УДК 577.213/.216; 681.785.45:535.241; 667.287; 543.426
№ держреєстрації 0120U104770
Інв. №

Національна академія наук України
Державна наукова установа
Науково-технологічний комплекс "Інститут монокристалів"
61072, м. Харків, пр. Науки, 60;
тел. (057) 3410272; e-mail: tatarets@isc.kh.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Перший заступник генерального директора з наукової роботи
НТК «Інститут монокристалів»
НАН України
чл.-кор. НАН України, д-р хім. наук, проф.
_____ Валентин ЧЕБАНОВ
«13» грудня 2021 р

ЗВІТ
про науково-дослідну роботу
за договорами № 103/01.2020 від 29.10.2020 та № 176/01/0516 від 14.05.2021

Створення флуоресцентних діагностичних матеріалів для гібридизаційних аналізів та досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу "Наука для безпеки людини та суспільства"

(заключний)

Науковий керівник НДР
завідувач відділу, к.х.н., ст. досл. _____ Анатолій ТАТАРЕЦЬ

2021

Рукопис закінчено 09 грудня 2021 р.
Результати роботи розглянуто хімічною секцією Вченої ради ДНУ НТК ІМК НАНУ
10 грудня 2021 р., протокол № 15

Список авторів

Керівник НДР, завідувач відділу, к.х.н, с.д.	10.12.2021	А. Л. Татарець (Підготовка звіту, Розділи 2, 16, висновки)
Виконавці (ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН Україна):		
Завідувач лабораторії, к.х.н., с.д.	10.12.2021	О. І. Кривошей (Розділи 7–9)
Старший науковий співробітник, к.х.н.	10.12.2021	О. С. Колосова (Розділи 4, 7)
Старший науковий співробітник, к.х.н.	09.12.2021	О. С. Чернишова (Розділ 5)
В.о. старшого наукового співробітника, к.х.н.	09.12.2021	О. Г. Кулик (Вступ, Розділи 1, 10, підготовка звіту)
Молодший науковий співробітник, к.х.н.	09.12.2021	Е. В. Санін (Розділи 3, 11)
В.о. наукового співробітника, к.х.н.	10.12.2021	Г. С. Власенко (Розділ 5)
Молодший науковий співробітник	09.12.2021	О. М. Обухова (Розділ 13, 15)
Молодший науковий співробітник	10.12.21	І. В. Говор (Розділи 6, 10, 11)
Молодший науковий співробітник, аспірант	10.12.21	Д. В. Кобзев (Розділи 11, 14)
В.о. молодшого наукового співробітника, аспірант	10.12.21	Р. П. Свояков (Розділи 9, 14)
Провідний інженер	10.12.21	О. Ю. Степаненко (Розділи 7, 9)

Виконавці (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України):

Аспірант	7.12.2021	І. М. Краєвська (Розділ 12)
Молодший науковий співробітник, к.б.н.	07.12.2021	О. Ю. Скоробогатов (працював у період з жовтня по грудень 2021 р.) (Розділ 12)
Аспірант	7.12.2021	Є. Ю. Степаненко (працював у період з листопада 2020 р. по серпень 2021 р.) (Розділ 12)

Реферат

Звіт про НДР: 194 стор., містить 16 розділів, 29 рис., 13 табл., 81 джерело.

БАРВНИКИ-ІНТЕРКАЛЯТОРИ, ГІБРИДИЗАЦІЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ, МОНОМЕТИНОВІ БАРВНИКИ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ЧАС ЖИТТЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ, ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ.

Мета роботи – створення вітчизняних флуоресцентних матеріалів для гібридизаційного аналізу, проведення ПЛР-діагностики генетичних та інфекційних захворювань, зокрема вірусу COVID-19, визначення наявності генетично модифікованих організмів (ГМО) та проведення інших досліджень нуклеїнових кислот.

Основні завдання проєкту:

– Синтез мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів, а також барвників з часом життя флуоресценції чутливим до середовища (FLT-чутливих);

– Дослідження фотофізичних властивостей одержаних барвників та оцінка придатності нових барвників для розробки методик для визначення ДНК;

– Створення ПЛР-тестів на основі барвників-інтеркаляторів та методів гібридизаційних аналізів на основі FLT-чутливих барвників.

Об'єкти дослідження – мономерні та димерні барвники-інтеркалятори на основі похідних акридинового оранжевого та монометинціанінів; FLT-чутливі флуоресцентні барвники різних класів.

Методи дослідження – органічний синтез, спектральні та інші фізичні та фотофізичні методи досліджень – ЯМР-спектроскопія, мас-спектрометрія, електронна абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія.

У ході виконання проєкту отримано такі результати:

– Розроблено методики синтезу нових мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів, з використанням яких одержано десять нових гомодимерних барвників-інтеркаляторів на основі акридинового оранжевого, які, порівняно з комерційно доступними ціаніновими барвниками, є більш фотолітично, термічно та гідролітично стабільними.

– Відпрацьовані та вдосконалені способи одержання структурних аналогів комерційних барвників-інтеркаляторів **SYBR Green I** та **YOYO-1**.

– Проведено синтез та досліджено спектральні та фотофізичні властивості низки реакційноздатних FLT-чутливих барвників різних класів, серед яких найбільш придатними як мітчики виявились похідні скваріїнових барвників.

– Отримано дані про спектральні та фотофізичні властивості усіх одержаних барвників у водних розчинах та органічних розчинниках.

– Розроблено рекомендації щодо застосування нових флуорофорів та методик аналізів для розробки та покращення діагностичних наборів, заснованих на ПЛР та гібридизаційних методах.

Рівень дослідження. Роботи виконані на високому науковому рівні з застосуванням сучасних експериментальних методів досліджень.

Практична значимість. Впровадження результатів роботи на державному рівні дозволить замінити коштовні імпортні діагностичні матеріали більш дешевими та більш якісними вітчизняними, а також налагодити експорт високотехнологічної продукції та технологій.

Abstract

Report SRW: 194 p., there are 16 chapters, 29 figures, 13 tables, 81 sources.

DYES-INTERCALATORS, NUCLEIC ACIDS HYBRIDIZATION, MONOMETHINE DYES, POLYMERASE CHAIN REACTION, FLUORESCENCE LIFETIME, FLUORESCENCE.

Purpose of work – development of domestic fluorescent materials for the hybridization analysis, the PCR diagnostics of genetic and infectious diseases, in particular virus of COVID-19, the detection of genetically modified organisms (GMOs) and other nucleic acid studies.

Main tasks of the project:

– Synthesis of monomeric and dimeric dyes-intercalators, as well as dyes with fluorescence lifetime (FLT) sensitive to the environment (FLT-sensitive);

– Investigation of photophysical properties of the obtained dyes and evaluation of their suitability for the development of methods for DNA determination.

– Development of PCR tests based on intercalating dyes and hybridization assay methods based on FLT-sensitive dyes.

Research objects – monomeric and dimeric dyes-intercalators based on derivatives of acridine orange and monomethine cyanine dyes; FLT-sensitive fluorescent dyes of different classes.

Research methods – organic synthesis, spectral and other physical and photophysical research methods – NMR-spectroscopy, mass-spectrometry, electron absorption and fluorescence spectroscopy.

Results obtained during the project implementation:

– Methods for the synthesis of new monomeric and dimeric intercalating dyes have been developed. Using this method ten new homodimeric intercalating dyes based on acridine orange have been obtained. New dyes are more photolytically, thermally and hydrolytically stable compared to commercially available cyanine dyes.

– Developed and improved methods for obtaining structural analogues of commercial dyes-intercalators **SYBR Green I** and **YOYO-1**.

– Synthesis of reactive FLT-sensitive dyes of various classes of fluorescent compounds as well as investigation of their spectral and photophysical properties were performed. Among obtained dyes the most suitable as labels were derivatives of squaraine dyes.

– Data on the spectral and photophysical properties of all obtained dimeric dyes in aqueous solutions and organic solvents were obtained.

– Recommendations for the use of new fluorophores and methods of analysis for the development and improvement of diagnostic kits based on PCR and hybridization methods were developed.

Level of research. The work was performed at a high scientific level with the use of modern experimental research methods.

Practical significance. Implementation of the results of work at the state level will allow replacing the expensive imported diagnostic materials with the cheaper and improved domestic ones, as well as to establish the export of high-tech products and technologies.

Зміст

Умовні позначення 12

Вступ 13

1 Літературний і патентний пошук флуоресцентних сполук, потенційно придатних як барвники-інтеркалятори, та методів їх одержання 17

1.1 Специфічна детекція результатів ПЛР 19

1.2 Неспецифічна детекція продуктів ПЛР 21

1.2.1 Жолобкове зв’язування 22

1.2.2 Інтеркаляція 23

2 Синтез, очищення і підтвердження структури флуоресцентних барвників різних класів 28

2.1 Синтез похідних 2,5-діарил-1,3-оксазолу 28

2.2 Синтез похідних нафталевої кислоти 29

2.3 Синтез похідних антрацену та бензантрону 29

2.4 Синтез скваранових барвників 30

2.5 Синтез ксантенових барвників 32

3 Спектральна та фотофізична характеризація флуоресцентних барвників у водних розчинах 33

4 Синтез реакційноздатних мономерних барвників-інтеркаляторів 43

4.1 Синтез несиметричних ціанінових барвників 43

4.1.1 Синтез вихідних сполук для синтезу ціанінових барвників 44

4.1.2 Синтез монометинціанінового барвника 46

4.2 Синтез похідних акридинового оранжевого 46

5 Дослідження будови одержаних мономерних барвників-інтеркаляторів 50

5.1 Загальні відомості 50

5.2 Методики проведення ВЕРХ аналізів 50

5.3 Методики синтезу 51

6 Спектральна та фотофізична характеризація мономерних барвників-інтеркаляторів 61

6.1 Умови та методики дослідження спектральних та фотофізичних властивостей 61

6.2 Спектральна характеризація мономерних барвників-інтеркаляторів . 62

7 Синтез та очистка димерних барвників-інтеркаляторів 66

7.1 Синтез лінкерів 67

7.2 Синтез димерних барвників на основі акридинового оранжевого 73

7.2.1 Синтез димерних барвників алкілюванням акридинового оранжевого 73

7.2.2 Синтез димерних барвників конденсацією діамінів з активованим мономерним барвником **АО-1** 76

8 Налагодження синтезу відомих барвників **SYBR Green I** та **YOYO-1** 83

8.1 Несиметричний ціаніновий барвник **SYBR Green I** 83

8.1.1 Синтез вихідних сполук для отримання **SYBR Green I** 84

8.1.2 Синтез **SYBR Green I** 85

8.2 Гомодимерний ціаніновий барвник **YOYO-1** 93

8.2.1 Синтез вихідних сполук для отримання **YOYO-1** 94

8.2.2 Синтез **YOYO-1** 94

9 Відпрацювання методик синтезу та очистки димерних барвників-інтеркаляторів 96

9.1 Димерні барвники-інтеркалятори, сполучені лінкером з центральним гетероциклічним фрагментом 96

9.2 Синтез димерних барвників-інтеркаляторів, сполучених лінкерами різної природи 102

9.3 Синтез гомодимерних ціанінових барвників-інтеркаляторів..... 106

10 Визначення кореляцій спектральних та фотофізичних властивостей з молекулярною будовою одержаних барвників 110

11 Дослідження реакційної здатності та хімічної стабільності барвників-інтеркаляторів 120

11.1 Вивчення термічної та гідролітичної стабільності барвників-інтеркаляторів..... 120

11.2 Дослідження фотохімічної стабільності барвників-інтеркаляторів ... 122

11.3 Вивчення стабільності барвників-інтеркаляторів до дії окислювальних реагентів 123

11.4 Дослідження змін інтенсивності флуоресценції барвників-інтеркаляторів від температури 125

12 Розробка ПЛР тест-систем на основі барвників-інтеркаляторів..... 127

12.1 Умови проведення кПЛР..... 127

12.2 Дослідження методом ПЛР у реальному часі 129

13 Синтез та очистка реакційноздатних FLT-чутливих барвників, підтвердження їх структури 135

13.1 Похідні нафталевої кислоти..... 135

13.2 Похідні бензантрону 142

13.3 Похідні пірену 142

13.4 Оксазинові барвники 143

13.5 Скваратнові барвники 145

14 Спектральна та фотофізична характеризація одержаних FLT-чутливих барвників у водних розчинах та у органічних розчинниках 158

14.1 FLT-мітчики на основі похідних нафталевої кислоти 159

14.2 Бензантроновий FLT-мітчик 162

14.3 FLT-мітчики на основі пірену 162

14.4 FLT-Мітчик на основі оксазину 163

14.5 Скваріновi мітчики 164

14.6 Димерні барвники на основі акридинового оранжевого 170

15. Синтез кон'югатів реакційноздатних мітчиків з олігонуклеотидами 172

16 Розробка методів гібридизаційних аналізів на основі FLT-чутливих зондів та мітчиків 175

Висновки 180

Рекомендації 183

Перелік використаних джерел 184

Перелік наукових праць, виданих за темою дослідження 192

Умовні позначення

A	Оптична густина, безрозмірна величина: $D = \lg (I_0 / I) = \varepsilon c l$
Ar	Арильний замісник (арил)
c	Молярна концентрація, моль/л
CDI	*біс*-карбонілдіімідазол
o-DCB	*o*-Дихлоробензол
DIPEA	*N*,*N*-Діізопропілетиламін
FLT	Час життя флуоресценції (Fluorescence lifetime)
PB	Фосфатний буфер, 67 мМ, pH 7.4
τ_{mean}	Середній час життя флуоресценції, нс
l	Довжина оптичного шляху, см
TSTU	Тетрафтороборат *N*,*N*,*N*′,*N*′-тетраметил-*O*-(*N*-сукцинімідил)-уронію
Φ_F	Квантовий вихід флуоресценції
ε	Молярний коефіцієнт поглинання (коефіцієнт екстинкції), л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$ = М$^{-1}$см$^{-1}$
$\lambda_{абс}$	Довжина хвилі поглинання, нм
$\lambda_{фл}$	Довжина хвилі флуоресценції, нм
$\lambda_{збуд.}$	Довжина хвилі збудження, нм
$I_{фл.}$	Інтенсивність флуоресценції
ВЕРХ	Високоефективна рідинна хроматографія
длДНК	Дволанцюжкова дезоксирибонуклеїнова кислота
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДМФА	*N*,*N*-Диметилформамід
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
ПМР	Протонний магнітний резонанс
РНК	Рибонуклеїнова кислота
ТГФ	Тетрагідрофуран
$T_{пл}$	Температура плавлення
ТШХ	Тонкошарова хроматографія
ЯМР	Ядерний магнітний резонанс

Вступ

Одними з найбільш надійних та перспективних діагностичних технологій є флуоресцентні методи, в основі яких лежить використання флуоресцентних сполук, здатних утворювати комплекси або ковалентно зв'язуватися з біологічними молекулами, зокрема з ДНК, і при цьому поглинати і випромінювати світло, яке застосовується для одержання аналітичного сигналу при проведенні досліджень.

Наприкінці 2019 року людство зіткнулося з пандемією коронавірусної хвороби (COVID-19), спричиненою новим штамом коронавірусу SARS-CoV-2. У боротьбі з коронавірусом вкрай важливим етапом для своєчасного виявлення хворих людей та попередження розповсюдження інфекції є ефективна діагностика. Серед існуючих діагностичних технологій тестування метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є одним із найбільш достовірних та точних, оскільки дає змогу виявити безпосередньо наявність генетичного матеріалу вірусу (РНК) [1].

ПЛР є потужним інструментом молекулярної біології, широко вживаним не тільки для діагностики COVID-19 та інших інфекційних захворювань, але й для виявлення біологічного забруднення в екологічних дослідженнях, проведення генотипування людини, секвенування ДНК, визначення ГМО в харчових продуктах тощо [2,3]. Суть ПЛР полягає у багаторазовому повторюванні термозалежних циклів синтезу (ампліфікації) певної ділянки дволанцюжкової ДНК (длДНК), що веде до експоненціального збільшення кількості цільового фрагменту длДНК у біологічній пробі [4]. Аналіз продуктів ампліфікації здійснюють за допомогою флуоресцентних методів. Існує багато варіантів такої детекції, але найбільш інформативними, швидкими та дешевими є методи, що базуються на використанні барвників-інтеркаляторів, здатних специфічно зв'язуватися з нуклеїновою кислотою. Широке застосування для детекції продуктів ПЛР знайшли комерційно доступні барвники-інтеркалятори **SYBR**

Green I та **EvaGreen**, які при зв'язуванні з длДНК збуджуються світлом з довжиною хвилі 470 нм та мають максимум флуоресценції в області 520 нм. При цьому інтенсивність флуоресценції утвореного комплексу барвник–длДНК у десятки/сотні разів вища у порівнянні з флуоресценцією вільного інтеркалятора [5–7].

Щодо реєстрації флуоресцентного сигналу маркеру, існує багато різноманітних флуоресцентних діагностичних технологій (методів одержання аналітичного сигналу), але всі вони засновані на вимірюванні лише трьох відомих параметрів флуоресценції — інтенсивності, поляризації або часу життя, чи на комбінації цих параметрів. Найбільш розповсюдженою технологією є вимірювання інтенсивності флуоресценції, а поляризація (FP) і, особливо, час життя флуоресценції (FLT) використовуються значно рідше. У той же час інтенсивність люмінесценції, як параметр вимірювань, дуже сильно піддається впливу внутрішніх та зовнішніх перешкоджаючих факторів, а поляризація та, особливо, час життя флуоресценції є найбільш стабільними та забезпечують найкраще співвідношення сигнал/шум [8]. Тому перехід від вимірювань інтенсивності сигналу до поляризації та часу життя флуоресценції значно підвищує чутливість і достовірність діагностичних вимірювань і може бути шляхом для покращення характеристик діагностичного методу. Вже почали з'являтися поодинокі дослідження з використанням FLT і FP у якості аналітичного сигналу в ПЛР [9, 10], але такої інформації ще замало. Проблема полягає також у тому, що на світовому ринку існує лише дуже невелика кількість флуоресцентних барвників, придатних для вимірювань поляризації та часу життя флуоресценції, а існуючі барвники мають недостатню яскравість, малі та/або нечутливі до мікрооточення часи життя флуоресценції та незадовільну стабільність.

Сьогодні на вітчизняному ринку не представлені флуоресцентні барвники-інтеркалятори власного виробництва, а для розробки тест-систем на основі ПЛР використовують імпортні коштовні матеріали. Крім того, існуючі флуоресцентні барвники за своїми характеристиками часто не

відповідають зростаючім потребам ринку діагностичних технологій. Основними недоліками є низька фотостабільність, недостатня хімічна стійкість до окислюючих агентів, недостатня яскравість світіння та малі часи життя флуоресценції, а також низька специфічність флуорофорів, що використовуються для аналізу продуктів ПЛР.

Таким чином, актуальність проєкту визначається, перш за все, необхідністю розробки власної діагностичної бази на основі вітчизняних тестів, таких як ПЛР-тести для проведення масового тестування людей в умовах пандемії COVID-19. Крім того, доцільним є розробка більш надійних та достовірних методів діагностичних досліджень, що можуть бути використані не тільки для виявлення COVID-19, але й для діагностування широкого кола інших інфекційних хвороб.

Головна мета роботи полягала у створенні вітчизняних флуоресцентних матеріалів для гібридизаційного аналізу, проведення ПЛР-діагностики генетичних та інфекційних захворювань, зокрема вірусу COVID-19, визначення наявності генетично модифікованих організмів (ГМО) та проведення інших досліджень нуклеїнових кислот.

Основні завдання проєкту:

- Проведення попереднього відбору флуоресцентних сполук, що є потенційно придатними як барвники-інтеркалятори для обрання найбільш перспективних прототипів з метою подальшої функціоналізації та покращення їхніх властивостей.
- Синтез нових реакційноздатних мономерних барвників для побудови димерних барвників та кон'югації з олігонуклеотидами.
- Синтез та вдосконалення методик одержання закордонних люмінесцентних біомедичних матеріалів, які втратили або втрачають правовий патентний захист в Україні, таких як барвники **SYBR Green I** та **YOYO-1**.

- Дослідження спектральних та фотофізичних властивостей одержаних мономерних та димерних барвників, а також проведення медико-біологічного тестування за їх участі.
- Проведення порівняння та оцінки придатності нових розроблених барвників-інтеркаляторів в умовах ПЛР-аналізу, розробка ПЛР тест-систем на основі нових інтеркаляторів та оцінка їхніх основних характеристик, зокрема чутливості та точності.
- Розробка методів гібридизаційних аналізів з використанням FLT-чутливих зондів та мітчиків.

Об'єкти дослідження – мономерні та димерні барвники-інтеркалятори на основі похідних акридинового оранжевого та монометинціаніну; FLT-чутливі флуоресцентні барвники різних класів.

Методи дослідження – органічний синтез, спектральні та інші фізичні та фотофізичні методи досліджень – ЯМР, мас-спектрометрія, електронна абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія.

У ході виконання проєкту було розроблено методи синтезу нових мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів, а також мітчиків і зондів для гібридизаційних аналізів та проведення ПЛР досліджень. Крім того, були одержані барвники-інтеркалятори, аналоги комерційним барвникам **SYBR Green I** та **EvaGreen**, які за своїми спектральними характеристиками сумісні з усіма сучасними ПЛР ампліфікаторами. Також у рамках проэкту синтезовані мітчики і зонди, придатні для флуоресцентних досліджень, заснованих на вимірюванні часу життя (FLT) та поляризації флуоресценції. Для усіх одержаних барвників з'ясовано закономірності зв’язку їхніх спектральних та фотофізичних властивостей з молекулярною будовою. Розроблено рекомендації щодо застосування нових флуорофорів та методик аналізів для розробки та покращення діагностичних наборів, заснованих на ПЛР та гібридизаційних методах.

Результати роботи викладені у статтях, патентах, конференційних тезах доповідей та звіті про науково-дослідну роботу.

1 Літературний і патентний пошук флуоресцентних сполук, потенційно придатних як барвники-інтеркалятори, та методів їх одержання

На теперішній час ПЛР є найбільш точним та ефективним методом діагностики багатьох інфекційних захворювань, зокрема COVID-19, в основі якого лежить детекція та ідентифікація специфічного фрагменту геному збудника інфекційної хвороби. Суть ПЛР полягає в ампліфікації певної ділянки ДНК, обмеженої різноспрямованими праймерами, при циклічній зміні температури реакційної суміші. Зворотній та прямий праймери представляють собою синтетичні олігонуклеотиди, комплементарні певним послідовностям ДНК, які обмежують ділянку ДНК, що піддається ампліфікації, та ініціюють синтез комплементарного ланцюга за участі термостабільної полімерази [4,11].

Класична ПЛР складається з багаторазового повторення циклів, кожен з яких складається з трьох стадій, для яких характерні різні температурні режими: (1) денатурація (плавлення) длДНК мішені (93–96 °C); (2) приєднання праймерів (гібридизація, відпал) до комплементарних ділянок одноланцюгових молекул ДНК мішені (40–75 °C); (3) синтез комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою термостабільної полімерази шляхом подовження (елонгації) праймерів (60–75 °C) (Рис. 1.1). Для отримання достатньої для детекції кількості ДНК необхідно провести від 20 до 50 циклів ПЛР залежно від вихідної концентрації ДНК мішені та ефективності реакції. У кожному циклі число копій бажаної ділянки длДНК подвоюється, що веде до експоненціального збільшення її кількості у пробі [4].

Існує багато модифікацій класичного варіанту ПЛР, спрямованих на покращення ефективності реакції та зниження ризику утворення неспецифічних продуктів [12]. Серед них варто згадати ПЛР з «гарячим» стартом, особливістю якої є попереднє прогрівання суміші при 95 °C впродовж 10 хвилин для попередження неспецифічних взаємодій

компонентів реакції до досягнення оптимальних умов. Також широкого застосування для ідентифікації відомої послідовності РНК набув метод ПЛР зі зворотньою транскрипцією, суть якого полягає у синтезі длДНК на матриці одноланцюгової РНК шляхом перетворення останньої у комплементарну ДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції. Метод мультиплексної (мультипраймерової) ПЛР дозволяє одночасно ампліфікувати дві та більше бажаних ділянок длДНК у одній пробірці, що дає змогу вилучити максимум інформації з одного аналізу. Більш того, застосування мультиплексної ПЛР для виявлення SARS-CoV-2 у режимі реального часу дозволяє скоротити час реакції та знизити витрату реагентів [13].

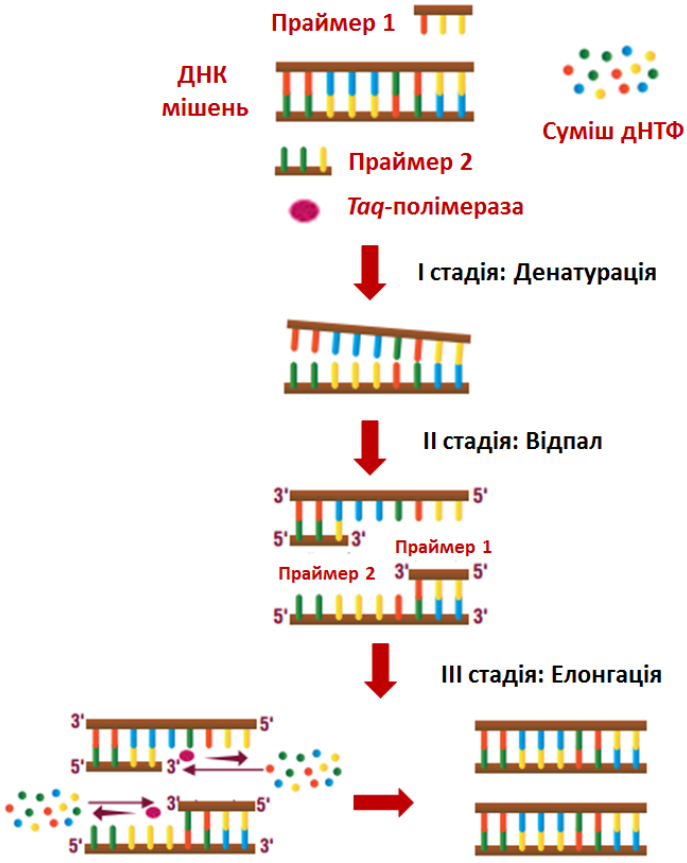


Рисунок 1.1 – Схема класичної ПЛР.

Достовірність дослідження залежить від способу детекції та інтерпретації результатів ПЛР. Як правило, для аналізу продуктів ампліфікації використовують гель-електрофорез, гібридизаційно-ферментний аналіз, флуоресцентну детекцію результатів після аналізу (ПЛР з аналізом

результатів у кінцевій точці) та в процесі аналізу (ПЛР у режимі реального часу) [14,15]. Останні два методи відрізняються тим, що продукт ампліфікації не виймається з пробірки, а реєстрація результатів йде у закритій пробірці, що попереджує контамінацію досліджуваного зразка. Поряд із цією перевагою варто зауважити, що флуоресцентні методи детекції є одними з найбільш надійних та перспективних діагностичних технологій завдяки надзвичайно високій чутливості, простоті, експресності, безпечності, екологічній чистоті та малій вартості [8].

ПЛР з реєстрацією результатів у режимі реального часу базується на детектуванні сигналу флуоресценції, що зростає пропорційно зі збільшенням кількості продуктів ампліфікації. Аналіз ампліконів проводять у термоциклері, оснащеному флуоресцентним детектором з використанням барвників-інтеркаляторів (неспецифічна детекція) або флуорофорів у складі олігонуклеотидних гібридизаційних зондів (специфічна детекція) [5,15].

1.1 Специфічна детекція результатів ПЛР

В основі специфічної детекції продуктів ампліфікації з використанням олігонуклеотидних зондів, мічених флуоресцентним барвником, лежить резонансний перенос енергії від флуорофора-донора (репортер) до молекули акцептора (інший флуорофор з більш довгохвильовим спектром емісії або «темновий» гасник, нефлуоресціюючий барвник). Ефективність переносу енергіїї залежить від взаємного розташування донора та акцептора [16,17].

Мічений олігонуклеотид може бути прикріплений до праймера або знаходитись у реакційній суміші у вільній формі (у цьому випадку блокують 3'-кінець зонду для попередження його елонгаціїї полімеразою). Прикладом першого варіанту є зонд *Scorpion*, в якому мічений олігонуклеотид прикріплюється до 5'-кінця праймера за допомогою етиленглікольного лінкера (блокатор), що не дозволяє ДНК-полімеразі використовувати мічену послідовність в якості матриці [18]. У вільному стані зонд нагадує шпильку з просторово зближеними флуорофором та гасником флуоресценції. У ході

ампліфікації зонд розкривається та гібридизується з внутрішньою частиною амплікона таким чином, що гасник та флуорофор відокремлюються один від одного і спостерігається поява флуоресценції. Схожим чином проходить гібридизація за участю флуоресцентно-мічених праймерів типу *Amplifluor* [19]. Однак, через відсутність лінкера-блокатора, що запобігає утворенню небажаних продуктів ампліфікаціїї, у тому числі димерів праймерів, *Amplifluor* характеризується нижчою специфічністю порівняно з зондами *Scorpion* [16].

Прикладом гідролітичного зонду є *TaqMan*, що являє собою лінійний олігонуклеотид, мічений з 5'-кінця флуорофором, а з 3'-кінця – гасником флуоресценції. За відсутності ДНК мішені флуорофор та гасник просторово зближені, в результаті чого флуоресценція пригнічена [20]. При накопиченні комплементарного продукту ПЛР відбувається гібридизація амплікону та зонду, що супроводжується гідролітичним руйнуванням останнього за рахунок 5'-екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази. Спостерігається поява та зростання інтенсивності флуоресценціїї по мірі накопичення ампліконів у реакційній суміші.

Аналогічний принцип дії лежить в основі гібридизаційного зонду *Molecular beacons*, що має вигляд шпильки, кінцеві послідовності якої спарені і несуть флуорофор і гасник флуоресценції [21]. При появі в реакційній суміші ампліконів, які містять ділянку ДНК, комплементарну петельній частині зонда, відбувається розкриття шпильки та гібридизація, що приводять до просторового віддалення флуорофора і гасника і, відповідно, до збільшення інтенсивності флуоресценції.

Перевагами використання флуоресцентно-мічених зондів є висока чутливість та специфічність зондів до ДНК мішеней, а також відсутність кросс-реакцій з іншими мішенями. Однак необхідність конструювання кожен раз нових зондів і оптимізації умов ПЛР суттєво підвищують собівартість та трудомісткість аналізу з використанням таких зондів.

1.2 Неспецифічна детекція продуктів ПЛР

Використання флуоресцентних барвників, здатних утворювати комплекси з длДНК, лежить в основі неспецифічної детекції продуктів ПЛР [15]. Існує три основних способи зв'язування молекули барвника з длДНК (Рис. 1.2) [22]. Перший спосіб полягає у взаємодії барвника з малим чи великим жолобком длДНК (жолобкове зв'язування), другий базується на можливості барвника вбудовуватися між сусідніми парами комплементарних основ (інтеркаляція). В обох випадках утворення комплексу проходить за рахунок гідрофобних, ван-дер-ваальсових та електростатичних взаємодій. При жолобковому зв'язуванні особливу роль у стабілізації комплексу відіграють водневі зв'язки з гетероциклічними основами та гідроксильними групами залишків вуглеводів. Зовнішнє електростатичне зв'язування позитивно зарядженого барвника з подвійною спіраллю ДНК, що містить негативно заряджені фосфатні групи, лежить в основі третього способу утворення комплексу барвник-длДНК [22,23].

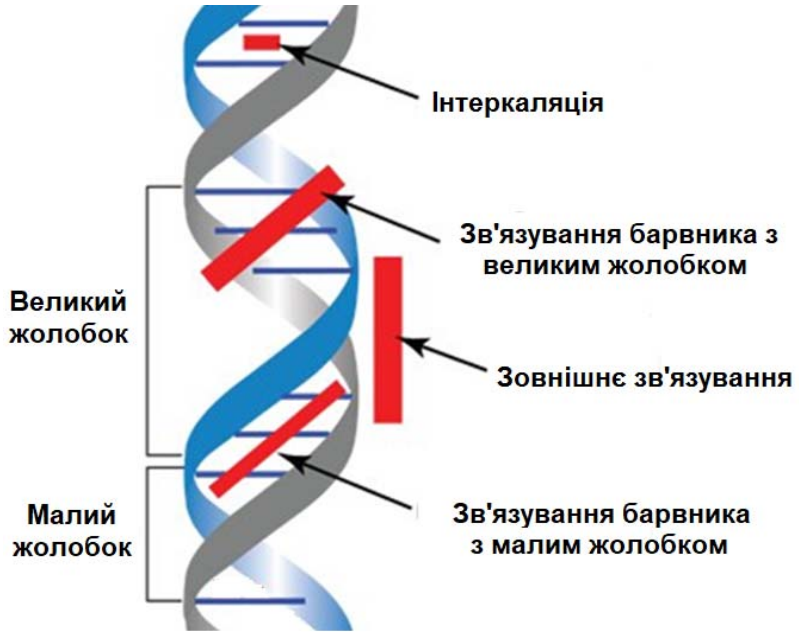


Рисунок 1.2 – Способи зв'язування барвника з длДНК.

Придатність барвника для детекції продуктів ПЛР визначається, у першу чергу, його здатністю селективно зв'язуватися з фрагментами длДНК

з утворенням флуоресцентного комплексу. При цьому флуоресценція барвника у вільному стані повинна бути мінімальною або взагалі відсутньою. Барвник повинен бути термічно, гідролітично та фотолітично стійким в умовах проведення ПЛР, а також мінімально інгібувати хід реакції. Не менш важливим критерієм є високий квантовий вихід комплексу длДНК з барвником, від якого залежить рівень чутливості детекції. Окрім цього, барвник повинен мати довжини хвиль поглинання та випромінювання, сумісні з існуючими приладами, які зазвичай оснащені оптичними каналами для збудження при 488 нм та детектування при 520 нм.

1.2.1 Жолобкове зв'язування

Флуоресцентні барвники, придатні для жолобкового зв'язування, складаються щонайменше з двох ароматичних або гетероароматичних кілець та мають форму півмісяця, що сприяє селективному зв'язуванню барвника з малим жолобком длДНК [24]. Найпоширенішими представниками є барвники сімейства **Hoechst**, а також **DAPI**, **BEBO**, **BETO**, **BOXTO** тощо (Рис. 1.3) [25,26].

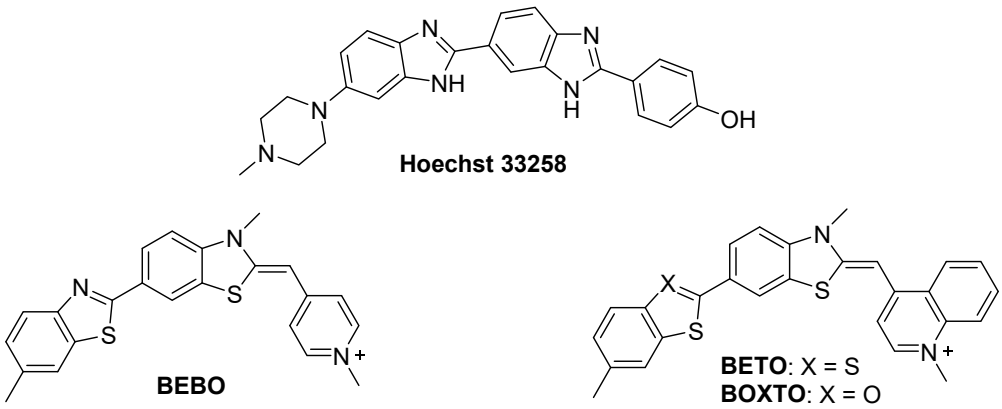


Рисунок 1.3 – Приклади барвників, що локалізуються у малому жолобі длДНК.

Автори роботи [27] звітують про успішне застосування **BEBO** для детекції продуктів ПЛР у режимі реального часу. При цьому інтенсивність флуоресценції комплексу **BEBO** з длДНК збільшується у 200 разів у порівнянні з флуоресценцією вільного барвника. Крім того, автори

відзначають відсутність інгібування ПЛР при концентрації **BEBO** у межах 0.1–0.4 μM.

Ті самі автори описують синтез нових несиметричних ціанінових барвників **BETO** та **BOXTO** зі схожою тенденцією утворювати комплекс з малим жолобком длДНК, але покращеними спектральними властивостями [28]. Так, **BOXTO** при зв'язуванні з длДНК демонструє збільшення інтенсивності флуоресценції у 300 разів та зростання квантового виходу у 50 разів у порівнянні з вільним барвником.

Барвники сімейства **Hoechst** набули широкого застосування для візуалізації живих клітин, у тому числі для детального вивчення процесів усередині клітинного ядра [25]. Однак проведення ПЛР у присутності **Hoechst 33258** привело до повного інгібування реакції згідно даних, отриманих за допомогою капілярного електрофорезу [29].

Основною перевагою барвників, здатних до нековалентного зв'язування з малим жолобком длДНК, є їхня висока спорідненість саме до фрагментів длДНК. З іншого боку, невисокі квантові виходи комплексів барвник-длДНК, наявність фонової флуоресценції, а також схильність до фотознебарвлення пояснюють низький інтерес у цих барвниках для аналізу продуктів апліфікації у режимі реального часу.

1.2.2 Інтеркаляція

Барвники-інтеркалятори – планарні гетероциклічні сполуки, здатні вбудовуватись між комплементарними парами основ длДНК з утворенням флуоресцентних комплексів барвник-длДНК [30].

На відміну від жолобкового зв'язування, інтеркаляція має значний вплив на структуру длДНК, оскільки длДНК необхідно розкрутитися, щоб дати змогу інтеркалятору увійти між двома парами основ. Розкручування длДНК, у свою чергу, веде до подовження її спіралі на приблизно 3.4 Å, що супроводжується конформаційними змінами деяких залишків дезоксирибози [31,32]. Ці структурні зміни впливають на електростатичний потенціал поверхні длДНК за рахунок збільшення відстані між фосфатними залишками

та, відповідно, зменшення щільності заряду вздовж спіралі длДНК [33]. Таким чином, інтеркаляція позитивно заряджених молекул проходить краще, аніж нейтральних. Ще одним наслідком структурних змін длДНК у результаті інтеркаляції є «принцип виключення сусіда»: наявність інтеркалятора між двома парами основ виключає вбудовування іншого інтеркалятора між сусідніми парами основ [34].

Використання барвників-інтеркаляторів лежить в основі найбільш простого та дешевого способу детекції продуктів ампліфікації, заснованого на реєстрації зростання інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні барвника з длДНК [15]. За придатністю до ПЛР розрізняють три покоління барвників-інтеркаляторів, що відрізняються між собою спорідненістю до длДНК, спектральними властивостями та здатністю інгібувати процес ПЛР. До представників першого покоління належать похідні фенантридину, зокрема етидій бромід (**EtBr**) (Рис. 1.4). Так, **EtBr** був першим барвником, застосованим для одночасної ампліфікації та детекції результатів ПЛР, що суттєво знизило рівень контамінації аналізу та відкрило нові перспективи ПЛР [35]. Однак **EtBr** забезпечує лише 25-кратне збільшення квантового виходу флуоресценції при зв'язуванні з длДНК, а також має низький коефіцієнт екстинкції. Завдяки високій проникності через біологічні мембрани та здатності впливати на процеси реплікації і транскрипції ДНК, **EtBr** володіє сильною мутагенною дією і потребує особливої обережності при роботі з ним.

На відміну від **EtBr**, барвники-інтеркалятори другого покоління є більш безпечними та демонструють покращені спектральні властивості. До них належать несиметричні ціанінові барвники сімейств **SYBR** (**SYBR Gold** [36], **SYBR Green I** (**SG**) [37] та ін.) та **SYTO** (**SYTO 9** [38] та ін.), а також **YO-PRO-1** [39], **PicoGreen** [40] тощо (Рис. 1.4).

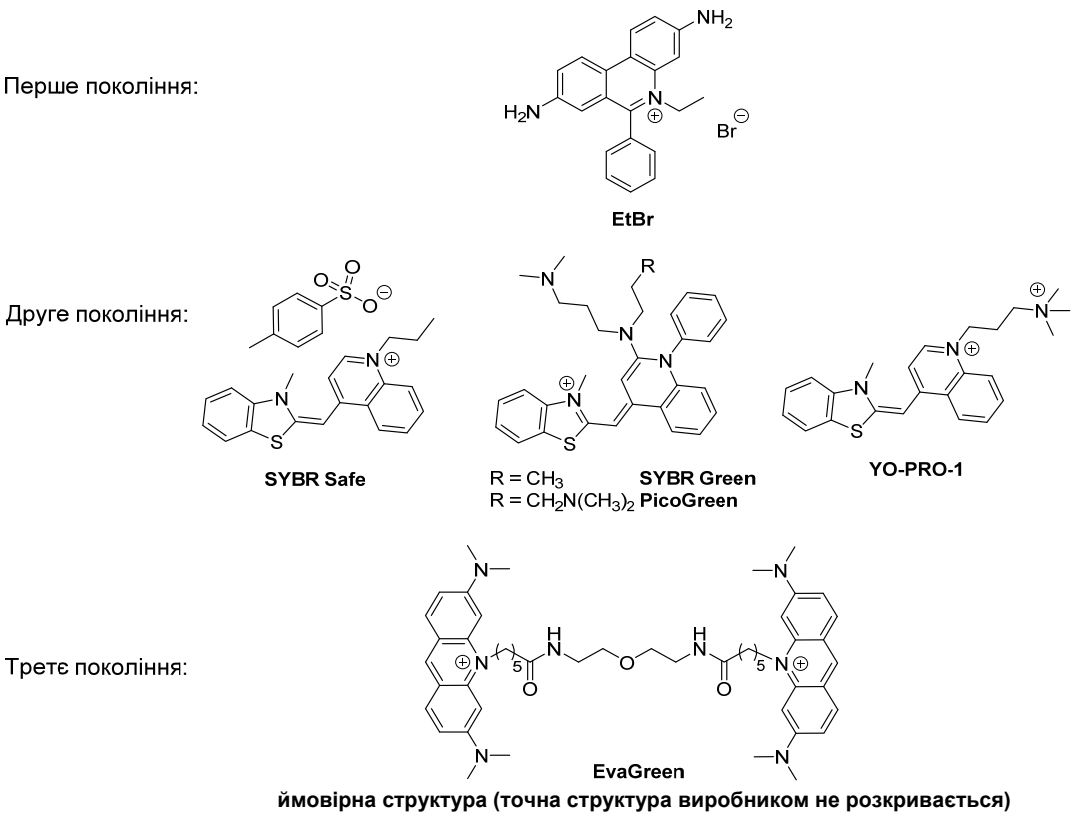


Рисунок 1.4 – Типові представники трьох поколінь барвників-інтеркаляторів, придатних для неспецифічної детекції продуктів ампліфікації.

Широкого застосування для реєстрації ампліконів у режимі реального часу набув **SG**, який у 20-25 разів чутливіший і виявляє набагато більшу специфічність щодо длДНК, ніж **EtBr**. При цьому після зв'язування з длДНК інтенсивність флуоресценції утвореного комплексу посилюється у 800–1000 разів у порівнянні з вільним барвником. До того ж **SG** демонструє високу термостабільність в умовах ПЛР при багаторазовому нагріванні до температури денатурації [8, 42]. Але поряд із перевагами існує і ряд недоліків, пов'язаних, насамперед, зі здатністю **SG** інгібувати ПЛР залежно від концентрації [42]. Так, його надлишок пригнічує активність *Taq*-полімерази, що призводить до отримання хибнонегативних результатів. Крім того, необхідність використання низьких концентрацій **SG** ускладнює інтерпретацію результатів ПЛР за допомогою аналізу температури плавлення ампліконів [43]. Також слід зазначити, що **SG** є хімічно нестійким і

розкладається при зберіганні протягом декількох днів при 4° С у лужному Tris-буфері, який використовується для проведення ПЛР.

У пошуках альтернативних барвників для більш ефективної детекції ампліконів у режимі реального часу було протестовано ряд інтеркаляторів сімейств **SYTO** та **TOTO**, а також **YO-PRO-1**, **PO-PRO-3**, **TO-PRO-1** тощо [38, 44, 45]. Було встановлено, що барвники **SYTO 9**, **SYTO 13**, **SYTO 16**, **SYTO 80** та **SYTO 82** не інгібують ПЛР та не впливають на температуру плавлення длДНК, навіть при високих концентраціях. Це дуже важливо, оскільки введення високих концентрацій барвників, які при цьому не інгібують ПЛР, дозволяє провести аналіз кривої плавлення з високою роздільною здатністю. Серед протестованих барвників **PO-PRO-3** взагалі не дав флуоресцентного сигналу у присутності длДНК, а димерні барвники **TOTO-3**, **BOBO-3** та **POPO-3** проявили найвищу пригнічуючу дію на хід ПЛР. Останній факт пояснюється високою спорідненістю цих барвників до длДНК, що впливає на температуру денатурації ампліконів та, відповідно, ускладнює аналіз результатів [45].

Сьогодні популярним аналогом **SG** є димерний барвник третього покоління **EvaGreen** (**EG**). Хоча структура цього барвника офіційно не розкривається виробником, у публікаціях деякі автори приписують **EG** структуру представлену на Рис. 1.4 [7, 46, 47]. Вагомою перевагою використання димерних барвників є їхня здатність до *біс*-інтеркаляції та, як наслідок, висока спорідненість до длДНК та покращені спектральні властивості, зокрема високий квантовий вихід комплексу барвник-длДНК тощо [26]. Але, як було показано на прикладі **YOYO-1** [48] та барвників типу **TOTO** [45], міцне зв’язування полікатіонного інтеркалятора з длДНК не сприяє кращій детекції продуктів ПЛР, а навпаки, інгібує реакцію. **EG** являє собою димерне похідне акридинового оранжевого, в якому гетероциклічні молекули об’єднані між собою нейтральним гідрофільним лінкером. З одного боку, така будова сприяє *біс*-інтеркаляції, а з іншого – забезпечує середню спорідненість барвника до длДНК, що надає перевагу **EG** над гомодимерами

ціанінових барвників з точки зору придатності до ПЛР. Крім того, **EG** не проявляє інгібуючої дії на ПЛР при достатньо високій концентрації (1.34 μM), тоді як верхня допустима концентрація **SG** складає лише 0.34 μM [7]. У свою чергу, використання порівняно високої концентрації барвника у ПЛР усуває проблему перерозподілу барвника в ході аналізу кривих температур плавлення з високою роздільною здатністю. Варто також відмітити, що **EG** є гідролітично та термічно стабільним барвником з високою стійкістю до фотознебарвлення та дії окислюючих реагентів. До того ж, **EG** є спектрально сумісним із існуючими приладами для детекції продуктів ампліфікації.

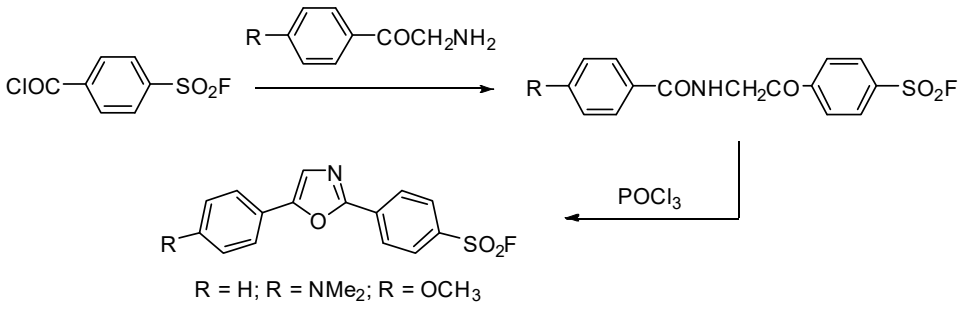
Незважаючи на зручність, швидкість та дешевизну неспецифічної детекції продуктів ПЛР, основним недоліком цього способу є здатність барвників-інтеркаляторів зв’язуватися з будь-якими фрагментами длДНК: як цільовими, так і артефактами (димери праймерів тощо). Ось чому, для отримання достовірних результатів після закінчення ПЛР необхідно проводити аналіз температури плавлення. Для цього реакційну суміш поступово нагрівають до 95 °C та одночасно реєструють зміни флуоресценції. Суть аналізу базується на відмінностях температури плавлення фрагментів різної довжини та складу, при цьому, чим вища роздільна здатність аналізу, тим точніший висновок стосовно складу реакційної суміші можна зробити.

2 Синтез, очищення і підтвердження структури флуоресцентних барвників різних класів

Для обрання найбільш перспективних прототипів барвників-інтеркаляторів для подальшої функціоналізації та покращення їх властивостей ми, перш за все, дослідили власну бібліотеку флуоресцентних сполук. Для цього ми відібрали найбільш репрезентативні барвники серед наявних у нас зразків різних класів флуоресцентних сполук, а також заново синтезували деякі із них. У даному розділі наведені деякі методики синтезу та очищення флуоресцентних барвників різних класів. Слід зазначити, що ці барвники та методи їх отримання є відомими та описані у різних наукових працях за участю наших співробітників. Саме тому ми не наводимо детального опису синтезу усіх барвників, спектральні та фотофізичні властивості яких далі вивчали (див. *Розділ 3*).

2.1 Синтез похідних 2,5-діарил-1,3-оксазолу

Загальним методом синтезу похідних 2,5-діарил-1,3-оксазолів є взаємодія хлорангідридів ароматичних карбонових кислот з α-аміноацетофенонами або з ароїлгідразинами, з наступною циклізацією отриманого продукту конденсації у хлороксиді фосфору або у сірчаній кислоті. За такою схемою було отримано 2-(4-фторсульфонілфеніл)-5-арилоксазоли:



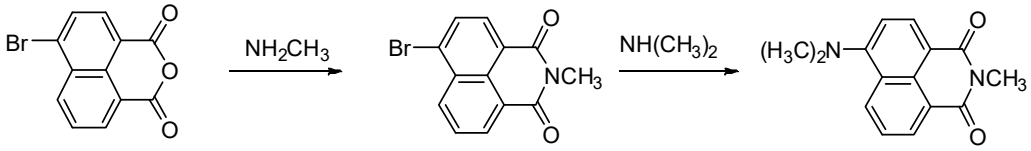
R = H; R = NMe_2; R = OCH_3

Методика синтезу: до розчину 0.15 моль хлорангідриду 4-фторсульфонілбензойної кислоти у 50 мл бензолу додавали розчин 0.1 моль α-амінометиларилкетону гідрохлориду у 150 мл води. Потім, при 5 °C додавали розчин бікарбонату натрію. Суміш перемішували впродовж 2

годин, осад відфільтровували, висушували та кип’ятили 1 годину у 1 молі $POCl_3$. Реакційну масу переносили на лід, осад відфільтровували, промивали водою, сушили, очищували перекристалізацією та колонковою хроматографією.

2.2 Синтез похідних нафталевої кислоти

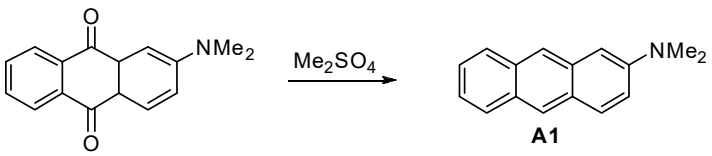
Синтез метиліміду 4-диметиламінонафталевої кислоти — широкосмугового люмінофору зеленого кольору світіння:



Методика синтезу: 11 г (0.04 моль) 4-бромнафталевого ангідриду розчиняли у 120 мл оцтової кислоти та додавали 20 мл метиламіну. Реакційну суміш кип’ятили впродовж 5 годин. Після охолодження осад відфільтровували, промивали водою та висушували. Після перекристалізації з оцтової кислоти отримали 8.2 г люмінофору. До розчину 8.2 г (0.03 моль) метиліміду у 100 мл ДМФА додавали 10 мл диметиламіну. Реакційну суміш кип’ятили впродовж 5 годин, після охолодження осад відфільтровували. Після перекристалізації з суміші толуол-гексан отримали 5.6 г барвника.

2.3 Синтез похідних антрацену та бензантрону

2-Диметиламіноантрацен **A1** було синтезовано нагріванням 2-диметил-аміноантрахінону з цинковим пилом в диметилсульфаті:

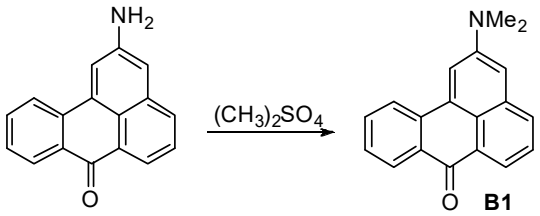


A1

Методика синтезу: до розчину 2.5 г (0.01 моль) 2-диметиламіноантрахіну та 4.5 г цинкового пилу в 45 мл 10% спиртового розчину гідроксиду натрію при 5 °C додавали 6.5 мл диметилсульфату. Реакційну суміш перемішували впродовж 2 годин при кімнатній температурі та 30 хвилин при 50 °C. Після охолодження осад відфільтровували,

висушували та очищали на хроматографічній колонці з оксидом алюмінію, елюент — хлороформ. Т.пл. 251–253 °С. Вихід 0.88 г люмінофору.

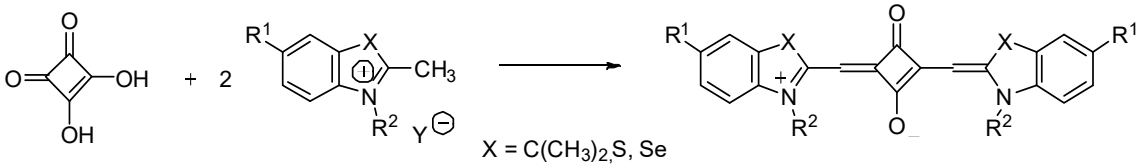
Похідне 2-диметиламінобензантрону **B1** було синтезовано алкілуванням 2-амінобензантрону у диметилсульфаті при 130 °С:



Методика синтезу: 0.01 моля 2-амінобензантрону розчиняли у 10 мл диметилсульфату та нагрівали впродовж 2 годин при 130 °С. Після охолодження реакційну суміш переносили в воду та додавали водний розчин NaOH. Продукт очищали на хроматографічній колонці (Al_2O_3, бензол) та отримували 2-диметиламінобензантрон.

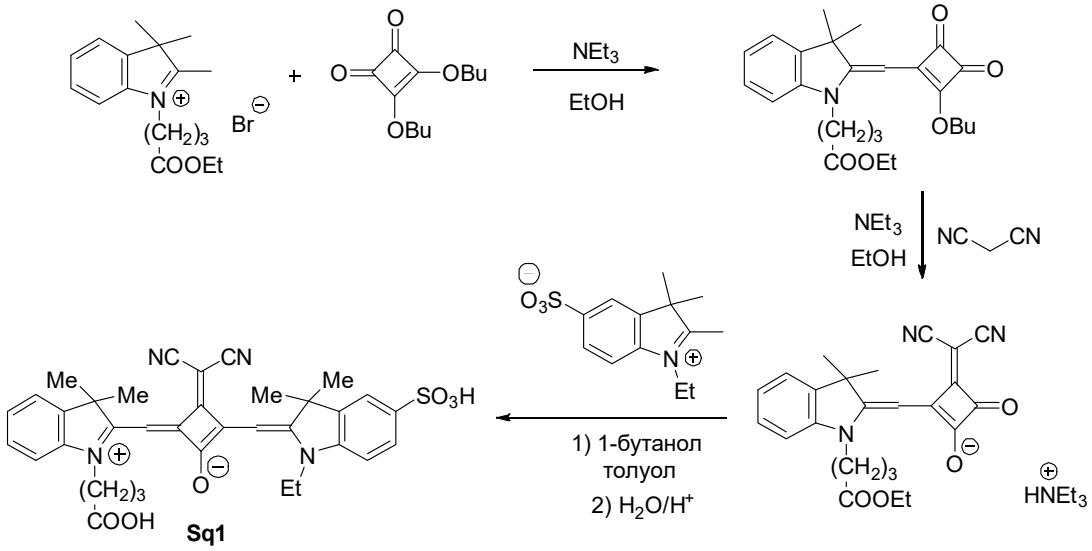
2.4 Синтез скваратових барвників

Скваратові барвники можна синтезувати кількома різними методами. Найбільш поширеним та зручним методом одержання симетричних скваратів є взаємодія квадратної кислоти з метиленовими гетероциклічними основами [49,50]:

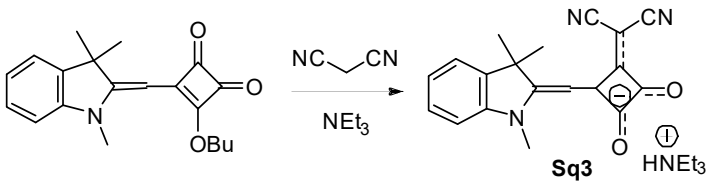


Біфункціональна природа квадратної кислоти дозволяє відносно легко синтезувати не тільки симетричні, але й несиметричні скваратові барвники [51]. Це відчиняє додаткові можливості щодо варіювання спектрального діапазону та інших фізико-хімічних властивостей сполук, таких як водорозчинність, полярність, кількість та положення реакційноздатних груп, тощо. Несиметричні сполуки одержують послідовним синтезом. Спочатку взаємодією дибутилскварату з гетероциклічною основою отримують моноскваратін. Наступна взаємодія з малонодинітрилом у присутності

триетиламіну веде до утворення відповідного диціанометиленового похідного, а кип'ятінням моноскваратну з кватернізованим індоленіном у суміші *н*-бутанолу та толуолу було одержано водорозчинний скваратн несиметричної будови **Sq1**:



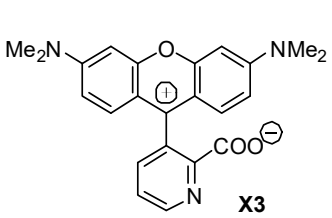
Також нами було одержано з майже кількісним виходом диціанометиленове похідне **Sq3** взаємодією моноскваратну з малонодинітрилом у присутності триетиламіну:



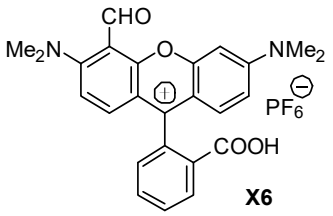
Методика синтезу: 1 мл (7.14 ммоль) триетиламіну додавали по краплям до суміші 2 г (6.15 ммоль) 3-бутокси-4-(1,3,3-триметил-2,3-дигідро-1*H*-2-індоліденметил)-3-циклобутен-1,2-діону з 440 мг (6.66 ммоль) малонодинітрилом та 35 мл етанолу і перемішували 2 години при кімнатній температурі. Розчинник випаровували при зниженому тиску на ротаційному випаровувачі. Технічний продукт чистили на колонці (Silica gel 60, 0–2% метанол-хлороформ) і одержували (2.52 г, 98%) цільового продукту у вигляді оранжевих кристалів, $T_{пл}$ 153 °C.

2.5 Синтез ксантенових барвників

Залежно від будови розрізняють симетричні та несиметричні ксантенові барвники. Так, барвник типу **X3** є прикладом симетричного похідного, а **X6** – несиметричного:



X3



X6

Методика синтезу симетричних ксантенових барвників: суміш 1 ммоль хінолінового ангідриду та 2 ммоль відповідного *м*-R_2N-фенолу сплавляли протягом 1–5 годин при 100–150 °С. Після охолодження реакційну масу розчиняли у 5 мл концентрованої соляної кислоти, отриманий розчин виливали у 50 мл води та нейтралізували 20%-ним розчином NaOH до pH = 6–7. Осад відфільтровували, промивали на фільтрі невеликою кількістю води. Після висушування осад технічного продукту очищали за допомогою колонкової хроматографії (Silica gel 60, метанол, хлороформ-метанол (10:1)).

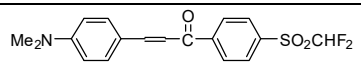
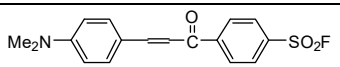
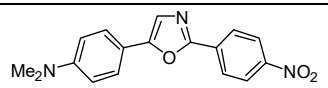
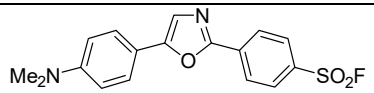
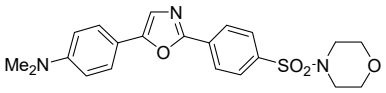
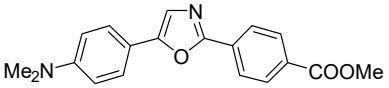
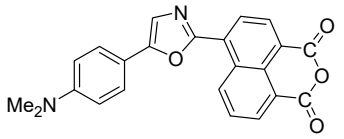
Методика синтезу несиметричних ксантенових барвників: суміш 1 ммоль *м*-R_2N-фенола та 1 ммоль R-бензоїлбензойної кислоти або R-бензоїлкарбоксипіридину у 3 мл 75–80%-ній сірчаній кислоті нагрівали впродовж 2–7 годин при 100–150 °С. Після охолодження реакційну масу виливали в 25–50 мл води, нейтралізували 20%-ним розчином NaOH. Осад відфільтровували, промивали на фільтрі невеликою кількістю води. Після висушування осад технічного продукту очищали за допомогою колонкової хроматографії (Silica gel 60, метанол, суміші хлороформ-метанол у різних співвідношеннях).

3 Спектральна та фотофізична характеризація флуоресцентних барвників у водних розчинах

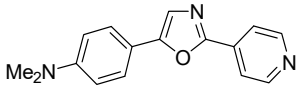
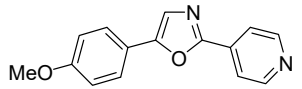
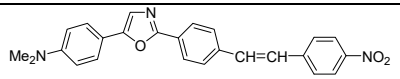
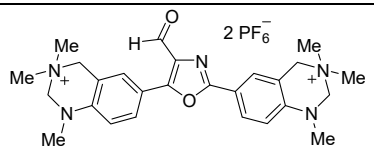
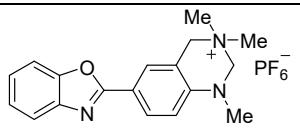
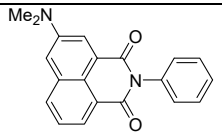
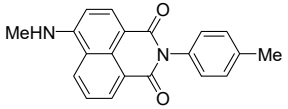
Для обрання флуоресцентних барвників, потенційно придатних для зв'язування з длДНК шляхом інтеркаляції, ми дослідили спектральні властивості різних класів сполук, які поглинають і випромінюють світло в різних областях спектрального діапазону. У ході дослідження власної бібліотеки флуоресцентних сполук ми, перш за все, звертали увагу на здатність барвника селективно зв'язуватись саме з фрагментами длДНК з утворенням флуоресцентного комплексу. При цьому флуоресценція барвника у вільному стані повинна бути мінімальною або взагалі відсутньою. Для оцінки взаємодії барвника з одноланцюговою ДНК (олДНК) ми вивчали спектральні властивості флуоресцентних сполук у присутності РНК. Поряд із спектральними характеристиками нас цікавила також розчинність досліджуваних зразків у водних розчинах, оскільки барвники-інтеркалятори, що застосовуються для детекції продуктів ампліфікаціїї ПЛР, характеризуються високою розчинністю у водних буферних розчинах.

Загалом, було проведено дослідження спектральних властивостей для більш ніж 50-ти сполук різних класів флуоресцентних барвників, зокрема для похідних нафталіміду, оксазолу, антрацену, антрахінону, бензантрону, халкону, а також ксантенових та скваріїнових барвників (Табл. 3.1). Спектри поглинання та флуоресценції наведених сполук були виміряні у Tris-буфері у вільному стані та у присутності длДНК або РНК. В усіх випадках ми порівнювали інтенсивності флуоресценції барвника у вільному стані (I_0) та після нековалентного зв'язування з длДНК ($I_{ДНК}$) або РНК ($I_{РНК}$).

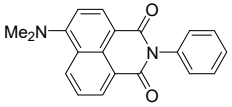
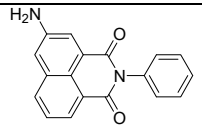
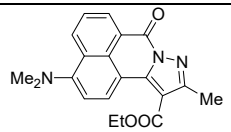
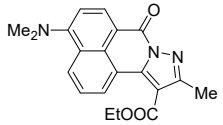
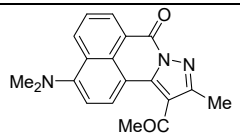
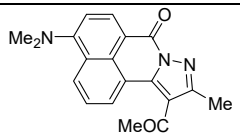
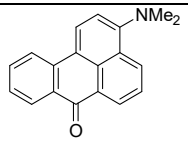
Таблиця 3.1 – Спектральні характеристики різних класів флуоресцентних сполук у Tris-буфері за відсутності та у присутності макромолекул – длДНК або РНК.

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
Халкони												
Ch1		353	431	3.85	350	432	4.62	1.20	360	470	3.69	0.96
Ch2		436	612	12.1	438	614	9.7	0.80	448	616	12.55	1.04
Похідні оксазолу												
Ox1		357	447	4.1	365	448	4.75	1.16	361	449	4.7	1.15
Ox2		370	579	18.2	370	589	19.87	1.09	370	576	16	0.88
Ox3		385	543	26.2	385	544	33.8	1.29	386	539	28	1.07
Ox4		329	500 570	12.47 22.72	327	500 573	15.17 29.49	1.22 1.30	328	505 569	13.55 22.95	1.09 1.01
Ox5		360	445	3.85	361	443	4.08	1.06	360	444	4.39	1.14

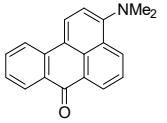
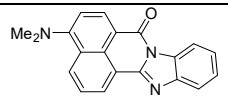
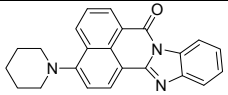
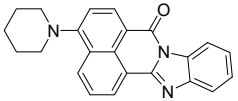
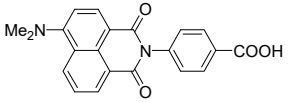
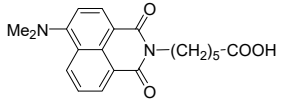
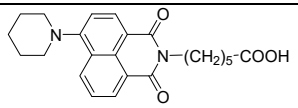
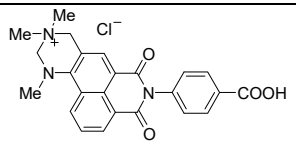
Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
Ox6		355	444 620	4.1 2.5	350	448 620	4.54 2.46	1.11 0.98	355	430 615	4.77 2.46	1.16 0.98
Ox7		335	468 549	284 280	333	471 549	282 276	0.99 0.99	333	474 547	284 282	1.00 1.01
Ox8		304	350	8.09	310	346	8.68	1.07	307	350	9.32	1.15
Ox9		343	437	224	330	481	301.6	1.35	339	444	202.9	0.91
Ox10		355	443	4.5	355	438	4.9	1.09	330	387	4.2	0.94
Похідні нафталіміду												
N1		366	447	5.21	360	438	6.2	1.19	338	423	6.27	1.20
N2		462	552	360	455	548	385	1.07	452	550	395	1.10

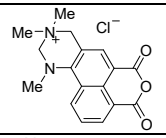
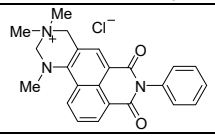
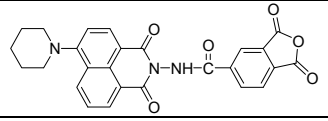
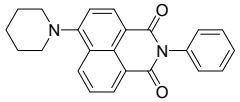
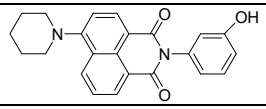
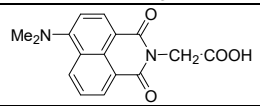
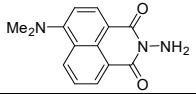
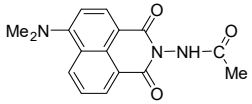
Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
N3		348	510	27.03	327	507	43.2	1.60	340	510	33.34	1.23
N4		346	588	32.42	348	591	31.96	0.99	345	591	28.86	0.89
N5		497	637	10.4	547	630	32.3	3.11	528	635	14.82	1.43
N6		353	445	5.2	372	456	5.4	1.04	350	443	5.6	1.08
N7		514	629	6.6	531	629	12.5	1.89	510	628	6.6	1.00
N8		370	451	4.14	367	449	4.7	1.14	369	451	5.5	1.33
N9		475	655	5.7	471	671	6.6	1.16	468	658	5.4	0.95

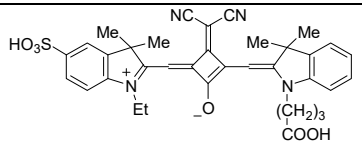
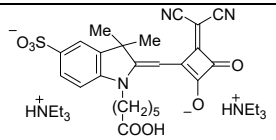
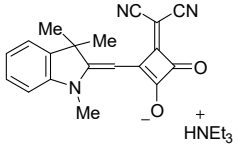
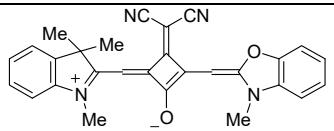
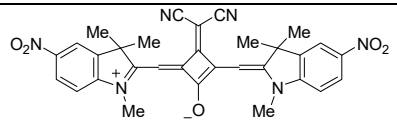
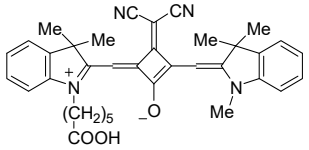
Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
N9		475	655	5.7	471	671	6.6	1.16	468	658	5.4	0.95
N10		463	607	69.2	464	606	69.7	1.01	460	606	60.7	0.88
N11		450	608	74.1	452	608	74.3	1.00	450	606	59.6	0.80
N12		440	595	207.3	439	593	189	0.91	438	593	211.6	1.02
N13		456	558	5.6	414	525	5.2	0.93	532	548	16.1	2.88
N14		377	461	10.3	378	458	12.1	1.17	370	456	12	1.17
N15		365	444	5.24	357	450	7.01	1.34	340	429	7.78	1.48
N16		409	512	1590.9	428	512	1486.3	0.90	408	511	1386.36	0.87

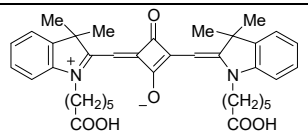
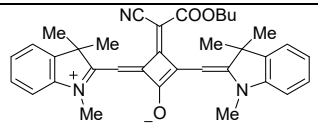
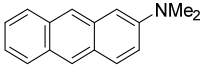
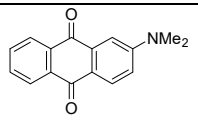
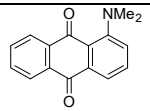
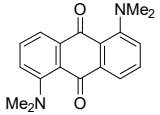
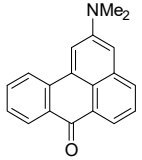
Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
N17		401	526	339.9	430	526	150.7	0.44	404	526	321.6	0.96
N18		407	511	1181.3	428	514	577.27	0.49	408	512	968.12	0.82
N19		391	451	5.4	349	432	6	1.11	345	432	5.9	1.09
N20		396	537	37.9	397	534	38.9	1.03	395	535	31	0.82
N21		373	449	3.85	350	439	4.47	1.16	340	424	5.46	1.42
N22		452	548	6.88	454	547	7.25	1.05	454	552	6.52	0.95
N23		390	481	2.48	378	456	3.95	1.59	348	430	5.61	2.26
N24		358	435	5.4	345	410	8.01	1.48	336	404	8.13	1.51

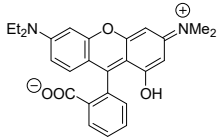
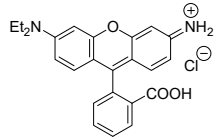
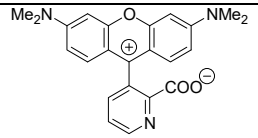
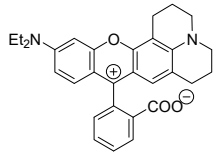
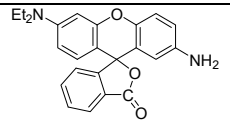
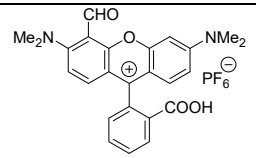
Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
Скваранові барвники												
Sq1		666	683	498.7	664	682	548.2	1.10	669	683	485.3	0.97
Sq2		471	517	229.8	472	518	282	1.23	471	517	222.9	0.97
Sq3		470	513	136.4	469	512	139.6	1.02	472	512	133.2	0.98
Sq4		622	634	9.1	638	650	20.14	2.21	638	650	20.27	2.23
Sq5		623	630	7.93	649	661	1.36	0.17	558	590	1.14	0.14
Sq6		654	669	84.3	656	670	82.3	0.98	654	671	83.8	0.99

Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
Sq7		637	644	420	634	645	410	0.98	637	645	431.9	1.03
Sq8		686	695	7.5	412	422	10.7	0.49	411	419	20.91	0.96
Похідні антрацену, антрахінону та бензантрону												
A1		392	530	31	392	528	31.6	1.02	391	528	30.7	0.99
Aq1		366	445	4.3	349	431	5.83	1.36	339	432	6.91	1.61
Aq2		366	436	3.73	357	448	4.51	1.21	337	428	6.89	1.85
Aq3		363	441	3.63	342	432	4.77	1.31	332	420	6.33	1.74
B1		558	586	5.23	556	585	5.99	1.15	558	585	4.13	0.79

Продовження **Таблиці 3.1**

Сполука	Структура	Tris-буфер			длДНК				РНК			
		$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	I_0	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{ДНК}$	$I_{ДНК}/I_0$	$\lambda_{збуд.}$,нм	$\lambda_{фл.}$,нм	$I_{РНК}$	$I_{РНК}/I_0$
Ксантенові барвники												
X1		543	573	481.4	544	571	466.9	0.97	544	571	381.7	0.79
X2		530	557	681.2	529	557	634	0.93	528	556	526.76	0.77
X3		560	591	2141	560	590	1986	0.93	561	590	1734	0.81
X4		544	573	696.9	544	572	671.5	0.96	544	572	684.6	0.98
X5		359	443	3.73	349	441	5.36	1.44	340	429	5.28	1.42
X6		540	568	170.1	539	568	165.5	0.97	539	570	165.4	0.97

На основі аналізу отриманих даних було виявлено, що співвідношення інтенсивності флуоресценції у зв'язаному з длДНК (або РНК) та у вільному станах для похідних оксазолу **Ox**, антрацену **A**, антрахінону **Aq**, ксантену **X** та халконів **Ch** не перевищують 1.44, що дозволило нам зробити висновок про низьку чутливість вказаних сполук до присутності нуклеїнових кислот та відмовитись від подальшого розгляду цих похідних як потенційних барвників-інтеркаляторів. Натомість, серед похідних нафталіміду було виявлено зразок **N5**, що продемонстрував підвищення інтенсивності флуоресценції у присутності длДНК у 3.11 рази у порівнянні з флуоресценцією вільного барвника. Крім того, слід відзначити похідні **N13** та **N23**, інтенсивність флуоресценції яких підвищилася у 2.88 та 2.26 рази, відповідно, при зв'язуванні з РНК, що свідчить про кращу спорідненість цих зразків до олДНК, аніж до длДНК. Однак, зважаючи на низьку розчинність похідних нафталіміду у водних розчинах, ми були вимушені відмовитись від подальшої роботи з цими сполуками. Серед досліджених скваратових барвників зразок **Sq4** продемонстрував підвищення флуоресценції у 2.21 та 2.23 рази при взаємодії з длДНК та РНК, відповідно. Цей результат показав відсутність селективності у даного зразка по відношенню до длДНК, що також є небажаною рисою для потенційного барвника-інтеркалятора.

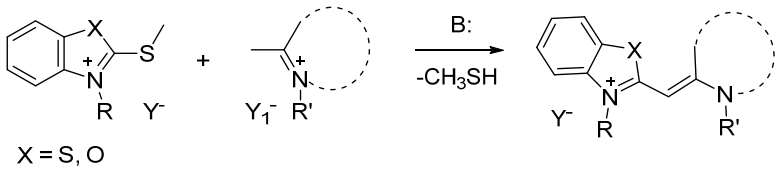
Загалом, серед досліджених барвників не було виявлено сполук, які б повністю відповідали критеріям (див. *Розділ 1, п. 1.2*), що висуваються до барвників-інтеркаляторів, придатних для неспецифічної детекції продуктів ампліфікації ПЛР. Так, усі зразки продемонстрували зовсім незначне підвищення інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні з длДНК. До того ж максимуми поглинання та випромінювання для більшості із протестованих барвників мали довжини хвиль, несумісні з існуючими приладами. Також слід зазначити, що основна маса досліджених сполук мала лімітовану або дуже погану розчинність у водних розчинах. Ось чому, ми зупинили свій вибір на дослідженні ціанінових барвників та похідних акридину як потенційних барвників-інтеркаляторів (див. *Розділ 4*).

4 Синтез реакційноздатних мономерних барвників-інтеркаляторів

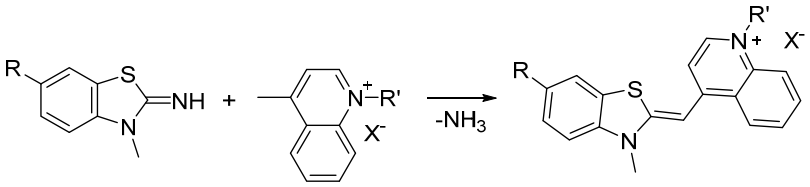
Аналіз літературних джерел показав, що серед існуючих барвників-інтеркаляторів найбільш перспективними з огляду на придатність для детекції результатів ПЛР є похідні акридину та несиметричних ціанінових барвників. Для детального вивчення особливостей синтезу та спектральних характеристик вищезгаданих похідних, ми синтезували деякі з них.

4.1 Синтез несиметричних ціанінових барвників

Як правило, монометинові ціанінові барвники отримують взаємодією солей 2-метилтіобензотіазолію або 2-метилтіобензоксазолію з кватернізованими гетероциклічними солями, що містять активну метильну групу [52].

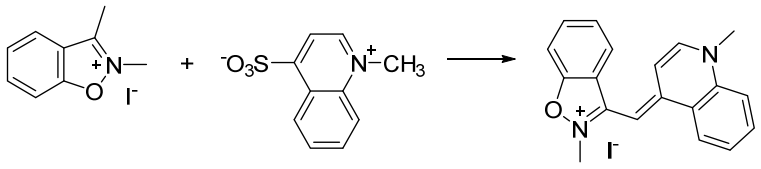


Альтернативний спосіб отримання даних сполук включає конденсацію похідних 2-іміно-3-метилбензотіазолу з солями 1-алкіл-4-метилхінолінію [53]. Цей метод дозволяє варіювати замісники у положенні 6 бензотіазольного циклу, а також уникнути головного недоліку попереднього підходу – виділення токсичного метилмеркаптану, який має неприємний запах.



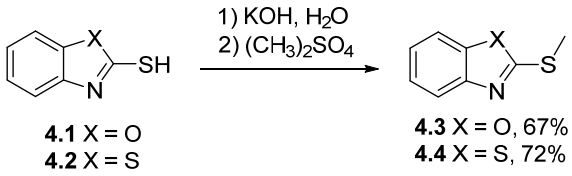
Серед інших підходів до синтезу ціанінових барвників варто згадати також конденсацію цвітеріонних похідних хіноліну з кватернізованими солями гетероциклічних сполук, що містять активну метильну групу [54]. Оскільки реакція проходить за відсутності розчинника та основного реагента,

похідні бензоксазолу та інші гетероцикли, чутливі до гідролізу, дають кращі виходи цільових сполук.

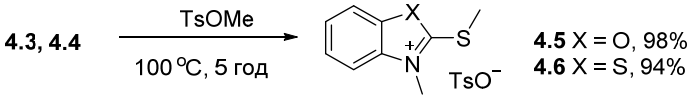


4.1.1 Синтез вихідних сполук для синтезу ціанінових барвників

Проаналізувавши літературні джерела та доступність вихідних реагентів, ми обрали перший із вищенаведених підходів для синтезу несиметричних ціанінових барвників. Спочатку ми отримали ряд проміжних сполук на основі бензоксазольного, бензотіазольного та хінолінового фрагментів. Так, алкілуванням 2-меркаптобензоксазолу **4.1** диметилсульфатом з подальшою очисткою технічного продукту вакуумною перегонкою було одержано сполуку **4.3** з виходом 67%. Аналогічним чином ми синтезували 2-метилтіобензотіазол **4.4** з виходом 72%.

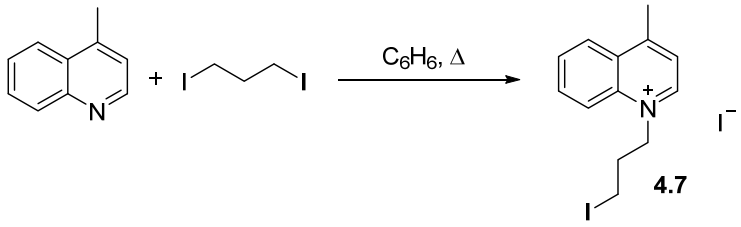


Наступну кватернізацію проводили сплавленням з двократним надлишком метил 4-метилбензолсульфонату у герметично закритій пробірці при 100 °С:

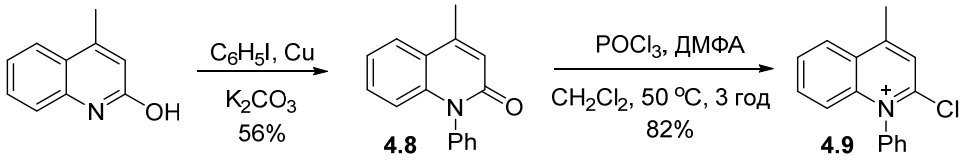


Для синтезу кватернізованої солі 4-метилхіноліну ми спершу спробували методику, успішно застосовану для отримання *N*-(3-бром-пропіл)заміщеного 4-лепідину [55]. Але нагрівання 1,3-дийодпропану з 4-лепідином за відсутності розчинника при 120 °С впродовж 30 хвилин привело до утворення суміші цільового продукту та його димеру. У пошуках більш оптимальних умов ми провели аналогічну реакцію у полярному та неполярному розчинниках. Так, при нагріванні вихідних сполук у бензолі

впродовж 4 годин при 55 °С, а потім ще 30 хвилин при 80 °С було одержано цільовий продукт **4.7** з виходом 55%. З іншого боку, проведення реакції в ізопропанолі привело до утворення продукту **4.7** з виходом 34% та великою кількістю домішок.

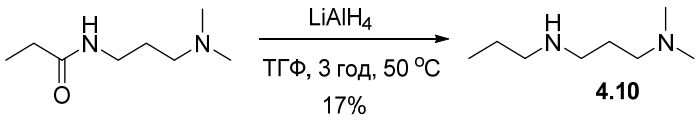


В умовах реакції Ульмана [56] при взаємодії 2-гідрокси-4-метилхіноліну з 4-йодобензолом у присутності калій карбонату та добре подрібненої міді було одержано похідну *N*-феніл-2-хінолону **4.8** з виходом 56 %. У результаті взаємодії останнього з фосфор(V)трихлороксидом у присутності каталітичної кількості ДМФА отримали хлорімінієву сіль (аддукт Вільсмайєра) **4.9** [57].



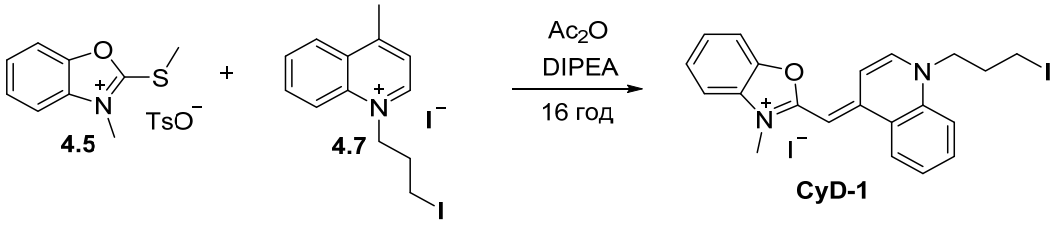
Четвертинна сіль 2-хлорхінолінію **4.9** є важливою вихідною сполукою для синтезу великої кількості різноманітних монометинових барвників, які містять $N(Alk)_2$-групу у положенні 2 хінолінового фрагменту. У роботі [58] зазначено, що наявність цієї групи відіграє ключову роль у суттєвому зростанні інтенсивності флуоресценції барвника при зв'язуванні з длДНК. Очевидно, $N(Alk)_2$-група обмежує вільний рух навколо метинового містка та забезпечує фіксацію планарної конформації барвника, що, у свою чергу, сприяє покращенню флуоресцентних властивостей. З огляду на переваги наявності $N(Alk)_2$-групи у положенні 2 хінолінового циклу, ми вирішили дослідити взаємодію хлорімінієвої солі **4.9** з сіллю 2-метилтіобензотіазолію **4.6** та подальшу взаємодію отриманого продукту з вторинними амінами. Для цього ми, перш за все, синтезували амін **4.10** відновленням відповідного

аміду дією $LiAlH_4$ у ТГФ. Нажаль, нам не вдалося отримати сполуку **4.10** з виходом кращим за 17%, тому пошук оптимальних умов одержання та виділення продукту **4.10** залишається актуальним.



4.1.2 Синтез монометинціанінового барвника

Для синтезу монометинціанінового барвника **CyD-1** на основі бензоксазолового та хінолінового фрагментів ми оптимізували існуючу синтетичну методику [59] шляхом проведення низки експериментів, де змінювали співвідношення реагентів, час та температуру реакції. Найкращий результат отримали при додаванні двократного надлишку третинної основи DIPEA до розчину вихідних сполук **4.5** та **4.7** у оцтовому ангідриді з подальшим перемішуванням при кімнатній температурі впродовж 16 годин. Після обробки реакційної суміші та очистки технічного продукту за допомогою колонкової хроматографії (Silica gel 60, хлороформ-метанол (100:1, 100:3, 100:7)) було одержано барвник **CyD-1** з виходом 30%.

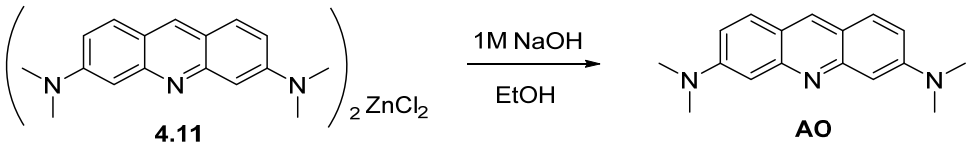


Одержаний барвник має максимум поглинання при 479 нм у воді.

4.2 Синтез похідних акридинового оранжевого

Комерційно доступну сіль акридинового оранжевого **4.11** було переведено в основу при перемішуванні з 1M NaOH на крижаній бані впродовж 30 хвилин. Осад відфільтровували та повторно розчиняли у 65%-му розчині водного етанолу при нагріванні. Гарячий розчин ще раз профільтровували від нерозчинних домішок, а до фільтрату додавали 1M NaOH та охолоджували на крижаній бані. У результаті було одержано

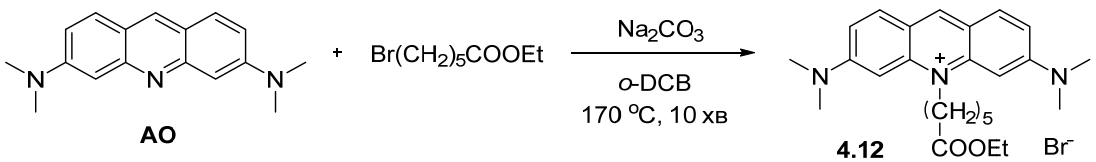
золотисті кристали цільового продукту – основи акридинового оранжевого (**АО**) з кількісним виходом.



Подальшу кватернізацію ми спершу проводили з півторакратним надлишком 6-бромогексанової кислоти. Однак, при нагріванні вихідних сполук у ацетонітрилі при 90 °С впродовж 16 годин було виділено лише гідробромід акридинового оранжевого. Тому ми спробували провести аналогічну реакцію у *трет*-бутанолі при 60 °С в присутності $NaHCO_3$ та NaI. Але і ця спроба виявилась невдалою, бо ми отримали механічну суміш вихідних речовин згідно даних ВЕРХ.

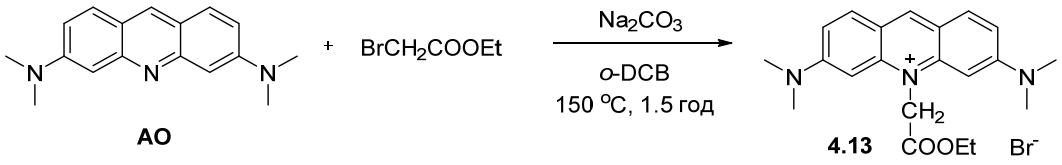
Отримати продукт кватернізації **4.12** вдалось при перемішуванні основи акридинового оранжевого **АО** з етиловим естером бромогексанової кислоти у хлорбензолі при 130 °С впродовж 15 годин. Але, виходячи з даних ВЕРХ аналізу проб реакційних сумішей, в цих умовах не вдається досягти відсотка перетворення більшого за 75%.

Кращого результату кватернізації вдалося досягти при проведенні реакції в умовах, що описані в [60], а саме, при додаванні до реакційної суміші двократного надлишку Na_2CO_3 та нагріванні при 170 °С у *о*-дихлорбензолі впродовж лише 10 хвилин. За таких умов повнота перетворення склала більше ніж 85%, а кількість побічних продуктів не була значною, не зважаючи на високу температуру перебігу реакції. Збільшення часу проведення реакції до 25 хвилин не дозволило збільшити відсоток перетворення, а кількість побічних продуктів дещо зросла.



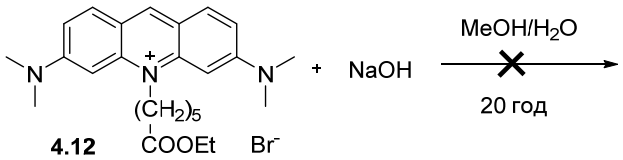
Очистку продукту **4.12** проводили колонковою хроматографією на силікагелі з використанням сумішей метанола з хлороформом у градієнтному режимі елюювання.

Кватернізацію акридинового оранжевого залишком оцтової кислоти проводили також у присутності Na_2CO_3, але через нижчу температуру кипіння етилового естеру бромоцтової кислоти довелося знизити температуру нагрівання до 150 °С. Незважаючи на це, реакція кватернізації пройшла за півтори години нагрівання з майже кількісним виходом продукту реакції **4.13**.

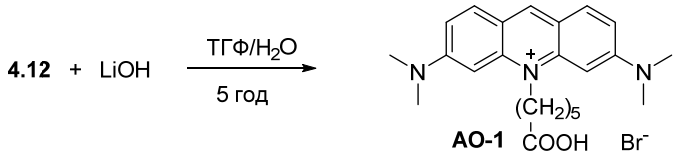


Можна зробити висновок, що збільшення довжини алкільного ланцюга в кватернізуючому агенті зменшує реакційну здатність при кватернізації акридинового оранжевого.

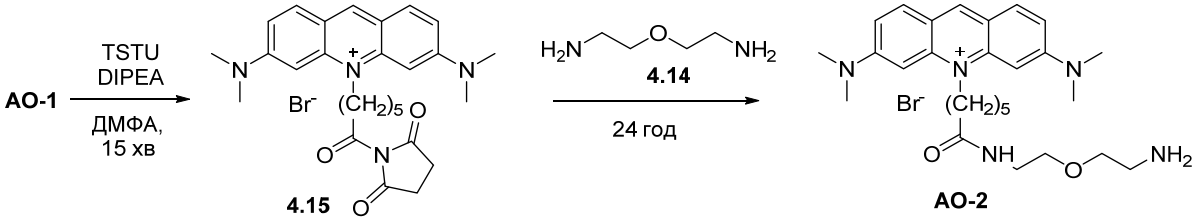
Для отримання продукту заміщення акридинового оранжевого залишком гексанкарбонової кислоти необхідно було провести гідроліз естерової групи. Зробити це в умовах лужного гідролізу водним розчином гідроксиду натрію у метанолі при кімнатній температурі не вдалося: судячи з даних ПМР спектра проби реакційної суміші, гідроліз за таких умов не відбувається.



Гідроліз вдалося провести при додаванні водного розчину гідроксиду літію до розчину **4.12** у ТГФ та подальшому перемішуванні реакційної суміші при кімнатній температурі впродовж 5 годин. Судячи з даних спектра ПМР та ВЕРХ аналізів, вихід продукту реакції на цій стадії є кількісним.



Отриманий таким чином продукт **АО-1** вводили далі в реакцію конденсації з 2-(2-аміноетокси)етан-1-аміном (**4.14**) для введення групи, що підвищить розчинність сполуки у воді. Реакцію проводили через стадію утворення *N*-гідроксисукцинімідного естеру **4.15**, який потім легко вступав у взаємодію з надлишком діаміну **4.14**, утворюючи продукт **АО-2**.



Аналіз проб реакційної суміші методом ВЕРХ показав, що крім сигналу цільового продукту спостерігаються сигнали побічних продуктів та вихідної сполуки, тому було проведено очистку продукту **АО-2** колонковою хроматографією на оберненофазному силікагелі RP-C18 з використанням сумішей ацетонітрилу з водою із додаванням ортофосфорної кислоти у градієнтному режимі елюювання. Вихід продукту **АО-2** склав 43%.

5 Дослідження будови одержаних мономерних барвників-інтеркаляторів

5.1 Загальні відомості

Спектри ^{1}H ЯМР вимірювали на спектрометрах Varian Mercury VX-200 (200 МГц) та Varian MR-400 (400 МГц) у ДМСО-d_6 (δ_H = 2.50 м.ч.) та $CDCl_3$ (δ_H = 7.26 м.ч.) з використанням $Si(CH_3)_4$ як внутрішнього стандарту. Константи спін-спінової взаємодії (J) вказані в Гц. Мультиплетність сигналів описано як: с (синглет), д (дублет), дд (дублет дублетов) т (триплет), к (квартет), м (мультиплет). Елементний аналіз проводили на елементному аналізаторі EuroVector Euro EA 3000 EA-IRMS. Тонкошарову хроматографію (ТШХ) проводили на пластинах Merck Silica gel 60 F254 з візуалізацією за допомогою УФ лампи при довжині хвилі 254 нм та з використанням сумішей хлороформ-метанол і гексан-етилацетат у різних співвідношеннях як елюенти. Для визначення чистоти сполук, підтвердження їх структури та контроля за перебігом реакцій використовували газові хроматографи Agilent 7890A з FID-детектором та Agilent 7890A з мас-спектрометричним детектором. Дослідження чистоти сполук та їх очистку здійснювали за допомогою аналітичних та препаративних рідинних хроматографічних систем Agilent 1100 та Bischoff. Для отримання мас-спектрів сполук використовували рідинний хроматограф із мас-спектрометричним детектором Agilent Technologies 1260 Infinity (LC) 6120 quadrupole (MS), колонку Agilent Zorbax SB-C18, 1.8 мм, 2.1 * 50 мм, елюент вода-ацетонітрил + 0.1% мурашиної кислоти. Для вимірювання температур плавлення використовували столик Кофлера.

5.2 Методики проведення ВЕРХ аналізів

Аналіз складу реакційних сумішей, а також чистоти напівпродуктів і цільових сполук було проведено за допомогою ВЕРХ на модульних хроматографах Bischoff та Agilent 1100.

Визначення акридинового оранжевого та його похідних проводили на рідинному хроматографі із спектрофотометричним або діодно-матричним детекторами в таких умовах:

– хроматографічна колонка Discovery Bio Wide Pore C18 з розміром 250 мм х 4.6 мм, з розміром частинок 5 мкм, розміром пор 300 мкм;

– рухома фаза А – вода для хроматографії з додаванням 0.05% об. ортофосфорної кислоти;

– рухома фаза В – ацетонітрил для хроматографії з додаванням 0.05% об. ортофосфорної кислоти;

– режим елюювання – градієнтний, згідно схеми:

Час, хвилини	Рухома фаза А, % об/об	Рухома фаза В, % об/об	Режим елюювання
0−15	80 → 25	20 → 75	Лінійний градієнт
15−17	25	75	Ізократичний
17−20	25 → 80	75 → 20	Лінійний градієнт

– швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв;

– температура термостату колонки – 30 °С;

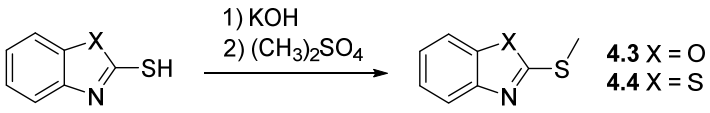
– детектування на довжині хвилі 270 нм;

– об'єм інжекції – 10 мкл.

Інші продукти та напівпродукти аналізували з використанням УФ детектора Bischoff Lambda 1010 та хроматографічної колонки «Nucleosil 100-5-C18 5.0 μm» (4,0×150 мм) з неполярною (зворотньою) нерухомою фазою. В якості елюентів використовували ацетонітрил та суміші ацетонітрил-вода і ацетонітрил-вода-трифторооцтова кислота, детектування сигналу проводили на довжині хвилі 254 нм.

5.3 Методики синтезу

Синтез 2-(метилтіо)бенз[*d*]оксазолу (**4.3**) та 2-(метилтіо)бензо[*d*]тіазолу (**4.4**)



Метод А. У стакані зважують 2-меркаптобензоксазол або 2-меркапто-бензтіазол (26.7 ммоль) та при перемішуванні додають розчин КОН (36.1 ммоль) у воді (140 мл). Суміш перемішують до розчинення реагентів, фільтрують, отримують фільтрат з pH~10. До фільтрату додають по краплях диметилсульфат (40.05 ммоль), розчин забарвлюється у жовтий колір та мутніє, далі утворюється червоний осад. Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі впродовж 9 годин, підлужують до pH~9-10 та екстрагують хлороформом. Екстракт сушать Na_2SO_4 ($MgSO_4$), осушувач відфільтровують, фільтрат концентрують на ротаційному випаровувачі. Отриманий технічний продукт очищують вакуумною перегонкою на форвакуумному насосі, збираючи фракцію з $T_{кип}$ = 93–100 °C для сполуки **4.3** та з $T_{кип}$ = 135–140 °C для сполуки **4.4** (1-2 мбар). Одержують продукти **4.3** або **4.4** з виходами 67 % та 72 %, відповідно.

2-(Метилтіо)бенз[*d*]оксазол **4.3**: прозора рідина. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 7.66–7.55 (2H, м, ArH), 7.36–7.23 (2H, м, ArH), 2.74 (3H, с, CH_3). Розраховано для C_8H_7NOS (165.21): C, 58.16; H, 4.27; N, 8.48%. Знайдено: C, 58.13; H, 4.25; N, 8.51%.

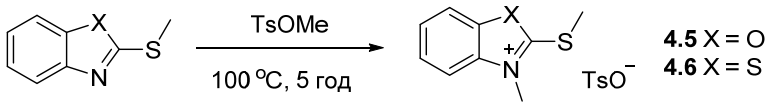
Метод Б (для синтезу 2-(метилтіо)бензо[*d*]тіазолу (**4.4**)).

До суміші 2-меркаптобензтіазолу (1.0 г, 6.0 ммоль) і K_2CO_3 (2.48 г, 17.9 ммоль) у сухому ДМФА (5 мл) при перемішуванні додають йодометан (2.55 г, 17.9 ммоль). Колбу закривають щільною кришкою, і витримують реакційну суміш при кімнатній температурі впродовж 16 годин. Надлишок йодометану випаровують при пониженому тиску при 40 ºС. Залишок розбавляють етилацетатом (30 мл) і виливають у воду (30 мл). Органічний шар відокремлюють, водний – екстрагують етилацетатом (3 × 5 мл). Органічні екстракти об’єднують, промивають водою і сушать над Na_2SO_4. Осушувач відфільтровують, фільтрат концентрують у вакуумі. Одержують 0.92 г (84 %) цільового продукту у вигляді жовтої густої рідини.

Чистота (ВЕРХ, обернена фаза RP-18, азеотропна суміш ацетонітрил-вода, 254 нм) — 88.6% (0.9% вихідної сполуки, 10.0% основної домішки —

ймовірно, продукта *N*-метилювання). ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.00 (1H, д, *J* = 7.9, ArH), 7.85 (1H, д, *J* = 7.9, ArH), 7.51–7.28 (2H, м, ArH), 2.78 (3H, с, SCH_3). Розраховано для $C_8H_7NS_2$ (181.27): C, 53.01; H, 3.89; N, 7.73%. Знайдено: C, 53.07; H, 3.94; N, 7.75.

Синтез 4-метилбензолсульфонатів 3-метил-2-(метилтіо)бензо[*d*]оксазолію (**4.5**) та 3-метил-2-(метилтіо)бензо[*d*]тіазолію (**4.6**)

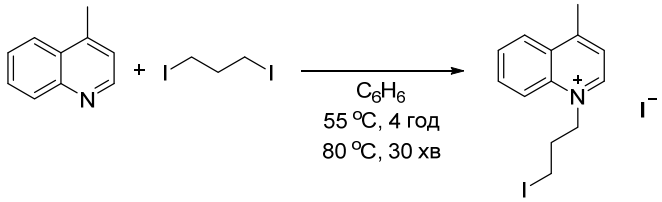


Суміш 2-(метилтіо)бензо[*d*]оксазолу (**4.3**) або 2-(метилтіо)бензо[*d*]тіазолу (**4.4**) (2.2 ммоль) та метил 4-метилбензолсульфонату (860 мг, 4.6 ммоль) нагрівають при перемішуванні у герметично закритій пробірці при 100 °C впродовж 5 годин. Після охолодження суміш затирають *трет*-бутилметиловим етером та отримують продукти **4.5** або **4.6** з виходами 98 % та 94 %, відповідно.

4-Метилбензолсульфонат 3-метил-2-(метилтіо)бензо[*d*]оксазолію (**4.5**): жовта в'язка рідина. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 7.50 (2H, д, *J* = 7.8, ArH), 7.31 (1H, д, *J* = 8.0, ArH), 7.26–7.18 (2H, м, ArH), 7.13 (2H, д, *J* = 7.8, ArH), 3.33 (3H, с, NCH_3), 7.13–7.08 (1H, м, ArH), 2.85 (3H, с, SCH_3), 2.29 (3H, с, CH_3). Розраховано для $C_{16}H_{17}NO_4S_2$ (351.44): C, 54.68; H, 4.88; N, 3.99%. Знайдено: C, 54.62; H, 4.85; N, 4.02%.

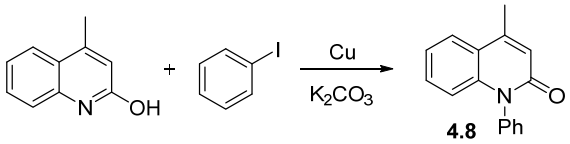
4-Метилбензолсульфонат 3-метил-2-(метилтіо)бензо[*d*]тіазолію (**4.6**): безбарвний кристалічний осад. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.15 (1H, д, *J* = 8.3, ArH), 7.93 (1H, д, *J* = 8.3, ArH), 7.72–7.68 (1H, м, ArH), 7.65 (2H, д, *J* = 8.0, ArH), 7.59–7.56 (1H, м, ArH), 7.06 (2H, д, *J* = 8.0, ArH), 4.17 (3H, с, NCH_3), 3.06 (3H, с, SCH_3), 2.30 (3H, с, CH_3). Розраховано для $C_{16}H_{17}NO_3S_3$ (367.50): C, 52.29; H, 4.66; N, 3.81%. Знайдено: C, 52.35; H, 4.62; N, 3.88%.

Синтез йодиду 1-(3-йодопропіл)-4-метилхінолінію (**4.7**)



Реакцію проводять у герметично закритій пробірці та захищених від світла умовах. Суміш лепідину (1 мл, 7.5 ммоль), 1,3-дийодпропан (3.45 мл, 30 ммоль) у бензолі (5 мл) нагрівають на масляній бані впродовж 4 годин при 55 °С, а потім ще 30 хвилин при 80 °С. Через 10 хвилин після початку реакції розчин забарвлюється у червоний колір. Після охолодження отриманий світло-жовтий осад відфільтровують та промивають бензолом. Фільтрат концентрують на ротаційному випаровувачі до 1/3 об'єму та відфільтровують додаткову порцію осаду, що випав, промивають бензолом. Одержують 1.8 г (55%) продукту **4.7** у вигляді кристалічного осаду жовтого кольору. $T_{пл}$ = 162–165 °С. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 9.37 (1H, д, J = 6.0, ArH), 8.63–8.47 (2H, м, ArH), 8.27 (1H, т, J = 8.0, ArH), 8.12–7.97 (2H, м, ArH), 5.03 (2H, т, J = 7.4, CH_2), 3.33–3.23 (4H, м, $2CH_2$), 3.01 (3H, с, CH_3). Розраховано для $C_{13}H_{15}I_2N$ (439.08): C, 35.56; H, 3.44; N, 3.19%. Знайдено: C, 35.55; H, 3.46; N, 3.14%.

Синтез 4-метил-1-фенілхінолін-2(1*H*)-ону (**4.8**)

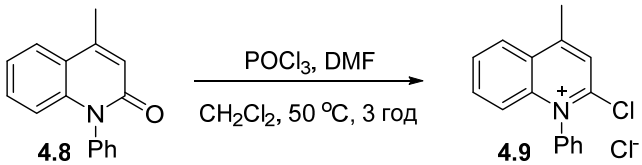


4.8

В атмосфері аргону, суміш 2-гідрокси-4-метилхіноліну (1 г, 6.3 ммоль), 4-йодобензолу (1.92 г, 9.4 ммоль), K_2CO_3 (0.87 г, 6.3 ммоль) та порошку міді (2.31 г, 36.4 ммоль) кип'ятять у ДМФА (11 мл) впродовж 66 годин (контроль – відбір проб та аналіз методом ВЕРХ). Після охолодження до реакційної суміші додають 30 мл етилацетату і 50 мл води. Одержану трифазну суміш (органічна фаза, водна фаза і твердий осад нерозчинних солей міді) фільтрують через шар *Celite 535* і промивають етилацетатом. Органічний шар

відокремлюють, водний — екстрагують етилацетатом (3 × 10 мл). Органічні екстракти об'єднують, сушать Na_2SO_4, осушувач відфільтровують, і фільтрат випаровують. Залишок після випаровування переносять у колонку для гарячої екстракції, заповнену силікагелем, і екстрагують гарячим гептаном, відокремлюючи надлишок 4-йодобензолу. Технічний продукт виділяють з колонки шляхом промивання холодною сумішшю етилацетату з гептаном (3:2), концентрують на ротаційному випаровувачі. Залишок після випаровування кип'ятять у гептані, по краплях додаючи етилацетат до розчинення осаду. Кристали, які утворюються після поступового охолодження до –15 ºС, відфільтровують, промивають охолодженою до –15 ºС сумішшю етилацетату з гептаном (3:2) і висушують у вакуумі, одержуючи 0.81 г (54%) цільового продукту у вигляді світло-коричневого осаду. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ 7.73 (1H, дд, *J* = 6.6, 1.4, ArH), 7.61–7.53 (2H, м, ArH), 7.54–7.46 (1H, м, ArH), 7.35–7.28 (1H, м, ArH), 7.28–7.23 (1H, м, ArH), 7.24–7.17 (2H, м, ArH), 6.70–6.62 (2H, м, ArH), 2.54 (3H, д, *J* = 1.2, CH_3). ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц): δ 7.73 (1H, дд, *J* = 6.6, 1.4, ArH), 7.61–7.53 (2H, м, ArH), 7.54–7.46 (1H, м, ArH), 7.35–7.28 (1H, м, ArH), 7.28–7.23 (1H, м, ArH), 7.24–7.17 (2H, м, ArH), 6.70–6.62 (2H, м, ArH), 2.54 (3H, д, *J* = 1.2, CH_3). Розраховано для $C_{16}H_{13}NO$ (235.29): C, 81.68; H, 5.57; N, 5.95%. Знайдено: C, 81.63; H, 5.56; N, 5.89%.

Синтез хлориду 4-метил-2-хлор-1-фенілхінолінію (**4.9**)

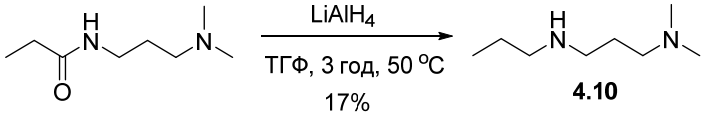


4.8 **4.9**

Суміш 4-метил-1-фенілхінолін-2(1*H*)-ону (**4.8**) (290 мг, 1.23 ммоль) та $POCl_3$ (192 мг, 1.25 ммоль) у CH_2Cl_2 (3 мл) у присутності каталітичної кількості ДМФА (~20 μл) нагрівають при 60 °С впродовж 3 годин. Хід реакції контролюють за допомогою ТШХ (гексан-етилацетат (1:1)). Після охолодження реакційну суміш концентрують при низькому тиску на

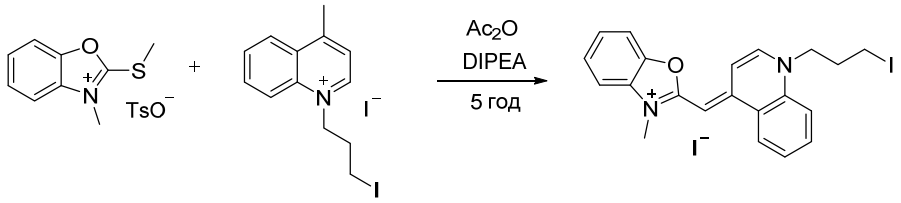
ротаційному випаровувачі. Отриманий технічний продукт використовують без подальшої очистки. Спектр ^{1}H ЯМР сполуки **4.9** співпадає з даними, описаними у роботі [61]. Розраховано для $C_{16}H_{13}Cl_2N$ (290.19): C, 66.22; H, 4.52; N, 4.83%. Знайдено: C, 66.28; H, 4.55; N, 4.81%.

Синтез N^1,N^1-диметил-N^3- пропілпропан-1,3-діаміну (**4.10**)



До розчину відповідного аміду (2 г, 12.6 ммоль) у ТГФ (2 мл) додають порціями $LiAlH_4$ (380 мг, 10 ммоль). Реакційну суміш перемішують при 50 °C впродовж 3 годин, а далі ще 16 годин при 40 °C. Після охолодження додають воду (5 мл) та КОН (560 мг), екстрагують диетиловим етером (4 × 50 мл). Екстракт сушать Na_2SO_4, осушувач відфільтровують, фільтрат концентрують на ротаційному випаровувачі. Технічний продукт очищують вакуумною перегонкою на форвакуумному насосі, збираючи фракцію з $T_{кип}$ = 75–80 °C (1-2 мбар). Одержують 311 мг (17 %) продукту **4.10** у вигляді прозорої рідини. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 2.63–2.53 (4H, м, NH(CH_2)$_2$), 2.38 (2H, т, J = 6.0, 7.1, NCH_2), 2.15 (6H, с, N(CH_3)$_2$), 1.46–1.55 (4H, м, 2CH_2), 0.87 (3H, т, J = 2.0, 8.0, CH_3). Розраховано для $C_8H_{20}N_2$ (144.26): C, 66.61; H, 13.97; N, 19.42%. Знайдено: C, 66.55; H, 13.94; N, 19.47%.

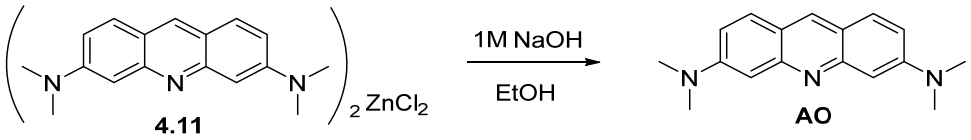
Синтез йодиду 2-((1-(3-йодопропіл)хінолін-4(1*H*)-іліден)метил)-3-метилбензо[*d*]оксазолію (**CyD-1**)



Суміш 4-метилбензолсульфонату 3-метил-2-(метилтіо)бензо[*d*]оксазолію (**4.5**) (400 мг, 1.14 ммоль) та йодиду 1-(3-йодопропіл)-4-метилхінолінію (**4.7**) (250 мг, 0.57 ммоль) у оцтовому ангідриді (3 мл) нагрівають на водяній бані

при 50 °C до повного розчинення. Після охолодження до отриманого розчину жовтого кольору додають по краплях DIPEA (0.2 мл, 1.14 ммоль). Розчин миттєво стає червоним. Реакційну масу перемішують при кімнатній температурі впродовж 16 годин. Хід реакції контролюють за допомогою вимірювання спектрів поглинання (λ_{abs} = 479 нм). Після закінчення реакції до суміші додають *трет*-бутилметиловим етер та залишають при температурі -18 °C. Розчин декантують, а осад сушать у ексикаторі, далі висаджують диетиловим етером. Отриманий осад очищують за допомогою колонкової хроматографії (Silica gel 60, хлороформ-метанол (100:1, 100:3, 100:7)). Одержують 97 мг (30%) продукту **CyD-1** у вигляді кристалічного осаду оранжевого кольору. $T_{пл}$ = 262–263 °C (з розкладанням). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.78 (1H, д, *J* = 8.0, ArH), 8.44 (1H, д, *J* = 8.0, ArH), 8.11 (1H, д, *J* = 8.4, ArH), 8.04–7.88 (2H, м, ArH), 7.80 (1H, д, *J* = 8.4, ArH), 7.77–7.68 (1H, м, ArH), 7.67–7.57 (1H, м, ArH), 7.49 (1H, т, *J* = 7.6, ArH), 7.40 (1H, т, *J* = 7.6, ArH), 6.29 (1H, с, CH), 4.70–4.49 (2H, м, NCH_2), 3.87 (3H, с, NCH_3), 2.46–2.26 (2H, м, CH_2I), 1.33–1.12 (2H, м, CH_2). Розраховано для $C_{21}H_{20}I_2N_2O$ (570.21): C, 44.23; H, 3.54; N, 4.91%. Знайдено: C, 44.27; H, 3.55; N, 4.93%.

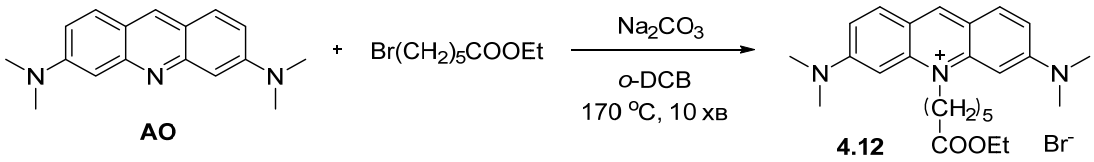
Синтез акридинового оранжевого (**AO**)



Суспензію солі акридинового оранжевого (5 г, 7.5 ммоль) у 1M NaOH (100 мл) перемішують на крижаній бані впродовж 30 хвилин. Осад відфільтровують, додають 1M NaOH (100 мл) та перемішують ще 30 хвилин. Осад відфільтровують, промивають 0.5M NaOH (100 мл) та розчиняють у 65%-му розчині водного етанолу (200 мл). Отриману суміш кип’ятять впродовж 15 хвилин для повного розчинення осаду. Гарячий розчин фільтрують від нерозчинних домішок. До теплого фільтрату додають порціями 1M NaOH (60 мл), охолоджують на крижаній бані та залишають на

30 хвилин. Осад відфільтровують, сушать та отримують 1.98 г (~100%) оранжевого кристалічного осаду цільового продукту **АО**. $T_{пл}$ = 181–183 °C. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.47 (1H, с, ArH), 7.78 (2H, д, J = 9.2, ArH), 7.20 (2H, дд, J = 9.2, 2.5, ArH), 6.84 (2H, д, J = 2.5, ArH), 3.07 (12H, с, $2N(CH_3)_2$). Розраховано для $C_{17}H_{19}N_3$ (265.36): C, 76.95; H, 7.22; N, 15.84%. Знайдено: C, 76.87; H, 7.25; N, 15.87%.

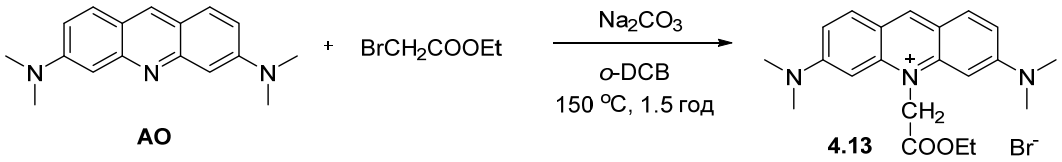
Синтез броміду 3,6-*біс*(диметиламіно)-10-(5-карбетоксипентил)акридинію (**4.12**)



АО **4.12**

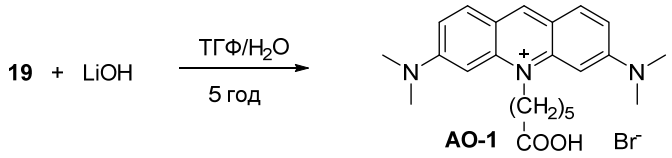
В одногорлій колбі об'ємом 25 мл, суміш акридинового оранжевого (0.25 г, 0.94 ммоль), етилового естеру 6-бромогексанової кислоти (335 мкл, 1.88 ммоль) та натрій карбонату (0.2 г, 1.88 ммоль) у 1,2-дихлоробензолі (2 мл) перемішують при 170 °C впродовж 10 хвилин. Після охолодження реакційної маси її промивають трьома порціями бензолу та трьома порціями гексану для видалення залишку *о*-дихлоробензолу та кватернізуючого агенту. Залишок після промивання розчиняють у невеликій кількості хлороформу та очищують колонковою хроматографією на алюміній оксиді з використанням сумішей ізопропанолу з хлороформом (0-15 % *i*-PrOH) у градієнтному режимі елюювання. Вихід оранжевого кристалічного осаду цільового продукту **4.12** після очищення складає 75 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.74 (1H, с, ArH), 7.90 (2H, д, J = 9.2, ArH), 7.24 (2H, дд, J = 9.2, 2.5, ArH), 6.57 (2H, д, J = 2.5, ArH), 4.66 (2H, м, OCH_2), 4.04 (2H, т, J = 7.4, N^+CH_2), 3.26 (12H, с, $2N(CH_3)_2$), 2.34 (2H, т, J = 7.5, CH_2COOH), 1.90–1.78 (2H, м, CH_2), 1.75–1.61 (2H, м, CH_2), 1.60–1.49 (2H, м, CH_2), 1.14 (3H, т, J = 2.5, CH_3). Розраховано для $C_{25}H_{34}BrN_3O_2$ (488.47): C, 61.47; H, 7.02; N, 8.60%. Знайдено: C, 61.49; H, 7.07; N, 8.54%.

Синтез броміду 3,6-*біс*(диметиламіно)-10-(5-карбетоксиметил)акридинію (**4.13**)



В одногорлій колбі об'ємом 25 мл, суміш акридинового оранжевого (0.3 г, 1.13 ммоль), етилового естеру бромоцтової кислоти (335 мкл, 2.26 ммоль) та натрій карбонату (0.24 г, 2.26 ммоль) у 1,2-дихлорбензолі (2 мл) перемішують при 150 °С впродовж 1.5 години. Після охолодження реакційної маси її промивають трьома порціями бензолу та трьома порціями гексану для видалення залишку *о*-дихлорбензолу та кватернізуючого агенту. Вихід оранжевого кристалічного осаду цільового продукту **4.13** після промивання та висушування складає 87%. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.84 (1H, с, ArH), 7.94 (2H, д, J = 9.2, ArH), 7.25 (2H, дд, J = 9.2, 2.5, ArH), 6.56 (2H, д, J = 2.5, ArH), 5.73 (2H, т, J = 7.4, N+CH_2), 4.22 (2H, м, OCH_2), 3.22 (12H, с, 2N(CH_3)$_2$), 1.20 (3H, т, J = 2.5, CH_3). Розраховано для $C_{21}H_{26}BrN_3O_2$ (432.36): C, 58.34; H, 6.06; N, 9.72%. Знайдено: C, 58.39; H, 6.12; N, 9.65%.

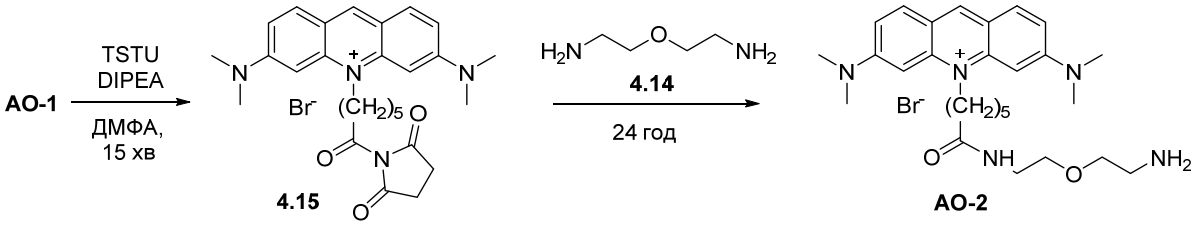
Синтез броміду 10-(5-карбоксипентил)-3,6-*біс*(диметиламіно)-акридинію (**АО-1**)



Естер **4.12** (0.25 г, 0.58 ммоль) розчиняють у ТГФ (10 мл) та додають розчин LiOH (30 мг, 1.25 ммоль) у воді (2 мл). При цьому вихідна сполука починає осідати на стінках колби. Для її розчинення у реакційну суміш додають метанол (5 мл) і перемішують при кімнатній температурі впродовж 15 годин. Потім з реакційної маси видаляють розчинники на ротаційному випаровувачі, а до водного залишку додають краплями розчин 1М HCl до

pH 5 і упарюють насухо, висушують у вакуумному ексикаторі. Вихід темно-оранжевого смолоподібного осаду цільового продукту **АО-1** складає 98%. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.72 (1H, с, ArH), 7.84 (2H, д, J = 9.2, ArH), 7.18 (2H, дд, J = 9.2, 2.5, ArH), 6.53 (2H, д, J = 2.5, ArH), 4.62 (2H, т, J = 7.4, N+CH_2), 3.24 (12H, с, 2N(CH_3)$_2$), 2.25 (2H, т, J = 7.5, CH_2COOH), 1.90–1.73 (2H, м, CH_2), 1.71–1.61 (2H, м, CH_2), 1.61–1.49 (2H, м, CH_2). Розраховано для $C_{23}H_{30}BrN_3O_2$ (460.42): C, 60.00; H, 6.57; N, 9.13%. Знайдено: C, 60.09; H, 6.49; N, 9.18%.

Синтез броміду 10-(6-((2-(2-аміноетокси)етил)аміно)-6-оксогексил)-3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (**АО-2**)



До 0.2 г кислоти **АО-1** (0.43 ммоль) додають 0.26 г TSTU (0.87 ммоль), 175 мкл діізопропілетиламіну (1 ммоль) та 5 мл ДМФА. Реакційну масу перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі та додають 0.1 г діаміну **22** (1 ммоль) і перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин. Реакційну масу заливають етилацетатом та залишають у холодильнику на ніч для кристалізації продукту. Потім етилацетат декантують, а залишок промивають ще декількома порціями етилацетату і досушують у вакуум-ексикаторі. Для очистки смолоподібний залишок розчиняють у невеликій кількості води та очищують колонковою хроматографією на оберненофазному силікагелі RP-18 з використанням сумішей ацетонітрилу з водою з додаванням трифтороцтової кислоти у кількості 0.05% об. (0-15% об. ацетонітрилу) у градієнтному режимі елюювання. Вихід оранжевого кристалічного осаду цільового продукту **АО-2** після очищення складає 43%. Мас-спектр MS-ESI (m/z) 466 (M^+, 14%). Розраховано для $C_{27}H_{40}BrN_5O_2$ (546.55): C, 59.33; H, 7.38; N, 12.81%. Знайдено: C, 59.35; H, 7.34; N, 12.75%.

6 Спектральна та фотофізична характеризація мономерних барвників-інтеркаляторів

6.1 Умови та методики дослідження спектральних та фотофізичних властивостей

– *Реагенти та розчинники для спектральних, фотофізичних та біофізичних досліджень*

Розчинники метанол, етанол та ДМСО були кваліфікації ч.д.а (Україна) та використовувалися без додаткової очистки.

Для виготовлення 10 мМ Tris-буфера pH 8.0 в 1000 мл Milli-Q води було розчинено 1.57 г гідрохлориду *трис*-(гідроксиметил)амінометану (Trizma®hydrochloride, Sigma-Aldrich). Отриманий розчин доводили до pH 8.0 додаванням 10 М розчину NaOH. Значення pH контролювали за допомогою pH-метра *Hanna Instruments pH 213*.

Розчини длДНК (зі сперми лосося, Sigma-Aldrich) та РНК (з дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) готували у Tris-буфері з концентрацією 0.1 мг/мл. Для утворення комплексів длДНК-барвник та РНК-барвник до 3 мл розчину відповідних макромолекул додавали аліквоти барвників у ДМСО, які не перевищували 100 мкл. Спектри поглинання та флуоресценції знімали після інкубування комплексів при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

– *Спектри поглинання*

Електронні спектри поглинання вимірювали при кімнатній температурі на спектрофотометрі *Perkin–Elmer Lambda 35 UV/Vis* в стандартних 1-см кварцових кюветах. Максимуми поглинання були визначені з точністю 0.5 нм. Концентрація барвника знаходилася у межах $1.1–2.0\times10^{-6}$ М.

– *Спектри флуоресценції та квантові виходи*

Спектри флуоресценції та квантові виходи барвників як у вільному стані, так і після зв’язування з длДНК або РНК, вимірювали при кімнатній температурі на спектрофлуориметрі *Varian Cary Eclipse* у стандартних 1-см

кварцових кюветах. Усі експериментальні спектри корегувались з урахуванням чутливості фотоелектронного помножувача приладу. Концентрація барвника знаходилася у межах 1.1–2.0×10^{-6} М. Максимуми спектрів флуоресценції визначені з точністю 1 нм.

Абсолютні квантові виходи флуоресценції (Φ_F) визначали відносним методом [63, 64]. В якості еталонів використовували хінін бісульфат (Φ_F = 58% у 0.1 М H_2SO_4), флуоресцеїн (Φ_F = 95% у 0.1 М NaOH) [64] та акридиновий оранжевий (Acridine Orange, Sigma) з квантовим виходом 25 % в 5 мМ фосфатному буфері (pH 6,9) [65].

Квантові виходи барвників розраховували за формулою [62]:

$$\Phi_F = \Phi_{F(ет)} \times (F / F_{(ет)}) \times (A_{(ет)} / A),$$

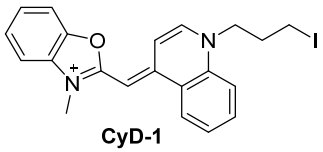
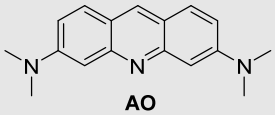
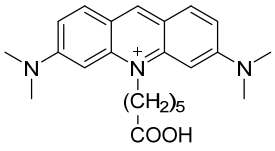
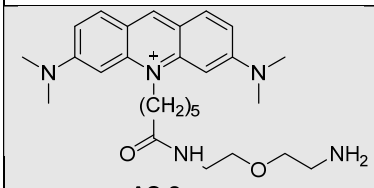
де $\Phi_{F(ет)}$ — квантовий вихід еталону; $F_{(ет)}$ та F – інтегральні площі спектрів флуоресценції ($F = \int I(\lambda)d\lambda$) еталону та барвників, відповідно; $A_{(ет)}$ та A — оптичні густини еталону і досліджуваного барвника відповідно на довжині хвилі збудження.

Усі квантові виходи вимірювали 3-4 рази для кожного зразка і усереднювали.

6.2 Спектральна характеризація мономерних барвників-інтеркаляторів

Спектральні та фотофізичні властивості монометинового барвника **CyD-1**, акридинового оранжевого **AO** і двох його похідних **AO-1** та **AO-2** досліджували у водному середовищі в Tris-буфері (pH 8), в етанолі та у присутності длДНК. Отримані дані максимумів поглинання та флуоресценції, а також Стоксові зсуви та квантові виходи флуоресценції наведено у Табл. 6.1, спектри поглинання та флуоресценції у різних середовищах представлено на Рис. 6.1 та Рис. 6.2.

Таблиця 6.1 – Спектральні властивості мономерних барвників-інтеркаляторів у EtOH, Tris-буфері та у присутності длДНК.

Барвник	Середовище	Максимум погл., нм	Максимум флуор., нм	Стоксів зсув, $см^{-1}$	Квантовий вихід, %
 CyD-1	Tris-буфер	479	Не флуоресціює		
	Етанол	480	Не флуоресціює		
	длДНК	488	509	850	32
 AO	Tris-буфер	492	530	1460	27
	Етанол	490	522	1250	60
	длДНК	500	528	1060	48
 AO-1	Tris-буфер	493	525	1240	17
	Етанол	494	520	1010	44
	длДНК	501	525	910	43
 AO-2	Tris-буфер	495	525	970	17
	Етанол	495	520	1150	41
	длДНК	505	526	790	52

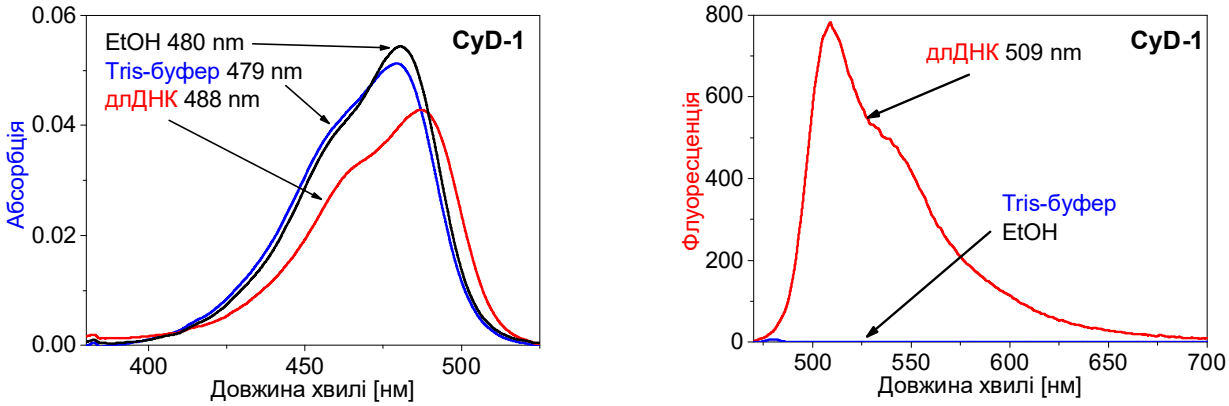
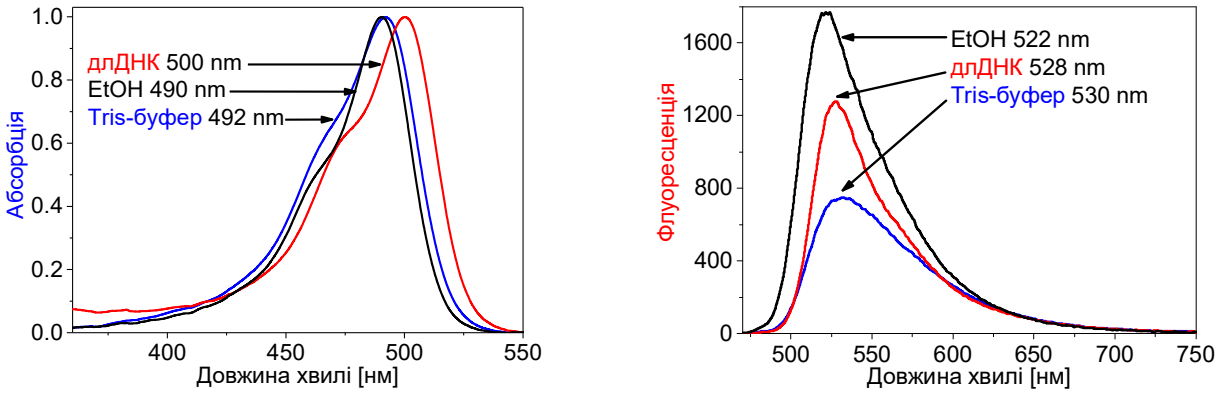
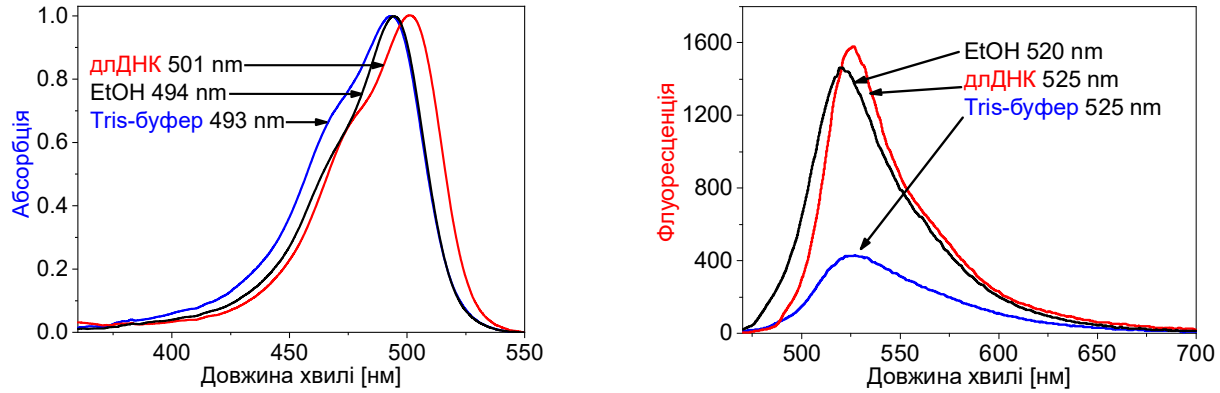


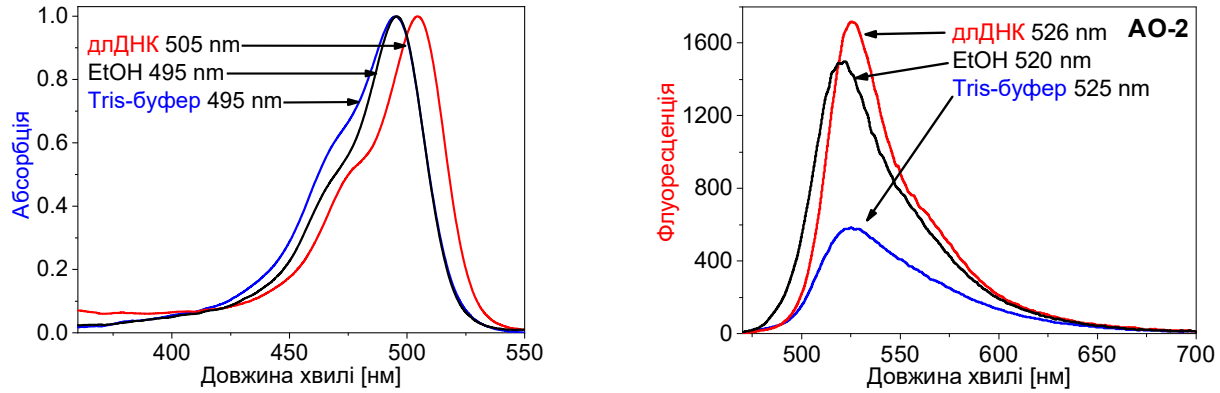
Рисунок 6.1 – Спектри поглинання та флуоресценції барвника **CyD-1**.



а) **АО**



б) **АО-1**



в) **АО-2**

Рисунок 6.2 – Спектри поглинання та флуоресценції для: а) акридинового оранжевого **АО**; б) барвника **АО-1**; в) барвника **АО-2**.

Максимуми поглинання барвників знаходяться в області 479–505 нм, а флуоресценції — в області 509–530 нм, що добре співпадає з оптичними каналами для збудження при 470–488 нм та детектування при 520 нм. Для всіх барвників спостерігаються батохромний та батофлорний зсуви

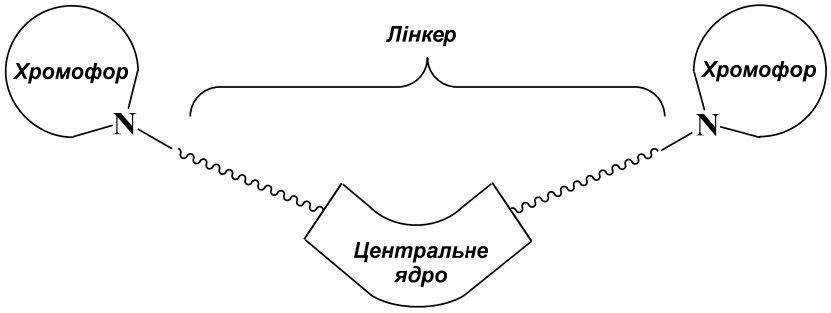
максимумів при переході з водного середовища до розчина длДНК, але у випадку етанолу, незважаючи на зниження полярності середовища, відбувається короткохвильовий зсув максимумів флуоресценції у порівнянні з водним середовищем для усіх барвників, проте значення цих зсувів є невеликими та не перевищують 10 нм. Стоксові зсуви мають тенденцію до зменшення при переході від водного буферного розчину до розчину длДНК, що, вочевидь, свідчить про збільшення конформаційної жорсткості молекули барвника при інтеркаляції у молекулу длДНК.

Квантові виходи барвників при зв'язуванні з длДНК збільшуються у два рази та більше, окрім акридинового оранжевого **АО**, у випадку якого, квантовий вихід збільшується в 1.77 рази з 27% до 48%. Найбільше значення квантового виходу (52%) спостерігається для комплекса барвника **АО-2** з длДНК. Проте у вільному стані у водному розчині барвник **АО-2** також має суттєву флуоресценцію (17%), але меншу за **АО**, тобто він повинен бути більш придатним для використання в ПЛР аналізах. У випадку ціанінового барвника **CyD-1**, який взагалі не флуоресціює у водному буферному розчині та етанолі, при зв'язуванні з длДНК спостерігається розгоряння флуоресценції до 32% квантового виходу. Використання барвника такого типу не буде супроводжуватися збільшенням фонового сигналу за рахунок його власної флуоресценції у незв'язаному стані.

7 Синтез та очистка димерних барвників-інтеркаляторів

З метою покращення спектральних властивостей мономерних барвників, зокрема для зменшення рівня флуоресценції барвника у вільному стані та збільшення квантового виходу комплексу барвник-длДНК, у цьому розділі ми дослідили синтез димерних барвників на їх основі. Ми очікували, що такі барвники за рахунок асоціації двох π-електронних хромофорних систем будуть схильними до агрегації у водному середовищі за відсутності длДНК. Водночас при *моно-* або *біс*-інтеркаляції в молекулу длДНК буде спостерігатися поява флуоресценції за рахунок порушення стекінг-взаємодії через віддалення двох хромофорних фрагментів молекули один від одного. До того ж завдяки збільшенню коефіцієнтів екстинкції біс-барвників (їх властивості поглинати світло) рівень флуоресценцентного сигналу, який можна держати від комплексу такого інтеркалятора з длДНК, буде вищим за той, що характерний для відповідного моно-інтеркалятора, завдяки поглинанню і випромінюванню обох фрагментів молекули флуорофора.

Димерні барвники складаються з двох планарних хромофорних систем, сполучених між собою за допомогою мостикової групи, так званого *лінкера:*



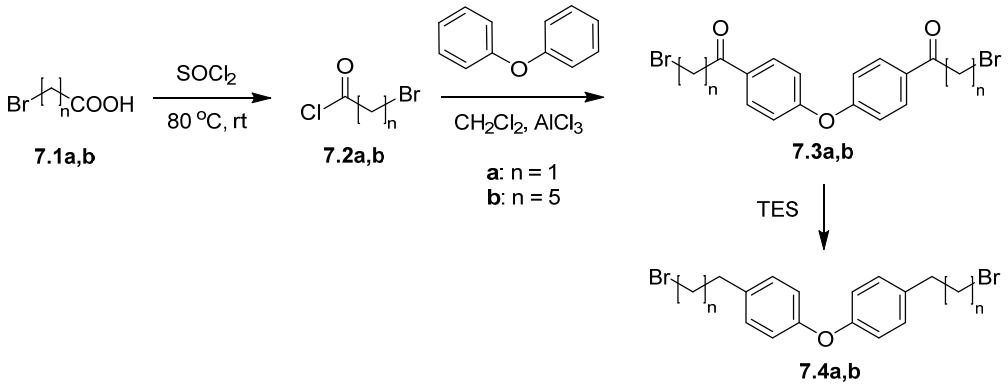
Довжина, гідрофільність, жорсткість та заряд лінкеру також впливають на спектрально-флуоресцентні та інтеркалюючі властивості димерних барвників. Саме тому, крім створення димерних інтеркаляторів, ми досліджували вплив природи лінкеру на властивості барвника при інтеркаляції.

7.1 Синтез лінкерів

Вибір лінкера має важливе значення при розробці нових або вдосконаленні вже існуючих димерних барвників, оскільки його природа впливає як на ступінь спорідненості барвника до длДНК так і на спектральні властивості утвореного комплекса барвник-длДНК, і на спосіб зв'язування барвника з длДНК. Лінкер повинен бути достатньо довгим, щоб обидва хромофорні фрагменти мали здатність інтеркалювати між комплементарними парами основ. Так, на прикладі діакридинових похідних було встановлено, що при довжині лінкера менше 8.8 Å відбувається моно-інтеркаляція, тоді як для димерних барвників з довшими лінкерами властива *біс*-інтеркаляція [66]. Крім того, позитивно заряджені лінкери мають вищу спорідненість до длДНК, на відміну від нейтральних лінкерів, і забезпечують міцне зв'язування барвника з длДНК. Наявність вторинної аміногрупи, амідної або етерної груп у лінкері підвищують його гідрофільність, що сприяє кращій розчинності димерного барвника у водних середовищах.

Враховуючи літературні відомості стосовно впливу різних лінкерів на характер зв'язування з длДНК на прикладі ціанінових, акридинових та фенантридинових гомо- та гетеродимерів, ми розробили та синтезували низку нових лінкерів, які, на наш погляд, сприятимуть утворенню флуоресцентних комплексів барвник-длДНК та не впливатимуть на хід ПЛР.

Синтез лінкерів на основі дифенілового етеру **7.4** проводили виходячи з відповідних бромозаміщених кислот **7.1** через стадію синтезу хлорангідридів кислот **7.2** з наступним ацилюванням дифенілового етеру у присутності кислоти Льюіса та подальшим відновленням утворених ацилпохідних **7.3** дією триетилсилана (TES).



Методика синтезу 2-бромоацетилхлориду (7.2a). В колбу вносять 19.5 г (0.14 моль) бромоцтової кислоти та 19.2 г (0.16 моль, 1.15 екв.) тіонілхлориду. Суміш нагрівають до 80 °C і залишають на ніч при перемішуванні, після чого охолоджують і фракціонують ($T_{кип}$ 95 °C (15 мм. рт. ст.)). Вихід: 11.1 г (51 %).

Методика синтезу 6-бромогексаноїлхлориду (7.2b). В колбу вносять 2 г (10 ммоль) 6-бромогексанової кислоти та 1.78 г (15 ммоль, 1.5 екв.) тіонілхлориду, 3.3 мл сухого бензола та 2 краплі сухого диметилформаміда. Суміш нагрівають до 80 °C і залишають на ніч при перемішуванні, після чого охолоджують, випаровують розчинник, видаляють залишок тіонілхлорида шляхом додавання і випаровування бензола (2 × 5 мл) та висушують залишок у вакуумі. Вихід 1.8 г (86 %).

Загальна методика ацилювання дифенілового етера. В колбу, ізольовану від вологи, вносять 7 мл сухого дихлорометана та 0.68 г (4.0 ммоль) дифенілового етера. Суміш охолоджують при перемішуванні до –10 ºС, після чого порціями, при температурі не вище –5 ºС додають до неї безводний $AlCl_3$ (1.49 г, 11.2 моль, 1.1 екв. у розрахунку на хлорангідрид), витримують 15 хв. при температурі –10 °C, після чого по краплях, при температурі не вище 0 °C додають 10.4 ммоль (1.3 екв. у рохрахунку на дифеніловий етер) відповідного ω-бромалканоїлхлорида **7.2a** або **7.2b**. Охолодження припинюють і продовжують перемішування 12 год. Реакційну суміш розбавляють водою (20 мл), підкислюють HCl (водн.), органічний шар відокремлюють, водний екстрагують дихлорометаном (3×10 мл). Органічні екстракти об'єднують, сушать над Na_2SO_4, і випаровують розчинник досуха.

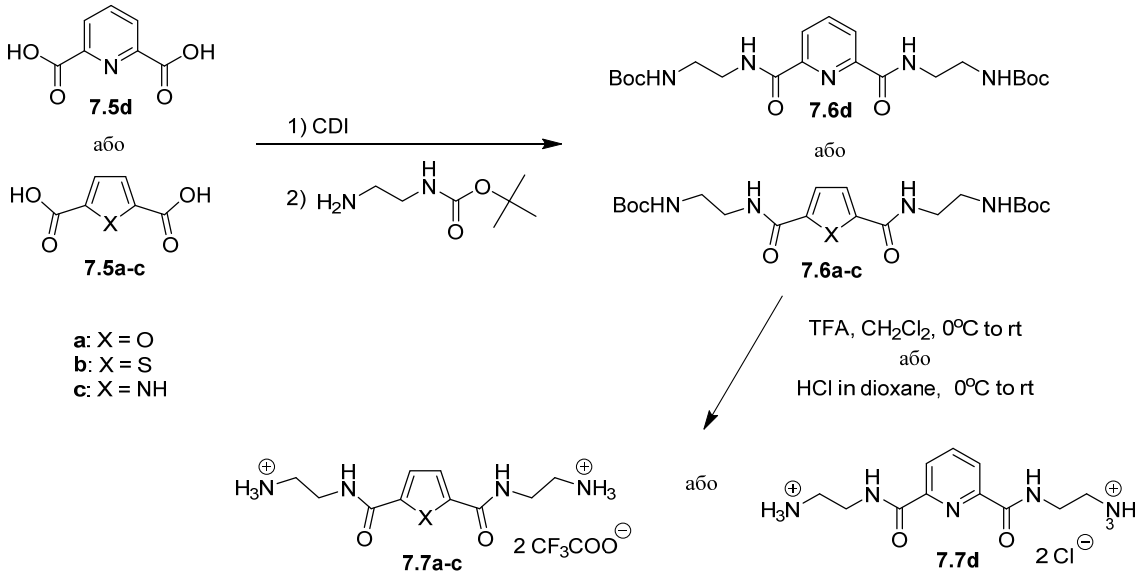
1,1'-(оксібіс(4,1-фенілен))біс(2-брометан-1-он) (7.3a). Очищений кристалізацією з суміші ізопропиловий спирт/хлороформ (2:1). Вихід: 1.1 г (62 %). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.ч.: 8.02 (д, J = 8.8 Гц, 4H), 7.10 (д, J = 8.8 Гц, 4H), 4.40 (с, 4H).

Загальна методика відновлення ацетофенонів 7.3. В атмосфері аргона, в колбу вносять при перемішуванні 2.4 ммоль відповідного дикетона **7.3a** або **7.3b**, 8 мл трифтороцтової кислоти та 1.45 г (12.5 ммоль, 2.6 екв.) триетилсилана (TES). Суміш залишають при перемішуванні на ніч, після чого виливають у 20 мл розбавленого розчину $NaHCO_3$, промивають водою та екстрагують дихлорометаном (3 × 10 мл), органічні шари об'єднують, та сушать над безводним Na_2SO_4. Розчинник випаровують досуха.

4,4'-оксибіс((2-бромоетил)бензол) (7.4a). Вихід: 700 мг (73 %). Чистота (^{1}H ЯМР) 90 % (продукт містить приблизно 10 % 4,4'-оксибіс((2-хлороетил)бензола). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.ч.: 7.16 (д, J = 8.7 Гц, 4H), 6.95 (д, J = 8.6 Гц, 4H), 3.54 (т, J = 7.6 Гц, 4H), 3.13 (т, J = 7.4 Гц, 4H).

4,4'-оксибіс((2-бромогексил)бензол) (7.4b). Вихід: 650 мг (95 %). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.ч.: 7.11 (д, J = 8.2 Гц, 4H), 6.95 (д, J = 8.2 Гц, 4H), 3.39 (т, J = 6.4 Гц, 4H), 2.58 (т, J = 7.3 Гц, 4H), 1.93–1.79 (м, 4H), 1.69–1.57 (м, 4H), 1.53–1.42 (м, 4H), 1.41–1.30 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 154.9, 137.1, 129.6, 118.3, 35.1, 34.2, 32.2, 30.9, 27.7, 27.3.

Гідрофільні лінкери **7.7**, що містять центральне гетероциклічне ядро, одержували конденсацією відповідних гетероциклічних 2,5-дикарбонових кислот **7.5** із *трет*-бутил-(2-аміноетил)карбаматом через стадію активації за участю *біс*-карбонілдіімідазолу (CDI) з наступним зняттям *трет*-бутоксикарбонільної захисної групи (Boc-групи) шляхом обробки відповідних захищених похідних **7.6** трифтороцтовою кислотою за наступною схемою:



Загальна методика синтезу Boc-захищених лінкерів 7.6. В атомосфері аргона до суспензії відповідної дикарбонової кислоти **7.5** (1.0 ммоль) у сухому ТГФ (2 мл) додавали CDI (405 мг, 2.5 ммоль, 1.25 екв.). Суміш нагрівали до кипіння і витримували протягом 1 години, після чого додавали до неї розчин *трет*-бутил-(2-аміноетил)карбамату (400 мг, 2.5 ммоль, 1.25 екв.) у сухому ТГФ (1 мл) і продовжували кип'ятіння протягом 16 годин. Після охолодження ТГФ випаровували, і до залишку додавали дихлорометан (10 мл) і воду (10 мл). Органічний шар відокремлювали, водний — екстрагували дихлорометаном (3 × 5 мл). Органічні екстракти об'єднували, дихлорометан випаровували, залишок кристалізували з ацетонітрилу.

Ді-*трет*-бутил-(((фуран-2,5-дикарбоніл)*біс*(азадієніл))*біс*(етан-2,1-диіл))-дикарбамат (7.6a). Вихід: 68 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.52 (шир. с, 2H), 7.10 (с, 2H), 6.92 (т, 2H, J = 5.8 Гц), 3.27 (м, 4H), 3.07 (м, 4H), 1.35 (с, 18H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 157.4, 155.7, 148.1, 114.4, 77.7, 38.8, 28.2.

Ді-*трет*-бутил-(((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азадієніл))*біс*(етан-2,1-диіл))-дикарбамат (7.6b). Вихід: 59 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.58 (м, 2H), 7.66 (с, 2H), 6.88 (м, 2H), 3.26 (м, 4H), 3.09 (м, 4H), 1.36 (с, 18H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 160.8, 155.7, 143.0, 128.1, 77.7, 38.9, 28.2.

Ді-*трет*-бутил-(((1*H*-пірол-2,5-дикарбоніл)*біс*(азадієніл))*біс*(етан-2,1-диіл))дикарбамат (7.6c). Вихід: 47 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 11.62 (с, 1H), 8.27 (т, 2H, J = 5.8 Гц), 6.84 (т, 2H, J = 5.8 Гц), 6.68 (с, 2H), 3.21 (м, 4H), 3.03 (м, 4H), 1.33 (с, 18H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 160.0, 155.7, 128.7, 111.5, 77.7, 38.9, 28.2.

Ді-*трет*-бутил-(((піридин-2,6-дикарбоніл)*біс*(азадієніл))*біс*(етан-2,1-диіл))дикарбамат (7.6d). Вихід: 84 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 9.33 (2H, т, J = 5.8 Гц, 2 NH), 8.22–8.11 (3H, м, 3 CH), 6.98 (2H, т, J = 5.8 Гц, 2 NH), 3.39 (4H, м, 2 CH_2), 3.16 (4H, м, 2 CH_2), 1.36 (18H, с, 2 $C(CH_3)_3$). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 163.3, 155.8, 148.6, 139.4, 124.1, 77.7, 39.4, 39.2, 28.2.

Загальна методика зняття захисної Boc-групи для 7.6a–c. До суспензії відповідного Boc-захищеного лінкера **7.6a–c** (0,2 ммоль) у CH_2Cl_2 (5 мл) додавали трифтороцтову кислоту (1.2 мл, 16.0 ммоль) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували 1.5 год. Хід реакції контролювали за допомогою ТШХ (елюент: хлороформ-метанол (2:1)). Після закінчення реакції суміш концентрували за допомогою ротаційного випаровувача, залишок досушували у вакуум-ексикаторі над КОН.

Дитрифтороацетат 2,2'-(фуран-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*-(етан-1-амінію) (7.7a). Вихід: 97 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.74 (т, 2H, J = 5.9 Гц), 7.87 (шир. с, 6H), 7.21 (с, 2H), 3.51 (кв, 4H, J = 6.1 Гц), 2.98 (кв, 4H, J = 6.1 Гц). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 158.6 (кв, J = 34.4 Гц, CF_3COO^-), 157.9, 148.1, 116.3 (кв, J = 295.9 Гц, CF_3COO^-), 114.8, 38.5, 36.5.

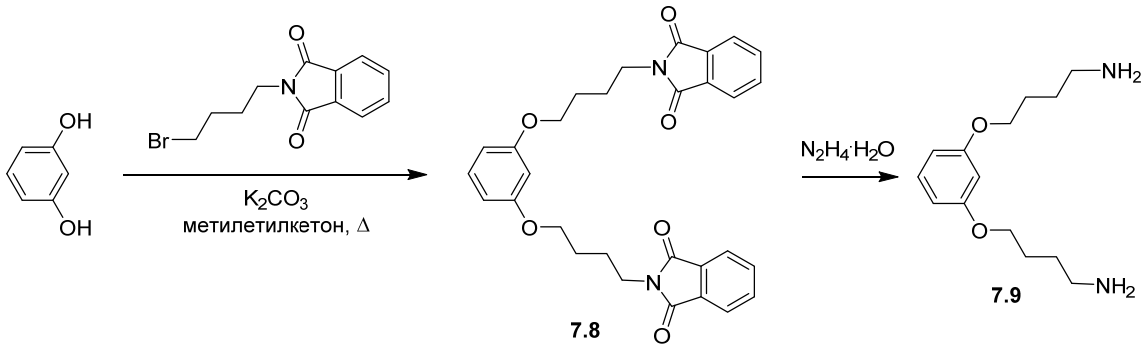
Дитрифтороацетат 2,2'-(тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*-(етан-1-амінію) (7.7b). Вихід: 86 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч: 8.79 (т, 2H, J = 5.5 Гц), 7.84 (шс, 6H), 7.71 (с, 2H), 3.48 (кв, 4H, J = 6.1 Гц), 2.98 (кв, 4H, J = 6.1 Гц). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 161.4, 158.6 (кв, J = 34.1 Гц, CF_3COO^-), 142.9, 128.6, 116.4 (кв, J = 295.9 Гц, CF_3COO^-), 38.5, 37.1.

Дитрифтороацетат 2,2'-(пірол-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*-(етан-1-амінію) (7.7c). Вихід: 92 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.:

11.65 (с, 1H), 8.48 (т, 2H, *J* = 5.6 Гц), 7.86 (шс, 6H), 6.77 (с, 2H), 3.46 (кв, 4H, *J* = 6.1 Гц), 2.96 (кв, 4H, *J* = 6.0 Гц).

Методика зняття захисної Boc-групи для 7.6d. Boc-захищене похідне **7.6d** (0.32 ммоль) додавали до 25%-ного розчину соляної кислоти у діоксані (5 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували 30 хвилин. Хід реакції контролювали за допомогою ТШХ (елюент: хлороформ-метанол (1:2)). Після закінчення реакції суміш концентрували, сушили у вакуум-ексикаторі над КОН і отримували цільову сполуку **7.7d** у вигляді білого порошку з виходом 98 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 10.03 (2H, т, *J* = 5.8 Гц, 2 NH), 8.24 (6H, уш. с, 2 NH_3^+), 8.23–8.14 (3H, м, 3 CH), 3.65 (4H, м, 2 CH_2), 3.09 (4H, м, 2 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 163.6, 148.5, 139.4, 124.4, 38.8, 36.7.

Напівгнучкий лінкер **7.9** на основі похідного резорцину одержували шляхом алкілювання резорцину 2-(4-бромобутил)ізоіндолін-1,3-діоном з подальшим зняттям фталатної захисної групи обробкою захищеного продукту **7.8** гідразингідратом за схемою:



Методика синтезу 2,2'-((1,3-фенілен-*біс*(окси))*біс*(бутан-4,1-діїл))*біс*-(ізоіндолін-1,3-діона) (7.8). Суміш резорцина (110 мг, 1.0 ммоль), 2-(4-бромобутил)ізоіндолін-1,3-діона (621 мг, 2.2 ммоль, 1.1 екв.), свіжопрокаленого K_2CO_3 (829 мг, 6.0 ммоль, 3 екв.) кип'ятили у сухому метилетилкетоні (10 мл) при перемішуванні зі зворотнім холодильником і висушувальним патроном, заповненим свіжопрокаленими цеолітами (CaA), без доступу вологи, протягом 48 годин. Після охолодження теплу реакційну суміш фільтрували крізь тонкий шар *Celite 535* і промивали теплим метилетилкетоном (3 × 10 мл). Фільтрат

випаровували, залишок кристалізували з ацетонітрила. Вихід 343 мг (67 %). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.ч.: 7.83 (м, 4H), 7.70 (м, 4H), 7.11 (т, 1H, J = 8.2 Гц), 6.43 (д, 2H, J = 8.1 Гц), 6.40 (с, 1H), 3.95 (т, 4H, J = 5.8 Гц), 3.75 (т, 4H, J = 6.7 Гц), 2.08–1.55 (м, 8H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $CDCl_3$) δ 168.5, 160.2, 134.02, 132.3, 129.9, 123.3, 106.9, 101.6, 67.3, 37.8, 26.8, 25.5.

Методика синтезу 4,4'-(1,3-фенілен-*біс*(окси))*біс*(бутан-1-аміна) (**7.9**). Суміш захищеної сполуки **7.8** (235 мг, 0.5 ммоль) і гідразингідрату (85 % водний розчин, 0.5 мл) кип'ятили у етанолі (5 мл) зі зворотнім холодильником в атмосфері аргона протягом 16 годин. Осад побічного продукта (2,3-дигідрофталазін-1,4-діона), який утворився під час реакції, відфільтровували і промивали на фільтрі хлороформом (3 × 5 мл). Фільтрат промивали 2 М розчином натрій гідроксиду (3 × 10 мл), висушували над Na_2SO_4 і випаровували, одержуючи продукт у вигляді густої рідини світло-жовтого кольору з кількісним виходом. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.ч.: 7.14 (т, 1H, J = 8.1 Гц), 6.48 (д, 2H, J = 8.1 Гц), 6,43 (с, 1H), 3,95 (т, 4H, J = 6.4 Гц), 2,76 (т, 4H, J = 7.0 Гц), 1.81 (м, 4H), 1.61 (м, 4H), 1.22 (м, 4H).

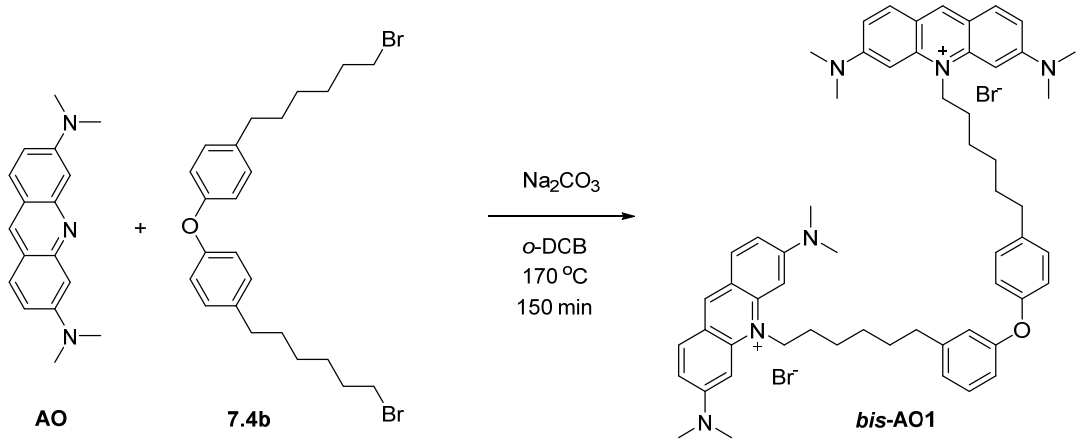
7.2 Синтез димерних барвників на основі акридинового оранжевого

7.2.1 Синтез димерних барвників алкілюванням акридинового оранжевого

Перший підхід до синтезу димерних барвників ґрунтується на кватернізації акридинового оранжевого дигалогеновмісними алкілюючими реагентами.

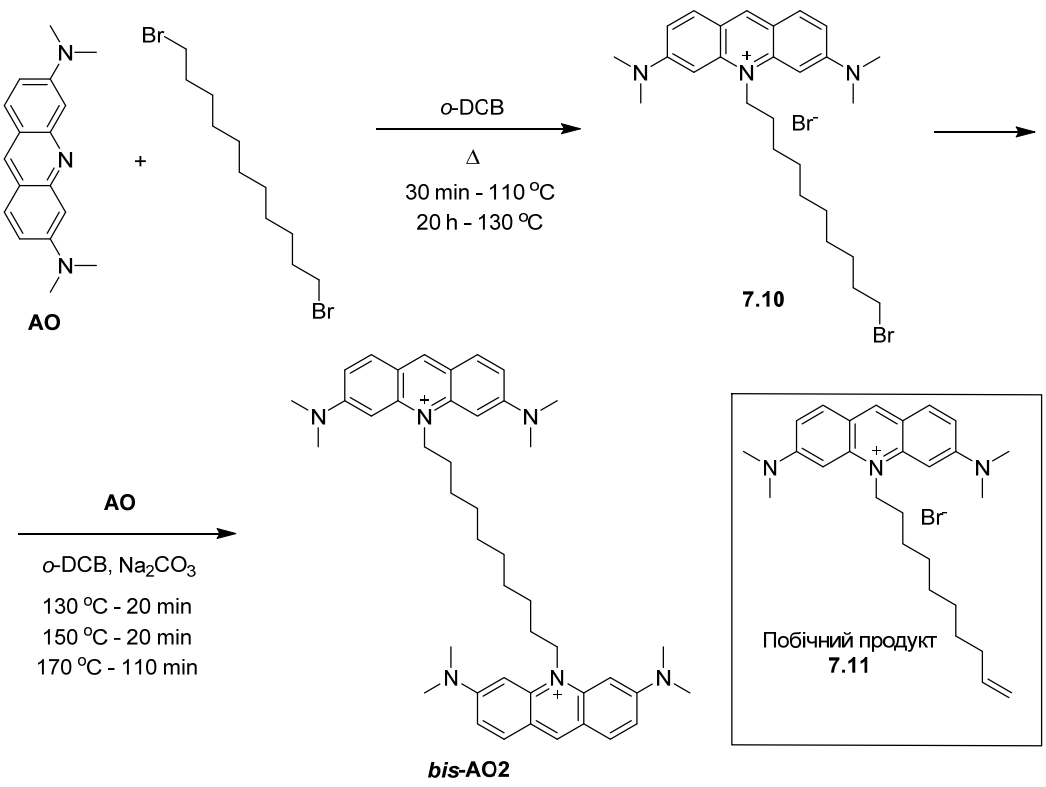
Для синтезу димерного барвника ***bis*-AO1**, що містить два фрагменти акридинового оранжевого, сполучених між собою напівгнучким гідрофобним лінкером на основі дифенілового етеру, ми використали умови, успішно застосовані для кватернізації **AO** (*див. Розділ 5, п. 5.3*). Суміш **AO**, Na_2CO_3 та відповідного лінкеру **7.4b** у *о*-DCB нагрівали при 170 °C впродовж 150 хвилин. Хід реакції контролювали за допомогою ВЕРХ. Після охолодження та обробки реакційної суміші гексаном залишок розчиняли у

невеликій кількості хлороформу та очищували за допомогою колонкової хроматографії з використанням сумішей метанолу з хлороформом (0–20% метанолу) у градієнтному режимі елюювання.



У ході аналізу фракцій за допомогою ВЕРХ, ^{1}H ЯМР спектроскопії та мас-спектрометрії було встановлено, що поряд із цільовим продуктом ***bis*-AO1** утворюються два мономерні барвники, один із яких містить термінальний атом брому, а інший – подвійний зв'язок, сформований у результаті відщеплення молекули HBr. Отже, синтез цільового димерного барвника ***bis*-AO1** у зазначених умовах проходить неселективно та з низьким виходом, що пояснюється утворенням нереакційноздатного мономерного продукту з подвійним зв'язком.

Для запобігання відщеплення молекули HBr ми спробували пом'якшити умови реакції та на прикладі синтезу димерного барвника ***bis*-AO2**, в якому хромофорні системи сполучені гнучким аліфатичним лінкером, дослідити двостадійний підхід. Для цього до розчину акридинового оранжевого у *o*-DCB додавали 1,10-дибромодекан та нагрівали реакційну суміш при 110 °C впродовж 30 хвилин. Оскільки реакція йшла дуже повільно при 110 °C, температуру підняли до 130 °C. Хід реакції контролювали за допомогою ВЕРХ.



Після охолодження, обробки реакційної суміші та очистки технічного продукту за допомогою колонкової хроматографії було виділено дві фракції, одна із яких була сумішшю двох продуктів з дуже близьким часом утримання, а інша – більш гідрофільним продуктом. Згідно з даними мас-спектрометрії перша фракція містила цільовий мономерний барвник **7.10** разом із похідним **7.11**, отриманим шляхом елімінування молекули HBr, а друга фракція – димерний барвник ***bis*-AO2**.

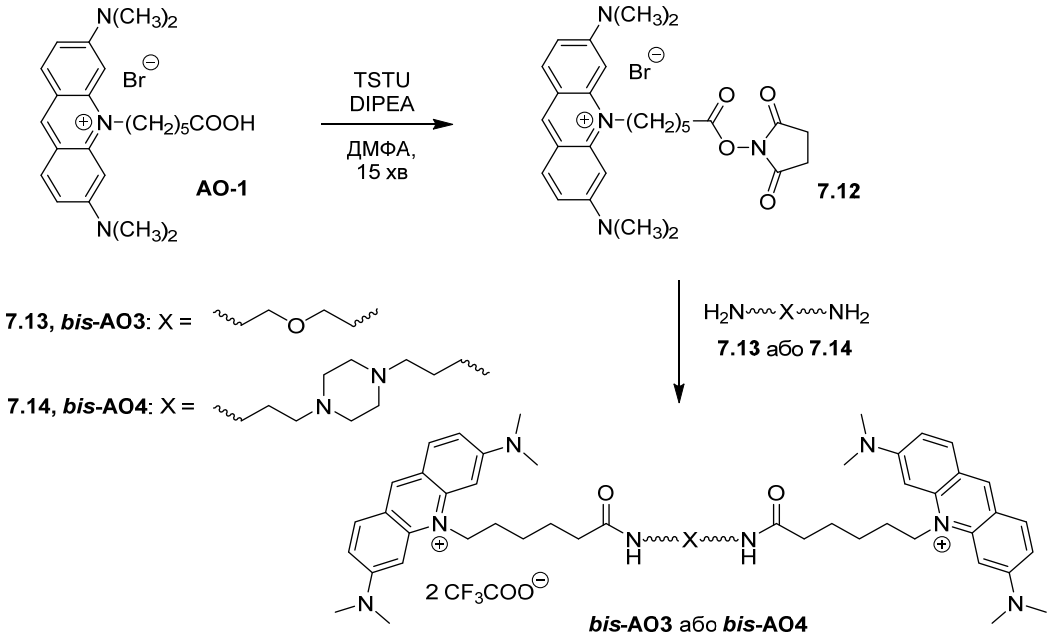
На наступній стадії ми ввели суміш мономерних барвників у реакцію з **AO** у присутності Na_2CO_3 з метою синтезу димерного барвника ***bis*-AO2**. Однак, згідно даних ВЕРХ та мас-спектрів фракцій, зібраних у ході очистки реакційної суміші, цільовий барвник ***bis*-AO2** було одержано з дуже низьким виходом (5%), що пояснюється утворенням на першій та другій стадіях нереакційноздатного мономерного продукту **7.11** з термінальним подвійним зв'язком.

Ми варіювали розчинники, співвідношення реагентів та час реакції, але, на жаль, нам не вдалося підібрати селективні умови для цілеспрямованого синтезу димерних барвників типу ***bis*-AO1** та ***bis*-AO2**.

7.2.2 Синтез димерних барвників конденсацією діамінів з активованим мономерним барвником АО-1

В основі другого підходу до синтезу димерних барвників на основі акридинового оранжевого лежить конденсація кислоти **АО-1**, отриманої згідно розроблених методик (*див. Розділ 5, п. 5.3*), з різними діамінами у присутності активуючого реагенту.

На першому етапі виконання проєкту ми синтезували мономерний барвник **АО-2** взаємодією **АО-1** з 2-(2-аміноетокси)етан-1-аміном у присутності активуючого реагенту. Ми продовжили дослідження і на звітному етапі отримали димерний барвник ***bis*-АО3** виходячи з **АО-1** через стадію утворення *N*-гідроксисукцинімідного естеру **7.12** з подальшою взаємодією останнього з 2-(2-аміноетокси)етан-1-аміном.



Аналогічним чином ми отримали димерний барвник ***bis*-АО4** при використанні 3,3'-(піперазин-1,4-діїл)*біс*(пропан-1-аміну), замість 2-(2-аміноетокси)етан-1-аміну, для створення містка між хромофорними фрагментами.

Загальна методика синтезу димерних барвників *bis*-АО3 та *bis*-АО4. До розчину **АО-1** (200 мг, 0.43 ммоль) у ДМФА (2 мл) додають *N*,*N*-діізопропілетиламін (225 мкл, 1.29 ммоль) і тетрафтороборат *N*,*N*,*N*′,*N*′-

тетраметил-O-(N-сукцинімідил)уронію (258.9 мг, 0.86 ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі впродовж 15 хвилин. Утворення *N*-гідроксисукцинімідного естеру контролюють за допомогою ВЕРХ. Далі додають відповідний діамін **7.13** або **7.14** (0.306 ммоль) та перемішують при кімнатній температурі впродовж 16 годин. До реакційної суміші додають невелику кількість води та очищують за допомогою колонкової хроматографії з використанням оберненофазового силікагелю RP-18 як сорбенту та сумішей ацетонітрилу з водою (0-25 % ацетонітрилу) з додаванням 0.05% трифтороцтової кислоти у градієнтному режимі елюювання.

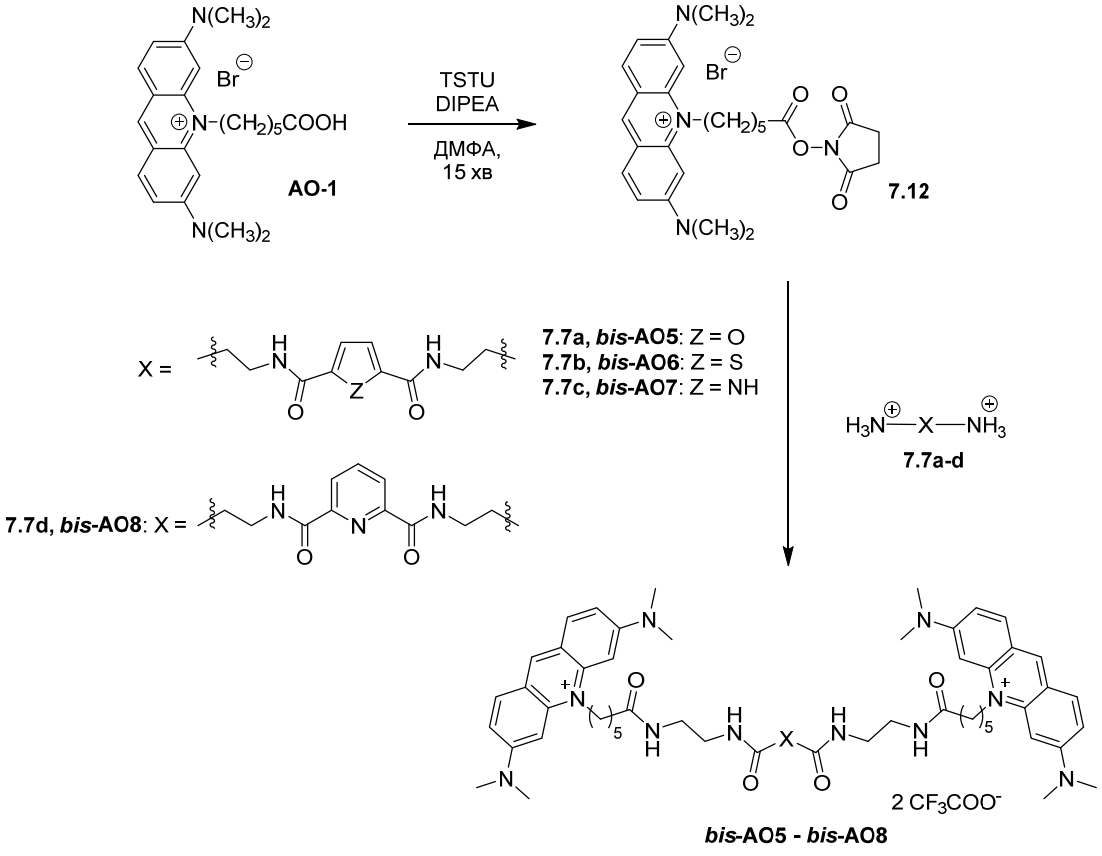
Дитрифтороацетат 10,10'-((окси-*біс*(етан-2,1-діїл))*біс*(азендіїл))*біс*(6-оксогексан-6,1-діїл))*біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-AO3). Вихід: 34 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.62 (2H, с, ArH), 8.24–8.12 (2H, м, NH), 7.81 (4H, д, J = 9.2 Гц, ArH), 7.19 (4H, д, J = 9.2 Гц, ArH), 6.49 (4H, с, ArH), 4.61–4.48 (4H, м, 2 N^+CH_2), 3.40 (4H, т, J = 5.6 Гц, 2 CH_2), 3.24 (24H, с, 4 $N(CH_2)_3$), 3.23–3.17 (4H, м, 2 CH_2), 2.16 (4H, т, J = 7.2 Гц, 2 NCH_2), 1.82–1.71 (4H, м, 2 CH_2), 1.70–1.60 (4H, м, 2 CH_2), 1.58–1.47 (4H, м, 2 CH_2).

Дитрифтороацетат 10,10'-((піперазин-1,4-діїл)*біс*(пропан-3,1-діїл))-*біс*(азанедіїл))*біс*(6-оксогексан-6,1-діїл))*біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-AO4). Вихід: 52 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8.80 (2H, с, ArH), 8.01–7.93 (2H, м, NH), 7.94 (4H, д, J = 9.3 Гц, ArH), 7.29 (4H, д, J = 9.6 Гц, ArH), 6.65 (4H, с, ArH), 4.77–4.64 (4H, м, 2 N^+CH_2), 3.38 (4H, кв, J = 7.0 Гц, 2 $NHCH_2$), 3.28 (24H, с, 4 $N(CH_2)_3$), 3.15–3.03 (8H, м, фрагмент піперазину), 2.13 (4H, т, J = 7.3 Гц, 2 NCH_2), 1.94–1.81 (4H, м, 2 CH_2), 1.82–1.71 (4H, м, 2 CH_2), 1.70–1.61 (4H, м, 2 CH_2), 1.60–1.49 (4H, м, 2 CH_2), 1.08 (4H, т, J = 7.0 Гц, 2 $C(O)CH_2$).

Далі ми дослідили синтез димерних барвників-інтеркаляторів ***bis*-AO5**–***bis*-AO7**, які мають дві планарні хромофорні системи, сполучені між собою напівгнучким лінкером із центральним гетероароматичним ядром. Молекулярний дизайн цих димерів ґрунтується на поєднанні у молекулах

барвника корисних властивостей, притаманних флуоресцентним барвникам, здатним до жолобкового зв'язування з длДНК (сприятливий кут для селективного зв'язування барвника з малим жолобком длДНК), а також димерним барвникам-інтеркаляторам (здатність до *біс*-інтеркаляції, висока придатність для детекції результатів ПЛР). Так, для забезпечення необхідного вигину лінкер містить центральне ароматичне або гетероароматичне ядро із замісниками, розташованими під деяким кутом один до одного, що забезпечує форму «півмісяця».

Цільові димерні барвники ***bis*-AO5 – *bis*-AO7** були одержані аналогічно синтезу ***bis*-AO3** та ***bis*-AO4** через стадію активації COOH-групи **AO-1** при взаємодії з TSTU з утворенням *N*-гідроксисукцинімідного естеру, який далі реагував з відповідним лінкером типу **7.7**.



Загальна методика синтезу димерних барвників *bis*-AO5 – *bis*-AO8. Суміш **AO-1** (100 мг, 0.22 ммоль), TSTU (132 мг, 0.44 ммоль) та діізопропілетиламіну (DIPEA, 157 мкл, 0.9 ммоль) у ДМФА (2 мл)

перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі. Утворення *N*-гідрокси-сукцинімідного естеру контролюють за допомогою ВЕРХ. До реакційної суміші додають відповідний попередник лінкера **7.7** (0.11 ммоль) і перемішують при кімнатній температурі впродовж 2 годин. Реакційну масу концентрують на ротаційному випаровувачі, обробляють діетиловим етером та досушують у вакуум-ексикаторі. Для очистки смолоподібний осад розчиняють у невеликій кількості суміші вода-ацетонітрил (10:1) та очищують колонковою хроматографією на оберненофазному силікагелі RP-18 з використанням сумішей ацетонітрилу з водою з додаванням трифторооцтової кислоти у кількості 0.05 об. % (2–50 об. % ацетонітрилу) у градієнтному режимі елюювання.

Дитрифтороацетат 10,10'-(((фуран-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедіїл))*біс*-(етан-2,1-діїл))*біс*(азанедіїл))*біс*(6-оксогексан-6,1-діїл))*біс*((3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-АО5). Вихід: 47 %. Чистота (ВЕРХ): 96.0 %. ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.75 (2Н, с, Н(9) та Н(9′) акридинових фрагментів), 8.62–8.46 (2Н, м, 2 NH), 8.05–7.87 (4Н, м, Н(1), Н(1′), Н(8) та Н(8′) акридинових фрагментів), 7.92 (2Н, с, тіофеновий фрагмент), 7.26 (4Н, д, J = 9.5 Гц, Н(4), Н(4′), Н(5) та Н(5′) акридинових фрагментів), 7.11 (2Н, с, 2 NH), 6.72–6.56 (4Н, м, Н(2), Н(2′), Н(7) та Н(7′) акридинових фрагментів), 4.80–4.60 (4Н, м, 2 NCH_2), 3.26 (24Н, с, 4 $N(CH_3)_2$), 3.26–3.12 (8Н, м, 2 $N(CH_2)_2N$), 2.18–2.05 (4Н, м, 2 CH_2), 1.93–1.75 (4Н, м, 2 CH_2), 1.72–1.43 (8Н, м, 4 CH_2). Розраховано для $C_{60}H_{72}F_6N_{10}O_9$ (1191.29): C, 60.49; H, 6.09; N, 11.76%. Знайдено: C, 60.32; H, 6.18; N, 11.85%. Мас-спектр MS-ESI (m/z) 482.38 $(M - 2CF_3COO^-)^{2+}$.

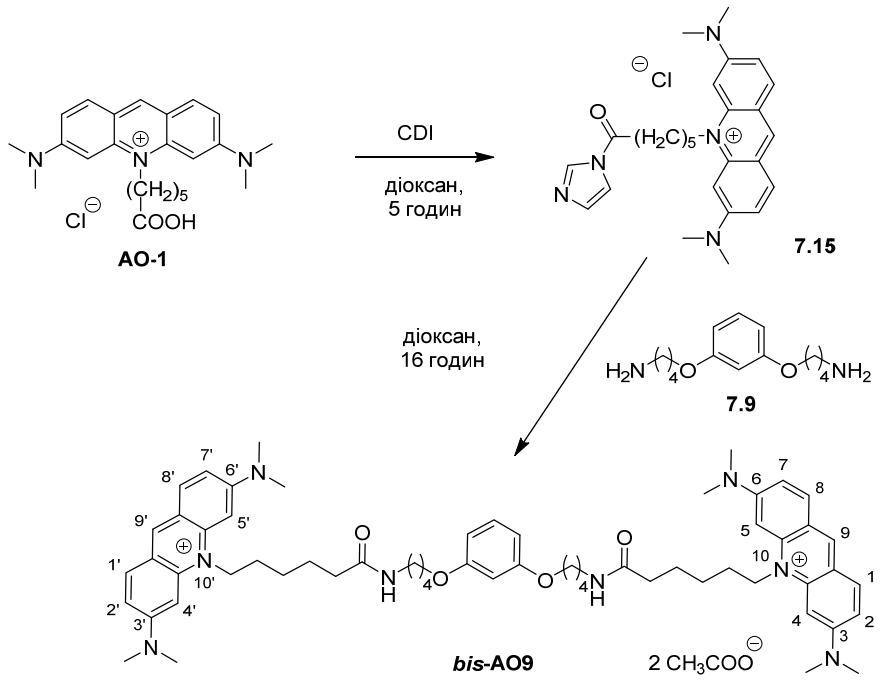
Дитрифтороацетат 10,10'-(((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедіїл))-*біс*(етан-2,1-діїл))*біс*(азанедіїл))*біс*(6-оксогексан-6,1-діїл))*біс*((3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-АО6). Вихід: 57 %. Чистота (ВЕРХ): 97.0 %. ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.80 (2Н, с, Н (9) та Н(9′) акридинових фрагментів), 8.68–8.56 (2Н, м, 2 NH), 8.01–7.90 (4Н, м, Н(1), Н(1′), Н(8) та Н(8′) акридинових фрагментів), 7.93 (2Н, с, тіофеновий фрагмент), 7.64 (2Н, с, 2 NH), 7.29 (4Н, д, J = 9.5 Гц, Н(4), Н(4′), Н(5) та Н(5′) акридинових фрагментів), 6.71–

6.57 (4H, м, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів), 4.79–4.62 (4H, м, 2 NCH_2), 3.28 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 3.28–3.11 (8H, м, 2 $N(CH_2)_2N$), 2.18–2.05 (4H, м, 2 CH_2), 1.94–1.79 (4H, м, 2 CH_2), 1.73–1.47 (8H, м, 4 CH_2). Розраховано для $C_{60}H_{72}F_6N_{10}O_8S$ (1207.35): C, 59.69; H, 6.01; N, 11.60%. Знайдено: C, 59.77; H, 6.09; N, 11.68%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 490.70 $(M - 2CF_3COO^-)^{2+}$.

Дитрифтороацетат 10,10'-(((1*H*-пірол-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))-*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(азанедііл))*біс*(6-оксогексан-6,1-дііл))*біс*((3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-АО7). Вихід: 45 %. Чистота (ВЕРХ): 94.0 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.85 (1H, с, NH фрагменту пірола), 8.77 (2H, с, H(9) та H(9′) акридинових фрагментів), 8.66–8.51 (2H, м, 2 NH), 8.07–7.89 (4H, м, H(1), H(1′), H(8) та H(8′) акридинових фрагментів), 7.93 (2H, с, фрагмент піролу), 7.25 (4H, д, J = 9.5 Гц, H(4), H(4′), H(5) та H(5′) акридинових фрагментів), 7.13 (2H, с, 2 NH), 6.74–6.60 (4H, м, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів), 4.81–4.63 (4H, м, 2 NCH_2), 3.27 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 3.25–3.12 (8H, м, 2 $N(CH_2)_2N$), 2.19–2.07 (4H, м, 2 CH_2), 1.91–1.72 (4H, м, 2 CH_2), 1.74–1.46 (8H, м, 4 CH_2). Розраховано для $C_{60}H_{73}F_6N_{11}O_8$ (1190.30): C, 60.54; H, 6.18; N, 12.94%. Знайдено: C, 60.69; H, 6.20; N, 12.87%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 481.81 $(M - 2CF_3COO^-)^{2+}$.

Дитрифтороацетат 10,10'-(((піридин-2,6-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))-*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(азанедііл))*біс*(6-оксогексан-6,1-дііл))*біс*((3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію (*bis*-АО8). Вихід: 45 %. Чистота (ВЕРХ): 97.0 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.48 (2H, с, H(9) та H(9′) акридинових фрагментів), 8.59 (2H, уш. с, 2 NH), 8.21 (2H, уш. с, 2 NH), 8.14–8.03 (3H, м, піридиновий фрагмент), 7.78 (4H, д, J = 9.0 Гц, H(1), H(1′), H(8) та H(8′) акридинових фрагментів), 7.16 (4H, д, J = 9.0 Гц, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів, 6.44 (4H, с, H(4), H(4′), H(5) та H(5′) акридинових фрагментів), 4.57–4.42 (4H, м, 2 N^+CH_2), 3.36–3.20 (8H, м, 2 $N(CH_2)_2N$), 3.21 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 2.23–2.09 (4H, м, 2 CH_2), 1.83–1.59 (8H, м, 4 CH_2), 1.58–1.44 (4H, м, 2 CH_2). Мас-спектр MS-ESI (m/z) 488.36 $(M - 2CF_3COO^-)^{2+}$.

Спроба синтезувати кватернізовану сіль *біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)-акридин-10-ію ***bis*-AO9** на основі **AO-1** та попередника лінкера **7.9** з використанням вищенаведених умов була безуспішною і призвела до виділення вихідних сполук, що пояснюється поганою розчинність сполуки **7.9** у ДМФА. У пошуках альтернативних умов ми варіювали розчинники, час та температуру реакції, а також реагенти для активації утворення амідного зв'язку. Нам вдалося отримати цільовий барвник ***bis*-AO9** шляхом активації **AO-1** з використанням *N*,*N*′-карбонілдіімідазолу (CDI) через стадію утворення ацилімідазоліду типу **7.15** з подальшою взаємодією останнього з попередником лінкера **7.9** за наступною схемою:



Методика синтезу димерного барвника *bis*-AO9. До суспензії **AO-1** (208 мг, 0.50 ммоль) у сухому діоксані (10 мл) у зустрічному струмі аргону додають CDI (122 мг, 0.75 ммоль). Одержану суміш перемішують при 90 ºС протягом 5 годин, після чого у зустрічному струмі аргону до неї додають сполуку **7.9** (60 мг, 0.25 ммоль) і продовжують перемішування при 90 ºС протягом приблизно 16 годин. Хід реакції контролюють за допомогою ВЕРХ. Рідку фазу реакційної суміші декантують, а твердий залишок промивають гарячим діоксаном (3 × 5 мл). Залишок після промивання розчиняють у

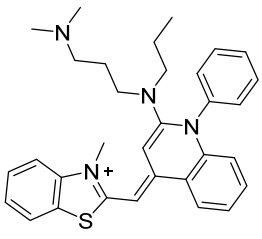
мінімальній кількості суміші 15 об. % ацетонітрилу у воді та очищують колонковою хроматографією на скляній колонці (36 × 1.3 см), заповненій оберненофазним сорбентом RP18 (Luknova), в режимі градієнтного елюювання з використанням сумішей ацетонітрилу з водою з додаванням оцтової кислоти у кількості 0.05 об. % (15–25 об. % ацетонітрилу) у градієнтному режимі елюювання. Збагачені цільовою сполукою фракції (контроль — ВЕРХ) об'єднують, випаровують, розчиняють у мінімальній кількості суміші 40 об. % ацетонітрилу у воді і ще раз очищують колонковою хроматографією на оберненофазному сорбенті RP18 (Luknova) з використанням суміші 40 об. % ацетонітрилу у воді як рухомої фази. Вихід: 27 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.82 (2H, с, H (9) та H(9′) акридинових фрагментів), 7.99–7.87 (4H, м, H(1), H(1′), H(8) та H(8′) акридинових фрагментів), 7.61 (2H, с, 2 NH), 7.24 (4H, д, J = 9.5 Гц, H(4), H(4′), H(5) та H(5′) акридинових фрагментів), 7.10 (1H, т, J = 8.1 Гц, Ph), 6.71–6.57 (4H, м, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів), 6.44 (2H, д, J = 8.1 Гц, Ph), 6.32 (1H, с, Ph), 4.79–4.62 (4H, м, 2 N^+CH_2), 3.95 (4H, т, J = 6.4 Гц, 2 OCH_2), 3.27 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 3.27–3.11 (4H, м, 2 NCH_2), 2.32 (6H, с, 2 CH_3COO^-), 2.17–2.03 (8H, м, 4 CH_2), 1.92–1.78 (8H, м, 4 CH_2), 1.72–1.45 (8H, м, 4 CH_2). Розраховано для $C_{65}H_{86}N_8O_8$ (1095.4): C, 70.17; H, 7.91; N, 10.23%. Знайдено: C, 70.25; H, 8.01; N, 10.14%. Мас-спектр MS-ESI (m/z) 488.36 $(M - 2CF_3COO^-)^{2+}$.

8 Налагодження синтезу відомих барвників SYBR Green I та YOYO-1

Розділ 8 присвячено відпрацюванню та оптимізації методів синтезу закордонних люмінесцентних матеріалів, зокрема барвників-інтеркаляторів **SYBR Green I** та **YOYO-1**, які втратили правовий захист в Україні. Сьогодні ці матеріали виробляються за кордоном та постачаються в Україну за надзвичайно високими цінами. Саме тому власне виробництво цих барвників дозволить знизити, щонайменше у 2 рази, їх собівартість у порівнянні з вартістю імпортних барвників.

8.1 Несиметричний ціаніновий барвник SYBR Green I

SYBR Green I (**SG**) – несиметричний ціаніновий барвник-інтеркалятор, який, на відміну від інших барвників цього типу, є достатньо безпечним та демонструє покращені спектральні властивості. Так, **SG** у 20-25 разів більш чутливий і виявляє набагато більшу специфічність щодо длДНК, ніж бромід етидію **EtBr**. При цьому після зв'язування з длДНК інтенсивність флуоресценції утвореного комплексу посилюється у 800–1000 разів у порівнянні з вільним барвником. Крім того, **SG** демонструє високу термостабільність в умовах ПЛР при багаторазовому нагріванні до температури денатурації [5,61].



SG

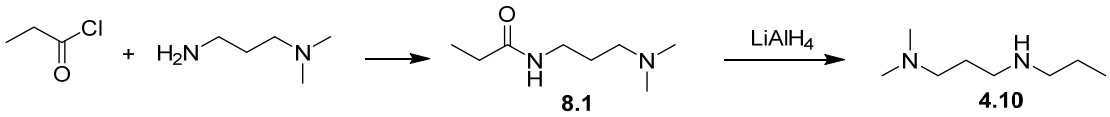
Через сприятливу сукупність практично важливих властивостей **SG** у теперішній час є одним з найбільш широко використовуваних флуоресентних барвників у повсякденній практиці проведення аналізів ПЛР в режимі реального часу.

8.1.1 Синтез вихідних сполук для отримання SYBR Green I

Для синтезу кватернізованої солі 2-метилтіобензотіазолію **4.6** ми застосували метод, наведений у *Розділі 5, п. 5.3*, що включає S-алкілювання 2-меркаптобензотіазолу йодометаном з подальшою кватернізацією надлишком метил 4-метилбензолсульфонату при 100 °С.

В умовах реакції Ульмана при взаємодії 2-гідрокси-4-метилхіноліну з 4-йодобензолом у присутності калій карбонату та добре подрібненої міді було одержано похідне *N*-феніл-2-хінолону **4.8**, наступна взаємодія якого з фосфор(V)трихлороксидом у присутності каталітичної кількості ДМФА привела до хлорімінієвої солі **4.9** (*див. Розділ 5, п. 5.3*).

Для введення $N(Alk)_2$-групи у положення 2 хінолінового фрагменту монометинового барвника шляхом нуклеофільного заміщення атома хлору ми відпрацювали умови отримання нуклеофільного реагенту – вторинного аміну **4.10** (*див. Розділі 5, п. 5.3*). Для цього ацилюванням *N*,*N*-диметилпропан-1,3-діаміну хлорангідридом пропіонової кислоти було синтезовано амід **8.1**, який далі відновлювали дією $LiAlH_4$ у ТГФ до цільового вторинного аміну.



8.1 **4.10**

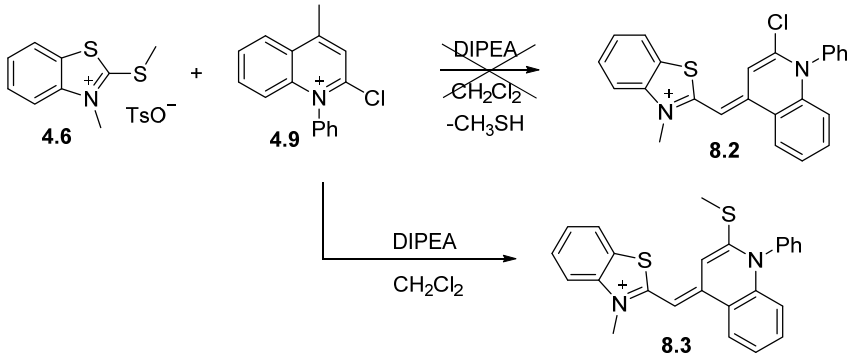
Методика синтезу *N*-(3-(диметиламіно)пропіл)пропіонаміду (8.1). В атмосфері аргону, до охолодженого до 0 ºС розчину N^1,N^1-диметилпропан-1,3-діаміна (17.58 г, 190 ммоль) у сухому дихлорометані (80 мл) по краплях додають пропіонілхлорид (21.36 г, 209 ммоль, 1.1 екв.). Суміш залишають при перемішуванні на ніч, після чого випаровують дихлорометан, додають до залишку розчин $Na_2CO_3 \times 10\ H_2O$ (60.0 г, 210 ммоль) у воді (300 мл) і сухий NaCl до насичення. Воду випаровують і до залишку додають етилацетат до утворення суспензії. Суспензію перемішують протягом декількох годин, після чого осад неорганічних речовин відфільтровують, промивають на фільтрі етилацетатом. Фільтрат висушують над Na_2SO_4, і концентрують за

допомогою ротаційного випаровувача, одержуючи продукт у вигляді жовтої рідини. Вихід 15.21 г (64 %). Чистота (ГХ-ПІД) > 99 %.

Оптимізована методика синтезу *N*^{1},*N*^{1}-диметил-*N*^{3}-пропілпропан-1,3-діаміну (4.10). В атмосфері аргону, до колби у зустрічному струмені аргону вносять $LiAlH_4$ (4.88 г, 128.7 ммоль, 1.5 екв.), після чого, при перемішуванні, додають по краплях безводний ТГФ (70 мл). Одержану суспензію охолоджують до ~0 ºС і по краплях, при температурі не вище +5 ºС додають до неї розчин *N*-(3-(диметиламіно)пропіл)пропіонаміду (13.58 г, 85.8 ммоль) у безводному ТГФ (40 мл). Охолоджуючу баню видаляють, нагрівають реакційну суміш до 60 ºС і витримують протягом доби при 60 ºС, після чого охолоджують до –10 ºС і дуже повільно додають по краплях 5 мл (2.1 екв. у розрахунку на $LiAlH_4$) води, 5 мл 15 %-го водного розчину NaOH (0.17 екв. у розрахунку на $LiAlH_4$) і 5 мл води (2.1 екв. у розрахунку на $LiAlH_4$). Суміш перемішують 30 хв. при охолодженні, фільтрують скрізь тонкий шар *Celite 535* і промивають ТГФ. Фільтрат випаровують досуха (70 мбар/60 ºС), до залишку додають дихлорометан, висушують одержаний розчин над Na_2SO_4, і концентрують під зниженим тиском, одержуючи продукт у вигляді жовтої рідини. Вихід 10.88 г (88 %). Чистота (ГХ-ПІД) 96.2 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 2.47 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 2.42 (т, *J* = 7.0 Гц, 2H), 2.20 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 2,09 (с, 6H), 1,50 (квінтет, *J* = 7.1 Гц, 2H), 1.38 (секстет, *J* = 7.3 Гц, 2H), 0.85 (т, *J* = 7.4 Гц, 3H).

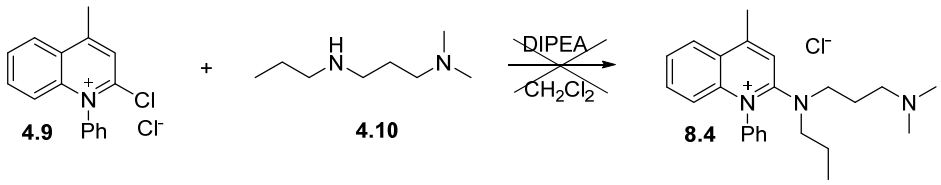
8.1.2 Синтез SYBR Green I

Здійснивши синтез усіх вихідних сполук, ми перейшли до відпрацювання синтезу цільового барвника – **SG**. З цією метою ми, перш за все, спробували підхід, описаний у американському патенті [41], що включає ціанінову конденсацію хлорімінієвої солі **4.9** з кватернізованою сіллю 2-метилтіобензотіазолію **4.6** і наступну реакцію монометинового барвника **8.2** з відповідним вторинним аміном **4.10**.



Однак, при перемішуванні вихідних сполук **4.6** та **4.9** з надлишком DIPEA у CH_2Cl_2 при кімнатній температурі нам не вдалося отримати цільову сполуку **8.2**. В усіх випадках було одержано побічний продукт типу **8.3**, структуру якого встановили на основі даних ПМР та мас-спектрів. Вочевидь, метилмеркаптан, що виділяється в ході реакції, швидко вступає в реакцію з продуктом конденсації **8.2** з утворенням побічної сполуки **8.3**. Слід відзначити, що наші спроби провести реакцію у середовищі оцтового ангідриду та оцтової кислоти були також невдалими та привели до виділення вихідних речовин. Аналогічний результат описаний в літературі [61] при спробі синтезу за вищенаведеним способом відомого барвника **SG**, де зокрема показано, що реакції з метилмеркаптаном чинять значний вплив навіть в умовах конкуренції з іншими *S*-нуклеофілами.

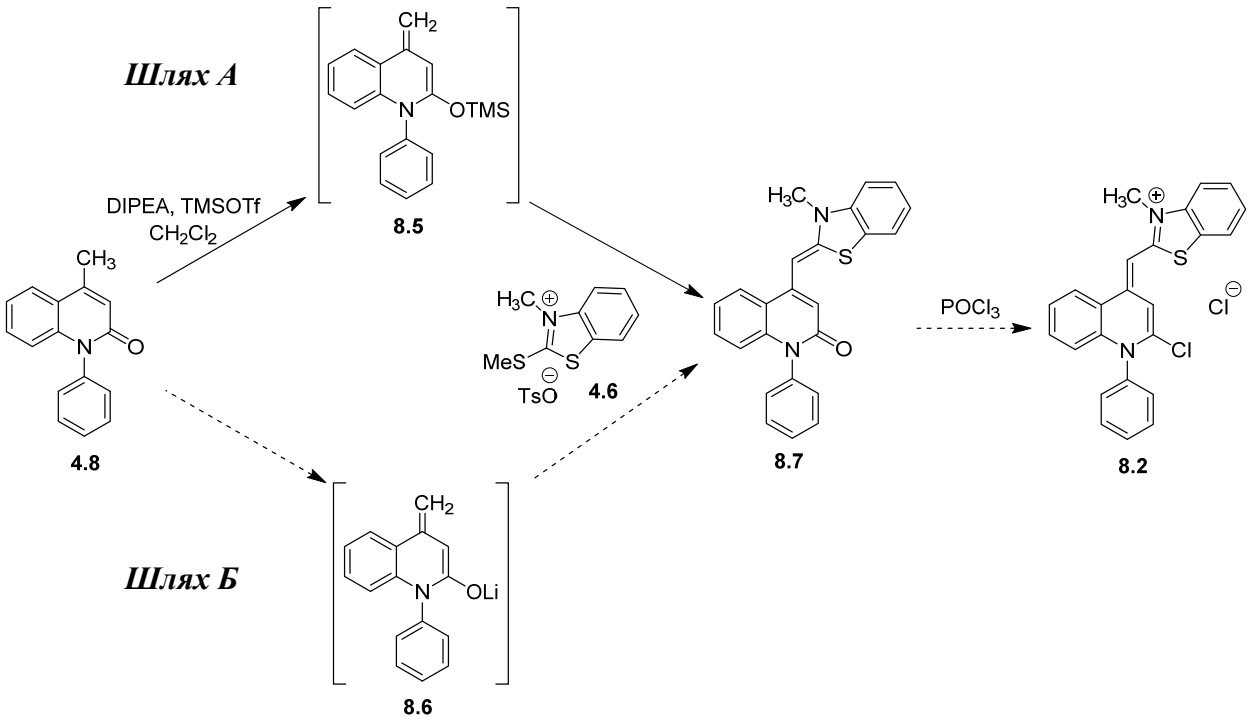
З метою запобігання утворення побічного продукту ми вирішили ввести $N(Alk)_2$-групу у положення 2 хінолінового фрагменту до конденсації з сіллю 2-метилтіобензотіазолію **4.6**. Однак, взаємодія хлорімінієвого аддукту **4.9** з аміном **4.10** у присутності DIPEA не привела до утворення бажаної сполуки **8.4**, а єдиним виділеним продуктом був димер похідної хіноліна.



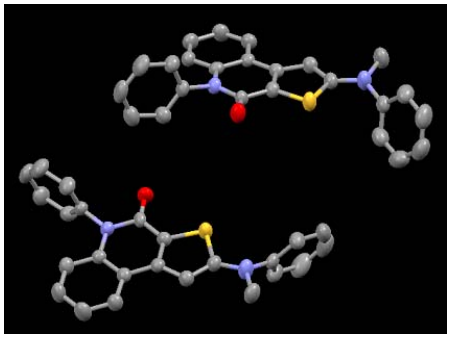
Таким чином, є підстави припускати, що дані про синтез **SG** та подібних несиметричних ціанінових барвників, які існують у відкритому доступі є,

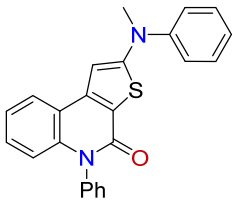
щонайменше, неповними. Тому існує потреба у розробці більш ефективних шляхів синтезу **SG** та його аналогів.

Вже в перших публікаціях стосовно несиметричних ціанінових барвників вказано (але без істотних подробиць) на можливість одержання сполуки **8.2** шляхом ціанінової конденсації відповідного силіленолового етера **8.5** (шлях А) або літієвого енолята **8.6** (шлях Б), одержаного шляхом обробки вихідного хінолона **4.8** літій діізопропіламідом (LDA, 2,7 екв.), із сполукою **4.6** з подальшою обробкою $POCl_3$ інтермедіата **8.7**. В роботі [67] сполука **8.7** була одержана саме через силіленоловий етер **8.5**, проте дані про її чистоту і підтвердження структури не наведені.



При проведенні реакції за шляхом Б, тобто через енолят **8.6**, використання великого надлишку LDA (2.7 екв.) по відношенню до **4.8** приводить до переважного утворення іншого продукту, при цьому у реакційній суміші присутні лише слідові кількості цільового продукту **8.7**. Нам вдалося виділити та встановити структуру основного продукту реакції **8.8**, зокрема методом рентгеноструктурного аналізу (Рис. 8.1).





8.8

Рисунок 8.1 – Структура сполуки **8.8** за даними рентгеноструктурного аналізу.

Сполуки, подібні до **8.8**, описані в літературі [68,69], проте формування тіофенового циклу в них відбувається в умовах відомої реакції Гевальда, тоді як у випадку **8.8** тіофеновий цикл, вочевидь, утворюється внаслідок розкриття тіазольного фрагменту в молекулі **8.7** і подальшої рециклізації.

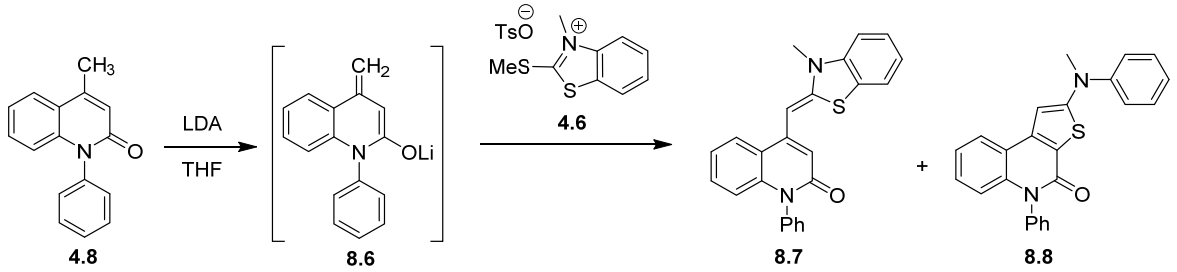
Ми провели низку дослідів з метою оптимізації умов одержання сполуки **8.8** (таблиця 8.1), в яких варіювали масштаб реакції, порядок і спосіб додавання реагентів, температуру реакції (–18 °C або –78 °C) і час енолізації. Попередніми дослідами було встановлено, що переважне утворення **8.8** відбувається при використанні більше 2 екв. LDA (пп. 1–3). При додаванні **4.6** до розчину енолята **8.6** однією порцією (спосіб A1) з розрахунку на 1 ммоль вихідної сполуки **4.8** оптимальна кількість LDA становить 2.7–3.0 екв. (пп. 4, 5, 8). Температура реакції не має вирішального впливу на результат, проте при –18 °C реакційна суміш містить більші кількості побічних продуктів (пп. 3, 6, 7), тобто переважною є нижча температура (–78 °C). Оптимальний час енолізації сполуки **4.8** становить приблизно 40 хв, та не залежить від температури (пп. 4, 6, 8). Більш тривале витримування (пп. 5, 8) принципово не покращує, але і не погіршує результат, тобто можна стверджувати, що енолят **8.6** утворюється досить швидко і є відносно стабільним в умовах реакції. Підвищення кількості LDA до 4.0 екв. приводить до деградації реакційної суміші незалежно від температури (пп. 13, 14). Важливою особливістю цього способу є те, що при масштабуванні реакції (з розрахунку на 4 ммоль

сполуки **4.8**) з використанням оптимальних умовах не вдається відтворити результат, отриманий у п. 8. Натомість, утворюється суміш, яка містить переважно вихідний хінолон **4.8** і велику кількість побічних продуктів (п. 10). Більш того, додавання **4.6** у декілька порцій (спосіб А2; п. 11) приводить до переважного утворення **8.7**.

Альтернативний спосіб, що передбачає додавання розчину LDA до суміші реагентів (спосіб Б), хоча і потребує низької температури (пп. 7, 9), а також приводить до меншого вмісту цільової сполуки **8.8** у реакційній суміші (пп. 5, 8, 9), проте дозволяє успішно проводити масштабування реакції у межах 1–4 ммоль (пп. 9, 12). Тому саме цей спосіб слід визнати більш доцільним для синтезу **8.8**.

Методика синтезу 2-(метил(феніл)аміно)-5-фенілтієно[2,3-c]хінолін-4(5H)-ону (**8.8**). **Спосіб А1** (таблиця 8.1). В атмосфері аргону, при перемішуванні до охолодженого льодом з водою розчину DIPEA (320 мг, 3.2 ммоль, 3.1 екв.) в сухому ТГФ (4 мл) по краплях додають розчині *н*-бутил літію (2.5 моль/л в гексані, 1.2 мл, 3.0 ммоль, 3.0 екв.) і охолоджують одержану суміш до –78 ºС. Далі додають розчин сполуки **4.8** (235 мг, 1.0 ммоль) в сухому ТГФ (6 мл) при температурі не вище –75 ºС, витримують одержану суміш протягом 40 хвилин при –78 ºС і у зустрічному струмі аргону додають сполуку **4.6** (250 мг, 1.2 ммоль, 1.2 екв.), після чого витримують ще 40 хвилин при –78 ºС, дають суміші нагрітися до кімнатної температури і по краплях додають насичений водний розчин NH_4Cl (50 мл). Органічний шар відокремлюють, а водний – екстрагують EtOAc (3×20 мл). Органічні екстракти об’єднують, промивають водою до нейтральної реакції і висушують над безводним Na_2SO_4. Після концентрування у вакуумі залишок екстрагують скрізь шар силікагелю гарячою сумішшю 30 об. % EtOAc в гексані. Кристалічний осад відфільтровують, одержуючи першу порцію продукту. Фільтрат випаровують і очищують колонковою хроматографією на силікагелі (550 × 15 мм, 20 об. % EtOAc в гексані), одержуючи другу порцію продукту. Загальний вихід 53 мг (14 %).

Таблиця 8.1 – Оптимізація умов одержання сполуки **8.8**.



4.8 8.6 8.7 8.8

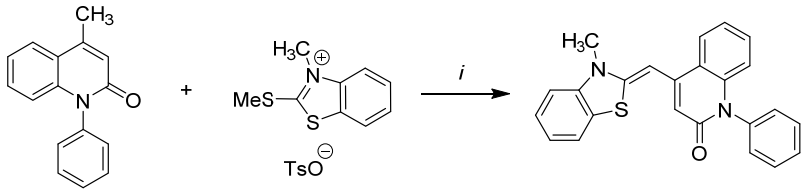
№	Масштаб, ммоль	Спосіб[1)]	Кількість LDA, екв.	Температура, °C	Час енолізації, хв.	Вміст (ВЕРХ), %			Вихід (продукт), %
						4.8	**8.7**	**8.8**	
1	1.0	А1	1.3	–18	40	5.3	**51.3**	10.0	28 (**8.7**)
2	1.0	А1	2.1	–18	40	11.8	**53.1**	19.3	37 (**8.7**)
3	1.0	А1	2.7	–18	40	<1	6.3	**26.3**	–
4	1.0	А1	2.7	–78	40	5.0	7,1	**30.5**	–
5	1.0	А1	2.7	–78	120	4.3	9.2	**35.4**	14 (**8.8**)
6	1.0	А1	3.0	–18	10	4.6	<1	5.5	–
7	1.0	Б	3.0	–18	–	9.3	4,5	9.4	–
8	1.0	А1	3.0	–78	40	11.5	4.6	**34.2**	–
9	1.0	Б	3.0	–78	–	8.3	7.3	**29.3**	–
10	4.0	А1	3.0	–78	40	28.9	5.8	**20.2**	–
11	2.0	А2	3.0	–18	40	18.5	**47.7**	7.0	25 (**8.7**)
12	4.0	Б	3.0	–78	–	21.0	3.9	**28.0**	15 (**8.8**)
13	1.0	А1	4.0	–18	40	<1	4.0	1.3	–
14	1.0	А1	4.0	–78	40	7.7	5.3	**19.4**	–

[1)] А1 — додавання **4.6** до розчину енолята однією порцією; А2 — додавання **4.6** до розчину енолята декількома порціями; Б — додавання розчину LDA до суміші реагентів.

В рамках проєкту нами досліджено одержання сполуки **8.7**, а також її подальші перетворення. Дані про оптимізацію умов синтезу **8.7** наведені в таблиці 8.2.

Нам вдалося оптимізувати умови ціанінової конденсації та отримати продукт **8.7** з виходом 45 % при перемішуванні вихідних сполук **4.6** та **4.8** у дихлороетані у присутності триметилсилілтрифторометансульфонату (TMSOTf) при температурі реакційної суміші від -5 ºС до кипіння.

Таблиця 8.2 – Оптимізація умов ціанінової конденсації за участю похідного *N*-феніл-2-хінолону **4.8** та солі 2-метилтіобензотіазолію **4.6.**



4.8 **4.6** **8.7**

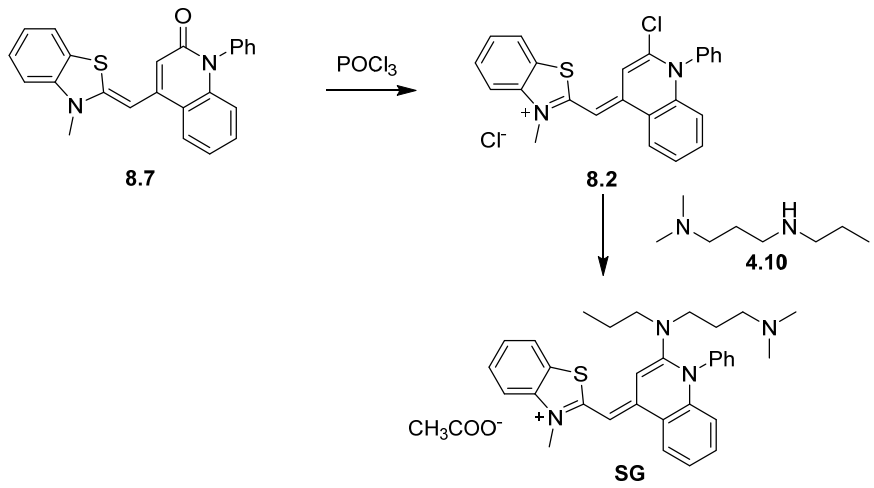
№	*i*	Розчинник	T, ºC	Продукт **8.7**		
				Вміст в реакційній суміші, %	Вихід, %	Чистота, %
1	TMSOTf (5 екв.), DIPEA (4 екв.)	CH_2Cl_2	38	92,0	47	98,3
2	TMSOTf (8 екв.), DIPEA (7 екв.)	CH_2Cl_2	38	63,2	20	92,5
3	TMSOTf (5 екв.), DIPEA (4 екв.)	дихлороетан	45	85,9	68	98,0
4	*t*-BuOK (1,2 екв.)	ДМСО	20	14,5	—	—
5	LDA (1,3 екв.)	ТГФ	–18	51,3	28	87,4
6	LDA (2,1 екв.)	ТГФ	–18	53,1[1)]	37	59,7[1)]
7	LDA (2,7 екв.)	ТГФ	–18	6,3[1)]	—	—

[1)] Суміш містить ще один продукт.

Методика синтезу 4-((3-метилбензо[*d*]тіазол-2(3*H*)-іліден)метил)-1-фенілхінолін-2(1*H*)-ону (8.7). В атмосфері аргону, до охолодженої (–5 ºС) суміші 4-метил-1-фенілхінолін-2(1*H*)-ону **4.8** (2.00 г, 8.5 ммоль) і солі

2-метилтіобензотіазолію **4.6** (3.75 г, 10.2 ммоль, 1.2 екв.) у сухому дихлороетані (30 мл) при перемішуванні по краплях додають DIPEA (4.39 г, 34.0 ммоль, 4.0 екв.). Суміш витримують протягом 10 хв і по краплях, при температурі не вище 0 ºС додають до неї TMSOTf (9.45 г, 42.5 ммоль, 5.0 екв.). Через 10 хв охолоджуючу баню видаляють, нагрівають суміш до кипіння і витримують протягом 1 годин, після чого охолоджують (~0 ºС) і по краплях, при температурі не вище 10 ºС додають воду (100 мл). Органічний шар відокремлюють, водний шар і емульсію, яка утворилася, екстрагують CH_2Cl_2 (10 × 10 мл). Органічні екстракти об'єднують, промивають розбавленим розсолом (100 мл), висушують над Na_2SO_4 і випаровують досуха. Залишок піддають кристалізації з ізопропилового спирта, одержуючи продукт у вигляді кристалічної речовини, яка має колір від червоного до жовтого. Вихід: 2.20 г (68 %). Чистота (ВЕРХ, RP-18, азеотроп ацетонітрил/вода, 254 нм): 98.0–99.6 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.21 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.73–7.45 (м, 4H), 7.45–7.23 (м, 5H), 7.23 (т, J = 7.5 Гц, 1H), 7.07 (т, J = 7.4 Гц, 1H), 6.53 (с, 1H), 6.52 (д, J = 7.4 Гц, 1H), 6.15 (с, 1H), 3.64 (с, 3H).

Одержаний продукт **8.7** вводили у реакцію з з хлорокисом фосфору з утворенням сполуки **8.2**, взаємодією якої далі з вторинним аміном **4.10** синтезували цільовий барвник **SG**.

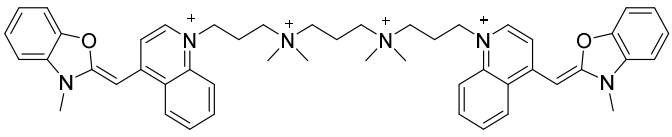


Методика синтезу хлориду 2-((2-хлоро-1-фенілхінолін-4(1*H*)-іліден)метил)-3-метилбензо[*d*]тіазолію (8.2). До розчину сполуки **8.7** (200 мг, 0.52 ммоль) у сухому дихлороетані (5 мл) додають $POCl_3$ (241 мг, 1.57 ммоль, 3.0 екв.). Суміш перемішують при 60 ºС без доступу вологи протягом 6 годин, охолоджують і випаровують розчинник. Залишок після випаровування промивають сухим етером (3 × 2 мл) і висушують у вакуумі. Вихід: 190 мг (84 %). Чистота (ВЕРХ): 77 %.

Ацетат 2-((2-((3-(диметиламіно)пропіл)(пропіл)аміно)-1-фенілхінолін-4(1*H*)-іліден)метил)-3-метилбензо[*d*]тіазолію (SG). До суміші сполуки **8.2** (190 мг, 0.43 ммоль) і сухого дихлороетана (2 мл) додають розчин вторинного аміну **4.10** (313 мг, 2.17 ммоль, 5.0 екв.) у 1.5 мл сухого дихлороетана. Суміш перемішують при 60 ºС без доступу вологи протягом 3 годин, охолоджують і випаровують дихлороетан. Залишок після випаровування промивають етером (3 × 5 мл), розчинюють у ацетонітрилі, відфільтровують нерозчинні домішки, і фільтрат очищують на хроматографічній колонці (60 × 1.8 см; нерухома фаза — силікагель, рухома фаза — градієнт: ацетонітрил → азеотроп ацетонітрил-вода → 50 % ацетонітрил/вода → 50 % ацетонітрил/вода + 3 % оцтової кислоти). Основну фракцію після виділення випаровують досуха, додають ацетонітрил і фільтрують скрізь фільтр із розміром пор 0.45 мкм. Фільтрат випаровують, отримуючи продукт у вигляді твердої речовини оранжевого кольору. Вихід: 30 мг (12 %). Чистота (ВЕРХ) 97 %.

8.2 Гомодимерний ціаніновий барвник YOYO-1

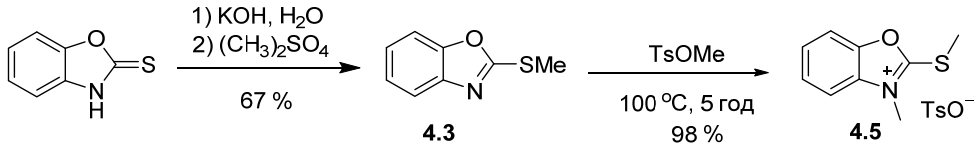
YOYO-1 – гомодимерний ціаніновий барвник, здатний міцно зв'язуватися з длДНК шляхом інтеркаляції, при цьому інтенсивність його флуоресценції збільшується у 1000 разів у порівнянні з вільним барвником [70,71].



YOYO-1 використовують для виявлення та кількісного визначення ДНК, а також візуалізації ДНК флуоресцентною мікроскопією.

8.2.1 Синтез вихідних сполук для отримання YOYO-1

Синтез кватернізованої солі S-метилтіобензоксазолію **4.3** проводили алкілуванням 2-меркаптобензоксазолу диметилсульфатом з подальшою кватернізацією отриманого продукту **4.5** двократним надлишком метил 4-метилбензолсульфонату (*див. Розділ 5, п. 5.3*).

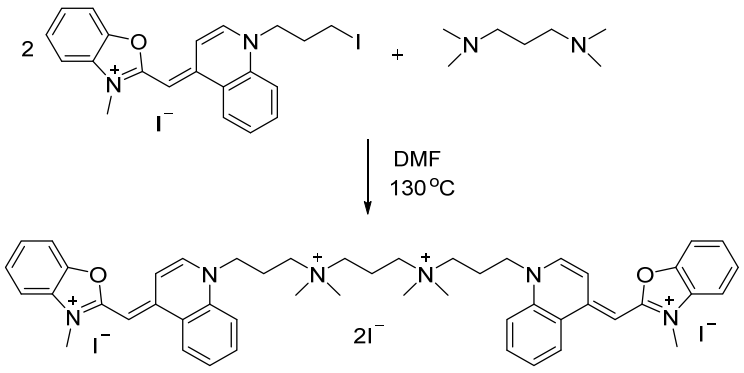


Синтез кватернізованої солі 4-метилхіноліну **4.7** проводили при нагріванні вихідних сполук у бензолі впродовж 4 годин при 55 °С, а потім ще 30 хвилин при 80 °С (*див. Розділ 5, п. 5.3*).

Монометинціаніновий барвник **CyD-1** на основі бензоксазолового та хінолінового фрагментів було одержано з виходом 30% за методикою, що наведена у *Розділі 5, п. 5.3*.

8.2.2 Синтез YOYO-1

Для синтезу гомодимерного барвника **YOYO-1** ми, перш за все, спробували методику, описану у патенті [70], яка включає нагрівання суміші мономерного барвника **CyD-1** з *N*,*N*,*N*′,*N*′-тетраметилпропандіаміну у ДМФА при 130 °С впродовж 4 діб.



Однак, після охолодження та обробки реакційної суміші було одержано смолоподібний залишок темно-зеленого кольору, перекристалізацією якого нам вдалося виділити цільовий барвник з виходом лише 6 %.

У пошуках оптимальних умов ми варіювали розчинники, температуру та час реакції. Найкращий результат був одержаний при нагріванні вихідних сполук у середовищі 2-етоксиетанолу впродовж 24 годин при 90 °C, що привело до утворення **YOYO-1** з виходом 49 %.

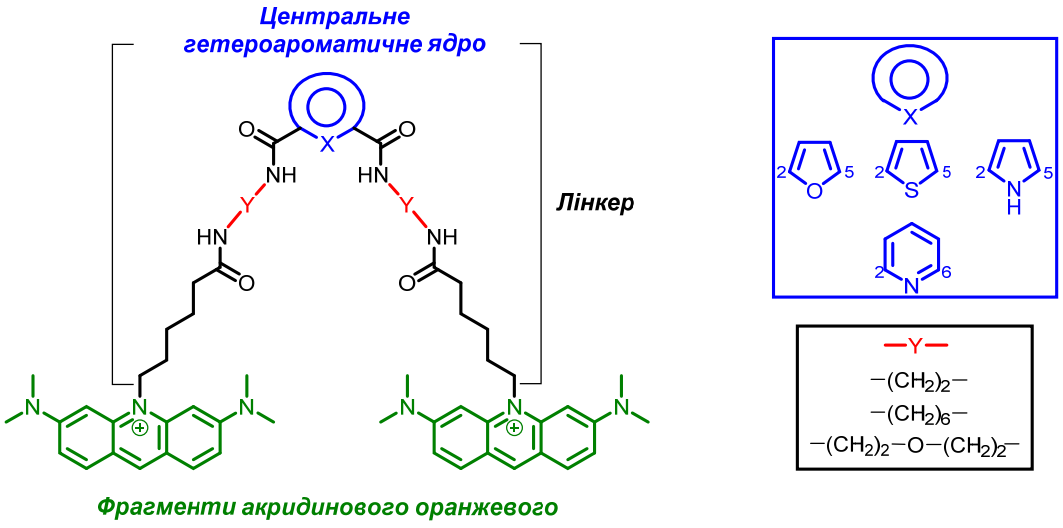
Методика синтезу YOYO-1. У колбі на 100 мл розчиняють монометиновий барвник (430 мг, 0.75 ммоль) у 2-етоксиетанолі (55 мл), і додають *N*,*N*,*N*′,*N*′-тетраметилпропандіамін (63 μл, 0.37 ммоль). Отриману суміш нагрівають при перемішуванні впродовж 24 годин при 90 °C. По ходу реакції випадає осад оранжевого кольору. Хід реакції контролюють за допомогою ТШХ (хлороформ-метанол, 1:1) та вимірювання спектрів поглинання (λ_{abs} = 458, 480 нм). Після охолодження осад відфільтровують, промивають діетиловим етером і сушать у ексикаторі. Одержують 234 мг (49 %) продукту.

9 Відпрацювання методик синтезу та очистки димерних барвників-інтеркаляторів

Для одержання димерних барвників-інтеркаляторів з кращими виходами та у кількостях достатніх для проведення подальших досліджень в умовах полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ми відпрацювали умови проведення їхнього синтезу та методи очистки.

9.1 Димерні барвники-інтеркалятори, сполучені лінкером з центральним гетероциклічним фрагментом

У попередньому розділі описані дані стосовно синтезу димерних барвників-інтеркаляторів, які мають дві планарні хромофорні системи акридинового оранжевого, сполучені між собою напівгнучким лінкером із центральним 2,5- чи 2,6-дизаміщеним гетероароматичним ядром:



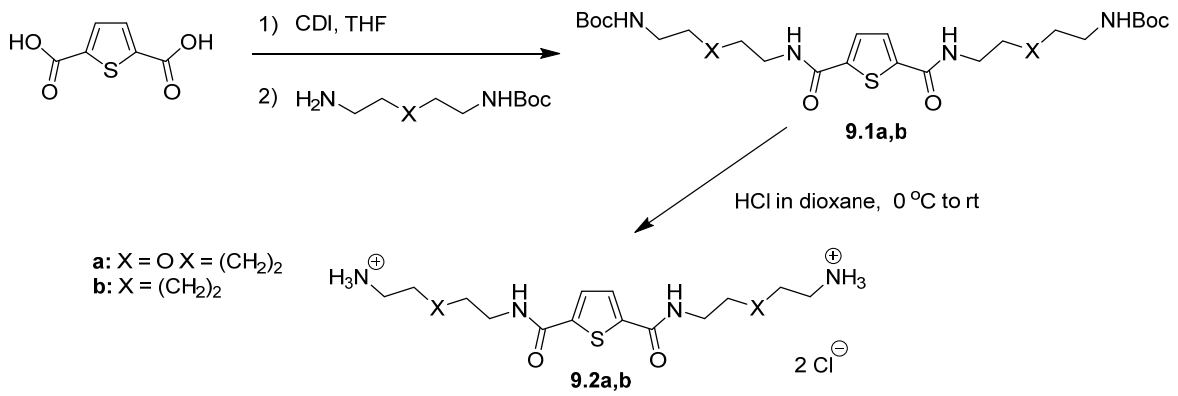
В основі синтезу даних сполук лежить конденсація кислоти **АО-1** з відповідними діамінами, отриманими згідно розроблених методик (*див. Розділ 7, п. 7.2.2*). Однак, у ході дослідження ми з'ясували, що отримані барвники поступово розкладаються при зберіганні у сухому вигляді. Це явище, на наш погляд, було пов'язано з наявністю у структурі агресивного протиіону CF_3COO^-. Для попередження небажаного розкладу ми вдосконалили процес очистки цільових барвників та використали більш

слабку оцтову кислоту замість трифтороцтової як компонент елюента у ході колонкової хроматографії. Крім того, одержані барвники з CH_3COO^- як протиіоном були переосаджені з водного розчину натрій хлоридом для заміни ацетат іонів на хлорид іони Cl^-. Синтезовані таким чином барвники краще зберігаються як у сухому вигляді, так і в органічних та водних розчинах.

З використанням оптимізованої методики були одержані препаративні кількості (100–200 мг) барвників ***bis*-AO5–*bis*-AO8**, достатні для проведення подальших досліджень, у тому числі ПЛР.

Попередні тестування одержаних барвників в умовах ПЛР показали, що барвник ***bis*-AO6** не інгібує хід ПЛР, сприяє формуванню специфічних продуктів ампліфікації, а інтенсивність його флуоресценції лінійно зростає по мірі накопичення ампліконів у реакційній суміші (*див. Розділ 12*). Спираючись на отримані дані та з метою поглиблення знань щодо впливу лінкера на процес інтеркаляції та хід ПЛР, на звітному етапі було синтезовано два нових похідних барвника ***bis*-AO6**, в яких варіюються довжина та гідрофільність лінкера, що сполучає фрагменти АО.

Для синтезу нових лінкерів було використано той самий підхід, що й раніше був успішно застосований для одержання лінкерів типу **7.7** (*див. Розділ 7, п. 7.1*). Так, лінкери **9.2a** та **9.2b** були отримані конденсацією 2,5-тіофендикарбонової кислоти з відповідним монозахищеним діаміном через стадію активації за участю *біс*-карбонілдіімідазолу (CDI) з наступним зняттям *трет*-бутоксикарбонільної захисної групи (Boc-групи) шляхом обробки відповідних захищених похідних **9.1a** та **9.1b** 25%-ним розчином соляної кислоти у діоксані за наступною схемою:



Ді-*трет*-бутил-(((((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(окси))*біс*(етан-2,1-дііл))дикарбамат (9.1a). В атмосфері аргону до суспензії 2,5-тіофендикарбонової кислоти (200 мг, 1.2 ммоль) у сухому ТГФ (4 мл) додавали CDI (471 мг, 2.9 ммоль, 1.25 екв.). Суміш нагрівали до кипіння і витримували протягом приблизно 1 години. Паралельно у окремій колбі в атмосфері аргону до суспензії гідрохлорида *трет*-бутил-(2-(2-аміноетокси)етил)карбамата (668 мг, 2.8 ммоль, 1.20 екв.) у сухому ТГФ (3 мл) додавали DIPEA (379 мг, 3.1 ммоль), суміш нагрівали до кипіння і витримували при перемішуванні до розчинення осаду гідрохлориду, після чого додавали одержаний розчин у зустрічному струмі аргону до основної реакційної суміші і продовжували кип'ятіння протягом 16 годин. Після охолодження ТГФ випаровували, і до залишку додавали CH_2Cl_2 (10 мл) і воду (10 мл). Органічний шар відокремлювали, водний — екстрагували CH_2Cl_2 (3 × 5 мл). Органічні екстракти об'єднували, CH_2Cl_2 випаровували, а до залишку, густої рідини світло-жовтого кольору, додавали ацетонітрил, одержаний розчин витримували при –20 ºС протягом ночі. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали холодним ацетонітрилом і висушувалиу вакуумі. Вихід 480 мг (76 %). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.59 (т, 2H, J = 5.1 Гц, 2 NH), 7.67 (с, 2H, 2 CH), 6.70 (шир. с, 2H, 2 NH), 3.51–3.42 (м, 4H, 2 CH_2), 3.41–3.31 (м, 8H, 4 CH_2), 3.09–2.98 (м, 4H, 2 CH_2), 1.33 (с, 18H, 2 $C(CH_3)_3$). Розраховано для $C_{24}H_{40}N_4O_8S$ (544.66): C, 52.93; H, 7.40; N, 10.29%. Знайдено: C, 52.95; H, 7.45; N, 10.22%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 545.40 (MH^+).

Ді-*трет*-бутил-(((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(гексан-6,1-дііл))дикарбамат (9.1b) одержували за загальною методикою з 2,5-тіофендикарбонової кислоти (*див. Розділ 7, п. 7.1*). Вихід 300 мг (80 %). ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.54 (т, 2H, J = 5.6 Гц, 2 NH), 7.66 (с, 2H, 2 CH), 6.74 (шир. с, 2H, 2 NH), 3.25–3.14 (м, 4H, 2 CH_2), 2.94–2.82 (м, 4H, 2 CH_2), 1.54–1.43 (м, 4H, 2 CH_2), 1.42–1.33 (м, 4H, 2 CH_2), 1.36 (с, 18H, 2 $C(CH_3)_3$), 1.30–1.17 (м, 8H, 4 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 160.6, 155.6, 143.2, 127.9, 77.4, 39.8, 39.2, 29.5, 29.1, 28.3, 26.2, 26.0. Розраховано для $C_{28}H_{48}N_4O_6S$ (568.77): C, 59.13; H, 8.51; N, 9.85%. Знайдено: C, 59.19; H, 8.42; N, 9.93%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 591.30 $(M + Na)^+$.

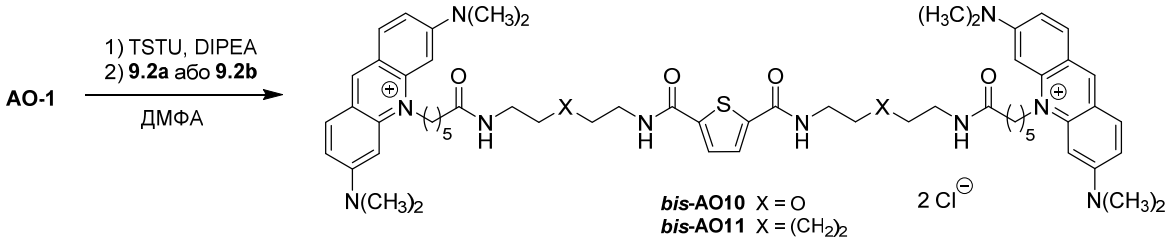
Методика зняття захисної Boc-групи для 9.2a та **9.2b**. Відповідні Boc-захищені похідні **9.1a** та **9.1b** (0.32 ммоль) додавали до 25%-ного розчину соляної кислоти у діоксані (5 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували 30 хвилин. Хід реакції контролювали за допомогою ТШХ (елюент: хлороформ-метанол (1:2)). Після закінчення реакції суміш концентрували, сушили у вакуум-ексикаторі над КОН і отримували цільові сполуки **9.2a** та **9.2b**.

Дихлорид 2,2'-((((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(окси))*біс*(етан-1-амінію) (9.2a). Вихід: 97 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.90 (т, 2H, J = 5.6 Гц, 2 NH), 8.06 (шир. с, 6H, 2 NH_3^+), 7.92 (с, 2H, 2 CH), 3.63 (кв, 4H, J = 5.2 Гц, 2 CH_2), 3.60–3.55 (м, 4H, 2 CH_2), 3.40–3.47 (м, 4H, 2 CH_2), 3.02–2.92 (м, 4H, 2 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 161.0, 143.1, 128.7, 68.8, 66.2, 38.9, 38.6. Розраховано для $C_{14}H_{26}Cl_2N_4O_4S$ (417.35): C, 40.29; H, 6.28; N, 13.42%. Знайдено: C, 40.35; H, 6.19; N, 13.44%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 345.39 ($M^+ - H^+$, $2Cl^-$).

Дихлорид 6,6'-((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(гексан-1-амінію) (9.2b). Вихід: 95 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.65 (т, 2H, J = 5.9 Гц, 2 NH), 7.80 (шир. с, 6H, 2 NH_3^+), 7.72 (с, 2H, 2 CH), 3.26–3.14 (м, 4H, 2 CH_2), 2.81–2.68 (м, 4H, 2 CH_2), 1.61–1.42 (м, 8H, 4 CH_2), 1.37–1.22 (м, 4H, 2 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 160.7, 143.2, 128.1, 39.0, 38.7,

28.9, 26.9, 25.9, 25.5. Розраховано для $C_{18}H_{34}Cl_2N_4O_2S$ (441.46): C, 48.97; H, 7.76; N, 12.69%. Знайдено: C, 48.89; H, 7.72; N, 12.73%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 369.49 ($M^+ - H^+$, $2Cl^-$).

Цільові димерні барвники ***bis*-AO10** та ***bis*-AO11** були одержані тим самим шляхом, що й барвники ***bis*-AO5**–***bis*-AO8** з використанням оптимізованої методики за наступною схемою:



Оптимізована методика синтезу димерних барвників *bis*-AO5 – *bis*-AO8, ***bis*-AO10** та ***bis*-AO11.** Суміш **AO-1** (100 мг, 0.22 ммоль), TSTU (132 мг, 0.44 ммоль) та діізопропілетиламіну (DIPEA, 157 мкл, 0.9 ммоль) у ДМФА (2 мл) перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі. Утворення *N*-гідроксисукцинімідного естеру контролюють за допомогою ВЕРХ. До реакційної суміші додають відповідний попередник лінкера (0.11 ммоль) і перемішують при кімнатній температурі впродовж 2 годин. Реакційну масу концентрують на ротаційному випаровувачі, обробляють діетиловим етером та досушують у вакуум-ексикаторі. Для очистки смолоподібний осад розчиняють у невеликій кількості суміші вода-ацетонітрил (10:1) та очищують колонковою хроматографією на оберненофазному силікагелі RP-18 з використанням сумішей ацетонітрилу з водою з додаванням оцтової кислоти у кількості 0.05 об. % (2–50 об. % ацетонітрилу) у градієнтному режимі елюювання. Далі до розчину очищеного барвника (20 мг) у дистильованій воді (1 мл) додають 20%-ний водний розчин натрій хлориду (2 мл). Реакційну суміш перемішують впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі та залишають для кристалізації на ніч. Утворений осад відфільтровують, промивають водою, сушать у вакуум-ексикаторі.

Дихлорид 10,10'-(((((((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(окси))*біс*(етан-2,1-дііл))*біс*(азанедііл))*біс*(6-оксогексан-6,1-дііл))*біс*((3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію) (*bis*-АО10). Вихід: 37 %. Чистота (ВЕРХ): 90.0 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.90–8.77 (2H, м, 2 NH), 8.62 (2H, с, H(9) та H(9′) акридинових фрагментів), 8.04–7.89 (2H, м, 2 NH), 7.79 (4H, д, J = 9.4 Гц, H(1), H(1′), H(8) та H(8′) акридинових фрагментів), 7.73 (2H, с, тіофеновий фрагмент), 7.16 (4H, д, J = 9.4 Гц, H(4), H(4′), H(5) та H(5′) акридинових фрагментів), 6.54–6.39 (4H, м, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів), 4.66–4.43 (4H, м, 2 NCH_2), 3.54–3.43 (4H, м, 2 CH_2), 3.44–3.31 (8H, м, 4 CH_2), 3.22 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 2.19–2.07 (4H, м, 2 CH_2), 1.83–1.70 (8H, м, 4 CH_2), 1.69–1.57 (4H, м, 2 CH_2), 1.56–1.41 (4H, м, 2 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 173.2, 172.1, 160.9, 155.2, 143.1, 142.6, 141.9, 132.9, 128.2, 116.4, 114.2, 92.3, 68.9, 68.6, 46.5, 40.2, 38.5, 35.1, 25.9, 25.2, 24.9, 23.5. Розраховано для $C_{60}H_{80}Cl_2N_{10}O_6S$ (1140.32): C, 63.20; H, 7.07; N, 12.28%. Знайдено: C, 63.24; H, 7.21; N, 12.32%. Мас-спектр MS-ESI (m/z) 534.91 (M – $2CF_3COO^-)^{2+}$.

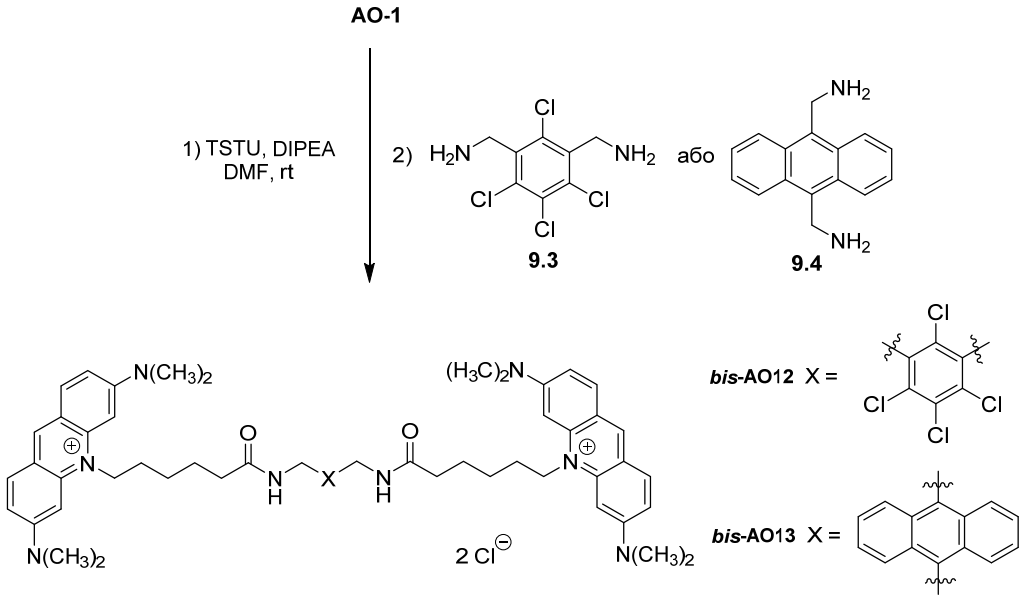
Дихлорид 10,10'-(((((тіофен-2,5-дикарбоніл)*біс*(азанедііл))*біс*(гексан-6,1-дііл))*біс*(азанедііл))*біс*(6-оксогексан-6,1-дііл))*біс*((3,6-*біс*(диметил-аміно)акридинію) (*bis*-АО6). Вихід: 45 %. Чистота (ВЕРХ): 92.0 %. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.83–8.69 (2H, м, 2 NH), 8.62–8.49 (2H, м, H(9) та H(9′) акридинових фрагментів), 7.98–7.81 (4H, м, H(1), H(1′), H(8) та H(8′) акридинових фрагментів), 7.79–7.70 (2H, м, 2 NH), 7.65 (2H, с, тіофеновий фрагмент), 7.33–7.17 (4H, м, H(4), H(4′), H(5) та H(5′) акридинових фрагментів), 6.69–6.53 (4H, м, H(2), H(2′), H(7) та H(7′) акридинових фрагментів), 4.75–4.58 (4H, м, 2 NCH_2), 3.26 (24H, с, 4 $N(CH_3)_2$), 3.25–3.12 (8H, м, 4 CH_2), 3.07–2.92 (4H, м, 2 CH_2), 2.18–1.99 (4H, м, 2 CH_2), 1.94–1.76 (4H, м, 2 CH_2), 1.72–1.40 (12H, м, 6 CH_2), 1.39–1.19 (8H, м, 4 CH_2). ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d_6) δ 171.7, 160.6, 155.4, 143.2, 142.8, 142.1, 133.0, 127.8, 116.5, 114.4, 92.5, 46.6, 40.3, 40.2, 38.3, 35.2, 29.1, 29.0, 26.1, 26.1, 25.9, 25.3, 24.9. Розраховано для $C_{64}H_{88}Cl_2N_{10}O_4S$

(1164.43): C, 66.02; H, 7.62; N, 12.03%. Знайдено: C, 66.15; H, 7.54; N, 12.11%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 546.77 $(M - 2Cl^-)^{2+}$.

9.2 Синтез димерних барвників-інтеркаляторів, сполучених лінкерами різної природи

Для кращого розуміння впливу природи лінкера на ступінь спорідненості барвника до длДНК, а також на спектральні властивості утвореного комплекса барвник-длДНК були синтезовані ще декілька димерних барвників, хромофорні фрагменти яких сполучені лінкерами різної природи.

З використанням оптимізованої методики для синтезу димерних барвників (*див. п. 9.1*) у реакцію з **АО-1** були успішно введені такі попередники лінкерів як (перхлоро-1,3-фенілен)диметанамін **9.3** та антрацен-9,10-діілдиметанамін **9.4**. Після очистки сирих продуктів колонковою хроматографією були отримані цільові барвники ***bis*-АО12** та ***bis*-АО13** з виходами 33 та 41 %, відповідно.



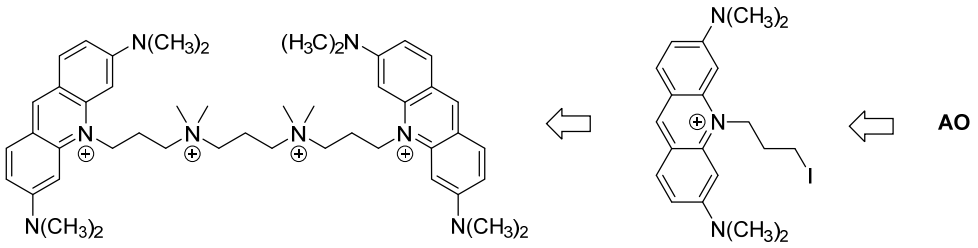
Дихлорид 10,10'-((((перхлоро-1,3-фенілен)*біс*(метилен))*біс*(азанедііл))*біс*(6-оксогексан-6,1-дііл))*біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію) (*bis*-АО12). Вихід: 33 %. Чистота (ВЕРХ): 91.0 %. Розраховано для

$C_{54}H_{64}Cl_6N_8O_2$ (1069.86): C, 60.62; H, 6.03; N, 10.86%. Знайдено: C, 72.21; H, 7.07; N, 10.93%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 500.23 $(M - 2Cl^-)^{2+}$.

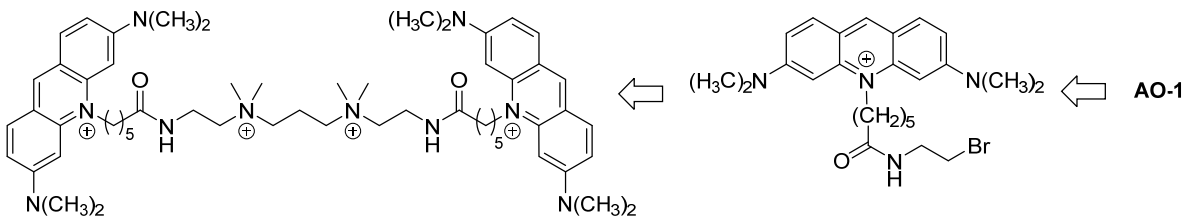
Дихлорид 10,10'-(((антрацен-9,10-діїл)*біс*(метилен))*біс*(азанедіїл))-*біс*(6-оксогексан-6,1-діїл))*біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридинію) (*bis*-AO13). Вихід: 41 %. Чистота (ВЕРХ): 89.0 %. Розраховано для $C_{62}H_{72}Cl_2N_8O_2$ (1032.21): C, 72.14; H, 7.03; N, 10.47%. Знайдено: C, 72.14; H, 7.03; N, 10.47%. Мас-спектр MS-ESI (m/z): 480.79 $(M - 2Cl^-)^{2+}$.

Результати тестувань в умовах кПЛР показали, що димерні барвники, в яких хромофорні системи сполучені між собою за допомогою позитивно зарядженого лінкеру, як у випадку ціанінового гомодимера **YOYO-1**, інгібують хід ПЛР та унеможливлюють аналіз ампліконів за температурною плавлення (*див. Розділ 12*). Отримані дані добре співпадають із літературними [45], та пояснюються надто сильною спорідненістю **YOYO-1**, структура якого має чотири позитивні заряди, з длДНК. Для підтвердження цього твердження, а також як непрямий доказ на користь дизайну розроблених нами димерних барвників, ми вирішили синтезувати барвник, в якому фрагменти акридинового оранжевого сполучені між собою за допомогою позитивно зарядженого лінкеру. Для цього було запропоновано два підходи:

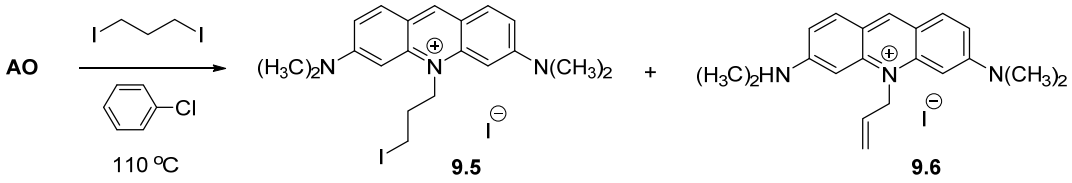
Підхід I:



Підхід II:



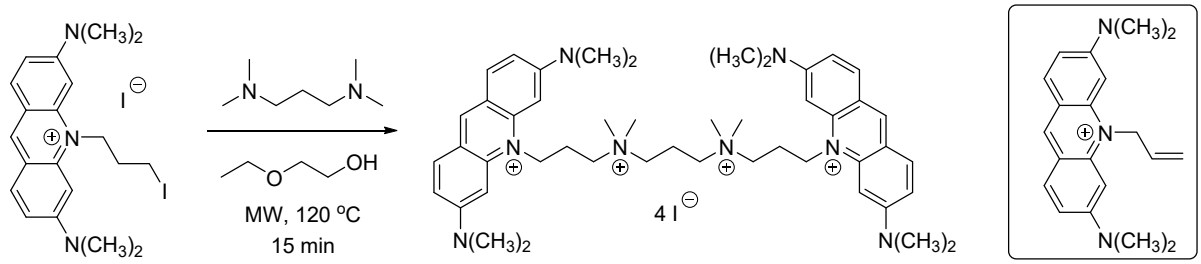
Перший підхід був раніше описаний у патентній літературі [46], але без синтетичних подробиць. При алкілюванні **АО** 1,3-дийодопропаном у хлоробензолі при 110 °С було отримано суміш вихідної сполуки **АО**, цільового продукту **9.5** та побічного продукту дегідрогалогенування **9.6**. Компоненти суміші вдалося розділити колонковою хроматографією та проаналізувати за допомогою ВЕРХ, мас-спектрометрії та ЯМР спектроскопії.



Для оптимізації умов синтезу цільової сполуки **ХХ** ми варіювали співвідношення реагентів (надлишок алкілюючого реагента), розчинники (толуол, *о*-дихлоробензол та ін.) та температурний режим реакції. Однак, в усіх умовах, у тому числі при безпосередньому нагріванні **АО** у надлишку 1,3-дийодопропану, було одержано суміш вихідного **АО** та сполук **9.5** і **9.6**. Для уникнення утворення побічного продукту **9.6** ми спробували скоротити час реакції за рахунок мікрохвильової активації. Так, при мікрохвильовому опроміненні суміші вихідних сполук у толуолі при 150 °С впродовж 10 хвилин було отримано суміш вихідного **АО** та цільового продукту **9.5** зі співвідношенням 60:40 (**АО** : **9.5**). Однак, додаткове нагрівання реакційної суміші при мікрохвильовому опроміненні впродовж 20 хвилин при 130 °С призвело до накопичення побічного продукту **9.6**. Тому далі ми провели мікрохвильовий синтез в умовах нагрівання при 170 °С впродовж 5 хвилин, і отримали суміш у співвідношенні 45:55 (**АО** : **9.5**). Подальше нагрівання у тих самих умовах впродовж 30 хвилин не привело до накопичення цільового продукту **9.5**. Оскільки осад, що утворювався в усіх попередніх випадках містив як **АО** так і **9.5**, ми вирішили провести мікрохвильовий синтез у розчинниках, в яких добре розчиняється як вихідна, так і цільова сполуки. Однак, нагрівання вихідних сполук у *N*-метил-2-піролідоні при 170 °С в

умовах мікрохвильового опромінення впродовж 5 хвилин не привело до утворення цільового продукту, тоді як додаткове нагрівання реакційної суміші при 200 °C впродовж 30 хвилин призвело до руйнування хромофорної системи. При проведенні реакції в ацетонітрилі спостерігалось утворення цільової сполуки **9.5**, але у суміші з низкою побічних продуктів. Саме тому, найкращими умовами для синтезу **9.5**, на наш погляд, виявилось нагрівання вихідних сполук при 170 °C впродовж 5 хвилин з подальшим розділенням суміші у співвідношенні 45:55 (**AO** : **9.5**) колонковою хроматографією.

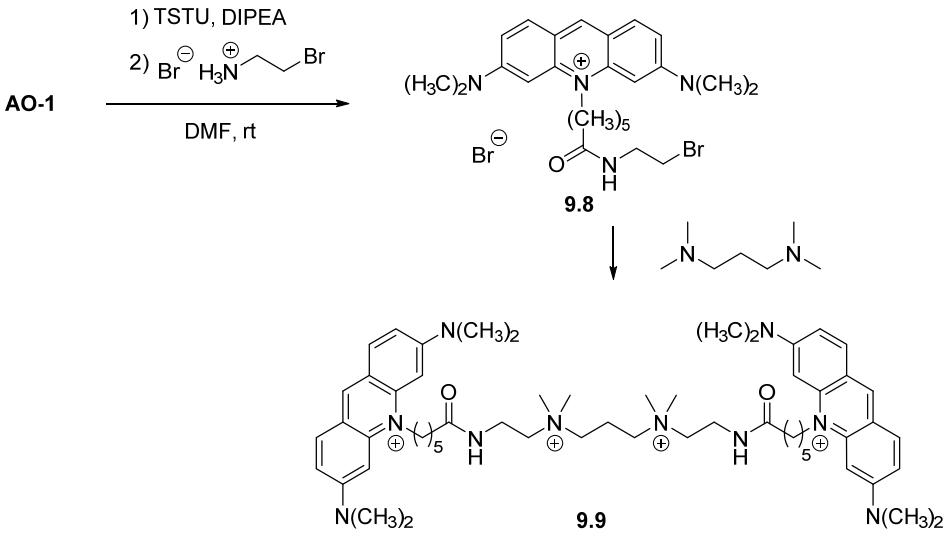
По аналогії з синтезом **YOYO-1** (*див. Розділ 8, п. 8.2.2*), ми спробували синтезувати сполуку **9.7** при нагріванні вихідних сполук у середовищі 2-етоксиетанола в умовах мікрохвильового опромінення впродовж 15 хвилин. Однак, у результаті реакції відбулося дегідрогалогенування сполуки **9.5** з утворенням побічного продукта **9.6**, який далі не реагує.



9.5 **9.7** **9.6**

Пошук оптимальних умов для синтезу сполуки **9.7** є предметом подальших досліджень.

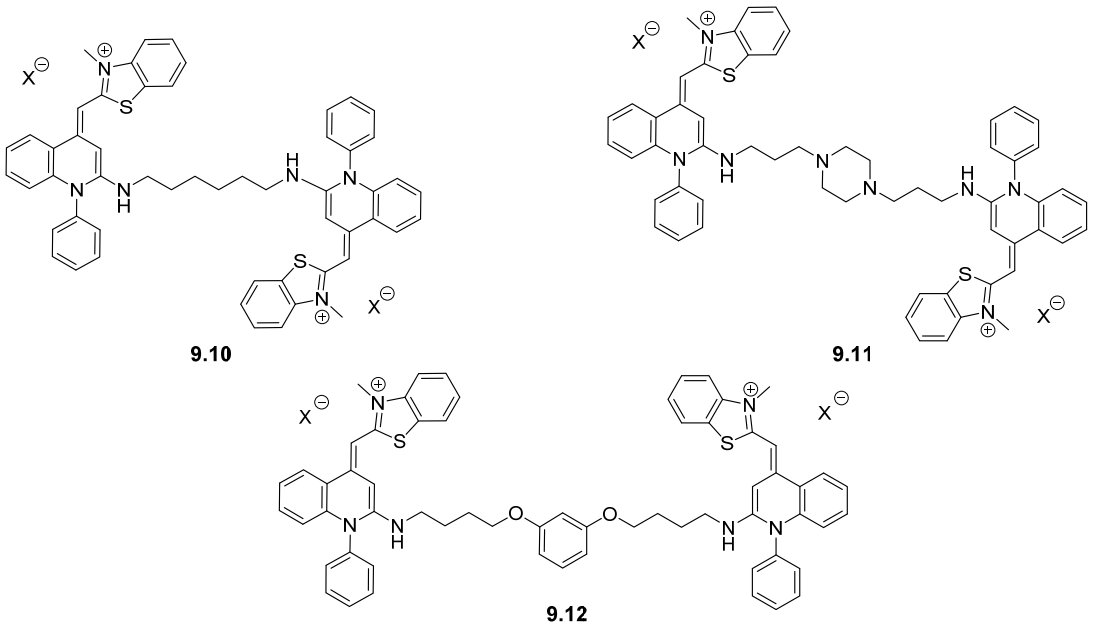
Паралельно ми відпрацьовували другий підхід і на першій стадії провели синтез сполуки **9.8** шляхом взаємодії **AO-1** з сіллю 2-бромо-етиламіну у присутності DIPEA та TSTU. Отриманий продукт **9.8** вводили у реакцію алкілування N^1,N^1,N^3,N^3-тетраметилпропан-1,3-діаміну у середовищі 2-етоксиетанола при нагріванні впродовж 16 годин. Хід реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ. Згідно з даними ВЕРХ у реакційній суміші спостерігалось утворення цільового продукту **9.9**, але в невеликій кількості та поряд із низкою побічних продуктів.



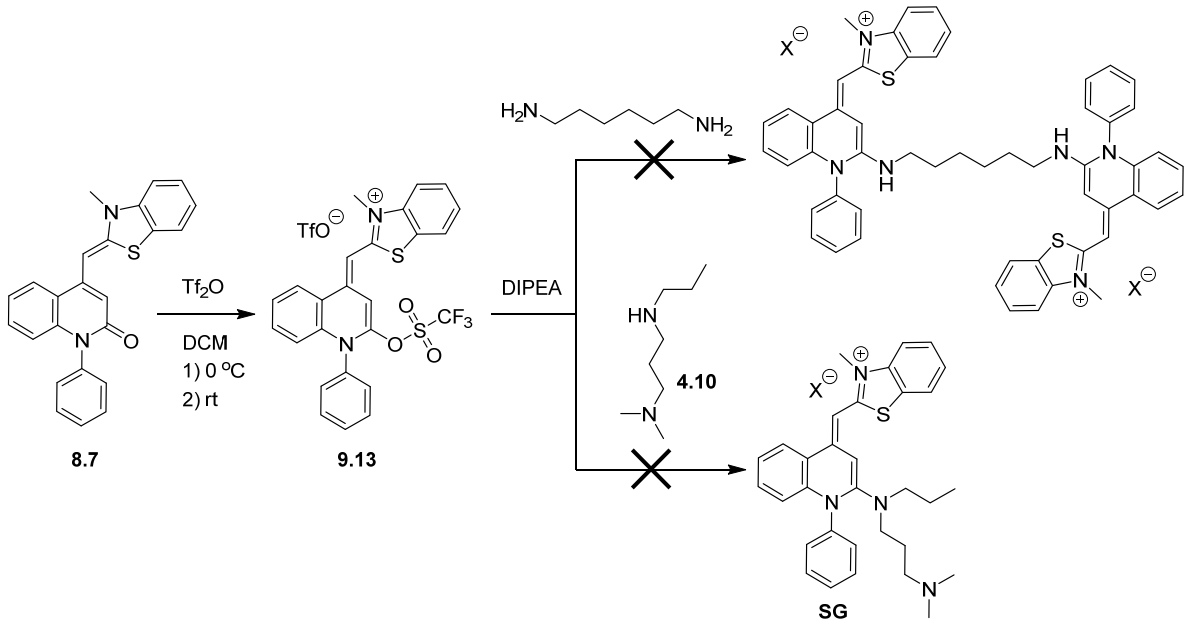
Відпрацювання умов одержання сполуки **9.9** є предметом подальших досліджень.

9.3 Синтез гомодимерних ціанінових барвників-інтеркаляторів

Оскільки синтез мономерного барвника **SYBR Green I** (*див. Розділ 8, п. 8.1*) за модифікованою схемою шляхом реакції відповідних хлоропохідної **8.2** та аміну **4.10** перебігає з малим виходом, і не має підстав очікувати покращення виходів у реакціях **8.2** з діамінами для одержання цільових сполук **9.10**–**9.12**, нами, в першу чергу, була вивчена можливість використання для введення аміногруп іншої відхідної групи замість хлорид-аніона у сполуці **8.2**.

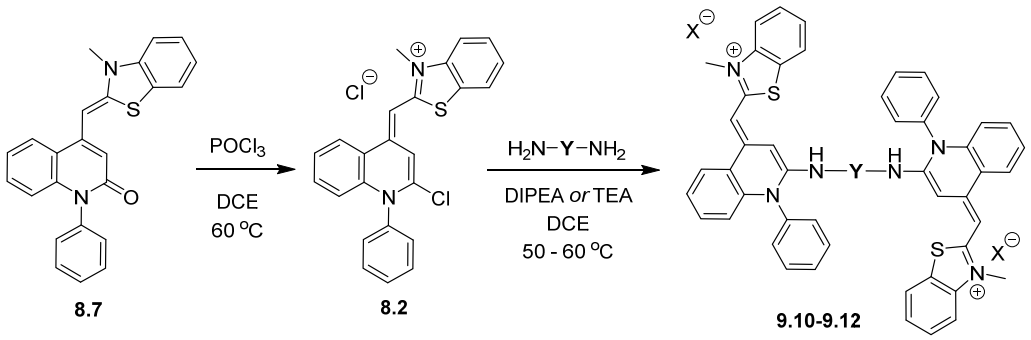


Так, за даними патентної заявки [67], використання трифлат-аніона як відхідної групи дозволяє провести реакції відповідної трифлат-похідної **9.13** з амінами в більш м'яких умовах, тобто в даному випадку трифлат-аніон є кращою відхідною групою, ніж хлорид.



Проте реакцію сполуки **9.13**, одержаної за методикою [67], з гексаметилендіаміном не вдалося провести ані в літературних (DIPEA, дихлорометан, 30 °C), ані в більш м'яких умовах. Більш того, при використанні **9.13** в реакції з **4.10** замість **SYBR Green I** (**SG**), за даними ВЕРХ, утворюється інший продукт.

Тому для одержання цільових гомодимерних барвників **9.10**–**9.12** ми скористалися схемою, подібною до синтезу **SG**.



Однак, реакцію **8.2** з гексаметилендіаміном в цих умовах також провести не вдалося, тому сполука **9.8** була виключена з подальшого

розгляду. Реакція **8.2** з відповідними діамінами для одержання гомодимерних барвників **9.11** та **9.12** перебігає набагато повільніше, ніж із вторинним моноаміном **4.10** у синтезі **SG**, потребує надлишку діаміну і супроводжується утворенням великих кількостей побічних продуктів, через що вміст цільових сполук у реакційній суміші, за даними ВЕРХ, становить не більше 30 %, і, за рахунок втрат при очищені, виходи **9.10** та **9.12** є дуже помірними.

Методика синтезу трифлату 3-метил-2-((1-феніл-2-(((трифторометил)сульфоніл)окси)хінолін-4(1*H*)-іден)метил)бензо[*d*]тіазол-3-ію (9.13). В атмосфері аргону, до охолодженого до 2 °С розчину сполуки **8.7** (210 мг, 0.55 моль) у сухому дихлорометані (5 мл) із шприца, через гумову септу, по краплях додають ангідрид трифторометансульфокислоти (195 мг, 0.69 ммоль, 1.25 екв.). Одержану суміш перемішують при температурі нижче 5 °С протягом 1 години, ще 2 години — при кімнатній температурі, і випаровують досуха. Одержаний з кількісним виходом продукт використовують у подальших перетвореннях без додаткової очистки.

Хлорид 2-((2-хлоро-1-фенілхінолін-4(1*H*)-іліден)метил)-3-метилбензо-[d]тіазолію **8.2** одержували за розробленою нами методикою (*див. Розділ 8, п. 8.1.2*).

Методика синтезу подвійної солі 2,2'-((((піперазин-1,4-дііл*біс*(пропан-3,1-дііл))*біс*(азанедііл))*біс*(1-фенілхінолін-2(1*H*)-іл-4(1*H*)-іліден))*біс*(метанілілідену))*біс*(3-метилбензо[*d*]тіазол-3-ію) (9.11). До сполуки **8.2** (0.39 ммоль) додають сухий дихлороетан (4 мл), 4,4'-3,3'-(піперазін-1,4-дііл)*біс*(пропан-1-амін) (51 мг, 0.25 ммоль, 1.1 екв.) і DIPEA (252 мг, 1.95 ммоль, 2.5 екв.) і перемішують реакційну суміш в атмосфері аргону при 60 ºС протягом 3 діб. Після другої доби до реакційної суміші додають 90 мг (0.39 ммоль, 2.3 екв.) діаміну. Після охолодження і випаровування розчинника залишок промивають етером (3×2 мл), випаровують і кристалізують з ацетонітрилу. Одержаний осад очищують колонковою хроматографією з оберненою фазою (скляна колонка 360 × 13 мм, LU011BM, елюент — суміш ацетонітрил-вода 50:50 (v/v) із

додаванням 0.05 % оцтової кислоти). Основну фракцію після розділення випаровують і піддають повторному очищенню (360×13 мм, LU011BM, елюент — азеотропна суміш ацетонітрил-вода). Основну фракцію після розділення випаровують і висушують в вакуумі. Вихід 70 мг. Чистота 80.0 % (ВЕРХ).

Методика синтезу подвійної солі 2,2'-(((((1,3-феніле*н*бі*с*(окси))-*бі*с(бутан-4,1-діїл))*бі*с(азанедіїл))*бі*с(1-фенілхінолін-2(1*H*)-іл-4(1*H*)-іліден))*бі*с(метаніліліден))*бі*с(3-метилбензо[*d*]тіазол-3-ію) (9.12). До сполуки **8.2** (0.78 ммоль) додають сухий дихлороетан (3.5 мл), 4,4'-(1,3-феніле*н*бі*с*(окси))*бі*с(бутан-1-амін) (100 мг, 0.39 ммоль, 1 екв.) і триетиламін (474 мг, 4.68 ммоль, 3 екв.) і перемішують реакційну суміш в атмосфері аргону при 60 ºС протягом 3 діб. Після першої і другої доби до реакційної суміші додають по 100 мг (0.39 ммоль; загалом 200 мг, 0.78 ммоль, 2 екв.) діаміну. Після охолодження і випаровування розчинника залишок промивають етером (3×2 мл), висушують в вакуумі і очищують колонковою хроматографією з силікагелем (скляна колонка 550 × 19 мм, елюент — азеотропна суміш ацетонітрил-вода). Основну фракцію після розділення випаровують, кристалізують з ацетонітрилу, фільтрують гарячим. Одержаний осад висушують в вакуумі. Вихід 16 мг. Чистота 94.1 % (ВЕРХ). З фільтрату після кристалізації виділяють додатково 40 мг продукту з чистотою 84.0 % (ВЕРХ).

10 Визначення кореляцій спектральних та фотофізичних властивостей з молекулярною будовою одержаних барвників

Димерні барвники складаються з двох хромофорних фрагментів, сполучених між собою лінкерами різної природи та довжини. Завдяки такій будові ці барвники утворюють у водному середовищі внутрішньо-молекулярні агрегати, що обумовлює мінімальний рівень флуоресценції у незв'язаному з длДНК стані. Але при *бі*с-інтеркаляції хромофорних фрагментів між парами комплементарних основ длДНК агрегати дисоціюють з утворенням високофлуоресцентних комплексів барвник-длДНК (Рис. 10.1).

Димерний барвник у асоційованій формі

Комплекс барвник-длДНК

Рисунок 10.1 – Схематичне зображення процесу інтеркаляціїї димерного барвника у длДНК.

Спектральні та фотофізичні властивості мономерних (**AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**) та димерних барвників-інтеркаляторів (**YOYO-1** та ***bis*-AO3** – ***bis*-AO13**) досліджували у метанолі, водному середовищі 10 мМ Tris-буферу (pH 8.0) та при додаванні длДНК ($c_{\text{длДНК}}$ = 100 мкг/мл). Отримані дані максимумів поглинання та флуоресценції, коефіцієнти екстинкції, Стоксові зсуви, а також квантові виходи флуоресценції наведено у таблиці 10.1. Спектри поглинання та флуоресценції мономерних (**AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**) та димерних (**YOYO-1** та ***bis*-AO3** – ***bis*-AO13**) барвників-інтеркаляторів у різних середовищах представлені на Рис. 10.2 та. Рис. 10.3, відповідно.

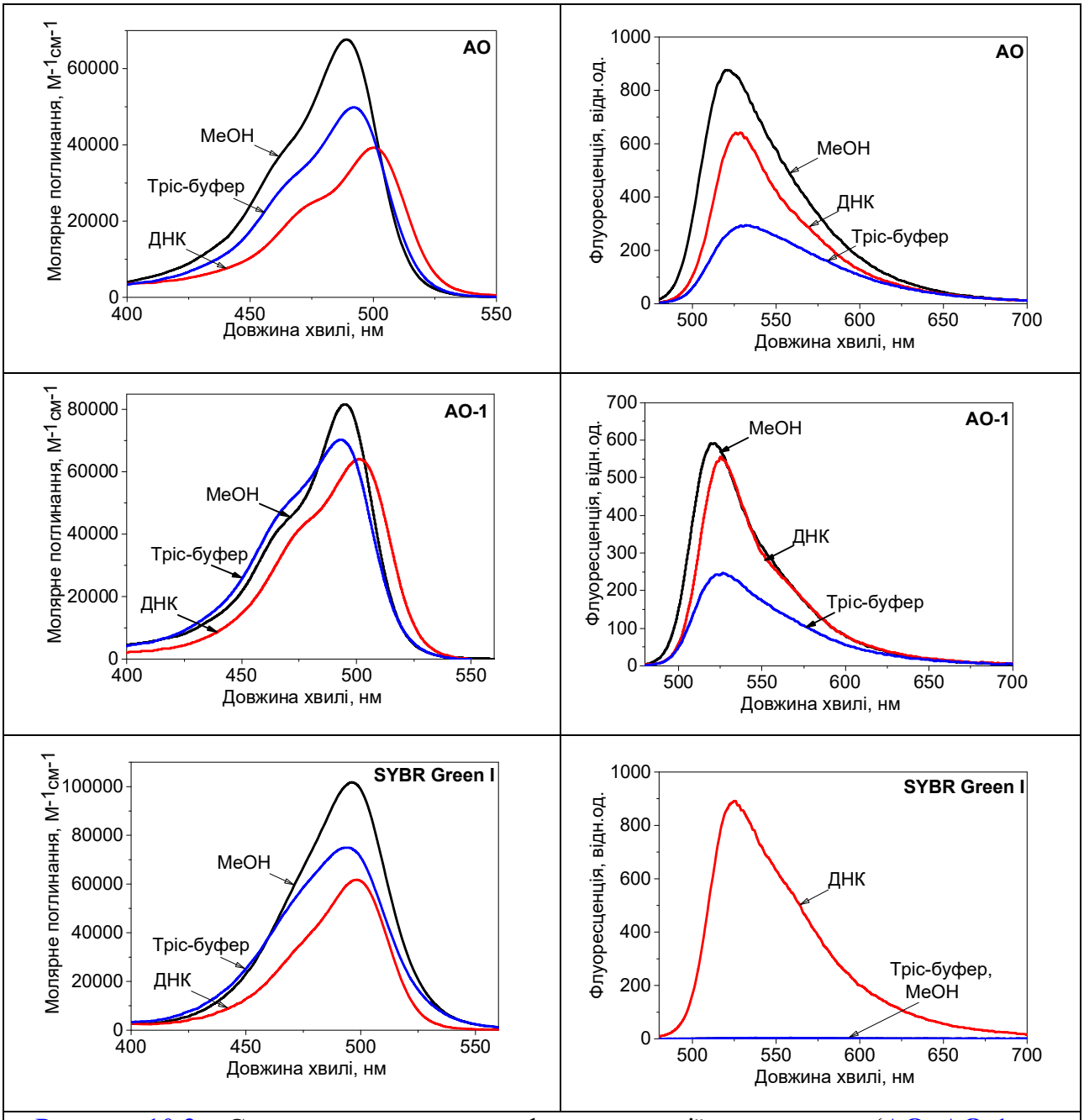


Рисунок 10.2 – Спектри поглинання та флуоресценції мономерних (**AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**) барвників-інтеркаляторів ($c_{\text{барвників}}$ = 1мкМ) у метанолі, 10 мМ Tris буфері та у присутності длДНК ($c_{\text{длДНК}}$ = 100 мкг/мл).

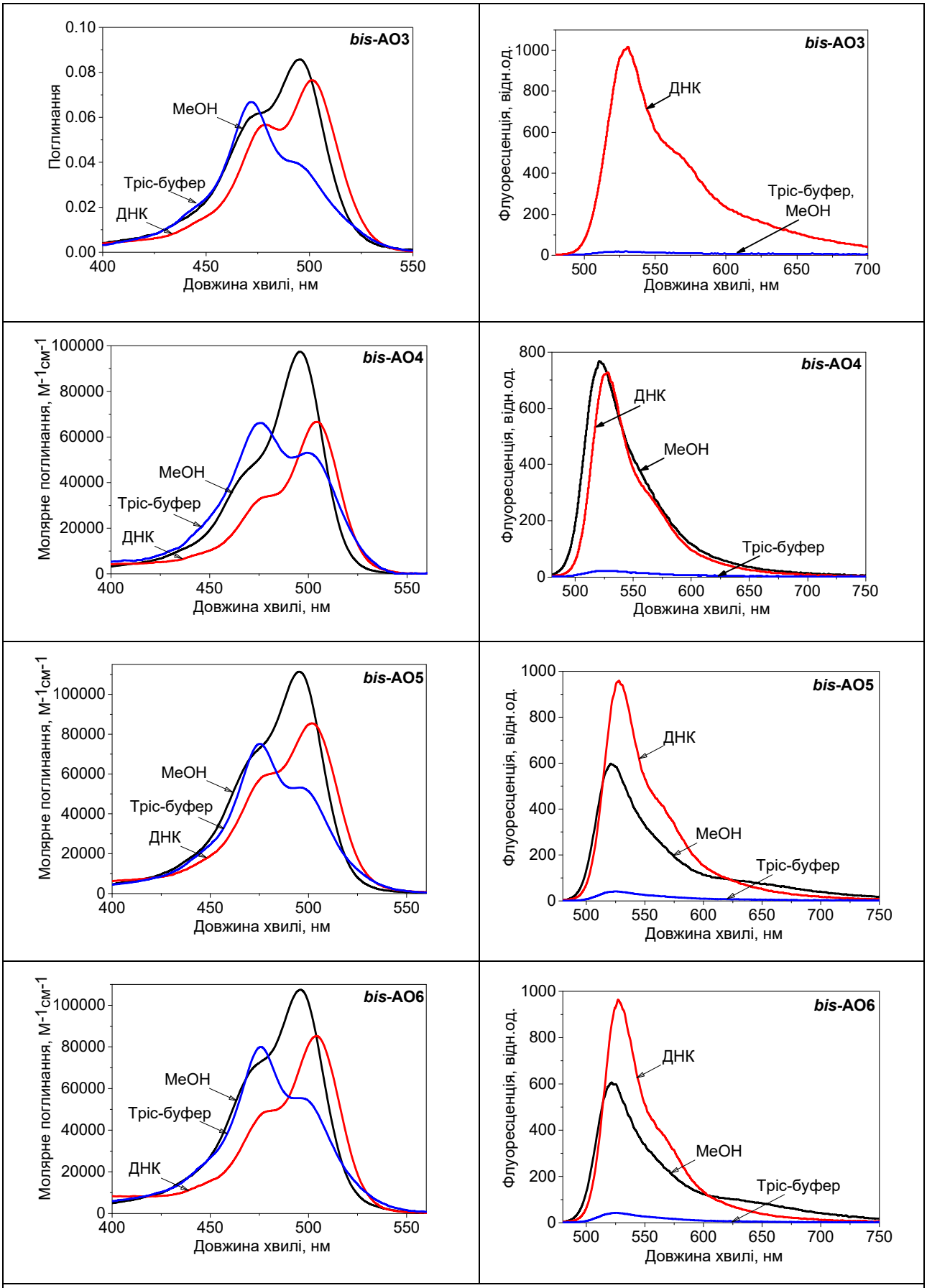
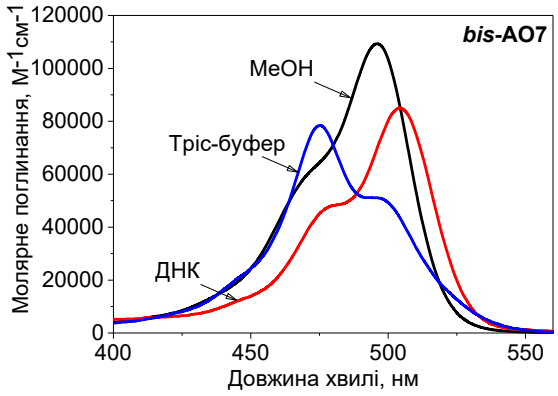
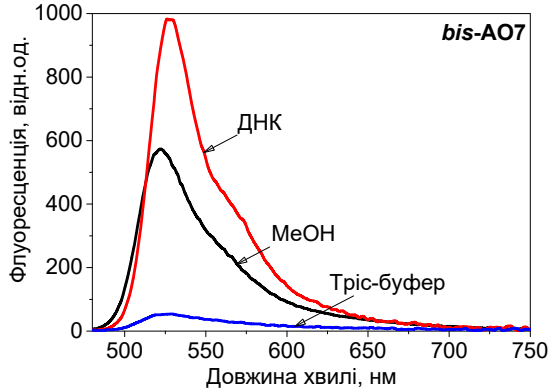
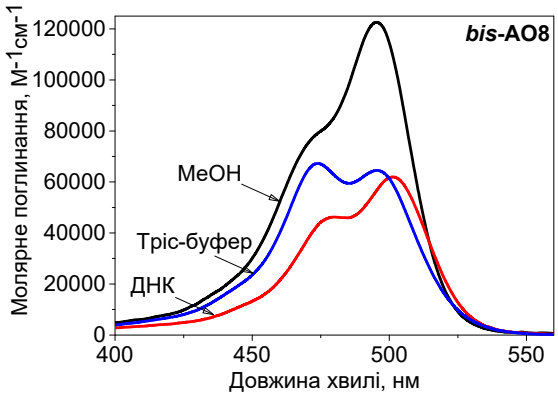
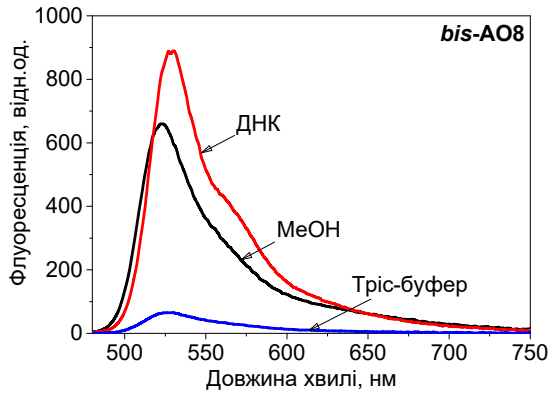


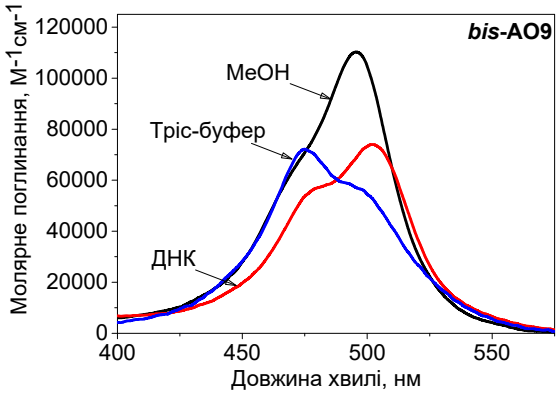
Рисунок 10.3 – Спектри поглинання та флуоресценції димерних (***bis*-АО3** – ***bis*-АО13** та **YOYO-1**) барвників-інтеркаляторів (с = 1мкМ) у метанолі, 10 мМ Tris буфері та у присутності длДНК ($с_{длДНК}$ = 100 мкг/мл).

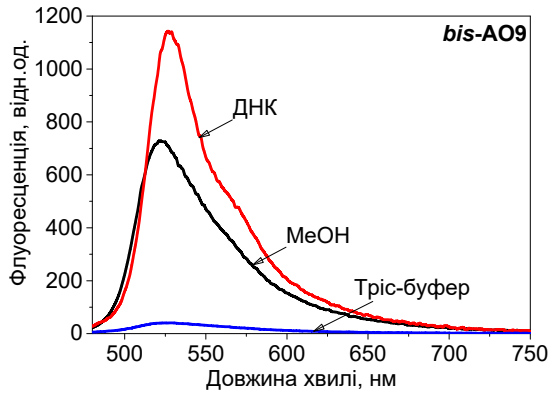


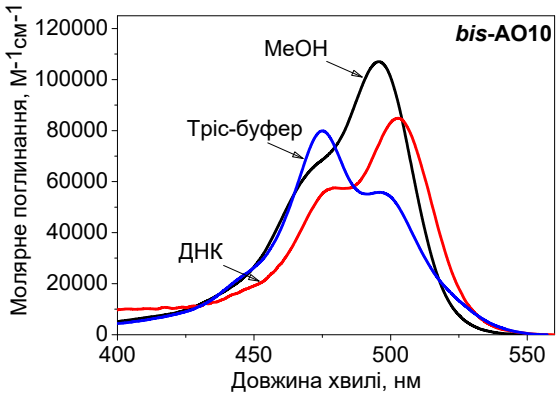












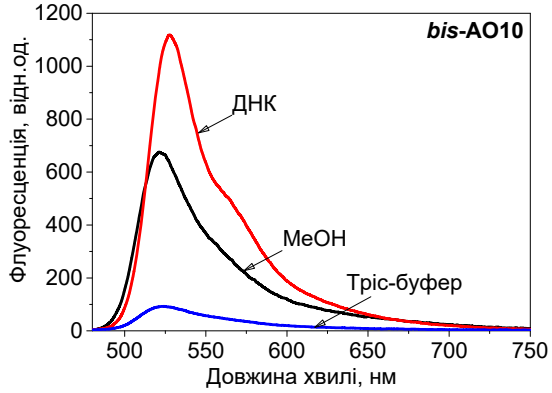


Рисунок 10.3, аркуш 2

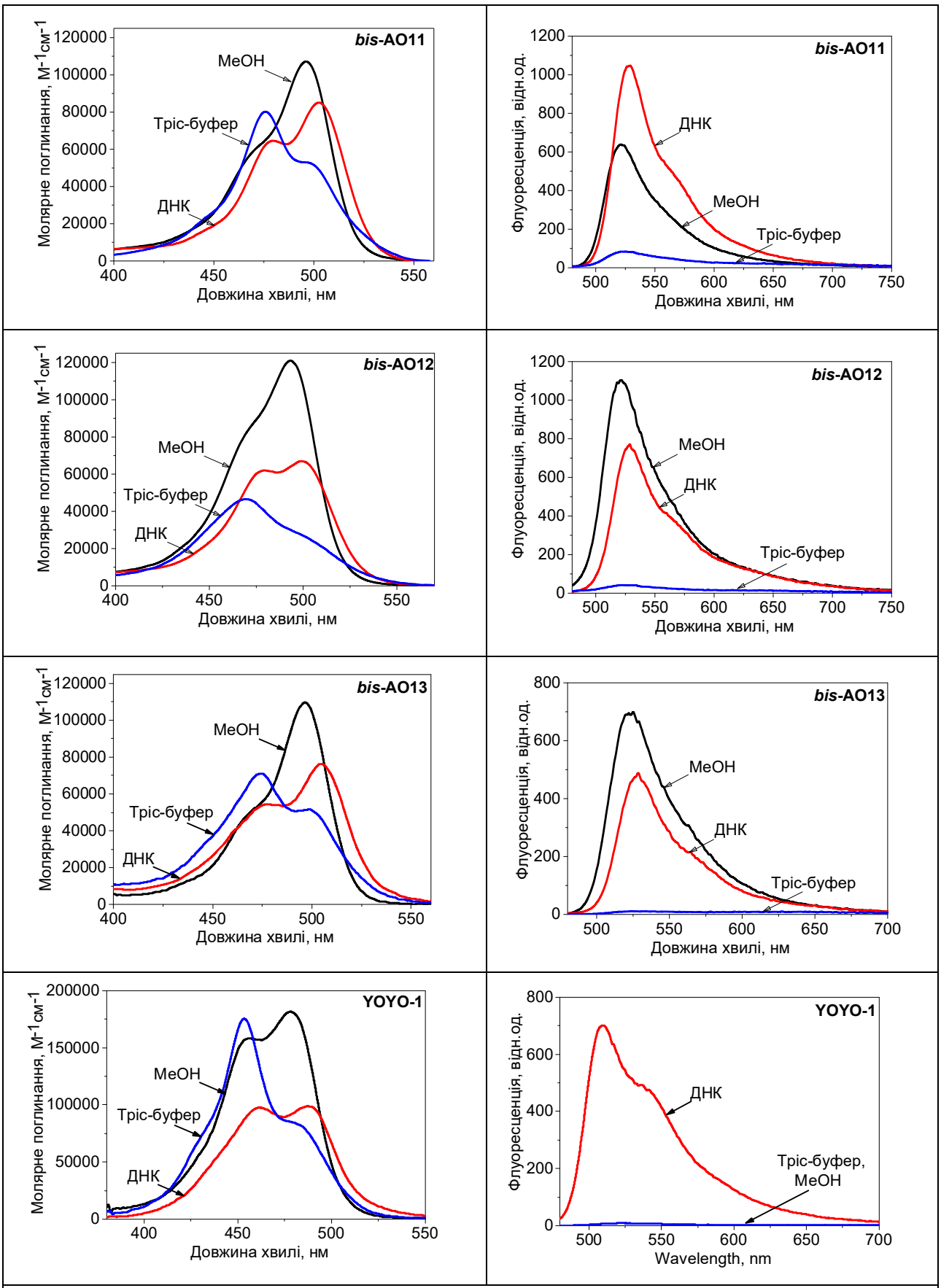
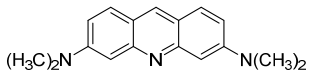
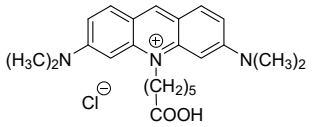
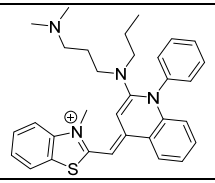
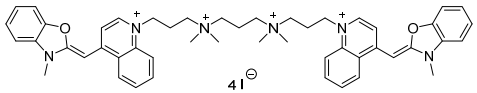
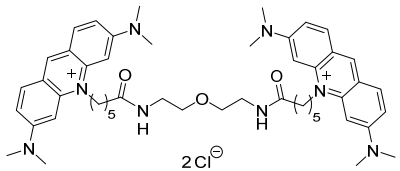
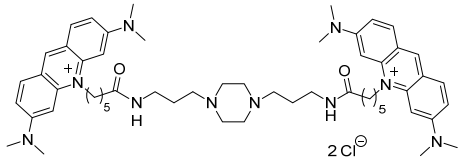
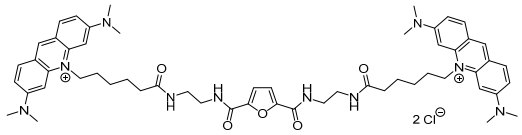
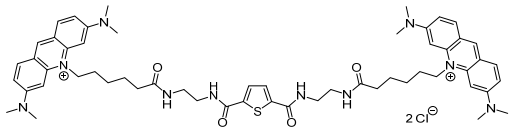
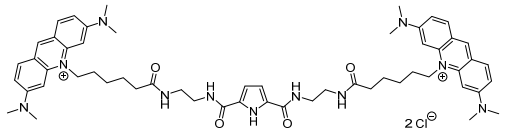
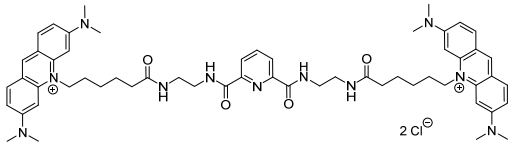


Рисунок 10.3, аркуш 3

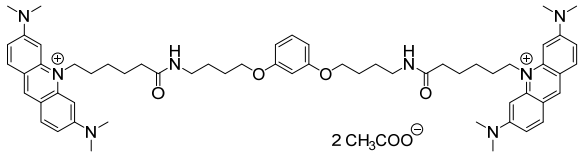
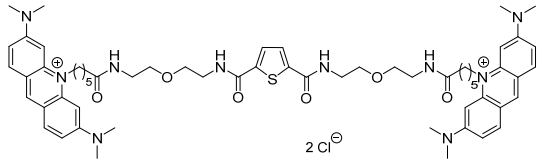
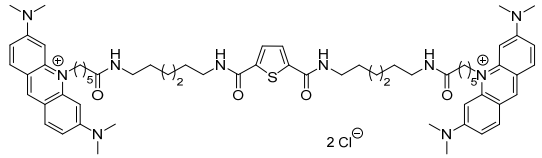
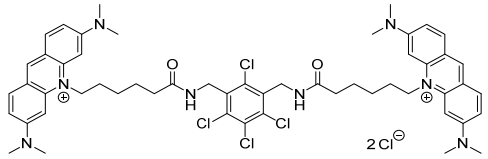
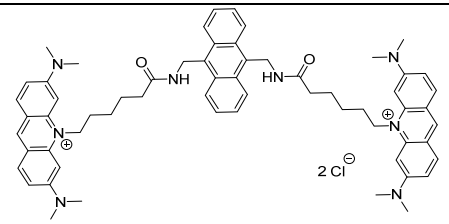
Таблиця 10.1 – Спектральні властивості мономерних (**AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**) та димерних барвників-інтеркаляторів (**YOYO-1** та ***bis*-AO3** – ***bis*-AO13**) у Tris-буфері та у присутності длДНК (100 мкг/мл).

Шифр	Структура	Середовище	$\lambda_{max(abs)}$, нм	$\lambda_{max(em)}$, нм	Φ_F, %	ε, $M^{-1}см^{-1}$	Стоксів зсув, $см^{-1}$
AO		Tris-буфер	492	530	27	49900	1460
		длДНК	500	528	48	39300	1060
		MeOH	487	522	56	67700	1380
AO-1		Tris-буфер	493	525	17	70300	1240
		длДНК	501	525	43	64100	910
		MeOH	494	521	38	81800	1050
SYBR Green I		Tris-буфер	494	–	–	75000	–
		длДНК	498	527	48	61700	1100
		MeOH	494	–	–	101800	–
YOYO-1		Tris-буфер	457	–	–	–	–
		длДНК	490	512	39	–	880
		MeOH	480	–	–	–	–
***bis*-AO3**		Tris-буфер	472	524	1	–	2100
		длДНК	501	530	38	–	1090
		MeOH	495	522	19	–	1040

Продовження **Таблиці 10.1**

Шифр	Структура	Середовище	$\lambda_{max(abs)}$, нм	$\lambda_{max(em)}$, нм	Φ_F, %	ε, $M^{-1}см^{-1}$	Стоксів зсув, $см^{-1}$
***bis*-AO4**		Tris-буфер	474	637	2	66200	5400
		длДНК	504	528	55	66700	900
		MeOH	494	522	34	97500	1090
***bis*-AO5**		Tris-буфер	474	524	2	75200	1940
		длДНК	502	528	45	85500	910
		MeOH	495	520	26	111400	970
***bis*-AO6**		Tris-буфер	476	524	2	80100	1920
		длДНК	504	527	47	85300	870
		MeOH	496	520	28	107600	930
***bis*-AO7**		Tris-буфер	475	524	2	78500	1970
		длДНК	504	527	51	85200	870
		MeOH	496	520	29	109400	930
***bis*-AO8**		Tris-буфер	473	526	5	67300	2130
		длДНК	502	528	46	62000	980
		MeOH	495	523	29	122600	1080

Продовження **Таблиці 10.1**

Шифр	Структура	Середовище	$\lambda_{max(abs)}$, нм	$\lambda_{max(em)}$, нм	Φ_F, %	ε, $M^{-1}см^{-1}$	Стоксів зсув, $см^{-1}$
***bis*-AO9**		Tris-буфер	475	525	6	72300	2000
		длДНК	502	528	32	74100	980
		MeOH	495	522	28	110300	1050
***bis*-AO10**		Tris-буфер	474	525	5	80000	2050
		длДНК	502	528	39	84900	980
		MeOH	495	522	23	107100	1050
***bis*-AO11**		Tris-буфер	475	525	5	80300	2000
		длДНК	502	527	47	85100	950
		MeOH	496	522	23	107200	1000
***bis*-AO12**		Tris-буфер	470	525	4	46600	2230
		длДНК	500	530	37	67000	1130
		MeOH	493	522	26	121100	1130
***bis*-AO13**		Tris-буфер	474	525	1	71300	2050
		длДНК	505	527	29	76400	830
		MeOH	496	522	29	109800	1000

Спектри поглинання мономерного барвника **АО** у Tris буфері (Рис. 10.2) мають одну довгохвильову смугу при 492 нм з молярним поглинанням ε = 49 900 $М^{-1}$ $см^{-1}$, а також короткохвильову смугу при 468 нм за рахунок агрегації у димери шляхом утворення π-π комплексів між π-спряженими системами молекул АО у водному середовищі. Проте ця агрегація є слабо вираженою, коли концентрація **АО** не перевищує 1×10^{-5} М. У метанолі як у менш полярному середовищі спостерігається гіпсохромний зсув смуги поглинання **АО** на 5 нм. При цьому молярне поглинання **АО** в метанолі збільшується в 1.36 рази. Це може бути результатом незначної агрегації у водних розчинах. Факт агрегації додатково підтверджує напівширина смуги поглинання, яка зменшується від 1530 $см^{-1}$ у Tris буфері до 1330 $см^{-1}$ у метанолі. Оскільки в нашій роботі **АО** використовували при низькій концентрації (~10^{-6} М) як еталонну сполуку, агрегація була незначною і не впливала на спектральні та фотофізичні властивості барвника.

Максимуми поглинання димерних барвників ***bis*-АО3** – ***bis*-АО13** в Tris буфері знаходяться в області 472–476 нм, а флуоресценції – в області 524 нм, що добре співпадає з оптичними каналами для збудження при 470 нм та детектування при 520 нм. Для всіх барвників спостерігаються батохромний та батофлуорохромний зсуви максимумів поглинання та флуоресценції при переході з водного середовища до розчина длДНК. Спектри поглинання димерних барвників ***bis*-АО3** – ***bis*-АО13**, виміряні в Tris буфері без додавання длДНК, демонструють дві смуги поглинання: основну смугу близько 475 нм і додаткову – близько 495 нм. Після додавання зростаючих концентрацій длДНК максимум поглинання в області 475 нм знижується, тоді як новий максимум в області 501–504 нм зростає, що свідчить про руйнування “шпилькоподібних” агрегатів при зв’язуванні димерних барвників з длДНК.

При переході з більш полярного водного середовища Tris буферу до менш полярного метанолу, смуга поглинання ***bis*-АО3** – ***bis*-АО13** біля ~ 475 нм зникає, тоді як смуга при ~ 495 нм зростає, що свідчить про

відсутність внутрішньомолекулярних агрегатів у метанолі. Димерні барвники ***bis*-AO3** – ***bis*-AO13** мають приблизно в 1.5 рази вищі коефіцієнти молярного поглинання порівняно з мономерним барвником **AO** у водному буфері та в MeOH, що пояснюється, вочевидь, об'єднанням двох хромофорних фрагментів в одній молекулі.

Варто зазначити, що спектри поглинання інтеркальованих у длДНК димерних барвників (Рис. 10.3) подібні до тих, що демонструють мономерні барвники **AO** та **AO-1** (Рис. 10.2), що вказує на незначний вплив інтеркаляції на електронну структуру двох мономерних одиниць **AO**, пов'язаних у димерній структурі.

При переході конформаційно гнучких димерних барвників від водного буферного розчину до розчину длДНК, спостерігається збільшення їх квантових виходів у 18.8–27.0 разів (табл. 10.1), що, вочевидь, свідчить про збільшення конформаційної жорсткості молекули барвника за рахунок руйнуванням внутрішньомолекулярних агрегатів при інтеркаляції у молекулу длДНК. Натомість, квантові виходи мономерних барвників **AO** та **AO-1** при зв'язуванні з длДНК зростають лише у 1.8 та 2.5 рази, відповідно, порівняно з їх квантовими виходами у вільному, незв'язаному з длДНК, стані. Таким чином, завдяки низькому рівню фонової флуоресценції у випадку димерних барвників ***bis*-AO3** – ***bis*-AO13**, вони є більш придатними для детекції продуктів ампліфікації під час проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

11 Дослідження реакційної здатності та хімічної стабільності барвників-інтеркаляторів

Придатність барвника для детекції ДНК визначається, у першу чергу, його здатністю селективно зв'язуватися з фрагментами длДНК з утворенням флуоресцентного комплексу з високим квантовим виходом, від якого залежить рівень чутливості детекції. Крім того, барвник повинен бути термічно, гідролітично та фотолітично стійким в умовах проведення детекції, а також мінімально інгібувати хід реакції при ПЛР аналізі.

Розділ 11 присвячено вивченню термічної, фотохімічної та гідролітичної стабільності мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів, отриманих у ході виконання проєкту.

11.1 Вивчення термічної та гідролітичної стабільності барвників-інтеркаляторів

Визначення термічної стабільності мономерних барвників **AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**, а також димерних барвників **YOYO-1** та ***bis*-AO3**–***bis*-AO7** проводили при витримуванні розчину барвника в концентрації 150 мкМ у 10 мМ Tris-буфері (pH 8.0) при 90 °C впродовж 5 годин. На початку дослідження та кожні 30 хвилин відбирали аліквоти розчину барвника об'ємом 20 мкл, розводили у 2.98 мл 10 мМ Tris-буферу (pH 8.0) для одержання концентрації барвника у розчині 1×10^{-6} М, та вимірювали спектри поглинання при кімнатній температурі на спектрофотометрі *Perkin–Elmer Lambda 35 UV/Vis* в стандартних 1-см кварцових кюветах. Отримані зміни інтенсивності поглинання у максимумі мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів від часу витримування при 90 °C представлено на Рис. 11.1.

Серед досліджених барвників мономерні та димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого (**AO**, **AO-1**, ***bis*-AO3**–***bis*-AO7**) продемонстрували високу термічну стабільність в умовах нагрівання при 90 °C впродовж 5 годин, що є необхідною умовою для

використання даних барвників для детекції продуктів ампліфікації у ході аналізу методом ПЛР у режимі реального часу (Рис. 11.1). З іншого боку, несиметричний ціаніновий барвник **SYBR Green I** показав найнижчу термічну стабільність в умовах проведення експерименту, що свідчить про розкладання барвника при інкубуванні в лужних умовах Tris-буферу при 90 °C та робить його менш придатним для детекції ДНК у зазначених умовах.

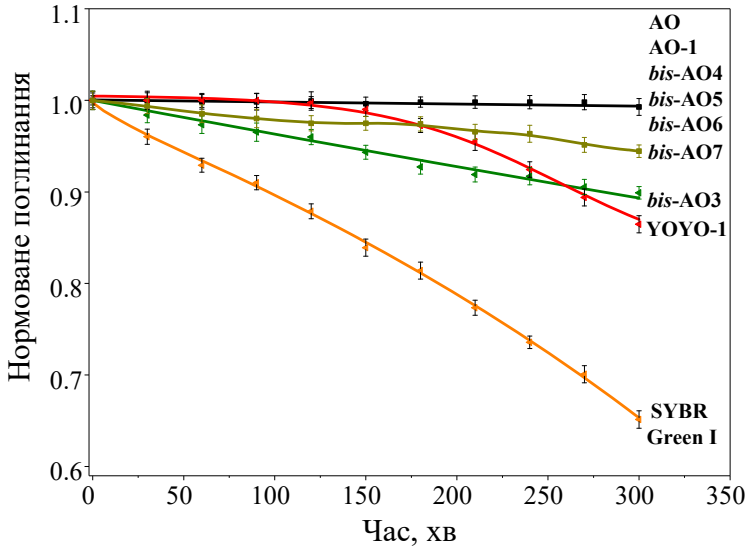


Рисунок 11.1 – Криві залежності нормованого поглинання (A/A_0) мономерних барвників **AO**, **AO-1**, **SYBR Green I** та димерних барвників **YOYO-1** та ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** у 10 мМ Tris-буфері (pH 8.0) від часу витримування при 90 °C.

У ході виконання проєкту було досліджено також стабільність барвників при зберіганні зразків у різних умовах. Ступінь чистоти та індивідуальність барвників контролювали за допомогою ^{1}H ЯМР спектроскопії та методом ВЕРХ. Ми встановили, що мономерні барвники **AO**, **AO-1** та **AO-3** є досить стабільними при тривалому зберіганні у вигляді порошку при кімнатній температурі згідно з даними ^{1}H ЯМР спектрів та ВЕРХ аналізів. Для практичного використання у ПЛР краще мати і застосовувати барвник у вигляді розчину. Проведене дослідження показало, що димерні барвники мають гарну стабільність навіть у водних розчинах (Tris-буфер) та ДМСО. Але для подовження терміну зберігання краще димерні барвники ***bis*-AO3**–***bis*-AO7** зберігати при –18 °C.

11.2 Дослідження фотохімічної стабільності барвників-інтеркаляторів

Фотостабільність мономерних барвників **AO-1** та **SYBR Green I**, а також димерних барвників **YOYO-1** та ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** оцінювали за зміною оптичної густини розчинів барвників у 10 мМ Tris-буфері (pH 8.0) та при додаванні длДНК ($c_{длДНК}$ = 100 або 150 мкг/мл) з використанням галогенової лампи *Philips HPI-T Plus 400W/645* потужністю 400 Вт як джерела світла. Вимірювання спектрів поглинання проводили при 24 °C на спектрофотометрі *Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis*. Концентрація барвників становила 1 мкМ. Опромінення зразків проводили у 1-см кварцових кюветах з тефлоновими пробками, які розміщували на відстані 30 см від джерела світла без використання оптичних фільтрів. У процесі опромінення, через певні проміжки часу вимірювали оптичну густину зразків. Швидкість фотодеградації барвників визначали на рівні 50 % кривих залежності нормованого поглинання A/A_0 від часу, де A_0 та A – оптичні густини зразків до опромінення та у процесі опромінення, відповідно. Отримані графіки залежності нормованого поглинання A/A_0 від часу опромінення представлено на Рис. 11.2 та Рис. 11.3.

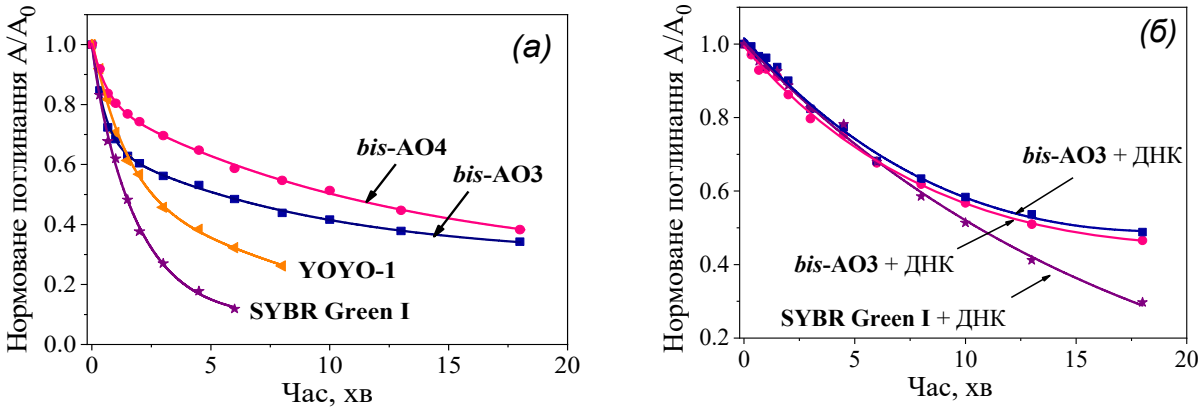


Рисунок 11.2 – Криві залежності нормованого поглинання (A/A_0) барвників ($c_{барвників}$ = 1 мкМ) **SYBR Green I**, **YOYO-1**, ***bis*-AO3** та ***bis*-AO4** у (*а*) 10 мМ Tris-буфері з pH 8.0 та (*б*) при додаванні длДНК($c_{ДНК}$ = 150 мкг/мл) від часу опромінення.

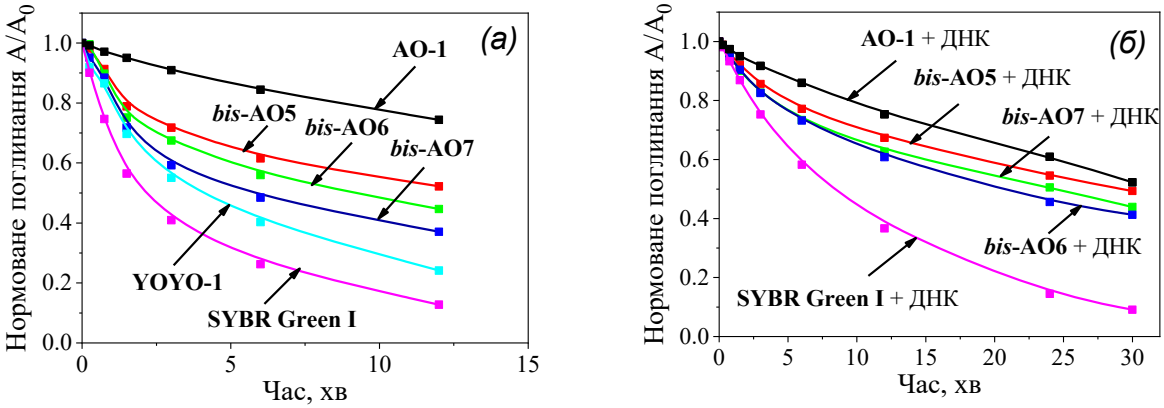


Рисунок 11.3 – Криві залежності нормованого поглинання (A/A_0) барвників ($c_{барвників}$ = 1 мкМ) **SYBR Green I**, **YOYO-1**, **AO-1**, ***bis*-AO5** – ***bis*-AO7** у (*а*) 10 мМ Tris-буфері з pH 8.0 та (*б*) при додаванні длДНК ($c_{длДНК}$ = 100 мкг/мл) від часу опромінення.

Серед досліджених барвників найбільш фотостабільним виявився мономерний барвник **AO-1**, тоді як ціанінові барвники **SYBR Green I** та **YOYO-1** продемонстрували найнижчу фотостабільність в умовах проведення експерименту. Димерні барвники на основі акридинового оранжевого ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** також є більш стабільними до опромінення у порівнянні з ціаніновими барвниками. Так, фотостабільність барвників ***bis*-AO4** ($\tau_{1/2}$ = 5.6 хв) та ***bis*-AO3** ($\tau_{1/2}$ = 10.3 хв) у 2 та 4 рази, відповідно, вища у порівнянні з фотостабільністю ціанінового димеру **YOYO-1** ($\tau_{1/2}$ = 2.6 хв).

11.3 Вивчення стабільності барвників-інтеркаляторів до дії окислювальних реагентів

Стабільність мономерних барвників **AO**, **AO-1** та **SYBR Green I**, а також димерних барвників ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** до дії окислювальних реагентів визначали у 8%-ному розчині H_2O_2 спектрофотометричним методом. Розчин 8%-ного H_2O_2 у 10 мМ Tris-буфері готували розбавленням 30%-ного розчину перекису водню 13.6 мМ Tris-буфером (pH 8.0). Значення початкової оптичної густини барвників обирали в межах A = 0.095–0.100 в максимумі поглинання при вимірюванні у стандартній 1 см кварцовій кюветі. Вимірювання спектрів поглинання проводили при 24 ºС на спектрофотометрі

PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis у стандартній 1 см кварцовій кюветі, через певні проміжки часу. Стабільність досліджуваних барвників визначали на рівні 50 % кривих залежності нормованого поглинання A/A_0 від часу, де A_0 та A – оптичні густини зразків у 10 мМ Tris-буфері (pH 8.0) та у 8%-ному розчині H_2O_2 у 10 мМ Tris-буфері, відповідно. Отримані графіки залежності нормованого поглинання A/A_0 від часу дії окислювального реагенту представлено на Рис. 11.4.

У порівнянні з ціаніновими барвниками **SYBR Green I** та **YOYO-1**, акридиновий оранжевий **AO** та барвники на його основі (**AO-1**, ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7**) є набагато більш стабільними до дії окислювальних реагентів. Так, наприклад, оптична густина **YOYO-1** у 8%-ному розчині H_2O_2 зменшується у 2 рази протягом 11 хвилин, у той час як оптична густина барвників ***bis*-AO5** – ***bis*-AO7** зменшується лише в 1.3 рази протягом 3 годин. Слід зазначити, що найбільш стабільними до дії розбавленого розчину перекису водню є димерні барвники ***bis*-AO3** та ***bis*-AO4**, що робить ці барвники поряд із ***bis*-AO5** – ***bis*-AO7** придатними для проведення аналізів на ДНК-мікрочипах.

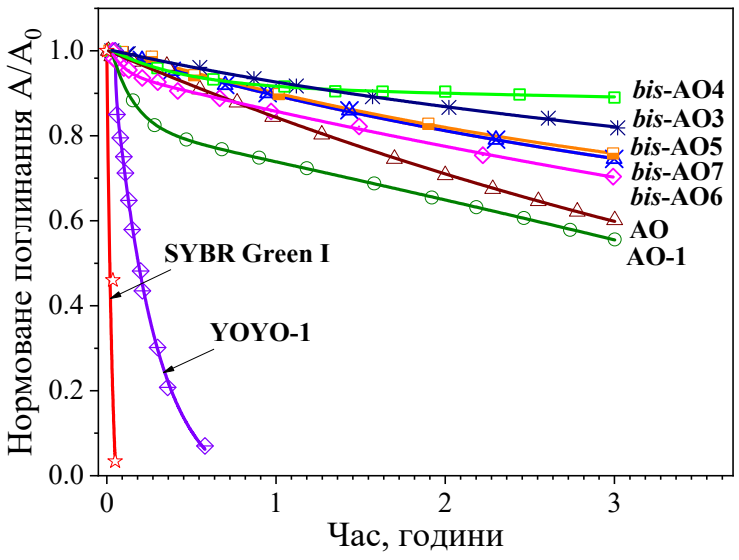


Рисунок 11.4 – Криві залежності нормованого поглинання (A/A_0) барвників ($c_{\text{барвників}}$ = 1 мкМ) **AO**, **AO-1**, **SYBR Green I**, **YOYO-1**, ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** у 8%-ному розчині перекису водню у 10 мМ Tris-буфері (pH 8.0) від часу витримування.

11.4 Дослідження змін інтенсивності флуоресценції барвників-інтеркаляторів від температури

Вимірювання спектрів флуоресценції мономерних барвників **AO** та **SG**, а також димерних барвників ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** у *н*-бутанолі та у розчині длДНК ($c_{длДНК}$ = 100 мкг/мл) в 10 мМ Tris-буфері з pH 8.0 проводили на спектрофлуориметрі *ISS ChronosFD* при різних температурах (20–90 ºС) при постійному перемішуванні розчину. Значення початкової оптичної густини барвників обирали в межах A = 0.095–0.100 в максимумі поглинання при вимірюванні у стандартній 1 см кварцовій кюветі з пробкою на спектрофотометрі *PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis.* Спектри флуоресценції вимірювали мінімум 3 рази і більше при кожній температурі до досягнення стабільного значення. Температурний режим регулювали за допомогою термостату *Fisher Scientific Isotemp 4100* та додатково контролювали термометром у кюветі. Флуоресценцію досліджуваних розчинів збуджували на довжині хвилі 470 нм. Отримані графіки залежності флуоресценції мономерних та димерних барвників у *н*-бутанолі та у розчині длДНК ($c_{длДНК}$ = 100 мкг/мл) в 10 мМ Tris-буфері з pH 8.0 від температури представлено на Рис. 11.5 та Рис 11.6.

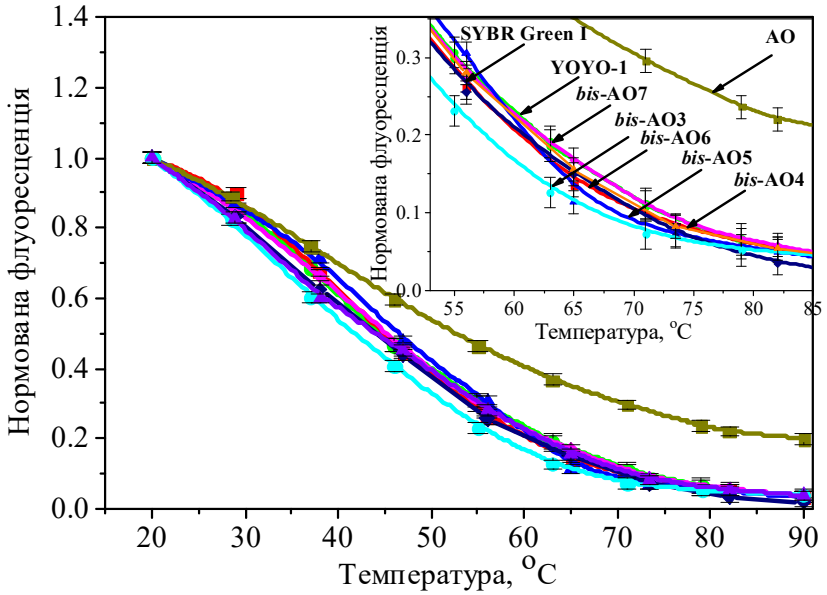


Рисунок 11.5 – Криві залежності нормованої інтенсивності флуоресценції барвників ($c_{барвників}$ = 1 мкМ) **AO**, **SYBR Green I**, **YOYO-1**, ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** у розчині длДНК ($c_{длДНК}$ = 100 мкг/мл) в 10 мМ Tris-буфері з pH 8.0 від температури.

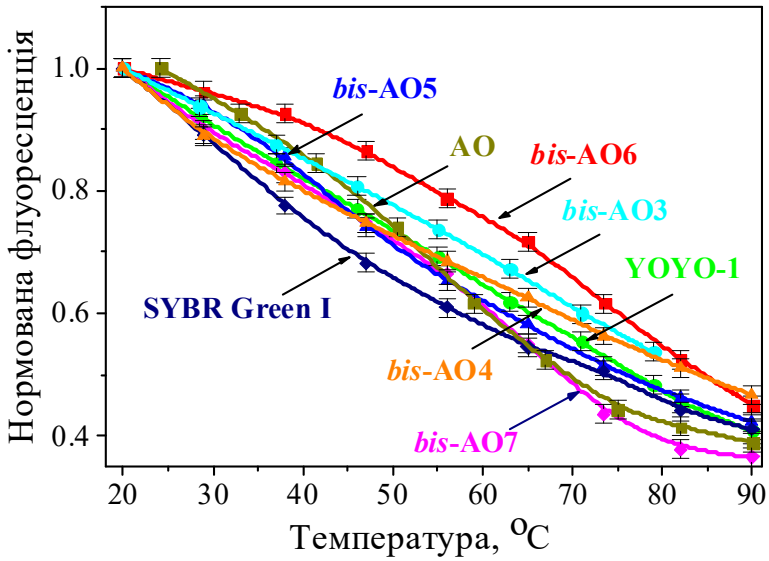


Рисунок 11.6 – Криві залежності нормованої інтенсивності флуоресценції барвників ($c_{\text{барвників}}$ = 1 мкМ) **AO**, **SYBR Green I**, **YOYO-1**, ***bis*-AO3** – ***bis*-AO7** у *н*-бутанолі від температури.

12 Розробка ПЛР тест-систем на основі барвників-інтеркаляторів

Придатність флуоресцентного барвника для проведення за його участі кількісної ПЛР (кПЛР) у режимі реального часу визначається низкою критеріїв (*див. Розділ 1*). Так, поряд зі стійкістю до світла, тепла та дії окислювальних реагентів, ідеальний барвник для кПЛР повинен бути нефлуоресцентним або мінімально флуоресціювати у вільному стані, тоді як при зв'язуванні з длДНК утворювати флуоресцентні комплекси з високими квантовими виходами. Висока інтенсивність флуоресценції барвника при зв'язуванні з дцДНК сприяє відтворюваності результатів і дозволяє аналізувати утворені амплікони за температурою плавлення. Крім того, такий барвник не повинен пригнічувати процес ПЛР, або проявляти мінімальний інгібуючий вплив на хід реакції.

Для визначення найкращих кандидатів для створення ПЛР тест-систем на їх основі ми дослідили поведінку одержаних димерних барвників ***bis*-AO4** – ***bis*-AO8** в умовах проведення кПЛР. Отримані дані порівняли з результатами кПЛР у присутності відомого барвника **SYBR Green I**.

12.1 Умови проведення кПЛР

Для проведення кількісної ПЛР (кПЛР) у режимі реального часу використовують реакційну суміш наступного складу: HOT FIREPol® ДНК полімераза – 0.025 U/мкл, HOT FIREPol® 10x, буфер B1 – 1x, $MgCl_2$ – 1.5 мМ, дНТФ – 200 мкМ кожного, прямий та зворотній праймери – 0.3 мкМ кожного, кодуюча ДНК (кДНК) – 22.5 нг та одержані барвники у вигляді 1 мМ розчину в ДМСО, який доводять до фінальної концентрації водою, вільною від нуклеаз (Zymo Research). Димерні барвники ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8** використовують у концентрації 0.75, 1.25 та 1.75 мкМ; барвник ***bis*-AO4** – 0.25, 0.5, 0.75, 1.25, та 1.75 мкМ; мономерний барвник **SYBR Green I** – 0.75, 1.0, 1.25 та 1.5 мкМ. Фінальний об'єм реакційної суміші становить 20 мкл.

кДНК отримують з РНК лейкоцитів людини шляхом реакції зворотної транскрипції. Використовують праймери з наступними послідовностями: STAT4 прямий праймер – CAGTGAAAGCCATCTCGGAGGA, STAT4 зворотній праймер – TGTAGTCTCGCAGGATGTCAGC (довжина продукту – 140 пн); STAT6 прямий праймер – CCTTGGAGAACAGCATTCCTGG, STAT6 зворотній праймер – GCACTTCTCCTCTGTGACAGAC (довжина продукту – 116 пн); HLA-B прямий праймер – CAGGGCTCTGATGTGTCTC; HLA-B зворотній праймер – TCAGTCCCTCACAAGACAG (довжина продукту – 63 пн).

Для негативного контролю аналізують проби, в яких матриця ДНК відсутня.

кПЛР проводять на ампліфікаторі з детекцією результатів реакції у реальному часі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System C1000 Touch (Bio-Rad) за стандартним протоколом: початкова активація полімерази – 95 °С, 12 хв; денатурація – 95 °С, 15 с; відпал – 60 °С, 20 с; подовження – 72 °С, 20 с. Стадії денатурації, відпалу та подовження повторюють циклічно 40 разів. Плавлення продуктів ампліфікації після закінчення ПЛР проводять за протоколом: 95 °С, 10 с, охолодження до 62 °С і потім нагрівання від 62 °С до 95 °С по 10 с з кроком 0,2 °С. Реєструють флуоресцентний сигнал на каналі SYBR: збудження на довжинах хвиль 450–490 нм, детекція на довжинах хвиль 515–530 нм.

Оцінку результатів кПЛР проводять за визначення порогового циклу C_t (кількість циклів, при яких флуоресценція перевищує поріг, що складає 250 відносних флуоресцентних одиниць (RFU)), який вказує на перехід графіка ампліфікації з лінійної до експоненційної фази.

Після закінчення ампліфікації проводять аналіз кривих плавлення продуктів реакції для підтвердження утворення специфічних ампліконів. Для цього реакційну суміш нагрівають, вимірюючи флуоресценцію. При досягненні температури плавлення продукту ампліфікації флуоресценція різко знижується. Плавлення продуктів ампліфікації після закінчення ПЛР

проводять за протоколом: 95 °C, 10 с, охолодження до 62 °C і потім нагрівання від 62 °C до 95 °C по 10 с з кроком 0.2 °C.

12.2 Дослідження методом ПЛР у реальному часі

Ступінь інгібування кПЛР у присутності одержаних (***bis*-AO4** – ***bis*-AO8**) та комерційних (**SYBR Green I** та **YOYO-1**) барвників досліджували при сталій концентрації ДНК та різних концентраціях барвника. Порогове значення циклу (C_t) використовували для оцінки інгібуючого ефекту кожного барвника на ефективність кПЛР. Ступінь інгібування кПЛР визначали як рівень нахилу лінії тренду на графіку залежності середнього значення C_t від концентрації барвника.

При ампліфікації гена STAT4 (*Рис. 12.1, а*) найменше значення нахилу лінії тренду спостерігається при використанні барвника ***bis*-AO6**. При цьому середнє значення C_t становить 29.4±0.8 для всіх досліджуваних концентрацій. Барвник ***bis*-AO5** у концентраціях 0.75 і 1.25 мкМ має значення C_t подібні до ***bis*-AO6**. Однак при збільшенні концентрації ***bis*-AO5** до 1.75 мкМ спостерігається зростання значення C_t до 32.2±1.1. Для ***bis*-AO6** і ***bis*-AO7** значення C_t зростають лінійно зі збільшенням концентрації. Нахил лінії тренду для барвників ***bis*-AO5** і ***bis*-AO8** приблизно в 4 рази вище, ніж для ***bis*-AO6**, що вказує на більш виражений інгібуючий ефект цих барвників саме при високих концентраціях (тобто при 1.75 мкМ). У той же час, нахил лінії тренду для барвника ***bis*-AO7** більш ніж у 6 разів вищий порівняно з барвником ***bis*-AO6**. Слід зазначити, що використання ***bis*-AO4** у зазначених концентраціях призводить до слабкого флуоресцентного сигналу, тоді як зниження концентрації до 0.25 мкМ дозволяє досягти значення C_t 28.9±0.6. Однак, при підвищенні концентрації до 0.5–0.75 мкМ спостерігається сильне інгібування кПЛР. Подібна тенденція спостерігається при ампліфікації генів STAT6 і HLA-B (*Рис. 12.1, в, д*). Отже, використання барвників ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8** в концентрації 0.75 мкМ, а також ***bis*-AO5** і ***bis*-AO6** в концентрації 1.25 мкМ та ***bis*-AO4** в концентрації 0.25 мкМ дозволяє досягти значення C_t

приблизно 24.1±0.7 для STAT6 і 19.1±0.5 для HLA-B. Серед досліджених барвників гомодимер ***bis*-AO6** демонструє найнижчі значення нахилу лінії тренду зі збільшенням концентрації, що вказує на відсутність інгібуючого впливу на кПЛР навіть при високих концентраціях. Слід зазначити, що флуоресценція в негативних контролях для всіх досліджуваних барвників не спостерігалася.

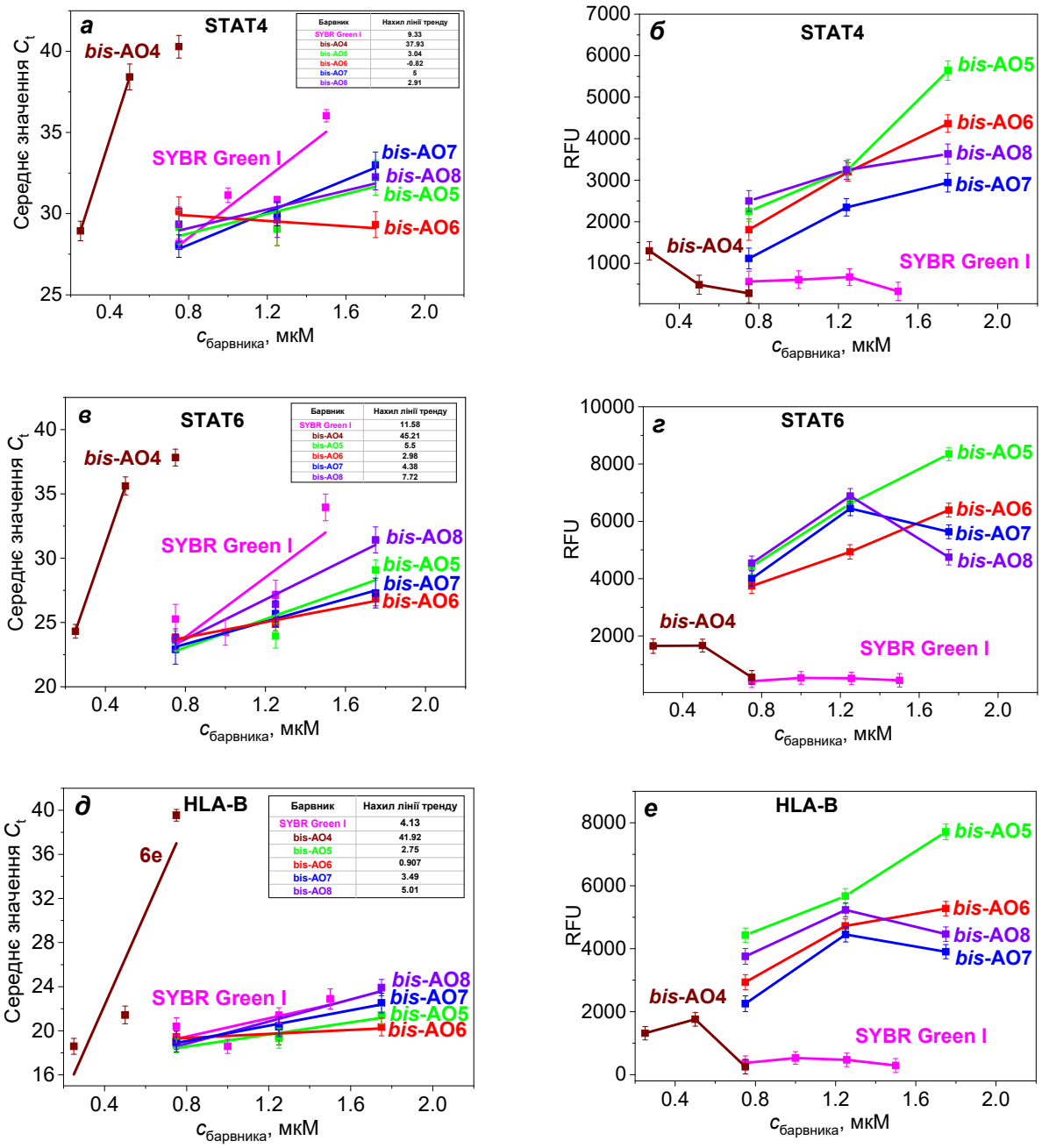


Рисунок 12.1 – Криві залежності середнього значення C_t (*а*, *в*, *д*) та відносної інтенсивності флуоресценції (RFU) у кінцевій точці (*б*, *г*, *е*) від концентрації барвників ***bis*-AO4** – ***bis*-AO8** та **SYBR Green I**.

Також ми дослідили залежність відносної інтенсивності флуоресценції у кінцевій точці реакції від концентрації барвників ***bis*-AO4** – ***bis*-AO8** та **SYBR Green I** (*Рис. 12.1, б, г, е*). Так, при ампліфікації гена STAT4 з використанням ***bis*-AO4** в концентрації 0.25 мкМ значення відносної інтенсивності флуоресценції у кінцевій точці становило приблизно 1250 RFU, тоді як зі збільшенням концентрації спостерігалось поступове зменшення значень RFU (*Рис. 12.1, б*). Натомість, для барвників ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8** спостерігалось зростання значень RFU зі збільшенням концентрації. При цьому для барвників ***bis*-AO5** та ***bis*-AO6** зростання інтенсивності флуоресценції було більш суттєвим порівняно з іншими барвниками. Подібні тенденції були виявлені при ампліфікації генів STAT6 і HLA-B (*Рис. 12.1, г, е*).

У порівнянні з синтезованими барвниками ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8** оптимальний діапазон концентрацій для комерційного барвника **SG** становить 0.75–1.0 мкМ, тоді як підвищення концентрації до 1.25–1.5 мкМ призводить до суттєвого зростання значень C_t. При ампліфікації гена STAT4 у присутності **SG** рівень інгібування ПЛР в 11 разів вище ніж при використанні ***bis*-AO5**, і приблизно в 2–3 рази вище, ніж для ***bis*-AO5**, ***bis*-AO7** та ***bis*-AO8**. Ця тенденція характерна також для гена STAT6 (*Рис. 12.1, в*). Однак, при ампліфікації гена HLA-B у присутності **SG** спостерігається нижчий рівень інгібування ПЛР, ніж для генів STAT. Оскільки продукти ампліфікації праймерів HLA-B відрізняються за довжиною від продуктів ампліфікації генів типу STAT, зниження інгібуючих властивостей **SG** може бути пов’язано з меншою довжиною ампліконів у випадку HLA-B. Інтенсивність флуоресценції у кінцевій точці реакції для барвника **SG** нижча при усіх досліджуваних концентраціях у порівнянні з гомодимерами на основі акридинового оранжевого ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8** (*Рис. 12.1, б, г, е*).

Аналіз кривих плавлення продуктів ампліфікації дозволяє ідентифікувати конкретні, ампліфіковані фрагменти ДНК, та відрізнити їх від

артефактів, утворених у ході ПЛР. Слід зазначити, що середня температура плавлення ампліконів, утворених за умови використання різних концентрацій барвників ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8**, вагомо не відрізняється (*Рис. 12.2*). При цьому середня температура плавлення ампліконів, що утворюються в присутності ***bis*-AO4**, в усіх випадках на декілька градусів вище. Крім того, при ампліфікації гена STAT6 з використанням ***bis*-AO4** в концентрації 0.5 та 0.75 мкМ спостерігається утворення низькотемпературних неспецифічних продуктів (*Рис. 12.2, в, г*).

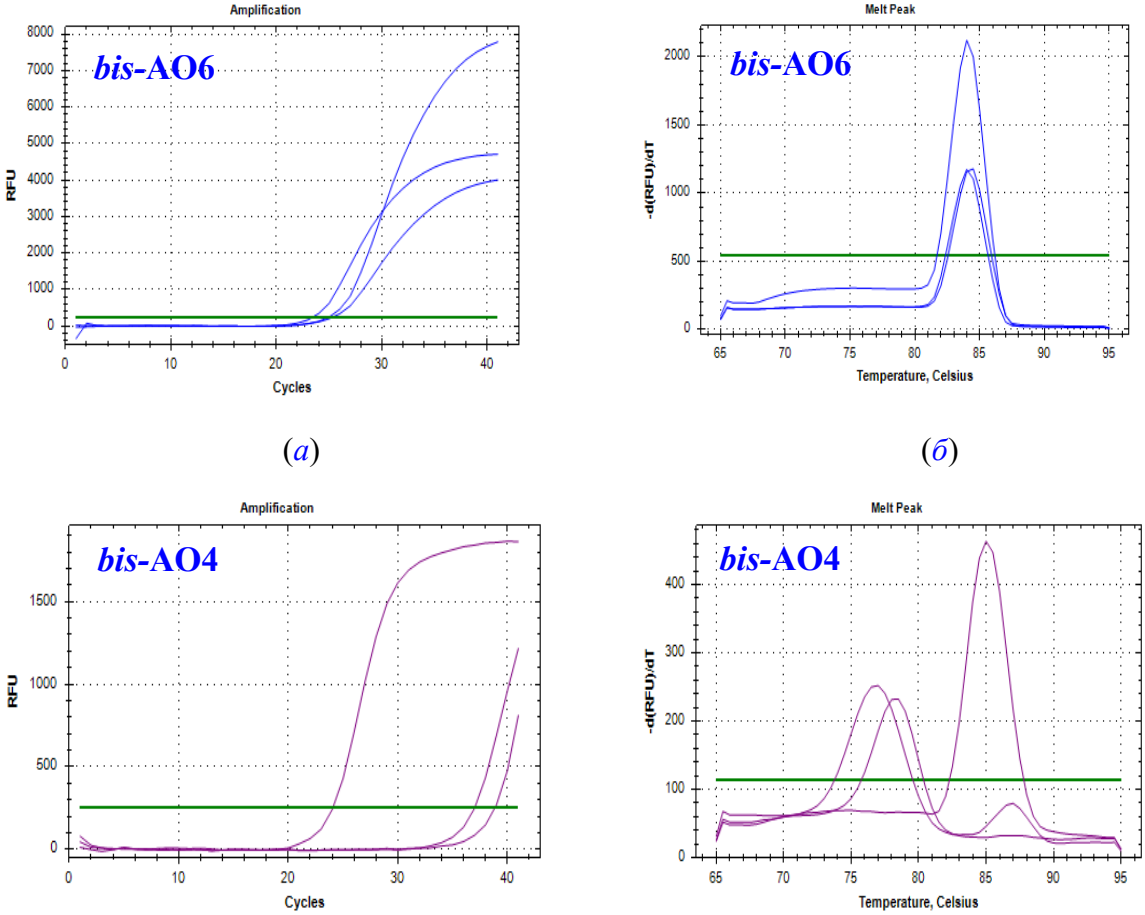


Рисунок 12.2 – Криві ампліфікації (*а, в*) та плавлення (*б, г*) продуктів реакції у присутності ***bis*-AO6** ($c_{\text{барвника}}$ = 0.75, 1.25, 1.75 мкМ) або ***bis*-AO4** ($c_{\text{барвника}}$ = 0.25, 0.5, 0.75 мкМ) при ампліфікації гена STAT6.

Спираючись на літературні дані, зсув точок температури плавлення разом із пригніченням процесу ПЛР у випадку ***bis*-AO4** можна пояснити

високою спорідненістю барвника ***bis*-AO4** до длДНК [45,72]. Очевидно, висока спорідненість до длДНК знижує ефективність кПЛР, а також утруднює аналіз кривих плавлення продуктів ПЛР через сильну електростатичну взаємодію позитивно зарядженого лінкера з малим жолобком длДНК при *біс*-інтеркаляції ***bis*-AO4** в длДНК.

При ампліфікації гена STAT4 у присутності відомого *біс*-інтеркалятора **YOYO-1** в діапазоні концентрацій від 10 до 0.1 мкМ нам взагалі не вдалося зареєструвати утворення продуктів ампліфікації. При цьому фонова інтенсивність флуоресценції барвника в концентрації 2.5–1.25 мкМ була вище порога без утворення ампліконів, що можна інтерпретувати як хибнопозитивний результат. Саме тому **YOYO-1** є непридатним для проведення досліджень методом ПЛР у реальному часі. Отриманий результат повністю узгоджується з раніше опублікованими даними [45].

Для оцінки кількості копій ДНК заданої послідовності, утвореної у ході ПЛР, ми дослідили реакцію у вищенаведених умовах у присутності барвників ***bis*-AO5**, ***bis*-AO6** та **SYBR Green I** ($c_{барвників}$ = 1.25 мкмоль/л). При цьому кількість утвореної длДНК вимірювали після кожного циклу ПЛР і на основі отриманих даних будували криві залежності середнього значення C_t від концентрації ДНК у реакційній суміші (*Рис. 12.3*).

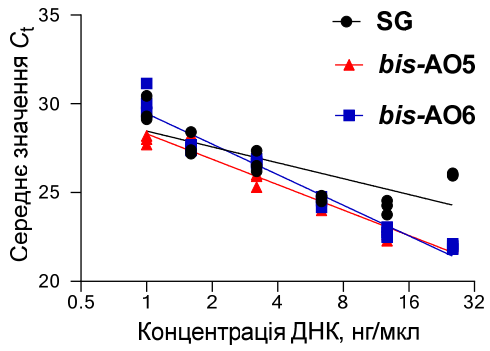


Рисунок 12.3 – Криві залежності C_t від концентрації ДНК у присутності барвників ***bis*-AO5**, ***bis*-AO6** та **SYBR Green I** ($c_{барвників}$ = 1.25 мкмоль/л).

Проведення кПЛР у присутності барвників ***bis*-AO5** та ***bis*-AO6** дозволяє отримати лінійну залежність середнього значення C_t від кількості ДНК, утвореної у ході реакції. Натомість, при проведенні кПЛР у присутності барвника **SYBR Green I** при високих концентраціях ДНК (25.4 нг/мкл) спостерігається підвищення середнього значення C_t на 2 цикли порівняно зі значенням при двократному розведенні ДНК (12.7 нг/мкл), що порушує лінійність зростання середнього значення C_t зі зменшенням концентрації ДНК (*Рис. 12.3*).

Таким чином, барвники ***bis*-AO5** – ***bis*-AO8**, одержані у ході виконання проєкту, дозволяють детектувати длДНК у вигляді ампліконів в умовах кПЛР. При цьому найнижчий ступінь інгібування ПЛР при ампліфікації усіх досліджених генів демонструє барвник ***bis*-AO6** у діапазоні концентрацій 0.75–1.25 мкМ.

13 Синтез та очистка реакційноздатних FLT-чутливих барвників, підтвердження їх структури

У ході виконання проєкту було досліджено сполуки різних класів флуоресцентних барвників, які є придатними для подальшої розробки медико-біологічних мітчиків з довгими часами життя флуоресценції (FLT) та FLT, чутливими до навколишнього середовища. Для досягнення цієї мети, на підставі літературних даних, нашого досвіду та результатів, одержаних на першому етапі проєкту, ми синтезували низку барвників, а саме похідні нафталевої кислоти, бензантрону, пірену, оксазину і скваріну, та вивчили їх фотофізичні властивості (*див. Розділ 14*).

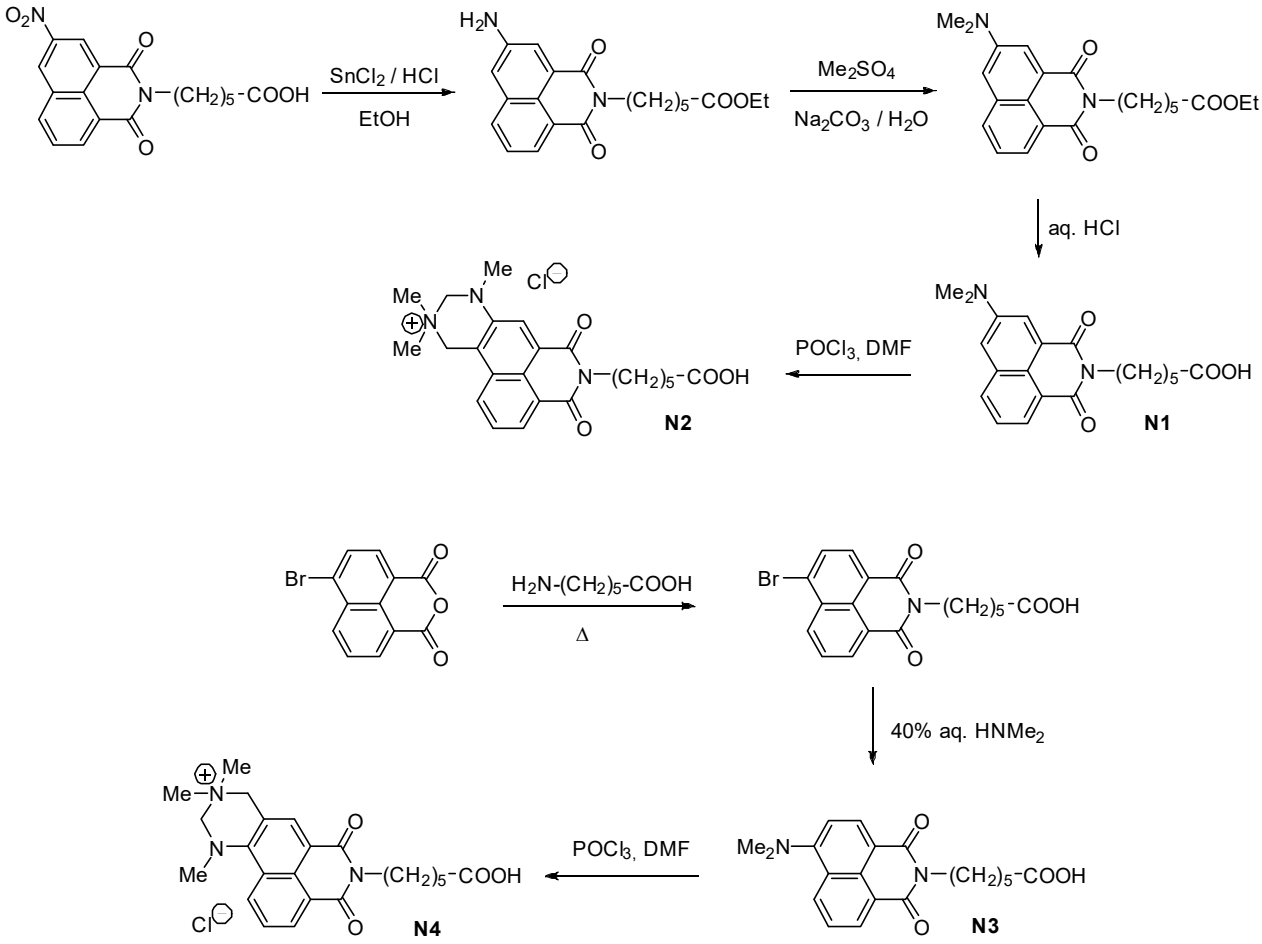
Відомо, що конденсовані ароматичні сполуки мають зазвичай більш довгі FLT, ніж поліциклічні сполуки ланцюгової будови. Так, антрацен і *n*-терфеніл містять три бензольних кільця, але ці кільця у першому випадку є конденсованими, а у другому утворюють ланцюг. В результаті цього антрацен має значно більший FLT у порівнянні з *n*-терфенілом. Але і FLT, і квантові виходи флуоресценції (QYs) цих молекул значно зменшуються у водному середовищі. Така ж закономірність має місце і у випадку довгохвильових поліметинових та скваріновых барвників.

Літературний аналіз показав також, що найбільш перспективні барвники з чутливими до мікрооточення FLT, можуть бути знайдені серед донорно-акцепторних сполук. Квантові виходи цих барвників також є чутливими до навколишнього середовища. Значення QY та FLT цих барвників є низькими у високополярних середовищах, таких як вода, але вони значно зростають у менш полярному середовищі, такому як біологічні макромолекули, клітини та ліпіди.

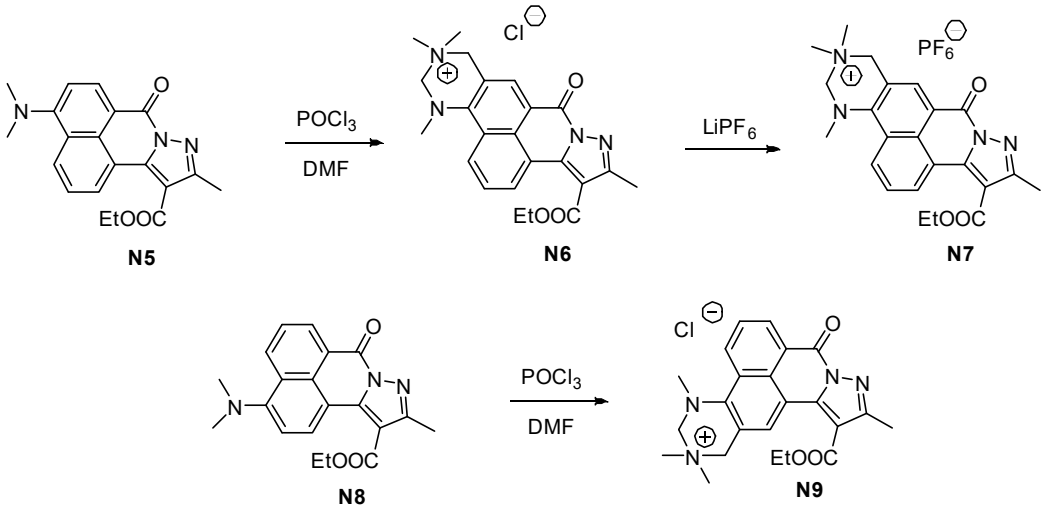
13.1 Похідні нафталевої кислоти

Ми синтезували ряд похідних нафталіміду, що містять замісники у положеннях 3 і 4 нафталевого фрагменту та карбоксильну групу на лінкері,

пов'язаному з імідним атомом азоту. Головну увагу було приділено сполукам, що містять сильний електронодонор – диметиламіногрупу, тому що передбачалося, що ці донорно-акцепторні барвники матимуть довгі та чутливі до навколишнього середовища FLT. Перетворенням диметиламіногруп в тетрагідропіримідинієву сіль ми підвищили водорозчинність цих барвників. Це перетворення було проведено в умовах реакції Вільсмайєра за допомогою розробленого нами раніше методу [73].



Також були отримані тетрагідропіримідинієві солі нафталевої кислоти **N7** та **N9** виходячи із відповідних диметиламінозаміщених піразолів **N5** та **N8**:



Загальна методика синтезу барвників N6–N9. До суміші 1 ммоль піразолу **N5** або **N8** в 2 мл (26 ммоль) ДМФА при 40 °С додавали по краплям 0.37 мл (4 ммоль) $POCl_3$. Реакційну суміш перемішували при 100 °С впродовж 6 годин, охолоджували та виливали на лід. Продукти у вигляді хлоридних солей висаджували з водного розчину ізопропанолом та перекристалізовували з етанолу. При додаванні $LiPF_6$ (1 ммоль) до водного розчину барвника **N6** отримували гексафторофосфат **N7**.

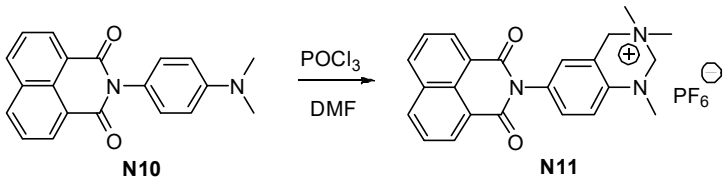
Хлорид 13-етилоксикарбоніл-4,6,6,12-тетраметил-9-оксо-4,6,7,9-тетрагідро-5*H*-піразоло[5',1':1,2]ізо-хіно[4,5-*gh*]хіназолінію (N6). Вихід 0.13 г (30%). Т пл. 251–252 °С. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.27 (1H, H^7, д, 7.6 Гц), 8.39 (1H, H^5, д, 8.6 Гц), 8.32 (1H, H^2, с), 7.75 (1H, H^6, т, 8.2 Гц), 5.17 (2H, CH_2, с), 5.02 (2H, CH_2, с), 4.42 (2H, $COO\underline{CH_2}CH_3$, кв, 14.0; 7.0 Гц), 3.72 (3H, NCH_3, с), 3.31 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с), 2.49 (3H, CH_3, с), 1.41 (3H, $COOCH_2\underline{CH_3}$, т, 7.2 Гц). Знайдено, %: C 62.59; H 5.73; N 12.23. $C_{23}H_{25}N_4O_3Cl$. Розраховано, %: C 62.65; H 5.67; N 12.71.

Гексафторофосфат 13-этилоксикарбоніл-4,6,6,12-тетраметил-9-оксо-4,6,7,9-тетрагідро-5*H*-піразоло[5',1':1,2]ізохіно[4,5-*gh*]хіназолінію (N7). Вихід 0.3 г (55 %). Т пл. 315–318 °С. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.27 (1H, H^7, д, 7.6 Гц), 8.39 (1H, H^5, д, 8.6 Гц), 8.32 (1H, H^2, с), 7.75 (1H, H^6, т, 8.2 Гц), 5.17 (2H, CH_2, с), 5.02 (2H, CH_2, с), 4.42 (2H, $COO\underline{CH_2}CH_3$, кв, 14.0, 7.0 Гц), 3.72 (3H, NCH_3, с), 3.31 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с), 2.49 (3H, CH_3, с), 1.41 (3H,

$COOCH_2\underline{CH_3}$, т, 7.2 Гц). Знайдено, %: C 50.11; H 4.46; N 10.54. $C_{25}H_{25}N_4O_3PF_6$. Розраховано, %: C 50.18; H 4.54; N 10.18.

Хлорид 12-етилоксикарбоніл-2,2,4,11-тетраметил-8-оксо-2,3,4,8-тетрагідро-1*H*-піразоло[1',5':2,3]ізохіно[4,5-*gh*]хіназолінію (N8). Вихід 0.15 г (34%). Т пл. 242–245 °C. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.16 (1H, H^7, с), 8.68 (1H, H^4, д, 8.0 Гц), 8.65 (1H, H^2, д, 6.3 Гц), 7.91 (1H, H^3, т, 7.9 Гц), 5.11 (2H, CH_2, с), 4.92 (2H, CH_2, с), 4.41 (2H, $COO\underline{CH_2}CH_3$, кв, 14.1, 7.2 Гц), 3.68 (3H, NCH_3, с), 3.30 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с), 2.54 (3H, CH_3, с), 1.41 (3H, $COOCH_2\underline{CH_3}$, т, 7.2 Гц). Знайдено, %: C 62.59; H 5.52; N 12.66. $C_{23}H_{25}N_4O_3Cl$. Розраховано, %: C 62.65; H 5.67; N 12.71.

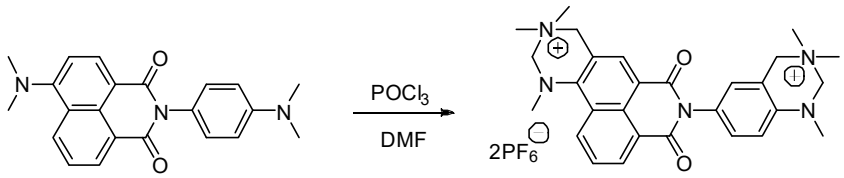
Гексафторофосфат 6-(1,3-діоксо-2,3,3a,6-тетрагідро-1*H*-бензо[*de*]ізохінолін-2-іл)-1,3,3-триметил-1,2,3,4-тетрагідрохіназолінію (N11).



N10 N11

До розчину 0.1 г (3 ммоль) *N*,*N*-диметиламінофеніліміду нафталевої кислоти (**N10**) в 0.3 мл (1.5 ммоль) ДМФА при 40 °C додавали по краплям 0.055 мл (0.6 ммоль) $POCl_3$. Реакційну суміш витримували впродовж 10 годин при 80 °C, після охолодження виливали на лід. Додаванням 3 ммоль NH_4PF_6 виділяли цільовий продукт. Після перекристалізації із водного етанолу (1:1) отримували 0.16 г (70%) сполуки **N11**. Т пл. 294–296 °C. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.44–8.61 (4H, м), 7.92 (2H, т, 7.9 Гц), 7.33 (1H, д, 8.8 Гц), 7.16 (1H, с), 7.09 (1H, д, 8.8 Гц), 4.75 (2H, CH_2, с), 4.67 (2H, CH_2, с), 3.19 (3H, NCH_3, с), 3.13 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с). Знайдено, %: C 53.19, H 4.53, N 8.05. $C_{23}H_{22}N_3O_2PF_6$. Розраховано, %: C 53.38, H 4.25, N 8.12.

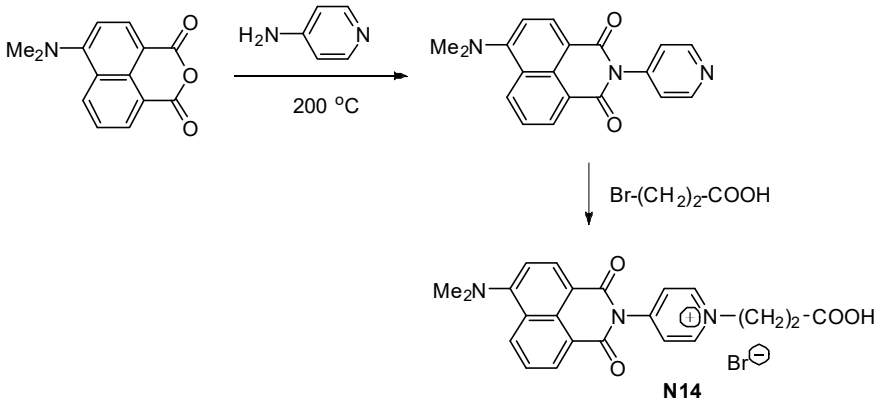
Дігексафторофосфат 9,9,11-триметил-4,6-діоксо-5-(1,3,3-триметил-1,2,3,4-тетрагідрохіназолін-3-ію-6-іл)-5,6,6a,8,9,10,11,11a-октагідро-4*H*-ізохіно[4,5-*gh*]хіназолін-9-ію (N13).



N12 **N13**

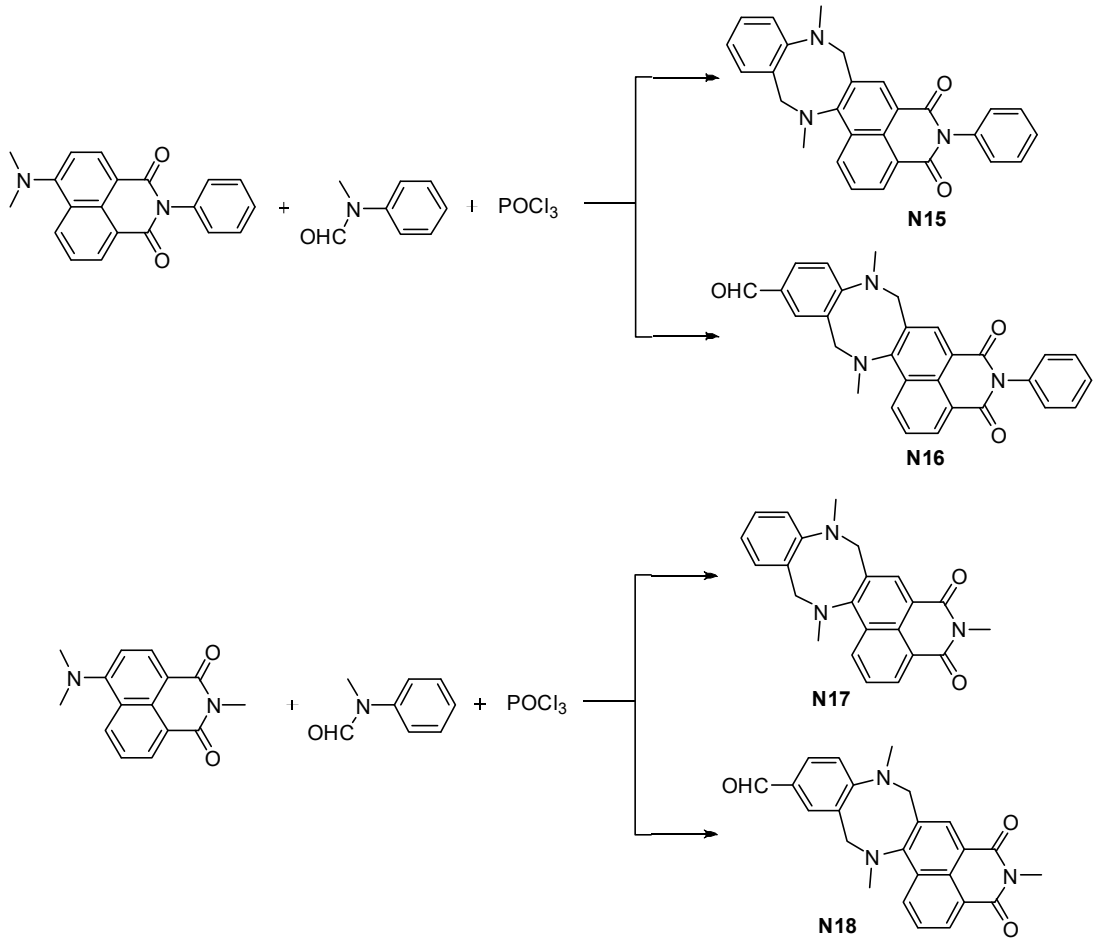
До розчину 0.1 г (0.27 ммоль) 6-диметиламіно-2-(4-диметиламінофеніл)-2,3,3a,6-тетрагідро-1*H*-бензо[*de*]ізохінолін-1,3-діона (**N12**) в 0.4 мл (5 ммоль) ДМФА при 40 °С додавали по краплям 0.5 мл (0.04 моль) $POCl_3$, реакційну суміш нагрівали впродовж 15 годин при 80 °С, після охолодження виливали на лід. Осад висаджували 0.27 ммоль NH_4PH_6. Після перекристалізації із суміші етанол-вода (1:3) отримували 0.075 г (60 %) продукту **N13**. Тпл. 297 °С. ^{1}H ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6), δ, м.ч.: 8.64 (1H, H^5, д, 8.3 Гц), 8.52 (1H, H^7, д, 7.0 Гц), 8.21 (1H, H^2, с), 7.90 (1H, H^6, т, 8.3 Гц), 7.27 (1H, $H^{5'}$, д, 8.3 Гц), 7.11 (1H, $H^{3'}$, с), 7.08 (1H, $H^{6'}$, д, 8.3 Гц), 5.04 (2H, CH_2, с), 4.91 (2H, CH_2, с), 4.75 (2H, CH_2, с), 4.67 (2H, CH_2, с), 3.66 (3H, NCH_3, с), 3.20 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с), 3.18 (3H, NCH_3, с), 3.12 (6H, $N^+(CH_3)_2$, с). Знайдено, %: C 44.10, H 4.25, N 9.52. $C_{28}H_{33}N_5O_2P_2F_{12}$. Розраховано, %: C 44.15, H 4.34, N 9.20.

Інший шлях до покращення водорозчинності похідних нафталевої кислоти полягав у приєднанні фрагменту піридинієвої солі до імідного атому азоту:



N14

Крім того, ми синтезували деякі конденсовані нафталеві похідні **N15–N18**, що містять 1,2,5,6-тетрагідро-1,5-діазоциновий цикл:



Загальна методика синтезу бензодіазоцинів N15–N18. До розчину 1.8 мл (0.015 моль) *N*-метилформаніліду в 9 мл (0.1 моль) $POCl_3$ при кімнатній температурі додавали 0.01 моль метил- або фенілімід 4-диметиламінонафталевої кислоти. Реакційну масу нагрівали при 70–75 °С впродовж 10 годин, після охолодження виливали на лід. Осад висаджували додаванням 20%-ного розчину NaOH. Суміш бензодіазоцинів **N15, N16** та **N17, N18** розділяли колонковою хроматографією (силікагель, хлороформ для **N15, N16**, суміш хлороформ-бензол для **N17, N18**).

9,5-Диметил-5-феніл-3a,4,5,6,8,9,14,15-октагідро-1*H*-бензо[6,7][1,5]-діазоцино[2,3-*g*]ізохінолін-4,6-діон (N15). Вихід: 1 г (24 %). Т пл. 227–228 °С. ^{1}H ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6), δ, м.ч.: 8.64 (1H, H^7, д, 8.6 Гц), 8.44 (1H, H^5, д, 7.5 Гц), 8.38 (1H, H^2, с), 7.81 (1H, H^6, т, 7.8 Гц), 7.55-7.31 (5H, arom, м), 7.26 (1H, H^{12}, д, 7.7 Гц), 7.20 (1H, H^{11}, т, 7.8 Гц), 6.89 (1H, H^9, д, 8.4 Гц), 6.80 (1H, H^{10}, т, 7.3 Гц), 4.72 (2H, CH_2, с), 4.55 (2H, CH_2, с), 2.83 (12H,

2×NCH_3, с). Знайдено, %: C 77.65, H 5.45, N 9.52. $C_{28}H_{23}N_3O_2$. Розраховано, %: C 77.58, H 5.35, N 9.69. FAB MS: *m*/*z* 434 (MH^+).

9,5-Диметил-4,6-діоксо-5-феніл-3a,4,5,6,8,9,14,15-октагідро-1*H*-бензо[6,7][1,5]діазоцино[2,3-*g*]ізохінолін-12-карбальдегід (N16). Вихід: 1.15 г (26 %). Т пл. 304–305 °C. ^{1}H ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6), δ, м.ч.: 9.80 (1H, CHO, с), 8.65 (1H, H^7, д, 8.7 Гц), 8.46 (1H, H^5, д, 7.7 Гц), 8.43 (1H, H^2, с), 7.83 (1H, H^6, т, 7.8 Гц), 7.82 (1H, H^{12}, с), 7.74 (1H, H^{10}, д, 8.7 Гц), 7.55-7.31 (5H, м), 7.02 (1H, H^9, д, 8.6 Гц), 4.83 (2H, CH_2, с), 4.72 (2H, CH_2, с), 2.94 (3H, NCH_3, с), 2.82 (3H, NCH_3, с). Знайдено, %: C 75.55, H 5.15, N 9.26. $C_{29}H_{23}N_3O_3$. Розраховано, %: C 75.47, H 5.02, N 9.10. FAB MS: *m*/*z* 462 (MH^+).

5,9,15-Триметил-3a,4,5,6,8,9,14,15-октагідро-1*H*-бензо[*de*]бензо-[6,7][1,5]діазоцино[2,3-*g*]ізохінолін-4,6-діон (N17). Вихід: 0.72 г (20 %). Т пл. 205–206 °C. ^{1}H ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6), δ, м.ч.: 8.61 (1H, H^7, д, 8.6 Гц), 8.44 (1H, H^5, д, 7.5 Гц), 8.39 (1H, H^2, с), 7.78 (1H, H^6, т, 7.8 Гц), 7.25 (1H, H^{12}, д, 7.8 Гц), 7.18 (1H, H^{11}, т, 7.8 Гц), 6.90 (1H, H^9, д, 8.4 Гц), 6.81 (1H, H^{10}, т, 7.4 Гц), 4.71 (2H, CH_2, с), 4.54 (2H, CH_2, с), 3.43 (3H, NCH_3, с), 2.82 (12H, 2×NCH_3, с). Знайдено, %: C 74.45, H 5.59, N 11.40. $C_{23}H_{21}N_3O_2$. Розраховано, %: C 74.37, H 5.70, N 11.31.

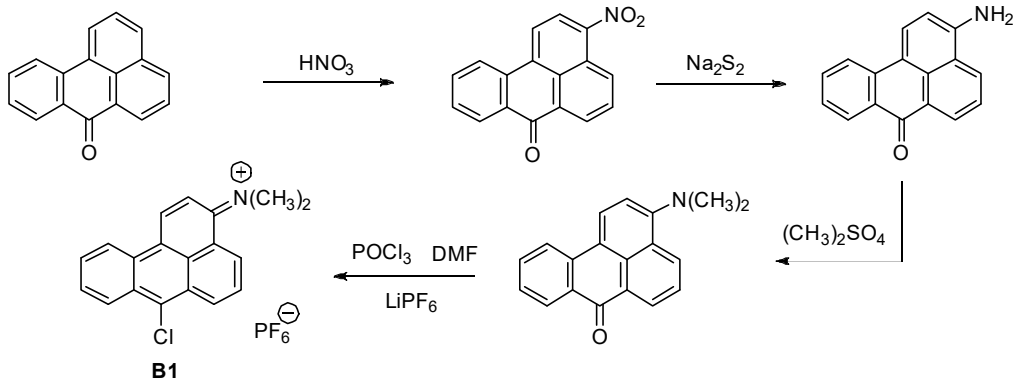
5,9,15-Триметил-4,6-діоксо-3a,4,5,6,8,9,14,15-октагідро-1*H*-бензо[*de*]-бензо[6,7][1,5]діазоцино[2,3-*g*]ізохінолін-12-карбальдегід (N18). Вихід 0.95 г (24 %). Т пл. 293–294 °C. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 9.78 (1H, CHO, с), 8.60 (1H, H^7, д, 8.7 Гц), 8.46 (1H, H^5, д, 7.7 Гц), 8.44 (1H, H^2, с), 7.83 (1H, H^{12}, с), 7.81 (1H, H^{10}, д, 7.7 Гц), 7.76 (1H, H^6, т, 7.7 Гц), 7.01 (1H, H^9, д, 7.6 Гц), 4.79 (2H, CH_2, с), 4.68 (2H, CH_2, с), 3.40 (3H, NCH_3, с), 2.93 (3H, NCH_3, с), 2.78 (3H, NCH_3, с). Знайдено, %: C 72.27, H 5.45, N 10.65. $C_{24}H_{21}N_3O_3$. Розраховано, %: C 72.16, H 5.30, N 10.52.

Спектральні характеристики усіх мітчиків на основі нафталевої кислоти приведено в таблицях 14.1 та 14.2 (*див. Розділ 14, п. 14.1*).

13.2 Похідні бензантрону

Бензантрони, подібно до вищезгаданих похідних нафталевої кислоти, також являють собою конденсовані ароматичні сполуки, що містять електроноакцепторний карбонільний атом кисню, який до того ж здатен до утворення водневих зв'язків. Тому ці барвники приваблюють до себе увагу як FLT-чутливі до навколишнього середовища зонди і мітчики зі збільшеними часами життя флуоресценції. До того ж електронодонорна алкіламіно- або діалкіламіногрупа в їх молекулах може бути корисною для підвищення чутливості цих барвників до навколишнього середовища.

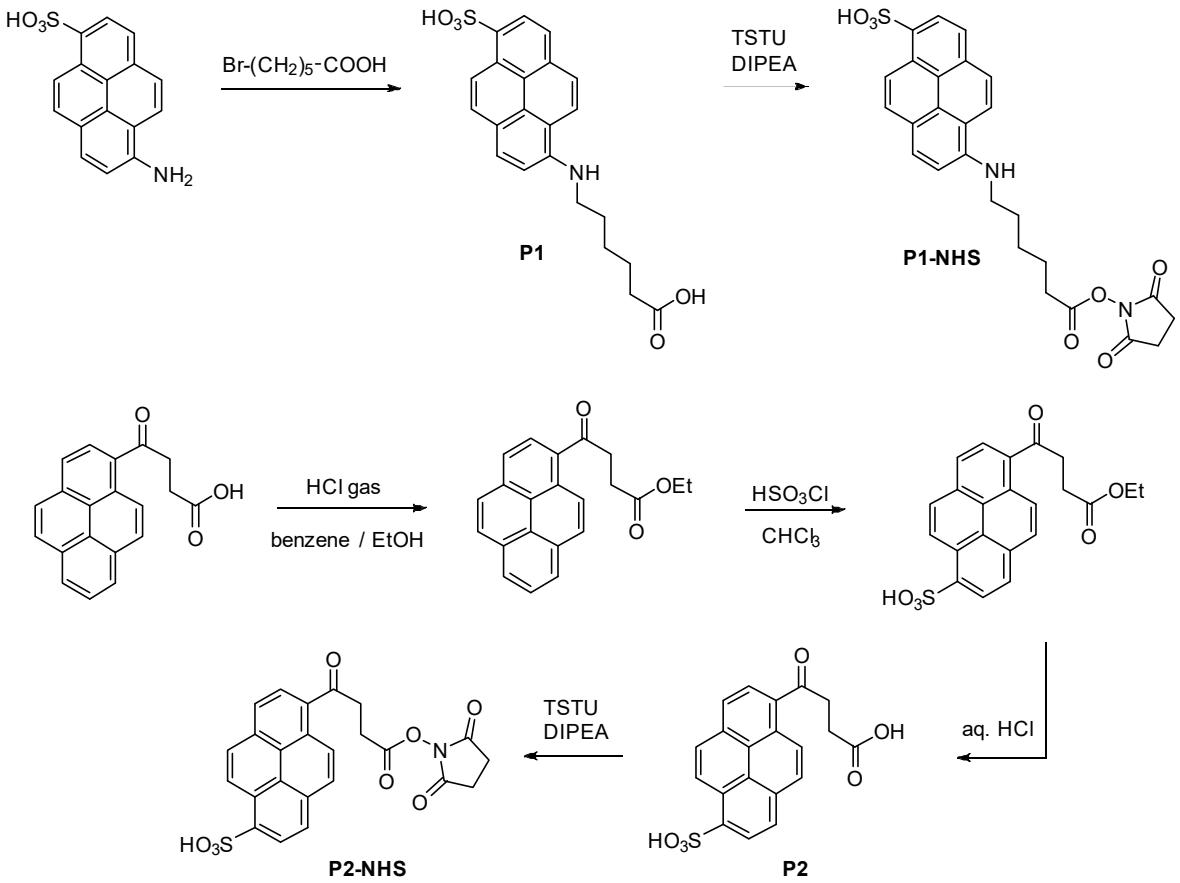
На звітному етапі ми синтезували водорозчинний бензантроновий барвник **B1**, що містить реакційний атом хлору, завдяки чому його спектральні і FLT характеристики можуть виявитися чутливими до мікросередовища та біологічних молекул, що містять аміногрупи.



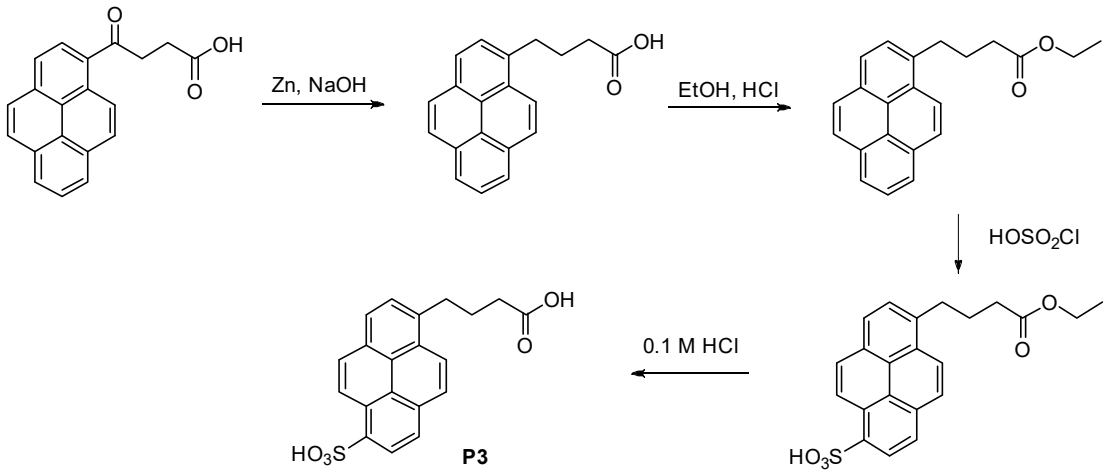
Спектральні характеристики бензантронового барвника **B1** наведено у таблиці 14.3 (*див. Розділ 14, п. 14.2*).

13.3 Похідні пірену

У рамках другого етапу проєкту ми синтезували піренові барвники **P1** і **P2**, що містять COOH-групи. Було встановлено, що ці барвники мають великі FLTs і тому ми синтезували їх NHS естери (**P1-NHS** і **P2-NHS**), тобто отримали FLT-чутливі мітчики, що є реакційноздатними до аміногруп біологічних молекул.



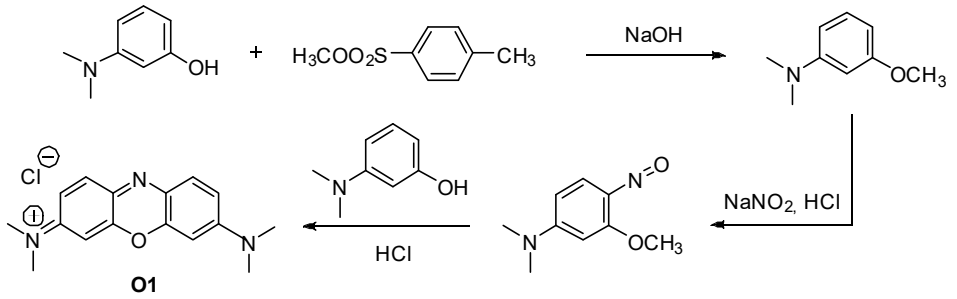
Також ми синтезували реакційноздатний піреновий барвник **P3**:



Спектральні характеристики піренових мітчиків зібрані у таблиці 14.4 (*див. Розділ 14, п. 14.3*).

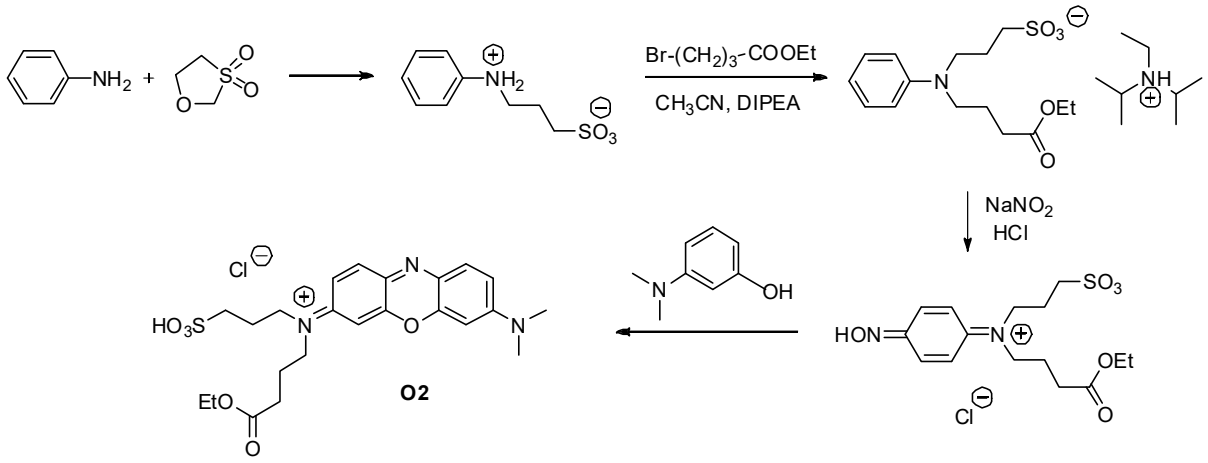
13.4 Оксазинові барвники

Далі ми спробували отримати нові оксазинові барвники, але перш за все, перевірили підхід до їх синтезу на прикладі синтезу барвника **O1**:



Методика синтезу O1. В круглодонну колбу на 100 мл з капіляром та холодильником для перегонки розчинника додавали 280 мг (2 ммоль) *м*-*N*,*N*-диметиламінофенолу та 40 мл 90%-ного ізопропанолу. Реакцію проводили в атмосфері аргону при 70 °C. За допомогою шприца у реакційну масу за чотири рази додавали розчин 360 мг (2 ммоль) *N*,*N*-диметил-3-метокси-4-нітрозоаніліну та 0.2 мл (2 ммоль) конц. HCl в 40 мл 90%-ного ізопропанолу. Після цього температуру підвищували для видалення розчинника. Далі до реакційної суміші додавали 40 мл 90%-ного ізопропанолу. Цю операцію повторювали 3 рази впродовж 3-х годин. Синій розчин випаровували, а залишок очищували на хроматографічній колонці (силікагель), елюенти: суміші $CHCl_3$-MeOH (від 10:1 до 10:2.5). Розчин випаровували, а залишок розчиняли в 5 мл метанолу та додавали 40 мл етилацетату. Через 10 хвилин суміш опромінювали ультразвуком та осад відфільтровували, промивали етилацетатом, етером та сушили у вакуум-ексикаторі. Вихід 210 мг (34%). ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6) δ, м.ч.: 7.78 (2H, 2 × Ar-H, d), 7.39 (2H, 2 × Ar-H, dd), 6.90 (2H, 2 × Ar-H, s), 3.25 (12H, 2 × NMe_2).

Для підвищення водорозчинності ми ввели у оксазиновий барвник водорозчинну сульфогрупу та реакційну COOH-групу, та одержали новий оксазиновий барвник **O2**:



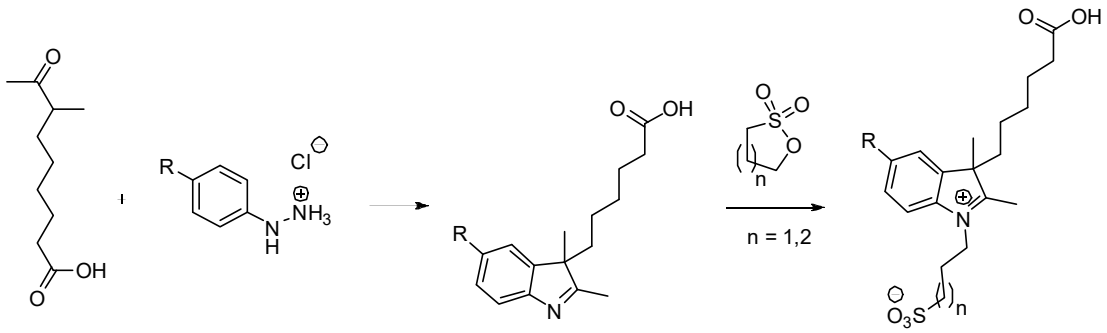
Методика синтезу O2. В круглодонну колбу на 100 мл з капіляром та холодильником для перегонки розчинника додавали 630 мг (4.6 ммоль) *м-N,N*-диметиламінофенолу у 15 мл етанолу. Реакцію проводили в атмосфері аргону при 70 °C. Далі по краплям протягом 1 години додавали розчин нітрозоаніліну та нагрівали суміш впродовж 3-х годин при 70 ºC. Розчинник видаляли за допомогою ротаційного випаровувача. Залишок висушували у вакуум-ексикаторі та два рази очищували на хроматографічній колонці (силікагель, елюенти: суміші $CHCl_3$-MeOH (від 100:1 до 100:10)). Вихід: 40 мг. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6) δ, м.ч.: 7.80 (2H, 2 × Ar-H, с), 7.45 (2H, 2×Ar-H, д), 7.02 (2H, 2×Ar-H, д), 4.04 (2H, CH_2, кв), 3.81 (2H, N-CH_2, т), 3.67 (2H, N-CH_2, т), 2.45 (2H, C$\underline{H}_2$-SO_3H, т), 2.32 (2H, C$\underline{H}_2$-COOEt, т), 1.89 (4H, 2×CH_2, м), 1.17 (3H, CH_3, т).

Спектральні характеристики нового оксазинового мітчика **O2** зібрані у таблиці 14.5 (*див. Розділ 14, п. 14.4*).

13.5 Скваратінові барвники

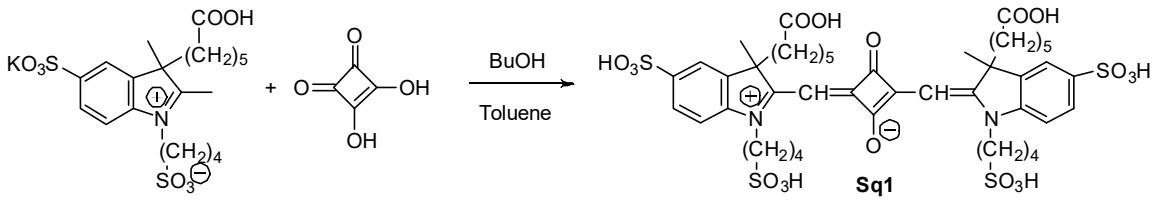
Ми синтезували декілька типових симетричних та несиметричних скваратінових барвників, щоб дослідити їх FLT у вільному стані та при ковалентному зв'язуванні з біологічними макромолекулами.

Найважливішим інтермедіатом синтезу скваратінових барвників зі збільшеними квантовими виходами та FLT є індоленін з карбоксильною групою у положенні 3 та його похідні. Ці інтермедіати були синтезовані методом, який наведено нижче:



З використанням цих інтермедіатів були отримані скваральнові барвники **Sq1**–**Sq5** симетричної будови. Синтез проведено добре відомими методами, які описані в [51,74,75]. Загальна методика полягала у взаємодії заміщеного індоленіну з квадратною кислотою або її похідними у суміші бутанол-толуол або у піридині при кип'ятінні. В деяких випадках використання піридину дозволило запобігти необхідності додаткової стадії — гідролізу бутоксильних груп у цільовому барвнику. Знайдено, що замісники в індоленіновому та скваральновому фрагментах значно впливають на швидкість реакції та виходи продукту. Так, скваральн **Sq1** та барбітурові скваральни **Sq2** і **Sq3** були одержані з кращими виходами у порівнянні з тіо- та диціанометиленовими барвниками **Sq4** і **Sq5**, відповідно, які були синтезовані з меншими виходами та впродовж більш тривалого кип'ятіння.

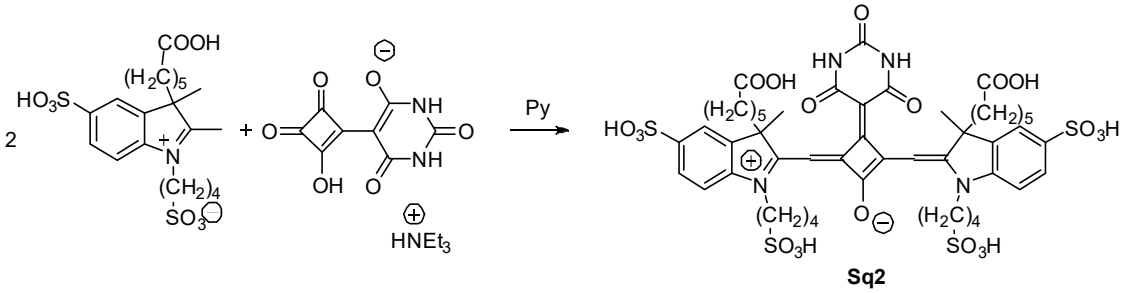
2-[3-(5-Карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-2,3-дигідро-1*H*-2-індолілметил]-4-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-3*H*-2-індолійілетил]-3-оксо-1-циклобутен-1-олат (Sq1).



Суміш 58 мг (0.5 ммол) 3,4-дигідрокси-3-циклобутен-1,2-діону, 0.9 г (1.5 ммол) 3-(5-карбоксипентил)-2,3-диметил-1-(4-сульфонатобутил)-5-індолійсульфонату калію, 10 мл бутанолу та 10 мл толуолу кип'ятили 15 годин. Розчинник випаровували, залишок розчиняли в 50 мл 0.1 М HCl та кип'ятили 2 години. Розчинник видаляли при зниженому тиску, а продукт очищували на силікагелі RP-18 (вода-метанол) та одержували 78 мг (13 %) продукту **Sq1**

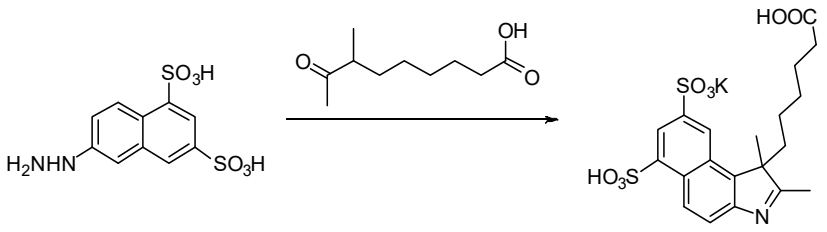
темно-синього кольору. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 7.64 (2H, с), 7.62 (2H, д, 8.3 Гц), 7.35 (2H, д, 8.5 Гц), 5.91 (2H, CH, с), 4.11 (4H, NCH_2, шир. с), 2.65 (4H, CH_2SO_3H, т, 6.8 Гц), 2.00 (4H, CH_2, т, 6.8 Гц), 1.77 (4H, C-CH_2-, с), 1.66 (6H, C-CH_3, с), 1.87–0.92 (16H, CH_2, м), 0.80–0.32 (4H, м).

2-[3-(5-Карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-2,3-дигідро-1*H*-2-індоліліденметил]-4-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-3*H*-2-індолійілметилен]-3-(2,4,6-тріоксогекса-гідро-5-піримідиніл)-1-циклобутен-1-олат (Sq2).

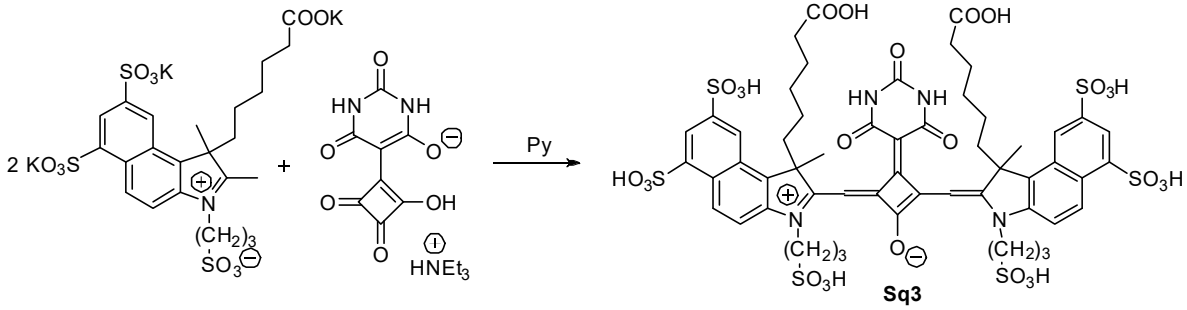


Суміш 0.69 г (2.12 ммоль) 5-(2-гідрокси-3,4-діоксо-1-циклобутеніл)-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідро-6-піримідинолат триетиламонію, 2.65 г (4.8 ммоль) 3-(5-карбоксипентил)-2,3-диметил-1-(4-сульфонатобутил)-5-індолійсульфонат калію та 50 мл піридину кип'ятили 20 годин. Розчинник видаляли при пониженому тиску за допомогою ротаційного випаровувача, залишок очищували колонковою хроматографією (силікагель RP-18, H_2O-MeOH) та одержували 160 мг (6.8 %) продукту **Sq2** темно-синього кольору. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 10.45 (2H, $(NH)_2$, шир. с), 7.67 (2H, с), 7.65 (2H, д, 8.1 Гц), 7.35 (2H, д, 8.3 Гц), 5.31 (2H, CH, с), 4.91 (8H, NCH_2, CH_2, шир. с), 4.27–3.90 (4H, CH_2, м) 3.03–2.43 (4H, $\underline{CH_2}SO_3H$, м), 2.05–1.54 (4H, CH_2, м) 1.98 (4H, CH_2, т, 6.8 Гц), 1.70 (6H, C-CH_3, с), 1.43–0.89 (8H, CH_2, м), 0.88–0.37 (4H, CH_2, м).

Щоб одержати більш довгохвильові гідрофільні скваріїнові барвники ми, перш за все, конденсували 7-метил-8-оксононанову кислоту з 5,6-дисульфо-2-нафтилгідразином та синтезували 3-заміщений дисульфобензоіндоленін:

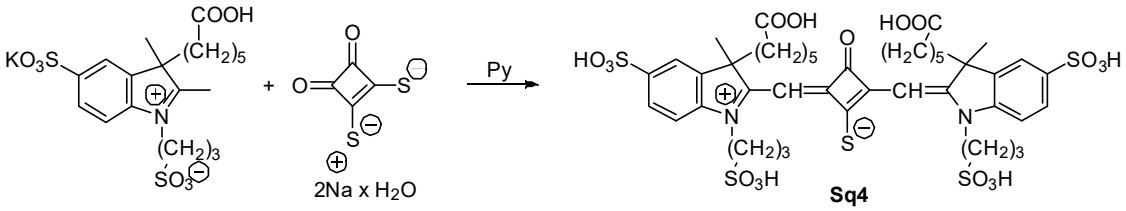


4-[1-(5-Карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-3-(3-сульфопропіл)-1*H*-бензо[*e*]індолій-2-ілметилен]-2-[1-(5-карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-3-(3-сульфопропіл)-2,3-дигідро-1*H*-бензо[*e*]індол-2-іліденметил]-3-(2,4,6-тріоксогексагідро-5-піримідиніл)-1-циклобутен-1-олат (Sq3).



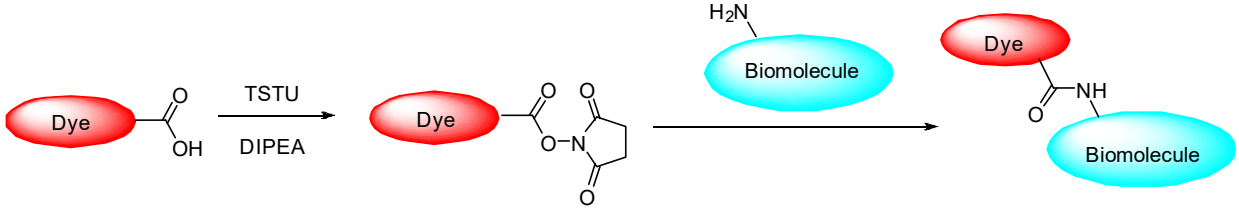
Суміш 0.5 г (0.71 ммоль) 4-[1-(5-карбоксипентил)-1,2-диметил-6,8-дисульфо-5,9*b*-дигідро-1*H*-бензо[*e*]індолій-3-іл]-1-пропансульфонату і 0.10 г (0.3 ммоль) 5-(2-гідрокси-3,4-діоксо-1-циклобутеніл)-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідро-6-піримідинолату триетиламонію в 15 мл піридину кип'ятили 17 годин при періодичному диспергуванні ультразвуком. Після охолодження продукт відфільтровували, промивали *н*-бутанолом та сушили в вакуум-ексикаторі протягом 12 годин. Барвник **Sq3** очищали на хроматографічній колонці (силікагель RP-18, H_2O-MeOH з додаванням 0.05 % CF_3COOH) та одержували 35 мг (8.5 %) барвника **Sq3**. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ , м.ч.: 10.37 (2H, NH барбітуровий фрагмент, с), 8.99 (2H, д, 7.9 Гц), 8.43 (2H, с), 8.22 (2H, с), 7.88 (2H, д, 7.7 Гц), 6.55 (2H, CH, с), 4.60-4.24 (4H, NCH_2, м), 3.48–3.34 (4H, $\underline{CH_2}SO_3H$, м), 2.78–2.56 (4H, CH_2, м), 2.24–2.02 (4H, CH_2, м), 1.93 (6H, CH_3, с), 1.82–1.62 (4H, CH_2, м), 1.35–1.09 (4H, CH_2, м), 1.09–0.88 (4H, CH_2, м), 0.80–0.14 (4H, CH_2, м).

2-[3-(5-Карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропіл)-2,3-дигідро-1*H*-2-індолиліденметил]-4-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропіл)-3*H*-2-індолійілметилен]-3-оксо-1-циклобутен-1-тіолат (Sq4).



3 г (5.6 ммоль) 3-(5-карбоксипентил)-2,3-диметил-1-(3-сульфонато-пропіл)-5-індолійсульфонат калію диспергували в 50 мл піридину та додавали 0.29 г (1.4 ммоль) 1,2-дитіоквадратної кислоти. Суміш кип'ятили 28 годин. Після охолодження розчинник видаляли при пониженому тиску за допомогою ротаційного випаровувача. Залишок обробляли гексаном, відфільтровували та промивали гексаном. Осад на фільтрі розчиняли в метанолі та розчинник випаровували. Залишок очищували на хроматографічній колонці (силікагель RP-18, вода) та одержували 120 мг (2.2 %) продукту **Sq4**. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 7.67 (2H, с), 7.63 (2H, д, 8.9 Гц), 7.43 (2H, д, 8.5 Гц), 6.24 (2H, CH, с), 3.50–3.25 (4H, NCH_2, м), 2.71–2.56 (4H, $\underline{CH_2}SO_3H$, м), 2.20–1.85 (12H, CH_2, м), 1.69 (6H, CH_3, с), 1.43-0.93 (8H, CH_2, м), 0.81–0.38 (4H, CH_2, м).

Далі ми активували карбоксильні групи у вищезазначених скваратових барвниках та синтезували **реакційні FLT-чутливі мітчики**. Так, аміно-реакційні NHS естери було синтезовано реакцією відповідних барвників з TSTU і DIPEA в сухому ДМФА при кімнатній температурі.



2-[3-(2,5-Діоксотетрагідро-1*H*-1-пірролілоксикарбонілпентил)-3-метил-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-2,3-дигідро-1*H*-2-індолілметил]-4-[3-(2,5-діоксотетрагідро-1*H*-1-пірролілоксикарбонілпентил)-3-метил-5-

сульфо-1-(4-сульфобутил)-3*H*-2-індолійілметил]-3-оксо-1-циклобутен-1-олат (Sq1-NHS). Скваріновий барвник **Sq1** (31.2 мг, 26.6 мкмол), TSTU (22.5 мг, 74.7 мкмол) і DIPEA (27.4 мкл) розчиняли в 4 мл ДМФА. Розчин перемішували 5 годин при кімнатній температурі. Після фільтрування розчинник видаляли за допомогою ротаційного випаровувача, а залишок декілька разів промивали етером. Вихід: 30.5 мг.

NHS-естер 2-[3-(5-карбоксипентіл)-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-2,3-дигідро-1*H*-2-індолиліденметил]-4-1-[3-(5-карбоксипентил)-5-сульфо-1-(4-сульфобутил)-3*H*-2-індолійіл]метиліден-3-(2,4,6-тріоксогексагідро-5-піримідиніл)-1-циклобутену-1-олату (Sq2-NHS). Скваріновий барвник **Sq2** (11.5 мг, 10 мкмол), TSTU (7.5 мг, 45 мкмол) та DIPEA (12 мкл) розчиняли в 2 мл ДМФА. Розчин перемішували 5 годин при кімнатній температурі, фільтрували та розчинник видаляли за допомогою ротаційного випаровувача. Залишок промивали діетиловим етером декілька разів, сушили у вакуум-ексикаторі та одержували 10 мг продукту.

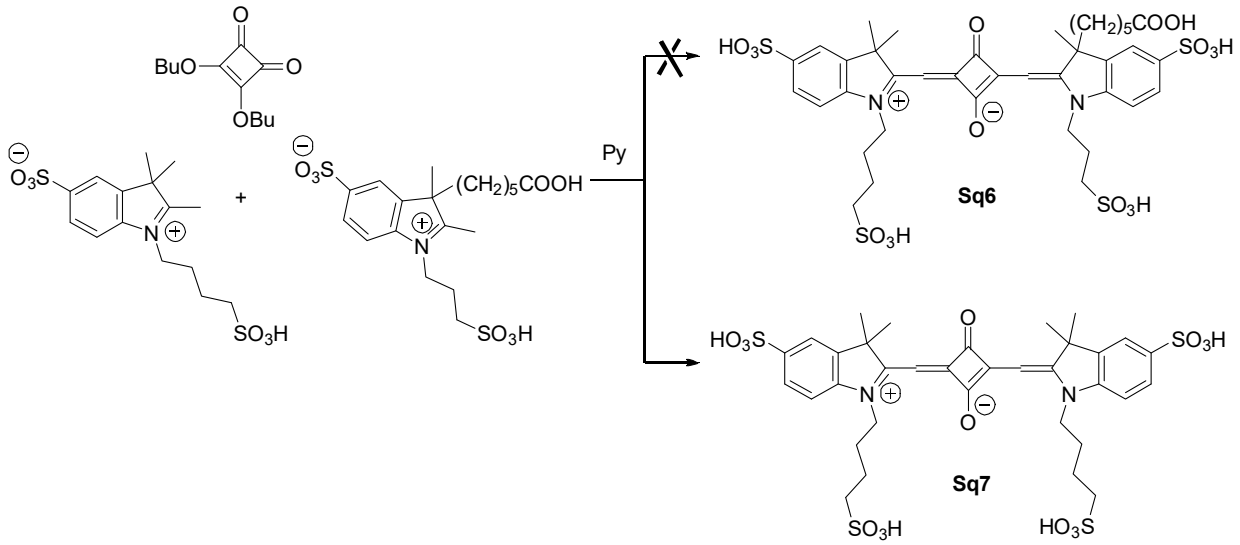
NHS-естер 4-[1-(5-карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-3-(3-сульфопропіл)-1*H*-бензо[*e*]індолій-2-ілметилен]-2-[1-(5-карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-3-(3-сульфопропіл)-2,3-дигідро-1*H*-бензо[*e*]-індол-2-іліденметил]-3-(2,4,6-тріоксогексагідро-5-піримідиніл)-1-циклобутен-1-олату (Sq3-NHS). Суміш 15 мг (11 ммоль) барвника **Sq3** та 9.8 мг (33 ммоль) TSTU розчиняли у 3 мл ДМФА при перемішуванні та додавали 10 мкл (0.029 мкмол) DIPEA. Отриману суміш перемішували 2 години при кімнатній температурі, розчинник швидко видаляли за допомогою ротаційного випаровувача, залишок промивали етером (3 × 5 мл) та висушували у вакуум-ексикаторі протягом 24 годин. Одержували 12 мг (88 %) продукту **Sq3-NHS**.

NHS-естер 2-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропіл)-2,3-дигідро-1*H*-2-індоліліденметил]-4-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропіл)-3*H*-2-індолійілметилен]-3-оксо-1-циклобутен-1-тіолат (Sq4-NHS). Скваріновий барвник **Sq4** (5 мг, 4.9 мкмол) та TSTU (4.5 мг, 15 мкмол) розчиняли в 1 мл ДМФА в атмосфері

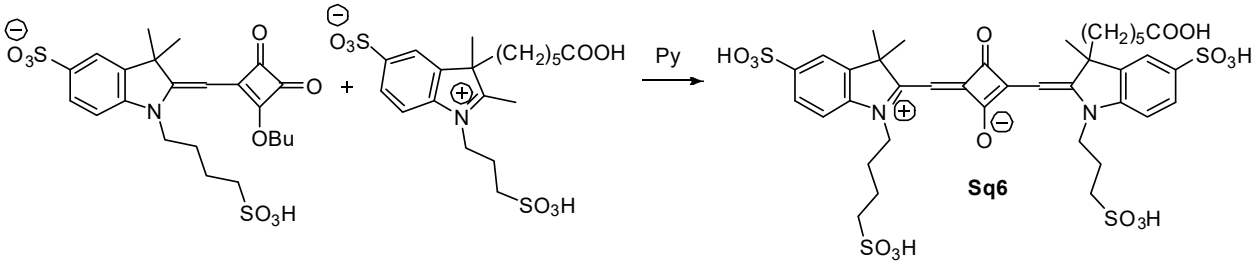
аргону та додавали 3.2 мл (20 ммоль) DIPEA. Суміш перемішували при кімнатній температурі 8 годин. Далі розчинник видаляли за допомогою ротаційного випаровувача, залишок промивали етером, сушили у вакуум-ексикаторі та одержували 5.7 мг (96 %) продукту **Sq4-NHS**.

Для багатьох медико-біологічних використань, зокрема для мічення олігонуклеотидів та кількісних екологічних тестів, потрібні барвники, що містять лише одну реакційну карбоксильну групу. Саме тому наша наступна задача полягала у синтезі скваранів, які мають несиметричну будову.

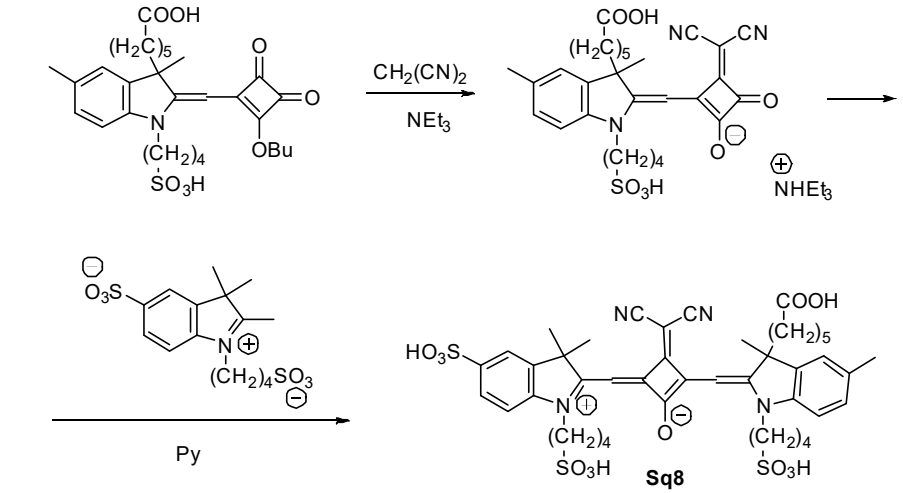
Несиметричний монореакційний барвник **Sq6** ми намагалися отримати перехресним синтезом за наведеною нижче схемою. Ми вважали, що в цих умовах можна отримати три барвники, які ми планували розділити препаративною колонковою хроматографією. Але з'ясувалося, що вихідні індоленіни дуже відрізняються за реакційною здатністю і тому в результаті реакції було отримано тільки симетричний барвник **Sq7**, що не містить карбоксильних груп:

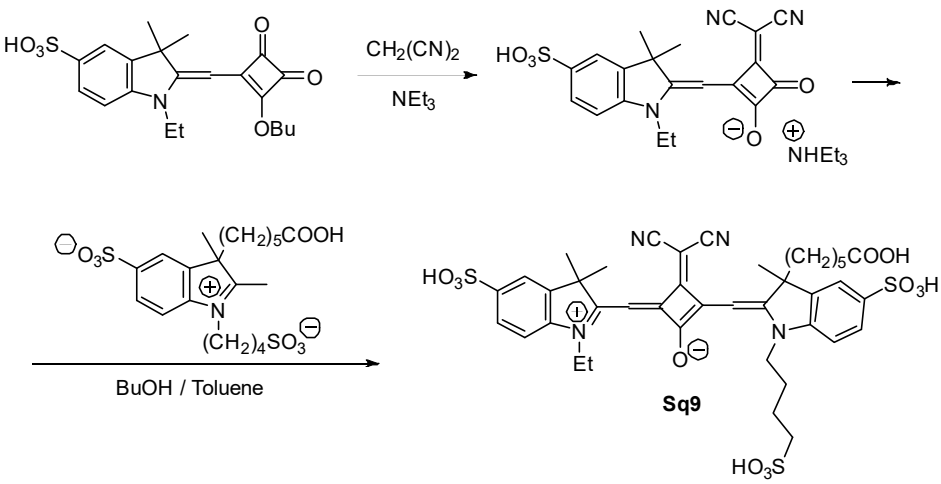


Тому, як показано на схемі нижче, цільовий барвник **Sq6** було синтезовано виходячи з водорозчинного моноскваранa:

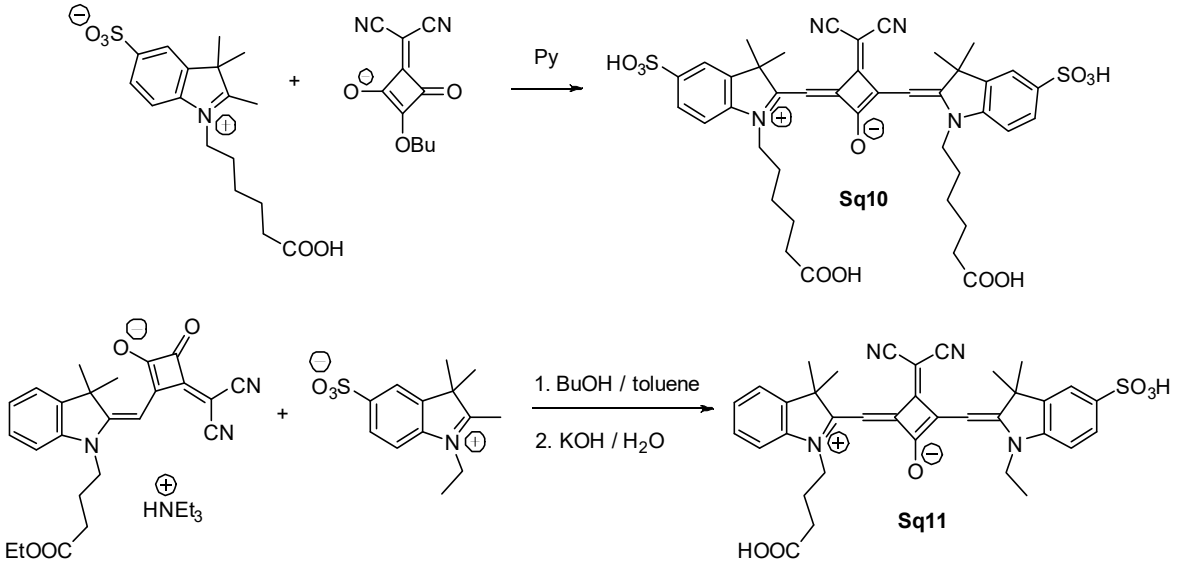


Несиметричні диціанометиленові сквараїни **Sq8** і **Sq9** були синтезовані за допомогою підходу, що описано в [75]. Взаємодією відповідних моносквараїнів з малонодинітрилом були одержані заміщені моносквараїни, які далі вводили у реакції з іншими заміщеними індоленінами.

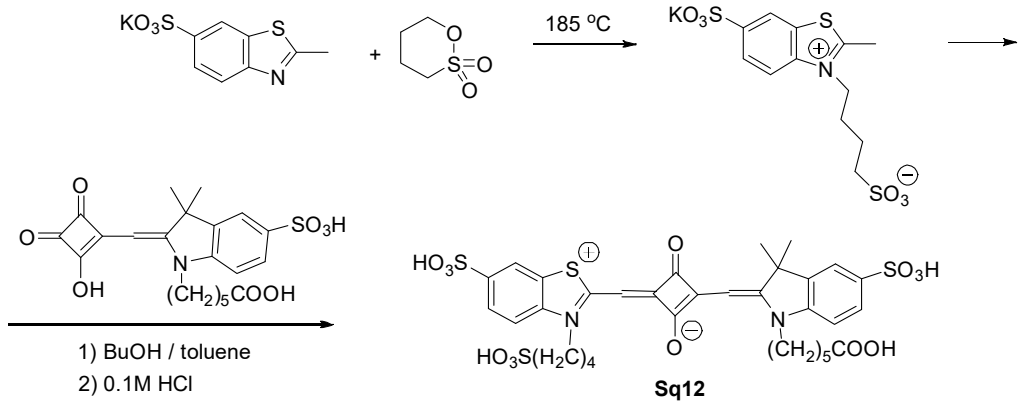




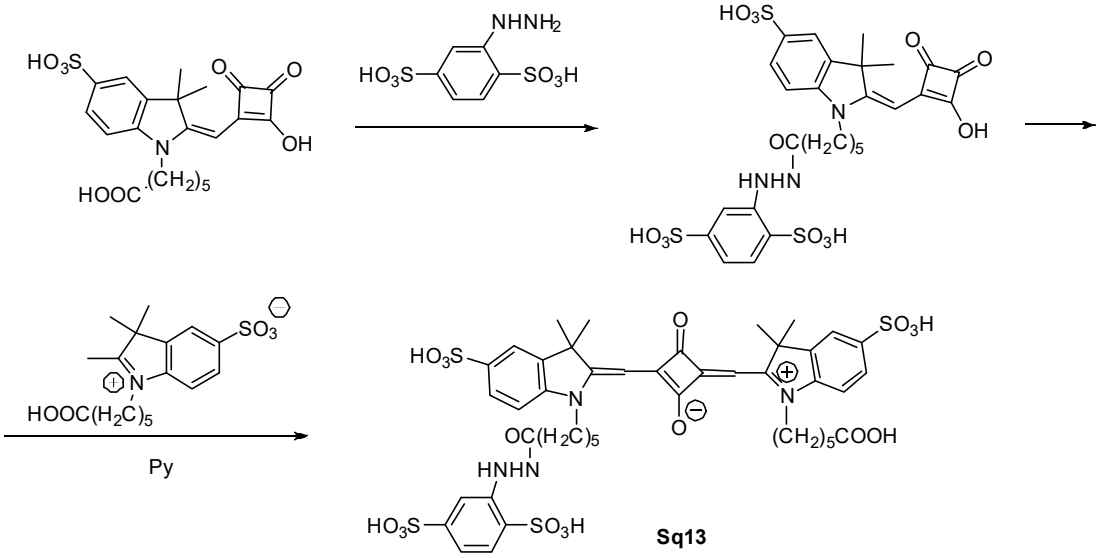
На цьому етапі проєкту ми синтезували реакційні симетричний **Sq10** та несиметричний **Sq11** диціанометиленові скваратні мітчики:



Ми також одержали скваріновий барвник **Sq12** з бензтіазольним фрагментом замість індоленінового:



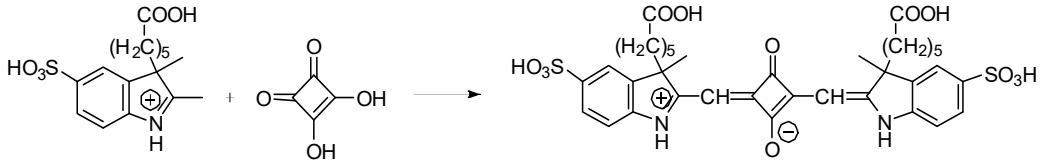
Для підвищення водорозчинності та, як наслідок, квантового виходу та FLT, ми ввели у замісник при гетероциклічному атомі азоту одного з термінальних індоленінових фрагментів додатково дві сульфогрупи та отримали барвник **Sq13**. На жаль, синтетичний вихід останнього дуже низький і, якщо цей барвник виявиться перспективним, потрібно буде вдосконалювати умови його синтезу.



Sq13

Далі ми синтезували серію скваранових барвників **Sq14-19** без замісника у гетероциклічного атома азоту.

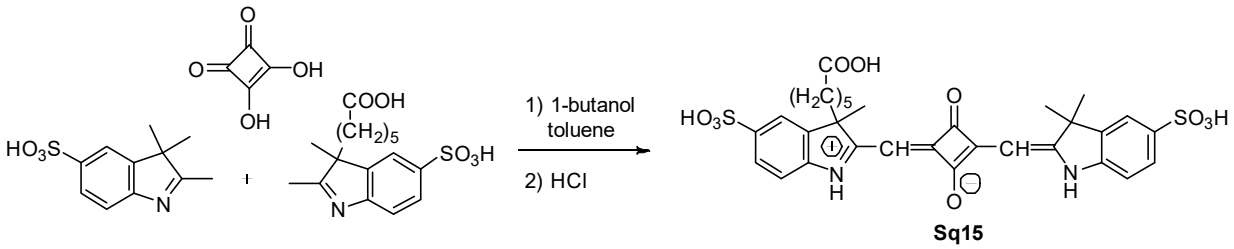
2-[3-(5-Карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-2,3-дигідро-1*H*-2-індоліл-іденметил]-4-[3-(5-карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-3*H*-2-індолійіл-метилен]-3-оксо-1-циклобутен-1-олат (Sq14).



Sq14

Суміш 60 мг (0.5 ммоль) квадратної кислоти, 500 мг (1.47 ммоль) 3-(5-карбоксипентил)-2,3-диметил-5-індолійсульфонової кислоти, 10 мл бутанолу та 10 мл толуолу кип'ятили 18 годин. Розчинник випаровували, залишок розчиняли в 20 мл 0.25 М HCl та кип'ятили протягом 3 годин. Розчинник видаляли при пониженому тиску, продукт очищували колонковою хроматографією (силікагель RP-18, H_2O-MeOH) та одержували 50 мл темно-синього продукту **Sq14**. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 12.80 (2H, с), 7.60 (2H, с), 7.56 (2H, д, 8.3 Гц), 7.16 (2H, д, 8.2 Гц), 5.55 (2H, CH, с), 2.08 (4H, CH_2, т, 6.8 Гц), 2.04–1.75 (4H, CH_2, м), 1.42 (6H, CH_3, с), 1.42–1.01 (8H, CH_2, м), 1.00–0.74 (2H, CH_2, м), 0.73–0.47 (2H, CH_2, м).

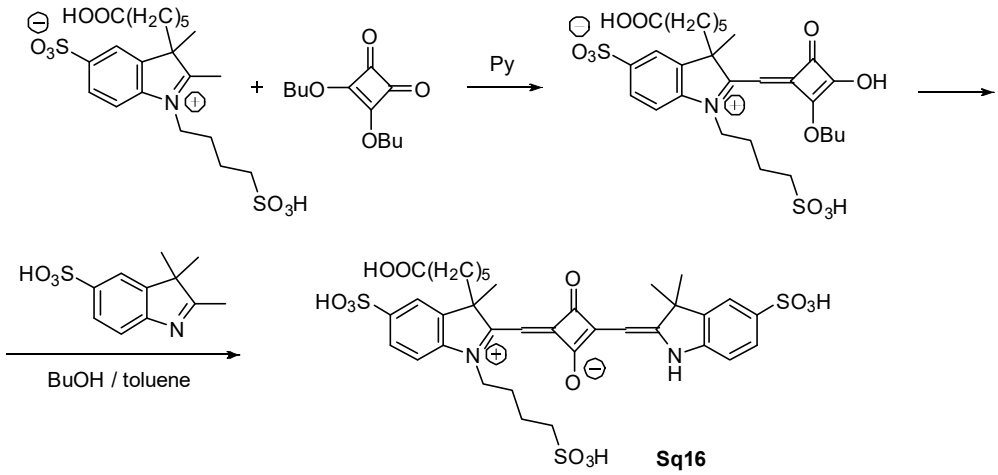
4-[3-(5-Карбоксипентил)-3-метил-5-сульфо-3*H*-2-індолійілметилен]-2-(3,3-диметил-5-сульфо-2,3-дигідро-1*H*-2-індоліліденметил)-3-оксо-1-циклобутен-1-олат (Sq15).



Sq15

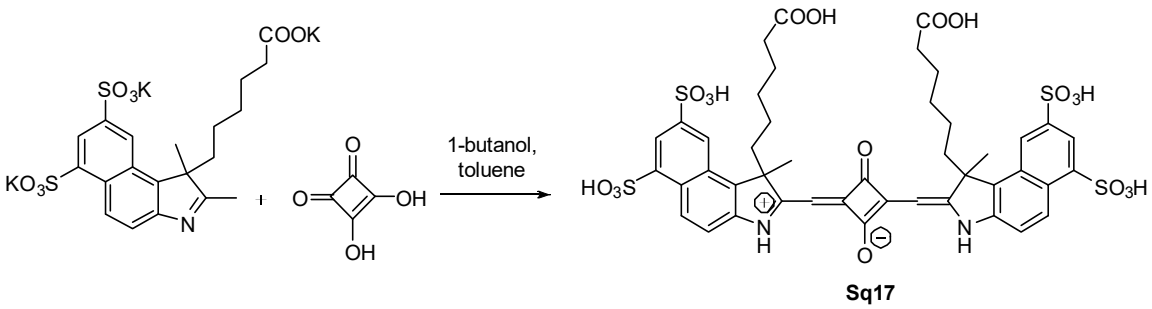
Суміш 350 мг (1.47 ммоль) 2,3,3-триметил-3*H*-5-індолсульфонової кислоти, 500 мг (1.47 ммоль) 6-(2,3-диметил-5-сульфо-3*H*-3-індоліл)гексанової кислоти та 220 мг (1.92 ммоль) 3,4-дигідрокси-3-циклобутен-1,2-діону кип'ятили з насадкою Діна-Старка у суміші 30 мл 1-бутанолу та 10 мл толуолу протягом 15 годин. Розчинник видаляли під зниженим тиском за допомогою ротаційного випаровувача. Отриманий залишок кип'ятили в 70 мл 0.2 M HCl протягом часу, а потім видаляли воду при пониженому тиску. Отриманий продукт два рази очищували на хроматографічній колонці (силікагель RP-18, 0–5% метанол-вода) та одержували 65 мг (6.7 %) продукту **Sq15**. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 12.78 (2H, шир с, N*H*), 7.66 (1H, sc), 7.61 (1H, с), 7.56 (2H, дд, 8.5, 1.2 Гц), 7.16 (2H, д, 8.1 Гц), 5.58 (1H, с, C*H*), 5.54 (1H, с, C*H*), 2.07 (2H, т, 6.9 Гц, CH_2COOH), 2.02–1.74 (2H, м, CH_2), 1.44 (6H, с, (CH_3)$_2$), 1.42 (3H, с, (CH_3)$_2$), 1.37–1.05 (4H, м, CH_2), 1.00–0.45 (2H, м, CH_2). UV: λ_{max} (abs) 638 nm, ε 136,000 M^{-1} cm^{-1} (PBS); λ_{max} (фл) 655 нм, квантовий вихід 31% (PB).

Ми також синтезували pH-чутливий монореакційний барвник **Sq16**:



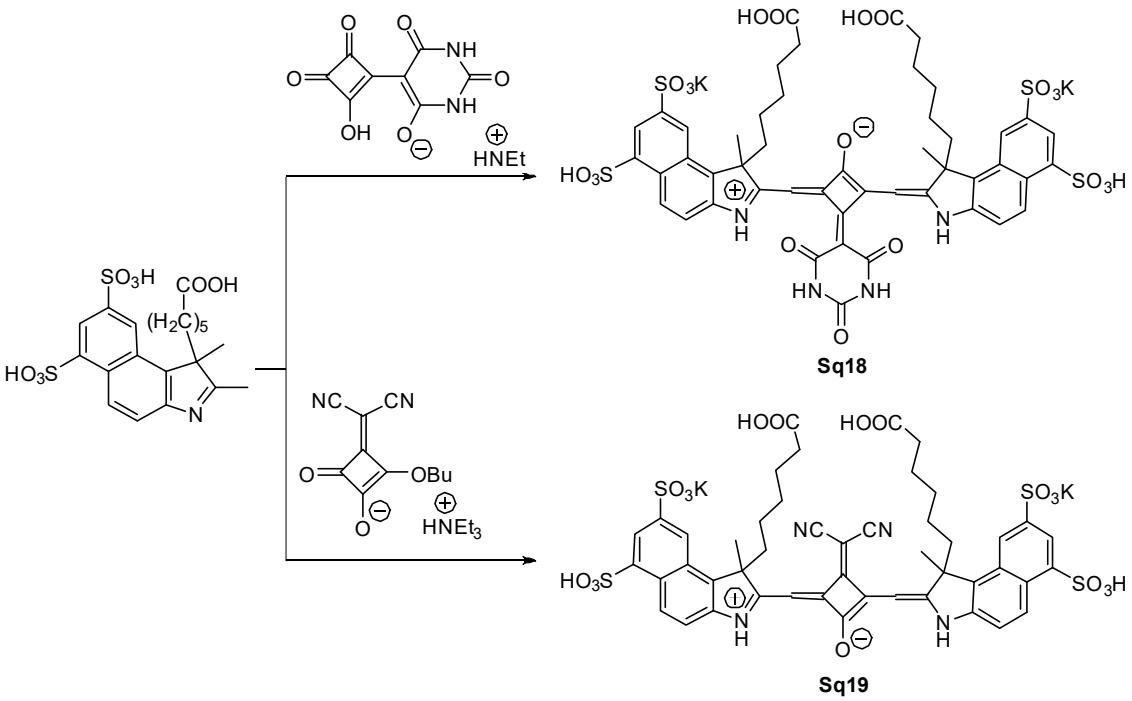
Sq16

На основі 6,8-дисульфобензоіндоленіну було синтезовано три водорозчинних симетричних pH-чутливих барвника (**Sq17-Sq19**) з різними замісниками в скваріновому фрагменті.



Sq17

4-[1-(5-Карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-1*H*-бензо[*e*]індолій-2-ілметилен]-2-[1-(5-карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-2,3-дигідро-1*H*-бензо[*e*]індол-2-іліденметил]-3-оксо-1-циклобутен-1-олат (Sq17). Суміш 6-(1,2-диметил-6,8-дисульфо-1*H*-бензо[e]індол-1-іл)гексанової кислоти (700 мг, 1.5 ммоль) та квадратної кислоти (85 мг, 0.75 ммоль) кип'ятили при перемішуванні в 10 мл суміші 1-бутанол-толуол (1:1, об.) протягом 20 годин. Зеленувато-чорний осад відфільтровували, промивали 5 мл бутанолу та 5 мл етеру. Після висушування у вакуум-ексикаторі продукт розчиняли у 25 мл 0.2 М розчину HCl та кип'ятили 1 годину. Далі розчинник видаляли під пониженим тиском. Отриманий продукт очищували на хроматографічній колонці (силікагель RP-18, 0–10% метанол-вода) та одержували 12 мг (2%) цільового продукту. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 8.92 (2H, д, 8.4 Гц), 8.23 (2H, с), 8.15 (2H, с), 7.59 (2H, д, 7.2 Гц), 5.66 (2H, с, CH), 2.01 (4H, т, CH_2COOH), 1.67 (6H, с, CH_3), 1.39–1.02 (12H, м, CH_2), 0.97–0.35 (4H, м, CH_2).



4-[1-(5-Карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-1*H*-бензо[*e*]індолій-2-ілметилен]-2-[1-(5-карбоксипентил)-1-метил-6,8-дисульфо-2,3-дигідро-1*H*-бензо[*e*]індол-2-іліденметил]-3-(2,4,6-тріоксогексагідро-5-піримідиніліден)-1-циклобутен-1-олат (**Sq18**). Суміш 0.5 г (1.06 ммоль) карбоксипентил-дисульфобензіндоленіну та 0.16 г (0.5 ммоль) барбітурового похідного квадратної кислоти кип'ятили 15 годин в 15 мл піридину при перемішуванні. Після охолодження продукт фільтрували, промивали 10 мл *н*-бутанолу та висушували у вакуум-ексикаторі. Барвник **Sq18** декілька разів очищували на хроматографічній колонці (силікагель RP-18, вода-метанол (98:2) з 0.05% CF_3COOH) та одержували 10 мг (2%) барвника **Sq18**. ^{1}H ЯМР (200 МГц, ДМСО-d_6), δ, м.ч.: 12.38 (2H, с, NH індоленіновий фрагмент), 10.31 (2H, с, NH of барбітуровий фрагмент), 8.95 (2H, д), 8.25 (2H, с), 8.17 (2H, д), 7.73 (2H, д), 6.77 (2H, с, CH), 2.12-1.88 (4H, м, CH_2COOH,), 1.67 (6H, с, CH_3), 1.40–0.98 (12H, м, CH_2), 0.98–0.35 (4H, м, CH_2).

Спектральні та інші фотофізичні характеристики скваріїнових мітчиків наведено у таблицях 14.6 та 14.7 (*див. Розділ 14, п. 14.5*).

14 Спектральна та фотофізична характеризація одержаних FLT-чутливих барвників у водних розчинах та у органічних розчинниках

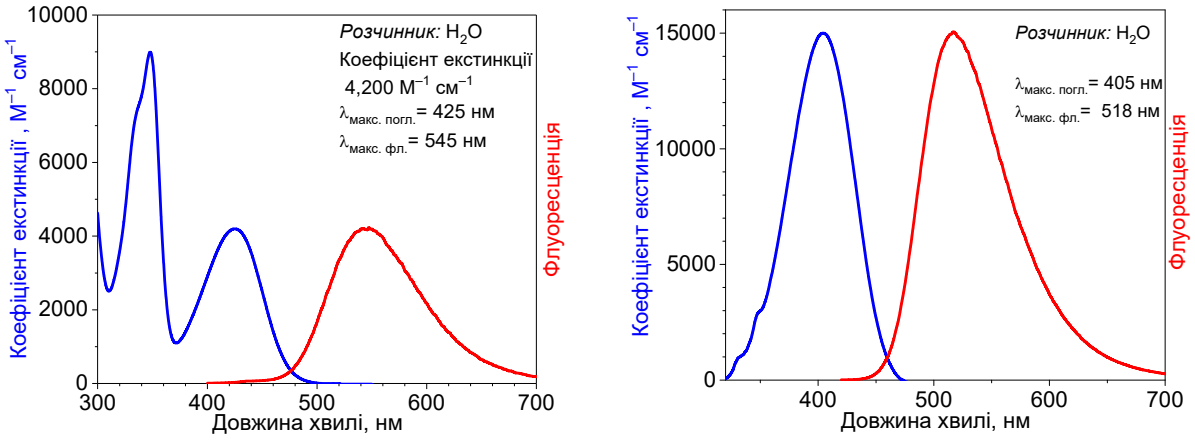
З використанням методик для вимірювання спектрів поглинання, флуоресценції та квантових виходів, наведених у *Розділі 6 (див. п. 6.1)*, ми дослідили спектральні та інші фотофізичні характеристики синтезованих FLT-чутливих барвників.

Вимірювання **часів життя флуоресценції (FLTs)** було проведено на спектрометрі Chronos (ISS, Champaign, Illinois) з 635-нм лазерним діодним джерелом випромінювання. Два синтезатора (Модель IFR2023) забезпечували модуляцію частоти у межах від 9 кГц до 1.2 ГГц: один синтезатор керував світлодіодами напряму з частотою f, а другий синтезатор – вікном світлового детектора на частоті (f + Δf), де значення Δf, що називається крос-кореляційною частотою, було приблизно 1 кГц. Сигнали сум (тобто $2f$ + Δf) та різниця (тобто Δf) двох частот записувалися, і низькочастотна компонента Δf використовувалася для визначення DC (постійного струму), AC (змінного струму) і фазових компонентів сигналу.

При вимірюванні часу життя флуоресценції концентрація барвника PB (pH 7.4) була у межах 10^{-6}–10^{-7} М. Інструментальний контроль, одержання даних та їх аналіз проводилися за допомогою Vinci – мультирозмірного флуоресцентного спектроскопічного програмного забезпечення (ISS, Champaign, Illinois). Аналіз одержаних флуоресцентних даних здійснювався з використанням традиційного нелінійного метода найменших квадратів. Цей метод визначає, на скільки вибрана модель відповідає одержаним інструментальним даним: алгоритм Марквардта–Левенберга використовували для процедури мінімізації χ^2-функції, яка порівнює вибрану модель з експериментальними даними. Аналіз включає алгоритм підгонки для встановлення множинних часів гасіння (експоненційного, неекспоненційного, розподілення часів життя).

14.1 FLT-мітчики на основі похідних нафталевої кислоти

Нафталеві барвники поглинають у синій області спектру (330–450 нм) і тому їх можна збуджувати 380-нм та 405-нм діодними лазерами. Вони випромінюють у блакитній, зеленій або жовтій областях спектру (390–610 нм) та мають великі Стоксові зсуви. Їх коефіцієнти екстинкції є не дуже високими. Квантові виходи для незв'язаних барвників дорівнюють 60 % в етанолі та 40 % у воді. Типові спектри поглинання та флуоресценції нафталевих барвників показано на Рис. 14.1.

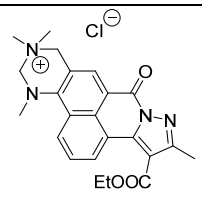
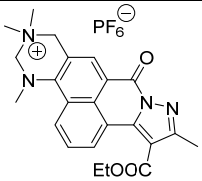
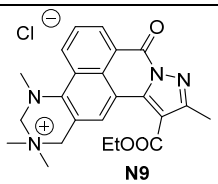
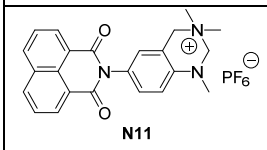
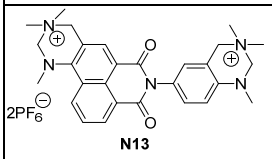
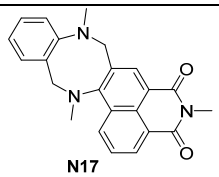
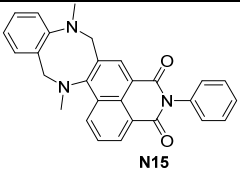


N2 **N20**

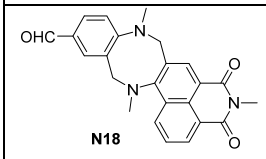
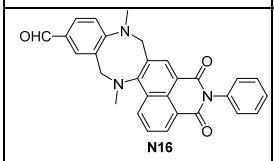
Рисунок 14.1 – Спектри поглинання та флуоресценції барвників **N2** та **N20** у воді.

Спектральні характеристики нафталевих мітчиків представлено у таблицях 14.1 і 14.2. Ми встановили, що введення піримідинового фрагменту в структуру молекул нафталевих барвників підвищує їх FLT і тому такі барвники як **N2**, **N4** і **N20** найкращим чином підходять як FLT-мітчики (таблиця 14.2).

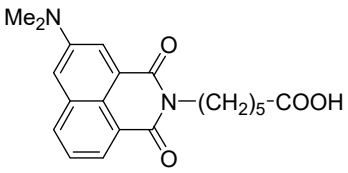
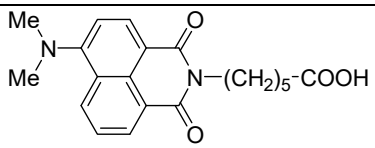
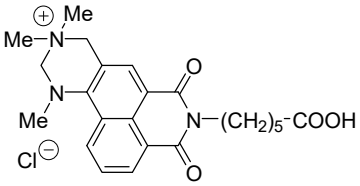
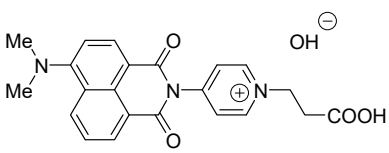
Таблиця 14.1 – Спектральні характеристики барвників і мітчиків на основі похідних нафталевої кислоти.

Барвник	Етанол				Вода			
	Поглинання		Флуоресценція		Поглинання		Флуоресценція	
	$\lambda_{абс}$, нм	$\varepsilon\times10^{-3}$, $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	$\lambda_{абс}$, нм	$\varepsilon\times10^{-3}$, $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %
 **N6**	418	0.80	494	60	430	0.90	508	39
 **N7**	421	0.86	492	59	429	0.54	508	34
 **N9**	436	1.60	584	44	448	0.72	606	7
 **N11**	337	12.2	463	1	344	11.5	392	1
 **N13**	395	9.8	500	3.5	410	14.9	514	3.0
 **N17**	425	-	496	3	441	-	530	1
 **N15**	431	-	494	6	448	-	521	1

Продовження **Таблиці 14.1**

Барвник	Етанол				Вода			
	Поглинання		Флуоресценція		Поглинання		Флуоресценція	
	$\lambda_{абс}$, нм	$\varepsilon\times10^{-3}$, $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	$\lambda_{абс}$, нм	$\varepsilon\times10^{-3}$, $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %
 N18	424	-	501	4	438	-	545	1
 N16	427	-	496	9	441	-	533	1

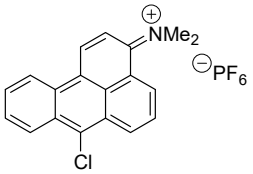
Таблиця 14.2 – Спектральні та FLT характеристики мітчиків на основі похідних нафталевої кислоти.

№	Барвник	Розчинник	$\lambda_{абс}$, нм (ε, $M^{-1}\cdot см^{-1}$)	$\lambda_{фл}$, нм (Φ_F, %)	Час життя, нс
N1		Етанол	458 (4,100)	599 (6%)	6.5
N3		Етанол Вода	423 443	535 558	7.2 <0.1
N4		Вода	402 (10,600)	515 (52%)	9.3
N14		Вода	452 (11,300)	566 (0.2%)	

14.2 Бензантроновий FLT-мітчик

Бензантронові барвники поглинають між 430 та 500 нм та флуоресціюють в області 525–650 нм. Як правило, бензантрони поглинають та випромінюють у більш довгохвильовому діапазоні у порівнянні з похідними нафталевої кислоти, але їх квантові виходи та FLT мають такі ж або нижчі значення. Спектральні дані синтезованого нами бензантронового барвника **B1** представлені у таблиці 14.3.

Таблиця 14.3 – Спектральні характеристики бензантронового барвника **B1** у воді та етанолі.

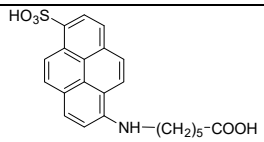
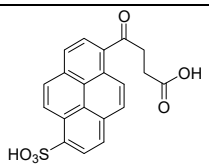
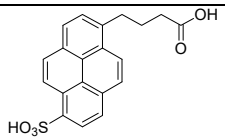
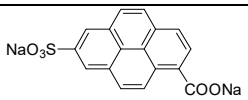
Барвник	Етанол			Вода		
	Поглинання	Флуоресценція		Поглинання	Флуоресценція	
	$\lambda_{абс}$, нм	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	$\lambda_{абс}$, нм	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %
	571	668	5	568	690	1.5

14.3 FLT-мітчики на основі пірену

Оскільки пірен, особливо у ексимерній формі, має довгий FLT, ми синтезували його водорозчинні похідні та дослідили їх спектральні властивості у водному середовищі.

Спектральні характеристики водорозчинних мітчиків **P1–P4** на основі пірену наведені у таблиці 14.4. Ці мітчики у воді мають високі квантові виходи (до 77 %) та довгі FLT (до 14.4 нс у воді).

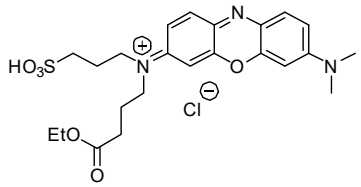
Таблиця 14.4 – Спектральні характеристики мітчиків на основі пірену **P1–P4** у водному розчині.

№	Барвник	$\lambda_{абс}$, нм	ε, $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм (Φ_F, %)	Час життя, нс
P1		411	5,000	492 (61%)	5.3
P2		383	16,500	447 (77%)	1.6
P3		369	–	408	5.35
P4		358	18,500	398 (55%)	14.4

14.4 FLT-Мітчик на основі оксазину

Новий оксазиновий мітчик **O2** поглинає та випромінює у воді у червоній області спектру з квантовим виходом 10% (табл. 14.5). Час життя флуоресценції складає 0.8 нс. Для визначення перспективності цього барвника як FLT-мітчика передбачається дослідити його спектральні властивості після зв'язування з біологічними макромолекулами.

Таблиця 14.5 – Спектральні характеристики оксазинового мітчика **O2**.

Барвник	Вода			
	Поглинання	Флуоресценція		
	$\lambda_{абс}$, нм	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	τ, нс
	649	668	10	0.8

14.5 Скваранові мітчики

Скваранові мітчики, що поглинають і випромінюють у червоній та ближній ІЧ області спектру, становлять найбільший інтерес у порівнянні з іншими FLT-мітчиками, розробленими у цьому проєкті. Це пояснюється тим, що довгохвильові скваранові барвники дозволяють суттєво зменшити вплив таких негативних факторів, як власне поглинання та флуоресценція біологічної речовини. Саме тому ми зосередили нашу увагу на ретельному дослідженні цих барвників.

Спектри поглинання та випромінювання гідрофільних (водорозчинних) скваранових барвників **Sq0–Sq11**, **Sq14**, **Sq17–Sq19**, **Sq21–Sq23** та **Cy5** були виміряні у фосфатному буфері (PB) при pH 7.4. Максимуми поглинання та випромінювання, а також коефіцієнти екстинкції і квантові виходи наведені у таблиці 14.6, а часи життя флуоресценції (FLT) — в таблиці 14.7. Типовий спектр поглинання та випромінювання скваранових барвників показано на Рис. 14.2.

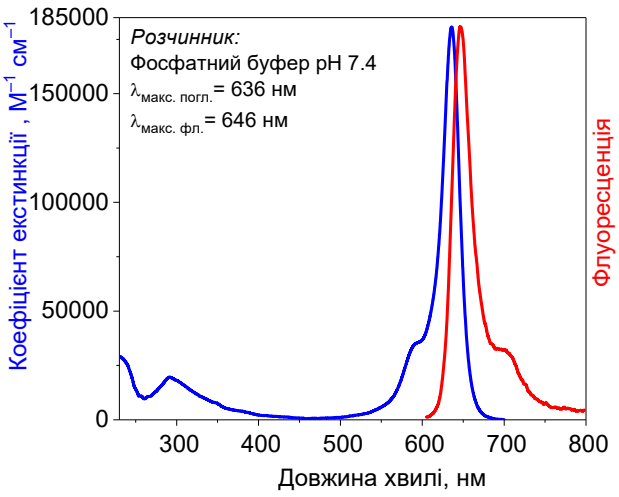
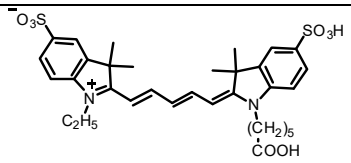
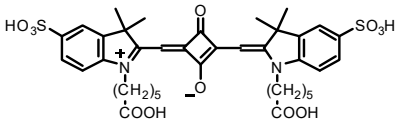
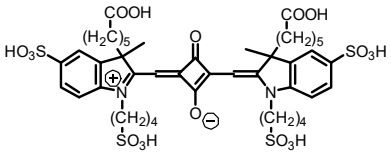
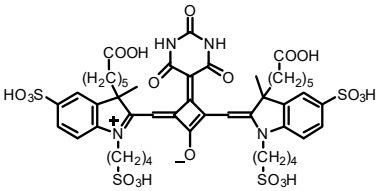
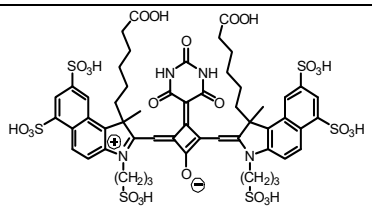
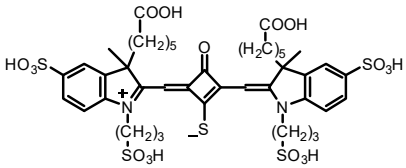
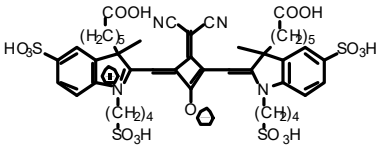
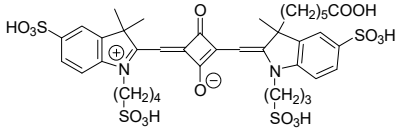
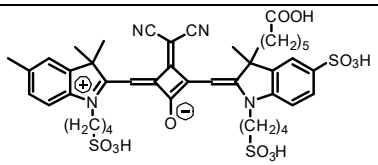
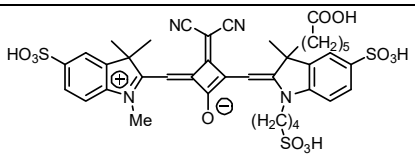
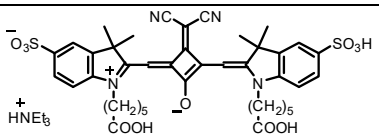
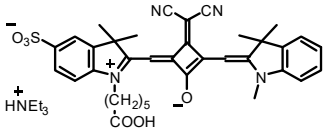
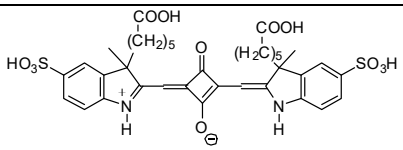
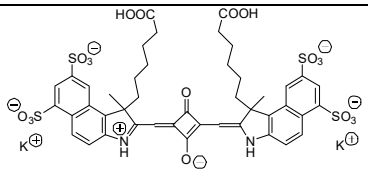
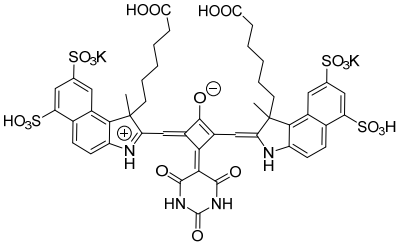
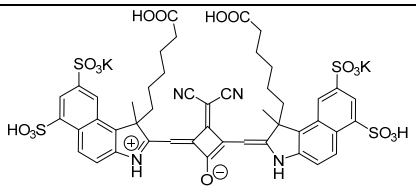
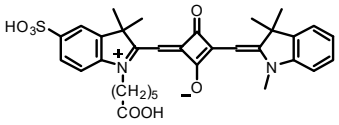


Рисунок 14.2 – Спектри поглинання та випромінювання для скваранового барвника **Sq1** в PB pH 7.4.

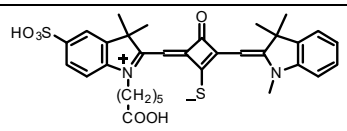
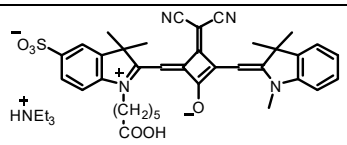
Таблиця 14.6 – Спектральні характеристики скваріонових мітчиків у фосфатному буфері (PB) з pH 7.4.

Барвник	Структура	$\lambda_{абс}$, нм	ε. $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	Стоксів зсув Δν, $см^{-1}$
Cy5		647	250,000	664	27	400
Sq0		632	265,000	642	6	250
Sq1		638	181,000	647	13	220
Sq2		634 427	131,000 18,000	656	8	530
Sq3		659 419	132,000 16,000	679	10	450
Sq4		640 390	120,000 17,000	653	5	310
Sq5		669 381	144,000 26,000	691	12	480
Sq6		633	250,000	644	7	270

Продовження **Таблиці 14.6**

Барвник	Структура	$\lambda_{абс}$, нм	ε. $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	Стоксів зсув Δν, $см^{-1}$
Sq8		667 389	118,000 28,000	683	3	350
Sq9		667 391	179,000 33,000	688	7	460
Sq10		667 380	188,000 26,500	685	7	390
Sq11		658 385	182,000 34,000	677	3	430
Sq14		640	188,000	656	33	380
Sq17		662	70,000	679	19	378
Sq18		662	87,000	684	17	486
Sq19		693	113,000	714	14	424
Sq21		624	245,000	635	2	280

Продовження **Таблиці 14.6**

Барвник	Структура	$\lambda_{абс}$, нм	ε. $M^{-1}\cdot см^{-1}$	$\lambda_{фл}$, нм	Φ_F, %	Стоксів зсув Δν, $см^{-1}$
Sq22		628 373	163,000 21,500	642	3	350
Sq23		659 385	207,000 44,500	676	2	380

Довгохвильові максимуми поглинання (634–669 нм) та випромінювання (647–691 нм) досліджених скваратів з фрагментами 3-заміщеного індоленіна **Sq1–Sq5**, **Sq8**, **Sq9** знаходяться у тому ж самому спектральному діапазоні, що і для добре відомих комерційно доступних барвників **Cy5** (*Amersham now GE Healthcare*) та **Sq0**. Крім того, ці барвники мають високі коефіцієнти екстинкції (118000–181000 $M^{-1}\cdot см^{-1}$). Максимуми поглинання та випромінювання 3-заміщених скваратів дещо зміщені в більш довгохвильову область у порівнянні зі звичайними скваратами, що містять дві метильні групи у положенні 3 індольного циклу.

Знайдено, що замісники у скваратовому циклі мають різний вплив на спектральні характеристики. Якщо максимум поглинання барбітурового скваратa **Sq2** зміщений у синю область на 4 нм у порівнянні з кисневим скваратом **Sq1**, то для тіо- (**Sq4**) і ще сильніше для диціанометиленового скваратy (**Sq5**) він зміщений у довгохвильову область. У той же час, максимуми випромінювання всіх досліджених скваратів з замісниками у скваратовому циклі зміщені в довгохвильову область в ряду: оксо < монотіо < барбітурова кислота << диціанометиленова група. Стоксові зсуви для барбітурового скваратa **Sq2** суттєво збільшені у порівнянні з кисневим та тіо-скваратами. Диціанометиленовий барвник **Sq5** також має збільшений стоксів зсув у порівнянні з оксо- (**Sq1**) та тіо- (**Sq4**) скваратами, але цей зріст обумовлено тим, що довгохвильовий зсув максимума випромінювання є

більшим, ніж для максимума поглинання. У порівнянні з **Sq2** смуги поглинання та випромінювання бензіндоленінового скваріну **Sq3** зміщені у довгохвильову область відповідно на 25 і 23 нм, тоді як стоксові зсуви для цих барвників є майже однаковими.

Збільшені стоксові зсуви допомагають уникнути небажаних спектральних явищ, що негативно впливають на достовірність вимірювань при медико-біологічних тестуваннях. У цьому аспекті дуже важливим є те, що спектри поглинання тіо- (**Sq4**), диціанометиленових (**Sq5**, **Sq8** і **Sq9**) та барбітурових скваріїнів **Sq2** і **Sq3**, у протилежність до звичайних поліметинів, таких як **Cy5** та кисневих скваріїнів, мають додаткову смугу поглинання біля 380–430 нм з коефіцієнтом екстинкції 16000–33000 $M^{-1}·см^{-1}$ (табл. 14.6). Ці коефіцієнти екстинкції мають такий самий порядок, як і для більшості звичайних люмінофорів на цей спектральний діапазон, що робить ці червоні та ближні інфрачервоні випромінюючі мітчики придатними для збудження не лише червоними діодними лазерами, але ще й синіми діодними лазерами та навіть УФ променями.

Аналіз серії **Sq17–Sq19** показує наступне: у порівнянні з діоксо-скваріїном **Sq17**, барбітуровий скваріїн **Sq18** має такий самий максимум поглинання, а спектр його випромінювання зміщений у червону область на 5 нм. В той же час, спектр поглинання диціанометиленового скваріну **Sq20** зміщений у червону область на 31 нм, а спектр випромінювання – на 35 нм.

Квантовий вихід ($Ф_F$), поряд із коефіцієнтом екстинкції, є найважливішими характеристиками для практичного застосування флуоресцентних барвників. Скваріїни **Sq1–Sq5**, **Sq8** і **Sq9** мають такі ж $Ф_F$, що і **Sq0**, тобто у декілька раз менші, ніж **Cy5** (табл. 14.6). Явного зв'язку між квантовими виходами та молекулярною будовою не знайдено, але є тенденція їх збільшення при переході від несиметричних скваріїнів **Sq8** і **Sq9** до симетричного барвника **Sq5** аналогічної будови. Слід зазначити, що квантові виходи скваріїнів не залежать від довжини хвилі збудження (620 нм або 400 нм).

Середні часи життя флуоресценції (τ_{mean}) скваріновых барвників у РВ майже у два рази менші, ніж для **Cy5** (табл. 14.7). У той час як крива затухання флуоресценції **Cy5** добре описується моноекспоненціальною функцією, затухання всіх досліджених скваріновых барвників може бути описано лише біекспоненціальною кривою. Перша компонента (τ_1) з більшим вкладом (f_1) є швидкою, а друга — (τ_2, f_2) повільна. Друга компонента (τ_2) має приблизно таке ж значення, що і τ_{mean} для **Cy5**.

Таблиця 14.7 – Часи життя флуоресценції (τ) скваріновых мітчиків у фосфатному буфері (РВ) при pH 7.4.

Барвник	τ_1, нс	f_1	τ_2, нс	f_2	χ^2	τ_{mean}, нс
Cy5	1.00	1.00	—	—	1.20	1.00
Sq0	0.20	0.84	1.12	0.16	2.00	0.35
Sq1	0.36	0.58	1.00	0.42	0.53	0.68
Sq2	0.31	0.69	0.93	0.31	0.43	0.50
Sq3	0.97	0.58	0.28	0.42	1.69	0.68
Sq4	0.28	0.79	1.21	0.21	1.90	0.47
Sq10	0.51	0.81	1.48	0.29	2.4	0.84
Sq11	0.19	0.87	0.98	0.13	1.0	0.29
Sq14	1.80	1.00	—	—	1.60	1.80
Sq17	1.08	1.00	—	—	1.90	1.08
Sq18	1.09	1.00	—	—	1.84	1.09
Sq19	1.21	1.00	—	—	1.51	1.21
Sq21	0.05	0.83	0.72	0.17	2.2	0.16
Sq22	0.088	0.78	0.625	0.22	4.7	0.15
Sq23	0.16	0.66	0.83	0.34	1.9	0.29

Виміряні у РВ часи життя флуоресценції барвників з однією сульфогрупою **Sq11**, **Sq21–Sq23** мають значення від 0.15 до 0.29 нс, у той час як часи життя дисульфозаміщених барвників **Sq0** та **Sq10** складають 0.35 та 0.84 нс, відповідно (табл. 14.7). Барвники з двома сульфогрупами мають майже вдвічі більші часи життя у порівнянні з моносульфованими барвниками.

Цікаво, що тетрасульфоскваратін **Sq1** має майже вдвічі більший τ_{mean} у порівнянні з дисульфопохідним **Sq0**. Заміщення скваратінового атома кисню сіркою (**Sq4**) та фрагментом барбітурової кислоти (**Sq2**) зменшує τ_{mean}.

14.6 Димерні барвники на основі акридинового оранжевого

Час життя флуоресценції (FLT) — це час, який флуорофор, наприклад, флуоресцентний барвник, проводить у збудженому стані, перш ніж здійснити випромінювання фотону та повернутися до основного стану. Оскільки час життя флуоресценції низки флуоресцентних барвників залежить від їхнього мікрооточення, цей параметр використовують як аналітичний сигнал для спостереження важливих міжмолекулярних процесів, зокрема взаємодій типу акцептор-ліганд. Важливою перевагою досліджень, заснованих на вимірюванні часу життя флуоресценції, є можливість використання лише одного мітчика. FLT для барвників, які зазвичай використовуються в системах ПЛР в реальному часі, знаходиться в діапазоні від 1 до 20 нс. Наприклад, для **SYBR Green I** (**SG**) FLT становить 5.2 нс при зв'язуванні з длДНК [76], тоді як час життя флуоресценції вільного барвника значно нижчий – 3.1 нс. Тобто за зміною часу життя флуоресценції можна детектувати кількість ампліфікованих продуктів ПЛР в режимі реального часу, що, зокрема, продемонстровано у роботі [9] на прикладі **SG**. Крім того, використання зміни FLT дозволяє виконувати ПЛР-аналізи із задіянням меншої кількості теплових циклів, що може покращити продуктивність обладнання.

На прикладі димерних барвників ***bis*-АО6** та ***bis*-АО8** ми дослідили часи життя флуоресценції вільних барвників у Tris буфері (pH 8.0) та при утворенні комплексів з длДНК ($c_{ДНК}$ = 100 мкг/мл). Отримані дані наведено у таблиці 14.8.

Таблиця 14.8 – Часи життя флуоресценції (τ) димерних барвників ***bis*-АО6** та ***bis*-АО8** у Tris буфері (pH 8.0) та при утворенні комплексів барвник-длДНК ($c_{ДНК}$ = 100 мкг/мл).

Барвник	τ_1, нс	f_1	τ_2, нс	f_2	χ^2	τ_{mean}, нс
***bis*-АО8**	1.46	0.50	4.49	0.50	1.72	2.91
***bis*-АО8**-длДНК	5.29	0.81	26.3	0.19	1.41	9.11
***bis*-АО6**-длДНК	6.13	0.62	3.01	0.38	0.89	4.94

Аналогічно до більшості скваранінів (таблиця 14.7), затухання димерного барвника ***bis*-АО8** за відсутності длДНК описується біекспоненціальною кривою. При цьому середній час життя флуоресценції (τ_{mean}) барвника ***bis*-АО8** є більшим у порівнянні зі значеннями τ_{mean} для скваранінових барвників. Так, наприклад, середній час життя флуоресценції барвників **Sq0** та **Sq10**, які мають дві SO_3H-групи, менше у 8 та 3 рази, відповідно, порівняно зі значеннями τ_{mean} для ***bis*-АО8**.

При інтеркаляції димерного барвника ***bis*-АО8** у длДНК значення τ_{mean} зростає з 2.91 нс до 9.11 нс, тобто у три рази.

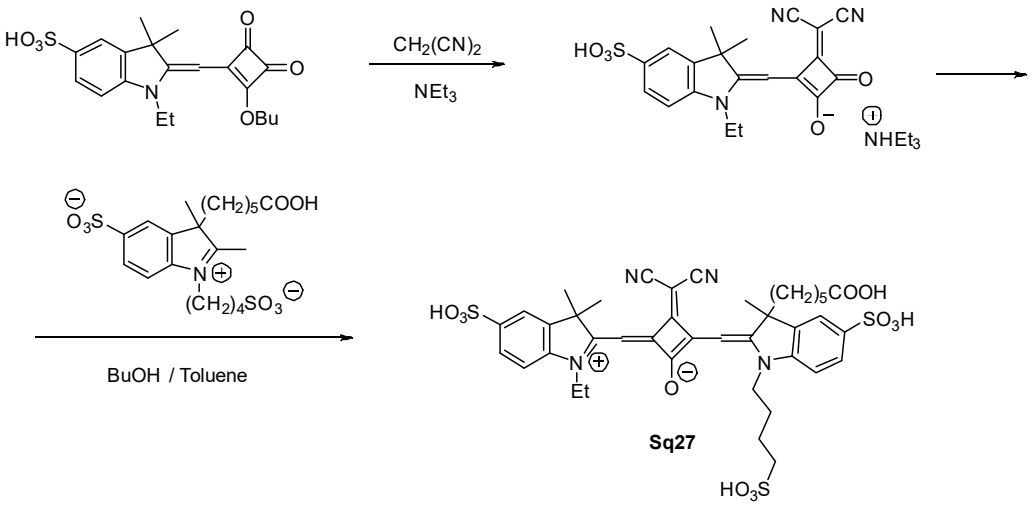
Таким чином, димерні барвники на основі акридинового оранжевого демонструють великий динамічний діапазон змін часу життя флуоресценції при зв'язуванні з длДНК, що робить їх придатними як біоаналітичні реагенти для проведення досліджень, заснованих на реєстрації часу життя флуоресценції.

15. Синтез кон'югатів реакційноздатних мітчиків з олігонуклеотидами

Скваратнові барвники, що поглинають і випромінюють у червоній та ближній ІЧ області спектру, становлять найбільший інтерес у порівнянні з іншими FLT-мітчиками, розробленими у цьому проєкті. Це пояснюється тим, що довгохвильові скваратнові мітчики дозволяють суттєво зменшити вплив таких негативних факторів, як власне поглинання та флуоресценція біологічної речовини. Саме тому у даному розділі для синтезу кон'югатів з олігонуклеотидами ми використали скваратнові барвники.

Серед досліджених у попередніх розділах (*див. Розділи 13 та 14*) FLT-чутливих барвників найкращим кандидатом для розробки гібридизаційних аналізів виявився скваратновий барвник **Sq27**.

Несиметричний диціанометиленовий скваратн **Sq27** був синтезований за допомогою підходу, описаного в [75]. Так, взаємодією моноскваратну з малонодинітрилом було одержано спершу заміщений моноскваратн, який далі вводили у реакцію з іншим заміщеним індоленіном.



Результати вимірювань фотофізичних та спектральних характеристик для барвника **Sq27** підтверджують його придатність для розробки модельного гібридизаційного аналізу. Так, барвник **Sq27** має високий коефіцієнт екстинкції ε = 179000 $M^{-1}см^{-1}$ у його довгохвильовому максимумі поглинання (λ = 667 нм), максимум флуоресценції при 686 нм, квантовий

вихід 7% та час життя флуоресценції (FLT) 0.40 нс виміряний у фосфатному буфері при pH 7.4 (Рис. 15.1).

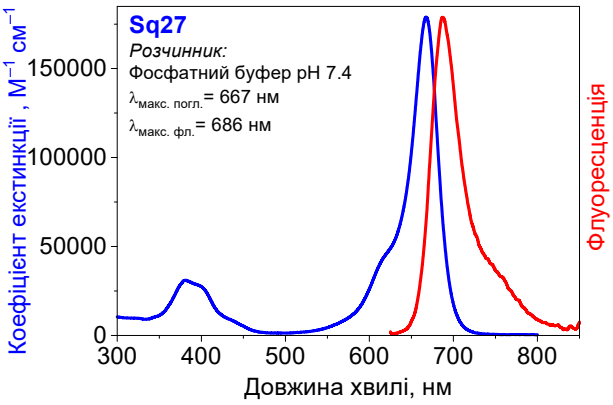


Рисунок 15.1 – Спектри поглинання та флуоресценції скваратного барвника **Sq27** у фосфатному буфері (pH 7.4).

Фотостабільність барвників є одним із вирішальних критеріїв при виборі барвників для проведення різноманітних медико-біологічних досліджень, у тому числі для розробки гібридизаційних методів аналізу на основі вимірювання часів життя флуоресценції. Саме тому, перш ніж одержати кон'югати барвника **Sq27** з олігонуклеотидом, ми дослідили фотостабільність **Sq27** та порівняли її з фотостабільністю відомих комерційних барвників **Cy5** та **Alexa 647** (Рис. 15.2).

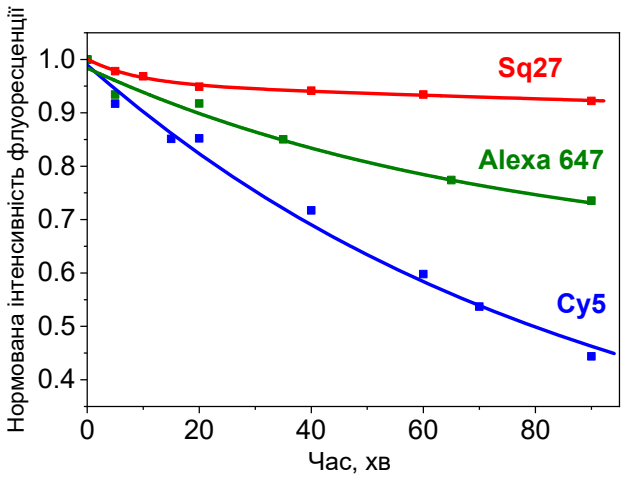


Рисунок 15.2 – Криві залежності нормованої інтенсивності флуоресценції барвників **Sq27**, **Cy5** та **Alexa 647** від часу опромінення галогеновою лампою.

З огляду на отримані дані (Рис. 15.2) фотостабільність скваранового барвника **Sq27** вища у порівнянні з фотостабільністю комерційних барвників **Cy5** та **Alexa 647**, що робить їх придатними для розробки гібридизаційних методів аналізу.

Для синтезу кон'югату ми обрали 3'-аміно-модифікований 15-мерний одноланцюговий олігонуклеотид ACAATTTGCTGCCGG (**Оліго-1**) (MW ~ 4569 Да). Оскільки його молекулярна маса суттєво менша у порівнянні з молекулярною масою антитіл (MW ~ 150 кДа) або авідину (MW ~ 68 кДа), основною вимога до барвника – підвищена чутливість до відносно невеликих змін мікрооточення, викликаних зв'язуванням з комплементарним олігонуклеотидом.

Методика синтезу NHS-естеру барвника Sq27. Суміш 30 мг (22 ммоль) барвника **Sq27** та 19.6 мг (66 ммоль) TSTU розчиняли у 6 мл ДМФА при перемішуванні та додавали 20 мкл (0.06 мкмол) DIPEA. Отриману суміш перемішували 2 години при кімнатній температурі, розчинник швидко видаляли за допомогою ротаційного випаровувача, залишок промивали діетиловим етером (3 × 5 мл) та висушували у вакуум-ексикаторі протягом 24 годин. Одержували 12 мг (88 %) продукту **Sq27-NHS**.

Методика синтезу кон'югату Sq27 з олігонуклеотидом. До розчину **Оліго-1** (1.4 мг, 0.3 мкМ) у 500 мкл бікарбонатного буферу (50 мМ, pH 9.0) додають розчин NHS-естеру барвника **Sq27-NHS** (2 мг) у 50 мкл ДМФА. Реакційну суміш перемішують впродовж 15 годин при 20 ºС у темряві. Далі кон'югат **Sq27** з олігонуклеотидом відділяють від вільного, не зв'язаного з олігонуклеотидом, барвника за допомогою гель-проникаючої хроматографії з використанням колонки (1.5 см × 25 см), де як нерухому фазу застосовують Sephadex G10, а як елюент – 67 мМ фосфатний буфер з pH 7.4. Цільовий кон'югат має найменший час утримування на колонці та забарвлений у блакитно-зелений колір.

16 Розробка методів гібридизаційних аналізів на основі FLT-чутливих зондів та мітчиків

Гібридизаційні аналізи засновані, як правило, на застосуванні двох барвників, один з яких ковалентно зв'язаний із олігонуклеоттидною послідовністю **Оліго-1**, а інший – з **Оліго-2**. Факт комплементарної взаємодії реєструють як результат безвипромінювального перенесення енергії (FRET) від донора, ковалентно зв'язаного з **Оліго-1**, до акцептора, зв'язаного з комплементарним **Оліго-2**, або навпаки (Рис. 16.1).

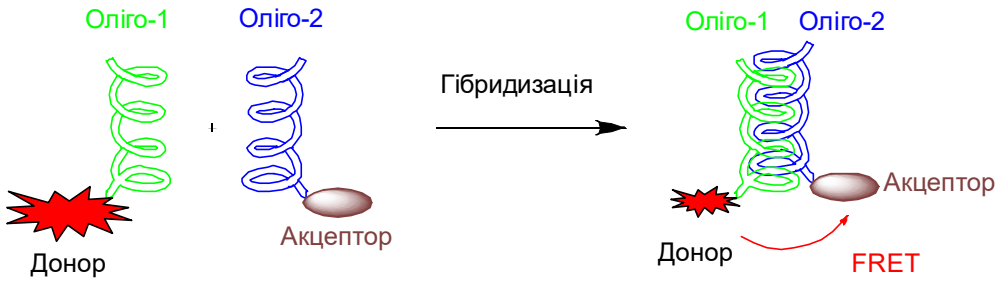


Рисунок 16.1 – Схема гібридизаційного аналізу, заснованого на переносі енергії між двома барвниками.

Гібридизаційні аналізи із застосуванням двох барвників використовуються в основному для якісного та кількісного визначення олігонуклеотидів та при визначенні внутрішніх та міжмолекулярних відстаней з високою роздільною здатністю (1–10 нм) [77]. Особливе місце займають гібридизаційні аналізи, що ґрунтуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [78], в яких застосовуються олігонуклеотиди, один з яких пов'язаний з флуоресцентним барвником, а інший – з гасником [79].

Існують також гібридизаційні аналізи, засновані на застосуванні олігонуклеотидів, мічених лише одним барвником. Ці методи використовуються для визначення локалізації специфічних послідовностей ДНК в хромосомах [80], для детекції поліморфізму одиничного нуклеотиду [81] і при вирішенні багатьох інших біоаналітичних завдань. Зазвичай як аналітичний сигнал у цих методах використовують інтенсивність або

поляризацію флуоресценції, але не час життя флуоресценції, що пов'язано з відсутністю довгохвильових біоаналітичних реагентів з чутливими до мікрооточення часом життя.

У рамках даного проєкту ми розробили підхід до проведення гібридизаційного аналізу, заснований на реєстрації змін часів життя флуоресценції з використанням лише одного барвника, що суттєво спрощує та пришвидшує аналіз (Рис. 16.2).

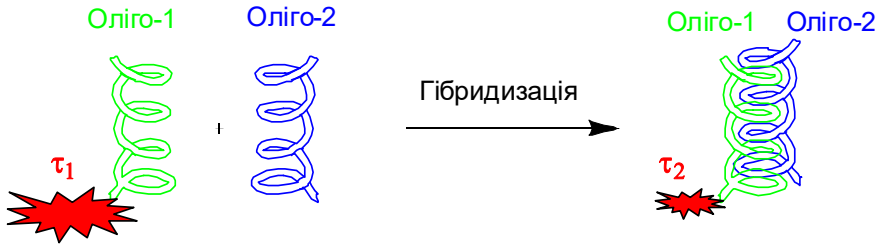


Рисунок 16.2 – Схема гібридизаційного аналізу, заснованого на використанні одного барвника.

Даний метод передбачає використання кон'югату барвника **Sq27** з **Оліго-1**, який при зв'язуванні з комплементарним **Оліго-2** змінюватиме час життя флуоресценції в аналітично значущих межах. Синтез кон'югату барвника **Sq27** з **Оліго-1** наведено у *Розділі 15*.

Встановлено, що після ковалентного приєднання до **Оліго-1** час життя флуоресценції **Sq27** зростає майже у 6 разів (від 0.42 нс до 2.2 нс) у порівнянні з FLT вільного барвника. При цьому спостерігається також довгохвильовий зсув смуг поглинання та флуоресценції відповідно на 7 нм та 4 нм. Однак, після додавання до кон'югату комплементарного **Оліго-2** суттєвих змін FLT не спостерігалось (Рис. 16.3, крива 1). Тому ми вирішили змінити мікрооточення міченого **Оліго-1** додаванням БСА (бичачий сироватковий альбумін). Для міченого **Оліго-1**, у присутності БСА, додавання комплементарного **Оліго-2** спричинило зменшення FLT (Рис. 16.3, крива 2) до 2.51 нс. Це відбувається завдяки тому, що при додаванні **Оліго-2**

кон’югат, що спочатку був локалізований всередині гідрофобних порожнин, переміщується до більш полярного водного середовища.

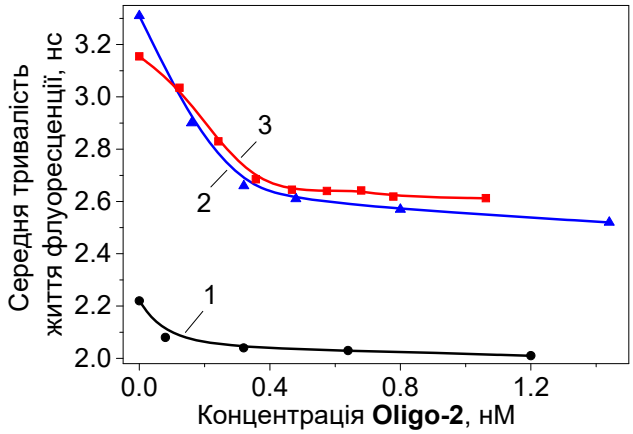


Рисунок 16.3 – Зміни середнього часу життя флуоресценції при додаванні комплементарного **Оліго-2** до міченого **Оліго-1**, де криві ***1*** – у фосфатному буфері pH 7.4, ***2*** – у присутності 15 μM БСА, ***3*** – у присутності Triton X-100. Концентрація міченого **Оліго-1** була 0.40 μM для всіх експериментів.

Аналогічний підхід було апробовано із застосуванням замість БСА міцелярного середовища, утвореного Тритоном X-100, в якому час життя флуоресценції кон'югату барвника **Sq27** з **Оліго-1** зростає до 3.15 нс (Рис. 16.3, крива 3), а спектри поглинання та флуоресценції зсуваються у довгохвильову область відповідно на 9 нм та 11 нм. При додаванні комплементарного **Оліго-2** мічений **Оліго-1** переходить з міцели у водне середовище, що супроводжується зменшенням часу життя до 2.61 нс і зсувом смуг поглинання та флуоресценції до значень, близьких до таких як для міченого **Оліго-1** у фосфатному буфері (Рис. 16.4).

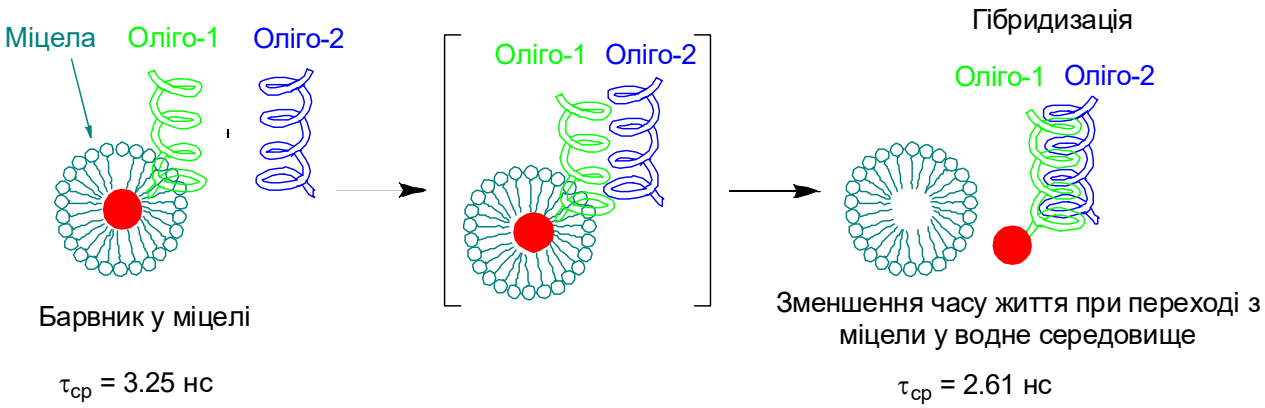


Рисунок 16.4 – Загальна схема запропонованого гібридизаційного аналізу.

Отримані результати були використані для розробки модельного гібридизаційного аналізу, заснованого на застосуванні міцелярного середовища. Щоб встановити оптимальну концентрацію Тритону X-100, за якої час життя флуоресценції кон'югату **Оліго-1** з **Sq27** досягає максимальної величини, ми провели титрування цього кон'югату при постійній концентрації розчином тритону X-100 (Рис. 16.5). Згідно отриманих даних оптимальна концентрація Triton X-100, яку ми і використали для наступних експериментів, становить 1 %.

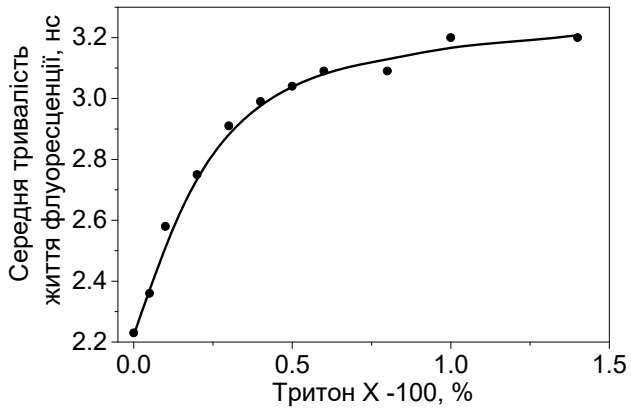


Рисунок 16.5 – Титрування міченого **Оліго-1** розчином Тритону X-100. Концентрація міченого **Оліго-1** становить 0.40 μM.

Використовуючи FLT як аналітичний сигнал, ми дослідили гібридизаційну реакцію між **Sq27**-міченим **Оліго-1** та комплементарним

йому олігонуклеотидом **Оліго-2**. Реакцію проводили у фосфатному буфері pH 7.4 у присутності 1% Тритон X-100. На основі проведених експериментів ми отримали градуювальні криві, за допомогою яких можна визначити вміст **Оліго-2** при двох різних концентраціях міченого **Оліго-1** (Рис. 16.6).

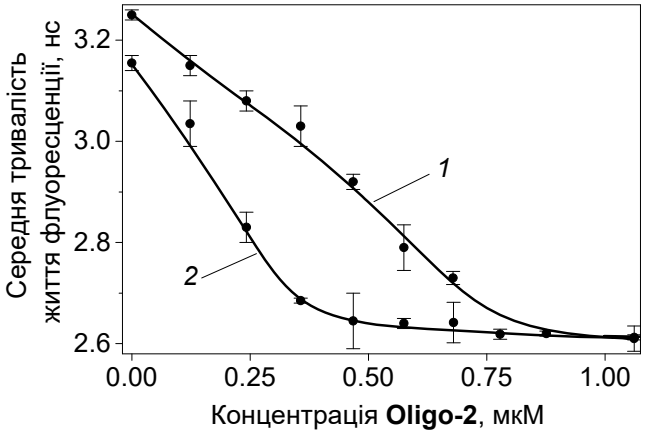


Рисунок 16.6 – Криві залежності середнього значення часів життя флуоресценції **Sq27**-міченого **Оліго-1** від концентрації комплементарного йому **Оліго-2** при проведенні гібридизаційного аналізу. Концентрація міченого **Оліго-1** становить 0.96 μM (*1*) та 0.40 μM (*2*).

При титруванні міченого **Оліго-1** комплементарним йому **Оліго-2** початкове значення FLT зменшується з 3.25 нс до 2.61 нс (Рис. 16.6, крива 1). Це дає змогу надійно виявляти **Оліго-2** в області концентрацій до 0.8 μM. Зменшення концентрації міченого **Оліго-1** до 0.40 μM покращує чутливість детектування **Оліго-2** при низьких концентраціях, але обмежує область детектування до 0.3 μM (Рис. 16.6, крива 2).

Даний модельний аналіз демонструє можливість моніторингу гібридизації використовуючи час життя флуоресценції мітчика **Sq27** як аналітичний сигнал.

Висновки

У ході виконання проєкту було синтезовано та досліджено низку флуоресцентних сполук, зокрема похідних нафталевої кислоти, бензантрону, пірену, оксазину, антрацену, антрахінону, акридину, а також ксантенових, ціанінових та скваріїнових барвників. Серед досліджених барвників було обрано прототипи флуоресцентних барвників-інтеркаляторів, чутливих до присутності длДНК, а також барвники, придатні для розробки медико-біологічних мітчиків з довгими та/або чутливими до навколишнього середовища часами життя флуоресценції. Крім того, було досліджено синтез, спектрально-люмінесцентні властивості та перспективність проведення досліджень методом ПЛР у присутності димерних барвників-інтеркаляторів на основі акридинового оранжевого.

– Більшість досліджених барвників, окрім похідних акридину та монометинціанів, не проявили суттєвого підвищення інтенсивності флуоресценції при зв'язуванні з длДНК. Крім того, похідні нафталевої кислоти, антрацену, бензантрону та антрахінону мали дуже низьку розчинність у водному середовищі, що лімітує їх використання у ПЛР.

– Одержано низку мономерних реакційноздатних барвників-інтеркаляторів, придатних для подальшого створення димерних барвників, та досліджено їх спектральні властивості у етанолі, Tris-буфері та при утворенні комплексів з длДНК.

– Показано, що квантові виходи похідних акридинового оранжевого при зв'язуванні з длДНК збільшуються у два рази та більше, порівняно з квантовими виходами барвників у вільному стані. У випадку монометинціаніну, який взагалі не флуоресціює у водному буферному розчині та етанолі, при зв'язуванні з длДНК спостерігається збільшення квантового виходу до 32%.

– Об’єднання мономерних барвників у димерну структуру покращує чутливість барвників до присутності длДНК завдяки утворенню

нефлуоресціюючих або малофлуоресціюючих асоціатів у незв’язаному з длДНК стані, які при інтеркаляції у длДНК руйнуються з утворенням яскраво флуоресціюючих комплексів.

– Одержані димерні барвники-інтеркалятори при дослідженні їх спектральних властивостей у Tris-буфері у вільному, незв’язаному з длДНК, стані та при зв’язуванні з длДНК поглинають та випромінюють світло в областях, що добре співпадають з оптичними каналами ПЛР-ампліфікаторів для збудження при 470 нм та детектування при 520 нм.

– Квантові виходи димерних барвників-інтеркаляторів на основі акридинового оранжевого при зв'язуванні з длДНК збільшуються у 18–27 разів, порівняно з квантовими виходами цих барвників у вільному стані.

– Синтезовані гомодимерні барвники на основі акридинового оранжевого, порівняно з ціаніновими барвниками, є термічно, гідролітично та фотолітично більш стійкими в умовах, максимально наближених до тих, в яких проводять ПЛР.

– Ступінь інгібування кількісної ПЛР (кПЛР) у присутності нових димерних барвників ***bis*-AO5** та ***bis*-AO6** у 2 та 4 рази, відповідно, нижчий у порівнянні зі ступенем інгібування кПЛР за участю відомого барвника **SYBR Green I**. До того ж, значення відносної інтенсивності флуоресценції у кінцевій точці ПЛР для вказаних барвників зростають пропорційно збільшенню концентрації, що, порівняно з **SYBR Green I**, забезпечує кращу чутливість аналізу та вищу достовірність результатів.

– Досліджено вплив лінкеру, за допомогою якого об’єднуються два фрагменти акридинового оранжевого (АО) в одну молекулу, на здатність інгібувати кПЛР. Так, димерні барвники-інтеркалятори, що містять нейтральні напівжорсткі лінкери з 2,5 або 2,6-дизаміщеними п’яти- або шестичленними гетероциклічними фрагментами, інгібують реакцію ПЛР значно менше, ніж барвник ***bis*-AO4**, молекула якого складається з двох фрагментів АО, об’єднаних між собою лінкером із піперазиновим гетероциклом.

– Можливість використання порівняно високої концентрації одержаних димерних барвників-інтеркаляторів у кПЛР усуває проблему перерозподілу барвника в ході аналізу кривих температури плавлення з високою роздільною здатністю.

– Серед досліджених класів флуоресцентних сполук найбільш придатними як FLT-мітчики виявились похідні сквараїну, які не тільки мають довгі часи життя флуоресценції, але й поглинають у довгохвильовій спектральній області, що дозволяє проводити дослідження *in vivo*.

– На прикладі водорозчинного сквараїнового барвника **Sq27** розроблено модельний гібридизаційний аналіз, заснований на зміні часу життя флуоресценції при взаємодії флуоресцентно-міченого олігонуклеотиду з комплементарною олігонуклеотидною послідовністю.

Отже, у ході виконання проєкту створено потужне підґрунтя для розробки вітчизняних ПЛР тест-систем з використанням флуоресцентних матеріалів власного виробництва. Завдяки покращеним експлуатаційним характеристикам нових димерних барвників-інтеркаляторів, зокрема стабільності до дії світла, окиснювальних реагентів та високих температур, а також завдяки вдосконаленим спектрально-люмінесцентним властивостям, у рамках проєкту підвищено якість, чутливість та достовірність методів досліджень на основі ПЛР.

Крім того, продемонстровано доцільність створення гібридизаційних методів аналізу на основі нових FLT-чутливих барвників, час життя флуоресценції яких залежить від мікрооточення. Розроблений у рамках проєкту модельний гібридизаційний аналіз демонструє можливість моніторингу процесу гібридизації флуоресцентно-міченого олігонуклеотиду з комплементарною олігонуклеотидною послідовністю з використанням часу життя флуоресценції мітчика як аналітичного сигналу.

Рекомендації

Завдяки суттєвому зростанню інтенсивності флуоресценції при зв’язуванні з длДНК, сумісності з сучасним обладнанням для медико-біологічних досліджень, а також високій стабільності та низькому ступеню інгібування ПЛР нові димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого можуть бути використані для вирішення проблеми ефективного виявлення длДНК у досліджуваній біологічній пробі, зокрема для детекції продуктів ампліфікації у ході аналізу методом ПЛР у режимі реального часу, для проведення гель або капілярного електрофорезу нуклеїнових кислот, проточної цитометрії, візуалізації хромосом та ядер клітин у флуоресцентній мікроскопії, виявлення длДНК на твердих носіях, таких як ДНК-мікрочипи, тощо.

Розроблені у цьому проекті реакційноздатні FLT-чутливі мітчики, зокрема на основі похідних сквараїнових барвників, можуть бути використані як для ковалентного зв’язування з низькомолекулярними біологічними молекулами, такими як пептиди та олігонуклеотиди, так і для нековалентного мічення протеїнів. Так, розроблений гібридизаційний аналіз на прикладі олігонуклеотиду міченого водорозчинним флуоресцентним сквараїновим барвником **Sq27** придатний для виявлення олігонуклеотидів з комплементарною послідовністю з використанням часу життя флуоресценції як аналітичного сигналу.

Перелік використаних джерел

1. Afzal A. Molecular Diagnostic Technologies for COVID-19: Limitations and Challenges. *J. Adv. Res.* **2020**, Vol. 26, P. 149–159.
2. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M. Real-Time PCR in Food Science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2013**, Vol. 15, No 2, P. 25–38.
3. Cook N., D'Agostino M., Thompson K. C. *Molecular Microbial Diagnostic Methods*; Elsevier Inc, 2016.
4. Jalali M., Zaborowska J., Jalali M. The Polymerase Chain Reaction. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*; Elsevier, 2017; pp 1–18.
5. Mackay J., Landt O. Real-Time PCR Fluorescent Chemistries. In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*; Humana Press: New Jersey, 2007; Vol. 353, pp 237–262.
6. Biassoni R., Raso A. *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols*; Humana Press, 2020.
7. Mao F., Leung W.-Y., Xin X. Characterization of EvaGreen and the Implication of Its Physicochemical Properties for QPCR Applications. *BMC Biotechnol.* **2007**, Vol. 7, No 1, P. 76.
8. Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 2006.
9. Siminfar A. R., Shoaei O. Development of a Passive Quenching SiPM-Based Detection System for Quantification of Real Time PCR Products Based on Fluorescence Lifetime. *J. Instrument.* **2019**, Vol. 14, No 5, P05019–P05019.
10. He Y.-C., Yin B.-C., Jiang L., Ye B.-C. The Rapid Detection of MicroRNA Based on P19-Enhanced Fluorescence Polarization. *Chem. Commun.* **2014**, Vol. 50, No 47, P. 6236–6239.
11. Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H., Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science (80-.).* **1988**, Vol. 239, No 4839, P. 487–491.
12. King N. *RT-PCR Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and*

Protocols); Humana Press: Totowa, NJ, 2010.

13. Perchetti G. A., Nalla A. K., Huang M.-L., Jerome K. R., Greninger A. L. Multiplexing Primer/Probe Sets for Detection of SARS-CoV-2 by QRT-PCR. *J. Clin. Virol.* **2020**, Vol. 129, P. 104499.
14. John M., Walker R. R. *Molecular Biomethods Handbook*; Humana Press, 2008.
15. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M. J., Solera J. Real-Time PCR Detection Chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2015**, Vol. 439, P. 231–250.
16. Juskowiak B. Nucleic Acid-Based Fluorescent Probes and Their Analytical Potential. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, Vol. 399, No 9, P. 3157–3176.
17. Didenko V. V. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Designs and Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, 2006; Vol. 335.
18. Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S. Detection of PCR Products Using Self-Probing Amplicons and Fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **1999**, Vol. 17, No 8, P. 804–807.
19. Uehara H., Nardone G., Nazarenko I., Hohman R. J. Detection of Telomerase Activity Utilizing Energy Transfer Primers: Comparison with Gel- and ELISA-Based Detection. *Biotechniques* **1999**, Vol. 26, No 3, P. 552–558.
20. Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of Thermus Aquaticus DNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, Vol. 88, No 16, P. 7276–7280.
21. Tyagi S., Kramer F. R. Molecular Beacons: Probes That Fluoresce upon Hybridization. *Nat. Biotechnol.* **1996**, Vol. 14, No 3, P. 303–308.
22. Blackburn G. M., Gait M. J., Loakes D. M. W. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology Temperature*; 2006.
23. Strekowski L., Wilson B. Noncovalent Interactions with DNA: An Overview. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, Vol. 623, No 1–2, P. 3–13.
24. Kovalska V. B., Valyukh I. V., Lukashov S. S., Slominskii Y. L., Yarmoluk

S. M. An Investigation of Tricarbocyanines “Stains-All” and “Iso-Stains-All” as Fluorescent Nucleic Acids Probes. *J. Fluoresc.* **2002**, Vol. 12, No 2, P. 209–212.

25. Bucevičius J., Lukinavičius G., Gerasimaitė R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* **2018**, Vol. 6, No 2, P. 18.
26. Armitage B. A. Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation. In *Top. Curr. Chem.*; 2005; Vol. 253, P. 55–76.
27. Bengtsson M. A New Minor Groove Binding Asymmetric Cyanine Reporter Dye for Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2003**, Vol. 31, No 8, P. 45e – 45.
28. Karlsson H. J., Eriksson M., Perzon E., Åkerman B., Lincoln P., Westman G. Groove-Binding Unsymmetrical Cyanine Dyes for Staining of DNA: Syntheses and Characterization of the DNA-Binding. *Nucleic Acids Res.* **2003**, Vol. 31, No 21, P. 6227–6234.
29. Li Z., Liu C., Ma S., Zhang D., Yamaguchi Y. Analysis of the Inhibition of Nucleic Acid Dyes on Polymerase Chain Reaction by Capillary Electrophoresis. *Anal. Methods* **2016**, Vol. 8, No 11, P. 2330–2334.
30. Ihmels H., Otto D. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA - General Principles and Recent Developments. *Top. Curr. Chem.* **2005**, Vol. 258, P. 161–204.
31. Tibbs J., Tabei S. M. A., Kidd T. E., Peters J. P. Effects of Intercalating Molecules on the Polymer Properties of DNA. *J. Phys. Chem. B* **2020**, Vol. 124, No 39, P. 8572–8582.
32. Herzyk P., Neidle S., Goodfellow J. M. Conformation and Dynamics of Drug-DNA Intercalation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, Vol. 10, No 1, P. 97–139.
33. Friedman R. A. G., Manning G. S. Polyelectrolyte Effects on Site-Binding Equilibria with Application to the Intercalation of Drugs into DNA. *Biopolymers* **1984**, Vol. 23, No 12, P. 2671–2714.
34. Rao S. N., Kollman P. A. Molecular Mechanical Simulations on Double

Intercalation of 9-Amino Acridine into d(CGCGCGC) X d(GCGCGCG): Analysis of the Physical Basis for the Neighbor-Exclusion Principle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, Vol. 84, No 16, P. 5735–5739.

35. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat. Biotechnol.* **1992**, Vol. 10, No 4, P. 413–417.
36. Tuma R. S., Beaudet M. P., Jin X., Jones L. J., Cheung C.-Y., Yue S., Singer V. L. Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized for Use with 300-Nm Ultraviolet Transilluminators. *Anal. Biochem.* **1999**, Vol. 268, No 2, P. 278–288.
37. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques* **1997**, Vol. 22, No 1, P. 130–138.
38. Monis P. T., Giglio S., Saint C. P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for Real-Time Polymerase Chain Reaction and Investigation of the Effect of Dye Concentration on Amplification and DNA Melting Curve Analysis. *Anal. Biochem.* **2005**, Vol. 340, No 1, P. 24–34.
39. Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Yamagishi H., Iwasaki S., Mitoma Y. Homogeneous Quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater. *Anal. Biochem.* **1995**, Vol. 229, No 2, P. 207–213.
40. Ahn S., Costa J. R. E. PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre- or Post-PCR. *Nucleic Acids Res.* **1996**, Vol. 24, No 13, P. 2623–2625.
41. Yue S., Singer V., Roth B., Mozer T., Millard P., Jones L., Jin X. H. R. US Patent 5658751, 1997.
42. Nath K., Sarosy J. W., Hahn J., Di Como C. J. Effects of Ethidium Bromide and SYBR® Green I on Different Polymerase Chain Reaction Systems. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2000**, Vol. 42, No 1–2, P. 15–29.
43. Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. Product Differentiation by

Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* **1997**, Vol. 245, No 2, P. 154–160.

44. Eischeid A. C. SYTO Dyes and EvaGreen Outperform SYBR Green in Real-Time PCR. *BMC Res. Notes* **2011**, Vol. 4, No 1, P. 263.
45. Gudnason H., Dufva M., Bang D. D., Wolff A. Comparison of Multiple DNA Dyes for Real-Time PCR: Effects of Dye Concentration and Sequence Composition on DNA Amplification and Melting Temperature. *Nucleic Acids Res.* **2007**, Vol. 35, No 19, P. e127.
46. Mao F., Leung W.-Y. Methods of Using Dyes in Association with NA Staining or Detection and Associated Technology. US7803943B2, 2010.
47. Shoute L. C. T., Loppnow G. R. Characterization of the Binding Interactions between EvaGreen Dye and DsDNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, Vol. 20, No 7, P. 4772–4780.
48. Yamamoto N., Okamoto T. A Rapid Detection of PCR Amplification Product Using a New Fluorescent Intercalator; the Pyrylium Dye, P2. *Nucleic Acids Res.* **1995**, Vol. 23, No 8, P. 1445–1446.
49. Sprenger H.-E., Ziegenbein W. Das Cyclobuten-Diylium-Kation, Ein Neuartiger Chromophor Aus Quadratsäure. *Angew. Chemie* **1967**, Vol. 79, No 12, P. 581–582.
50. Kim S. H., Hwang S. H. Synthesis and Photostability of Functional Squarylium Dyes. *Dye. Pigment.* **1997**, Vol. 35, No 2, P. 111–121.
51. Oswald B., Patsenker L., Duschl J., Szmacinski H., Wolfbeis O. S., Terpetschnig E. Synthesis, Spectral Properties, and Detection Limits of Reactive Squaraine Dyes, a New Class of Diode Laser Compatible Fluorescent Protein Labels. *Bioconjugate Chem.* **1999**, Vol. 10, No 6, P. 925–931.
52. Hammer F. *The Cyanine Dyes and Related Compounds.*; Interscience Publishers: New York, 1964.
53. Deligeorgiev T. G., Gadjev N. I. Preparation of Intercalating Dye Thiazole Orange and Derivatives. *Dye. Pigm.* **1995**, Vol. 29, No 4, P. 315–322.

54. Deligeorgiev T. G., Zaneva D. A., Katerinopoulos H. E., Kolev V. N. A Novel Method for the Preparation of Monomethine Cyanine Dyes. *Dye. Pigm.* **1999**, Vol. 41, No 1–2, P. 49–54.

55. Deligeorgiev T. G., Gadjev N. I., Timtcheva I. I., Maximova V. A., Katerinopoulos H. E., Foukaraki E. Synthesis of Homodimeric Monomethine Cyanine Dyes as Noncovalent Nucleic Acid Labels and Their Absorption and Spectral Characteristics. *Dye. Pigm.* **2000**, Vol. 44, No 2, P. 131–136.

56. Wawzonek S., Van Truong T. Preparation and Proton Spectra of 1-Aryl-1,2-Dihydro-2-Quinolones. *J. Het. Chem.* **1988**, Vol. 25, No 2, P. 381–382.

57. Marson C. M. Reactions of Carbonyl Compounds with (Monohalo) Methyleniminium Salts (Vilsmeier Reagents). *Tetrahedron* **1992**, Vol. 48, No 18, P. 3659–3726.

58. Uno K., Sasaki T., Sugimoto N., Ito H., Nishihara T., Hagihara S., Higashiyama T., Sasaki N., Sato Y., Itami K. Key Structural Elements of Unsymmetrical Cyanine Dyes for Highly Sensitive Fluorescence Turn-On DNA Probes. *Chem. - An Asian J.* **2017**, Vol. 12, No 2, P. 233–238.

59. Brooker L. G. S., Keyes G. H., Williams W. W. Color and Constitution. V. 1 The Absorption of Unsymmetrical Cyanines. Resonance as a Basis for a Classification of Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, Vol. 64, No 2, P. 199–210.

60. Dimitrijevs P., Domracheva I., Arsenyan P. Improved Method for the Preparation of Nonyl Acridine Orange Analogues and Utilization in Detection of Cardiolipin. *New J. Chem.* **2020**, Vol. 44, No 23, P. 9626–9633.

61. Saarnio V. K., Salorinne K., Ruokolainen V. P., Nilsson J. R., Tero T.-R., Oikarinen S., Wilhelmsson L. M., Lahtinen T. M., Marjomäki V. S. Development of Functionalized SYBR Green II Related Cyanine Dyes for Viral RNA Detection. *Dye. Pigm.* **2020**, Vol. 177, P. 108282.

62. Паркер С. Фотолюминесценция растворов / Паркер С. ; [пер. с . англ. Н. Л. Комиссаровой, Б. М. Ужинова]. — М. : Мир, 1972. — 510 с. *Фотолюминесценция Растворов*.

63. Черкасов С. А. Исследование Абсорбции и Люминесценции Некоторых

Мезоалкил- и Мезоарилпроизводных Антрацена. *Журн. физич. химии* **1955**, Vol. 24, No 12, P. 2209–2217.

64. http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/FL_QuantumYieldStandards.html.
65. Kubota Y., Steiner R. F. Fluorescence Decay and Quantum Yield Characteristics of Acridine Orange and Proflavine Bound to DNA. *Biophys.Chem.* **1977**, Vol. 6, No 3, P. 279–289.
66. Denny W. A., Atwell G. J., Baguley B. C., Wakelin L. P. G. Potential Antitumor Agents. 44. Synthesis and Antitumor Activity of New Classes of Diacridines: Importance of Linker Chain Rigidity for DNA Binding Kinetics and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1985**, Vol. 28, No 11, P. 1568–1574.
67. F. Mao, C. Cheung, W.-Y. Leung, S. L. Windler, L. M. R. Fluorescent Nucleic Acid-Binding Dyes and Their Analytical Uses. International patent application WO No. 2014/005125, 2014.
68. Abass M. Substituted Quinolinones, Part 10: Synthesis of Angular Tetracyclic Thieno and Thiopyrano[3,2- c]Benzo[h]Quinolinones Under PTC Conditions as Novel Enzymatic Enhancers. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* **2007**, Vol. 182, No 4, P. 735–748.
69. Ismail M. Synthesis and Cyclization Reactions of 2-(6-Methylquinolin-4-Yl)Malononitriles and Ethyl 2-Cyano-2-(6-Methylquinolin-4-Yl)Acetates. *J. Serb. Chem.* **2006**, Vol. 71, No 7, P. 721–732.
70. Yue S., Haugland R. Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes Containing Pyridinium Moieties. US patent 5410030A, 1995.
71. Yue S. T., Johnson I. D. Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes. US patent 5582977, 1996.
72. Rye H. S., Yue S., Wemmer D. E., Quesada M. A, Haugland R. P., Mathies R., Glazer A. N. Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes: Properties and Applications. *Nucleic Acids Res.* **1992**, Vol. 20, No 11, P. 2803–2812.
73. Patsenker L. D., Yermolenko I. G., Artyukhova Y. Y., Baumer V. N.,

Krasovitskii B. M. Formation and Destruction of Diazine Ring under Conditions of the Vilsmeier–Haack Formylation of 4-Dialkyl-aminonaphthalic Acid Derivatives. *Tetrahedron* **2000**, Vol. 56, No 37, P. 7319–7323.

74. Keil D., Hartmann H. Synthesis and Characterization of a New Class of Squaraine Dyes. *Dye. Pigm.* **2001**, Vol. 49, No 3, P. 161–179.
75. Terpetsching E., Szmacinski H., Lakowicz J. R. Synthesis, Spectral Properties and Photostabilities of Symmetrical and Unsymmetrical Squarines; a New Class of Flourophores with Long-Wavelength Exiciation and Emmision. *Anal. Chim. Acta* **1993**, Vol. 282, No 3, P. 633–641.
76. Dragan A. I., Pavlovic R., McGivney J. B., Casas-Finet J. R., Bishop E. S., Strouse R. J., Schenerman M. A., Geddes C. D. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *J. Fluoresc.* **2012**, Vol. 22, No 4, P. 1189–1199.
77. Didenko V. V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques* **2001**, Vol. 31, No 5, P. 1106–1121.
78. Böhm-Hofstätter H., Tschernutter M., Kunert R. Comparison of Hybridization Methods and Real-Time PCR: Their Value in Animal Cell Line Characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, Vol. 87, No 2, P. 419–425.
79. Laitala V., Ylikoski A., Raussi H.-M., Ollikka P., Hemmilä I. Time-Resolved Detection Probe for Homogeneous Nucleic Acid Analyses in One-Step Format. *Anal. Biochem.* **2007**, Vol. 361, No 1, P. 126–131.
80. Maierhofer C. Multicolor FISH in Two and Three Dimensions for Clastogenic Analyses. *Mutagenesis* **2002**, Vol. 17, No 6, P. 523–527.
81. Fan J. B., Chen X., Halushka M. K., Berno A., Huang X., Ryder T., Lipshutz R. J., Lockhart D. J., Chakravarti A. Parallel Genotyping of Human SNPs Using Generic High-Density Oligonucleotide Tag Arrays. *Genome Res.* **2000**, Vol. 10, No 6, P. 853–860.

Перелік наукових праць, виданих за темою дослідження

Статті у профільних наукових журналах

1. Kulyk O.G., Kolosova O.S., Svoiakov R.P., Kobzev D.V., Hovor I.V., Kraievska I.M., Sanin E.V., Krivoshey A.I., Tkachuk Z.Yu., Tatarets A.L. Novel Dimeric Dyes Based on the Acridine Orange Chromophore: Synthesis, Characterization and Application in Real-time PCR / Dyes Pigm. (відноситься до першого (Q1) квартилю за класифікацією JCR, IF 4.889). Стаття на даний момент знаходиться на рецензуванні.
2. Tatarets A.L., Kolosova O.S., Svoiakov R.P., Povrozin Y.A., Sidorov V.I., Patsenker L.D. Long-wavelength Fluorescent Label Seta-670 as the New Material for FLT Based Hybridization Analysis / Funct. Mater. (IF 0.41). Стаття на даний момент знаходиться на рецензуванні.

Патенти

- *Опубліковані патенти*

1. О. Г. Кулик, О. С. Колосова, Р. П. Свояков, І. В. Говор, Д. В. Кобзев, О. І. Кривошей, А. Л. Татарець. Спосіб детекції длДНК з використанням димерних барвників-інтеркаляторів: пат. 148984 Україна: МПК C09B 15/00. № u202102739; заявл. 25.05.21; опубл. 05.10.2021, Бюл. № 40, 10 с.
2. О. І. Кривошей, Г. С. Власенко, О. С. Колосова, А. Л. Татарець. Спосіб одержання барвника-інтеркалятора SYBR Green I: пат. 149489 Україна: МПК C09B 23/00. № u202102740; заявл. 25.05.21; опубл. 24.11.2021, Бюл. № 47.

- *Зареєстровані заявки*

1. Заявка України № a202103235 від 10.06.2021 на винахід «Похідні кватернізованої солі *біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридин-10-ію та спосіб їх одержання» авторів: Кулик О. Г., Єрмоленко І. Г., Кривошей О. І., Михайленко В. В., Степаненко О. Ю., Колосова О. С., Татарець А. Л.
2. Заявка України № a202103234 від 10.06.2021 на винахід «Спосіб детекції дволанцюгової ДНК з використанням димерних барвників-

інтеркаляторів» авторів: Кулик О. Г., Колосова О. С., Говор І. В., Кобзев Д. В., Санін Е. В., Кривошей О. І., Татарець А. Л.

3. Заявка України на корисну модель «Спосіб кількісного визначення дволанцюгової ДНК (длДНК) під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)» авторів: Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова О. С., Говор І. В., Тукало М. А., Краєвська Е. В., Ткачук З. Ю.
4. Заявка України на корисну модель «Кватернізовані солі *біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридин-10-ію» авторів: Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова О. С., Кривошей О. І, Тукало М. А., Краєвська Е. В., Ткачук З. Ю.
5. Заявка України на корисну модель «Похідні кватернізованої солі *біс*(3,6-*біс*(диметиламіно)акридин-10-ію та спосіб їх одержання» авторів: Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова О. С., Кривошей О. І, Тукало М. А., Краєвська Е. В., Ткачук З. Ю.

Тези доповідей

1. Кобзев Д. В., Кулик О. Г., Говор І. В., Колосова О. С., Татарець А. Л. Спектрально-люмінесцентні властивості барвників-інтеркаляторів на основі акридинового оранжевого // XVIII Наукова конференція “Львівські хімічні читання – 2021”, 31 травня–2 червня 2021 р., Львів, Україна – Ф3.
2. Кривошей О. І., Шишкіна С. В., Татарець А. Л. Рециклізація тіазоло-4'-хіномонометинціаніну в присутності сильної основи // Всеукраїнська конференція наукових дослідників (Секція «Всеукраїнський симпозіум з органічної та медичної хімії, присвячений 80-річчю проф. В.Д. Орлова»), 19–25 вересня 2021 р., Львів, Україна. – С. 86.
3. Кулик О. Г., Кривошей О. І., Говор І. В., Краєвська І. М., Татарець А. Л. Нові димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого для використання у дослідженнях методом ПЛР // Всеукраїнська конференція наукових дослідників, 19–25 вересня 2021 р., Львів, Україна. – С. 87.

4. Кривошей О. І., Колосова О. С., Власенко Г. С., Татарець А. Л. Оптимізація синтезу несиметричних ціанінових барвників-інтеркаляторів типу SYBR Green I // Всеукраїнська конференція наукових дослідників, 19–25 вересня 2021 р., Львів, Україна. – С. 115.
5. Kulyk O. G., Kolosova O. S., Hovor I. V., Kraievska I. M., Krivoshey A. I., Tatarets A. L. Characterization of new dimeric intercalating dye and its application for DNA detection // 7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects» (NBP-2021). 4–8 October 2021, Kharkiv, Ukraine. – P. 117.
6. Кулик О. Г., Колосова О. С., Краєвська І. М., Татарець А. Л. Нові похідні акридинового оранжевого для виявлення ГМО методом ПЛР // IX Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, Біо- і Нанотехнології, Екологія та Економіка в Харчовій та Косметичній Промисловості», 18–19 листопада 2021 р., Харків, Україна. – С. 47-48.
7. Кривошей А. И., Колосова О. С., Власенко А. С., Татарец А. Л. Оптимизация технологии получения красителя-интеркалятора SYBR Green I // IX Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, Біо- і Нанотехнології, Екологія та Економіка в Харчовій та Косметичній Промисловості», 18–19 листопада 2021 р., Харків, Україна. – С. 43-46.