

УДК 541.49:546.719

К. О. Пілецька, О. В. ШтеменкоДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет»,
кафедра неорганічної хімії,
пр. Гагаріна, 8, м. Дніпро, 49005, Україна**СИНТЕЗ БІОКОН'ЮГАТУ НА ОСНОВІ КАРБОНІЛЬНОГО
КОМПЛЕКСУ РЕНІЮ(I) ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ПАТОЛОГІЧНИХ
ПРОЦЕСІВ**

Синтезовано новий комплекс $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebruCOONHBr}]$, склад та будову якого встановлено за допомогою мас-спектрометрії, ІЧ- та ПМР спектроскопії. Розроблено методику синтезу біокон'югату шляхом приєднання пептиду до комплексу ренію(I). Проведено селективне сполучення енкефаліну з комплексом $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebruCOONHBr}]$. Утворення нового продукту підтверджено за допомогою високоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії.

Ключові слова: реній, карбоніли, пептиди, енкефалін маркер.

ВСТУП

Карбонільні комплекси ренію(I) з N,N-гетероциклічними лігандами проявляють фотофізичні властивості придатні для візуалізації клітин, тканин та процесів, що проходять у них. Їх люмінесценція характеризується високою інтенсивністю і великими зсувом Стокса та тривалістю життя [1-3], що дозволяє зафіксувати сигнал за невисокої концентрації речовини та виділити його на фоні автофлуорисценції клітин. Крім того, комплекси на основі ядра *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]$ є кінетично стабільними і нетоксичними для біологічних систем [4]. Не дивлячись на весь цей набір цінних для візуалізації властивостей використання цих сполук обмежено проблемою доставки комплексу до клітин.

Одним із способів створення біомаркерів є одержання кон'югату за рахунок приєднання біомолекул, наприклад пептидів, до комплексів металів. Кожна із складових таких кон'югатів має своє завдання. Комплекс металу, який виступає в якості функціональної мітки несе спектроскопічні властивості. Друге завдання виконується пептидною послідовністю, яка, як правило, виконує транспортну роль. Одним з різновидів пептидів, що доволі часто використовуються для цієї мети, є специфічні рецепторні пептиди [5].

У наших дослідженнях як металоорганічну складову ми обрали трикарбонільний комплекс ренію(I) з 4-метил-2,2'-біпіридин-4'-карбоксилатом. Це пов'язано з тим, що комплекси з похідними біпіридину проявляють фотофізичні властивості, що є цінними для візуалізації. Крім того, вільна карбоксильна група дозволяє шляхом пептидного синтезу приєднувати до неї біомолекули. Для такого приєднання ми обрали пентамірний опіодний рецепторний пептид $[\text{Leu}^5]$ -енкефалін (Enk).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали. Для проведення синтезу ренієвого комплексу використовували пентакарбонілреній(I) бромід, що був синтезований за методикою [6]. Ліганд

4-метил-2,2'-біпіридин-4'-карбоксилат (рис. 1) синтезували за відомою методикою [7].

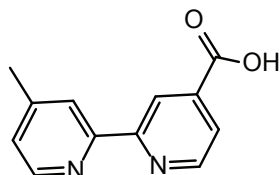


Рис. 1. Будова 4-метил-2,2'-біпіридин-4'-карбоксилату.

Реагенти для твердофазного пептидного синтезу (SPPS) були придбані у наступних компаній: Fmoc-амінокислоти (Iris Biotech, Novabiochem), смола для синтезу пептидів (Iris Biotech). Такі допоміжні реагенти для SPPS, як TBTU (O-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилсечовини тетрафлуорборат), HOBT (гідроксibenзотриазол), DIPEA (диізопропілетиламін), НАТУ (гексафторфосфат 2-(7-аза-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруонія) придбали у Sigma-Aldrich. Твердофазний синтез пептиду проводили у DMF (Roth) пептидного класу. HPLC проводили з використанням Millipore®-Q води, ацетонітрилу та трифлуороцттової кислоти класу для HPLC.

Методи. ІЧ-спектри в області 4000–400 см⁻¹ записували за допомогою Фур'є-спектрометра ФСМ 1201 з застосуванням стандартної методики пресування речовини з калій бромідом. **Спектри ¹H ЯМР** реєстрували на спектрометрах Bruker DRX 200, 250, 400 або 600 у ДМСО-d₆. **Мас-спектри** фіксували за допомогою мас-спектрометра Bruker Esquire 6000 у метанолі. **Високоєфективну рідинну хроматографію** проводили на приладі Varian Prostar з використанням аналітичної колонки RP Varian Dynamax (C18 сорбент 60 Å, діаметр 4.5 мм, довжина 250 мм) води та ацетонітрилу, що містять 0,1 % TFA. Як елюент, використовували лінійний градієнт ацетонітрилу 20-100% протягом 30 хв, швидкість потоку 1мл/хв.

СИНТЕЗ БІОКОН'ЮГАТУ

Синтез [Re(CO)₃MebyCOOHBr] Взаємодію 4-метил-2,2'-біпіридин-4'-карбоксилату з пентокарбонілренієм(I) проводили за наступною методикою відповідно до схеми 1.

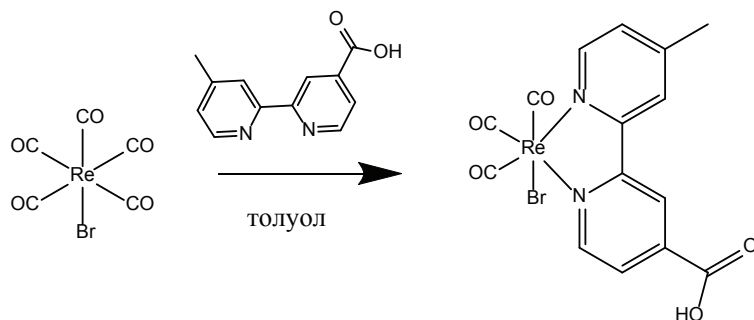
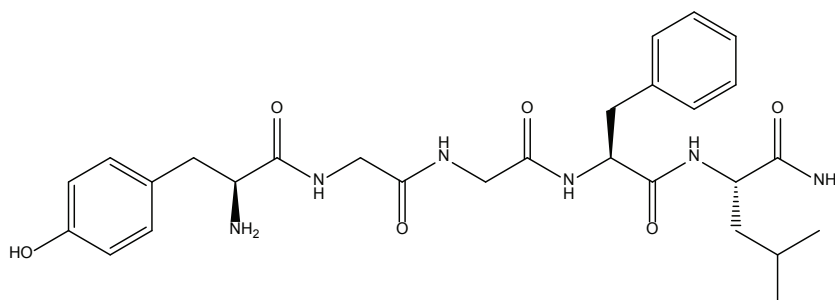


Схема 1. Реакція між [Re(CO)₅Br] та MebyCOOH у толуолі

До круглодонної колби поміщали 100 мг $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ та 60 мг MeBr_2COOH і додавали 40 мл толуолу. Суміш, що одержали, нагрівали протягом 16 годин у інертній атмосфері за температури 80°C . Після розчин охолоджували. Яскравий помаранчевий осад, що утворився, відфільтровували та промивали гексаном та діетиловим ефіром. Вихід продукту склав 74,3 %. Нова комплексна сполука добре розчинна у метанолі, обмежено розчинна у полярних органічних розчинниках і нерозчинна у воді та неполярних розчинниках.

Синтез енкефаліну. За допомогою (SPPS) твердофазного пептидного синтезу (схема 2) було синтезовано $[\text{Leu}^5]$ -енкефалін (рис. 2).

Рис. 2. Будова $[\text{Leu}^5]$ -енкефаліну

Спочатку смолу поміщали у пластиковий шприц об'ємом 2 мл з поліпропіленовим диском у якості фільтра («реактор періодичної дії»). Всі синтетичні кроки, в тому числі набування, зняття Fmoc-захисту, промивання, приєднання амінокислоти та відщеплення проводили шляхом перемішування реакційної суміші на лабораторному шейкері (400 – 480 обертів на хвилину) за кімнатної температури. Розчини (табл. 1), необхідні для твердофазного синтезу енкефаліну і використані реагенти (табл. 2) перераховані нижче.

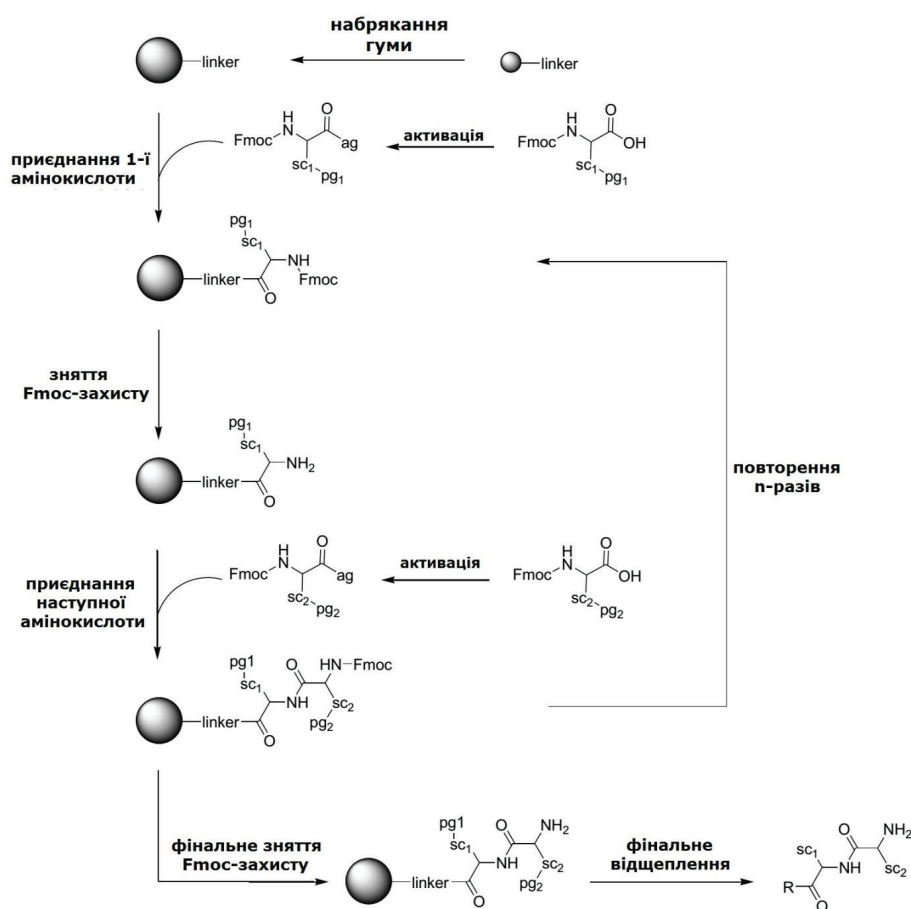
Таблиця 1

Розчини для твердофазного синтезу пептидів

| Реагент | Склад |
|-------------------------|---------------------|
| для зняття Fmoc-захисту | 20% піперидин у DMF |
| лужний розчин | 0,2 DIPEA у DMF |

Смолу (0,2 ммоль) поміщали в «реактор періодичної дії» об'ємом 2 мл, додали в $\sim 1,5$ мл DMF, і суміш збовтували за кімнатної температури протягом 1 години. Після цього знімали захисну групу. Для цього промивали 20% розчином піперидину у DMF (~ 1 мл, $2 \cdot 9$ хв). Далі знову промивали DMF (~ 1 мл, $3 \cdot 1$ хв). Смолу промивали після кожної стадії синтезу: Fmoc-зняття захисту, зв'язування для того, щоб видалити надлишок реагентів і не бажані реагенти. Після промивання додавали заздалегідь підготовлений розчин з амінокислоти, TBTU, HOBT та DIPEA і

суспензію збовтували протягом 45 хвилин. Далі знову промивали DMF (~ 2 мл, 3 · 1 хв) і повторювали, описані вище дії відповідно до схеми 2 з іншими амінокислотами. Після приєднання останньої амінокислоти та промивання DMF, пептид на твердій фазі промивали DCM (~ 2 мл, 3 · 1 хв). Таким чином був одержаний енкефалін придатний для наступних досліджень.



●: полімерна матриця (тверда фаза)
 sc : бічна послідовність
 pg : захисна група

R: C-кінцевий залишок
 ag : активаційна група

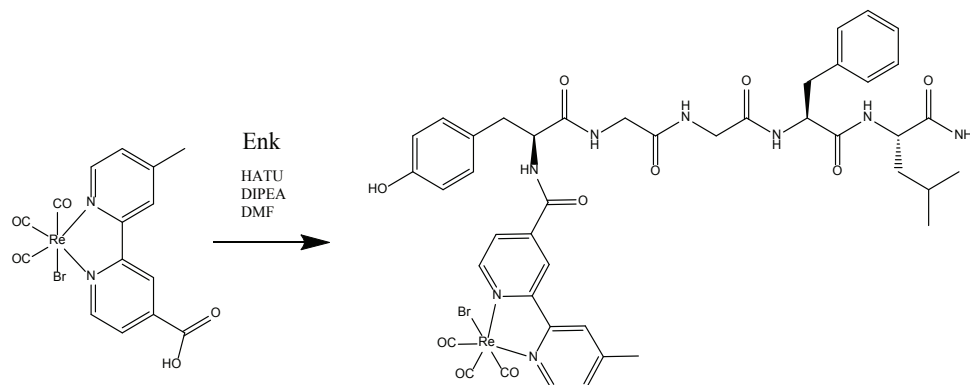
Схема 2. Зображення SPPS з використанням Fmoc-методу захисту

Таблиця 2

Реагенти для твердофазного синтезу пептидів

| Реагент | ν , ммоль | m, г |
|------------------|---------------|-------|
| Fmoc-Leu-OH | 0,8 | 0,283 |
| Fmoc-Phe-OH | 0,8 | 0,310 |
| Fmoc-Gly-OH | 0,8 | 0,238 |
| Fmoc-Gly-OH | 0,8 | 0,238 |
| Fmoc-Tir(tBu)-OH | 0,8 | 0,368 |
| TBTU | 0,8 | 0,257 |
| HOBt | 0,8 | 0,108 |
| DIPEA | 1,6 | 0,207 |

Взаємодія $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebryCOOHBr}]$ з енкефаліном. Приєднання ренієвого комплексу до енкефаліну проводили відповідно наступним чином (схема 3)

Схема 3. Взаємодія $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{MebryCOOH})\text{Br}]$ з енкефаліном у розчині

До мікропробірки Епендорфа поміщали 2 мг (1 еквівалент) енкефаліну 2 мг (1 еквівалент) $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebryCOOHBr}]$ 1,4 мг (1,2 еквіваленти) HATU, 2,1 мкл (4 еквіваленти) DIPEA та 250 мкл DMF. Одержаний розчин збовтували протягом двох діб.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebryCOOHBr}]$ проводили за допомогою мас-спектрометрії, ІЧ- та ^1H ЯМР спектроскопії.

У мас-спектрі спостерігали патерн (рис. 2) що за масою та ізотопним складом відповідає іону $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOOH}]^+$, що свідчить про приєднання MebpyCOOH до ренію.

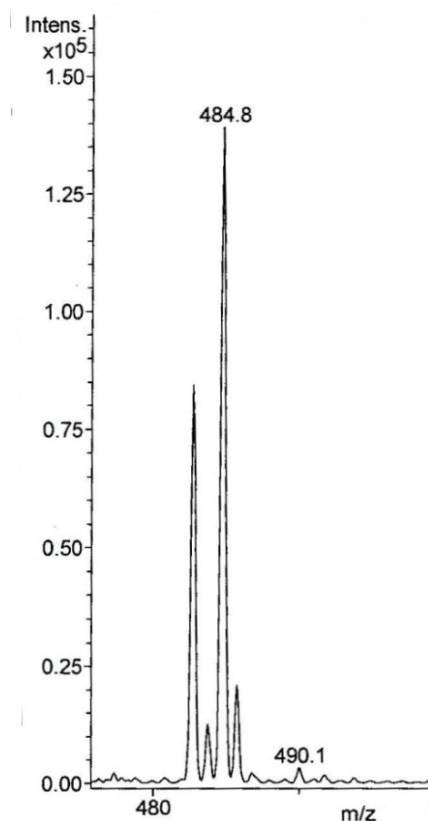


Рис. 2. Фрагмент мас-спектру $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{MebpyCOOH})\text{Br}]$ у метанолі

У ^1H ЯМР спектрі спостерігаємо хімічні зсуви, що відповідають атомам Гідрогену ліганду MebpyCOOH. На підставі одержаних результатів можна говорити про приєднання 4-метил-2,2'-біпіридин-4'-карбоксилату до ядра *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$.

Дві інтенсивні смуги 2026 та 1896 cm^{-1} в ІЧ-спектрі (рис. 3), що відповідають асиметричним та симетричним валентним коливанням CO, вказують на присутність трьох карбонільних груп у *fac*-конфігурації відносно атому ренію [8]. А смуга у області 1708 cm^{-1} свідчить про наявність вільної карбоксильної групи [9]. Таким чином, карбоксильна група органічного ліганду залишається некоординованою і тому є можливим за допомогою пептидного синтезу приєднання до неї біомолекул.

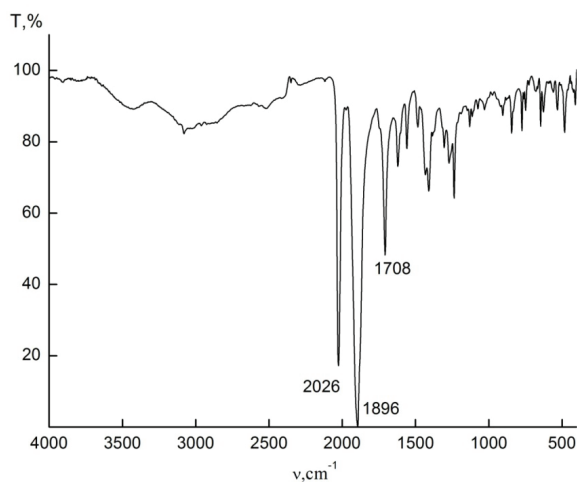


Рис. 3. ІЧ-спектр $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{MebruCOOH})\text{Br}]$ у KBr

Після проведення приєднання енкефаліну до $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{MebruCOOH})\text{Br}]$ розчин, що утворився дослідили за допомогою HPLC (високоєфективної рідинної хроматографії). Аналіз показав утворення нового продукту (рис. 4 (смуга 7), рис. 5 (смуга 8)).

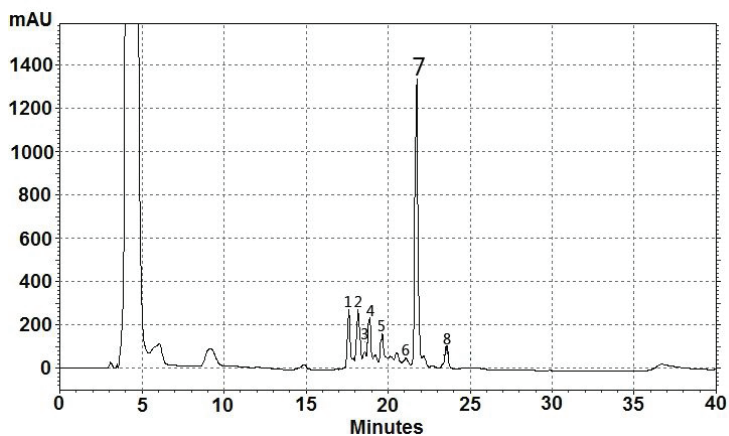


Рис. 4. Дослідження продукту реакції приєднання енкефаліну до $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebruCOOHBr}]$ за допомогою HPLC. Довжина випромінювання 214 нм

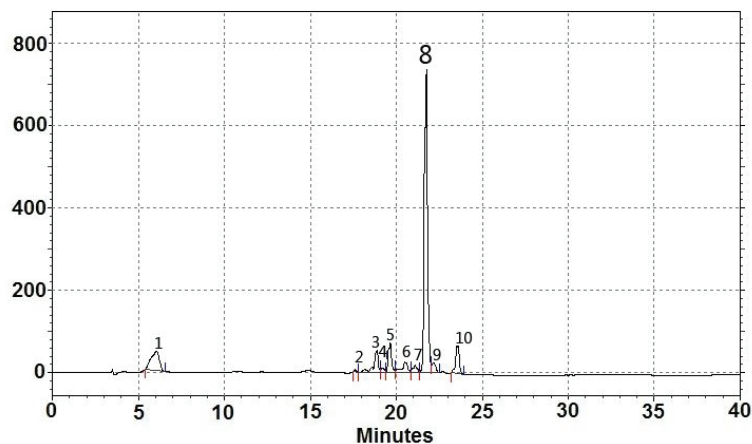


Рис. 5. Дослідження продукту реакції приєднання енкефаліну до $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOOHBr}]$ за допомогою HPLC. Довжина випромінювання 254 нм

Нову сполуку було досліджено за допомогою мас-спектрометричного методу аналізу. На мас-спектрі (рис. 6) спостерігали патерн, що за масою та ізотопним складом відповідає іону $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCO-Enk}]^+$, що підтверджує приєднання енкефаліну до ренієвого комплексу.

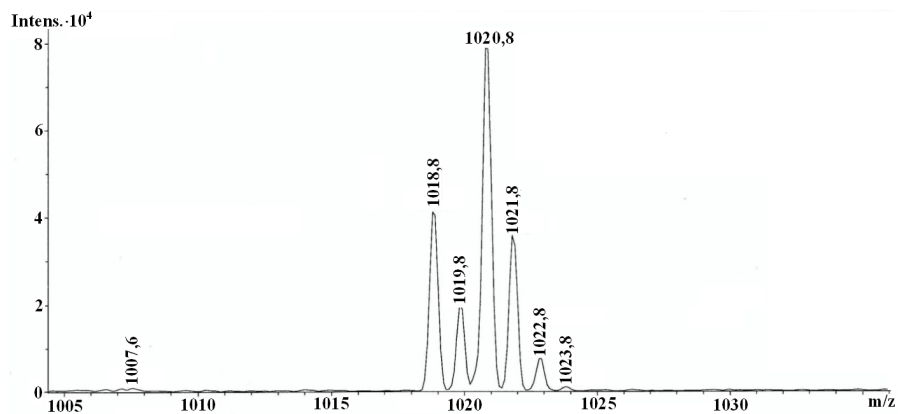


Рис. 6. Мас-спектр продукту взаємодії $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOOHBr}]$ з енкефаліном

Подібним чином можливе приєднання інших пептидів до $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOOHBr}]$. Зміною пептидів можна впливати на розподіл комплексної сполуки у певних частинах організму та проводити діагностику. Недоліком цього методу є неможливість приєднання пептидів, що є не стійкими без твердої фази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zhao Q., Huang C., Li F. Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging // Chem. Soc. Rev. – 2011 – Vol. 40, N 5. – P. 2508-2524. <http://dx.doi.org/10.1039/C0CS00114G>
2. Pitchumony T.S., Banevicius L., Janzen N., Zubieta J., Valliant J. F. Isostructural Nuclear and Luminescent Probes Derived From Stabilized [2+1] Rhenium(I)/Technetium(I) Organometallic Complexes // Inorg. Chem. – 2013. – Vol. 52, N 23. – P. 13521–13528. <http://dx.doi.org/10.1021/ic401972g>
3. Kirgan R.A. Sullivan B.P., Rillema D.P. Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Rhenium // Top. Curr. Chem. – 2007. – Vol. 281. – P. 45–100. http://dx.doi.org/10.1007/128_2007_143
4. Hartwig J.F. Organotransition Metal Chemistry – From Bonding to Catalysis – California: University Science Books, Mill Valley, 2010. – 1160 p.
5. Strack M., Bedini A., Yip K.T., Lombardi S., Siegmund D., Stoll R, Spampinato S.M., Metzler-Nolte N.A Blocking Group Scan Using a Spherical Organometallic Complex Identifies an Unprecedented Binding Mode with Potent Activity In Vitro and In Vivo for the Opioid Peptide Dermorphin // Chem. Eur. J. – 2016. – Vol. 22, N 41. – P. 14605–14610. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201602432>
6. Штеменко А.В., Шаповал А.Н. Восстановление перрената калия гипофосфитом натрия в смеси муравьиной и бромистоводородной кислот // Укр. хим. журнал. – 2006. – Т. 72, № 11. – С. 17–20.
7. Banerjee T., Rawalekar S., Das A., Ghosh H. N. Interfacial Electron Transfer Dynamics of Two Newly Synthesized Catecholate Bound Ru^{II} Polypyridyl-Based Sensitizers on TiO₂ Nanoparticle Surface – A Femtosecond Pump Probe Spectroscopic Study // Eur. J. Inorg. Chem. – 2011. – Vol. 2011, N 27. – P. 4187–4197. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201100411>
8. Stuart B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.–John Wiley & Sons, Ltd., 2004. – 244 p.
9. Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry, 6 ed.– NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009. – 408 p.

Стаття надійшла до редакції 15.01.2017

К. А. Пилецкая, А. В. Штеменко

ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет»,
кафедра неорганической химии,
пр. Гагарина, 8, г. Днепр, 49005, Украина

СИНТЕЗ БИОКОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ КАРБОНИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА РЕНИЯ(I) ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Синтезирован новый комплекс $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOONBr}]$, состав и строение которого установлены с помощью масс-спектрометрии, ИК и ПМР спектроскопии. Разработана методика синтеза биоконьюгата, путем присоединения пептида к комплексу рения(I). Проведено селективное связывание энкефалина с комплексом $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MebpyCOONBr}]$. Образование нового продукта подтверждено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

Ключевые слова: рений, карбонилы, пептиды, энкефалин маркер.

K. O. Piletska, A. V. Shtemenko
Ukrainian State University of Chemical Technology
Department of Inorganic Chemistry

THE SYNTHESIS OF BIOCONJUGATE BASED ON RHENIUM(I) CARBONYL COMPLEX FOR VISUALIZATION OF PATHOLOGICAL PROCESS

Tricarbonyl rhenium(I) complexes have a great potential like biomarkers. It is caused their biological stability, low toxicity, large Stokes shifts, and long luminescence lifetimes. Rhenium tricarbonyl complexes $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})]$, where $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ is a ligand with low π^* orbitals are excellent candidates as imaging dyes. The method of obtaining potential biomarkers based on tricarbonyl rhenium(I) complex with a 4-methyl-2,2'-bipyridine-4'-carboxylate by the addition of biomolecules by peptide synthesis was developed. The new complex $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{MeppyCOOHBr}]$ was synthesized, composition and structure of which were established by mass spectrometry, IR and NMR spectroscopy. A selective attachment of receptor peptide enkephalin to complex $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{MeppyCOOH})\text{Br}]$ was performed. The formation of a new compound and its structure has been confirmed by HPLC and mass spectral analysis. The method which has been developed allows to connect various peptides to rhenium(I) complex in the solution.

Key words: rhenium, carbonyl, peptide, enkephalin, marker.

REFERENCES

1. Zhao Q., Huang C., Li F. *Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging*. Chem. Soc. Rev. 2011, vol. 40, no. 5, pp. 2508-2524. <http://dx.doi.org/10.1039/C0CS00114G>
2. Pitchumony T.S., Banevicius L., Janzen N., Zubieta J., Valliant J. F. *Isostructural Nuclear and Luminescent Probes Derived From Stabilized [2+1] Rhenium(I)/Technetium(I) Organometallic Complexes*. Inorg. Chem. 2013, vol. 52, no. 23, P. 13521-13528. <http://dx.doi.org/10.1021/ic401972g>
3. Kirgan R.A. Sullivan B.P., Rillema D.P. *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Rhenium*. Top. Curr. Chem. 2007, vol. 281, pp. 45-100. http://dx.doi.org/10.1007/128_2007_143
4. Hartwig J.F. *Organotransition Metal Chemistry – From Bonding to Catalysis*. California, University Science Books, Mill Valley, 2010, 1160 p.
5. Strack M., Bedini A., Yip K.T., Lombardi S., Siegmund D., Stoll R, Spampinato S.M., Metzler-Nolte N.A *Blocking Group Scan Using a Spherical Organometallic Complex Identifies an Unprecedented Binding Mode with Potent Activity In Vitro and In Vivo for the Opioid Peptide Dermorphin*. Chem. Eur. J. 2016, vol. 22, no. 41, pp. 14605-14610. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201602432>
6. Shtemenko A.V., Shapoval A.N. *Reducing of potassium perrhenate by sodium hypophosphite in a mixture of formic acid and hydrobromic* [Восстановление перрената калия гипофосфитом натрія в смесі мурав'їної і бромистоводородної кислоти]. Українськij хімічeskij журнал, 2006, vol. 72, no. 11, pp. 17-20.
7. Banerjee T., Rawalekar S., Das A., Ghosh H. N. *Interfacial Electron Transfer Dynamics of Two Newly Synthesized Catecholate Bound Ru^{II} Polypyridyl-Based Sensitizers on TiO₂ Nanoparticle Surface – A Femtosecond Pump Probe Spectroscopic Study* Eur. J. of Inorg. Chem. 2011, vol. 2011, no 27, pp. 4187-4197. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201100411>
8. Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd., 2004, 244 p.
9. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 6 ed. NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, 408 p.