БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 5, с. 553–556

ПИСЬМО РЕДАКТОРУ

УДК 547.782

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНФОРМАЦИОННО-ФИКСИРОВАННЫХ ИНДОЛЬНОГО И ИНДОЛИНОВОГО ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА GFP

© 2020 г. Н. С. Балеева*, #, А. Ю. Смирнов*, И. Н. Мяснянко*, М. С. Баранов*, **

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

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

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 11.04.2020 г.
Принята к публикации 13.04.2020 г.

Синтезированы новые конформационно-фиксированные аминопроизводные хромофора GFP, содержащие индольный и индолиновый фрагменты. Изучены оптические свойства полученных соединений. Установлено, что введение индолинового фрагмента позволяет сместить максимумы поглощения и испускания в более длинноволновую область и стабилизировать величину квантового выхода флуоресценции. Введение индольного фрагмента приводит к гипсохромному сдвигу и резкому уменьшению интенсивности флуоресценции.

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

DOI: 10.31857/S0132342320050048

Изучение процессов, происходящих в живых организмах невозможно без современных методов визуализации, среди которых наибольшую популярность приобрела флуоресцентная микроскопия. Возрастающий круг задач, решаемых с помощью этого метода, требует все большего разнообразия используемых маркеров. В качестве основы для создания такого типа соединений все чаще встречаются производные хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP), так как они имеют небольшой размер, хорошо растворимы в воде, нетоксичны и характеризуются большим разнообразием оптических свойств [1–3]. Разработанные подходы к внешней или внутренней фиксации бензилиденового фрагмента этих молекул позволяют многократно увеличивать квантовый выход флуоресценции и использовать их в роли флуорогенных [4–9] или флуоресцентных [10–15] красителей.

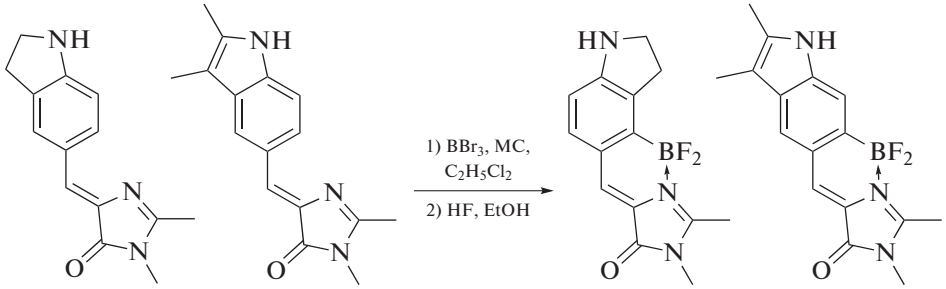
Ранее нами было показано, что замена гидроксильной группы бензилиденового фрагмента производных хромофора GFP на аминогруппу позволяет сместить положение спектральных максимумов в длинноволновую область [11–13]. Однако наличие свободных алкильных заместителей при атоме азота часто обусловливает заметное варьирование величины квантового выхода флуоресценции этих веществ в различных растворителях. Избежать этой проблемы позволяет введение разнообразных циклических групп. В частности, эффективным оказалось введение в молекулы тетра- и дигидрохинолинового фрагмента (соединения (**V**) и (**VI**), схема 1).

В данной работе мы продолжили свое исследование в этом направлении и создали похожие конформационно-фиксированные производные, содержащие индолиновый и индольный фрагменты (соединения (**III**) и (**IV**), схема 1). Эти вещества были получены по классической схеме из имидазолонов (**I**) и (**II**). Введение дифторборильной группы проводилось в дихлорэтане в присутствии трибромида бора и молекулярных сит (схема 1). Удивительным результатом оказался тот факт, что в случае соединения (**I**) борирование приводило к образованию стерически более нагруженного продукта, чего не наблюдалось ранее для соединения (**V**).

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок; МС – молекулярные сита.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

Данная работа:



Прошлые работы:

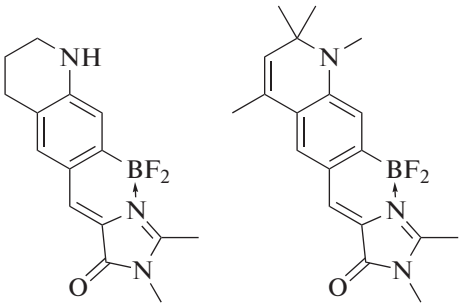


Схема 1. Схема синтеза производных (**III**) и (**IV**) и строение производных (**V**) и (**VI**).

Изучение оптических свойств полученных веществ показало, что индолиновый аналог (**III**) характеризуется заметным батохромным смещением максимумов поглощения и испускания относительно GFP и соответствующего ему хромофора, а также не отличается заметным варьированием квантового выхода флуоресценции в разных растворителях в отличие от родственных веществ с подвижными алкильными группами. Тем не менее отличия от соединения (**V**) для этого индолинового производного оказались не велики (рис. 1, табл. 1). Неожиданно было обнаружено, что полученное нами индольное производное (**IV**) и вовсе характеризуется весьма коротковолновым положением максимумов (рис. 1), более того, для него также было обнаружено резкое падение интенсивности эмиссии – квантовый выход флуоресценции снизился до ~1% во всех растворителях.

Таким образом, можно заключить, что индолиновое производное фиксированного хромофора GFP может быть использовано в качестве основы для новых флуоресцентных красителей и сенсоров, в то время как введение индольного фрагмента в подобные красители представляется нецелесообразным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 K в DMSO-d_6 (внутренний стандарт – Me_4Si). 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.

***Z*-5-(Аминобензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4оны.** Соответствующий ароматический альдегид (5 ммоль) растворяли в хлороформе (25 мл), к полученному раствору добавляли раствор метиламина (40% водный, 2 мл), каталитическое количество пирролидина (0.05 ммоль) и безводный Na_2SO_4 (5 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч, после чего отфильтровывали, дополнительно сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. К полученному остатку добавляли этил(метоксиэтилиден)амино ацетат и выдерживали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали методом колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–этиловый спирт, 50 : 1).

***Z*-5-(Индолин-5-илметилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4он (I).** Желтый порошок

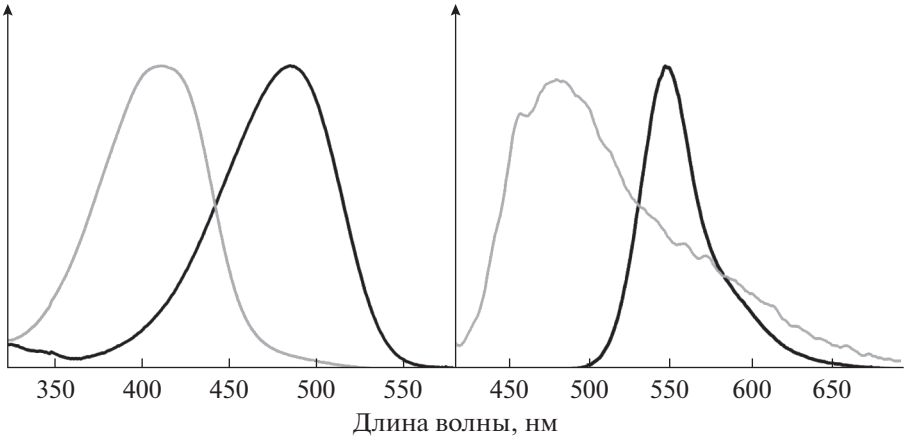


Рис. 1. Нормализованные спектры поглощения (слева) и испускания (справа) соединений (**III**) (черный) и (**IV**) (серый) в ацетонитриле.

(0.73 г, 60%); т. пл. 221–224°C; ^{1}H-ЯМР: 8.03 (с, 1H), 7.70 (д, J_2 8.0, 1H), 6.81 (с, 1H), 6.48 (д, J_2 8.2, 1H), 6.40 (с, 1H), 3.54 (т, J_2 8.6, 2H), 3.07 (с, 3H), 2.98 (т, J_2 8.5, 2H), 2.30 (с, 3H); ^{13}C-ЯМР: 169.6, 159.7, 154.9, 134.0, 133.8, 129.2, 128.0, 127.0, 122.7, 107.1, 46.2, 28.2, 26.1, 15.1; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 242.1295; рассчитано для $C_{14}H_{16}N_3O^+$, $[M + H]^+$ 242.1288.

***Z*-5-((2,3-Диметил-1*H*-индол-5-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4он (II).** Желтый порошок (1.23 г, 92%); т. пл. 294–297°C; ^{1}H-ЯМР: 10.93 (с, 1H), 8.17 (с, 1H), 8.06 (д, J_2 8.4, 1H), 7.27 (д, J_2 8.4, 1H), 7.06 (с, 1H), 3.10 (с, 3H), 2.35 (с, 3H), 2.31 (с, 3H), 2.18 (с, 3H); ^{13}C-ЯМР: 169.9, 161.3, 136.3, 135.7, 132.6, 129.2, 128.1, 124.5, 124.4, 123.1, 110.5, 106.3, 26.1, 15.2, 11.1, 8.2; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 268.1449; рассчитано для $C_{16}H_{18}N_3O^+$, $[M + H]^+$ 268.1444.

***Z*-5-((Дифторборанил)аминобензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4оны.** Соответствующий имидазолон (2 ммоль) растворяли в дихлорэтане (100 мл), к полученному раствору добавляли молекулярные сита (8 г 3Å и 8 г Å) и трибромид бора (8 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 3 часов (для соединения **II** перемешивали при комнатной температуре в течение 96 ч). Полученную смесь охлаждали и фильтровали, сита промывали этиловым спиртом (2 × 10 мл). К полученному фильтрату добавляли раствор плавиковой кислоты (40% водный, 4 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), промывали водным раствором карбоната калия (5%, 2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2 × 50 мл). Полученный раствор сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали методом колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–этиловый спирт, 50 : 1).

***Z*-5-((4-(Дифторборанил)индолин-5-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4он (III).** Оранжевый порошок (0.1 г, 18%); т. пл. около 300°C с разложением; ^{1}H-ЯМР: 7.41 (с, 1H), 7.25 (д, J_2 8.1, 1H), 6.98 (с, 1H), 6.41 (д, J_2 8.1, 1H), 3.61 (т, J_2 8.6, 2H), 3.21 (с, 3H), 3.05 (т, J_2 8.6, 2H), 2.67(с, 3H); ^{13}C-ЯМР: 161.9, 159.8, 156.8, 135.4, 133.1, 130.6, 122.8, 120.5, 106.4, 46.1, 27.6, 26.2, 12.5; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 290.1277; рассчитано для $C_{14}H_{15}BF_2N_2O^+$, $[M + H]^+$ 290.1271.

***Z*-5-((6-(Дифторборанил)-2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)метилен)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4он (IV).** Оранжевый порошок (0.06 г, 10%); т. пл. около 300°C с разложением; ^{1}H-ЯМР: 11.18 (с, 1H), 7.82 (с, 1H), 7.72 (с, 1H), 7.48 (с, 1H),

Таблица 1. Оптические свойства соединений (**III**), (**IV**), (**V**) и (**VI**) в ацетонитриле

Соединение	Максимум поглощения	Максимум эмиссии	Коэффициент молярного поглощения	Квантовый выход флуоресценции
(**III**)	486	549	39000	59%
(**IV**)	412	480	30000	1%
(**V**)	487	547	44000	67%
(**VI**)	515	595	35000	57%

3.23 (с, 3H), 2.73 (с, 3H), 2.50 (с, 1H), 2.25 (с, 1H); ^{13}C-ЯМР: 163.6, 162.7, 138.7, 132.9, 131.6, 128.2, 124.5, 124.0, 114.3, 109.4, 106.6, 26.4, 15.0, 12.8, 8.2; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 316.1429; рассчитано для $C_{16}H_{17}BF_2N_3O^+$, $[M + H]^+$ 316.1427.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-03-00094_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. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.002
2. *Baleeva N.S., Baranov M.S.* // Chem. Heterocycl. Compd. 2016. V. 52. P. 444–446. https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4
3. *Yampolsky I.V., Kislukhin A.A., Amatov T.T., Shcherbo D., Potapov V.K., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Bioorg. Chem. 2008. V. 36. P. 96–104. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2007
4. *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. https://doi.org/10.1093/nar/gkx803
5. *Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R.* // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 16299–16308. https://doi.org/10.1021/ja508478x
6. *Ge S., Deng H., Su Y., Zhu X.* // RSC Adv. 2017. V. 7. P. 17980–17987. https://doi.org/10.1039/C7RA00974G
7. *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. Communs. 2019. V. 55. P. 2537–2540. https://doi.org/10.1039/C8CC10007A
8. *Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R.* // Science. 2011. V. 333. P. 642–646. https://doi.org/10.1126/science.1207339
9. *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.* // Chem. – A Eur. J. 2019. V. 25. P. 9592–9596. https://doi.org/10.1002/chem.201901151
10. *Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Yu., Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A.V.* // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 38730–38734. https://doi.org/10.1039/C9RA08808C
11. *Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V, Baranov M.S.* // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 2015. P. 5716–5721. https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721
12. *Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Gorbachev D.A., Zagudaylova M.B., Baranov M.S.* // Eur. J. Org. Chem. 2017. V. 35. P. 5219–5224. https://doi.org/10.1002/ejoc.201700805
13. *Baranov M.S., Solntsev K.M., Baleeva N.S., Mishin A.S., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V.* // Chem. Eur. J. 2014. V. 20. P. 13234–13241. https://doi.org/10.1002/chem.201403678
14. *Wu L., Burgess K.* // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 4089–4096. https://doi.org/10.1021/ja710388h
15. *Baldridge A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka N., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M.* // Chem. Comm. 2010. V. 46. P. 5686–5688. https://doi.org/10.1039/B927313A

Synthesis and Optical Properties of the Conformationally Locked Indole and Indoline Derivatives of GFP Chromophore

N. S. Baleeva*, #, A. Yu. Smirnov*, I. N. Myasnyanko*, and M. S. Baranov*, **

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

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

We report novel conformationally locked GFP chromophore amino-derivatives containing indole and indoline moieties. Optical properties of the obtained compounds were studied. The introduce of the indoline group allows to shift the absorption and emission maxima to the long-wavelength region and stabilize the quantum yield of fluorescence. The introduce of the indole group leads to hypsochromic shift and noticeable decrease of fluorescence intensity.

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