



УДК 547.782.057

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА БЕЛКА KAEDE

© 2020 г. С. О. Зайцева*, Э. Р. Зайцева*^{**, **}, А. Ю. Смирнов*^{*, #},
Н. С. Балеева*, М. С. Баранов*^{*, ***}

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9

***Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 28.08.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

Синтезировано новое производное хромофора белка Kaede (*Z*)-2-(4-метоксибензилиден)-7-фенилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2*H*)-он. Сравнение оптических свойств нового соединения и его известного аналога (5-((*Z*)-4-метоксибензилиден)-3-метил-2-((*E*)-стирил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он) показало, что максимумы поглощения и эмиссии нового соединения оказываются смещенными в более длинноволновую область благодаря увеличению сопряженной π -системы имидазолонового фрагмента молекулы.

Ключевые слова: имидазолон, хромофоры, флуоресцентные красители, зеленый флуоресцентный белок, GFP, Kaede, оптические свойства

DOI: 10.31857/S0132342320010157

Одним из важнейших современных методов исследования биологических объектов является флуоресцентная микроскопия. Активное развитие данного направления требует все возрастающего количества красителей с различными оптическими свойствами. Бензилиденимидазолон — производные хромофоров многих флуоресцентных белков, в частности зеленых флуоресцентных белков (GFP), — одних из самых распространенных и многочисленных представителей флуоресцентных белковых красителей [1]. Причиной тому являются узкие пики испускания и поглощения, небольшой размер, низкая токсичность, водорастворимость, а также простота синтеза бензилиденимидазолонов и возможность значительно изменить оптические свойства производных варьированием заместителей [2–5]. Известно, что большинство живых объектов поглощают коротковолновое излучение, в малой степени поглощают длинноволновое излучение и почти полностью пропускают

инфракрасное. Классические хромофоры GFP требуют для флуоресценции облучения фототоксичным синим или даже ультрафиолетовым светом, что ограничивает применение подобных соединений в биологических исследованиях, а потому актуальной задачей является поиск аналогов хромофора GFP со значительным батохромным сдвигом. Часто этого можно добиться увеличением размера сопряженной π -системы бензилиденимидазолонного остатка молекулы красителя. Например, бензилиденимидазолон со стирольным заместителем во втором положении имидазолонного цикла является хромофором белка Kaede (см. соединение (V), схема 1) с заметным батохромным смещением в сравнении с аналогичным хромофором GFP [6]. В частности, ранее в своих работах мы показали, что пиридиновые аналоги хромофора белка Kaede могут использоваться в качестве флуоресцентных меток в биологических объектах [7, 8]. Очевидно, что дальнейшее увеличение сопряженной π -системы приведет к смещению максимумов абсорбции и эмиссии в еще более длинноволновую область.

Сокращения: GFP — зеленый флуоресцентный белок.

Автор для связи: (тел.: +7 (905) 552-86-82; эл. почта: alexmsu@yandex.ru).

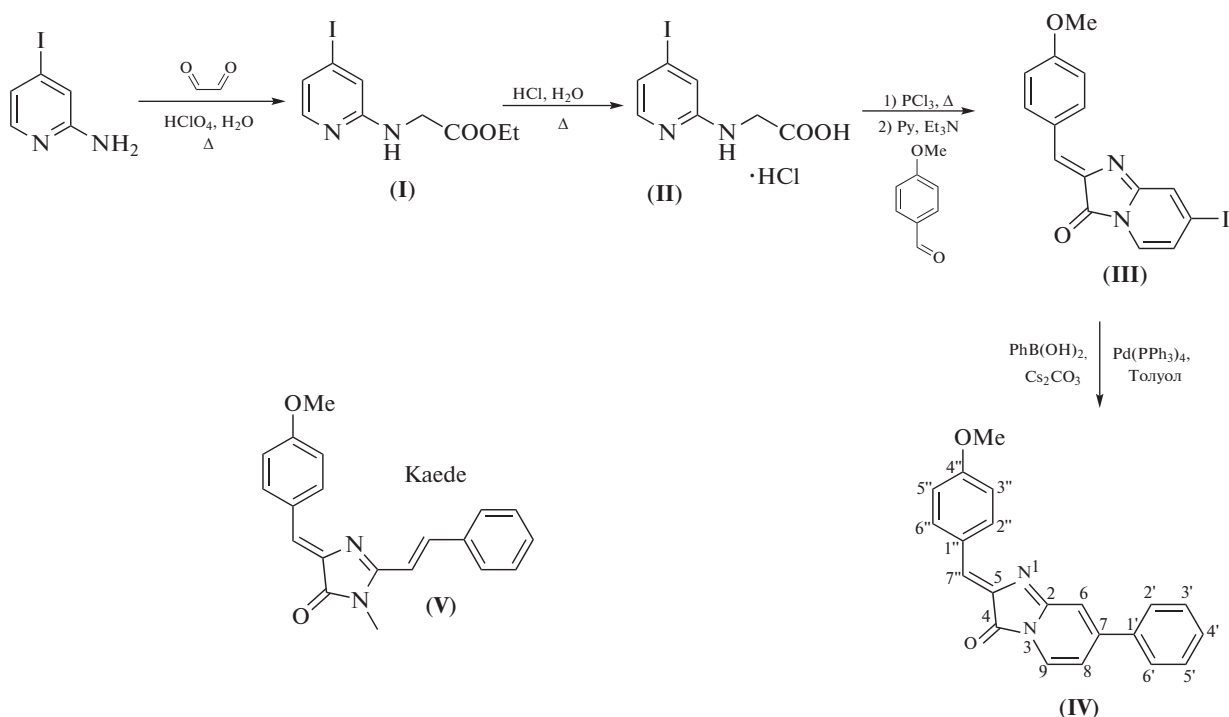


Схема 1. Схема синтеза производного (IV).

В данной работе мы решили сравнить оптические свойства классического хромофора белка Kaede с впервые синтезированным соединением (IV) малоизученного типа ауриноподобных красителей (схема 1). Известно, что подобные вещества могут быть эффективно использованы для мечения внутриклеточных объектов, а также имеют длинноволновые пики испускания и поглощения [9].

Соединение (IV) было синтезировано в соответствии с литературной методикой [10] получения йодпроизводного (III) с последующим арилированием. Сначала нами из 4-йодопиридин-2-амина был синтезирован этил-(4-йодопиридин-2-ил)глицинат (I), который затем подвергался кислотному гидролизу. Полученное соединение (II) конденсировали с анисовым альдегидом, в результате чего нами было выделено йодпроизводное (III). Затем в результате проведения стандартной реакции Сузуки-Мияуры в результате взаимодействия с фенилбороновой кислотой PhB(OH)₂ нами было синтезировано целевое соединение (IV).

Изучение оптических свойств полученного соединения (IV) (рис. 1, максимумы адсорбции и эмиссии 503 и 559 нм соответственно) в сравнении со свойствами производного (V) (максимумы адсорбции и эмиссии 424 и 540 нм соответственно) показало, что увеличение π-системы имидазольного фрагмента приводит к значительному bathochromному смещению максимумов адсорбции и эмиссии. Хотя стоксов сдвиг нового соединения оказался ниже, чем у образца сравнения, необходимо отметить, что его возбуждение при ис-

пользовании в качестве флуоресцентной метки будет требовать более длинноволнового воздействия, которое меньше поглощается биологическими объектами и обладает меньшей фототоксичностью.

Таким образом, нами был получен новый фенилимидазопиридиновый аналог хромофора Kaede. Максимумы абсорбции и эмиссии данного соединения лежат в более длинноволновой области, чем у аналогичного хромофора Kaede (V), за счет создания дополнительных сопряженных π-связей в имидазольном фрагменте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ, м.д.; J, Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 К в DMSO-d₆ (внутренний стандарт – Me₄Si). Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США); спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением. Соединение (V) было получено по литературной методике [11].

4-Йодопиридин-2-амин. 2-Аминопиридин (4.7 г, 50 ммоль) растворяли в предварительно охлажденной до комнатной температуры смеси воды (6 мл), ледяной уксусной (120 мл) и концентриро-

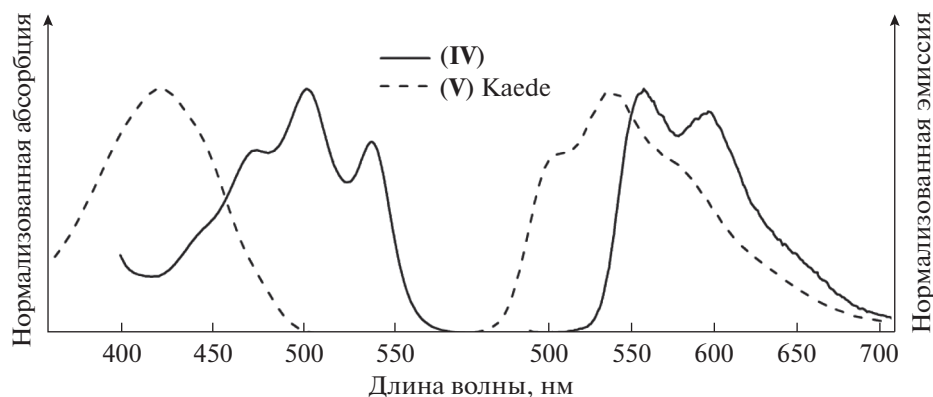


Рис. 1. Спектры поглощения и эмиссии соединений (IV) и (V) в ацетонитриле.

ванной серной кислот (1 мл). При перемешивании добавляли йод (6 г, 23.6 ммоль) и NaIO_4 (1.6 г, 7.5 ммоль). Полученную смесь выдерживали при 80°C в течение 4 ч, после чего добавляли или 200 мл 10% раствора тиосульфата натрия и экстрагировали этилацетатом (3×150 мл). Органическую фазу промывали 10% раствором гидроксида натрия (3×60 мл) и рассолом (2×50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали и очищали методом флеш-хроматографии (элюент — хлороформ—этиловый спирт, 50 : 1). Фиолетовый порошок (10.3 г, 94%); ^1H -ЯМР: 8.04 (д, J_2 2.1, 1H), 7.58 (дд, J_2 8.6, 2.2, 1H), 6.35 (д, J_2 8.6, 1H), 6.10 (уш.с., 2H).

Этил-N-(4-йодопиридин-2-ил)глицинат (I). 4-Йодопиридин-2-амин (5.50 г, 25 ммоль) растворяли в смеси хлорной кислоты (50%, 12.5 мл), воды (14 мл) и этилового спирта (28 мл), добавили глиоксаль (1.45 г, 25 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 9 ч, за прохождением реакции следили методом ТСХ в системе этилацетат—гексан, 1 : 1. По истечению указанного времени колбу охлаждали ледяной бане до 0°C , нейтрализовали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия до pH 7 и экстрагировали хлороформом (3×100 мл). Экстракт сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали и очищали методом флеш-хроматографии (элюент — хлороформ). Розовый порошок (1.76 г, 23%); т. пл. $56\text{--}59^\circ\text{C}$; ^1H -ЯМР: 8.11 (д, J_2 2.1, 1H), 7.63 (дд, J_2 8.8, 2.2, 1H), 7.19 (т, J_2 6.0, 1H), 6.50 (д, J_2 8.8, 1H), 4.07 (к, J_2 7.1, 2H), 3.97 (д, J_2 6.1, 2H), 1.17 (т, J_2 7.1, 3H); ^{13}C -ЯМР: 170.9, 157.1, 152.5, 143.9, 111.5, 76.6, 60.1, 42.4, 14.1; HRMS (ESI), m/z : найдено M , 306.9938; рассчитано для $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{IN}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 306.9938.

N-(4-Йодопиридин-2-ил)глицин гидрохлорид (II). Этил (4-йодопиридин-2-ил)глицинат (I) (1.33 г, 4.3 ммоль) растворяли в 8.5 мл 5 М соляной кислоты и кипятили 6 ч. Реакционную смесь упаривали, полученный твердый остаток промывали

диэтиловым эфиром (4×15 мл) и сушили. Белый порошок (1.02 г, 75%); т. пл. около 165°C с разложением; ^1H -ЯМР: 8.16 (с, 1H), 7.95 (д, J_2 8.4, 1H), 6.85 (д, J_2 9.0, 1H), 4.12 (с, 2H); ^{13}C -ЯМР: 170.2, 153.2, 148.9, 142.7, 114.6, 74.9, 43.4; HRMS (ESI) m/z : найдено M 278.9623; рассчитано для $\text{C}_7\text{H}_8\text{IN}_2\text{O}_2^+$, $[M - \text{Cl}]^+$ 278.9625.

(Z)-7-Йодо-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он (III). (4-Йодопиридин-2-ил)глицин гидрохлорид (II) (350 мг, 1.1 ммоль) помещали в колбу Шленка, которую вакуумировали, заполняли аргоном и затем добавляли в нее 2 мл трихлорида фосфора (22.9 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 3 ч, после чего упаривали в вакууме водоструйного насоса. К светло-голубому остатку в токе аргона добавляли анисовый альдегид (0.16 мл, 1.3 ммоль), пиридин (1.6 мл) и триэтиламин (0.45 мл). Реакционную смесь выдерживали при 80°C в течение 3 ч, а затем упаривали. Полученный остаток растворяли в хлороформе (50 мл), промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (20 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Полученный продукт был очищен флеш-хроматографией (элюент — хлороформ—гексан, 1 : 1). Красный порошок (21 мг, 5%); т. пл. около 260°C с разложением; ^1H -ЯМР: 8.29 (д, J_2 8.8, 2H), 7.99 (с, 1H), 7.42 (д, J_2 9.7 1H), 7.25 (с, 1H), 7.06 (д, J_2 8.8, 2H), 6.88 (д, J_2 9.7, 1H), 3.84 (с, 3H); ^{13}C -ЯМР: 165.2, 161.4, 153.2, 144.5, 135.8, 134.7, 130.8, 128.4, 127.3, 120.0, 114.5, 72.2, 55.4; HRMS (ESI), m/z : найдено M 378.9933; рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{IN}_2\text{O}_2^+$, $[M + \text{H}]^+$ 378.9938.

(Z)-2-(4-Метоксибензилиден)-7-фенилимидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он (IV). В колбу Шленка насыпали (Z)-7-йодо-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-он (III; 28 мг, 0.07 ммоль), фенолбороновую кислоту (12 мг, 0.10 ммоль) и карбонат цезия (120 мг, 0.37 ммоль).

Колбу вакуумировали, заполнили аргоном, в токе аргона добавляли толуол (2 мл) и Pd(PPh₃)₄ (9 мг, 0.01 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при 75°C 4 ч, затем добавляли хлористый метилен (50 мл) и промывали водой (2 × 80 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлористый метилен). Красный порошок (12 мг, 52%); т. пл. около 300°C с разложением; ¹H-ЯМР: 8.33 (д, J₂ 8.8, 2H, H2", H6"), 7.98 (д, J₂ 0.8 1H, H6), 7.75 (дд, J₂ 9.6, 1.8, 1H, H9), 7.69 (д, J₂ 7.2, 2H, H2', H6'), 7.46 (т, J₂ 7.5, 2H, H3', H5'), 7.38 (т, J₂ 7.4, 1H, H4'), 7.28 (с, 1H, H7'), 7.15 (дд, J₂ 9.6, 0.8, 1H, H8'), 7.07 (д, J₂ 8.8, 2H, H3", H5"), 3.85 (с, 3H, OCH₃); ¹³C-ЯМР: 166.5 (C4), 161.3 (C4"), 154.3 (C2), 138.0 (C7), 136.7 (C7'), 135.1 (C5), 134.6 (C1'), 129.0 (C2", C6"), 127.8 (C3', C5'), 127.8 (C2', C6'), 127.4 (C4'), 125.7 (C1"), 122.2 (C9), 122.0 (C6), 118.8 (C8), 114.5 (C3", C5"), 55.4 (OCH₃); HRMS (ESI) *m/z*: найдено *M* 329.1284; рассчитано для C₂₁H₁₇N₂O₂⁺, [*M* + H]⁺ 329.1285.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-33-00075 мол_а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 64–74.
2. Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 17980–17987.
3. Povarova N.V., Bozhanova N.G., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *J. Mater. Chem. C.* 2016. V. 4. P. 3036–3040.
4. Chen C., Baranov M.S., Zhu L., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zaitseva S.O., Yampolsky I.V., Solntsev K.M., Fang C. // *Chem. Commun.* 2019. V. 55 P. 2537–2540.
5. Feng G., Luo C., Yi H., Yuan L., Lin B., Luo X., Hu X., Wang H., Lei C., Nie Z., Yao S. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 10380–10392.
6. Yampolsky I. V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2008. V. 36. P. 96–104.
7. Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S. // *Eur. J. Org. Chem.* 2015. V. 26. P. 5716–5721.
8. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1958–1963.
9. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // *Dye. Pigment.* 2019. V. 170. P. 1075550.
10. Knott E.B. // *J. Chem. Soc.* 1956. P. 1360–1364.
11. Muselli M., Colombeau L., Hédouin J., Hoarau C., Bischoff L. // *Synlett.* 2016. V. 27. P. 2819–2825.

Synthesis and Optical Properties of the New Kaede Chromophore Analogue

S. O. Zaitseva*, E. R. Zaitseva**, A. Yu. Smirnov*., #, N. S. Baleeva*, and M. S. Baranov*, ***

#Phone: +7 (905) 552-86-82; e-mail: alexmsu@yandex.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

***Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

A novel derivative of Kaede protein chromophore was synthesised. Obtained compound showed the shift of absorption and emission maxima to the long-wavelength region in comparison with classical Kaede chromophore analogue due to increasing of the conjugated π-system in the imidazolone fragment.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent dyes, GFP, Kaede, optical properties