

## Фотолабільні захисні групи

О.Д. Федоряк

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
вул. Мурманська, 1, Київ, 02660, Україна

**Резюме.** В огляді узагальнено та систематизовано відомості про фотолабільні захисні групи, що широко використовуються в хімії та біології.

**Ключові слова:** фотолабільні захисні групи, фотоліз, блоковані сполуки.

Фотолабільні захисні групи відомі хімікам досить давно. Вони концептуально відрізняються від класичних захисних груп, що використовуються в органічному синтезі, зокрема тим, що не потребують хімічного реагенту для їх зняття. Це основна перевага, яка дає змогу здійснювати реакції з високою селективністю за дуже м'яких умов. Можливість руйнування зв'язків світлом без використання будь-якого реагенту має важливе значення не тільки в класичному, а й у твердофазному органічному синтезі.

Фотолабільні захисні групи знайшли широке використання в біологічних дослідженнях, зокрема у вивченні фізіології клітин, завдяки їхній властивості дезактивувати («cage») фізіологічно активний месенджер (рис. 1). Відновлення (або «uncaging») біологічної активності може бути досягнуто за допомогою опромінення світлом протягом мілі- чи мікросекунд, що знімає захисну групу і таким чином швидко збільшує концентрацію месенджера в розчині.

Більшість біологічно активних молекул (АТФ, нейротрансмітери, нуклеотиди та ін.) можуть бути поєднані з фотолабільними захисними групами. Такі сполуки широко застосовують для моніторингу відповіді клітин на різноманітні стимуляції завдяки можливості

вивчати швидкі клітинні процеси без втручання дифузійного фактора. Це дуже зручний метод для досягнення контролю в часі за вивільненням біологічно активної сполуки, для вивчення кінетики швидких процесів або просторової гетерогенності біохімічних відповідей у клітині чи культурі тканин (рис. 2).

У міжнародній літературі опубліковано декілька загальних оглядів [1-6] і велику кількість статей, що стосуються синтезу фотолабільних захисних груп, їх використання, механізму дії тощо. Твердження про важливість цих груп в органічному синтезі та біології базуються на тисячі прикладів їхнього використання. У нашому огляді ми сфокусуємось лише на найбільш поширених фотолабільних групах, що відомі своїм широким використанням, особливо в біології для вивчення різноманітних процесів, які відбуваються в клітинах.

**Вимоги до фотолабільних захисних груп.** Для того, щоб фотолабільна група була ефективною, необхідне дотримання багатьох вимог. Насамперед фотохімічні, фізико-хімічні та фармакологічні властивості блокованої сполуки мають відповідати її призначенню.

Фотохімічні властивості загалом залежать

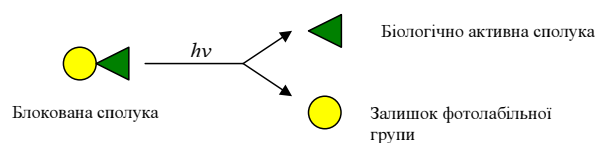


Рис. 1. Фотоліз блокованої біологічно активної сполуки.

\* Corresponding author.

Tel.: +38044-5732557

E-mail address: fedoryak\_l@bpci.kiev.ua

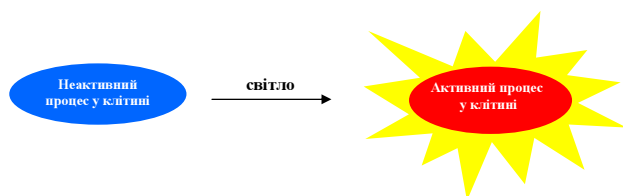


Рис. 2. Використання блокованих сполук у живій клітині.

від ефективності та швидкості фотолізу після опромінення світлом відповідної довжини хвилі (бажано  $>300$  нм) для запобігання руйнуванню біологічних систем. *Швидкість фотолізу* визначається як швидкість вивільнення активної молекули після опромінення та вимірюється періодом часу, що потрібен для початку біопроецесу. *Ефективність фотолізу* визначається як кількість блокованої сполуки, що вивільняє активну молекулу після опромінення, та залежить від коефіцієнта екстинкції при довжині хвилі опромінення (кількість абсорбованого молекулою світла) і квантового виходу (кількість молекул, що після поглинання фотона утворюють новий продукт). Зрозуміло, що чим більша ефективність фотолізу, тим менше необхідно світла для вивільнення активної молекули.

Важливі фізико-хімічні властивості сполуки включають у себе розчинність у воді та гідролітичну стабільність, яка необхідна для запобігання вивільненню активної молекули до опромінення світлом.

Також мають бути враховані і фармакологічні властивості блокованої сполуки. По-перше, остання повинна мати мінімальну взаємодію з біологічною системою, що вивчається. По-друге, продукти фотолітичної реакції, тобто постфотолітичні залишки фотолабільної групи, мають бути інертними в клітинному оточенні.

Більшість фотолабільних захисних груп потребують УФ-світла, яке шкідливе для клітин. Окрім цього в ході використання блокованих сполук у живих клітинах з'ясувалося, що дуже важко досягнути дійсно просторового контролю за вивільненням біологічно активної сполуки, оскільки кожна молекула блокованої сполуки, що потрапляє в промінь світла, деблокується. Отже, лише сфокусувавши опромінення, можна було б впливати на біохімію клітини локально. Цього можна досяг-

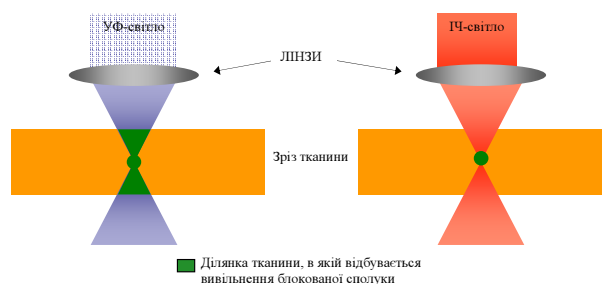


Рис. 3. Порівняння одно- і двофотонних процесів.

ти, якщо фотохімія буде ініціюватись не звичайним поглинанням одного УФ-фотона, а синхронною абсорбцією двох (або більше) ІЧ-фотонів еквівалентної сумарної енергії, що набагато безпечніше для клітин [7]. Вірогідність багатофотонного процесу нелінійно залежить від інтенсивності опромінення. Отже, тільки за дуже високої інтенсивності світла два ІЧ-фотони об'єднують свої енергії та мають той же ефект, що й один фотон удвічі нижчої довжини хвилі. Таку високу інтенсивність світла можна отримати лише при фокусуванні фемтосекундного імпульсного ІЧ-лазера (наприклад, титан-сапфірового). Завдяки такому методу активація біомолекули здійснюється лише у фокусі лазерного променя (об'єм опромінення  $1 \mu\text{м}^3$ ) та за дуже короткий період часу ( $\sim$  за 1 фемтосек) (рис. 3). При цьому зменшується кількість світла, що поглинається, а також його розсіюваність, відбувається більш глибоке і цільове проникнення променя в складну клітинну структуру, що покращує просторовий контроль за вивільненням біоефектора [8].

При двофотонному фотолізі підвищуються вимоги до властивостей фотолабільних груп. Хромофорів, що можуть діяти як фотолабільні захисні групи з достатньою чутливістю до двофотонного збудження, усе ще дуже мало. Параметром кількісної характеристики двофотонного поглинання (ДФП) світла речовиною є переріз двофотонного поглинання  $\delta_a$  (two-photon absorbance cross section), що вимірюється в ГМ (Гепперт-Майєр), де  $1 \text{ ГМ} = 10^{-50} \text{ см}^4\text{сек/фотон} \cdot \text{моль}$  (назва походить від імені дослідниці Марії Гепперт-Майєр (Maria Göppert-Mayer), яка ще в 1931 р. теоретично обґрунтувала засади багатофотонного збудження).

Чутливість блокованої сполуки до двофо-

тонного збудження визначається як переріз двофотонного вивільнення активної молекули  $\delta_u$  (uncaging action cross section), що є комбінацією перерізу двофотонного поглинання  $\delta_a$  та квантового виходу фотолітичної реакції [9]. В ідеалі для того, щоб блокована сполука могла бути використана в біологічних дослідженнях із використанням двофотонного опромінення, вона повинна мати  $\delta_u$ , що перевищує 0,1 ГМ. Зараз зусилля багатьох дослідників спрямовані на пошук молекул з високим значенням двофотонного перерізу.

**Нітробензильні похідні.** *o*-Нітробензильні похідні — найбільш поширені фотолабільні захисні групи, що використовуються в органічному синтезі, фотолітографії, синтезі біочипів і біофізичних дослідженнях. Їхні переваги: сумісність із багатьма функціональними групами (фосфати, тіофосфати, карбоксилати, аміни, амідни, феноли, спирти, тіоли, карбамати та ін.), легкість синтезу і достатня світлочутливість. У процесі фотолізу відбувається вивільнення блокованої сполуки та утворюється нітрозильний побічний продукт, зазвичай це альдегід або кетон (схема 1).

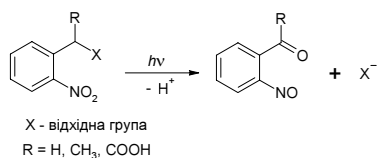


Схема 1

Серед найбільш відомих *o*-нітробензильних груп слід назвати *o*-нітробензильну, 1-(2-нітрофеніл)етильну, 4,5-диметокси-2-нітробензильну, 1-(4,5-диметокси-2-нітрофеніл)етильну та  $\alpha$ -карбоксі-2-нітробензильну (рис. 4).

Результати детального вивчення механізму фотолізу нітробензильних похідних [15, 16] засвідчили, що послідовність процесів, які відбуваються між поглинанням світла та вивільненням субстрату X (схема 2), досить складна і залежить від багатьох факторів: нуклеофільності відхідної групи X, природи замісника R та розчинника, рН розчину.

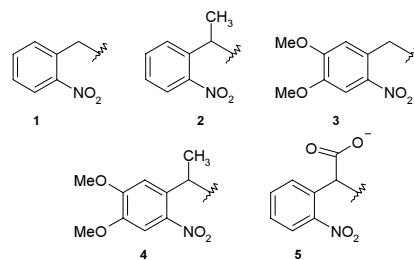
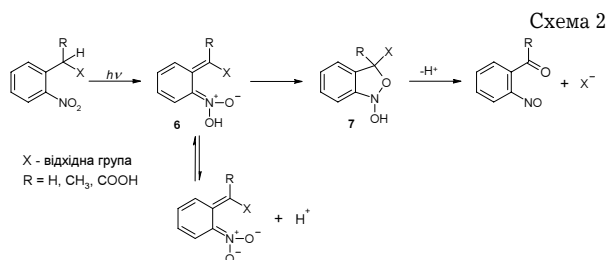


Рис. 4. Найбільш відомі *o*-нітробензильні фотолабільні захисні групи: **1** — *o*-нітробензильна, NB; **2** — 1-(2-нітрофеніл)етильна, NPE; **3** — 4,5-диметокси-2-нітробензильна, DMNB; **4** — 1-(4,5-диметокси-2-нітрофеніл)етильна, DMNPE; **5** —  $\alpha$ -карбоксі-2-нітробензильна,  $\alpha$ -CNB.

Поглинання фотона призводить до утворення таутомерної ациформи (**6**), яка має інтенсивне поглинання за довжини хвилі  $\lambda_{\max} \approx 400$  нм. На наступній стадії ацинітро ізомер циклізується в N-гідроксибензізоксазолін (**7**), який миттєво розкладається на кінцеві продукти реакції.

Після публікації Каплана та ін. у 1978 р. [17], в якій уперше повідомлялося про синтез «блокованої» АТФ, *o*-нітробензильні похідні почали вивчати з метою застосування їх у біології для блокування біологічно активних сполук. Широке використання вони знайшли при блокуванні нейротрансмітерів (рис. 5, **8**) [4, с. 30-50; 18-20], нуклеотидів і природних фосфатів (АТФ та ін.) (рис. 5, **9**) [17, 21-24], пептидів і протеїнів [4, с. 95-116; 25, 26], флуоресцентних проб (рис. 5, **12**) [4, с. 63-78], а також важливого вторинного месенджера — іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 5, сполуки **10**, **11**) [27, 28] і протонів [29].

На сьогодні більше сорока біохімічних реагентів (карбамати, карбонати та ефіри), блокованих нітробензильними залишками, є комерційно доступними.

Незважаючи на широке використання нітробензильних похідних як фотолабільних сполук, слід вказати і їхні суттєві недоліки. По-перше, побічні продукти фотолізу токсичні та сильно абсорбують, по-друге, швидкість вивільнення активної сполуки після фотозбудження не завжди задовільна, особливо при фізіологічних значеннях рН. До того ж фотоліз загалом здійснюється при 265-300 нм, що шкідливо для живих клітин. Нітробензильні захисні групи майже не мають чутливості до

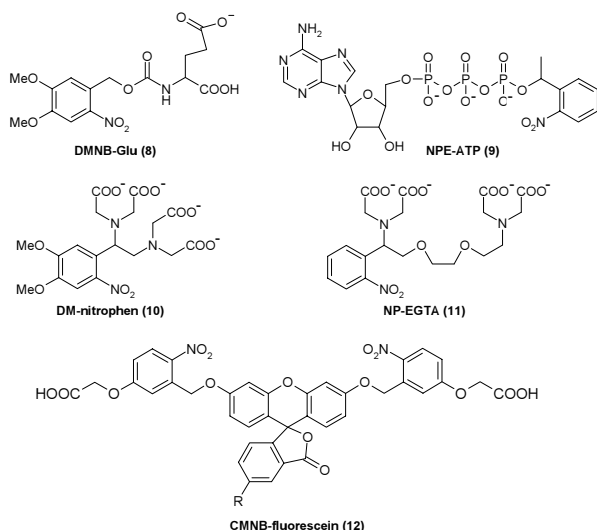


Рис. 5. Приклади комерційно доступних блокованих біологічно активних сполук (8, 9, 12) і сполук, що використовуються для блокування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (10 і 11).

двофотонного збудження при довжинах хвиль, які використовуються у двофотонній мікроскопії, — 730-980 нм.

**Бензоїнова група.** У 90-х рр. ХХ ст. починається інтенсивне вивчення бензоїнових похідних з метою пошуку можливостей їхнього використання у біологічних дослідженнях. Дослідниками встановлено, що вивільнення субстрату з бензоїнового ефіру під дією світла відбувається з високою ефективністю, при цьому утворюється побічний фотопродукт реакції — інертний бензофуран (схема 3). Його максимум поглинання знаходиться в межах 300 нм, що дає змогу контролювати процес реакції фотолізу за допомогою УФ-спектроскопії.

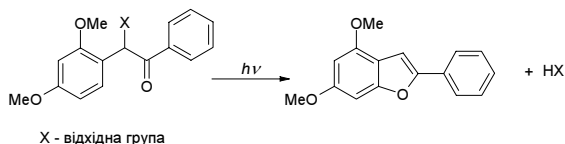


Схема 3

Найбільш глибоко вивчено використання бензоїнової групи для синтезу блокованих фосфатів [30, 31]. 3',5'-Диметоксибензоїнофосфат має чудові фотохімічні властивості: високий квантовий вихід (0,78) і високу швидкість вивільнення блокованої сполуки ( $>105 \text{ сек}^{-1}$ ). Однак низьке поглинання при опроміненні світлом довжиною хвилі більше 340 нм ( $\epsilon_{347} = 170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) та наявність хірального центру, що призводить до утворення суміші діастереоізо-

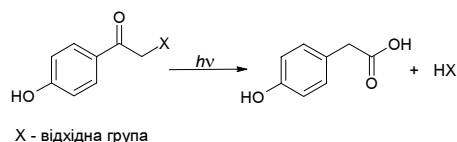
мерів, значно обмежує застосування цієї групи.

При спробі використання бензоїнових груп для захисту амінокислот-нейротрансмітерів виявилось, що декарбоксілювання карбамінових кислот відбувається дуже повільно. У випадку, коли біологічний процес потребує швидкого вивільнення амінокислоти, ці сполуки, на жаль, не можуть бути застосовані [32].

Слід зазначити, що фотолабільні групи на основі бензоїну ще перебувають на стадії вивчення, тому в літературі зустрічаємо лише декілька прикладів їх практичного використання. Зокрема, ми знаходимо приклади застосування 3',5'-диметоксибензоїнової групи для блокування карбонових кислот, деяких олігопептидів [33], а також у синтезі блокованих спиртів і нуклеотидів [34].

**n-Гідроксифенацильна група.** n-Гідроксифенацильна група (pHP) — одна з нових і перспективних фотолабільних захисних груп, яку запропонував і дослідив Р. Гівенс (схема 4) [35]. Вона відповідає багатьом вимогам, що висуваються для фотолабільних захисних груп: проста схема синтезу блокованих сполук, отримані похідні розчинні у воді та стабільні в біологічних буферах протягом 24 годин. У результаті фотолізу утворюється розчинна у воді та нетоксична n-гідроксифенілоцтова кислота.

Схема 4



Фотодеградація відбувається достатньо швидко після поглинання фотона (у наносекундному інтервалі) ( $k \approx 10^7 - 10^8 \text{ сек}^{-1}$ ) з високим квантовим виходом. Однак слід підкреслити, що блоковані гідроксифенацильною групою похідні мають максимум абсорбції при 282 нм. Детальний механізм вивільнення біологічно активної сполуки при опроміненні світлом поки не з'ясований, тому зараз обговорюється декілька робочих гіпотез.

n-Гідроксифенацильна група може бути приєднана до карбонових кислот, фосфатів і тиолів. Використання цієї групи в органічному синтезі досить обмежене, проте вона широко застосовується при блокуванні біологічних сполук. Низку публікацій присвячено викори-

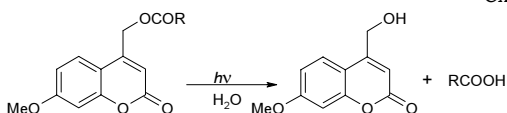
станню *n*-гідроксифенацильної групи для блокування різних біомолекул, наприклад, АТФ [35], деяких амінокислот, пептидів [36, 37] і навіть протеїнів [38]. Квантові виходи знаходяться в проміжку 0,1-0,4, що є дуже привабливим.

На жаль, *n*-гідроксифенацильні ефіри  $\alpha$ -амінокислот виявились не дуже стабільними у водному розчині. Проте завдяки швидкому вивільненню субстрату з заблокованої сполуки *n*-гідроксифенацильна група застосовується для вивчення процесів нейропередачі та трансдукції сигналів у клітині. Так, заблокована глутамінова кислота (*p*HP-L-Glu) була успішно використана для дослідження різноманітних аспектів синаптичної трансмісії в ізольованих клітинах мозку [39]. Блокований брадикінін знайшов застосування у дослідженнях можливих взаємодій між астроцитами [40]. На сьогодні відомі також два випадки блокування *n*-гідроксифенацильною групою ензимів (тирозинфосфатаза і протеїнкіназа А) [38].

Отже, основним недоліком *n*-гідроксифенацильної групи є її низький коефіцієнт поглинання при довжині хвилі вище 320 нм.

**Кумаринові похідні.** Фотолітична активність 7-метоксикумарин-4-ілметилових ефірів (МСМ) відома ще з 1984 р. [41]. Однак вивчення похідних кумаринів як потенційних фотолабільних захисних груп розпочалося набагато пізніше, коли група японських учених (Т. Фурута та ін.) використала МСМ для блокування цАМФ [42]. Дослідження показали, що опромінення кумаринових ефірів світлом довжиною хвилі 340 нм у водному середовищі веде до вивільнення заблокованої сполуки з майже кількісним виходом і формування відповідного 7-метоксикумарин-4-ілметанолу (схема 5).

Схема 5



Кумарин-4-ілметилова група знайшла використання при блокуванні фосфатів, карбонових кислот, амінів, спиртів, фенолів і карбонільних сполук.

Перевага у застосуванні кумаринових похідних як фотолабільних захисних груп головним чином полягає в тому, що опромінення можна здійснювати майже у видимому спектрі

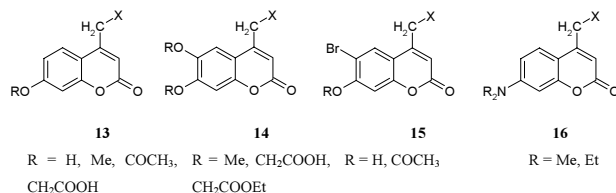
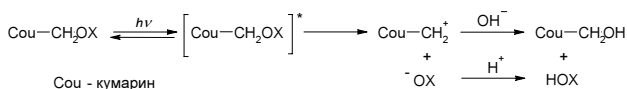


Рис. 6. Структури кумарин-4-ілметильних захисних груп.

(високий коефіцієнт екстинкції при довжинах хвилі більше 350 нм) із достатньо високою ефективністю фотолізу. Блоковані сполуки мають дуже слабку флуоресценцію, тоді як продукт фотолізу — кумаринілметанол — характеризується дуже сильною флуоресценцією, яка може покращити моніторинг процесу вивільнення біологічної молекули.

У ході досліджень фотолізу багатьох кумарин-4-ілметилових ефірів було помічено, що квантовий вихід реакції підвищується при збільшенні концентрації полярного розчинника в суміші [43]. Такі дані дали змогу дослідникам запропонувати іонний механізм перебігу реакції (схема 6) [44].

Схема 6



Абсорбційні властивості, мембранна проникність і розчинність у воді заблокованих сполук можуть легко оптимізуватися в залежності від природи замісника в кумариновому кільці. Замісники також відіграють дуже важливу роль у покращенні квантового виходу реакції фотолізу.

На сьогодні відома серія кумаринових похідних, що використовуються для блокування різних типів сполук (рис. 6) [5]. Їх можна поділити на 4 групи: 7-алкоксильні (**13**), 6,7-діалкоксильні (**14**), 6-бром-7-алкоксильні (**15**) і 7-діалкіламінопохідні кумарину (**16**). Ці групи розроблені з метою полегшення методу введення заблокованої сполуки в біологічну систему, підвищення їх абсорбційних властивостей і розчинності у воді. Ефірні замісники застосовують з метою покращення мембранної проникності цільової сполуки. Після потрапляння в живу клітину методом простої дифузії ефірна група гідролізується внутрішніми естеразами з утворенням гідроксильного похідного, яке практично непроникне крізь мембрану, у результаті чого заблокована сполука пов-

ністю акумулюється в середині клітини [3, с. 50-63].

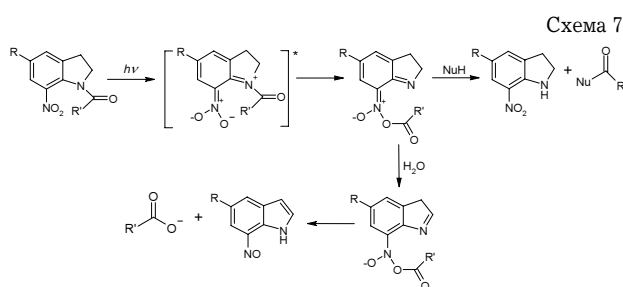
Із вищезазначених похідних кумарину найбільш цікавою і перспективною є (6-бром-7-гідроксикумарин-4-іл)метильна група (Bhc-група), що була синтезована і запропонована для використання лабораторією Роджера Тсієна (Roger Tsien) [45]. Bhc-група має єдиний максимум поглинання при фізіологічному значенні рН і високе значення молярного коефіцієнта поглинання ( $19\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ще одна дуже важлива перевага цієї групи над іншими кумариновими похідними — висока чутливість до двофотонного збудження (показник перерізу вивільнення активної молекули в районі 1,99 ГМ) [45]. Тобто 6-бром-7-гідроксикумарин-4-ілметилова група має найкращі двофотонні характеристики і може бути використана для блокування різноманітних біологічно активних сполук. Відомі приклади її застосування для блокування нейротрансмітерів [45], ДНК і РНК [46], діолів [47], спиртів [48], циклічних нуклеотидних монофосфатів [49], кетонів та альдегідів [50], а також інгібітора протеїнового синтезу — анізоміцину [51].

Слід також звернути увагу і на деякі недоліки кумаринових похідних, зокрема, на їх обмежену розчинність у воді та високий рівень флуоресценції продукту фотолізу, що звужує можливості їх використання з флуоресцентними індикаторами, які необхідні для спостереження за фізіологічним процесом.

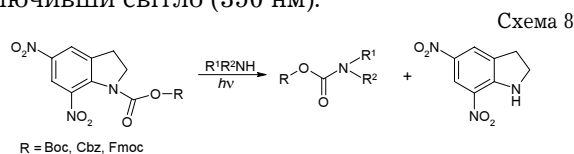
**Похідні нітроіндоліну — захисні групи для карбонових кислот.** Фотохімічні властивості 7-нітроіндолінів відомі ще з 1976 р. [52]. Однак широко вивчати індолінові похідні стали наприкінці 90-х — на початку 2000 рр. Дослідники (Корі та ін.) зацікавилися можливістю використання цих сполук для блокування амінокислот-нейротрансмітерів [53].

Згідно з механізмом фотолізу індолінових похідних (схема 7) після поглинання фотона відбувається перехід карбонілу до просторово сусідньої 7-нітрогрупи з утворенням проміжної сполуки, яка залежно від іонізуючої сили розчинника утворює 7-нітрозоіндол або 7-нітроіндолін як побічний продукт [5]. Отже, якщо фотоліз нітроіндолінових похідних карбонових кислот відбувається в присутності нуклеофільного реагенту, цю реакцію можна ви-

користувати як м'який метод одержання необхідних карбаматів та інших похідних [54].



Фотохімічне ацилювання амінів за допомогою 7-нітроіндолінових похідних більш детально вивчено в роботах [55-58]. Так, групою Боше [56, 58] запропоновано метод уведення відомих і загальноприйнятих захисних груп амінів Cbz, Fmoc і Boc за допомогою ацилюючих агентів на базі динітроіндоліну (схема 8). Одна з переваг цього методу полягає в тому, що реакція відбувається в нейтральних умовах. Це дає змогу спокійно змішувати реагенти і після цього запускати реакцію ацилювання, включивши світло (350 нм).



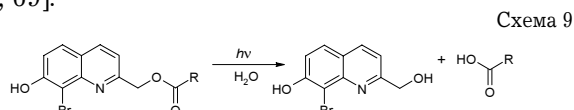
У ході вивчення дії замісників на фотолітичну активність індолінових похідних показано, що 4-метокси-7-нітроіндолінова група (MNI) є найбільш придатною для блокування карбонових кислот [59]. Цей хромофор був використаний для блокування глутамінової та D-аспарагінової кислот [59, 60]. Блокований аналог L-глутамінової кислоти використано в деяких фізіологічних дослідженнях [61-64] з урахуванням даних, де локалізоване вивільнення нейротрансмітера досягнуто за допомогою двофотонного фотолізу [61, 65, 66]. Однак слід зазначити, що блоковані гліцин та  $\gamma$ -аміномасляна кислота виявилися активними по відношенню до відповідних рецепторів, що зробило неможливим їх використання в біологічних дослідженнях.

У публікації [67] представлено синтез 4-метокси-5,7-динітроіндолінілглутамінової кислоти (MDNI) та висвітлено її фотохімічні властивості. Автором з'ясовано, що ця сполука має квантовий вихід у 5,5 раза вищий, ніж відомий MNI-Glu. У статті також наведено дані про швидке збільшення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в

астроцитах після введення досліджуваної сполуки до ізольованих тонких зрізів головного мозку мишей та застосування світла. Отже, можна стверджувати, що група MDNI є досить перспективною.

Слід зазначити, що зараз нітроіндолінові похідні використовуються лише для блокування карбонових кислот, проте вчені проводять дослідження з метою розширення спектра дії цих цікавих похідних.

**Хінолінові похідні та ін.** З нових, перспективних захисних груп для блокування карбонових кислот слід назвати 8-бром-7-гідроксихінолін. Його запропоновано зовсім недавно. Зараз його вивчають більш глибоко (схема 9) [68, 69].

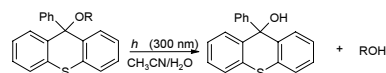


Фотохімічні властивості хіноліну та його похідних, особливо 7-гідроксихіноліну, відомі вже давно. Їх застосовували як флуоресцентні проби для різноманітних металів та іонів, а Т. Дором та ін. [68] вони вперше досліджені як захисні фотолабільні групи.

Показано, що 8-бром-7-гідроксихінолінова група (ВНQ) може бути використана для блокування карбонових кислот, фосфатів і діолів. До того ж фотоліз може бути здійснений за допомогою як одно-, так і двофотонних процесів з високою ефективністю.

Для захисту 5'-гідроксильного залишку дезоксирибонуклеозидів Колман і Бойд запропонували 9-фенілтіоксантильну або S-піксьильну

групу [69]. Опромінення блокованої сполуки у водному ацетонітрилі призводить до вивільнення нуклеозиду (схема 10). Але для цього необхідне світло з довжиною хвилі від 200 до 300 нм. У цій області поглинають багато функціональних груп, у зв'язку з чим час, необхідний для вивільнення блокованої сполуки, збільшується.



**Висновки.** На сьогодні існує велике різноманіття фотолабільних захисних груп. Фотохімічні властивості найбільш поширених з них наведено в таблиці 1.

Фотоліз блокованих сполук зараз є загальноприйнятою технікою для вивчення живих клітин. Фотолабільні захисні групи використовують для блокування нейротрансмітерів, іонів кальцію та інших вторинних месенджерів, а також біологічних макромолекул (ДНК, РНК і протеїнів). З їх допомогою можна здійснювати контроль за активацією дії ліків, модулювати експресію генів, фотоактивувати флуорофори. Більш докладно про роль фотолабільних захисних груп у ході вивчення біологічних процесів ітиметься в нашому наступному огляді.

На жаль, більшість із вищезазначених фотолабільних захисних груп не може бути використана для блокування сполук з різними функціональними групами. У цілому їх застосування обмежується кислотами (АТФ, глутамінова кислота, цАМФ та ін). Виняток ста-

Таблиця 1

Фотохімічні властивості фотолабільних захисних груп (двофотонне поглинання вимірювали за 720-740 нм)

Фотолабільна захисна група	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$Q_f$	$\delta_{\text{ш}}$ , ГМ	Швидкість, сек <sup>-1</sup>
DMNB	320	відсутня	0,01-0,23	0,01	140-80 000
pHP	282	не визн.	0,1-0,7	не визн.	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>
MCM	328	400	0,1	не визн.	10 <sup>8</sup>
DMCM	349	444	0,04	не визн.	10 <sup>8</sup>
Bhc	370	530	0,012-0,04	0,95	не визн.
BHQ	369	510	0,29	0,54	не визн.
MNI	335	відсутня	0,085	0,06	10 <sup>5</sup>

Примітки: DMNB — 4,5-диметокси-2-нітробензильна, pHP — *p*-гідроксифенацильна, MCM — 7-метоксикумаринілметильна, DMCM — 6,7-диметоксикумаринілметильна, Bhc — 6-бром-7-гідроксикумаринілметильна, BHQ — 8-бром-7-гідроксихінолінова, MNI — 4-метокси-7-нітроіндолінова.  $\lambda_{\text{max}}$  — довжина хвилі максимального поглинання,  $\lambda_{\text{fl}}$  — флуоресценція,  $Q_f$  — квантовий вихід фотолізу,  $\delta_{\text{ш}}$  — переріз двофотонного вивільнення активної молекули.

новлять лише нітробензильна і диметоксинітробензильна групи, що мають дуже широкий спектр сполук для блокування, але весь комплекс недоліків, пов'язаних з нітробензильними групами, не дає можливості їх широко використовувати. Отже, питання створення універсальної фотолабільної захисної групи залишається відкритим.

У більшості досліджень опромінення здійснюється звичайним УФ-світлом. Останнім часом двофотонне збудження блокованих сполук стало можливим за використання фемтосекундного імпульсного титан-сапфірового лазера. Однак у таких дослідженнях були застосовані лише глутамінова кислота [61, 66] і кальцій [71]. Розробка нових хромофорів, що мають високі показники двофотонного збудження, стає дуже важливою у наш час, оскільки в умовах технічного прогресу виникає можливість випробовування фотолізу блокованих сполук на тваринах.

Наступна проблема — розвиток зворотних фотолабільних захисних груп. Існуючі блоковані сполуки функціонують лише в одному напрямі, тобто вивільняють біомолекулу. Нині відома лише азобензольна сполука, яку використовують у дослідженнях як зворотну фотолабільну групу. Механізм її дії базується на

властивості азобензолу змінювати конфігурацію з *транс*- у *цис*- у процесі опромінення світлом з різними довжинами хвиль. При цьому молекула, до якої приєднаний азобензол (зокрема, пептид або протеїн), також змінює свою конфігурацію, що призводить до її активації або, навпаки, до блокування її дії. З огляду на це дослідники з допомогою світла можуть контролювати процес у живій клітині (наприклад, генерувати потенціал дії в нейронах, а через деякий час блокувати його генерацію) [72-74]. Такі дослідження започатковують новий напрям у галузі хімії фотолабільних захисних груп.

Ще одне цікаве питання — це можливість селективного зняття однієї захисної групи світлом визначеної довжини хвилі при збереженні іншої [75, 76]. Цей новий підхід нині перебуває на стадії розробки, але, поза сумнівом, він відкриває широкі можливості в хімії захисних груп, твердофазному синтезі та біології.

У цьому огляді ми хотіли звернути увагу на переваги використання фотолабільних захисних груп і проблеми, пов'язані з ними. Сподіваємося, що наш огляд стимулюватиме дослідження в цьому напрямі і в нашій країні.

Надійшла в редакцію 10.02.2009 р.

### Photolabile protecting groups

O.D. Fedoryak

Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry, NAS of Ukraine  
1 Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine

**Summary.** Photolabile protecting groups have been known to the chemical community for a long time. They differ conceptually from the classical protecting groups used in organic synthesis because they do not require addition of a cleaving reagent. This is a major advantage, allowing chemists to perform reactions with high selectivity at very mild reaction conditions. The possibility of breaking bonds only by illumination seems to be very appealing not only to classical organic synthesis but also to the solid-phase organic synthesis. Photolabile protecting groups have become important also in combinatorial chemistry and cell biology.

Photoremovable protecting groups for controlling and manipulating cell physiology are valuable because of their ability to inactivate or «cage» a physiologically active messenger and then release or «uncage» it with a flash of light. This is an excellent way to achieve temporal control over messenger release and examine the fast kinetics or spatial heterogeneity of biochemical responses in cell or tissue culture.

To be useful in biological experiments, a caging group must undergo photolysis rapidly, in high yield, and at wavelengths that are not detrimental to the biological system. It should not interfere with the methods used to measure the response of the system, and the postphotolysis remains of the caging group must not interact with the physiological processes under study. The caged compound should exhibit good water solubility and hydrolytic stability in the dark.

A summary of the major families of photolabile protecting groups with some of their advantages, drawbacks and applications is given in the review.

**Keywords:** photolabile protecting groups, photolysis, caged compounds.

## Перелік літератури

1. *Bochet C.* Photolabile protecting groups and linkers // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* — 2002. — 1. — P. 125-142.
2. *Pillai V.N.R.* Photolytic deprotection and activation of functional groups // *Org. Photochem.* — Padwa, Ed. Marcel Dekker, Inc. — New York, 1987. — 9. — P. 225-323.
3. *Caged Compounds* // *In Methods in Enzymology.* — Ed. G. Marriotti, Academic Press, San Diego, 1998. — 291. — 529 pp.
4. *Pelliccioli A.P.* Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications / A.P. Pelliccioli, J. Wirz // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2002. — 1. — P. 441-458.
5. *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* // Ed. M. Goeldner, R. Givens. — Wiley VCH, 2005. — 584 p.
6. *Givens R.S.* Photoremovable Protecting Groups / R.S. Givens, P.G. Conrad II, A.L. Yousef, J.-I. Lee // *In CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, 2<sup>nd</sup> Edition*, Ed. W. M. Horspool, CRC Press, Boca Raton. — 2003. — Ch. 69. — P. 1-46.
7. *Denk W.* Two-photon laser scanning fluorescence microscopy / W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb // *Science.* — 1990. — 248. — P.73-76.
8. *Xu C.* Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy / C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams, W.W. Webb // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — 93. — P. 10763-10768.
9. *Brown E.* Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation / E. Brown, J.B. Shear, S.R. Adams et al. // *Biophys. J.* — 1999. — 76. — P. 489-499.
10. *Rubinstein M.* The use of light-sensitive phosphate protecting group for some mononucleotide syntheses / M. Rubinstein, B. Amit, A. Patchornik // *Tetrahedron Lett.* — 1975. — 17. — P. 1445.
11. *Zehavi U.* Light-sensitive glycosides. I. 6-Nitroveratryl  $\beta$ -D-glucopyranoside and 2-nitrobenzyl  $\beta$ -D-glucopyranoside / U. Zehavi, B. Amit, A. Patchornik // *J. Org. Chem.* — 1972. — 37. — P. 2281.
12. *Sterson S.M.* An acid- and base-stable o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase organic synthesis / S.M. Sterson, S.L. Schreiber // *Tetrahedron Lett.* — 1998. — 39. — P. 7451-7454.
13. *Fodor S.P.A.* Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis / S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung et al. // *Science.* — 1991. — 251. — P. 767-773.
14. *Pirrung M.C.* Proofing of photolithographic DNA synthesis with 3',5'-dimethoxybenzoinyl-oxycarbonyl-protected deoxynucleoside phosphoramidites / M.C. Pirrung, L. Fallon, G. McGall // *J. Org. Chem.* — 1998. — 63. — P. 241-246.
15. *Schwörer M.* Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds in solution. I. 2-Nitrotoluene: thermodynamic and kinetic parameters of the *aci*-nitro tautomer / M. Schwörer, J. Wirz // *Helv. Chim. Acta.* — 2001. — 84. — P. 1441-1457.
16. *Il'ichev Y.V.* Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: methyl ethers and caged ATP / Y.V. Il'ichev, M.A. Schwörer, J. Wirz // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — 126. — P. 4581-4595.
17. *Kaplan J.H.* Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts / J.H. Kaplan, B. Forbush, J.F. Hoffman // *Biochemistry.* — 1978. — 17 (10). — P. 1929-1935.
18. *Gee K.R.* Synthesis and photochemistry of a photolabile precursor of N-methyl-D-aspartate (NMDA) that is photolyzed in the microsecond time region and is suitable for chemical kinetic investigations of the NMDA receptor / K.R. Gee, L. Niu, K. Schaper et al. // *Biochemistry.* — 1999. — 38. — P. 3140-3147.
19. *Corrie J.E.T.* Postsynaptic activation at the squid giant synapse by photolytic release of L-glutamate from a «caged» L-glutamate / J.E.T. Corrie, A. DeSantis, Y. Katayama et al. // *J. Physiol.* — 1993. — 465. — P. 1-8.
20. *Callaway E.M.* Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. / E.M. Callaway, L.C. Katz // *Proc. Natl. Sci. USA.* — 1993. — 90. — P. 7661-7665.
21. *Corrie J.E.T.* Caged nucleotides and neurotransmitters / J.E.T. Corrie, D.R. Trentham // *Biological Applications of Photochemical Switches, Bioorg. Photochem.* — V. 2, Ed. H. Morrison, 1993. — P. 243-305.
22. *Pollock J.* A comparison between the distinct inward currents activated in rat cultured dorsal root ganglion neurones by intracellular flash photolysis of two forms of caged cyclic guanosine monophosphate / J. Pollock, J.H. Crawford, J.F. Wootton et al. // *Neurosci. Lett.* — 2003. — 338. — P. 143-146.
23. *Абрамова Т.В.* Синтез и свойства блокированных фотоллабильными группами фосфотриэфирных производных динуклеозидфосфатов / Т.В. Абрамова, Ж.Л. Леонетти, В.В. Власов, Б. Лебле // *Биоорг. химия.* — 2000. — Т. 26, № 3. — С. 197-205.
24. *Nerbonne J.M.* Design and application of photolabile intracellular probes / J.M. Nerbonne // *Optical Methods in Cell Physiology.* — 1986. — 40. — P. 417-445.
25. *Okuno T.* Folding character of cytochrome c studied by o-nitrobenzyl modification of methionine 65 and subsequent ultraviolet light irradiation / T. Okuno, S. Hirota, O. Yamauchi // *Biochemistry.* — 2000. — 39. — P. 7538-7545.
26. *Ghosh M.* A new strategy for caging proteins regulated by kinases / M. Ghosh, Y. Ichetovkin, X. Song et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — 124, 11. — P. 2440-2441.
27. *Ellis-Davies G.C.R.* A New Class of Photolabile Chelators for the Rapid Release of Divalent Cations: Generation of Caged Ca and Caged Mg / G.C.R. Ellis-Davies, J.H. Kaplan // *J. Org. Chem.* — 1988. — 53. — P. 1966-1969.
28. *Ellis-Davies G.C.R.* Laser photolysis of caged calcium: Rates of calcium release by nitrophenyl-EGTA and DM-nitrophen / G.C.R. Ellis-Davies, J.H. Kaplan, R.J. Barsotti // *Biophys. J.* — 1996. — 66. — P. 1006-1016.
29. *Barth A.* Characterization of a new caged proton capable of inducing large pH jumps / A. Barth, J.E.T. Corrie // *Biophys. J.* — 2002. — 83, 5. — P. 2864-2871.
30. *Corrie J.E.T.* Synthetic, mechanistic and photochemical studies of phosphate esters / J.E.T. Corrie, D.R. Trentham // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* — 1992. — 1. — P. 2409-2417.
31. *Pirrung M.C.* Photoremovable protecting groups for phosphorylation of chiral alcohols. Asymmetric syn-

- thesis of phosphotriesters of (-)-3',5'-dimethoxybenzoic acid / M.C. Pirrung, S.W. Shuey // *J. Org. Chem.* — 1994. — 59. — P. 3890-3897.
32. *Papageorgiou G.* Synthesis and properties of carbamoyl derivatives of photolabile benzoins / G. Papageorgiou, J.E.T. Corrie // *Tetrahedron.* — 1997. — 53. — P. 3917-3932.
33. *Peach J.M.* Photolabile benzoic acid and furoin esters of a biologically-active peptide / J.M. Peach, A.J. Pratt, J.S. Snaith // *Tetrahedron.* — 1995. — 51. — P. 10013-10024.
34. *Pirrung M.C.* Dimethoxybenzoic acid carbonates: photochemically-removable alcohol protecting groups suitable for phosphoramidite-based DNA synthesis / M.C. Pirrung, J.-C. Bradley // *J. Org. Chem.* — 1995. — 60. — P. 1116-1117.
35. *Givens R.S.* *p*-Hydroxyphenacyl ATP — a new phototrigger / R.S. Givens, C.-H. Park // *Tetrahedron Lett.* — 1996. — 37. — P. 6259-6266.
36. *Givens R.S.* New photoactivated protecting groups. 7. *p*-Hydroxyphenacyl: a phototrigger for excitatory amino acids and peptides / R.S. Givens, A. Jung, C.-H. Park et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 1997. — 119. — P. 8369-8370.
37. *Givens R.S.* New phototriggers 9: *p*-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides / R.S. Givens, J.F.W. Weber, P.G. Conrad et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2000. — 122. — P. 2687-2697.
38. *Zou K.* Catalytic subunit of protein kinase A caged at the activating phosphothreonine / K. Zou, S. Cheley, R.S. Givens, H. Bayley // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — 124. — P. 8220-8229.
39. *Kandler K.* Focal photolysis of caged glutamate reveals an entirely postsynaptic form of hippocampal long-term depression / K. Kandler, L.C. Katz, J.A. Kauer // *Nat. Neurosci.* — 1998. — 1. — P. 119-123.
40. *Sul J.-Y.* Astrocytic Connectivity in the hippocampus / J.-Y. Sul, G. Orosz, R.S. Givens, P.G. Haydon // *Neuron Glia Biology.* — 2004. — 1. — P. 3-11.
41. *Givens R.S.* Photochemistry of phosphate esters: An efficient method for the generation of electrophiles / R.S. Givens, B. Matuszewski // *J. Am. Chem. Soc.* — 1984. — 106. — P. 6860-6861.
42. *Furuta T.* Photochemically labile protecting group for phosphates / T. Furuta, H. Torigai, T. Osawa, M. Iwamura // *Chem. Lett.* — 1993. — P. 1179-1182.
43. *Schade B.* Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives / B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt et al. // *J. Org. Chem.* — 1999. — 64. — P. 9109-9117.
44. *Eckardt T.* Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 2. Photocleavage of selected (coumarin-4-yl)methyl-caged adenosine cyclic 3',5'-monophosphates with fluorescence enhancement / T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade et al. // *J. Org. Chem.* — 2002. — 67. — P. 703-710.
45. *Furuta T.* Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: novel photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis / T. Furuta, S.S.-H. Wang, J.L. Dantzker et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1999. — 96. — P. 1193-2000.
46. *Ando H.* Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos / H. Ando, T. Furuta, R.Y. Tsien, H. Okamoto // *Nat. Genet.* — 2001. — 28. — P. 317-325.
47. *Lin W.A.* Strategy for the construction of caged diols using a photolabile protecting group / W. Lin, D.S. Lawrence // *J. Org. Chem.* — 2002. — 67. — P. 2723-2726.
48. *Suzuki A.Z.* Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as phototriggers for alcohols and phenols / A.Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto et al. // *Org. Lett.* — 2003. — 5. — P. 4867-4870.
49. *Furuta T.* Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one and two-photon excitation / T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki et al. // *ChemBioChem.* — 2004. — 5. — P. 1119-1128.
50. *Lu M.* Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones / M. Lu, O.D. Fedoryak, B.R. Moister, T.M. Dore // *Org. Lett.* — 2003. — 5. — P. 2119-2122.
51. *Goard M.* Light-mediated inhibition of protein synthesis / M. Goard, G. Aakalu, O.D. Fedoryak et al. // *Chem. Biol.* — 2005. — 12. — P. 685-693.
52. *Amit B.* Light-sensitive amides. The photosolvolysis of substituted 1-acyl-7-nitroindolines / B. Amit, D.A. Ben-Efraim, A. Patchornik // *J. Am. Chem. Soc.* — 1976. — 98. — P. 843-844.
53. *Papageorgiou G.* Photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in aqueous solution: rapid and efficient photorelease of L-glutamate / G. Papageorgiou, D.C. Ogden, A. Barth, J.E.T. Corrie // *J. Am. Chem. Soc.* — 1999. — 121. — P. 6503-6504.
54. *Pass S.* Racemization-free photochemical coupling of peptide segments / S. Pass, B. Amit, A. Patchornik // *J. Am. Chem. Soc.* — 1981. — 103. — P. 7674-7675.
55. *Nicolaou K.C.* A new photolabile linker for the photoactivation of carboxyl groups / K.C. Nicolaou, B.S. Safina, N. Winssinger // *Synlett.* — 2001. — SI. — P. 900-903.
56. *Helgen C.* Preparation of secondary and tertiary amides under neutral conditions by photochemical acylation of amines / C. Helgen, C.G. Bochet // *Synlett.* — 2001. — P. 1968-1970.
57. *Vizvardi K.* Phototransamidation as a method for the synthesis of N-glycosyl asparagines / K. Vizvardi, C. Kretz, A.S. Davis et al. // *Chem. Lett.* — 2003. — 32. — P. 348-349.
58. *Helgen C.* Photochemical protection of amines with Cbz and Fmoc groups / C. Helgen, C.G. Bochet // *J. Org. Chem.* — 2003. — 68. — P. 2483-2486.
59. *Papageorgiou G.* Regioselective nitration of 1-acyl-4-methoxyindolines leads to efficient synthesis of a photolabile l-glutamate precursor / G. Papageorgiou, J.E.T. Corrie // *Synth. Commun.* — 2002. — 32. — P. 1571-1577.
60. *Huang Y.H.* Synthesis and characterization of 4-methoxy-7-nitroindoliny-D-aspartate, a caged compound for selective activation of glutamate transporters and N-Methyl-D-aspartate receptors in brain tissue / Y.H. Huang, S.R. Sinha, O.D. Fedoryak et al. // *Biochemistry.* — 2005. — 44. — P. 3316-3326.
61. *Matsuzaki M.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptors expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons / M. Matsuzaki, G.C.R. Ellis-Davies, T. Nemoto et al. // *Nat. Neurosci.* — 2001. — 4. — P. 1086-1092.
62. *Canepari M.* Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindoliny- and 4-methoxy-7-nitroindonyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmit-

- ters / M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou et al // *J. Neurosci. Methods.* — 2001. — 112. — P. 29-42.
63. *Lowe G.* Flash photolysis reveals a diversity of ionotropic glutamate receptors on the mitral cell somatodendritic membrane // *J. Neurophysiol.* — 2003. — 90. — P. 1737-1746.
64. *Canepari M.* Ca<sup>2+</sup> ion permeability and single-channel properties of the metabotropic slow EPSC of rat Purkinje neurons / M. Canepari, C. Auger, D. Ogden // *J. Neurosci.* — 2004. — 24. — P. 3563-3573.
65. *Smith M.A.* Mechanism of the distance-dependent scaling of Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons / M.A. Smith, G.C.R. Ellis-Davies, J.C. Magee // *J. Physiol.* — 2003. — 548. — P. 245-258.
66. *Matsuzaki M.* Dendritic spine morphology is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons / M. Matsuzaki, N. Honkura, G.C.R. Ellis-Davies, H. Kasai // *Nature.* — 2004. — 429. — P. 761-766.
67. *Fedoryak O.D.* Synthesis of a caged glutamate for efficient one- and two-photon photorelease on living cells / O.D. Fedoryak, J.-Y. Sul, P.G. Haydon, G.C.R. Ellis-Davies // *Chem. Commun.* — 2005. — P. 3664-3666.
68. *Fedoryak O.D.* Brominated hydroxyquinoline as a photolabile protecting group with sensitivity to multiphoton excitation / O.D. Fedoryak, T.M. Dore // *Org. Letters.* — 2002. — 4. — P. 3419-3422.
69. *Zhu Y.* 8-Bromo-7-hydroxyquinoline as a photo-removable protecting group for physiological use: mechanism and scope / Y. Zhu, C.M. Pavlos, J.P. Toscano, T.M. Dore // *J. Am. Chem. Soc.* — 2006. — 128. — P. 4267-4276.
70. *Coleman M.P.* The S-pixyl group: an efficient photocleavable-protecting group for the 5' hydroxyl function of deoxyribonucleosides / M.P. Coleman, M.K. Boyd // *Tetrahedron Lett.* — 1999. — 40. — P. 7911-7915.
71. *Momotake A.* The benzofuran chromophore — a new caging group for ultra efficient photolysis in living cells / A. Momotake, N. Lidegger, N. Niggli // *Nature Methods.* — 2006. — 3. — P. 35-40.
72. *Bredenbeck J.*  $\alpha$ -Helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy / J. Bredenbeck, J. Helbing, J.R. Kumita et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — 102. — P. 2379-2384.
73. *Renner C.* Azobenzene as conformational switch in model peptides / C. Renner, L. Moroder // *Chembiochem.* — 2006. — 7. — P. 868-878.
74. *Banghart M.* Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing / M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff et al. // *Nat. Neurosci.* — 2004. — 7. — P. 1381-1386.
75. *Bochet C.G.* Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups // *Tetrahedron Lett.* — 2000. — 41. — P. 6341-6346.
76. *Bochet C.G.* Orthogonal photolysis of protecting groups // *Angew. Chem, Int. Ed.* — 2001. — 40. — P. 2071-2073.