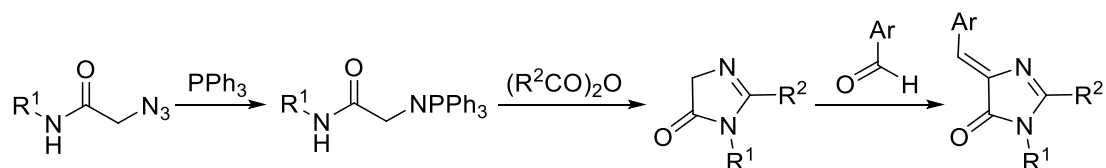


Схема 1.28. Амиды азидоуксусной кислоты в синтезе 1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов.

В отличие от предыдущего подхода эта методика позволяет удобно вводить различные заместители во втором положении имидазольного кольца, так как промежуточные фосфазены достаточно стабильны и могут быть выделены в индивидуальном виде [190]. Позднее с привлечением этого метода нашей лаборатории удалось показать, что конденсация интермедиатов реакции с имидатами действительно может приводить к образованию альтернативных продуктов, содержащих аминогруппу, причем реакция проходит быстро и легко при достаточно мягких условиях – в толуоле в присутствии молекулярных сит [191]:

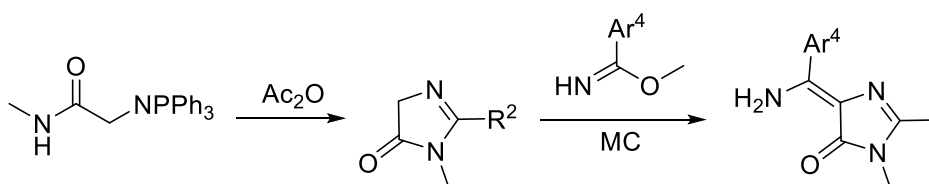


Схема 1.29. Взаимодействие 1*H*-имидазол-5(4*H*)-она с имидатом.

Для получения имидазолонов также были предложены конденсации амидинов с производными хлоруксусной кислоты [176,192] или конденсации ортоэфиров с аминоацетонитрилом [193]. Однако выделить насыщенный имидазолон в индивидуальном виде удалось лишь в последнем случае.

### ***Взаимодействие оснований Шиффа с имидатами (Метод III)***

Взаимодействие оснований Шиффа с иминоэфирами является еще одним довольно популярным и относительно современным методом синтеза производных бензилиденимидазолонов (схема 1.30). Эта реакция проходит по механизму [2+3] циклоприсоединения с перезамыканием цикла [194,195].

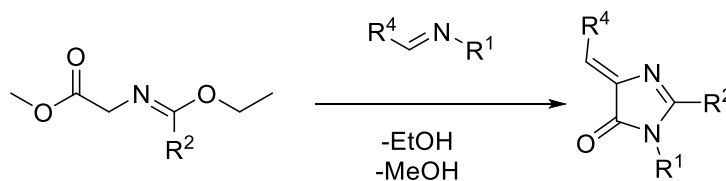


Схема 1.30. Циклоприсоединение имидатов к иминам.

Для осуществления циклоприсоединения не требуется особой активации. Поэтому не существует большого разнообразия условий проведения реакции, обычно это непосредственное смешивание исходных соединений при комнатной температуре и зачастую в отсутствие растворителя. Единственным ограничением является крайняя неустойчивость исходных соединений – они легко гидролизуются с образованием имидазолонов, содержащих остаток эфира глицина [196]. Простота и широкая применимость этого метода позволила получить большую библиотеку аналогов хромофора GFP [197–206], включая флуоресцентные производные [207–209].

#### **Использование производных азидокоричной кислоты (Метод IV)**

Не так давно в нашей лаборатории был предложен еще один способ получения различных имидазолонов, исходя из производных азидокоричных кислот:

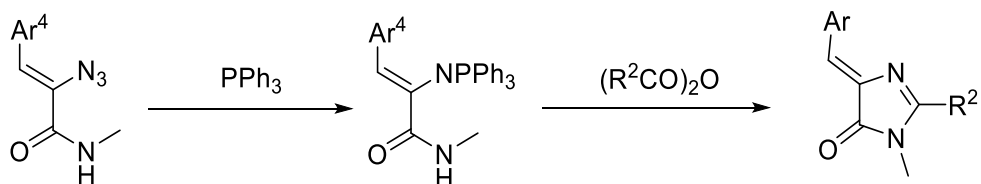


Схема 1.31. Амиды азидокоричных кислот в синтезе имидазолонов.

Из амидов азидокоричных кислот легко могут быть получены соответствующие фосфазены, которые достаточно стабильны и могут быть выделены в индивидуальном виде. Для получения целевых имидазолонов фосфазены коричных кислот подвергают воздействию различных ацилирующих агентов. Стоит отметить, что этот метод позволил получить некоторые другие, более труднодоступные производные [210,211]:

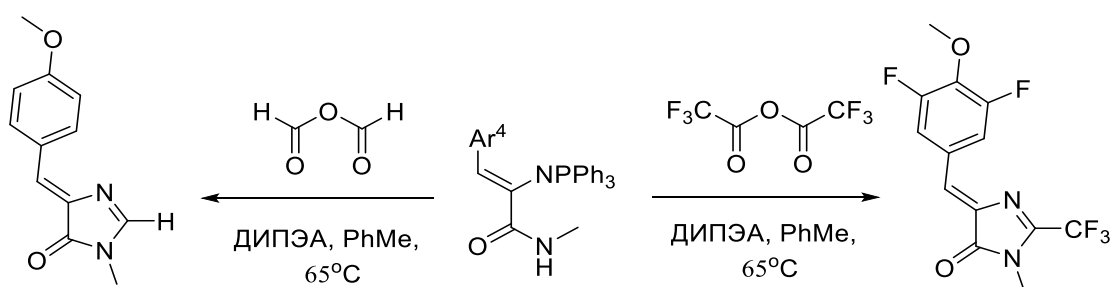


Схема 1.32. Синтез имидазолонов с атомом Н и CF<sub>3</sub>-группой во 2-ом положении.

Также для получения различных имидазолонов могут быть использованы имиды азидокоричных кислот [212]. В этом случае образующиеся под действием трифенилфосфина фосфазены сразу претерпевают циклизацию в целевые соединения:

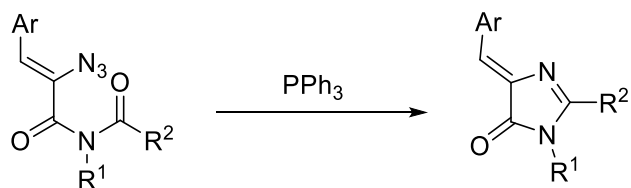


Схема 1.33. Применение имидов азидокоричных кислот.

### *Прочие методы синтеза*

В заключении следует рассмотреть менее популярные методы синтеза имидазолонов. Из литературы известно, что для этих целей можно использовать амидины в медь-катализируемой реакции с бромкоричной кислотой [213] или конденсации с производными ацетиленкарбоновых кислот [214]:

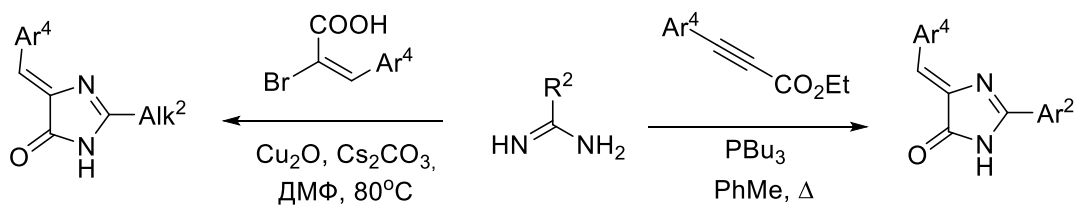


Схема 1.34. Конденсация амидинов.

Также стоит упомянуть методы с привлечением серосодержащих производных. Недавно была предложена конденсация иминоэфиров с тиимидами [215]:

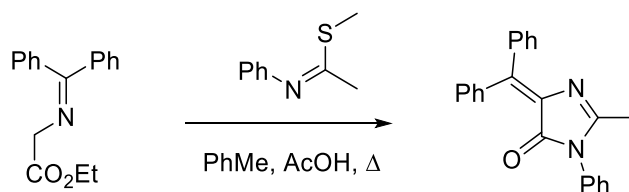


Схема 1.35. Использование тиимидатов.

Еще одним интересным подходом является взаимодействие тиогидантоинов и их алкилированных производных с арилбороновыми кислотами, позволяющие получать 2-арилзамещенные производные [216,217]:

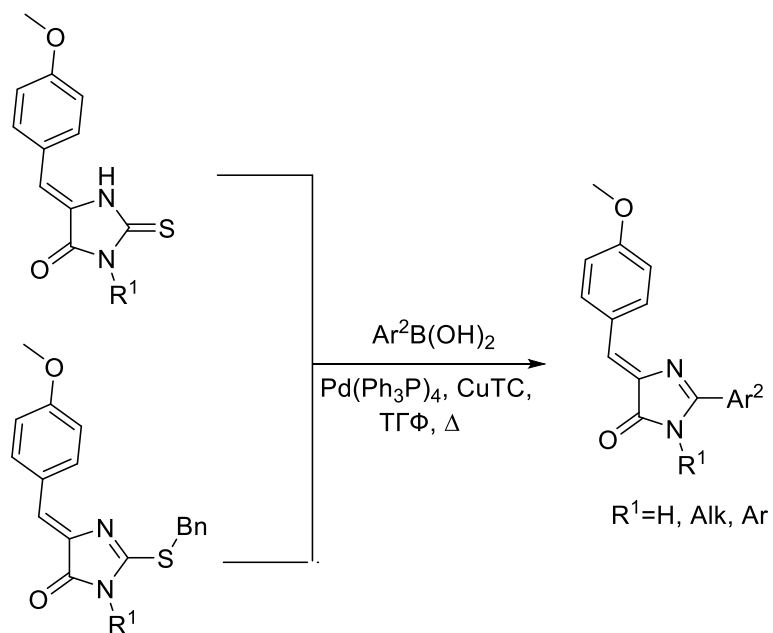


Схема 1.36. Применение тиогидантоинов.

### 1.2.2. Модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов

Важным направлением развития химии 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов является разработка методов модификации. Необходимость создания флуоресцентных меток с разным цветовым окрашиванием, разными оптическими и физико-химическими свойствами требует разработки новых подходов к химической модификации подобных соединений. Поэтому в этом разделе будут рассмотрены методики, позволяющие вводить различные заместители в 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны.

#### *Реакции конденсации*

Производные 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов, содержащие во втором положении метильную группу, легко вступают в реакцию конденсации с различными карбонильными соединениями или их аналогами. Метильная группа в таких соединениях является высоко реакционно способной из-за ее активации соседним частично ароматическим циклом. В литературе описано много примеров конденсации с ароматическими альдегидами (схема 1.37). В результате такого взаимодействия получают соединения с дополнительной двойной связью – близкие аналоги хромофора белка Kaede (про строение и свойства белка Kaede см. раздел 1.1.2. Флуоресцентные белки).

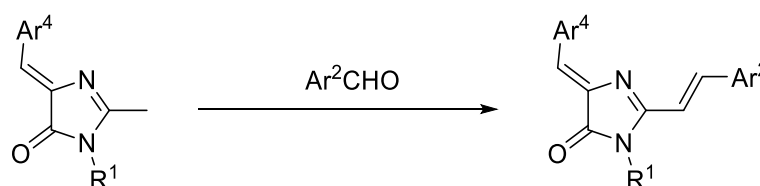
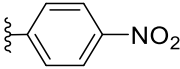
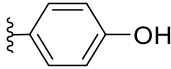

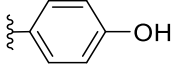
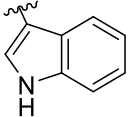


Схема 1.37. Конденсация с ароматическими альдегидами.

Такое взаимодействие происходит в присутствии кислотных или основных катализаторов. В качестве кислотных реагентов чаще используют хлорид цинка [86,89,202,204,218–222], а также хлориды индия [223], алюминия [224] или олова [225]:

Таблица 1.3. Некоторые примеры конденсации с ароматическими альдегидами.

$R^1$	$Ar^2$	$Ar^4$	Условия
Ph			$AlCl_3$ , ТГФ, кипячение
$CH_3$			$SnCl_4$ , ТГФ, кипячение
Ph		Ph	$InCl_3$ , ТГФ, кипячение

Конденсации в основных условиях обычно проводится в пиридине в присутствии каталитических количеств пиперидина. С помощью такого метода был получен ряд аналогов хромофора белка Kaede [89,226,227]:

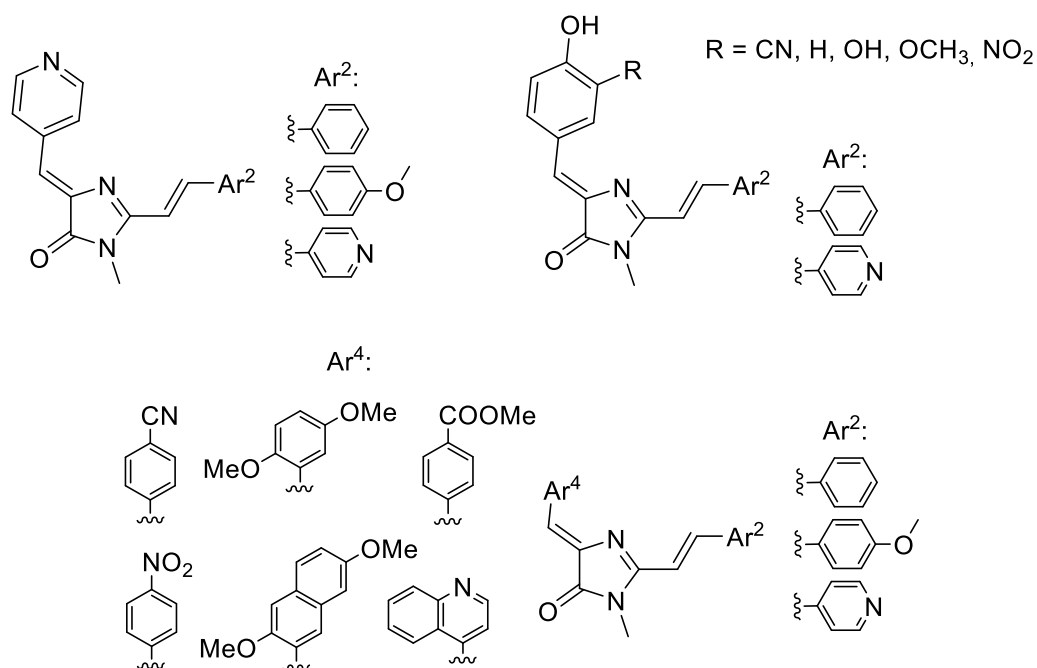


Схема 1.38. Аналоги хромофора белка Kaede.

Путем конденсации в основных условиях также были получены разные борированные аналоги конформационно зафиксированного хромофора белка Kaede, имеющие более длинноволновое испускание по сравнению с соединениями описанными выше. [47,207]:

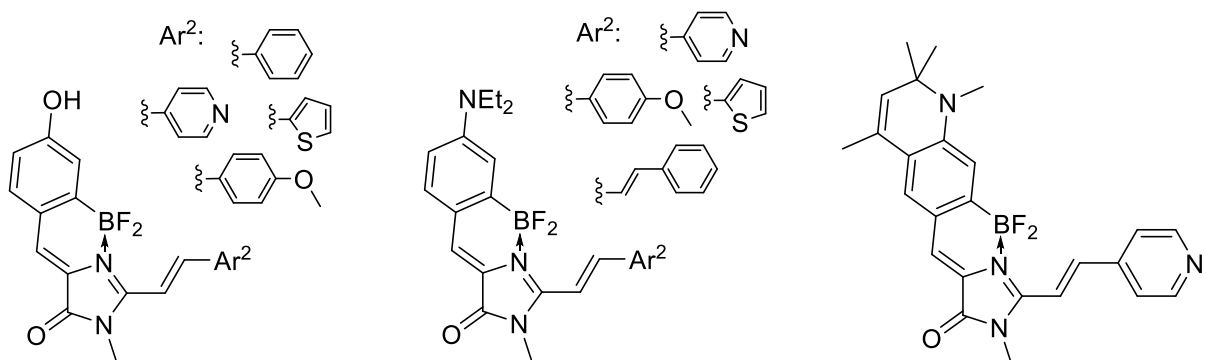


Схема 1.39. Конформационно зафиксированные производные хромофора белка Каеде.

Производные 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов активно вступают во взаимодействие с ароматическими хлорангидами. В качестве продуктов получают соответствующие кетоны [228]. Реакция проводится в избытке хлорангида в присутствии диизопропиламина:

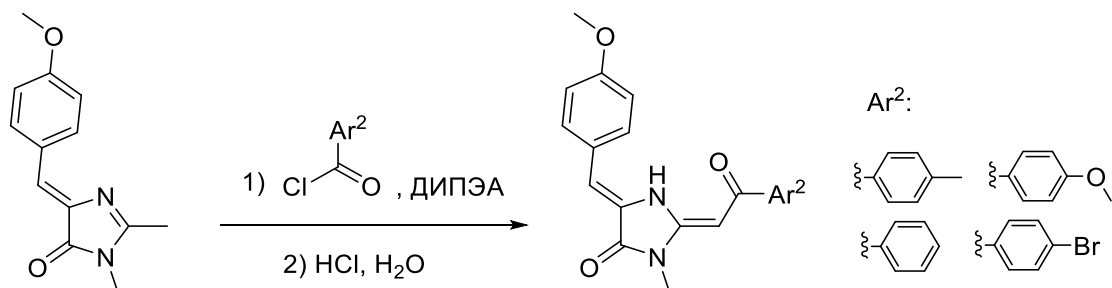


Схема 1.40. Взаимодействие с хлорангидами.

Кроме того, достаточно эффективно происходит присоединение разных аминоацеталей с образованием енаминных производных [47,229]:

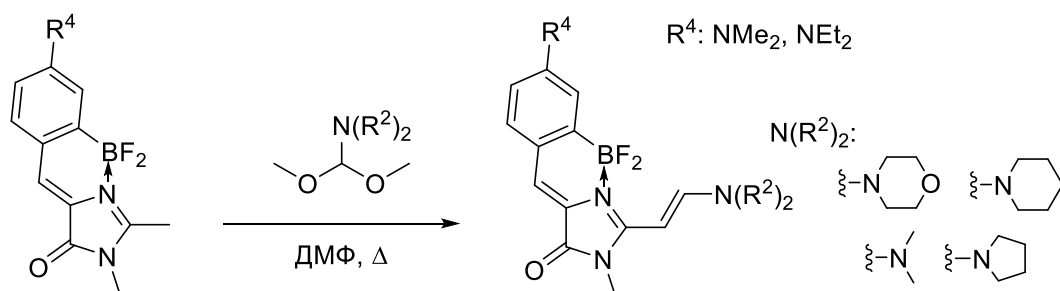


Схема 1.41. Присоединение аминоацеталей.





В заключении можно отметить, что существующие подходы к синтезу и модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов были успешно использованы для создания большого количества различных соединений, в частности широкой библиотеки аналогов хромофоров флуоресцентных белков. Однако разработка новых и усовершенствование уже известных методов по-прежнему активно продолжается и позволяет не только синтезировать ранее недоступные вещества, но и способствует развитию технологий флуоресцентного мечения.

## Глава 2. Обсуждение результатов

Генетически кодируемые метки являются распространённым инструментом маркирования во флуоресцентной микроскопии. Не так давно в качестве основы для такого типа меток были предложены флуороген-активирующие белки. Такие белки способны образовывать высокофлуоресцентные комплексы с флуорогенами, веществами которые в свободном виде крайне слабо флуоресцируют. Этот метод довольно перспективен и имеет некоторые преимущества в сравнении с прочими. Малый размер вводимой метки снижает вероятность нарушения функций исследуемого белка после мечения. Благодаря тому, что флуоресцирует метка исключительно после образования комплекса белок-флуороген, снижается уровень фоновой флуоресценции и исключается необходимость отмычки избыточного количества флуорогена. Кроме того исследователь может инициировать флуоресцентный сигнал в любой момент простым добавлением флуорогена или убрать его, с помощью замены среды. Также использование синтетического флуорогена значительно упрощает задачу по увеличению цветового разнообразия такого типа меток.

Производные хромофоров флуоресцентных белков высокоперспективны в качестве флуорогенов. Они имеют малый размер и высокую гидрофильность. Разработано большое количество удобных синтетических подходов, позволяющих получать бензилиденимидазолы различной окраски. Кроме того известно, что эти соединения имеют крайне слабую флуоресценцию в растворе из-за подвижности бензилиденового фрагмента, которая приводит к безызлучательному высвобождению энергии возбужденного состояния. Однако внешняя [198,232] или внутренняя [177,233] фиксация этого подвижного фрагмента приводит к многократному росту интенсивности флуоресценции.

Настоящая работа посвящена расширению возможностей использования 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов в роли флуорогенных красителей. Первая часть работы посвящена разработке новых подходов к синтезу и модификации этих соединений, в частности, предложены подходы, позволяющие создавать бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны, которые характеризуются более длинноволновым положением спектров поглощения и эмиссии. Вторая часть работы посвящена созданию новых флуорогенов для известного флуороген-активирующего белка FAST.

## 2.1. Новые методы синтеза и модификации бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов

Одной из важных задач при разработке флуоресцентных маркеров является создание более красных меток. Поглощение и флуоресценция таких соединений должны лежать в длинноволновой области примерно в диапазоне 700-900 нм. Свет с такой длиной волны в наименьшей степени поглощается биологическими объектами. Поэтому первая часть работы посвящена разработке новых химических модификаций, позволяющих в значительной степени сместить максимумы абсорбции и эмиссии 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов в красную область спектра.

### 2.1.1. Синтез 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с помощью реакции *O*-алкилирования амидоацетатов

4-Бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны, имеющие во втором положении имидазолонна акцепторные заместители, например кетогруппы, характеризуются более длинноволновыми поглощением и испусканием. Эту закономерность можно увидеть, например, при сравнении структур хромофоров флуоресцентных белков (см. раздел «1.1.2 Флуоресцентные белки»). Благодаря высокой реакционной способности алкильного остатка во втором положении, имидазолонны под воздействием диоксида селена легко могут быть окислены до альдегидов или кетонов (подробное описание в разделе «1.2.2 Модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов»). Однако синтез исходных имидазолонов, особенно тех, что содержат бензильный заместитель во втором положении, зачастую затруднен.

Один из самых популярных подходов к синтезу бензилиденимидазолонов заключается в использовании реакции циклоприсоединения оснований Шиффа к иминоэфирам. Иминоэфиры в свою очередь в основном получают из соответствующих нитрилов в две стадии [234]:

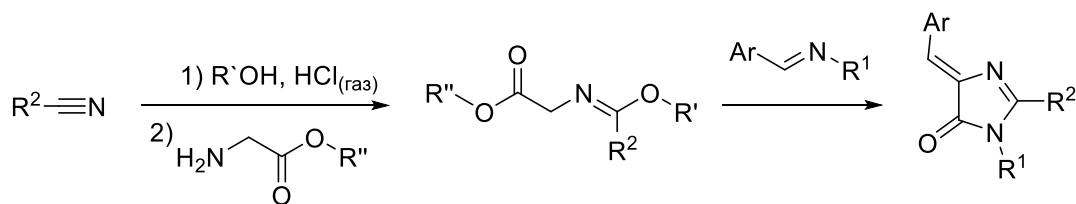


Схема 2.1. Синтез имидазолонов из имидатов.

Однако у этого подхода есть один существенный недостаток – ограниченный круг нитрилов, подходящих для данной реакции, а следовательно и ограниченный круг заместителей, которые можно ввести во второе положение имидазолон. В настоящей работе была предложена модификация этого метода, позволяющая получить имидазолон, содержащие разные заместители во втором положении, включая бензильные. В качестве альтернативного способа получения иминоэфиров мы использовали реакцию *O*-алкилирования амидоацетатов **1** с помощью тетрафторбората триэтилоксония:

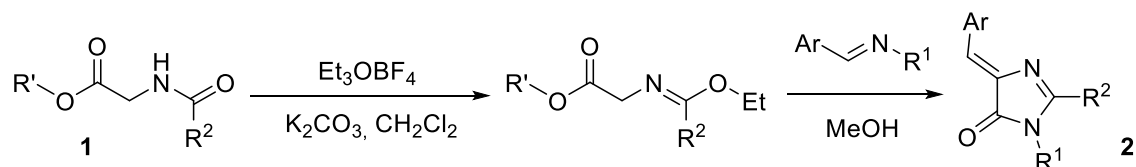


Схема 2.2. Синтез имидаатов из амидоацетатов.

Тетрафторборат триэтилоксония взаимодействует с амидами при комнатной температуре в присутствии карбоната калия в хлористом метиле с образованием иминоэфиров. В препаративном плане можно обойтись без выделения полученных соединений. Так, реакционную смесь промывают насыщенным раствором хлорида натрия, упаривают и без дополнительной очистки вводят в реакцию циклоприсоединения с основанием Шиффа.

С помощью предложенной методики были получены производные 4-(4-гидроксипбензилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она **2a-m**, содержащие во втором положении имидазолон различные заместители, в том числе искомые бензильные группы. Универсальность данного метода была продемонстрирована синтезом соединений с этильным, *трет*-бутильным, фенильным и фенилэтильным остатками:

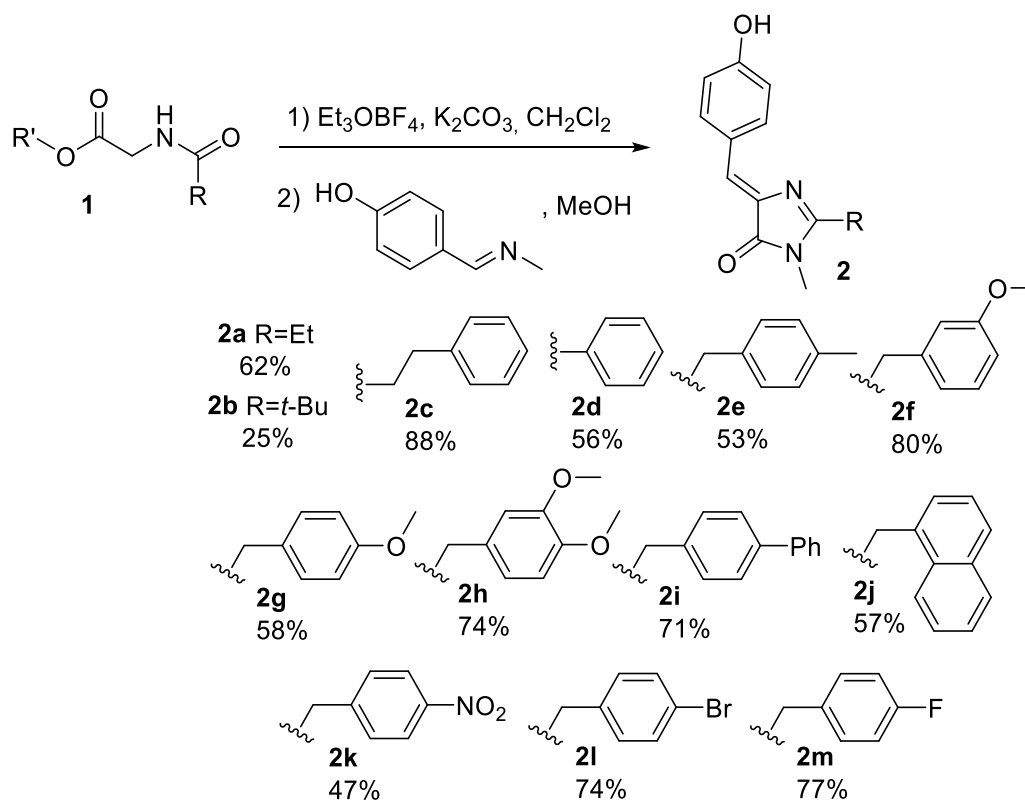


Схема 2.3. Ряд производных 4-(4-гидроксибензилиден)-1H-имидазол-5(4H)-она, полученных по разработанному в данной работе методу.

В ходе синтеза было замечено, что строение вводимого в положение C2 заместителя существенно влияет на ход реакции. Выход реакции варьировался от 25 до 90% (схема 2.3). С минимальным выходом 25% было получено производное **2b**, содержащее *tert*-бутильный заместитель. Впрочем, стоит отметить, что и ранее синтез этого вещества удавалось проводить лишь с крайне низкими выходами [210].

Далее было изучено влияние заместителя на атоме азота. Было показано, что заместитель в первом положении имидазолонна имеет минимальное влияние – выходы во всех случаях составили 80-85%:

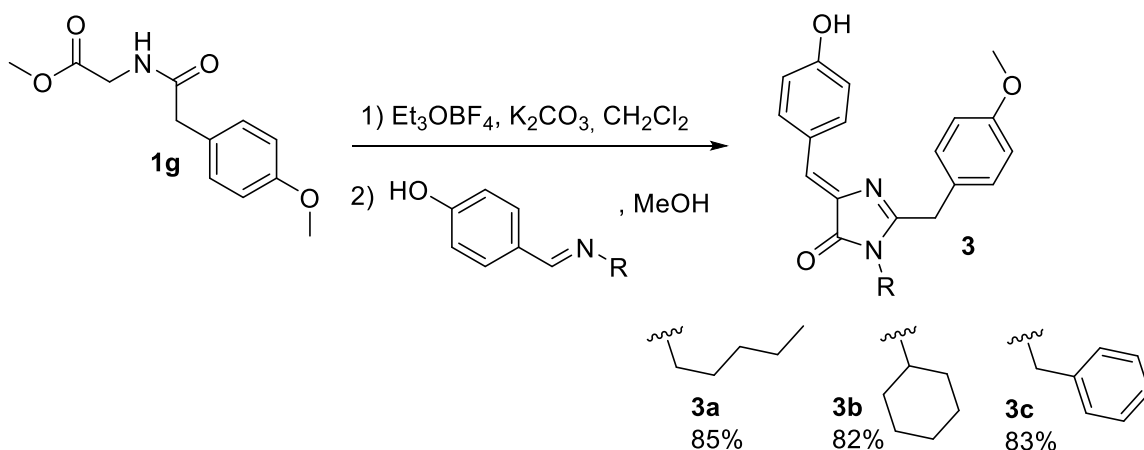


Схема 2.4. 4-(4-Гидроксibenzyliden)-2-(4-метоксibenзил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-оны с разными заместителями в первом положении.

Применимость этого метода также была исследована в синтезе имидазолонов с разными арилиденовыми заместителями (схема 2.5). В зависимости от использованного основания Шиффа выход реакции составлял от 30 до 85%.

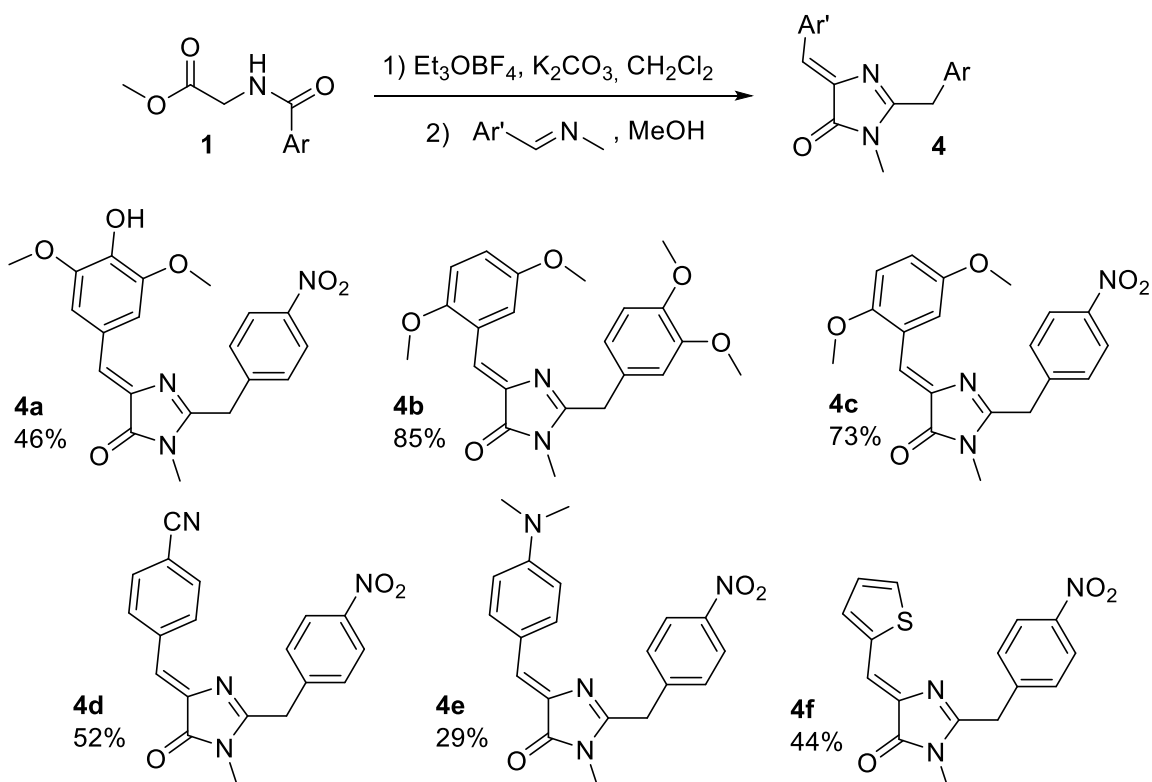


Схема 2.5. Варьирование арилиденового заместителя в четвертом положении 2-бензилимидазолонa.

На следующем этапе некоторые производные 4-(4-гидроксибензилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-она с бензильным заместителем в положении С2 были окислены до соответствующих 2-ароилпроизводных. Реакция осуществлялась под действием небольшого избытка диоксида селена в диоксане при кипячении:

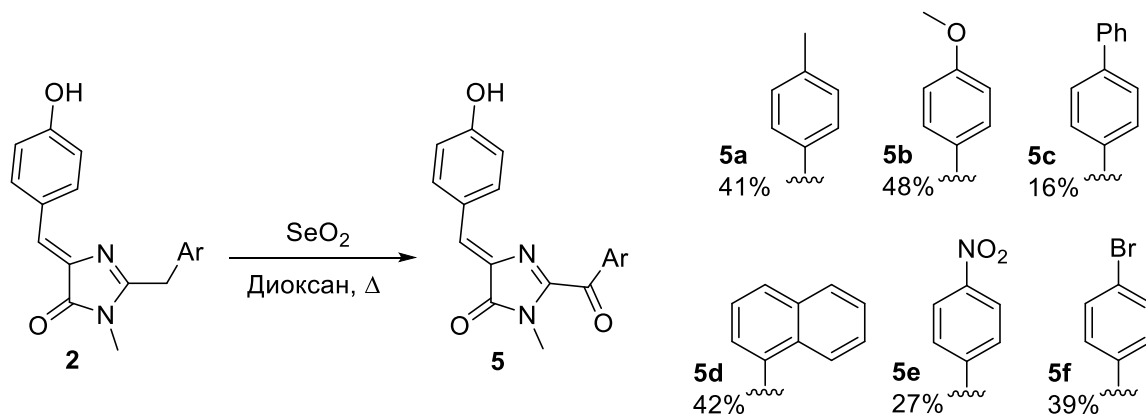


Схема 2.6. Синтез кетонов **5**.

Изучение оптических свойств исходных имидазолонов **2** и их окисленных производных **5** показало, что введение кетогруппы приводит к батохромному сдвигу спектральных максимумов в среднем на 50 нм:

Таблица 2.1. Максимумы абсорбции (в нм) имидазолонов **2** и кетонов **5** в ацетонитриле.

Соединение	Нейтральная форма	Анионная форма
<b>2e</b>	370	481
<b>5a</b>	418	592
<b>2g</b>	370	481
<b>5b</b>	414	591
<b>2i</b>	370	483
<b>5c</b>	423	602
<b>2j</b>	371	483
<b>5d</b>	423	596
<b>2k</b>	373	490
<b>5e</b>	440	616
<b>2l</b>	372	484
<b>5f</b>	427	602



Синтезированные кетоны **5** и их предшественники **2** имеют в четвертом положении бензилидена гидроксигруппу и могут существовать в виде анионов (схема 2.7). Было установлено, что для депротонированной формы кетонов характерно поглощение около 600 нм (таблица 2.1).

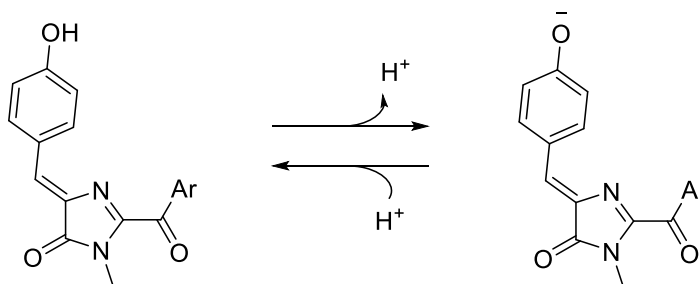


Схема 2.7. Депротонирование кетонов **5**.

Стоит обратить внимание, что природа ароматического заместителя при кето-группе практически не влияет на оптические свойства производных **5** (таблица 2.1). По всей видимости данный фрагмент не в полной мере входит в общую сопряженную систему молекулы.

Таким образом, в настоящей работе был разработан удобный подход к синтезу 4-арилиденимидазолонов, содержащих во втором положении имидазольона разные заместители. Окисление 4-гидроксибензилиденовых производных позволило получить ряд кетонов с абсорбцией в области 600 нм, что делает их хорошими кандидатами на роль флуорогенных красителей.

### 2.1.2. Синтез циклических амидов 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов с использованием реакции окисления диоксидом селена

Как было показано в прошлом разделе, одним из возможных путей модификации 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов, приводящим к батохромному смещению спектральных максимумов в более красную область спектра, является окисление заместителя в 2-ом положении. Ранее в нашем коллективе было показано, что такое окисление может приводить к формированию циклических амидов [231], что приводит к батохромному сдвигу на ~50 нм:

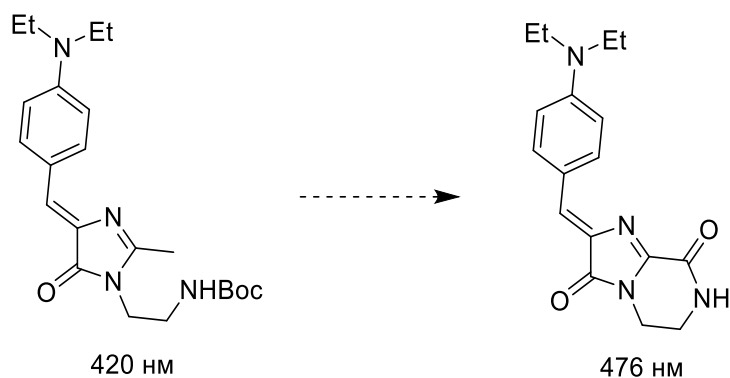
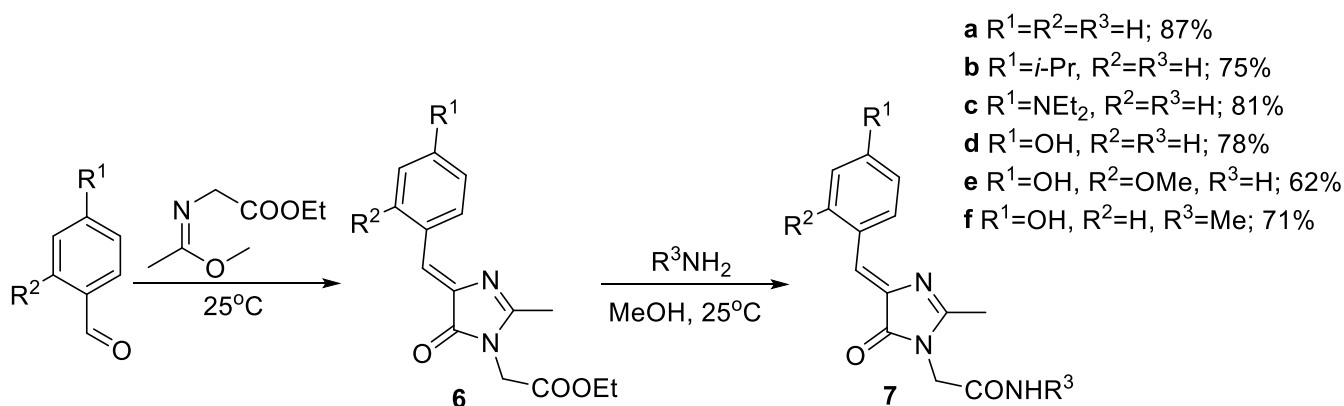


Схема 2.8. Циклические амиды (указаны максимумы поглощения).

Нами было предположено, что введение дополнительной С=О группы может привести к более сильному сдвигу в длинноволновую область. Для получения таких соединений на первой стадии при взаимодействии ароматических альдегидов с имидатом были синтезированы имидазолы **6a-f**, содержащие эфирную группу в боковой цепи. Затем при реакции с аминами из этих эфиров были получены соответствующие амиды **7a-f**:



- a R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=H; 87%
- b R<sup>1</sup>=*i*-Pr, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=H; 75%
- c R<sup>1</sup>=NEt<sub>2</sub>, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=H; 81%
- d R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=H; 78%
- e R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=OMe, R<sup>3</sup>=H; 62%
- f R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=Me; 71%

Схема 2.9. Синтез амидов **7** для изучения реакции окисления SeO<sub>2</sub>.

На заключительном нами было изучено окисление соединений **7a-f** до циклических имидов **8a-f** под воздействием избытка диоксида селена при кипячении в смеси вода-диоксан:

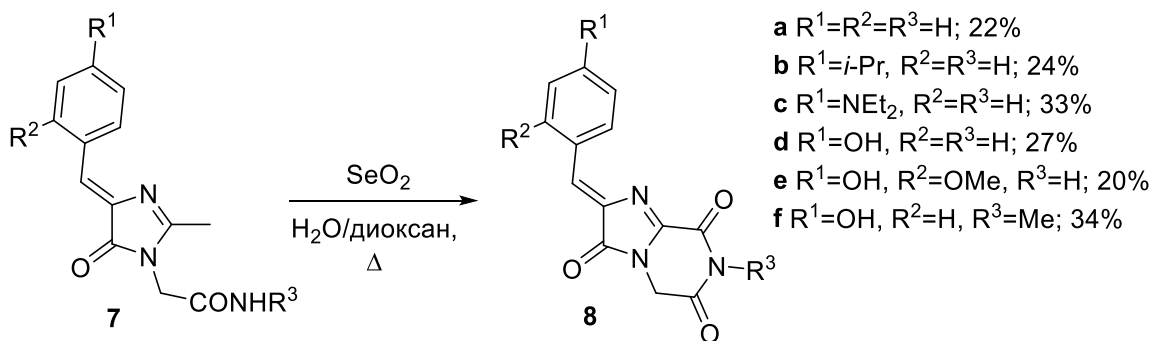


Схема 2.10. Получение циклических имидов **8a-f**.

Механизм этого превращения, по всей видимости, включает формирование альдегида, который затем подвергается нуклеофильной атаке и избыточному окислению (схема 2.11). Однако подтвердить предложенный механизм, и зафиксировать образование альдегида с помощью масс-спектрометрии не удалось.

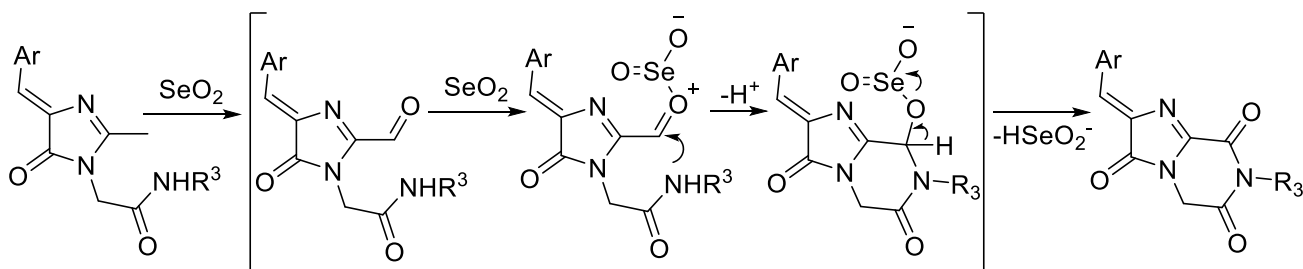


Схема 2.11. Возможный механизм окисления.

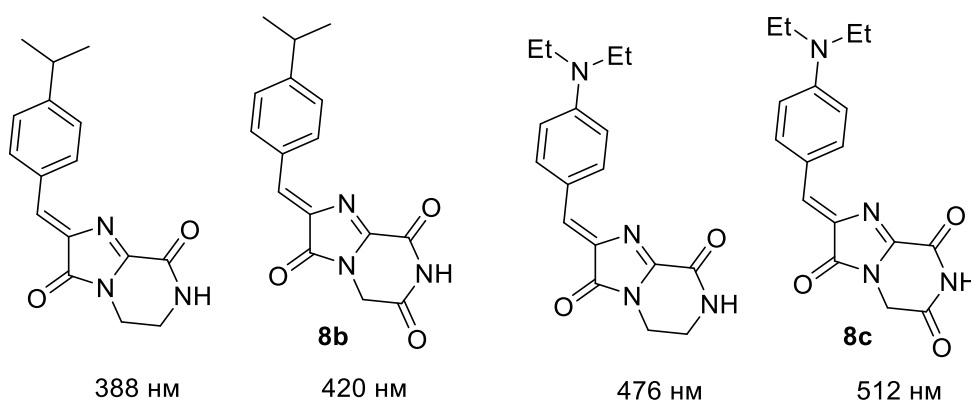
Изучение оптических свойств исходных амидов **7** и имидов **8** показало, что подобное окисление приводит к батохромному смещению положений максимумов поглощения и эмиссии в среднем на 70 нм (таблица 2.2). Также заметно возрастание величины стоксового сдвига в ряде случаев почти до 100 нм:

Таблица 2.2. Оптические свойства амидов **7a-f** и имидов **8a-f** в ацетонитриле.

Соединение	Максимум абсорбции, нм	Максимум эмиссии, нм	Стоксов сдвиг, нм
<b>7a</b>	345	408	63
<b>8a</b>	409	498	89
<b>7b</b>	355	415	60
<b>8b</b>	420	507	87
<b>7c</b>	430	494	64
<b>8c</b>	512	605	93
<b>7d</b>	363	408	45
<b>8d</b>	409	506	97
<b>7e</b>	383	435	52
<b>8e</b>	442	538	96
<b>7f</b>	361	407	46
<b>8f</b>	412	510	98

Заметное влияние на положение спектральных максимумов также оказывает электронный характер заместителей  $R^1$  и  $R^2$  в бензилиденовом фрагменте (Схема 2.10). Так с увеличением донорного характера введенного заместителя максимумы поглощения и испускания в большей степени смещаются в длинноволновую область, что хорошо коррелирует с данными, полученными ранее в нашей лаборатории для других 4-арилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов [57].

Сравнение оптических свойств новых циклических имидов **8b** и **8c** с ранее полученными циклическими амидами показало, что введение дополнительного атома кислорода действительно приводит к более выраженному батохромному сдвигу:

Схема 2.12. Циклические амиды [231] и имиды **8** (указаны максимумы поглощения).

В заключении также можно отметить, что все полученные новые циклические имиды **8a-f** имеют квантовый выход флуоресценции около 0.1-0.2%. Такие оптические свойства – эмиссия в области 500-600 нм и слабая флуоресценция в свободном виде, говорят о перспективности использования подобных соединений в качестве флуорогенных красителей.

## 2.2. Новые флуорогены белка FAST

Производные хромофоров флуоресцентных белков имеют высокий флуорогенный потенциал. В частности, в нашей лаборатории уже было показано, что некоторые производные этой группы могут быть использованы в роли флуорогенных красителей для отдельных клеточных органелл [227], в то время как другие могут быть использованы в роли флуорогенов для флуороген-активирующих белков, сконструированных нашими коллегами из ИБХ на базе белка семейства липокалинов [47].

Флуороген-активирующий белок FAST (от англ. Fluorescence-activating and Absorption-Shifting Tag) также является перспективным объектом для связывания производных хромофоров. Этот белок образует флуоресцентные комплексы при взаимодействии с производными 4-гидроксibenзилиденроданина [49]. Помимо многократного усиления флуоресцентного сигнала при формировании комплекса также происходит bathochромное смещение спектральных максимумов флуорогена, обусловленное депротонированием гидроксигруппы:

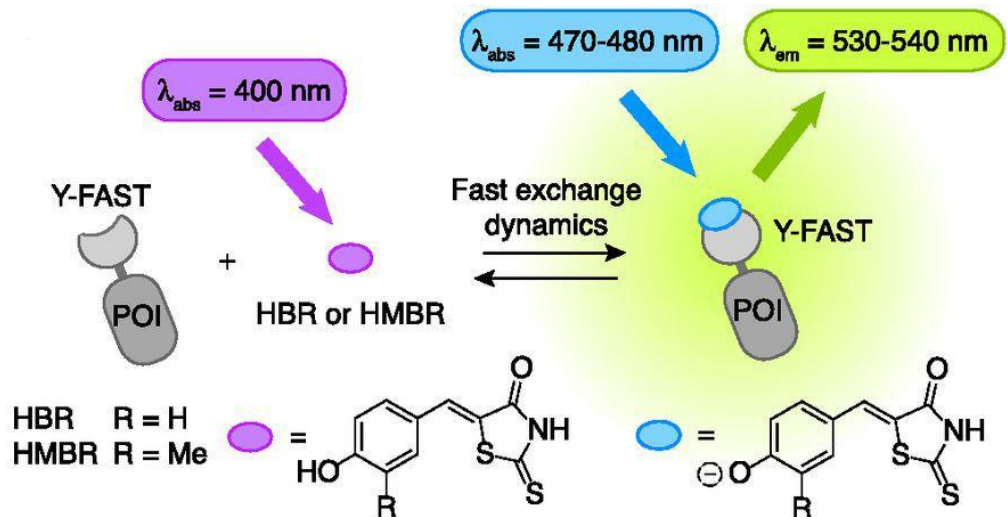


Схема 2.13. Роданиновые флуорогены белка FAST [49].

Высокое структурное подобие хромофоров флуоресцентных белков с роданиновым флуорогеном (схема 2.14), позволяет предположить, что белок FAST будет также эффективно образовывать флуоресцентные комплексы и с производными 4-гидроксibenзилиденимидазолна.

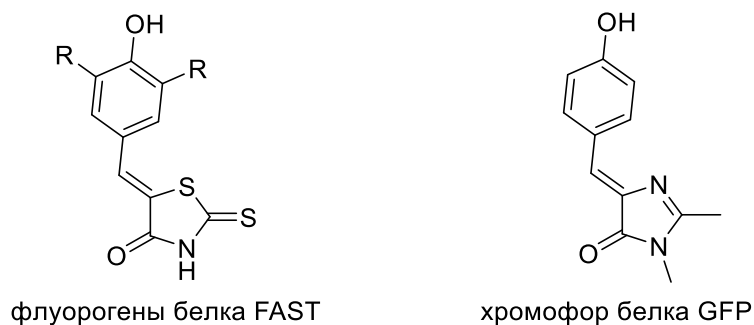


Схема 2.14. Структуры флуорогенов белка FAST и хромофора белка GFP.

В связи с этим вторая часть настоящей работы посвящена созданию разноцветных флуорогенов для белка FAST на основе производных 4-гидроксibenзилиденимидазолна, и выявлению самых перспективных кандидатов.

### 2.2.1. Поиск новых флуорогенов для белка FAST среди различных 4-гидроксibenзилиденимидазолонов

Существенным отличием роданиновых лигандов белка FAST от хромофоров флуоресцентных белков является присутствие более крупных атомов серы в роданиновом фрагменте (схема 2.14). Поэтому для выявления перспективных кандидатов на роль флуорогенов белка FAST были протестированы разные производные хромофоров флуоресцентных белков, содержащие гидроксигруппы в четвертом положении бензилидена.

В это исследование были включены кетоны **5a-f** и циклические имиды **8d-f**, синтез которых был описан выше. Также из библиотеки соединений, ранее полученных в нашей лаборатории, была использована серия производных хромофора белка GFP **GA02-06**, содержащая разные алкильные остатки во втором положении имидазолонана. Кроме того был синтезирован ряд аналогов хромофора белка Kaede **10a-e** и **11a-i** (схема 2.15). Синтез этой группы соединений проводился с помощью конденсации различных альдегидов по метильной группе, находящейся во втором положении имидазолонанового цикла.

Необходимое превращение легко протекает как в присутствии основных, так и кислотных катализаторов. Основной катализ заключается в использовании смеси пиридин-пиперидин, а кислотный – в использовании хлорида цинка. При этом применение основного катализа более эффективно при введении в реакцию альдегидов, содержащих донорные заместители, в то время как реакция альдегидов, содержащих акцепторные заместители, лучше протекает с хлоридом цинка.

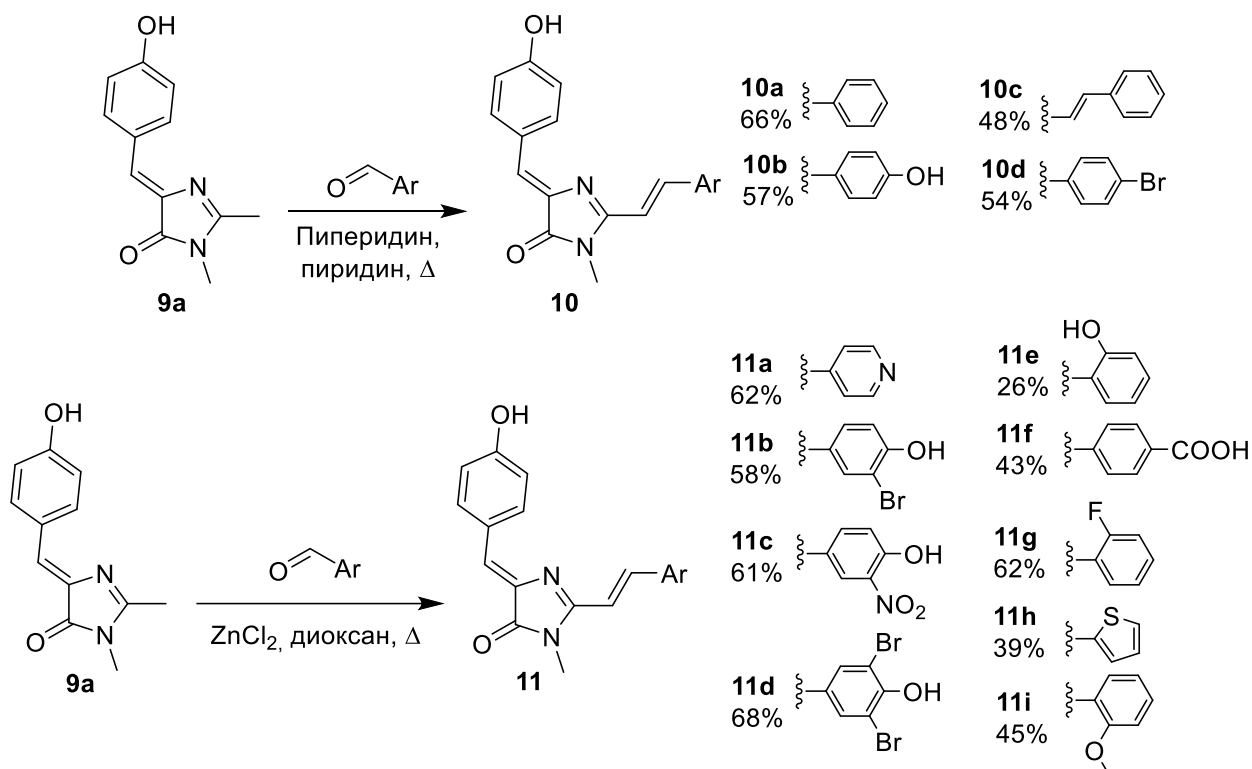
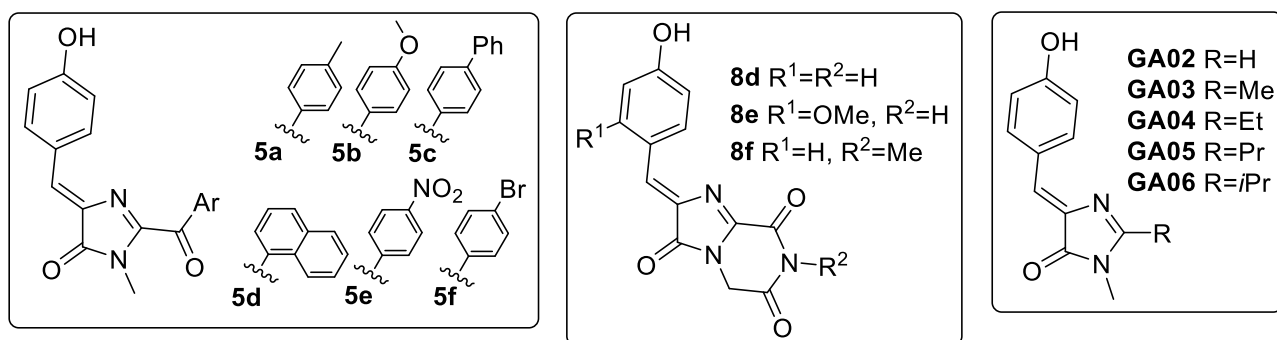


Схема 2.15. Структуры потенциальных флуорогенов белка FAST.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН был подготовлен образец белка FAST, иммобилизованного на металл-аффинной смоле TALON. Выявление эффективных флуорогенов проводилось с помощью масштабного скрининга. Небольшие количества смолы смешивали с растворами потенциальных флуорогенов в многолучночных плашках и осматривали на флуоресцентном микроскопе в различных каналах. В результате было установлено, что для двух соединений **11a** и **11d** (схема 2.15), после взаимодействия с белком FAST наблюдается заметное усиление флуоресценции.

Эксперименты с очищенным белком в растворе показали, что при образовании комплексов происходит примерно десятикратное возрастание интенсивности флуоресценции. Также было установлено, что флуорогены сильно отличаются по эффективности связывания с белком. Для производного **11a** наблюдается очень слабое связывание с  $K_D$  около 50 мкМ, что существенно



затрудняет дальнейшее исследование этого комплекса. В то время как KD соединения **11d** намного меньше (таблица 2.3). Однако дальнейшее изучение оптических свойств комплекса белка FAST с производным **11d** показало, что квантовый выход этой пары крайне мал:

Таблица 2.3. Оптические свойства соединений **11a** и **11d** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.

	Абсорбция, нм	Коэффициент молярного поглощения, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	Эмиссия, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	K <sub>D</sub> , μM
<b>11a</b>	537	-	604	-	~ 50
<b>11d</b>	480	21000	600	1.2	0.54

Полученные результаты подтверждают изначальную гипотезу, что производные хромофоров GFP, такие как вещества **11a** и **11d**, будут проявлять флуорогенные свойства при смешивании с белком FAST. Однако из-за незначительного усиления флуоресцентного сигнала, а также слабого связывания (производное **11a**) и низкого квантового выхода (производное **11d**) они не могут быть использованы для мечения. Однако эти соединения являются отличной основой для создания новых производных, среди которых могут быть выявлены более перспективные флуорогены.

Оптические свойства свободных форм флуорогенов **11a** и **11d** также были изучены. Соединения **11a** и **11d**, как и все 4-гидроксibenзилиденимидазолонны, могут переходить в анионную форму. Было установлено, что процесс депротонирования сопровождается bathochromным сдвигом максимумов на 50-120 нм (таблица 2.4), pK<sub>a</sub> соединения **11a** составляет 7.55, а соединения **11d** – 8.15 (рис. 2.1).

Таблица 2.4. Оптические свойства соединений **11a** и **11d** в составе комплекса с белком FAST и в свободном виде в разных растворителях.

	<b>11a</b>		<b>11d</b>	
	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.
Диоксан	431/-	550/646	433/485	553/586
Этилацетат	429/550	548/ 657	431/490	550/590
Ацетонитрил	431/585	537/689	430/547	548/619
Метанол	440/521	535/645	450/513	570/600
Вода	430/511	545/600	480/512	560/600
Комплекс с FAST в PBS	537	604	480	600

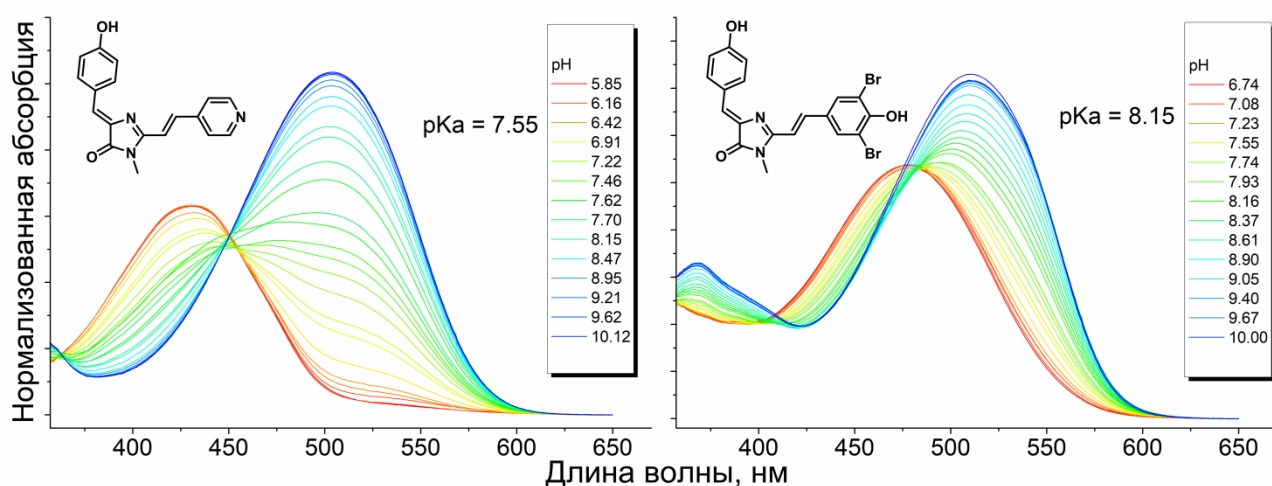


Рисунок 2.1. Спектры поглощения соединений **11a** и **11d** в воде при различном значении pH.

Стоит отметить, что оптические свойства комплексов в большей степени схожи со свойствами свободных флуорогенов в анионной форме (таблица 2.4). Вероятно, что при формировании комплексов с белком FAST производные имидазолонов, как и роданиновые флуорогены, депротонируются, и происходит bathochromное смещение спектральных максимумов:

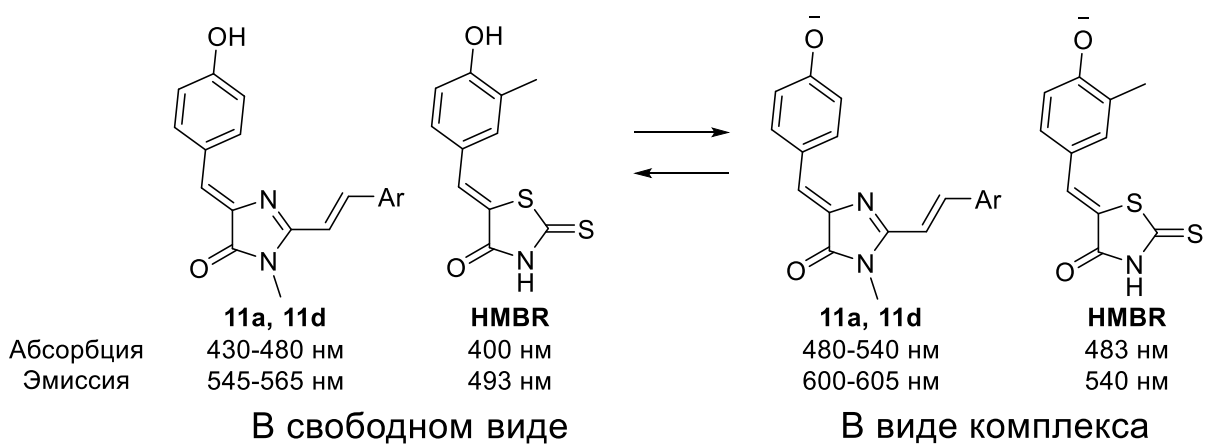


Схема 2.16. Депротонирование флуорогенов белка FAST.

На следующем этапе этого исследования на флуорогенную активность был протестирован расширенный ряд производных флуорогенов **11a** и **11d**. Для всех новых соединений было решено сохранить структурный фрагмент 4-(4-гидроксibenзилидена), который очевидно имеет важное значение в процессе связывания с белком. Чтобы сместить положения спектральных максимумов в длинноволновую область в бензилиденовый фрагмент были введены дополнительные электронодонорные группы, а в стирольный остаток – акцепторные (схема 2.17).

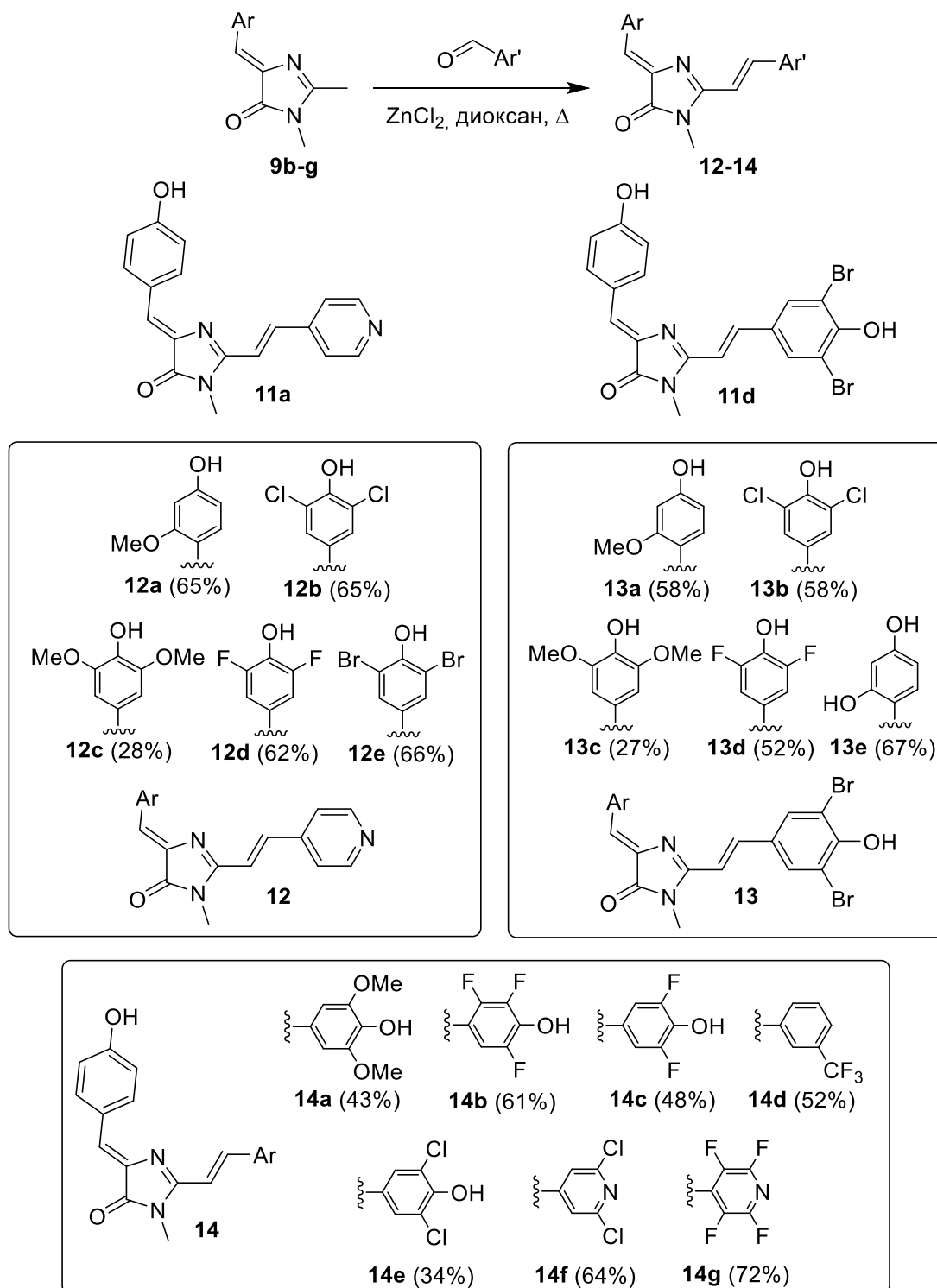


Схема 2.17. Аналоги хромофора белка Kaede как потенциальные флуорогены белка FAST (в скобках приведены выходы реакции).

Скрининг проводился путем смешивания каждого вещества с белком FAST, иммобилизованного на металл-аффинной смоле TALON. В результате было замечено, что для соединений **12c** и **12e** добавление белка не приводит к усилению флуоресцентного сигнала. Увеличение интенсивности сигнала в 10-30 раз наблюдалось для соединений **12d** и **13c-e**. Такие

же результаты были получены для ряда соединений **14a-g**, содержащие разные заместителей в стирольном фрагменте. Более сильное разгорание, в 50-80 раз, было зафиксировано для производных, содержащих атомы хлора в бензилиденовом фрагменте (**12b** и **13b**). Но к наибольшему росту флуоресценции привело введение метоксигруппы во второе положение бензилиденового фрагмента. Для соединений **12a** и **13a** флуоресцентный сигнал усиливался при смешивании с белком FAST почти в 200 раз.

Важно отметить, что помимо способности образовывать флуоресцентные комплексы флуорогены должны соответствовать и другим требованиям. Для красителей, используемых во флуоресцентной микроскопии, также необходимыми характеристиками являются способность проникать через клеточные мембраны и отсутствие неспецифического окрашивания. Поэтому в продолжение этого исследования вещества, проявившие флуорогенные свойства, были использованы для окрашивания в живых клетках.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН был создан ряд конструкций, белков слияния гистона H2B или белков цитоскелета с белком FAST, которые были использованы для временной трансфекции клеток линии HeLa Kyoto. Исследуемые флуорогены добавляли в клеточную среду до конечной концентрации 5-10  $\mu\text{M}$ .

Большинство исследуемых веществ не окрашивали ядра клеток, трансфицированных конструкцией H2B-FAST. Добавление лишь некоторых соединений (**11a**, **12b** и **14a**) приводило к появлению слабой флуоресценции. Наиболее яркий сигнал был получен при использовании производного **12a** (рис. 2.2 А). Значимое усиление флуоресцентного сигнала соединения **12a** также наблюдалось на более сложной модели цитоскелета (рис. 2.2 Б,В). Стоит также отметить, что при использовании этого флуорогена не наблюдалось неспецифического окрашивания.

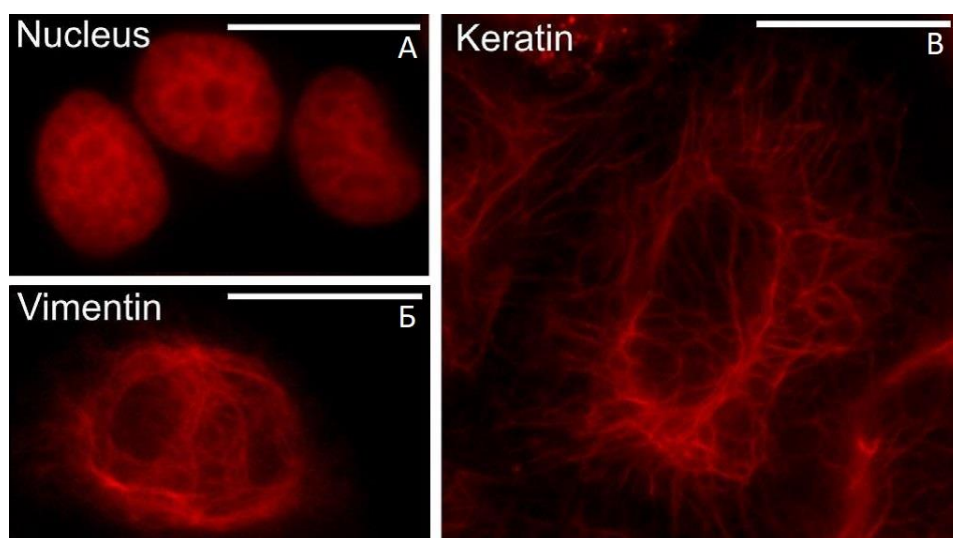


Рисунок 2.2. Флуоресцентная широкопольная микроскопия конструкций белка FAST с флуорогеном **12a** в клетках HeLa Kyoto; масштабная линейка 20  $\mu\text{m}$ .

Исследование оптических свойств показало, что спектральные характеристики комплекса **12a**-FAST схожи со свойствами комплекса, образующегося с ранее предложенным флуорогеном **HBR-DOM** [50] (схема 2.18). Положение максимумов абсорбции и эмиссии этих комплексов практически совпадают (таблица 2.5). Однако, стоит отметить, что спектр флуоресценции пары **12a**-FAST имеет заметно более широкую форму (рис. 2.3). Применение такой метки позволит детектировать флуоресцентный сигнал в большем диапазоне, до 700 нм.

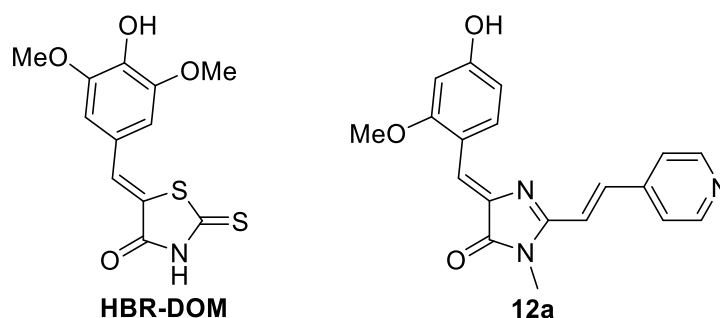


Схема 2.18. Структуры флуорогенов **HBR-DOM** и **12a**.

Таблица 2.5. Оптические свойства соединений **12a** и **HBR-DOM** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.

	Абсорбция, нм	Коэффициент молярного поглощения, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	Эмиссия, нм	Квантовый выход флуоресценции, %	К <sub>D</sub> , μМ
<b>HBR-DOM</b>	520	39000	600	31	0.97
<b>12a</b>	562	23000	606	25	0.25

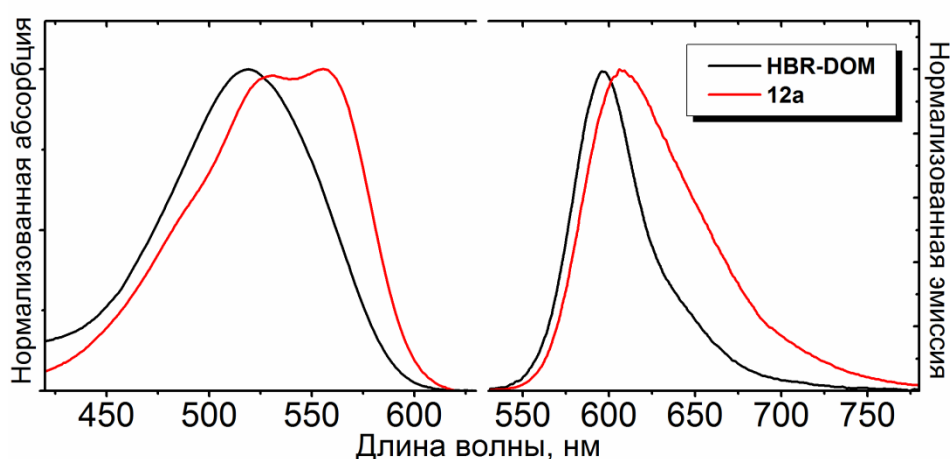


Рисунок 2.3. Спектры абсорбции и эмиссии комплексов **12a**-FAST и **HBR-DOM**-FAST в фосфатном буфере.

Взаимодействие белка FAST с производным **12a** приводит к смещению спектральных максимумов. Очевидно, что формирование флуоресцентного комплекса **12a**-FAST, как и в случае вышеописанных флуорогенов, сопровождается депротонированием гидроксигруппы. Положения максимумов абсорбции и эмиссии комплекса близки соответствующим анионной формы свободного соединения **12a** (таблица 2.6).

Таблица 2.6. Оптические свойства производного **12a** в составе комплекса с белком FAST и в свободном виде в разных растворителях.

	Абсорбция, нм нейтр./анион.	Эмиссия, нм нейтр./анион.
<b>Диоксан</b>	455/-	540/627
<b>Этилацетат</b>	454/570	542/ 658
<b>Ацетонитрил</b>	450/596	550/679
<b>Метанол</b>	465/544	546/646
<b>Вода</b>	455/528	570/630
<b>Комплекс с FAST в PBS</b>	558	610

Изучение спектров поглощения производного **12a** при разном значении pH в воде показало, что депротонирование происходит в диапазоне pH 6-8.5 и характеризуется pKa 7.40 (рис.2.4). Эти данные позволяют предположить, что при флуоресцентном мечении живых клеток свободный флуороген **12a**, который не связан белком FAST, будет существовать в двух формах и потенциально может создавать фоновую флуоресценцию.

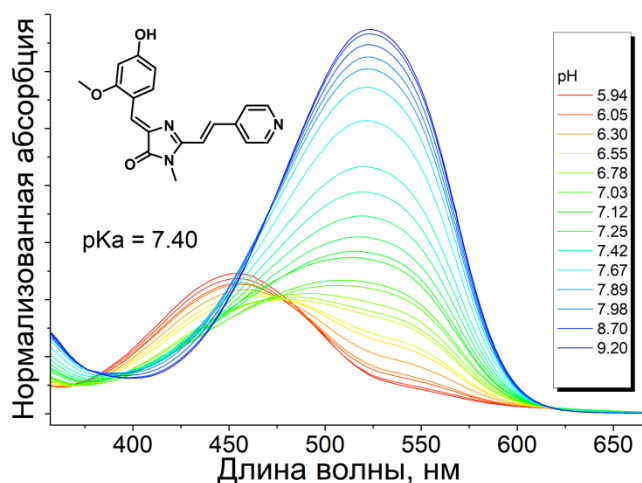


Рисунок 2.4. Спектры абсорбции соединения **12a** в воде при различном значении pH.

Было установлено, что в растворах соединения **12a** в фосфатном буфере действительно присутствуют и нейтральная и депротонированная форма. При сравнении спектров поглощения

и флуоресценции комплекса **12a**-FAST и свободного флуорогена **12a** в фосфатном буфере можно увидеть сильное перекрытие сигналов, особенно хорошо это заметно в спектрах эмиссии:

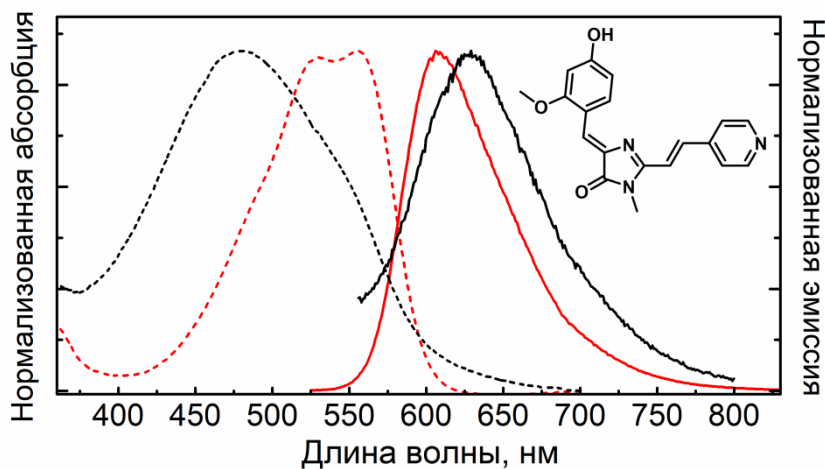


Рисунок 2.5. Спектры абсорбции (пунктирная линия) и эмиссии (сплошная линия) соединения **12a** в свободном виде (черным) и в виде комплекса с белком FAST (красным) в фосфатном буфере.

Однако, квантовый выход флуоресценции нейтральной и анионной формы соединения **12a** в водных растворах не превышает 0.2 %, что на два порядка меньше квантового выхода комплекса **12a**-FAST (квантовый выход равен 25 %). Таким образом, незначительная фоновая флуоресценция несвязанного флуорогена будет обеспечивать хорошую контрастность флуоресцентного сигнала метки.

Константа диссоциации комплекса **12a**-FAST составила 0.25  $\mu\text{M}$ , что близко к аналогичным показателям некоторых из ранее предложенных флуорогенов:

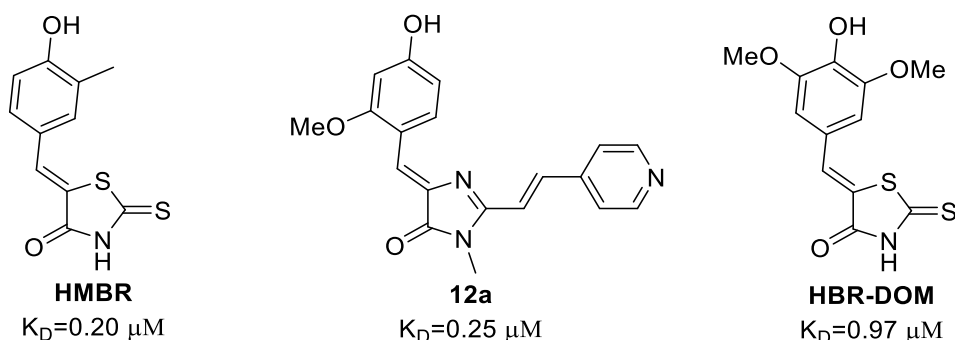


Схема 2.19. Флуорогены **HMBR**, **HBR-DOM** и **12a**.



Окрашивание живых клеток линии НЕК293NT, трансфицированных Н2В-FAST, в потоке растворов флуорогенов показало, что флуороген **12a** имеет аналогичную флуорогену **HMBR** скорость связывания с белком и вымывания:

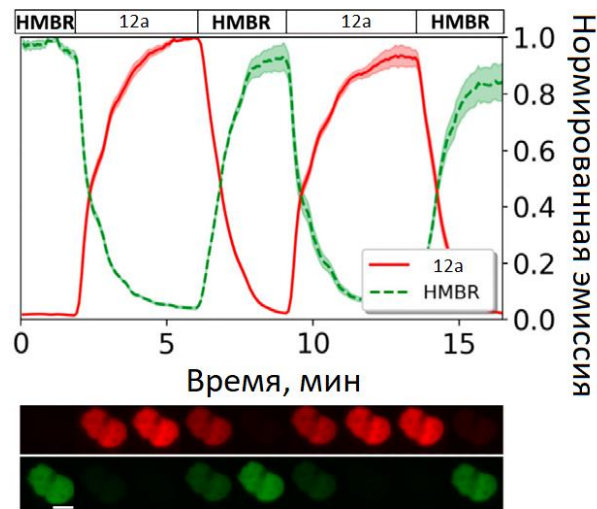


Рисунок 2.6. Флуоресцентная микроскопия клеток линии НЕК293NT, трансфицированных вектором Н2В-FAST, при попеременном добавлении и отмывании флуорогенов **HMBR** и **12a**; масштабная линейка 10μm.

Также наши коллеги из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов показали, что комплекс FAST-**12a**, в сравнении с ранее предложенными роданиновыми, имеет заметно большую устойчивость в условиях флуоресцентной микроскопии. При интенсивном облучении зеленым и синим светом комплекс соединения **12a** оказался более фотостабильным:

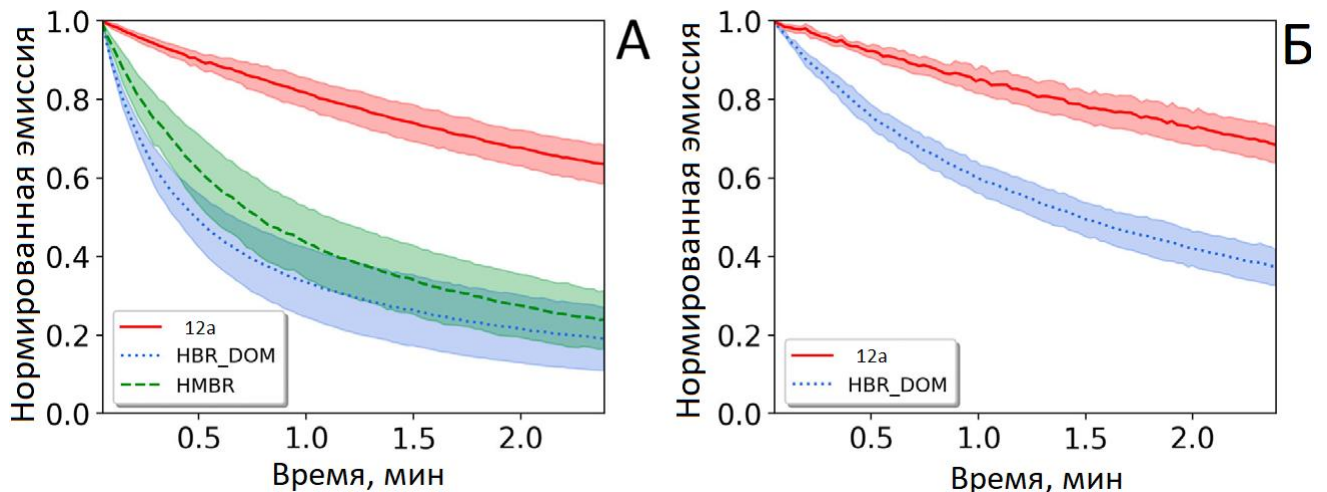


Рисунок 2.7. Кривые фотообесцвечивания флуоресцентного сигнала комплексов флуороген-белок в ядрах клеток линии HeLa Kyoto, полученные при облучении лазером 488 нм (А) и 543 нм (Б).

В заключении можно сказать, что соединение **12a** может быть использовано в качестве флуорогена белка FAST для визуализации структур и процессов в живых системах во

флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентный комплекс, образующийся при взаимодействии белка FAST с новым флуорогеном, по своим характеристикам сопоставим ранее предложенным. Соединение **12a** не уступает роданиновым производным по эффективности связывания с белком. Более того, новый лиганд формирует комплекс с более широким спектром флуоресценции и заметно большей фотостабильностью.

### 2.2.2. Расширение палитры флуорогенов для белка FAST

Широкий спектр задач, решаемых с помощью флуоресцентной микроскопии, довольно часто требует разработки меток разной окраски. Такие метки позволяют одновременно следить за разными биологическими объектами в разных каналах микроскопа. Расширить цветовую палитру меток на основе флуороген-активирующих белков значительно проще в сравнении с другими флуоресцентными маркерами. Так как окраска такой метки зависит от флуорогена, то для изменения цвета необходимо модифицировать лишь молекулу флуорогена с помощью химических методов.

Флуорогены белка FAST, созданные на основе производных хромофоров флуоресцентных белков, более доступны для химической модификации, чем роданиновые флуорогены. Молекула 4-гидроксипрохлоридина имеет только одно направление для модификации – бензилиденовый фрагмент. В то время как ряд производных **12a** может быть легко расширен варьированием стирольных заместителей (схема 2.20). Кроме того, на сегодняшний день разработано много удобных подходов к созданию и модификации разных имидазолонов (см. раздел 1.2 Синтез и модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов).

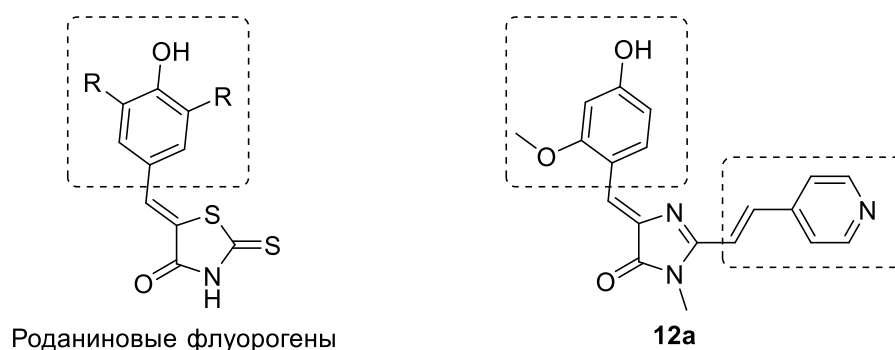


Схема 2.20. Направление для модификации флуорогенов белка FAST.

Благодаря высокой реакционной способности алкильного заместителя во втором положении имидазолонна на следующем этапе данной работы был получен ряд аналогов соединения **12a**, содержащих различные заместители при двойной связи (схема 2.21).

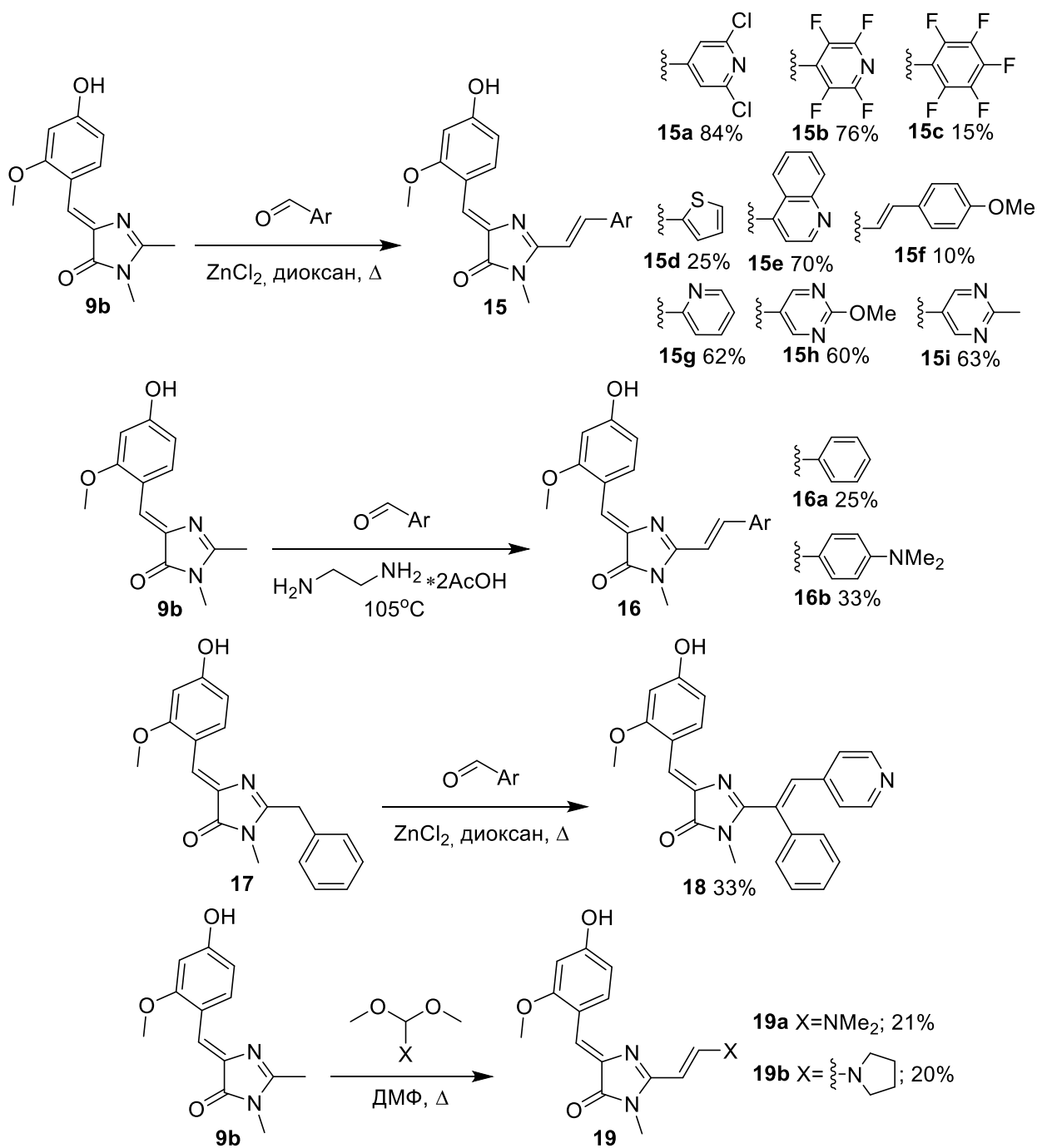


Схема 2.21. Синтез аналогов соединения **12a**.

Введение заместителей разного характера позволило получить библиотеку соединений, характеризующихся и гипсохромным и батохромным смещением спектральных максимумов относительно производного **12a**. Что ранее было продемонстрировано на примере различных аналогов хромофора белка Kaede [47,207,227,229].

С использованием реакции окисления были синтезированы кетонные производные **21a-b** и альдегидный аналог **23** (схема 2.22). При взаимодействии последнего с различными ароматическими нитрилами были получены аналоги **24a-b**, содержащие нитрильный заместитель при двойной связи (схема 2.22).

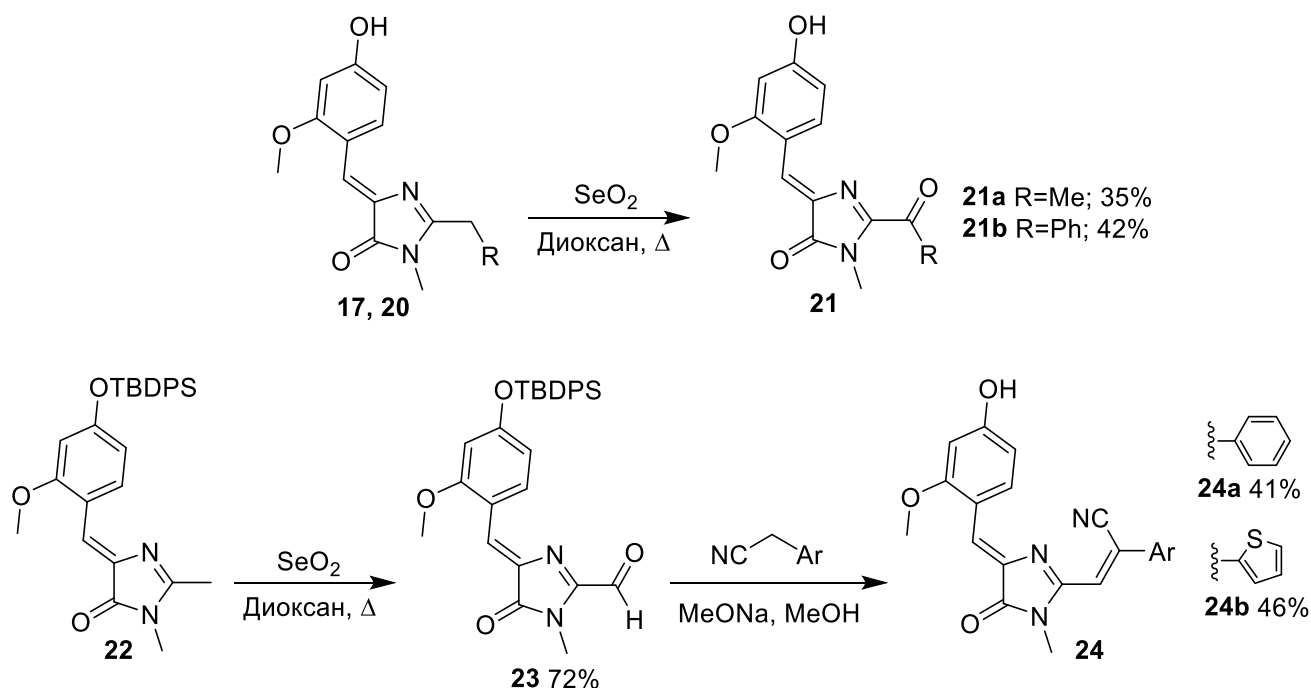


Схема 2.22. Использование диоксида селена в синтезе флуорогенов белка FAST.

Ряд производных соединения **12a** также был расширен имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2*H*)-онами – аналогами, содержащими дополнительное конденсированное ароматическое кольцо (схема 2.23).

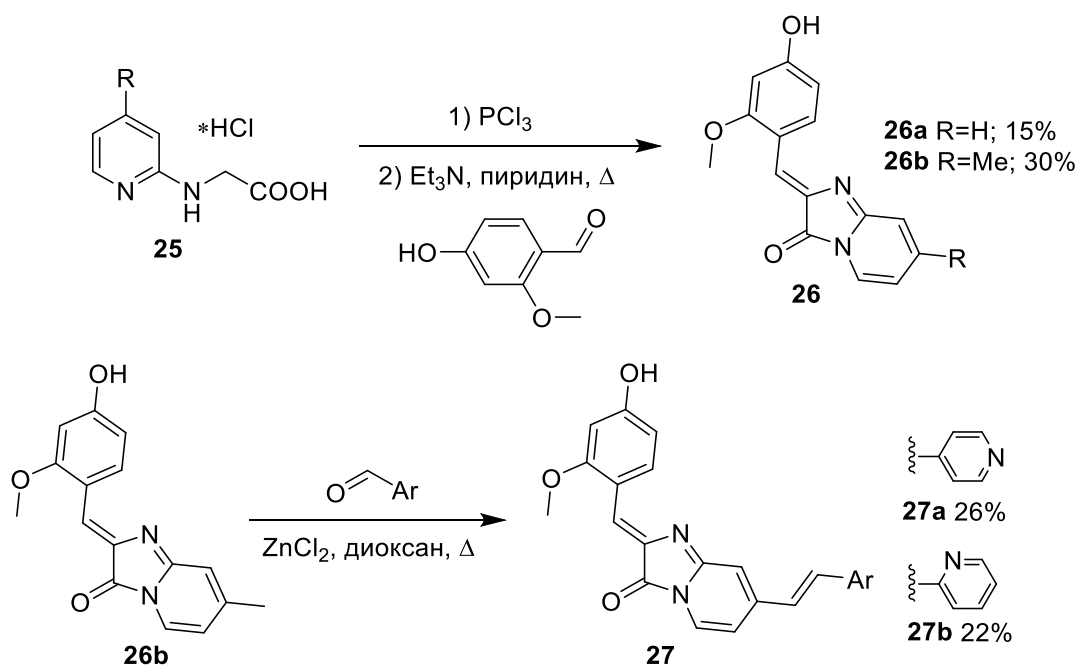


Схема 2.23. Синтез циклических аналогов **12a**.

Из литературных данных известно, что введение кето- [47,231] и нитрильных групп [235–237], а также удлинение  $\pi$ -системы сопряженных связей [207,209], позволяет значительно сместить поглощение и флуоресценцию в длинноволновую область.

Образец белка FAST был подготовлен сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН. Скрининг этой библиотеки проводился уже не на иммобилизованном белке, а в растворе с использованием плащечного ридера. Было установлено, что все полученные соединения проявляют флуорогенные свойства. Однако в некоторых случаях интенсивность сигнала увеличивалась не более чем в 50 раз. Такие результаты были получены для енаминных **19a-b**, кетонных **21a-b** и циклического **26a** производных, а также аналогов **18** и **24a-b**, содержащих дополнительные заместители при двойной связи. Поэтому эти соединения были исключены из дальнейшего исследования.

Изучение оптических свойств новых комплексов с белком FAST показало, что все они имеют квантовый выход флуоресценции от 5 до 30 %, за исключением циклического производного **26b** (таблица 2.7). Также было отмечено, что введение различных арильных заместителей незначительно влияет на константу связывания – величина  $K_D$  изменяется в диапазоне от 0.15 до 0.95  $\mu\text{M}$ :

Таблица 2.7. Оптические свойства соединений **12a**, **15a-i**, **16a-b**, **26b** и **27a-b** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере (вещества расположены в порядке увеличения длины волны максимума флуоресценции).

	Абсорбция, нм	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Эмиссия, нм	КВФ, %	$K_D$ , $\mu\text{M}$	Яркость (КВФ $\cdot\epsilon$ )
<b>16a</b>	539	33000	570	26	0.44	8600
<b>15d</b>	549	34000	579	28	0.58	9500
<b>15h</b>	547	36000	582	15	0.44	5400
<b>26b</b>	570	65500	584	0.7	0.21	450
<b>15f</b>	525	22500	588	~5	0.86	~5400
<b>15c</b>	519	21000	590	~15	0.93	~3000
<b>15g</b>	552	47000	593	32	0.44	15000
<b>15i</b>	552	47000	595	14	0.16	6600
<b>16b</b>	549	41500	605	20	0.40	8300
<b>12a</b>	562	23000	606	25	0.25	5800
<b>27b</b>	617	40000	634	14	0.17	5600
<b>27a</b>	619	56000	636	18	0.14	10100
<b>15e</b>	533	21000	641	5,5	0.27	1200
<b>15a</b>	542	16500	644	29	0.16	5000
<b>15b</b>	542	15500	645	32	0.29	4800

КВФ – квантовый выход флуоресценции,  $\epsilon$  – коэффициент молярного поглощения

Введение разных электронодонорных и акцепторных групп позволило получить комплексы с флуоресценцией в диапазоне 550-650 нм (таблица 2.7). Наиболее красные производные были получены при увеличении системы сопряженных двойных связей (циклические производные **27a-b** или соединение **15e**) и введении в пиридиновое кольцо галогенов (соединения **15a** и **15b**).

На следующем этапе этого исследования нашими коллегами из лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН новые флуорогены были протестированы в окрашивании живых клеток HeLa, трансфицированных конструкцией H2B-TagBFP2-FAST. Флуоресцентный белок TagBFP2 был использован в качестве стандарта для оценки яркости и уровня фоновой флуоресценции по отношению к флуоресцентному сигналу комплекса. Для проведения этого эксперимента из всех соединений, представленных в таблице 2.7 были отобраны те, которые при формировании комплекса с белком FAST демонстрируют большую яркость или имеют более красную флуоресценцию чем соединение **12a**. В результате было установлено, что для трех соединений **15d**, **15g** и **27a** наблюдается эффективное окрашивание ядер клеток в отсутствие нецелевой флуоресценции.

Флуорогены **15d** и **15g** характеризуются гипсохромным сдвигом спектральных максимумов относительно производного **12a**, а соединение **27a** – батохромным:

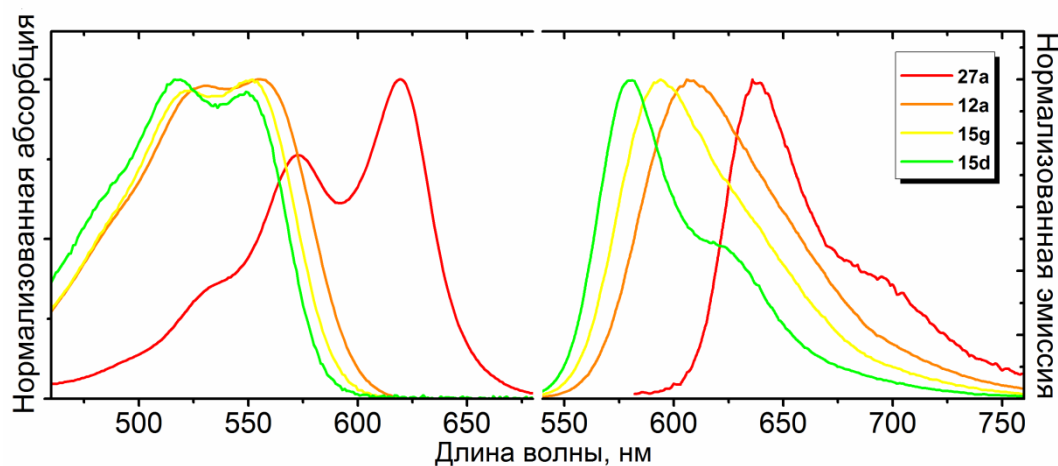


Рисунок 2.8. Спектры абсорбции и эмиссии соединений **15d**, **15g**, **12a** и **27a** в виде комплекса с белком FAST в фосфатном буфере.

Сотрудниками лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН было показано, что такая разница позволяет отслеживать меченые объекты с использованием разных флуоресцентных фильтров. Фильтр TRITC использовался для детектирования флуоресцентного сигнала комплекса **15d**-FAST, фильтр mCherry для **15g**-FAST и фильтр Cy5 для **27a**-FAST:

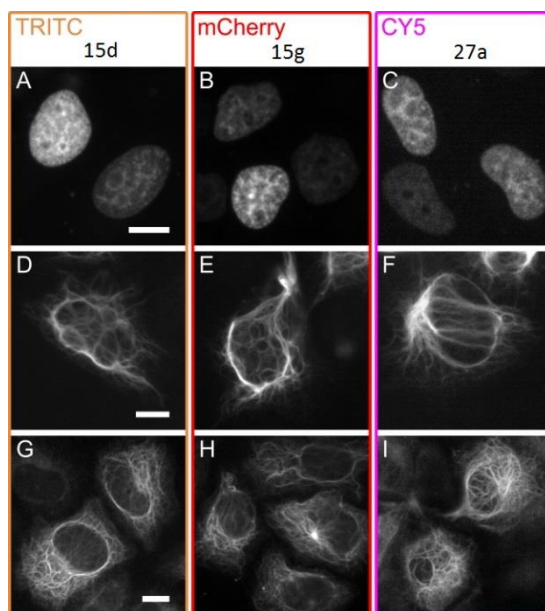


Рисунок 2.9. Флуоресцентная микроскопия клеток линии HeLa, трансфицированных конструкцией H2B-FAST (A, B, C), виментин-FAST (D, E, F) и цитокератин-FAST (G, H, I) с флуорогенами **15d**, **15g** и **27a**; масштабная линейка 10µm.

В результате было продемонстрировано, что бензилиденимидазолон являются отличной основой для создания флуорогенов белка FAST различной окраски. Современные удобные и доступные химические методы позволяют синтезировать библиотеки производных имидазолонов с различными заместителями и разными оптическими свойствами.



## Глава 3. Экспериментальная часть

### 3.1 Материалы и оборудование

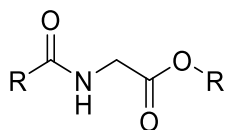
Спектры ЯМР зарегистрированы на приборах Bruker Avance III 800 (снабжен 5-мм СРТХI криодатчиком), Bruker Avance III 700 и Bruker Fourier 300 в ДМСО- $d_6$  и CDCl<sub>3</sub>, внутренний стандарт - ТМС. Температуры плавления определены на приборе SMP30 и не корректировались. Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе LTQ Orbitrap Elite (ThermoFisher Scientific, USA) методом электрораспылительной ионизации (ESI).

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio. Спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре Agilent Cary Eclipse. Скрининг библиотеки соединений проводился на планшет-ридере Tecan Infinity M200.

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

## 3.2 Синтез

### 3.2.1 Синтез кетопроизводных 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов

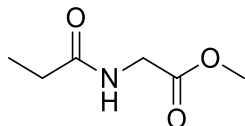


#### Получение амидоацетатов (1). Общая методика А:

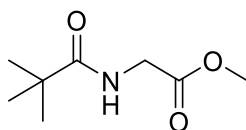
Соответствующую карбоновую кислоту (15 ммоль) растворяли в 20 мл ацетонитрила и добавляли *N,N'*-карбонилдиимидазол (2.675 г, 16.5 ммоль). По окончании выделения газа, реакционную смесь продували аргоном и добавляли диизопропилэтиламин (2.751 мл, 15.75 ммоль) и следом прикапывали суспензию гидрохлорида метилового эфира глицина (1.883 г, 15 ммоль) в 10 мл ацетонитрила. Реакционную массу перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре, упаривали насухо, остаток растворяли в 50 мл хлористого метилена и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2 × 100 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ - этанол как элюент (95:5).

#### Получение амидоацетатов (1). Общая методика В:

Соответствующую карбоновую кислоту (20 ммоль) растворяли в 25 мл хлороформа, добавляли оксалил хлорид (3.43 мл, 40 ммоль) и одну каплю диметилформамида. Реакционную массу кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч, упаривали насухо, остаток растворяли в 30 мл хлористого метилена и охлаждали до 0 °С. К полученному раствору добавили гидрохлорид метилового эфира глицина (2.64 г, 21 ммоль) и диизопропилэтиламин (7.335 мл, 42 ммоль) и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь промывали 0.5 М раствором соляной кислоты (100 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (100 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали. Полученный остаток растирали в смеси гексан – диэтиловый эфир (95:5), отфильтровывали и сушили в вакууме масляного насоса.

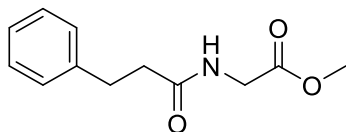
**Метил 2-пропионамидоацетат (1a):**

Синтезировано по общей методике **A**. Выход 915 мг (42%), белый порошок, т. пл. 42-44°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.00 (т,  $J = 7.6$ , 3H), 2.13 (кв,  $J = 7.6$ , 2H), 3.62 (с, 3H), 3.81 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 8.18 (т,  $J = 5.9$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  9.7, 28.1, 40.5, 51.5, 170.5, 173.4; HRMS (m/z) найдено 146.0811  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3^+$ . Вычислено 146.0812.

**Метил 2-пивалоиламидоацетат (1b):**

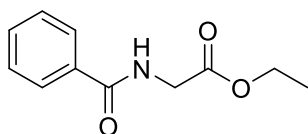
Синтезировано по общей методике **B**. Выход 1.51 г (58%), бесцветное масло;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.10 (с, 9H), 3.61 (с, 3H), 3.76 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.88 (т,  $J = 6.1$ , 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [241].

**Метил 2-(3-фенилпропанамидо)ацетат (1c):**

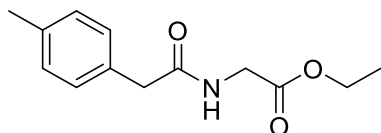
Синтезировано по общей методике **A**. Выход 2.66 г (80%), белый порошок;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.44 (т,  $J = 7.5$ , 2H), 2.82 (т,  $J = 7.8$ , 2H), 3.62 (с, 3H), 3.83 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.17 (т,  $J = 7.3$ , 1H), 7.21 (д,  $J = 6.7$ , 1H), 7.27 (т,  $J = 7.6$ , 2H), 8.30 (т,  $J = 5.9$ , 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [242].

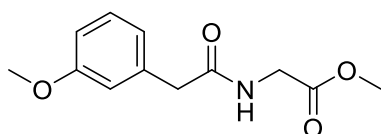
**Этил 2-бензамидоацетат (1d):**

Синтезировано по общей методике **B**. Выход 3.65 г (88%), белый порошок;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.30 (т,  $J = 7.2$ , 3H), 4.22 (д,  $J = 5.1$ , 2H), 4.24 (кв,  $J = 7.2$ , 2H), 6.76 (ушир. с., 1H), 7.42 (т,  $J = 7.8$ , 2H), 7.50 (т,  $J = 7.9$ , 1H), 7.81 (д,  $J = 8.3$ , 2H).

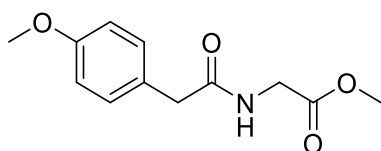
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [243].

**Этил 2-(2-(*n*-толил)ацетида)ацетат (1e):**

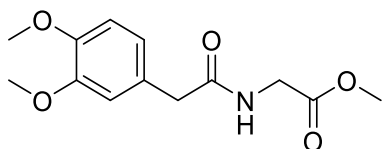
Синтезировано по общей методике **В**. Выход 3.39 г (72%), желтоватый порошок, т. пл. 99-102°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.17 (т,  $J = 7.1$ , 3H), 2.27 (с, 3H), 3.43 (с, 2H), 3.82 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 4.08 (кв,  $J = 7.1$ , 2H), 7.10 (д,  $J = 7.8$ , 2H), 7.16 (д,  $J = 8.0$ , 2H), 8.39 (т,  $J = 6.1$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.0, 20.6, 40.8, 41.5, 60.3, 125.2, 128.7, 128.8, 135.3, 169.8, 170.8; HRMS ( $m/z$ ) найдено 236.1280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_3^+$ . Вычислено 236.1281.

**Метил 2-(2-(3-метоксифенил)ацетида)ацетат (1f):**

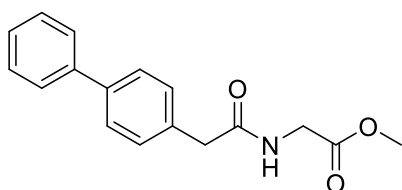
Синтезировано по общей методике **А**. Выход 2.01 г (56%), белый порошок, т. пл. 78-80°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.45 (с, 2H), 3.62 (с, 3H), 3.73 (с, 3H), 3.84 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 6.69 – 6.94 (м, 3H), 7.20 (т,  $J = 7.8$ , 1H), 8.48 (т,  $J = 6.0$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  41.2, 42.4, 52.1, 55.4, 112.3, 115.2, 121.8, 129.6, 138.0, 159.7, 170.8, 171.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 238.1075  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_4^+$ . Вычислено 238.1074.

**Метил 2-(2-(4-метоксифенил)ацетида)ацетат (1g):**

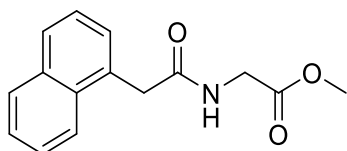
Синтезировано по общей методике **А**. Выход 2.57 г (72%), белый порошок, т. пл. 71-73°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.40 (с, 2H), 3.62 (с, 3H), 3.72 (с, 3H), 3.83 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 6.86 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 7.18 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.38 (т,  $J = 5.9$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  41.1, 41.5, 52.1, 55.5, 114.1, 128.4, 130.5, 158.4, 170.9, 171.5; HRMS ( $m/z$ ) найдено 238.1071  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_4^+$ . Вычислено 238.1074.

**Метил 2-(2-(3,4-диметоксифенил)ацетида)ацетат (1h):**

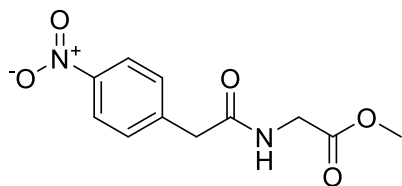
Синтезировано по общей методике А. Выход 3.10 г (77%), белый порошок, т. пл. 96-98°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.56 (с, 2H), 3.71 (с, 3H), 3.87 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 4.00 (д,  $J = 5.4$ , 2H), 6.00 (ушир. с., 1H), 6.73 – 6.88 (м, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  40.6, 41.5, 51.6, 55.4, 55.5, 111.8, 113.0, 121.0, 128.4, 147.5, 148.5, 170.4, 170.9; HRMS ( $m/z$ ) найдено 268.1180  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$ . Вычислено 268.1179.

**Метил 2-(2-([1,1'-бифенил]-4-ил)ацетида)ацетат (1i):**

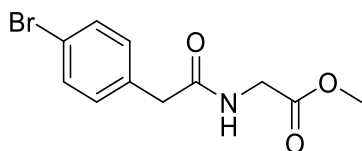
Синтезировано по общей методике А. Выход 2.32 г (55%), белый порошок, т. пл. 132-135°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  3.53 (с, 2H), 3.63 (с, 3H), 3.86 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.28 – 7.39 (м, 3H), 7.45 (т,  $J = 7.6$ , 2H), 7.54 – 7.70 (м, 4H), 8.55 (т,  $J = 5.5$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  41.2, 42.0, 52.1, 127.0, 127.0, 127.7, 129.4, 130.1, 135.8, 138.8, 140.5, 170.9, 171.1; HRMS ( $m/z$ ) найдено 284.1280  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_3^+$ . Вычислено 284.1281.

**Метил 2-(2-(нафтил-1)ацетида)ацетат (1j):**

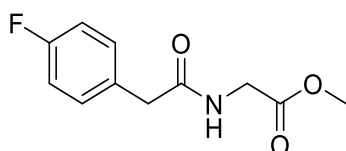
Синтезировано по общей методике А. Выход 2.98 г (77%), белый порошок, т. пл. 138-140°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  3.61 (с, 3H), 3.86 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 3.97 (с, 2H), 7.44 – 7.47 (м, 2H), 7.49 – 7.56 (м, 2H), 7.80 – 7.84 (м, 1H), 7.90 – 7.94 (м, 1H), 8.05 – 8.10 (м, 1H), 8.56 (т,  $J = 6.1$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  39.9, 41.3, 52.1, 124.8, 126.0, 126.1, 126.4, 127.6, 128.2, 128.8, 132.4, 132.9, 133.8, 170.8, 171.2; HRMS ( $m/z$ ) найдено 258.1126  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_3^+$ . Вычислено 258.1125.

**Метил 2-(2-(4-нитрофенил)ацетида)ацетат (1k):**

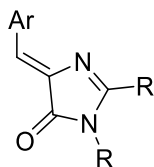
Синтезировано по общей методике А. Выход 2.77 г (73%), желтоватый порошок, т. пл. 147-150°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.62 (с, 3H), 3.68 (с, 2H), 3.87 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.55 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.18 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.53 – 8.64 (т,  $J = 6.0$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  41.2, 41.9, 52.2, 123.7, 130.8, 144.6, 146.8, 170.1, 170.7; HRMS (m/z) найдено 253.0818  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5^+$ . Вычислено 253.0819.

**Метил 2-(2-(4-бромфенил)ацетида)ацетат (1l):**

Синтезировано по общей методике А. Выход 3.41 г (79%), белый порошок, т. пл. 93-95°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.47 (с, 2H), 3.62 (с, 3H), 3.84 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.22 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 7.49 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 8.52 (т,  $J = 5.9$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  41.2, 41.6, 52.1, 120.1, 131.5, 131.8, 136.0, 170.7, 170.8; HRMS (m/z) найдено 286.0069  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrNO}_3^+$ . Вычислено 286.0073.

**Метил 2-(2-(4-фторфенил)ацетида)ацетат (1m):**

Синтезировано по общей методике А. Выход 2.54 г (75%), белый порошок, т. пл. 105-107°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.48 (с, 2H), 3.62 (с, 3H), 3.84 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.06 – 7.21 (м, 2H), 7.21 – 7.39 (м, 2H), 8.50 (т,  $J = 5.6$ , 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  41.1, 41.4, 52.1, 115.3 (д,  $J = 21.2$ ), 131.3 (д,  $J = 8.0$ ), 132.7 (д,  $J = 3.2$ ), 161.5 (д,  $J = 242.0$ ), 170.8, 171.1; HRMS (m/z) найдено 226.0872  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FNO}_3^+$ . Вычислено 226.0874.

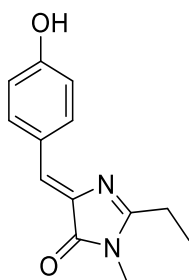


**Синтез 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (2, 3 и 4). Общая методика С:**

Соответствующий амидоацетат **1a-m** (3 ммоль) растворили в 10 мл безводного хлористого метилена, добавили тетрафторборат триэтилоксония (684 мг, 3.6 ммоль) и карбонат калия (498 мг, 3.6 ммоль) в атмосфере аргона.

Полученный раствор перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре, разбавили 30 мл хлористого метилена и 50 мл насыщенного раствора NaCl, энергично перемешивали в течение 10 минут. Отделили органический слой и сушили над безводным сульфатом натрия. В упаренный остаток добавили 2 мл метанола и соответствующее основание Шиффа (2.49 ммоль) и выдерживали в течение 1-12 дней (контроль по ТСХ). Реакционную смесь упаривали. Продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформа и этанола в качестве элюента (97:3).

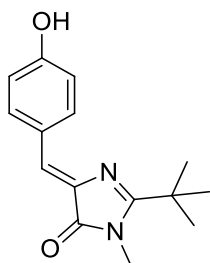
**(*Z*)-2-этил-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2a):**



Синтезировано по общей методике С. Выход 356 мг (62%), желтый порошок; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27 (т, *J* = 7.4, 3H), 2.67 (кв, *J* = 7.4, 2H), 6.84 (д, *J* = 8.7, 2H), 6.90 (с, 1H), 8.10 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.07 (с, 1H).

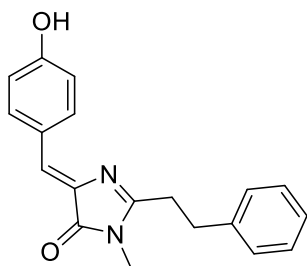
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [53].

**(*Z*)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-2-(трет-бутил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2b):**

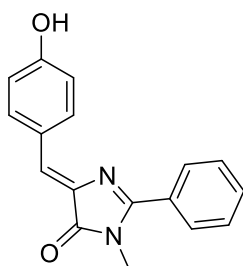


Синтезировано по общей методике С. Выход 194 мг (25%), желтый порошок; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.40 (с, 9H), 3.28 (с, 3H), 6.84 (д, *J* = 8.7, 2H), 6.96 (с, 1H), 8.11 (д, *J* = 8.5, 2H), 10.12 (ушир. с., 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [210].

**(Z)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-2-фенилэтил-1H-имидазол-5(4H)-он (2c):**

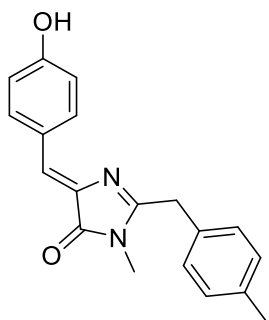
Синтезировано по общей методике С. Выход 671 мг (88%), желтый порошок, т. пл. 193-196°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.97 (т,  $J = 7.8$ , 2H), 3.05 (с, 3H), 3.08 (т,  $J = 7.8$ , 2H), 6.84 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 6.91 (с, 1H), 7.21 (т,  $J = 7.3$ , 1H), 7.31 (т,  $J = 7.5$ , 2H), 7.35 (д,  $J = 7.5$ , 2H), 8.10 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 10.09 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  25.9, 29.6, 30.6, 115.7, 125.4, 125.8, 126.1, 128.3, 128.5, 134.2, 136.1, 140.8, 159.6, 164.1, 169.9; HRMS ( $m/z$ ) найдено 307.1435 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 307.1441.

**(Z)-2-фенил-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (2d):**

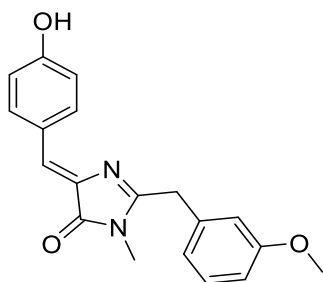
Синтезировано по общей методике С. Выход 388 мг (56%), желтый порошок;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.27 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.11 (с, 1H), 7.56 – 7.67 (м, 3H), 7.93 (д,  $J = 6.9$ , 2H), 8.18 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.19 (ушир. с., 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [64].

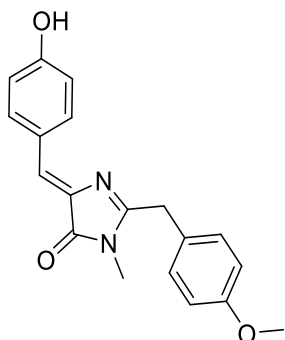


**(Z)-2-(4-метилбензил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (2e)**

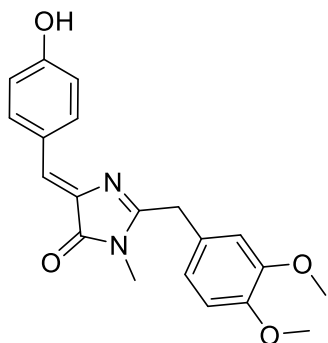
Синтезировано по общей методике С. Выход 405 мг (13%), желтый порошок, т. пл. 189-192°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.28 (с, 3H), 2.97 (с, 3H), 4.02 (с, 2H), 6.83 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.96 (с, 1H), 7.17 (д,  $J = 7.8$ , 2H), 7.22 (д,  $J = 7.9$ , 2H), 8.09 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 10.11 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  20.6, 26.3, 34.3, 115.7, 125.3, 126.5, 128.6, 129.3, 131.6, 134.3, 136.0, 136.1, 159.7, 163.0, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 307.1437  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 307.1441.

**(Z)-2-(3-метоксибензил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (2f):**

Синтезировано по общей методике С. Выход 646 мг (80%), желтый порошок, т. пл. 167-169°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.99 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 4.05 (с, 2H), 6.83 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 6.86 (дд,  $J = 8.1$ , 2.6, 1H), 6.89 (д,  $J = 7.6$ , 1H), 6.94 (с, 1H), 6.97 (с, 1H), 7.27 (т,  $J = 7.9$ , 1H), 8.10 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.12 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 34.5, 55.0, 112.3, 114.6, 115.7, 120.8, 125.3, 126.6, 129.7, 134.3, 136.1, 136.2, 159.4, 159.7, 162.8, 169.9; HRMS ( $m/z$ ) найдено 323.1388  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 323.1390.

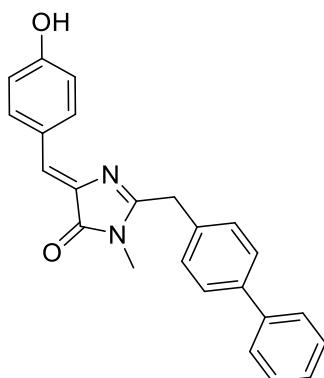
**(Z)-2-(4-метоксибензил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он****(2g):**

Синтезировано по общей методике С. Выход 468 мг (58%), желтый порошок, т. пл. 194-196°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.98 (с, 3H), 3.74 (с, 3H), 4.00 (с, 2H), 6.83 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 6.92 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.95 (с, 1H), 7.26 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.09 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.11 (с, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 33.8, 55.0, 114.1, 115.7, 125.3, 126.4, 126.5, 129.8, 134.3, 136.1, 158.2, 159.7, 163.2, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 323.1391  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 323.1390.

**(Z)-2-(3,4-диметоксибензил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он****(2h):**

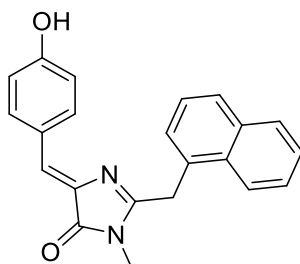
Синтезировано по общей методике С. Выход 649 мг (74%), желтый порошок, т. пл. 186-188°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.00 (с, 3H), 3.73 (с, 3H), 3.74 (с, 3H), 4.00 (с, 2H), 6.80 – 6.85 (м, 3H), 6.92 (д,  $J = 8.3$ , 1H), 6.95 (с, 1H), 7.00 (д,  $J = 2.1$ , 1H), 8.10 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.11 (ушир. с., 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 34.1, 55.5, 55.5, 112.0, 112.9, 115.7, 120.7, 125.3, 126.4, 126.8, 134.2, 136.1, 147.9, 148.8, 159.7, 163.1, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 353.1489  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4^+$ . Вычислено 353.1496.

**(Z)-2-([1,1'-бифенил]-4-ил-метил)-4-(4-гидроксифензилиден)-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2i):**

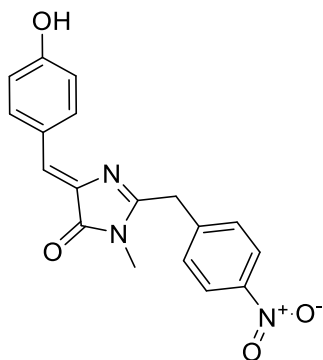


Синтезировано по общей методике С. Выход 654 мг (71%), желтый порошок, т. пл. 243-246°C; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.03 (с, 3H), 4.12 (с, 2H), 6.84 (д, *J* = 8.7, 2H), 6.98 (с, 1H), 7.36 (т, *J* = 7.3, 1H), 7.41 – 7.48 (м, 4H), 7.63 – 7.70 (м, 4H), 8.11 (д, *J* = 8.5, 2H), 10.12 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 34.2, 115.8, 125.3, 126.5, 126.7, 126.9, 127.4, 128.9, 129.4, 134.0, 134.3, 136.1, 138.8, 139.7, 159.8, 162.9, 170.0; HRMS (*m/z*) найдено 369.1591 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 369.1598.

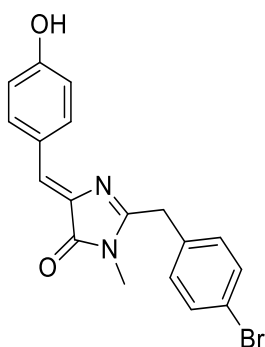
**(Z)-4-(4-гидроксифензилиден)-1-метил-2-(нафтилметил-1)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2j):**



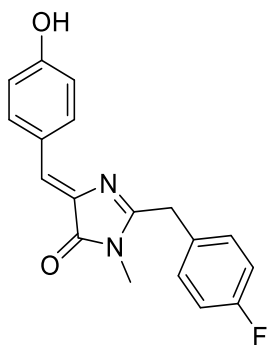
Синтезировано по общей методике С. Выход 273 мг (57%), оранжевый порошок, т. пл. 205-207°C; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.04 (с, 3H), 4.54 (с, 2H), 6.76 (д, *J* = 8.4, 2H), 6.95 (с, 1H), 7.43 (д, *J* = 7.0, 1H), 7.49 (т, *J* = 7.6, 1H), 7.56 (т, *J* = 7.2, 1H), 7.59 (т, *J* = 7.1, 1H), 7.89 (д, *J* = 8.2, 1H), 7.97 (д, *J* = 8.0, 1H), 7.99 (д, *J* = 8.5, 2H), 8.30 (д, *J* = 8.3, 1H), 10.08 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 32.2, 115.7, 124.3, 125.3, 125.5, 125.9, 126.1, 126.5, 126.7, 127.6, 128.4, 131.1, 131.7, 133.4, 134.3, 136.0, 159.7, 162.9, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 343.1441 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 343.1435.

**(Z)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-2-(4-нитробензил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2k):**

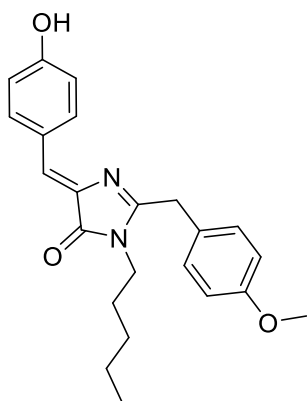
Синтезировано по общей методике С. Выход 396 мг (47%), оранжевый порошок, т. пл. 262-264°C с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.04 (с, 3H), 4.26 (с, 2H), 6.80 (д, *J* = 8.5, 2H), 6.98 (с, 1H), 7.65 (д, *J* = 8.4, 2H), 8.03 (д, *J* = 8.7, 2H), 8.24 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.11 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 34.1, 115.7, 123.6, 125.2, 126.9, 130.5, 134.3, 135.9, 142.9, 146.6, 159.8, 162.2, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 338.1134 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 338.1135.

**(Z)-2-(4-бромбензил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (2l):**

Синтезировано по общей методике С. Выход 684 мг (74%), желтый порошок, т. пл. 212-215°C; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.00 (с, 3H), 4.07 (с, 2H), 6.82 (д, *J* = 8.8, 2H), 6.96 (с, 1H), 7.32 (д, *J* = 8.4, 2H), 7.56 (д, *J* = 8.4, 2H), 8.06 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.12 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 33.8, 115.7, 120.1, 125.2, 126.7, 131.1, 131.5, 134.2, 134.3, 136.0, 159.7, 162.6, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 371.0385 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 371.0390.

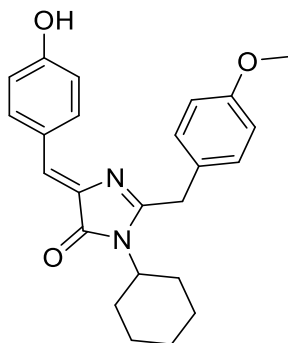
**(Z)-2-(4-фторбензил)-4-(4-гидроксипенцилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (2m):**

Синтезировано по общей методике С. Выход 595 мг (77%), оранжевый порошок, т. пл. 214-215°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.01 (с, 3H), 4.07 (с, 2H), 6.82 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 6.96 (с, 1H), 7.15 – 7.23 (м, 2H), 7.36 – 7.42 (м, 2H), 8.07 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.12 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 33.7, 115.4 (д,  $J = 21.0$ ), 115.7, 125.3, 126.6, 130.8 (д,  $J = 8.0$ ), 130.9, 134.3, 136.0, 159.7, 161.2 (д,  $J = 243.0$ ), 162.9, 169.9; HRMS (m/z) найдено 311.1191  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 311.1190.

**(Z)-1-пентил-4-(4-гидроксипенцилиден)-2-(4-метоксибензил)-1H-имидазол-5(4H)-он (3a):**

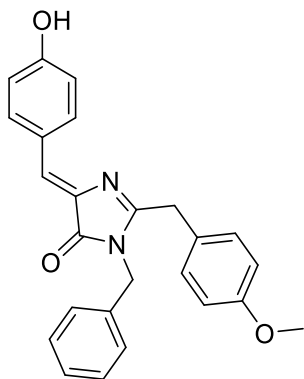
Синтезировано по общей методике С. Выход 801 мг (85%), желтоватый порошок, т. пл. 192-195°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  0.78 (т,  $J = 7.3$ , 3H), 1.10 (м, 2H), 1.17 (м, 2H), 1.23 (м, 2H), 3.43 (т,  $J = 7.6$ , 2H), 3.73 (с, 3H), 4.00 (с, 2H), 6.84 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 6.92 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.94 (с, 1H), 7.27 (д,  $J = 8.3$ , 2H), 8.10 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 10.12 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  13.7, 21.6, 27.9, 28.2, 33.8, 40.1, 55.0, 114.1, 115.8, 125.3, 126.5, 126.6, 129.8, 134.3, 135.9, 158.3, 159.7, 162.9, 170.1; HRMS (m/z) найдено 379.2017  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 379.2016.

**(Z)-1-циклогексил-4-(4-гидроксибензилиден)-2-(4-метоксибензил)-1H-имидазол-5(4H)-он (3b):**



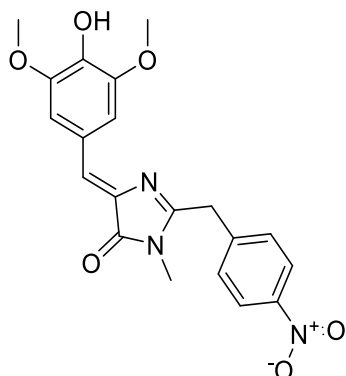
Синтезировано по общей методике С. Выход 797 мг (82%), желтоватый порошок, т. пл. 215-218°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.02 – 1.15 (м, 3H), 1.26 (д,  $J = 10.7$ , 2H), 1.54 (д,  $J = 12.6$ , 1H), 1.65 (д,  $J = 13.9$ , 2H), 1.98 (кд,  $J = 12.5$ , 3.5, 2H), 3.64 (тт,  $J = 11.7$ , 3.5, 1H), 3.73 (с, 3H), 4.02 (с, 2H), 6.83 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 6.85 (с, 1H), 6.92 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.27 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.08 (д,  $J = 8.7$ , 1H), 10.09 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  24.6, 25.3, 28.9, 34.3, 53.6, 55.0, 114.1, 115.7, 125.3, 125.9, 126.8, 129.7, 134.1, 136.3, 158.2, 159.6, 163.3, 170.2; HRMS ( $m/z$ ) найдено 391.2011  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 391.2016.

**(Z)-1-бензил-4-(4-гидроксибензилиден)-2-(4-метоксибензил)-1H-имидазол-5(4H)-он (3c):**



Синтезировано по общей методике С. Выход 823 мг (83%), желтый порошок, т. пл. 178-181°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.71 (с, 3H), 3.86 (с, 2H), 4.73 (с, 2H), 6.84 (д,  $J = 8.7$ , 4H), 7.03 (с, 1H), 7.11 (д,  $J = 7.1$ , 2H), 7.15 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 7.25 (т,  $J = 7.5$ , 1H), 7.30 (т,  $J = 7.5$ , 2H), 8.10 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.16 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  33.8, 43.0, 55.0, 114.0, 115.8, 125.2, 126.2, 126.5, 127.3, 128.6, 129.8, 134.4, 135.6, 136.6, 158.2, 159.9, 162.5, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 399.1705  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 399.1703.

**(Z)-4-(4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-1-метил-2-(4-нитробензил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (4a):**

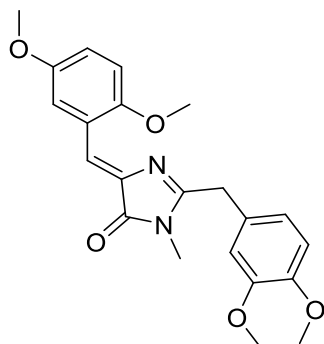


Синтезировано по общей методике С. Выход 455 мг (46%), желтый порошок, т. пл. 180 °С с разл.

Получена смесь *Z*- и *E*- изомеров в соотношении 3:1. Спектральные характеристики преобладающего *Z*-изомера приведены далее:

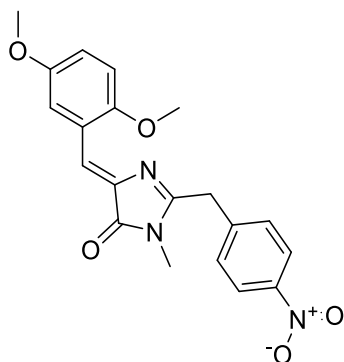
<sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.99 (с, 3Н), 3.83 (с, 6Н), 3.93 (с, 2Н), 6.99 (с, 1Н), 7.58 (с, 2Н), 7.64 (д, *J* = 8.8, 2Н), 8.11 (д, *J* = 8.8, 2Н), 9.30 (с, 1Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 46.4, 56.4, 111.1, 123.8, 124.1, 128.5, 130.6, 135.4, 139.6, 143.1, 147.1, 148.0, 163.3, 169.6; HRMS (*m/z*) найдено 396.1202 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>. Вычислено 396.1201.

**(Z)-2-(3,4-диметоксибензил)-4-(2,5-диметоксибензилиден)-1-метил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (4b):**



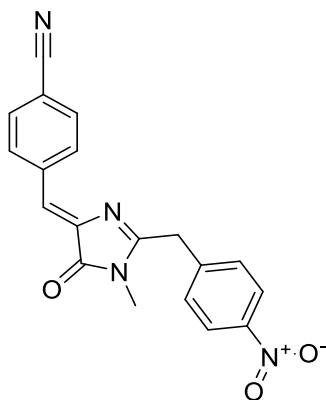
Синтезировано по общей методике С. Выход 839 мг (85%), желтый порошок, т. пл. 165-167°С; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.08 (с, 3Н), 3.56 (с, 3Н), 3.73 (с, 3Н), 3.74 (с, 3Н), 3.82 (с, 3Н), 4.02 (с, 2Н), 6.86 (дд, *J* = 8.1, 2.0, 1Н), 6.91 (д, *J* = 8.1, 1Н), 6.96 (дд, *J* = 9.0, 3.1, 1Н), 6.99 (д, *J* = 2.0, 1Н), 7.00 (д, *J* = 9.1, 1Н), 7.30 (с, 1Н), 8.36 (д, *J* = 3.1, 1Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 34.1, 55.0, 55.4, 55.5, 56.1, 111.8, 112.4, 113.4, 116.1, 118.0, 118.1, 121.3, 122.8, 126.6, 138.4, 147.8, 148.6, 152.8, 153.1, 165.5, 170.0; HRMS (*m/z*) найдено 397.1757 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>. Вычислено 397.1758.

**(Z)-4-(2,5-диметоксибензилиден)-1-метил-2-(4-нитробензил)-1H-имидазол-5(4H)-он (4c):**



Синтезировано по общей методике С. Выход 693 мг (73%), желтый порошок, т. пл. 171-174°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.15 (с, 3H), 3.38 (с, 3H), 3.81 (с, 3H), 4.30 (с, 2H), 6.93 (дд,  $J = 9.0, 3.2, 1\text{H}$ ), 6.98 (д,  $J = 9.1, 1\text{H}$ ), 7.31 (с, 1H), 7.67 (д,  $J = 8.6, 2\text{H}$ ), 8.18 (д,  $J = 3.2, 1\text{H}$ ), 8.22 (д,  $J = 8.7, 2\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 34.0, 54.6, 56.1, 112.5, 115.0, 118.5, 118.9, 122.5, 123.2, 131.2, 138.0, 142.8, 146.5, 152.7, 153.2, 164.7, 169.8; HRMS ( $m/z$ ) найдено 382.1398  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5^+$ . Вычислено 382.1397.

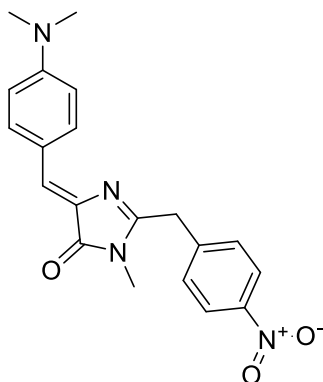
**(Z)-4-((1-метил-2-(4-нитробензил)-5-оксо-1H-имидазол-4(5H)-илиден)метил)бензонитрил (4d):**



Синтезировано по общей методике С. Выход 452 мг (52%), желтый порошок, т. пл. 246-248°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.09 (с, 3H), 4.33 (с, 2H), 7.12 (с, 1H), 7.68 (д,  $J = 8.5, 2\text{H}$ ), 7.87 (д,  $J = 8.0, 2\text{H}$ ), 8.25 (д,  $J = 8.7, 2\text{H}$ ), 8.31 (д,  $J = 8.1, 2\text{H}$ );  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 34.2, 111.6, 118.7, 123.3, 123.6, 130.7, 132.2, 132.4, 138.4, 140.8, 142.4, 146.7, 166.7, 169.7; HRMS ( $m/z$ ) найдено 347.1139  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3^+$ . Вычислено 347.1139.

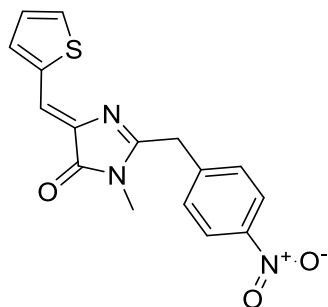


**(Z)-4-(4-(диметиламино)бензильден)-1-метил-2-(4-нитробензил)-1H-имидазол-5(4H)-он (4e):**

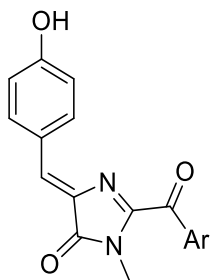


Синтезировано по общей методике С. Выход 263 мг (29%), оранжевый порошок, т. пл. 167-170°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.00 (с, 6H), 3.04 (с, 3H), 4.25 (с, 2H), 6.71 (д,  $J = 9.2$ , 2H), 6.95 (с, 1H), 7.65 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.01 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.25 (д,  $J = 8.8$ , 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 34.1, ~40.0 (уширен, скрыт сигналом ДМСО), 111.6, 121.3, 123.6, 127.8, 130.4, 134.0, 134.2, 143.2, 146.5, 151.4, 160.2, 169.6; HRMS ( $m/z$ ) найдено 365.1609  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3^+$ . Вычислено 365.1608.

**(Z)-1-метил-2-(4-нитробензил)-4-(тиофен-3-ил-метилен)-1H-имидазол-5(4H)-он (4f):**



Синтезировано по общей методике С. Выход 359 мг (44%), оранжевый порошок, т. пл. 180°C с разл;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.08 (с, 3H), 4.27 (с, 2H), 7.13 (дд,  $J = 5.1$ , 3.7, 1H), 7.39 (с, 1H), 7.66 (дт,  $J = 3.7$ , 1.0, 1H), 7.69 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.84 (дт,  $J = 5.2$ , 1.1, 1H), 8.25 (д,  $J = 8.7$ , 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.36, 33.93, 120.25, 123.40, 127.53, 130.73, 134.68, 134.97, 136.01, 137.27, 142.72, 146.53, 162.78, 168.97; HRMS ( $m/z$ ) найдено 328.0752  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}^+$ . Вычислено 328.0750.

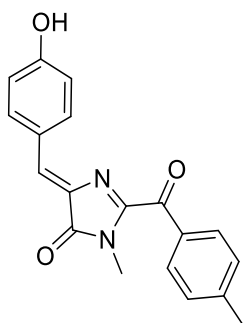


**Синтез кетонных производных 4-гидроксипбензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (5).**

**Общая методика D:**

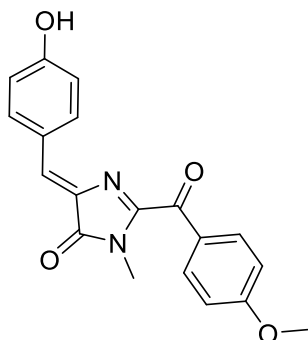
Соответствующий (Z)-4-(4-гидроксипбензилиден)-1-метил-2-(арилметил)-имидазол-5-он (0.5 ммоль) добавили к предварительно приготовленной суспензии диоксида селена (67 мг, 0.6 ммоль) в безводном 1,4-диоксане (4 мл) и кипятили с обратным холодильником в течении 30 минут. Реакционную массу упарили и добавили 30 мл этилацетата, полученный раствор промывали водой (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, раствор упарили насухо, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь этилацетат – толуол (1:9) в качестве элюента.

**(Z)-4-(4-гидроксипбензилиден)-1-метил-2-(4-метилбензоил)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (5a):**



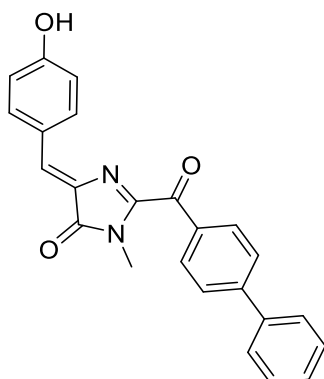
Синтезировано по общей методике D. Выход 66 мг (41%), оранжевый порошок, т. пл. >250°C; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.45 (с, 3H), 3.29 (с, 3H), 6.86 (д, *J* = 8.6, 2H), 7.40 (с, 1H), 7.44 (д, *J* = 7.9, 2H), 8.11 (д, *J* = 8.4, 2H), 8.15 (д, *J* = 8.0, 2H), 10.46 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 21.3, 28.1, 116.2, 124.9, 129.1, 130.9, 132.5, 133.8, 135.3, 135.5, 145.1, 154.6, 161.3, 169.3, 184.7; HRMS (*m/z*) найдено 321.1238 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 321.1234.

**(Z)-4-(4-гидроксибензилиден)-2-(4-метоксибензоил)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (5b):**

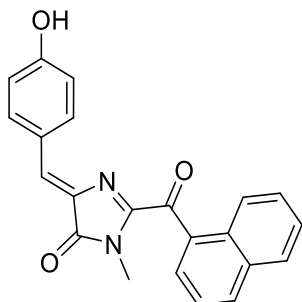


Синтезировано по общей методике **D**. Выход 81 мг (48%), красный порошок, т. пл. >250°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.27 (с, 3H), 3.91 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.16 (д,  $J = 9.0$ , 2H), 7.38 (с, 1H), 8.12 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.26 (д,  $J = 8.9$ , 2H), 10.44 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.0, 55.7, 114.0, 116.2, 124.9, 127.7, 133.3, 133.4, 135.3, 135.5, 154.9, 161.2, 164.3, 169.3, 183.5; HRMS (m/z) найдено 337.1184  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4^+$ . Вычислено 337.1183.

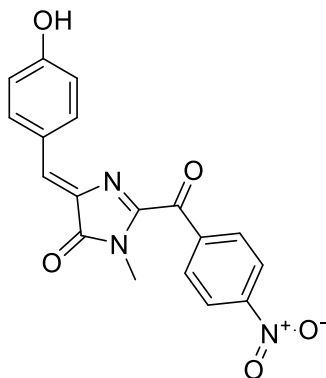
**(Z)-2-([1,1'-бифенил]-4-карбонил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (5c):**



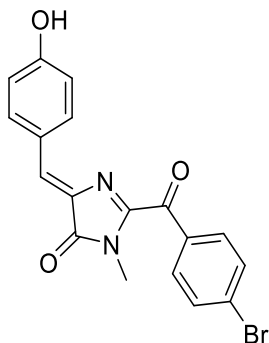
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 31 мг (16%), красный порошок, т. пл. >250°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.33 (с, 3H), 6.88 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 7.43 (с, 1H), 7.47 (т,  $J = 7.3$ , 1H), 7.54 (т,  $J = 7.7$ , 2H), 7.83 (д,  $J = 7.2$ , 2H), 7.95 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 8.14 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.35 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 10.47 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.1, 116.3, 124.9, 126.6, 127.1, 128.6, 129.1, 131.5, 133.9, 134.0, 135.3, 135.6, 138.7, 145.5, 154.5, 161.4, 169.3, 184.6; HRMS (m/z) найдено 307.1437  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 307.1441.

**(Z)-2-(1-нафтоил)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (5d):**

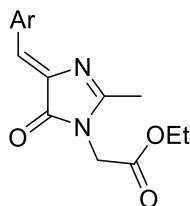
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 72 мг (42%), оранжевый порошок, т. пл.  $>250^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.40 (с, 3H), 6.74 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 7.40 (с, 1H), 7.64 – 7.72 (м, 3H), 7.98 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 8.11 (д,  $J = 7.9$ , 1H), 8.26 (дд,  $J = 7.2$ , 1.2, 1H), 8.29 (д,  $J = 8.2$ , 1H), 8.54 (д,  $J = 8.4$ , 1H), 10.42 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.2, 116.1, 124.4, 124.9, 124.9, 126.6, 127.9, 128.3, 128.7, 130.4, 131.9, 133.1, 133.3, 134.0, 134.1, 135.6, 155.6, 161.3, 169.5, 187.9; HRMS (m/z) найдено 383.1389  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 383.1390.

**(Z)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-2-(4-нитробензоил)-1H-имидазол-5(4H)-он (5e):**

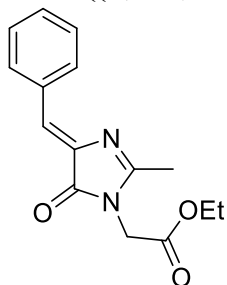
Синтезировано по общей методике **D**. Выход 47 мг (27%), красный порошок, т. пл.  $>250^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.38 (с, 3H), 6.86 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 7.47 (с, 1H), 8.11 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.44 (д,  $J = 9.1$ , 2H), 10.54 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.3, 116.3, 123.2, 124.8, 132.1, 135.1, 135.2, 135.9, 140.3, 150.1, 153.8, 161.7, 169.1, 183.8; HRMS (m/z) найдено 352.0929  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5^+$ . Вычислено 352.0928.

**(Z)-2-(4-бромбензоил)-4-(4-гидоксибензилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-он (5f):**

Синтезировано по общей методике **D**. Выход 75 мг (39%), оранжевый порошок, т. пл. >250°C;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.32 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 7.43 (с, 1H), 7.86 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.11 (д,  $J = 8.4$ , 2H), 8.17 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 10.50 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.2, 116.3, 124.9, 128.5, 131.5, 132.6, 134.1, 134.4, 135.3, 135.7, 154.1, 161.5, 169.2, 184.1; HRMS (m/z) найдено 385.0184  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 385.0182.

**3.2.2 Синтез имидных производных 4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов****Синтез эфирных производных 4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов (6). Общая методика E:**

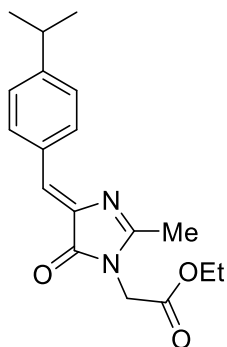
Соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль) смешали с 2.0 г. (12.5 ммоль) этил-2-[(1-метоксиэтилиден)амино]ацетатом и выдерживали при комнатной температуре в течение 7 суток. Раствор упаривали насухо, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ-этанол как элюент (50:1).

**Этил ((Z)-2-(4-бензилиден-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил))ацетат (6a):**

Синтезировано по общей методике **E**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.20 (т,  $J = 7.0$ , 3H), 2.29 (с, 3H), 4.17 (к,  $J = 7.0$ , 2H), 4.24 (с, 2H), 6.99 (с, 1H), 7.39–7.43 (м, 1H), 7.45 (т,  $J = 7.5$ , 2H), 8.16 (д,  $J = 7.5$ , 2H).

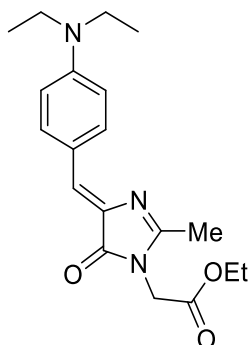
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [244].

**Этил ((4Z)-2-метил-5-оксо-4-[4-(пропан-2-ил)бензилиден]-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)ацетат (6b):**



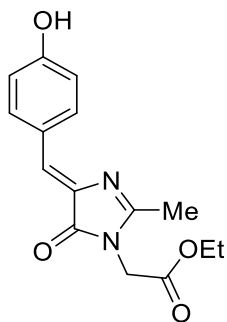
Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 1.34 г (85%), желтоватое масло.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.20–1.25 (м, 9H), 2.31 (с, 3H), 2.89–2.96 (м, 1H), 4.18 (к,  $J = 7.0$ , 2H), 4.50 (с, 2H), 7.01 (с, 1H), 7.34 (д,  $J = 8.2$ , 2H), 8.14 (д,  $J = 8.2$ , 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.0, 15.2, 23.6, 33.5, 41.3, 61.4, 125.9, 126.7, 131.6, 132.2, 137.5, 151.1, 162.6, 168.1, 169.4. HRMS ( $m/z$ ) найдено 315.1703  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 315.1703.

**Этил ((4Z)-4-[4-(диэтиламино)бензилиден]-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)ацетат (6c):**



Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 1.19 г (69%), темно-оранжевый порошок, т. пл. 158–160 °С.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.12 (т,  $J = 7.0$ , 6H), 1.22 (т,  $J = 7.0$ , 3H), 2.26 (с, 3H), 3.42 (к,  $J = 7.0$ , 4H), 4.17 (к,  $J = 7.1$ , 2H), 4.46 (с, 2H), 6.72 (д,  $J = 9.1$ , 2H), 6.89 (с, 1H), 8.05 (д,  $J = 8.7$ , 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  12.5, 14.0, 15.0, 41.1, 43.8, 61.3, 111.1, 120.6, 127.5, 133.3, 134.4, 149.0, 158.6, 168.3, 169.1. HRMS ( $m/z$ ) найдено 344.1969  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 344.1969.

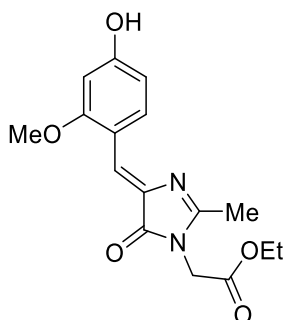
**Этил ((Z)-2-(4-(4-гидроксбензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)ацетат (6d):**



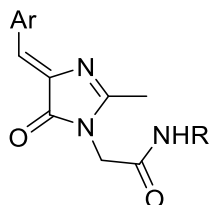
Синтезировано по общей методике **Е**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.15 (т,  $J = 7.0$ , 3H), 2.25 (с, 3H), 4.13 (к,  $J = 7.0$ , 2H), 4.21 (с, 2H), 6.84 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.90 (с, 1H), 8.08 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.09 (уш. с, 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [244].

**Этил ((4Z)-4-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)ацетат (6e):**



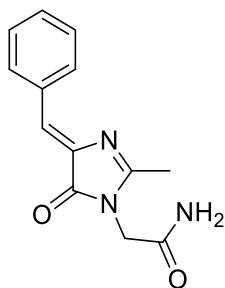
Синтезировано по общей методике **Е**. Выход 1.18 г (74%), желтый порошок, т. пл. 170–173 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.22 (т,  $J = 7.2$ , 3H), 2.27 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 4.17 (к,  $J = 7.2$ , 2H), 4.47 (с, 2H), 6.46 (д,  $J = 2.1$ , 1H), 6.49 (дд,  $J = 8.6$ , 2.1, 1H), 7.29 (с, 1H), 8.65 (д,  $J = 8.8$ , 1H), 10.27 (уш. с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  14.0, 15.1, 41.2, 55.6, 61.4, 98.7, 108.6, 113.7, 119.8, 133.9, 134.6, 160.4, 160.6, 162.0, 168.3, 169.4; HRMS ( $m/z$ ) найдено 318.1215 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5^+$ . Вычислено 318.1216.



**Синтез амидных производных 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (7). Общая методика F:**

В 100 мл метанола растворили 2 ммоль соответствующего эфира **6a-e**, добавили 20 мл концентрированного водного раствора аммиака (или 8.64 мл (10 ммоль) 40% водного раствора метиламина для получения соединения **7f**) и перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ- этанол как элюент (10:1).

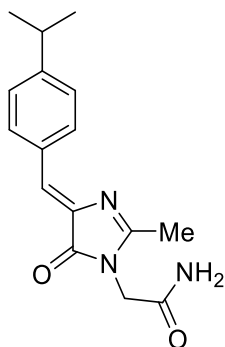
**2-((4*Z*)-4-Бензилиден-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)ацетамид (7a):**



Синтезировано по общей методике F. Выход 426 мг (87%), желтый порошок, т. пл. 190–192 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.29 (с, 3H), 4.24 (с, 2H), 6.99 (с, 1H), 7.27 (уш. с, 1H), 7.39–7.43 (м, 1H), 7.46 (т,  $J = 7.5$ , 2H), 7.71 (уш. с, 1H), 8.21 (д,  $J = 7.5$ , 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.8, 42.5, 125.4, 129.1, 130.5, 132.4, 134.5, 139.2, 164.7, 169.0, 170.2; HRMS (m/z) найдено 244.1445 [M+H] $^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$ . Вычислено 244.1081.

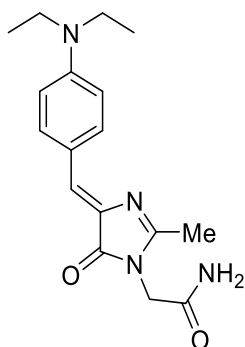


**2-((4*Z*)-2-Метил-5-оксо-4-[4-(пропан-2-ил)бензилиден]-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)ацетамид (7b):**



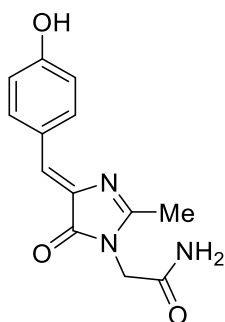
Синтезировано по общей методике **Ф**. Выход 430 мг (75%), желтый порошок, т. пл. 162–165 °С; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.22 (д, *J* = 6.9, 6H), 2.28 (с, 3H), 2.92 (септет, *J* = 6.9, 1H), 4.23 (с, 2H), 6.96 (с, 1H), 7.26 (уш. с, 1H), 7.33 (д, *J* = 8.2, 2H), 7.69 (уш. с, 1H), 8.13 (д, *J* = 8.2, 2H); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 15.3, 23.6, 33.5, 42.0, 125.1, 126.7, 131.8, 132.1, 138.1, 150.8, 163.6, 168.5, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 286.1550 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 286.1550.

**2-((4*Z*)-4-[4-(Диэтиламино)бензилиден]-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-1-ил)ацетамид (7с):**



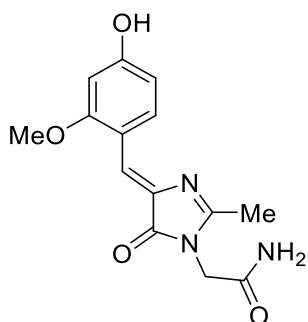
Синтезировано по общей методике **Ф**. Выход 512 мг (81%), красный порошок, т. пл. 248–250 °С; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.12 (т, *J* = 7.0, 6H), 2.23 (с, 3H), 3.42 (к, *J* = 7.0, 4H), 4.20 (с, 2H), 6.72 (д, *J* = 9.1, 2H), 6.85 (с, 1H), 7.21 (уш. с, 1H), 7.64 (уш. с, 1H), 8.04 (д, *J* = 8.7, 2H); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 12.5, 15.2, 41.9, 43.8, 111.1, 120.8, 126.7, 133.9, 134.2, 148.8, 159.7, 168.8, 169.5; HRMS (*m/z*) найдено 315.1816 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 315.1816.

**2-[(4Z)-4-(4-Гидроксбензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]ацетамид (7d):**



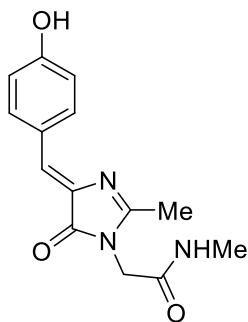
Синтезировано по общей методике **F**. Выход 408 мг (78%), желтый порошок, т. пл. 188–191 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.25 (с, 3H), 4.21 (с, 2H), 6.84 (д, *J* = 8.7, 2H), 6.90 (с, 1H), 7.24 (уш. с, 1H), 7.66 (уш. с, 1H), 8.08 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.09 (уш. с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 15.3, 42.0, 115.8, 125.3, 125.8, 134.2, 136.0, 159.6, 162.0, 168.6, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 260.1029 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 260.1030.

**2-[(4Z)-4-(4-Гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]ацетамид (7e):**

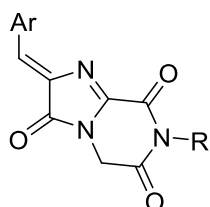


Синтезировано по общей методике **F**. Выход 358 мг (62%), желтый порошок, т. пл. 188–190 °С. <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.24 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 4.21 (с, 2H), 6.45 (д, *J* = 2.1, 1H), 6.49 (дд, *J* = 8.8, 2.1, 1H), 7.23 (уш. с, 1H), 7.26 (с, 1H), 7.65 (уш. с, 1H), 8.65 (д, *J* = 8.6, 1H), 10.21 (уш. с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 15.3, 42.0, 55.6, 98.7, 108.6, 113.9, 119.1, 133.8, 135.2, 160.5, 161.5, 161.7, 168.8, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 288.0993 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>. Вычислено 288.0990.

**2-[(4Z)-4-(4-Гидроксibenзилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил]-N-метилацетамид (7f):**

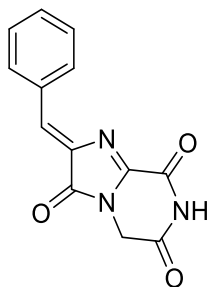


Синтезировано по общей методике **F**. Выход 388 мг (71%), желтый порошок, т. пл. 199–201 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.25 (с, 3H), 2.61 (д,  $J = 4.5$ , 3H), 4.22 (с, 2H), 6.84 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.90 (с, 1H), 8.09 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.16 (д,  $J = 4.4$ , 1H), 10.13 (уш. с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.3, 25.6, 42.2, 115.8, 125.3, 125.8, 134.2, 135.9, 159.6, 161.9, 167.1, 169.6; HRMS (m/z) найдено 272.1040 [M–H] $^-$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3^-$ . Вычислено 272.1041.

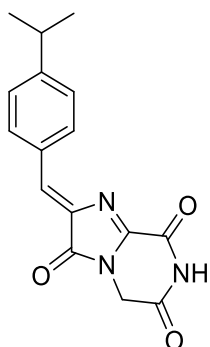


**Синтез имидных производных 4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов (8). Общая методика G:**

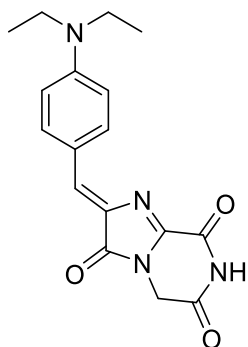
К раствору 1 ммоль соответствующего амида **7a–f** в 14 мл 1,4-диоксана добавили 7 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , и при кипении добавили 1.10 г (10 ммоль) диоксида селена. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 10 мин и охладили до комнатной температуры. Добавили 50 мл насыщенного раствора хлорида натрия и экстрагировали этилацетатом ( $3 \times 100$  мл). Органическую фазу промыли насыщенным раствором  $\text{NaCl}$  ( $3 \times 50$  мл), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ- этанол как элюент (10:1).

**(2Z)-2-Бензилиденимидазо[1,2-а]пиазин-3,6,8-(2H,5H,7H)-трион (8a):**

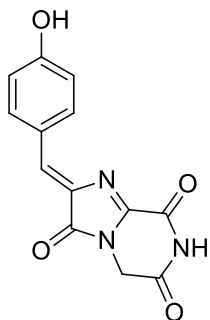
Синтезировано по общей методике **G**. Выход 56 мг (22%), красный порошок, т. пл. 155–157 °С (с разл.); <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 4.16 (с, 2H), 7.22 (с, 1H), 7.43–7.51 (м, 3H), 8.23 (д, *J* = 7.2, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 42.8, 128.5, 128.7, 130.6, 132.3, 133.5, 138.9, 158.1, 165.3, 168.3; HRMS (*m/z*) найдено 256.0723 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 256.0717.

**(2Z)-2-[4-(Пропан-2-ил)бензилиден]имидазо[1,2-а]-пиазин-3,6,8(2H,5H,7H)-трион (8b):**

Синтезировано по общей методике **G**. Выход 72 мг (24%), красный порошок, т. пл. 153–155 °С (с разл.); <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.22 (д, *J* = 6.9, 6H), 2.93 (септет, *J* = 6.9, 1H), 4.15 (с, 2H), 7.19 (с, 1H), 7.36 (д, *J* = 8.2, 2H), 8.15 (д, *J* = 8.3, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 23.5, 33.5, 42.8, 71.0, 126.8, 128.7, 131.2, 132.5, 138.2, 151.6, 157.5, 165.4, 168.3; HRMS (*m/z*) найдено 298.1183 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 298.1186.

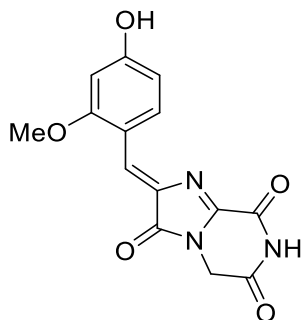
**(2Z)-2-[4-(Диэтиламино)бензилиден]имидазо[1,2-а]-пирозин-3,6,8(2H,5H,7H)-трион****(8c):**

Синтезировано по общей методике **G**. Выход 108 мг (33%), черный порошок, т. пл. 120 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.16 (т, *J* = 7.0, 6H), 3.49 (к, *J* = 7.0, 4H), 4.36 (с, 2H), 6.83 (д, *J* = 9.1, 2H), 7.34 (с, 1H), 8.19 (м, 2H), 11.93 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 12.3, 43.7, 44.1, 110.1, 111.7, 116.0, 131.2, 133.4, 135.3, 143.4, 150.5, 156.0, 167.4; HRMS (*m/z*) найдено 327.1453 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 327.1452.

**(2Z)-2-(4-Гидроксибензилиден)имидазо[1,2-а]пирозин-3,6,8(2H,5H,7H)-трион (8d):**

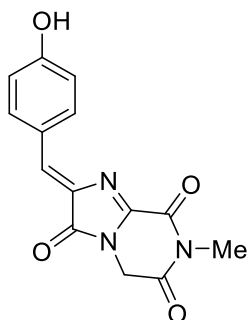
Синтезировано по общей методике **G**. Выход 73 мг (27%), красный порошок, т. пл. 222–225 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 4.13 (с, 2H), 6.81 (д, *J* = 8.3, 2H), 7.12 (с, 1H), 8.09 (д, *J* = 8.4, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 44.5, 116.3, 124.8, 135.5, 136.0, 146.5, 154.1, 156.0, 159.8, 161.7, 167.7; HRMS (*m/z*) найдено 270.0523 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 270.0520.

**(2Z)-2-(4-Гидрокси-2-метоксибензилиден)имидазо-[1,2-а]пирозин-3,6,8(2H,5H,7H)-трион (8e):**



Синтезировано по общей методике **G**. Выход 60 мг (20%), красный порошок, т. пл. 236 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.89 (с, 3H), 4.37 (с, 2H), 6.50 (д, *J* = 2.1, 1H), 6.60 (дд, *J* = 8.9, 2.0, 1H), 7.71 (с, 1H), 8.74 (д, *J* = 8.8, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 55.9, 56.0, 98.9, 109.6, 113.6, 127.3, 134.9, 135.0, 156.2, 162.1, 164.2, 167.1, 167.6; HRMS (*m/z*) найдено 300.0625 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>. Вычислено 300.0626.

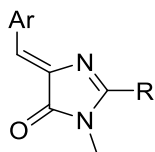
**(2Z)-2-(4-Гидроксибензилиден)-7-метилимидазо-[1,2-а]пирозин-3,6,8(2H,5H,7H)-трион (8f):**



Синтезировано по общей методике **G**. Выход 97 мг (34%), красный порошок, т. пл. 208–210 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.19 (с, 3H), 4.50 (с, 2H), 6.94 (д, *J* = 8.8, 2H), 7.44 (с, 1H), 8.24 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.57 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 28.5, 44.2, 116.2, 124.6, 134.4, 135.8, 138.7, 145.9, 155.8, 161.6, 165.9, 167.3; HRMS (*m/z*) найдено 284.0676 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 284.0677.

### 3.2.3 Синтез флуорогенов белка FAST на основе бензилиденимидазолонов

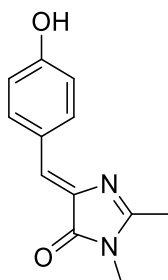
Соединения **GA02-06** были синтезированы ранее сотрудниками лаборатории «Группа химии гетероциклических соединений» [210].



**Синтез исходных 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (9, 17 и 20). Общая методика **Н**:**

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

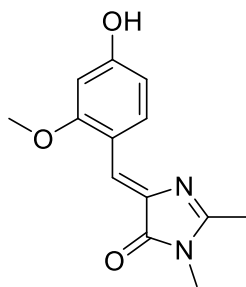
**(*Z*)-5-(4-Гидроксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (9а):**



Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3H), 3.08 (с, 3H), 6.83 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.88 (с, 1H), 8.08 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 10.08 (с, 1H).

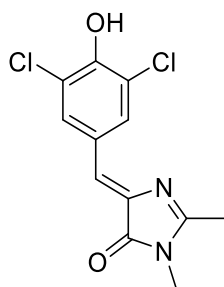
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [245].

**(Z)-5-(4-Гидрокси-2-метоксибензиледен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9b):**



Синтезировано по общей методике **Н**. Выход 170 мг (69%), коричневый порошок, т. пл. ~273 °С с разл.;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.31 (с, 3H), 3.07 (с, 3H), 3.83 (с, 3H), 6.44 (д,  $J = 2.2$ , 1H), 6.47 (дд,  $J = 8.6, 2.1$ , 1H), 7.25 (с, 1H), 8.64 (д,  $J = 8.6$ , 1H), 10.18 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.2, 26.1, 55.5, 98.6, 108.4, 113.9, 118.6, 133.7, 135.4, 160.3, 161.5, 161.6, 169.8; HRMS ( $m/z$ ) найдено 247.1077  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 247.1077.

**(Z)-5-(3,5-Дихлор-4-гидроксибензиледен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9c):**

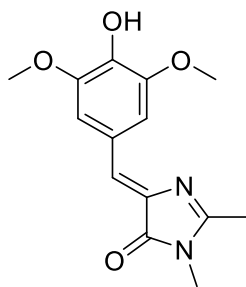


Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.37 (с, 3H), 3.10 (с, 3H), 6.90 (с, 1H), 8.10 (с, 2H), 10.78 (с, 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [211].



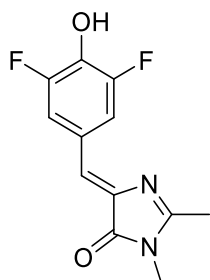
**(Z)-5-(4-Гидрокси-3,5-диметоксибензиледен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9d):**



Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3 H), 3.08 (с, 3 H), 3.79 (с, 6 H), 6.90 (с, 1 H), 7.63 (с, 2 H), 9.15 (уш. с., 1 H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [246].

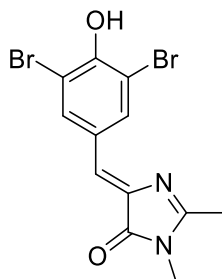
**(Z)-5-(3,5-Дифтор-4-гидроксибензиледен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9e):**



Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.36 (с, 3H), 3.09 (с, 3H), 6.89 (с, 1H), 7.97 (м, 2H), 10.88 (с, 1H).

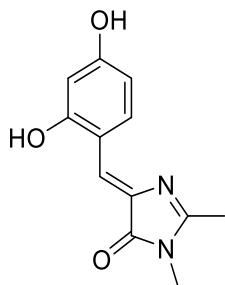
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [90].

**(Z)-5-(3,5-Дибром-4-гидроксибензиледен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9f):**



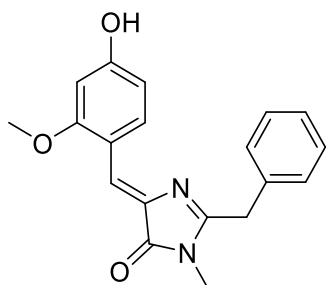
Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.39 (с, 3H), 3.18 (с, 3H), 6.91 (с, 1H), 8.34 (с, 2H), 10.78 (с, 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [211].

**(Z)-5-(2,5-Дигидроксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (9g):**

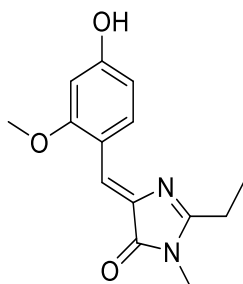
Синтезировано по общей методике **Н**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.33 (с, 3H), 3.08 (с, 3H), 6.25 (д,  $J = 2.4$ , 1H), 6.33 (дд,  $J = 8.6, 2.4$ , 1H), 6.98 (с, 1H), 7.96 (д,  $J = 8.6$ , 1H), 10.18 (с, 1H), 12.40 (с, 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [247].

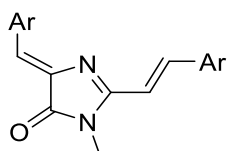
**(Z)-2-бензил-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (17):**

Синтезировано по общей методике **Н**. Выход 1.55 г (48%), оранжевый порошок, т. пл. 273-276 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  2.98 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 4.06 (с, 2 H), 6.45 - 6.47 (м, 2 H), 7.28 (т,  $J = 7.2$ , 1 H), 7.32 - 7.38 (м, 5 H), 8.64 (д,  $J = 8.2$ , 1 H), 10.24 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 34.7, 55.7, 98.7, 108.6, 113.9, 119.9, 127.0, 128.8, 128.8, 134.0, 134.9, 135.3, 160.6, 161.9, 162.4, 170.1; HRMS (m/z) найдено 323.1390  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 323.1390.

**(Z)-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-этил-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (20):**



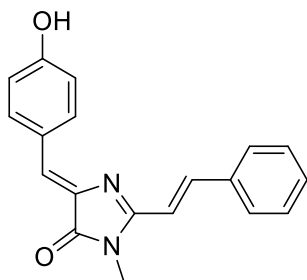
Синтезировано по общей методике **Н**. Выход 1.40 г (54%), желтый порошок, т. пл. 263-266 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.25 (т,  $J = 7.4$ , 3 H), 2.65 (кв,  $J = 7.4$ , 2 H), 3.07 (с, 3 H), 3.83 (с, 3 H), 6.44 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 6.48 (дд,  $J = 8.7$ , 2.2, 1 H), 7.26 (с, 1 H), 8.69 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 10.19 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  9.3, 21.3, 25.9, 55.6, 98.6, 108.4, 114.0, 118.8, 133.8, 135.4, 160.4, 161.5, 165.2, 170.1; HRMS ( $m/z$ ) найдено 261.1234  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 261.1234.



**Синтез производных белка Kaede (10). Общая методика I:**

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

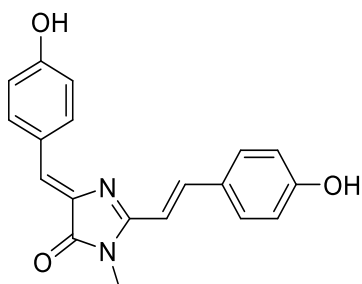
**5-((Z)-4-гидроксибензилден)-3-метил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (10a):**



Синтезировано по общей методике I.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.29 (с, 3H), 6.90 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.99 (с, 1H), 7.22 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 7.45–7.48 (м, 3H), 7.86 (д,  $J = 7.5$ , 2H), 7.99 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 8.22 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.20 (уш. с., 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [230].

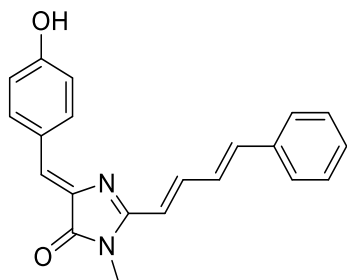
**5-((Z)-4-гидроксибензилден)-2-((E)-4-гидроксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (10b):**



Синтезировано по общей методике I.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.26 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.89 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 6.97 (с, 1H), 7.06 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 7.73 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.98 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 8.16 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 10.15 (уш. с., 2H).

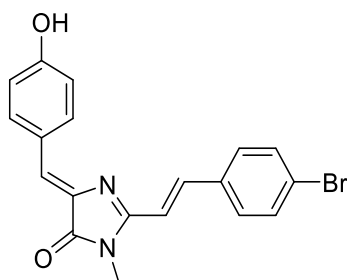
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [230].

**5-((*Z*)-4-гидроксипензилден)-3-метил-2-((1*E*,3*E*)-4-фенилбута-1,3-диен-1-ил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (10с):**

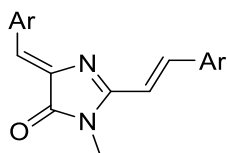


Синтезировано по общей методике **I**. Выход 159 мг (48%), темно-красный порошок, т. пл. 144–147 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.20 (с, 3H), 6.72 (д, *J* = 15.0, 1H), 6.87 (д, *J* = 8.2, 2H), 6.95 (с, 1H), 7.18 (д, *J* = 15.6, 1H), 7.28 (дд, *J* = 15.6, 11.1, 1H), 7.34 (т, *J* = 7.2, 1H), 7.42 (т, *J* = 7.4, 2H), 7.60 (д, *J* = 7.8, 2H), 7.79 (дд, *J* = 15.0, 11.0, 1H), 8.18 (д, *J* = 8.4, 2H), 10.18 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.2, 115.8, 117.3, 125.6, 125.9, 127.1, 127.9, 128.9, 129.1, 134.4, 136.2, 137.1, 139.3, 140.2, 158.5, 159.7, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 331.1448 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 331.1442.

**2-((*E*)-4-бромстирил)-5-((*Z*)-4-гидроксипензилден)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (10d):**



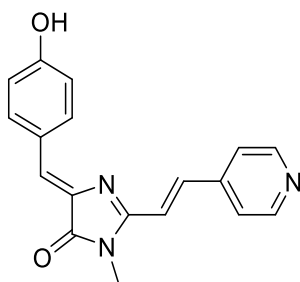
Синтезировано по общей методике **I**. Выход 207 мг (54%), желтый порошок; т. пл. ~245 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3H), 6.87 (д, *J* = 8.5, 2H), 6.99 (с, 1H), 7.27 (д, *J* = 16.0, 1H), 7.67 (д, *J* = 8.4, 2H), 7.84 (д, *J* = 8.4, 2H), 7.95 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.19 (д, *J* = 8.4, 2H), 10.16 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 115.0, 115.9, 123.3, 125.8, 126.3, 130.2, 131.9, 134.5, 134.6, 136.9, 138.1, 158.6, 159.9, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 383.0383 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 383.0390.



### Синтез производных белка Kaede (11-15, 18). Общая методика J:

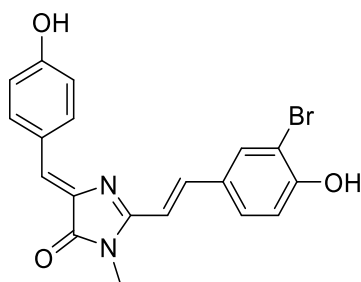
Соответствующий имидазолон (1 ммоль) и альдегид (1.2 ммоль) растворили в безводном 1,4-диоксане (5 мл), добавили безводный хлорид цинка (30 мг, 0.22 ммоль) и кипятили с обратным холодильником в течение 1-6 ч (контроль по ТСХ до исчезновения соответствующего имидазол-4-она). Реакционную массу упаривали насухо, остаток растворяли в 50 мл этилацетата и промывали 10 мл 0.5 % раствора ЭДТА. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ- этанол как элюент (19:1).

**5-((Z)-4-гидроксибензиленден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (11a):**



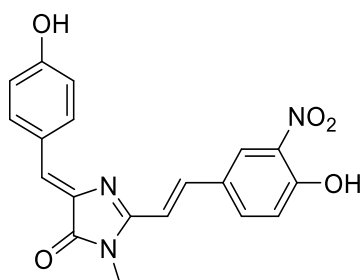
Синтезировано по общей методике J. Выход 190 мг (62%), оранжевый порошок, т. пл. ~263 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (с, 3H), 6.88 (д, *J* = 7.7, 2H), 7.05 (с, 1H), 7.49 (д, *J* = 15.2, 1H), 7.83 (д, *J* = 4.7, 2H), 7.94 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.21 (д, *J* = 7.8, 2H), 8.67 (д, *J* = 4.7, 2H), 10.27 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 115.9, 118.8, 121.9, 125.6, 127.3, 134.7, 136.5, 136.7, 142.2, 150.2, 158.1, 160.0, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 306.1235 [M+H]<sup>+</sup>. С<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 306.1237.

**2-((E)-3-бром-4-гидроксистирил)-5-((Z)-4-гидроксипензиледен)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (11b):**



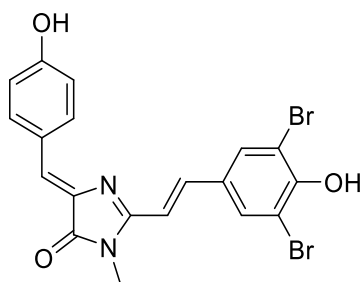
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 231 мг (58%) оранжевый порошок, т. пл. ~278 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (с, 3H), 6.86 (д, *J* = 8.6, 2H), 6.92 (с, 1H), 7.01 (д, *J* = 8.4, 1H), 7.07 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.68 (дд, *J* = 8.5, 1.8, 1H), 7.88 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.11 (д, *J* = 1.7, 1H), 8.17 (д, *J* = 8.6, 2H), 10.13 (ушир. с., 1H), 10.81 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 110.2, 111.9, 115.9, 116.5, 125.3, 126.0, 128.2, 129.5, 132.7, 134.4, 137.1, 138.4, 155.9, 159.0, 159.6, 170.1; HRMS (*m/z*) найдено 399.0297 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 399.0339.

**2-((E)-4-Гидрокси-3-нитростирил)-5-((Z)-4-гидроксипензиледен)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (11с):**



Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 223 мг (61%), оранжевый порошок, т. пл. ~273 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3H), 6.87 (д, *J* = 8.7, 2H), 7.20 (д, *J* = 5.5, 1H), 7.18 (с, 1H), 6.96 (с, 1H), 7.97 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.06 (дд, *J* = 8.6, 1.9, 1H), 8.19 (д, *J* = 8.6, 2H), 8.42 (д, *J* = 1.9, 1H), 10.15 (с, 1H), 11.48 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 113.6, 115.9, 119.4, 125.1, 125.8, 125.9, 126.9, 134.2, 134.6, 137.0, 137.4, 137.5, 153.0, 158.7, 159.8, 170.0; HRMS (*m/z*) найдено 366.1082 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>. Вычислено 366.1084.

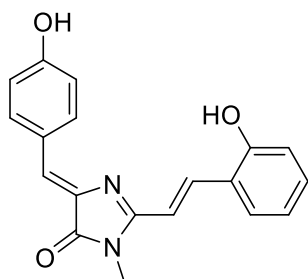
**2-((*E*)-3,5-Дибром-4-гидроксистирил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (11d):**



Синтезировано по общей методике **Ж**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.26 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.95 (с, 1H), 7.19 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 7.83 (д,  $J = 15.7$ , 1H), 8.15 (с, 2H), 8.19 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 10.17 (уш. с., 1H), 10.44 (уш. с., 1H).

Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [248].

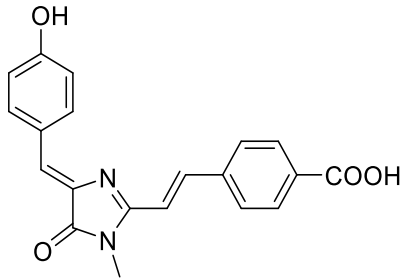
**5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-2-((*E*)-2-гидроксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (11e):**



Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 83 мг (26%), темно-оранжевый порошок, т. пл.  $\sim 224$  °C с разл.;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.25 (с, 3H), 6.90-6.86 (м, 3H), 6.97-6.93 (м, 2H), 7.18 (д,  $J = 15.9$ , 1H), 7.25 (т,  $J = 7.4$ , 1H), 7.79 (д,  $J = 7.4$ , 1H), 8.16 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.22 (д,  $J = 15.9$ , 1H), 10.14 (с, 1H), 10.26 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 113.0, 115.8, 116.2, 119.4, 122.0, 125.2, 125.9, 128.5, 131.3, 134.2, 135.2, 137.1, 156.6, 159.3, 159.6, 170.0; HRMS (m/z) найдено 321.1230 [M+H] $^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 321.1234.

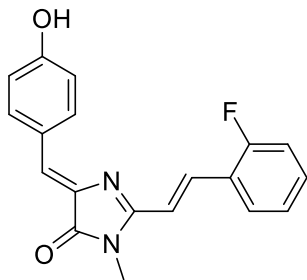


**4-((*E*)-2-(4-((*Z*)-4-гидроксибензиледен)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-2-ил)винил)бензойная кислота (11f):**



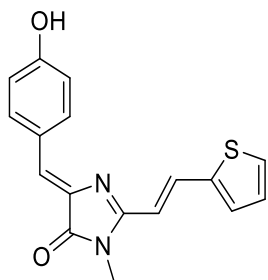
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 150 мг (43%), оранжевый порошок, т. пл. ~282 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.30 (ушир. с., 3H), 6.88 (д, *J* = 8.6, 2H), 7.01 (с, 1H), 7.35 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.96 - 8.00 (м, 4H), 8.03 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.20 (д, *J* = 8.6, 2H), 10.10 (с, 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 116.0, 116.4, 125.8, 126.7, 128.3, 129.8, 131.9, 134.7, 136.9, 138.1, 139.2, 158.5, 160.0, 167.1, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 349.1184 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 349.1183.

**2-((*E*)-2-Фторстирил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензиледен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (11g):**



Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 200 мг (62%), коричневый порошок, т. пл. 250–253 °С; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3H), 6.88 (д, *J* = 8.8, 2H), 7.01 (с, 1H), 7.28 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.36-7.30 (м, 2H), 7.50 (кв, *J* = 6.9, 1H), 8.07-8.01 (м, 2H), 8.17 (д, *J* = 8.6, 2H), 10.20 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 116.0, 116.2, 116.6 (д, *J*=5.2), 122.9 (д, *J*=11.9), 125.0 (д, *J* = 3.0), 125.8, 126.6, 128.9, 130.7 (д, *J* = 3.7), 131.9 (д, *J* = 8.2), 134.6, 136.8, 158.5, 159.9, 160.4 (д, *J* = 251.1), 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 323.1185 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 323.1190.

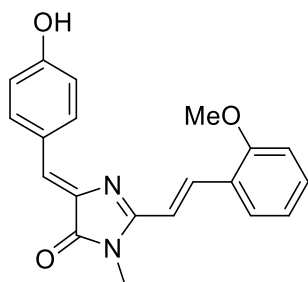
**5-((Z)-4-Гидроксипбензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(тиофен-2-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (11h):**



Синтезировано по общей методике **Ж**.  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.24 (с, 3H), 6.81 (д,  $J = 16.0$ , 1H), 6.83 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 6.94 (с, 1H), 7.16 (дд,  $J = 3.2$ , 4.8, 1H), 7.65 (д,  $J = 3.2$ , 1H), 7.74 (д,  $J = 4.8$ , 1H), 8.11 (д,  $J = 16.0$ , 1H), 8.13 (д,  $J = 8.8$ , 2H), 10.21 (уш. с., 1H).

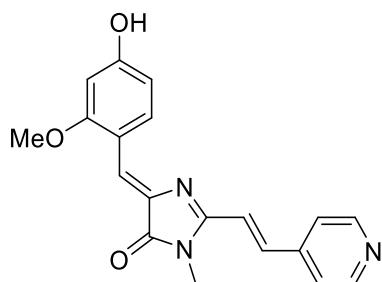
Спектральные характеристики совпадают с литературными данными [218].

**5-((Z)-4-Гидроксипбензилиден)-2-((E)-2-метоксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (11i):**



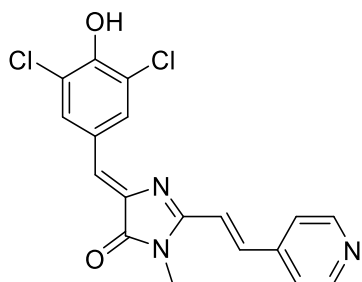
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 151 мг, (45%), оранжевый порошок, т. пл. 224–227 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.25 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 6.88 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.96 (с, 1H), 7.13 (д,  $J = 8.6$ , 1H), 7.05 (т,  $J = 7.4$ , 1H), 7.19 (д,  $J = 16.0$ , 1H), 7.43 (т,  $J = 7.7$ , 1H), 7.88 (д,  $J = 6.9$ , 1H), 8.16 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.21 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 10.12 (ушир. с., 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 55.7, 111.7, 114.1, 115.9, 120.8, 123.6, 125.7, 125.9, 128.5, 131.6, 134.3, 134.4, 137.0, 157.8, 159.2, 159.8, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 335.1391 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 335.1390.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (12a):**



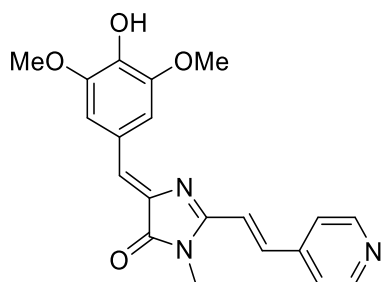
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 218 мг (65%), темно-красный порошок, т. пл. 263–265 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.28 (с, 3H), 3.86 (с, 3H), 6.47 (д,  $J = 2.2$ , 1H), 6.55 (дд,  $J = 8.7, 2.2$ , 1H), 7.40 (с, 1H), 7.47 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 7.80(д,  $J = 5.9$ , 2H), 7.89 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 8.65 (д,  $J = 5.9$ , 2H), 8.83 (д,  $J = 8.6$ , 1H), 10.36 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.4, 55.6, 98.7, 108.8, 114.4, 118.8, 120.4, 121.8, 134.2, 135.8, 136.1, 142.2, 150.2, 157.4, 160.8, 162.1, 169.7; HRMS ( $m/z$ ) найдено 336.1337  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 336.1343.

**5-((Z)-3,5-дихлоро-4-гидроксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (12b):**



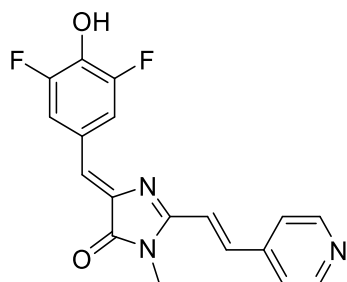
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 243 мг (65%), темно-красный порошок, т. пл. ~220 °С с разл.;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.32 (ушир. с., 3H), 7.05 (с, 1H), 7.52 (д,  $J = 15.9$ , 1H), 7.82 (д,  $J = 6.0, 2\text{H}$ ), 7.89 (д,  $J = 15.9$ , 1H), 8.38 (с, 2H), 8.68 (д,  $J = 5.9$ , 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 118.9, 122.2, 122.3, 123.8, 127.3, 132.2, 137.5, 138.7, 142.0, 150.3, 150.9, 160.0, 169.6; HRMS ( $m/z$ ) найдено 374.0459  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}^+$ . Вычислено 374.0458.

**5-((Z)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (12c):**



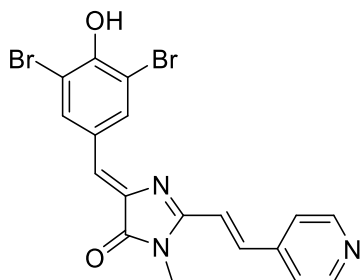
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 102 мг (28%), темно-красный порошок, т. пл. ~258 °С с разл.; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.30 (ушир. с., 3H), 3.87 (с, 6H), 7.06 (с, 1H), 7.51 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.76 (с, 2H), 7.78 (д, *J* = 5.7, 2H), 7.89 (д, *J* = 15.8, 1H), 8.66 (д, *J* = 5.7, 2H), 9.27 (с, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 56.0, 110.5, 118.9, 121.9, 127.6, 124.8, 136.3, 137.0, 139.1, 142.2, 147.9, 150.1, 158.0, 169.6; HRMS (*m/z*) найдено 366.1451 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 366.1448.

**5-((Z)-3,5-дифтор-4-гидроксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (12d):**



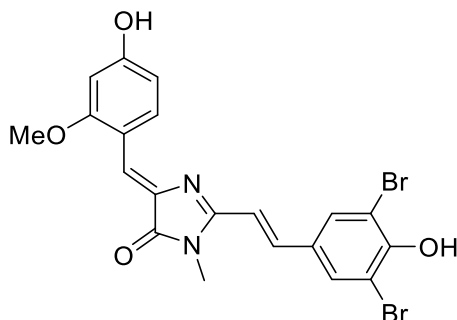
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 212 мг (62%), темно-красный порошок, т. пл. ~255 °С с разл.; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (ушир. с., 3H), 7.04 (с, 1H), 7.50 (д, *J* = 15.9, 1H), 7.84 (д, *J* = 5.6, 2H), 7.96 (д, *J* = 15.9Hz, 1H), 8.05 (д, *J* = 9.5, 2H), 8.67 (д, *J* = 5.6, 2H), 11.03 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 115.5 (дд, *J* = 17.3, 4.8), 118.7, 122.1, 124.5, 136.2, 137.5, 138.7, 142.0, 150.2, 151.9 (дд, *J* = 241.1, 7.8), 153.3, 159.8, 169.6; HRMS (*m/z*) найдено 342.1044 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 342.1049.

**5-((Z)-3,5-дибром-4-гидроксibenзилен)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (12e):**



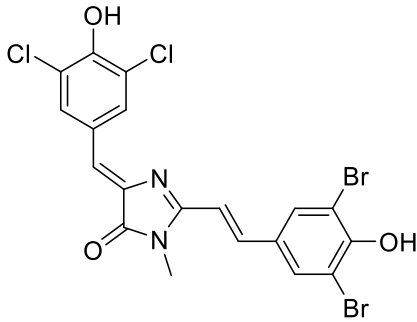
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 306 мг (66%), коричневый порошок, т. пл. ~225 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (с, 3H), 7.04 (с, 1H), 7.52 (д, *J* = 15.9, 1H), 7.80 (д, *J* = 5.9, 2H), 7.86 (д, *J* = 15.9, 1H), 8.55 (с, 2H), 8.68 (д, *J* = 5.8, 2H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.6, 111.9, 118.9, 122.1, 123.6, 128.7, 135.9, 137.4, 138.7, 142.0, 150.2, 152.6, 159.9, 169.6; HRMS (*m/z*) найдено 463.9425 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 463.9427.

**2-((E)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (13a):**



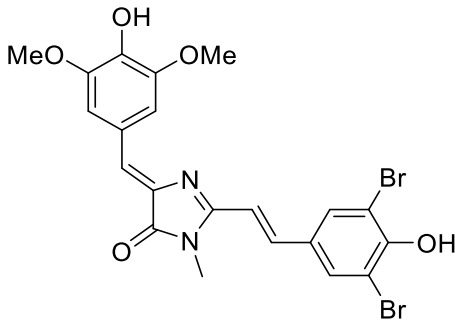
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 295 мг (58%), темно-красный порошок, т. пл. ~235 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.25 (с, 3H), 3.85 (с, 3H), 6.46 (д, *J* = 2.0, 1H), 6.53 (дд, *J* = 8.7, 2.0, 1H), 7.19 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.32 (с, 1H), 7.83 (д, *J* = 15.6, 1H), 8.13 (с, 2H), 8.83 (д, *J* = 8.6, 1H), 10.28 (с, 1H), 10.40 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 55.6, 98.6, 108.7, 112.2, 113.9, 114.6, 119.0, 130.1, 132.1, 134.3, 136.1, 136.4, 151.9, 158.1, 160.6, 161.8, 170.0; HRMS (*m/z*) найдено 508.9535 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 508.9529.

**2-((*E*)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-5-((*Z*)-3,5-дихлоро-4-гидроксипенцилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (13b):**



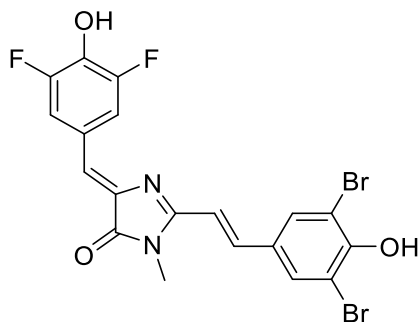
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 317 мг (58%), темно-оранжевый порошок, т. пл. 249–252 °С; <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3Н), 6.95 (с, 1Н), 7.22 (д, *J* = 15.9, 1Н), 7.82 (д, *J* = 15.8, 1Н), 8.15 (с, 2Н), 8.35 (с, 2Н), 10.70 (ушир. с., 1Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 112.2, 113.7, 122.2, 122.3, 127.5, 129.6, 131.9, 132.2, 137.7, 138.9, 150.5, 152.4, 160.5, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 546.8647 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 546.8644.

**2-((*E*)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-5-((*Z*)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (13c):**



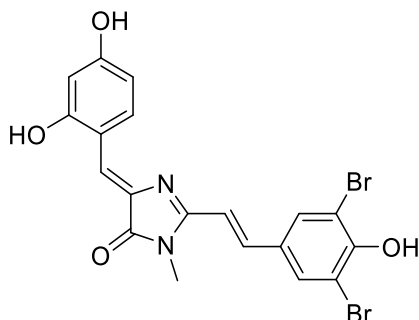
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 145 мг (27%), оранжевый порошок, т. пл. ~253 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3Н), 3.86 (с, 6Н), 6.97 (с, 1Н), 7.21 (д, *J* = 15.7, 1Н), 7.72 (с, 2Н), 7.79 (д, *J* = 15.7, 1Н), 8.09 (с, 2Н), 9.18 (с, 1Н), 10.43 (ушир. с., 1Н); <sup>13</sup>С ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 56.0, 110.2, 112.2, 113.9, 124.9, 126.1, 129.9, 131.9, 136.5, 137.2, 138.7, 147.8, 152.0, 158.6, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 538.9626 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>. Вычислено 538.9635.

**2-((E)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-5-((Z)-3,5-дифтор-4-гидроксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (13d):**



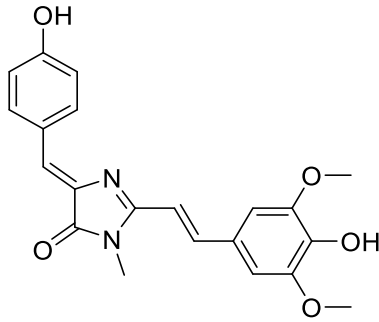
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 268 мг (52%), темно-оранжевый порошок, т. пл. ~270 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3H), 6.94 (с, 1H), 7.20 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.89(д, *J* = 15.8, 1H), 8.03 (д, *J* = 9.4, 2H), 8.18 (с, 2H), 10.49 (ушир. с., 1H), 10.92 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 112.2, 113.5, 115.3 (дд, *J*=17.6, 4.3), 122.8, 125.1, 129.6, 132.3, 135.7 (т, *J* = 16.2), 137.9, 139.0, 151.9 (дд, *J* = 241.6, 8.7), 152.4, 160.5, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 514.9213 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 514.9235.

**2-((E)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-5-((Z)-2,4-дигидроксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (13e):**



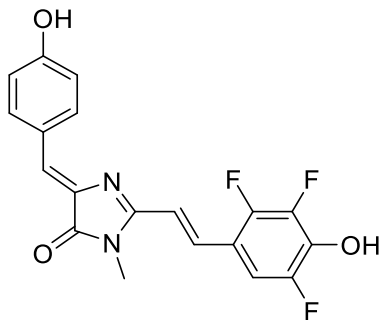
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 331 мг (67%), красный порошок, т. пл. ~192 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (с, 3H), 6.33 (д, *J* = 2.3, 1H), 6.37 (дд, *J* = 8.6, 2.2, 1H), 7.21 (д, *J* = 15.9, 1H), 7.22 (с, 1H), 7.69 (д, *J* = 15.9, 1H), 8.06 (ушир. с., 1H), 8.13 (с, 2H), 10.16 (с, 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 103.0, 108.1, 108.5, 112.2, 113.2, 113.3, 129.8, 132.0, 136.3, 132.8, 136.5, 152.0, 155.3, 160.0, 162.5, 168.3; HRMS (*m/z*) найдено 494.9361 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 494.9373.

**2-((*E*)-4-гидрокси-3,5-диметоксистирил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14a):**



Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 164 мг (43%), оранжевый порошок, т. пл. 255–258 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.28 (с, 3H), 3.86 (с, 6H), 6.87 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 6.91 (с, 1H), 7.04 (д,  $J = 15.6$ , 1H), 7.17 (с, 2H), 7.91 (д,  $J = 15.6$ , 1H), 8.17 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 8.97 (ушир. с., 1H), 10.12 (ушир. с., 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 56.2, 106.4, 110.8, 115.8, 124.7, 125.7, 134.2, 126.0, 137.1, 138.3, 140.6, 148.1, 159.1, 159.5, 170.1; HRMS ( $m/z$ ) найдено 381.1442  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5^+$ . Вычислено 381.1445.

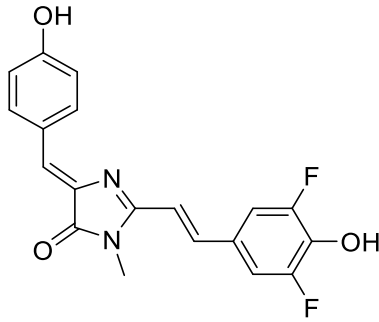
**5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-3-метил-2-((*E*)-2,3,5-трифтор-4-гидроксистирил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14b):**



Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 229 мг (61%), коричневый порошок, т. пл. ~248 °С с разл.;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.25 (с, 3H), 6.87 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 6.97 (с, 1H), 7.18 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 7.91 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 8.15 (д,  $J = 8.6$ , 2H), 10.18 (ушир. с., 1H), 11.50 (ушир. с., 1H). HRMS ( $m/z$ ) найдено 375.0949  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 375.0951.

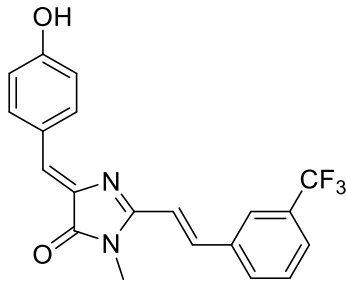


**2-((*E*)-3,5-дифтор-4-гидроксистирил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14c):**



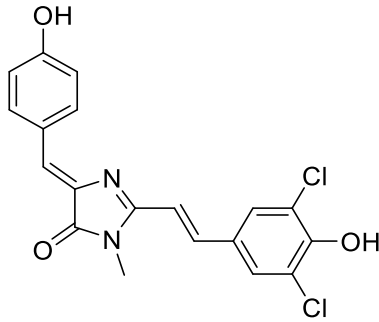
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 171 мг (48%), оранжевый порошок, т. пл. ~265 °С с разл;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.24 (с, 3H), 6.88-6.83 (м, 4H), 7.55 (ушир. с., 2H), 7.84 (д,  $J = 15.6$ , 1H), 8.16 (д,  $J = 8.5$ , 2H), 10.14 (ушир. с., 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 104.5, 111.8 (д,  $J = 21.1$ ), 115.8, 124.7, 125.9, 126.4, 130.2, 134.2, 137.1, 139.8, 158.9, 159.2, 159.6, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 357.1042  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 357.1045.

**5-((*Z*)-4-гидроксибензилен)-3-метил-2-((*E*)-3-(трифторметил)стирил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14d):**



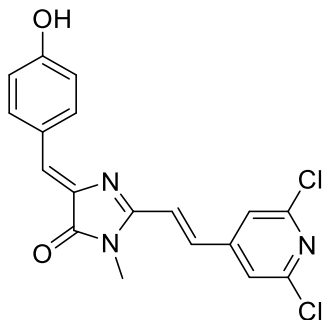
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 194 мг (52%), оранжевый порошок, т. пл. 256–259 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.30 (ушир. с., 3H), 7.01 (с, 1H), 6.88 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 7.41 (д,  $J = 15.8$ , 1H), 7.70 (т,  $J = 7.7$ , 1H), 7.77 (д,  $J = 7.7$ , 1H), 8.07 (д,  $J = 15.8\text{Hz}$ , 1H), 8.18 (д,  $J = 7.6$ , 1H), 8.21 (д,  $J = 8.7$ , 2H), 8.29 (с, 1H), 10.19 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.5, 116.0, 116.3, 124.9, 125.8, 126.1 (д,  $J = 3.8$ ), 126.6, 127.9 (кв,  $J = 275.3$ ), 129.9, 130.1, 132.0, 134.7, 136.4, 136.9, 137.7, 158.5, 160.0, 170.0; HRMS ( $m/z$ ) найдено 373.1160  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2^+$ . Вычислено 373.1158.

**2-((*E*)-3,5-дихлоро-4-гидроксистирил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензиледен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14e):**



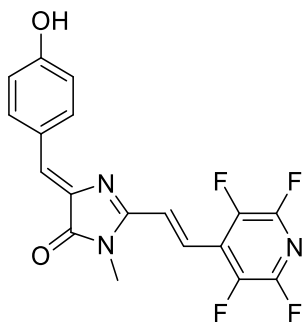
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 132 мг (34%), оранжевый порошок, т. пл. ~272 °С с разл.; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (с, 3H), 6.86 (д, *J* = 8.6, 2H), 6.95 (с, 1H), 7.20 (д, *J* = 15.6, 1H), 7.87 (д, *J* = 15.6, 1H), 8.18 (д, *J* = 8.6, 2H) 7.98 (с, 2H), 10.16 (с, 1H), 10.67 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 113.8, 115.8, 122.6, 125.7, 125.8, 128.5, 128.4, 134.5, 136.9, 137.0, 150.3, 158.6, 159.7, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 389.0455 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 389.0454.

**2-((*E*)-2-(2,6-дихлоропиридин-4-ил)винил)-5-((*Z*)-4-гидроксибензиледен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (14f):**



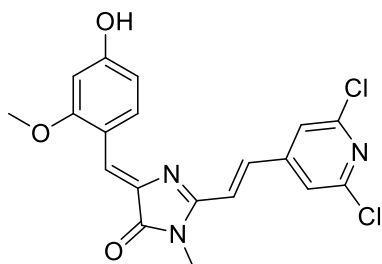
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 239 мг (64%), оранжевый порошок, т. пл. ~290 °С с разл.; <sup>1</sup>Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.28 (с, 3H), 6.87 (д, *J* = 8.7, 2H), 7.08 (с, 1H), 7.91 (д, *J* = 15.8, 1H), 7.66 (д, *J* = 15.9, 1H), 8.10 (с, 2H), 8.21 (д, *J* = 8.7, 2H), 10.31 (ушир. с., 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 116.0, 121.6, 125.7, 121.7, 128.1, 133.6, 135.0, 136.7, 149.0, 150.0, 157.6, 160.3, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 374.0459 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 374.0458.

**5-((Z)-4-гидроксипензилден)-3-метил-2-((E)-2-(перфторпиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (14g):**



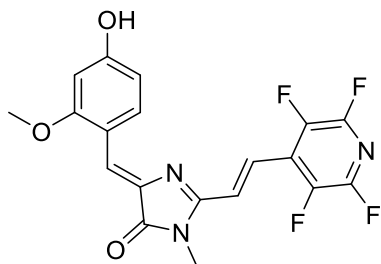
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 272 мг (72%), красный порошок, т. пл. ~288 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (с, 3H), 6.90 (д, *J* = 8.6, 2H), 7.15 (с, 1H), 7.46 (д, *J* = 16.2Hz, 1H), 7.80 (д, *J* = 16.2, 1H), 8.19 (д, *J* = 8.5, 2H), 10.34 (с, 1H); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.2, 115.9, 121.3, 125.4, 125.9, 129.0, 127.2, 134.9, 136.3, 139.7 (д, *J*=258.0), 143.0 (д, *J*=240.6), 157.0, 160.5, 169.4; HRMS (*m/z*) найдено 378.0859 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 378.0860.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилден)-2-((E)-2-(2,6-дихлоропиридин-4-ил)винил)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15a):**



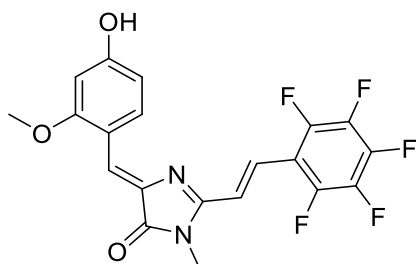
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 339 мг (84%), красный порошок, т. пл. ~250 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.28 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.47 (д, *J* = 1.9, 1 H), 6.54 (дд, *J* = 8.7, 1.8, 1 H), 7.43 (с, 1 H), 7.64 (д, *J* = 15.8, 1 H), 7.88 (д, *J* = 15.8, 1 H), 8.09 (с, 2 H), 8.83 (д, *J* = 8.8, 1 H), 10.42 (с, 1 H); <sup>13</sup>С ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.5, 55.7, 98.7, 108.9, 114.4, 121.2, 121.6, 121.7, 133.2, 134.5, 135.9, 149.1, 149.9, 157.0, 161.1, 162.5, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 404.0565 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 404.0563.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(перфторпиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15b):**



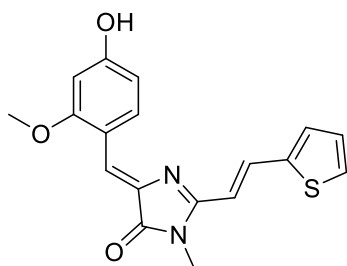
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 309 мг (76%), красный порошок, т. пл. ~300 °С с разл;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.24 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.47 (д,  $J = 1.9$ , 1 H), 6.55 (дд,  $J = 8.6$ , 1.9, 1 H), 7.43 (д,  $J = 16.2$ , 1 H), 7.48 (с, 1 H), 7.75 (д,  $J = 16.2$ , 1 H), 8.75 (д,  $J = 8.8$ , 1 H), 10.48 (с, 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (176 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  55.5, 91.7, 98.6, 108.9, 114.2, 120.8, 122.1, 126.0, 134.1, 135.4, 139.6 (дм,  $J = 260.7$ ), 142.9 (дм,  $J = 240.1$ ), 156.2, 161.1, 162.6, 169.3; HRMS ( $m/z$ ) найдено 408.0969  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 408.0966.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(перфторфенил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15с):**



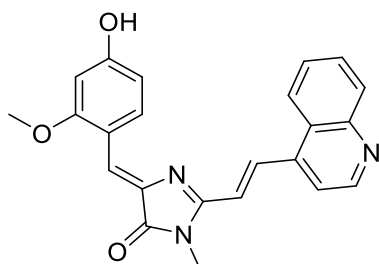
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 64 мг (15%), красный порошок, т. пл. ~280 °С с разл;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.23 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.47 (д,  $J = 2.1$ , 1 H), 6.54 (дд,  $J = 8.7$ , 2.0, 1 H), 7.25 (д,  $J = 16.2$ , 1 H), 7.43 (с, 1 H), 7.74 (д,  $J = 16.2$ , 1 H), 8.75 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 10.41 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.2, 55.6, 91.9, 98.7, 108.9, 114.3, 121.1, 121.8, 122.1, 134.1, 135.6, 137.3 (дм,  $J = 248.7$ ), 140.5 (дм,  $J = 284.3$ ), 144.8 (дм,  $J=247.9$ ), 157.1, 161.0, 162.4, 169.6; HRMS ( $m/z$ ) найдено 425.0915  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 425.0919.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(тиофен-2-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15d):**



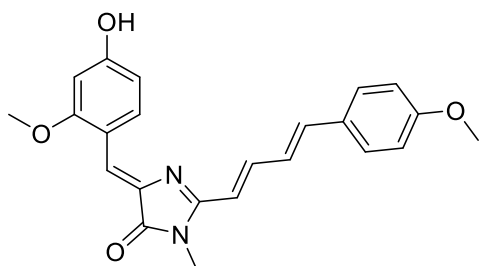
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 85 мг (25%), красный порошок, т. пл. 254-257 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.24 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 6.46 (д,  $J = 1.9$ , 1 H), 6.54 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), (д,  $J = 15.4$ , 1 H), 7.19 (т,  $J = 3.8$ , 1 H), 7.32 (с, 1 H), 7.64 (д,  $J = 3.2$ , 1 H), 7.73 (д,  $J = 5.0$ , 1 H), 8.10 (д,  $J = 15.4$ , 1 H), 8.80 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 10.28 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.3, 55.6, 98.7, 108.8, 112.6, 114.6, 118.8, 128.7, 129.5, 131.3, 132.0, 134.1, 136.1, 140.5, 157.9, 160.6, 161.8, 169.9; HRMS ( $m/z$ ) найдено 341.0947  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ . Вычислено 341.0954.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(хинолин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15e):**



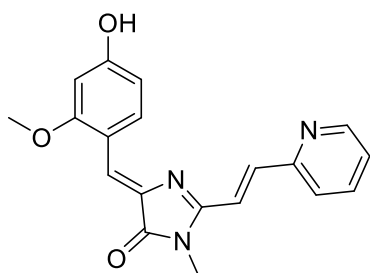
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 270 мг (70%), красный порошок, т. пл. 269-272 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.33 (с, 3 H), 3.87 (с, 3 H), 6.48 (д,  $J = 2.1$ , 1 H), 6.60 (дд,  $J = 8.7$ , 2.2, 1 H), 7.45 (с, 1 H), 7.51 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 7.75 (т,  $J = 8.1$ , 1 H), 7.85 (т,  $J = 8.1\text{Hz}$ , 1 H), 8.05 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 8.10 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 8.42 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 8.64 (д,  $J = 15.6$ , 1 H), 8.90 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 8.99 (д,  $J = 4.6$ , 1 H), 10.38 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  26.6, 55.7, 98.7, 109.1, 114.4, 118.3, 120.8, 121.0, 123.7, 125.5, 127.4, 129.8, 132.3, 134.6, 135.9, 140.0, 148.3, 150.3, 157.5, 161.0, 162.4, 169.9; HRMS ( $m/z$ ) найдено 386.1498  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 386.1499.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-((1E,3E)-4-(4-метоксифенил)бута-1,3-диен-1-ил)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15f):**



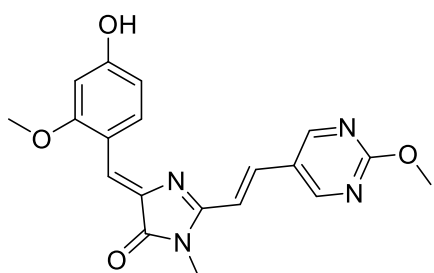
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 39 мг (10%), красный порошок, т. пл. ~240 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.19 (с, 3 H), 3.80 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 6.46 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.53 (дд, *J* = 8.7, 2.0, 1 H), 6.63 (д, *J* = 15.1, 1 H), 6.99 (д, *J* = 8.8, 2 H), 7.07 - 7.09 (м, 1 H), 7.12 - 7.13 (м, 1 H), 7.29 (с, 1 H), 7.55 (д, *J* = 8.8, 2 H), 7.76 - 7.71 (м, 1 H), 8.80 (д, *J* = 8.6, 1 H), 10.26 (ушир. с., 1 H); HRMS (*m/z*) найдено 391.1644 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 391.1652.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пиридин-2-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15g)**



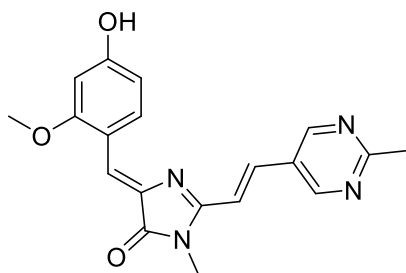
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 208 мг (62%), оранжевый порошок, т. пл. ~270 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.47 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.56 (дд, *J* = 8.6, 2.1, 1 H), 7.36 - 7.44 (м, 2 H), 7.53 (д, *J* = 15.6, 1 H), 7.85 (д, *J* = 7.6, 1 H), 7.89 (тд, *J* = 7.6, 1.7, 1 H), 7.96 (д, *J* = 15.4, 1 H), 8.68 (д, *J* = 4.2, 1 H), 8.83 (д, *J* = 8.8, 1 H), 10.34 (с, 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 55.6, 98.6, 108.8, 114.4, 117.4, 120.1, 124.1, 124.3, 134.1, 135.9, 137.0, 138.0, 149.8, 153.0, 157.6, 160.7, 162.0, 169.7; HRMS (*m/z*) найдено 336.1344 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 336.1343.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2-((E)-2-(2-метоксипиримидин-5-ил)винил)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15h)**



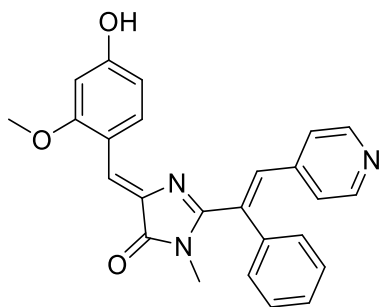
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 220 мг (60%), красный порошок, т. пл. 281-284 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 3.98 (с, 3 H), 6.47 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.53 (дд, *J* = 8.6, 1.9, 1 H), 7.33 (д, *J* = 16.0, 1 H), 7.35 (с, 1 H), 7.90 (д, *J* = 16.0, 1 H), 8.82 (д, *J* = 8.6, 1 H), 9.11 (с, 2 H), 10.31 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 54.9, 55.6, 98.6, 108.7, 114.5, 114.6, 119.5, 123.5, 132.2, 134.1, 136.0, 157.8, 158.9, 160.7, 161.9, 165.1, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 365.1258 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>. Вычислено 365.1255.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(2-метилпиримидин-5-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (15i)**

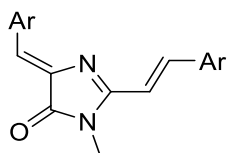


Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 221 мг (63%), оранжевый порошок, т. пл. 290-293 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.67 (с, 3 H), 3.27 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 6.47 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.53 (дд, *J* = 8.8, 2.1, 1 H), 7.38 (с, 1 H), 7.43 (д, *J* = 16.0, 1 H), 7.91 (д, *J* = 16.0, 1 H), 8.82 (д, *J* = 8.6, 1 H), 9.16 (с, 2 H), 10.34 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 25.6, 26.4, 55.6, 98.6, 108.8, 114.5, 116.5, 120.0, 126.2, 132.3, 134.2, 135.9, 156.0, 157.5, 160.8, 162.1, 167.4, 169.8; HRMS (*m/z*) найдено 351.1453 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 351.1452.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-1-фенил-2-(пиридин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (18):**



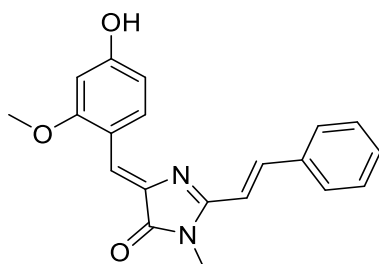
Синтезировано по общей методике **Ж**. Выход 136 мг (33%), желтый порошок, т. пл. 255-258 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.71 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.46 - 6.48 (м, 2 H), 7.09 (д, *J* = 6.1, 2 H), 7.28 - 7.32 (м, 2 H), 7.43 - 7.48 (м, 5 H), 8.45 (д, *J* = 5.9, 2 H), 8.68 (д, *J* = 8.4, 1 H), 10.36 (с, 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 28.0, 55.7, 98.7, 108.9, 114.0, 121.7, 123.9, 129.1, 129.2, 129.2, 129.4, 133.0, 134.3, 134.8, 135.1, 135.2, 142.5, 149.7, 161.0, 162.4, 170.2; HRMS (*m/z*) найдено 410.1510 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>. Вычислено 410.1510.



### Синтез производных белка Kaede (16). Общая методика К:

В смесь соответствующего имидазолонa (1 ммоль) и соответствующего альдегида (1.7 ммоль) добавили этилендиамин диацетат (90 мг, 0.5 ммоль) и выдерживали без растворителя на масляной бане при 105 °С в течение 1 ч. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ- этанол как элюент (25:1).

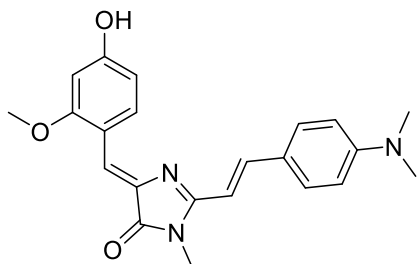
### 5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-стирил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (16a):



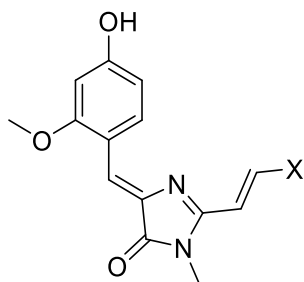
Синтезировано по общей методике К. Выход 84 мг (25%), оранжевый порошок, т. пл. ~230 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.27 (с, 3 H), 3.86 (с, 3 H), 6.47 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.55 (дд, *J* = 8.6, 2.1, 1 H), 7.20 (д, *J* = 15.8, 1 H), 7.35 (с, 1 H), 7.42 - 7.48 (м, 3 H), 7.84 (д, *J* = 7.4, 2 H), 7.94 (д, *J* = 15.8, 1 H), 8.82 (д, *J* = 8.8, 1 H), 10.21 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.4, 55.6, 98.7, 108.8, 114.2, 114.5, 119.2, 128.2, 128.9, 129.9, 134.2, 135.3, 136.1, 139.1, 158.2, 160.6, 161.9, 170.0; HRMS (*m/z*) найдено 335.1390 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 335.1390.



**5-((*Z*)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((*E*)-4-(диметиламино)стирил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (16b):**



Синтезировано по общей методике **К**. Выход 124 мг (33%), красный порошок, т. пл. ~285°C с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.01 (с, 6 H), 3.24 (с, 3 H), 3.85 (с, 3 H), 6.46 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.54 (дд, *J* = 8.7, 2.2, 1 H), 6.76 (д, *J* = 9.0, 2 H), 6.85 (д, *J* = 15.6, 1 H), 7.24 (с, 1 H), 7.66 (д, *J* = 9.0, 2 H), 7.86 (д, *J* = 15.6, 1 H), 8.81 (д, *J* = 8.6, 1 H), 10.12 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 39.7, 55.6, 98.6, 107.7, 108.6, 111.8, 114.8, 117.0, 122.8, 129.9, 133.9, 136.5, 140.1, 151.5, 158.9, 160.3, 161.3, 170.2; HRMS (*m/z*) найдено 378.1812 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 378.1812.

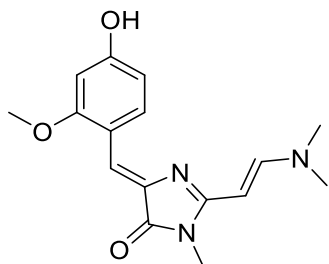


**Синтез енаминных 4-гидрокси-2-метоксибензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (19).**

**Общая методика L:**

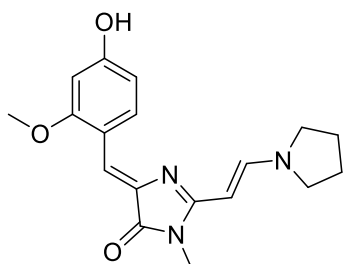
Соответствующий 5-(*Z*)-бензилиден-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (1 ммоль) и аминокеталь (2 ммоль) растворили в безводном ДМФА (4 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч (контроль по ТСХ до исчезновения соответствующего имидазол-4-она). Реакционную массу упаривали насухо. Продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ-этанол как элюент (19:1).

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(диметиламино)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (19a):**

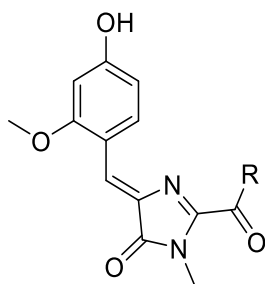


Синтезировано по общей методике **L**. Выход 63 мг (21%), коричневый порошок, т. пл. 215-218 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.04 (ушир. с., 6 H), 3.07 (с, 3 H), 3.80 (с, 3 H), 4.87 (д,  $J = 12.4$ , 1 H), 6.39 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 6.44 (дд,  $J = 8.6$ , 2.1, 1 H), 6.83 (с, 1 H), 7.90 (д,  $J = 12.4$ , 1 H), 8.74 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 9.82 (с, 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  25.8, 40.0, 55.3, 79.5, 98.4, 107.9, 109.5, 115.8, 132.8, 137.5, 150.3, 159.0, 159.3, 161.1, 170.4; HRMS ( $m/z$ ) найдено 302.1499  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 302.1499.

**5-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-2-((E)-2-(пирролидин-1-ил)винил)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (19b):**



Синтезировано по общей методике **L**. Выход 65 мг (20%), коричневый порошок, т. пл. 196-199 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.07 (с, 3 H), 3.80 (с, 3 H), 4.80 (д,  $J = 12.4$ , 1 H), 6.40 (д,  $J = 2.1$ , 1 H), 6.44 (дд,  $J = 8.3$ , 2.0, 1 H), 6.83 (с, 1 H), 8.08 (д,  $J = 12.4$ , 1 H), 8.72 (д,  $J = 8.4$ , 1 H), 9.74 (с, 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (201 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  24.7, 25.8, 46.7, 51.9, 55.3, 80.2, 98.4, 107.9, 109.2, 115.8, 132.7, 137.6, 146.0, 159.0, 159.3, 160.9, 170.4; HRMS ( $m/z$ ) найдено 328.1656  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^+$ . Вычислено 328.1656.

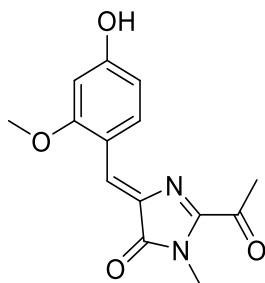


### Синтез кетонных 4-гидрокси-2-метоксибензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов (21).

#### Общая методика М:

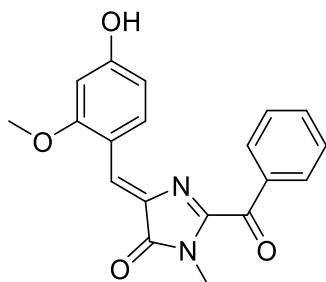
Соответствующий (*Z*)-4-(4-гидроксибензилиден)-1-метил-2-(арилметил/алкил)-имидазол-5-он (0.5 ммоль) добавили к предварительно приготовленной суспензии диоксида селена (67 мг, 0.6 ммоль) в безводном 1,4-диоксане (4 мл) и кипятили с обратным холодильником в течении 30 минут. Реакционную массу упарили и добавили 30 мл этилацетата, полученный раствор промывали водой (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, раствор упарили насухо, продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь этилацетат – толуол (1:9) в качестве элюента.

#### (*Z*)-2-ацетил-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он (21а):



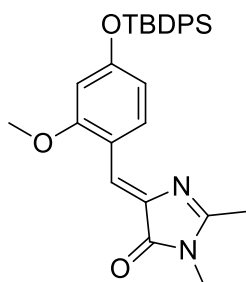
Синтезировано по общей методике М. Выход 192 мг (35%), оранжевый порошок, т. пл. ~250 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.60 (с, 3 H), 3.29 (с, 3 H), 3.88 (с, 3 H), 6.49 (д, *J* = 2.3, 1 H), 6.57 (дд, *J* = 8.6, 2.1, 1 H), 7.70 (с, 1 H), 8.74 (д, *J* = 8.8, 1 H), 10.69 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.2, 28.3, 55.8, 98.8, 109.6, 113.8, 127.3, 134.3, 134.9, 153.0, 162.0, 164.0, 169.6, 192.7; HRMS (*m/z*) найдено 273.0880 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>. Вычислено 273.0881.

**(Z)-2-бензоил-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (21b):**



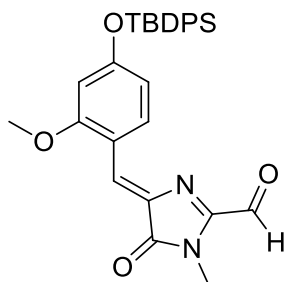
Синтезировано по общей методике **М**. Выход 282 мг (42%), красный порошок, т. пл. 274-277 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.32 (с, 3 H), 3.88 (с, 3 H), 6.46 (дд,  $J = 8.7, 2.2, 1 \text{ H}$ ), 6.49 (д,  $J = 2.1, 1 \text{ H}$ ), 7.62 (т,  $J = 7.8, 2 \text{ H}$ ), 7.72 (с, 1 H), 7.75 (т,  $J = 7.4, 1 \text{ H}$ ), 8.22 (д,  $J = 7.2, 2 \text{ H}$ ), 8.52 (д,  $J = 8.8, 1 \text{ H}$ ), 10.66 (ушир. с., 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  28.2, 55.9, 98.9, 109.5, 113.7, 127.2, 128.4, 130.8, 134.1, 134.4, 134.6, 135.2, 153.7, 162.0, 163.9, 169.3, 185.2; HRMS ( $m/z$ ) найдено 337.1183  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4^+$ . Вычислено 337.1183.

**(Z)-5-(4-((трет-бутилдифенилсилил)окси)-2-метоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (22):**

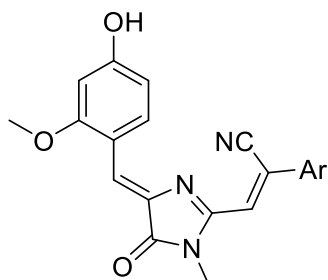


К раствору (Z)-5-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (1 г, 4 ммоль) добавляют в 50 мл ТГФ добавляют TBDPSCl (1.2 мл, 4.4 ммоль), диизопропилэтиламин (1 мл, 6 ммоль) и имидазол (14 мг, 0.2 ммоль) и перемешивают 12 часов. Реакционную массу упарили насухо, добавили 200 мл этилацетата, промыли насыщенным раствором NaCl ( $3 \times 50 \text{ мл}$ ), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ - этанол как элюент (99:1). Выход 1.45 г (76%), желтый порошок, т. пл. 176-179 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.08 (с, 9 H), 2.28 (с, 3 H), 3.05 (с, 3 H), 3.60 (с, 3 H), 6.35 (дд,  $J = 8.7, 2.2, 1 \text{ H}$ ), 6.41 (д,  $J = 2.3, 1 \text{ H}$ ), 7.15 (с, 1 H), 7.47 (т,  $J = 7.2, 4 \text{ H}$ ), 7.50 - 7.52 (м, 2 H), 7.69 (д,  $J = 6.5, 4 \text{ H}$ ), 8.51 (д,  $J = 8.8, 1 \text{ H}$ );  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  15.2, 19.0, 26.2, 26.3, 55.5, 103.0, 112.0, 116.1, 117.6, 128.2, 130.4, 131.7, 133.0, 135.1, 136.7, 158.4, 159.7, 162.9, 169.8; HRMS ( $m/z$ ) найдено 485.2255  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}^+$ . Вычислено 485.2255.

**(Z)-4-(4-((трет-бутилдифенилсилил)окси)-2-метоксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-карбальдегид (23):**



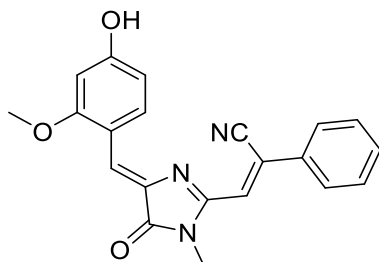
Синтезировано по общей методике **М**. Выход 0.72 г (72%), оранжевый порошок, т. пл. 115-118 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  1.09 (с, 9 H), 3.28 (с, 3 H), 3.67 (с, 3 H), 6.41 (дд,  $J = 8.9$ , 2.2, 1 H), 6.49 (д,  $J = 2.1$ , 1 H), 7.48 (т,  $J = 7.2$ , 4 H), 7.50 - 7.54 (м, 2 H), 7.64 (с, 1 H), 7.70 (д,  $J = 6.7$ , 4 H), 8.59 (д,  $J = 8.8$ , 1 H), 9.60 (с, 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  19.0, 26.3, 27.4, 55.8, 103.3, 112.9, 115.8, 127.2, 128.2, 130.5, 131.4, 134.5, 135.0, 136.1, 154.0, 160.9, 161.4, 169.4, 185.7; HRMS ( $m/z$ ) найдено 499.2048  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}^+$ . Вычислено 499.2048.



**Синтез акрилонитрилов (24). Общая методика N:**

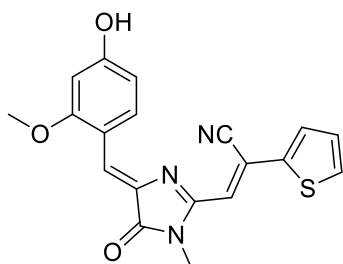
К раствору соответствующего арилацетонитрила (0.55 ммоль) в 35 мл метанола добавили раствор метилата натрия в метаноле (0.5 М, 1 мл, 0.75 ммоль) и перемешивали 10 минут. К полученному раствору добавили раствор соответствующего имидазолон-2-карбальдегида (0.25 г, 0.5 ммоль) в 1 мл метанола и перемешивали 1 час. Реакционную смесь разбавили 10 мл 0.5 М фосфатного буферного раствора и экстрагировали этилацетатом (3  $\times$  25 мл), промыли насыщенным раствором NaCl (2  $\times$  10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь гексан - этилацетат как элюент (1:1).

**(Z)-3-(4-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-2-фенилакрилонитрил (24a):**

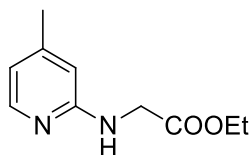


Получено по общей методике **N**. Выход 74 мг (41%), темно-красный порошок, т. пл. ~260 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.29 (с, 3 H), 3.88 (с, 3 H), 6.45 (дд, *J* = 8.7, 2.2, 1 H), 6.48 (д, *J* = 2.1, 1 H), 7.55 - 7.60 (м, 4 H), 7.74 (с, 1 H), 7.95 (д, *J* = 8.4, 2 H), 9.03 (д, *J* = 8.8, 1 H), 10.50 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (75 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.3, 55.8, 98.6, 109.1, 114.3, 116.8, 117.8, 123.1, 125.5, 127.0, 127.5, 129.4, 130.9, 133.1, 134.5, 135.1, 135.2, 154.4, 161.5, 163.2, 169.0; HRMS (*m/z*) найдено 358.1197 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>. Вычислено 358.1197.

**(Z)-3-(4-((Z)-4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-1-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-2-(тиофен-2-ил)акрилонитрил (24b):**

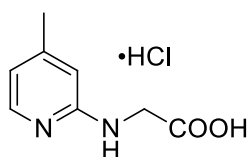


Получено по общей методике **N**. Выход 84 мг (46%), темно-красный порошок, т. пл. ~290 °С с разл; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (с, 3 H), 3.87 (с, 3 H), 6.44 (дд, *J* = 8.8, 2.1, 1 H), 6.47 (д, *J* = 2.3, 1 H), 7.28 (дд, *J* = 5.0, 3.8, 1 H), 7.48 (с, 1 H), 7.53 (с, 1 H), 7.79 (дд, *J* = 3.8, 1.0, 1 H), 7.89 (дд, *J* = 5.1, 0.9, 1 H), 8.98 (д, *J* = 8.6, 1 H), 10.49 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 26.1, 55.6, 98.6, 109.0, 111.8, 114.3, 116.0, 121.9, 122.6, 129.0, 129.5, 130.8, 134.9, 135.3, 138.0, 154.0, 161.3, 163.0, 168.8; HRMS (*m/z*) найдено 364.0761 [M-H]<sup>-</sup>. C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S<sup>-</sup>. Вычислено 364.0761.

**Этил 2-((4-метилпиридин-2-ил)амино)ацетат:**

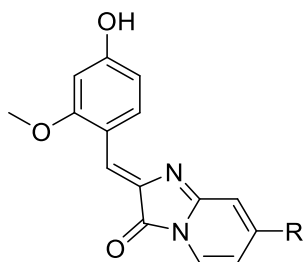
4-Метилпиридин-2-амин (21.6 г, 200 ммоль) растворили в смеси 100 мл 50 % хлорной кислоты и 200 мл этанола и добавили 40 % раствор глиоксаля в воде (25 мл, 220 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 72 ч, затем охладили до 0°C и нейтрализовали 10% раствором карбоната натрия. Полученную реакционную смесь отфильтровали и фильтрат экстрагировали хлороформом (4 × 150 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь гексан - этилацетат как элюент (1:1).

Выход 24.7 г (64%), белый порошок, т. пл. 44-46 °С; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 1.17 (т, *J* = 7.2, 3 Н), 2.15 (с, 3 Н), 3.98 (д, *J* = 6.1, 2 Н), 4.07 (кв, *J* = 7.1, 2 Н), 6.36 (д, *J* = 3.6, 1 Н), 6.36 (с, 1 Н), 6.75 (т, *J* = 6.2, 1 Н), 7.80 (д, *J* = 5.7, 1 Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 14.1, 20.5, 42.6, 59.9, 108.6, 113.8, 146.8, 146.9, 158.3, 171.3; HRMS (*m/z*) найдено 195.1130 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 195.1128.

**2-((4-метилпиридин-2-ил)амино)уксусной кислоты гидрохлорид (25):**

Полученный на предыдущей стадии этил 2-((4-метилпиридин-2-ил)амино)ацетат (23.7 г, 122 ммоль) растворили в 130 мл 5 М растворе соляной кислоты и кипятили с обратным холодильником в течение 8 ч. Охлажденную до комнатной температуры реакционную массу упарили насухо, добавили 50 мл диэтилового эфира и отфильтровали, полученный осадок промыли небольшим количеством диэтилового эфира и сушили в вакууме масляного насоса.

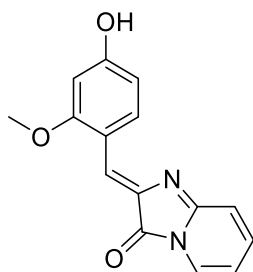
Выход 24.5 г (94%), белый порошок, т. пл. 186-187 °С с разл.; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.34 (с, 3 Н), 4.26 (с, 2 Н), 6.77 (д, *J* = 6.5, 1 Н), 6.98 (с, 1 Н), 7.84 (ушир. д, 1 Н), 8.86 (ушир. с., 1 Н), 13.84 (ушир. с., 1 Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 21.4, 43.4, 114.5, 135.0, 152.7, 169.9; HRMS (*m/z*) найдено 167.0815 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>. Вычислено 167.0815.



### Синтез циклических аналогов хромофора белка Kaede (26). Общая методика O:

Полученный на предыдущей стадии 2-((4-метилпиридин-2-ил)амино)уксусной кислоты гидрохлорид (7.5 г, 38 ммоль) или (пиридин-2-иламино)уксусной кислоты гидрохлорид (7.2 г, 38 ммоль) растворили в 75 мл  $\text{PCl}_3$  и кипятили с обратным холодильником в течение 5 ч, затем упарили насухо и остаток растворили в 70 мл пиридина. К полученному раствору добавили 4-гидрокси-2-метоксибензальдегид (4.5 г, 30 ммоль) и триэтиламин (7 мл, 50 ммоль) и перемешивали на масляной бане в течение 5 ч. Охлажденную до комнатной температуры реакционную смесь упарили насухо, добавили 200 мл метанола и полученный раствор разбавили водой, довели до pH ~5 раствором соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством воды и диэтилового эфира и сушили в вакууме. Продукт очищали методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформа и метанола в качестве элюента (50:1).

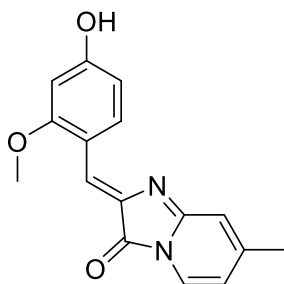
### (Z)-2-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)имидазо[1,2-а]пиридин-3(2H)-он (26a):



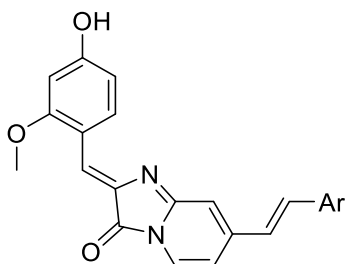
Выход 1.21 г (15%), красный порошок, т. пл.  $\sim 290$  °C с разл;  $^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  3.86 (с, 3 H), 6.37 (т,  $J = 6.3$ , 1 H), 6.47 (д,  $J = 2.3$ , 1 H), 6.53 (дд,  $J = 8.8, 2.1$ , 1 H), 6.98 (д,  $J = 9.3$ , 1 H), 7.27 (ддд,  $J = 9.4, 6.3, 1.2$ , 1 H), 7.53 (с, 1 H), 7.73 (д,  $J = 6.9$ , 1 H), 8.81 (д,  $J = 8.6$ , 1 H), 10.42 (с, 1 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  55.7, 98.7, 108.9, 109.4, 114.9, 118.5, 121.4, 126.0, 134.6, 134.7, 137.2, 154.0, 161.0, 162.5, 166.4; HRMS ( $m/z$ ) найдено 267.0775  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^+$ . Вычислено 267.0775.



**(Z)-2-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-7-метилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2*H*)-он (26b):**



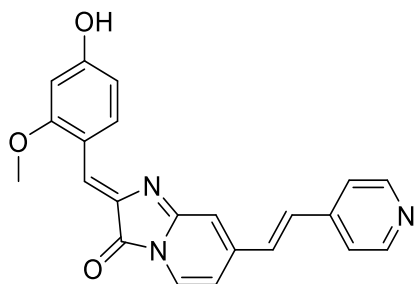
Выход 2.52 г (30%), фиолетовый порошок, т. пл. ~ 287 °С с разл; <sup>1</sup>Н ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 2.21 (с, 3 Н), 3.85 (с, 3 Н), 6.24 (дд, *J* = 7.1, 1.3, 1 Н), 6.46 (д, *J* = 2.1, 1 Н), 6.51 (дд, *J* = 8.7, 2.0, 1 Н), 6.77 (д, *J* = 1.1, 1 Н), 7.45 (с, 1 Н), 7.65 (д, *J* = 7.1, 1 Н), 8.78 (д, *J* = 8.8, 1 Н), 10.35 (ушир. с., 1 Н); <sup>13</sup>С ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 21.7, 55.6, 98.6, 108.8, 112.2, 115.0, 115.7, 120.2, 124.9, 134.4, 135.1, 148.7, 154.2, 160.7, 162.1, 166.3; HRMS (*m/z*) найдено 283.1078 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 283.1077.



**Синтез арилвинилимидазопиридинонов (27). Общая методика Р:**

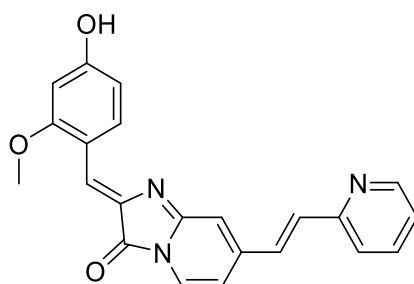
Соответствующий имидазопиридин (1 ммоль) и альдегид (1.2 ммоль) растворили в безводном 1,4-диоксане (5 мл), добавили безводный хлорид цинка (30 мг, 0.22 ммоль) и кипятили с обратным холодильником в течение 1-6 ч (контроль по ТСХ до исчезновения соответствующего имидазол-4-она). Реакционную массу упаривали насухо, остаток растворяли в 50 мл этилацетата и промывали 10 мл 0.5 % раствора ЭДТА. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали, продукт выделяли методом колоночной хроматографии, используя смесь хлороформ- этанол как элюент (19:1).

**(Z)-2-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-7-((E)-2-(пиридин-4-ил)винил)имидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он (27a):**



Синтезировано по общей методике **Р**. Выход 96 мг (26%), фиолетовый порошок, т. пл. >300 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.87 (с, 3 H), 6.48 (д, *J* = 2.0, 1 H), 6.55 (дд, *J* = 8.7, 2.0, 1 H), 6.82 (дд, *J* = 7.3, 1.1, 1 H), 7.13 (с, 1 H), 7.49 (д, *J* = 6.1, 2 H), 7.52 (с, 1 H), 7.59 (д, *J* = 6.1, 2 H), 7.78 (д, *J* = 7.3, 1 H), 8.61 (дд, *J* = 4.4, 1.5, 2 H), 8.82 (д, *J* = 8.7, 1 H), 10.46 (с, 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 55.7, 98.7, 106.3, 109.0, 115.1, 117.4, 121.2, 121.9, 125.7, 130.5, 131.4, 134.6, 135.5, 143.2, 144.0, 150.2, 153.8, 161.0, 162.6, 165.9; HRMS (*m/z*) найдено 372.1355 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 372.1343.

**(Z)-2-(4-гидрокси-2-метоксибензилиден)-7-((E)-2-(пиридин-2-ил)винил)имидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он (27b):**



Синтезировано по общей методике **Р**. Выход 82 мг (22%), фиолетовый порошок, т. пл. >300 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 3.87 (с, 3 H), 6.48 (д, *J* = 2.1, 1 H), 6.55 (дд, *J* = 8.7, 2.1, 1 H), 6.85 (дд, *J* = 7.4, 1.4, 1 H), 7.18 (с, 1 H), 7.34 (ддд, *J* = 7.4, 4.7, 1.0, 1 H), 7.51 (с, 1 H), 7.52 (д, *J* = 14.78, 1 H), 7.58 (д, *J* = 7.8, 1 H), 7.64 (д, *J* = 15.8, 1 H), 7.76 (д, *J* = 7.4, 1 H), 7.85 (тд, *J* = 7.7, 1.8, 1 H), 8.63 (д, *J* = 3.8, 1 H), 8.83 (д, *J* = 8.7, 1 H), 10.45 (ушир. с., 1 H); <sup>13</sup>C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ 55.5, 98.6, 106.4, 108.8, 115.0, 116.9, 120.9, 123.0, 123.4, 125.2, 129.4, 133.2, 134.3, 135.5, 136.7, 144.1, 149.5, 153.7, 153.8, 160.9, 162.3, 165.7; HRMS (*m/z*) найдено 372.1353 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>. Вычислено 372.1343.

### 3.3 Изучение оптических свойств

Для исследования оптических свойств небольшое известное количество каждого вещества растворяли в ДМСО. Затем с помощью нескольких последовательных разбавлений концентрированного раствора необходимым растворителем готовили растворы с концентрацией 1-20  $\mu\text{M}$  и детектировали спектры поглощения и флуоресценции.

Коэффициент молярного поглощения рассчитывался по формуле:

$$\varepsilon = \frac{A}{c\ell} \quad (1)$$

где  $A$  – значение абсорбции в максимуме,  $c$  – концентрация вещества в растворе,  $\ell$  – длина пути светового пучка в растворе.

Расчет величины квантового выхода флуоресценции проводился согласно описанной в литературе процедуре [249]. Измерения проводились при 3-4 разных концентрациях (1-20  $\mu\text{M}$ ). Расчет квантового выхода осуществлялся по формуле:

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

где  $F$  – площадь эмиссии,  $f$  фактор абсорбции,  $n$  – показатель преломления,  $\Phi$  – величина квантового выхода флуоресценции, индекс  $x$  соответствует исследуемому соединению,  $st$  – стандарту. Фактор абсорбции рассчитывался по формуле:

$$f = 1 - 10^{-A} \quad (3)$$

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

Для каждого исследуемого вещества в качестве стандарта было выбрано подходящее соединение из перечня рекомендованных флуоресцентных красителей [249].

### 3.4 Изучение взаимодействия белка FAST с флуорогенами

Для исследования флуорогенных свойств небольшое известное количество каждого вещества растворяли в ДМСО. Затем с помощью нескольких последовательных разбавлений фосфатным буфером (рН 7.4, #cat E404-200TABS, Amresco) получали два рабочих раствора. Первый – раствор исследуемого вещества с концентрацией 1  $\mu\text{M}$ . Ко второму раствору добавляли образец белка FAST до финальной концентрации вещества 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  белка. Полученные растворы помещали на 96-луночный черный планшет и с помощью планшетного ридера Tecan Infinity M200 регистрировали спектры флуоресценции. Степень усиления флуоресцентного сигнала оценивали из отношения интенсивности флуоресценции раствора, содержащего смесь вещества и белка, к интенсивности флуоресценции раствора, содержащего только исследуемое вещество. Спектры флуоресценции регистрировали при разных длин волн возбуждения – 380, 430, 480, 530, 580 и 630 нм.

Константу диссоциации комплексов флуороген-FAST определяли с помощью растворов в фосфатном буфере (рН 7.4, #cat E404-200TABS, Amresco), содержащих 0.10  $\mu\text{M}$  белка и от 0 до 20  $\mu\text{M}$  вещества. Спектры флуоресценции детектировали на 96-луночном планшетном ридере Tecan Infinity M200. Полученные экспериментальные данные обрабатывались методом *leastsq* из пакета OriginPro 8.6.

Коэффициент молярного поглощения комплексов флуороген-FAST рассчитывали по формуле, описанной выше (раздел 3.3 Изучение оптических свойств).

Величину квантового выхода флуоресценции комплексов флуороген-FAST определяли по протоколу, приведенному выше (раздел 3.3 Изучение оптических свойств). Для регистрации спектров использовали растворы в фосфатном буфере (рН 7.4, #cat E404-200TABS, Amresco), содержащие 5  $\mu\text{M}$  (поглощение) и 0.5  $\mu\text{M}$  (флуоресценция) флуорогена. В оба раствора добавляли необходимое количество белка FAST ( $\alpha > 95\%$ ).

## Выводы

1. На основе реакции *O*-алкилирования амидоацетатов тетрафторборатом триэтилоксония разработан новый метод синтеза бензилиденимидазолонов, позволяющий получать производные с разными вариантами заместителя во втором положении имидазолонового цикла.
2. Показано, что окисление при помощи диоксида селена может быть использовано для создания широкого набора замещенных бензилиденимидазолонов, отличающихся заметным батохромным смещением максимумов абсорбции и эмиссии по сравнению с исходными соединениями.
3. С помощью скрининга библиотеки веществ показано, что некоторые производные хромофоров флуоресцентных белков демонстрируют эффективное связывание с флуороген-активирующим белком FAST, сопровождающееся многократным возрастанием интенсивности флуоресценции.
4. Определены взаимосвязи между строением производных хромофоров флуоресцентных белков, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов. Предложены направления для структурной модификации флуорогенов.
5. Получена группа веществ, различающихся по своей окраске, которые могут быть использованы в роли флуорогенов белка FAST. Показано что они могут применяться во флуоресцентной микроскопии для окрашивания живых систем.

## Благодарности

Автор выражает сердечную благодарность своему научному руководителю к.х.н. Баранову Михаилу Сергеевичу за неоценимую помощь и всяческую поддержку на всех этапах работы. Также автор особо благодарит к.х.н. Балееву Надежду Сергеевну за всестороннюю помощь в проведении работы и создание чудесной рабочей атмосферы. Автор благодарит коллектив группы химии гетероциклических соединений ИБХ РАН, а в частности к.х.н. Смирнова Александра Юрьевича, Зайцеву Снежану Олеговну, Соколова Анатолия Игоревича и Зайцеву Эльвиру Романовну за помощь и советы в проведении работы. Также автор благодарит коллектив Лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов ИБХ РАН и сотрудников Группы молекулярных меток для оптической наноскопии ИБХ РАН за проведение экспериментов на живых клеточных линиях с привлечением флуоресцентной микроскопии. Автор также благодарит руководителя отдела биофотоники ИБХ РАН д.б.н., чл.-корр. РАН Лукьянова Константина Анатольевича. Автор благодарит к.х.н. Михайлова Андрея Андреевича за помощь на финальном этапе написания работы. Автор выражает благодарность коллективу Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН за регистрацию спектров ядерного магнитного резонанса, а в частности д.х.н. Минееву Константину Сергеевичу.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., **Myasnyanko I.N.**, Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. Red-shifted substrates for FAST fluorogen-activating protein based on the GFP-like chromophores // *Chem. Eur. J.* 2019. Т. 25. № 41. С. 9592-9596.
2. Sokolov A.I., **Myasnyanko I.N.**, Baleeva N.S., Baranov, M.S. Convenient and Versatile Synthetic Protocol for Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones // *ChemistrySelect.* 2020. Т. 5. № 23. С. 7000-7003.
3. Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., **Myasnyanko I.N.**, Sokolov A.I., Baranov M.S. Synthesis of 2-arylideneimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6,8(2H,5H,7H)-triones as a result of oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with selenium dioxide // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2020. Т. 56. № 1. С. 116–119.
4. **Myasnyanko I.N.**, Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov, M.S. Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein // *Chem. Eur. J.* 2020. Т. 27. № 12. С. 3986-3990.

**Тезисы докладов на конференциях**

1. **Мяснянко И.Н.**, Балеева Н.С., Баранов М.С. Новые флуорогены для белка FAST // Материалы XXXII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН – 2020. С. 22.
2. **Мяснянко И.Н.**, Балеева Н.С., Баранов М.С. Новые флуорогены для белка FAST с расширенным цветовым разнообразием // Материалы XXXIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М: ИБХ РАН – 2021. С. 85.

## Список сокращений и условных обозначений

<b>Вос</b>	трет-бутоксикарбонил
<b>CFP</b>	cyan fluorescent protein (циановый флуоресцентный белок)
<b>GFP</b>	green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)
<b>BFP</b>	blue fluorescent protein (синий флуоресцентный белок)
<b>YFP</b>	yellow fluorescent protein (желтый флуоресцентный белок)
<b>DsRed</b>	red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок)
<b>HRMS</b>	масс-спектрометрия высокого разрешения
<b>FAST</b>	Fluorescence-activating and Absorption-Shifting Tag
<b>PYP</b>	Photoactive Yellow Protein
<b>HBR</b>	4-HydroxyBenzylidene Rhodanine
<b>HPAR</b>	4-HydroxyPhenylAllylidene Rhodanine
<b>TBDMS</b>	трет-бутилдиметилсилил
<b>ТБАФ, TBAF</b>	тетра-бутиламмоний фторид
<b>TBDPS</b>	трет-бутилдифенилсилил
<b>ДБУ, DBU</b>	диазобициклоундецен
<b>ДИПЭА, DIPEA</b>	диизопропилэтиламин
<b>ДМСО, DMSO</b>	диметилсульфоксид
<b>ДМФ, DMF</b>	диметилформаид
<b>ДЦК, DCC</b>	дициклогексилкарбодиимид
<b>Имидазолон</b>	5-арилиден-3,5-дигидро-4 <i>H</i> -имидазол-4-он
<b>КВФ</b>	квантовый выход флуоресценции
<b>МС, MS</b>	молекулярные сита
<b>MW</b>	микроволновое излучение
<b>Оксазолон</b>	5-арилиден-3,5-дигидро-4 <i>H</i> -оксазол-4-он
<b>PBS</b>	фосфатный буфер
<b>ТГФ, THF</b>	тетрагидрофуран
<b>ТСХ</b>	тонкослойная хроматография
<b>ЯМР</b>	ядерный магнитный резонанс

Также применяются типичные сокращения для названий алкильных (Et, Pr и т.п.) и прочих (Bn, Ph, Ar, Ts и т.п.) радикалов.



## Список литературы

1. Griffin B.A., Adams S.R., Tsien R.Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells // *Science* (80-. ). 1998. T. 281. № 5374. C. 269–272.
2. Sahoo H. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback // *RSC Advances*. 2012. T. 2. № 18. C. 7017–7029.
3. Reche P., Perham R.N. Structure and selectivity in post-translational modification: Attaching the biotinyl-lysine and lipoyl-lysine swinging arms in multifunctional enzymes // *EMBO J*. 1999. T. 18. № 10. C. 2673–2682.
4. Slavoff S.A., Chen I., Choi Y.A., Ting A.Y. Expanding the substrate tolerance of biotin ligase through exploration of enzymes from diverse species // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 4. C. 1160–1162.
5. Uttamapinant C., White K.A., Baruah H., Thompson S., Fernández-Suárez M., Puthenveetil S., Ting A.Y. A fluorophore ligase for site-specific protein labeling inside living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. T. 107. № 24. C. 10914–10919.
6. Liu D.S., Nivón L.G., Richter F., Goldman P.J., Deerinck T.J., Yao J.Z., Richardson D., Phipps W.S., Ye A.Z., Ellisman M.H., Drennan C.L., Baker D., Ting A.Y. Computational design of a red fluorophore ligase for site-specific protein labeling in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. T. 111. № 43. C. E4551–E4559.
7. Zimmer M.H., Li B., Shahid R., Peshkepija P., Zimmer M. Structural consequences of chromophore formation and exploration of conserved lid residues amongst naturally occurring fluorescent proteins // *Chem. Phys.* 2014. T. 429. C. 5–11.
8. Lemay N.P., Morgan A.L., Archer E.J., Dickson L.A., Megley C.M., Zimmer M. The role of the tight-turn, broken hydrogen bonding, Glu222 and Arg96 in the post-translational green fluorescent protein chromophore formation // *Chem. Phys.* 2008. T. 348. № 1–3. C. 152–160.
9. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. T. 59. № 3. C. 223–239.
10. Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein // *Gene*. 1992. T. 111. № 2. C. 229–233.
11. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science* (80-. ). 1994. T. 263. № 5148. C. 802–805.
12. Inouye S., Tsuji F.I. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein // *FEBS Lett.* 1994. T. 341. № 2–3. C. 277–280.
13. Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein // *Nat. Biotechnol.* 1996. T. 14. № 10. C. 1246–1251.

14. Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Science* (80-. ). 1996. T. 273. № 5280. C. 1392–1395.
15. Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Annual Review of Biochemistry*. 1998. T. 67. C. 509–544.
16. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. T. 91. № 26. C. 12501–12504.
17. Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., Tsien R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1995. T. 20. № 11. C. 448–455.
18. Matz M. V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // *Nat. Biotechnol.* 1999. T. 17. № 10. C. 969–973.
19. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. T. 97. № 22. C. 11990–11995.
20. Mizuno H., Mal T.K., Tong K.I., Ando R., Furuta T., Ikura M., Miyawaki A. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein // *Mol. Cell.* 2003. T. 12. № 4. C. 1051–1058.
21. Remington S.J., Wachter R.M., Yarbrough D.K., Branchaud B., Anderson D.C., Kallio K., Lukyanov K.A. zFP538, a yellow-fluorescent protein from *Zoanthus*, contains a novel three-ring chromophore // *Biochemistry*. 2005. T. 44. № 1. C. 202–212.
22. Karasawa S., Araki T., Nagai T., Mizuno H., Miyawaki A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer // *Biochem. J.* 2004. T. 381. № 1. C. 307–312.
23. Tretyakova Y.A., Pakhomov A.A., Martynov V.I. Chromophore structure of the kindling fluorescent protein asFP595 from *Anemonia sulcata* // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 25. C. 7748–7749.
24. Ai H.W., Shaner N.C., Cheng Z., Tsien R.Y., Campbell R.E. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins // *Biochemistry*. 2007. T. 46. № 20. C. 5904–5910.
25. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2004. T. 22. № 12. C. 1567–1572.
26. Chudakov D.M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues // *Physiological Reviews*. 2010. T. 90. № 3. C.

- 1103–1163.
27. Hoffman R.M. Application of GFP imaging in cancer // *Lab. Investig.* 2015. T. 95. № 4. C. 432–452.
  28. Germond A., Fujita H., Ichimura T., Watanabe T.M. Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters // *Biophysical Reviews.* 2016. T. 8. № 2. C. 121–138.
  29. Ni Q., Mehta S., Zhang J. Live-cell imaging of cell signaling using genetically encoded fluorescent reporters // *FEBS Journal.* 2018. T. 285. № 2. C. 203–219.
  30. Maity D. Selected peptide-based fluorescent probes for biological applications // *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 2020. T. 16. C. 2971–2982.
  31. González-Vera J.A., Morris M.C. Fluorescent reporters and biosensors for probing the dynamic behavior of protein kinases // *Proteomes.* 2015. T. 3. № 4. C. 369–410.
  32. Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H., Johnsson K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo // *Nat. Biotechnol.* 2003. T. 21. № 1. C. 86–89.
  33. Keppler A., Pick H., Arrivoli C., Vogel H., Johnsson K. Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. T. 101. № 27. C. 9955–9959.
  34. Juillerat A., Heinis C., Sielaff I., Barnikow J., Jaccard H., Kunz B., Terskikh A., Johnsson K. Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells // *ChemBioChem.* 2005. T. 6. № 7. C. 1263–1269.
  35. Gautier A., Juillerat A., Heinis C., Corrêa I.R., Kindermann M., Beaufils F., Johnsson K. An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells // *Chem. Biol.* 2008. T. 15. № 2. C. 128–136.
  36. Janssen D.B. Evolving haloalkane dehalogenases // *Current Opinion in Chemical Biology.* 2004. T. 8. № 2. C. 150–159.
  37. Los G. V. и др. HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis // *ACS Chem. Biol.* 2008. T. 3. № 6. C. 373–382.
  38. Kumagai A., Ando R., Miyatake H., Greimel P., Kobayashi T., Hirabayashi Y., Shimogori T., Miyawaki A. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle // *Cell.* 2013. T. 153. № 7. C. 1602–1611.
  39. Shu X., Royant A., Lin M.Z., Aguilera T.A., Lev-Ram V., Steinbach P.A., Tsien R.Y. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome // *Science (80-. ).* 2009. T. 324. № 5928. C. 804–807.
  40. Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V. V. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging // *Nat. Biotechnol.* 2011. T. 29. № 8. C. 757–

- 761.
41. Auldridge M.E., Satyshur K.A., Anstrom D.M., Forest K.T. Structure-guided Engineering Enhances a Phytochrome-based Infrared Fluorescent Protein // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. № 10. C. 7000–7009.
  42. Khan F.I., Hassan F., Anwer R., Juan F., Lai D. Comparative analysis of bacteriophytochrome *agp2* and its engineered photoactivatable *nir* fluorescent proteins *pairfp1* and *pairfp2* // *Biomolecules.* 2020. T. 10. № 9. C. 1–22.
  43. Bhattacharya S., Auldridge M.E., Lehtivuori H., Ihalainen J.A., Forest K.T. Origins of fluorescence in evolved bacteriophytochromes // *J. Biol. Chem.* 2014. T. 289. № 46. C. 32144–32152.
  44. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.A., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A.J., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K. V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins // *Nat. Biotechnol.* 2008. T. 26. № 2. C. 235–240.
  45. Zhang M., Chakraborty S.K., Sampath P., Rojas J.J., Hou W., Saurabh S., Thorne S.H., Bruchez M.P., Waggoner A.S. Fluoromodule-based reporter/probes designed for in vivo fluorescence imaging // *J. Clin. Invest.* 2015. T. 125. № 10. C. 3915–3927.
  46. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N. V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I. V., Zagaynova E. V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. T. 8. № 10. C. 7138–7142.
  47. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S. Red-shifted aminated derivatives of GFP chromophore for live-cell protein labeling with lipocalins // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. T. 19. № 12.
  48. McRee D.E., Tainer J.A., Meyer T.E., Van Beeumen J., Cusanovich M.A., Getzoff E.D. Crystallographic structure of a photoreceptor protein at 2.4 Å resolution. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. T. 86. № 17. C. 6533–6537.
  49. Plamont M.A. и др. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. T. 113. № 3. C. 497–502.
  50. Li C., Plamont M.A., Sladitschek H.L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. Dynamic multicolor protein labeling in living cells // *Chem. Sci.* 2017. T. 8. № 8. C. 5598–5605.
  51. Tebo A.G., Moeyaert B., Thauvin M., Carlon-Andres I., Böken D., Volovitch M., Padilla-Parra S., Dedecker P., Vriz S., Gautier A. Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging // *Nat. Chem. Biol.* 2020. T. 17. № 1. C. 30–38.

52. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M., Volovitch M., Morin X., Vriz S., Gautier A. A Far-Red Emitting Fluorescent Chemogenetic Reporter for In Vivo Molecular Imaging // *Angew. Chemie*. 2020. T. 132. № 41. C. 18073–18079.
53. Yampolsky I. V., Remington S.J., Martynov V.I., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Synthesis and properties of the chromophore of the asFP595 chromoprotein from *Anemonia sulcata* // *Biochemistry*. 2005. T. 44. № 15. C. 5788–5793.
54. Yampolsky I. V., Balashova T.A., Lukyanov K.A. Synthesis and spectral and chemical properties of the yellow fluorescent protein zFP538 chromophore // *Biochemistry*. 2009. T. 48. № 33. C. 8077–8082.
55. Walker C.L., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V., Mishin A.S., Bommarius A.S., Duraj-Thatte A.M., Azizi B., Tolbert L.M., Solntsev K.M. Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015. T. 27. C. 64–74.
56. Frizler M., Yampolsky I. V., Baranov M.S., Stirnberg M., Gütschow M. Chemical introduction of the green fluorescence: imaging of cysteine cathepsins by an irreversibly locked GFP fluorophore // *Org. Biomol. Chem*. 2013. T. 11. № 35. C. 5913–5921.
57. Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. Red-Shifted Fluorescent Aminated Derivatives of a Conformationally Locked GFP Chromophore // *Chem. - A Eur. J*. 2014. T. 20. № 41. C. 13234–13241.
58. Youssef A.S.A., Kandeel K.A., Abou-Elmagd W.S.I., Haneen D.S.A. Action of Some Nitrogen and Carbon Nucleophils on 4-Arylidene-1,3-oxazolones // *J. Heterocycl. Chem*. 2016. T. 53. № 1. C. 175–182.
59. Abbas S.E., Gawad N.M.A., Georgey H.H., Abdullah J.H. New quinazolinone derivatives: Synthesis, anti-inflammatory and antitumor activities // *Int. J. ChemTech Res*. 2010. T. 2. № 3. C. 1560–1578.
60. Gränacher C., Gulbas G. Über Glyoxalone und Glyoxalidone II // *Helv. Chim. Acta*. 1927. T. 10. № 1. C. 819–826.
61. Sofan M.A., Abou Elmaaty T.M., Elkafafy A.K.M., Abdel Mageed A.E.M. Synthesis of novel 5-substituted imidazolinones as insecticides against cotton leaf worm (*Spodoptera littoralis*) // *J. Heterocycl. Chem*. 2020. T. 57. № 1. C. 377–389.
62. Matsumoto J., Takemori K., Ishikawa J., Nabetani Y., Fujitsuka M., Majima T., Yasuda M. Synthesis and spectroscopic analysis of benzylidene imidazolone linked to P-porphyrins through axial ligand // *Med. Chem. Res*. 2018. T. 27. № 11–12. C. 2530–2537.
63. Rani V.A., Kumari Y.B. One pot synthesis and antibacterial activity of (4Z)-4-benzylidene-1-methyl-2-styryl-1H-imidazol-5(4H)-one // *Asian J. Chem*. 2016. T. 28. № 7. C. 1975–1978.
64. Chatterjee S., Karuso P. An efficient and concise method to synthesize locked GFP chromophore

- analogues // *Tetrahedron Lett.* 2016. T. 57. № 47. C. 5197–5200.
65. Suzdalev K.F., Babakova M.N. Synthesis of Analogues of Indole Alkaloids from Sea Sponges – Aplysinopsins by the Reaction of Amines with (4Z)-4-[(1H-indol-3-yl)-methylene]-1,3-oxazol-5(4H)-ones // *J. Heterocycl. Chem.* 2016. T. 53. № 4. C. 1200–1206.
66. Badr M.Z., El-Sherief H.A.H., Tadros M.E. Studies on 2-Methyl- and 2-Phenyl-4-arylmethylene-2-imidazolin-5-ones and Related Compounds // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1982. T. 55. № 7. C. 2267–2270.
67. Rafiq S., Rajbongshi B.K., Nair N.N., Sen P., Ramanathan G. Excited State Relaxation Dynamics of Model Green Fluorescent Protein Chromophore Analogs : Evidence for Cis - Trans Isomerism // *J. Phys. Chem. A.* 2011. T. 115. № 47. C. 13733–13742.
68. Rajbongshi B.K., Nair N.N., Nethaji M., Ramanathan G. Segregation into chiral enantiomeric conformations of an achiral molecule by concomitant polymorphism // *Cryst. Growth Des.* 2012. T. 12. № 4. C. 1823–1829.
69. Bondock S., Khalifa W., Fadda A.A. Utility of 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde in the synthesis of novel heterocycles with pharmaceutical interest // *Synth. Commun.* 2006. T. 36. № 11. C. 1601–1612.
70. Abdellattif M.H. Synthesis of Some Novel Compounds of Saccharinyl Acetic Acid Containing Nucleus and Evaluation of Their Biological Activities as Antimicrobial. Oriental Journal of Chemistry, 32(1), 565–574 | 10.13005/ojc/320164 // *Orient. J. Chem.* 2016. T. 32. № 1. C. 567–574.
71. Hamama W.S., Gouda M.A., Badr M.H., Zoorob H.H. Synthesis of Some New Fused and Binary 1,3,4-Thiadiazoles as Potential Antitumor and Antioxidant Agents // *J. Heterocycl. Chem.* 2013. T. 50. № 4. C. 787–794.
72. Sadula A., Peddaboina U.R., Subhashini N.J.P. Synthesis and characterization of novel chalcone linked imidazolones as potential antimicrobial and antioxidant agents // *Med. Chem. Res.* 2015. T. 24. № 2. C. 851–859.
73. Aparna Y., Sharada L.N., Subhashini N.J.P., Sreekanth S. Synthesis, Characterization, Molecular Docking, and Antimicrobial Activity of New Arylidene-Substituted Imidazoles // *Russ. J. Gen. Chem.* 2019. T. 89. № 6. C. 1202–1208.
74. Suthakaran R., Venkaiaiah S., Kavimani P., Suganthi K. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(2-oxo-2-phenyl imidazol-1-yl)ethyl)-6,8- un / dibromo substituted-2-substituted quinazoline-(3H)-one // *Rasayan J. Chem.* 2008. T. 1. № 1. C. 22–29.
75. Naganagowda G., Thamyongkit P., Petsom A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Oxazolone , Imidazolone and Triazine Derivatives Containing Benzothiophene // *J. Korean Chem. Soc.* 2011. T. 55. № 5. C. 794–804.

76. Kalita S., Tripathy P.K. A Facile synthesis of 1, 2-disubstituted 4-arylmethylene-2-imidazolin-5-ones via 2-substituted 2-oxazolin-5-ones // *Int. J. Chem. Stud.* 2019. T. 7. № 3. C. 3655–3658.
77. Fatah S.A., Khalleefah Amhimmid W. Synthesis and Chemical Reaction of 2-Oxazoline 5-Ones Derivatives // *Int. J. Chem. Biomol. Sci.* 2019. T. 5. № 1. C. 7–18.
78. Samad M.K., Hawaiz F.E. Synthesis, characterization, antioxidant power and acute toxicity of some new azo-benzamide and azo-imidazolone derivatives with in vivo and in vitro antimicrobial evaluation // *Bioorg. Chem.* 2019. T. 85. C. 431–444.
79. Youssef A.S.A., El-Mariah F.A., Abd-Elmottaleb F.T., Hashem H.E. Reaction of 2-Phenyl-4-arylidene-1,3-oxazolones with Different Nucleophiles for Synthesis of Some New Heterocycles // *J. Heterocycl. Chem.* 2019. T. 56. № 2. C. 456–463.
80. Georgey H.H., Manhi F.M., Mahmoud W.R., Mohamed N.A., Berrino E., Supuran C.T. 1,2,4-Trisubstituted imidazolinones with dual carbonic anhydrase and p38 mitogen-activated protein kinase inhibitory activity // *Bioorg. Chem.* 2019. T. 82. C. 109–116.
81. Abdel-Galil E., Moawad E.B., El-Mekabaty A., Said G.E. Synthesis and Biological Evaluation of New Multifunctional Oxazolone Scaffolds Incorporating Phenyl Benzoate Moiety // *J. Heterocycl. Chem.* 2018. T. 55. № 5. C. 1092–1100.
82. Lamie P.F., Philoppes J.N., Rárová L. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 1,2-diaryl-4-substituted-benzylidene-5(4H)-imidazolone derivatives as cytotoxic agents and COX-2/LOX inhibitors // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2018. T. 351. № 3–4. C. 1700311.
83. El-Hady H.A., Abubshait S.A. Synthesis and anticancer evaluation of imidazolinone and benzoxazole derivatives // *Arab. J. Chem.* 2017. T. 10. C. S3725–S3731.
84. Petersen M.Å., Riber P., Andersen L.H., Nielsen M.B. Synthesis and characterization of model compounds for the neutral green fluorescent protein chromophore // *Synthesis (Stuttg)*. 2007. № 23. C. 3635–3638.
85. Dong J., Solntsev K.M., Poizat O., Tolbert L.M. The meta-green fluorescent protein chromophore // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 33. C. 10084–10085.
86. Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S. DNA mimics of red fluorescent proteins (RFP) based on G-quadruplex-confined synthetic RFP chromophores // *Nucleic Acids Res.* 2017. T. 45. № 18. C. 10380–10392.
87. Shinde D.N., Trivedi R., Vamsi Krishna N., Giribabu L., Sridhar B., Rathod B.B., Prakasham R.S. Facile synthesis, characterisation and anti-inflammatory activities of ferrocenyl ester derivatives of 4-arylidene-5-imidazolinones // *Appl. Organomet. Chem.* 2018. T. 32. № 2.
88. Lin C.Y., Romei M.G., Oltrogge L.M., Mathews I.I., Boxer S.G. Unified Model for Photophysical and Electro-Optical Properties of Green Fluorescent Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. T. 141. № 38. C. 15250–15265.

89. Chen C., Baranov M.S., Zhu L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zaitseva S.O., Yampolsky I. V., Solntsev K.M., Fang C. Designing redder and brighter fluorophores by synergistic tuning of ground and excited states // *Chem. Commun.* 2019. T. 55. № 17. C. 2537–2540.
90. Chen C., Liu W., Baranov M.S., Baleeva N.S., Yampolsky I. V., Zhu L., Wang Y., Shamir A., Solntsev K.M., Fang C. Unveiling Structural Motions of a Highly Fluorescent Superphotoacid by Locking and Fluorinating the GFP Chromophore in Solution // *J. Phys. Chem. Lett.* 2017. T. 8. № 23. C. 5921–5928.
91. Huang S., Li F., Liao C., Zheng B., Du J., Xiao D. A selective and sensitive fluorescent probe for the determination of HSA and trypsin // *Talanta.* 2017. T. 170. C. 562–568.
92. Štěpánek P., Cowie T.Y., Šafařík M., Šebestík J., Pohl R., Bouř P. Resolving Electronic Transitions in Synthetic Fluorescent Protein Chromophores by Magnetic Circular Dichroism // *ChemPhysChem.* 2016. T. 17. № 15. C. 2348–2354.
93. He X., Bell A.F., Tonge P.J. Synthesis and Spectroscopic Studies of Model Red Fluorescent Protein Chromophores // *Org. Lett.* 2002. T. 4. № 9. C. 1523–1526.
94. Chen K.Y., Cheng Y.M., Lai C.H., Hsu C.C., Ho M.L., Lee G.H., Chou P.T. Ortho green fluorescence protein synthetic chromophore; excited-state intramolecular proton transfer via a seven-membered-ring hydrogen-bonding system // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 15. C. 4534–4535.
95. Mokale S.N., Lokwani D.K., Shinde D.B. Synthesis, in-vitro reverse transcriptase inhibitory activity and docking study of some new imidazol-5-one analogs // *Med. Chem. Res.* 2014. T. 23. № 8. C. 3752–3764.
96. Eldehna W.M., Abdelrahman M.A., Nocentini A., Bua S., Al-Rashood S.T., Hassan G.S., Bonardi A., Almehizia A.A., Alkahtani H.M., Alharbi A., Gratteri P., Supuran C.T. Synthesis, biological evaluation and in silico studies with 4-benzylidene-2-phenyl-5(4H)-imidazolone-based benzenesulfonamides as novel selective carbonic anhydrase IX inhibitors endowed with anticancer activity // *Bioorg. Chem.* 2019. T. 90. C. 103102.
97. Mohamed L.W., El-Badry O., El-Ansary A.K., Ismael A. Synthesis of new imidazolones and their biological evaluation as COX-2 inhibitors // *Arch. Pharm. Res.* 2018. T. 9. № 4. C. 1029–1040.
98. Ahmed Arafa W.A., Abdel-Magied A.F. An eco-compatible access to diversified bisoxazolone and bisimidazole derivatives // *Arkivoc.* 2018. T. 2018. № 3. C. 338–352.
99. Awadallah F.M., Bua S., Mahmoud W.R., Nada H.H., Nocentini A., Supuran C.T. Inhibition studies on a panel of human carbonic anhydrases with N1-substituted secondary sulfonamides incorporating thiazolinone or imidazolone-indole tails // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018. T. 33. № 1. C. 629–638.
100. Hassanein H.H., Georgey H.H., Fouad M.A., El Kerdawy A.M., Said M.F. Synthesis and



- molecular docking of new imidazoquinazolinones as analgesic agents and selective COX-2 inhibitors // *Future Med. Chem.* 2017. T. 9. № 6. C. 553–578.
101. Abdellatif K.R.A., Abdelgawad M.A., Labib M.B., Zidan T.H. Synthesis and Biological Evaluation of New Diarylpyrazole and Triarylimidazoline Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2017. T. 350. № 8.
  102. Abdellatif K.R.A., Fadaly W.A.A. New 1,2-diaryl-4-substituted-benzylidene-5-4H-imidazolone derivatives: Design, synthesis and biological evaluation as potential anti-inflammatory and analgesic agents // *Bioorg. Chem.* 2017. T. 72. C. 123–129.
  103. Yang J.S., Huang G.J., Liu Y.H., Peng S.M. Photoisomerization of the green fluorescence protein chromophore and the meta- and para-amino analogues // *Chem. Commun.* 2008. № 11. C. 1344–1346.
  104. Huang G.J., Ho J.H., Prabhakar C., Liu Y.H., Peng S.M., Yang J.S. Site-selective hydrogen-bonding-induced fluorescence quenching of highly solvatofluorochromic GFP-like chromophores // *Org. Lett.* 2012. T. 14. № 19. C. 5034–5037.
  105. Bhatt P. V., Wadia D.N., Patel R.M., Patel P.M. Synthesis of some novel imidazolinones // *Heterocycl. Commun.* 2006. T. 12. № 1. C. 79–82.
  106. Atia A.J.K. Synthesis and antibacterial activities of new metronidazole and imidazole derivatives // *Molecules*. 2009. T. 14. № 7. C. 2431–2446.
  107. Bishnoi A., Srivastava K., Singh S., Mani Tripathi C. Facile synthesis of 3-(1-(4'-(3-chloro-2-(substituted phenyl)-4-oxoazetidin-1-yl)biphenyl-4-yl)-5-oxo-2-phenyl-1H-imidazol-4(5H)-ylidene)indolin-2-ones and 3-(1-(3-chloro-2-(substituted phenyl)-4-oxoazetidin-1-yl)-5-oxo-2-phenyl-1H-imidazol-4(5H)-ylidene) // *Eur. J. Chem.* 2011. T. 2. № 3. C. 359–364.
  108. Lee C.Y., Chen Y.C., Lin H.C., Jhong Y., Chang C.W., Tsai C.H., Kao C.L., Chien T.C. Facile synthesis of 4-arylidene-5-imidazolinones as synthetic analogs of fluorescent protein chromophore // *Tetrahedron*. 2012. T. 68. № 29. C. 5898–5907.
  109. Kuba M., Pohl R., Hocek M. Synthesis of 2'-deoxycytidine and its triphosphate bearing tryptophan-based imidazolinone fluorophore for environment sensitive fluorescent labelling of DNA // *Tetrahedron*. 2018. T. 74. № 46. C. 6621–6629.
  110. Shah P.J. SYNTHESIS OF NOVEL FUSED HETEROCYCLIC COMPOUNDS 4-BENZYLIDENE-1-(SUBSTITUED-2-BENZOTHIAZOLYL)-2-(P-NITRO)-1H-IMIDAZOL-5(4H)-ONE // *Heterocycl. Lett.* 2017. T. 7. № 2. C. 2230–9632.
  111. Kanamori T., Takamura A., Tago N., Masaki Y., Ohkubo A., Sekine M., Seio K. Fluorescence enhancement of oligodeoxynucleotides modified with green fluorescent protein chromophore mimics upon triplex formation // *Org. Biomol. Chem.* 2017. T. 15. № 5. C. 1190–1197.
  112. Desai N.C., Joshi V. V., Rajpara K.M., Makwana A.H. A new synthetic approach and in vitro

- antimicrobial evaluation of novel imidazole incorporated 4-thiazolidinone motifs // *Arab. J. Chem.* 2017. T. 10. C. S589–S599.
113. Kortiwala N., Patel J., Desai V.A. NOVEL IMIDAZOLINONES DERIVATIVES WITH DIVERSE BIOLOGICAL ACTIVITIES // *Desai al. World J. Pharm. Res.* 2016. T. 5.
114. Chavez F., Pavy C., Williamson T., Cleary T. A Practical and Efficient Synthesis of 2,5-Disubstituted-3,5-dihydro-imidazol-4-ones from Oxazolones // *Synth. Commun.* 2012. T. 42. № 22. C. 3321–3327.
115. Stafforst T., Diederichsen U. Synthesis of Alaninyl and N-(2-Aminoethyl)glycinyl Amino Acid Derivatives Containing the Green Fluorescent Protein Chromophore in Their Side Chains for Incorporation into Peptides and Peptide Nucleic Acids // *European J. Org. Chem.* 2007. T. 2007. № 6. C. 899–911.
116. Bonauer C., Walenzyk T., König B.  $\alpha,\beta$ -dehydroamino acids // *Synthesis.* 2006. T. 2006. № 1. C. 1–20.
117. Schmitz K. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Volume 1 - Origins and Synthesis of Amino Acids. Edited by Andrew B. Hughes. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2010. T. 49. № 22. C. 3717–3718.
118. Cativiela C., Garcíá J.I., Melendez E. Stereospecific Synthesis of the (Z/E)-Isomers of N-Aryl(Alkyl)-2-benzoylamino-3-aryl-2-butenecarboxamides // *Synth.* 1982. T. 1982. № 9. C. 763–765.
119. Atia A.J.K., Al-Marjani M.F., Qaban M.A. Synthesis of New Heterocyclic Compounds Derived from 3-Chlorobenzo[b]thiophene-2-carbonyl chloride // *World J. Pharm. Res.* 2015. T. 4. № 6. C. 2390–2407.
120. Sawant S.D., Barvrkar A.A., Chabukswar A.R., Sarak S.D. Molecular docking and synthesis of 8-substituted 3,4-dihydro-6-methyl-4-(2,4-dinitrophenyl)imidazo[1,5-b][1,2,4]triazin-2(8H)-one derivatives as novel antiasthmatic agents Sanjay // *J. Appl. Chem.* 2013. T. 2. № 3. C. 372–384.
121. JHamad A., Jabar Kh Atia A., Al-Marjani M.F., Abdullah S.K., AL-Bayti R.I., Batah E.H. Synthesis and anti-microbial activity of new 4-carboxylic imidazole derivatives // *J. Pharm. Sci. Res.* 2019. T. 11. № 1. C. 131–135.
122. Tu S., Zhang J., Jia R., Zhang Y., Jiang B., Shi F. A novel reaction of 4-(arylmethylene)-2-phenyloxazol-5(4H)-ones with pyridin-2-amine: Formation of 3-(arylmethyl)-3-(benzoylamino)imidazo-[1,2-a] pyridin-2(3H)-ones // *Synthesis (Stuttg).* 2007. № 4. C. 558–564.
123. Shi F., Zeng X.-N., Wu F.-Y., Yan S., Zheng W.-F., Tu S.-J. Efficient Microwave-Assisted Synthesis and Antioxidant Activity of 4-Arylidene-2-phenyl-1H-imidazol-5(4H)-ones // *J. Heterocycl. Chem.* 2012. T. 49. № 1. C. 59–63.
124. Abu-Melha S. Synthesis, antimicrobial evaluation and spectroscopic characterization of novel

- imidazolone, triazole and triazinone derivatives // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. T. 96. C. 898–905.
125. Zhou Q., Wu F., Wu M., Tian Y., Niu Z. Confined chromophores in tobacco mosaic virus to mimic green fluorescent protein // *Chem. Commun. (Camb)*. 2015. T. 51. № 82. C. 15122–15124.
  126. Wenge U., Wagenknecht H.A. Synthetic GFP chromophore and control of excited-state proton transfer in DNA: An alternative concept for fluorescent DNA labels with large apparent Stokes' shifts // *Synthesis (Stuttg)*. 2011. T. 3. C. 502–508.
  127. Rani A., Kumari B. One Pot Synthesis of (4z)-4-(Benzylidene/Substituted Benzylidene)-1n-Methyl-2-(Styryl/Substituted Styryl)-1h-Imidazol-5(4h)-One Derivatives and their Anti-Bacterial Activity Evaluation. 2018. T. 10. № 9. C. 105–110.
  128. Chandrasekhar S., Karri P. Erlenmeyer azlactone synthesis with aliphatic aldehydes under solvent-free microwave conditions // *Tetrahedron Lett.* 2007. T. 48. № 5. C. 785–786.
  129. Shaw E., McDowell J. Analogs of Aspergillilic Acid. III. Synthesis of Cyclic Hydroxamic Acids with a Five-membered Ring // *J. Am. Chem. Soc.* 1949. T. 71. № 5. C. 1691–1694.
  130. Amareshwar V., Mishra N.C., Ila H. 2-Phenyl-4-bis(Methylthio)Methyleneoxazol-5-One: Versatile Template for Diversity Oriented Synthesis of Heterocycles // *Org. Biomol. Chem.* 2011. T. 9. № 16. C. 5793–5801.
  131. Phelps D.J., Gaeta F.C.A. A convenient synthesis of glycyl-( $\beta$ -aryl)-dehydroalanines // *Synthesis (Germany)*. 1982. T. 1982. № 3. C. 234–235.
  132. Omar A.M., Abdelghany T.M., Abdel-Bakky M.S., Alahdal A.M., Radwan M.F., El-Araby M.E. Design, Synthesis and Antiproliferative Activities of Oxidative Stress Inducers Based on 2-Styryl-3,5-dihydro-4<i>i>>H<i>i>>-imidazol-4-one Scaffold // *Chem. Pharm. Bull.* 2018. T. 66. № 10. C. 967–975.
  133. Palmer D.C. Oxazoles : synthesis, reactions, and spectroscopy. 2004.
  134. Jun E.E. Ueber die Condensation der Hippursäure mit Phtalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd // *Justus Liebig's Ann. der Chemie.* 1893. T. 275. № 1. C. 1–8.
  135. Jones W.D. Aminolysis and hydrolysis of chromonyl oxazolones and some condensation reactions of 2-methylchromone leading to novel chromones // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1981. № 0. C. 344–348.
  136. Kiyama R., Honma T., Hayashi K., Ogawa M., Hara M., Fujimoto M., Fujishita T. Novel Angiotensin II Receptor Antagonists. Design, Synthesis, and in Vitro Evaluation of Dibenzo[ $\alpha$ ,d]cycloheptene and Dibenzo[b,f]oxepin Derivatives. Searching for Bioisosteres of Biphenyltetrazole Using a Three-Dimensional Search Technique // *J. Med. Chem.* 1995. T. 38. № 14. C. 2728–2741.
  137. Cornforth J., Ming-Hui D. Syntheses of 3-methylpyrrole via methyl 4-methylpyrrole-2-

- carboxylate. A thermal oxazolone-pyrone rearrangement // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1990. № 5. C. 1459–1462.
138. Cativiela C., De Villegas M.D.D., Meléndez E. On the synthesis of geometric isomers of 2-methyl (or phenyl)-4-[ $\alpha$ -arylethylidene]-5(4*H*)-oxazolones // *J. Heterocycl. Chem.* 1985. T. 22. № 6. C. 1655–1657.
139. Wang Y., Shi D., Lu Z., Dai G. A convenient synthesis of 4-arylidene-2-phenyloxazol-5-ones catalyzed by KF-alumina // *Synth. Commun.* 2000. T. 30. № 4. C. 707–712.
140. Haasbroek P.P., Oliver D.W., Carpy A.J.M. Design and synthesis of 2,4-difluorophenylpyruvic acid and of its azlactone precursor for macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity // *J. Mol. Struct.* 2004. T. 690. № 1–3. C. 89–94.
141. Kidwai M., Kumar R. A novel route to 4-arylidene-2-phenyl-5(4*h*)-oxazolones // *Org. Prep. Proced. Int.* 1998. T. 30. № 4. C. 451–453.
142. Gaset A., Gorrichon J.P. The use of ion-exchange resins in the perkin reaction for the synthesis of azlactones from aldehydes of plant origin // *Synth. Commun.* 1982. T. 12. № 1. C. 71–79.
143. El-Hashash M.A., Afify A.A., Kaddah A.M., El-Kady S.S. Synthesis of Some 2-Substituted 5-Oxo-4,5-dihydro-1,3-oxazoles and their Ring Cleavage Reactions with Aromatic Hydrocarbons // *Synth.* 1981. T. 1981. № 10. C. 798–801.
144. Kumar P., Mishra H.D., Mukerjee A.K. Condensation of 2-substituted 5-oxo-4,5-dihydro-1,3-oxazoles with imines and their corresponding carbonyl compounds // *Synth.* 1980. T. 1980. № 10. C. 836–839.
145. Takács E., Berente Z., Háda V., Mahó S., Kollár L., Skoda-Földes R. Synthesis of new steroidal derivatives by the reaction of steroid-amino acid conjugates with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. Unusual formation of steroidal imide derivatives // *Tetrahedron*. 2009. T. 65. № 24. C. 4659–4663.
146. Melhado A.D., Luparia M., Toste F.D. Au(I)-catalyzed enantioselective 1,3-dipolar cycloadditions of münchnones with electron-deficient alkenes // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. T. 129. № 42. C. 12638–12639.
147. Hashimoto M., Matsumoto M., Terashima S. Synthetic studies of carzinophilin. Part 2: Synthesis of 3,4-dibenzyloxy-2-methylidene-1-azabicyclo[3.1.0]hexane systems corresponding to the C1-C17 fragment of carzinophilin // *Tetrahedron*. 2003. T. 59. № 17. C. 3041–3062.
148. Cabaret D., Liu J., Wakselman M. An efficient synthesis of aryl phenacetates using acid catalyzed dicyclohexylcarbodiimide esterification and transient N-tert-butoxycarbonylation // *Synthesis (Stuttg)*. 1994. T. 1. № 5. C. 480–482.
149. Nestor J.J., Ho T.L., Simpson R.A., Horner B.L., Jones G.H., McRae G.I., Vickery B.H. Synthesis and Biological Activity of Some Very Hydrophobic Superagonist Analogues of Luteinizing

- Hormone-Releasing Hormone // *J. Med. Chem.* 1982. T. 25. № 7. C. 795–801.
150. Cornforth J., Ming-Hui D. 4-(2'-Hydroxyphenylmethylene)-2-phenyloxazol-5(4H)-one: A comedy of errors // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1991. № 9. C. 2183–2187.
151. Yadav L.D.S., Rai V.K., Yadav B.S. The first ionic liquid-promoted one-pot diastereoselective synthesis of 2,5-diamino-/2-amino-5-mercapto-1,3-thiazin-4-ones using masked amino/mercapto acids // *Tetrahedron.* 2009. T. 65. № 7. C. 1306–1315.
152. Conway P.A., Devine K., Paradisi F. A simple and efficient method for the synthesis of Erlenmeyer azlactones // *Tetrahedron.* 2009. T. 65. № 15. C. 2935–2938.
153. Yadav L.D.S., Singh A. Microwave activated solvent-free cascade reactions yielding highly functionalised 1,3-thiazines // *Tetrahedron Lett.* 2003. T. 44. № 30. C. 5637–5640.
154. Molina P., Tárraga A., Lidón M.J. Preparation and thermal ring-closure of  $\beta$ -aryl vinyl carbodiimides: Synthesis of isoquinoline derivatives // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1990. № 6. C. 1727–1731.
155. Molina P., Fresneda P.M., Hurtado F. Iminophosphorane-Mediated Synthesis Of 4-Hetero-Arylmethylene-2-Aryl-2-Oxazolin-5-Ones. // *Synth. Commun.* 1987. T. 17. № 4. C. 485–490.
156. Ward D.E., Vázquez A., Pedras M.S.C. Probing host-selective phytotoxicity: Synthesis and biological activity of phomalide, isophomalide, and dihydrophomalide // *J. Org. Chem.* 1999. T. 64. № 5. C. 1657–1666.
157. Mauldin S.C., Hornback W.J., Munroe J.E. Synthesis of pentenoic acid analogs as potential anti-influenza agents // *J. Chem. Soc. Perkin 1.* 2001. T. 1. № 13. C. 1554–1558.
158. Tripathy P.K., Mukerjee A.K. A facile synthesis of N-substituted 2-acylamino-2-alkenamides // *Synth.* 1985. T. 1985. № 3. C. 285–288.
159. O'Brien J.L., Niemann C. The Formation and Reactions of Certain Oxazolonium Ions // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. T. 79. № 1. C. 80–85.
160. Mustafa A., Asker W., Harhash A.H., Ali Khalifa M.E., Zayed E.M. Das Verhalten von Oxazolinonen-(5) und Thiazolinonen-(5) gegen N-Phenyl-hydroxylamin und Phenylhydrazin // *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1968. T. 713. № 1. C. 151–161.
161. Lott R.S., Breitholle E.G., Stammer C.H. Azlactone Oxidation // *Journal of Organic Chemistry.* 1980. T. 45. № 6. C. 1151–1153.
162. Inui T. Oxazolidone Derivatives of Hydroxyamino Acids. VII. Syntheses and Properties of DL-trans -3-Benzoyl-5-methyl-2-oxo-oxazolidine- 4-carboxylic Acid and Its Derivatives. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1972. T. 45. № 4. C. 1254–1256.
163. Shaw K.N.F., Mcmillan A., Gudmundson A.G., Armstrong M.D. Preparation and Properties of  $\beta$ -3-Indolyl Compounds Related to Tryptophan Metabolism // *J. Org. Chem.* 1958. T. 23. № 8. C. 1171–1178.

164. Zupet R., Tišler M. Some Transformations of Alkyl Heteroarylpyruvates // *J. Org. Chem.* 1994. T. 59. № 2. C. 507–508.
165. Manis P.A., Rathke M.W. Reaction of  $\alpha$ -Azido Esters with Lithium Ethoxide: Synthesis of Dehydroamino Esters and  $\alpha$ -Keto Esters // *J. Org. Chem.* 1980. T. 45. № 24. C. 4952–4954.
166. Stohlmeyer M.M., Tanaka H., Wandless T.J. A stereospecific elimination to form dehydroamino acids: Synthesis of the phomopsin tripeptide side chain // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. T. 121. № 25. C. 6100–6101.
167. Wulff G., Böhnke H. Synthese von N-(Arylmethylen)dehydroalaninestern // *Angew. Chemie.* 1984. T. 96. № 5. C. 362–362.
168. Sai H., Ogiku T., Ohmizu H. Stereoselective syntheses of (E)- $\alpha,\beta$ -dehydroamino acids and (E)- $\alpha,\beta$ -dehydropeptides by stereospecific dehydration with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) // *Synthesis (Stuttg.)*. 2003. № 2. C. 201–204.
169. Li K.W., Wu J., Xing W., Simon J.A. Total synthesis of the antitumor depsipeptide FR-901,228 // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. T. 118. № 30. C. 7237–7238.
170. Grim M.D., Chauhan V., Shimohigashi Y., Kolar A.J., Stammer C.H. Synthesis of Dehydrothyroliberin,  $\Delta$ ZPhe<sup>2</sup>-TRF // *J. Org. Chem.* 1981. T. 46. № 13. C. 2671–2673.
171. Enders D., Chen Z.X., Raabe G. Stereoselective synthesis of 3-substituted ethyl (Z)-4,4,4-trifluoro-2-formylamino-2-butenates // *Synthesis (Stuttg.)*. 2005. № 2. C. 306–310.
172. Nagano T., Kinoshita H. A new and convenient method for the synthesis of dehydroamino acids starting from ethyl N-Boc- and N-Z- $\alpha$ -tosylglycinates and various nitro compounds // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2000. T. 73. № 7. C. 1605–1613.
173. Xu F., Zacuto M., Yoshikawa N., Desmond R., Hoerrner S., Itoh T., Journet M., Humphrey G.R., Cowden C., Strotman N., Devine P. Asymmetric synthesis of telcagepant, a CGRP receptor antagonist for the treatment of migraine // *J. Org. Chem.* 2010. T. 75. № 22. C. 7829–7841.
174. Krause N., Hoffmann-Röder A., Canisius J. From amino acids to Dihydrofurans: Functionalized allenes in modern organic synthesis // *Synthesis*. 2002. № 12. C. 1759–1774.
175. Kimura R., Nagano T., Kinoshita H. A new synthetic method for the preparation of  $\alpha,\beta$ -didehydroamino acid derivatives by means of a Wittig-type reaction. Syntheses of (2S, 4S)- and (2R, 4R)-4-hydroxyprolines // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2002. T. 75. № 11. C. 2517–2525.
176. Devasia G.M. A new method for the synthesis of unsaturated 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones. // *Tetrahedron Lett.* 1976. T. 17. № 7. C. 571–572.
177. Wu L., Burgess K. Syntheses of Highly Fluorescent GFP-Chromophore Analogues // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 12. C. 4089–4096.
178. Brunken J., Bach G. Synthesen in der Imidazolone-Reihe // *Chem. Ber.* 1956. T. 89. № 6. C. 1363–1373.

179. Kobori A., Arai T., Sakata Y., Sugita T., Yamayoshi A., Murakami A. Photochromic DNA having fluorescent protein-inspired nucleosides // *Tetrahedron Lett.* 2018. T. 59. № 41. C. 3690–3693.
180. Chen Y.A., Meng F.Y., Hsu Y.H., Hung C.H., Chen C.L., Chung K.Y., Tang W.F., Hung W.Y., Chou P.T. N–H-Type Excited-State Proton Transfer in Compounds Possessing a Seven-Membered-Ring Intramolecular Hydrogen Bond // *Chem. - A Eur. J.* 2016. T. 22. № 41. C. 14688–14695.
181. Liu X.Y., Shi L., Ding Z., Long Y.T. New insight into the application of GFP chromophore inspired derivatives: A F- fluorescent chemodosimeter // *RSC Adv.* 2014. T. 4. № 96. C. 53557–53560.
182. Lehr H., Karlan S., Goldberg M.W. Derivatives of 4(5H)-Imidazolone // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. T. 75. № 15. C. 3640–3645.
183. Kidwai A.R., Devasia G.M. A New Method for the Synthesis of Amino Acids. Synthesis of Amino Acids and Their Derivatives through 2,4-Disubstituted 2-Imidazolin-5-ones // *J. Org. Chem.* 1962. T. 27. № 12. C. 4527–4531.
184. Shimomura O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein // *FEBS Lett.* 1979. T. 104. № 2. C. 220–222.
185. Shafi P.M., Sobha T.D., Basheer P.A.M., Waibel R. Synthesis and reactions of 4-(aminoaryl)-methylene-2-aryl-2-imidazolin-5-ones // *Indian J. Chem.* 2005. T. 44B. C. 1298–1300.
186. Ortiz Barbosa Y.A., Hart D.J., Magomedov N.A. Spiroquinazoline support studies: methods for the preparation of imidazoloindolines from oxindoles // *Tetrahedron.* 2006. T. 62. № 37. C. 8748–8754.
187. Hsu Y.-H., Chen Y.-A., Tseng H.-W., Zhang Z., Shen J.-Y., Chuang W.-T., Lin T.-C., Lee C.-S., Hung W.-Y., Hong B.-C., Liu S.-H., Chou P.-T. Locked ortho - and para -Core Chromophores of Green Fluorescent Protein; Dramatic Emission Enhancement via Structural Constraint // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. T. 136. № 33. C. 11805–11812.
188. Baldridge A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka T., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M. Inhibition of twisting of a green fluorescent protein-like chromophore by metal complexation // *Chem. Commun.* 2010. T. 46. № 31. C. 5686–5688.
189. Shen X., Huang G., Li K., Zhang G., Zhang D. Tuning the solid-state emission of the analogous GFP chromophore by varying alkyl chains in the imidazolinone ring // *Sci. China Chem.* 2013. T. 56. № 9. C. 1197–1203.
190. Zaitseva S.O., Golodukhina S. V., Baleeva N.S., Levina E.A., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Azidoacetic Acid Amides in the Synthesis of Substituted Arylidene-1-*H*-imidazol-5-(4*H*)-ones // *ChemistrySelect.* 2018. T. 3. № 30. C. 8593–8596.
191. Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Shakhov

- A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A. V. Excited-state locked amino analogues of the green fluorescent protein chromophore with a giant Stokes shift // *RSC Adv.* 2019. T. 9. № 66. C. 38730–38734.
192. Griffiths G.J., Hauck M.B., Imwinkelried R., Kohr J., Roten C.A., Stucky G.C., Gosteli J. Novel syntheses of 2-butyl-5-chloro-3H-imidazole-4-carbaldehyde: A key intermediate for the synthesis of the angiotensin II antagonist losartan // *J. Org. Chem.* 1999. T. 64. № 22. C. 8084–8089.
193. Hosmane R.S. Imidates in organic synthesis: Methyl N-cyanomethylmethanimidate // *Tetrahedron Lett.* 1984. T. 25. № 4. C. 363–366.
194. Lerestif J.M., Perrocheau J., Tonnard F., Bazureau J.P., Hamelin J. 1,3-Dipolar cycloaddition of imidate ylides on imino-alcohols: Synthesis of new imidazolones using solvent free conditions // *Tetrahedron.* 1995. T. 51. № 24. C. 6757–6774.
195. Baldrige A., Kowalik J., Tolbert L.M. Efficient synthesis of new 4-arylideneimidazolin-5-ones related to the GFP chromophore by 2+3 cyclocondensation of arylideneimines with imidate ylides // *Synthesis (Stuttg.)*. 2010. № 14. C. 2424–2436.
196. Clark T.B., Orr M.E., Flynn D.C., Goodson T. Synthesis and optical properties of two-photon absorbing GFP-type probes // *J. Phys. Chem. C.* 2011. T. 115. № 15. C. 7331–7338.
197. Baldrige A., Amador A., Tolbert L.M. Fluorescence turn on by cholate aggregates // *Langmuir.* 2011. T. 27. № 7. C. 3271–3274.
198. Baldrige A., Samanta S.R., Jayaraj N., Ramamurthy V., Tolbert L.M. Steric and Electronic Effects in Capsule-Confined Green Fluorescent Protein Chromophores // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. T. 133. № 4. C. 712–715.
199. Chatterjee T., Mandal M., Gude V., Bag P.P., Mandal P.K. Strong Electron Donation Induced Differential Nonradiative Decay Pathways for para and meta GFP Chromophore Analogues // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. T. 17. № 32. C. 20515–20521.
200. Dong J., Abulwerdi F., Baldrige A., Kowalik J., Solntsev K.M., Tolbert L.M. Isomerization in Fluorescent Protein Chromophores Involves Addition / Elimination // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. T. 130. № 43. C. 14096–14098.
201. Samanta S.R., Da Silva J.P., Baldrige A., Tolbert L.M., Ramamurthy V. A latent reaction in a model GFP chromophore revealed upon confinement: Photohydroxylation of ortho -halo benzylidene-3-methylimidazolidiones via an electrocyclization process // *Org. Lett.* 2014. T. 16. № 12. C. 3304–3307.
202. Steinmetzger C., Palanisamy N., Gore K.R., Höbartner C. A Multicolor Large Stokes Shift Fluorogen-Activating RNA Aptamer with Cationic Chromophores // *Chem. – A Eur. J.* 2019. T. 25. № 8. C. 1931–1935.
203. Singh A., Samanta D., Boro M., Maji T.K. Gfp chromophore integrated conjugated microporous



- polymers: Topological and ESPT effects on emission properties // *Chem. Commun.* 2019. T. 55. № 19. C. 2837–2840.
204. Liu Y., Wolstenholme C.H., Carter G.C., Liu H., Hu H., Grainger L.S., Miao K., Fares M., Hoelzel C.A., Yennawar H.P., Ning G., Du M., Bai L., Li X., Zhang X. Modulation of Fluorescent Protein Chromophores to Detect Protein Aggregation with Turn-On Fluorescence // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. T. 140. № 24. C. 7381–7384.
205. Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X. Emission enhancement of GFP chromophore in aggregated state via combination of self-restricted effect and supramolecular host-guest complexation // *RSC Adv.* 2017. T. 7. № 29. C. 17980–17987.
206. Tsai M.S., Ou C.L., Tsai C.J., Huang Y.C., Cheng Y.C., Sun S.S., Yang J.S. Fluorescence Enhancement of Unconstrained GFP Chromophore Analogues Based on the Push-Pull Substituent Effect // *J. Org. Chem.* 2017. T. 82. № 15. C. 8031–8039.
207. Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I. V., Baranov M.S. Bioinspired Fluorescent Dyes Based on a Conformationally Locked Chromophore of the Fluorescent Protein Kaede // *European J. Org. Chem.* 2015. T. 26. C. 5716–5721.
208. Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Gorbachev D.A., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. The Role of *N*-Substituents in Radiationless Deactivation of Aminated Derivatives of a Locked GFP Chromophore // *European J. Org. Chem.* 2017. T. 2017. № 35. C. 5219–5224.
209. Baleeva N.S., Khavroshechkina A. V., Zaitseva E.R., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Naphthalene derivatives of a conformationally locked GFP chromophore with large stokes shifts // *Tetrahedron Lett.* 2019. T. 60. № 34. C. 150963.
210. Baranov M.S., Solntsev K.M., Lukyanov K.A., Yampolsky I. V. A synthetic approach to GFP chromophore analogs from 3-azidocinnamates. Role of methyl rotors in chromophore photophysics // *Chem. Commun.* 2013. T. 49. № 51. C. 5778–5780.
211. Song W., Strack R.L., Svensen N., Jaffrey S.R. Plug-and-Play Fluorophores Extend the Spectral Properties of Spinach // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. T. 136. № 4. C. 1198–1201.
212. Wang Y., Xie H., Pan Y.-R., Ding M.-W. Facile Synthesis of 4-Arylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones by an Ugi–Aza-Wittig Sequence // *Synthesis (Stuttg.)* 2013. T. 46. № 3. C. 336–342.
213. Gong X., Yang H., Liu H., Jiang Y., Zhao Y., Fu H. Simple and efficient copper-catalyzed approach to 2,4-disubstituted imidazolones // *Org. Lett.* 2010. T. 12. № 14. C. 3128–3131.
214. Gabillet S., Loreau O., Specklin S., Rasalofonjatovo E., Taran F. A phosphine-catalyzed preparation of 4-Arylidene-5-imidazolones // *J. Org. Chem.* 2014. T. 79. № 20. C. 9894–9898.
215. Ikejiri M., Tsuchino M., Chihara Y., Yamaguchi T., Imanishi T., Obika S., Miyashita K. Design and Concise Synthesis of a Novel Type of Green Fluorescent Protein Chromophore Analogue // *Org. Lett.* 2012. T. 14. № 17. C. 4406–4409.

216. Oumouch S., Bourotte M., Schmitt M., Bourguignon J.J. An expeditious synthesis of 2,4-disubstituted 2-imidazolin-5-ones // *Synthesis (Stuttg)*. 2005. № 1. C. 25–27.
217. Gosling S., Rollin P., Tatibouët A. Thiohydantoins: Selective N- and S-functionalization for Liebeskind-Srogl reaction study // *Synthesis (Stuttg)*. 2011. № 22. C. 3649–3660.
218. Chuang W.-T., Chen B.-S., Chen K.-Y., Hsieh C.-C., Chou P.-T. Fluorescent protein red Kaede chromophore; one-step, high-yield synthesis and potential application for solar cells // *Chem. Commun.* 2009. № 45. C. 6982–6984.
219. Singh A., Ramanathan G. Red fluorescence protein chromophore inspired selective optical chemosensor for Cu<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> metal ions // *J. Lumin.* 2017. T. 182. C. 220–225.
220. Shen B., Qian Y. Red emission cysteine probe with high selectivity based on fluorescent protein chromophores and turn-on fluorescence in cell cultures // *Dye. Pigment.* 2019. T. 166. C. 350–356.
221. Jung K.H., Fares M., Grainger L.S., Wolstenholme C.H., Hou A., Liu Y., Zhang X. A SNAP-tag fluorogenic probe mimicking the chromophore of the red fluorescent protein Kaede // *Org. Biomol. Chem.* 2019. T. 17. № 7. C. 1906–1915.
222. Ramanathan G.B.S.S.A.G. Solvent free Lewis acid catalyzed vinylogous condensation // *Arkivoc.* 2006. T. 2006. № 10. C. 152.
223. Singh T.P., Devi T.J., Singh N.P., Singh O.M. GFP Chromophores from L-Phenylalanine: Synthesis, Photophysical and Thermal Properties // *ChemistrySelect.* 2018. T. 3. № 23. C. 6596–6600.
224. Singh T.P., Shunmugam R. PCl<sub>3</sub>-mediated synthesis of green/cyan fluorescent protein chromophores using amino acids // *New J. Chem.* 2016. T. 40. № 4. C. 3024–3027.
225. Tay J., Parkes M.A., Addison K., Chan Y., Zhang L., Hailes H.C., Bulman Page P.C., Meech S.R., Blancafort L., Fielding H.H. The Effect of Conjugation on the Competition between Internal Conversion and Electron Detachment: A Comparison between Green Fluorescent and Red Kaede Protein Chromophores // *J. Phys. Chem. Lett.* 2017. T. 8. № 4. C. 765–771.
226. Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core // *Dye. Pigment.* 2020. T. 177. C. 108258.
227. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes with Large Solvent-Dependent Stokes Shift // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. T. 9. № 8. C. 1958–1963.
228. Golodukhina S. V., Baleeva N.S., Mineyev K.S., Baranov M.S. Reversible condensation of 4-arylidene-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with aromatic acyl chlorides // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2015. T. 51. № 10. C. 944–947.

229. Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Mineev K.S., Khavroshechkina A. V., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Enamine–azide [2+3]-cycloaddition as a method to introduce functional groups into fluorescent dyes // *Tetrahedron Lett.* 2019. T. 60. № 5. C. 456–459.
230. Yampolsky I. V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Synthesis and properties of the red chromophore of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Kaede and its analogs // *Bioorg. Chem.* 2008. T. 36. № 2. C. 96–104.
231. Baleeva N.S., Levina E.A., Baranov M.S. Synthesis of 2-arylidene-6,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazine-3,8(2H,5H)-diones by oxidation of 4-arylidene-2-methyl-1H-imidazol-5(4H)-ones with selenium dioxide // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2017. T. 53. № 8. C. 930–933.
232. Baldrige A., Feng S., Chang Y.T., Tolbert L.M. Recapture of GFP chromophore fluorescence in a protein host // *ACS Comb. Sci.* 2011. T. 13. № 3. C. 214–217.
233. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L. V., Tolbert L.M., Yampolsky I. V., Solntsev K.M. Conformationally locked chromophores as models of excited-state proton transfer in fluorescent proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 13. C. 6025–6032.
234. Cornforth J.W., Cornforth R.H. A new synthesis of oxazoles and iminazoles including its application to the preparation of oxazole // *J. Chem. Soc.* 1947. C. 96–102.
235. Wang X., Guo Z., Zhu S., Liu Y., Shi P., Tian H., Zhu W.H. Rational design of novel near-infrared fluorescent DCM derivatives and their application in bioimaging // *J. Mater. Chem. B.* 2016. T. 4. № 27. C. 4683–4689.
236. Redon S., Eucat G., Ipuay M., Jeanneau E., Gautier-Luneau I., Ibanez A., Andraud C., Bretonnière Y. Tuning the solid-state emission of small push-pull dipolar dyes to the far-red through variation of the electron-acceptor group // *Dye. Pigment.* 2018. T. 156. C. 116–132.
237. Jadhav M.M., Patil D., Sekar N. Highly Stoke shifted near infrared (NIR) emitting donor-pi-acceptor chromophore: Synthesis and combined experimental and computational studies of photophysical properties // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2018. T. 363. C. 13–22.
238. Shank N.I., Zanotti K.J., Lanni F., Berget P.B., Armitage B.A. Enhanced photostability of genetically encodable fluoromodules based on fluorogenic cyanine dyes and a promiscuous protein partner // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. T. 131. № 36. C. 12960–12969.
239. Tan X., Constantin T.P., Sloane K.L., Waggoner A.S., Bruchez M.P., Armitage B.A. Fluoromodules Consisting of a Promiscuous RNA Aptamer and Red or Blue Fluorogenic Cyanine Dyes: Selection, Characterization, and Bioimaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. T. 139. № 26. C. 9001–9009.
240. Senutovitch N., Stanfield R.L., Bhattacharyya S., Rule G.S., Wilson I.A., Armitage B.A.,

- Waggoner A.S., Berget P.B. A variable light domain fluorogen activating protein homodimerizes to activate dimethylindole red // *Biochemistry*. 2012. T. 51. № 12. C. 2471–2485.
241. Park H., Li Y., Yu J. Utilizing Carbonyl Coordination of Native Amides for Palladium-Catalyzed C(sp<sup>3</sup>)-H Olefination // *Angew. Chemie*. 2019. T. 131. № 33. C. ange.201906075.
242. Guan M., Pang Y., Zhang J., Zhao Y. Pd-Catalyzed sequential  $\beta$ -C(sp<sup>3</sup>)-H arylation and intramolecular amination of  $\delta$ -C(sp<sup>2</sup>)-H bonds for synthesis of quinolinones: Via an N,O-bidentate directing group // *Chem. Commun.* 2016. T. 52. № 43. C. 7043–7046.
243. Hans J.J., Driver R.W., Burke S.D. Direct transacylation of 2,2,2-trihaloethyl esters with amines and alcohols using phosphorus(III) reagents for reductive fragmentation and in situ activation // *J. Org. Chem.* 2000. T. 65. № 7. C. 2114–2121.
244. Saito R., Hoshi M., Kato A., Ishikawa C., Komatsu T. Green fluorescent protein chromophore derivatives as a new class of aldose reductase inhibitors // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. T. 125. C. 965–974.
245. Knittel D. Verbesserte Synthese von  $\alpha$ -Azidozimtsäure-estern und 2H-Azirinen // *Synth.* 1985. T. 1985. № 2. C. 186–188.
246. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein // *Science (80- )*. 2011. T. 333. C. 642–646.
247. McLaughlin C., Assmann M., Parkes M.A., Woodhouse J.L., Lewin R., Hailes H.C., Worth G.A., Fielding H.H. ortho and para chromophores of green fluorescent protein: controlling electron emission and internal conversion // *Chem. Sci.* 2017. T. 8. № 2. C. 1621–1630.
248. Povarova N. V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I. V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands // *J. Mater. Chem. C*. 2016. T. 4. № 14. C. 3036–3040.
249. Würth C., Grabolle M., Pauli J., Spieles M., Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples // *Nat. Protoc.* 2013. T. 8. № 8. C. 1535–1550.