

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

На правах рукописи

Баранов Михаил Сергеевич

**Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители
на его основе**

специальность – 02.00.10 – «биоорганическая химия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2013

Работа выполнена в Группе синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук Ямпольский Илья Викторович

Официальные оппоненты:

Юровская Марина Абрамовна, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории биологически активных органических соединений, кафедры органической химии, химического факультета ФГБОУ ВПО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Безуглов Владимир Виленович, доктор химических наук, профессор, заведующий Лабораторией оксипиринов ФГБУН Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Защита состоится 19 июня 2013 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при ФГБУН Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, по адресу: 117997, Москва В-437, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук**

В.А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Современные технологии флуоресцентной микроскопии позволили визуализировать многие биологические процессы. Одним из важнейших инструментов подобных исследований, применимых как для прикладных биомедицинских анализов, так и для научных задач, являются флуоресцентные красители, дающие возможность проводить наблюдение за целевыми молекулами и средами в режиме реального времени.

Использование живых систем наложило множество дополнительных ограничений на строение подобных веществ. Такие красители должны быть достаточно гидрофильны (для исключения неспецифических гидрофобных взаимодействий), их спектр поглощения и испускания должен лежать в видимой, по возможности более красной области (для уменьшения фототоксичности и фоновой автофлуоресценции), а молекулярный вес должен быть наименьшим (для уменьшения влияния на меченые биомолекулы).

Очевидно, что не существует веществ, идеально удовлетворяющих всем этим условиям. В связи с этим, важной задачей, стоящей перед современными химиками является разработка новых флуоресцентных красителей.

Одним из потенциальных претендентов на эту роль является хромофор зеленого флуоресцентного белка (GFP). Это соединение обладает достаточно высоким коэффициентом молярного поглощения, а также имеет небольшую молекулярную массу и высокую гидрофильность. Однако, в отличие от флуоресцентных белков, синтетический хромофор GFP совершенно лишен флуоресцентных свойств.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было выявление взаимосвязи между строением и флуоресцентными свойствами ряда аналогов хромофора зеленого флуоресцентного белка, а также синтез новых высокофлуоресцентных производных хромофора GFP и создание серии флуоресцентных красителей на их основе.

В рамках поставленной цели были сформулированы задачи:

- Разработать эффективный метод синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов, имеющих различные алкильные заместители во втором положении имидазолонового ядра.
- С использованием этого метода синтезировать ряд соединений, на примере которых выявить зависимость между природой заместителя во втором положении имидазолонового ядра и величиной квантового выхода флуоресценции.
- Предложить близкие структурные аналоги хромофора GFP с фиксированным бензилиденовым фрагментом, а также разработать методы их синтеза.
- Синтезировать серию аналогов хромофора GFP с фиксированным бензилиденовым фрагментом и изучить их физико-химические свойства.
- На основе полученных данных выявить соединения, наиболее перспективные в роли флуоресцентных красителей, и предложить методы

создания их производных, содержащих функциональные группы, позволяющие проводить конъюгацию с биомолекулами.

- Синтезировать ряд высокофлуоресцентных аналогов хромофора GFP, содержащих функциональные группы для конъюгации с биомолекулами, и показать возможность их использования в роли флуоресцентных маркеров.

Научная новизна и практическая ценность работы. Разработаны и синтезированы новые высокофлуоресцентные борированные аналоги хромофора GFP. Впервые показано ключевое влияние подвижности бензилиденового фрагмента на его флуоресцентные свойства. Синтезирован ряд новых флуоресцентных красителей с различными спектральными характеристиками. Получены производные новых красителей, содержащие функциональные группы, позволяющие проводить конъюгацию с биомолекулами, показана перспективность их применения в роли флуоресцентных маркеров.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Подвижность бензилиденового фрагмента оказывает доминирующее влияние на флуоресцентные свойства хромофора GFP.
- Новые высокофлуоресцентные аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка – 5-(2-(дифторборил)-арилиден)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-оны могут использоваться в качестве флуоресцентных маркеров.

Апробация полученных данных и публикации. Основные материалы диссертации были доложены на школе-конференции молодых ученых “Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2011” (Москва, 2011), а также на XX международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, 2013). По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 161 странице и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 288 ссылок. Диссертация содержит 13 рисунков, 122 схемы и 21 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор. Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию строения и свойств большинства структурных классов современных флуоресцентных красителей. Во втором разделе изложены методы синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов (имидазолонов) – структурной основы хромофоров флуоресцентных белков.

Экспериментальная часть. Экспериментальная часть представлена во второй главе диссертации и включает в себя описание методов синтеза веществ представленных в настоящей работе.

Подходы к созданию флуоресцентных аналогов хромофора GFP

За спектральные свойства зеленого флуоресцентного белка (GFP) отвечает структура 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов (Схема 1):

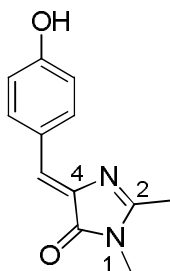


Схема 1. Хромофор GFP

Хромофор GFP является относительно несложной, стабильной молекулой и может быть синтезирован в свободном от белка виде. Однако, как оказалось, это вещество, несмотря на аналогичный с белком спектр поглощения, имеет крайне низкий квантовый выход флуоресценции.

До недавнего времени существовало несколько возможных объяснений этого феномена. Как известно, переход молекулы из возбужденного состояния в основное, помимо флуоресценции, также может проходить через другие типы энергетических переходов, в реализации которых немаловажную роль играют изменения конформации и/или конфигурации молекулы.

Молекула хромофора GFP имеет несколько подвижных частей, которые могли бы отвечать за подобные безызлучательные переходы. С одной стороны, такими заместителями являются группы находящиеся в положениях 1 и 2 (Схема 1) имидазолонового ядра - в структуре флуоресцентных белков они являются частью белковой цепи, что существенно ограничивает их подвижность. С другой стороны, возможно также изменение конфигурации бензилиденового фрагмента хромофора (заместитель в положении 4), который плотно зафиксирован в белковой молекуле за счет пространственных взаимодействий.

В настоящей работе было установлено, что первый фактор не имеет заметного влияния на флуоресцентные свойства хромофора GFP, в то время как фиксация бензилиденового фрагмента приводит к драматическому росту интенсивности флуоресценции.

1. Роль заместителей во 2 положении

Самым простым, а возможно и единственным, способом выявления влияния подвижности заместителей в 1 и 2 положении хромофора GFP на его флуоресцентные свойства является сравнительный анализ группы соединений с варьирующим размером и характером этих радикалов.

Для систематического изучения роли заместителя при втором положении имидазолонового ядра хромофора GFP, нами был разработан удобный метод введения в это положение серии алкильных заместителей, основанный на использовании производных 2-азидо коричных кислот (Схема 2):

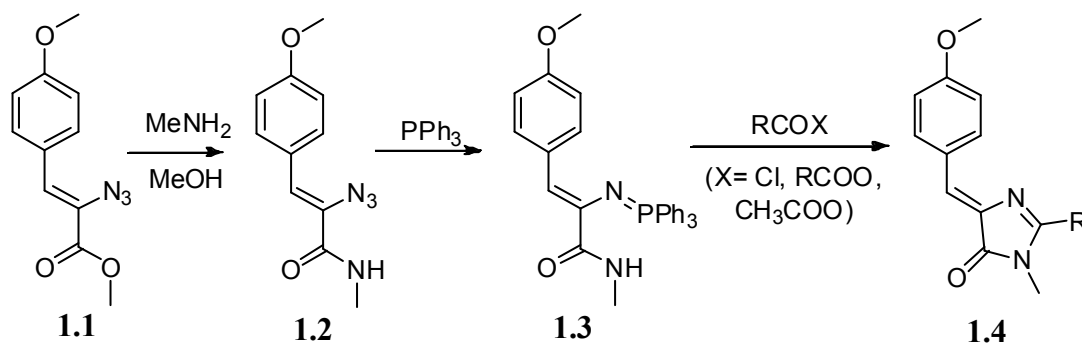


Схема 2. Синтез имидазолонов с использованием амидов 2-азидо коричных кислот

Мы показали, что для введения алифатических заместителей соответствующие хлорангидриды могут быть применены только для соединений, не имеющих атомов водорода в *альфа*-положении (Таблица 1):

Таблица 1. Результат взаимодействия фосфазена (1.3) с различными хлорангидридами

R	Выход, %	Соединение
Me	0	1.4a
Et	следы	1.4b
Pr ⁱ	17	1.4d
Bu ^t	34	1.4e

В то же время, использование ангидридов алифатических кислот позволило повысить выход и расширить круг синтезируемых соединений (Таблица 2):

Таблица 2. Результаты взаимодействия фосфазена (1.3) с различными ангидридами

R	Условия	Выход, %	Соединение
Me	90°C, 4ч	61	1.4a
Et	100 °C, 6ч	35	1.4b
Pr	100 °C, 6ч	26	1.4c
Pr ⁱ	кип., 15ч	15	1.4d
Bu ^t	кип., 24ч	следы	1.4e
CF ₃	40°C, 1.5ч	45	1.4f
H	65°C, 2ч	30	1.4g

Заключительной стадией синтеза хромофоров (1.5) стало удаление метильной защиты, с помощью реакции с трибромидом бора (Схема 3):

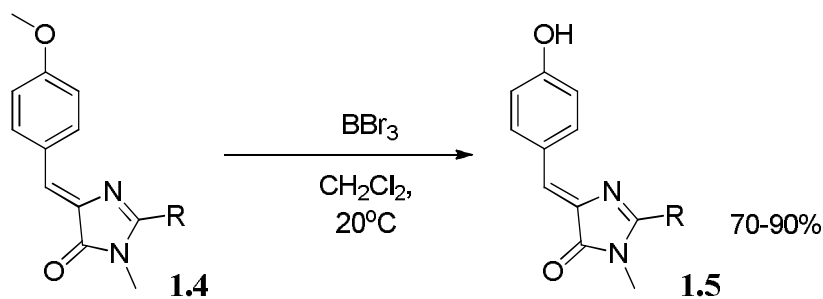


Схема 3. Удаление метильной защиты

Синтез линейки имидазолонов (**1.5a-g**) должен был позволить нам провести подробный анализ влияния заместителей во втором положении имидазолонового ядра на флуоресцентные свойства соединений этого ряда. Однако оказалось, что для всех полученных соединений не наблюдается заметного возрастания квантового выхода флуоресценции, относительно хромофора (**1.5a**). При этом, как для хромофора (**1.5a**), так и для его аналогов, данная величина является настолько низкой, что не поддается точной оценке классическими спектрофотометрическими методами. Более того, эксперименты с привлечением спектроскопии, разрешенной по времени, проведенные группой Кирилла Солнцева (Технологический институт, Джорджия, США), также не показали существенного различия в ряду соединений (**1.5**).

Таким образом, мы смогли прийти к окончательному выводу о том, что размер и подвижность данного радикала не оказывают заметного влияния на флуоресцентные свойства хромофора GFP.

2. Производные оксазол-4-карбоновых кислот

Косвенным подтверждением доминирующего влияния изменения конфигурации бензилиденного фрагмента на флуоресцентные свойства хромофра GFP, является высокий квантовый выход флуоресценции производных оксазол-4-карбоновой кислоты. Структура этих соединений (**2.1**) имеет сходство со строением имидазолонов, однако конфигурация кратной связи в них жестко зафиксирована (Схема 4):

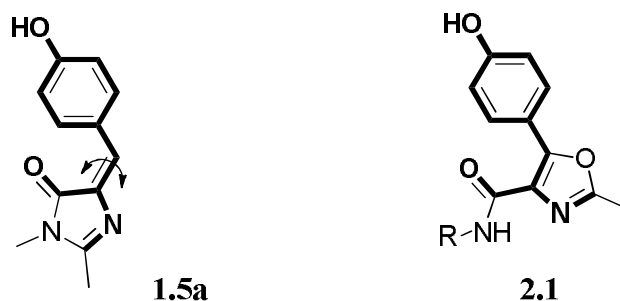


Схема 4. Аналогия в строении хромофоров ФБ и амидов оксазол-4-карбоновых кислот

В ходе работы нами был обнаружен достаточно универсальный подход к синтезу этих веществ, в основу которого легло использование бромированных производных N-ацилдегидроаминокислот (**2.3**), которые легко (а в некоторых случаях спонтанно) претерпевают циклизацию в оксазолы (**2.1**) (Схема 5):

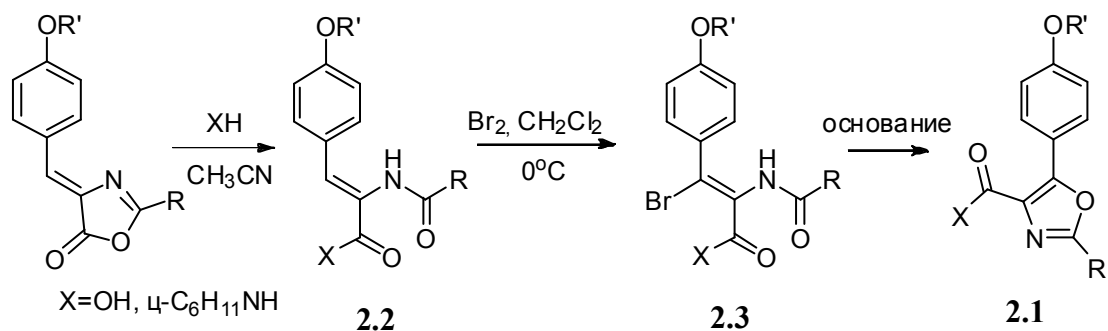


Схема 5. Метод синтеза производных оксазол-4-карбоновых кислот (2.1)

В нашей работе было синтезировано несколько производных оксазол-4-карбоновой кислоты (**2.1**) (Схема 6):

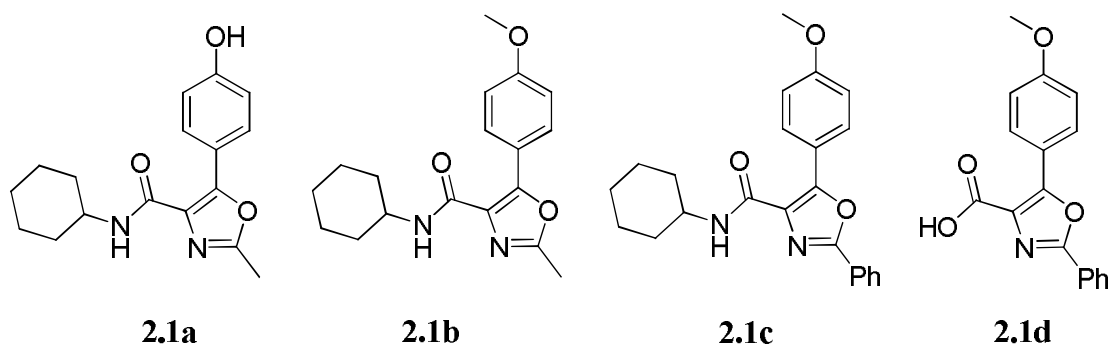


Схема 6. Синтезированные производные оксазол-4-карбоновой кислоты (2.1)

На примере этих соединений было показано, что такие вещества имеют достаточно высокие квантовые выходы флуоресценции (Таблица 3):

Таблица 3. Оптические свойства водных растворов соединений (2.1a-d)

Соединение	Абс., нм	Эм., нм	Кв. выход
2.1a	290	400	0.25
2.1a (анион) ^a	322	460	0.01
2.1b	291	395	0.82
2.1c	333	393	0.15
2.1d	309	411	0.65

(a – измерения проводились в 1мМ растворе NaOH)

Как видно из таблицы 3, соединения (**2.1**) характеризуются большими стоксовыми сдвигами (до 100 нм), однако большинство максимумов абсорбции и эмиссии лежит в ультрафиолетовой области. Интересной особенностью оказалось драматическое снижение квантового выхода, происходящее при депротонировании соединения (**2.1a**). Эта особенность отличает соединение (**2.1a**) от флуоресцентных белков, для которых такое поведение нехарактерно. В целом, совокупность перечисленных спектральных свойств оксазолов (**2.1**) говорит о невысокой перспективности использования этих веществ в роли флуоресцентных красителей.

3. Производные 1,2-оксазин-3-карбоновых кислот

Одним из возможных методов фиксации бензилиденового фрагмента аналогов хромофора GFP являются различного рода координационные взаимодействия. В ходе нашей работы мы предположили, что триарилметеновое соединение (3.1), строение которого близко к структуре хромофора, могло бы вступать в такие реакции, приводящие к фиксации геометрии молекулы (Схема 7):

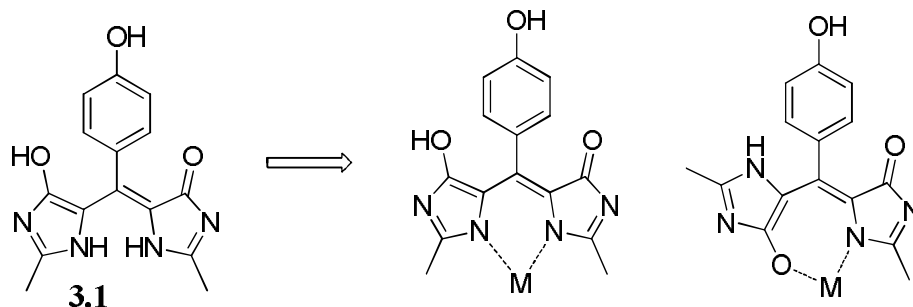


Схема 7. Структура предложенного аналога хромофора GFP (3.1) способного к координационной фиксации

Синтез этого соединения предполагалось проводить на основе производных 2,4-динитро-3-арил-глутаровой кислоты (3.2) (Схема 8):

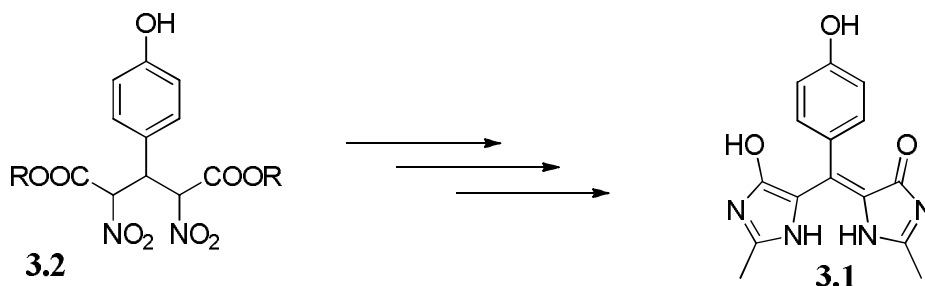


Схема 8. Производное глутаровой кислоты (3.2), как предполагаемый предшественник соединения (3.1)

Тем не менее, в ходе нашей работы было обнаружено, что описанные подходы к синтезу производных (3.2), не приводят к образованию искомого продукта. Согласно литературным данным [1], конденсация ароматических альдегидов с эфирами нитроуксусной кислоты в присутствии вторичных аминов, должна приводить к образованию кристаллических осадков солей диэфиров 2,4-динитро-3-арил-глутаровых кислот (3.2). Однако попытки воспроизведения литературной методики показали, что основным продуктом подобной реакции зачастую являются ранее неописанные соли (3.3) (Схема 9):

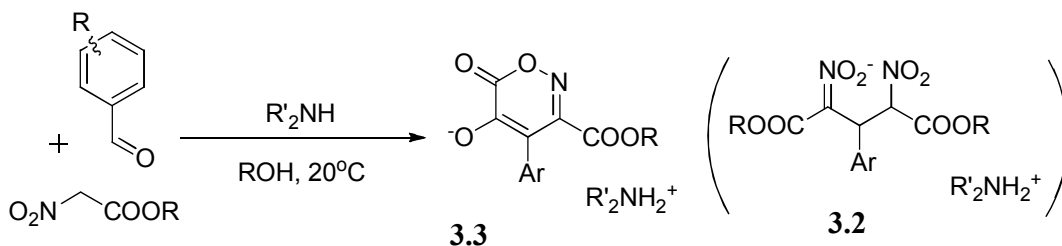


Схема 9. Конденсация ароматических альдегидов с эфирами нитроуксусной кислоты

¹ Dornow A., Wiehler G. // *Justus Lieb. Ann. der Chem.* – 1952. – №578. – С. 113-121.

Строение продукта (3.3) было подтверждено методами ЯМР, а также масс-спектрометрии высокого разрешения и рентгеноструктурным анализом, что не оставляет сомнений по поводу его структуры.

Для выявления различных факторов влияющих на протекание конденсации, мы ввели в реакцию серию ароматических альдегидов имеющих как донорные, так и акцепторные заместители, использовали три различных нитроуксусных эфира (метильный, этиловый и *изо*-пропиловый), а также несколько вторичных аминов (диэтиламин, дициклогексиламин (ДКГА), пирролидин (pyr) и пиперидин (pip)) (Таблица 4):

Таблица 4. Продукты конденсации различных ароматических альдегидов (Схема 9)

Ar	Продукт, выход, %	Ar	Продукт, выход, %
Ph	3.3a(Me)*Et₂NH , 56	2-пиридил	3.2c(iPr)*Et₂NH , 33
Ph	3.3a(Et)*Et₂NH , 31 или 3.2a(Et)*Et₂NH , 56 ^a	Ph	3.3a(Me)*ДКГА , 33
Ph	3.3a(iPr)*Et₂NH , 43 или смесь (3.2) и (3.3) ^a	Ph	3.3a(Me)*pip , 13
4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3.3b(Me)*Et₂NH , 27	Ph	3.3a(Me)*pyr , 39
4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3.3b(Et)*Et₂NH , 54	2-тиофенил	3.3e(Me)*Et₂NH , 36
4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3.3b(iPr)*Et₂NH , 23	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3.3f(Me)*Et₂NH , 46
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	3.3z(Me)^b , 22	4-Pr ⁱ -C ₆ H ₄	3.3g(Me)*Et₂NH , 35
4-NO ₂ -C ₆ H ₄	3.3z(iPr)^b , 15	4-Br-C ₆ H ₄	3.3h(Me)*Et₂NH , 43
4-OH-C ₆ H ₄	3.3d(Me)*Et₂NH , 45	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3.3i(Me)*Et₂NH , 32
4-OH-C ₆ H ₄	3.3d(Et)*Et₂NH , 44	4-NEt ₂ -C ₆ H ₄	3.3j(Me)*Et₂NH , 47
4-OH-C ₆ H ₄	3.3d(iPr)*Et₂NH , 53	2-F-C ₆ H ₄	3.3k(Me)*Et₂NH , 37
2-пиридил	3.2c(Et)*Et₂NH , 58	4-F-C ₆ H ₄	3.3l(Me)*Et₂NH , 36

(а – в зависимости от длительности реакции мог быть выделен тот или иной продукт или их смесь; б – в реакции не наблюдалось выпадения осадка соли (3.3), однако продукт мог быть выделен в протонированном виде)

Как видно из таблицы 4, в большинстве случаев были получены исключительно соли (3.3). Лишь в отдельных примерах было выявлено предварительное выпадение осадка (3.2), который затем превращался в производное (3.3), и только в случае пиридин-2-карбальдегида образования (3.3) не наблюдалось вовсе. Таким образом, образование того или иного продукта зависело исключительно от выбранного альдегида и времени проведения реакции, в то время как природа используемого эфира и вторичного амина практически не влияли на результат.

Таким образом, полученные ранее данные, по всей видимости, объясняются несовершенством аналитической техники, или же недостаточным качеством выполнения эксперимента.

В завершение, стоит отметить, что в литературе известно мало примеров синтеза оксазинонов (3.3), таким образом, полученные результаты демонстрируют новый подход к этим труднодоступным соединениям.

4. Борированный аналог хромофора GFP с фиксированной геометрией

Как уже было сказано, одним из возможных подходов к фиксации бензилиденовой части аналогов хромофора GFP являются различного рода координационные взаимодействия. Этот подход уже был использован ранее [2], однако строение полученных авторами производных, как и предложенного нами соединения (**3.1**), существенно отличалось от структуры хромофора GFP.

В настоящей работе нам удалось синтезировать наиболее близкий из всех известных аналог хромофора GFP с координационно фиксированным бензилиденовым фрагментом (**4.1**), в котором фиксация происходит за счет взаимодействия неподеленной электронной пары атома азота имидазолонового кольца со свободной орбиталью атома бора дифторборильной группы (Схема 10):

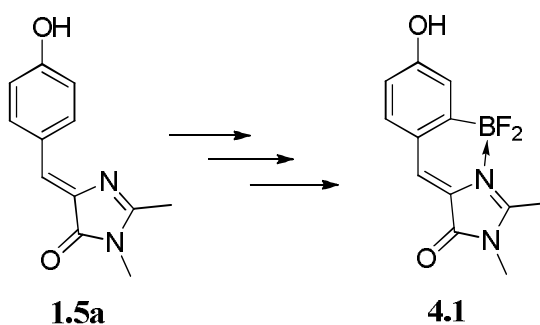


Схема 10. Борированный аналог хромофора GFP

4.1 Синтез

Синтез соединения (**4.1**) проводился с помощью недавно открытой реакции борирования биарильных соединений, содержащих атом азота в орто-положении одного из ароматических колец [3] (Схема 11):

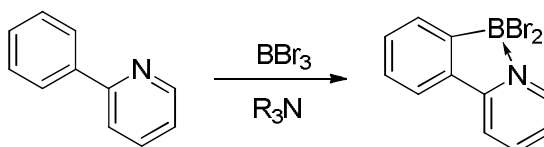


Схема 11. Реакция борирования биарильных соединений

Методика, предложенная авторами работы, предполагала воздействие на субстрат избытка трибромида бора в присутствии диизопропилэтиламина (ДИПЭА) в хлороформе при комнатной температуре. Данный подход оказался совершенно неприменим для хромофора (**1.5a**), так как он имеет незначительную растворимость в хлороформе, а при добавлении трибромида бора образует нерастворимый комплекс, не вступающий в дальнейшие превращения. Для увеличения растворимости, мы ввели в молекулу хромофора дифенилтретбутилсилильную (TBDPS) защитную группу. Подобный липофильный заместитель позволил избежать выпадения осадка на стадии борирования, что и привело к получению искомого соединения (Схема 12):

² (a) Wu L., Burgess K. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – №130. – С. 4089-4096. (б) Baldrige A., Solntsev K.M. // *Chem. Comm.* – 2010. – №46. – С. 5686-5688.

³ Ishida N., Moriya T., Goya T., Murakami M. // *J. Org. Chem.* – 2010. – №75. – С. 8709-8712.

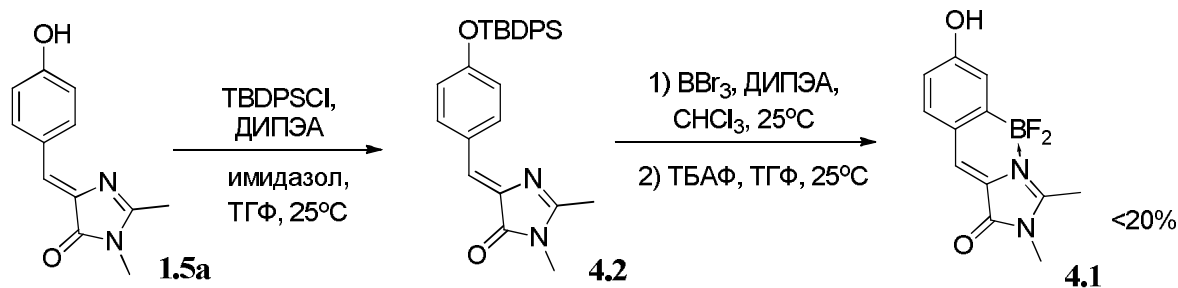


Схема 12. Синтез соединения (4.1) с использованием основания

Последующее действие фторида тетрабутиламмония (ТБАФ), необходимое для удаления силильной защиты позволило также заменить дибромоборильную группу на более устойчивую дифтороборильную.

Тем не менее, предложенная методика характеризовалась низким выходом, а сама реакция сопровождалась осмолением. Причиной этого послужило присутствие основания, способного депротонировать метильную группу, находящуюся во втором положении имидазолонового ядра хромофора.

Отказаться от введения основания удалось при использовании молекулярных сит (МС). Такая замена позволила повысить выход реакции борирования более, чем в два раза (Схема 13):

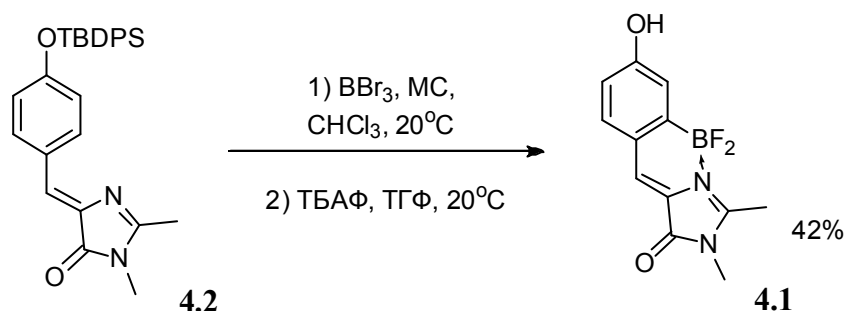


Схема 13. Синтез (4.1) с использованием молекулярных сит

4.2 Свойства

Полученный нами синтетический хромофор (4.1) обладает ярко выраженной флуоресценцией с квантовым выходом, достигающим 73% (ацетонитрил), что близко к аналогичному значению для GFP (79%).

Максимумы поглощения и испускания этого соединения оказались также близки к аналогичным параметрам GFP и имеют лишь незначительный батохромный сдвиг (20-30 нм), который объясняется, по всей видимости, смещением электронной плотности на атоме азота из-за образования координационной связи с дифторборильной группой.

Наличие фенольной группы в молекуле хромофора (4.1) определяет способность этого соединения к диссоциации с отщеплением протона (Схема 14):

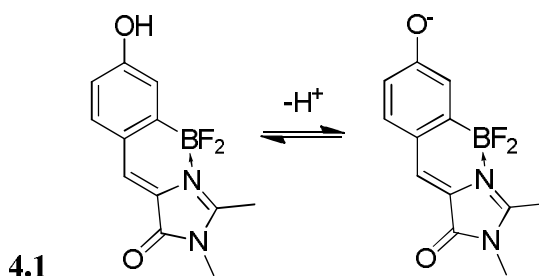


Схема 14. Депротонирование соединения (4.1)

Образование аниона самым серьезным образом изменяет оптические свойства таких веществ. Так, для зеленого флуоресцентного белка, при диссоциации фенольной группы Tug66 происходит bathochромное смещение максимумов поглощения и испускания на величину 80-90 нм.

Интересен также тот факт, что во флуоресцентных белках протонированный хромофор помимо коротковолнового излучения также излучает в области, соответствующей диссоциированной форме. Подобный эффект вызывается так называемым переносом протона в возбужденном состоянии (Excited State Proton Transfer (ESPT)) и объясняется большей кислотностью возбужденного состояния.

Оказалось, что соединение (4.1) обладает аналогичными свойствами. Изучение спектров поглощения водных растворов этого вещества при различных значениях pH показало, что соединение имеет два максимума абсорбции при 400 и 485 нм, с изобестической точкой при 425 нм и $pK_a=6.4$ (см. Рисунок 1). В то же время, при возбуждении растворов (4.1) на длине волны, соответствующей протонированной форме, для большинства значений pH наблюдалось наличие двух максимумов эмиссии при 485 и 527 нм. В ходе титрования было обнаружено, что переход между ними происходит при значениях pH соответствующих $pK_a^*=2.3$ (здесь и далее pK_a^* - это pK_a возбужденного состояния).

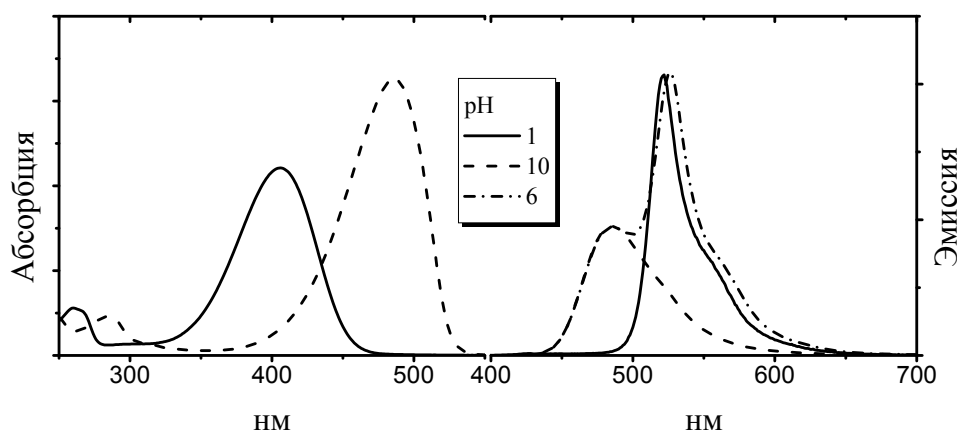


Рисунок 1. Спектры абсорбции и эмиссии водных растворов (4.1) при различных pH

Совместно с группой Кирилла Солнцева (Технологический институт, Джорджия, США), нами было проведено изучение кривых спада флуоресценции (4.1). Это исследование показало, что константа скорости процесса переноса протона возбужденного состояния в воде составляет - $K_{ESPT}=0.45 \text{ нс}^{-1}$, что отлично коррелирует с данными полученными ранее для других флуоресцентных фенолов.

В завершение стоит сказать, что свойства (4.1), а именно, высокий квантовый выход, расположение максимумов поглощения и флуоресценции в видимой области спектра, достаточно высокий коэффициент молярной экстинкции (до $50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для анионной формы), а также высокая растворимость в воде (до 1 мМ) и небольшой размер свидетельствуют о перспективности использования аналогичных соединений в качестве флуоресцентных красителей.

Флуоресцентные красители на основе борированного аналога хромофора GFP

5. Аминопроизводные

Способность соединения (4.1) к депротонированию и, как следствие, наличие у него двух максимумов абсорбции и эмиссии ограничивают круг его возможного применения в роли флуоресцентного красителя. Мы предложили два пути возможной модификации, которые позволили бы избежать подобной проблемы. Первым из этих подходов, стала замена гидроксильной группы на аминную, которая исключала возможность депротонирования.

5.1 Синтез

В настоящей работе нами был синтезирован следующий ряд аминопроизводных (5.1) (Схема 15):

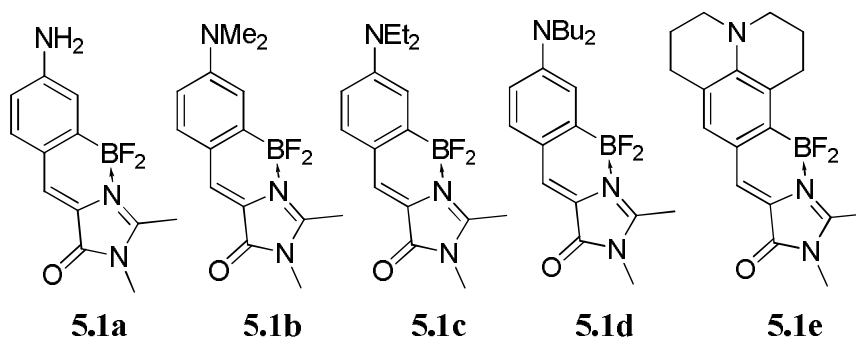


Схема 15. Аминированные аналоги соединения (4.1)

Для создания этих веществ в первую очередь потребовалось синтезировать соответствующие не борированные имидазолы. Часть из них была получена по классической схеме включающей синтез оксазолонов (5.2) (Схема 16):

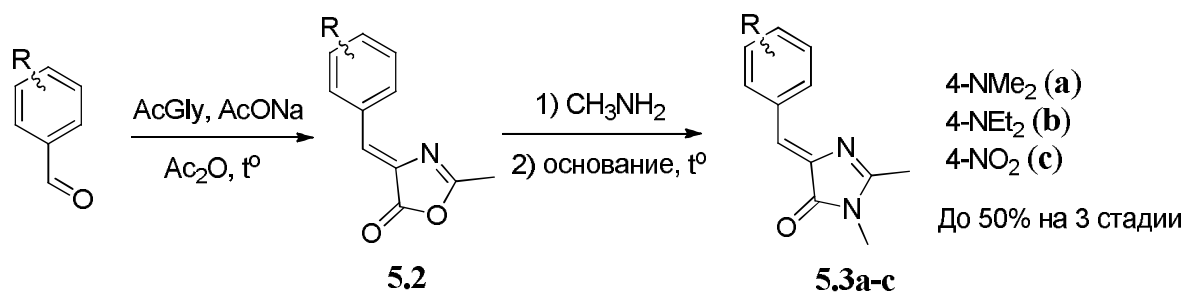


Схема 16. Схема синтеза имидазолонов (5.3а-с)

Восстановление полученного таким образом нитро производного (5.3с) позволило получить имидазолон содержащий свободную аминную группу (5.3d) (Схема 17):

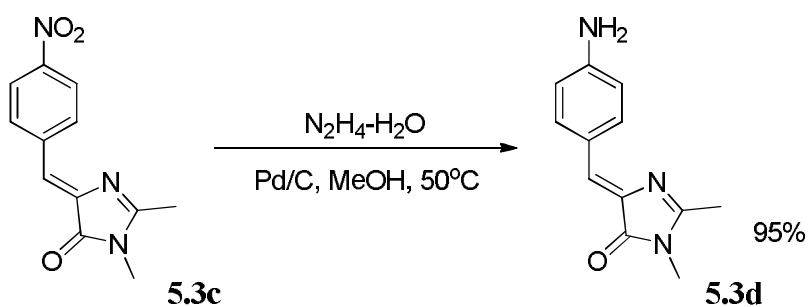


Схема 17. Синтез производного (5.3d)

Производные (**5.3e**) и (**5.3f**) были синтезированы по более новой методике связанной с использованием иминов (**5.4**) (Схема 18):

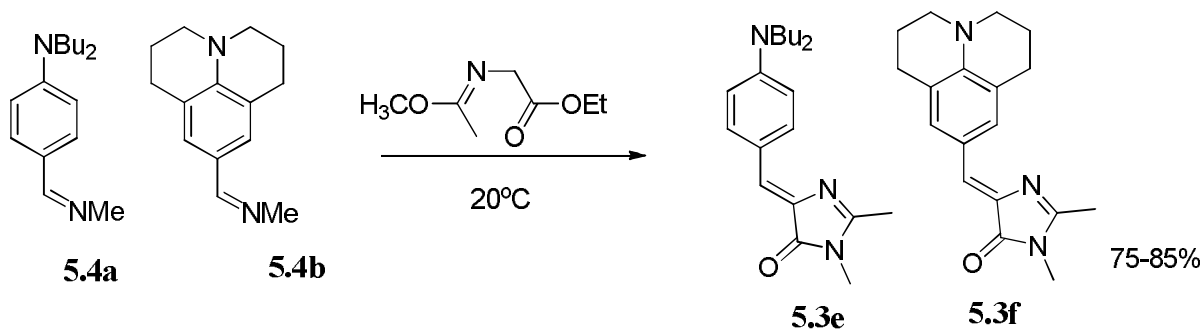


Схема 18. Схема синтеза имидазолонов (**5.3e**) и (**5.3f**)

Последующее борирование полученных имидазолонов (**5.3**) потребовало модификации методики, предложенной для (**1.5a**). Основной причиной для этого стала невозможность введения защитной силильной группы в эти соединения.

В ходе экспериментов с использованием различных растворителей и температур было выбрано наиболее удачное сочетание, дающее наибольший выход продуктов – кипячение компонентов в дихлорэтане.

Поскольку выбранный подход не подразумевал введения силильной защиты, нам также удалось изменить условия замены атомов галогена в борильной группе. Мы отказались от трудноудаляемого фторида тетрабутиламмония в пользу фтористоводородной кислоты. При этом замена атомов брома протекала так же быстро, а выделение полученных соединений существенно упрощалось (Схема 19, Таблица 5):

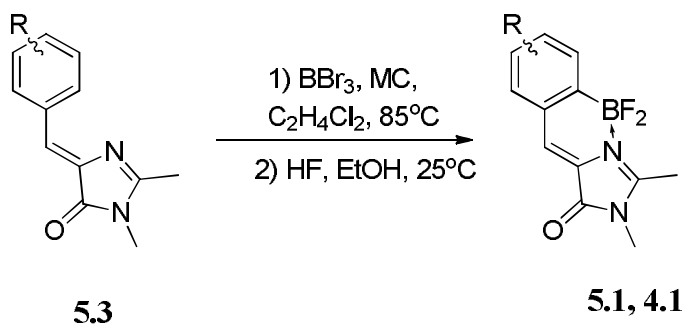


Схема 19. Оптимизированная методика синтеза борированных производных

Таблица 5. Выходы борированных производных синтезированных по оптимизированной методике

R	Соединение	Выход, %
4-OH	4.1	47
4-NH ₂	5.1a	19
4-NMe ₂	5.1b	72
4-NEt ₂	5.1c	69
4-NBu ₂	5.1d	53
N(CH ₂) ₃	5.1e	39

Данный подход оказался также применим в синтезе гидрокси-производного (**4.1**), что позволило отказаться от использования дорогостоящего реагента – *трет*-бутил дифенил силилхлорида, а также повысить выход с 36% до 47%.

5.2 Свойства

Рассмотрение свойств аминированных аналогов борированного хромофора (4.1) мы начнем с соединения (5.1c), содержащего диэтиламинную группу (Схема 20):

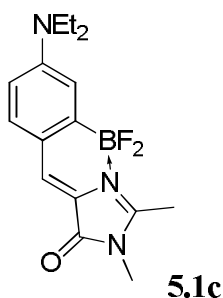


Схема 20. Аналог соединения (4.1) с диэтиламинным заместителем

Данное соединение характеризуется заметным батохромным смещением (10-30 нм) максимумов абсорбции и флуоресценции относительно депротонированной формы (4.1), а также не имеет кислотно-основных переходов в широком диапазоне рН (подробнее см. в конце раздела). Однако при изучении его свойств была выявлена интересная особенность, связанная с заметным варьированием квантового выхода флуоресценции в зависимости от растворителя (Таблица 6):

Таблица 6. Относительные квантовые выходы (5.1c) в разных растворителях

Растворитель	Отн. кв. выход	Растворитель	Отн. кв. выход
Вода	0.03	CH ₂ Cl ₂	0.60
MeOH	0.15	Пиридин	0.75
EtOH	0.20	ТГФ	0.80
CH ₃ CN	0.40	EtOAc	0.85
DMF	0.45	Толуол	0.85
DMCO	0.50	Et ₂ O	1.0
Ацетон	0.55	Диоксан	1.0

Согласно существующей модели, этот эффект объясняется наличием у таких молекул отдельного возбужденного состояния, характеризующегося высокой степенью перераспределения заряда (ICT – Intramolecular Charge Transfer), в котором распределение заряда дополнительно стабилизировано свернутой структурой молекулы (TICT – Twisted Intramolecular Charge Transfer).

Поскольку возможность реализации такого возбужденного состояния сильно зависит от структуры молекулы, нами было синтезировано четыре аналога соединения (5.1c), содержащие незамещенную аминогруппу (5.1a), диметил- (5.1b) и дибутил- (5.1d) аминогруппы, а также более сложный заместитель с циклической структурой (5.1e) (Схема 15).

Как оказалось, полный отказ от алкильных групп на атоме азота, или их жесткая фиксация за счет внутримолекулярного связывания, приводят к уменьшению зависимости квантового выхода флуоресценции от свойств растворителя (Таблица 7):

Таблица 7. Квантовые выходы соединений (5.1a-e) в различных растворителях

Соединение	Заместитель	Вода	EtOH	CH ₃ CN	EtOAc	Диоксан
5.1a	H	0.70	0.67	0.67	0.66	0.82
5.1b	Me	0.05	0.35	0.48	0.67	0.78
5.1c	Et	0.03	0.22	0.31	0.63	0.72
5.1d	Bu	- ^a	0.27	0.37	0.64	0.73
5.1e	(CH ₂) ₃	0.33	0.50	0.52	0.54	0.64

(a - недостаточная растворимость)

Помимо изменений квантового выхода флуоресценции, введение этих заместителей привело к изменению и других оптических свойств. Для незамещенного соединения (**5.1a**) был обнаружен сильный гипсохромный, а для циклического (**5.1e**) батохромный сдвиги (Таблица 8):

Таблица 8. Оптические свойства соединений (5.1a-e) в различных растворителях

Заместитель		H	Me	Et	Bu	(CH ₂) ₃
Вода	Абс.	461	511	520	518	547
	Эм.	530	564	563	562	586
CH ₃ CN	Абс.	453	485	494	497	521
	Эм.	517	552	554	556	574
Диоксан	Абс.	462	489	497	499	519
	Эм.	506	532	538	538	556

В завершение раздела мы хотели бы отдельно рассмотреть кислотно-основные свойства соединений (**5.1a-e**). Помимо нейтрально-заряженной формы, свойства которой обсуждались выше, все эти соединения также могут быть протонированы по амино-группе, в результате чего происходит существенное гипсохромное смещение максимумов абсорбции и эмиссии этих соединений (Таблица 9):

Таблица 9. Максимумы абсорбции и эмиссии протонированной (катион) и нейтральной форм соединений (5.1a-e) в воде

Заместитель	Абс. (Нейтр.)	Абс. (Кат.)	Эм. (Нейтр.)	Эм. (Кат.)	pKa(Абс.)
H	461	356	530	417	~2
Me	511	356	564	419	~3
Et	520	358	563	419	3.9
Bu	518	356	562	416	~4
(CH ₂) ₃	547	359	586	415	1.4

Свойства заместителей оказали большое влияние на величину pKa соответствующих сопряженных кислот производных (**5.1a-e**). Так, в ряду соединений с увеличивающимися алкильными заместителями ((**5.1a-d**) водород, метил, этил и бутил) наблюдалось увеличение этого параметра, которое объясняется возрастанием донорного эффекта. Однако наименьшее значение pKa было выявлено для циклического производного (**5.1e**), структура которого затрудняет протонирование.

5.3 Применение

Специфические оптические свойства хромофора (**5.1c**), связанные с драматическим изменением его квантового выхода флуоресценции позволили нам предложить использовать это соединение во флуоресцентной микроскопии для окрашивания клеток. Поскольку это производное имеет существенное сродство к органическим средам (коэффициент распределения октанол-вода для него составлял около 2), можно было ожидать, что оно также будет преимущественно накапливаться в клеточных мембранах и различных липидных агрегатах.

Совместно с Константином Лукьяновым (Лаборатория биофтонки, ИБХ РАН, Москва) была проведена серия опытов, которая показала, что при добавлении в среду содержащую клетки человека HeLa и HEK293 красителя (**5.1c**) в конечной концентрации 1-5 мкМ, уже через несколько секунд возникала яркая зелено-желтая флуоресценция, ассоциированная с мембранными внутриклеточными структурами и липидными каплями (Рисунок 2):

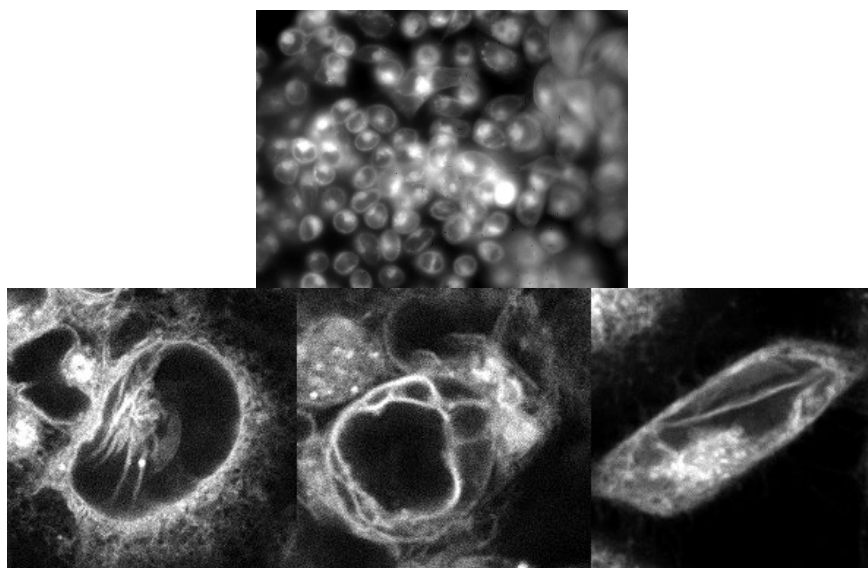


Рисунок 2. Клеточная культура и органеллы окрашенные (**5.1c**)

Было показано, что фотостабильность сигнала (**5.1c**) во много раз больше сигнала EGFP. Можно предположить, что эта особенность объясняется постоянным обменом связанного и свободного красителя, так как при высоком сродстве к органическим средам (**5.1c**) сохраняет достаточную растворимость в воде.

Благодаря подобным характеристикам, использование (**5.1c**) может позволить получать изображения внутриклеточных мембранных структур высокого качества, а кроме того такие свойства предполагают возможность его потенциального использования в спектроскопии сверхвысокого разрешения, так как постоянный обмен связанного и свободного красителя может способствовать наблюдению флуоресценции отдельных молекул.

6. Фторпроизводные

Вторым подходом к модификации соединения (4.1), позволяющим избежать рН-зависимых переходов красителя в области физиологических значений рН, стало введение в молекулу атомов фтора для понижения рКа фенольной группы.

6.1 Синтез

В настоящей работе нами было синтезировано два фторированных аналога хромофора (4.1) (Схема 21):

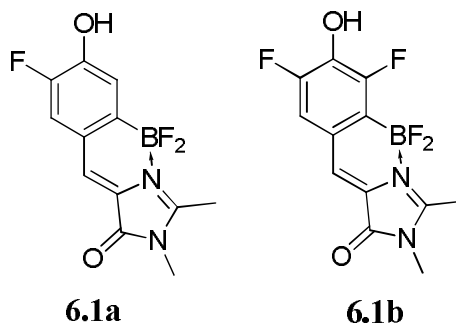


Схема 21. Фторосодержащие аналоги соединения (4.1)

Исходные имидазолонны были синтезированы по классической методике с использованием оксазолонов, а последующее борирование проводилось по оптимизированной методике, не предусматривающей введения защитных групп (Схема 22, Таблица 10):

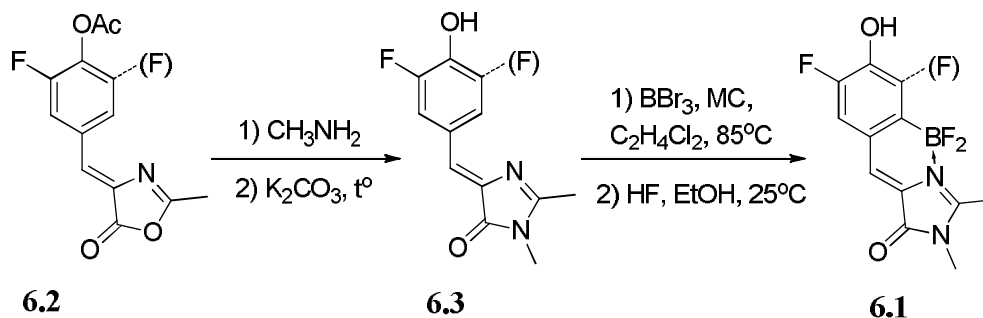


Схема 22. Метод синтеза фторпроизводных (6.1)

Таблица 10. Выходы в реакции борирования фторированных производных

Заместители	Соединение	Выход, %
5-фтор	6.1a	44
3,5-дифтор	6.1b	52

6.2 Свойства

Изучение спектров абсорбции и эмиссии водных растворов фторированных производных (6.1) при различных рН показало, что введение атомов фтора действительно привело к существенному изменению рКа этих соединений, относительно хромофора (4.1).

Более того, для них также существенно увеличилась разница между рКа основного и возбужденного состояний. Причем для соединения (6.1b) это изменение стало столь сильным, что излучение его депротонированной формы наблюдалось даже в 6М растворах хлорной кислоты. Группа наших коллег под руководством Кирилла Солнцева (Технологический институт, Джорджия, США)

провела серию экспериментов, которые позволили оценить pK_a^* этих соединений (Таблица 11):

Таблица 11. pK_a основного и возбужденного состояний соединений (6.1a,b) и (4.1)

Соединение	4.1	6.1b	6.1a
pK_a	6.4	5.8	3.9
pK_a^*	2.3	-0.6	-3.5

Подобная особенность позволяет отнести производные (**6.1**) к так называемым «супер» фотокислотам – соединениям, для которых характерно сильное изменение pK_a при возбуждении и отрицательное значение pK_a^* . Причем, в отличие от многих описанных фотокислот, соединения (**6.1**) имеют максимумы поглощения и флуоресценции, лежащие в видимой области, что может позволить проводить работу с ними в средах, непрозрачных в области ультрафиолетового излучения.

7. Флуоресцентные красители с линкерными заместителями

Другим аспектом модификации соединения (**4.1**) стало введение в молекулу реакционноспособных функциональных групп (линкеров) для конъюгации с другими молекулами. Использование трибромида бора на ключевой стадии синтеза существенно ограничивает круг функциональных заместителей, которые могут присутствовать в исходном имидазолоне, поскольку действие столь агрессивного реагента разрушает большинство из них. Поэтому в качестве основы для создания линкеров нами был выбран остаток *гамма*-аминомасляной кислоты.

В настоящей работе было получено два соответствующих флуоресцентных красителя: соединение (**7.1a**), аналогичное производному (**4.1**), а также соединение (**7.1b**), содержащие два атома фтора (Схема 23):

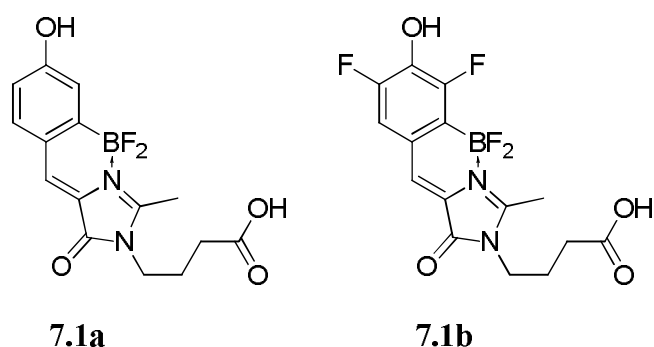


Схема 23. Синтезированные производные (7.1)

7.1 Синтез

Как уже было сказано, синтез соединений (7.1) проводился на основе имидазолонов, содержащих остаток *гамма*-аминомасляной кислоты (7.2). Последние были синтезированы по классической методике с использованием оксазолонов (Схема 24):

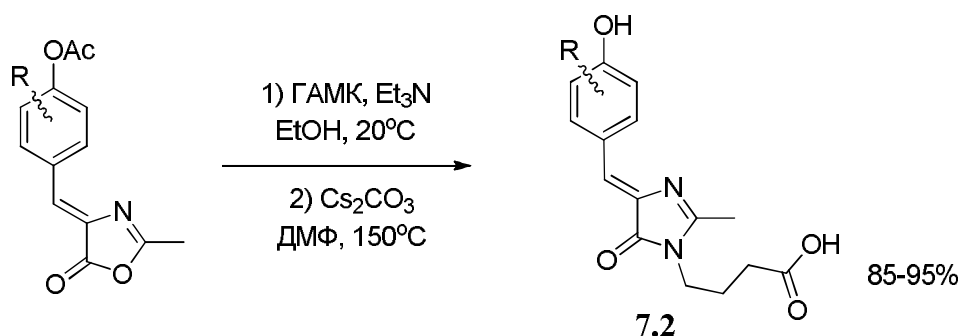


Схема 24. Синтез имидазолонов (7.2), содержащих линкерный заместитель

Как оказалось, при непосредственном взаимодействии таких кислот с трибромидом бора происходит образование нерастворимых комплексов, осмолющихся при нагревании. Этот факт потребовал возвращения к методике связанной с введением защитных силильных групп, введение которых проводилось не только по фенольной гидроксильной группе, а также и по кислотной (7.3). Воздействие трибромида бора постепенно разрушало сложные силиловые эфиры (COOTBDPS), однако этот процесс не сказывался на общем протекании реакции борирования, а образующиеся при этом бромангидриды были затем переведены в сложные эфиры под действием спирта (Схема 25):

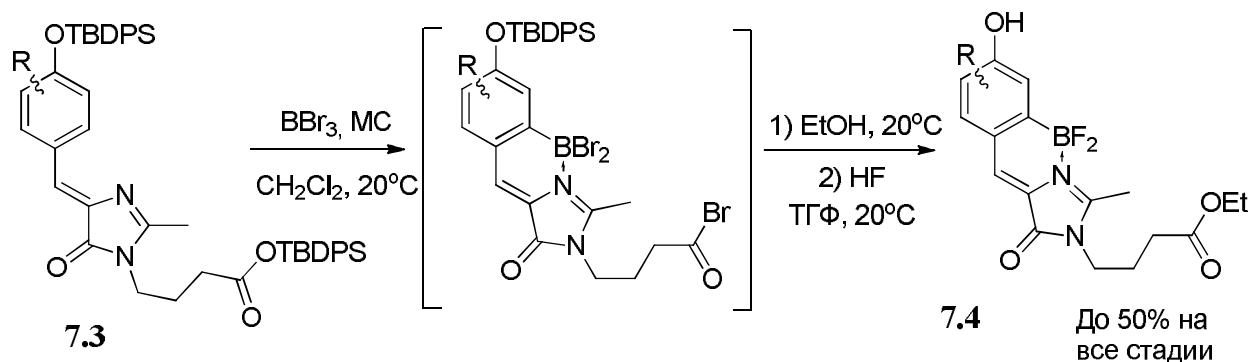


Схема 25. Борирование соединений (7.3) с последующим получением эфиров (7.4)

Подобное превращение позволило существенно облегчить выделение продукта, хотя и потребовало дополнительной стадии гидролиза (Схема 26):

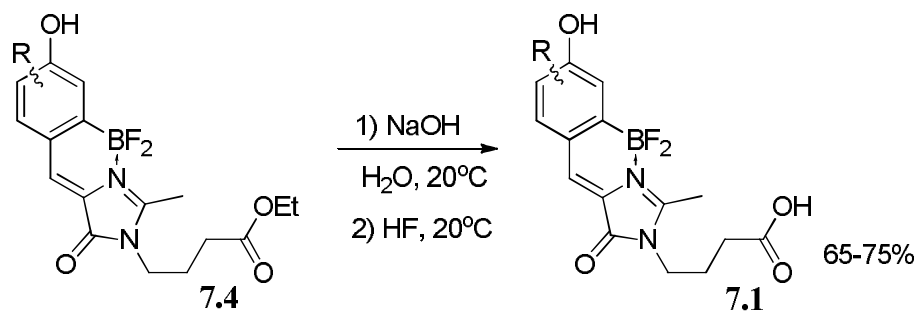


Схема 26. Гидролиз эфиров (7.4)

Наличие карбоксильной группы в соединениях (7.1) позволяет использовать их для введения меток в различные производные содержащие свободные амино-, а также тиольные и спиртовые группы. Однако более удобными реагентами для выполнения подобных процедур являются готовые активированные эфиры. В настоящей работе мы синтезировали два таких производных на основе N-гидроксисукцинимида (Схема 27):

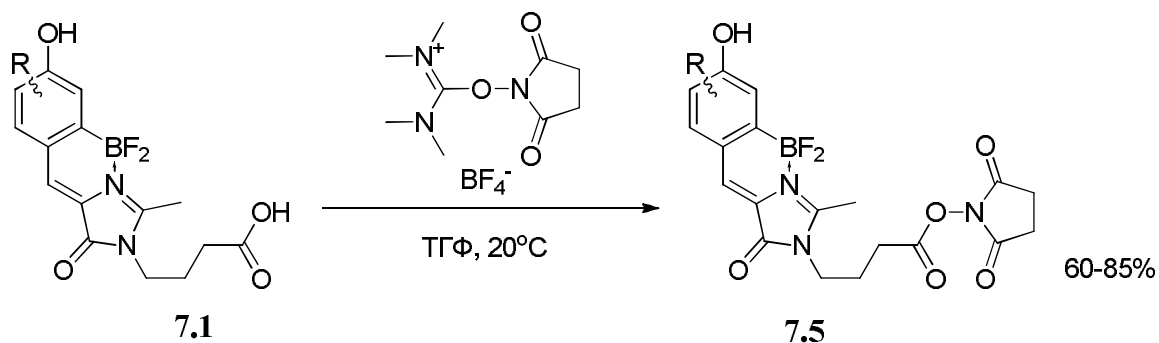


Схема 27. Синтез активированных эфиров (7.5)

С другой стороны, введенная карбоксильная группа может быть модифицирована различными аминами, содержащими другие функциональные группы. Эта возможность позволила нам создать два аналога, содержащих аминную и азидную группы (Схема 28):

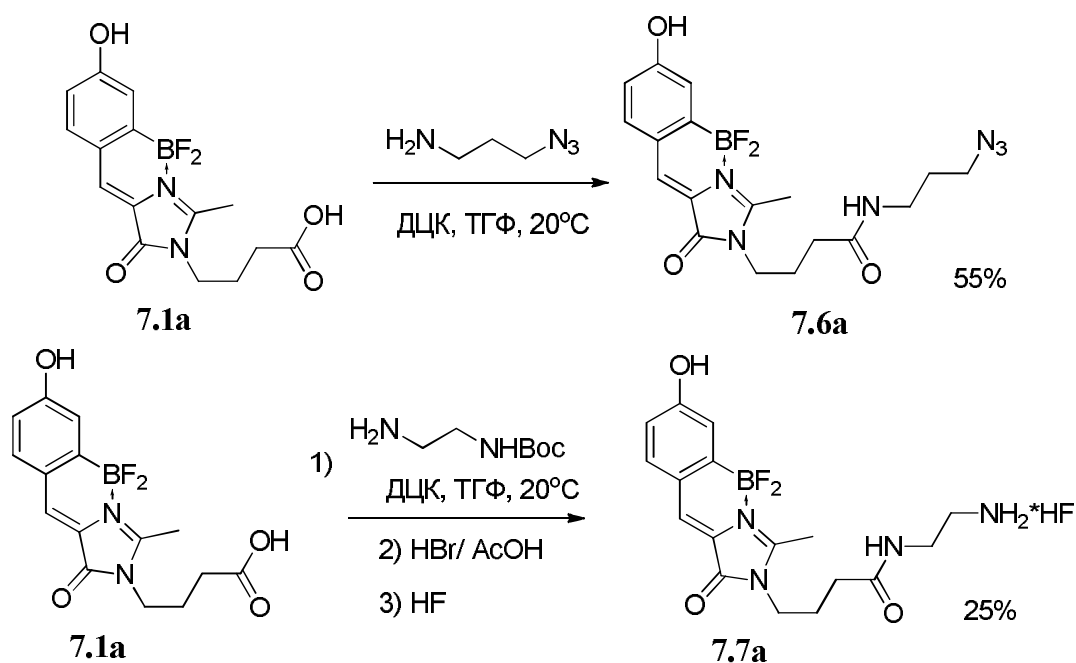


Схема 28. Синтез производных содержащих азидную (7.6a) и аминную (7.7a) группы

По аналогии с кислотами (7.1) и активированными эфирами (7.5), полученные таким образом амиды могут быть использованы для введения флуоресцентных меток в различные объекты. В частности, азид (7.6a) может быть использован для введения флуорофора в молекулы, содержащие терминальную ацетиленовую группу методами медь-катализируемого [2+3] циклоприсоединения. Соединение (7.7a), имеющее в своей структуре остаток этилендиамина, в свою очередь, может быть использовано для модификации мишеней, содержащих, например, карбоксильную группу.

7.2 Флуоресцентно-меченый ингибитор катепсинов человека

Первым примером использования функционально-замещенных флуоресцентных красителей, созданных в настоящей работе, стало создание флуоресцентно-меченого необратимого ингибитора цистеиновых катепсинов человека (Схема 29):

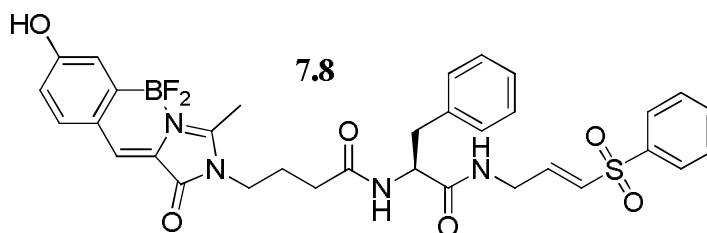


Схема 29. Флуоресцентно-меченый ингибитор цистеиновых катепсинов (7.8)

Синтез предложенного ингибитора проводился совместно с группой Профессора Михаэля Гютцова (Michael Guetschow, Боннский университет, Бонн, Германия). Для присоединения метки использовалась свободная кислота (7.1a), а конъюгирование осуществлялось за счет действия хлор *изо*-бутилформиата в присутствии метилморфолина (Схема 30):

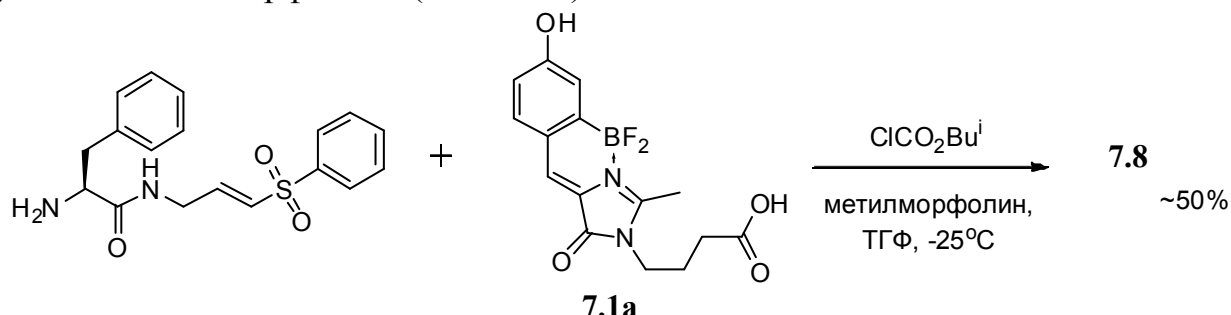


Схема 30. Синтез флуоресцентно-меченого ингибитора (7.8)

Исследование активности полученного вещества в отношении человеческих катепсинов L, S, K и В, проведенное нашими коллегами, показало, что соединение (7.8) проявляет высокую ингибирующую активность в отношении всего ряда выбранных белков. На примере катепсина К была показана возможность визуализации этого белка, а также было установлено, что необратимое связывание соединения (7.8) происходит непосредственно с активным центром катепсина, а не с другими участками белка, что гарантирует визуализацию только активной формы.

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение (7.8) может быть успешно использовано в различных исследованиях, а также в диагностических целях для визуализации и количественного определения цистеиновых катепсинов.

7.3 Флуоресцентно-меченый диолеилфосфатидилэтаноламин

Вторым примером применения синтезированных нами красителей стало создание флуоресцентно-меченого липида. Данная работа проводилась совместно с коллегами из Лаборатории углеводов (под руководством проф. Бовина Н.В., ИБХ РАН, Москва), в ходе нее был создан липид на основе диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE, от англ. DiOleoyl PhosphatidylEthanolamine), модифицированный флуоресцентным красителем (7.1a) (Схема 31):

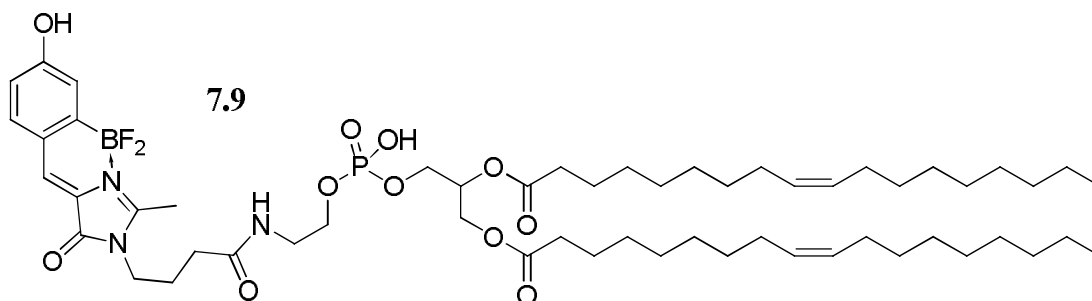


Схема 31. Флуоресцентно меченый липид (7.9)

Введение метки проводилось при непосредственном действии активированного эфира (7.5a) на DOPE и протекало в достаточно мягких условиях, практически не осложняясь побочными процессами (Схема 32):

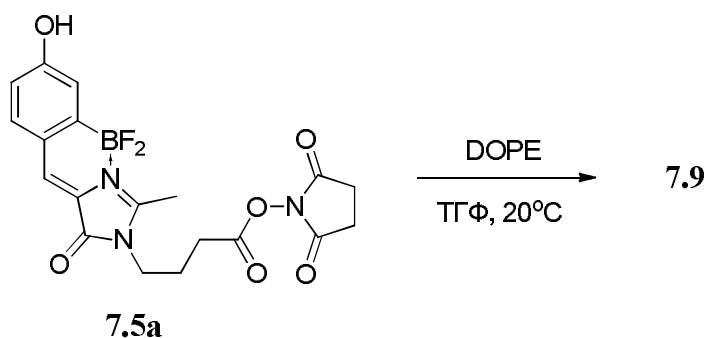


Схема 32. Синтез флуоресцентно меченого липида (7.9)

Изучение полученного липида, проведенное нашими коллегами, показало, что соединение (7.9) способно встраиваться в клеточную мембрану (в частности, эритроцитов), причем эффективность подобного встраивания, а также времена жизни в составе клеточной мембраны, сопоставимы с параметрами аналогов на основе флуоресцеина. Однако в отличие от них, соединение (7.9) значительно лучше растворимо в водных средах (по крайней мере, 0.1 мг/мл), а также стабильно при длительном хранении, что говорит о перспективности использования этого маркера в различных исследованиях.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов, на основе 2-азидо-коричных кислот. С использованием этого метода получена серия производных, содержащих различные заместители в положении 2 имидазолонового ядра. Показано отсутствие заметного влияния размера заместителя на величину квантового выхода флуоресценции.
2. Разработан новый подход к синтезу производных оксазол-4-карбоновых кислот. Изучены спектральные свойства полученных этим методом соединений.
3. Разработан новый высокоэффективный метод синтеза эфиров 4-арил-5-гидрокси-6-оксо-1,2-оксазин-3-карбоновых кислот.
4. Впервые разработан метод синтеза (*Z*)-4-(2-(дифторборил)-арилиден)-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов, представляющих собой аналоги хромофора GFP с фиксированным бензилиденовым фрагментом.
5. Показано ключевое влияние подвижности бензилиденового фрагмента на флуоресцентные свойства хромофора GFP.
6. Показана перспективность использования (*Z*)-4-(2-(дифторборил)-4-аминобензилиден)-1,2-диметил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов в роли флуоресцентных красителей.
7. Показано существенное уменьшение pK_a основного и возбужденного состояний и возникновение "супер" фотокислотности для борированных аналогов хромофора GFP при введении в их структуру атомов фтора.
8. Разработан метод синтеза флуоресцентных борированных аналогов хромофора GFP, содержащих функциональные группы, позволяющие проводить конъюгацию с биомолекулами. Показана возможность использования полученных соединений в роли флуоресцентных маркеров.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **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 a model of excited state proton transfer in fluorescent proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – №134. – С. 6025-6032.
2. **Baranov M.S.**, Yampolsky I.V. Novel condensations of nitroacetic esters with aromatic aldehydes leading to 5-hydroxy-1,2-oxazin-6-ones // *Tetrahedron Lett.* – 2013. – №54. – С. 628-629.
3. **Baranov M.S.**, Lukyanov K.A., Ivashkin P.E., Yampolsky I.V. An efficient synthetic approach to fluorescent oxazole-4-carboxylate derivatives // *Synth. Commun.* – 2013. (DOI: 10.1080/00397911.2012.706350).
4. **Баранов М.С.**, Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. Синтез хромофоров флуоресцентных белков и их аналогов // *Биоорг. Хим.* – 2013. – №3. – С. 255-276.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Баранов М.С.**, Ямпольский И.В. Разработка нового флуоресцентного красителя на основе хромофора зеленого флуоресцентного белка // Материалы конференции. «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2011». – М.: Ваш полиграфический партнер. – 2011. – С. 5-6.
2. **Баранов М.С.** Новое семейство флуоресцентных красителей на основе хромофора зеленого флуоресцентно белка // Материалы международного молодежного научного форума «Ломоносов-2013» [Электронный ресурс] – М.: Макс Пресс. – 2013. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).