



УДК 547.782

## ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ СОПРЯЖЕННОГО ЗАМЕСТИТЕЛЯ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОФОРА БЕЛКА Kaede<sup>1</sup>

© 2022 г. И. Н. Мяснянко\*, \*\*, Н. С. Балеева\*, \*\*, #, М. С. Баранов\*, \*\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
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 13.09.2021 г.

После доработки 20.09.2021 г.

Принята к публикации 29.09.2021 г.

Синтезированы новые производные хромофора белка Kaede – (Z)-2-(4-метоксипензилиден)-6/8-фенилимидазо[1,2-a]пиридин-3(2H)-оны. Установлено, что положение фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте не влияет на оптические свойства подобных соединений.

*Ключевые слова:* имидазолы, хромофоры, флуоресцентный белок Kaede, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342322030149

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические аналоги хромофоров флуоресцентных белков – бензилиденимидазолы – высокоперспективны в качестве основы для новых флуоресцентных меток. Благодаря большому количеству существующих синтетических методов модификаций этих соединений можно легко получить вещества разного строения и с разными заместителями, что потенциально позволяет значительно варьировать их оптические свойства [1, 2]. В частности, для флуоресцентных красителей важна способность поглощать и испускать свет длинноволнового диапазона – менее токсичный для биологических тканей. Эффективный подход к батохромному смещению максимумов абсорбции и эмиссии красителей – увеличение системы сопряженных π-связей. Например, флуоресцентные белки Kaede и DsRed, хромофоры которых содержат во 2-м положении имидазолон заместители с кратными связями, имеют максимум флуоресценции 580–585 нм [3], в то время как флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein), хромофор которого имеет алкильную группу в этом положении, характеризуется флуоресценцией с максимумом 510 нм [3]. Аналогично показано, что синтетические аналоги хромофора GFP, имеющие во 2-м положении иные стироль-

ные заместители, испускают свет в области ~600 нм [4–8]. Схожими свойствами обладают конденсированные производные [9, 10], у которых данный фрагмент циклически замкнут на атом азота имидазолонного цикла. Ранее на примере пары синтетических аналогов хромофора Kaede нами была изучена зависимость оптических свойств от подвижности кратной связи во 2-м положении имидазолон (рис. 1) [11]. Было установлено, что фиксация двойной связи для конденсированного производного (I) приводит к батохромному сдвигу максимумов абсорбции на 79 нм и эмиссии на 19 нм (рис. 1).

Цель настоящей работы – изучение влияния положения фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте на оптические свойства производных хромофора белка Kaede.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами из бромопиридин-2-аминов были получены пиридиновые производные глицина (II) и (III). Затем с помощью конденсации с анисовым альдегидом были синтезированы соответствующие имидазопиридины (IV). На заключительной стадии синтеза с помощью реакции арилирования бромпроизводных (IV) были получены целевые соединения (V).

Установлено, что оптические свойства полученных соединений (V) (схема 1) не отличаются от свойств ранее описанного аналога (I) (рис. 1). Все производные характеризуются абсорбцией с максимумом 500–505 нм и эмиссией с максимумом

<sup>1</sup> Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342322030149 для авторизованных пользователей.

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

мом 555–560 нм в ацетонитриле (рис. 2). Вероятно, что отсутствие влияния положения фенильного заместителя связано с неполным сопряжением с  $\pi$ -системой молекулы из-за его подвижности. В

связи с этим перспективное направление для дальнейших исследований – создание производных с жестко фиксированными ароматическими заместителями.

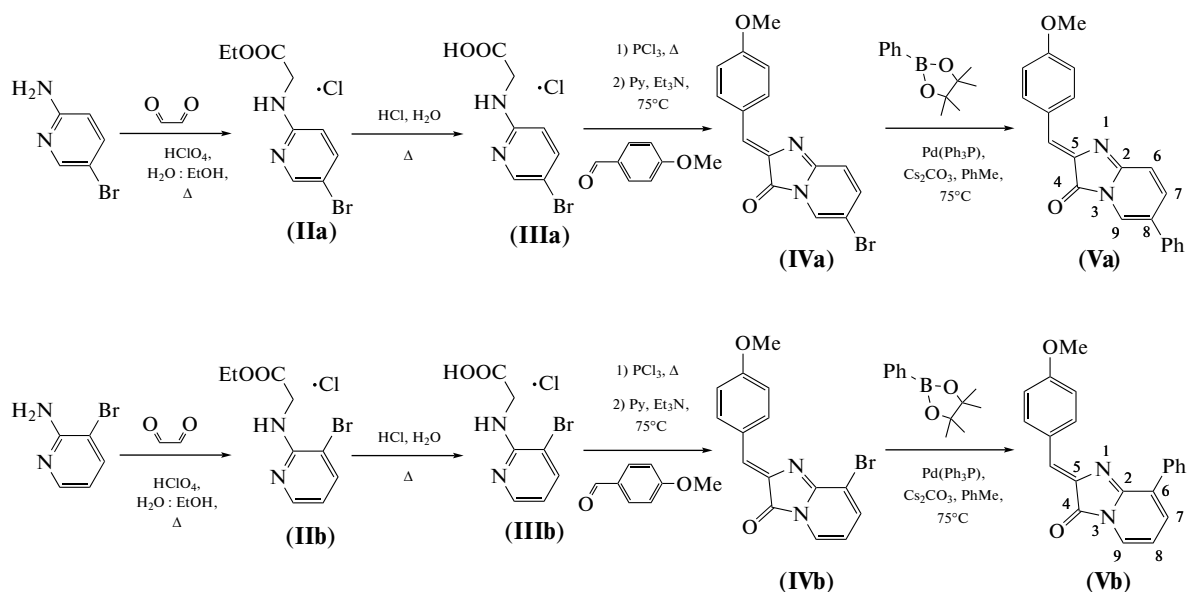


Схема 1. Схема синтеза целевых соединений (V).

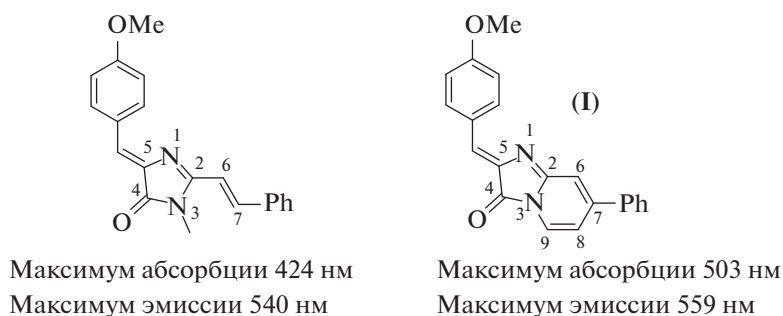


Рис. 1. Производные хромофора белка Каеде и их оптические свойства в ацетонитриле.

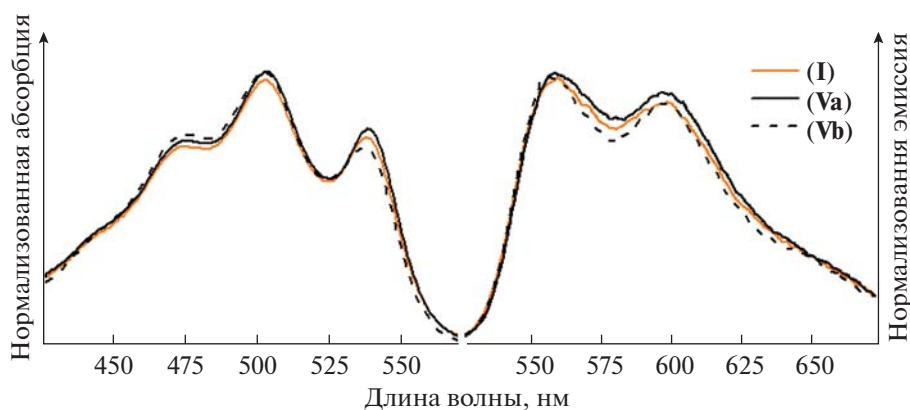


Рис. 2. Нормализованные спектры абсорбции и эмиссии соединений (I), (Va) и (Vb) в ацетонитриле.

Также мы установили, что новые производные (V) обладают слабой флуоресценцией с квантовым выходом 1.5–2.0% (в ацетонитриле). Многие производные хромофоров флуоресцентных белков с подобными свойствами могут быть использованы в качестве флуорогенных красителей [10, 12]. Поэтому можно предположить, что производные (V) и родственные им соединения также перспективны для применения во флуоресцентной микроскопии в данной роли.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Оборудование.** Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.;  $J$ , Гц) регистрировали на спектрометре Fourier 300 (300 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO- $d_6$  (внутренний стандарт – Me<sub>4</sub>Si), спектры поглощения – на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP 30 (Stuart Scientific, Великобритания) и не исправляли. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе micrOTOF II (Bruker, Германия), ионизация электрораспылением.

**Синтез этил(бромопиридин-2-ил)глицината (II).** Бромопиридин-2-амин (10 г, 58 ммоль) растворяли в смеси HClO<sub>4</sub> (50%, 24.0 мл) и EtOH (50 мл), добавляли водный раствор глиоксаля (40%, 8.00 мл, 64 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 40 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C, разбавляли насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> до pH 7, экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (4 × 160 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали методом флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 1).

**Синтез гидрохлорида (бромопиридин-2-ил)глицина (III).** Этил-2-((бромопиридин-2-ил)амино)ацетат (32 ммоль) растворяли в HCl (5 М, 32 мл) и кипятили 6 ч. Затем смесь упаривали, остаток промывали Et<sub>2</sub>O (2 × 50 мл) и сушили в вакууме.

**Синтез (Z)-бromo-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-она (IV).** 2-((3-Бромопиридин-2-ил)амино)уксусной кислоты гидрохлорид (800 мг, 3.0 ммоль) помещали в колбу Шленка, вакуумировали, заполняли аргоном и добавляли 4.5 мл PCl<sub>3</sub> (51 ммоль). Полученную смесь кипятили в течение 5 ч и упаривали. К остатку в токе аргона добавляли анисовый альдегид (0.330 мл, 2.7 ммоль), пиридин (3.0 мл) и триэтиламин (0.50 мл). Реакционную смесь выдерживали при 70°C в течение 12 ч, а затем упаривали. Полученный остаток растворяли в EtOAc (50 мл), промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (10 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 × 15 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Полученный продукт очищали методом

флеш-хроматографии (элюент – этилацетат и гексан, 1 : 3).

**Синтез (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-фенилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-она (V).** В колбу Шленка помещали (Z)-бromo-2-(4-метоксибензилиден)имидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-он (33 мг, 0.1 ммоль), фенилбороновой кислоты пинаколовый эфир (54 мг, 0.26 ммоль) и CsCO<sub>3</sub> (163 мг, 0.5 ммоль). Колбу вакуумировали, заполнили аргоном и добавляли PhMe (2 мл) и Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (12 мг, 0.01 ммоль). Смесь выдерживали 4 ч при 75°C, затем добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) и промывали водой (2 × 80 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Продукт очищали флеш-хроматографией (элюент – хлороформ).

Выходы реакций, температуры плавления и спектральные характеристики синтезированных соединений (II–V) приведены в дополнительных материалах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые производные хромофора белка Kaede – (Z)-2-(4-метоксибензилиден)-6/8-фенилимидазо[1,2-*a*]пиридин-3(2H)-оны. Установлено, что оптические свойства этих соединений не зависят от положения фенильного заместителя в имидазопиридиновом фрагменте, что, вероятно, объясняется неполным сопряжением с  $\pi$ -системой молекулы.

Новые соединения могут быть использованы в качестве флуорогенных красителей, поскольку они, как и многие производные хромофоров флуоресцентных белков, обладают слабой флуоресценцией.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10105).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов М.С., Лукьянов К.А., Ямпольский И.В. // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 255–276. [Baranov M.S., Lukyanov K.A., Yampolsky I.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 223–244.] <https://doi.org/10.1134/S1068162013030047>

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. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Physiological Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
4. *Chuang W.-T., Chen B.-S., Chen K.-Y., Hsieh C.-C., Chou P.-T.* // Chem. Commun. 2009. V. 45. P. 6982–6984.  
<https://doi.org/10.1039/b908542d>
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.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx803>
6. *Singh A., Rajbongshi B.K., Ramanathan G.* // J. Chem. Sci. 2015. V. 127. P. 941–948.  
<https://doi.org/10.1007/s12039-015-0855-5>
7. *Muselli M., Baudequin C., Perrio C., Hoarau C., Bischoff L.* // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. P. 5520–5524.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201600602>
8. *Shen B., Qian Y.* // Dyes Pigm. 2019. V. 166. P. 350–356.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.03.034>
9. *Baleeva N.S., Myannik K.A., Yampolsky I.V., Baranov M.S.* // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 26. P. 5716–5721.  
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201500721>
10. *Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., Gavrikov A.S., Mishin A.S.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 3778.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19123778>
11. *Зайцева С.О., Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю., Балеева Н.С., Баранов М.С.* // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 106–109. [Zaitseva S.O., Zaitseva E.R., Smirnov A.Yu., Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 120–123.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010136>
12. *Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Yu., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshvskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // Chem. Eur. J. 2020. V. 27. P. 3986–3990.  
<https://doi.org/10.1002/chem.202004760>

## Study of the Position of the Conjugated Substitute Influence on the Optical Properties of the Kaede Protein Chromophorus Derivatives

I. N. Myasnyanko\*, \*\*, N. S. Baleeva\*, \*\*, #, and M. S. Baranov\*, \*\*

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

\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

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

We report novel derivatives of chromophore of the fluorescent protein Kaede – (Z)-2-(4-methoxybenzylidene)-6/8-phenylimidazo[1,2-a]pyridine-3(2H)-ones. The introduced of phenyl substituent in the 6- and 8-position of the imidazopyridinone fragment does not leads to a shift absorption and emission spectra.

*Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescent protein Kaede, fluorescence*