

Синтез карбоксиалкільних похідних 3-фурилкумаринів для флуоресцентного мічення біомолекул

Я.Б. Кузів¹, В.В. Іщенко², В.П. Хиля², І.Я. Дубей^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 62а, Київ, 01033, Україна

Резюме. Описано синтез і спектральні властивості серії флуоресцентних реагентів на основі 7-заміщених 3-фурилкумаринів з інтенсивним голубим випромінюванням, які через карбоксиалкільну лінкерну групу можуть бути приєднані до олігонуклеотидів та інших біомолекул.

Ключові слова: флуоресцентні зонди, кумарини, мічення, кон'югати.

Вступ. Швидкий розвиток біотехнологій і медицини викликав особливий інтерес до кон'югатів олігонуклеотидів з іншими молекулами зі специфічними властивостями — флуоресцентними та афінними мітками, інтеркаляторами, ліпофільними групами, транспортними пептидами тощо. Флуоресцентне мічення нуклеїнових кислот (НК) поступово витісняє класичне введення ізотопних міток (³²P та ін.). Флуоресцентні мітки забезпечують чутливість детекції, що зіставна з радіоактивними (10⁻¹⁸ моль і менше), і при цьому вони є безпечними та зручними в роботі. В автоматичному секвенуванні ДНК і деяких інших біоаналітичних технологіях сьогодні застосовують уже майже виключно флуоресцентні мітки, зокрема флуоресцеїн, родамін, Texas Red, ціаніни Cy3, Cy5, SYBR Green та ін. [1-3].

Кумарини — важливий клас флуоресцентних сполук, що мають досить широкий спектр фізіологічної дії і тому активно використовуються в біології та медицині [4]. Так, кумарини володіють антипроліферативною та цитоток-

сичною активністю [5, 6], а деякі похідні та олігонуклеотидні кон'югати кумаринів інгібують вірус імунодефіциту людини HIV-1 [7, 8]. Кумарини широко використовують як лазерні барвники. Їх застосування як флуорофорів у біологічних дослідженнях дещо обмежене порівняно з іншими барвниками. По-перше, мітки, що випромінюють у більш довгохвильовій області, менше руйнують біомолекули. По-друге, живі клітини і тканини мають власну флуоресценцію в «кумариновому» діапазоні [9]. Проте в багатоколірному флуоресцентному аналізі, що використовує одночасно кілька флуорофорів з різними максимумами емісії, у т.ч. імунофлуоресцентних дослідженнях, твердофазній гібридизації, мікроареях НК та білків тощо, зонди із синьою флуоресценцією забезпечують високу контрастність, а їх світіння легко відрізнити від жовтої, зеленої чи червоної флуоресценції інших флуорофорів [2, 3, 10]. Перевагою кумаринових сполук є саме те, що вони флуоресціюють у синій частині спектра, де випромінює обмежене число інших міток. Для мічення НК корисним є невеликий розмір молекул кумаринів, оскільки такі барвники менше впливають на процес гібридизації. Деякі з кумаринів виявились ефективними донорами в експериментах, що

* Corresponding author.
Tel.: +38044-5265598
E-mail address: dubey@imbg.org.ua

базуються на явищі переносу енергії флуоресценції (FRET) [11–13]. Крім того, кумарини — один із небагатьох класів фотолабільних захисних груп для біомолекул [14].

Кумарини вводять в олігонуклеотиди як безпосередньо у процесі синтезу, так і постсинтетично. Для першого методу запропоновані фосфітамідні реагенти ненуклеозидної природи [15] та на основі нуклеозидів, у т.ч. 2'-аміно-2'-дезоксириндину, ацильованого 7-гідрокси-3-карбоксихумарином [13], та С-рибозиду похідної 7-амінокумарину, який вводили в олігонуклеотиди для вивчення структурної динаміки ДНК у нано- та пікосекундній часовій шкалі [16]. Проте репортерні молекули переважно приєднують постсинтетично через аміноалкільний лінкер, уведений у біополімер. Для цього часто використовують активовані естери 3-карбоксихумаринів з N-гідроксисукцинімідом чи його сульфоаналогом [17]. Іноді як додатковий лінкер вводять залишок 5-амінокапронової кислоти [18] чи гліцину [19]. Описано приєднання кумаринів через тіофосфатний зв'язок [11]. Останнім часом для кон'югації все частіше використовують реакцію циклоприєднання азидопохідних кумаринів до нуклеозидів та олігонуклеотидів, що містять алкільний фрагмент [20, 21], і взаємодію азидонуклеозидів із карбоксихумаринів за реакцією Штаудінгера [22].

Кумаринові реагенти широко застосовують і для мічення білків та пептидів [3, 9, 23]. Так, запропоновано зонди з α -дикарбонільним фрагментом у положенні С-3 для специфічного зв'язування з гуанідиною групою аргініну [24]. Описано похідну кумарину, введення якої у білки реакцією Штаудінгера супроводжувалось різким підвищенням інтенсивності флуоресценції барвника [25].

Хорошими оптичними характеристиками (інтенсивність і квантовий вихід флуоресценції) володіють кумарини, що містять 7-гідрокси- або 7-аміногрупу, вільну чи алкільовану. На їх основі розроблено ряд флуоресцентних зондів, де як додаткові замісники використано метильну, трифторметильну чи карбоксиметильну групи в положенні С-4 (вводять для підвищення фотостабільності), карбоксильну або карбоксиметильну при С-3 [9, 10]. Атоми фтору при С-6 і С-8 підвищують фото-

стабільність та інтенсивність флуоресценції кумаринів [26]. Для підвищення водорозчинності реагентів у кумаринове ядро вводять сульфогрупу [10, 23].

Відомо, що деякі 3-гетарилкумарини мають інтенсивну емісію [27]. Нещодавно нами запропоновано флуоресцентні реагенти на основі 3-тіазолілкумарину для модифікації біополімерів [28]. Для зв'язування з біомолекулами у барвники вводили карбоксильну групу. У цій роботі ми пропонуємо нові похідні 7-гідрокси-3-фурилкумарину, що містять карбоксиалкільну функцію у фурановому ядрі.

Матеріали та методи. У роботі використано N,N'-дициклогексилкарбодимід (DCC) і N-гідроксисукцинімід (HONSu) фірми «Acros» (Бельгія), інші реагенти та розчинники виробництва «Макрохім» і «Хімлаборреактив» (Україна). Піридин переганяли над NaOH, ДМФ витримували над молекулярними ситами 4Å. Етиловий естер 5-ціанметилфуран-2-карбонової кислоти (**1**) синтезували за методом [29]. Гідрохлорид метилового естеру 6-амінокапронової кислоти отримали за методом [30] і перекристалізували із суміші метанол-ефір (1:3).

Препаративну колонкову хроматографію проводили на силікагелі Kieselgel 60 (0,03–0,07 мм, Acros), тонкошарову хроматографію (ТШХ) — на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (Сорбполімер, Росія) у системі CHCl_3 -MeOH 9:1.

Протонні ЯМР-спектри записували на спектрометрі «Mercury-400» (Varian, США) із робочою частотою 400 МГц у ДМСО- d_6 , використовуючи тетраметилсилан як внутрішній стандарт. Величини хімічних зсувів наведено в м.ч. Хроматомас-спектри (LC-MS) із детекцією позитивних і негативних іонів отримували на приладі «Agilent 1100LC/MSD SL» (США), використовуючи на етапі хроматографії колонку Zorbax-C18 Rapid Resolution HT Cartridge (2,1x30 мм, 1,8 мкм) і градієнт 0–100 % ацетонітрилу в 0,1% мурашиній кислоті. Електронні спектри поглинання записували на спектрофотометрі «Shimadzu UV-3100» (Японія), спектри флуоресценції — на спектрофлуориметрі «Signe 4M» (Латвія).

Етил-5-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хроманіл)-2-фураат (2). У 40 мл ізопропанолу розчинили 2,4-дигідроксибензальдегід (2,18 г,

15,8 ммоль), етил-5-ціанметил-2-фуроат (**1**) (2,66 г, 14,8 ммоль) і піперидин (1,5 мл, 15,2 ммоль). Суміш витримували 5 год при 70 °С та 20 год за кімнатної температури. Розчин вилили у 1 М соляну кислоту та відфільтрували оранжевий осад. Залишок імінокумарину гідролізували в суміші концентрованої соляної та оцтової кислот (2:1, 60 мл) при 50 °С протягом двох днів. Зелений осад відфільтрували, промили водою та висушили (вихід 3,52 г, 78 %). Для очистки порцію сирого продукту (2,5 г) кип'ятили в етилацетаті (2x15 мл), залишок відфільтрували та промили EtOAc (3x10 мл). Об'єднаний фільтрат випарили, одержавши 1,9 г жовтого порошку (вихід 60 %). R_f 0,92. $^1\text{H-NMR}$: δ 10,62 (с, 1H, OH), 8,35 (с, 1H, H-4), 7,68 (д, $J=8,6$ Hz, 1H, H-5), 7,24 (д, $J=3,6$ Hz, 1H, фуран), 7,17 (д, $J=3,6$ Hz, 1H, фуран), 6,81 (дд, $J=1,8$ Hz, $J=8,6$ Hz, 1H, H-6), 6,73 (д, $J=1,8$ Hz, 1H, H-8), 4,31 (кварт, $J=7,2$ Hz, 2H, OCH_2), 1,36 (т, $J=7,2$ Hz, 3H, CH_3).

Етил-5-(7-метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-2-фуроат (3). Сполуку (**2**) (1 г, 3,3 ммоль) розчинили в ацетоні (30 мл, висушений над Na_2SO_4), до розчину додали Na_2CO_3 (1,4 г) і диметилсульфат (1,3 мл, 13,7 ммоль). Реакційну суміш кип'ятили протягом 10 год, потім вилили у воду (120 мл) та екстрагували етилацетатом (150 мл). Органічний шар двічі промили водою, висушили над сульфатом натрію та випарили у вакуумі. Одержали 1 г порошкоподібного продукту (**3**). Вихід 96 %. R_f 1.

5-(7-Гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фуран-2-карбонова кислота (4). Сполуку (**2**) (1,6 г, 5,33 ммоль) розчинили у водному NaOH (~3 %, 200 мл). Через 3 год суміш підкислили 30 мл концентрованої соляної кислоти, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Залишок екстрагували гарячим етилацетатом (5x7 мл), екстракт охолодили, продукт осадили в гексан, відфільтрували та висушили. Одержали жовтий порошок (0,85 г, 58 %). R_f 0,04. $T_{\text{пл}} > 280$ °С (розкл.).

5-(7-Метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фуран-2-карбонова кислота (5). Гідроліз сполуки (**3**) (1 г, 3,18 ммоль) провели у ~3% розчині NaOH у водно-спиртовій суміші (4:9, 130 мл, 7 год за кімнатної температури). Підкислили розчин розведеною HCl до рН 6, розчинник випарили до ~1/3 об'єму, осад відфільтрували,

промили водою та висушили. Отримали жовто-коричневий порошок (0,7 г, 77 %). R_f 0,04.

Метил-6-[5-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капроат (6). Сполуку (**4**) (0,4 г, 1,47 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (169 мг, 1,47 ммоль) розчинили у ДМФ (11 мл), додали DCC (0,303 г, 1,46 ммоль) та залишили на ніч при кімнатній температурі. Додали гідрохлорид метил-6-амінокапроату (293 мг, 1,61 ммоль) і NEt_3 (0,2 мл, 1,47 ммоль), перемішали та залишили на 1,5 год (контроль ТШХ). Розчин вилили у воду й екстрагували EtOAc (100 мл). Органічний шар тричі промили водою, висушили над Na_2SO_4 та випарили. Продукт очистили хроматографією на силікагелі у градієнті метанолу (0-3 %) у хлороформі. Отримали жовтий порошок (302 мг, 51 %). R_f 0,86. $T_{\text{пл}}$ 238-240 °С. LC-MS: m/z 400 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). $^1\text{H-NMR}$: δ 10,54 (с, 1H, OH), 8,55 (с, 1H, H-4), 8,31 (т, $J=5,6$ Hz, 1H, NH), 7,55 (д, $J=8,4$, 1H, H-5), 7,1 (д, $J=3,2$ Hz, 1H, фуран), 7,05 (д, $J=3,2$ Hz, 1H, фуран), 6,82 (дд, $J=2$ Hz, $J=8,8$ Hz, 1H, H-6), 6,73 (д, $J=2$ Hz, 1H, H-8), 3,59 (с, 3H, COOCH_3), 3,27 (м, 2H, NCH_2), 2,3 (т, $J=7,6$ Hz, 2H, CH_2CO), 1,60 (м, 4H, $(\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO})$), 1,35 (м, 2H, $(\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO})$).

Метил-6-[5-(7-ацетокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капроат (7). Сполуку (**6**) (0,2 г, 0,5 ммоль) розчинили в сухому піридині (2,5 мл), додали оцтовий ангідрид (0,12 мл, 1,27 ммоль) і залишили при кімнатній температурі на 3 год (контроль ТШХ). Розчин випарили, залишок піридину видалили випарюванням із толуолом. Продукт очистили хроматографією на силікагелі у градієнті метанолу (0-2 %) у CHCl_3 . Отримали жовтий порошок (110 мг, 50 %). R_f 0,98. $T_{\text{пл}}$ 153-155 °С. LC-MS: m/z 442 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). $^1\text{H-NMR}$: δ 8,65 (с, 1H, H-4), 8,37 (уш.с, 1H, NH), 7,80 (д, $J=8,4$ Hz, 1H, H-5), 7,24 (с, д, 2H, H-8, фуран), 7,15 (дд, $J=1,2$ Hz, $J=8,4$ Hz, 1H, H-6), 7,1 (д, $J=3,2$ Hz, 1H, фуран), 3,59 (с, 3H, OCH_3), 3,28 (м, 2H, NCH_2), 2,3 (с+т, 5H, Ac, CH_2CO), 1,60 (м, 4H, $(\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO})$), 1,35 (м, 2H, $(\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO})$).

6-[5-(7-Гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капронова кислота (8). Похідну (**4**) (0,58 г, 2,13 ммоль) та N-гідроксисукцинімід (0,27 г, 2,35 ммоль) розчинили у ДМФ (15 мл) і додали DCC (0,474 г, 2,3 ммоль).

Після закінчення активації (ніч при кімнатній температурі) додали 6-амінокапронову кислоту (0,33 г, 2,52 ммоль) і перемішували суміш протягом доби при кімнатній температурі. Суміш вилили у воду та екстрагували EtOAc (150 мл), екстракт профільтрували, тричі промили водою, висушили над Na₂SO₄ та випарили. Одержали 1,1 г коричневої речовини. Сирій кумарин ацилювали та очистили ацетокси-похідну (**9**), як описано нижче. Очищену сполуку (**9**) (130 мг, 0,31 ммоль) гідролізували обробкою аміаком (10 %, 20 мл) протягом 20 хв, нейтралізували розведеною соляною кислотою. Розчин екстрагували EtOAc (100 мл), екстракт перемішували 3 год із активованим вугіллям, профільтрували, промили водою, органічний шар висушили над сульфатом натрію та випарили. Отримали жовто-коричневий порошок (112 мг, 96 %). R_f 0,06. T_{пл} 280 °C. LC-MS: *m/z* 384 ([M-1]). ¹H-ЯМР: δ 11,8 (с, 1H, COOH), 10,56 (с, 1H, OH), 8,58 (с, 1H, H-4), 8,33 (т, J=6 Hz, 1H, NH), 7,58 (д, J=8,4 Hz, 1H, H-5), 7,14 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 7,10 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 6,83 (дд, J=2 Hz, J=8,4 Hz, 1H, H-6), 6,75 (д, J=2 Hz, 1H, H-8), 3,29 (м, 2H, NCH₂), 2,23 (т, J=7,2 Hz, 2H, CH₂CO), 1,61 (м, 4H, (NCH₂CH₂CH₂CH₂CO)), 1,4 (м, 2H, (N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CO)).

6-[5-(7-Ацетокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капронова кислота (**9**). Неочищену сполуку (**8**) (1,1 г) висушили двократним упарюванням із сухим піридином, розчинили у 8 мл цього ж розчинника, додали оцтовий ангідрид (0,6 мл, 6,3 ммоль) та витримали 1,5 год при кімнатній температурі. Суміш випарили у вакуумі, залишок піридину видалили випарюванням із толуолом. Продукт очистили хроматографією на силікагелі у градієнті 0-4 % метанолу в CHCl₃. Одержали аморфний коричневий порошок (0,25 г, 20 %). R_f 0,15. LC-MS: *m/z* 426 ([M-1]). ¹H-ЯМР: δ 11,8 (с, 1H, COOH), 8,67 (с, 1H, H-4), 8,39 (т, J=6 Hz, 1H, NH), 7,82 (д, J=8,4 Hz, 1H, H-5), 7,24 (м, 2H, H-8, фуран), 7,15 (дд, J=2 Hz, J=8,4 Hz, 1H, H-6), 7,10 (д, J=3,2 Hz, 1H, фуран), 3,29 (м, 2H, NCH₂), 2,33 (с, 3H, Ac), 2,21 (т, J=7,2, 2H, CH₂CO), 1,60 (м, 4H, (NCH₂CH₂CH₂CH₂CO)), 1,4 (м, 2H, (N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CO)).

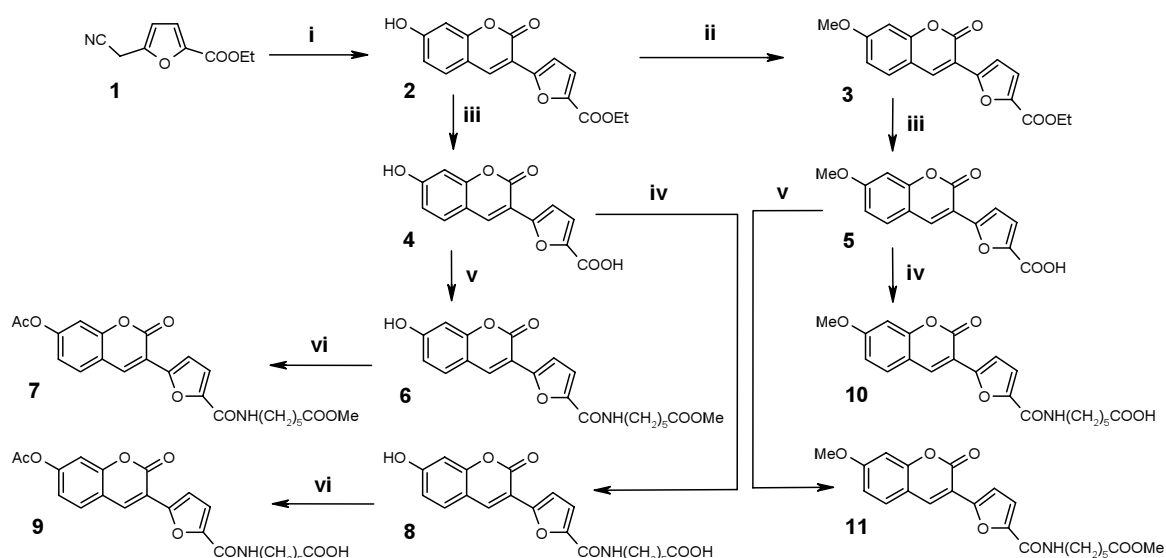
6-[5-(7-Метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капронова кислота (**10**).

Синтез провели за методикою, описаною для сполуки (**8**). Очистку виконали хроматографією на силікагелі у градієнті 0-4 % метанолу в хлороформі. Одержали 148 мг жовтого порошку (30 %). R_f 0,13. T_{пл} 201-202 °C. LC-MS: *m/z* 398 ([M-1]). ¹H-ЯМР: δ 11,8 (с, 1H, COOH), 8,62 (с, 1H, H-4), 8,34 (т, J=6,2 Hz, 1H, NH), 7,69 (д, J=8,8 Hz, 1H, H-5), 7,17 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 7,10 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 7,01 (д, J=2,4 Hz, 1H, H-8), 6,97 (дд, J=2,4 Hz, J=8,8 Hz, 1H, H-6), 3,9 (с, 3H, OCH₃), 3,3 (м, 2H, NCH₂), 2,23 (т, J=7,4 Hz, 2H, CH₂CO), 1,60 (м, 4H, (NCH₂CH₂CH₂CH₂CO)), 1,35 (м, 2H, (N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CO)).

Метил-6-[5-(7-метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фурил-2-карбоксамідо]капроат (**11**). Синтез провели аналогічно до сполуки (**6**). Продукт очистили хроматографією на силікагелі у градієнті 75-100 % CHCl₃ у гексані. Відповідні фракції випарили у вакуумі, отримали жовтий порошок (206 мг, 60 %). R_f 0,96. T_{пл} 136-137 °C. LC-MS: *m/z* 414 ([M+H]⁺). ¹H-ЯМР: δ 8,58 (с, 1H, H-4), 8,3 (с, 1H, NH), 7,65 (д, J=8,4 Hz, 1H, H-5), 7,15 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 7,07 (д, J=3,6 Hz, 1H, фуран), 6,98 (д, J=2,4 Hz, 1H, H-8), 6,94 (дд, J=2,4 Hz, J=8,4 Hz, 1H, H-6), 3,9 (с, 3H, CH₃O), 3,59 (с, 3H, COOCH₃), 3,28 (м, 2H, NCH₂), 2,3 (т, J=7,6 Hz, 2H, CH₂CO), 1,60 (м, 4H, (NCH₂CH₂CH₂CH₂CO)), 1,35 (м, 2H, (N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CO)).

Результати та обговорення. Комерційно доступні зонди на основі кумаринів із випромінюванням у блакитній частині спектра, що використовуються для біологічних і медичних досліджень, мають відносно слабку флуоресценцію. Як уже зазначалося, флуоресцентні характеристики кумаринів часто покращуються при введенні гетарильного замісника в положення С-3 [27]. Ми вирішили одержати 3-фурилкумарини із інтенсивною емісією, придатні для ковалентного мічення біомолекул. На першому етапі провели порівняння інтенсивності флуоресценції серії кумаринів і відібрали етиловий естер 5-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)фуран-2-карбонової кислоти (**2**) як базову структуру, на основі якої надалі синтезували похідні, що містять карбоксіалкільний лінкер. У його ролі використали 6-амінокапронову кислоту, яку вводили через амідний зв'язок у положення С-2 фурано-

Синтез похідних 3-фурилкумарину



i. (1) 2,4-дигідроксибензальдегід, піперидин, *i*PrOH; (2) HCl-HOAc 1:1; **ii.** Me_2SO_4 , Na_2CO_3 , ацетон; **iii.** NaOH; **iv.** $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$, HONSu, DCC, ДМФ; **v.** $\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{COOMe}$, HONSu, DCC, NEt_3 , ДМФ; **vi.** Ac_2O , Py.

вого ядра. Таке розташування лінкера обумовлене простою синтезу реагентів і мінімальним впливом замісника на флуоресценцію хромофору. Карбоксиалкільні реагенти після відповідної активації можуть селективно взаємодіяти з аміноалкіль-олігонуклеотидами та іншими амінами. Оскільки реагенти містять кислотний протон, порівнювати їхні спектральні характеристики з відповідними властивостями нейтральних кон'югатів не зовсім коректно. Тому для контролю одержали нейтральні естери карбоксипохідних кумаринів. Стратегію синтезу реагентів представлено на схемі 1.

7-Гідрокси-3-фурилкумарини отримують конденсацією *n*-гідроксисаліцилового альдегіду з фурилоцтовими кислотами [31] чи ціанметилфуранами [31, 32]. Останній підхід виявився єдиним описаним методом одержання ключового кумарину (2), який синтезували реакцією 2,4-дигідроксибензальдегіду з етил-5-ціанметил-2-фууроатом (1) в ізопропанолі в присутності піперидину. Проміжний імінокумарин гідролізували сумішшю концентрованих оцтової та соляної кислот. Ця сполука малорозчинна у водно-органічних системах, тому гетерогенна реакція перебігала повільно. Фурани відносно нестійкі в кислому середовищі та легко окислюються, що утруднює роботу з

ними. 7-Метоксипохідну (3) отримали метилюванням кумарину (2) диметилсульфатом в ацетоні з використанням Na_2CO_3 як основи. Гідроліз естерної групи фурилкумарину (2) з утворенням кислоти (4) провели у ~3% водному NaOH. Метоксипохідна (3), на відміну від сполуки (2), не розчинна в цій системі, тому кислоту (5) одержали у водно-метанольному (4:9) розчині луку.

Для введення лінкера використали активацію COOH-групи системою дициклогексилкарбодіімід—*N*-гідроксисукцинімід. Активовані естери кислот (4) та (5) синтезували у ДМФ із використанням 10% надлишку DCC і HONSu. Після їхньої конденсації із 6-амінокапроновою кислотою (20% надлишок) отримали сполуки (8) і (10), що містять вільну COOH групу на відносно довгому лінкері. У процесі цієї реакції спостерігалось утворення невеликої кількості побічних продуктів, що містять два та три залишки амінокислоти. Причиною цього є надлишок DCC, здатний активувати COOH-групу продукту чи амінокапронової кислоти. Проблеми можна уникнути за допомогою хроматографічної очистки активованих естерів, проте в цій роботі очищали продукти конденсації. Виявилось, що легше очищати 7-ацетоксипохідні, ніж гідрокси-аналоги, оскільки менш полярні сполуки мають кращі хрома-

Спектральні характеристики кумаринових реагентів у метанолі

| Сполука | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| λ_{abs} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) | 280 (10,00) 383 (24,45) | 269 (11,05) 368 (23,15) | 280 (9,05) 382 (22,20) | 269 (9,85) 368 (22,70) | 277 (9,15) 380 (22,25) | 277 (11,05) 380 (21,45) |
| λ_{em} , нм | 446 | 429 | 446 | 429 | 443 | 443 |

тографічні характеристики. Тому для виділення сполуки (8) продукти конденсації кумарину (4) та амінокапронової кислоти проацилювали й виділили ацетокси похідну (9), а вже після її гідролізу отримали реагент (8).

Для синтезу метилових естерів (6) і (11) у реакцію з активованими естерами кислот (4) та (5) вводили гідрохлорид метил-6-амінокапроату в присутності триетиламіну. Перебіг реакцій відбувався швидко та без утворення побічних продуктів. Ацилюванням фенольного гідроксилу гідроксикумаринів (6) і (8) оцтовим ангідридом у піридині отримали ацетильні похідні (7) та (9). Усі сполуки, за винятком (8), очищували хроматографією на силікагелі.

Будову отриманих сполук підтверджено за допомогою мас-спектрометрії та ЯМР. Спектрофлуоресцентні характеристики кумаринів наведено в табл. 1. Спектри поглинання всіх сполук подібні й характеризуються двома смугами в УФ- та видимій області. Метилювання 7-ОН-групи майже не впливає на положення максимумів поглинання, ацилювання ж гіпсохромно зсуває довгохвильовий максимум на 14-15 нм, а короткохвильовий — на 11 нм. Виявилось, що естерифікація СООН-групи практично не впливає на спектральні характеристики сполук.

Усі сполуки мають інтенсивну блакитну флуоресценцію. Закономірності залежності положення максимумів випромінювання від структури аналогічні тим, що спостерігаються для спектрів поглинання. Максимуми емісії ацетокси похідних (7) і (9) відрізняються на 17 нм, а метокси похідних (10) та (11) — на 3 нм відносно гідрокси-аналогів (6) і (8). Наявність

кислотної групи не впливає на спектри флуоресценції. Величина Стокового зсуву всіх сполук знаходиться в межах 61-64 нм.

Описані кумаринові похідні, як і інші карбоксильні реагенти, призначені передусім для модифікації високонуклеофільних аліфатичних аміногруп з утворенням амідного зв'язку. Це, наприклад, уведено в олігонуклеотиди аміноалкільні групи, залишки N-кінцевих амінокислот та лізину білків тощо. Для реакції кон'югації потрібно відповідним чином активувати СООН-функцію реагенту. Результати досліджень щодо кон'югації реагентів з аміноалкіл-олігонуклеотидами будуть представлені в наступній публікації. Можлива і реакція активованих карбокси похідних із менш нуклеофільними ароматичними аміногрупами, а також гідроксильними функціями, у т.ч. ковалентне приєднання реагентів до природних нуклеозидів, що теж буде описано окремо.

Отже, в роботі отримано й охарактеризовано серію похідних 3-фурилкумарину, які мають інтенсивну голубу флуоресценцію. Кумаринове ядро одержали конденсацією етил-5-ціанметил-2-фууроату з *n*-гідроксисаліциловим альдегідом, а далі комбінацією реакцій метилювання, ацилювання, гідролізу та конденсації з амінокапроновою кислотою синтезували карбоксиалкільні похідні 7-гідрокси-, 7-метокси- і 7-ацетокси-3-фурилкумарину. Запропоновані реагенти можуть бути ковалентно приєднані до біомолекул через аміно-, а також гідроксильну групу.

Надійшла в редакцію 28.10.2009 р.

Synthesis of carboxyalkyl derivatives of 3-furylcoumarins for the fluorescent labeling of biomolecules

Іа.В. Кувзів¹, V.V. Ishchenko², V.P. Khilya², I.Ya. Dubey¹¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03680, Ukraine² Department of Chemistry, Taras Shevchenko National University
64 Volodymyrska Str., Kyiv, 01033, Ukraine

Summary. Synthesis and spectral properties of a series of fluorescent reagents based on 7-substituted 3-furylcoumarins with intense blue emission that can be covalently linked to oligonucleotides and other biomolecules via carboxyalkyl linker group are described.

Keywords: fluorescent probes, coumarins, covalent labeling, conjugates.

Перелік літератури

1. Wojczewski C., Stolce K., Engels J.W. Fluorescent oligonucleotides — versatile tools as probes and primers for DNA and RNA analysis // *Synlett.* — 1999. — No. 10. — P. 1667-1678.
2. Demchenko A.P. Introduction to fluorescence sensing. — Springer Verlag, 2009. — 590 p.
3. Goncalves M.S.T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes // *Chem. Rev.* — 2009. — Vol. 109, No. 1. — P. 190-212.
4. Soine T.O. Naturally occurring coumarins and related physiological activities // *J. Pharm. Sci.* — 1964. — Vol. 53, No. 3. — P. 231-264.
5. Schapira M., Lamigeon C., Gutmann M., Barthelax A., Huggo N., Colas P. Anti-proliferative compounds deriving from a 3-aryl-coumarin or 3-aryl-quinolin-2-one and uses thereof // Patent EP1860104A1. — 2007.
6. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents // *Curr. Med. Chem. — Anti-Cancer Agents.* — 2005. — Vol. 5, No. 1. — P. 29-46.
7. Kostova I., Raleva S., Genova P., Argirova R. Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors // *Bioinorg. Chem. Appl.* — 2006. — P. 1-9.
8. Martyanov I.V., Zakharova O.D., Sottofattori E., Pyshnyi D.V., Yurchenko E.Y., Babbi P., Mazzei M., Balbi A., Andreola M.L., Litvak S., Tarrago-Litvak L., Nevinsky G.A. Interaction of oligonucleotides conjugated to substituted chromones and coumarins with HIV-1 reverse transcriptase // *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* — 1999. — Vol. 9, No. 5. — P. 473-480.
9. The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies / Ed. by Haugland R.P. // *Invitrogen-Molecular Probes: Eugene, Oregon, 2005.* — 10th Ed. — 1136 p.
10. Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J., Bhalgat N.K., Millard P.J., Mao F., Leung W.-Y., Haugland R.P. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates // *J. Histochem. Cytochem.* — 1999. — Vol. 47, No. 9. — P. 1179-1188.
11. Mergny J.-L., Boutorine A.S., Garestier T., Belloc F., Rougee M., Bulychov N.V., Koshkin A.A., Bourson J., Lebedev A.V., Valeur B., Thuong N.T., Helene C. Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequence // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22, No. 6. — P. 920-928.
12. Zlokarnik G., Negulescu P.A., Knapp T.E., Mere L., Burres N., Feng L., Whitney M., Roemer K., Tsien R.Y. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with β -lactamase as reporter // *Science.* — 1998. — Vol. 279, No. 5347. — P. 84-88.
13. Mitsui T., Nakano H., Yamana K. Coumarin-fluorescein pair as a new donor-acceptor set for fluorescence energy transfer study of DNA // *Tetrahedron Lett.* — 2000. — Vol. 41, No 15. — P. 2605-2608.
14. Ellis-Davies G.C.R. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology // *Nature Methods.* — 2007. — Vol. 4, No. 8. — P. 619-628.
15. Kosiova I., Kois P. Synthesis of novel coumarin based fluorescent probes // The 10th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOS-10), 1-30 November 2006. <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/10/GOS/a027/a027.pdf>
16. Somoza M.M., Andreatta D., Murphy C.J., Coleman R.S., Berg M.A. Effect of lesions on the dynamics of DNA on the picosecond and nanosecond timescales using a polarity sensitive probe // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — Vol. 32, No. 8. — P. 2494-2507.
17. Houstone P., Kodadek T. Spectrophotometric assay for enzyme-mediated unwinding of double-stranded DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — Vol. 91, No. 12. — P. 5471-5474.
18. Zhang P., Beck T., Tan W. Design of a molecular beacon DNA probe with two fluorophores // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2001. — Vol. 40, No. 2. — P. 402-406.
19. Ortiz E., Estrada G., Lizardi P.M. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons // *Mol. Cell. Probes.* — 1998. — Vol. 12, No. 4. — P. 219-226.
20. Kosiova I., Kovackova S., Kois P. Synthesis of coumarin-nucleoside conjugates via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition // *Tetrahedron.* — 2007. — Vol. 63, No. 2. — P. 312-320.
21. Seela F., Xiong H., Leonard P., Budow S. 8-Aza-7-deazaguanine nucleosides and oligonucleotides with octadiynyl side chains: synthesis, functionalization by the azide-alkyne click reaction and nucleobase specific fluorescence quenching of coumarin dye conjugates // *Org. Biomol. Chem.* — 2009. — Vol. 7, No. 7. — P. 1374-1387.
22. Kosiova I., Janicova A., Kois P. Synthesis of coumarin or ferrocene labeled nucleosides via Staudinger ligation // *Beilstein J. Org. Chem.* — 2006. — Vol. 2, No. 23. — P. 1-4.
23. Leung W.Y., Trobridge P.A., Haugland R.P., Haugland R.P., Mao F. 7-Amino-4-methyl-6-sulfocoumarin-3-acetic acid: a novel blue fluorescent dye for protein labeling // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 1999. — Vol. 9, No. 15. — P. 2229-2232.

24. Baburaj K., Azam N., Udgaonkar D., Durani S. HOCGO and DMACGO. Two coumarin derived α -dicarbonyls suitable as pH and polarity sensitive fluorescent reporters for proteins that can be targeted at reactive arginines // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1994. — Vol. 1199, No. 1. — P. 253-265.
25. Lemieux G.A., de Graffenried C.L., Bertozzi C.R. A fluorogenic dye activated by the Staudinger ligation // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — Vol. 125, No. 16. — P. 4708-4709.
26. Sun W.C., Gee K.R., Haugland R.P. Synthesis of novel fluorinated coumarins: excellent UV-light excitable fluorescent dyes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 1998. — Vol. 8, No. 22. — P. 3107-3110.
27. Takechi H., Oda Y., Nishizono N., Oda K., Machida M. Screening search for organic fluorophores: syntheses and fluorescence properties of 3-azolyl-7-diethylaminocoumarin derivatives // *Chem. Pharm. Bull.* — 2000. — Vol. 48, No. 11. — P. 1702-1710.
28. Кузів Я.Б., Іщенко В.В., Хилія В.П., Дубей І.Я. Синтез реагентів на основі 7-заміщених 3-тіазолілкумаринів для ковалентного мічення олігонуклеотидів // *Ukr. Bioorg. Acta.* — 2008. — Т. 6, No. 1. — С. 3-12.
29. Ароян А.А., Африкян В.Г., Бабиан Н.А., Мджоян О.Л., Татевосян В.Г. Метилловий ефір 5-ціанметилфуран-2-карбонової кислоти // Синтезы гетероциклических соединений. — 1957. — Вып. 2. — С. 50-52.
30. McKay A.F., Tarlton E.J., Petri S.I., Steyermark P.R., Mosley M.A. Amino Acids. V. 1,3-Di-(ω -carboxyalkyl)-thioureas and their chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* — 1958. — Vol. 80, No. 6. — P. 1510-1517.
31. Bensten J.G., Mickelson C.A., Knudson O.B., Lewandowski K.M. Fluorogenic compounds and uses therefor // United States Patent 6566508. — 2003.
32. Shablykina O.V., Khilya O.V., Ishchenko V.V., Khilya V.P. 3-(2-Quinolyl)- and 3-(5-carbethoxyfuryl-2)coumarins // *Chem. Nat. Comp.* — 2005. — Vol. 41, No. 5. — P. 529-532.