



СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО РОДАМИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ ДИГИДРОХИНОЛИНА ДЛЯ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2020 г. И. В. Матвиенко*, **, #, В. М. Байрамов*,
Н. А. Парыгина*, **, В. Е. Курочкин***, Я. И. Алексеев**, ***

*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

**ООО "Синтол", Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

***ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН,
Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31/33

Поступила в редакцию 13.08.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

Разработана оптимизированная схема синтеза производных ксантенового флуоресцентного красителя на основе дигидрохинолина. Впервые продемонстрирована возможность их использования в качестве эффективных флуорофоров в составе гибридизационных зондов для ПЦР в реальном времени с детекцией на индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: флуоресцентные родаминовые красители, полимеразная цепная реакция в реальном времени, нуклеиновые кислоты, хинолины

DOI: 10.31857/S0132342320030203

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своим хорошим фотохимическим и фотофизическим спектральным характеристикам, а именно высоким коэффициенту экстинкции и квантовому выходу, родаминовые флуоресцентные красители находят широкое применение для визуализации биологических макромолекул [1]. По сравнению с флуоресцентными красителями флуоресцеинового ряда, родаминовые красители более фотостабильны, их спектр флуоресценции не зависит от pH в диапазоне от 4 до 10 [2]. По этим причинам они находят широкое применение не только в биотехнологии для введения в со-

став белков и нуклеиновых кислот, но также и в медицине для диагностической визуализации живых клеток или живых организмов в доклинических исследованиях [3]. За последние годы большое разнообразие родаминовых красителей было выведено на рынок для конъюгирования с биомолекулами [2]. Тем не менее задача синтеза эффективных красителей, флуоресцирующих в спектральном диапазоне от 610 до 665 нм остается актуальной, так как наиболее распространенные красители, используемые для введения в состав нуклеиновых кислот, белков и других биологических макромолекул, флуоресцируют либо в более коротковолновой области спектра (5-карбоксиродамин 6Ж (5-R6G, $\lambda_{em} = 562$ нм), тетраметилкарбоксиродамин (5-TAMRA, $\lambda_{em} = 583$ нм), карбокси-X-родамин (6-ROX, $\lambda_{em} = 610$ нм), либо в близкой ИК области (3,3,3',3'-тетраметил-индокарбоцианин (Cy5, $\lambda_{em} = 669$ нм).

Ранее Liu Jixiang и др. [4] синтезировали флуоресцентные красители, содержащие в своей структуре фрагмент 2,2-диметил-1,2-дигидрохинолина, аннелированного с тиофеном, бензтиофеном или нафталином.

Целью данной работы было разработать метод синтеза красителей родаминовой природы, со-

Сокращения: BNQ2 – 4'-(4-нитрофенилазо)-2',5'-диметокси-4''-(N,N-диэтаноламино)азобензол, гаситель флуоресценции; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; s – синглет; d – дублет; dd – дублет дублетов; t – триплет; q – квадруплет; qt – квинтет; m – мультиплет; b – уширенный сигнал; J – константа спин-спинового взаимодействия, Гц; Tos – тозилат; p-TsOH – *p*-толуолсульфокислота; DSC – дисукцинимидилкарбонат; DMAP – 4-диметиламинопиридин; ТВТА – трис(бензтриазолилметил)амин; TCEP – трис(2-карбоксиэтил)фосфин; TSTU – N,N,N',N' – тетраметил-O-(N-сукцинимидил)мочевинный тетрафторборат; p-TsOEt – этилтозилат.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 984-69-93 доб. 118; эл. почта: storz@mail.ru).

державших аналогичный по структуре аннелированный дигидрохинолиновый фрагмент с улучшенными спектральными характеристиками, а также изучить его свойства в составе гибридных зондов для ПЦР в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве целевой была выбрана структура (V), синтез которой приведен на схеме 1. Последовательность синтеза соединений I–IV, изображенная на верхней части схемы 1, описана впервые.

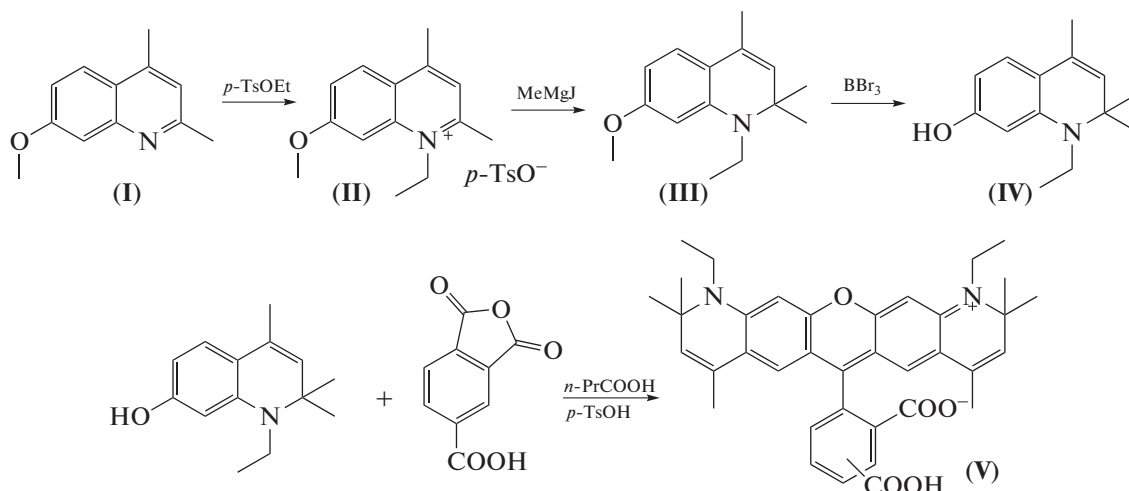


Схема 1. Синтез целевого красителя (5(6)-карбоксит-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дигидрохинолиний-6-ил)бензоата, (5/6-Sy630).

При кипячении замещенных хинолинов с этилтозилатом в хлорбензоле были получены соответствующие четвертичные аммониевые соли, которые при обработке избытком реактива Гриньяра давали производные 1-этил-1,2-дигидрохинолина. Метоксигруппу удаляли обработкой трехбромистым бором при комнатной температуре. В связи с тем, что производные 7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина чувствительны к действию минеральных кислот и кислот Льюиса, ядро красителя синтезировали кипячением их с тримеллитовым ангидридом в масляной кислоте с добавлением каталитических количеств *n*-толуолсульфокислоты.

Полученную смесь изомеров разделяли при помощи хроматографии.

N-Гидроксисукцинимидные эфиры (VI) получали взаимодействием соответствующих карбоксипроизводных с дисукцинимидилкарбонатом в сухом хлористом метиле с добавлением 1.5 эквивалентов основания Хюнига и 0.5 эквивалентов 4-диметиламинопиридина. Также были синтезированы их пропилазидные производные взаимодействием активированных эфиров (VI) с 3-аминопропилазидом, как изображено на схеме 2.

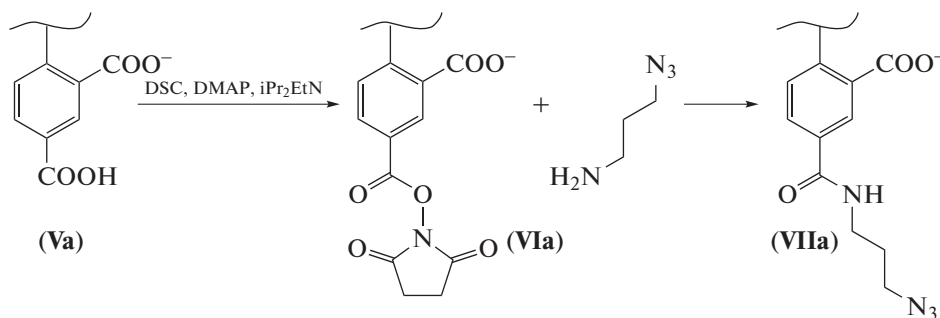


Схема 2. Получение N-гидроксисукцинимидного эфира и пропилазида красителя 5-карбоксит-Sy630.

2-Аминофенилкетоны, такие как 2-аминобензофенон и 2-аминоацетофенон и их замещенные производные являются удобными исходными соединениями для получения хинолинов [5]. 4-Метокси-2-аминоацетофенон был получен по

методу Tsutomu Sugawara и др. [6] путем взаимодействия *m*-анизида с ацетонитрилом в присутствии треххлористого бора и хлорида алюминия и последующим гидролизом полученного 2-аминофенилкетимина, как это показано на

схеме 3. Синтез хинолинов, основанный на конденсации α -замещенного анилина с кетонами, впервые описан Фридендером в 1882 г. [7]. В даль-

нейшем были разработаны многочисленные вариации этого метода с использованием различных катализаторов [8–20].

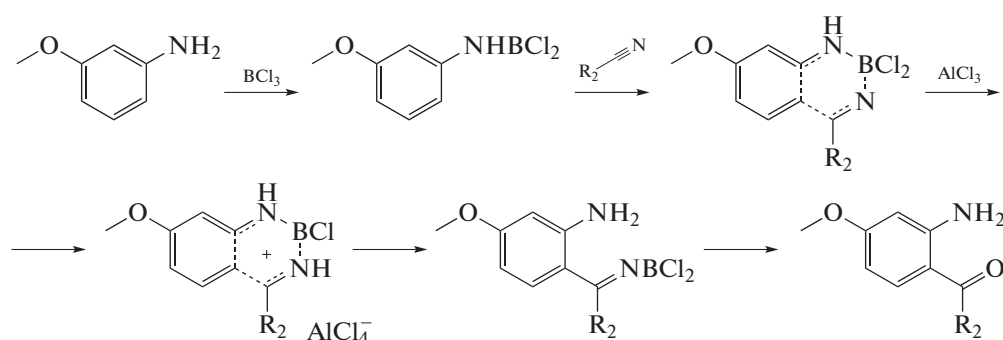


Схема 3. Получение 4-метокси-2-аминоацетофена.

Перспективной казалась идея получить и 2,4-диметил-7-метоксихинолин по этому же способу реакцией 2-амино-4-метоксиацетофена с ацетоном, но по сообщению E. Roberts и E.E. Turner [21] взаимодействие 3,4-дихлор-2-аминоацето-

фена с ацетоном протекает лишь при нагревании в запаянном сосуде при 185°C в течение 6 ч. Тогда была получена 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновая кислота (схема 4).

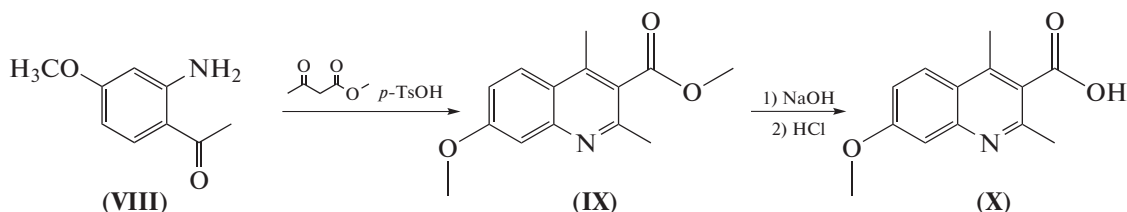


Схема 4. Получение 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты.

Однако эта кислота весьма устойчива к декарбоксилированию, эффективно удалить карбоксильную группу удастся лишь разложением ее серебряной соли. Более рациональным представляется получение 2,4-диметил-7-ме-

токсихинолина путем нагревания с концентрированной серной кислотой продукта конденсации *m*-анизидина с ацетилацетоном (схема 5), в работе [21] так были получены различные хлорпроизводные хинолина.

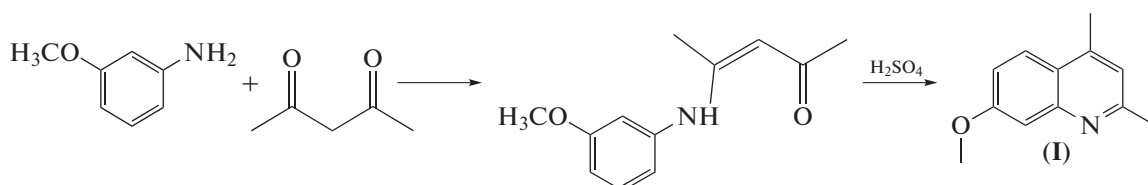


Схема 5. Получение 2,4-диметил-7-метоксихинолина.

Спектральные характеристики 5(6)-изомеров карбокси-Sy630 **Va** и **Vb**, а также их производных **VIa**, **VIb**, **VIIa** и **VIIb** приведены в табл. 1. Значения квантовых выходов и коэффициентов экстинкции были получены аналогично [22].

Синтезированные N-гидроксисукцинимидные производные 5 и 6 изомеров красителя Sy630 (**VIa**, **VIb**) были присоединены на 5'-концы олигонуклеотидов, путем конденсации с 5'-терми-

альной аминогруппой (Aminolink-C6) олиготимидилатов T₂₀. Соответствующие азидные производные (**VIIa**, **VIIb**) были присоединены на 5'-концы олиготимидилатов T₂₀, путем конденсации с 5'-терминальной алкильной группой (Alkyn). Результаты масс-спектрометрического анализа синтезированных олигонуклеотидов приведены в табл. 2 и 3 соответственно.

Таблица 1. Спектральные характеристики изомеров новых флуоресцентных красителей (**Va** и **Vb**) и их производных (**VIa**, **VIb**, **VIIa** и **VIIb**) в системе этанол–вода (1 : 1)

Название	Обозначение	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм	Квантовый выход, %	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹
5-Карбокси-Sy630	5-Sy630 (Va)	589/615	70 ± 8	101900 ± 1100
6-Карбокси-Sy630	6-Sy630 (Vb)	586/612	88 ± 12	90300 ± 4600
5-Азидопропил-Sy630	5-Sy630-N ₃ (VIIa)	592/619	66 ± 8	71300 ± 2000
6-Азидопропил-Sy630	6-Sy630-N ₃ (VIIb)	592/617	97 ± 3	107800 ± 3900

Таблица 2. Результаты MALDI-TOF анализа модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид, 5' → 3'	Обозначение	Молекулярная масса	m/z [M + H] ⁺
5-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Aminolink-C6-T20	6775.9	6780.1
6-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Aminolink-C6-T20	6775.9	6781.3
5-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Alkyn-T20	6930.0	6942.6
6-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Alkyn-T20	6930.0	6927.7
5-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Aminolink-C6-Fc	8382.0	8371.6
6-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Aminolink-C6-Fc	8382.0	8372.1
5-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Alkyn-Fc	8536.1	8521.2
6-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Alkyn-Fc	8536.1	8517.1
6-ROX-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_ROX	8310.8	8308.8
Cy5-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_Cy5	8300.6	8303.8
cac-ata-ttt-aca-gaa-tgg-caa-agg	Fc-up	7393.8	7395.1
ctg-aag-aca-cat-ttt-tac-tcc-caa	Fc-low	7255.7	7256.5

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, максимумы длин волн эмиссии у 5-ого и 6-ого карбокси изомеров красителя Sy630 отличаются на 4–5 нм, что также характерно для 5-ых и 6-ых карбокси изомеров других красителей ксантенового ряда (FAM, R6G, TAMRA, ROX). Однако, эта разница исчезает при введении 5-ого или 6-ого карбокси изомера красителя Sy630 в гибридные зонды, видимо, из-за влияния гете-

рогенной по составу, по сравнению олиготимидилатом, последовательности зондов.

Максимумы спектров поглощения и флуоресценции производных красителя Sy630 в составе олигонуклеотидов имеют промежуточные значения по сравнению с максимумами поглощения и флуоресценции красителей 6-ROX и Cy5 (рис. 1, 2). Для обеспечения возможности детектировать новый флуоресцентный краситель Sy630 в инди-

Таблица 3. Спектральные характеристики модифицированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид, 5' → 3'	Обозначение	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм
5-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Aminolink-C6-T20	602/628
5-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	5-Sy630-Alkyn-T20	602/629
6-Sy630-Aminolink-C6-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Aminolink-C6-T20	602/625
6-Sy630-Alkyn-t-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-t	6-Sy630-Alkyn-T20	601/624
5-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Aminolink-C6-Fc	604/629
6-Sy630-Aminolink-C6-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Aminolink-C6-Fc	603/626
5-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	5-Sy630-Alkyn-Fc	602/626
6-Sy630-Alkyn-a-gcg-gct-cct-act-tct-gca-ggg-g-BHQ2	6-Sy630-Alkyn-Fc	603/626
6-ROX-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_ROX	588/613
Cy5-ag-cgg-ctc-cta-ctt-ctg-cag-ggg-BHQ2	FC_Pr_up_Cy5	648/668

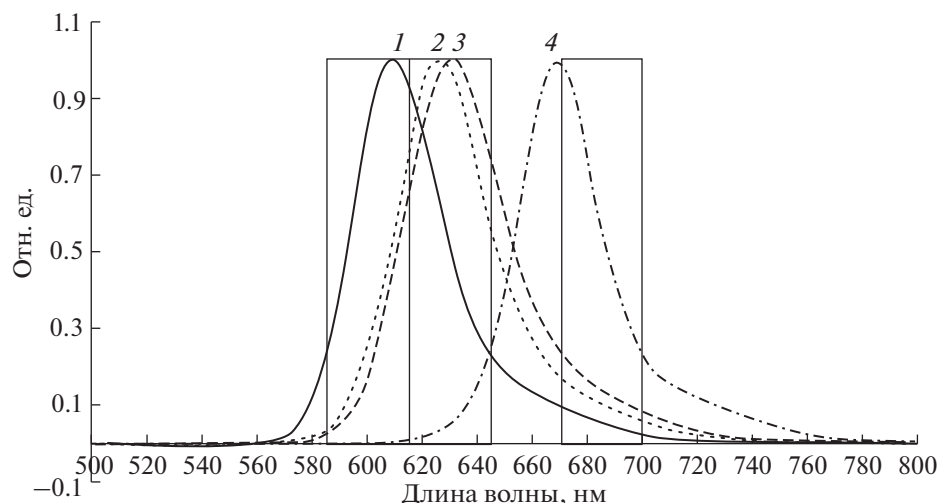


Рис. 1. Нормализованные спектры возбуждения олиготимидилатов, содержащих на 5'-конце красители 6-ROX (1), 6-Sy630 (2), 5-Sy630 (3) и Cy5 (4). Прямоугольниками выделены спектральные диапазоны пропускания интерференционных светофильтров, использованных для постановки ПЦР-РВ.

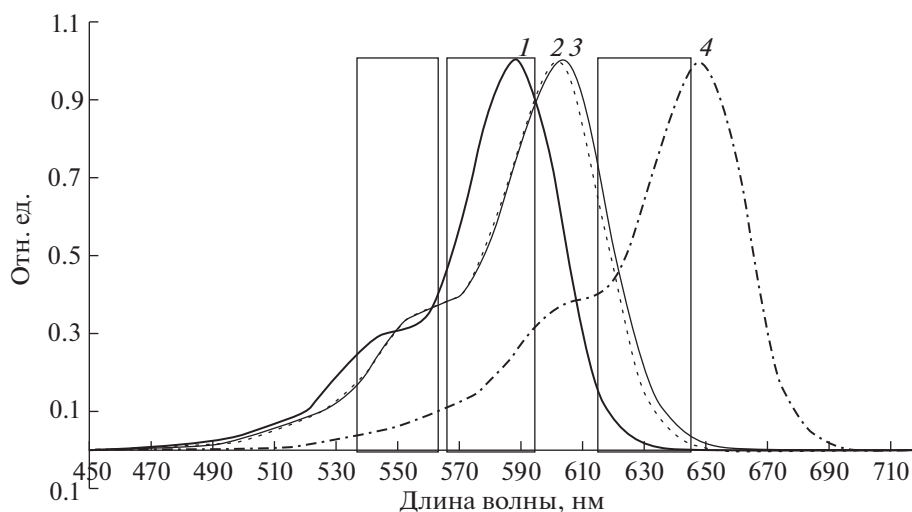


Рис. 2. Нормализованные спектры эмиссии олиготимидилатов, содержащих на 5'-конце красители 6-ROX (1), 6-Sy630 (2), 5-Sy630 (3) и Cy5 (4). Прямоугольниками выделены спектральные диапазоны пропускания интерференционных светофильтров, использованных для постановки ПЦР-РВ.

видуальном спектральном канале, в прибор для ПЦР-РВ АНК-М [23] была установлена пара светофильтров 580 нм (30 нм)/630 нм (30 нм), где 30 нм – значение полной ширины пропускания на половине амплитуды. Для того, чтобы снизить перекрестное свечение сигнала флуоресценции красителя Sy630 в спектральный канал, соответствующий красителю 6-ROX, имеющему в составе гибридационных зондов (см. табл. 3) характеристики длин волн возбуждения – 587–588 нм и длин волн эмиссии – 613–614 нм, для его детекции использовали не стандартную пару светофильтров с характеристиками возбуждения/эмиссии 550 нм (25 нм)/600 нм (30 нм). Для детекции сигнала флуоресценции красителя Cy5 использовали

стандартную пару светофильтров 630 нм (30 нм)/685 нм (25 нм).

На рис. 3 приведены результаты постановок ПЦР-РВ с одновременной детекцией красителей 6-ROX, 5-Sy630-NHS (**VIa**), 6-Sy630-NHS (**VIb**) и Cy5 в составе гибридационных зондов на индивидуальных спектральных каналах.

На рис. 4 приведены результаты постановок ПЦР-РВ с одновременной детекцией красителей 6-ROX, 5-Sy630-N₃ (**VIIa**), 6-Sy630-N₃ (**VIIb**) и Cy5 в составе гибридационных зондов на индивидуальных спектральных каналах.

Как видно из приведенных на рис. 3 и 4 данных, системы праймеров и зондов, меченных производными нового флуоресцентного красителя Sy630, обеспечивают высокую (выше 97%) эф-

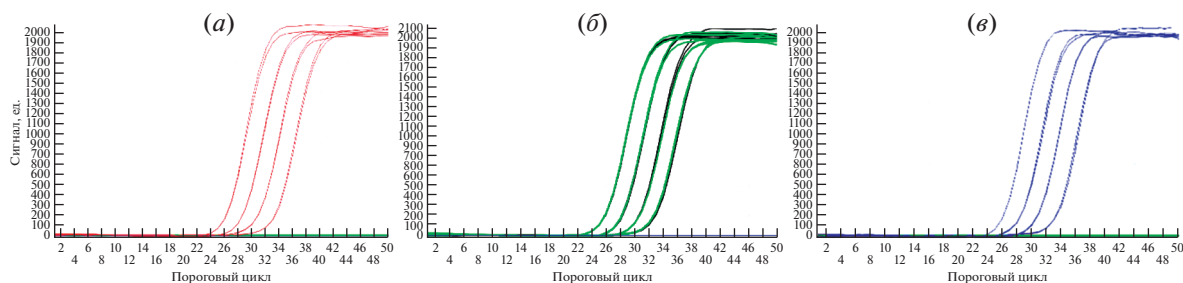


Рис. 3. Результаты ПЦР-РВ (данные нормированы к нулю и по максимуму) серии из четырех 10-кратных разведений ДНК человека с концентрациями 5, 1, 0,2, 0,04 нг/мкл в двух повторах, полученные с использованием гибридационных зондов. (а) FC_Pr_up_ROX, ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (б) 5-Sy630-Aminolink-C6-Fc, ($R^2 = 1.0$, $E = 98\%$) и 6-Sy630-Aminolink-C6-Fc ($R^2 = 0.999$, $E = 100\%$); (е) FC_Pr_up_Cy5 ($R^2 = 0.997$, $E = 98\%$).

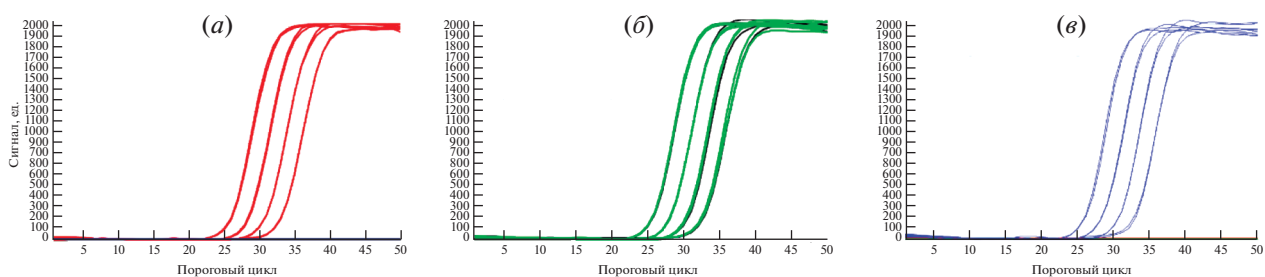


Рис. 4. Результаты ПЦР-РВ (данные нормированы к нулю и по максимуму) серии из четырех 10-кратных разведений ДНК человека с концентрациями 5, 1, 0,2, 0,04 нг/мкл в двух повторах, полученные с использованием гибридационных зондов. (а) FC_Pr_up_ROX, ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (б) 5-Sy630-Alkyn-Fc, ($R^2 = 0.998$, $E = 100\%$) и 6-Sy630-Alkyn-Fc ($R^2 = 1.0$, $E = 97\%$); (е) FC_Pr_up_Cy5 ($R^2 = 0.999$, $E = 101\%$).

эффективность ПЦР в реальном времени в широком диапазоне концентраций ДНК. Рассчитанные значения R^2 , близкие к 1 и значения эффективности ПЦР-РВ, близкие к 100% для зондов, в которые красители вводили либо в виде N-гидроксисукцинимидных эфиров, либо в виде азидопропильных производных, свидетельствуют о том, что оба типа производных нового красителя могут быть использованы для введения в состав гибридационных зондов для ПЦР в реальном времени. При этом стоит отметить, что в силу более высокой стабильности азидопропильных производных они являются более предпочтительными кандидатами для рутинной работы по введению флуоресцентных меток в состав гибридационных зондов для ПЦР-РВ. При этом наиболее предпочтительным является использование производного 6-изомера азидопропила, так как он имеет большие значения квантового выхода и коэффициента экстинкции (табл. 1), производство которых пропорционально светимости флуорофора. Подобранный комбинация интерференционных светофильтров для трех соседних спектральных каналов обеспечивает эффективное определение ДНК-мишени на каждом индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР-РВ, хотя не является оптимальной. Для обеспечения наилучшего возбуждения и сбора сигнала

флуоресценции для детекции флуоресценции красителя Sy630 необходимо использовать интерференционные светофильтры, с максимумами пропускания, сдвинутыми на 20–30 нм в красную область спектрального диапазона.

Таким образом, впервые продемонстрирована возможность постановки ПЦР в реальном времени с гибридационными зондами, содержащими производные нового флуоресцентного красителя на основе дигидрохинолина (5(6)-карбокси-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дигидрохинолиниум-6-ил)бензоата – 5/6-карбокси-Sy630. Продемонстрирована возможность использования таких зондов в мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией на индивидуальном спектральном канале прибора для ПЦР-РВ. Это позволяет увеличить количество одновременно выявляемых в одной пробирке ДНК и/или РНК мишеней на одну, по сравнению со стандартным набором флуоресцентных красителей и соответствующих им комбинаций интерференционных светофильтров широко используемых сегодня в приборах для ПЦР-РВ для постановки мультиплексной ПЦР в реальном времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ацетонитрил (ч.д.а) и бензол (х.ч.) перегнанные над P_2O_5 , хлороформ (х.ч.), метил-*трет*-бутиловый эфир (ч.д.а) и хлористый метилен (х.ч.) над CaH_2 , диизопропилэтиламин 99% (Fisher Scientific) перегоняли над КОН, ацетилацетон (ч.д.а.) (Черкасского завода химреактивов им. XXV съезда КПСС) перегоняли в вакууме с дефлегматором. Остальные реактивы использовали без дополнительной очистки: этил *n*-толуолсульфонат 98%, *m*-анизидин 99%, циклопентанон 99+%, 1 М раствор треххлористого бора в хлористом метиле, трибромид бора 99% (Acros Organics); тетрагидрофуран *dry* (max 0.0075% water) (Panreac); магний в гранулах 12–50 меш 99.8%, метилацетоацетат 99% (Alfa Aesar); 4-диметиламинопиридин 99+% (Fluka); фосфор(V) оксид (ч.), натрий серноокислый б/водн. (х.ч.), *n*-толуолсульфоукислота моногидрат (ч.), этилацетат (х.ч.), гексан (х.ч.), диэтиловый эфир (ч.д.а) (Химмед); соляная кислота (х.ч.), гидроксид натрия (ч.д.а.), масляная кислота (имп.), серная кислота (х.ч.), бихромат калия (х.ч.), метилиодид (имп.) (Вектон); хлорбензол (ч.д.а.) (Экос-1); хлорид аммония (х.ч.) (Реахим); тримеллитовый ангидрид 97%, *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат 95+%, азид натрия 99.5+%, 3-бромопропиламина гидробромид 98%, диметилсульфоксид USP, трис-[(1-бензил-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин 97%, меди(II) сульфат пентагидрат 98%, трис(2-карбоксиил)фосфина гидроксид (Sigma-Aldrich); метанол 99.9% (Lab-Scan); *N,N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(*N*-сукцинимидил)мочевины тетрафторборат (Hangzhou Dayangchem); остальные реактивы отечественно-го производства марки “х.ч.”.

ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах, приведенных ниже.

Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезировали и очищали как описано ранее [22]. Последовательности праймеров и зондов Fc-up, Fc-low, 5-Sy630-Aminolink-C6-Fc, 6-Sy630-Aminolink-C6-Fc, 5-Sy630-Alkyn-Fc, 6-Sy630-Alkyn-Fc, FC_Pr_up_ROX, FC_Pr_up_Cy5 были подобраны к Fc-фрагменту гена иммуноглобулина G человека (FCGR3B, Sequence ID: NM_001271036.1).

В работе использовали магнитную мешалку с подогревом (Heildolph MR 3001 K, Германия), роторный испаритель (Buchi Rotavapor R200, Швейцария), синтезатор ДНК (ASM-2000, Биоссет, Россия), препаративный хроматограф (Reveleris Prep Grace, США), термостат (Циклотемп-303, Россия), шейкер для пробирок (Eppendorf Mixer 5432, Германия), вакуумный испаритель (Univapo 150 ECH, Германия), микроцентрифугу-встраиватель (Циклотемп-901, Россия). Спектры поглощения красителей и их конъюгатов с олигонуклеотидами регистрировали на спектрофотометре

Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, США). Спектры возбуждения и флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре PerkinElmer LS55 (Perkin Elmer, США) со следующими параметрами: скорость сканирования 500 нм/мин, ширина щели при измерении возбуждения – 15 нм, при измерении эмиссии – 10 нм. Спектральный диапазон возбуждения – от 450 до 700 нм; эмиссии – от 500 до 750 нм. Спектры ЯМР записывали на приборе DRX500 (Bruker Daltonics, Германия), снимали в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва). Масс-спектры MALDI-TOF снимались на приборе Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия) в центре коллективного пользования научным оборудованием ФГБНУ ВНИИСБ “Биотехнология”. ПЦР в реальном времени проводили на приборе АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) по следующей циклограмме: 95°C – 5 мин, затем 49 циклов: 60°C – 40 с, 95°C – 15 с. Полученные данные автоматически обрабатывали с помощью программного обеспечения АНК-Shell 1.0.5.100.

2,4-Диметил-7-метоксихинолин (I). Ацетилацетон 45 мл (43.875 г, 0.438 моль, 1.1 экв.) и *m*-анизидин 45 мл (1 экв., 0.398 моль, 49.06 г) кипятили с обратным холодильником в течение 2.5 ч, нагревая на масляной бане при 140°C. Реакционную массу упаривали в вакууме при 70°C. Полученное масло при перемешивании и охлаждении на ледяной бане выливали в 250 мл концентрированной серной кислоты. Затем реакционную массу нагревали на кипящей водяной бане 1.5 ч. Выливали в 1 л воды, охлаждали на водяной бане и приливали раствор 135 г бихромата калия в 1 л воды. Охлаждали на ледяной бане. Выпавший осадок бихромата хинолина отфильтровывали, тщательно промывали на фильтре водой и растворяли в 900 мл 12% раствора гидроксид натрия. Перемешивали до полного растворения осадка, экстрагировали 4 × 200 мл диэтилового эфира. Экстракты сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Получено 38.0 г вещества в виде бесцветного масла, при стоянии в холодильнике (на 4°C) медленно кристаллизующегося в виде крупных призм. Выход 2,4-диметил-7-метоксихинолина 51%. $R_f = 0.85$ (метанол–хлороформ 1 : 3), m/z найдено: 188.165, рассчитано: 187.1. ЯМР 1H в $CDCl_3$ (500 МГц) δ (м.д.): 7.73 (1H, d, $J = 9.1$, C_5H), 7.30 (1H, d, $J = 2.4$, C_8H), 7.06 (1H, dd, $J = 9.1$, 2.4, C_6H), 6.90 (1H, s, C_3H), 3.88 (3H, s, OCH_3), 2.61 (3H, s, C_2-CH_3), 2.53 (3H, s, C_4-CH_3). ЯМР ^{13}C в $CDCl_3$ (126 МГц) δ (м.д.): 159.86 (C_2), 158.41 (C_7), 148.97 (C_{8a}), 143.50 (C_4), 124.16 (C_5), 120.95 (C_{4a}), 120.20 (C_3), 117.56 (C_6), 106.81 (C_8), 54.87 (OCH_3), 24.60 (C_2-CH_3), 17.95 (C_4-CH_3).

1-Этил 2,4-диметил-7-метокси-хинолиния тозилат (IIa). 2,4-Диметил-7-метоксихинолин 38.0 г (0.203 моля) и этилтозилат 38 мл (1.1 экв., 0.223 мо-

ля, 44.7 г) кипятили с обратным холодильником в 115 мл хлорбензола в течение 20 часов. При охлаждении реакционной массы выпадали кристаллы. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре петролейным эфиром, сушили на воздухе. Фильтрат упаривали в вакууме масляного насоса. Полученное масло при стоянии кристаллизовалось. Получено 72.236 г вещества в виде кремовых кристаллов. Выход 1-этил-2,4-диметил-7-метокси-хинолина тозилата 92%. $R_f = 0.27$ (метанол–хлороформ 1 : 3), m/z найдено: 215.969, рассчитано: 216.3. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 8.08 (1H, d, $J = 9.2$, C_3H), 7.64 (2H, d, $J = 8.0$, $\text{Tos}(2' + 6')$), 7.58 (1H, d, $J = 1.9$, C_8H), 7.52 (1H, s, C_3H), 7.40 (1H, dd, $J = 9.2$, 2.1, C_6H), 6.98 (2H, d, $J = 7.9$, $\text{Tos}(3' + 5')$), 5.09 (2H, q, $J = 7.2$, CH_2CH_3), 4.10 (3H, s, OCH_3), 3.04 (3H, s, $\text{C}_2\text{-CH}_3$), 2.81 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 2.25 (3H, s, $\text{Tos}(\text{CH}_3)$), 1.58 (3H, t, $J = 7.3$, CH_2CH_3).

2,2,4-Триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолин (IIIa). К раствору 9.438 г (24.36 ммоль) 1-этил-2,4-диметил-7-метокси-хинолина тозилата в 100 мл абсолютного тетрагидрофурана прибавляли по каплям в темноте, в атмосфере аргона реактив Гриньяра, полученный из 2.43 г (4 экв., 100 ммоль) магния и 6.23 мл (100 ммоль, 14.194 г) йодистого метила в 100 мл метилтретбутилового эфира. Перемешивали в темноте в течение 2 суток. При охлаждении на ледяной бане добавляли 150 мл насыщенного раствора хлорида аммония. Осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством воды и метилтретбутилового эфира. Фильтрат разделяли в делительной воронке. Водную фазу экстрагировали 2×100 мл диэтилового эфира. Объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и упарили в вакууме. Полученный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле. Элюировали смесью гексан–хлороформ 9 : 1. Получено 2.742 г вещества в виде масла. Выход 2,2,4-триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолина 49%. m/z найдено: 231.168, рассчитано: 231.2. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 6.97 (1H, d, $J = 8.3$, C_5H), 6.14 (1H, dd, $J = 8.3$, 2.3, C_6H), 6.08 (1H, d, $J = 2.3$, C_8H), 5.10 (1H, s, C_3H), 3.79 (3H, s, OCH_3), 3.32 (2H, q, $J = 7.0$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 1.97 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.32 (6H, s, $\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 1.22 (3H, t, $J = 7.0$, $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$). ЯМР ^{13}C в CDCl_3 (126 МГц) δ (м.д.): 160.69 (C_7), 145.11 (C_{8a}), 127.48 (C_4), 127.12 (C_3), 124.59 (C_5), 116.73 (C_{4a}), 98.91 (C_6), 97.65 (C_8), 57.02 (C_2), 55.19 (OCH_3), 38.32 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_3$), 28.80 ($\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 18.90 ($\text{C}_4\text{-CH}_3$), 14.39 ($\text{N-CH}_2\text{CH}_3$).

2,2,4-Триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолин (IVa). 2,2,4-Триметил-1-этил-7-метокси-1,2-дигидрохинолин 2.655 г (11.5 ммоль) растворяли в 20 мл сухого хлороформа и в темноте при охлаждении на ледяной бане, в атмосфере аргона добавляли по каплям 2.22 мл (5.762 г, 23 ммоль,

2 экв.) трехбромистого бора в 10 мл сухого хлороформа. Выдерживали 1 ч при -3°C , затем 1 ч 40 мин при комнатной температуре. При охлаждении льдом добавляли 22.5 мл 12% раствора гидроксида натрия. Отделяли на делительной воронке нижний слой. Водную фазу подкисляли, экстрагировали хлороформом. Объединенные экстракты сушили безводным сульфатом натрия и пропускали через слой силикагеля, элюировали хлороформом и упаривали в вакууме. Получено 1.106 г масла, темнеющего на воздухе. Выход 2,2,4-триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина 44%. m/z найдено: 217.230, рассчитано: 217.1. ЯМР ^1H в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 6.87 (1H, d, C_5H), 6.03 (2H, m, $\text{C}_6\text{H} + \text{C}_8\text{H}$), 5.05 (1H, s, C_3H), 3.27 (2H, q, NCH_2), 1.92 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.29 (6H, s, $\text{C}_2\text{-(CH}_3)_2$), 1.18 (3H, t, CH_2CH_3).

5(6)-Карбокси-Sy630 4(5)-карбокси-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (Va) и (Vb). К 3.63 г (16.7 ммоль, 2 экв.) 2,2,4-триметил-1-этил-7-гидрокси-1,2-дигидрохинолина в 130 мл масляной кислоты добавляли 60 мг (0.32 ммоль) гидрата *n*-толуолсульфокислоты и 1.603 г (8.35 ммоль, 1 экв.) тримеллитового ангидрида. Кипятили в темноте, в атмосфере аргона с обратным холодильником 24 ч. Упаривали в вакууме (при 80°C), заливали гексаном, на следующий день гексан отбрасывали. Предварительно очищали хроматографией на нейтральной окиси алюминия. Элюировали изопропанолом с 0–15% воды с 5% триэтиламина. Фракции, содержащие 5-й изомер, упаривали и растворяли остаток в 5 мл сухого хлористого метилена. Приливали по каплям, при перемешивании на магнитной мешалке, к 100 мл абсолютного диэтилового эфира. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме. Получено после сушки в вакууме 0.265 г чистого 5-карбокси изомера, остальные фракции, содержащие продукт, дополнительно очищали хроматографией на силикагеле. Элюировали 0–20% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. 6-карбоксиизомер (Vb) выходил при 10% метанола, 5-карбоксиизомер (Va) – при 15–20%. Получено 0.796 г 6-карбокси-Sy630 в виде фиолетовой пены. Выход 6-карбокси-Sy630 16%. $R_f = 0.24$, (метанол–хлороформ 1 : 4). Масс-спектр: m/z , найдено: 591.315, рассчитано: 590.3, квантовый выход = 0.77 (в системе этанол–вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, максимум длины волны поглощения = 584 нм (в системе этанол–вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 609 нм (в системе этанол–вода 1 : 1). ЯМР ^1H триэтиламмониевой соли в CDCl_3 (500 МГц) δ (м.д.): 8.23 (1H, d, $J = 7.9$), 7.98 (1H, d, $J = 8.1$), 7.80 (1H, s), 6.37 (2H, s), 6.24 (2H, s), 5.09 (2H, s), 3.36 (4H, q, $J = 6.9$, $2^*\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 3.01 (6H, q, $J = 7.3$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$),

1.63 (6H, s, C₄-CH₃ + C₈CH₃), 1.31 (12H, s, 2*C₂-CH₃ + 2*C₁₁-CH₃), 1.24 (15H, m, 2*NCH₂CH₃ + N(CH₂CH₃)₃). Получено 1.199 г 5-карбоксиву630 в виде фиолетового порошка. Выход 5-карбоксиву630 24%. R_f = 0.59 (метанол-хлороформ 1 : 9 + 5% триэтиламина), *m/z* Масс-спектр: *m/z*, найдено: 591.334, рассчитано: 590.3, квантовый выход = 0.50 (в системе этанол-вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = 1.007 × 10⁵ М⁻¹ см⁻¹, максимум длины волны поглощения = 585 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 612 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H триэтиламмониевой соли в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.66 (1H, s), 8.31 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.3), 7.16 (1H, d, *J* = 7.8), 6.31 (2H, s), 6.25 (2H, s), 5.08 (2H, s), 3.35 (4H, q, *J* = 6.9, 2*NCH₂CH₃), 3.05 (6H, q, *J* = 7.2, N(CH₂CH₃)₃), 1.61 (6H, s, C₄-CH₃ + C₈CH₃), 1.24–1.32 (27H, m, 2*C₂-CH₃ + 2*C₁₁-CH₃ + 2*NCH₂CH₃ + N(CH₂CH₃)₃).

5-Sy630-NHS 5-карбоксиву630-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоата N-гидроксисукцинимидный эфир (VIa). 5-Карбоксиву630 95 мг (0.161 ммоль) растворяли в 9.5 мл сухого хлористого метилена, добавляли 42 мкл (31 мг, 0.242 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина, 50 мг (0.193 ммоль, 1.2 экв.) дисукцинимидилкарбоната и 10 мг (0.08 ммоль, 0.5 экв.) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем добавляли еще 25 мг дисукцинимидилкарбоната и перемешивали еще 1 ч. Выливали в 10 мл 0.6 М раствора соляной кислоты и отделяли нижний слой в делительной воронке. Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия, упаривали в вакууме, полученное вещество растворяли в 2 мл сухого хлористого метилена и добавляли по каплям при перемешивании к 30 мл абсолютизированного метилтретбутилового эфира. Отфильтровывали, промывали метилтретбутиловым эфиром, сушили в вакууме. Выход соединения (VIa) составил 43 мг (39%), фиолетовый порошок. R_f = 0.75, (метанол-хлороформ 1 : 3), *m/z* найдено: 688.1, рассчитано: 687.3 максимум длины волны поглощения = 592 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 641 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 9.08 (1H, s), 8.41 (1H, d, *J* = 7.7), 7.40 (1H, d, *J* = 7.7), 6.61 (2H, s), 6.58 (2H, s), 5.44 (2H, s), 3.62 (4H, d, *J* = 6.5), 2.98 (4H, s), 1.76 (6H, s), 1.48 (12H, s), 1.38 (6H, не разрешившийся триплет).

6-Sy630-NHS 4-Карбоксиву630-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоата N-гидроксисукцинимидный эфир (VIb). 6-Карбоксиву630 227 мг (0.38 ммоль) растворяли в 22 мл сухого хлористого метилена, добавляли 100 мкл (75 мг,

0.576 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина, 117 мг (0.456 ммоль, 1.2 экв.) дисукцинимидилкарбоната и 23 мг (0.19 ммоль, 0.5 экв.) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали при комнатной температуре 1 ч, затем добавляли еще 12 мг дисукцинимидилкарбоната и перемешивали еще 1.5 ч. Выливали в 25 мл насыщенного раствора дигидрофосфата калия, встряхивали в делительной воронке. Органическую фазу отделяли, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали в вакууме. Очищали хроматографией на обращенной фазе, элюировали системой вода-ацетонитрил. Продукт собирали при 40% ацетонитрила. Фракции, содержащие продукт, упаривали до половины объема и экстрагировали хлористым метилом, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Выход соединения (VIb) составил 67 мг (26%) фиолетовая пена. R_f = 0.72, (метанол-хлороформ 1 : 3), *m/z* найдено: 688, рассчитано: 687.3, максимум длины волны поглощения = 603 нм (в воде). ЯМР ¹H в CDCl₃ (400 МГц) δ (м.д.): 8.51 (1H, d, *J* = 8.2), 8.44 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6), 7.99 (1H, d, *J* = 1.5), 6.64 (2H, s), 6.60 (2H, s), 5.46 (2H, s), 3.61–3.64 (4H, m), 2.94 (4H, s), 1.77 (6H, s), 1.48 (12H, d), 1.39 (6H, t, *J* = 7.0).

5-Sy630-N₃ 5-((3-Азидопропил)карбамоил)-2-(1,11-диэтил-2,2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2H-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (VIIa). 0.265 г 5-Карбоксиву630 (0.45 ммоль) растворяли в 10 мл безводного хлористого метилена, прибавляли при перемешивании 0.162 г (0.54 ммоль, 1.2 экв.) TSTU, затем 94 мкл (0.54 ммоль, 1.2 экв, 70 мг) диизопропилэтиламина и 27 мг (0.22 ммоль, 0.5 экв.) DMAP. Через 1 ч 20 мин реакционную смесь выливали при перемешивании в 100 мл 1%-ного раствора соляной кислоты. Экстрагировали 2 × 50 мл хлороформа, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл безводного хлористого метилена, добавляли 68 мкл (0.675 ммоль, 1.5 экв.) аминопропилазида и 118 мкл (87 мг, 0.675 ммоль, 1.5 экв.) диизопропилэтиламина. Перемешивали 20 мин и упаривали в вакууме. Очищали хроматографией на силикагеле, элюировали 0–5% метанола в хлороформе, затем 6–8% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. Упаривали в вакууме и сушили в вакууме над P₂O₅. Выход соединения (VIIa) 212 мг (70%), фиолетовый порошок. R_f = 0.54, (метанол-хлороформ 1 : 4), *m/z* найдено: 673.423, рассчитано: 672.3, квантовый выход = 0.74 (в системе этанол-вода 1 : 1), коэффициент экстинкции (при максимуме поглощения) = 1.286 × 10⁵ М⁻¹ см⁻¹, максимум длины волны поглощения = 596 нм (в воде), 590 нм (в системе этанол-вода 1 : 1), максимум длины волны флуоресценции = 620 нм (в системе этанол-вода 1 : 1). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.62 (1H, s, C₄'H), 8.19 (1H, d, *J* = 7.8, C₇'H), 7.58 (1H, t,

$J = 5.6$, CONH), 7.20 (1H, d, $J = 7.8$, C₆'H), 6.72 (2H, s, C₁₂H + C₁₃H), 6.50 (2H, s, C₅H + C₇H), 5.32 (2H, s, C₃H + C₉H), 3.61 (2H, dd, $J = 12.6$, 6.4, CONHCH₂), 3.53 (4H, m, N₁CH₂CH₃ + N₁₁CH₂CH₃), 3.45 (2H, t, $J = 6.7$, CH₂N₃), 1.97 (2H, qt, $J = 6.7$, CONHCH₂CH₂), 1.72 (6H, s, C₄-CH₃ + C₇-CH₃), 1.42 (12H, d, $J = 5.3$, C₂-2*CH₃ + C₁₀-2*CH₃), 1.34 (6H, m, N₁CH₂CH₃ + N₁₁CH₂CH₃).

6-Sy630-N₃ 4-((3-Азидопропил)карбамоил)-2-(1,11-диэтил-2,4,8,10,10-гексаметил-10,11-дигидро-2Н-пирано[3,2-g:5,6-g']дихинолин-1-иум-6-ил)бензоат (VIIb). 6-Sy630-NHS 66 мг (0.096 ммоль) растворяли в 10 мл сухого хлористого метилена, добавляли 19 мг (0.192 ммоль, 2 экв.) 3-аминопропилазида. Перемешивали 4 ч при комнатной температуре, разбавляли 10 мл хлористого метилена, промывали 2 × 10 мл 0.1% раствора трифторуксусной кислоты, 2 × 10 мл раствора гидрокарбоната натрия (насыщенный раствор—вода 1 : 1), 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Очищали хроматографией на силикагеле. Элюировали 5% метанола в хлороформе с 1% триэтиламина. Выход соединения (VIIb) 41 мг (64%), сине-фиолетовый порошок. Rf = 0.27, (метанол—хлороформ 1 : 10 с 5% триэтиламина), m/z найдено: 673.248, рассчитано: 672.3.

ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 8.24 (1H, d, $J = 8.1$), 8.11 (1H, d, $J = 8.0$), 7.75 (2H, s), 6.66 (2H, s), 6.53 (2H, s), 5.35 (2H, s), 3.58 (4H, неразрешившийся q, $J = 6.8$, 2*CH₂N), 3.50 (2H, dt, $J = 15.8$, 7.9, CH₂NHCO), 2.36 (2H, t, $J = 6.9$, CH₂N₃), 1.92 (2H, qt, $J = 6.8$, -CH₂-), 1.66 (6H, s, 2*CH₃), 1.44 (12H, s, 4*CH₃), 1.33 (6H, t, $J = 6.9$, 2*CH₂CH₃). На основании спектра НМВС и HSQC удалось соотнести ЯМР ¹³C и подтвердить структуру каждого изомера. ЯМР ¹³C в CDCl₃ (126 МГц) δ (м.д.): 166.93 (COO-), 165.61 (CONH), 157.46 (2C, F), 157.29 (2), 151.54 (2C, D), 136.27 (6), 136.10 (1), 133.02 (3), 131.29 (2C, X), 131.18 (1), 128.45 (5), 127.79 (4), 125.41 (2C, E), 123.04 (2C, A), 122.29 (2C, H), 113.63 (2C, C), 94.90 (2C, B), 59.42 (2C, 2*C(CH₃)₂), 48.96 (a), 39.56 (2C, 2*NCH₂CH₃), 37.27 (c), 29.22, 29.05 (4C, 4*CH₃), 28.16 (b), 17.86 (2*CH₃), 12.76 (2*CH₂CH₃).

2-Амино-4-метоксиацетофенон (VIII). В приборе, снабженном хлоркальциевой трубкой, к 25 мл 1 М раствора треххлористого бора в хлористом метилена при охлаждении льдом по каплям добавляли раствор *m*-анизидина 2.777 мл (24.72 ммоль, 3.044 г) в 20 мл сухого бензола. Затем добавляли ацетонитрил 2.58 мл (2 экв. = 49.44 ммоль, 3.03 г) и хлорид алюминия 3.626 г (1.1 экв. = 27.19 ммоль). Кипятили 2 ч с обратным холодильником, затем отгоняли с дефлегматором хлористый метилен (пока температура не достигала 80°C). Кипятили еще 5 ч. Добавляли еще 1.29 мл (1 экв.) ацетонит-

рила и продолжали кипятить 8 ч. Затем при охлаждении льдом добавляли 90 мл 2 М раствора соляной кислоты. Кипятили 1 ч 15 мин с обратным холодильником, охлаждали, отделяли органический слой, водный подщелачивали 101 мл 2 М раствора гидроксида натрия до pH 3. Охлаждали до 3°C, выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат экстрагировали 2 × 50 мл хлористого метилена, сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток объединяли с полученным осадком и перекристаллизовывали из водного этанола. Получено 1.078 г вещества в виде блестящих бесцветных призм. Выход 2-амино-4-метоксиацетофенона 27%.

ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 7.64 (1H, d, $J = 9.0$, C₆H), 7.30 (1.5H, b, NH₂), 6.23 (1H, d, $J = 2.3$, C₃H), 6.13 (1H, dd, $J = 9.0$, 2.5, C₅H), 3.73 (3H, s, OCH₃), 2.41 (3H, s, COCH₃).

Метилловый эфир 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты (IX). Смешивали 0.772 г (4.67 ммоль) 2-амино-4-метоксиацетофенона, 0.605 мл (1.2 экв. = 5.6 ммоль, 0.651 г) метилацетата и 0.804 г (1 экв.) *n*-толуолсульфо кислоты. Медленно нагревали до 100°C на масляной бане и выдерживали при этой температуре полчаса. Охлаждали, добавили 14 мл воды и нейтрализовали 1.56 мл 12% раствора гидроксида натрия, перемешивали 5 мин, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 3 раза водой. Очищали флэш-хроматографией на силикагеле. Элюировали в системе 2–50% этилацетата в гексане. Вещество выходило при 25–30% этилацетата. Получено 0.664 г в виде бледно-желтой массы. Выход метилового эфира 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты 64%. Rf = 0.73 (метанол—хлороформ 1 : 9). ЯМР ¹H в CDCl₃ (500 МГц) δ (м.д.): 7.82 (1H, d, $J = 9.2$, C₅H), 7.30 (1H, s, C₈H), 7.13 (1H, dd, $J = 9.1$, 2.5, C₆H), 3.96 (3H, s, C₇-OCH₃), 3.92 (3H, s, COO-CH₃), 2.65 (3H, s, C₂-CH₃), 2.59 (3H, s, C₄-CH₃). ЯМР ¹³C в CDCl₃ (126 МГц) δ (м.д.): 170.04 (COO), 161.36 (C₇), 155.08 (C_{8a}), 149.34 (C₂), 141.90 (C₄), 125.90 (C₃), 125.39 (C_{4a}), 120.81 (C₅), 119.38 (C₆), 107.54 (C₈), 55.69 (C₇-OCH₃), 52.54 (COOCH₃), 24.07 (C₂-CH₃), 15.94 (C₄-CH₃).

2,4-Диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновая кислота (X). К 0.66 г (3 ммоль) метилового эфира 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты добавляли 8 мл 2 М раствора гидроксида натрия (5.5 экв., 16.5 ммоль), кипятили с обратным холодильником в течение 15 ч. Добавили 12 мл воды и 2.66 мл 6 М раствора соляной кислоты. Выдерживали ночь в холодильнике, отфильтровали осадок, промывали на фильтре водой, сушили в вакууме над P₂O₅. Получено 0.436 г вещества в виде бледно-желтых кристаллов. Выход 2,4-диметил-7-метоксихинолин-3-карбоновой кислоты 70%.

ЯМР ^1H в DMSO- d_6 (500 МГц) δ (м.д.): 8.27 (1H, d, $J = 9.4$, C_5H), 7.62 (1H, d, $J = 2.3$, C_8H), 7.47 (1H, dd, $J = 9.3, 2.4$, C_6H), 3.96 (3H, s, OCH_3), 2.83 (3H, s, $\text{C}_2\text{-CH}_3$), 2.79 (3H, s, $\text{C}_4\text{-CH}_3$).

N-гидроксисукцинимидные эфиры 5- и 6-карбок-си изомеров Су630 вводили в состав 5'-аминосодержащих олигонуклеотидов по следующей общей методике. К 200 мкл 5 мкМ раствора олигонуклеотида, содержащего аминокгруппу на 5'-конце в 0.1 М водном растворе гидрокарбоната натрия (рН 8) добавляли 5-ти кратный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира красителя (20 мкл раствора с концентрацией 10 мг/мл в ДМСО). Полученную смесь перемешивали на шейкере со скоростью 1400 об./мин при температуре 25°C в течение 12 часов. Модифицированные олигонуклеотиды очищали методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле с последующей очисткой обращенно-фазовой ВЭЖХ. Азидные производные 5- и 6-карбок-си изомеров Су630 вводили в состав 5'-алкинсодержащих олигонуклеотидов по методике, описанной в [22]. ПЦР в реальном времени проводили по следующей циклограмме: денатурация: 95°C – 5 мин, затем 49 циклов: 60°C – 40 с, 95°C – 15 с. Рабочие концентрации праймеров были 5 мкМ, зондов – 2.5 мкМ. В реакцию брали 5 единиц фермента ДНК-полимеразы *SynTaq* с ингибирующими активностью фермента антителами (ООО “Синтол”, E-039-1000).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по государственному заданию ФГБНУ ВНИИСБ № 0574-2019-0003 по теме “Расширение спектра используемых в молекулярно-генетических методах анализа флуоресцентных красителей”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Johnson I.D.* Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11th ed. Life Technologies. Corp., 2010.
2. *Valeur B., Berberan-Santos M.N.* Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2nd ed. Wiley-VCH. Weinheim. Germany, 2013.
3. (a) *Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Yu.V., Kvach M.V., Aparin I.L., Brylev V.A., Prikazhikova T.A., Maklakova S.Yu., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zaitsepina T.S.* // Bioconjugate Chem. 2017. 28 (10). P. 2599. (b) *Mason W.T.* Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis. 2nd ed. Academic Press. San Diego, 1999. (c) *Taatjes D.J., Mossman B.T.* Cell Imaging Techniques. Humana Press. Totowa. New Jersey, 2006.
4. *Liu Jixiang, Diwu Zhenjun, Leung Wai-Yee, Lu Yixin, Patch B., Haugland R.P.* // Tetrahedron Lett. 2003. 44. P. 4355.
5. (a) *Elderfield R.C.* Heterocyclic Compounds. New York. N.Y. 1961. 45. P. 60. (b) *Walser A., Zenchoff G., Fryer R.I.* // J. Heterocycl. Chem. 1976. 13. P. 131.
6. *Sugasawa Tsutomu, Toyoda Tatsuo, Adachi Makoto, Sasakura Kazuyuki* // J. Am. Chem. Soc. 1978. 100. P. 4842.
7. *Friedlander P.* // Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1882. 15. P. 2572–2575.
8. *Wang Guan-Wu, Jia Cheng-Sheng, Dong Ya-Wei* // Tetrahedron Lett. 2006. 47. P. 1059.
9. *Jia Cheng-Sheng, Ze Zhang, Tu Shu-Jiang, Wang Guan-Wu* // Org. Biomol. Chem. 2006. 4. P. 104.
10. *Selvam N.P., Saravanan C., Muralidharan D., Perumal P.T.* // J. Heterocyclic Chem. 2006. 43. P. 1379.
11. *Narasimhulu M., Reddy T.S., Mahesh K.C., Prabhakar P., Rao Ch.B., Venkateswarlu Y.* // J. Mol. Catal. A: Chem. 2007. 266. P. 114.
12. *De S.K., Gibbs R.A.* // Tetrahedron Lett. 2005. 46. P. 1647.
13. *Wu Jie, Zhang Liang, Diao Tian-Ning* // Synlett. 2005. P. 2653.
14. *Kumar S., Saini A., Sandhu J.S.* // Synth. Commun. 2007. 37. P. 4071.
15. *Bose D.S., Kumar R.K.* // Tetrahedron Lett. 2006. 47. P. 813.
16. *Varala R., Enugala R., Adapa S.R.* // Synthesis. 2006. P. 3825.
17. *Arumugam P., Karthikeyan G., Atchudan R., Muralidharan D., Perumal P.T.* // Chem. Lett. 2005. 34. P. 314.
18. *Zhang L., Wu J.* // Adv. Synth. Catal. 2007. 349. P. 1047.
19. *Zolfigol M.A., Salehi P., Ghaderi A., Shiri M.* // Catal. Commun. 2007. 8. P. 1214.
20. *Wu Jie, Xia Hong-Guang, Gao Ke* // Org. Biomol. Chem. 2006. 4. P. 126.
21. *Roberts E., Turner E.E.* // J. Chem. Soc. 1927. P. 1832.
22. *Натыров А.Н., Власова Н.А., Матвиенко И.В., Волков Е.М., Байрамов В.М., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И.* // Биоорг. хим. 2018. 44. 5. С. 570–580. [*Natyrov A.N., Vlasova N.A., Matvienko I.V., Volkov E.M., Bajramov V.M., Kurochkin V.E., Alekseev Y.I.* // Rus. J. Bioorg. Chem. 2018. 44. 5. P. 562–571.]
23. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петросяков А.О., Румянцев Д.А., Скоблilов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко В.А., Чернышев А.В.* // Научное приборостроение. 2006. 16. 3. С. 132–136.

Synthesis of Derivatives of Fluorescent Rhodamine Dye on the Basis of Dihydroquinolin for Analysis of Nucleic Acids by Real Time Polymerase Chain Reaction

I. V. Matvienko^{*, **, #}, V. M. Bayramov^{*}, N. A. Parygina^{*, **},
V. E. Kurochkin^{***}, and Y. I. Alekseev^{**, ***}

[#]Phone: +7 (495) 984-69-93#118; e-mail: storz@mail.ru

^{*}All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia

^{**}“Syntol” LLC, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia

^{***}Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences,
ul. Ivana Chernyh 31/33, St. Petersburg, 198095 Russia

An optimized synthesis scheme for derivatives of xanthene fluorescent dye based on dihydroquinoline has been developed. The possibility of using them as effective fluorophores as part of hybridization probes for real-time PCR with the detection on an individual spectral channel is demonstrated for the first time.

Keywords: fluorescent rhodamine dyes, real-time polymerase chain reaction, nucleic acids, quinolines