



УДК 547.979.733:547.466

СИНТЕЗ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ С ИЗОТИОЦИАНАТНОЙ ГРУППОЙ

© 1995 г. О. Н. Понаморева, В. Д. Румянцева, А. Ф. Миронов[#], А. В. Чудинов*

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва;

* Государственный институт биологического приборостроения, Москва

Поступила в редакцию 20.06.94 г.

В качестве потенциальных фосфоресцентных меток для белков синтезированы палладиевые комплексы 6,7-бис(N^{α} -лизино)мезопорфирина IX и его изотиоцианатного производного.

Ключевые слова: порфирины, палладиевые комплексы; лизин, изотиоцианатные производные; иммуноанализ фосфоресцентный.

Как известно, комплексы порфиринов с металлами (Pd, Pt, Ru(II), Co(III)) обладают интенсивной фосфоресценцией при температурах около 300 К [1], что позволяет использовать такие соединения в аналитической биохимии для маркировки биологических объектов. Измерение фосфоресценции металлокомплексов порфиринов, связанных с биологическими образцами, при комнатной температуре в импульсном режиме с отсечением короткоживущей люминесценции фона (анализ с временным разрешением) позволяет регистрировать малые и сверхмалые концентрации исследуемых белков [2].

Описано применение в иммуноанализе палладиевого и платинового комплексов копропорфиринов, соединенных с белками карбодиимидным методом [3, 4].

В настоящей работе для связывания порфиринов с белками был предложен иной подход. Нами был синтезирован палладиевый комплекс мезопорфирина IX, содержащий изотиоцианатную группу, отделенную от порфиринового ядра остатком модифицированного лизина. Использование модифицированного лизина в качестве спейсера не увеличивает общей гидрофобности маркера и поэтому не должно приводить к увеличению его неспецифического связывания с белком.

Мезопорфирин IX и его палладиевый комплекс получали по методикам [5, 6], метиловый эфир N^{ϵ} -бензилоксикарбониллизина – так, как описано в работах [7, 8]. Для синтеза лизиновых производных Pd-мезопорфирина IX были использованы карбодиимидный и хлорангидридный методы. Модификация метода с водорастворимым карбодиимидом позволила легко удалять избы-

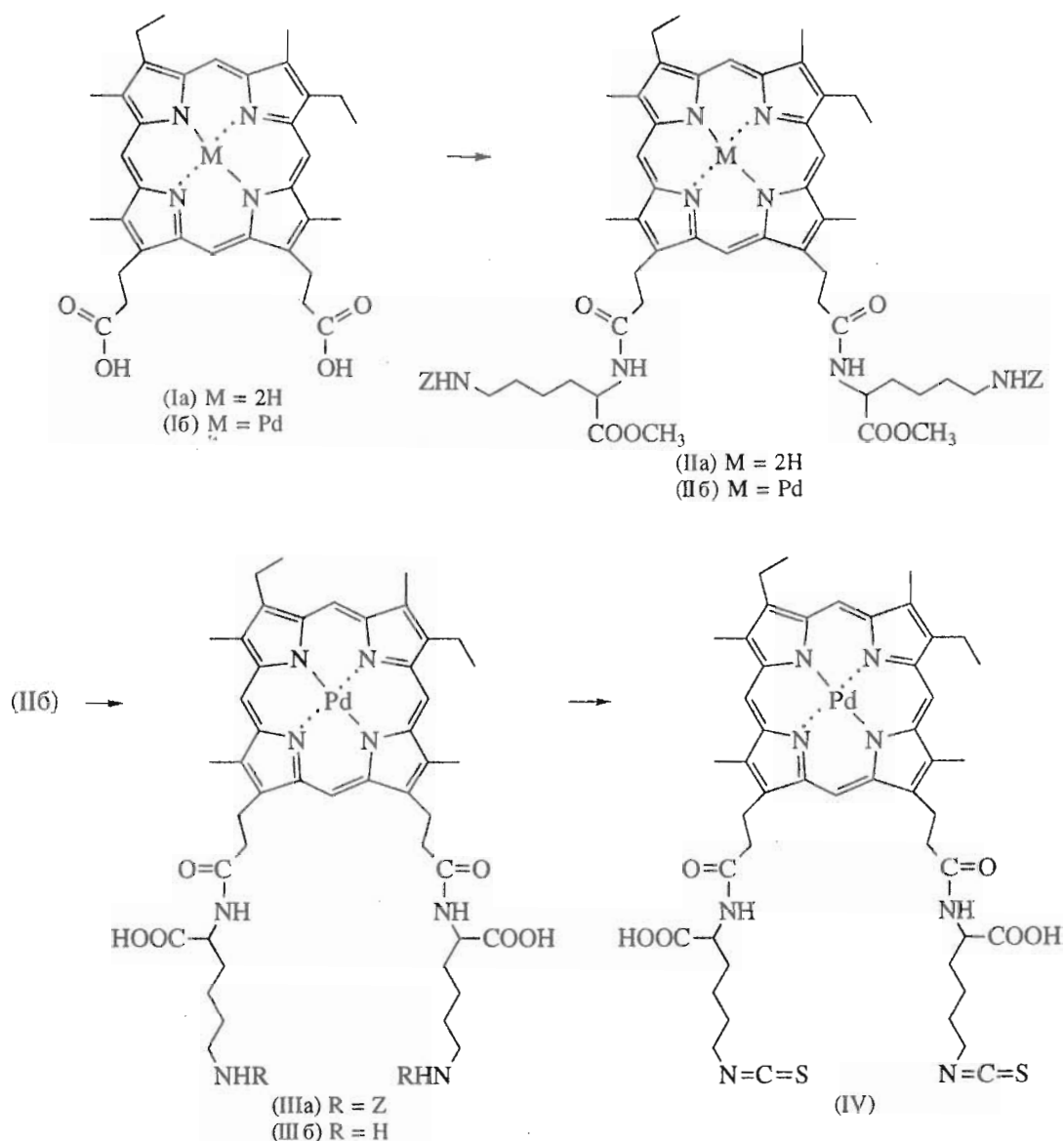
ток как самого карбодиимида, так и продуктов его распада. Реакцию Pd-мезопорфирина IX (Iб) с метиловым эфиром N^{ϵ} -бензилоксикарбониллизина проводили в безводном пиридине с двукратным избытком 1-циклогексил-3-[2-(1-метилморфолиний)этил]карбодиимида-*n*-толуолсульфоната.

В конденсацию хлорангидридным методом в качестве исходного вещества вводили мезопорфирин IX (Iа). Его обработка тионилхлоридом приводила к соответствующему бисхлорангидриду, при взаимодействии которого с метиловым эфиром N^{ϵ} -бензилоксикарбониллизина образовывался диметиловый эфир N^{ϵ} -бензилоксикарбонил- N^{α} -лизино-мезопорфирина (IIа). Палладиевый комплекс получали кипячением аминокислотного производного (IIа) в диметилформамиде с хлоридом палладия. После хроматографической очистки на силикагеле общий выход метилового эфира бис- N^{ϵ} -бензилоксикарбонил- N^{α} -лизино-Pd-мезопорфирина (IIб) составил 58%, что выше выхода по первому методу с использованием карбодиимида (45%). Структуры полученных соединений (IIа) и (IIб) были доказаны элементарным анализом, 1H -ЯМР-, ИК-, масс- и электронной спектроскопией. Электронный спектр полученного палладиевого производного идентичен спектру диметилового эфира Pd-мезопорфирина.

Омыление сложноэфирных групп в соединении (IIб) проводили действием щелочи в тетрагидрофуране, а N^{ϵ} -бензилоксикарбонильную группу отщепляли раствором бромистого водорода в уксусной кислоте. После упаривания получали красный осадок, хорошо растворимый в воде, представляющий собой бис- N^{ϵ} -гидробромид Pd-бислизино-мезопорфирина (IIIб).

Соединение (IIIб) показало хорошую фосфоресценцию в водных растворах при тщательном удалении кислорода. Оно хорошо растворимо

[#] Адрес для переписки: 117571, Москва, ул. 26 Бакинских комиссаров, д. 1, корп. 1, кв. 73, Миронову А.Ф.



при pH < 7, удобно для получения конъюгатов с белками. Кроме того, известно, что аминокислотные производные порфиринов могут избирательно накапливаться в злокачественных образованиях, а их токсичность по сравнению с самими порфиринами при этом значительно снижается [9]. Следовательно, люминесценцию палладиевого комплекса лизинового производного мезопорфирина (IIIб) удастся, по-видимому, использовать для диагностики раковых заболеваний.

Для достижения конечной цели – получения изотиоцианатного производного – водный раствор порфирина (IIIб) подщелачивали до pH 8 и обрабатывали при интенсивном перемешивании тиофосгеном в хлороформе. После подкисления продукты реакции экстрагировали хлороформом и хроматографировали на силикагеле. В результате был получен диизотиоцианат порфирина (IV)

с выходом 28%. ИК-спектр подтвердил наличие изотиоцианатной группы. Высокочастотная полоса поглощения валентных колебаний органических изотиоцианатов находится в области 2020 - 2100 см⁻¹ и обычно представляет собой дублет или имеет плечо [10]. Именно такую интенсивную полосу поглощения с плечом в области 2100 см⁻¹ мы обнаружили в ИК-спектре выделенного вещества (рис. 1), причем в спектре исходного вещества (IIIб) эта полоса отсутствовала (рис. 2). Структура конечного продукта (IV) была также подтверждена данными масс-спектрометрии. Известно, что одним из ограничений порфириновых меток, не имеющих специальных группировок для связывания с белком, является то, что большое количество антител теряет активность в результате взаимодействия с карбодиимидом. Синтезированное нами изотиоцианатное производное

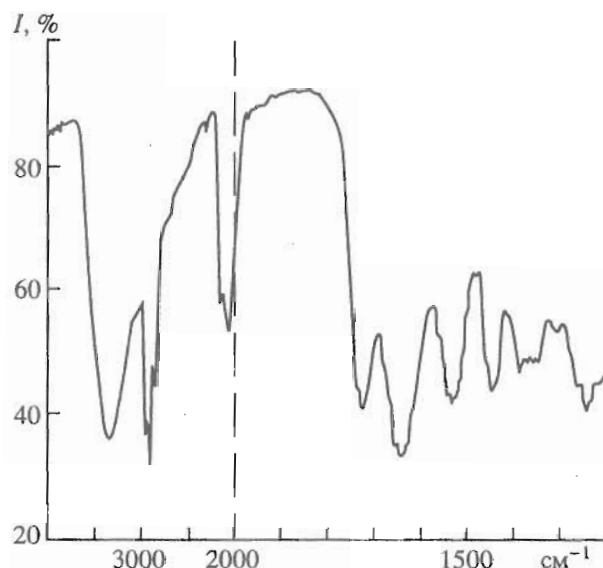


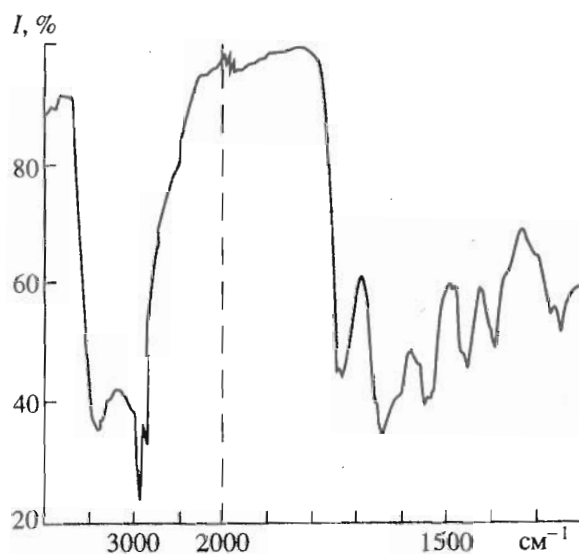
Рис. 1. ИК-спектр изотиоцианатного производного (IV).

палладиевого комплекса порфирина (IV), вероятно, позволит существенно снизить внутрибелковое ковалентное связывание и уменьшить дезактивацию антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Флуоресценцию измеряли в водном растворе с добавлением сульфата натрия (2 мг/мл) на спектрофотометре Perkin-Elmer. Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре Bruker MSL-200 (200 МГц) в дейтерохлороформе. Электронные спектры записаны на спектрометре Beckman DU-8B (США) и Shimadzu UV-240 (Япония). ИК-спектры снимали на спектрометре Shimadzu IR-435 (Япония) в таблетках с KBr. Масс-спектры измерены на приборе МСВХ (НПО "Электрон", Украина), используя метод плазменно-десорбционной масс-спектрометрии, основанной на бомбардировке образца осколками деления ^{252}Cf в сочетании с время-пролетным анализатором [11]. Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия). Для аналитической ТСХ применяли пластины Silufol UV-254. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 мкм (Chemapol, Чехия), а препаративную ТСХ – на силикагеле L 5/40 мкм (Chemapol, Чехия).

6,7-Бисдиметилловый эфир (N^ϵ -бензилоксикарбонил- N^α -лизино)мезопорфирин IX (IIa). К 80 мг (0.14 ммоль) мезопорфирина IX (Ia) прибавляли 4 мл тионилхлорида, смесь выдерживали 2 ч при 20°C до полного растворения осадка и упаривали досуха. Полученный хлорангидрид сушили 2 ч при 40°C и 1 мм рт. ст. и затем обрабатывали раствором 180 мг (0.56 ммоль) хлоргидрата метилового эфира N^ϵ -бензилоксикарбониллизина и

Рис. 2. ИК-спектр Pd-6,7-бис(N^α -лизино)мезопорфирина IX (IIIб).

0.2 мл (1.41 ммоль) триэтиламина в 4 мл хлороформа. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20°C, добавляли 30 мл хлороформа, промывали 30 мл 0.1 н. HCl, 50 мл воды, сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток очищали на колонке (100 × 35 мм) с силикагелем. Вещество (IIa) элюировали смесью хлороформа и метанола (60 : 1). Выход 103 мг (65%), R_f 0.36 (система хлороформ-метанол, 60 : 1). Электронный спектр (CHCl_3) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 400 (196.7), 497.5 (14.0), 534.2 (10.3), 565.8 (7.3), 619.2 (5.1)]. ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 10.20, 10.05, 10.00 (1H, 2H, 1H, с, мезо-H); 7.30 (5H, м, C_6H_5); 7.15 (4H, м, CONH); 4.78 (4H, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 4.30 (4H, кв, CH_2CH_3); 4.05, 4.03 (2H, 2H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3.65, 3.55, 3.53 (6H, 3H, 3H, с, CH_3); 3.60 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.40 (6H, с, OCH_3); 3.30 (4H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3.05 (2H, м, $\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.80 (6H, т, CH_2CH_3); 1.57 (12H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). Найдено, %: C 68.69, H 7.03, N 9.60. $\text{C}_{64}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 68.67, H 7.02, N 10.01.

Палладиевый комплекс 6,7-бисдиметилового эфира (N^ϵ -бензилоксикарбонил- N^α -лизино)мезопорфирина IX (IIб). Способ I. К раствору 38 мг (0.034 ммоль) лизинового производного мезопорфирина (IIa) в 10 мл диметилформамида прибавляли 10 мг (0.51 ммоль) хлорида палладия. Реакционную смесь кипятили 45 мин, затем охлаждали и выливали в воду со льдом (200 мл). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали в вакуум-эксикаторе. Сухой остаток очищали на колонке (150 × 25 мм) с силикагелем. Вещество (IIб) элюировали смесью хлороформ-ацетон (10 : 3). Выход 37 мг (90%). Электронный

спектр (CHCl_3) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 392.5 (21.1); 545.8 (41.3); 511.7 (14.8)]. Масс-спектр, m/z : 1223 (M^+). ^1H -ЯМР (δ , м. д.): 10.00, 9.95, 9.90, 9.85 (1H, 1H, 1H, 1H, с, мезо-Н); 7.30 (5H, м, C_6H_5); 7.18 (4H, м, NHCO); 4.8 (4H, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 4.2 (4H, кв, CH_2CH_3); 3.95 (4H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3.60, 3.55, 3.50 (6H, 3H, 3H, с, CH_3); 3.58 (4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.40 (6H, с, OCH_3); 3.20 (4H, т, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2.95 (2H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.80, 1.75 (3H, 3H, т, CH_2CH_3); 1.60 (12H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). Найдено, %: С 63.29, Н 6.24, N 9.46. $\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Pd}$. Вычислено, %: С 62.81, Н 6.26, N 9.16.

Способ 2. К раствору 67 мг (0.1 ммоль) палладиевого комплекса мезопорфирина в 1 мл сухого пиридина и 6 мл хлороформа прибавляли 128 мг (0.4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира N^ϵ -бензилоксикарбониллизина и 0.14 мл (1 ммоль) триэтиламина и раствор охлаждали до 5°C . Затем к нему при постоянном перемешивании прибавляли 127 мг (0.3 ммоль) *n*-толуолсульфоната 1-циклогексил-3-[2-(1-метилморфолиний)этил]карбодиимида. Перемешивали 2 ч при охлаждении и 20 ч при 20°C , разбавляли 50 мл хлороформа и тщательно промывали водой, 0.1 н. HCl и водой до нейтральной реакции. Органический слой высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали досуха. Далее соединение (Шб) выделяли так же, как описано в предыдущем опыте. Выход 55 мг (45%).

Палладиевый комплекс 6,7-бис(N^ϵ -бензилоксикарбонил- N^α -лизино)мезопорфирина IX (Ша). К 32 мг (0.026 ммоль) порфирина (Шб) прибавляли 5 мл тетрагидрофурана и 5 мл 2 н. раствора KOH и кипятили 1 ч. Получающееся соединение выпадало в виде красных хлопьев на границе раздела фаз. После обесцвечивания органического слоя тетрагидрофуран упаривали, суспензию вещества в водно-щелочном растворе подкисляли 0.1 н. HCl до pH 3, осадок отфильтровывали, промывали 100 мл воды и сушили. Полученное соединение (Ша) нерастворимо в хлороформе и воде, но растворяется в метаноле. Выход 28 мг (90%), R_f 0.51 (CHCl_3 - CH_3OH - H_2O , 60 : 25 : 4). Электронный спектр (CH_3OH) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм (соотношение интенсивностей)]: 393.3, 545.8, 512.5 (1.0 : 0.26 : 0.11).

Палладиевый комплекс 6,7-бис(N^α -лизино)мезопорфирина IX (Шб). К 35 мг (0.029 ммоль) Pd-комплекса бензилоксикарбонильного производного (Ша) прибавляли 1 мл 33% раствора HBr в CH_3COOH , оставляли в закрытой колбе на 2 ч и избыток бромистого водорода упаривали на роторном испарителе при 20°C . Затем реакционную смесь выливали в 100 мл воды, нейтрализовали раствором гидрокарбоната натрия до pH 6, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, высушивали над NaOH и

продукт (Шб) промывали ацетоном. Он плохо растворим в ацетоне, хлороформе и воде, но хорошо растворяется в воде при слабом подкислении. Выход 17 мг (62%). Электронный спектр (раствор HCl , pH 5) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм (соотношение интенсивностей)]: 377.5, 519.2, 549.2 (1.0 : 0.12 : 0.18).

Дигидробромид палладиевого комплекса 6,7-бис(N^α -лизино)мезопорфирина IX (Шб · 2HBr). К 52 мг (0.043 ммоль) производного Pd-мезопорфирина IX (Ша) прибавляли 3 мл 33% раствора HBr в CH_3COOH при периодическом перемешивании. Затем реакционную смесь упаривали досуха. Полученное вещество нерастворимо в хлороформе, гексане, ацетоне, но хорошо растворяется в метаноле и воде. Продукт растирали с гексаном, отфильтровывали и промывали ацетоном. Выход 38 мг (80%). Электронный спектр (CH_3OH) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм (соотношение интенсивностей)]: 389.2, 510.0, 543.3 (1.0 : 0.10 : 0.27); (H_2O): 380.0, 520.0, 551.7 (1.0 : 0.17 : 0.33). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1638 ($\text{C}=\text{O}$, амид), 1736 ($\text{C}=\text{O}$, кислота), 3350 ($\text{N}-\text{H}$).

Изотиоцианатное производное палладиевого комплекса 6,7-бис(N^α -лизино)мезопорфирина IX (IV). К 50 мг (0.055 ммоль) 6,7-бис(N^α -лизино)-Pd-мезопорфирина IX (Шб) прибавляли 10 мл воды и 0.01 мл концентрированной соляной кислоты. После полного растворения порфирина раствор нейтрализовали 155 мг (2.25 ммоль) бикарбоната натрия и при постоянном перемешивании обрабатывали 0.40 мл (5.5 ммоль) тиофосгена в 5 мл хлороформа. Через 20 мин добавляли 230 мг (3.25 ммоль) NaHCO_3 , перемешивали 1 ч при комнатной температуре и подкисляли 0.1 н. HCl до pH 3. Органическую фазу отделяли, высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали. Остаток делили методом препаративной ТСХ на пластине 20 x 20 см с силикагелем в системе хлороформ-метанол (6 : 1). Выход вещества (IV) 30 мг (28%). R_f 0.65. Масс-спектр, m/z : 1011.8 (M^+). Электронный спектр (CHCl_3) [$\lambda_{\text{макс}}$, нм (соотношение интенсивностей)]: 393, 511.7, 545 (1.0 : 0.09 : 0.21). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1635 ($\text{C}=\text{O}$, амид), 1726 ($\text{C}=\text{O}$, кислота), 2055, 2120 ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$), 3410 ($\text{N}-\text{H}$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hopf F.R., Whitten D.G. // Porphyrins and Metalloporphyrins / Eds Smith K.M. Amsterdam; Oxford; New York: Acad. Press, 1975. P. 667 - 700.
2. Савицкий А.П. // Успехи биол. химии. 1990. Т. 31. С. 209 - 240.
3. Савицкий А.П., Папковский Д.Б., Березин И.В., Пономарев Г.В. Способ проведения иммуноанализа: А. с. 1464089 СССР // Б. И. 1989. № 9.
4. Прошина Е.Ю., Осин Н.С., Румянцева В.Д., Мионов А.Ф. Маркер для люминесцентного иммуноанализа: Патент Р.Ф. 1993. № 1707539.

5. Порфирины: структура, свойства, синтез / Ред. Ениколопан Н.С. М.: Наука, 1985.
6. Adler A.D., Longo F.R., Kampas F., Kim J. // J. Inorg. Nucl. Chem. 1970. V. 32. P. 2443 - 2445.
7. Neuberger A., Sanger F. // Biochem. J. 1943. V. 37. P. 515.
8. Shiba T., Kaneko T. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1960. V. 33. № 12. P. 1721.
9. Sakata I. Porphyrin Derivatives // EP 0350948. 1990.
10. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. М.: Мир, 1971. С. 66 - 68.
11. Knysh A.N., Savin O.R., Loschinin M.V. // Proceeding of First International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products. Bulgaria. 1989. V. 2. P. 370 - 372.
12. Gouterman M. // The Porphyrins. V. III / Ed. Dolphin D. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1978. P. 1 - 165.
13. Гуринович Г.П., Севченко А.П., Соловьев К.Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск: Наука, 1968.

Synthesis of Phosphorescent Metalloporphyrins with Isothiocyanate Group

O. N. Ponamoreva*, V. D. Rumyantseva*, A. F. Mironov*¹, and A. V. Chudinov**

*Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**State Institute of Biological Instrument Design, Moscow, Russia

Abstract – A synthesis of palladium complexes of 6,7-bis(N^α-lysino)mesoporphyrin IX and its isothiocyanate derivative as prospective phosphorescent protein probes was performed.

Key words: porphyrines, Pd complexes; lysine, isothiocyanate derivatives; phosphorescent immunoassay.

¹ To whom correspondence should be addressed.