

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

---

На правах рукописи

**ЦАРЬКОВА Александра Сергеевна**

**Синтез люциферина люминесцентного червя  
*Fridericia heliota* и его аналогов**

Специальность 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель  
к.х.н. Ямпольский Илья Викторович

Москва – 2015г.

*Feci quod potui faciant meliora potentes*

## Содержание

Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы .....	5
1.1 Основные природные люциферины и методы их синтеза .....	5
1.1.1 D-люциферин. Структура, билюминесценция и синтез.....	5
1.1.2 Люциферин рачков <i>Scyridina</i> . Структура, механизм билюминесценции и синтез. ....	10
1.1.3 Целентеразин. Структура, билюминесценция и синтез.....	16
1.1.4 Люциферины динофлагеллят и рачков эвфаузиид. Структура и билюминесценция.....	22
1.1.5 Люциферин бактерий. Структура и билюминесценция.....	27
1.1.6 Люциферин брюхоногого моллюска <i>Latia neritoides</i> . Структура, билюминесценция и синтез. ....	30
1.1.7 Люциферин кольчатых червей <i>Diplocardia longa</i> . Структура, билюминесценция и синтез. ....	33
1.2. Синтетические аналоги природных люциферинов и их применение. ....	35
1.2.1 Синтетические аналоги D-люциферина. ....	36
1.2.1.1 Первые аналоги D-люциферина, аминолуциферины. ....	37
1.2.1.2 Аналоги D-люциферина, имеющие в своем составе ароматический фрагмент, отличный от бензотиазола.....	42
1.2.2 Синтетические аналоги целентеразина.....	48
1.2.2.1 Аналоги целентеразина .....	50
1.3 Заключение.....	59
Глава 2. Результаты и обсуждение.....	60
2.1 Введение. Выделение и очистка компонентов билюминесцентной системы почвенного червя <i>Fridericia heliota</i> . ....	60
2.2 Синтез люциферина и его аналогов.....	62
2.2.1 Синтез и свойства природного аналога люциферина CompX.....	62
2.2.2 Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn2.....	67

2.2.3	Синтез и свойства люциферина <i>F. heliota</i> .....	72
2.2.4	Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn7.....	81
2.2.5	Обсуждение .....	85
Глава 3. Экспериментальная часть.....		87
3.1	Материалы и оборудование.....	87
3.2	Синтез .....	88
3.2.1	Синтез аналога люциферина CompX.....	88
3.2.2	Синтез аналога люциферина AsLn2.....	90
3.2.3	Синтез природного люциферина и его изомеров.....	93
3.2.4	Синтез аналога люциферина AsLn7.....	99
Выводы .....		101
Благодарности .....		102
Список сокращений и условных обозначений.....		103
Список литературы.....		105

## Введение

Билюминесценция – это явление излучения света живыми организмами. Основную роль в процессе билюминесценции играют фермент – люцифераза, и субстрат, называемый люциферин, при окислении которого происходит образование оксилуциферина в возбужденном состоянии с последующим испусканием видимого света. По современным оценкам существует около 30 различных химических механизмов билюминесценции, однако на сегодняшний день известны структуры лишь семи природных люциферин, последняя из которых была расшифрована более 25 лет назад.

Явление билюминесценции находит сегодня широкое применение в различных областях для решения большого круга практических задач. В экологии эффект билюминесценции используется для мониторинга окружающей среды [Alloush, Lewis, Salisbury, 2006; Girotti и др., 2008], в медицине - для проведения клинических анализов, в фармацевтике - для скрининга лекарственных кандидатов [Rudin, Weissleder, 2003]. В фундаментальных биохимических исследованиях билюминесценция применяется для визуализации физиологических процессов, происходящих в клетках и целых организмах, а также для определения различных аналитов, в первую очередь - АТФ, кальция, ферментов, антител, антигенов [Roda и др., 2009]. На сегодняшний день одним из важнейших методов билюминесцентного анализа является билюминесцентный имиджинг (BLI) – технология неинвазивного мониторинга молекулярных и клеточных процессов *in vivo*, в клетках и целых животных [Andreu, Zelmer, Wiles, 2011; Almeida de, Rappard van, Wu, 2011; Luker, Luker, 2008a, 2008b].

Применение билюминесценции для исследования живых систем наложило множество ограничений на строение и свойства используемых веществ. В связи с этим, актуальным направлением исследований в области билюминесценции является поиск новых систем, которые можно использовать для визуализации и мониторинга процессов жизнедеятельности клеток и организмов.

Настоящая работа посвящена изучению компонентов билюминесцентной системы нового билюминесцентного вида почвенных червей *Fridericia heliota*, установлению структуры и синтезу люциферина этой системы, а также установлению структур и синтезу ряда природных аналогов нового люциферина.

## Глава 1. Обзор литературы

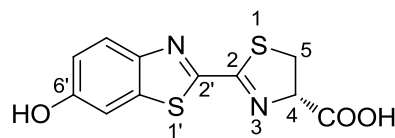
### 1.1 Основные природные люциферины и методы их синтеза

Из тридцати существующих билюминесцентных систем всего для семи удалось выделить и полностью расшифровать химические структуры люциферинов – субстратов ферментативной реакции билюминесценции, и лишь для некоторых из них были секвенированы гены ферментов - люцифераз либо фотопротеинов. Наиболее подробно изученными на сегодняшний день люциферинами являются имидазопиразинон целентеразин и бензотиазол D-люциферин, нашедшие повсеместное применение в широком спектре аналитических приложений.

В первой части настоящего обзора мы опишем структуры расшифрованных на данный момент люциферинов, методы их синтеза, а также механизмы билюминесцентных реакций с их участием.

#### 1.1.1 D-люциферин. Структура, билюминесценция и синтез.

D-люциферин ((S)-2-(6'- гидрокси-2'-бензотиазолил)тиазолин-4-карбоновая кислота **1.1**) – это природный субстрат фермента люциферазы (Luc), катализирующего испускание желто-зеленого света светлячками *Photinus pyralis* [White и др., 1971] (Рис.1.1). Помимо светлячков рода *Photinus* билюминесценцией обладают и другие насекомые семейства *Lampyridae*, длины волн свечения которых лежат в диапазоне от желто-зеленого (560 нм) до красного (620 нм) цветов [Seliger, McElroy, 1964; Viviani, 2002]. Различные виды светлячков обладают различными ферментами-люциферазами, однако субстратом для них выступает одно соединение - D-люциферин (**1.1**).



**1.1**  
**D-люциферин**

Рисунок 1.1 Люциферин светлячков семейства *Lampyridae* (D-люциферин).

Механизм реакции билюминесценции светлячков был всесторонне изучен различными исследовательскими группами [Hopkins и др., 1967; Koo, Schmidt, Schuster, 1978; Shimomura, Goto, Johnson, 1977; White и др., 1969, 1971; White, Miano, Umbreit, 1975]. Ими были установлены структуры всех компонентов, интермедиатов и продуктов билюминесцентной

реакции. Согласно работам этих исследователей, на первом этапе реакции биолюминесценции люцифераза связывает D-люциферин и катализирует образование активированного субстрата – аденилата люциферина – в присутствии ионов магния (Схема 1.1). На следующем этапе происходит отщепление протона от альфа-положения карбоксильной группы (С4 тиазолинового кольца D-люциферина) с последующим присоединением молекулярного кислорода к образовавшемуся карбаниону, приводящее к образованию пероксид-аниона люциферина. Затем происходит единовременное отщепление АМФ и циклизация пероксид-аниона, с образованием нестабильного 4-членного цикла - диоксетанона. Реакция завершается электроциклическим распадом диоксетанона с образованием молекулы углекислого газа и кето-формы оксилюциферина в возбужденном состоянии. Переход последней в нормальное состояние сопровождается испусканием света.

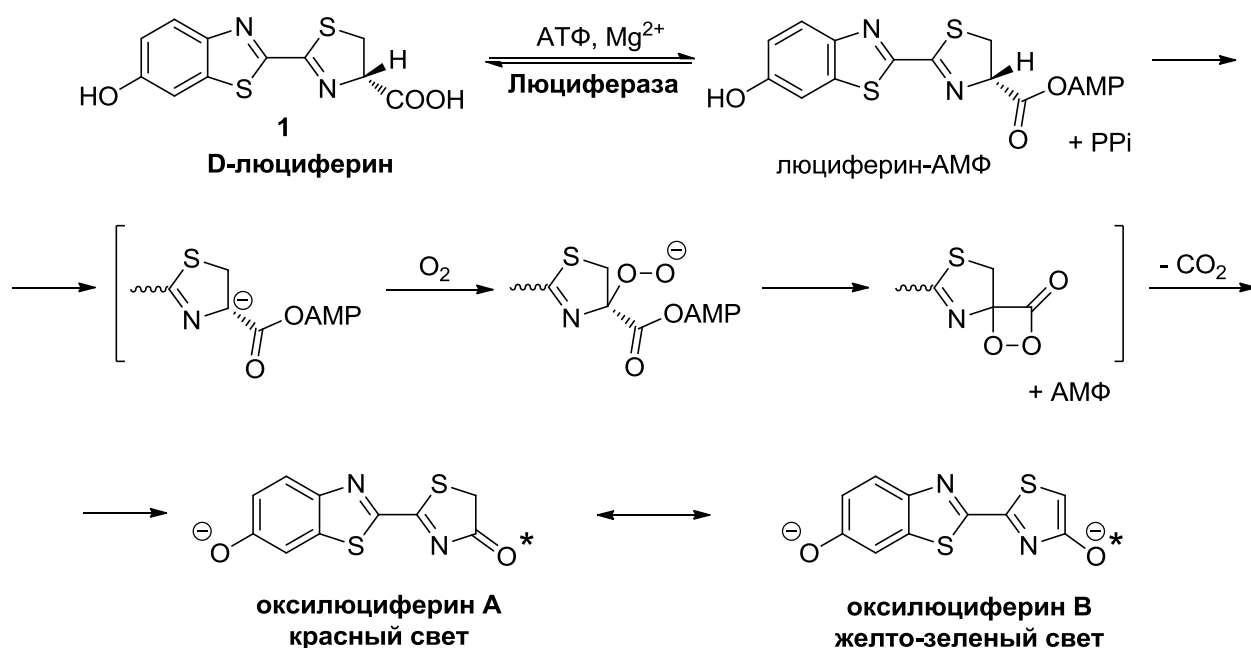


Схема 1.1 Механизм биолюминесценции светляков.

На сегодняшний день механизм лежащий в основе «многоцветности» биолюминесценции светляков остается нераскрытым. Несмотря на то, что реакционный путь, структуры субстратов и продуктов люминесцентной реакции для всех биолюминесцентных насекомых одинаковы, достаточно небольших изменений в строении активного центра люциферазы для смещения длины волны излучаемого света от желто-зеленого в красную область спектра [Nakatsu и др., 2006; Viviani, 2002]. Более того, оксилюциферин светлячков способен к кето-енольной таутомерии, а соотношение таутомеров зависит от рН среды: в щелочных условиях

преобладает енольная форма с максимумом испускания в желто-зеленой области спектра (~ 560 нм), при подкислении среды максимум спектра испускания смещается в более длинноволновую область (~ 620 нм) [Milne, Marques, Nogueira, 2010; Silva Da, Silva Da, 2011].

Структура D-люциферина (**1.1**) была впервые определена еще в 1961 году Уайтом и коллегами [White и др., 1961], и затем подтверждена встречным синтезом из *пара*-анизидаина в 1963. (Схема 1.2) [White, McCapra, Field, 1963].

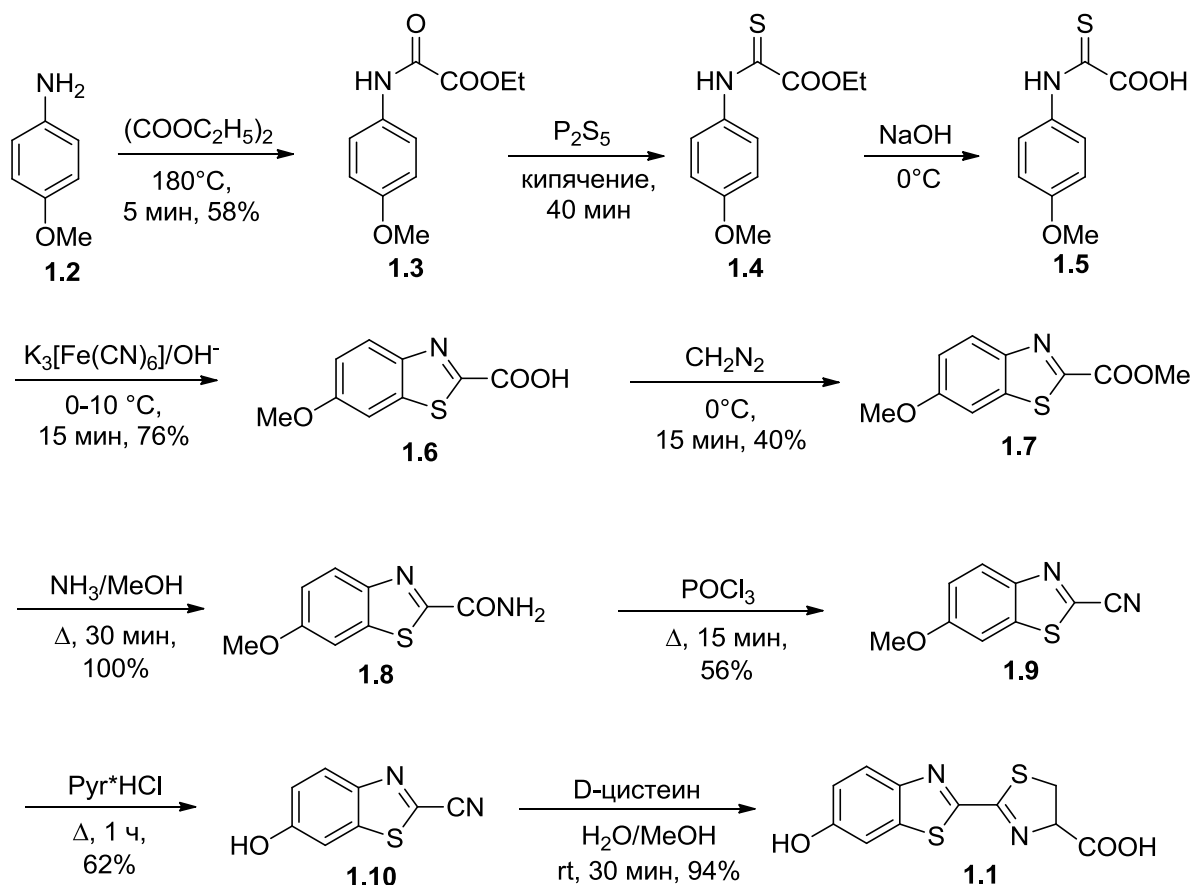


Схема 1.2. Первый синтез D-люциферина (**1.1**) из *пара*-анизидаина (**1.2**).

Общий выход первого девятистадийного синтеза люциферина светлячков из *пара*-анизидаина составил 9%. Ключевым интермедиатом в синтезе, предложенном Уайтом, является 2-циано-6-гидроксibenзотиазол **1.10**, получаемый деметилированием 2-циано-6-метоксибензотиазола **1.9** в процессе сплавления с гидрохлоридом пиридина при  $220^\circ\text{C}$ . С целью увеличить конечный выход люциферина группой японского исследователя Сето [Seto, Ogura, Nishiyama, 1963] был предложен альтернативный метод синтеза одного из синтетических предшественников гидроксibenзотиазола (**1.10**) - 6-метоксибензотиазол-2-карбоксамид (**1.8**) из *n*-анизидаина и карбамоилтиокарбонилтиоуксусной кислоты (Схема 1.3). Существенным ограничением для этой реакции являлась низкая стабильность последнего



соединения, в связи с чем его готовили *in situ* [Bowie, 1978]. Метод Сето позволил увеличить общий выход цианобензотиазола **1.9** из *n*-анизидина до 39%.

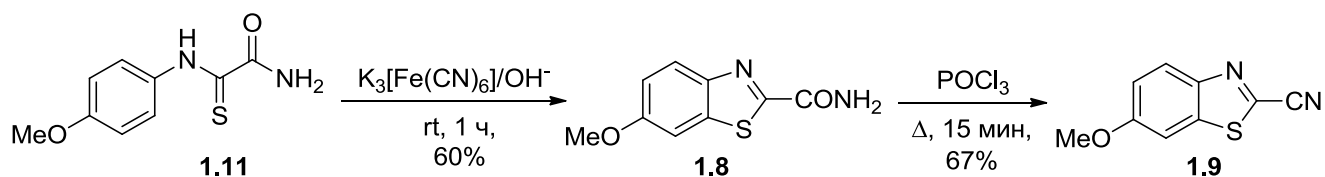


Схема 1.3. Синтез 6-метоксибензотиазол-2-карбоксамиды (**1.8**).

Другим подходом к синтезу 2-циано-6-метоксибензотиазола (**1.9**) из *para*-анизидина (**1.2**) стало использование реакции Зандмейера. Первым этапом данного метода являлось получение из *n*-анизидина 2-амино-6-метоксибензотиазола (**1.12**) [Stuckwisch, 1949], с последующим синтезом его 2-хлор-производного (**1.13**) (Схема 1.4). Последующая реакция **1.13** с цианидом калия в DMSO приводила, в свою очередь, к получению нитрила **1.9** [White и др., 1965]. Еще одним вариантом использования реакции Зандмейера стало прямое введение цианогруппы в аминобензотиазол **1.12** сочетанием цианидов меди (I) и калия с увеличением выхода до 41% [Тоуа и др., 1992].

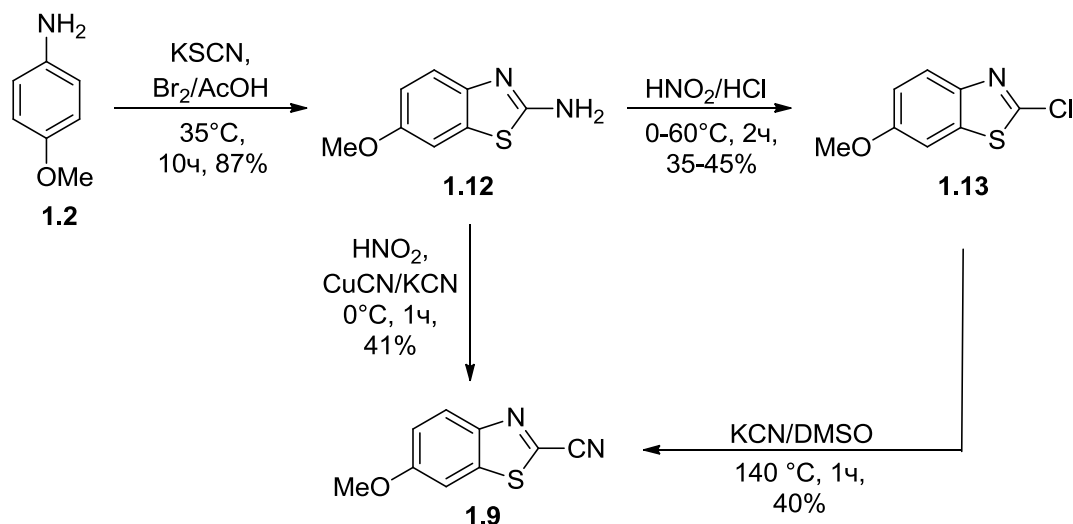


Схема 1.4. Синтез 2-циано-6-метоксибензотиазола **1.9** с использованием реакции Зандмейера.

В 2012 году группой исследователей из Калифорнийского университета был описан новый подход к синтезу цианобензотиазола **1.9** с использованием хлорида дитиазолия, также известного как соль Аппеля (Схема 1.5) [McCutcheon и др., 2012]. В описываемом методе соль

Аппеля конденсировали с ариламином **1.2**, при комнатной температуре и получаемый иминодитиазол **1.14** легко расщеплялся под действием различных нуклеофилов с образованием тиоформамида **1.15** [Cuadro, Alvarez-Buila, 1994], который затем циклизовали в цианобензотиазол **1.9**. Этот подход позволил значительно сократить путь синтеза нитрила **1.9**, а также многократно увеличить его общий выход (84%) по сравнению с методикой, предложенной Уайтом (9%).

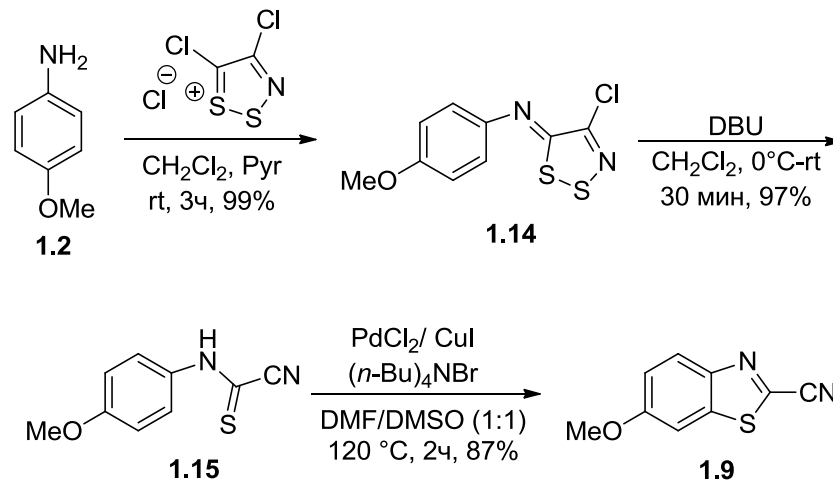
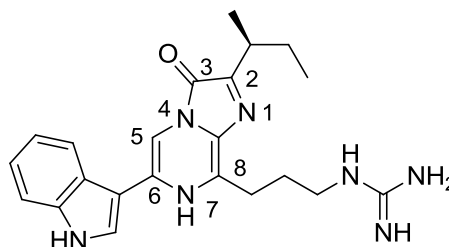


Схема 1.5. Современный метод синтеза D-люциферина.

### 1.1.2 Люциферин рачков *Cypridina*. Структура, механизм биолюминесценции и синтез.

Наиболее широко явление биолюминесценции распространено среди морских организмов. Несмотря на то, что на сегодняшний день полностью изучена лишь малая часть морских биолюминесцентных систем, известно, что в реакциях биолюминесценции глубоководных организмов наиболее типичными субстратами являются имидазопиразиновые люциферины: целентеразин и люциферин *Cypridina* (варгулин) **1.16** (Рис. 1.2) [Campbell, Herring, 1990]. Последний был обнаружен в двух видах рачков рода *Cypridina*, откуда этот люциферин и получил свое название, а также в трех различных видах рыб: *Porichthys*, *Apogon* и *Parapriacanthus*. В структуре люциферина *Cypridina* **1.16** можно различить остатки трех модифицированных аминокислот: триптофана, изолейцина и аргинина [Kato и др., 2004].



**1.16**  
люциферин *Cypridina*  
(варгулин)

Рисунок 1.2. Структура люциферина рачков *Cypridina* (варгулина).

В 1968 году группа японских ученых предложила механизм окислительного декарбоксилирования люциферина *Cypridina hilgendorffii* на основании результатов, полученных при исследовании хемилюминесценции его аналогов в апротонных растворителях [Goto, 1968; Goto, Inoue, Sugiura, 1968; Shimomura, Johnson, 1971]. В 2000х годах этот механизм был подтвержден исследователями Кондо и Хирано. [Hirano и др., 2008; Kondo и др., 2005].

Согласно предложенному Гото механизму, первым этапом является депротонирование N7-атома азота имидазопиразинового кольца люциферина, которое приводит к образованию аниона (Схема 1.6). На следующем этапе после переноса электрона с аниона люциферина на кислород формируются короткоживущие люциферин-радикал и супероксиданион-радикал  $O_2^{\cdot-}$ .

Рекомбинация радикала люциферина и супероксид анион-радикала приводит к образованию пероксид-аниона люциферина [McSara, 2000]. На следующем этапе происходит циклизация пероксид-аниона, с образованием четырехчленного диоксетанона, в результате распада которого происходит формирование возбужденного состояния продукта и

высвобождение молекулы  $\text{CO}_2$ , сопровождающееся испусканием света с максимумом эмиссии при 453 нм.

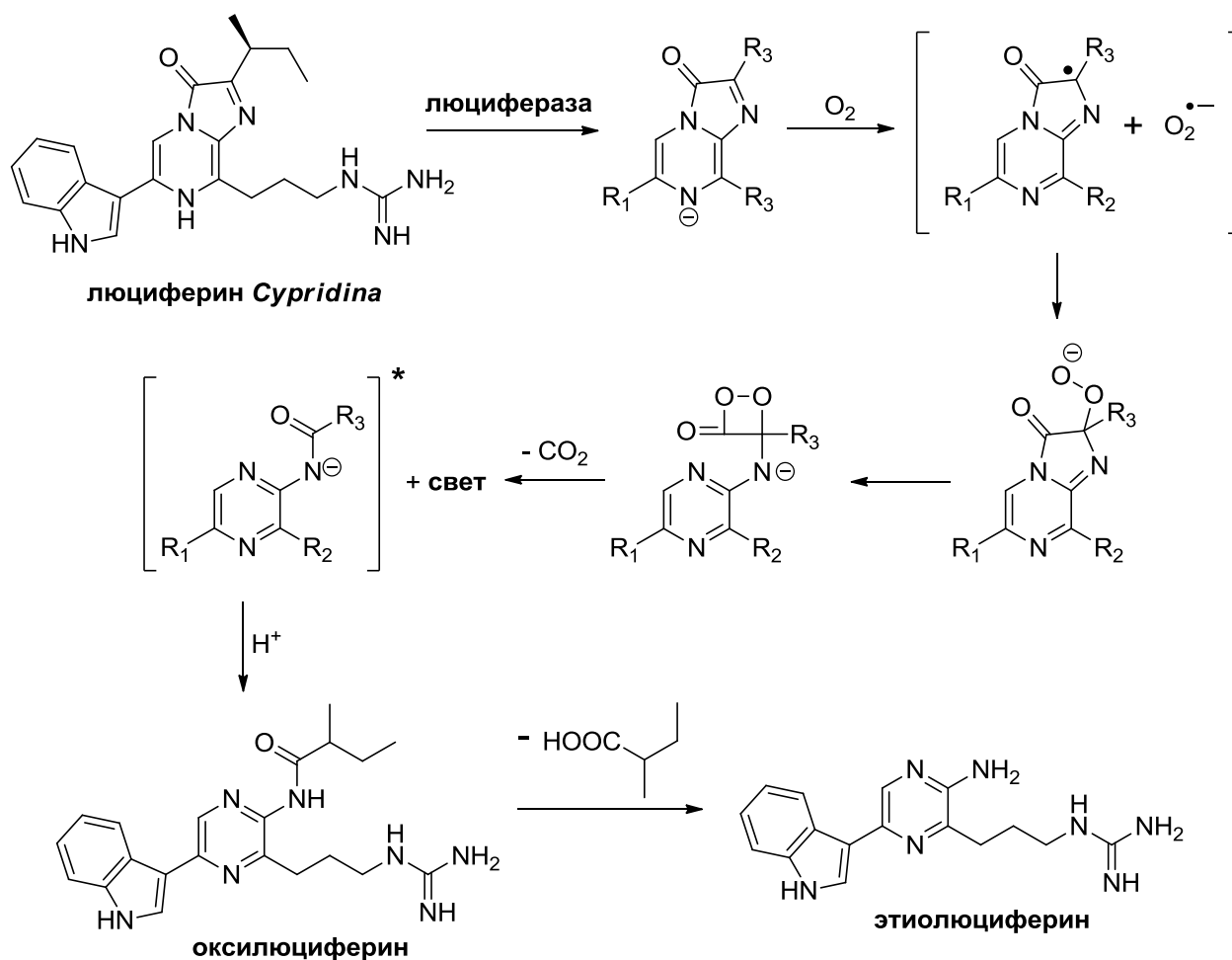


Схема 1.6 Механизм реакции био- и хемилюминесценции люциферина рачков *Cypridina*.

Работа, направленная на выделение и определение химической структуры люциферина рачков *Cypridina*, была начата в середине пятидесятых годов Шимомурой, однако в силу низкой стабильности этого модифицированного трипептида эта задача заняла несколько лет [Shimomura, Goto, Hirata, 1957]. Химическая структура люциферина рачков была установлена группой японских ученых под руководством Киши в 1966 году [Kishi и др., 1966]. Тогда авторами было установлено, что *втор*-бутильный заместитель во втором положении имидазопиразинона имеет ту же конфигурацию, что и в L-изолейцине. Полный синтез люциферина, подтверждающий его структуру, был предложен группами Киши в конце шестидесятых [Kishi и др., 1969; Sugiura и др., 1969a, 1969b] и Карпетски и Уайта в начале семидесятых годов [Karpetsky, White, 1973; White, Karpetsky, 1971].

Ключевой стадией синтеза Киши являлось получение стабильного предшественника люциферина – этиолуциферамина **1.20**. Для достижения этой цели авторы предложили

использовать реакцию конденсации бисульфита 3-индолилглиоксаля **1.17** и дигидробромида 2-амино-5-бензамидовалерамида **1.18**, получаемого из N-(4,4-диэтоксипентил)бензамида, в результате которой получали бензоилэтиолюциферамин **1.19** (Схема 1.7). Мягкий щелочной гидролиз в метаноле пиразина **1.19** позволил получить этиолюциферамин **1.20**. Следующим этапом в синтезе люциферина стала конденсация соединения **1.20** с изотиомочевинной, приведшая к получению этиолюциферина **1.21**, оказавшегося полностью идентичным продукту деградации природного люциферина *Cypridina*.

Реакция этиолюциферина **1.21** с  $\alpha$ -оксивалериановой кислотой в этаноле с последующим каталитическим гидрированием и циклизацией в инертной атмосфере привели к получению люциферина **1.16** с общим выходом 1.3% [Kishi и др., 1966].

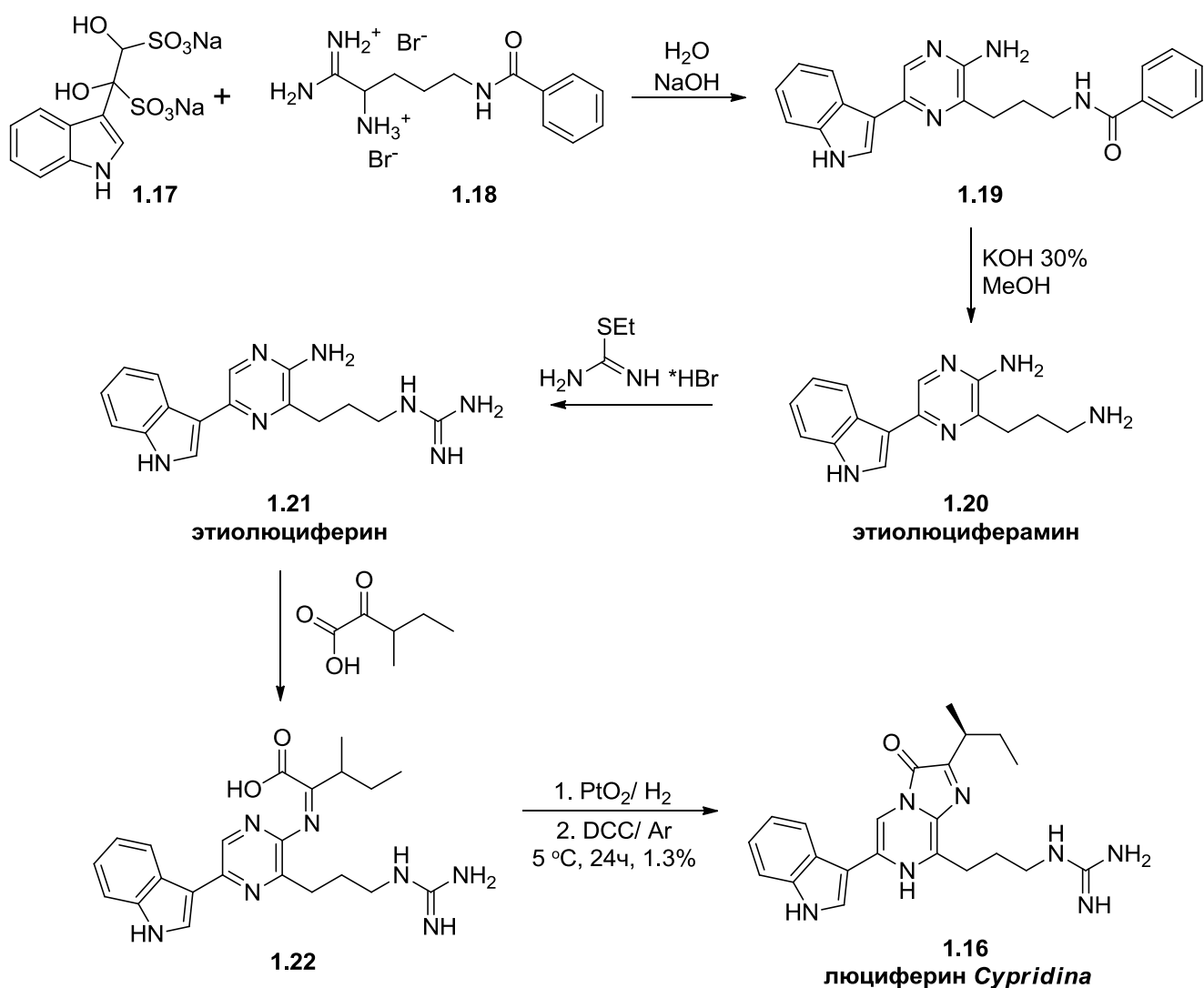


Схема 1.7. Первый синтез люциферина *Cypridina*, предложенный Киши и др.

В начале 70-х годов исследователи Карпетски и Уайт предложили альтернативный подход к синтезу этиолюциферамина **1.20** [White, Karpetsky, 1971]. Авторы обратили внимание на то что конденсация индолилглиоксаля с  $\alpha$ -аминоамидином на первом этапе синтеза люциферина, предложенная группой Киши, предполагает получение двух изомерных продуктов: требуемого пиазина **A** с остатком индола в пятом положении и побочного пиазина **B** с остатком индола в шестом положении цикла (Схема 1.8).

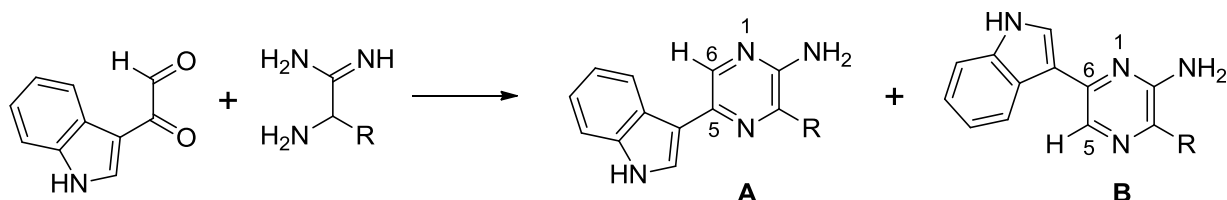


Схема 1.8. Конденсация индолилглиоксаля с  $\alpha$ -аминоамидином.

Чтобы избежать образования побочного изомера, Карпетски и Уайт предложили использовать метод Шарпа и Спринга для синтеза пиазинового кольца [Sharp, Spring, 1951] из  $\alpha$ -оксиминокетона **1.23** и  $\alpha$ -аминонитрила **1.24** в пиридине в присутствии тетрахлорида титана, приводящее к получению единственного продукта – пиазин N-оксида **1.25** (Схема 1.9) [Karpetsky, White, 1973; White, Karpetsky, 1971]. Использование  $\text{TiCl}_4$  позволяет эффективно осуществить нуклеофильное присоединение по карбонильной группе иминокетона **1.23**, не разрушая неустойчивый аминонитрил **1.24**. Дальнейшее восстановление в присутствии никеля Ренея и снятие фталильной защиты позволило получить этиолюциферамин **1.20** с общим выходом около 5%.

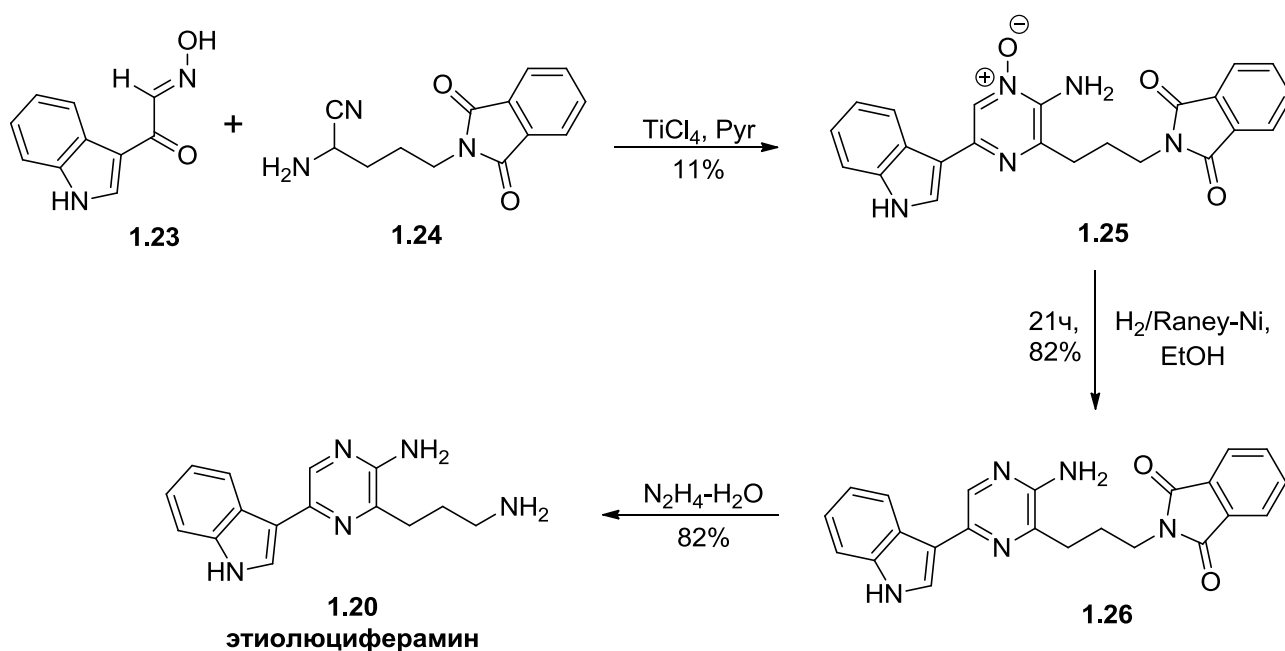


Схема 1.9 Подход к синтезу этиолюциферамина **1.20**, предложенный Карпетски и Уайтом.

Развитие методов палладиевого катализа в органической химии обеспечило возможность альтернативного подхода к синтезу люциферина Cypridina и его производных. В 2000 году Накамура и коллеги впервые использовали реакцию Сузуки для синтеза люциферина Cypridina [Nakamura и др., 2000]. Важным этапом этого метода является катализируемая комплексами палладия конденсация 5-бромопиразина **1.27**, получаемого в 3 стадии из коммерчески доступного 2-аминопиразина **1.29** [Sato, 1982; Sonogashira, 1991], с *N*-тозиллиндолил-3-бороновой кислотой **1.28** приводящая к получению предшественника люциферина Cypridina **1.32** с выходом 80% (Схема 1.10). Последующее удаление *tert*-бутилоксикарбонильной защиты с аминогруппы позволило получить гидрохлорид этиолюциферамина **1.20** с высоким выходом. Затем, из этиолюциферамина **1.20** был получен этиолюциферин **1.21** с количественным выходом, при использовании гидрохлорида 1*H*-пиразол-1-карбоксамидина в качестве гуанидилирующего агента [Bernatowicz, Wu, Matsueda, 1992]. Дальнейшая циклизация этиолюциферина с кетоацеталем привела к получению люциферина Cypridina **1.16** с общим выходом 24%.

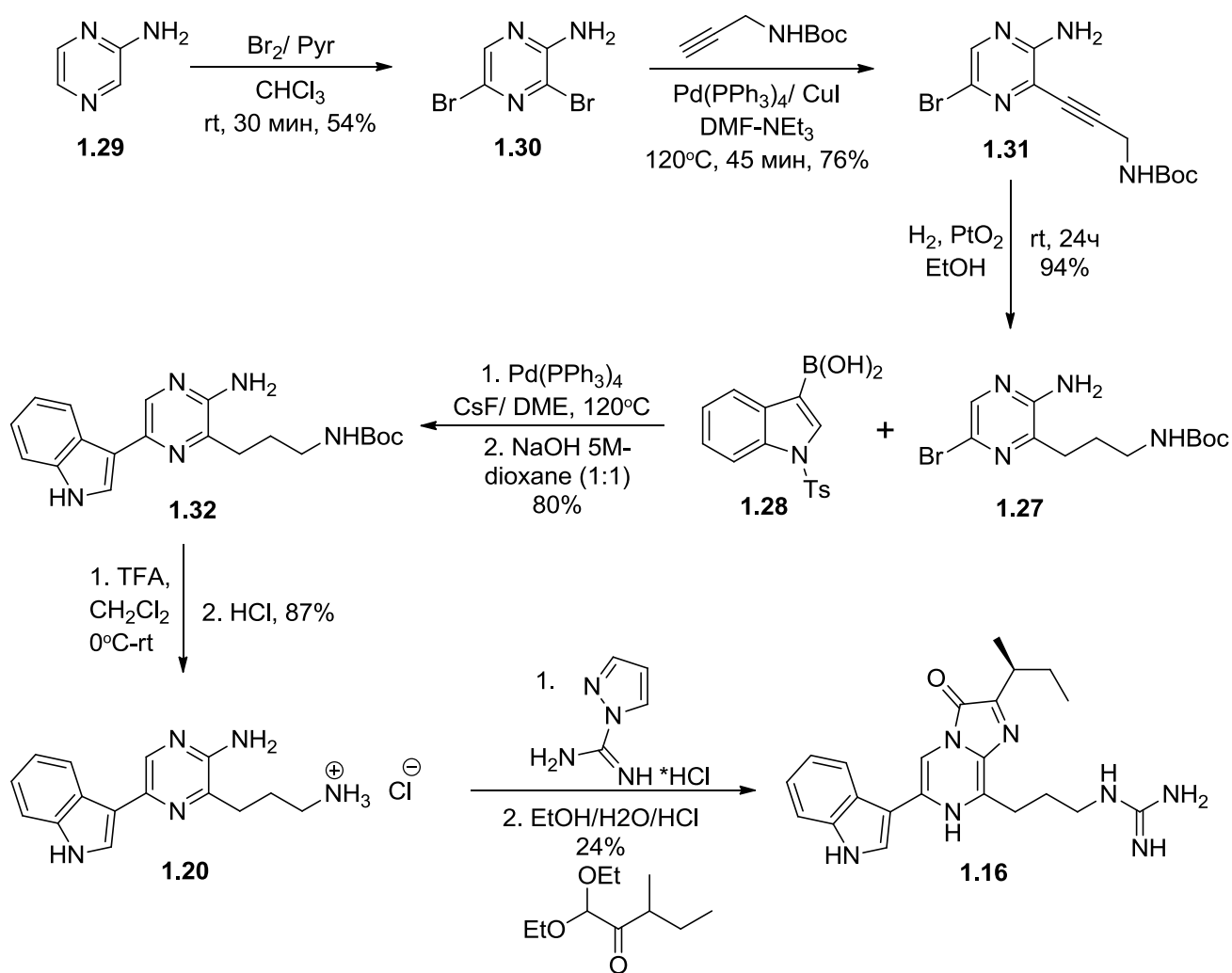


Схема 1.10. Применение палладиевого катализа для синтеза люциферина.

Использование реакции Сузуки позволило значительно сократить путь синтеза этиолюциферамина, увеличить общий выход люциферина по сравнению с оригинальным методом, а также разработать подход к синтезу различных аналогов этого люциферина за счет варьирования бороновых кислот, используемых в синтезе.



### 1.1.3 Целентеразин. Структура, биолюминесценция и синтез.

Большинство охарактеризованных биолюминесцентных систем морских организмов, принадлежит к целентеразин-зависимому типу, где субстратом биолюминесцентной реакции является имидазопиразин целентеразин **1.33** (Рис. 1.3) [Hastings, Johnson, 2003; Thomson, Herring, Campbell, 1997]. Установление структуры хромофора биолюминесцентной системы медуз *Aequorea victoria*, из которых целентеразин впервые был выделен, оказалось нетривиальной задачей, в связи с уникальной природой фермент-субстратного комплекса препятствующей выделению нативного хромофора. Как следствие, Шимомура применил распространенный для изучения люциферинов подход – денатурацию фермент-субстратного комплекса с последующим анализом результирующих фрагментов окисленного хромофора, на основании структуры которых позднее было сделано заключение о строении целентеразина [Kishi, Tanino, Goto, 1972; Shimomura, Johnson, 1969]. Как и люциферин *Cypridina* **1.16**, имидазопиразин целентеразин **1.33** является модифицированным бициклическим трипептидом, состоящим из остатков трех аминокислот: двух тирозинов и одного фенилаланина [Oba и др., 2009].

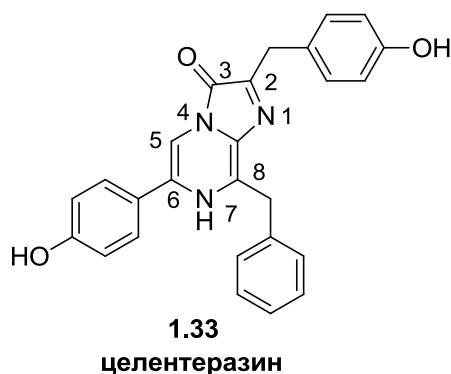


Рисунок 1.3. Структура целентеразина.

Все изученные на данный момент биолюминесцентные системы, использующие целентеразин в качестве субстрата, делятся на два биохимически различных класса. Помимо классических кислород-зависимых люциферин-люциферазных систем, встречающихся в мягких кораллах *Renilla* [Matthews, Hori, Cormier, 1977], копеподах *Gaussia* [Inouye, Sahara, 2008] и *Metridia* [Markova и др., 2004; Markova, Burakova, Vysotski, 2012] и креветках *Oplophorus* [Inouye и др., 2000; Inouye, Sasaki, 2007], также были обнаружены фотопротеиновые системы, не требующие кислорода для реакции биолюминесценции.  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины акворин, выделенный из медуз *Aequorea* [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962], и

обелин, обнаруженный в гидроидном полипе *Obelia* [Campbell, 1974] являются, на данный момент, наиболее изученными представителями этого класса.

Среди люциферазных систем достаточно полно описан механизм биолюминесценции морского мягкого коралла *Renilla*. Биолюминесценция *Renilla* контролируется нервной системой коралла и инициируется в результате увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция в ответ на механическую стимуляцию [Hastings, Morin, 1969]. Группа Кормье провела всестороннее исследование механизма биолюминесценции *Renilla*, выявив, что в реакции *in vivo* принимают участие три белка:  $Ca^{2+}$ -регулируемый целентеразин-связывающий белок (CBP), люцифераза и зеленый флуоресцентный белок (GFP) [Anderson, Charbonneau, Cormier, 1974].

На основании результатов, полученных при исследовании хемилюминесценции аналогов целентеразина в апротонных растворителях в присутствии оснований [Goto, 1968; Hori, Wampler, Cormier, 1973], Гото и др. предположили, что на первом этапе реакции биолюминесценции происходит присоединение кислорода к C2 атому углерода имидазопиразинового кольца, приводящее к образованию пероксид-аниона целентеразина (Схема 1.11). На следующем этапе происходит циклизация пероксид-аниона, с образованием четырехчленного диоксетанона, быстрое декарбоксилирование которого приводит к формированию аниона целентерамида в возбужденном состоянии [Hori и др., 1973]. Переход амид-аниона целентерамида из возбужденного в основное состояние сопровождается испусканием голубого света с максимумом эмиссии при 470 нм.

Биолюминесценция коралла *Renilla in vivo* в зеленой области спектра ( $\lambda_{max} = 509$  нм) объясняется переносом энергии от биолюминесцентного донора (люциферазы) к флуоресцентному акцептору (GFP) в результате образования белок-белкового комплекса между люциферазой и GFP [Ward, Cormier, 1976].

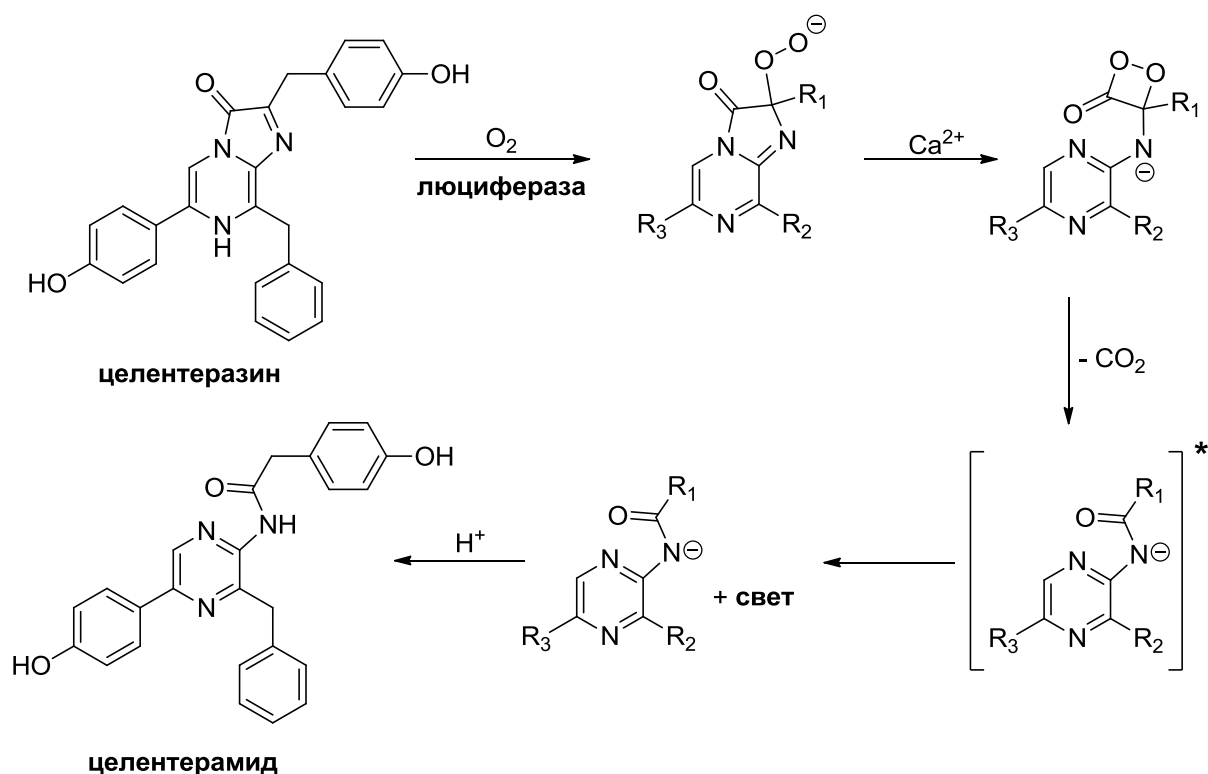


Схема 1.11. Механизм билюминесценции целентеразина.

В отличие от люциферин-люциферазных реакций, фотопротеиновые билюминесцентные системы не требуют для своей работы наличия молекул кислорода, и испускание света происходит при взаимодействии белка с ионами металлов [Shimoura, 2008]. Фотопротеины акворин и обелин представляют собой стабильные в отсутствие ионов кальция фермент-субстратные комплексы, состоящие из апобелка (апоакворин, апообелин) и молекулы субстрата – 2-гидропероксицелентеразина (Схема 1.12), прочно связанного с белком [Shimomura, Johnson, 1978]. Испускание света инициируется конформационными изменениями молекулы белка вследствие связывания ионов кальция, и является следствием декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина. Продуктами реакции являются молекула целентерамида в возбужденном состоянии и  $\text{CO}_2$ . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света.

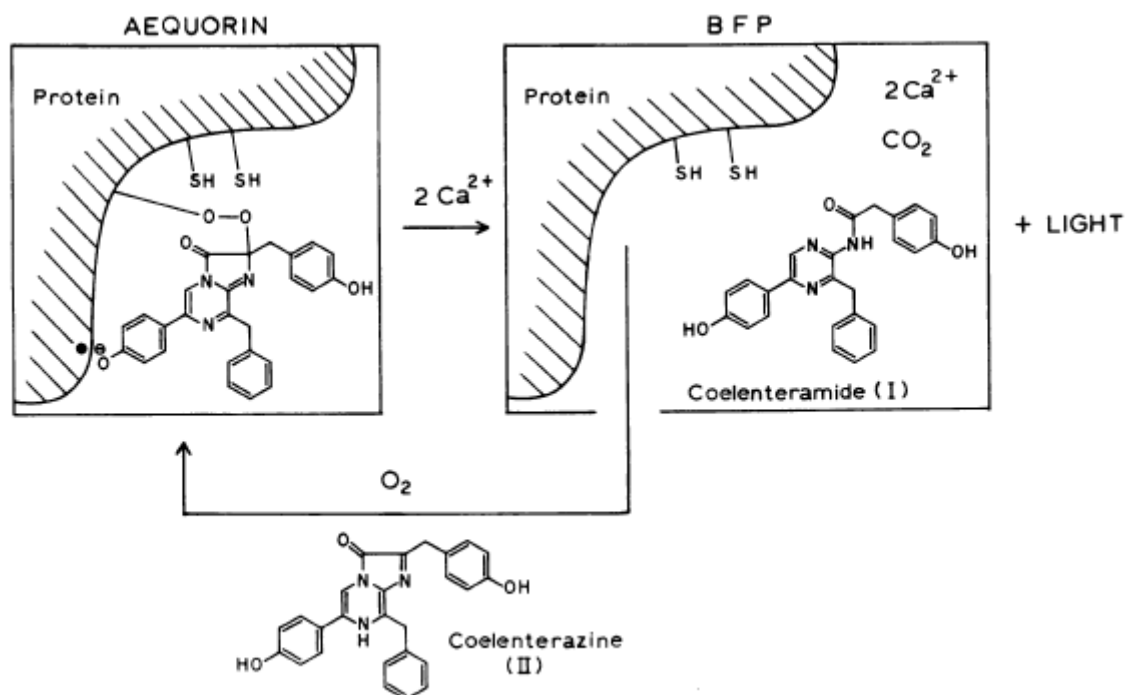


Схема 1.12. Механизм люминесценции и регенерации акворина [Shimomura, Johnson, 1978].

Химическая структура целентеразина **1.33** была предложена Шимомурой и Джонсоном в 1974 году [Shimomura, Johnson, Morise, 1974a]. Годом позже первый полный синтез этого люциферина, подтверждающий предположение Шимомуры, был проведен группой Иноуе [Inoue и др., 1975]. Как и ранее для синтеза люциферина Cypridina, исследователями был использован метод Шарпа и Спринга [Sharp, Spring, 1951]. Ключевой стадией синтеза Иноуе являлась конденсация 2-аминопиразина **1.34**, также называемого целентерамином [Kishi, Tanino, Goto, 1972] и *n*-ацетоксибензилглиоксаля **1.35**, приведшая к получению целентеразина с общим выходом менее 17% (Схема 1.13). Аминопиразин **1.34** получали циклизацией  $\alpha$ -оксиминокетона **1.36** и  $\alpha$ -аминонитрила **1.37** в пиридине с тетрахлоридом титана [Karpetsky, White, 1973]. Полученный пиразин N-оксид **1.38** восстанавливали и деметилировали до аминопиразина **1.34**. В параллельном синтезе из фенилуксусной кислоты **1.40** получали  $\alpha$ -бромокетон **1.41**, который затем использовали для получения бензилглиоксаля **1.35**. Существенным недостатком шестистадийного синтеза, предложенного Иноуе, являлась трудность введения заместителей в имидазопиразиновый цикл, что сильно затрудняло синтез аналогов целентеразина. Необходимо заметить, что несмотря на общие недостатки этого метода, в последующие годы работа по синтезу аналогов целентеразина основывалась на нем, в связи с отсутствием альтернативных подходов.

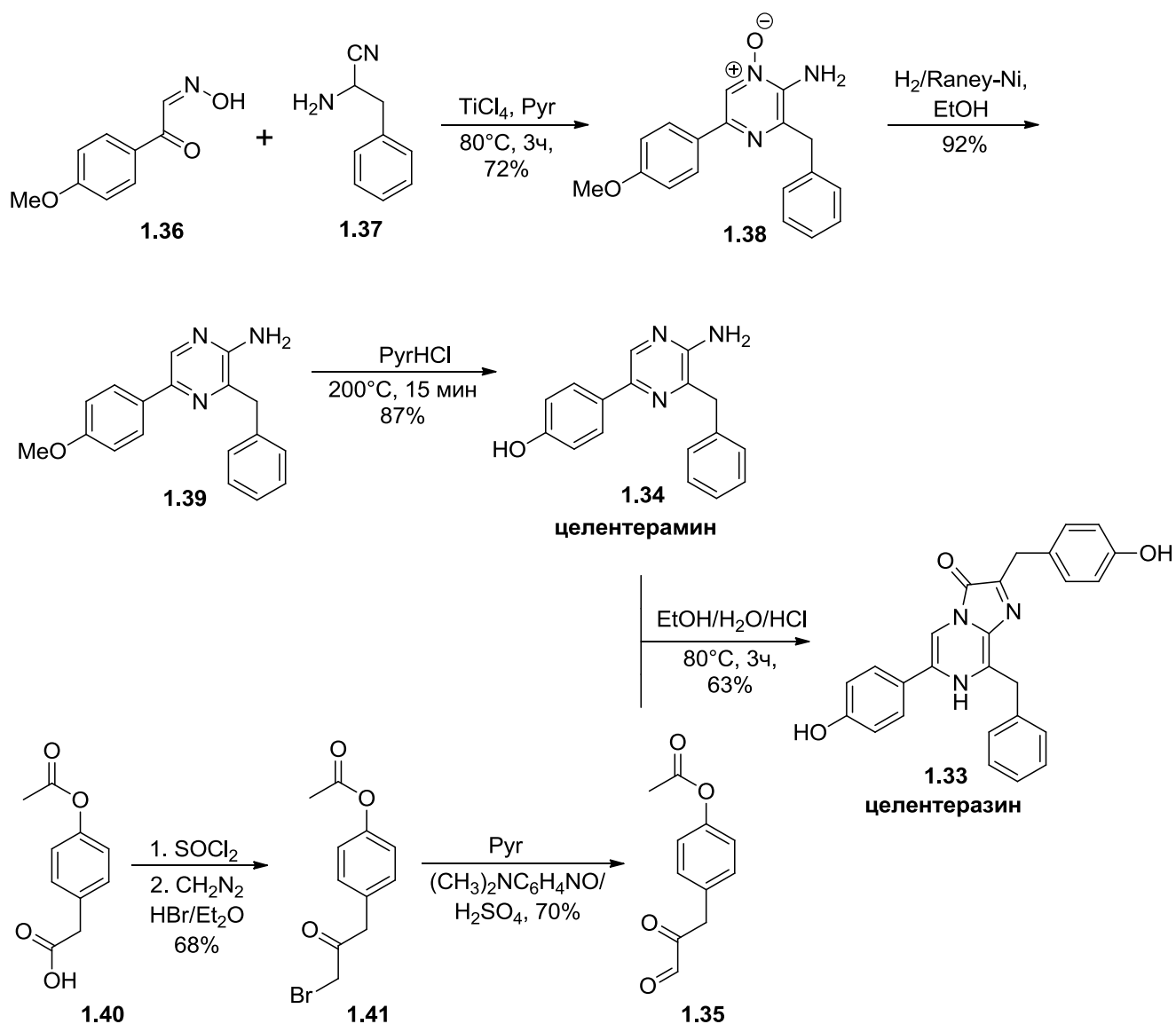


Схема 1.13. Первый синтез целентеразина.

С целью увеличения общего выхода целентеразина и оптимизации методов синтеза его аналогов Джонс и коллеги предложили использовать реакцию Сузуки [Jones, Keenan, Hibbert, 1996; Keenan, Jones, Hibbert, 1997; Jones, Hibbert, Keenan, 1999] (Схема 1.14). Ключевым этапом этого метода являлась катализируемая комплексами палладия конденсация 5-бромопиразина **1.42**, получаемого из 2-хлоропиразина, с метоксифенилбороновой кислотой **1.43**, приводившая к получению предшественника целентеразина **1.44**. Две последующие манипуляции - снятие метильной защиты с гидроксила и восстановление кетогруппы до метиленовой по методу Кижнера-Вольфа - позволяли получить целентерамин **1.34** с высоким выходом. Дальнейшая конденсация соединения **1.34** с соответствующим бензилглиоксалем привела к получению целентеразина **1.33** с общим выходом 25%.

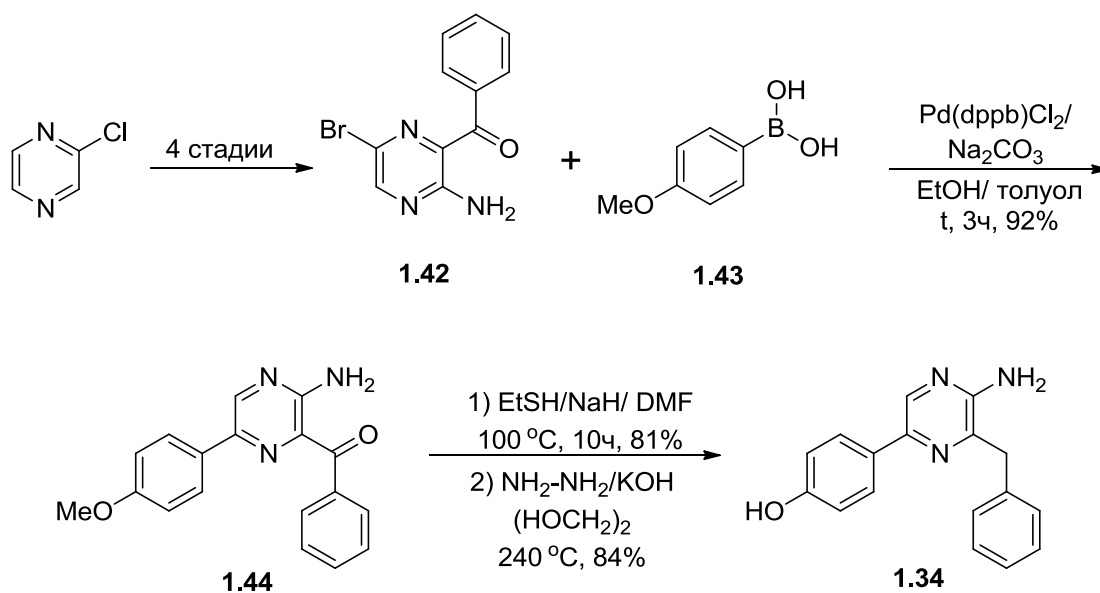


Схема 1.14. Новый подход к синтезу целентеразина с использованием реакции Сузуки.

Использование реакции Сузуки и относительная доступность исходных реагентов позволили увеличить общий выход целентеразина по сравнению с оригинальным методом, а также успешно использовать данную методику в синтезе ряда производных. Необходимо также заметить, что метод, предложенный Джонсом, позволил использовать коммерчески доступные 2-амино-3,5-дибромпириazines для получения производных целентеразина замещенных по 6 и 8 положению имидазопиридинового цикла [Adamczyk и др., 2003].

Еще одним подходом к синтезу предшественников целентеразина стало использование реакции Стилле. В работе группы Накамуры [Nakamura, Takeuchi, Murai, 1995] было продемонстрировано получение метилированного целентерамина **1.39** из 2-амино-5-бромпириазина **1.45** кросс-сочетанием с трибутил(4-метоксифенил)станнаном с выходом, близким к количественному (Схема 1.15).

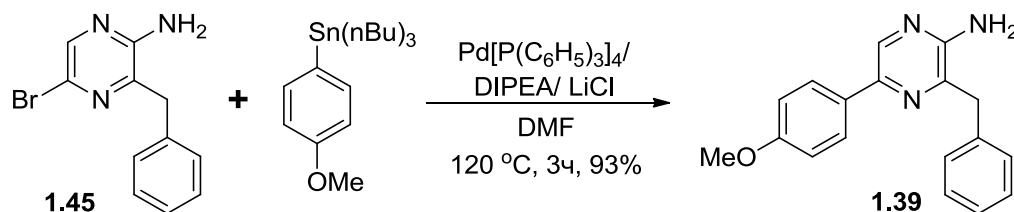
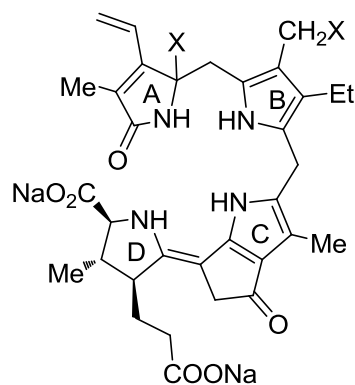


Схема 1.15. Применение кросс-сочетания Стилле для синтеза предшественников целентеразина.

### 1.1.4 Люциферины динофлагеллят и рачков эвфаузиид. Структура и биолюминесценция.

Помимо перечисленных выше имидазопиразиновых люциферинов, среди морских организмов также распространены тетрапирроловые субстраты биолюминесцентных реакций. Люциферины одноклеточных водорослей (динофлагеллят) **1.46** и рачков эвфаузиид (криля) **1.47** содержат четыре пиррольных ядра и сходны по строению и абсолютной конфигурации стереоцентров с хлорофиллом [Nakamura и др., 1988, 1989; Shimomura, 1980]. Однако, в отличие от последнего, тетрапиррольные люциферины содержат разомкнутый порфириновый цикл (Рис 1.4). Люциферин эвфаузиид представляет собой дигидроксипроизводное люциферина динофлагеллят.



**1.46**, X=H люциферин динофлагеллят  
**1.47**, X=OH люциферин эвфаузиид

Рисунок 1.4. Структуры люциферинов одноклеточных динофлагеллят **1.46** и рачков эвфаузиид **1.47**.

Несмотря на таксономическую удаленность этих организмов, компоненты биолюминесцентных систем динофлагеллят и эвфаузиевых рачков проявляют способность к перекрестной реакции биолюминесценции [Dunlap, Hastings, Shimomura, 1980]. Исследователями было доказано что люциферин динофлагеллят *Pyrocystis lunula* и *Gonyaulax polyedra* взаимодействует с люциферазой рачка *Meganctiphanes norvegica* с испусканием света, в то время как люциферин этого рачка проявляет биолюминесцентную активность с люциферазой динофлагеллят.

Компоненты биолюминесцентной системы эвфаузиид впервые выделили из рачков *Meganctiphanes norvegica* в шестидесятых годах [Shimomura, Johnson, 1967]. Оказалось, что система состоит из двух нестабильных компонентов, названных тогда фотопротеином Р и флуоресцентной субстанцией F, выступающей в качестве катализатора в биолюминесцентной реакции. Ошибочное предположение было исправлено тридцать лет спустя, когда было

однозначно доказано, что фотопротеин Р является люциферазой, а субстанция F – люциферин эвфаузиид [Shimomura, 1995a]. Субстанция F эвфаузиид и люциферин динофлагеллят испускают голубой свет ( $\lambda_{\text{max}}$  467-473 нм) в присутствии молекулярного кислорода и соответствующей люциферазы. Люминесцентные системы этих организмов обладают высокой чувствительностью к pH среды. Так, изменение pH с 7.4 до 7.6 приводит к увеличению биолюминесцентной эмиссии рачков с 5 до 80% от максимальной интенсивности свечения, в то время как максимальная эмиссия динофлагеллят лежит в области pH 6.3, а при повышении значения pH до 7.5 практически затухает.

Структура люциферина эвфаузиид была доказана анализом продуктов ацидолиза субстанции F [Nakamura и др., 1988]. При мягком окислении хромовой кислотой были получены 3-метил-4-винилмалеимид **1.48** и пиррол-2-карбальдегид **1.49**, в то время как в более жестких условиях продуктом являлась гематиновая кислота **1.50** (Схема 1.16). Разложение субстанции F под действием основания привело к получению пиррометенона **1.51**, строение которого было доказано встречным синтезом. Несмотря на то, что субстанция F никогда не была выделена в чистом виде, ее строение было окончательно подтверждено на основании сравнения данных ЯМР спектроскопии более стабильного оксилуциферина с данными ЯМР субстанции F.

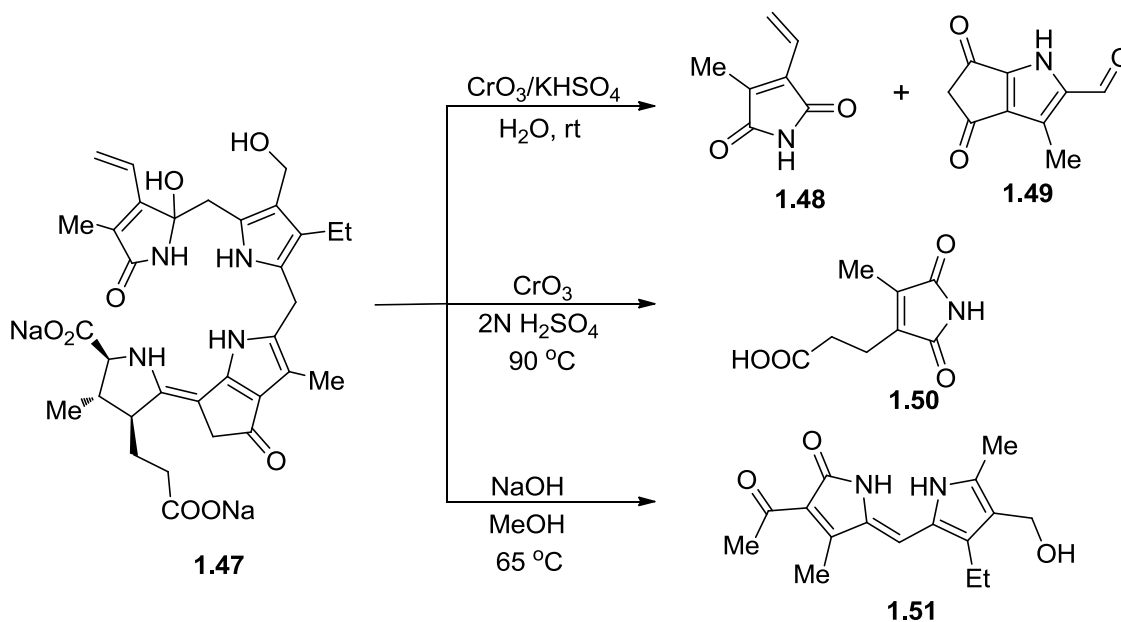


Схема 1.16. Продукты разложения флуоресцентной субстанции F в кислых и основных средах.

Люциферин динофлагеллят был выделен из водорослей *Pyrocystis lunula* [Nakamura и др., 1989]. Как и в случае люциферина эвфаузиид, продуктами кислотного гидролиза люциферина



динофлагеллят были винилмалеимид **1.48**, пиррол-2-карбальдегид **1.49** и гематиновая кислота **1.50**, а также этилмалеимид **1.52** (схема 1.17). Эти результаты позволили предположить фундаментальное сходство между химическими структурами люциферина этих организмов. Однако, в отличие от гидроксиметильной группы, обнаруженной в кольце В субстанции F рачков, у динофлагеллят была обнаружена метильная группа. Дальнейшее сравнение данных ЯМР спектроскопии люциферина динофлагеллят с данными ранее установленного Оху-F однозначно подтвердило наличие метильной группы в кольце В люциферина динофлагеллят, а также отсутствие гидроксильной группы в кольце А субстанции F. Таким образом химическая структура люциферина динофлагеллят была установлена как **1.46**.

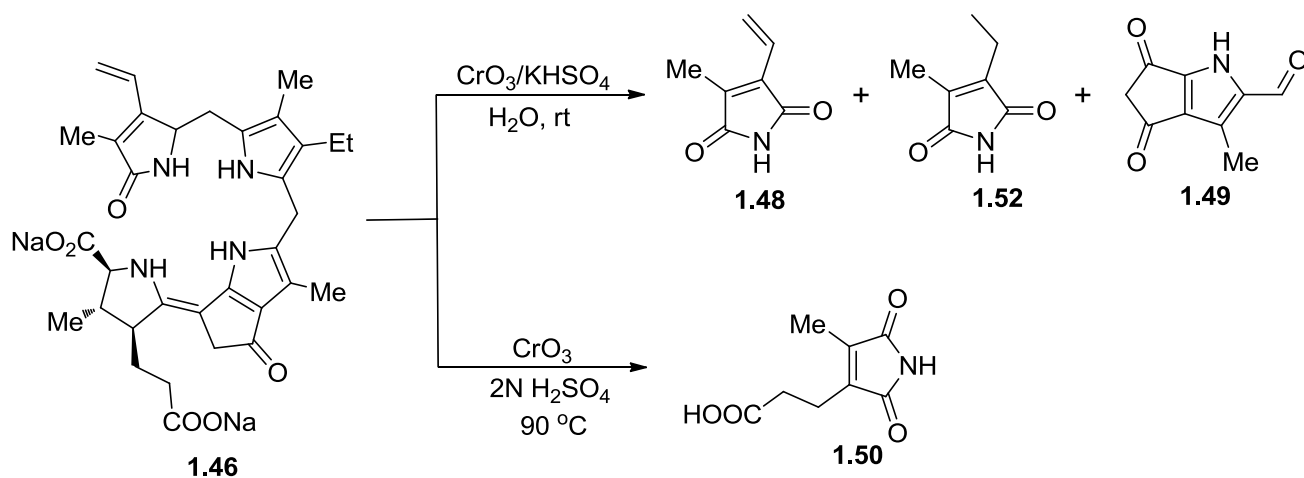


Схема 1.17. Продукты разложения люциферина динофлагеллят в кислых условиях.

В 1994 году исследователи Стоянович и Киши предложили механизмы ферментативного и неферментативного окисления люциферина динофлагеллят на основании результатов, полученных при исследовании модельного хромофора [Stojanovic, Kishi, 1994a]. В ходе этой работы была также однозначно определена конфигурация двойной связи между C16 и C17 атомами углерода люциферина динофлагеллят [Stojanovic, Kishi, 1994b] (Рис. 1.5). Согласно данным сравнительного анализа химических сдвигов в корреляционных спектрах НМРС и НМВС модельного хромофора с химическими сдвигами природного люциферина было установлено, что люциферин динофлагеллят имеет E-конфигурацию двойной связи (Рис. 1.5).

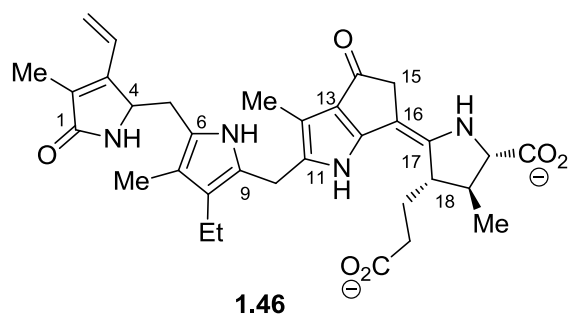


Рисунок 1.5 Структура люциферина динофлагеллят согласно Стояновичу и Киши.

Согласно предположению Стояновича и Киши, механизм биолюминесцентной реакции эвфаузиид и динофлагеллят проходит через формирование нескольких возможных промежуточных продуктов (**A**, **B**, **C** и **D**) (Схема 1.18), приводящих к образованию оксилуциферина и испусканию света. На первом этапе в присутствии люциферазы образуются катион-радикал люциферина **A** и супероксид анион-радикал, который в свою очередь депротонирует катион-радикал по углероду C15 с образованием интермедиата **B**. Последующая рекомбинация радикалов приводит к образованию пероксида **C** в возбужденном состоянии, в результате распада которого происходит формирование оксилуциферина, сопровождающееся испусканием света.

Исследователи также предложили альтернативный механизм, в котором люцифераза выступает в роли депротонирующего агента и способствует прямому окислению люциферина кислородом воздуха с образованием промежуточного пероксида **C**. На следующем этапе в результате перегруппировки образуется дигидроксиимин **D** в возбужденном состоянии, разложение которого сопровождается испусканием света и формированием оксилуциферина.

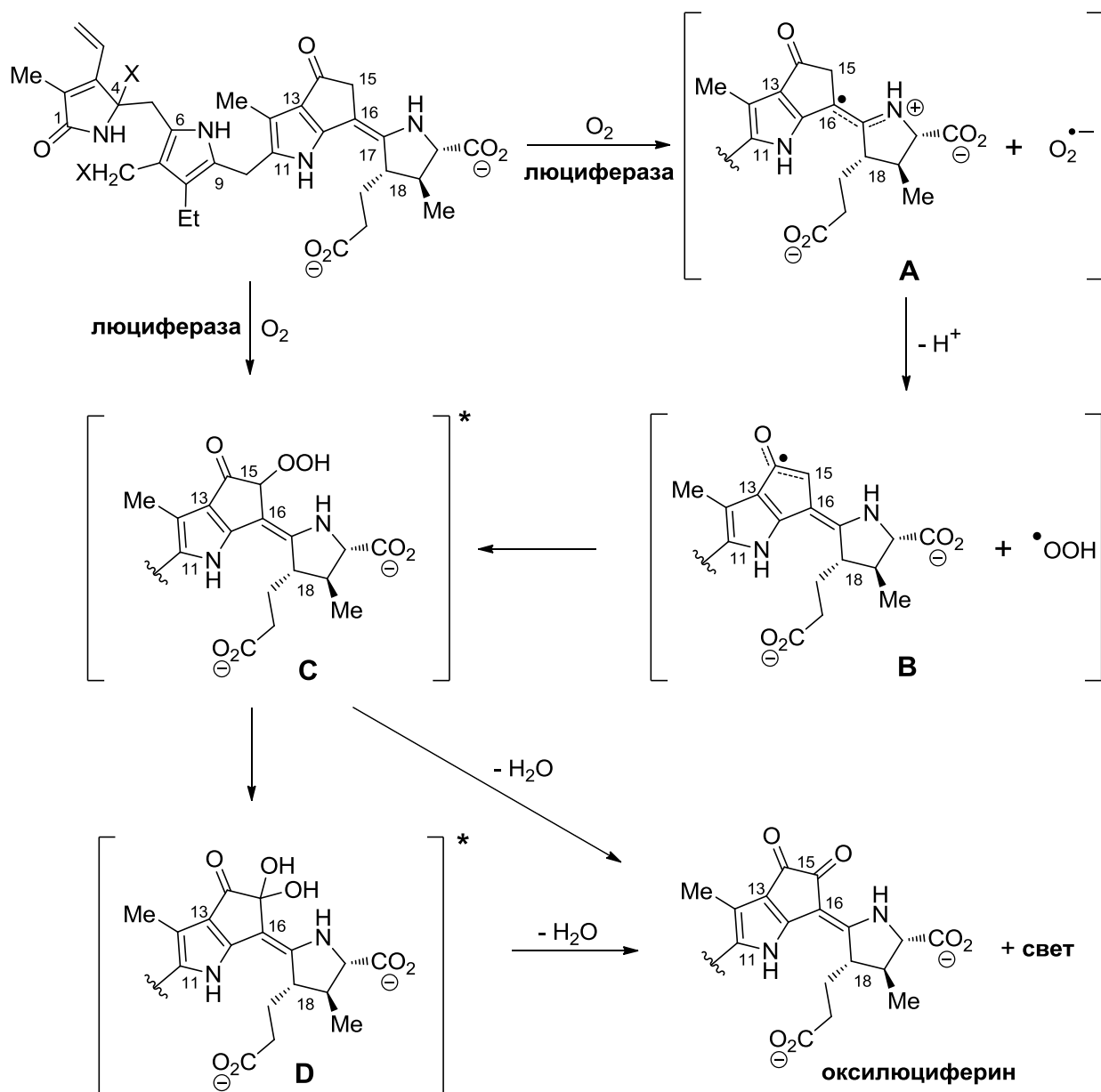


Схема 1.18. Предположительный механизм биолуминесценции рачков эвфаузиид и динофлагеллят.

### 1.1.5 Люциферин бактерий. Структура и биолюминесценция.

Из семнадцати известных на данный момент видов люминесцентных бактерий четырнадцать широко распространены в морских экосистемах. Среди этих 14 видов присутствуют как бактерии свободноживущие в морской воде или устьевых водах рек, так и симбиотические организмы, обитающие в фотофорах светящихся рыб и головоногих и обеспечивающие их свечение. Все морские люминесцентные бактерии принадлежат к трем родам: *Vibrio*, *Photobacterium* и *Shewanella*, причем представители рода *Photobacterium* преимущественно являются симбионтами морских организмов. На суше люминесцентные бактерии представлены лишь тремя видами, принадлежащими к роду *Photorhabdus*. Большинство наземных люминесцентных бактерий являются паразитирующими на насекомых видами, после заражения которыми их обыкновенно нелюминесцентные носители начинают светиться [Dunlap, Kita-Tsukamoto, 2006].

Несмотря на почти вековую историю исследования феномена биолюминесценции бактерий все компоненты биолюминесцентной системы этих организмов были впервые определены лишь в середине 20 века, в связи с тем, что классическая люциферин-люциферазная реакция с экстрактами бактерий по Дюбуа не приводила к испусканию квантов света. В начале пятидесятых годов исследователи Стрелер и Кормье обнаружили, что добавление восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NADH) (Рис. 1.6) к холодному бактериальному экстракту вызывает его слабое свечение, интенсивность которого, существенно возрастает при добавлении прокипяченного бактериального экстракта [Strehler, Cormier, 1953]. Дальнейшим шагом стали работы групп Стрелера и МакЭлроя, продемонстрировавшие, что для реакции люминесценции, помимо NADH, необходимо и производное рибофлавина – флаavinмоноклеотид (FMN), являющийся коферментом многих оксидоредуктаз и встречающийся во всех живых организмах. (Рис. 1.6) [McElroy и др., 1954; Strehler и др., 1954].

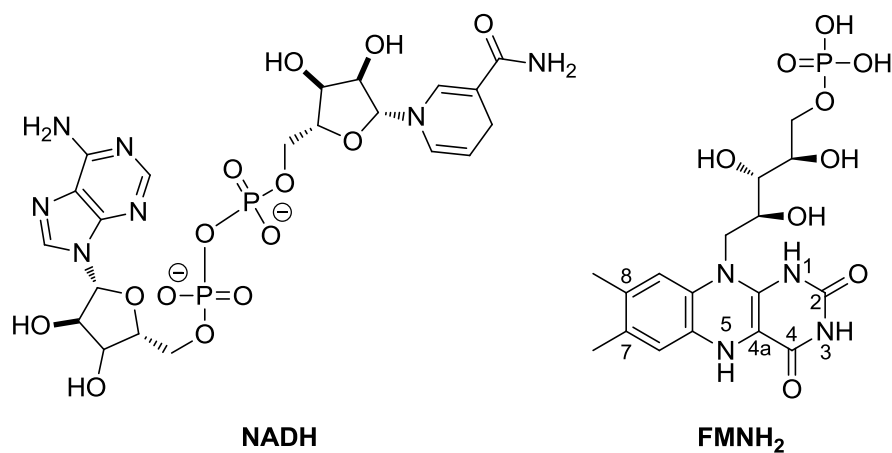
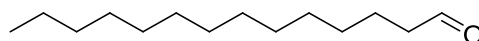


Рисунок 1.6. NADH и FMN необходимые для люминесценции бактериального экстракта.

Установив, таким образом, два компонента реакции, исследователи из различных групп предположили, что источником активирующего фактора (предположительного люциферина) являются фрагменты бактериальных клеток, присутствующие в горячем экстракте. Для подтверждения этой гипотезы было предпринято систематическое тестирование экстрактов различных тканей животных на стимулирующую свечение активность. В итоге, было обнаружено, что экстракты печени и коркового вещества почек свиньи активируют люминесценцию бактериального экстракта в присутствии NADH и кислорода. Экстракция и очистка коркового вещества почек привели к выделению активирующего люминесценцию фактора в чистом виде - им оказался пальмитиновый альдегид (гексадеканаль). Стрелер и Кормье также обнаружили, что и альдегиды-гомологи, в частности деканаль и додеканаль, также активируют люминесценцию [Cormier, Strehler, 1953; Strehler, Cormier, 1954]. Структуры природных альдегидов, вовлеченных в реакцию биолюминесценции бактерий были позже установлены Шимомурой [Shimomura, Johnson, Morise, 1974b]. Масс-спектрометрический анализ продуктов окисления альдегидных фракций из экстрактов различных биолюминесцентных бактерий обнаружил три мажорных альдегида, содержащих 12, 14 и 16 атомов углерода, из которых преобладающим был миристиновый альдегид (тетрадеканаль) **1.53** (Рис 1.7).



**1.53**  
миристиновый альдегид  
(бактериальный люциферин)

Рисунок 1.7. Природный альдегид, преобладающий в *Photobacterium phosphoreum* и других видах бактерий.

Последующее изучение механизма биолюминесценции бактерий показало, что он обладает уникальной особенностью: люциферин - алифатический альдегид, окисляющийся в процессе реакции, не является эммитером света. Более того, помимо люциферина в качестве двух ключевых компонентов люминесцентной цепи выступают NADH и FMN, встречающиеся во всех организмах, сопряженное окисление восстановленного FMN и альдегида приводит к образованию возбужденного флавинового фрагмента, испускающего свет с максимумом 480 нм [Eley, Cormier, 1968; McElroy, Green, 1955].

С момента установления структур всех компонентов биолюминесцентной системы бактерий, механизм реакции люминесценции был всесторонне изучен различными исследовательскими группами [Hastings, Nealson, 1977; Eberhard, Hastings, 1972; Kurfuerst и др., 1987; Kurfürst, Ghisla, Hastings, 1984; Lei, Ding, Tu, 2004; Tu, Mager, 1995; Watanabe и др., 1975;

Watanabe, Nakamura, 1976; Ziegler, Baldwin, 1981]. На сегодняшний день считается, что на первом этапе в момент связывания с люциферазой происходит депротонирование молекулы FMNH<sub>2</sub> по атому азота N1. Затем происходит быстрое окисление FMNH<sub>2</sub> кислородом по атому углерода C4a с образованием гидропероксида **A** (Схема 1.19). На следующем этапе гидропероксид реагирует с альдегидом с образованием пероксиполуацетала **B**, который затем претерпевает перегруппировку Байера-Виллигера с образованием соответствующей карбоновой кислоты и эмиттера **C** - 4a-гидрокси-5-гидрофлавинмононуклеотида - в возбужденном состоянии. При переходе интермедиата **C** из возбужденного в основное состояние происходит испускание кванта света и образование воды и флавинмононуклеотида (FMN). На завершающем этапе флавинмононуклеотид FMN восстанавливается NADH до исходного FMNH<sub>2</sub> при катализе NADH: FMN-оксидоредуктазой.

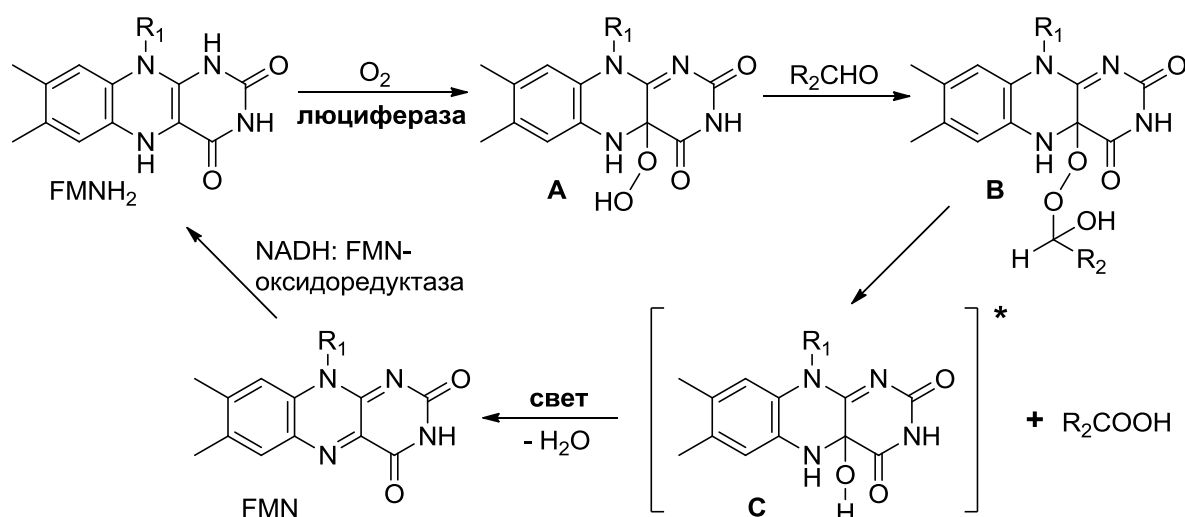
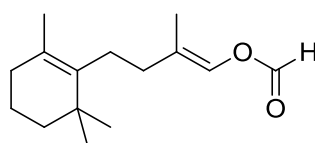


Схема 1.19. Механизм бактериальной биолуминесцентной реакции.

### 1.1.6 Люциферин брюхоногого моллюска *Latia neritoides*. Структура, биолюминесценция и синтез.

Помимо нескольких видов бактерий, обитающих в устьях рек, из пресноводных биолюминесцентных организмов науке известен лишь один вид новозеландского брюхоногого моллюска *Latia neritoides*, который выделяет светящуюся зеленым светом слизь [Bowden, 1950]. Химическая структура люциферина моллюска **1.54** (Рис. 1.8) была установлена Шимомурой и Джонсоном в 1968 году [Shimomura, Johnson, 1968a]. Авторы установили, что люциферин является формиат енольной формы терпенового альдегида, а продуктами его окисления являются дигидро- $\beta$ -ионон **1.55**, муравьиная кислота и углекислый газ.



**1.54**  
люциферин *Latia neritoides*

Рисунок 1.8. Структура люциферина брюхоногого моллюска *Latia neritoides*.

В 1968 году Шимомура и Джонсон впервые описали биолюминесцентную систему *L. neritoides*. Тогда авторы установили, что люциферин моллюсков испускает желто-зеленый свет ( $\lambda_{\text{max}}$  536 нм) в присутствии люциферазы, специфического кофактора, названного «пурпурный протеин» и кислорода [Shimomura, Johnson, 1968b]. Однако, исследования показали, что ни люциферин, ни продукт его окисления – оксилуциферин, не обладают флуоресценцией, что привело к выводу о том что, подобно бактериальной, в биолюминесцентной системе моллюсков люциферин не является эмиттером света. Позднее Шимомурой и др. было установлено, что добавление солей аскорбиновой кислоты и NADH к биолюминесцентной пробе способствует значительному увеличению интенсивности свечения [Shimomura, Johnson, Kohama, 1972]. Тогда же было установлено, что обыкновенно бесцветная, нефлуоресцентная люцифераза флуоресцирует в растворах щелочей или цианида калия. Более того, спектр ее флуоресценции достаточно близок к спектру биолюминесценции *L. neritoides* и спектру флуоресценции флавинадениндинуклеотида (FAD). На основании полученных результатов, исследователи выдвинули предположение что в биолюминесцентной системе *Latia neritoides*, аналогично бактериальной системе, эмиттером является не люциферин, а флавиновая простетическая группа, прочно связанная с белком.

Тогда авторами был предложен следующий механизм: в ходе реакции биолюминесценции происходит образование четырехчленного диоксетанового интермедиата, в результате

распада которого образуется оксильюциферин в возбужденном состоянии. Дальнейший перенос энергии с возбужденного оксильюциферина на флавиновую простетическую группу приводит к испусканию света (Схема 1.20).

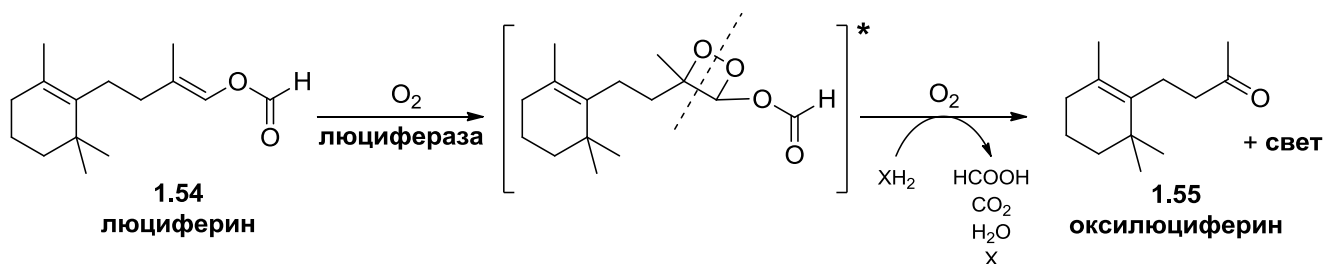


Схема 1.20. Предположительный механизм биолуминесценции брюхоногих моллюсков *Latia neritoides*. Восстановительный компонент  $\text{XH}_2$  и фактический эмиттер света до сих пор не определены.

Недавние исследования спектров биолуминесценции синтетических аналогов люциферина моллюсков в 2000-х годах подтвердили, что люциферин не является эмиттером света, однако опровергли наличие флавиновой группы связанной с молекулой люциферазы [Ohmiya и др., 2005]. На сегодняшний день компонент биолуминесцентной системы, отвечающий за испускание квантов света, остается загадкой. Также, неясной является и роль «пурпурного белка». Первоначально предполагалось, что «пурпурный белок» может являться эмиттером в процессе люминесценции *L. neritoides*, однако эта гипотеза не была подтверждена [Ohmiya и др., 2005; Shimomura, Johnson, Kohama, 1972].

Полный синтез люциферина *L. neritoides*, подтверждающий его структуру, был предложен группами Фрахебоуда и Накатсубо в 1969 и 1970 годах соответственно [Fracheboud и др., 1969; Nakatsubo, Kishi, Goto, 1970]. Ключевой стадией синтеза предложенного Фрахебоудом являлось ацилирование уксусно-муравьиным ангидридом деформированного люциферина **1.57**. Альдегид **1.57** был получен в две стадии издигидро- $\beta$ -инона **1.55** с использованием реакции Кори-Чайковского на первом этапе и последующей перегруппировкой оксиранового кольца соединения **1.56** под действием эфирата трифторида бора, приводящей к получению альдегида (Схема 1.21). Данные масс-спектрометрии и УФ-спектроскопии синтетического соединения **1.54** и природного люциферина *Latia neritoides* оказались идентичными, однако выход финальной стадии синтеза Фрахебоуда составил лишь 3%, в то время как полученные спектрометрические данные не позволяли определить конфигурацию двойной связи природного соединения.



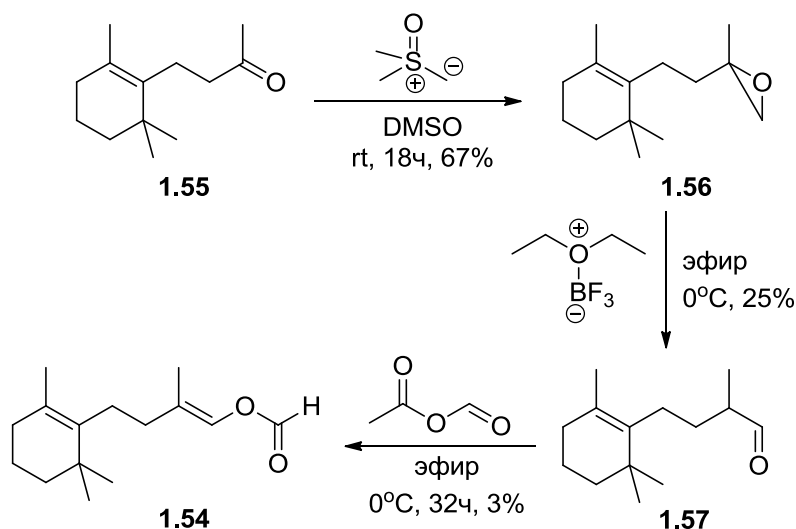


Схема 1.21. Синтез люциферина *Latia neritoides*, предложенный Фрахебуодом и др.

Для однозначного определения конфигурации двойной связи и увеличения общего выхода люциферина Накатсубо и коллеги предложили использовать реакцию Байера – Виллигера (Схема 1.22). На первом этапе синтеза из дигидро- $\beta$ -иона **1.55** были получены *транс*- и *цис*- $\alpha,\beta$ -ненасыщенные альдегиды **1.58a** и **1.58b**, изомеры были разделены и их строение подтверждено с помощью ЯМР-спектроскопии. Дальнейшая обработка альдегидов **1.58a,b** безводным пероксидом водорода в присутствии диоксида селена привела к образованию соответствующих енолформатов **1.54a** и **1.54b** с высокими выходами. Соединение **1.54a** оказалось полностью идентичным природному люциферину *L. neritoides*, таким образом, авторами было установлено, что люциферин моллюсков имеет *E*-конфигурацию двойной связи.

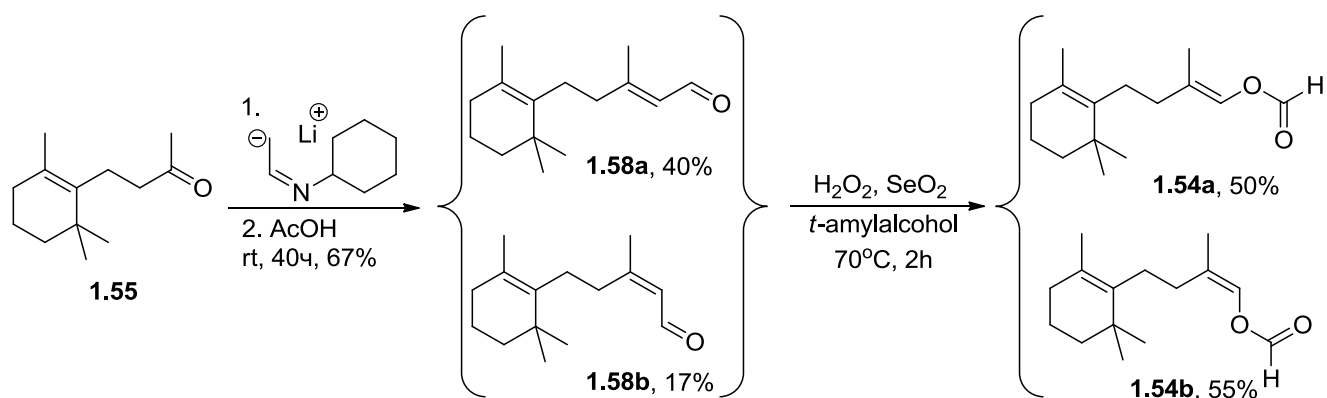
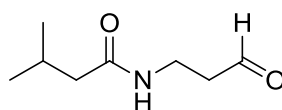


Схема 1.22. Альтернативный синтез и стереохимия люциферина *Latia neritoides*.

### 1.1.7 Люциферин кольчатых червей *Diplocardia longa*. Структура, биолюминесценция и синтез.

Среди кольчатых червей биолюминесцентные виды встречаются в двух классах: морских полихетах и в обитающих на суше олигохетах [Herring, 1987]. В настоящее время природа биолюминесценции полихет остается неизвестной. Среди олигохет все компоненты биолюминесцентной системы были однозначно определены лишь для вида *Diplocardia longa*. Люциферин этого кольчатого червя оказался простой алифатический альдегид - N-изоварил-3-амино-1-пропаналь **1.59** (Рис. 1.9). [Ohtsuka, Rudie, Wampler, 1976]



**1.59**  
люциферин *Diplocardia longa*

Рисунок 1.9. Структура люциферина кольчатых червей *Diplocardia longa*.

Механизм биолюминесценции кольчатых червей *D. longa* был впервые предложен Беллисарио и Кормье в начале семидесятых годов [Bellisario, Cormier, 1971; Bellisario, Spencer, Cormier, 1972]. Авторы установили, что в люминесцентной реакции *in vitro* добавление пероксида водорода к люциферин-люциферазной пробе стимулирует испускание зеленого света ( $\lambda_{\text{max}}$  500нм), в то время как *in vivo* отсутствие кислорода не ингибирует реакцию люминесценции. Таким образом было установлено, что в биолюминесцентной системе червей кислород не является основным окислителем люциферина. Десять лет спустя Руди и др. полностью описали химизм люминесценции червей [Rudie, Mulkerrin, Wampler, 1981]. Исследователи установили, что на первом этапе происходит некаталитическое присоединение перекиси водорода к альдегидной группе люциферина *D. longa* с образованием пероксиполуацетала, который затем под действием люциферазы распадается с излучением света (Схема 1.23). В процессе реакции альдегидная группа люциферина, вероятно, окисляется до соответствующей кислоты, однако это предположение не было доказано экспериментально.

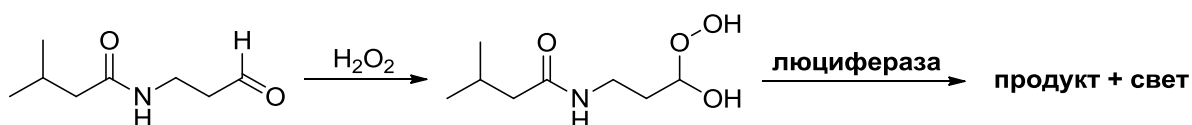


Схема 1.23. Механизм биолюминесценции кольчатых червей *Diplocardia longa*

Химическая структура люциферина червей *Diplocardia longa* была доказана встречным синтезом в 1976 году. Первой стадией синтеза стало получение изовалерил-3-амино-1-пропанола **1.61** из хлорангида изовалериановой кислоты **1.60** и 3-аминопропанола-1 с количественным выходом (Схема 1.24). Последующее окисление результирующего спирта триоксидом хрома привело к получению люциферина **1.59** с общим выходом реакции 60%. Синтетический и природный люциферины *Diplocardia longa* оказались идентичными по всем спектральным данным.

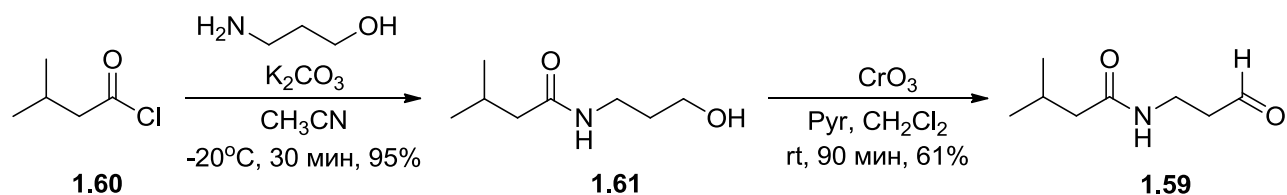


Схема 1.24. Синтез люциферина *Diplocardia longa*, подтверждающий его структуру.

## 1.2. Синтетические аналоги природных люциферинов и их применение.

Широко применяемый метод биолюминесцентного имиджинга (BLI) *in vivo* основан на реакции окисления субстрата – люциферина при катализе специфическим ферментом – люциферазой, сопровождающейся испусканием кванта света [Prescher, Contag, 2010]. При этом ДНК, кодирующую люциферазу, встраивают в геном целевых клеток, а субстрат вводится системно. В последнее десятилетие биолюминесцентный имиджинг живых клеток был признан весьма сильной альтернативой популярному флуоресцентному имиджингу. Несмотря на то, что флуоресцентные зонды намного ярче своих биолюминесцентных аналогов и, следовательно, обеспечивают гораздо лучшее пространственное и временное разрешение, а также четкость очертания клеточных структур, биолюминесцентные репортеры в свою очередь практически не токсичны для исследуемых клеток, что делает их более подходящими для обнаружения и количественного определения молекул и их взаимодействий в живых клетках, особенно в долгосрочных исследованиях. Более того, поскольку собственная биолюминесценция тканей крайне мала, данный подход позволяет осуществлять высокочувствительное детектирование светоотдачи клетками [Close и др., 2010]. Основными биолюминесцентными репортерами, используемыми для BLI *in vivo*, на сегодняшний день являются два типа совершенно различных по своей природе люцифераз, использующие различные субстраты: светлячковая и ее гомологи (~62 kDa), окисляющие D-люциферин и люциферазы морских организмов (~32 kDa) взаимодействующие с целентеразином.

Применение биолюминесценции для исследования живых систем наложило множество ограничений на строение и свойства используемых веществ. Основные недостатки BLI *in vivo* обусловлены прежде всего низкой стабильностью природных люциферинов на воздухе и в растворах. Более того, окно прозрачности биологических тканей лежит в красной и ближней инфракрасной областях спектра - диапазоне в котором свет проникает в ткани на наибольшую глубину - в то время как большинство известных природных люциферинов испускают свет в более коротковолновом диапазоне. Для улучшения метода биолюминесцентного имиджинга различными исследовательскими группами были предприняты попытки синтезировать более устойчивые аналоги люциферинов, испускающие свет в красной области спектра.

### 1.2.1 Синтетические аналоги D-люциферина.

Наиболее широкое применение для биолюминесцентного имиджинга нашла АТФ-зависимая люциферин-люциферазная система светляков *Photinus pyralis* [Edinger и др., 2002; Contag и др., 2000]. Испускание фотона природными D-люциферином и люциферазами этих организмов лежит в диапазоне от желто-зеленого до красного длин волн, что вплотную приближается к области оптической прозрачности биологических тканей (650-900 нм) [Weissleder, 2001; Zhao и др., 2005]. Более того, D-люциферин быстро распространяется в организме животного после внутривенной или внутрибрюшной инъекции, проникает через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры и является малотоксичным [Aswendt и др., 2013].

Так как излучение, лежащее за пределами видимого спектра, менее подвержено рассеиванию в биологических тканях, было предпринято множество попыток модифицировать люциферазы различных D-люциферин зависимых биолюминесцентных систем с тем, чтобы добиться батохромного сдвига результирующего излучения [Branchini и др., 2010; Liang, Walczak, Bulte, 2012; White, Branchini, 1975]. Однако выяснилось, что общий выход красного света мутантных форм люцифераз немногим больше испускания в красной области спектра природной люциферазы светляков в реакции с природным D-люциферинном [Mezzanotte и др., 2013].

Другим подходом для достижения батохромного сдвига эмиссионного спектра биолюминесцентной системы светляков стала синтетическая модификация субстрата ферментативной реакции – D-люциферина. Долгое время считалось, что для прохождения реакции биолюминесценции с природной люциферазой допустимы лишь незначительные изменения в структуре D-люциферина.

### 1.2.1.1 Первые аналоги D-люциферина, аминюциферины.

Первые синтетические аналоги природного люциферина, включающие дегидролюциферин **1.62**, декарбоксии- и дегидроксии- люциферины **1.63a-c**, 5,5-диметиллюциферин **1.64**, аминюциферины **1.66a-c**, а также аналоги, содержащие гидроксигруппу в различных положениях бензотиазольного фрагмента **1.65a-d** (Рис 1.10) были получены в 60-х годах [Denburg, Lee, McElroy, 1969; White и др., 1965, 1966, 1969; White, Wörther, 1966] Уайтом и МакЭлроем, с использованием синтетического подхода разработанного группой Сето. Этими авторами было установлено, что 6'-гидроксигруппа в бензотиазольном фрагменте D-люциферина может быть заменена на аминюгруппу без потери биолюминесцентной активности [White и др., 1966]. Более того, оказалось, что 6'-аминюлюциферин **1.66a** испускает свет в более длинноволновой области по сравнению с D-люциферин (593 и 557 нм соответственно) [Shinde, Perkins, Contag, 2006].

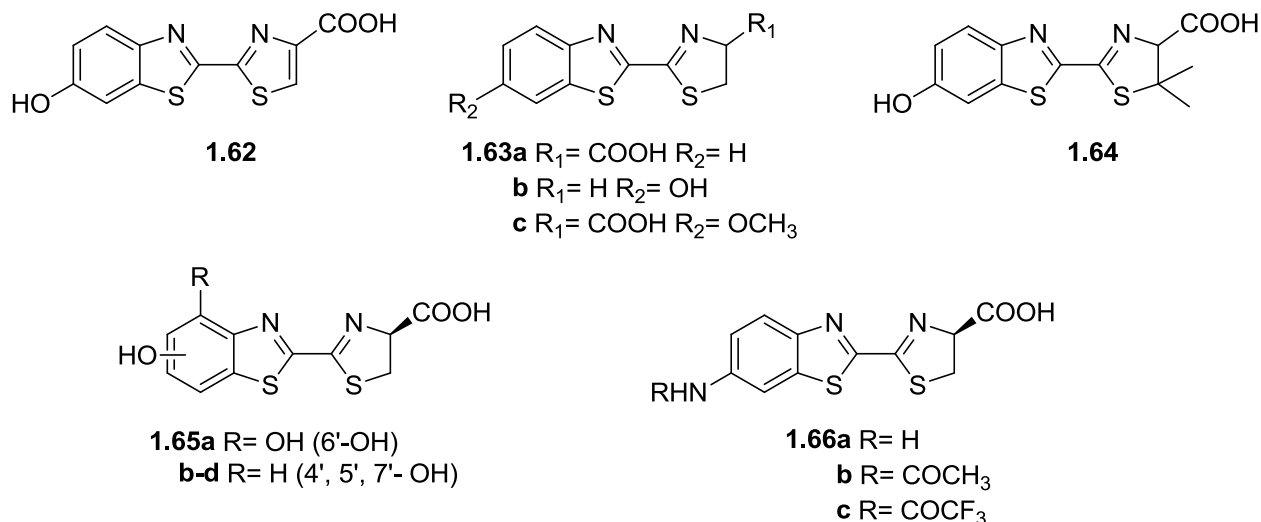


Рисунок 1.10. Первые синтетические аналоги D-люциферина.

В течение последнего десятилетия было установлено, что наиболее часто используемая для биолюминесцентного анализа *in vivo* природная люцифераза вида *Photinus pyralis* (PpyLuc) допускает достаточно глубокие изменения субстрата, без потери каталитической активности. Так недавно группы Клауберта, Миллера и Нагано независимо друг от друга получили и исследовали оптические свойства различных замещенных аминюлюциферинов [Reddy, Thompson, Miller, 2010; Takakura и др., 2011; Woodrooffe и др., 2008]. В результате исследований было обнаружено, что моно- и ди-алкиламинюлюциферины, а также циклический аминюлюциферин могут выступать в качестве субстратов люциферазы и ее мутантных аналогов.

Исследуемые ациклические аминолюциферины были синтезированы из коммерчески доступного 2-циано-6-аминобензотиазола, N-алкилирование которого проводили различными методами. Клауберт и коллеги использовали в качестве алкилирующих агентов алкилгалогениды, однако в результате им удалось получить лишь монозамещенные аминолюциферины с низкими выходами (5-30%) (Схема 1.25A). Нагано и др. предложили использовать два различных метода восстановительного алкилирования с использованием соответствующих альдегидов в кислых условиях, что привело к увеличению выходов искомых продуктов (39-91%) и получению дизамещенных аминов (Схема 1.25B). Исходным веществом в семистадийном синтезе циклических аминолюциферинов предложенном Миллером и др. являлся 5-нитроиндолин, восстановление нитрогруппы которого и дальнейшая окислительная циклизация привели к получению промежуточного 2-аминобензотиазола (Схема 1.25C), модификации которого проводились по описанным ранее методикам.

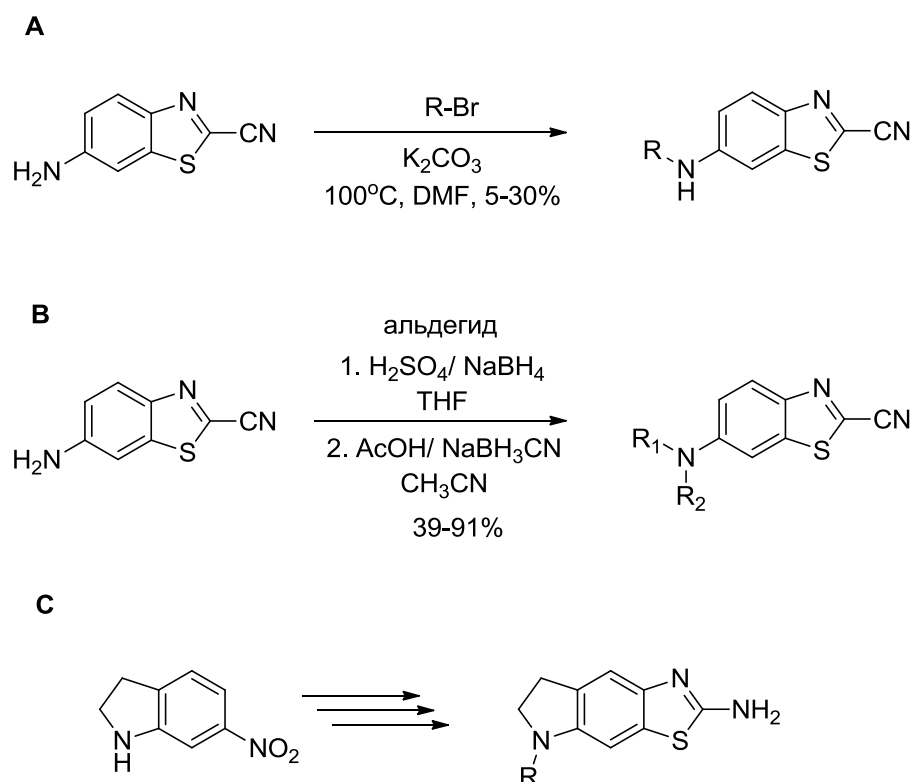


Схема 1.25. Методы синтеза аминобензотиазолов.

Конденсация приведенных выше промежуточных соединений с D-цистеином в водном метаноле приводила к получению алкиламинолюциферинов **1.67a-d**, а также их циклических аналогов **1.68a,b** (Рис. 1.11).

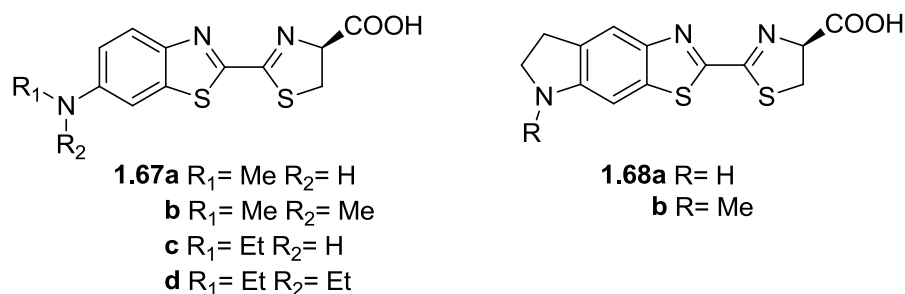


Рисунок 1.11. Синтетические алкиламинолюциферины

Соединения **1.67a-d** и **1.68a,b** проявили большее сродство к люциферазе, чем D-люциферин **1.1** и аминолуциферин **1.66a**. Более того, в спектрах биолюминесценции алкиламинолюциферинов в реакции с PpyLuc *in vitro* наблюдался значительный батохромный сдвиг максимумов эмиссии по сравнению с максимумами эмиссий природного субстрата и аминопроизводного **1.66a** (Таблица 1.1), однако общая светоотдача ферментативной реакции с аналогами люциферина была значительно снижена. При испытаниях с мутантной формой люциферазы Ultra-Glo в P450-Glo буферном растворе интенсивность свечения и общая светоотдача соединений **1.68a** и **b** превзошла эти показатели D-люциферина в 5.7 и 4.7 раза соответственно. К сожалению мутантная люцифераза Ultra-Glo не доступна как генетическая конструкция для введения в живую клетку и не может быть использована для биоимиджинга *in vivo* [Li и др., 2013].

Таблица 1.1. Оптические свойства аминопроизводных D-люциферина.

№ Соединения	$\lambda_{\text{max}}$ (нм)		Применение <i>in vivo</i>
	Природная люцифераза	Мутантная люцифераза	
D-люциферин <b>1.1</b>	557	551 (Ultra-Glo)	+
<b>1.66a</b>	594	576(Ultra-Glo)	+
<b>1.67a</b>	609	590	-
<b>1.67b</b>	623	601	-
<b>1.67c</b>	613	-	-
<b>1.67d</b>	606	-	-
<b>1.68a</b>	599	583 (Ultra-Glo)	-
<b>1.68b</b>	607	600 (Ultra-Glo)	+

В 2005 г. компания Promega Corporation выпустила новый продукт - оптимизированную люциферазу светляка Luc2 с улучшенными свойствами. Данная модификация белка среди



люцифераз, излучающих в желтом диапазоне спектра, характеризуется наибольшей яркостью и с высокой эффективностью и экспрессируется в цитоплазме клеток млекопитающих [Paguio и др., 2005]. При тестировании люциферина **1.68a** *in vivo* в трансгенных мышах, экспрессирующих люциферазу PpyLuc, а также на различных опухолевых моделях, экспрессирующих люциферазу Luc2, было выявлено что его клеточная проницаемость, включая проницаемость через гематоэнцефалический барьер, значительно превышает проницаемость D-люциферина, в то время как высокая интенсивность сигнала биолюминесценции и сдвиг максимума эмиссии соединения **1.68a** в длинноволновую область позволяют проводить наблюдение в глубоких слоях тканей [Evans и др., 2014].

Использование комбинации электрондонорного эффекта аминогруппы и поляризуемого атома селена позволило Конли и коллегам расширить линейку аналогов D-люциферина, испускающих в длинноволновом диапазоне [Conley и др., 2012]. Конденсация селено-D-цистеина с 2-циано-6-аминобензотиазолом в 0.5M Tris-HCl буферном растворе при комнатной температуре привели к получению amino-селено-D-люциферина **1.69** (Рис. 1.12) с выходом 78%. В присутствии АТФ, ионов магния и молекулярного кислорода соединение **1.69** в реакции с PpyLuc *in vitro* и *in vivo* испускает красный свет (> 600nm), хорошо отличимый от желто-зеленого излучения с той же люциферазой природного D-люциферина и оранжевого света amino-люциферина **1.66a**. Однако, общий выход и интенсивность свечения amino-селено-D-люциферина **1.69** оказались ниже чем у D-люциферина и его amino-аналога **1.66a**.

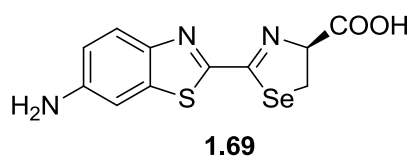


Рисунок 1.12. Структура amino-селено-D-люциферина.

В ходе исследований механизма и химической природы многоцветности биолюминесцентной реакции D-люциферина были получены синтетические аденилаты природного субстрата, а также его аналогов дегидролюциферина **1.62** и 5,5-диметиллюциферина **1.64** [Bowie, 1978; Branchini и др., 2002; Morton, Hopkins, Seliger, 1969]. Как и ожидалось, аденилат дегидролюциферина **1.70** (Рис. 1.13) не испускал свет в присутствии PpyLuc и мутантных люцифераз, однако аденилат 5,5-диметил-производного **1.71** обладал биолюминесцентной активностью с люциферазой светляков, с максимумом эмиссии, близким к испусканию природного D-люциферина (560 nm). Более того, в присутствии люциферазы огненосного шелкоуна (*Pyrophorus plagiophthalmus*) CBRluc [Wood и др., 1989], обыкновенно

излучающей в зеленом диапазоне спектра, наблюдался сдвиг эмиссии соединения **1.71** в длинноволновую область (624 нм).

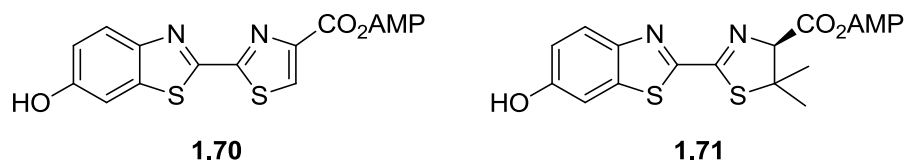


Рисунок 1.13. Синтетические аденилаты производных D-люциферина.

### 1.2.1.2 Аналоги D-люциферина, имеющие в своем составе ароматический фрагмент, отличный от бензотиазола.

Во всех вышеперечисленных структурных модификациях D-люциферина бензотиазольный фрагмент был сохранен, так как считалось, что этот фрагмент является необходимым для реакции биолюминесценции, катализируемой люциферазой PpyLuc. Однако, в течение последних десятилетий различными исследователями было доказано, что аналоги D-люциферина сохраняют способность испускать свет, даже при замене этого фрагмента на другие ароматические системы. Так в 1989 году были разработаны нафталиновый и хинолиновый производные природного люциферина **1.72a** и **1.73a** (Рис. 1.14) [Branchini, 2000; Branchini и др., 1989].

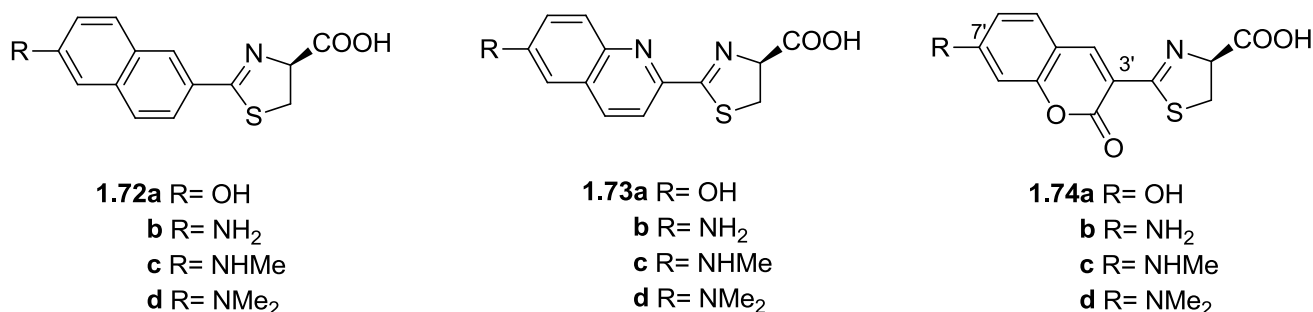


Рисунок 1.14. Нафталиновые, хинолиновые и кумариновые аналоги природного D-люциферина.

Соединения **1.72a** и **1.73a** были синтезированы из нитрилов 6-гидрокси-нафталина и 6-гидрокси-хинолина. Было показано, что оба производных испускают свет в присутствии PpyLuc, однако для достижения устойчивой эмиссии эти аналоги требовали повышенных pH: 9.3 для **1.72a** и 8.6 для **1.73a**. Свет, излучаемый производным **1.72a**, отличается сдвигом в более коротковолновую область относительно природного люциферина (524 нм, Таблица 1.2), в то время как испускание **1.73a**, напротив, лежит в оранжевой области видимого спектра (608 нм).

Двадцатью годами позже Нагано и коллеги синтезировали и исследовали спектральные свойства аминопроизводных вышеперечисленных нафтильных и хинолиновых аналогов люциферина **1.72b-d**, **1.73b-d**, а также аналогов, имеющих кумариновый скелет **1.74a-d** (Рис. 1.14) [Takakura и др., 2010]. Спектры биолюминесценции с PpyLuc этих производных значительно различались между собой, с максимумами эмиссии лежащими между 570-600 нм для амино-хинолиновых люциферинов, около 560 нм для аминаонафталиновых производных и от 500 до 530 нм для аминокумариновых аналогов (Таблица 1.2). В случае люциферинов с кумариновым и хинолиновым скелетами **1.73b-d** и **1.74b-d**, введение метильных заместителей в аминогруппу привело к увеличению длины волны излучения, тогда как для

аминонафталиновых аналогов **1.72b-d** значительной разницы не наблюдалось. Было установлено, что коротковолновый максимум билюминесцентной эмиссии аминокумарил-люциферина **1.74b** позволяет использовать его в качестве BRET-донора с другими красителями.

Таблица 1.2. Оптические свойства нафталиновых, хинолиновых и кумариновых аналогов D-люциферина.

№ Соединения	$\lambda_{\text{max}}$ (нм)	
	Природная люцифераза	Мутантная люцифераза
<b>1.72a</b>	524	-
<b>1.72b</b>	559	547 (CBRLuc)
<b>1.72c</b>	560	-
<b>1.72d</b>	564	-
<b>1.73a</b>	608	-
<b>1.73b</b>	570	548 (CBRLuc)
<b>1.73c</b>	588	-
<b>1.73d</b>	601	-
<b>1.74a</b>	555	-
<b>1.74b</b>	500	499 (CBRLuc)
<b>1.74c</b>	515	-
<b>1.74d</b>	526	-

Другим примером синтетических аналогов природного субстрата билюминесцентной реакции светляков, не содержащих бензотиазольного фрагмента, стали индольные, бензофурановые, бензотиофеновые, бензоксазольные, и бензимидазольные производные люциферина **1.75a-f** (Рис. 1.15), полученные в 2012 году [McCutcheon и др., 2012; Woodrooffe и др., 2012].

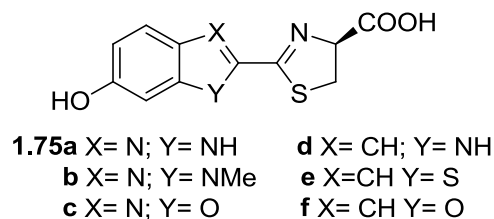


Рисунок 1.15. Индольные, бензофурановые, бензотиофеновые, бензоксазольные, и бензимидазольные производные D-люциферина.

Аналоги **1.75a-f** были получены конденсацией D-цистеина с нитрилами соответствующих гетероциклов. Циано-соединения - предшественники бензимидазольных люциферинов **1.75a,b**, а также бензоксазольный аналог-люциферина **1.75c** были синтезированы с использованием нового подхода: конденсацией соли Аппеля с ариламинами, что позволило значительно сократить путь синтеза и повысить выход искомым соединений – аналогов люциферина.

При инкубации с рекомбинантной люциферазой светляка RecFluc и АТФ при pH 7.4 бензимидазольные производные люциферина **1.75a,b** обладали высокой эмиссией. В тоже время, индольное производное **1.75d** практически не проявило люминесцентной активности в реакции с рекомбинантной люциферазой PpyWT при различных pH. В реакции с PpyWT спектры биолюминесценции соединений **1.75a**, **1.75c**, **1.75e** и **1.75f** значительно различались. При отсутствии атома азота в третьем положении гетероцикла (X = CH) наблюдалось зеленое излучение ( $\lambda_{\max}$  518-523 нм, Таблица 1.3). В свою очередь для бензимидазольных- и бензоксазольных аналогов (X=N) наблюдался сдвиг в область желтого света ( $\lambda_{\max}$  561-574 нм, Таблица 1.3).

При тестировании люциферинов **1.75a** и **b** *in vivo* на опухолевых моделях HEK293, экспрессирующих люциферазу RecFluc, было выявлено, что аналоги, несущие бензимидазольный фрагмент, обладают хорошей клеточной проницаемостью и биологической совместимостью и могут быть использованы для биолюминесцентного имиджинга в живых клетках. Необходимо заметить, что соединение **70b** обладает одним из самых коротковолновых максимумов эмиссии ( $\lambda_{\max}$  460 нм) среди известных люциферинов, что позволяет легко отличать его от других аналогов люциферина и использовать для многоцветного имиджинга.

Таблица 1.3. Оптические свойства аналогов **1.75a-f**.

№ Соединения	$\lambda_{\max}$ (нм)		Применение <i>in vivo</i>
	PpyWT	RecFluc	
<b>1.75a</b>	574	578	+
<b>1.75b</b>	-	460	+
<b>1.75c</b>	557	-	
<b>1.75e</b>	523	-	
<b>1.75f</b>	518	-	

В 2013 году Маки и коллеги, основываясь на данных структурного анализа белка люциферазы, использовали молекулярный дизайн для создания новых аналогов D-люциферина, излучающих в красной области спектра [Iwano и др., 2013; Miura и др., 2013]. Были

синтезированы аналоги **1.76-1.79** (Рис. 1.16) и установлено, что бензотиазольный фрагмент субстрата ферментативной реакции светляков с успехом может быть заменен на бензольную, стирольную или более длинную олефиновую систему с сопряженными  $\pi$ -связями, при этом, за счет увеличения сопряженной системы  $\pi$ -связей, может происходить образование хромофоров с более длинноволновым поглощением

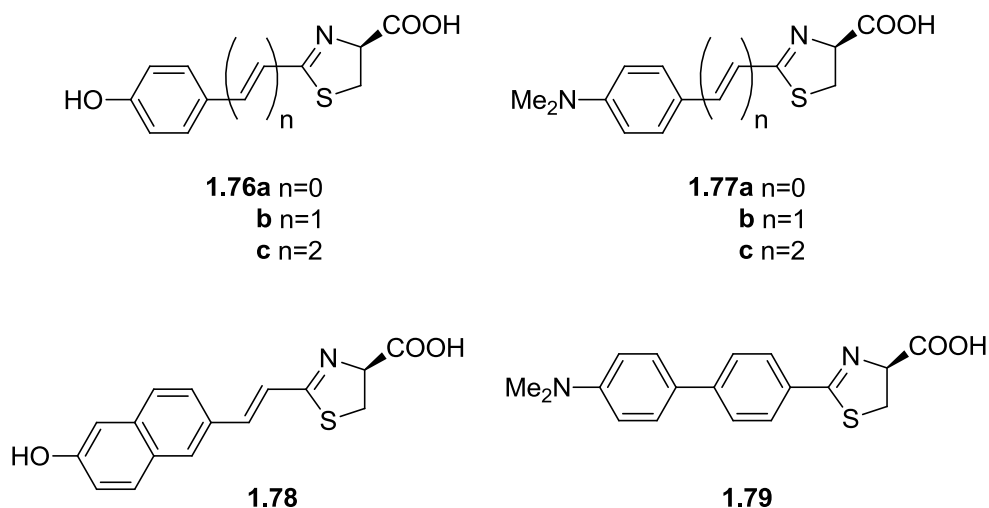


Рисунок 1.16. Аналоги D-люциферина, содержащие ароматическую и олефиновые системы с сопряженными  $\pi$ -связями.

Аналоги **1.76a,b** и **1.77a** были получены путем прямой конденсации D-цистеина с соответствующими ароматическими нитрилами. Для синтеза аналогов **1.76c**, **1.77b,c** и **1.78** использовали ферментативный гидролиз эфиров, полученных в результате конденсации метилового эфира (S)-третил-D-цистеина с соответствующими винилкарбоновыми кислотами. В свою очередь, 4'-(диметиламино)-[1,1'-дифенил]-4-карбоновая кислота – предшественник аналога люциферина **1.79** был получен в две стадии из 4-диметиламинофенилбороновой кислоты с использованием реакции Сузуки. Конденсация результирующего дифенила с метиловым эфиром (S)-третил-D-цистеина с последующими циклизацией и гидролизом привели к получению аналога D-люциферина **1.79**.

Максимумы длин волн биолюминесцентной эмиссии синтетических аналогов люциферина, имеющих систему сопряженных двойных связей **1.76-1.79**, варьировались в диапазоне от синего (440 нм) до дальне-красного (675 нм). Было обнаружено, что удлинение цепи сопряжения на один олефиновый фрагмент между ароматическим и тиазольным кольцами приводит к увеличению длины волны испускания люциферина с шагом в  $\sim 100$  нм (Таблица 1.4). Интенсивность испускания света олефинированными аналогами **1.76-1.78** медленно увеличивается (около минуты) и затем сохраняется в течение того же периода времени, в отличие от природного D-люциферина, быстро достигающего максимума интенсивности

свечения с последующим медленным угасанием. Также было установлено, что невысокая интенсивность свечения аналогов **1.76-1.78** может быть на порядки увеличена их аденилированием. Для бифенильного аналога люциферина **1.79** в реакции с люциферазой светляка также наблюдалось излучение в красной области спектра (675 нм), однако низкая растворимость в воде и чрезвычайно малая интенсивность испускаемого света (0,01% в сравнении с природным люциферинном) делают его непригодным для биоимиджинга *in vivo*.

Таблица 1.4. Оптические свойства аналогов **1.76 - 1.79**.

№ Соединения	$\lambda_{\text{max}}$ (нм) QuantiLum
<b>1.76a</b>	440
<b>1.76b</b>	530
<b>1.76c</b>	640
<b>1.77a</b>	445
<b>1.77b</b>	560
<b>1.77c</b>	675
<b>1.72a</b>	565
<b>1.78</b>	655
<b>1.79</b>	675

Совсем недавно был впервые синтезирован двухцветный аналог природного люциферина светляков **1.80** (Рис. 1.17), испускающий в области от дальнего красного до ближнего инфракрасного света в реакциях с природной и мутантными формами люцифераз [Jathoul и др., 2014]. Как и Маки, группа Пьюла использовали введение двойной связи для достижения батохромного сдвига излучения люциферина, однако гетероциклические фрагменты D-люциферина – бензотиазольное и тиазольное кольца были сохранены.

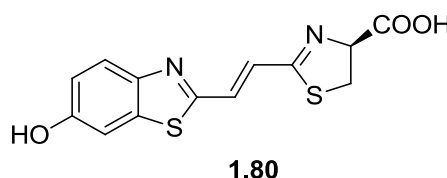


Рисунок 1.17. Первый двухцветный аналог D-люциферина, испускающий в красной и ближней ИК областях спектра.

Максимум билюминесцентной эмиссии *in vitro* люциферина **1.80** в реакции с мутантной люциферазой x5 S284T является самым длинноволновым среди существующих на данный момент аналогов D-люциферина (706 нм) При тестировании люциферина **1.80** *in vivo* на различных опухолевых моделях, экспрессирующих немутантную люциферазу светляков, было выявлено, что длина волны большей части испускаемого света находится выше 600 нм и, как следствие, наблюдалось меньшее рассеяние света в крови по сравнению с природным D-люциферинном, в то время как высокая интенсивность сигнала билюминесценции позволяла проводить наблюдение в глубоких слоях тканей.

Несмотря на то, что аналоги **1.66a**, **1.67a-d**, **1.68a,b**, **1.69**, **1.71**, **1.73a,c,d**, **1.76c**, **1.77c**, **1.78**, **1.79** и **1.80** обладают длинноволновыми максимумами испускаемого света, ни один из них не обнаружил улучшенной светоотдачи в ферментативной реакции по сравнению D-люциферинном в условиях повышенного содержания этих аналогов и АТФ. Причины этого явления многочисленны. В случае аминюцифериннов одним из ограничивающих факторов является ингибирование реакции продуктами окисления люцифериннов [Reddy, Thompson, Miller, 2010; Woodroofe и др., 2008]. Для субстратов, имеющих замещенное бензотиазольное кольцо (**1.72-1.79**) снижение скорости формирования аденилата и/или неферментативное окисление являются вероятными причинами [Branchini и др., 1989; Iwano и др., 2013; Woodroofe и др., 2012]. В обоих случаях сниженный квантовый выход возбужденного состояния может играть не последнюю роль. На сегодняшний день D-люциферин остается оптимальным субстратом для реакций *in vitro*, особенно когда концентрация люциферина не является лимитирующим фактором.



### 1.2.2 Синтетические аналоги целентеразина.

Открытие целентеразин-зависимой биолюминесцентной системы создало условия для развития множества хемилюцинесцентных и биолюминесцентных аналитических систем. Целентеразин используется с фотопротеином акворином и его рекомбинантными аналогами для мониторинга концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в живых клетках [Robert и др., 2000], что позволяет наблюдать за деятельностью, развитием и пластичностью центральной нервной системы в различных организмах. Аналоги целентеразина также используются с акворином для изучения ионных каналов [Dupriez и др., 2002]. Более того, были разработаны целентеразин-зависимые системы, использующие флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) для мониторинга белок-белковых взаимодействий в живых клетках [Xu и др., 2003].

В медузах хемилюминесцентный кальций-связывающий белок акворин, взаимодействует с зеленым флуоресцентным белком (GFP), что приводит к испусканию яркого зеленого света при стимуляции ионами кальция. Подражая природе для достижения батохромного сдвига люминесцентной реакции, различными исследователями были созданы гибридные белки с акворином. Так группой Брюлета был создан гибридный белок GFP-акворин, максимум испускания которого лежит в более длинноволновой области по сравнению с акворином [Baubet и др., 2000]. Получившийся фермент имеет относительно быструю кинетику, широкий динамический диапазон и относительно нечувствителен к pH [Curie и др., 2007; Rogers и др., 2005]. Совсем недавно были также получены более «красные» гибридные белки Venus-акворин, испускающий в желтой области спектра, а также комплекс акворина с красным флуоресцентным белком (RFP) [Curie и др., 2007; Manjarrés и др., 2008]. Эти белки были использованы для мониторинга уровня кальция в клетках мозга дрозофил [Martin и др., 2007] и на уровне целого организма мышей [Curie и др., 2007].

Помимо целентеразин-зависимых фотопротеинов в биолюминесцентном имиджинге также нашли широкое применение люциферин-люциферазные системы морских организмов. Морские люциферазы и их рекомбинантные аналоги имеют несколько весомых преимуществ для биоимиджинга по сравнению с люциферазой светляков. Одним из них является относительно небольшой размер морских люцифераз, что позволяет использовать их в случаях, когда необходимы короткие трансгенные последовательности [Kimura и др., 2010]. Еще одним преимуществом целентеразин-зависимых люминесцентных систем является то, что, в отличие от люциферазы светляков, морские ферменты не требуют АТФ в качестве кофактора и, таким образом, могут быть использованы для получения изображения трансдуцированных клеток и тканей независимо от их метаболического состояния, а также меньше нарушают деятельность клеток, в которых они экспрессируются. Недостатком *Renilla*, *Oplophorus* и *Gaussia* люцифераз

по сравнению с люциферазой светляков для биоимиджинга является то, что большая часть испускаемого морскими люциферазами света поглощается исследуемыми тканями. Более того, их субстрат – целенетразин также испускает свет в процессе автоокисления – неферментативного окисления кислородом воздуха, усиливающегося в присутствии супероксид аниона и пероксинитрита, присутствующих в тканях и клетках.

Для изменения чувствительности акворина и гибридных белков к ионам кальция, а также в попытке улучшить спектральные характеристики целентеразин-зависимых систем используются синтетические аналоги природного целентеразина.

### 1.2.2.1 Аналоги целентеразина

С начала семидесятых годов исследователями был предпринят ряд попыток регулирования цвета люминесценции целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем при помощи модификаций белков [Shimomura и др., 1993] и субстрата [Shimomura, 1995b].

Замещение природной функциональной простетической группы акворина – целентеразина – на его синтетические аналоги привело к получению полусинтетических фотопротеинов. Первые синтетические аналоги целентеразина были получены в конце 80-х годов группой Шимомуры с использованием модифицированного синтетического подхода Иноуэ и Киши с целью улучшить чувствительность метода мониторинга ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в живых клетках [Shimomura, Musicki, Kishi, 1988, 1989]. В 1988 были синтезированы 4 аналога **1.81-1.85** (Рис. 1.18, Таблица 1.5), содержащие аминокгруппу, а также метиленовый, диметиленовый и винильный мостики, которые затем были включены в апоакворин с образованием стабильных полусинтетических фотопротеинов: *a*-, *m*-, *e*- и *v*-акворинов соответственно. Было установлено, что чувствительность полусинтетического *e*-акворина к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в живых клетках в 4 раза превышает чувствительность природного акворина. Более того, спектр люминесценции этого фотопротеина имеет два пика (405 и 465 нм), соотношение которых напрямую зависит от концентрации ионов кальция в диапазоне рСа от 5 до 7, что позволяет быстро вычислить концентрацию кальция в клетке по соотношению пиков люминесценции.

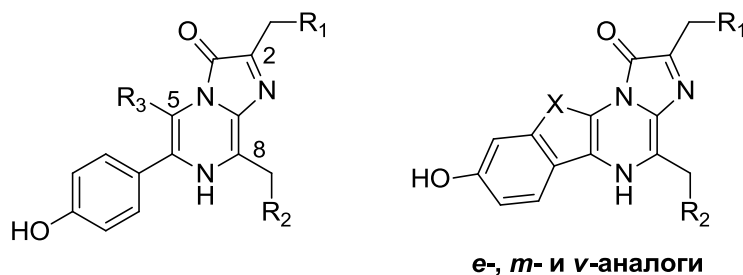


Рисунок 1.18. Структуры синтетических аналогов целентеразина. Заместители см. Таблица 1.5.

Годом позже были получены еще 30 аналогов целентеразина, спектральные свойства и чувствительность к ионам кальция соответствующих им полусинтетических акворинов были исследованы Шимомурой. Введение синтетического аналога целентеразина **1.85** (Таблица 1.5) в апоакворин привело к получению *h*-акворина, относительная интенсивность люминесценции которого в 10 раз превышала интенсивность природного акворина при рСа 7. Введение в апоакворин аналога **1.86**, имеющего атом фтора вместо гидроксигруппы в заместителе  $\text{R}_1$ , позволило получить фотопротеин с относительной интенсивностью люминесценции большей

чем у *h*-акворина, однако дальнейшее введение атомов фтора в структуру целентеразина – аналоги **1.87** и **1.88** – привело к сильному снижению интенсивности свечения полученных акворинов. Замещение гидроксигруппы заместителя R<sub>1</sub> на атомы других галогенов – аналоги **1.90-1.92**, как и замещение фенильного фрагмента R<sub>1</sub> на нафтильный также привели к значительному снижению люминесцентной активности соответствующих фотопротеинов.

Полусинтетические акворины *cp*-, *ch*-, *ip*- и *b*-, полученные из аналогов целентеразина **1.94**, **1.97**, **1.101** и **1.102**, в которых бензильная группа R<sub>2</sub> замещена на циклопентил, циклогексил, изопропил и бутил, соответственно, обладали большой интенсивностью люминесценции, в то время как для *cp*- и *ch*-акворинов также наблюдались высокая скорость взаимодействия с ионами кальция, сравнимая с природным акворином.

Полусинтетические фотопротеины, полученные из аналогов целентеразина, имеющих одновременно модифицированные заместители R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, обладали высоким уровнем относительной интенсивности люминесценции. Акворины, полученные из аналогов целентеразина **1.96** и **1.99**, оказались пригодны для измерения низких концентраций ионов кальция, так как обладали высокой люминесцентной активностью, чувствительностью к ионам Ca<sup>2+</sup> и относительно низким уровнем Са–независимой люминесценции.

Фотопротеины *e*-типа, полученные из аналогов целентеразина **1.107-1.114**, содержащих этиленовые мостики, обладали высокой люминесцентной активностью и относительной интенсивностью свечения. Более того, в спектрах люминесценции *eh*- и *ef*-акворинов, как и в случае *e*-акворина наблюдаются два пика, соотношение которых напрямую зависит от концентрации ионов кальция, тогда как в спектрах фотопротеинов полученных из аналогов **1.109-1.111** наблюдался только один пик при 400 нм.

Таблица 1.5. Структура и спектральные свойства аналогов целентерезина.

	Синтетические аналоги целентерезина			$\lambda_{\text{max}}$ (нм)		Фотопроtein Акворин
				Люцифераза		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	<i>Renilla</i>	<i>Oplopholus</i>	
<b>1.33</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	475	454	465
<b>81(e)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	418/475	459	405/465
<b>82(m)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X=CH <sub>2</sub>	475	-	460
<b>83(v)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X=CH=CH	512	480	485
<b>84(a)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H 6= C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	468	460	465
<b>85(h)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	475	452	464
<b>86(f)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F( <i>p</i> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	472	446	473
<b>87(f2)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> F <sub>2</sub> ( <i>m, p</i> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H			470
<b>88(f5)</b>	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H			465
<b>89(f8)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F( <i>p</i> )	H			466
<b>90(cl)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl ( <i>p</i> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	478	450	463
<b>91(br)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br ( <i>p</i> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H			473
<b>92(i)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> I ( <i>p</i> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H			476
<b>93(n)</b>	$\beta$ -нафтил	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	475	449	467
<b>94(cp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	H	470	443	442
<b>95(fcp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F( <i>p</i> )	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	H			452
<b>96(hcp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	H			444

<b>97(ch)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	H	470	444	452
<b>98(chm8)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	H			442
<b>99(fch)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	H			461
<b>100(hch)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	H			450
<b>101(ip)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H			441
<b>102(b)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	469	-	448
<b>103(fip)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H			449
<b>104(fb)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H			460
<b>105(m5)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>		440	438
<b>106(m8)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H		-	444
<b>107(eh)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			405/465
<b>108(ef)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			410/475
<b>109(ech)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400
<b>110(ehch)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400
<b>111(efch)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	C <sub>6</sub> H <sub>11-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400
<b>112(ecp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400/440
<b>113(ehcp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400/440
<b>114(efcp)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F(p)	C <sub>5</sub> H <sub>9-c</sub>	X=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>			400/440

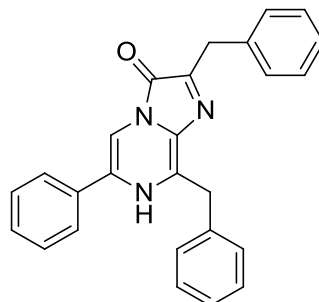
Исследователи установили, что при использовании подходящего полусинтетического акворина, диапазон чувствительности к концентрации ионов кальция может быть увеличен на одну единицу  $pCa$  в обе стороны по сравнению с природным акворином, чувствительность которого лежит в пределах  $pCa$  5-7 [Shimomura, 1991].

Для исследования применимости различных целентеразин-зависимых систем для биолюминесцентного имиджинга в живых организмах, 23 синтетических люциферина были протестированы *in vitro* на субстратную совместимость с рекомбинантными люциферазами *Renilla* (RLuc) и *Oplophorus* (OLuc) [Inouye, Shimomura, 1997]. Интенсивность люминесценции была наивысшей в реакциях, катализируемых OLuc, и самой низкой в реакциях с апоакворином, однако интенсивность свечения сильно варьировалась в зависимости от используемого субстрата. Высокий уровень светоотдачи ферментативной реакции катализируемой RLuc наблюдался для *e*- и *v*-аналогов люциферина. Более того, для *v*-аналогов наблюдался значительный батохромный сдвиг максимумов эмиссии (512 нм) по сравнению с максимумами эмиссий природного субстрата и других аналогов. Субстратная специфичность OLuc к синтетическим аналогам целентеразина оказалась шире чем у люциферазы RLuc, однако наибольшая интенсивность светоотдачи ферментативной реакции и интенсивность свечения наблюдалась при взаимодействии с природным целентеразином.

Спектральные характеристики некоторых из вышеперечисленных аналогов целентеразина были позднее определены на опухолевых клеточных линиях *in vitro* и *in vivo* на опухолевых моделях имплантированных атимусным мышам [Zhao и др., 2004]. В этом исследовании было показано, что светоотдача *e*-аналога люциферина в клетках, экспрессирующих RLuc, в четыре раза превышала светоотдачу природного целентеразина, однако уровень автоокисления и, как следствие, фонового шума биолюминесценции, был очень высок. По соотношению уровня интенсивности к уровню автолюминесценции наилучшими из субстратов для биолюминесцентного имиджинга *in vivo* оказались *h*- и *f*-производные.

Долгое время считалось, что *para*-гидроксильная группа фенильного заместителя в шестом положении имидазопиразинового кольца является необходимой для прохождения реакции биолюминесценции, так как квантовый выход и интенсивность светоиспускания различных аналогов целентеразина как в составе акворина так и в реакции с люциферазами значительно снижались при ее замещении на любую другую, за исключением аминогруппы. Однако, в ходе исследований применимости реакции Сузуки для синтеза аналогов целентеразина группой Накамуры был получен бисдеоксицелентеразин **1.115** (Рис. 1.19), проявивший высокую биолюминесцентную активность с OLuc [Nakamura и др., 1997]. Было установлено, что бисдеокси-производное **1.115** обладает одной из самых коротких длин волн

биолюминесцентной эмиссии среди известных на тот момент аналогов целентеразина, что позволяет использовать его в качестве BRET-донора с GFP.



бисдеоксицелентеразин 1.115

Рисунок 1.19. Бисдеоксицелентеразин

Для улучшения спектральных характеристик люциферина немногим позже группой Накамуры были получены аналоги целентеразина **1.116–1.118**, содержащие в своей структуре цепь сопряженных двойных связей в положении C8 (Рис. 1.20) [Wu и др., 2001].

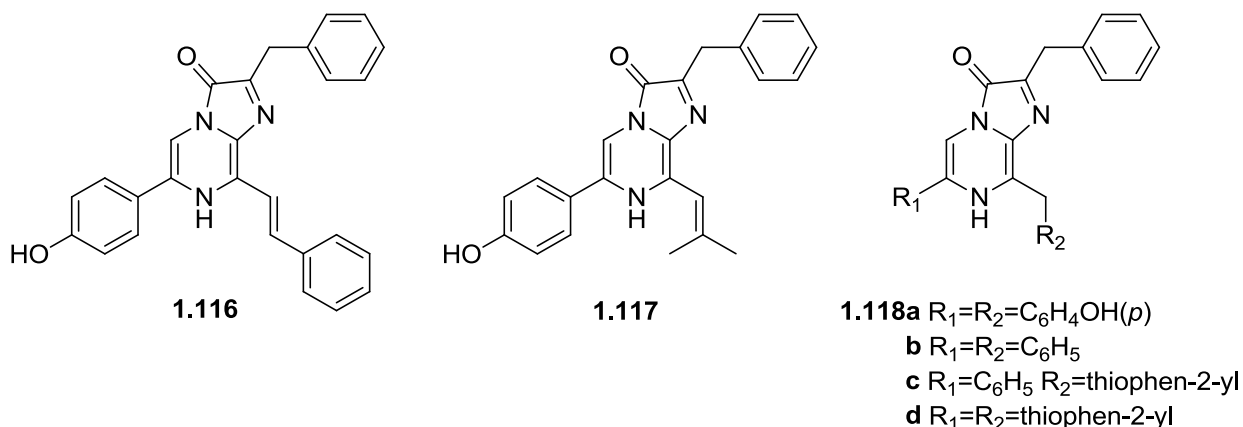


Рисунок 1.20. Аналоги целентеразина содержащие в своей структуре цепь сопряженных двойных связей в положении C8.

Спектральные свойства этих аналогов были исследованы с использованием рекомбинантных люцифераз *Renilla*, *Oplophorus* и акворина. Максимум хемилюминесценции аналога **1.116** имел наибольший сдвиг в длинноволновую область спектра (580 нм), однако в реакции биолюминесценции испускание зарегистрировать не удалось. В присутствии люциферазы *Renilla* интенсивности люминесценции аналогов, имеющих 6-фенильный заместитель **1.118b** и **c**, были невысокими. Низкая интенсивность люминесценции наблюдалась и для полусинтетических акворинов, полученных из аналогов **1.118b-d**. Лишь для акворина



**1.118a** общая светоотдача реакции достигла 5.5% от люминесцентной активности природного акворина.

При использовании люциферазы *Oplophorus* в сочетании с аналогами **1.117** и **1.118a-d** наблюдался батохромный сдвиг максимумов эмиссии всех аналогов, например испускание аналога **118d**, имеющего два тиофеновых фрагмента, лежало в зеленой области спектра (528 нм). Однако, интенсивность испускания для всех аналогов была незначительной, что не позволило применять их для биолюминесцентного имиджинга в живых организмах.

В 2005 г. компания Promega Corporation выпустила два оптимизированных аналога целентеразина, *ViviRen* и *EnduRen* (Рис.1.21), менее подверженных автоокислению, свойственному целентеразину, а также имеющих высокую светоотдачу в присутствии люциферазы *Renilla*, и более длительную эмиссию [Hawkins и др., 2005]. Оба аналога содержат небольшие защитные группы, блокирующие окисление целентеразина, и тем самым снижающие скорость деградации субстратов и уменьшающие спонтанное излучение света, вызывающее высокое фоновое свечение. Защитные группы отщепляются эстеразами и липазами в клетках, а результирующий субстрат вступает в ферментативную реакцию с люциферазой с образованием целентерамида и испусканием света.

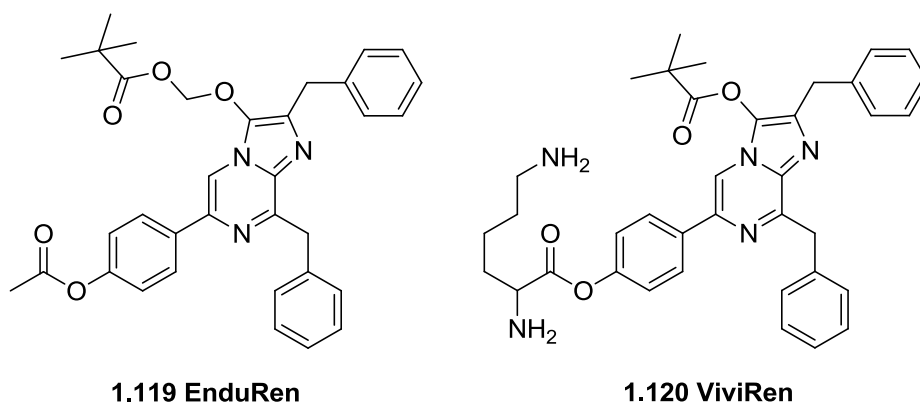
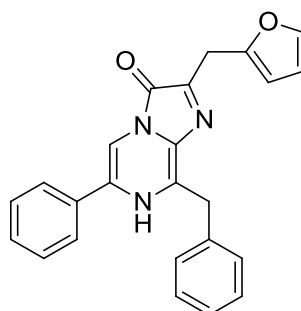


Рисунок 1.21. Оптимизированные аналоги целентеразина *ViviRen* и *EnduRen*.

Люциферины **1.119** и **1.120** были исследованы на различных опухолевых моделях, экспрессирующих гуманизированные ферменты: люциферазу *Renilla* [Otto-Duessel и др., 2006] и секретируемую люциферазу *Gaussia* (GLuc) [Kimura и др., 2010] *in vitro* и *in vivo*. Исследователями было выявлено, что интенсивность биолюминесцентного сигнала, испускаемого опухоленесущими мышами, была значительно выше как в случае внутрибрюшной, так и в случае внутривенной инъекции субстрата *ViviRen* в организм животного, в то время как интенсивность сигнал от *EnduRen* была равна или меньше, чем интенсивность сигнала ферментативной реакции с природным целентеразином.

Высокая чувствительность, широкий динамический диапазон и простота измерения сигнала различных биолюминесцентных систем достигаются в значительной степени путем постепенной модификации природных ферментов и субстратов различных светящихся организмов. Совсем недавно компания Promega создала совершенно новую биолюминесцентную систему (комплементарные люциферин и люциферазу), с улучшенными биохимическими и физическими характеристиками, способную к более эффективному светоиспусканию [Hall и др., 2012]. Основываясь на небольшой субъединице люциферазы (19 кДа) из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*, был получен рекомбинантный секретлируемый фермент названный NanoLuc, окисляющий специфический субстрат - синтетический имидазопиразинон фуримазин (**1.121**), содержащий фурильный заместитель во втором положении имидазопиразинонового кольца (Рис. 1.22).

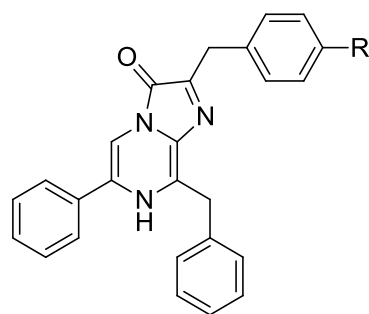


**1.121 Фуримазин**

Рисунок 1.22. Синтетический люциферин - фуримазин.

В люминесценции новой синтетической люциферин-люциферазной системы наблюдалась медленная кинетика подъема свечения до максимума (460 нм), а затем медленное затухание. Интенсивность испускания фуримазина в сочетании с NanoLuc более чем в 30 раз превосходила интенсивность свечения с природным субстратом, в то время как фоновая автолюминесценция, свойственная имидазопиразиноновым люциферинам, практически не наблюдалась.

В 2013 году Иноуэ и Сато получили альтернативную NanoLuc люциферазу небольшого размера, основанную на той же субъединице природного фермента *O. gracilirostris*, названную NanoKaz, субстратная совместимость и спектральные свойства которой были протестированны с четырьмя полученными ранее аналогами люциферина: *h*- и *f*-целентеразинами (**1.85**, **1.86**), бисдезоксипроизводным **1.115** и фуримазином **1.121**, а также с двумя новыми производными **1.122a,b** (Рис. 1.23) [Inoue и др., 2013].

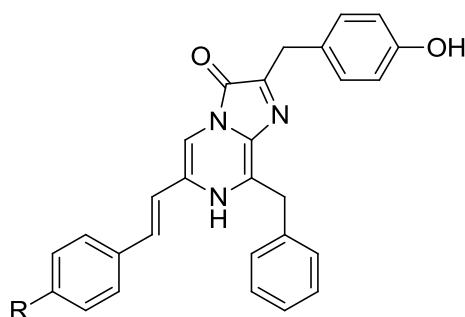


**1.122a** R= OH  
**b** R=F

Рисунок 1.23. Структура аналогов **1.122a** и **b**

В биолюминесцентной реакции, катализируемой синтетическим ферментом NanoKaz, максимумы испускания всех шести аналогов люциферина лежали в голубой области спектра (~450 нм), в то время как интенсивность испускания сильно зависела от примененного субстрата. Наиболее интенсивное свечение наблюдалось для *h*-и *f*- целентеразинов, однако длительность светоиспускания была наилучшей в реакциях с соединениями **1.115** и **1.122a** и **b**.

В конце 2014 года группе Сузуки удалось получить три новых стабильных целентеразина, несущих стирильные заместители в шестом положении имидазопиразинонового скелета **1.123a-c** (Рис 1.24) [Nishihara и др., 2015]. Спектральные характеристики и физические свойства этих аналогов были исследованы в сочетании с различными рекомбинантными RLuc. В спектре аналога **1.123a** наблюдался небольшой сдвиг максимума биолюминесцентной эмиссии в длинноволновую область, в то время как для производных **1.123b** и **c** наблюдался гипсохромный сдвиг в синюю область спектра, ранее наблюдавшийся лишь для соединения **1.115**. Высокие стабильность и интенсивность сигналов соединений **1.123b** и **c** делают их перспективной альтернативой бисдезоксигелентеразину в качестве BRET-донора для GFP.



**1.123a** R= OH  
**b** R=H  
**c** R=Ph

Рисунок 1.24. Стабильные аналоги целентеразина

### 1.3 Заключение

Изучение химических и физических свойств компонентов биолюминесцентных систем представляет большой интерес как с фундаментальной так и с прикладной точек зрения. В настоящем разделе мы постарались наиболее полно осветить все люциферины, химические структуры которых на данный момент установлены, а также синтетические подходы, используемые для их получения, и механизмы, лежащие в основе светоиспускания люминесцентных реакций с их участием. Далеко не все из изученных семи биолюминесцентных системы нашли свое применение на практике, однако возрастающая потребность в создании нетоксичных для живых организмов биолюминесцентных маркеров, испускающих в красной области спектра, требует как разработки новых аналогов существующих люциферин, так и исследования новых биолюминесцентных систем.

## Глава 2. Результаты и обсуждение

### 2.1 Введение. Выделение и очистка компонентов биолюминесцентной системы почвенного червя *Fridericia heliota*.

Долгое время существовала общая концепция о единой природе люминесценции почвенных червей (олигохет), основанная на результатах сравнительных исследований физиологии и биохимии 12 видов, относящихся к 6 родам (*Diplocardia*, *Diplotrema*, *Fletcherodrilus*, *Octochaetus*, *Pontodrilus* и *Spenceriella*) [Wampler, Jamieson, 1980]. Все эти биолюминесцентные олигохеты секретируют люминесцентную слизь, содержащую целомические клетки, в гранулах которых локализована люминесценция. Биолюминесценция олигохет характеризуется общим признаком - участием перекиси водорода. Люциферин вида *Diplocardia longa*, N-изовалерил-3-амино-1-пропаналь **1.59**, выступает в качестве субстрата для люциферазы всех биолюминесцентных дождевых червей. Кроме того, люцифераза *D. longa* проявляет активность в перекрестных реакциях с люциферинами других червей [Ohtsuka, Rudie, Wampler, 1976].

Изучаемый с середины XIX столетия феномен биолюминесценции почвенных червей из семейства энхитреид (*Enchytraeidae*), ограничивающийся исключительно родами *Henlea* и *Fridericia*, по сей день является малоизученным [Rota, 2009].

Недавно нашими коллегами из Красноярска Валентином Петушковым и Натальей Родионовой в Сибири был обнаружен новый вид биолюминесцентных олигохет *Fridericia heliota* - небольших (~ 15 мм в длину, 0,5 мм в диаметре и ~ 2 мг веса), бело-желтых червей, обитающих в лесной почве и испускающих синий свет ( $\lambda_{\max}$  люминесценции 478 нм) при механической стимуляции. Люминесценция *Fridericia heliota* локализована в эпидермальных клетках. [Rota и др., 2003].

В ходе дальнейшей работы данной группы было показано, что механизм биолюминесценции *F. heliota* является уникальным, так как люциферин и люцифераза этого червя не проявляют способность к перекрестной биолюминесценции с люциферазами или люциферинами других организмов. Люминесцентная система *F. heliota* включает 5 компонентов: люциферазу, люциферин, аденозин-5'-трифосфат (АТФ), ионы  $Mg^{2+}$  и кислород [Petushkov, Rodionova, Bondar, 2003; Rodionova, Bondar, Petushkov, 2003].

Выделение и определение структуры люциферина червя *Fridericia heliota* было сильно затруднено чрезвычайно малым количеством биомассы червя (ручной сбор давал около 30 г в год) и низким содержанием люциферина (~0.1 мкг/г необработанной биомассы) [Petushkov, Rodionova, 2007]. В ходе многочисленных экспериментов, направленных на очистку

люциферина *F. heliota*, Петушковым и сотр. были выделены вещества неустановленного состава, названные ComponentX (CompX), AsLn2 и AsLn7 [Marques и др., 2011]. Эти соединения проявили хроматографическую подвижность и УФ-спектральные свойства аналогичные люциферину. Однако они не обладали люминесцентной активностью при смешивании с люциферазой червя *F. heliota* или другими известными люциферазами. Мы предположили, что эти соединения могут являться неактивными природными аналогами люциферина – его биосинтетическими предшественниками или продуктами деградации. Принимая во внимание чрезвычайно малую концентрацию люциферина, тогда как количество CompX более чем в десять раз превышало количество люциферина, мы пришли к выводу о необходимости в первую очередь определить структуру и синтезировать CompX.

## 2.2 Синтез люциферина и его аналогов

### 2.2.1 Синтез и свойства природного аналога люциферина CompX

Мажорным компонентом низкомолекулярной люцифериновой фракции экстракта биомассы червя *F. heliота* было соединение, названное нами CompX, которого оказалось в 30 раз больше люциферина (0.15 мг). Анализ спектров поглощения (Рис. 2.1а) полученного вещества позволил выявить pH-зависимость в области 2.8 ÷ 5.0. При pH 2.8 наблюдаются максимумы поглощения при 234 нм (локальный максимум) и 296 нм, тогда как при pH 4.0 -  $\lambda_{\text{max}}$  230 нм (локальный максимум) и 294 нм, а при pH 5.0 -  $\lambda_{\text{max}}$  228 нм (локальный максимум) и 288 нм, что позволило предположить наличие ионогенных групп с  $pK_a$  около 4.

Исследуемое соединение CompX обладало способностью к флуоресценции (Рис. 2.1b), с эмиссией ( $\lambda_{\text{em}}$ ) в синей области видимого спектра. Спектр флуоресценции показал  $\lambda_{\text{em}}=460$  нм в кислом водном растворе (возбуждение при 310 нм) и  $\lambda_{\text{em}}=457$  нм в основном водном растворе ( $\lambda_{\text{ex}}=290$  нм). Стоксов сдвиг CompX был достаточно велик как в кислой (150 нм) так и в щелочной (167 нм) средах, что позволило предположить сильную делокализацию электронов.

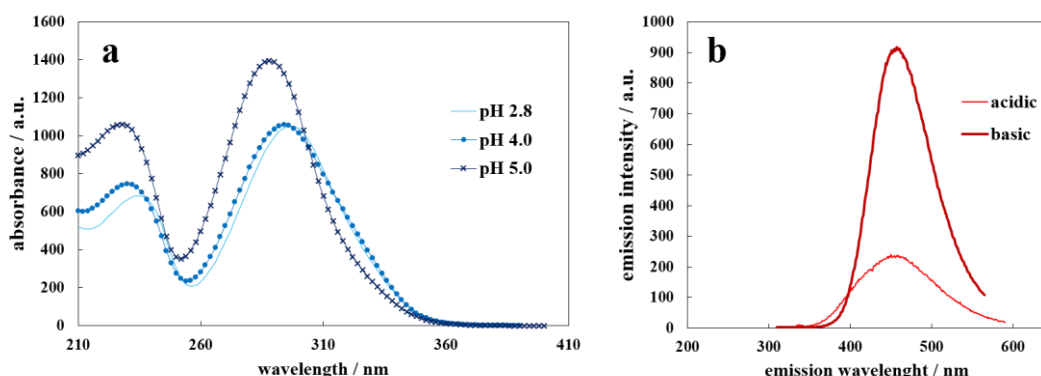


Рисунок 2.1 Спектры (а) абсорбции и (b) флуоресцентной эмиссии CompX при различных pH. В (а), измерения проводились в 0.1% формиате аммония при значениях pH 2.8 (тонкая линия), 4.0 (пунктирная линия), и 5.0 (линия с астерисками). В (b), измерения проводились в основных (жирная линия) и кислых (тонкая линия) условиях. Длины волн возбуждения 290 нм в основной среде и 310 нм в кислой.

Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного CompX выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  239.0598, соответствующей молекулярной формулой к которому являлась  $C_{11}O_6H_{11}^+$ , (расчетное  $m/z$  239.0550). В спектре  $^1H$  ЯМР CompX полученном Максимом Дубинным (ИБХ РАН) наблюдались характерные пики трех протонов в

ароматической области (Таблица 2.1): дублет с небольшой константой спин-спинового взаимодействия (2.2 Гц, Н5), дублет с большой константой (8.5 Гц, Н8) и дублет дублетов (2.2 и 8.5 Гц, Н9), с равными значениями интегралов. Такая картина характерна для трехзамещенного бензольного кольца, где два протона занимают соседнее положение, а третий находится в *мета*-положении к первому и *пара*-положении ко второму протону. Также в спектре наблюдались слабопольный синглет при 6.89 мд (один протон, С3) и метокси-группа (три протона, С11). Таким образом, в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР наблюдались 7 из предполагаемых 10 протонов. Все одиннадцать атомов углерода давали сигналы в одно- и двумерных ЯМР спектрах  $^{13}\text{C}$ . Помимо 8 сигналов в слабом поле наблюдались 2 сигнала карбоксильных углеродов и 1 сигнал метокси-группы. Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом согласовались со структурой 5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойной кислоты (Рис. 2.2а) [Petushkov и др., 2014а]. Для определения конфигурации трехзамещенной двойной связи и подтверждения строения CompX нами были синтезированы оба пространственных изомера (*E* и *Z*).

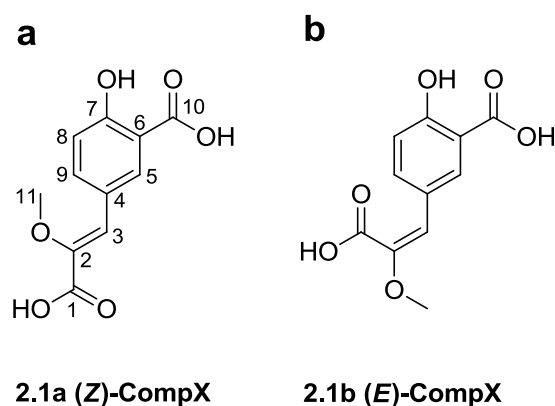


Рисунок 2.2. Структуры CompX и его (*E*)-изомера. (а) Нумерация углеродов в CompX согласно Таблице 2.1. (б) Синтетический (*E*)-изомер CompX с противоположной конфигурацией C2-C3 двойной связи.



Ключевой стадией синтеза CompX являлась реакция олефинирования 5-формил-2-гидроксibenзойной кислоты по Хорнеру-Водсворту-Эммонсу с использованием метил-2-(диметоксифосфонил)-2-метоксиацетата (полученного по описанной методике [Lowell и др., 2010]), позволившая получить оба изомера CompX в соотношении  $Z:E = 2:1$  (Схема 2.1). Основной  $Z$ -изомер был идентичен природному образцу согласно ЯМР и УФ спектрам (Рисунок 2.3), тогда как минорный  $E$ -изомер обладал значимо отличными свойствами. Наиболее существенными отличиями явились химические сдвиги углерода C3 и соответствующего протона ( $\Delta$  18.2 и 0.93 м.д., соответственно, Таблица 2.1). Стоит отметить также, что изомер CompX с неприродной конфигурацией двойной связи не обладал флуоресцентными свойствами.

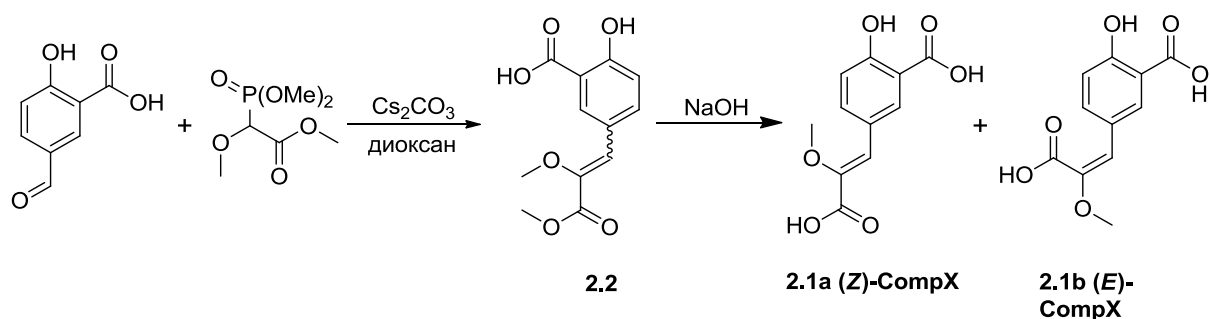


Схема 2.1. Синтез CompX и его  $E$ -изомера.

Таблица 2.1.  $^1\text{H}$  (800 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (200 МГц) химические сдвиги и мультиплетности сигналов протонов CompX и его синтетического аналога (*E*)-изомера CompX ( $\text{D}_2\text{O}$ , pH 4.2).

Нумерация атомов углерода	CompX		<i>(E)</i> -изомер CompX	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	170.4	-	171.0
2	-	146.5	-	151.1
3	6.89 (с)	122.1	5.96 (с)	103.9
4	-	117.8	-	116.1
5	8.15 (д, 2.2 Гц)	132.3	7.70 (д, 2.4 Гц)	129.9
6	-	124.7	-	126.5
7	-	160.4	-	158.4
8	6.95 (д, 8.5 Гц)	116.9	6.86 (д, 8.5 Гц)	116.4
9	7.82 (дд, 2.2 и 8.5 Гц)	135.4	7.35 (дд, 2.4 и 8.5 Гц)	134.0
10	-	174.9	-	174.3
11	3.71 (с)	58.6	3.69 (с)	55.6

Вывод об абсолютной (*Z*)-конфигурации двойной связи CompX был сделан на основе отсутствия кросс-пика H3-H11 в спектре ROESY природного соединения и его наличия в спектре ROESY синтетического *E*-изомера.

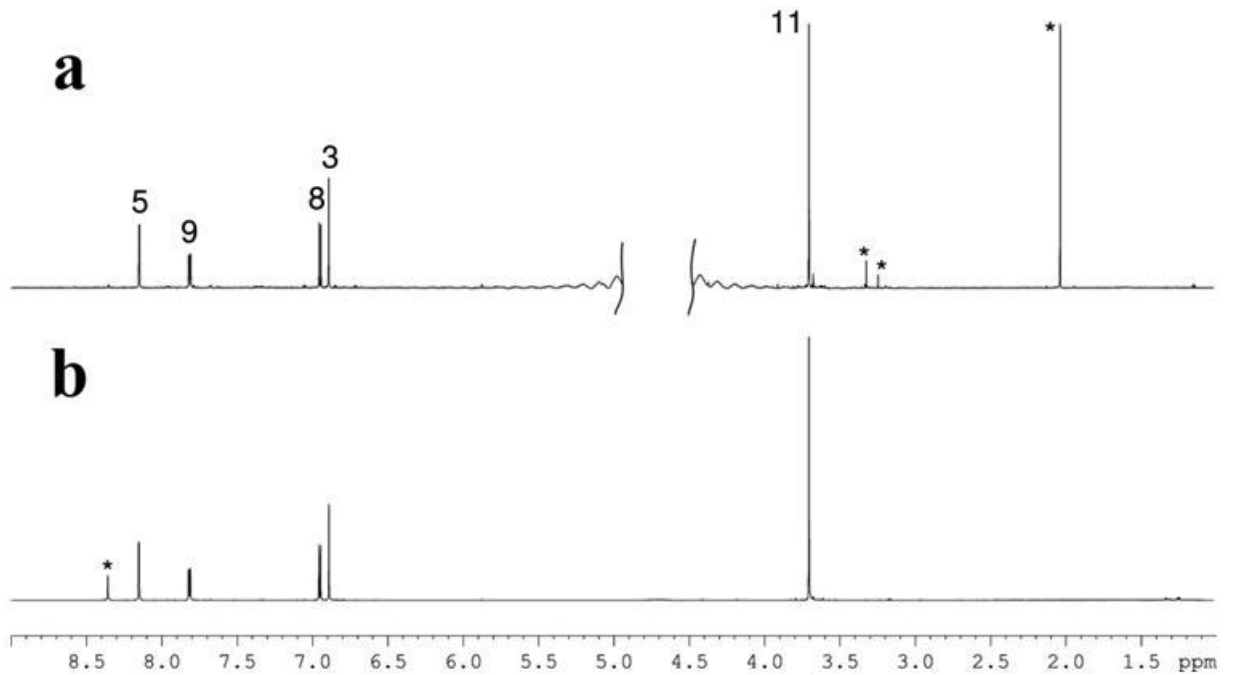


Рисунок 2.3. <sup>1</sup>H ЯМР спектры (a) синтетического ComrX и (b) природного ComrX. Примеси отмечены астерисками, числа обозначают номера атомов согласно Таблице 2.1 и Рисунку 2.2а.

Мы предположили, что в природе ComrX, возможно, синтезируется из тирозина в результате трех модификаций: дезаминирования до кетокислоты, *O*-метилирования енолята и карбоксилирования в орто-положение к фенольному гидроксилу. Дальнейшие эксперименты ЯМР свидетельствовали о том, что замещенный ComrX является структурным фрагментом люциферина *F. heliota*. В <sup>1</sup>H ЯМР спектре люциферина *F. heliota* был обнаружен такой же паттерн сигналов ароматических протонов, что и в спектрах ComrX. Мы обнаружили, что характерные сигналы протонов ComrX наблюдаются также в спектрах других аналогов люциферина.

## 2.2.2 Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn2

Помимо мажорного соединения CompX из люциферин-содержащей фракции экстракта биомассы червя *F. heliota* при помощи метода ионообменной хроматографии группе Петушкова удалось выделить около 0.1 мг чистого аналога люциферина, названного AsLn2. Спектры абсорбции люциферина и AsLn2 были сходными (Рис. 2.4а, Таблица 2.2). AsLn2 также обладал схожими с люциферинем флуоресцентными свойствами (Рис. 2.4б, Таблица 2.2), с максимумами эмиссии, лежащими в видимой области спектра.

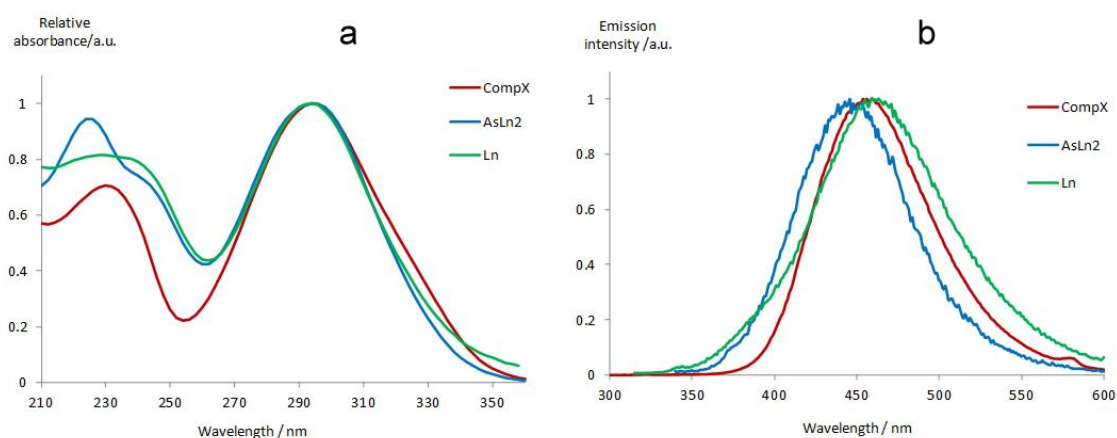


Рисунок 2.4. Спектры поглощения (а) и эмиссии флуоресценции (б) люциферина *Fridericia heliota* (зеленый), AsLn2 (синий) и CompX (красный) при pH 4.0 в воде. Длины волн возбуждения AsLn2 -  $\lambda_{ex}$  330 нм, CompX -  $\lambda_{ex}$  310 нм, люциферин *Fridericia heliota* -  $\lambda_{ex}$  300 нм.

Таблица 2.2. Длины волн поглощения и максимумы флуоресцентной эмиссии AsLn2 и люциферина *Fridericia heliota* при различных значениях pH.

Соединение	Поглощение		Флуоресценция	
	$\lambda_{max}$ , нм (локальный)	$\lambda_{max}$ , нм	$\lambda_{excitation}$ , нм	$\lambda_{emission}$ , нм
люциферин pH 7.0	228	294	290	466
AsLn2 pH 4.0	226	294	330	446
AsLn2 pH 2.8	226	294	290	464

Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного AsLn2, выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  530.21296, соответствующей молекулярной формулой к которому является  $C_{26}H_{32}N_3O_9^+$ , (расчетное  $m/z$  530.21385) [Petushkov и др., 2014b]. Для установления структуры AsLn2 Максимом Дубинным (ИБХ РАН) были применены следующие ЯМР эксперименты:  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^1H$ - $^1H$  COSY,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC,  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC и  $^1H$ - $^{15}N$  HMBC. Анализ ЯМР спектров  $^1H$  выявил наличие в структуре пяти сигналов, сходных с сигналами CompX. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что карбоксильные группы CompX вовлечены в образование пептидных связей с аминогруппами остатков лизина и тирозина. Полученные данные ЯМР и масс-спектрометрии наилучшим образом соответствовали структуре (Z)-2-амино-6-(5-(3-((1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксипроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксипенамидо)гексановой кислоты (**2.3**). (Рис. 2.5). Это предположение было подтверждено встречным синтезом.

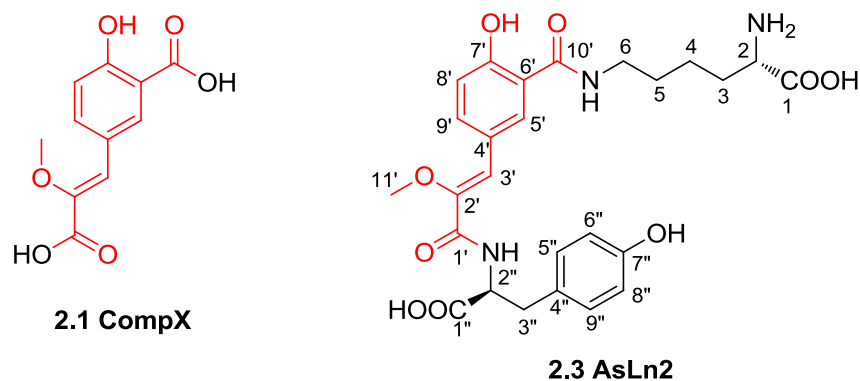


Рисунок 2.5. Структура AsLn2 с нумерацией атомов углерода согласно Таблице 2.3.

Таблица 2.3. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  (600 МГц) и  $^{13}\text{C}$  (150 МГц) и мультиплетности сигналов протонов природного AsLn2 в  $\text{D}_2\text{O}$  при pH 7.0 и 30 °С.

Фрагмент и нумерация атомов углерода		$^1\text{H}$ химические сдвиги и мультиплетности сигналов и $^{13}\text{C}$		
		химические сдвиги		
		$\delta_{\text{H}}$		$\delta_{\text{C}}$
Лизин	1	-		174.70
	2	3.724	дд (5.6 Гц, 6.8 Гц)	54.77
	3	1.928, 1.875	м, м	30.19
	4	1.463	м	22.02
	5	1.666	квинт (7.2 Гц)	28.21
	6	3.411	т (7.0 Гц)	39.09
СompX	1'	- <sup>a</sup>		165.40
	2'	-		146.09
	3'	6.744	с	120.19
	4'	-		117.81
	5'	7.970	д (1.7 Гц)	130.66
	6'	-		123.41
	7'	-		<sup>a</sup>
	8'	6.951	д (8.7 Гц)	118.54
	9'	7.743	дд (1.7 Гц, 8.7 Гц)	134.77
	10'	-		169.41
	11'	3.467	с	59.27
Тирозин	1''	-		177.79
	NH	<sup>a</sup>		$^{15}\text{N}$ : 121.24
	2''	4.533	дд (5.1 Гц, 8.2 Гц)	56.24
	3''	3.228	дд (5.1 Гц, 14.1 Гц)	36.72
		2.973	дд (8.2 Гц, 14.1 Гц)	
	4''	-		129.49
	5'', 9''	7.144	д (8.4 Гц)	130.59
	6'', 8''	6.824	д (8.4 Гц)	115.30
7''	-		154.12	

<sup>a</sup> Не наблюдается

Синтез соединения AsLn2 описан на Схеме 2.2. Метилловый эфир CompX (**2.2**) был последовательно введен в конденсации с L-лизином и L-тирозином, с использованием стандартных нерацемизирующих методов пептидного синтеза. *N*-Boc и *O*-*tert*-бутил защитные группы использовались для защиты лизина, что позволило осуществить их одновременное снятие в один этап, применив HBr в ледяной уксусной кислоте [Tsarkova и др., 2015]. Последним этапом в синтезе AsLn2 был основной гидролиз метилового эфира, использованного для защиты карбоксильной группы тирозина. Предложенный нами пятистадийный метод синтеза позволил получить аналог люциферина AsLn2 с выходом 14%.

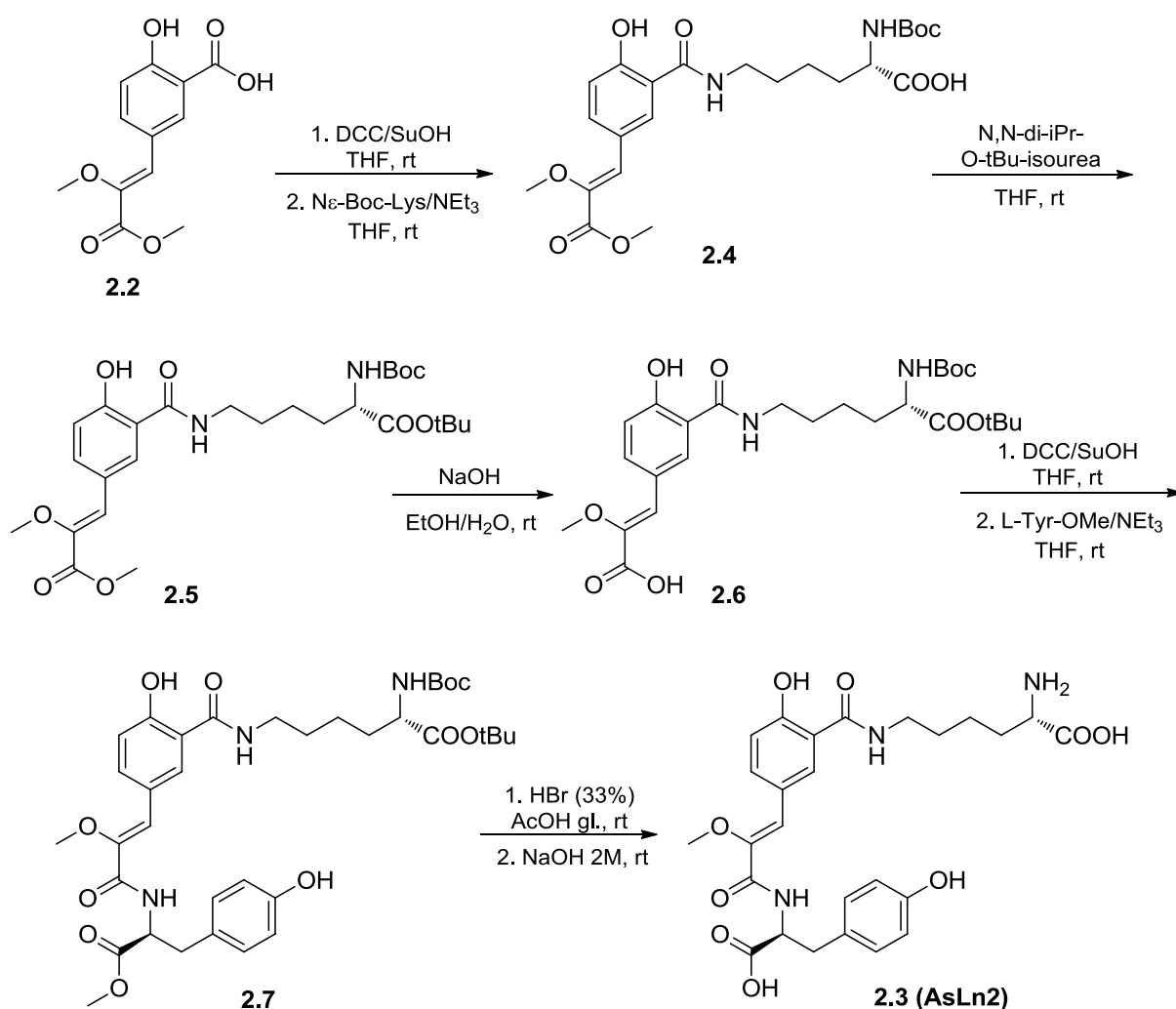


Схема 2.2. Синтез аналога люциферина AsLn2.

Молекула AsLn2 содержит два асимметрических атома углерода и может иметь четыре различные стереохимические конфигурации. Хроматографические характеристики HPLC и спектральные данные ЯМР ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги, мультиплетности) продукта последней стадии синтеза оказались абсолютно идентичны природному образцу, что позволило предположить идентичность порядка химических связей и относительной стереохимии двух

молекул. Количество природного AsLn2 было недостаточным для точного определения величины оптического вращения молекулы, однако, абсолютная стереохимия аналога люциферина AsLn2 была определена при помощи хирального ВЭЖХ-анализа природного и синтетического соединений, времена удерживания которых были практически идентичны (Рис. 2.6). Полученные данные позволили предположить L-конфигурацию обоих стереоцентров в молекуле AsLn2 и, таким образом, его структура была окончательно определена как (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота.

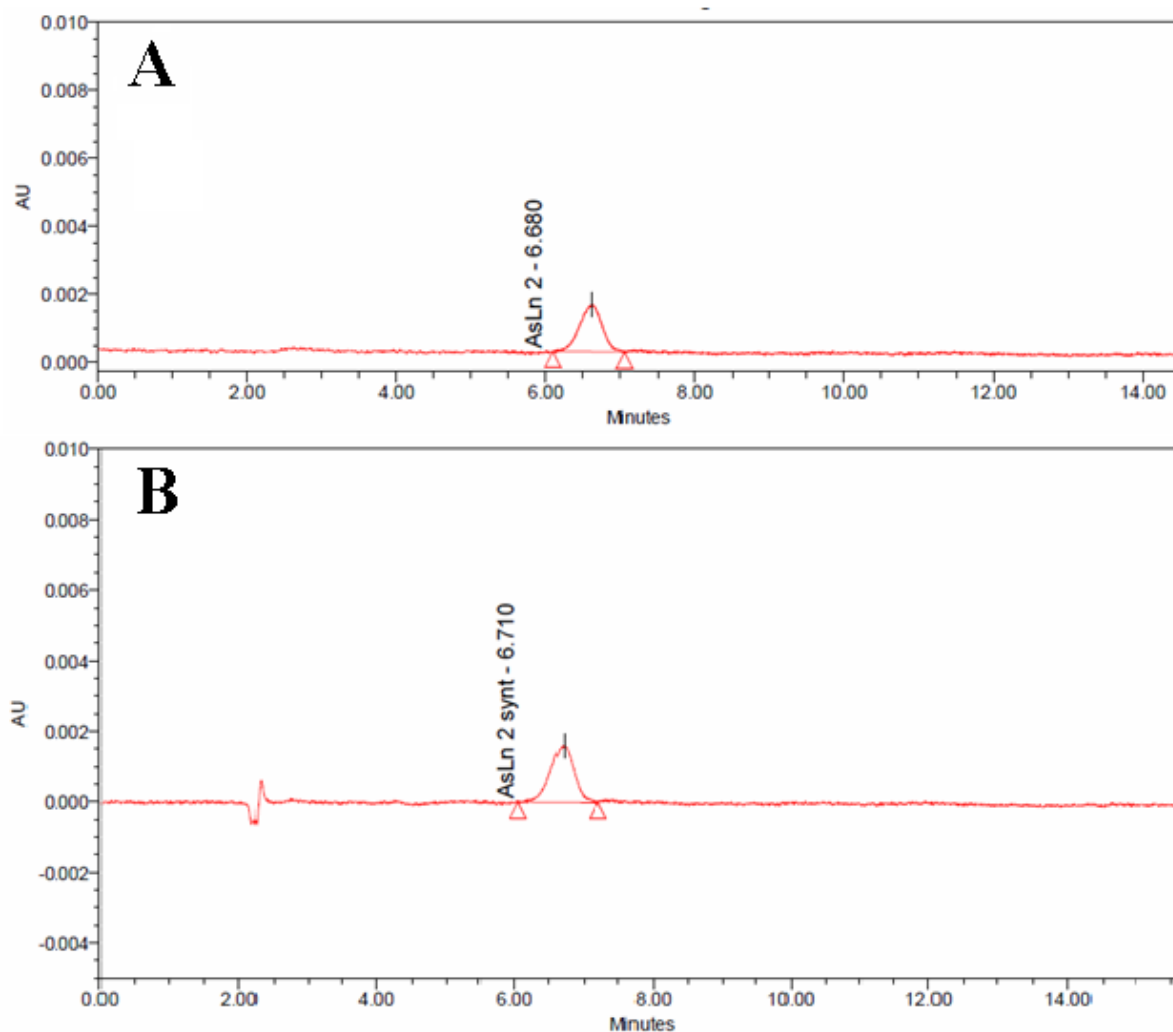


Рисунок 2.6. Времена удерживания природного (A) и синтетического (B) AsLn2 на хиральной колонке Ultron ES-OVM.



### 2.2.3 Синтез и свойства люциферина *Fridericia heliota*

Общее количество люциферина, выделенного из 70 г биомассы червя составило лишь 0.005 мг. Столь малое количество люциферина позволило провести лишь ограниченный ряд спектральных исследований. Из  $^1\text{H}$ , COSY и частичного  $^{13}\text{C}$ -HSQC ЯМР спектров, полученных Максимом Дубинным (ИБХ РАН) в совокупности с HRMS масс-спектрометрическими данными следовало, что молекула люциферина состоит из четырех фрагментов: остатков CompX, лизина, гамма-аминомасляной (ГАМК) и щавелевой кислот (Рис. 2.7) [Petushkov и др., 2014с].

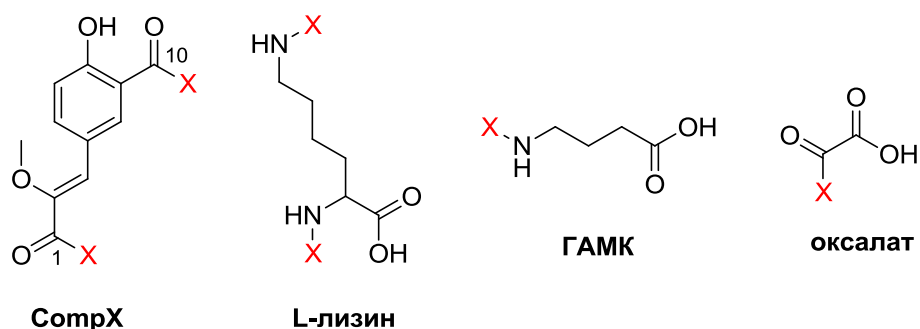


Рисунок 2.7. Фрагменты люциферина *F. heliota*.

Четыре изомерных структуры **2.8-2.11** (Рис. 2.8) соответствовали данным ЯМР и масс-спектров. Эти изомеры различались лишь порядком пептидных связей, соединяющих четыре остатка являющихся структурными элементами люциферина *F. heliota*: CompX, лизин, ГАМК и оксалат. В синтезе всех четырех соединений использовались производные L-лизина и предотвращающие рацемизацию методы образования пептидных связей.

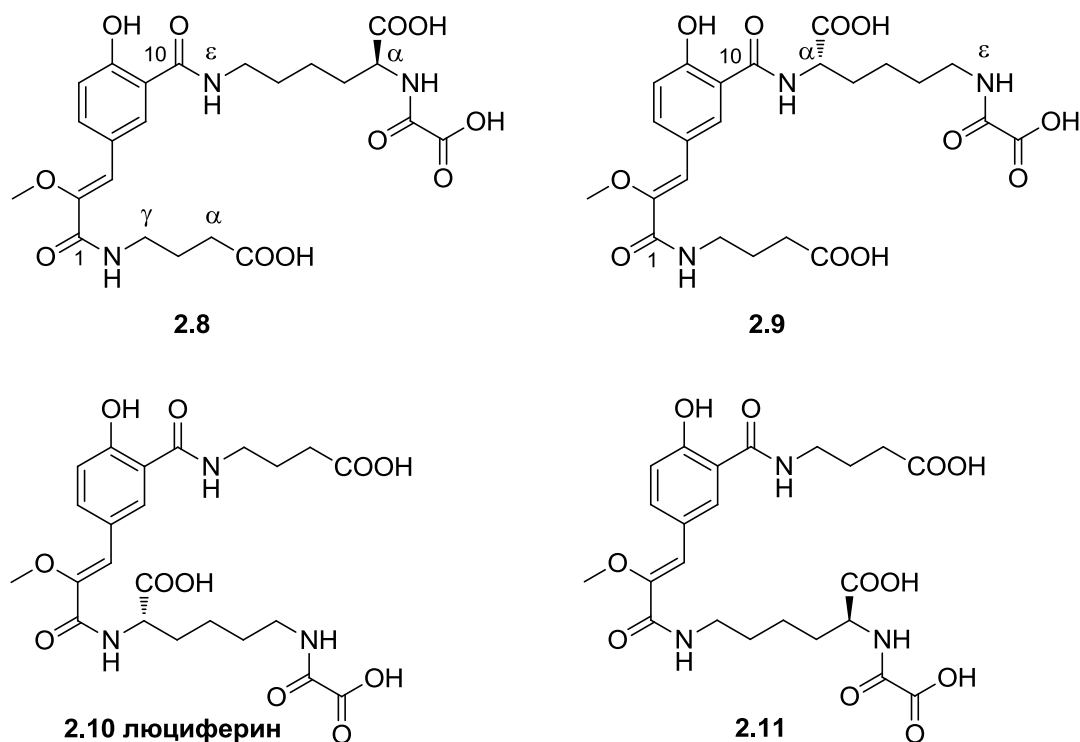


Рисунок 2.8. Четыре возможные изомерные структуры люциферина *F. heliota*

Основываясь на структуре расшифрованного и синтезированного нами ранее аналога люциферина AsLn2 (**2.3**), имеющего в своем составе фрагмент L-лизина, связанный с C10 углеродом фрагмента CompX, нами было сделано предположение о том, что лизин в молекуле люциферина также находится в этом положении, тогда как фрагмент гамма-аминомасляной кислоты, вероятнее всего, связан с C1 карбоксильной группой (Рис. 2.8). Для проверки этой версии нами был синтезирован изомер люциферина **2.8** - (S,Z)-2-(карбоксиформамидо)-6-(5-(3-((3-карбоксипропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота из монометилового эфира CompX **2.2**, с использованием стандартных методов пептидного синтеза (Схема 2.3).

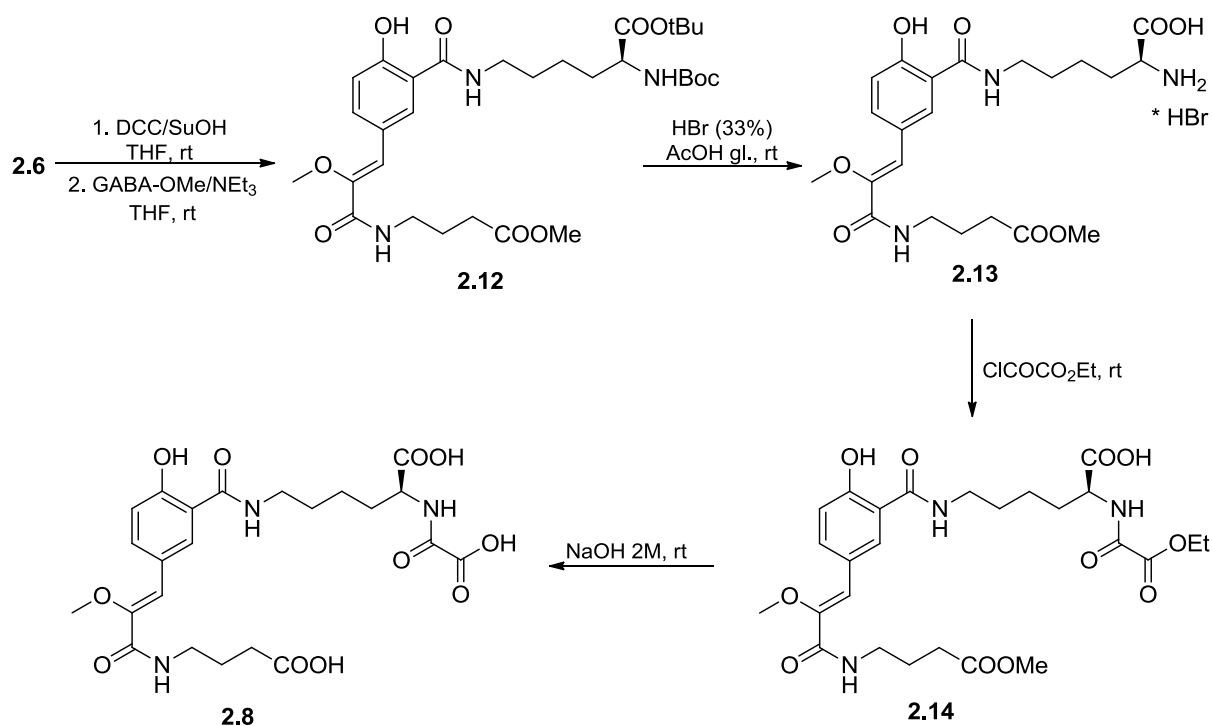


Схема 2.3. Синтез изомера люциферина **2.8** по аналогии с AsLn2.

Спектры ЯМР синтетического соединения **2.8** затем сравнили со спектрами природного люциферина, однако химические сдвиги протонов синтетического изомера люциферина **2.8** оказались близкими, но не идентичными химическим сдвигам протонов природного люциферина. Более того, соединение **2.8** не проявило люминесцентной активности при добавлении к неочищенной люциферазе *F. heliota*, в присутствии АТФ и ионов Mg<sup>2+</sup>.

Аналогично были синтезированы оставшиеся три изомерных пептида **2.9-2.11**, спектры ЯМР которых сравнили со спектрами природного люциферина. Синтез также начинали с метилового эфира CompX (Схемы 2.4-2.6). Все полученные соединения обладали сходными спектральными характеристиками ЯМР в D<sub>2</sub>O при pH 5.0. Однако только для соединения **2.10** - (*S,Z*)-6-(карбоксиформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановой кислоты наблюдались химические сдвиги <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C, полностью соответствующие химическим сдвигам природного люциферина (Рис. 2.10, Таблица 2.4).

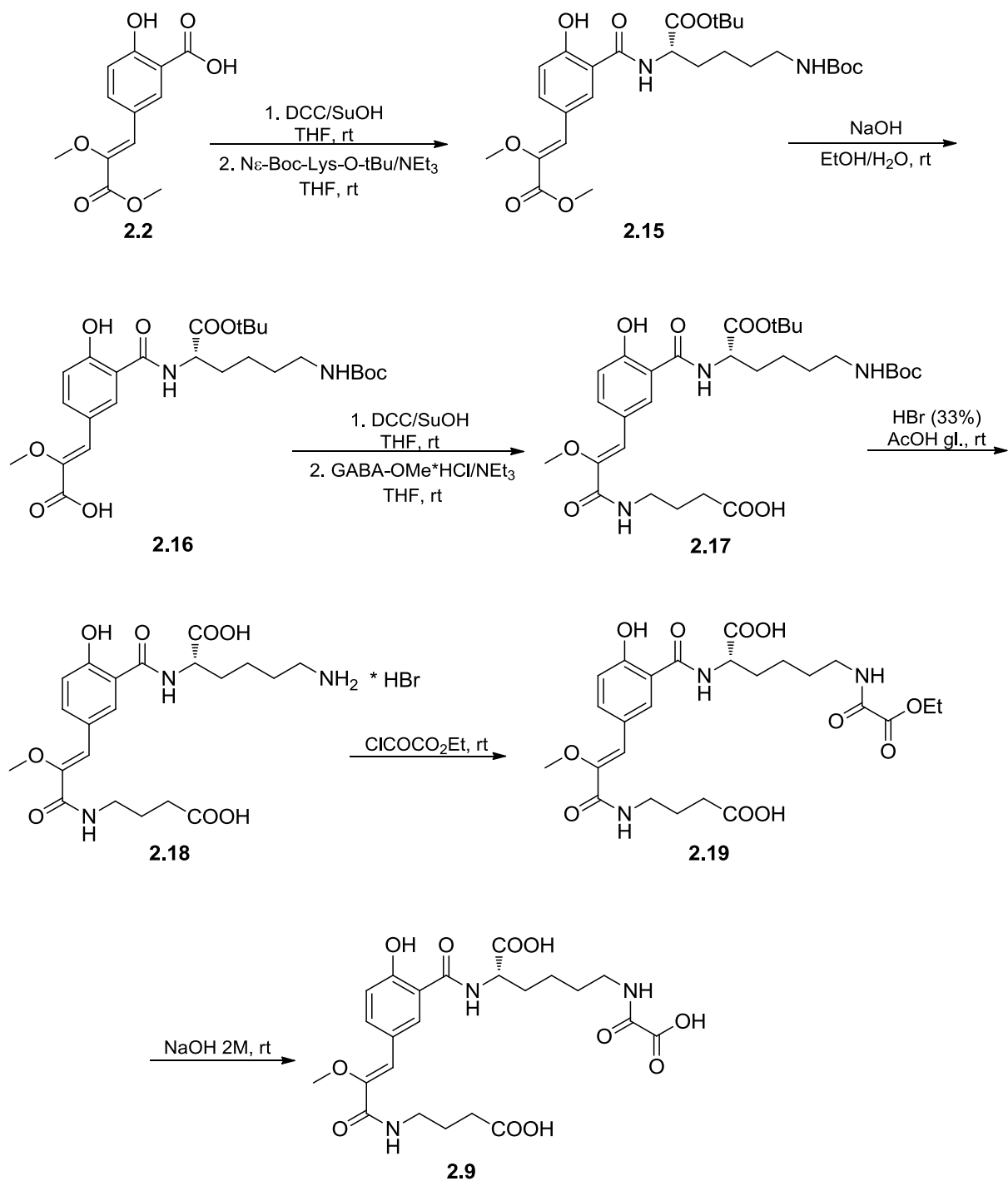


Схема 2.4. Синтез изомера люциферина **2.9** из монометилового эфира ComrX

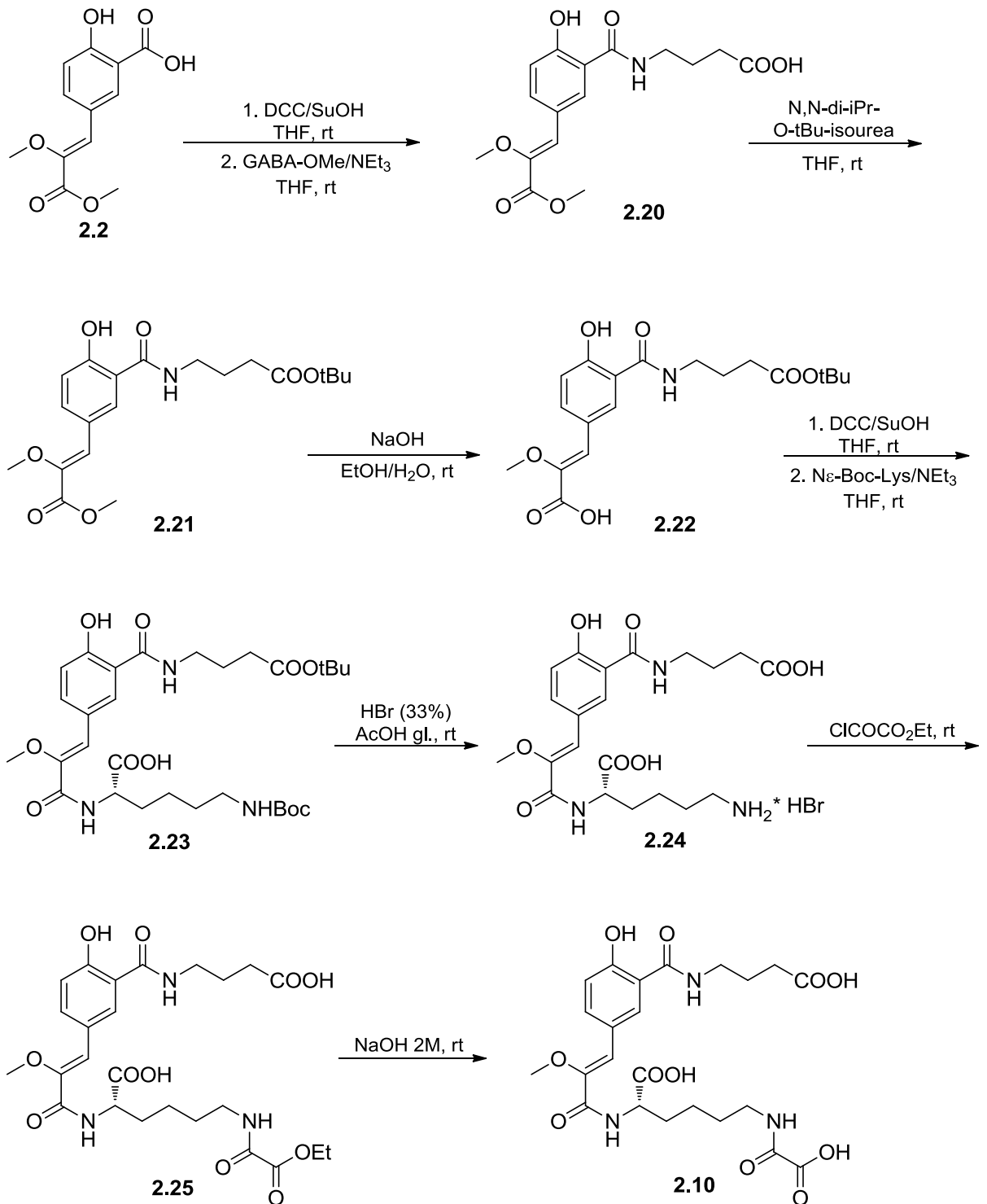


Схема 2.5. Синтез люциферина *F. heliota* **2.10**

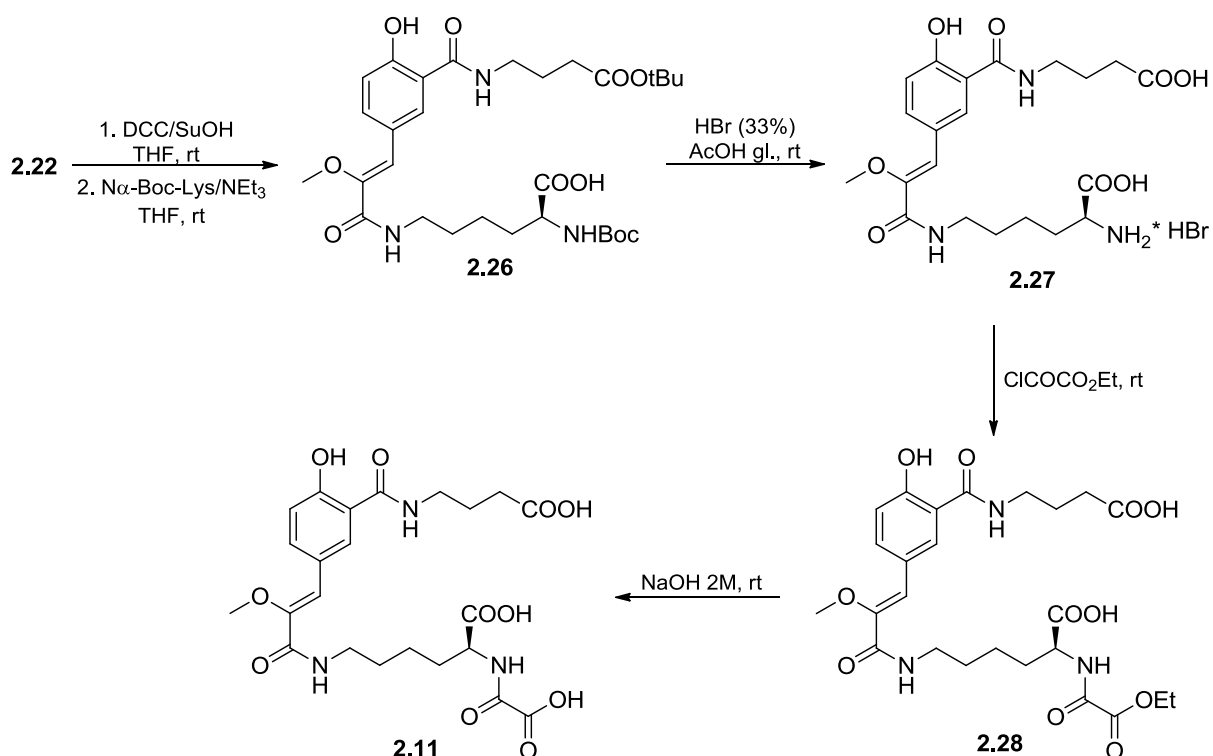


Схема 2.6. Синтез изомера люциферина **2.11**

Нами также была исследована способность соединений **2.9-2.11** к испусканию света при добавлении к неочищенной люциферазе *F. heliota*, в присутствии АТФ и MgSO<sub>4</sub>. В этих условиях люминесцентные свойства были обнаружены только у соединения **2.10**, спектр люминесценции (Рис. 2.9) и зависимость интенсивности свечения от концентрации которого оказались идентичны природному люциферину (Рис. 2.11).

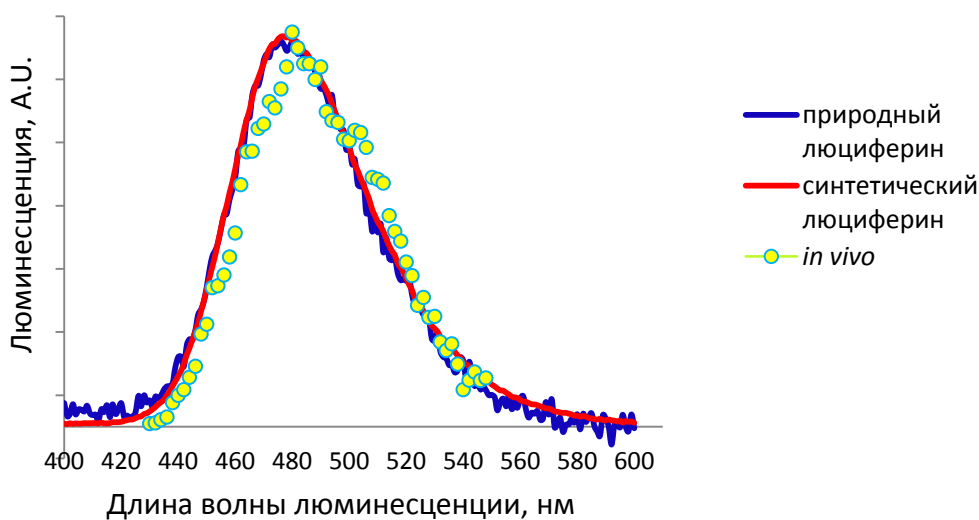


Рисунок 2.9 Спектры люминесценции природного и синтетического люциферин.

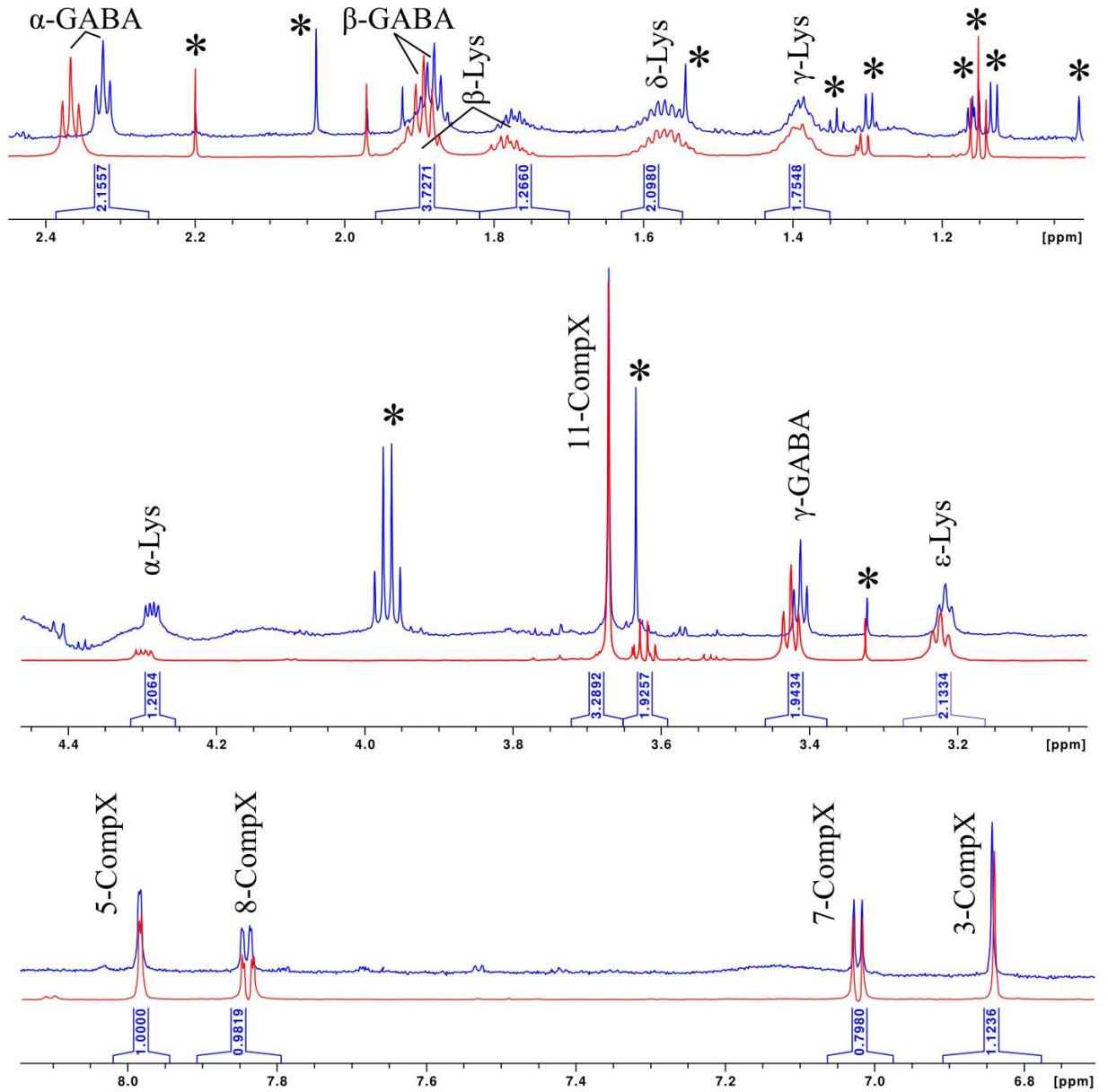


Рисунок 2.10. Совпадение химических сдвигов протонов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах природного (синий) и синтетического (красный) люциферин в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0. Примеси отмечены звездочками.

Таблица 2.4. ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,0$ ) люциферина *Fridericia* и синтетических соединений **2.8-2.11**.

		<i>Fridericia luciferin</i>		<b>2.10</b>		<b>2.11</b>		<b>2.8</b>		<b>2.9</b>	
		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
ГАМК	CO		n.o.		180.50		180.64		180.85		180.48
	$\alpha$	2.324	n.o.	2.361	33.19	2.350	33.28	2.312	33.49	2.330	33.20
	$\beta$	1.879	24.93	1.890	24.75	1.884	24.97	1.841	24.96	1.850	24.83
	$\gamma$	3.410	39.18	3.422	39.17	3.413	39.19	3.334	39.17	3.346	39.10
CompX	1		n.o.		165.89		166.23		166.35		166.40
	2		146.97		146.97		147.11		146.96		147.00
	3	6.844	119.82	6.840	119.88	6.796	119.62	6.811	119.84	6.857	119.85
	4		n.o.		117.54		117.51		117.79		117.76
	5	7.983	130.29	7.981	130.31	7.950	130.27	7.950	130.33	8.116	130.92
	6		n.o.		124.94		124.93		124.85		124.98
	7		n.o.		157.61		157.54		157.39		157.21
	8	7.022	117.58	7.022	117.65	7.006	117.64	6.992	117.60	7.070	117.61
	9	7.841	134.92	7.838	134.97	7.807	134.91	7.766	134.88	7.792	135.12
	10		n.o.		169.57		169.52		169.20		168.28
	11	3.671	59.39	3.670	59.50	3.620	59.37	3.633	59.38	3.660	59.41
Лизин	CO		n.o.		175.80 <sup>aj</sup>		178.52		178.55		178.90
	$\alpha$	4.288	55.13	4.297	55.12	4.171	55.03	4.176	55.10	4.399	55.35
	$\beta$	1.895 1.769	31.30	1.901 1.776	31.31	1.861 1.746	31.41	1.874 1.767	31.45	1.930 1.831	31.29
	$\gamma$	1.388	22.66	1.390	22.78	1.376	22.52	1.415	22.60	1.425	22.59
	$\delta$	1.566	27.83	1.572	27.97	1.587	28.19	1.631	28.12	1.587	28.04
	$\epsilon$	3.217	39.25	3.222	39.30	3.308	39.30	3.377	39.48	3.215	39.30
Оксалат	CO		n.o.		n.o.		164.29		164.33		165.08
	CO <sub>2</sub> H		n.o.		n.o.		170.82		170.82		170.77



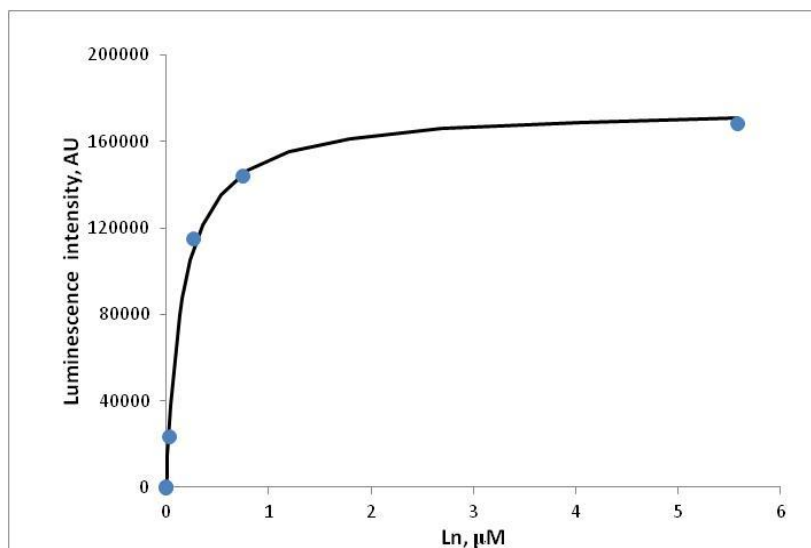
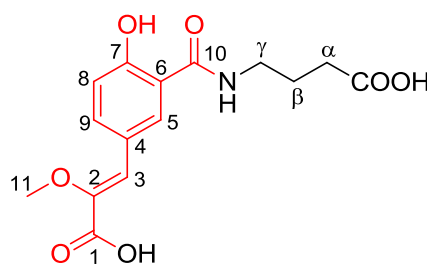


Рисунок 2.11. Зависимость интенсивности свечения люциферазы *F. heliota* от концентрации синтетического люциферина **2.10**, в присутствии АТФ и MgSO<sub>4</sub>.

### 2.2.4 Синтез и свойства природного аналога люциферина AsLn7

Предположительно, CompX является биосинтетическим прекурсором люциферина, в то время как биологическая роль AsLn2 остается неясной, в силу малого структурного сходства между молекулами аналога и самого люциферина. Возможно, этот пептид является побочным продуктом в биосинтезе люциферина *Fridericia*, в результате неселективного присоединения фрагмента CompX к L-тироzinу и  $\epsilon$ -аминогруппе L-лизина, вместо  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и  $\alpha$ -аминогруппы L-лизина, соответственно. Помимо соединений CompX и AsLn2 нами была расшифрована структура еще одного аналога люциферина – модифицированного пептида, названного AsLn7 (2.29, Рис 2.12). Было установлено, что молекула этого соединения состоит из двух структурных фрагментов, гамма-аминомасляной кислоты и CompX, что позволило предположить, что этот дипептид является прекурсором в биосинтезе люциферина.



2.29 AsLn7

Рисунок 2.12. Структура аналога люциферина *Fridericia heliota* AsLn7.

Как и для аналогов CompX и AsLn2, спектры абсорбции и флуоресцентной эмиссии аналога AsLn7 оказались схожими с люциферинном *Fridericia* (Рис. 2.13).

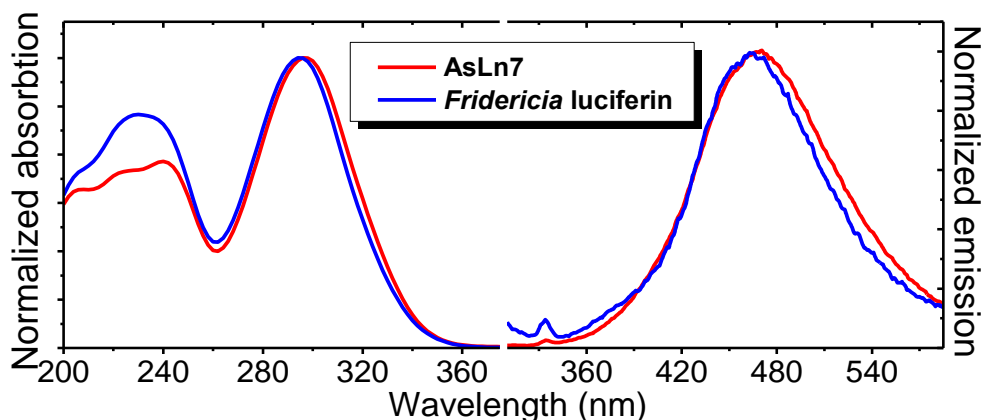


Рисунок 2.13. Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции люциферина *Fridericia heliota* (синий) и AsLn7 (красный).

Масс-спектры высокого разрешения очищенного природного AsLn7 выявили протонированный молекулярный ион с  $m/z$  324.1068, соответствующей молекулярной формулой к которому является  $C_{15}H_{18}NO_7^+$ , (расчетное  $m/z$  324.1078) [Dubinnyi и др., 2015]. Малое количество природного AsLn7 (~40 мкг) позволило получить лишь протонные DQF-COSY и  $^1H, ^{13}C$ -HSQC ЯМР спектры в  $D_2O$ . Анализ полученных Максимом Дубинным ЯМР спектров выявил наличие в структуре AsLn7 короткой алифатической цепи ( $CH_2-CH_2-CH_2$ ), с химические сдвигами в протонном и углеродном спектрах, характерными для гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), и четыре протона, химические сдвиги и мультиплетности которых были сходны с сигналами CompX. Полученные данные позволили нам предположить что AsLn7 является пептидом образованным аминок группой ГАМК и одним из двух карбоксильных групп фрагмента CompX.

Точное расположение пептидной связи было установлено при помощи эксперимента ЯМР-титрования в области рН 3.0 ÷ 5.0, проведенного Максимом Дубинным (Рис. 2.14).

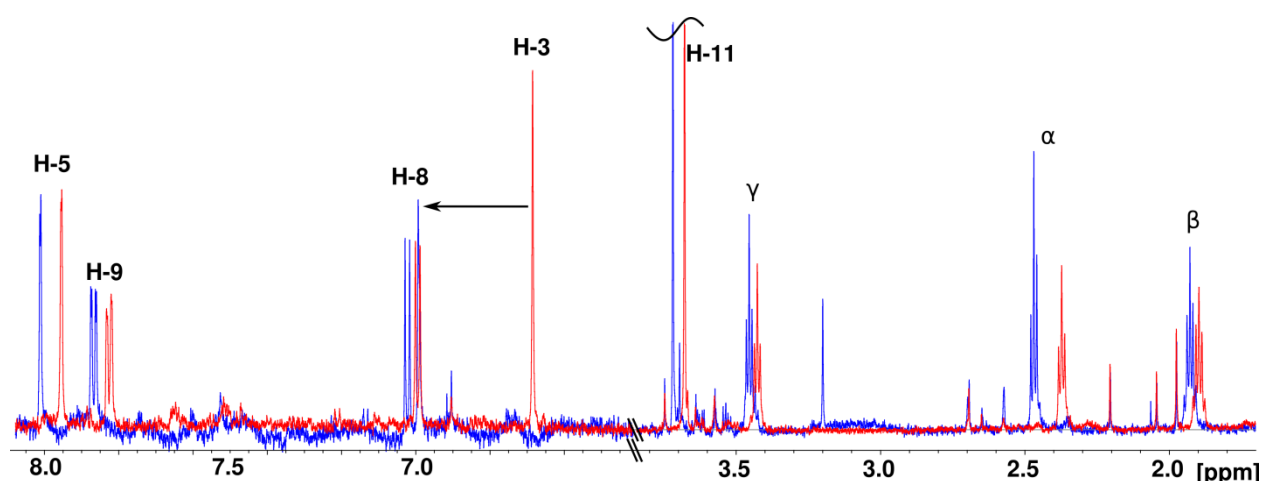


Рисунок 2.14.  $^1H$  ЯМР спектр природного AsLn7 в  $D_2O$ , 30°C при рН 5.0 (синий) и 3.0 (красный). Нумерация атомов согласно Рисунку 2.12.

При помощи ЯМР-титриметрического анализа удалось установить, что протон H3 обладает значительной чувствительностью к изменению рН ( $\Delta$ м.д. 0.31) в то время как химический сдвиг сигнала протона H5 изменяется в значительно меньшей степени ( $\Delta$  м.д. 0.06). Полученные данные позволили предположить, что C1 карбоксильная группа свободна, тогда как карбоксил C10 образует пептидную связь с фрагментом ГАМК. Более того, химические сдвиги протонов  $\alpha-CH_2$  группы гамма-аминомасляной кислоты также обладали

чувствительностью к рН, что свидетельствует о том, что карбоксильная группа этого фрагмента также является незамещенной. (Рис. 2.14).

Для подтверждения предположительной структуры AsLn7 нами был предпринят двухстадийный синтез молекулы. На первом этапе синтеза была проведена конденсация метилового эфира CompX **2.2** с метиловым эфиром гамма-аминомасляной кислоты, за которой последовал основной гидролиз сложноэфирных групп, использованных для защиты карбоксильных групп CompX и ГАМК (Схема 2.7).

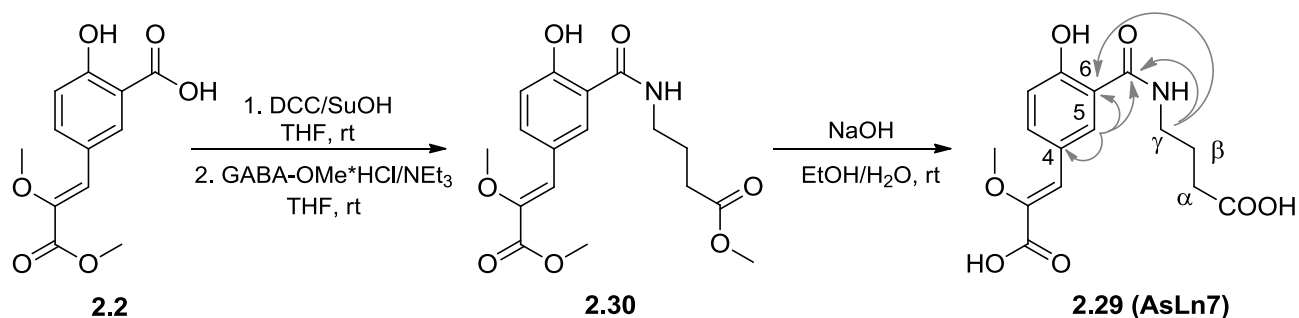


Схема 2.7. Синтез аналога люциферина AsLn7. Основные HMBC кросс-пики в синтетическом AsLn7.

ЯМР-исследование синтетического образца AsLn7 (D<sub>2</sub>O, рН 5.0) выявило полное совпадение его химических сдвигов и мультиплетностей с природным образцом, таким образом полностью подтверждая предложенное строение AsLn7 (Рис 2.15). Более того, идентичность синтетического и природного образцов была также подтверждена при помощи полного набора одно- и двумерных ЯМР экспериментов: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C]-HSQC, [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C]-HMBC and DQF-COSY. Необходимо заметить, что анализ наблюдаемых кросс-пиков в HMBC спектре синтетического AsLn7 между протонами γ-CH<sub>2</sub> гамма-аминомасляной кислоты и углеродом C6 заставил нас присвоить уточненные химические сдвиги углеродным сигналам фрагмента CompX C4 (126.1 м.д.) и C6 (117.3 м.д.), ошибочно определенные нами ранее для синтетических изомеров люциферина и его аналога AsLn2. Данные ЯМР синтетического AsLn7 приведены в Таблице 2.5, основные кросс-пики в спектрах HMBC приведены на Схеме 2.7.

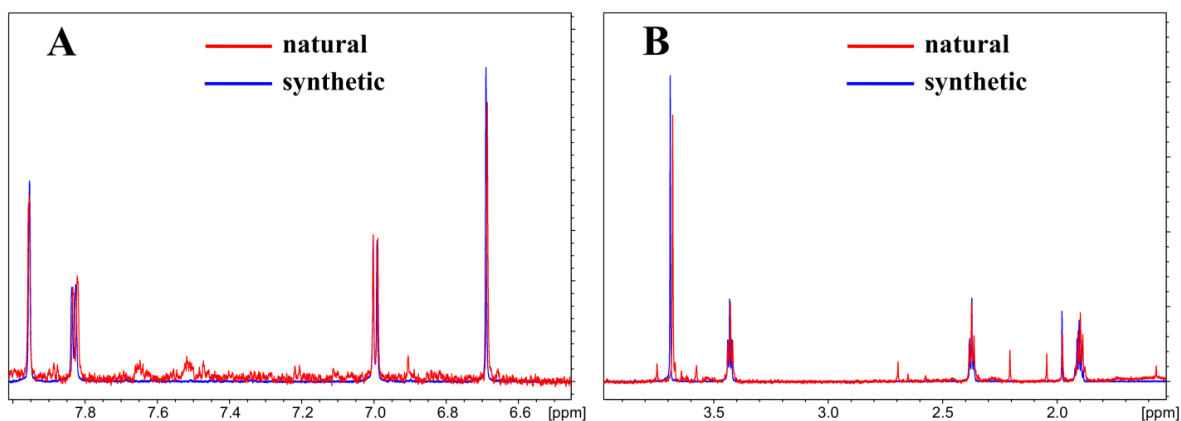


Рисунок 2.15. Химические сдвиги протонов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах природного (красный) и синтетического (синий) AsLn7 в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$  при pH 5.0.

Таблица 2.5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  химические сдвиги и мультиплетности протонов синтетического AsLn7 (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , pH 5.0). Нумерация атомов согласно Рисунку 2.12.

Номер атома	$\delta_{\text{H}}$ , мультиплетности. ( $J$ , Гц)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	171.6
2	-	149.5
3	6.69, с	118.7
4	-	126.1
5	7.96, д (2.2 Гц)	129.7
6	-	117.3
7	-	156.9
8	7.00, д (8.5 Гц)	117.5
9	7.83, дд (8.5, 2.2 Гц)	134.6
10	-	169.7
11	3.69, с	58.4
$\gamma$ -ГАМК	3.42, т (7.2 Гц)	39.2
$\beta$ -ГАМК	1.90, квинт (7.5 Гц)	24.8
$\alpha$ -ГАМК	2.37, т (7.8 Гц)	33.1
1-ГАМК	-	180.6

### 2.2.5 Обсуждение

Таким образом, мы представляем структуру нового люциферина – ключевого компонента новой АТФ-зависимой биолюминесцентной системы сибирского почвенного червя *Fridericia heliota*, обладающей принципиально новым химическим механизмом люминесценции. Предположительно, в ходе реакции люминесценции происходит окисление одной из трех свободных карбоксильных групп люциферина, в то время как флуоресцентный остаток CompX отвечает за испускание квантов света. Роль фрагмента CompX в качестве люминофора подтверждается близким сходством спектров флуоресценции люциферина со спектром биолюминесценции *Fridericia heliota* ( $\lambda_{\text{max}}$  466 и 480 нм, соответственно) [Petushkov и др., 2014с].

Ни один из синтезированных нами природных аналогов люциферина *F. heliota* (CompX, AsLn2 и AsLn7) не проявляет способности к биолюминесценции. Структуры вновь выявленных соединений позволяют предположить, что они могут являться неактивными аналогами люциферина – его предшественниками или продуктами деградации.

Точная биологическая функция соединения AsLn2 остается пока неясной. С одной стороны можно предположить, что это соединение является побочным продуктом биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*, причиной появления которого является неселективная конденсация молекулы CompX с L-лизином, при которой происходит образование пептидной связи между карбоксильной группой CompX и  $\epsilon$ -амино группой L-лизина, вместо  $\gamma$ -амино группы гамма-аминомасляной кислоты. С другой стороны, присутствие большого количества CompX и его амидов в биомассе червя также позволяет предположить, что эти соединения несут защитную функцию в организме.

Наличие в биомассе червя аналога люциферина AsLn7, в структуру которого входят два из четырех структурных фрагментов люциферина – CompX и ГАМК, с другой стороны, позволяет предположить, что путь биосинтеза люциферина *Fridericia heliota* протекает через последовательное присоединение четырех его фрагментов: ГАМК, CompX, L-лизина и щавелевой кислоты при участии специфических или неспецифических аминокислотных лигаз (Рис. 2.16).

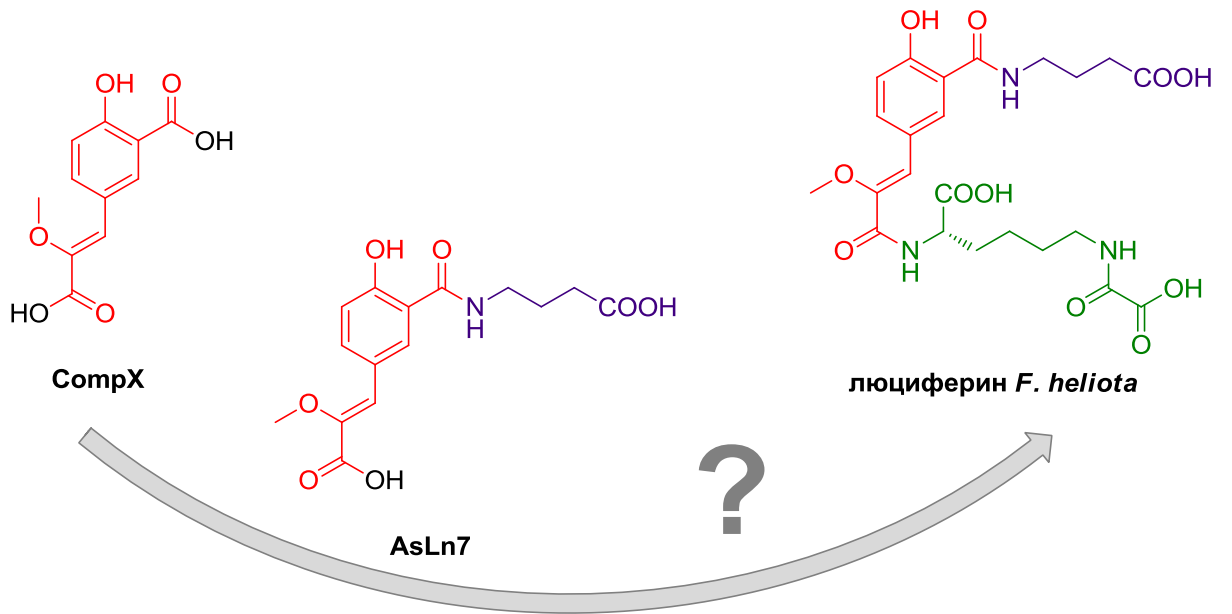


Рисунок. 2.16. Возможный путь биосинтеза люциферина *Fridericia heliota*.

## Глава 3. Экспериментальная часть

### 3.1 Материалы и оборудование

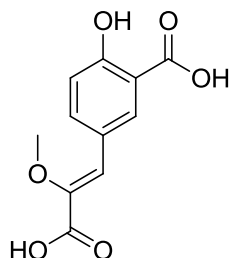
Спектры ЯМР зарегистрированы на приборах Bruker Avance III 800 (снабжен 5-мм СРТХІ криодатчиком), Bruker Avance III 700 и Bruker Avance III 600 в D<sub>2</sub>O, ДМСО-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, внутренний стандарт - ТМС. Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio. Спектры флуоресценции (возбуждения и эмиссии) и биолюминесценции были получены на спектрофлуориметре Agilent 1260 Infinity LC при использовании программного обеспечения Agilent Cary Eclipse, а.е. – условные единицы. Температуры плавления определены на приборе SMP30 и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы на приборе Agilent 6224 TOF LC/MS System методом электрораспылительной ионизации (ESI). HPLC хиральный анализ проводили на жидкостном хроматографе Waters Breeze HPLC System оборудованном автоинжектором (модель 2707), HPLC насосом (модель 1525) и спектрофотометрическим детектором с фотодиодной матрицей (модель 2998) с использованием хиральной колонки Ultron ES-OVM (150 x 4.6мм, 5 мкм при 20 °С). Подвижная фаза: 20 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (рН 4,6)/ ацетонитрил (85/15), Скорость потока 1.0 мл/мин.

Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh). Реактивы Acros Organics и SigmaAldrich применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегнанные растворители фирмы Химмед.



## 3.2 Синтез

### 3.2.1 Синтез аналога люциферина CompX.



#### (*E/Z*) 5- (2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензойная кислота (2.2):

Раствор метил 2-(диметоксифосфорил)-2-метоксиацетата (19.5 г, 92 ммоль) (полученного согласно описанной методике [Lowell и др., 2010]), 5-формил-2-гидроксибензойной кислоты (13 г, 78 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (76.6 г, 235 ммоль) в диоксане (100 мл) перемешивали при 60°C в течение 44 часов. Реакционную смесь подкислили водным HCl до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (3x150 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x100 мл), раствор сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили в вакууме, полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 93:5:2$ ): бел. крист. **2.2** (3.84 г, 19.6%), выделен в виде смеси (*E*) и (*Z*) изомеров в соотношении 1:2 (отнесение сигналов произведено по их интенсивности).

(*E*)  $^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{DMSO-d}^6$ )  $\delta$  8.19 (д,  $J = 2.1$  Гц, 1H, ArH), 7.83 (дд,  $J = 8.7, 2.2$  Гц, 1H, ArH), 6.91 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H, ArH), 6.87 (с, 1H, CH), 3.70 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.66 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

(*Z*)  $^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{DMSO-d}^6$ )  $\delta$  7.58 (д,  $J = 2.2$  Гц, 1H, ArH), 7.27 (дд,  $J = 8.6, 2.3$  Гц, 1H, ArH), 6.83 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H, ArH), 6.14 (с, 1H, CH). 3.61 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.57 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

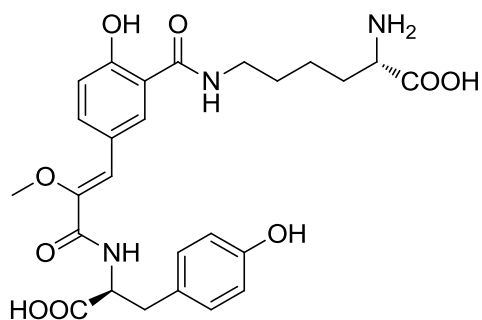
HRMS (ESI)  $m/z$ : 253.0721 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{12}\text{O}_6 \text{H}_{13}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  253.0707).

(*Z*)-5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (2.1a) и (*E*)-5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойная кислота (2.1b): Раствор NaOH (2M, 5мл) прибавили к (*E/Z*) 5- (2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензойной кислоте (2.2) (30 мг, 0.12 ммоль). Смесь перемешивали при 50°C в течение 2 часов. По окончании гидролиза (контроль: ТСХ, silufol,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 88:10:2$ ) реакционную смесь подкислили водным HCl до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (2x15 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x10 мл), раствор сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили в вакууме, остаток разделили с помощью колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ ,  $R_f$  0.60; 0.45): бел. крист., **CompX (2.1a)** (14 мг, 49%) и **CompX (*E*)-изомер (2.1b)** (7 мг, 25%).

Химические сдвиги и мультиплетности сигналов ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соединений **2.1a** и **2.1b** приведены в Таблице 2.1 в Главе 2 - результаты и обсуждение.

HRMS (ESI)  $m/z$ : 239.0598 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{11}\text{O}_6\text{H}_{11}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  239.0550).

### 3.2.2 Синтез аналога люциферина AsLn2.



#### (*S,Z*)-2-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)-6-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (**2.4**).

Смесь метилового эфира CompX **2.2** (0.50 г, 2.0 ммоль), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) (0.70 г, 3.4 ммоль) и *N*-гидроक्सисукцинимид (SuOH) (0.46 г, 4.0 ммоль) в 30 мл ТГФ перемешивали при 25°C в течение 3 часов. По окончании реакции (контроль: ТСХ, silufol, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 95:5) добавили 1.25 г (5.0 ммоль)  $\alpha$ -Вос-L-лизина и 1 г (10 ммоль) NEt<sub>3</sub>, перемешивали при 25°C в течение 12 часов. Затем реакционную смесь подкислили водным HCl до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (3x150 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x100 мл), раствор сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 97:2:1, Rf 0.45): бцв. жидк. **2.4** (1.0 г, 53%), сушили и использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

<sup>1</sup>H NMR (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12.59 (уш. с, 1H), 7.87 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H), 7.79 (дд, *J* = 8.7, 1.8 Гц, 1H), 6.98 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.93 (с, 1H), 6.67 (уш. с, 1H), 5.17 (уш. с, 1H), 4.35-4.31 (м, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.48-3.44 (м, 2H), 1.95-1.88 (м, 1H), 1.78-1.65 (м, 3H), 1.53-1.48 (м, 2H), 1.43 (с, 9H).

HRMS (ESI) *m/z*: 481.2197 найдено (рассчитано для C<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>H<sub>33</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup> 481.2181).

#### (*S,Z*)-*tert*-бутил 2-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)-6-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексаноат (**2.5**).

*N,N'*-диизопропил-*O-tert*-бутилизоуреа (1.7 г, 8.5 ммоль) добавили к раствору **2.4** (0.81 г, 1.7 ммоль) в ТГФ (10 мл), смесь перемешивали при 25°C в течение 14 часов. Осадок *N,N'*-диизопропилмочевины отфильтровали, раствор сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 97:2:1, Rf 0.60): бцв. жидк. **2.5** (0.7 г, 78%).

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.62 (с, 1H), 7.83 (дд,  $J = 8.7, 1.9$  Гц, 1H), 7.81 (д,  $J = 1.9$  Гц, 2H), 6.98 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.91 (с, 1H), 6.61 (уш. с, 1H), 5.09 (уш. с, 1H), 4.14-4.19 (м, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.49-3.43 (м, 2H), 1.86-1.80 (м, 1H), 1.72-1.63 (м, 3H), 1.51-1.46 (м, 2H), 1.45(с, 9H), 1.42(с, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (176 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.8, 169.8, 164.8, 162.3, 155.5, 144.2, 135.7, 127.7, 124.2, 123.3, 118.9, 114.4, 82.0, 79.8, 59.2, 53.8, 52.1, 39.5, 32.8, 28.9, 28.3, 28.0, 22.7.

HRMS (ESI)  $m/z$ : 537.2826 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{27}\text{N}_2\text{O}_9\text{H}_{41}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  537.2807).

**(S,Z)-3-(3-((6-(трет-бутокси)-5-((трет-бутоксикарбонил)амино)-6-оксогексил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.6).**

К 175 мг (0.33 ммоль) **2.5** добавили раствор NaOH (33 мг, 0.83 ммоль) в 5 мл смеси  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (3:1), перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Затем реакцию смесь подкислили водным раствором уксусной кислоты до pH 4.0, экстрагировали этилацетатом (4x50 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x50 мл), раствор сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ , Rf 0.55): бел. крист. **2.6** (150 мг, 88%).

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{DMCO-d}^6$ ):  $\delta$  12.84 (уш. с, 1H), 8.75 (brt,  $J 5.4$  Гц, 1H), 8.08 (д,  $J = 1.8$  Гц, 1H), 7.96 (дд,  $J = 8.7, 1.8$  Гц, 1H), 7.05 (уш. д,  $J 7.6$  Гц, 1H), 6.94 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.85 (с, 1H), 3.78-3.74 (м, 1H), 3.70 (с, 3H), 3.32-3.25 (м, 2H), 1.67-1.61 (м, 1H), 1.60-1.49 (м, 3H), 1.40-1.33 (м, 20H);

$^{13}\text{C}$  NMR (176 МГц,  $\text{DMCO-d}^6$ ): 171.8, 168.5, 164.9, 160.4, 155.5, 144.5, 134.1, 130.1, 124.1, 121.6, 117.8, 115.3, 80.1, 77.9, 58.5, 54.2, 38.7, 30.4, 28.3, 28.1, 27.6, 22.9.

HRMS (ESI)  $m/z$ : 523.2685 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{26}\text{N}_2\text{O}_9\text{H}_{39}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  523.2650).

**(S)-трет-бутил 2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-6-(2-гидрокси-5-((Z)3-(((S)3-(4-гидроксифенил)-1-метокси-1-оксопропан-2-ил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексаноат (2.7).**

Смесь **2.6** (100 мг, 0.2 ммоль),  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида (DCC) (70 мг, 0.34 ммоль) и  $N$ -гидроксисукцинимид (SuOH) (46 мг, 0.4 ммоль) в 3 мл ТГФ перемешивали при 25°C в течение 3 часов. По окончании реакции (контроль: ТСХ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ ) добавили 116 мг (0.5 ммоль) L-тирозина и 100 мг (1 ммоль)  $\text{NEt}_3$ , перемешивали при 25°C в течение 12 часов. Затем реакцию смесь подкислили водным HCl до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (3x15 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2 x 10 мл), раствор сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ , Rf 0.55): бцв. жидк. **2.7** (80 мг, 60%).

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.59 (с, 1H), 7.69 (с, 2H), 7.00 (д,  $J = 8.5$  Гц, 2H), 6.96 (д,  $J = 8.9$  Гц, 1H), 6.88 (д,  $J = 8.2$  Гц, 1H), 6.80 (д,  $J = 8.5$  Гц, 2H), 6.75 (с, 1H), 6.68 (уш. с, 1H), 5.11 (д,  $J = 7.1$  Гц, 1H), 4.91 (дд,  $J = 13.8, 6.0$  Гц, 1H), 4.17 (д,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 3.78 (с, 3H), 3.58 – 3.50 (м, 1H), 3.52 (с, 3H), 3.45 – 3.38 (м, 1H), 3.20 (дд,  $J = 14.2, 5.8$  Гц, 1H), 3.09 (дд,  $J = 14.2, 6.2$  Гц, 1H), 1.86 – 1.80 (м, 1H), 1.74 – 1.63 (м, 3H), 1.51 – 1.42 (м, 20H).

$^{13}\text{C}$  NMR (201 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.3, 172.0, 169.8, 163.6, 161.9, 155.8, 155.3, 147.1, 135.4, 130.5, 127.4, 127.2, 124.0, 119.4, 118.9, 115.7, 114.5, 82.3, 80.2, 59.2, 53.9, 53.1, 52.5, 39.4, 36.9, 32.7, 29.7, 28.6, 28.3, 28.0, 22.8, 20.4.

HRMS (ESI)  $m/z$ : 700.3519 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{36}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{H}_{50}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  700.3440).

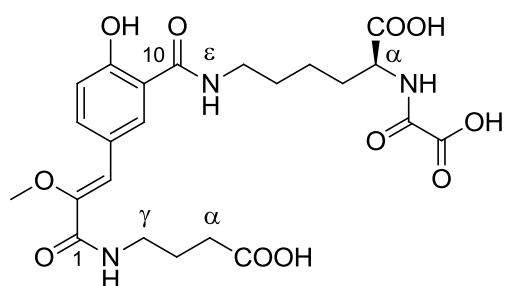
**(S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбокси-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо) гексановая кислота (2.3).**

К раствору **2.7** (80 мг, 0.11 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл) добавили 1 мл НВг (33% в ледяной уксусной кислоте), перемешивали при 25°C в течение 6 минут, затем реакцию смесь разбавили диэтиловым эфиром (30 мл). Осадок отфильтровали, промыли диэтиловым эфиром (5x30 мл), сушили в вакууме при комнатной температуре: бел. крист., 65 мг, (выход 91%). Затем добавили раствор NaOH (2M, 4 мл), перемешивали при 25°C в течение 5 минут. По окончании реакцию смесь подкислили водным HCl до pH 5.0, экстрагировали этилацетатом (5x25 мл), раствор сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили в вакууме. Остаток очищали с помощью HPLC хроматографии: бел. крист. **2.3** (40 мг, 72%).

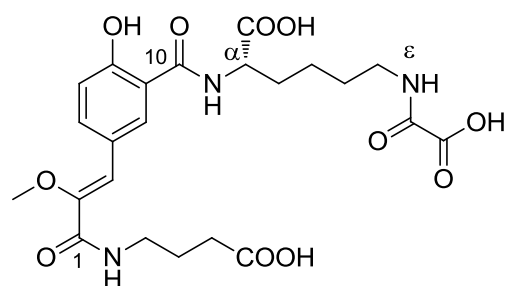
Химические сдвиги и мультиплетности сигналов ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соединения **2.3** приведены в Таблице 2.3 в Главе 2 - результаты и обсуждение.

HRMS (ESI)  $m/z$ : 530.2098 найдено (рассчитано для  $\text{C}_{26}\text{N}_3\text{O}_9\text{H}_{32}^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  530.2133).

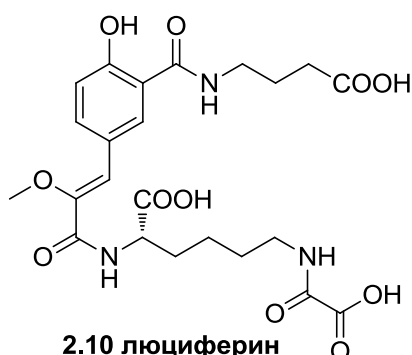
### 3.2.3 Синтез природного люциферина и его изомеров.



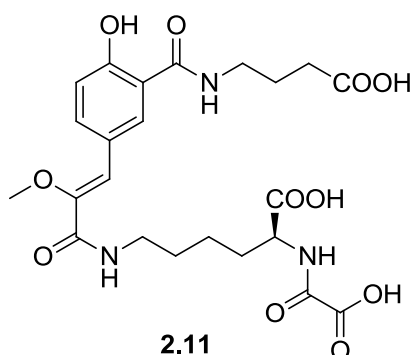
2.8



2.9



2.10 люциферин



2.11

#### Общая методика А: Пептидный синтез.

Смесь карбоновой кислоты (1 ммоль), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (1.7 ммоль) and *N*-гидрохсисукцинимид (SuOH) (1.8 ммоль) в 20 мл ТГФ перемешивают при 25°C в течение 12 часов. По окончании реакции (контроль ТСХ) добавляют 2.5 ммоль соответствующей аминокислоты и 5 ммоль  $\text{NEt}_3$ , смесь перемешивают при 25°C в течение 18 часов. Затем реакционную смесь подкисляют водным  $\text{HCl}$  (5%) до pH 3.0, экстрагируют этилацетатом (3x150 мл). Объединенную органическую фазу промывают насыщенным раствором хлорида натрия (2 x 100 мл), раствор сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривают в вакууме, остаток разделяют с помощью колоночной хроматографии.

#### Общая методика В: Введение *трет*-бутилового эфира по карбоксильной группе.

К раствору карбоновой кислоты (1 ммоль) в ТГФ 10мл добавляют *N,N'*-диизопропил-*О*-*трет*-бутилизоимочевина (6 ммоль), смесь перемешивают при 25°C в течение 14 часов. Осадок *N,N'*-диизопропилмочевины фильтруют, раствор сушат над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривают в вакууме, остаток разделяют с помощью колоночной хроматографии.

#### Общая методика С: Гидролиз метилового эфира.

К раствору 1 ммоль метилового эфира соответствующей карбоновой кислоты в 5 мл смеси  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{EtOH}$  (3:1) добавляют  $\text{NaOH}$  (2.5 ммоль), смесь перемешивают при 25°C в течение 3 часов. Затем реакционную смесь подкисляют водным раствором уксусной кислоты (5%) до pH 4.0,

экстрагируют этилацетатом (4x50 мл). Объединенную органическую фазу промывают насыщенным раствором NaCl (2x50 мл), раствор сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривают в вакууме, остаток разделяют с помощью колоночной хроматографии.

**Общая методика D:** Удаление защитных групп.

К раствору *N*-Вос-*O*-*t*-бутил-защищенного пептида (0.1 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл) добавляют 1 мл HBr (33% в ледяной уксусной кислоте), смесь перемешивают при 25°C в течение 6 минут, затем реакцию смесь разбавили диэтиловым эфиром (30 мл). Осадок фильтруют, промывают диэтиловым эфиром (5x30 мл), сушат в вакууме при комнатной температуре.

**Общая методика E:** Введение остатка щавелевой кислоты.

Раствор соответствующего пептида со свободной амино-группой (0.1 ммоль) в водном растворе K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4М, 2 мл) охлаждают на ледяной бане до 0°C, при активном перемешивании добавляют этил оксалилхлорид (4 ммоль). Смесь перемешивают при 25°C в течение 5 минут, затем подкисляют водным HCl (10%) до pH 1.0, экстрагируют этилацетатом (5x30 мл), упаривают в вакууме

**Общая методика F:** Гидролиз этилового эфира.

К 0.1 ммоль этилового эфира карбоновой кислоты добавляют раствор NaOH (2М, 4 мл), перемешивают при 25°C в течение 5 минут. Затем реакцию смесь подкисляют водным HCl (10%) до pH 1.0, экстрагируют этилацетатом (5x25 мл), раствор сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривают в вакууме. Остаток разделяют с помощью HPLC хроматографии.

**(*S,Z*)-трет-бутил 2((трет-бутоксикарбонил)амино)-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4-метокси-4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексаноат (2.12).**

Получен согласно методу А из 150 мг соединения **2.6**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, R<sub>f</sub> 0.55): бцв. жидк., 140 мг, (выход 79%).

<sup>1</sup>H NMR (700 МГц, ДМСО): δ 12.76 (уш. с, 1H), 8.81 (уш. с, 1H), 8.22 (т, *J* 5.6 Гц, 1H), 8.03 (д, *J* = 1.6 Гц, 1H), 7.86 (дд, *J* = 8.7, 1.6 Гц, 1H), 7.06 (д, *J* 7.5 Гц, 1H), 6.93 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.68 (с, 1H), 3.78-3.74 (м, 1H), 3.59 (с, 3H), 3.57 (с, 3H), 3.30-3.25 (м, 2H), 3.22-3.17 (м, 2H), 2.34 (т, *J* = 7.5, 2H), 1.77-1.73 (м, 2H), 1.66-1.49 (м, 4H), 1.40-1.33 (м, 20H);

<sup>13</sup>C NMR (176 МГц, ДМСО): 173.0, 171.8, 168.5, 163.1, 159.9, 155.5, 148.2, 133.7, 129.6, 124.2, 117.8, 116.9, 115.3, 80.1, 77.9, 58.8, 54.2, 51.2, 38.2, 38.1, 30.7, 30.4, 28.3, 28.1, 27.6, 24.4, 22.9;

HRMS (m/z): рассчитано для C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 622.3334, найдено 622.3381.

**(S,Z)-2-амино-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4- метокси -4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексановая кислота (2.13).**

Получен согласно методу D из 70 мг соединения **2.12**, бцв.крист., 52 мг, (выход 84%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.60 (т,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 8.42 (т,  $J = 6.3$  Гц, 1H), 7.97 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.82 (дд,  $J = 8.7, 2.0$  Гц, 1H), 7.03 (д,  $J = 7.5$  Гц, 1H), 6.64 (с, 1H), 3.95 (т,  $J = 6.1$  Гц, 1H), 3.68 (с, 3H), 3.65 (с, 3H), 3.45-3.35 (м, 4H), 2.46 (т,  $J = 7.4, 2\text{H}$ ), 2.02-1.88 (м, 4H), 1.71-1.66 (м, 2H), 1.55-1.46 (м, 2H).

**(S,Z)-2-(2-этокси-2-оксоацетамидо)-6-(2-гидрокси-5-(2-метокси-3-((4-метокси-4-оксобутил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамидо)гексановая кислота (2.14).**

Получен согласно методу E из 52 мг соединения **2.13**: бцв. жидк., использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

**(S,Z)-трет-бутил 6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексаноат (2.15).**

Получен согласно методу A из **2.2** (630 мг) и трет-бутилового эфира Nε-Вос-лизина гидрохлорида (2.10 г), выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ ,  $R_f$  0.55): бцв. жидк., 200 мг, (выход 15%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.34 (с, 1H), 7.92 (д,  $J = 1.6$  Гц, 1H), 7.85 (дд,  $J = 8.5, 1.6$  Гц, 1H), 7.36 (уш. с,  $J = 7.1$  Гц, 1H), 6.99 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H), 6.94 (с, 1H), 4.64-4.61 (м, 1H), 4.56-4.51 (м, 1H), 3.87 (с, 3H), 3.82 (с, 3H), 3.15-3.08 (м, 2H), 2.00-1.95 (м, 1H), 1.84-1.78 (м, 1H), 1.51-1.38 (м, 22H).

**(S,Z)-3-(3-((1-(трет-бутокси)-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-оксогексан-2-ил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.16).**

Получен согласно методу C из 190 мг соединения **2.15**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ ,  $R_f$  0.40): бцв. жидк., 160 мг, (выход 86%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

**(S,Z)-4-(3-(3-((1-(трет-бутокси)-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-оксогексан-2-ил)карбамил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)бутановая кислота (2.17).**

Получен согласно методу A из 160 мг соединения **2.16**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ ,  $R_f$  0.50): бцв. жидк., 60 мг, (выход 32%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{DMCO}$ ):  $\delta$  12.0 (уш. с, 1H), 9.0 (уш. с, 1H), 8.21 (т,  $J = 5.8$  Гц, 1H), 8.17 (д,  $J = 1.9$  Гц, 1H), 7.81 (дд,  $J = 8.5, 1.9$  Гц, 1H), 6.94 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H), 6.74 (т,  $J = 5.4$  Гц, 1H),



6.69 (с, 1H), 4.38-4.33 (м, 1H), 3.58 (с, 3H), 3.22-3.18 (м, 2H), 2.92-2.88 (м, 2H), 2.24 (т,  $J = 7.3$ , 2H), 1.83-1.70 (м, 4H), 1.43-1.32 (м, 22H).

**(S,Z)-6-амино-2-(5-(3-((3-карбоксыпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (2.18).**

Получен согласно методу D из 50 мг соединения **2.17**, бцв. крист., 43 мг, (выход 98%), т.пл. = 162-165 °C.

$^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.88 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.66 (дд,  $J = 8.7, 2.0$  Гц, 1H), 6.90 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.66 (с, 1H), 4.55-4.52 (м, 1H), 3.57 (с, 3H), 3.34-3.31 (м, 2H), 3.05-3.01 (м, 2H), 2.44 (т,  $J = 7.3$ , 2H), 2.03-1.98 (м, 1H), 1.93-1.84 (м, 3H), 1.77-1.71 (м, 2H), 1.54-1.50 (м, 2H);

$^{13}\text{C NMR}$  (176 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  177.9, 175.6, 168.5, 165.9, 157.5, 146.8, 135.2, 131.0, 124.8, 119.7, 117.5, 116.5, 59.3, 52.9, 39.3, 38.8, 31.2, 30.3, 26.4, 24.0, 22.2;

HRMS (m/z): рассчитано для  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_8$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 452.2027, найдено 452.2053.

**(S,Z)-2-(5-(3-((3-карбоксыпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетиамидо)гексановая кислота (2.19).**

Получен согласно методу E из 52 мг соединения **2.18**: бцв. жидк., использовали в следующей стадии без дополнительной очистки

**(Z)-трет-бутил 4-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)бутаноат (2.21).**

Получен согласно методам A и B без выделения промежуточных соединений из **2.2** (4 г),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) (4 г) и *N,N'*-диизопропил-*O*-трет-бутилизоомочевины (19 г), выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 97:2:1$ , Rf 0.40): бцв. жидк., 0.9 г, (выход 14%).

$^1\text{H NMR}$  (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.74 (с, 1H), 7.86 (дд,  $J = 8.7, 2.0$  Гц, 1H), 7.83 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.24 (уш. с,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 6.97 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.90 (с, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.78 (с, 3H), 3.51-3.49 (м, 2H), 2.40 (т,  $J = 6.7, 2\text{H}$ ), 1.96-1.93 (м, 2H), 1.45 (с, 9H);

$^{13}\text{C NMR}$  (176 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.6, 169.9, 164.9, 162.3, 144.2, 135.6, 128.0, 124.3, 123.3, 118.8, 114.4, 81.2, 59.2, 52.1, 39.8, 33.4, 28.1, 23.8;

HRMS (m/z): рассчитано для  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 394.1866, найдено 394.1869.

**(Z)-3-(3-((4-(трет-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.22).**

Получен согласно методу C из 550 мг соединения **2.21**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ , Rf 0.50): бцв. жидк., 200 мг, (выход 38%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.84 (с, 1H), 7.89-7.86 (м, 2H), 7.30 (уш. с, 1H), 7.07 (с, 1H), 7.00 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H), 3.81 (с, 3H), 3.53-3.50 (м, 2H), 2.42 (т,  $J = 6.5$ , 2H), 1.98-1.93 (м, 2H), 1.45 (с, 9H).

**(S,Z)-2-(3-(3-((4-*трет*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)гексановая кислота (2.23).**

Получен согласно методу А из 100 мг соединения **2.22**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ , Rf 0.55): бцв. жидк., 80 мг, (выход 50%).

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц, ДМСО):  $\delta$  12.74 (с, 1H), 8.79 (т,  $J = 3.8$  Гц, 1H), 8.18 (д,  $J = 8.0$  Гц, 1H), 8.18 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.90 (дд,  $J = 8.7, 2.0$  Гц, 1H), 6.96 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.75 (т,  $J = 5.5$  Гц, 1H), 6.97 (с, 1H), 4.29-4.26 (м, 1H), 3.62 (с, 3H), 3.33-3.27 (м, 2H), 2.92-2.86 (м, 2H), 2.27 (т,  $J = 7.3$ , 2H), 1.80-1.73 (м, 4H), 1.39-1.24 (м, 22H);

$^{13}\text{C}$  NMR (176 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.5, 171.9, 168.6, 163.3, 159.9, 155.5, 147.9, 133.8, 129.8, 124.2, 117.8, 117.3, 115.4, 79.6, 77.3, 58.8, 52.1, 39.9, 38.3, 32.2, 30.2, 29.0, 28.2, 27.7, 24.3, 23.0;

HRMS (m/z): рассчитано для  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_{10}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 608.3183, найдено 608.3205.

**(S,Z)-6-амино-2-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.24).**

Получен согласно методу D из 80 мг соединения **2.23**: бел. крист., 69 мг, (выход 98%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.01 (д,  $J = 1.8$  Гц, 1H), 7.84 (дд,  $J = 8.5, 1.8$  Гц, 1H), 7.05 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H), 6.88 (с, 1H), 4.50-4.46 (м, 1H), 3.70 (с, 3H), 3.48-3.43 (м, 4H), 2.48 (т,  $J = 7.3$ , 2H), 2.05-1.86 (м, 4H), 1.75-1.69 (м, 2H), 1.54-1.45 (м, 2H).

**(S,Z)-2-(3-(3-((3-карбоксипропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетиамидо)гексановая кислота (2.25).**

Получен согласно методу E из 69 мг соединения **2.24**: бцв. жидк., использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

**(S,Z)-6-(3-(3-((4-*трет*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)гексановая кислота (2.26).**

Получен согласно методу А из 100 мг соединения **2.22**, выделен из реакционной смеси методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 94:5:1$ , Rf 0.55): бцв. жидк., 93 мг, (выход 58%).

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.75 (с, 1H), 7.78 (дд,  $J = 8.7, 1.6$  Гц, 1H), 7.71 (д,  $J = 1.6$  Гц, 1H), 7.36 (уш. с, 1H), 6.98 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.97 (с, 1H), 6.78 (уш. с, 1H), 5.27 (уш. с, 1H), 4.32-

4.28 (м, 1H), 3.62 (с, 3H), 3.53-3.47 (м, 2H), 3.41-3.37 (м, 2H), 2.39 (т,  $J = 6.8$ , 2H), 1.97-1.89 (м, 3H), 1.78-1.73 (м, 1H), 1.65-1.59 (м, 2H), 1.52-1.44 (м, 2H), 1.44(с, 9H), 1.42(с, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (201 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  176.3, 173.7, 169.9, 164.5, 162.0, 155.9, 147.1, 134.9, 128.1, 124.0, 119.7, 119.9, 114.5, 81.3, 80.2, 59.4, 53.4, 39.6, 39.1, 33.3, 31.8, 29.1, 28.3, 28.1, 24.1, 22.5;

HRMS (m/z): рассчитано для  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_{10}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 608.3183, найдено 608.3226.

**(S,Z)-2-амино-6-(3-(3-((3-карбоксыпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.27).**

Получен согласно методу D из 90 мг соединения **2.26**: бцв. крист., 76 мг, (выход 96%), использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

$^1\text{H}$  NMR (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.99 (д,  $J = 2.0$  Гц, 1H), 7.82 (дд,  $J = 8.5, 2.0$  Гц, 1H), 7.04 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H), 6.85 (с, 1H), 3.91-4.78 (м, 1H), 3.66 (с, 3H), 3.48-3.43 (м, 2H), 3.37-3.33 (м, 2H), 2.48 (т,  $J = 7.3$ , 2H), 1.98-1.86 (м, 4H), 1.67-1.61 (м, 2H), 1.51-1.40 (м, 2H).

**(S,Z)-6-(3-(3-((3-карбоксыпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-2-(2-этокси-2-оксоацетамидо)гексановая кислота (2.28).**

Получен согласно методу E из 76 мг соединения **2.27**: бцв. жидк., использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

**(S,Z)-2-(карбоксыформамидо)-6-(5-(3-((3-карбоксыпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (2.8); (S,Z)-6-(карбоксыформамидо)-2-(5-(3-((3-карбоксыпропил)амино)-2-метокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)гексановая кислота (2.9); (S,Z)-6-(карбоксыформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксыпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.10) и (S,Z)-2-(карбоксыформамидо)-6-(3-(3-((3-карбоксыпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.11).**

Соединения **2.8**, **2.9**, **2.10** и **2.11** были получены согласно методу F из соединений **2.14**, **2.19**, **2.25** и **2.28** соответственно, выделены из реакционных смесей при помощи HPLC хроматографии:

**2.8** бцв.крист., 18 мг, (выход 87%);

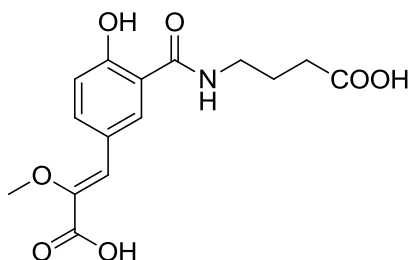
**2.9** бцв.крист., 30 мг, (выход 92%);

**2.10** бцв.крист., 22 мг, (выход 90%);

**2.11** бцв.крист., 31 мг, (выход 88%).

Химические сдвиги и мультиплетности сигналов ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соединений **2.8-2.11** приведены в Таблице 2.4 в Главе 2 - результаты и обсуждение.

### 3.2.4 Синтез аналога люциферина AsLn7



#### (Z)-метил 4-(5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо)бутаноат (2.30).

Смесь метилового эфира CompX **2.2** (150 мг, 0.6 ммоль), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) (210 мг, 1.0 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (SuOH) (140 мг, 1.2 ммоль) в 10 мл ТГФ перемешивали при 25°C в течение 3 часов. По окончании реакции (контроль: ТСХ, silufol, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1) добавили 230 мг (1.5 ммоль) метилового эфира гамма-аминомасляной кислоты и 300 мг (3.0 ммоль) NEt<sub>3</sub>, перемешивали при 25°C в течение 12 часов. Затем реакционную смесь подкислили водным HCl до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (3x50 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x50 мл), раствор сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 97:2:1, R<sub>f</sub> 0.55): бцв. жидк. **2.30** (150 мг, 72%).

<sup>1</sup>H NMR (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.66 (с, 1H), 7.84 (д, *J* = 1.9 Гц, 1H), 7.80 (дд, *J* = 8.7, 1.9 Гц, 1H), 7.04 (уш. с, 1H), 6.96 (д, *J* = 8.7 Гц, 1H), 6.89 (с, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.77 (с, 3H), 3.68 (с, 3H), 3.51 (дд, *J* = 12.3, 6.5 Гц, 2H), 2.47 (т, *J* = 6.8 Гц, 2H), 2.00-1.95 (м, *J* = 6.7 Гц, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (176 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.4, 169.9, 164.9, 162.3, 144.3, 135.9, 127.8, 124.3, 123.3, 118.9, 114.4, 59.2, 52.2, 51.9, 39.6, 31.8, 24.1.

HRMS (*m/z*): рассчитано для C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 352.1391, найдено 352.1402.

#### (Z)-4-(5-(2-карбокси-2-метоксивинил)-2-гидроксибензамидо)бутановая кислота (2.29).

К 120 мг (0.34 ммоль) **2.30** добавили раствор NaOH (68 мг, 1.7 ммоль) в 10 мл смеси H<sub>2</sub>O-EtOH (3:1), перемешивали при 25°C в течение 3 часов (контроль: ТСХ, silufol, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1). Затем реакционную смесь подкислили водным раствором уксусной кислоты до pH 3.0, экстрагировали этилацетатом (4x50 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (2x50 мл), раствор сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили в вакууме, остаток очищали с помощью колоночной

хроматографии (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 94:5:1, Rf 0.20): бцв. крист. **2.29** (85 мг, 77%), т.пл. = 155-158°C.

<sup>1</sup>H NMR (800 МГц, D<sub>2</sub>O, pH 5.0): δ 7.96 (д, *J* = 2.2 Гц, 1H), 7.80 (дд, *J* = 8.9, 2.2 Гц, 1H), 7.00 (д, *J* = 8.9 Гц, 1H), 6.69 (с, 1H), 3.69 (с, 3H), 3.42 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 2.37 (т, *J* = 7.8 Гц, 2H), 1.90 (м, *J* = 7.5 Гц, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (200 МГц, D<sub>2</sub>O, pH 5.0) δ 180.6, 171.6, 169.7, 156.9, 149.5, 134.6, 129.7, 118.7, 117.5, 117.3, 58.4, 39.2, 33.9, 24.8.

HRMS (*m/z*): рассчитано для C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 324.1083, найдено 324.1065.

## Выводы

1. Методом встречного синтеза установлено строение нового природного люциферина – субстрата АТФ-зависимой биolumинесцентной системы почвенного червя *Fridericia heliota*: (S,Z)-6-(карбоксихормамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксихпропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановой кислоты.
2. Впервые разработан метод синтеза CompX – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение CompX – (Z)-5-(2-карбоксих-2-метоксивинил)-2-гидроксибензойной кислоты, в частности, установлена конфигурация трехзамещенной двойной связи.
3. Разработан метод синтеза AsLn2 – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение AsLn2 – (S)-2-амино-6-(5-((Z)-3-(((S)-1-карбоксих-2-(4-гидроксифенил)этил)амино)-2-метоксих-3-оксипроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензамидо) гексановой кислоты, в частности, установлены относительные и абсолютные конфигурации стереоцентров.
4. Разработан метод синтеза AsLn7 – природного аналога люциферина люминесцентного почвенного червя *Fridericia heliota*. Методом встречного синтеза подтверждено строение AsLn7 – ((Z)-4-(5-(2-карбоксих-2-метоксивинил)-2-гидроксибензамидо)бутановой кислоты.

## Благодарности

Автор выражает сердечную благодарность своему научному руководителю к.х.н. Илье Викторовичу Ямпольскому за всестороннюю помощь в работе, полезные советы и поддержку на протяжении всех этапов исследования. Автор благодарит руководителя лаборатории Биофотоники ИБХ РАН Константина Анатольевича Лукьянова в чьей лаборатории проводилась часть работы, а также всех сотрудников, в дружеском коллективе которых автор имеет удовольствие работать. Автор также благодарит коллектив группы Синтеза природных соединений за помощь в работе и создание неповторимой рабочей атмосферы. Автор благодарит сотрудников лаборатории Фотобиологии Института Биофизики СО РАН к.б.н. Валентина Петушкова и к.б.н. Наталью Родионову с чьего многолетнего труда по сбору биомассы червя *F. heliota* и выделению компонентов его биoluminesцентной системы началось наше исследование. Автор благодарит руководителя лаборатории Биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН Александра Сергеевича Арсеньева, а также сотрудников этой лаборатории Максима Дубинного, Константина Минеева и Кирилла Надеждина за неоценимую помощь в регистрации и расшифровке спектров ядерного магнитного резонанса. Автор также благодарит Константина Владимировича Антонова и Рустама Зиганшина за регистрацию спектров HRMS. Автор благодарен официальным оппонентам к.х.н., с.н.с. Василию Викторовичу Туманову (ИОХ РАН) и д.х.н., профессору Марине Абрамовне Юровской (МГУ им. Ломоносова) за их ценные критические замечания, которые автор постарался учесть при оформлении работы. Автор также благодарит членов своей семьи и родственников за помощь и поддержку.

### Список сокращений и условных обозначений

<b>BLI</b>	биолюминесцентный имджинг
<b>Boc</b>	трет-бутоксикарбонил
<b>BRET</b>	биолюминесцентный резонансный перенос энергии
<b>CBRLuc</b>	люцифераза огненного шелкопряда ( <i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> )
<b>CBP</b>	Ca <sup>2+</sup> -регулируемый целентеразин-связывающий белок
<b>COSY</b>	гомоядерная корреляционная спектроскопия
<b>DCC</b>	дициклогексилкарбодиимид
<b>FAD</b>	флавинадениндинуклеотида
<b>FMN/FMNH<sub>2</sub></b>	флавиномононуклеотид
<b>GFP</b>	зеленый флуоресцентный белок
<b>GLuc</b>	секретируемая люцифераза <i>Gaussia</i>
<b>HMBC</b>	гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия
<b>HSQC</b>	гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
<b>HRMS</b>	масс-спектрометрия высокого разрешения
$\lambda_{\max}, \lambda_{\text{em}}$	длина волны, при которой наблюдается максимум спектра биолюминесценции (флуоресценции).
<b>Luc</b>	люцифераза
<b>Luc2</b>	оптимизированная люцифераза светляка (Promega)
<b>NanoLuc: NanoKaz</b>	рекомбинантные секретируемые люциферазы на основе OLuc
<b>NAD/NADH</b>	никотинамидадениндинуклеотид
<b>OLuc</b>	люцифераза <i>Oplophorus</i>
<b>PPi</b>	неорганический пирофосфат
<b>(PpyLuc)</b>	природная люцифераза вида <i>Photinus pyralis</i>
<b>PpyWT</b>	рекомбинантная люцифераза светляка
<b>RFP</b>	красный флуоресцентный белок
<b>Pyr</b>	пиридин



<b>RecFluc</b>	рекомбинантная люцифераза светляка
<b>RLuc</b>	люцифераза <i>Renilla</i>
<b>SuOH</b>	N-гидроксисукцинимид
<b>THF</b>	тетрагидрофуран
<b>Ultra-Glo</b>	мутантная люцифераза светляков (Promega)
<b>АМФ</b>	аденозин-5'-монофосфат
<b>АТФ</b>	аденозин-5'-трифосфат
<b>ГАМК</b>	<i>гамма</i> -аминомасляная кислота
<b>ДМСО, DMSO</b>	диметилсульфоксид
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>ТГФ, THF</b>	тетрагидрофуран
<b>ТСХ</b>	тонкослойная хроматография
<b>ЯМР</b>	ядерный магнитный резонанс

Также применяются общепринятые сокращения для названий аминокислот (Lys, Tyr и т.п.), карбонильных (Et, Pr и т.п.) и прочих (Bn, Ph, Ar, Ts и т.п.) радикалов.

## Список литературы

1. Adamczyk M., Akireddy S.R., Johnson D.D., Mattingly P.G., Pan Y., Reddy R.E. Synthesis of 3,7-dihydroimidazo[1,2a]pyrazine-3-ones and their chemiluminescent properties // *Tetrahedron*. 2003. T. 59. № 41. C. 8129–8142.
2. Alloush H.M., Lewis R.J., Salisbury V.C. Bacterial Bioluminescent Biosensors: Applications in Food and Environmental Monitoring // *Anal. Lett.* 2006. T. 39. № 8. C. 1517–1526.
3. de Almeida P.E., van Rappard J.R.M., Wu J.C. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. T. 301. № 3. C. H663–671.
4. Anderson J.M., Charbonneau H., Cormier M.J. Mechanism of calcium induction of Renilla bioluminescence. Involvement of a calcium-triggered luciferin binding protein. // *Biochemistry*. 1974. T. 13. № 6. C. 1195–1200.
5. Andreu N., Zelmer A., Wiles S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2011. T. 35. № 2. C. 360–394.
6. Aswendt M., Adamczak J., Couillard-Despres S., Hoehn M. Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies. // *PLoS One*. 2013. T. 8. № 2. C. e55662.
7. Baubet V., Le Mouellic H., Campbell A.K., Lucas-Meunier E., Fossier P., Brulet, P. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. T. 97. № 13. C. 7260–7265.
8. Bellisario R., Cormier M.J. Peroxide-linked bioluminescence catalyzed by a copper-containing, non-heme luciferase isolated from a bioluminescent earthworm. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. T. 43. № 4. C. 800–805.
9. Bellisario R., Spencer T.E., Cormier M.J. Isolation and properties of luciferase, a non-heme peroxidase, from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa*. // *Biochemistry*. 1972. T. 11. № 12. C. 2256–2266.
10. Bernatowicz M.S., Wu Y., Matsueda G.R. 1H-Pyrazole-1-carboxamide hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis // *J. Org. Chem.* 1992. T. 57. № 8. C. 2497–2502.

11. Bowden B.J. Some observations on a luminescent freshwater limpet from New Zealand. // *Biol. Bull.* 1950. T. 99. № 3. C. 373–380.
12. Bowie L.J. Synthesis of Firefly Luciferin and Structural Analogs // *Methods Enzymol.* 1978. T. 57. C. 15–28.
13. Branchini B.R., Hayward M.M., Bamford S., Brennan P.M., Lajiness E.J. Naphthyl- and quinolylluciferin: green and red light emitting firefly luciferin analogues. // *Photochem. Photobiol.* 1989. T. 49. № 5. C. 689–695.
14. Branchini B.R. Chemical Synthesis of Firefly Luciferin Analogs and Inhibitors // *Methods Enzymol.* 2000. T. 305. C. 188–195.
15. Branchini B.R., Murtiashaw M.H., Magyar R.A., Portier N.C., Ruggiero M.C., Stroh J.G.. Yellow-Green and Red Firefly Bioluminescence from 5,5-Dimethyloxyluciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. T. 124. № 10. C. 2112–2113.
16. Branchini B.R., Ablamsky D.M., Davis A.L., Southworth T.L., Butler B., Fan F., Jathoul A.P., Pule M.A. Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. // *Anal. Biochem.* 2010. T. 396. № 2. C. 290–297.
17. Campbell A.K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata*. // *Biochem. J.* 1974. T. 143. № 2. C. 411–418.
18. Campbell A.K., Herring P.J. Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms // *Mar. Biol.* 1990. T. 104. № 2. C. 219–225.
19. Close D.M., Patterson S.S., Ripp S., Baek S.J., Sanseverino J., Sayler G.S. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. // *PLoS One.* 2010. T. 5. № 8. C. e12441.
20. Conley N.R., Dragulescu-Andrasi A., Rao J., Moerner W.E.. A selenium analogue of firefly D-luciferin with red-shifted bioluminescence emission. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. T. 51. № 14. C. 3350–3353.
21. Contag C.H., Jenkins D., Contag P.R., Negrin R.S. Use of Reporter Genes for Optical Measurements of Neoplastic Disease In Vivo // *Neoplasia.* 2000. T. 2. № 1-2. C. 41–52.

22. Cormier M.J., Strehler B.L. The identification of KCF: requirement of long-chain aldehydes for bacterial extract luminescence // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. T. 75. № 19. C. 4864–4865.
23. Cuadro A.M., Alvarez-Buila J. 4,5-Dichloro-1,2,3-dithiazolium chloride (Appel's Salt): Reactions with N-nucleophiles. // *Tetrahedron*. 1994. T. 50. № 33. C. 10037–10046.
24. Curie T., Rogers K.L., Colasante C., Brulet P. Red-shifted aequorin-based bioluminescent reporters for in vivo imaging of Ca<sup>2+</sup> signaling. // *Mol. Imaging*. 2007. T. 6. № 1. C. 30–42.
25. Denburg J.L., Lee R.T., McElroy W.D. Substrate-binding properties of firefly luciferase // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. T. 134. № 2. C. 381–394.
26. Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Mineev K.S., Yampolsky I.V. Novel peptide chemistry in terrestrial animals: natural luciferin analogues from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *Chem. Euro. J.* 2015. T. 21. № 10. C. 3942–3947.
27. Dunlap J.C., Hastings J.W., Shimomura O. Crossreactivity between the light-emitting systems of distantly related organisms: Novel type of light-emitting compound // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980. T. 77. № 3. C. 1394–1397.
28. Dunlap P. V., Kita-Tsukamoto K. Luminous Bacteria // *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry* / под ред. М. Dworkin и др. New York, NY: Springer New York, 2006. C. 863–892.
29. Dupriez V.J., Maes K., Poul E.L., Burgeon E., Detheux M. Aequorin-Based Functional Assays for G-Protein-Coupled Receptors, Ion Channels, and Tyrosine Kinase Receptors // *Recept. Channels*. 2002. T. 8. № 5-6. C. 319–330.
30. Eberhard A., Hastings J.W. A postulated mechanism for the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. T. 47. № 2. C. 348–353.
31. Edinger M., Cao, Y.A., Hornig Y.S., Jenkins D.E., Verneris M.R., Bachmann M.H., Negrin R.S., Contag C.H. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging // *Eur. J. Cancer*. 2002. T. 38. № 16. C. 2128–2136.

32. Eley M., Cormier M.J. On the function of aldehyde in bacterial bioluminescence: Evidence for an aldehyde requirement during luminescence from the frozen state // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968. T. 32. № 3. C. 454–460.
33. Evans M.S., Chaurette J.P., Adams S.T., Reddy G.R., Paley M.A., Aronin N., Prescher J.A., Miller S.C. A synthetic luciferin improves bioluminescence imaging in live mice. // *Nat. Methods.* 2014. T. 11. № 4. C. 393–395.
34. Fracheboud M.G., Shimomura O., Hill R.K., Johnson F.H. Synthesis of luciferin // *Tetrahedron Lett.* 1969. T. 10. № 45. C. 3951–3952.
35. Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. T. 608. № 1. C. 2–29.
36. Goto T. Chemistry of bioluminescence // *Pure Appl. Chem.* 1968. T. 17. № 3-4. C. 421–442.
37. Goto T., Inoue S., Sugiura S. Cypridina bioluminescence IV. Synthesis and chemiluminescence of 3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one and its 2-methyl derivative // *Tetrahedron Lett.* 1968. T. 9. № 36. C. 3873–3876.
38. Hall, M.P., Unch J. Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., Robers M.B., Benink H.A., Eggers C.T., Slater M.R., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H., Fan F., Encell L.P., Wood K.V. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. // *ACS Chem. Biol.* 2012. T. 7. № 11. C. 1848–1857.
39. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and chemiluminescence. // *Methods Enzymol.* 2003. T. 360. C. 75–104.
40. Hastings J.W., Morin J.G. Calcium-triggered light emission in Renilla. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969. T. 37. № 3. C. 493–498.
41. Hastings J.W., Nealson K.H. Bacterial bioluminescence. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1977. T. 31. C. 549–595.

42. Hawkins E., Unch J., Murphy N., Vidugiriene J., Scurria M., Klaubert D.H., Wood K.V. Measuring Renilla Luciferase Luminescence in Living Cells // *Promega Notes*. 2005. T. 90. C. 10–14.
43. Herring P.J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1987. T. 1. № 3. C. 147–163.
44. Hirano T., Takahashi Y., Kondo H., Maki S., Kojima S., Ikeda H., Niwa H. The reaction mechanism for the high quantum yield of Cypridina (Vargula) bioluminescence supported by the chemiluminescence of 6-aryl-2-methylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (Cypridina luciferin analogues). // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. T. 7. № 2. C. 197–207.
45. Hopkins T.A., Seliger H.H., White E.H., Cass M.W.. Chemiluminescence of firefly luciferin. Model for the bioluminescent reaction and identification of the product excited state // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. T. 89. № 26. C. 7148–7150.
46. Hori K., Wampler J.E., Matthews J.C., Cormier M.J. Bioluminescence of *Renilla reniformis*. XIII. Identification of the product excited states during the chemiluminescent and bioluminescent oxidation of *Renilla* (sea pansy) luciferin and certain of its analogs // *Biochemistry*. 1973. T. 12. № 22. C. 4463–4468.
47. Hori K., Wampler J.E., Cormier M.J. Chemiluminescence of *Renilla* (sea pansy) luciferin and its analogues // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973. № 14. C. 492–493.
48. Inoue S., Sugiura S., Kakoi H., Hasizume K., Goto T., Iio H. Squid bioluminescence II. Isolation from *Watasenia scintillans* and synthesis of 2-(p-hydroxybenzyl)-6-(p-hydroxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one // *Chem. Lett.* 1975. № 2. C. 141–144.
49. Inouye S., Watanabe K., Nakamura H., Shimomura O. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. // *FEBS Lett.* 2000. T. 481. № 1. C. 19–25.
50. Inoue S., Sato J., Sahara-Miura Y., Yoshida S., Kurakata H., Hosoya T. C6-Deoxy coelenterazine analogues as an efficient substrate for glow luminescence reaction of nanoKAZ: the mutated catalytic 19 kDa component of *Oplophorus* luciferase. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. T. 437. № 1. C. 23–28.

51. Inouye S., Sahara Y. Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. T. 365. № 1. C. 96–101.
52. Inouye S., Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris*. // *Protein Expr. Purif.* 2007. T. 56. № 2. C. 261–268.
53. Inouye S., Shimomura O. The use of *Renilla* luciferase, *Oplophorus* luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. T. 233. № 2. C. 349–353.
54. Iwano S., Obata R., Miura C., Kiyama M., Hama K., Nakamura M., Amano Y., Kojima S., Hirano T., Maki S., Niwa H. Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light // *Tetrahedron*. 2013. T. 69. № 19. C. 3847–3856.
55. Jathoul A.P., Grounds H., Anderson J.C., Pule M.A. A dual-color far-red to near-infrared firefly luciferin analogue designed for multiparametric bioluminescence imaging. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. T. 53. № 48. C. 13059–13063.
56. Jones K., Hibbert F., Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine // *Trends Biotechnol.* 1999. T. 17. № 12. C. 477–481.
57. Jones K., Keenan M., Hibbert F. A Suzuki Coupling Approach to Pyrazines Related to Coelenterazine // *Synlett*. 1996. T. 1996. № 06. C. 509–510.
58. Karpetsky T.P., White E.H. The synthesis of cypridina etioluciferamine and the proof of structure of cypridina luciferin // *Tetrahedron*. 1973. T. 29. № 23. C. 3761–3773.
59. Kato S., Oba Y., Ojika M., Inoue S. Identification of the biosynthetic units of *Cypridina* luciferin in *Cypridina* (*Vargula*) *hilgendorffii* by LC/ESI-TOF-MS // *Tetrahedron*. 2004. T. 60. № 50. C. 11427–11434.
60. Keenan M., Jones K., Hibbert F. Highly efficient and flexible total synthesis of coelenterazine // *Chem. Commun.* 1997. № 3. C. 323–324.

61. Kimura T., Hiraoka K., Kasahara N., Logg C.R. Optimization of enzyme-substrate pairing for bioluminescence imaging of gene transfer using Renilla and Gaussia luciferases. // *J. Gene Med.* 2010. T. 12. № 6. C. 528–537.
62. Kishi Y., Goto T., Inoue S., Sugiura S., Kishimoto H. Cypridina bioluminescence III total synthesis of luciferin // *Tetrahedron Lett.* 1966. T. 7. № 29. C. 3445–3450.
63. Kishi Y., Sugiura S., Inoue S., Goto T. Synthesis of Cypridina Luciferin and Related Compounds. III. : Synthesis of Cypridina Luciferin // *J. Pharm. Soc. Japan.* 1969. T. 89. № 12. C. 1657–1660.
64. Kishi Y., Tanino H., Goto T. The structure confirmation of the light-emitting moiety of bioluminescent jellyfish // *Tetrahedron Lett.* 1972. T. 13. № 27. C. 2747–2748.
65. Kondo H., Igarashi T., Maki S., Niwa H., Ikeda H., Hirano T. Substituent effects on the kinetics for the chemiluminescence reaction of 6-arylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (Cypridina luciferin analogues): support for the single electron transfer (SET)–oxygenation mechanism with triplet molecular oxygen // *Tetrahedron Lett.* 2005. T. 46. № 45. C. 7701–7704.
66. Koo J.A., Schmidt S.P., Schuster G.B. Bioluminescence of the firefly: key steps in the formation of the electronically excited state for model systems. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978. T. 75. № 1. C. 30–33.
67. Kurfuerst M., Macheroux P., Ghisla S., Hastings J.W. Isolation and characterization of the transient, luciferase-bound flavin-4a-hydroxide in the bacterial luciferase reaction // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1987. T. 924. № 1. C. 104–110.
68. Kurfürst M., Ghisla S., Hastings J.W. Characterization and postulated structure of the primary emitter in the bacterial luciferase reaction. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984. T. 81. № 10. C. 2990–2994.
69. Lei B., Ding Q., Tu S.-C. Identity of the emitter in the bacterial luciferase luminescence reaction: binding and fluorescence quantum yield studies of 5-decyl-4a-hydroxy-4a,5-dihydroriboflavin-5'-phosphate as a model. // *Biochemistry.* 2004. T. 43. № 50. C. 15975–15982.
70. Li, J., Chen L., Du L., Li M.. Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. T. 42. № 2. C. 662–76.



71. Liang Y., Walczak P., Bulte J.W.M. Comparison of red-shifted firefly luciferase Ppy RE9 and conventional Luc2 as bioluminescence imaging reporter genes for in vivo imaging of stem cells. // *J. Biomed. Opt.* 2012. T. 17. № 1. C. 016004.
72. Lowell A.N., Wall P.D., Waters S.P., Kozlowski M.C. Syntheses of differentially protected isocoumarins // *Tetrahedron*. 2010. T. 66. № 30. C. 5573–5582.
73. Luker G.D., Luker K.E. Optical imaging: current applications and future directions. // *J. Nucl. Med.* 2008a. T. 49. № 1. C. 1–4.
74. Luker K.E., Luker G.D. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. // *Antiviral Res.* 2008b. T. 78. № 3. C. 179–187.
75. Manjarrés I.M., Chamero P., Domingo B., Molina F., Llopis J., Alonso M.T., García-Sancho J. Red and green aequorins for simultaneous monitoring of Ca<sup>2+</sup> signals from two different organelles. // *Pflugers Arch.* 2008. T. 455. № 5. C. 961–970.
76. Markova S.V., Golz S., Frank L.A., Kalthof B., Vysotski E.S. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. № 5. C. 3212–3217.
77. Markova S.V., Burakova L.P., Vysotski E.S. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. T. 417. № 1. C. 98–103.
78. Marques S.M., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Esteves da Silva J.C.G. LC-MS and microscale NMR analysis of luciferin-related compounds from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2011. T. 102. № 3. C. 218–223.
79. Martin J.-R., Rogers K.L., Chagneau C., Brulet P. In vivo bioluminescence imaging of Ca signalling in the brain of *Drosophila*. // *PLoS One*. 2007. T. 2. № 3. C. e275.
80. Matthews J.C., Hori K., Cormier M.J. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase // *Biochemistry*. 1977. T. 16. № 1. C. 85–91.
81. McCapra F. Chemical generation of excited states: the basis of chemiluminescence and bioluminescence. // *Methods Enzymol.* 2000. T. 305. C. 3–47.

82. McCutcheon D.C., Paley M.A., Steinhardt R.C., Prescher J.A. Expedient synthesis of electronically modified luciferins for bioluminescence imaging. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. T. 134. № 18. C. 7604–7607.
83. McElroy W.D., Hastings J.W., Sonnenfeld V. Coulombre J. Partial purification and properties of bacterial luciferin and luciferase. // *J. Bacteriol.* 1954. T. 67. № 4. C. 402–408.
84. McElroy W.D., Green A.A. Enzymatic properties of bacterial luciferase // *Arch. Biochem. Biophys.* 1955. T. 56. № 1. C. 240–255.
85. Mezzanotte L., Aswendt M., Tennstaedt A., Hoeben R., Hoehn M., Löwik C. Evaluating reporter genes of different luciferases for optimized in vivo bioluminescence imaging of transplanted neural stem cells in the brain. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2013. T. 8. № 6. C. 505–513.
86. Milne B.F., Marques M.A.L., Nogueira F. Fragment molecular orbital investigation of the role of AMP protonation in firefly luciferase pH-sensitivity. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. T. 12. № 42. C. 14285–14293.
87. Miura C., Kiyama M., Iwano S., Ito K., Obata R., Hirano T., Maki S., Niwa H. Synthesis and luminescence properties of biphenyl-type firefly luciferin analogs with a new, near-infrared light-emitting bioluminophore // *Tetrahedron.* 2013. T. 69. № 46. C. 9726–9734.
88. Morton R.A., Hopkins T.A., Seliger H.H. Spectroscopic properties of firefly luciferin and related compounds; an approach to product emission // *Biochemistry.* 1969. T. 8. № 4. C. 1598–1607.
89. Nakamura H., Musicki B., Kishi Y., Shimomura O. Structure of the light emitter in krill (*Euphausia pacifica*) bioluminescence // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. T. 110. № 8. C. 2683–2685.
90. Nakamura H., Kishi Y., Shimomura O., Morse D., Hastings J.W. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. T. 111. № 19. C. 7607–7611.
91. Nakamura H., Wu C., Murai A., Inouye S., Shimomura O. Efficient Bioluminescence of Bisdeoxycoelenterazine with the Luciferase of a Deep-Sea Shrimp *Oplophorus* // *Tetrahedron Lett.* 1997. T. 38. № 36. C. 6405–6406.

92. Nakamura H., Aizawa M., Takeuchi D., Murai A., Shimomura O. Convergent and short-step syntheses of dl-Cypridina luciferin and its analogues based on Pd-mediated cross couplings // *Tetrahedron Lett.* 2000. T. 41. № 13. C. 2185–2188.
93. Nakamura H., Takeuchi D., Murai A. Synthesis of 5- and 3,5-Substituted 2-Aminopyrazines by Pd Mediated Stille Coupling // *Synlett.* 1995. T. 1995. № 12. C. 1227–1228.
94. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. // *Nature.* 2006. T. 440. № 7082. C. 372–376.
95. Nakatsubo F., Kishi Y., Goto T. Synthesis and stereochemistry of latia luciferin // *Tetrahedron Lett.* 1970. T. 11. № 5. C. 381–382.
96. Nishihara R., Suzuki H., Hoshino E., Suganuma S., Sato M., Saitoh T., Nishiyama S., Iwasawa N., Citterio D., Suzuki K. Bioluminescent coelenterazine derivatives with imidazopyrazinone C-6 extended substitution. // *Chem. Commun.* 2015. T. 51. № 2. C. 391–394.
97. Oba Y., Kato S., Ojika M., Inoue S. Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. T. 390. № 3. C. 684–688.
98. Ohmiya Y., Kojima S., Nakamura M., Niwa H. Bioluminescence in the Limpet-Like Snail, *Latia neritoides* // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2005. T. 78. № 7. C. 1197–1205.
99. Ohtsuka H., Rudie N.G., Wampler J.E. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa* // *Biochemistry.* 1976. T. 15. № 5. C. 1001–1004.
100. Otto-Duessel M., Khankaldyyan V., Gonzalez-Gomez I., Jensen M.C., Laug W.E., Rosol M. In vivo testing of Renilla luciferase substrate analogs in an orthotopic murine model of human glioblastoma. // *Mol. Imaging.* 2006. T. 5. № 2. C. 57–64.
101. Paguio A., Almond B., Fan F., Stecha P., Garvin D., Wood M., Wood K. pGL4 Vectors: A New Generation of Luciferase Reporter Vectors // *Promega Notes.* 2005. T. 89. C. 7–10.
102. Petushkov V.N., Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Marques S.M., Esteves da Silva J.C.G., Shimomura O., Yampolsky I.V. CompX, a luciferin-related tyrosine derivative from

the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. Structure elucidation and total synthesis // *Tetrahedron Lett.* 2014a. T. 55. № 2. C. 460–462.

103. Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Rodionova N.S., Nadezhdin K.D., Marques S.M., Esteves da Silva J.C.G., Shimomura O., Yampolsky I.V. AsLn<sub>2</sub>, a luciferin-related modified tripeptide from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota* // *Tetrahedron Lett.* 2014b. T. 55. № 2. C. 463–465.

104. Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., Yampolsky I.V. A novel type of luciferin from the Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014c. T. 53. № 22. C. 5566–5568.

105. Petushkov V.N., Rodionova N.S. Purification and partial spectral characterization of a novel luciferin from the luminous enchytraeid *Fridericia heliota*. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2007. T. 87. № 2. C. 130–136.

106. Petushkov V.N., Rodionova N.S., Bondar V.S. Study of the luminescence system of the soil enchytraeid *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. T. 391. C. 204–207.

107. Prescher J.A., Contag C.H. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010. T. 14. № 1. C. 80–9.

108. Reddy G.R., Thompson W.C., Miller S.C. Robust light emission from cyclic alkylaminoluciferin substrates for firefly luciferase. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. T. 132. № 39. C. 13586–7.

109. Robert V., Pinton P., Tosello V., Rizzuto R., Pozzan T. Recombinant aequorin as tool for monitoring calcium concentration in subcellular compartments // *Methods Enzymol.* 2000. T. 327. C. 440–456.

110. Roda A., Guardigli M., Michelini E., Mirasoli M. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2009. T. 28. № 3. C. 307–322.

111. Rodionova N.S., Bondar V.S., Petushkov V.N. ATP is a cosubstrate of the luciferase of the earthworm *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae). // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003. T. 392. C. 253–255.

112. Rogers K.L., Stinnakre J., Agulhon C., Jublot D., Shorte S.L., Kremer E.J., Brûlet P. Visualization of local Ca<sup>2+</sup> dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. // *Eur. J. Neurosci.* 2005. T. 21. № 3. C. 597–610.
113. Rota E., Zalesskaja N.T., Rodionova N.S., Petushkov V.N. Redescription of *Fridericia heliota* (Annelida, Clitellata: Enchytraeidae), a luminous worm from the Siberian taiga, with a review of bioluminescence in the Oligochaeta // *J. Zool.* 2003. T. 260. № 3. C. 291–299.
114. Rota E. Lights on the ground: A historical survey of light production in the Oligochaeta. // *Bioluminescence In Focus - A Collection of Illuminating Essays* / под ред. V.B. Meyer-Rochow. Kerala, India: Research Signpost, 2009.
115. Rudie N.G., Mulkerrin M.G., Wampler J.E. Earthworm bioluminescence: Characterization of high specific activity *Diplocardia longa* luciferase and the reaction it catalyzes // *Biochemistry.* 1981. T. 20. № 2. C. 344–350.
116. Rudin M., Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. T. 2. № 2. C. 123–131.
117. Sato N. Studies on pyrazines, 8 . An improved syntheses of 2-amino-3,5-dibromo- and 2-amino-5-bromopyrazines // *J. Heterocycl. Chem.* 1982. T. 19. № 3. C. 673–674.
118. Seliger H.H., McElroy W.D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1964. T. 52. № 1. C. 75–81.
119. Seto S., Ogura K., Nishiyama Y. A Convenient Synthetic Method of 2-Carbamoyl-6-methoxybenzothiazole, One of Intermediates for the Synthesis of Firefly Luciferin // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1963. T. 36. № 3. C. 331–333.
120. Sharp W., Spring F.S. Pyrazine derivatives. Part XIII. Synthesis of 2-aminopyrazine 1-oxides by the condensation of  $\alpha$ -amino-nitriles with oximinomethyl ketones // *J. Chem. Soc.* 1951. T. 2. C. 932.
121. Shimomura O. Chlorophyll-derived bile pigment in bioluminescent euphausiids // *FEBS Lett.* 1980. T. 116. № 2. C. 203–206.

122. Shimomura O. Preparation and handling of aequorin solutions for the measurement of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  // *Cell Calcium*. 1991. T. 12. № 9. C. 635–643.
123. Shimomura O., Musicki B., Kishi Y., Inoue S. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. // *Cell Calcium*. 1993. T. 14. № 5. C. 373–378.
124. Shimomura O. The roles of the two highly unstable components F and P involved in the bioluminescence of euphausiid shrimps. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1995a. T. 10. № 2. C. 91–101.
125. Shimomura O. Cause of spectral variation in the luminescence of semisynthetic aequorins. // *Biochem. J.* 1995b. T. 306 ( Pt 2. C. 537–43.
126. Shimomura O., Goto T., Hirata Y. Crystalline Cypridina Luciferin // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1957. T. 30. № 8. C. 929–933.
127. Shimomura O., Goto T., Johnson F.H. Source of oxygen in the  $\text{CO}_2$  produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977. T. 74. № 7. C. 2799–2802.
128. Shimomura O., Johnson F.H. Extraction, Purification, and Properties of the Bioluminescence System of the Euphausiid Shrimp *Meganyctiphanes norvegica* // *Biochemistry*. 1967. T. 6. № 8. C. 2293–2306.
129. Shimomura O., Johnson F.H. The structure of Latia luciferin // *Biochemistry*. 1968a. T. 7. № 5. C. 1734–1738.
130. Shimomura O., Johnson F.H. Purification and properties of the luciferase and of a protein cofactor in the bioluminescence system of *Latia neritoides*. // *Biochemistry*. 1968b. T. 7. № 7. C. 2574–2580.
131. Shimomura O., Johnson F.H. Properties of the bioluminescent protein aequorin // *Biochemistry*. 1969. T. 8. № 10. C. 3991–3997.
132. Shimomura O., Johnson F.H. Mechanism of the luminescent oxidation of luciferin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. T. 44. № 2. C. 340–346.

133. Shimomura O., Johnson F.H. Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978. T. 75. № 6. C. 2611–2615.
134. Shimomura O., Johnson F.H., Kohama Y. Reactions involved in bioluminescence systems of limpet (*Latia neritoides*) and luminous bacteria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1972. T. 69. № 8. C. 2086–2089.
135. Shimomura O., Johnson F.H., Morise H. Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin // *Biochemistry.* 1974a. T. 13. № 16. C. 3278–3286.
136. Shimomura O., Johnson F.H., Morise H. The aldehyde content of luminous bacteria and of an “aldehydeless” dark mutant. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974b. T. 71. № 12. C. 4666–9.
137. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. T. 59. № 3. C. 223–239.
138. Shimomura O., Musicki B., Kishi Y. Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. // *Biochem. J.* 1988. T. 251. № 2. C. 405–410.
139. Shimomura O., Musicki B., Kishi Y. Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions. // *Biochem. J.* 1989. T. 261. № 3. C. 913–920.
140. Shimoura O. The Photoproteins // *Protein Science Encyclopedia* / под ред. A.R. Fersht. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
141. Shinde R., Perkins J., Contag C.H. Luciferin derivatives for enhanced in vitro and in vivo bioluminescence assays. // *Biochemistry.* 2006. T. 45. № 37. C. 11103–11112.
142. Da Silva L.P., Esteves Da Silva J.C.G.. Theoretical modulation of the color of light emitted by firefly oxyluciferin. // *J. Comput. Chem.* 2011. T. 32. № 12. C. 2654–2663.
143. Sonogashira K. Coupling Reactions Between sp<sup>2</sup> and sp Carbon Centers // *Comprehensive Organic Synthesis* / под ред. B.M. Trost, I. Fleming. Pergamon Press, 1991. C. 521–549.
144. Stojanovic M.N., Kishi Y. Dinoflagellate bioluminescence: Chemical behavior of the chromophore towards oxidants // *Tetrahedron Lett.* 1994a. T. 35. № 50. C. 9347–9350.

145. Stojanovic M.N., Kishi Y. Dinoflagellate bioluminescence: The chromophore of dinoflagellate luciferin // *Tetrahedron Lett.* 1994b. T. 35. № 50. C. 9343–9346.
146. Strehler B.L., Harvey E.N., Chang J.J., Cormier M.J. The luminescent oxidation of reduced riboflavin or reduced riboflavin phosphate in the bacterial luciferin-luciferase reaction // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1954. T. 40. № 1. C. 10–12.
147. Strehler B.L., Cormier M.J. Factors affecting the luminescence of cell-free extracts of the luminous bacterium, *Achromobacter fischeri* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1953. T. 47. № 1. C. 16–33.
148. Strehler B.L., Cormier M.J. Isolation, identification, and function of long chain fatty aldehydes affecting the bacterial luciferin-luciferase reaction. // *J. Biol. Chem.* 1954. T. 211. № 1. C. 213–225.
149. Stuckwisch C.G. Derivatives of 2-Amino-6-methoxybenzothiazole // *J. Am. Chem. Soc.* 1949. T. 71. № 10. C. 3417–3417.
150. Sugiura S., Inoue S., Kishi Y., Goto T. Synthesis of Cypridina Luciferin and Related Compounds. I. : Synthesis of 2-Amino-5-(3-indolyl)-pyrazine // *J. Pharm. Soc. Japan.* 1969a. T. 89. № 12. C. 1646–1651.
151. Sugiura S., Inoue S., Kishi Y., Goto T. Synthesis of Cypridina Luciferin and Related Compounds. II. : Synthesis of Etioluciferamine // *J. Pharm. Soc. Japan.* 1969b. T. 89. № 12. C. 1652–1656.
152. Takakura H., Sasakura K., Ueno T., Urano Y., Terai T., Hanaoka K., Tsuboi T., Nagano T. Development of luciferin analogues bearing an amino group and their application as BRET donors. // *Chem. Asian J.* 2010. T. 5. № 9. C. 2053–2061.
153. Takakura H., Kojima R., Urano Y., Terai T., Hanaoka K., Tsuboi T., Nagano T. Aminoluciferins as functional bioluminogenic substrates of firefly luciferase. // *Chem. Asian J.* 2011. T. 6. № 7. C. 1800–1810.
154. Thomson C.M., Herring P.J., Campbell A.K. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997. T. 12. № 2. C. 87–91.



155. Toya Y., Takagi M., Nakata H., Suzuki N., Isobe M., Goto T. A convenient synthetic method of 2-cyano-6-methoxybenzothiazole - a key intermediate for the synthesis of firefly luciferin. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992. T. 65. № 2. C. 392–395.
156. Tsarkova A.S., Dubinnyi M.A., Baranov M.S., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Zagudaylova M.B., Yampolsky I.V. Total synthesis of AsLn2 – a luciferin analogue from the Siberian bioluminescent earthworm *Fridericia heliota* // *Mendeleev Commun.* 2015. T. 25. № 2. C. 99–100.
157. Tu S.-C., Mager H.I.X. Biochemistry of bacterial bioluminescence // *Photochem. Photobiol.* 1995. T. 62. № 4. C. 615–624.
158. Viviani V.R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. T. 59. № 11. C. 1833–1850.
159. Wampler J.E., Jamieson B.G.M. Earthworm bioluminescence: Comparative physiology and biochemistry // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 1980. T. 66. № 1. C. 43–50.
160. Ward W.W., Cormier M.J. In vitro energy transfer in *Renilla* bioluminescence // *J. Phys. Chem.* 1976. T. 80. № 20. C. 2289–2291.
161. Watanabe H., Mimura N., Takimoto A., Nakamura T. Luminescence and respiratory activities of *Photobacterium phosphoreum*. Competition for cellular reducing power. // *J. Biochem.* 1975. T. 77. № 6. C. 1147–1155.
162. Watanabe T., Nakamura T. Studies on luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. VIII. FMN-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initiated bioluminescence and the thermodynamics of the elementary steps of the luciferase reaction. // *J. Biochem.* 1976. T. 79. № 3. C. 489–495.
163. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. // *Nat. Biotechnol.* 2001. T. 19. № 4. C. 316–317.
164. White E.H., McCapra F., Field G.F., McElroy W.D. The structure and synthesis of firefly luciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 1961. T. 83. № 10. C. 2402–2403.
165. White E.H., Wörther H., Field G.F., McElroy W.D. Analogs of Firefly Luciferin // *J. Org. Chem.* 1965. T. 30. № 7. C. 2344–2348.

166. White E.H., Wörther H., Seliger H.H., McElroy W.D. Amino Analogs of Firefly Luciferin and Biological Activity Thereof 1 // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. T. 88. № 9. C. 2015–2019.
167. White E.H., Rapaport E., Hopkins T.A., Seliger H.H. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 1969. T. 91. № 8. C. 2178–2180.
168. White E.H., Rapaport E., Seliger H.H., Hopkins T.A. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states // *Bioorg. Chem.* 1971. T. 1. № 1-2. C. 92–122.
169. White E.H., Branchini B.R. Modification of firefly luciferase with a luciferin analog. Red light producing enzyme // *J. Am. Chem. Soc.* 1975. T. 97. № 5. C. 1243–1245.
170. White E.H., Karpetsky T.P. Unambiguous synthesis of Cypridina etioluciferamine. Application of titanium tetrachloride to the synthesis of pyrazine N-oxides // *J. Am. Chem. Soc.* 1971. T. 93. № 9. C. 2333–2335.
171. White E.H., McCapra F., Field G.F. The Structure and Synthesis of Firefly Luciferin // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. T. 85. № 3. C. 337–343.
172. White E.H., Miano J.D., Umbreit M. Mechanism of firefly luciferin luminescence // *J. Am. Chem. Soc.* 1975. T. 97. № 1. C. 198–200.
173. White E.H., Wörther H. Analogs of Firefly Luciferin. III 1 // *J. Org. Chem.* 1966. T. 31. № 5. C. 1484–1488.
174. Wood K.V., Lam Y., Seliger H.H., McElroy, W.D. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors // *Science*. 1989. T. 244. № 4905. C. 700–702.
175. Woodrooffe C.C., Shultz J.W., Wood M.G., Osterman J., Cali J.J., Daily W.J., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H. N-Alkylated 6'-aminoluciferins are bioluminescent substrates for Ultra-Glo and QuantiLum luciferase: new potential scaffolds for bioluminescent assays. // *Biochemistry*. 2008. T. 47. № 39. C. 10383–93.

176. Woodroffe C.C., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H., Kovic Y., Rosenberg J.C., Behney C.E., Southworth T.L., Branchini B.R. Novel heterocyclic analogues of firefly luciferin. // *Biochemistry*. 2012. T. 51. № 49. C. 9807–13.
177. Wu C., Nakamura H., Murai A., Shimomura O. Chemi- and bioluminescence of coelenterazine analogues with a conjugated group at the C-8 position // *Tetrahedron Lett.* 2001. T. 42. № 16. C. 2997–3000.
178. Xu Y., Kanauchi A., von Arnim A.G., Piston D.W., Johnson C.H. Bioluminescence resonance energy transfer: Monitoring protein-protein interactions in living cells // *Methods Enzymol.* 2003. T. 360. C. 289–301.
179. Zhao H., Doyle T.C., Wong R.J., Cao Y., Stevenson D.K., Piwnicka-Worms D., Contag C.H. Characterization of coelenterazine analogs for measurements of Renilla luciferase activity in live cells and living animals. // *Mol. Imaging*. 2004. T. 3. № 1. C. 43–54.
180. Zhao H., Doyle T.C., Coquoz O., Kalish F., Rice B.W., Contag C.H. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. // *J. Biomed. Opt.* 2005. T. 10. № 4. C. 41210.
181. Ziegler M.M., Baldwin T.O. Biochemistry of Bacterial Bioluminescence // *Curr. Top. Bioenerg.* 1981. T. 12. C. 65–113.