



УДК 547.458.5'979.733

КОВАЛЕНТНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ К ПОЛИМЕРАМ.

IX.* ВОДОРАСТВОРИМЫЕ КОНЪЮГАТЫ ПОРФИРИНОВ С АГАРОЗНЫМ НОСИТЕЛЕМ

© 1995 г. В. Х. Митина, И. С. Нечаева, Г. В. Пономарев[#],
А. В. Решетников, Б. А. Клящицкий

Институт биомедицинской химии РАН, 119832, Москва, ул. Погодинская, 10

Поступила в редакцию 30.03.94 г.

Описан метод получения водорастворимых конъюгатов порфиринов с агарозным носителем, заключающийся в иммобилизации порфиринов на аминоэтилсефарозе с последующим удалением несвязавшегося порфирина промыванием на пористом фильтре и солубилизацией геля в кислотных или щелочных условиях. Для присоединения аминокислотных производных мезопорфирина IX, гематопорфирина и 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX использовали бромциановую и эпоксиактивацию носителя. Полученные конъюгаты содержали 50 - 80 мг порфирина на 1 г сухой массы конъюгата. Определены оптимальные условия процесса получения указанных конъюгатов, изучены их физико-химические свойства, а также фоточитотоксическая и радиозащитная активность.

Ключевые слова: порфирины, конъюгаты, агароза.

В последнее время многие порфирины и родственные макроциклы находят широкое применение при экспериментальных исследованиях по фотодинамической терапии (PDT) опухолей в качестве фотосенсибилизаторов (PS) [2]. Однако единственным PS, применяемым в клинической практике при PDT, остается Фотофрин II [очищенное производное гематопорфирина (HP)] [3]. Несмотря на наличие более эффективных PS новых поколений [4], их использованию в клинике препятствуют, в частности, плохая растворимость в воде или отсутствие селективности накопления в опухоли. Для повышения селективности PS по отношению к опухолевой ткани разрабатываются подходы к направленной PDT, основанные на использовании фотоиммунотоксина (PIT) – конъюгатов PS с моноклональными антителами против опухолеассоциированных антигенов [5]. При этом такие свойства PS, как растворимость в воде или преимущественное накопление в опухолевых клетках, отходя на второй план и основным критерием становятся фотофи-

зические свойства PS, например его способность генерировать при облучении синглетный кислород с высоким квантовым выходом. В ряде случаев с целью повышения содержания PS в PIT используется предварительная иммобилизация PS на полимерной вставке с последующим присоединением полученного конъюгата к антителу. В качестве промежуточных полимеров использовались декстран [6], поли(L-глутаминовая кислота) [7], поливиниловый спирт [8] и др. [9].

Известна также радиозащитная активность ряда порфиринов, которая может быть обусловлена их общебиологическим действием на организм [10]. В связи с этим конъюгаты порфиринов с водорастворимыми полимерами могут представлять самостоятельный интерес в качестве радиозащитных средств пролонгированного действия.

В настоящей работе описано получение водорастворимых конъюгатов ряда порфиринов с агарозным носителем с целью получения водорастворимых форм нерастворимых в воде порфиринов и возможного использования этих конъюгатов в качестве радиозащитных и противоопухолевых препаратов пролонгированного действия, а также при конструировании PIT. Агароза – нетоксичный биосовместимый природный полисахарид, используемый в производстве ряда коммерческих адсорбентов, в частности сефарозы [11]. В отличие от других носителей, используемых для гель-хроматографии, сефароза не содержит ковалентных поперечных сшивок между агарозными

* Сообщение VIII см. [1].

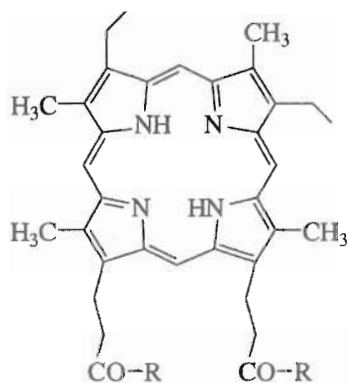
Принятые сокращения: AA – аминоэтилагароза; DAAM – ди(аланино)мезопорфирин IX; DGAM – ди(глицино)мезопорфирин IX; DMH – 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирин IX; DPAM – ди(фенилаланино)мезопорфирин IX; ECH – эпихлоргидрин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; HP – гематопорфирин; PDT – фотодинамическая терапия; PIT – фотоиммунотоксин; PS – фотосенсибилизатор; В- и Е-сефароза – сефароза, активированная бромцианом и эпихлоргидрином.

[#] Автор для переписки.

цепями и вследствие этого может быть переведена в водный раствор простым нагреванием при температуре выше 60°C. В свою очередь модифицированная сефароза может быть солиобилизована при нагревании в кислотной или щелочной среде, на основании чего был разработан простой метод определения количества иммобилизованного лиганда, ковалентно связанного с агарозной матрицей [12]. Частично гидролизованная в кислотной среде сефароза была использована для иммобилизации на ней белковых молекул [13].

Предлагаемый в настоящей статье метод получения водорастворимых конъюгатов порфиринов с агарозным носителем состоит из следующих стадий: а) иммобилизации PS, включая и не-

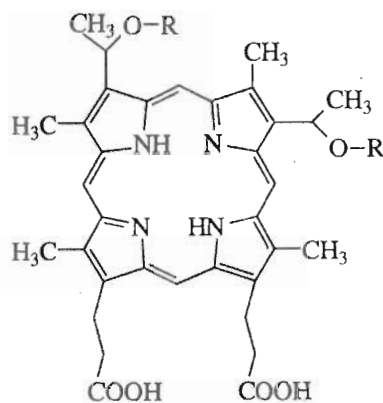
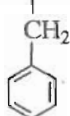
растворимые в воде, на коммерческой сефарозе 2В или 4В стандартными методами с последующим отделением модифицированной сефарозы на пористом фильтре; б) удалении несвязавшегося PS промыванием водой или органическими растворителями; в) солиобилизации геля в кислотных или щелочных условиях. В работе использовались аминокислотные производные мезопорфирина IX: ди(глицино)мезопорфирин IX (DGAM), ди(фенилаланино)мезопорфирин IX (DPAM), ди(аланино)мезопорфирин IX (DAAM), полученные хлорангидридным методом из соответствующего порфирина и избытка аминокислоты, а также гематопорфирин IX (HP) и 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирин IX (DMH).



DGAM: R = NH-CH₂-COOH

DAAM: R = NH-CH(CH₃)-COOH

DPAM: R = NH-CH(CO-Ph)-COOH



HP: R = H

DMH: R = Me

При получении целевых конъюгатов важное значение приобретают два фактора: максимальная степень иммобилизации порфирина на сефарозе и возможность солиобилизации модифицированного геля при сохранении ковалентной связи между порфирином и агарозным носителем. Для сравнения эффективности бромциановой [14] и эпоксиактивации [15] сефарозы с точки зрения количества присоединенного лиганда мы провели ряд модельных экспериментов по иммобилизации диглицилглицина (триглицина) на сефарозе, активированной указанными методами.

Эпоксиактивацию сефарозы проводили обработкой различными количествами эпихлоргидрина (ECH) в 0.4 М NaOH при 40°C в течение 2 ч [16], а бромциановую активацию осуществляли модифицированным методом с переносом цианогруппы в условиях получения средне-, сильно- и суперактивированной сефарозы [17]. После активации сефарозы (везде 5 г влажного сорбента) гель ин-

кубировали 16 ч при 40°C и pH 13 (в случае эпоксиактивации) или 16 ч при 20°C в натрий-бикарбонатном буфере, pH 8.5 (для бромциановой активации) с различными количествами триглицина, обрабатывали и высушивали до постоянного веса. Содержание лиганда определяли на аминокислотном анализаторе по количеству глицина, образовавшегося после кислотного гидролиза аликвоты сухого сорбента 6 н. HCl в течение 6 ч (табл. 1).

Эпоксиактивация приводила к более высокозамещенным гелям, причем максимальное содержание лиганда было достигнуто для сефарозы 2В (250 мг/г сухого веса). В случае бромциановой активации степень замещения "суперактивированного" геля составляла 86 мг триглицина на 1 г сухого веса сорбента. Однако при попытках солиобилизации гелей триглицин-Е-сефароза не было достигнуто полного растворения геля при нагревании в 50% CH₃COOH или в 0.1 н. HCl в течение длительного времени. Это можно объяснить имеющей

место при эпоксиактивации поперечной ковалентной сшивкой агарозных цепей [13]. С другой стороны, гели на основе бромцианактивированной сефарозы полностью растворялись в указанных условиях за 1 - 2 ч при 75°C. Таким образом, с точки зрения получения водорастворимых конъюгатов биологически активных веществ с агарозным носителем предпочтение следует отдать бромциановому методу активации. Проблема устойчивости ковалентной связи между лигандом и бромцианактивированной сефарозой при солюбилизации будет обсуждена ниже.

Иммобилизацию порфиринов проводили на аминоэтилсефарозе 4В в водно-органической среде в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (EDC). Аминоэтилсефарозу получали реакцией бромцианактивированной сефарозы 4В с большим избытком этилендиамина в условиях получения сильноактивированного носителя [15]. После присоединения порфирина ярко-красный гель отделяли на пористом фильтре и промывали водным диметилформамидом и водой до отсутствия порфирина в промывных водах. Солюбилизацию гелей, содержащих иммобилизованные порфирины, проводили нагреванием при 75°C в 50% CH_3COOH (условия А), 80% CH_3COOH (Б), 0.1 н. HCl (В), 0.5 н. HCl (Г) и 0.1 н. NaOH , содержащем 0.1% NaBH_4 (Д), в течение 0.5 - 4.0 ч. При этом соотношение сорбент-растворитель (г влажного сорбента/мл) составляло 1 : 10. При необходимости реакционную смесь центрифугировали и из раствора выделяли целевой конъюгат упариванием, лиофилизацией или гель-хроматографией. Подробности методики солюбилизации приведены в "Экспериментальной части", а результаты - в табл. 2.

Основные побочные эффекты при солюбилизации - возможность образования низкомолекулярных фрагментов агарозы (за счет более глубокого разрушения самих агарозных цепей) и выпадение осадка низкомолекулярного порфирина после диализа (возможно, за счет расщепления изомочевинной связи в порфирин-аминоэтилсефарозе [18]). Эти явления наблюдаются при солюбилизации в достаточно жестких условиях (0.5 н. HCl , 75°C, 2 - 3 ч; 0.1 н. NaOH + 0.1 н. NaBH_4 , 75°C, 4 ч; опыты 5, 7 в табл. 2). При этом в процессе диализа часть продукта проходила через диализную мембрану (низкомолекулярные фрагменты геля), а в диализате выпадал осадок низкомолекулярного порфирина. Наоборот, при излишне мягких условиях солюбилизации (0.1 н. HCl , 75°C, 0.5 ч) часть модифицированной сефарозы не растворялась, что приводило к снижению выхода целевого конъюгата (опыт 9). Это же происходило в случае использования 80% уксусной кислоты вместо 50% (опыт 2).

Содержание порфирина в полученных конъюгатах определяли спектрофотометрически, ис-

Таблица 1. Иммобилизация триглицина на коммерческих агарозных носителях*

Способ активации	Марка сефарозы	Количество активирующего реагента	Количество лиганда при иммобилизации, г		
			при им- мобилизации, г	Содержание лиганда в геле, мг/г сухой массы	
Эпоксиактивация	6В	ЕСН, мл			
		0.5	1	50	
		»	0.1	21	
		4В	1	163	
		»	0.1	23	
		»	0.5	160	
Бромциановая активация	2В	»	1	250	
		»	0.1	30	
		4В	ВгCN, мг		
			50	0.5	20
			100	0.5	22
			250	0.5	86

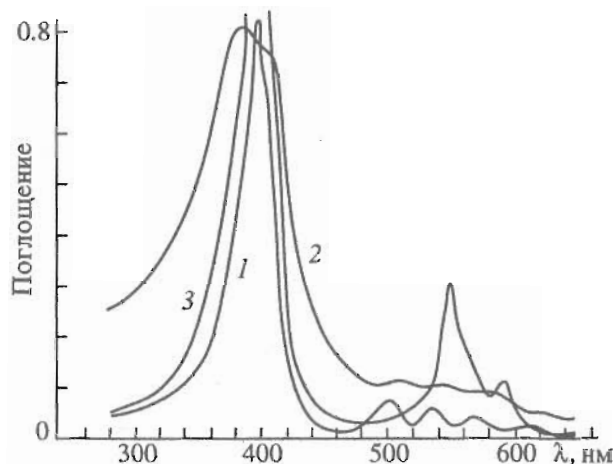
* Везде использовали 5 г влажного носителя.

Таблица 2. Результаты солюбилизации сефарозы 4В с иммобилизованными порфиринами

Номер опыта	Иммобилизованный порфирин	Солюбилизация		Выход водорастворимого конъюгата, мг	Содержание порфирина, мг/г сухой массы конъюгата
		Условия*	Время, ч		
1	DGAM	А	2	200	80
2	»	Б	2	140	75
3	DPAM	В	3	190	70
4	DAAM	Г	1	150	80
5	»	Г	3	90	50
6	HP	Д	2	120	60
7	»	Д	4	95	50
8	DMH	В	2	150	80
9	»	В	0.5	80	80

* Описание условий А - Д см. в "Экспериментальной части".

пользуя установленные коэффициенты экстинкции соответствующих свободных порфиринов. Для этого навеску конъюгата нагревали 2 ч при 100°C в 1 н. HCl и определяли поглощение полученного раствора при соответствующих длинах волн против такого же количества солюбилизированной незамещенной сефарозы. Содержание порфиринов в конъюгатах составляло в среднем 50 - 100 мг на 1 г сухой массы конъюгата (табл. 2; в таблице приведены усредненные значения результатов нескольких опытов). В электронных спектрах конъюгатов обнаружены максимумы



Спектры поглощения: 1 – раствора DPAM (0.01 мг/мл) в метаноле; 2, 3 – растворов DPAM-AA (0.1 мг/мл) в воде и 1 н. HCl. Кювета с толщиной слоя 10 мм.

поглощения, соответствующие поглощению исходного порфирина. На рис. 1 представлены электронные спектры конъюгата DPAM-аминоэтилагароза (DPAM-AA) в воде и кислоте и исходного порфирина в метаноле. При сравнении спектров конъюгата и DPAM видно существенное уширение полос в спектре конъюгата и смещение максимума полосы Сорре до 380 нм, что может указывать на агрегацию молекул порфирина, присоединенных к агарозной цепи [19].

Для оценки молекулярной массы полученных после солюбилизации фрагментов модифицированной агарозы была использована хроматография на Toyopearl HW-65. При этом в случае водорастворимых конъюгатов с порфиринами имела место неспецифическая сорбция этих конъюгатов на адсорбенте, связанная с наличием на агарозе гидрофобных молекул порфиринов. Это несколько искажало истинное распределение конъюгатов при хроматографии в соответствии с их молекулярной массой и не позволяло оценить последнюю по калибровочной кривой, построенной для декстранов с известной молекулярной массой. Поэтому было проведено определение молекулярной массы агарозных фрагментов, полученных после солюбилизации немодифицированной сефарозы 4В в условиях А. Полученные данные свидетельствовали о том, что водорастворимые агарозные фрагменты распределялись в трех основных пиках, соответствующих молекулярным массам 400000 - 500000, 40000 - 60000 и менее 20000, при их соотношении около 1 : 3 : 2. Следует отметить, что это соотношение может несколько изменяться от опыта к опыту. При проведении солюбилизации сефарозы 4В в условиях А в течение 8 ч наблюдалось уменьшение высокомолекулярного пика за счет увеличения количества низкомолекулярных фракций.

Наличие ковалентной связи между порфирином и агарозным носителем в полученных конъю-

гатах доказано рядом экспериментов. Во-первых, при проведении "холостого" опыта с аминоэтилсефарозой в DMH в отсутствие конденсирующего реагента EDC порфирин не связывался с сефарозой и полученный после фильтрования и промывания гель был практически бесцветным. Во-вторых, при гель-фильтрации на сефадексе G-25 реакционной смеси после солюбилизации сефарозы с иммобилизованным порфирином окрашенный конъюгат выходил с колонки с исключительным объемом. В-третьих, при тонкослойной хроматографии на силикагеле в нескольких системах растворителей в полученных конъюгатах не наблюдалось присутствия свободного порфирина (в отличие от механической смеси порфирина и водорастворимого агарозного фрагмента), а окрашенное пятно конъюгата оставалось на старте. И наконец, при центрифугировании при 2500g водного раствора образцов всех конъюгатов в пробирках с мембранным фильтром, исключающим вещества с молекулярной массой менее 10 кДа (Ultracent-10, Toyo-Soda), через фильтр проходило менее 10% нанесенного образца конъюгата.

Описанный метод получения водорастворимых конъюгатов фрагментов агарозного носителя с порфиринами применим и для других низкомолекулярных биологически активных веществ. Так, мы получили конъюгат уридина и агарозы путем иммобилизации уридин-5'-альдегида на гидразидоглутарил-сефарозе известным методом [20] с последующей солюбилизацией геля в условиях А. Водорастворимый продукт содержал около 50 мг уридина на 1 г сухой массы конъюгата.

Таким образом, нами разработан простой и универсальный метод получения водорастворимых конъюгатов биологически активных соединений и фрагментов агарозного носителя с различной молекулярной массой. Метод имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими способами получения полисахаридных конъюгатов. Например, известный метод синтеза конъюгата декстрана с Sn-комплексом хлорина еб включает 7 - 8 стадий с выделением на каждой стадии промежуточных продуктов осаждением, диализом, гель-фильтрацией, лиофилизацией и т.д. и использованием защитных групп и реакций активации как носителя, так и хлорина [6]. В предлагаемом методе мы имеем фактически лишь стадию иммобилизации низкомолекулярного вещества на коммерческой сефарозе (причем имеется широкий выбор методов иммобилизации, позволяющих в принципе ковалентно связывать с сефарозой практически любое соединение в водной или водно-органической среде [12]) и, после фильтрования и промывки, стадию солюбилизации модифицированного геля.

На заключительном этапе исследования были изучены цитотоксичность (табл. 3) и радиозащитное действие (табл. 4) полученных конъюгатов на

асинхронной культуре клеток сердца обезьяны циномольтус. Биологические испытания проводились в Институте биофизики Минздрава России. Полученные данные показали, что изученные конъюгаты относятся к низкотоксичным веществам. Изучение *in vitro* их радиопротекторной активности проводили на культуре указанных клеток. Конъюгаты и ДНК из молок осетровых рыб в нетоксичных для интактных клеток дозах вносили в инкубационную среду через 3 - 5 мин после облучения на рентгеновской установке РУМ-7 в дозе 4 грей (Гр) при мощности 0.4 Гр/мин и фильтре 0.47 мм Al. Культивирование и определение выживаемости клеток по способности к клонообразованию после облучения осуществляли по методике Пака и Маркуса [21]. Из табл. 4 видно, что пострадиационное действие (ПРД) ДРАМ-аминоэтилагарозы (ДРАМ-АА), НР-аминоэтилагарозы (НР-АА) и ДМН-аминоэтилагарозы (ДМН-АА) сопоставимо с терапевтическим действием ДНК, но отличается от последнего стабильностью результатов. Радиозащитная активность указанных конъюгатов была близка по значению к активности дикалиевой соли ДМН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали сефарозы 2В и 4В, сефадекс G-25 (LKB-Pharmacia, Швеция), EDC, НР и бромциан (Serva, Германия), диглицилглицинсульфат и уридин (Reanal, Венгрия). Тоуорепарл НВ-65 и центрифужные пробирки для ультрафильтрации Ultracent-10 получены от фирмы Тоуо-Soda (Япония). Аминокислотные производные мезопорфирина IX (DGAM, ДРАМ и DAAM) были синтезированы хлорангидридным методом в Институте биофизики Минздрава России, а ДМН получен по методу [22].

Электронные спектры снимали на приборе Hitachi 557 (Япония). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol (Чехия) в системе растворителей хлороформ-метанол (10 : 1 и 20 : 1). Содержание глицина в гидролизатах соответствующих адсорбентов определяли на аминокислотном анализаторе фирмы LKB, модель 3201 (Швеция).

Триглицин-Е-сефароза 4В. Суспензию сефарозы 4В (5 г влажного веса) в 6 мл воды и 3 мл 2 М раствора NaOH перемешивали 2 ч при 40°C с 1 мл ECH. Гель промывали на стеклянном фильтре 100 мл воды и смешивали с раствором 1 г триглицина в 10 мл 0.4 М NaOH (рН 13). Смесь перемешивали 16 ч при 40°C, гель отделяли и промывали водой до нейтральной реакции промывных вод. Образец полученного геля промывали ацетоном, затем эфиром и высушивали в вакууме над P₂O₅ до постоянного веса. Навеску сорбента гидролизовали при нагревании в 6 н. HCl в течение 6 ч и определяли содержание глицина на аминокислот-

Таблица 3. Цитотоксичность конъюгатов порфиринов с агарозным носителем на культуре клеток сердца обезьяны циномольтус

Соединение	Токсичность, ммоль/мл	
	LD ₅₀ × 10 ²	LD ₈₄ × 10 ³
ДРАМ-АА	2.6	4.6
НР-АА	2.5	7.1
ДМН-АА	1.8	3.2
ДМН, ди-К-соль	1.9	3.8

Таблица 4. Радиозащитное действие конъюгатов порфиринов с агарозным носителем на культуре клеток сердца обезьяны циномольтус

Соединение	Эффективная доза, ммоль/мл	ПРД при LD ₇₀ *
ДРАМ-АА	1 × 10 ⁻⁶	152.3 ± 3.9
НР-АА	1.3 × 10 ⁻⁶	162.7 ± 7.4
ДМН-АА	1.8 × 10 ⁻⁷	149.7 ± 5.2
ДМН, ди-К-соль	1 × 10 ⁻⁶	167.3 ± 3.9
ДНК	0.1 мг/мл	153.4 ± 3.4

* ПРД – пострадиационное действие (выживаемость относительно контрольного опыта, %); различия с контролем при P = 0.05 достоверны.

ном анализаторе. Полученный сорбент содержал 163 мг лиганда на 1 г сухого веса.

Аналогично осуществляли иммобилизацию триглицина на сефарозе в других примерах, приведенных в табл. 1.

Триглицин-В-сефароза 4В. Сефарозу 4В (5 г влажного сорбента) промывали на стеклянном фильтре 30% и затем 60% ацетоном, гель перемешивали в 5 мл 60% ацетона с 0.5 мл 1 М раствора ВгСN в ацетоне и 0.5 мл 1.5 М раствора NEI₃ в 60% ацетоне при -15°C в течение 7 мин. Затем гель быстро переносили на стеклянный фильтр, промывали 100 мл ледяной воды и 100 мл холодного 0.1 М натрий-бикарбонатного буфера, рН 8.5, и немедленно смешивали с раствором 0.5 г триглицина в 10 мл того же буфера. Суспензию перемешивали 16 ч при 20°C, гель отделяли, промывали 100 мл бикарбонатного буфера и 100 мл воды. Согласно аминокислотному анализу гидролизованного 6 н. HCl геля (см. предыдущий эксперимент), сорбент содержал около 20 мг триглицина на 1 г сухого веса.

Аналогично были получены другие сорбенты с использованием в реакции 100 и 250 мг ВгСN для активации (табл. 1).

Ди(глицино)мезопорфирин-IX-аминоэтилагароза (DGAM-АА). К раствору 68 мг (0.1 ммоль) DGAM в 10 мл 50% водного диметилформамида прибавляли раствор 100 мг EDC в 5 мл воды, доводили до рН 5 с помощью 6 н. HCl и смесь прибавляли к 10 мл аминоэтилсефарозы. Суспензию перемешивали 16 ч при 40°C в темноте. Гель отделяли на стеклянном фильтре, промывали смесью

диметилформамид–вода (1 : 2, 1 : 1) (по 50 мл) до отсутствия порфирина в промывных водах и водой (50 мл). Затем гель переносили в 50 мл 50% уксусной кислоты и нагревали 2 ч при 75°C. Полученный красный раствор упаривали несколько раз с водой, остаток растворяли в 5 мл воды и лиофилизировали. Для получения сухой навески конъюгат промывали ацетоном, эфиром и высушивали на воздухе, а затем в вакууме над P_2O_5 до постоянного веса. Выход DGAM-AA 200 мг. Здесь и ниже для определения содержания порфирина в водорастворимом конъюгате навеску высушенного в вакууме над P_2O_5 соединения нагревали 2 ч в 5 мл 1 н. HCl при 80°C и в полученном растворе определяли поглощение при длинах волн, соответствующих поглощению протонированной формы порфирина (в данном примере при 547 и 590 нм); экстинкцию 1% раствора протонированной формы исходного порфирина $E^{1\%}$ определяли после гидролиза высушенной до постоянного веса навески порфирина (1 н. HCl, 2 ч, 80°C) при 590 ($E^{1\%}$ 113) и 547 нм ($E^{1\%}$ 500). Полученный конъюгат содержал 80 мг DGAM в 1 г сухого веса препарата.

По другому методу для соллюбилизации DGAM-AA гель суспендировали в 50 мл 80% уксусной кислоты и нагревали 2 ч при 75°C. Нерастворившуюся часть геля отделяли центрифугированием, а супернатант упаривали несколько раз с водой и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Выход 140 мг. Содержание DGAM составляло 75 мг/г сухого веса конъюгата. R_f 0.0 при ТСХ в системах хлороформ–метанол.

Ди(фенилаланино)мезопорфирин-IX–аминоэтилсефароза (DPAМ-AA). Суспензию 5 г влажной аминоэтилсефарозы, 86 мг (0.1 моль) DPAМ и 100 мг EDC в смеси диметилформамид–вода (2 : 1) перемешивали 16 ч при 20°C в темноте, поддерживая pH 5.0 с помощью 6 н. HCl. Гель промывали 100 мл смеси диметилформамид–вода (2 : 1), водой (100 мл) и нагревали 3 ч в 50 мл 0.1 н. HCl при 75°C. Полученный красный раствор лиофилизировали. Выход DPAМ-AA 140 мг. Содержание порфирина в конъюгате, определенное по поглощению DPAМ при 547 и 590 нм ($E^{1\%}$ 510 и 144 соответственно), составило 70 мг/г сухого конъюгата.

По другому методу соллюбилизацию геля проводили в 50 мл 50% уксусной кислоты (условия А), полученный раствор упаривали до 5 мл и хроматографировали на колонке (V 20 мл) с сефадексом G-25, уравновешенным 0.1 н. уксусной кислотой. Окрашенную фракцию, выходящую с исключаемым объемом, лиофилизировали и получали 120 мг конъюгата, содержащего 60 мг DPAМ на 1 г сухой массы конъюгата.

Ди(аланино)мезопорфирин-IX–аминоэтилагароза (DAAM-AA). Раствор 70.8 мг (0.1 ммоль) DAAM в 15 мл DMF и раствор 100 мг EDC в 5 мл

воды прибавляли к 10 мл (5 г влажного веса) аминоэтилсефарозы 4В. Суспензию перемешивали 2.5 ч при 20°C и pH 4.7 - 5.0 в темноте, гель отделяли, промывали смесью DMF–вода (2 : 1, 1 : 1, по 100 мл) до отсутствия поглощения при 400 нм в промывных водах и водой (100 мл). Ярко-красный гель соллюбилизировали 1 ч при 75°C в 50 мл 0.5 н. HCl. Затем раствор диализовали против нескольких объемов дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход конъюгата DAAM-AA 150 мг, содержание порфирина 80 мг/г сухого веса. Вещество остается на старте при ТСХ (хлороформ–метанол, 10 : 1).

При проведении соллюбилизации геля в тех же условиях, но в течение 3 ч в процессе последующего диализа выпадал осадок отщепившегося низкомолекулярного порфирина, а часть окрашенного водорастворимого продукта проходила через диализную мембрану. Диализат центрифугировали и надосадочную жидкость лиофилизировали. Выход DAAM-AA составил 90 мг с содержанием порфирина 50 мг/г сухого веса (для DAAM $E^{1\%}$ = 500 при 547 и 138 при 590 нм).

Гематопорфирин-IX–аминоэтилсефароза (HP-AA). Раствор 67.1 мг (0.1 ммоль) HP в 10 мл DMF постепенно прибавляли к суспензии 10 мл аминоэтилсефарозы в 12 мл воды и одновременно прибавляли 100 мг твердого EDC, поддерживая pH 4.7 - 5.0. Суспензию перемешивали в темноте 2 ч при 20°C и 16 ч при 0°C, после стандартной обработки выделяли ярко-красный гель. Последний нагревали 2 ч при 75°C в 100 мл 0.1 н. NaOH, содержащего 0.1% $NaBH_4$. Полученный раствор диализовали 16 ч против 2 л дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход HP-AA 120 мг, содержание порфирина 60 мг/г сухого веса (для HP $E^{1\%}$ = 260 при 547 и 97.2 при 590 нм).

Если соллюбилизацию полученного геля проводили в тех же условиях в течение 4 ч, то после стандартной обработки, центрифугирования и лиофилизации выделяли 95 мг HP-AA, содержащего 50 мг порфирина/г сухого веса конъюгата.

2,4-Ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирин-IX–аминоэтилагароза (DMH-AA). К суспензии 10 мл аминоэтилсефарозы в 15 мл воды постепенно прибавляли раствор 70 мг (0.1 ммоль) DMH в 10 мл DMF и твердый EDC (150 мг), поддерживая pH 4.7 - 5.0 с помощью 0.1 н. NaOH в течение 1 ч. Суспензию перемешивали 2 ч при 20°C и 16 ч при 0°C, фильтровали, гель тщательно промывали на фильтре смесью DMF–вода (1.5 : 1) до отсутствия в промывных водах поглощения при 400 нм и затем водой. Полученный ярко-красный гель нагревали 2 ч при 75°C в 50 мл 0.1 н. HCl и после лиофилизации получали 150 мг конъюгата, содержащего 80 мг порфирина/г сухого веса конъюгата (для DMH $E^{1\%}$ = 243.5 при 545 и 90 при 590 нм).

Если солубилизацию в условиях В проводили 0.5 ч, то нерастворившийся гель отделяли центрифугированием и после обычной обработки выделяли 80 мг конъюгата с тем же содержанием DMH.

“Холостой опыт” (в отсутствие конденсирующего реагента EDC). Суспензию 10 мл аминокетилсепарозы перемешивали 2 ч при 20°C и 16 ч при 0°C раствором 70 мг DMH в 10 мл DMF (рН 4.7 - 5.0). Затем гель промывали на стеклянном фильтре – 100 мл смеси DMF–вода (1.5 : 1) до отсутствия поглощения при 400 нм в фильтрате и водой (200 мл). Фильтрат упаривали, сушили и выделяли 68.5 мг исходного DMH. Промытый на фильтре гель был бесцветным.

Уридин-агароза. Уридин-5'-альдегид-гидразидоглутарилагароза была получена так, как описано в работе [20]. 5 г влажного сорбента солубилизовали 2 ч в условиях А и после лиофилизации получали 180 мг конъюгата, содержащего 80 мг уридина/г сухого веса конъюгата (по данным спектрофотометрического определения).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Межова И.В., Кляцицкий Б.А., Швец В.И. // Хим.-фармацевт. журн. 1988. Т. 22. № 4. С. 455 - 461.
2. Moan J., Berg K. // Photochem. and Photobiol. 1992. V. 55. № 6. P. 931 - 948.
3. Dougherty T.J. // Photochem. and Photobiol. 1987. V. 45. № 6. P. 879 - 889.
4. Rosenthal I. // Photochem. and Photobiol. 1991. V. 53. № 6. P. 859 - 870.
5. Нечаева И.С., Митина В.Х., Пономарев Г.В., Кляцицкий Б.А. // Хим.-фармацевт. журн. 1993. Т. 27. № 10. С. 7 - 16.
6. Rakestraw S.L., Tompkins R.G., Yarmush M.L. // Bioconj. Chem. 1990. V. 1. № 3. P. 212 - 221.
7. Hasan T., Lin A., Yarmush D., Oseroff A., Yarmush M. // J. Controlled Rel. 1989. V. 10. P. 107 - 117.
8. Jiang F.N., Jiang S., Lin D., Richter A.M., Levy J.G. // J. Immunol. Methods. 1990. V. 134. P. 139 - 149.
9. Krinick N.L., Rihova R., Ulbrich K., Strohaln L., Kopecek J. // Makromol. Chem. 1990. V. 191. P. 839 - 856.
10. Ярцев Е.И., Аскаров К.А., Пономарев Г.В. Порфирины: спектроскопия, электрохимия, структура, свойства, синтез. М.: Наука, 1987. С. 214 - 245.
11. Hjerten S. // Biochim. et biophys. acta. 1964. V. 79. № 2. P. 393 - 398.
12. Failla D., Santi D.V. // Anal. Biochem. 1973. V. 52. № 2. P. 363 - 368.
13. Stults N.L., Lin P., Hardy M., Lee Y.C., Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T. // Anal. Biochem. 1983. V. 135. P. 392 - 400.
14. Кляцицкий Б.А., Межова И.В., Швец В.И. // Успехи биол. химии. 1986. Т. 27. С. 187 - 220.
15. Кляцицкий Б.А., Кузнецов П.В. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 10. С. 1740 - 1763.
16. Matsumoto I., Mizuno Y., Seno N. // J. Biochem. 1979. V. 85. P. 1091 - 1098.
17. Kohn J., Wilchek M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. P. 878 - 884.
18. Tesser G.I., Fisch H.-U. // Helv. chim. acta. 1974. V. 57. P. 1713 - 1730.
19. Rakestraw S.L., Ford W.E., Tompkins R.G., Rodgers M.A., Thorpe W.P., Yarmush M.L. // Biotech. Prog. 1992. V. 8. P. 30 - 39.
20. Митина В.Х., Дубинина И.Г., Варновицкая Г.И., Кляцицкий Б.А. // Журн. общей химии. 1981. Т. 51. С. 217 - 225.
21. Puck T.T., Marcus P.J. // J. Exp. Med. 1956. V. 104. № 3. P. 427 - 439.
22. Кириллова Г.В., Яшунский В.Г., Бабушкина Т.А., Пономарев Г.В. Способ получения тетраалкиловых эфиров гематопорфиринов. А. с. 857138 СССР // Б. И. 1981. № 31. С. 115.

Covalent Coupling Biologically Active Substances to Polymers: IX.¹ Water-Soluble Porphyrin Conjugates with Agarose Matrices

V. Kh. Mitina, I. S. Nechaeva, G. V. Ponomarev²,
A. V. Reshetnikov, and B. A. Klyashchitskii

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medicinal Sciences,
Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia*

Abstract – An approach for obtaining water-soluble conjugates of porphyrins with agarose matrices is described. The porphyrins were immobilized on aminoethyl-Sepharose. The nonbounded porphyrin was then removed by washing the resulting gel on the porous filter followed by solubilization under acidic or alkaline conditions. To couple amino acid derivatives of mesoporphyrin IX, hematoporphyrin (HP), and 2,4-di(α-methoxyethyl)deuteroporphyrin IX (DMH) cyanogen bromide and epoxy activation was used. The conjugates obtained contained 50 - 80 mg of a porphyrin per 1 g of dry weight of a conjugate. We have also determined the optimal conditions for obtaining the aforementioned conjugates, studied their physicochemical properties, photocytotoxic and radioprotective activities.

Key words: porphyrins, conjugates, agarose.

¹ For paper VIII see [1].

² To whom correspondence should be addressed.