

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 542.85:547.816.8

НОВЫЕ МЕТКИ И ЗОНДЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ
ЗАДАЧ БИОНАНОФОТОНИКИ

© 2019 г. О. В. Демина¹, Н. Е. Беликов¹, И. А. Мельникова¹,
А. Ю. Лукин², С. Д. Варфоломеев¹, А. А. Ходонов^{1*}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

*E-mail: khodonov@gmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2019;

после доработки 05.06.2019;

принята в печать 20.06.2019

Кратко рассмотрены перспективы и принципы создания новых типов меток и зондов для бионанофотоники, их методы получения и процедуры маркирования мишеней различной природы.

Ключевые слова: фотохромные метки и зонды, мишени, процедуры маркирования.

DOI: 10.1134/S0207401X19120057

При исследованиях механизмов действия небольших биологически активных молекул-лигандов (как природного, так и синтетического происхождения) центральное место занимает природа процесса взаимодействия низкомолекулярного лиганда со своим специфичным рецептором-мишенью (ферментом, GPCR, ядерным рецептором или определенными сайтами последовательностей нуклеиновых кислот). Неоценимую помощь при определении как места связывания, так и степени его эффективности оказывает ставший на сегодняшний день стандартным прием – введение в молекулу лиганда меток или маркеров различного рода и анализ процесса связывания с генерированием определенного физического сигнала, пропорционального количеству связанного меченого лиганда.

Основные типы меток и маркеров, применяемых для проведения биомедицинских исследований, можно разделить на две большие группы: радиоактивные (³H-, ¹⁴C- и ³²P-изотопы) и нерадиоактивные. Среди последней группы можно также выделить следующие типы меток: стабильные (нерадиоактивные) изотопы (²H-, ¹³C-, ¹⁵N-, ¹⁹F-изотопы и др.); хромогенные, флуоресцентные, спиновые, электроноплотные и фотохромные.

В настоящее время метки второй группы постепенно вытесняют радиоизотопные по ряду следующих причин: безопасность использования, высокая стоимость и проблемы с хранением и стабильностью меток первой группы. Различают также метки и зонды. Метки пассивно измеряют содержание или месторасположение в объекте исследования той молекулы, к которой они при-

креплены. Зонды предназначены для тестирования свойств ближнего окружения, конформационных изменений, полярности мембранных систем, присутствия ионов металлов или других агентов и веществ.

Разработан целый ряд физических и спектральных методов для измерения и анализа уровня аналитического сигнала. Для первой группы меток – это измерение уровня радиоактивности, а для других типов – измерение поглощения в определенном спектральном диапазоне, индукция или гашение флуоресценции или хемилюминесценции, измерение вида и параметров ЭПР- и ЯМР-спектров. Развитие и совершенствование существующих аналитических систем с использованием меченых субстратов позволяют на сегодняшний день проводить надежное определение содержания метки в системе в диапазонах концентраций от 10⁻⁶–до 10⁻¹⁵ моля. Термин “фотохромные метки” был впервые предложен проф. Г. Лихтенштейном в 80-х годах [1].

Дизайн и разработка эффективных методов получения новых гибридных молекулярных структур и систем, содержащих фрагменты фотохромов в качестве активного рабочего элемента, характеристики которых существенно изменяются под действием света, представляют особый интерес для бионанофотоники и наномедицины. Перспективный способ разработки таких гибридных фотоактивных и фотоуправляемых систем и материалов заключается в ковалентном связывании фотохромных меток с помощью ковалентной “иммобилизации” на различных субстратах, на-

пример полимерах, липидах, белках и квантовых точках. Для реализации этой процедуры необходима разработка нового поколения фотохромных меток и зондов, содержащих заместители с соответствующими типами функциональных групп.

В качестве исходных соединений для синтеза фотохромных меток и зондов нами были выбраны производные спиропиранов, молекулы которых было необходимо модифицировать для придания им способности к ковалентному или нековалентному (лиганд-специфичному) взаимодействию с различными типами мишеней путем введения в определенное положение разнообразных реакционноспособных терминальных групп или молекулярных адресов. Дополнительным преимуществом фотохромных меток на основе спиропиранов является то обстоятельство, что они обладают бинарным набором двух разных типов аналитических сигналов (поглощение в области 560–600 нм и индукция флуоресценции у фотоиндуцированной мероцианиновой формы). Индолиновые спиробензопираны – один из наиболее изученных и перспективных классов фотохромных соединений. Спектральные свойства и параметры их фотопревращения сильно зависят от имеющихся в молекуле заместителей таким образом, что направленное изменение их природы позволяет проводить поиск новых фотохромов с заданными свойствами и различными стимул-реагирующими структурными элементами. Структура потенциальных целевых мишеней определяет природу реакционноспособной якорной группы. В настоящее время достигнут существенный прогресс в синтезе и изучении свойств полифункциональных фотохромных органических соединений из класса спиропиранов [2–8]. Для последних ранее были известны работы по модификации уже готового исходного фотохромного звена, но структурное разнообразие молекул было ограничено и создавалось в основном путем введения соответствующего амфифильного спейсера по атому азота индолинового фрагмента кватернизацией галогенпроизводным с различной структурой. Для создания молекул фотохромных меток с заданными спектральными и фотохимическими параметрами также необходимо введение дополнительного электроакцепторного заместителя (EWG), например нитрогруппы по 6-положению молекулы.

В 2019 г. исполнилось 14 лет с начала “эры оптогенетики” (нейробиофотоники) – использования генетически кодируемых фоточувствительных белков для регуляции активности клеток человека и животных. Особенности этой технологии открывают новое направление для получения фотопереключаемых фотоактивных компонентов для оптогенетики на основе микробных родопсинов и других фоточувствительных белков с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами. Особые перспективы подобные системы маркирования имеют при за-

мене пока еще широко применяемых радиоактивных меток на более безопасные фотохромные; при разработке целого ряда прототипов технических смарт-устройств на основе меченых белков в бионанофотонике и сенсорных технологиях; при использовании в качестве средств визуализации различных бионанообъектов в реальном времени и в многопараметрических (многоцветных) системах, а также в качестве фотоуправляемых средств контроля строения и функции бионанообъектов (фотохромные сшивки, многопараметрические протоколы гибридизации нуклеиновых кислот, фотоуправляемые средства доставки биологически активных соединений и др.) [см. 2, 5, 6, 9–11].

Нами впервые был проведен достаточно широкий поиск оригинальных фотохромных систем с новыми функциональными возможностями и были разработаны оригинальные эффективные методы синтеза и модификации компонентов для получения целевых фотоактивных меток. Ранее нами были изучены процесс формилирования спиробензопиранов в условиях реакции Даффа и влияние различных заместителей в пирановом цикле на ее региоселективность. Было обнаружено, что формилирование по Даффу фотохромных спиропиранов, обладающих электроакцепторными заместителями в пирановой части молекулы (R: 6-NO₂, 8-NO₂, 6-CHO, 6-CO₂Et, 6-CO₂H), проходит в основном по C5'-положению индолинового фрагмента. Таким образом, нами был разработан новый метод синтеза серии ключевых карбонильных предшественников прямым формилированием 6-нитроспиропирана или его производных в одну стадию в условиях реакции Даффа [12, 13]. Далее нами был исследован и существенно расширен потенциал синтетического применения 6-нитро-5'-формилспиропирана для направленной модификации молекулы фотохрома по C5'-положению с использованием набора хорошо известных реакций: олефинирования по Виттигу и Хорнеру–Эммонсу; нуклеофильного присоединения по карбонильной группе реагентами, обладающими активной метиленовой или метиленовой группами; восстановительного аминирования; реакции [3+2]-циклоприсоединения, восстановления и последующей этерификации и других [12–17] (см. рис. 1).

В результате данного исследования нами был разработан ряд методов синтеза новых производных 5'-замещенных спиробензопиранов, содержащих заданные целевые реакционноспособные якорные группы с помощью прямых процедур введения заместителей [12–24]. Выбор целевой реакционноспособной группы определялся типом и природой целевой мишени. Были использованы следующие варианты процедуры конъюгации:

а) для белков-мишеней: ковалентное связывание молекулы зонда с целевым сайтом связывания по принципу самораспознавания (бактериородопсин): на-

пиранов и было проведено изучение процесса их связывания с рецепторами мембраны тромбоцитов человека [25–27];

в) ковалентное связывание молекулы метки с неорганической наноразмерной мишенью с помощью селективной терминальной реакционноспособной группы: для специфичного связывания с мишенью — квантовыми точками CdSe были использованы различные производные терминальных моно- и дитиолов и изучены различные варианты линкеров для их введения в молекулы целевых фотохромов;

г) ковалентное связывание молекулы метки с мишенью с помощью селективной терминальной реакционноспособной группы: для специфичного связывания с мишенью — сульфгидрильными группами остатков Cys белков была синтезирована серия фотохромных спиропиранов с малеинимидным фрагментом в молекуле [16];

д) ковалентное связывание молекулы зонда с мишенью с помощью терминальной реакционноспособной группы: для маркирования разнообразных органических молекул нами был разработан и использован целый набор оригинальных синтетических методов и подходов [14, 15, 17].

Работа была частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 16-03-00571а и № 17-04-01326а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Likhtenshtein G.I.* // Biophysical Labeling Methods in Molecular Biology. Cambridge University Press, 1993.
2. *Звездин К.В., Беликов Н.Е., Лантев А.В. и др.* // Рос. нанотехнологии. 2012. Т. 7. № 5–6. С. 112.
3. Photochromism. Molecules and Systems / Eds. Dürr H., Bouas-Laurent H. London: Elsevier Science, 2003.
4. Organic photochromic and thermochromic compounds / Eds. Crano J.C., Guglielmetti R.J. New York: Kluwer Acad. Publ., 2002.
5. Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function (Neuromethods. V. 55) / Eds. Chambers J.J., Kramer R.H. Humana Press, 2011.
6. *Parazoglou E.S., Parthasarathy A.* // Bionanotechnology. San Rafael, USA: Morgan&Claypool Publishers, 2007.
7. *Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Коган В.А. и др.* // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 6. С. 18.
8. *Винтер О.А., Вендиктова О.В., Кольцова Л.С. и др.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 12. С. 3.
9. Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs / Eds. Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V., Chupin V.V. Database ver. 1.0, 2017; <https://cnmmipt.ru/bacteriorhodopsin-analogs.html>
10. *Belikov N.E., Demina O.V., Melnikova I.A. et al.* // Mendeleev Commun. 2018. V. 28. № 4. P. 406.
11. *Belikov N.E., Melnikova I.A., Demina O.V. et al.* // J. Bioenerg. Biomembr. 2018. P. 60.
12. *Лантев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е. и др.* 5-Формил-замещенные индолиновые спиробензопираны и способ их получения. Патент РФ 2358977 // Б.И. 2009. № 17.
13. *Лантев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е. и др.* Фотохромные производные 5'-винил-6-нитроспиробензопирана и способы их получения. Патент РФ 2458927 // Б.И. 2012. № 23.
14. *Laptev A.V., Pugachev D.E., Lukin A.Yu. et al.* // Mendeleev Commun. 2013. V. 23. № 4. P. 199.
15. *Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E. et al.* // Ibid. 2013. V. 23. № 3. P. 145.
16. *Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E. et al.* // Ibid. 2014. V. 24. № 4. P. 245.
17. *Лантев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 9. С. 2026.
18. *Лантев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю. и др.* // Био-орган. химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 276.
19. *Лантев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю. и др.* // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. № 7. С. 102.
20. *Belikov N., Lukin A., Laptev A. et al.* // J. Photochem. Photobiol., A. 2008. V. 196. № 2–3. P. 262.
21. *Ходонов А.А., Лантев А.В., Лукин А.Ю. и др.* // Вестн. МИТХТ. 2011. Т. 6. № 2. С. 15.
22. *Laptev A., Lukin A., Belikov N. et al.* // J. Photochem. Photobiol., A. 2011. V. 222. № 1. P. 16.
23. *Varachevsky V.A., Khodonov A.A., Belikov N.E. et al.* // Dyes Pigm. 2012. V. 92. P. 831.
24. *Levin P.P., Tatikolov A.S., Laptev A.V. et al.* // J. Photochem. Photobiol., A. 2012. V. 231. P. 41.
25. *Демина О.В., Беликов Н.Е., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 2018. № 5. С. 866.
26. *Демина О.В., Ходонов А.А., Синауридзе Е.И., Швец В.И., Варфоломеев С.Д.* // Там же. 2014. № 9. С. 2092.
27. *Демина О.В., Беликов Н.Е., Варфоломеев С.Д., Швец В.И., Ходонов А.А.* 5-Алкил-3-(пирид-3-ил)изоксазолы и их 4,5-дигидропроизводные, обладающие антиагрегационной активностью. Патент РФ № 2565754 // Б.И. 2015. № 29.