



УДК 547.782

СИНТЕЗ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОНФОРМАЦИОННО ЗАФИКСИРОВАННОГО ДИАРИЛМЕТЕНОВОГО АНАЛОГА ХРОМОФОРА БЕЛКА GFP

© 2022 г. Н. С. Балеева*, **, #, А. Ю. Смирнов*, **, 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 15.02.2022 г.

После доработки 20.02.2022 г.

Принята к публикации 23.02.2022 г.

Синтезировано новое конформационно зафиксированное производное хромофора белка GFP – (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метил)-2-пропил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он. Установлено, что присутствие незафиксированного арильного заместителя в структуре приводит к снижению яркости флуоресценции и не влияет на положения максимумов поглощения и испускания. Перспективным направлением дальнейших исследований представляется замена этого заместителя на различные электронно-акцепторные группы, такие как нитрильная или CF₃-группа, способные к более эффективному сопряжению с π-системой молекулы.

Ключевые слова: имидазолы, хромофоры, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342322050074

ВВЕДЕНИЕ

Исследования последних десятилетий показывают, что флуоресцентные метки имеют высокую практическую значимость для визуализации и изучения биологических процессов [1]. К синтетическим флуорофорам относятся разные бензилиден-имидазолы – производные хромофора флуоресцентного белка GFP (Green Fluorescent Protein) [2]. Этот класс веществ представлен большим количеством соединений, имеющих разное химическое строение и, как следствие, характеризующихся разными свойствами. В литературе описан ряд хорошо проработанных методов химического синтеза этих соединений [3].

Важные свойства флуорофоров – способность поглощать и испускать свет в дальнекрасной области спектра и высокий квантовый выход флуоресценции. Хорошо известно, что хромофор GFP и прочие бензилиден-имидазолы слабо флуоресцируют из-за подвижности бензилиденового фрагмента молекулы [4]. Однако было показано, что этот фрагмент можно жестко зафиксировать,

например, с помощью дифторборильного мостика (например, соединение **(Ia)** на рис. 1) или других методов фиксации. Такие модификации позволили многократно увеличить квантовый выход флуоресценции [5–7]. “Красные” бензилиден-имидазолы можно получить путем увеличения сопряженной π-системы (введение стирольных или арилацетиленовых заместителей) [8–11] или расширением ароматической системы за счет аннелирования бензилиденового фрагмента [12–14].

Ранее нами была синтезирована пара аннелированных производных (рис. 1, соединения **(Ib)** и **(Ic)**) [12, 15]. Было установлено, что увеличение ароматической системы привело к батохромному сдвигу максимумов абсорбции на 54–65 нм и эмиссии на 50–77 нм относительно немодифицированного производного (**Ia**). Однако также оказалось, что флуоресценция сохраняется лишь для соединения **(Ic)**, в то время как квантовый выход флуоресценции производного **(Ib)** не превышает 0.2% (рис. 1). Мы установили, что данное поведение вызвано наличием ковалентной связи между двумя фенильными заместителями в производном **(Ib)**, благодаря которой происходит возникновение дополнительной свободной молекулярной орбитали, флуоресценция из которой невоз-

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein).

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

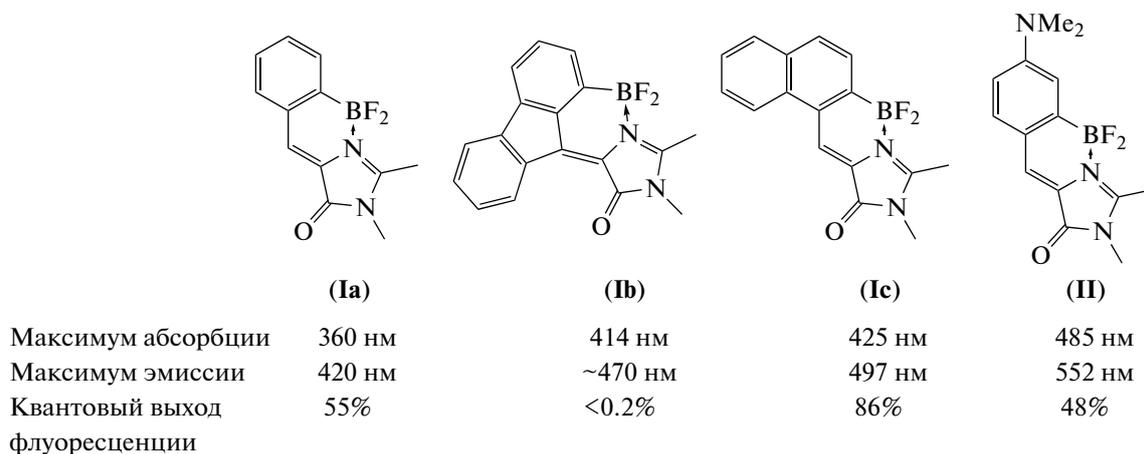


Рис. 1. Ранее синтезированные дифторборильные производные (I), (II) и их оптические свойства в ацетонитриле.

можно. Вероятно, что удаление этой связи может решить данную проблему и привести к усилению флуоресценции.

Цель настоящей работы – синтез соответствующего диарилметилена-имидазолон, в котором арильные заместители не связаны между собой ковалентной связью, и изучение оптических свойств этого соединения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельного нами было выбрано соединение (II) (рис. 1) [16]. Это соединение и его

ближайшие аналоги выступают субстратами для флуороген-активирующих белков на основе липокалина и могут применяться в генетически кодируемом мечении [17, 18].

Бензилиден-имидазолон (V) был синтезирован с помощью реакции конденсации кетона (III) и насыщенного имидазолон (IV) в пиридине (схема 1). Конформационно зафиксированное производное (VI) было получено при воздействии трибромид бора на бензилиден-имидазолон (V) в дихлорэтане в присутствии молекулярных сит (схема 1).

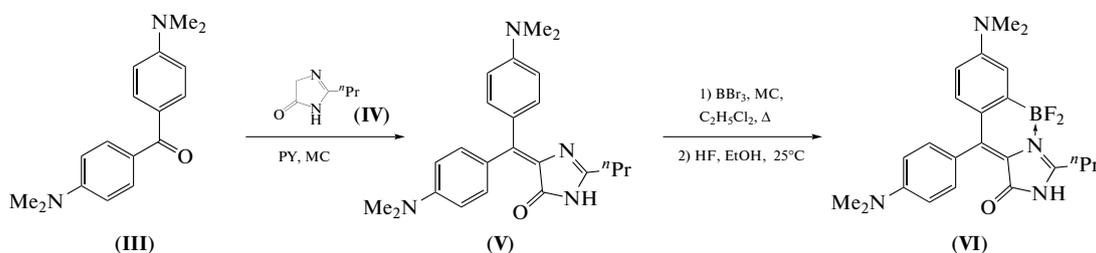


Схема 1. Схема синтеза соединений (V) и (VI).

Изучение оптических свойств показало, что новое производное (VI), как и модельное соединение (II), поглощает свет в области 450–480 нм и флуоресцирует в области 530–555 нм (рис. 2, табл. 1). Вероятно, что отсутствие существенной разницы вызвано неполным сопряжением второго арильного заместителя с π -системой молекулы.

Подвижность второго арильного заместителя в структуре соединения (VI) оказала также негативное влияние и на интенсивность флуоресценции. Было установлено, что квантовый выход флуоресценции этого вещества в ацетонитриле не пре-

вышает 0.5%, в то время как квантовый выход соединения (II) составляет 48% (рис. 1).

Полученные результаты говорят о том, что перспективным направлением для дальнейших исследований может быть введение иных групп, более способных к эффективному сопряжению с π -системой молекулы, например, введение второго арильного заместителя, как в случае соединения (VI), а различных электронно-акцепторных групп, таких как нитрильная или CF_3 -группа.

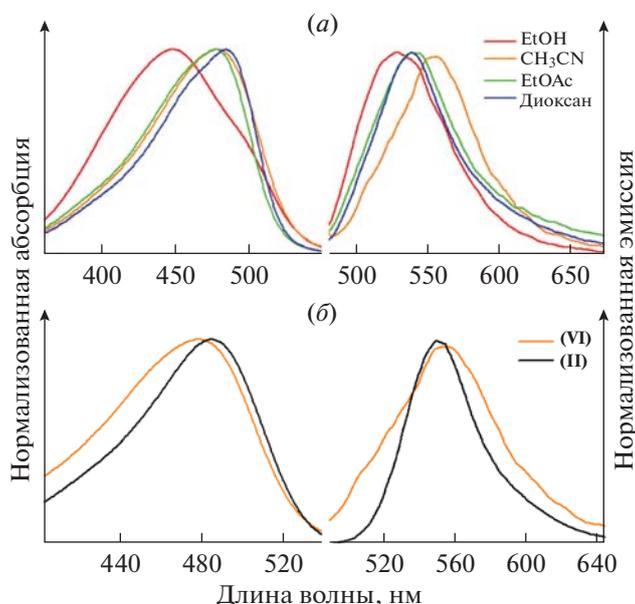


Рис. 2. (а) – Нормализованные спектры абсорбции и эмиссии соединения (VI) в разных растворителях; (б) – нормализованные спектры абсорбции и эмиссии соединений (VI) и (II) в ацетонитриле.

Таблица 1. Оптические свойства соединений (VI) и (II) в разных растворителях

Растворитель	Соединение	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм
Этанол	(VI)	449	528
	(II)	496	555
Ацетонитрил	(VI)	478	558
	(II)	485	552
Этилацетат	(VI)	477	541
	(II)	484	538
Диоксан	(VI)	484	540
	(II)	489	532

Примечание: данные для соединения (II) взяты из статьи Baranov et al. [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III NMR (700 МГц; Bruker, США) при 303 К в DMSO-*d*₆ (внутренний стандарт – Me₄Si), 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 5-(бис(4-(диметиламино)фенил)метилена)-2-пропил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (V). В колбу Шленка помещали 4,4'-бис(диметиламино)бензофенон (2.5 г, 9 ммоль), 2-пропил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он (2.3 г, 18 ммоль) и моле-

кулярные сита (1.2 г, 3 Å). Колбу вакуумировали, заполняли аргоном и добавляли 10 мл пиридина. Полученную смесь перемешивали при 120°C в течение 50 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали. Полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент – хлороформ и этанол, 50 : 1).

Оранжевый порошок (409 мг, 15%); т. пл. 206–209°C. ¹H-ЯМР: 10.85 (с, 1H), 7.31 (д, J_2 9.0, 2H), 7.03 (д, J_2 8.8, 2H), 6.68 – 6.63 (м, 4H), 2.97 (с, 6H), 2.96 (с, 6H), 2.37 (т, J_2 7.5, 2H), 1.64 (секст, J_2 7.4, 2H), 0.94 (т, J_2 7.4, 3H). ¹³C-ЯМР: 169.8, 159.3, 150.5, 150.4, 145.1, 134.0, 133.5, 132.4, 127.2, 125.2, 110.8, 110.6, 39.8, 39.7, 31.2, 19.2, 13.6. HRMS (ESI), m/z : найдено M 391.2466; рассчитано для C₂₄H₃₁N₄O⁺, $[M + H]^+$ 391.2492.

Синтез (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метилен)-2-пропил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она (VI). Продукт первой стадии (V) (0.2 г, 0.5 ммоль) смешивали с молекулярными ситами (2 г, 3 Å и 2 г, 4 Å) и трибромидом бора (5 ммоль) в 50 мл дихлорэтана. Полученную смесь кипятили в атмосфере аргона в течение 6 ч. Затем смесь охлаждали и отфильтровывали. Молекулярные сита промывали холодным этанолом (2 × 10 мл) и хлороформом (50 мл). К полученному раствору добавляли раствор HF (40%, 5 мл) и перемешивали 30 мин. Смесь разбавляли EtOAc (100 мл), промывали насыщенным раствором K₂CO₃ (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл) и насыщенным раствором NaCl (2 × 50 мл). Органические вытяжки высушивали над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Полученный продукт очищали методом флеш-хроматографии (элюент – хлороформ и этанол, 20 : 1).

Красный порошок (22 мг, 10%); т. пл. ~250°C с разложением. ¹H-ЯМР: 12.58 (с, 1H), 7.09 (д, J₂ 8.6, 2H), 6.94–6.90 (м, 2H), 6.78 (д, J₂ 8.6, 2H), 6.59 (дд, J₂ 9.1, 2.9, 1H), 3.03 (с, 6H), 3.00–2.93 (м, 8H), 1.78 (секст, J₂ 7.5, 2H), 0.98 (т, J₂ 7.3, 3H). ¹³C-ЯМР: 163.0, 162.7, 151.7, 150.2, 145.6, 132.2, 130.3, 123.7, 120.6, 119.0, 113.7, 111.3, 110.8, 110.8, 39.9, 39.8, 28.5, 19.9, 13.5. HRMS (ESI), m/z: найдено M 439.2480; рассчитано для C₂₄H₃₀BF₂N₄O⁺, [M + H]⁺ 439.2475.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе синтезировано новое производное хромофора белка GFP – (Z)-5-((2-(дифторборил)-4-(диметиламино)фенил)(4-(диметиламино)фенил)метилен)-3-метил-2-пропил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он. Изучены оптические свойства этого соединения и установлено, что отсутствие жесткой фиксации второго арильного заместителя и вызванное этим неполное сопряжение с π-системой молекулы приводит к резкому снижению интенсивности флуоресценции нового соединения. Вероятно, что эффективной модификацией, направленной на увеличение квантового выхода флуоресценции подобных соединений, будет замена незафиксированного арильного заместителя на различные электронно-акцепторные группы, такие как нитрильная или SF₃-группа, способные к более эффективному сопряжению с π-системой молекулы.

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. Sahoo H. // RSC Adv. 2012. V. 2. P. 7017–7029. <https://doi.org/10.1039/C2RA20389H>
2. 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>
3. Baleeva N.S., Baranov M.S. // Chem. Heterocycl. Compd. 2016. V. 52. P. 444–446. <https://doi.org/10.1007/s10593-016-1909-4>
4. Svendsen A., Kiefer H.V., Pedersen H.B., Bochenkova A.V., Andersen L.H. // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 8766–8771. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b04987>
5. 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. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6025–6032. <https://doi.org/10.1021/ja3010144>
6. Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., 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>
7. Baldrige A., Solntsev K.M., Song C., Tanioka N., Kowalik J., Hardcastle K., Tolbert L.M. // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 5686–5688. <https://doi.org/10.1039/B927313A>
8. Shen B., Qian Yi. // 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. 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>
11. Baleeva H.C., Baranov M.C. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 581–584. [Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 612–615.] <https://doi.org/10.1134/S106816201705003X>
12. Baleeva N.S., Khavroshechkina A.V., Zaitseva E.R., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Baranov M.S. // Tetrahedron Lett. 2019. V. 60. P. 150963. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.150963>
13. Huang G., Zhang G., Wu Y., Liao Q., Fu H., Zhang D. // Asian J. Org. Chem. 2012. V. 1. P. 352–358. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201200086>

14. *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>
15. *Sinenko G.D., Farkhutdinova D.A., Myasnyanko I.N., Baleeva N.S., Baranov M.S., Bochenkova A.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 13645. <https://doi.org/10.3390/ijms222413645>
16. *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>
17. *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>
18. *Muslinkina L., Gavrikov A.S., Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S.* // ACS Chem. Biol. 2020. V. 15. P. 2456–2465. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00440>

Synthesis and Optical Properties of the Conformationally Locked Diarylmethene Derivative of the GFP Chromophore

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

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: 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 derivative of the conformationally locked of the green fluorescent protein chromophore – (*Z*)-5-((2-(difluoroboryl)-4-(dimethylamino)phenyl)(4-(dimethylamino)phenyl)methylene)-2-propyl-3,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-on. The presence of an additional aryl substituent in the structure causes a decrease in the fluorescence intensity and does not lead to absorption and emission spectra shift. The promising direction of research is the replacement of this substituent with the electron-withdrawing groups greater conjugation of π -system of the molecule for example the nitrile group or CF₃-group.

Keywords: imidazolones, chromophores, fluorescence