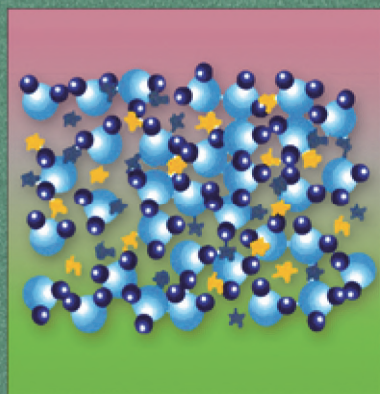


М Е Д И Ц И Н С К А Я Х И М И Я

БИОМЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

под редакцией Ж. Жауэна



Лаборатория
ЗНАНИЙ

БИОМЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Bioorganometallics

Biomolecules, Labeling, Medicine

Edited by
Gerard Jaouen



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

БИОМЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

3-е издание, электронное

Редактор Ж. Жауэн

Перевод с английского

канд. хим. наук В. П. Дядченко
и канд. хим. наук К. В. Зайцева

под редакцией
докт. хим. наук, профессора Е. Р. Милаевой



Москва
Лаборатория знаний
2020

УДК 547
ББК 24.2
Б63

Серия основана в 2010 г.

Биометаллоорганическая химия / ред. Ж. Жауэн ; пер. Б63 с англ. — 3-е изд., электрон. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 505 с. — (Медицинская химия). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-668-7

В книге, написанной коллективом авторов из Франции, Германии, Великобритании и других стран, обсуждается зависимость биологических функций химических соединений в живых организмах от особенностей строения молекул этих соединений. Показано, что эффективность терапевтических средств можно прогнозировать. Обсуждается терапевтическая эффективность многих противораковых препаратов.

Для научных работников, студентов, лекторов и преподавателей.

УДК 547
ББК 24.2

Деривативное издание на основе печатного аналога: Биометаллоорганическая химия / ред. Ж. Жауэн ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 494 с. : ил., [8] с. цв. вкл. — (Медицинская химия). — ISBN 978-5-9963-0225-3.

Originally published in the English language
by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
Boschstraße 12, D-69469 Weinheim, Federal
Republic of Germany, under the title
«Bioorganometallics. Biomolecules, Labeling,
Medicine».

Copyright © 2006 by WILEY-VCH Verlag
GmbH & Co. KGaA.

All Rights Reserved. This EBook published under
license with the original publisher.

© Перевод на русский язык, оформление.
Лаборатория знаний, 2015

ISBN 978-5-00101-668-7

Предисловие редактора перевода

Биометаллоорганическая химия – новое направление органической химии, развивающееся параллельно с *бионеорганической химией* (биологической неорганической химией), областью химической науки, связанной с изучением на молекулярном уровне роли металлов и их соединений в биологических процессах, происходящих в живых организмах и в окружающей среде. Интерес мирового научного сообщества к этим междисциплинарным направлениям вызван интенсивным развитием биохимии, молекулярной биологии, энзимологии, медицинской химии, фармакологии и других смежных направлений химической науки в последние десятилетия.

Биометаллоорганическая химия изучает механизмы реакций с участием соединений металлов, молекулы которых содержат связь металл–углерод, при функционировании различных биологически важных объектов: металлопротеинов и кофакторов, а также изучает действие экзогенных металлоорганических соединений на биологические мишени. Исследования в области биометаллоорганической химии включают: поиск, структурный дизайн и синтез потенциальных лекарственных веществ, создание биоматериалов, биозондов, радиофармацевтических препаратов и биосенсоров на основе металлоорганических соединений, а также разработку новых физико-химических методов в биохимическом, ферментативном и иммунном анализе на базе металлоорганических соединений.

В предлагаемой вниманию читателей книге впервые достаточно полно освещаются достижения в различных направлениях биометаллоорганической химии, интенсивно развивающейся в последние годы. Книга написана ведущими специалистами по металлоорганической химии, работающими в области фундаментальной медицины, фармакологии, биологии, энзимологии.

Хорошо известно, что первым «металлоорганическим лекарством» было органическое производное мышьяка – антибактериальный препарат сальварсан, который был введен в медицинскую практику П. Эрлихом еще в 1907 г. За прошедшее столетие получены и разрешены для применения многие металлоорганические фармакологические препараты. Однако некоторый скепсис фармакологов и существующие до сих пор затруднения в развитии медицинской металлоорганической химии связаны с токсичностью металлоорганических соединений.

Сейчас уже ни у кого не вызывает сомнений важнейшая роль органических комплексов переходных металлов в нормальном функционировании живых

систем. Помимо кофермента метилкобаламина (производное витамина B_{12}), содержащего фрагмент $Co-CH_3$, – классический пример полезного металлоорганического соединения – следует назвать ферменты гидрогеназы, в активный центр которых входят фрагменты со связью металл–углерод, а также некоторые интермедиаты ферментативных реакций, которые образуются в результате ингибирования ферментов, например, при действии CO . Поэтому главная цель этой книги – помочь медикам преодолеть барьер консерватизма по отношению к органическим комплексам металлов и обратить внимание химиков на те возможности, которые открываются для медицинского применения устойчивых в водной среде металлоорганических соединений.

Одно из перспективных применений металлоорганических соединений – использование их как «меток» для белков и нуклеиновых кислот, а также в качестве компонентов «биозондов» для определения лекарственных или наркотических веществ в организме. Наиболее чувствительными методами здесь оказываются разновидности иммуноанализа. Включение комплексов металлов в качестве трейсеров или сенсоров в системы, действующие по принципу «гость–хозяин», дает преимущества в чувствительности и однозначности по сравнению с традиционными методами анализа. В книге рассмотрены методы диагностики (визуализации органов), основанные на применении радионуклидов (МРТ, КТ и т. д.). Обсуждается участие металлоорганических соединений в процессах распознавания супрамолекулярных ансамблей.

Книга будет полезна и интересна широкому кругу читателей: химикам, биохимикам, фармакологам, энзимологам и медикам, а также преподавателям химии, биохимии и биологии.

Переводчики выражают благодарность С. А. Еремину, А. В. Медведько, Г. В. Латышеву и В. Г. Григоренко за помощь в переводе данной книги.

Профессор *Е. Р. Милаева*

Предисловие

В 1979 г., когда Аннэ Весьер, Сайдан Топ и я решили приступить к изучению пограничной области между химией металлоорганических соединений и биологией, развитие событий нельзя было предсказать заранее. Здесь нас ожидали и настоящие, пусть редкие, успехи, и многочисленные препятствия на пути вперед, и в целом неясные перспективы. Дороти Ходжкин расшифровала кристаллическую структуру витамина B₁₂, Джон С. Тейер изучил биологическую активность σ-металлоорганических соединений, в частности образование природных токсинов, таких как алкильные соединения олова и ртути (*J. Chem. Ed.*, 1971, 48, 806; *J. Organomet. Chem.*, 1974, 76, 265). В то же время химиотерапия, которая была введена в практику Эрлихом, предложившим препарат Сальварсан®, оставалась в стороне от металлоорганических соединений, отдавая предпочтение антибиотикам, таким как пенициллин. Прогресс наметился тогда, когда благодаря Дэниелю Мансви в результате открытия и последующего понимания природы связей металл–углерод нового типа было обнаружено существование карбеновой формы цитохромов P-450. Этому прогрессу способствовали работы Петры Кёпф-Майер, вдохновленного результатами, полученными на цисплатине и открывшего путь к терапевтическому применению металлоценов, таких как (C₅H₅)₂TiCl₂. В конце концов благодаря Майклу Кейсу появилась принципиальная возможность применения нового метода анализа, получившего название «металлоиммуноанализ». Все это были, однако, небольшие шаги, сделанные в то время, когда полным ходом развивался металлоорганический катализ.

Открытие металлоорганической природы анаэробного фермента, продуцирующего метан, поддержало нашу веру в то, что вода совместима с некоторыми металлоорганическими соединениями. Область наших исследований определялась той компетенцией, которой обладала наша небольшая исследовательская группа. Сайдан Топ – прекрасный специалист в области металлоорганического синтеза, способный пойти навстречу любому вызову. Аннэ Весьер – квалифицированный ученый, проводящий исследования в двух областях, по которым она защитила диссертации: химии карбонильных комплексов железа и эндокринологии. В связи с этим мы решили исследовать потенциальные возможности комплексов карбониллов металлов в приложениях, связанных с эндокринологией.

Позже мы поняли, что не совсем правильно оценили степень трудности поставленной задачи, и поэтому прошло пять лет, прежде чем стало заметно

продвижение вперед. Я рад, что имею возможность выразить признательность моим канадским друзьям: Майклу Дж. Макглинчи (Университет Макмастера) и Яну С. Батлеру (Университет Макгилла) – ведь они нашли в себе силы и способности пойти на определенный риск, что позволило нам сориентироваться в трудный начальный период нашей работы, который мог оказаться роковым. С самого начала мы получали конкретную поддержку и ценные советы от Пьера Потье, Ф. Альберта Коттона и лорда (Джека) Льюиса. После того как мы преодолели начальный период, дела пошли лучше. К первоначальной команде присоединились смелые и творчески мыслящие студенты, такие как Мишель Салман. Другие лаборатории заинтересовались этими многопрофильными исследованиями. Перед нами отчетливо выявилась значимость металлоорганических ферментов, а также радиофармацевтических препаратов, новых лекарств и анализов биологических объектов с помощью металлоорганических соединений. Объем материала увеличился до такой степени, что возникла необходимость в написании исчерпывающего обзора, который и представлен в настоящей книге. Одной из интересных особенностей биометаллоорганической химии на данной стадии ее развития является то, что перспективы гораздо шире, чем уже сделанные открытия. Мы надеемся, что это стимулирует воображение читателя.

Париж, октябрь 2005 г.

*Ж. Жауэн,
В. Бек,
М. Дж. Макглинчи*

1 Новая область исследований: биометаллоорганическая химия. Истоки и основные принципы

*Ж. Жауэн (Gérard Jaouen, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Laboratoire de Chimie Organométallique (UMR CNRS 7576), France),
В. Бек (Wolfgang Bek, Universität München, Department Chemie, Germany),
М. Дж. Макглинчи (Michael J. McGlinchey, Department of Chemistry, Centre for Synthesis and Chemical Biology, University College of Dublin, Ireland)*

1.1. Введение

Термин «биометаллоорганическая химия»* впервые был использован в 1985 г. по отношению к синтезу и исследованию металлоорганических соединений, представляющих интерес для биологии и медицины [1, 2]. В это время стало понятно, что накоплено большое число разрозненных результатов, которые требовали введения общего термина, определяющего исследования данного типа. Данный термин объединяет комплексы, образованные классическими для металлоорганической химии лигандами (например, СО, алкильными или π -связанными группами), и биомолекулы (стероиды, аминокислоты, углеводы, пептиды, ДНК, витамины, ферменты, антитела), присоединенные к металлу с образованием связи металл–углерод и обладающие способностью играть определенную роль в биологических процессах. Этот, без сомнения, исчерпывающий перечень признаков призван очертить возможные границы данной области исследований [3–15].

Конечно, идеей объединения металлоорганического и биологического компонентов с переменным успехом и ранее руководствовались многие исследователи. Цель данной вводной главы – рассмотреть период появления и становления идеи с точки зрения современных перспектив. Цель состоит также в том, чтобы попытаться показать, как развивались фундаментальные принципы данной области, которая является междисциплинарной по определению и связана с успехами различных научных направлений. В этом отношении замечательно то, что одним из факторов, который привел к взрывообразному развитию данной области, был усиленный интерес к природе связи металл–углерод (М–С). Результатом явилось то, что во всех исследованиях, включая изучение структуры витамина В₁₂, рассматривались только σ -связи [16–18]. Однако, проследивая историю открытия ферроцена и установления его сэндвичевой структуры [19–21], мы наблюдаем становление теоретических основ для понимания природы связей М–С новых

* В англоязычной научной литературе – «bioorganometallic chemistry». – *Прим. перев.*

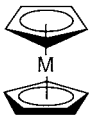
	Общая формула	Примеры
Карбонилы металлов (Монд, Бертло, Гибер)	$\begin{array}{c} L_nM-C\equiv O \\ \updownarrow \\ L_nM-C=O \end{array}$	$Ni(CO)_4$, $Fe(CO)_5$
Алкильные и арильные производные металлов (Поп)	$L_nM-C \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	$(CH_3)_3Pt-I$, $(CO)_4Co-CH_3$
Карбеновые комплексы металлов (Фишер, Шрок)	$L_nM=C \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	$(CO)_5Cr=C \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} Ph \\ OCH_3 \end{array}$
Металлоцены (Уилкинсон, Фишер)		$Fe(C_2H_5)_2$ (ферроцен)
Гидридные комплексы металлов (Гибер, Коттон)	L_nM-H	$H_2Fe(CO)_4$, $HCo(CO)_4$, $(C_2H_5)_2ReH$

Схема 1.1. Металлоорганические соединения переходных металлов

типов (σ , π и δ), таких как связи в металлоценах, карбонилах или карбеновых комплексах металлов (схема 1.1).

Такое структурное разнообразие комплексов металлов определяет и различие в их реакционной способности, что и дало начало развитию металлоорганической химии переходных металлов в целом, а затем и биометаллоорганической химии, какой мы знаем ее сегодня [22–24]. Положение биометаллоорганической химии среди других родственных дисциплин условно показано на схеме 1.2.

В ракурсе времени легче увидеть, как разнообразие новых функций, новых структур и, следовательно, новых свойств, привело к феноменальному успеху

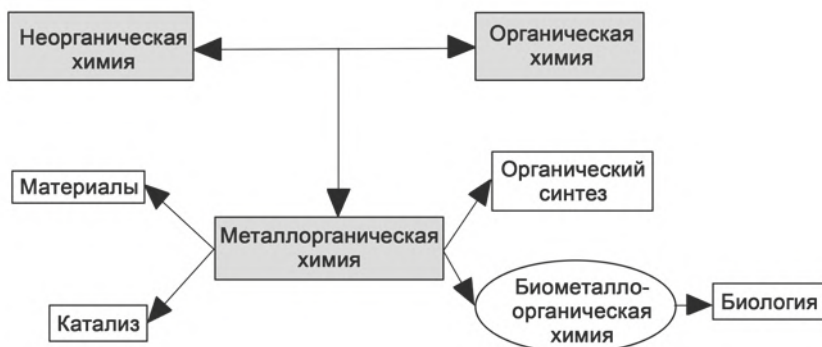


Схема 1.2. Взаимосвязь металлоорганической химии (комплексы с непосредственной связью металл–углерод) и основных родственных дисциплин



Схема 1.3. Основные области исследований в биометаллоорганической химии

металлоорганической химии переходных металлов во второй половине XX в. Наиболее тщательно разработанными областями применения металлоорганической химии являлись, прежде всего, катализ, в частности такая новаторская реакция, как полимеризация по Циглеру–Натта, асимметрический синтез (Шарплесс, Нойори, Каган, Ноулс) и метатезис олефинов (Граббс, Шрок), а также органический синтез, включая создание связи С–С в реакциях сочтения (Стилле, Сузуки, Хек, Посон), и путь к новым материалам и полимерам (Камински, Маркс, Бринтцингер). Биометаллоорганическая химия – предмет настоящей главы – появилась значительно позже, поскольку ее возникновение требовало объединения двух дисциплин* и, кроме того, возможности изучать поведение металлоорганических комплексов в водной среде. Дальнейшее развитие этой области было быстрым, и в настоящее время в ней можно выделить пять направлений (схема 1.3). В последующих главах будет дана краткая историческая справка по каждому из этих направлений с подробным обсуждением тех аспектов, которые уже были затронуты.

1.2. Металлоорганические соединения и терапия

1.2.1. Отец-основатель

В настоящее время в фармацевтической индустрии наблюдается относительное затишье в отношении поиска действительно новых веществ, пригодных к использованию в терапии. После невероятного успеха антибиотиков и, несколько позже, реализации надежд на генную инженерию, необходимо продолжать поиск инновационных концепций. Исследование применения металлоорганических комплексов в медицине могло бы стать одним из таких инновационных подходов благодаря необычной реакционной способности изучаемых объектов. С этой точки зрения, начало применения

* Металлоорганической химии и биологии. – *Прим. перев.*

металлоорганической химии в медицине относится к деятельности известного фармацевта эпохи Просвещения*, современника Пристли и Лавуазье. Этот фармацевт был членом *Académie Royal des Sciences*** и имел кабинет для приема больных с аптекой на улице Сант Оноре, 115 в Париже.

Речь идет о Луи-Клоде Кадэ де Гассикоре (Louis-Claude Cadet de Gassicourt; 1713–1799; см. цветную вклейку), который оставил необычное наследство. Его приемный сын Шарль-Луи, которого Кадэ усыновил в 1769 г., на самом деле был внебрачным отпрыском короля Людовика XV (и Марии-Терезы Босселе). В наши же дни его считают основателем металлоорганической химии, чего он, конечно, знать не мог. 27 августа 1758 г. он представил в Королевскую академию наук статью о «дымящей жидкости Кадэ», которая была опубликована в 1760 г. [25]. Эта тяжелая коричневая жидкость высоко токсична, обладает сильным чесночным запахом и самовоспламеняется на воздухе. Она состоит в основном из окиси какодила (Me_2As)₂O, но содержит и другие производные какодила, например, дикакодил (Me_2As)₂. По причинам личного характера Кадэ никогда больше не возвращался к этой основополагающей работе. Неудачная супружеская жизнь заставила его растратить все имеющиеся деньги, а также прочие ценности на женщин, приближенных к королевскому двору. Он не оставил практически никакого наследства своему приемному сыну, за исключением хорошего образования. Это, по крайней мере, позволило молодому человеку стать фармацевтом императора Наполеона и, таким образом, участвовать в его европейских кампаниях [26]. Этот рассказ, возможно, типичен для тех бурных лет французской истории, когда судьбы людей сталкивались, а состояния создавались и исчезали.



Во времена Кадэ нельзя было дать объяснения этой реакции, протекающей при перегонке смеси оксида мышьяка и «слоистой земли винного камня» (ацетата калия), что являлось частью работ по созданию невидимых чернил. Действительно, лишь почти 80 лет спустя, благодаря работам Бунзена стало понятно, что в этих условиях реакции образуются «какодилы» [27, 28]. Слово «какодил» происходит от греческого *κακωδης* (*kakodes*) – зловонный. Исследованием «дымящей жидкости» вначале занялся Б. Дюма. Однако в 1834 г. администрация *Ecole Polytechnique****, находившаяся в центре Парижа, запретила ему продолжать эти работы. В университете Марбурга к этому отнеслись с большим пониманием. Администрация университета в 1837–1842 гг. разрешила Бунзену (1811–1899) использовать крытый соломой охотничий домик в глубине леса для изучения этих самых «какодиловых тел». В результате проведенных работ была установлена их металлоорганическая природа, т. е. наличие в них связи М–С [27, 29–31].

* Этап развития западной философии и культуры в конце XVII – начале XIX вв. – Прим. перев.

** Королевская академия наук (франц.). – Прим. перев.

*** Политехнический институт (франц.). – Прим. перев.

Впоследствии были открыты многие производные какодила, в основном разнообразные какодилаты, которые использовались в первой половине XX в. в качестве тонизирующих и общеукрепляющих средств в случае болезней, связанных с понижением уровня гемоглобина (туберкулеза, рассеянного склероза, малярии и т. п.) [28].

1.2.2. Первое эффективное металлоорганическое лекарство

Вредное воздействие мышьяка на организм было известно очень давно (вспомним, к примеру, Нерона или Борджиа*). Во Франции в XVII в. белый мышьяк As_2O_3 получил в связи со своими ядовитыми свойствами название *poudre de succession* (порошок наследства).

На протяжении XIX в. в европейских странах металлоорганическая химия получила существенное развитие. Так, Бунзен и Франкланд описали алкиларсины и алкильные соединения ртути, Лёвиг синтезировал $(C_2H_5)_4Pb$, Фридель и Крафтс изучили органохлоросиланы, а Шютценбергер получил $[Pt(CO)Cl_2]_2$. Эти достижения привели Эрлиха (1854–1915; см. цветную вклейку) и других исследователей к мысли о том, что металлоорганические соединения на основе мышьяка могут оказаться менее токсичными, чем их неорганические аналоги, и, возможно, с ними будет проще работать. Идея была новаторской, но реализовать ее оказалось трудно. Потребовалось сотрудничество с химиком Бертхаймом и биологом Сакаширо Хата. В свою очередь, органические производные мышьяка нашли систематическое медицинское применение благодаря настойчивости Пауля Эрлиха, который был удостоен Нобелевской премии в 1908 г. [32–35].

Среди всех соединений, синтезированных до 1909 г., продукт № 606 оказался наиболее эффективным против сифилиса. В Европе он был зарегистрирован под торговым названием Сальварсан^{®**}, а в США этот препарат был известен под названием Арсфенамин. Вначале считали, что это соединение является мышьяковистым аналогом азобензола; его формулу изображали в виде димера с двойной связью $-As=As-$, а химическое название было 3,3'-диамино-4,4'-дигидроксиарсенобензол (формула **1** на схеме 1.4).

Последующие исследования показали, что незамещенный арсенобензол на самом деле является циклическим гексамером $[(C_6H_5As)_6]$, так что сальварсан скорее всего тоже имеет полиядерную структуру **2** (схема 1.4) [30]. На немецкой банкноте достоинством 200 DM был изображен общий вид молекулы

* Автор имеет в виду пятого римского императора Клавдия Друза Нерона (37–68 гг.) и Цезаря Борджиа (1476–1507 гг.), сына папы Пия VI, которые устранили неугодных им людей с помощью яда. – *Прим. перев.*

** Название «сальварсан» происходит от *лат.* *salvare* – спасать и *arsenicum* – мышьяк. – *Прим. перев.*

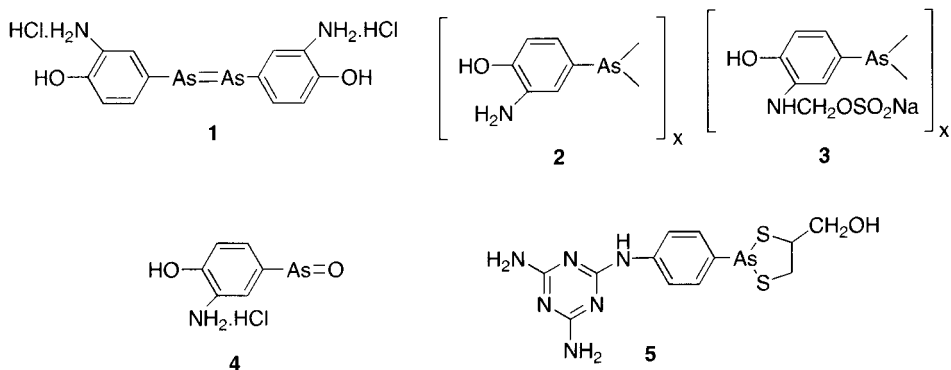


Схема 1.4. Структурные формулы сальварсана (2), неосальварсана (3), мафарсена (4) и меларсопрола (5)

сальварсана, соответствующий именно этой формуле*. Хотя мафарсен 4 обычно представляют в виде производного As(III) с двойной связью между атомами кислорода и мышьяка (по аналогии с нитрозоаренами), такая формула, по-видимому, некорректна. Данное соединение, скорее всего, является ариларсонистой кислотой** или ее циклическим ангидридом. К сожалению, рентгеноструктурные данные для этих соединений мышьяка получить не удастся. Что же касается сальварсана, то его состав*** установлен с помощью масс-спектрометрии (N.C. Lloyd, H.W. Morgan, B.K. Nicholson, R.S. Ronimus, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 941–944).

Сальварсан быстро стал широко применяемым препаратом для лечения сифилиса; поражающее действие этого заболевания в то время можно сравнить с действием СПИДа сегодня. Сальварсан сам по себе не очень хорошо растворим в воде, а его солянокислая соль оказалась слишком токсичной для медицинского применения. Поэтому готовили щелочной раствор сальварсана и применяли препарат для лечения в таком виде [34]. Несколько позже эта проблема разрешилась с появлением растворимого в воде Неосальварсана® (препарата № 914, неоарсфенамина 3) [34]. Однако сальварсан и неосальварсан окисляются на воздухе, и их следует хранить в атмосфере азота в запаянных ампулах.

* Банкнота выпускалась Федеральным банком Германии с 1 октября 1990 г. до введения в стране единой европейской валюты в 2002 г. Очертания циклического гексамера были помещены рядом с портретом П. Эрлиха. – *Прим. перев.*

** Органоарсонистые кислоты имеют общую формулу $RA_s(OH)_2$, где R – органический радикал. – *Прим. перев.*

*** В цитируемой статье показано, что в растворе сальварсан представляет собой смесь тримера и пентамера. – *Прим. перев.*

1.2.3. Соединения мышьяка, полученные после Эрлиха

После смерти Эрлиха в 1915 г. исследования мышьякорганических соединений продолжались. Тогда-то и было установлено, что сальварсан в организме окисляется до гидрохлорида оксофенарсина **4** (получившего название Мафарсен®). Поскольку это соединение было устойчиво на воздухе, оно постепенно заменило сальварсан в терапевтическом применении и в 1930-х гг. стало основным мышьякорганическим лекарственным препаратом.

Мафарсен и его аналоги, содержащие мышьяк, использовались в терапевтических целях и в течение 1940-х гг., но постепенно были вытеснены пенициллином. Это вовсе не значит, что мышьякорганические соединения полностью исчезли с рынка лекарственных препаратов. Эти соединения все еще используются в ветеринарии благодаря своим противопаразитарным свойствам. Недавно изучалась их противовирусная активность.

Остается еще много открытых вопросов, относящихся к сальварсану и его производным, причем немаловажными остаются вопросы истинной структуры и механизма действия этих соединений. Г. Морган из Университета Уэйкейта разработал программу исследований, основанную на работе Эрлиха по борьбе с инфекциями, устойчивыми к действию антибиотиков. Некоторым бактериям, включая возбудителей гастроэнтеритов, сифилиса, внутриутробной инфекции, а также болезни Лайма*, свойственна способность расщеплять углеводы с помощью уникального фермента. Этот фермент можно блокировать, используя соединения, содержащие мышьяк. Поэтому интересно было бы знать, способен ли сальварсан или другие родственные ему соединения блокировать этот ключевой фермент. Другим соединением, заслуживающим упоминания, является меларсопрол **5** (Арсобал®), используемый для лечения африканской сонной болезни [36, 37]. В то же время это и другие соединения данного ряда оказались эффективными в случае трудно поддающейся лечению острой лейкемии [38–40].

1.2.4. Ртутьорганические соединения

Ртуть использовали в медицине со времен древних греков, как следует из рукописей Диоскорида. Ртуть описана также Авиценной (980–1037) в начале средних веков как средство для избавления от вшей и для лечения чесотки. Токсичность ртути при длительном воздействии на человека была известна уже в те времена [41]: продолжительность жизни преступников, которых использовали римляне для работ в ртутных шахтах Испании, не превышала 3 лет. Идеи Парацельса (1493–1541), которые он высказывал во время пребывания в университете Базеля, часто касались природы токсичности. Парацельс пишет: «*Alle Ding sind Gift und nichts ohn Gift; alein die Dosis macht das ein Ding kein Gift ist*» («Все вещи есть яд, и ничто не лишено яда; лишь доза делает некую вещь неядовитой»), а также: «Так, например, любая еда и любой напиток ядовиты,

* Природно-очаговая трансмиссивная инфекция, разновидность клещевого возвратного тифа, возбудителем которого является бактерия *Borrelia burghdorferi* сем. *Spirochaetaceae*. – Прим. перев.

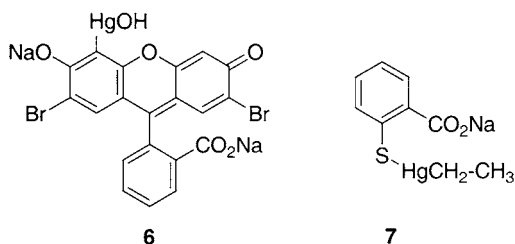


Схема 1.5. Структурные формулы меркурохрома (6) и мертиолата (7)

если их употреблять сверх нормы» [41, 42]. На этом основании он рекомендовал использовать неорганические соединения металлов, включая соединения мышьяка и ртути, для медицинских целей. Эти соединения использовались для лечения сифилиса на протяжении нескольких столетий. Примеры можно найти в книге J. J. Casanova de Seingalt (1725–1798) «Histoire de ma vie»^{*}.

Существует интересная историческая параллель между соединениями ртути и соединениями мышьяка: и том, и в другом случае наблюдается постепенный переход от неорганических к металлоорганическим соединениям. В результате мы видим использование соединений **6** и **7** (схема 1.5) в лекарственных целях или, в случае алкильных производных ртути и мышьяка, ядовитых веществ широкого спектра действия [43].

В настоящее время считается, что ртутьорганические соединения представляют незначительный интерес как лекарственные препараты, хотя меркурохром и мертиолат все еще используются как мягкие антисептики местного действия. Сказанное подчеркивает общую тенденцию для соединений рассматриваемого типа: эти соединения рекомендуют как противомикробные препараты для наружного применения, а не для приема внутрь. Большинство случаев отравлений металлоорганическими соединениями обусловлено тем, что с пищей в желудок попадают производные метилртути, источником которой являются морские организмы или злаки, предназначенные для сева^{**} в качестве семян [44].

1.2.5. Современная оценка эффективности, токсичности и селективности

Взрывообразное развитие синтетической металлоорганической химии, вызванное многообразием новых типов лигандов и образуемых ими комплексов, открытых во второй половине XX в. (схема 1.1), а также еще одно основополагающее событие, которое возродило интерес к поиску лекарств на основе соединений металлов, связано с именем Розенберга. Он открыл

^{*} Джакомо Казанова де Сейнгальт «История моей жизни».

^{**} Ртутьорганические соединения используются в качестве фунгицидов при обработке хлебных злаков, предназначенных только для посева или технических целей. – *Прим. перев.*

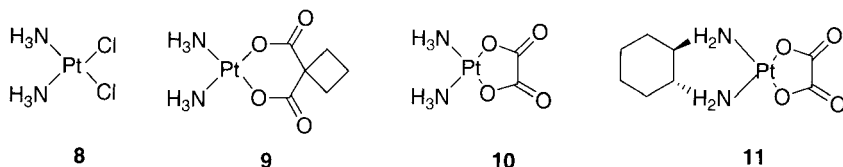


Схема 1.6. Структурные формулы *цисплатина* (8), *карбоплатина* (9), *недаплатина* (10) и *оксалиплатина* (11)

противоопухолевую активность неорганического препарата *цисплатина*, 8, особенно в лечении рака яичка. Это соединение было синтезировано Пейроном в 1844 г. [45], но лишь почти 120 лет спустя Розенберг открыл его лечебные свойства [46, 47].

К сегодняшнему дню по комплексам платины опубликовано около 20000 статей. Прекрасное изложение предмета можно найти в книге Липперта [48], а общие обзоры по металлосодержащим противораковым препаратам – в публикациях Кепплера [49], Сэдлера [50] или Кларка [51]. Несмотря на огромный объем проведенных исследований, для клинических целей были одобрены лишь следующие неорганические комплексы* (схема 1.6): *цисплатин* 8, *карбоплатин* 9, *недаплатин* 10 и *оксалиплатин* 11 (рак толстой и прямой кишки). Несколько других препаратов находятся на стадии клинических испытаний. Был исследован механизм действия этих препаратов [52].

Импульсом к поиску новых противораковых комплексов, отличных от комплексов платины, послужили некоторые недостатки последних, к которым относятся: устойчивость клеток к воздействию платины, что иногда встречается в клинической практике; побочное токсическое действие *цисплатина* 8, которое может быть значительным; недостаточная активность по отношению к раку других типов [48]. В качестве попытки преодолеть эти трудности, особенно связанные с общей токсичностью, была исследована возможность использования неорганических комплексов других металлов. В этом отношении наиболее перспективными являются комплексы рутения – металла, свойства которого близки к свойствам присутствующего в организме железа. Например, комплекс рутения(III) 12 [ImH]⁺[*транс*-RuCl₄(DMSO)Im][–] – *транс*-имидазол(диметилсульфоксид)тетрахлорорутенат имидазолия ((NAMI-A) схема 1.7) – проявляет антиметастатическую активность, обладая в то же время низкой токсичностью *in vivo* [53, 54]. Первая фаза клинических испытаний показала, что этот комплекс хорошо переносится организмом человека [55].

Параллельно с исследованиями в области координационной химии, значительный интерес привлекали металлоорганические комплексы сходного типа, особенно ряда металлоценов** – производных Ti, Fe, Mo, V, Re, Co, Ru [56–59]. Титаноцендихлорид 13 является интересным примером:

* Автор имеет в виду комплексы, не содержащие связи металл–углерод. – Прим. перев.

** В нашей стране металлоцены относят к области металлоорганической химии. – Прим. перев.

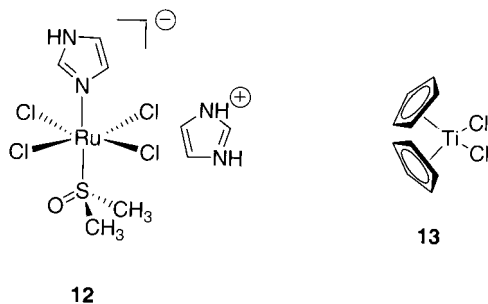


Схема 1.7. Структурные формулы NAMI-A (**12**) и титаноцендихлорида (**13**)

существует структурная аналогия между **13** и цисплатином **8**. Металлоорганический комплекс **13** подвергался клиническим испытаниям; считается, что он реагирует с ДНК аналогично цисплатину. Однако создать лекарственную форму из данного комплекса титана трудно, поскольку он легко гидролизует. Клинические испытания не дали обнадеживающих результатов и были прекращены. Следует также отметить, что соединения Ti(IV), образующиеся в результате гидролиза, проявляют сильное пролиферативное* действие на клетки гормон-зависимого рака груди [60]. Тем не менее исследования комплексов титана продолжаются. При этом используются лиганды более прочно связанные с металлом [61, 62]. Одновременно ведутся исследования в другом направлении с целью понизить токсичность металлосоодержащих лекарственных препаратов. В основе этого подхода лежит изменение центрального атома металла в комплексе. Металлоорганические комплексы рутения дают обнадеживающие результаты в этом отношении. В частности, полусэндвичевые комплексы, содержащие фрагмент (η^6 -арен) Ru(II), такие как **14** и **15** (схема 1.8), обладают низкой общей токсичностью [63, 64].

Комплекс **14** перспективен в плане противоопухолевой активности как *in vitro*, так и *in vivo*, включая активность по отношению к линиям клеток, устойчивых к цисплатину [63]. Такие металлоорганические комплексы представляют большие возможности для оптимизации биологической активности путем варьирования координированного арена, хелатирующего лиганда и уходящей группы (в случае **14** и **15** – хлорид-иона). Соединение **15** проявляет противомикробные свойства, а также pH-зависимую способность к связыванию [65]. Эти данные обсуждаются в гл. 2.

Другой перспективный подход к оптимизации действия лекарственного препарата основан на модификации уже известных биолигандов (тамоксифена, хлорохина) путем введения в них металла. Подобное изменение биолиганда преследует цель увеличить эффективность препарата за счет «работы» металлоорганического фрагмента. Роль металлосоодержащего фрагмента,

* Вызывающее деление и рост клеток. – Прим. перев.

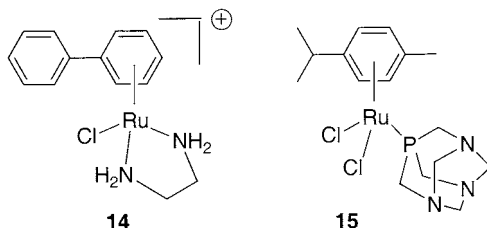


Схема 1.8. Металлоорганические комплексы рутения (**14** и **15**)

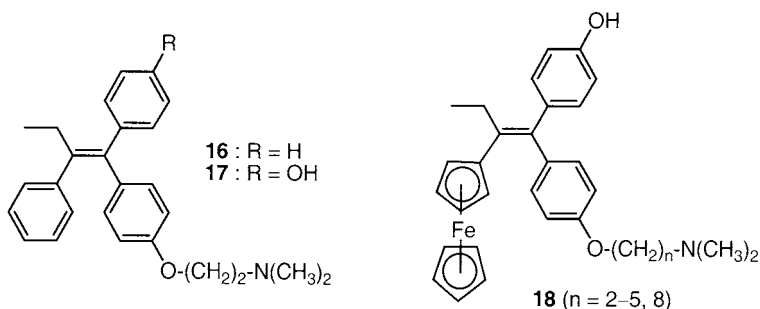


Схема 1.9. Антиэстроген тамоксифен (**16**), его активный метаболит гидрокситамоксифен (**17**) и гидроксиферроцифены (**18**)

возможно, заключается в образовании продуктов окисления вблизи активного сайта [66–73].

Схема 1.9 иллюстрирует два наиболее продуктивных на данный момент примера, использующих «принцип мишени»*. Так, значительным шагом вперед в лечении гормон-зависимого рака груди (ER+) является применение препаратов группы SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator – селективный модулятор эстрогенного рецептора), прототипом которых служит тамоксифен **16** (его активный метаболит – гидрокситамоксифен ОН-Там **17**). Для решения проблемы лечения гормон-независимых (ER–) видов опухолей был синтезирован гидроксиферроцифен (ОН-ферроцифен, **18**).

Это соединение проявляет антипролиферативное действие на клетки рака груди как типа (ER+), так и типа (ER–). Это обусловлено особыми свойствами ферроцифена в окислительной среде, которая в случае препарата такой структуры приводит к направленному апоптозу** [67–69].

Другой пример касается малярии. Так, в случае хлорохина **19** – одного из противомаларийных препаратов, используемых в настоящее время, проблемой

* В оригинале – «targeting principle». Имеется в виду использование сродства известного органического препарата к мишени в клетке. – *Прим. перев.*

** Апоптоз – механизм запрограммированной клеточной смерти, который существует в организме и позволяет уничтожать и обновлять клетки без развития воспаления или некроза. – *Прим. перев.*

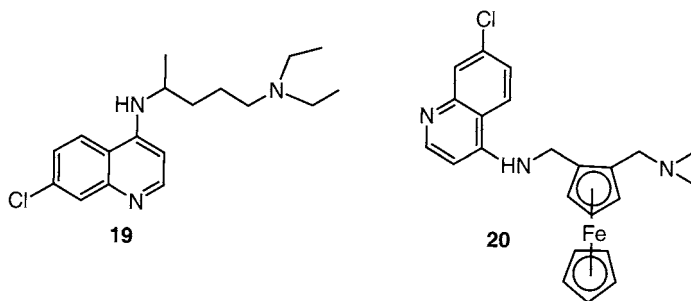


Схема 1.10. Структурные формулы хлорохина (19) и феррохина (20)

является возникновение резистентности возбудителя к нему. Удивительно, но в случае феррохина **20** этой проблемы нет. Фармацевтическая компания Sanofi-Aventis проводит в настоящее время клинические испытания феррохина [73].

Все последние достижения, включая также другие примеры, детально обсуждаются в гл. 3.

1.3. Токсикология и окружающая среда

В настоящей книге не будут подробно рассматриваться вопросы токсикологии металлоорганических соединений и вопросы их взаимодействия с окружающей средой, поскольку данные проблемы хорошо освещены в книгах Тэйера [44] и Крэйга [74] соответственно. Однако стоит отметить, что о токсичности металлоорганических соединений, например $\text{Ni}(\text{CO})_4$, стало известно сразу же после их открытия. В качестве примера все же приведем несколько исторически зафиксированных инцидентов.

Болезнь Минаматы – такое название получило отравление ртутьорганическими соединениями после первого массового случая этого типа, жертвами которого стали жители залива Минамата в Японии в 1953 г. Отравление было вызвано соединением ртути $\text{CH}_3\text{--Hg--SCH}_3$ [75], обнаруженном в съедобном моллюске *Hormona mutabilis*. Это ядовитое вещество содержалось в моллюсках только ниже по течению того места, где производились сбросы в воду промышленных отходов завода по производству ацетальдегида [76]. Из-за серьезных токсикологических проблем наиболее изученным с точки зрения биологии среди всех остальных металлоорганических соединений оказался метилмеркурхлорид [44].

Во время Первой мировой войны рассматривалась потенциальная возможность применения при газовой атаке органических производных мышьяка. Наиболее известным из них является люизит (Cl--CH=CH--AsCl_2) – отравляющее вещество кожно-нарывного действия, которое, однако, никогда не было использовано [77]. Исследования этого ядовитого вещества привели к разработке антидотов, среди которых наибольшее распространение получил

2,3-димеркаптопропанол [$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{SH})\text{--CH}_2\text{OH}$], известный как меркапрол или BAL (British Anti-Lewisite*). Действие этого препарата основано на связывании мышьяка с образованием растворимого в воде комплекса, который и выводится из организма [78, 79].

Одно из первых металлоорганических соединений, тетраэтилсвинец, который был впервые получен Лёвигом в Цюрихе [80], широко использовалось в качестве добавки к топливу до тех пор, пока не было выявлено его вредное воздействие на окружающую среду. Причастность тетраэтилсвинца в ряде случаев к загрязнению окружающей среды привело к запрету использования этого соединения [81]. Была исследована также токсикология (η^5 -метилциклопентадиенил)трикарбонилмарганца (ММТ). Это вещество разрешено в качестве добавки к топливу в некоторых районах стран Северной Америки.

Печальная история «сталинона» самым отрицательным образом сказалась на развитии биологического применения оловоорганических соединений. Как и болезнь Минаматы, эта история в значительной мере затормозила применение металлоорганических соединений в медицине. В 1954 г. во Франции под названием «сталинон» было изготовлено и поступило в продажу 4 миллиона капсул, предназначенных для лечения стафилококковой инфекции. Считалось, что эти капсулы содержат диэтилоловодиодид. Это был тот самый случай, когда лечение оказалось хуже самой болезни: 102 человека умерли и столько же было поражено различными неврологическими расстройствами. В последствии было установлено, что $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{SnI}_2$ и – даже в большей степени – $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{SnI}$ (присутствовавший в качестве примеси) обладают выраженной нейротоксичностью [82, 83].

Токсичность препятствовала развитию терапевтического применения металлоорганических соединений, хотя для производных кремния, фосфора и германия наблюдалась значительно более благоприятная тенденция [84–86]. Следует заметить, что непосредственное присоединение органических групп к металлу может привести к увеличению токсичности. Однако это соблюдается не всегда. Как было сказано выше, органические производные мышьяка менее токсичны, чем неорганические. Именно это обстоятельство позволило Эрлиху провести первое исследование в области химиотерапии.

Мы не можем закончить этот краткий исторический экскурс, не упомянув газа Гозию. В XIX в. в Германии стали появляться сообщения об отравлениях людей в комнатах, оклеенных обоями, которые были окрашены солями мышьяковой кислоты. В темных, плохо вентилируемых, сырых и заплесневелых помещениях обои могли выделять летучее дурно пахнущее соединение, содержащее мышьяк. Гозию предположил [87], что это токсичное вещество имеет формулу $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{AsH}$. Вопрос был решен Челленджером [88, 89], который установил, что газ является триметиларсином $(\text{CH}_3)_3\text{As}$, и понял, что его образование было вызвано деятельностью плесени с вовлечением

* Близким по структуре и действию к меркапролу является растворимый в воде отечественный препарат унитиол. – *Прим. перев.*

S-аденозилметионина. Челленджер предложил для этого процесса термин «биологическое метилирование», который впоследствии приобрел более широкое значение. Подобные процессы биологического метилирования с образованием токсичных металлоорганических соединений могут протекать с участием метилкобаламина. Та же проблема возникла для ртути и олова. В случае олова речь идет о применении оловоорганических соединений в составе средств, препятствующих обрастанию днища морского судна.

1.4. Биоаналитические методы, основанные на особых свойствах металлоорганических комплексов

Появление радиоиммуноанализа (RIA), непрямого аналитического метода, использующего радиоактивные трейсеры* и специфические антитела, было большим шагом вперед в 1960-х гг., благодаря работам Яллоу и Берсона [90, 91]. Развитие этого метода было решающим в истории анализа биологических объектов, поскольку позволило повысить чувствительность анализа, по крайней мере, в 1000 раз по сравнению с прямыми методами [92]. Использовать в этом плане металлоорганические соединения впервые предложили Гилл и Манн [93]. Эти авторы заинтересовались возможностью использовать ферроцен, меченный радиоактивным изотопом железа ^{59}Fe , который является смешанным β - и γ -излучателем с периодом полураспада 44,5 суток. Инъекция кроликам синтетического полипептида, меченного 2 или 16 ферроценильными группами, вызывала продукцию специфических антител на ферроцен, что, кстати, показало отсутствие токсичности у ферроцена и его устойчивость *in vivo*. Однако вскоре стало понятно, что использование радиоизотопов не лишено недостатков, в частности, малое время хранения меченых соединений, относительно небольшое число используемых изотопов и высокая стоимость. Проблемы были связаны также с риском для здоровья, что требовало жесткого контроля за препаратами и приводило к тому, что эти препараты могли использоваться лишь в небольшом числе специализированных аналитических лабораторий. Поэтому в начале 1970-х гг. получили развитие неизотопные методы, а именно, были разработаны иммунологические тесты, которые не требовали использования меченых атомов. Среди этих методов особое внимание привлекли методы ферментного, флуоресцентного и люминесцентного зондирования [94, 95]. При этом быстро стали понятны потенциальные возможности металло-зондов, не зависящие от того, в какой форме находится металл: коллоидов золота, хелатов редкоземельных металлов, обладающих

* Трейсером (от *англ.* tracer – следящее устройство) в иммуноанализе называется меченый (флуоресцентным красителем, радиоизотопом и т. п.) антиген (или гаптен), конкурирующий с немеченым антигеном (или гаптеном), находящимся в исследуемом образце, за ограниченное число центров связывания антител. Концентрация анализируемого вещества в пробе определяется степенью связывания трейсера с антителом. – *Прим. перев.*

интересными флуоресцентными свойствами, либо металлоорганических комплексов [96–98]. Так, Кейс еще в 1977 г. ввел термин «металлоиммуноанализ» (MIA), обозначающий иммуноанализ, использующий комплексы металлов в качестве трейсеров [96]. Некоторые из таких трейсеров обладают необычными физико-химическими свойствами, что позволяет анализировать их в пикомольных концентрациях, что и требуется от иммуноанализа. Кроме того, большие возможности синтетической металлоорганической химии делают доступными трейсеры, соответствующие большому числу определяемых соединений (аналитов) (см. табл. 8.1). Поскольку в гл. 8 дан полный обзор данных по этому вопросу, здесь достаточно привести лишь несколько примеров пионерских работ в этой области.

В середине 1980-х гг. получили развитие и нашли реальное применение первые три неизотопные разновидности иммуноанализа с использованием металлоорганических трейсеров. Эти разновидности анализа основаны на трех различных аналитических методах: атомно-абсорбционной спектроскопии, электрохимических методах и инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием (фурье-ИКС) [99–101]. Сам Кейс не довел до завершения работы по иммуноанализу с использованием атомной абсорбции, хотя и опробовал этот метод [102]. Бросье был первым, кто показал применимость данного подхода к анализу антидепрессантов [103] путем определения марганца в нортриптилиновом трейсере **21** (схема 1.1)

Этот метод, однако, недостаточно чувствителен, поскольку растворитель, используемый при проведении анализа, может быть загрязнен следами металлов. Поэтому дальнейшего развития этот подход не получил.

Напротив, все электрохимические методы анализа имеют высокую чувствительность, реализуются на дешевом (и достаточно миниатюрном) оборудовании и могут использоваться для непрозрачных сред. Достаточно быстро было установлено и получило соответствующую оценку особое электрохимическое поведение ферроцена, имеющего стабильно обратимый окислительно-восстановительный потенциал. Поэтому еще в 1986 г. Макнейл опубликовал остроумную методику опосредованного ферроценом амперометрического иммуноанализа лидокаина – препарата, используемого при лечении сердечной аритмии. В этой методике использовался ферроценильный трейсер лидокаина **22** [100]. Дегран и Лимож разработали другой вариант иммуноанализа, основанный на электрохимическом определении электроактивного катионного комплекса – кобальтоцениевого производного амфетамина **23** в сочетании с Нафионом,^{*} обладающего уникальными свойствами* [104]. Электрохимическое детектирование также лежит в основе работы ДНК-сенсоров и геносенсоров – нового семейства биосенсоров для определения патогенов, т. е. специфических генов, связанных с различными заболеваниями (см. гл. 9). Интересно отметить, что биосенсор этого типа e-СенсорTM, разработанный Фаркасом [105–107], уже поступил в торговую сеть. Принцип его работы показан на рис. 1.1.

* Нафион – полифторированный латекс, используемый в качестве электродной добавки. – Прим. перев.

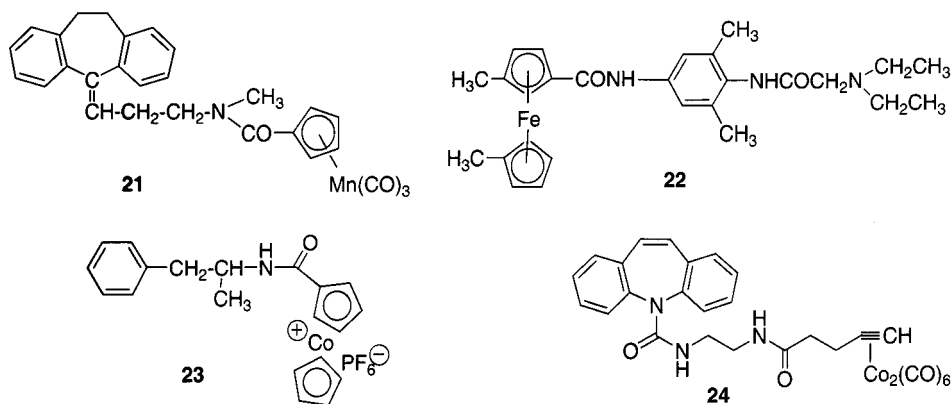


Схема 1.11. Примеры металлоорганических трейсеров, используемых в иммуноанализе: **21** – цимантренильный трейсер для нортриптилина, **22** – ферроценильный трейсер для лидокаина, **23** – кобальтоцениевый трейсер для амфетамина, **24** – алкиндикобальт-гексакарбонильный трейсер для карбамазепина

Другой препарат из этой серии – «ExacTech Pen» – производится фирмой Medisense Inc. Этот препарат с успехом используется для мониторинга уровня глюкозы у людей, страдающих диабетом. На электроде из пироли- тического графита иммобилизуют глюкозооксидазу (GOD). Ферроцениль- ный центр соединения **25** (схема 1.12) используется для обратимого обмена электронами между ферментом и электродом, поскольку соответствующий ион ферроценния* заменяет кислород в качестве кофактора GOD. Формаль- ный потенциал ферроцена зависит от заместителей в одном или обоих пятичленных кольцах, но процесс переноса электрона остается быстрым и обратимым [100].

Третий метод, основанный на инфракрасной спектроскопии, получил ак- тивное развитие в 1980-х гг., когда старое оборудование с применением дис- персий было вытеснено приборами с фурье-преобразованием (фурье-ИКС) и настольными компьютерами. Технический прогресс позволил использовать инфракрасную спектроскопию как надежный и чувствительный аналитиче- ский метод [108, 109]. Карбонилы металлов, в состав молекул которых входит фрагмент M–CO, являются одним из основных типов металлоорганических соединений (см. схему 1.1). Карбонилы были одними из первых метало- органических соединений, использованных в промышленных процессах

* В оригинале используется термин «феррициниевый ион». В соответствии с принятой в настоящее время номенклатурой, катион ферроцена, содержащий железо(III), следует называть ионом ферроценния. – *Прим. перев.*

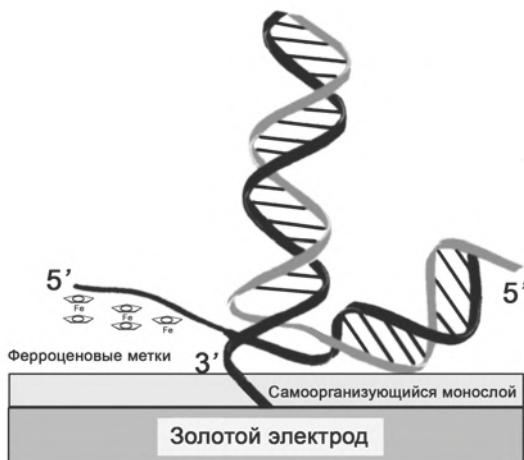


Рис. 1.1. Схематическое изображение системы для определения ДНК с помощью е-Сенсора™. На золотом электроде создается самоорганизующийся монослой. Для того чтобы было возможно электрохимическое определение, должны произойти две гибридизации ДНК. Первая – между зондом захвата (изображен черной линией, перпендикулярной электроду) и анализируемым объектом (например, ДНК вируса папилломы человека – изображена серой линией). Вторая гибридизация – между участком вблизи анализируемого объекта и меченым ферроценом сигнальным зондом (изображен черной линией, параллельной монослою) [106]

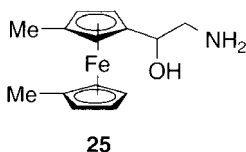


Схема 1.12. Производное ферроцена, используемое для мониторинга уровня глюкозы в крови

(Монд, Рёлен^{*}). Сравнительно недавно карбонилы металлов нашли новое применение (карбеновые комплексы Фишера). Эти соединения обладают уникальными спектральными свойствами в инфракрасной области (см. гл. 7). Действительно, в области частот около 2000 см^{-1} проявляются интенсивные полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям фрагмента М–СО. В этой частотной области не проявляются колебания никаких других функциональных групп, входящих в состав органических

^{*} Имеется в виду открытие Людвигом Мондом в 1890 г. карбонила никеля и открытие Отто Рёленом в 1938 г. катализируемого карбонилем кобальта процесса гидроформилирования алкенов. – *Прим. перев.*

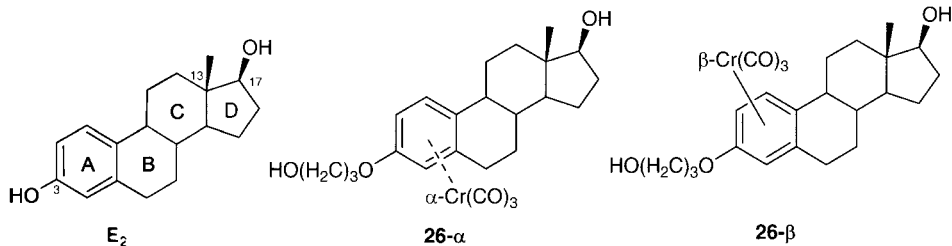


Схема 1.13. 17β-Эстрадиол (E_2), α- и β-бенхтренильные комплексы производного эстрадиола (26α и 26β соответственно) [110]

соединений*. Это отчетливо видно в спектре карбонильного комплекса хрома **26**, в котором характеристическим a_1 и e валентным колебаниям ν_{CO} фрагмента симметрии C_{3v} соответствуют полосы при частотах 1956 и 1876 см^{-1} (рис. 1.2). Эти полосы в 8–10 раз более интенсивны, чем любые другие полосы в спектре. Кроме того, они проявляются как раз в «окне поглощения» белков (рис. 1.3).

Это уникальное свойство и, в особенности, его аналитический потенциал впервые были показаны в 1985 г. для гормона, связанного с его специфическим рецептором [1, 2, 111]. Первоначальная идея состояла в том, чтобы получить комплекс, образованный за счет ароматического кольца эстрадиола с фрагментом Cr(CO)_3 (схема 1.13). Соответствующий комплекс был успешно синтезирован, но наличие в нем фенольной группы делает комплекс нестабильным и, следовательно, неприменимым в биологических средах. Более того, известно, что фенольная группа играет важную роль во взаимодействии гормона с его рецептором. Размещение группы OH дальше от ароматического кольца с помощью цепочки из 3 атомов углерода привело к получению двух стабильных диастереомерных комплексов **26α** и **26β**, в которых группа Cr(CO)_3 расположена на одной либо на другой стороне стероидного остова. Рецептор эстрогенов очень плохо распознает β-изомер, в котором фрагмент Cr(CO)_3 находится на той же стороне, что и группы 17β-OH и 13β- CH_3 (RBA = 1,8%), в то время как α-изомер распознается гораздо лучше (RBA = 28%). На сегодняшний день это единственный известный в литературе пример возможности дискриминации между α- и β-сторонами эстрадиола, которая проявляется на уровне кольца А.

Хотя количество рецептора эстрадиола в целевых тканях (рак матки, некоторые виды гормон-зависимого рака груди) мало (на уровне фмолей** в 1 мг белка), было возможно обнаружить характеристические полосы в фурье-ИК-спектре

* Ближайшими по частотным характеристикам являются валентные колебания тройной связи в терминальных алкинах, но интенсивность полос в этом случае очень мала. – Прим. перев.

** Фемтомоль – единица измерения концентрации; 1 наномоль = 10^6 фемтомольей. – Прим. перев.

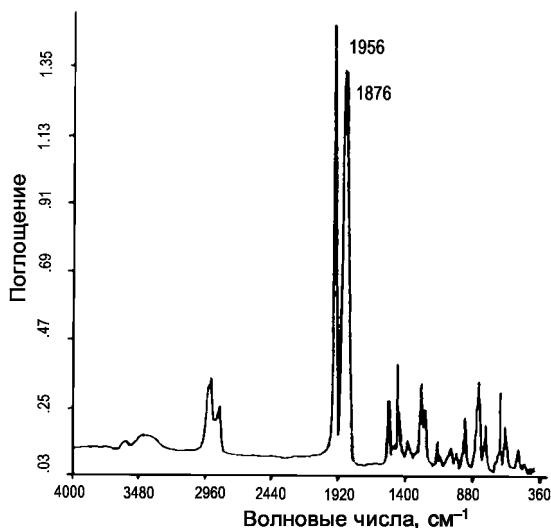


Рис. 1.2. ИК-спектр с фурье-преобразованием (фурье-ИК-спектр) комплекса **26a** в миникапсулах CsI [111]

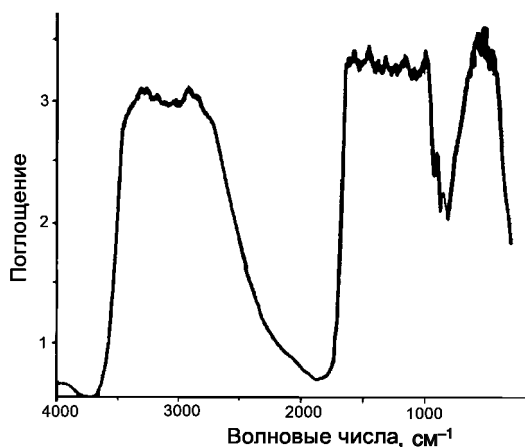


Рис. 1.3. Фурье-ИК-спектр миникапсул лиофилизированных белков (из маточного цитозоля), поглощение в относительных единицах, МСТ-приемник [1]

металлоорганического комплекса гормона **26a**, связанного с рецептором эстрогена, который содержался в цитозоле, осажденном из препарата матки овцы (рис. 1.4 и 1.5).

На этом уровне концентраций трудно было рассматривать возможность применения твердофазного количественного анализа. Однако для алкиндицикобальт-гексакарбонильного комплекса, такого как **24**, при использовании хлорированного растворителя и золотого световода ультрамалого объема можно достичь столь низкого предела обнаружения как 300 фмоль

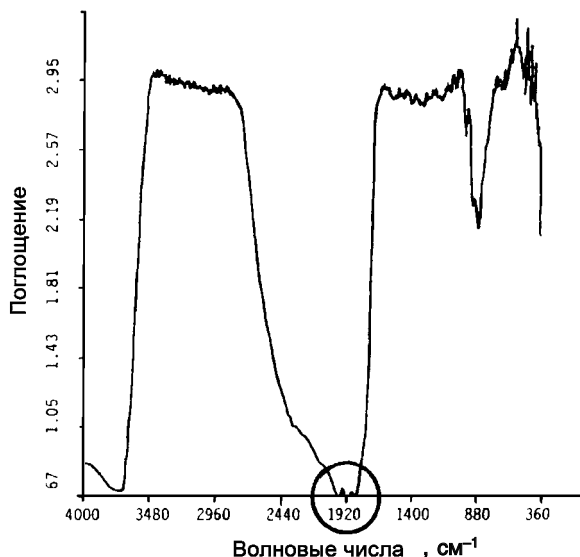


Рис. 1.4. Фурье-ИК-спектр маточного цитозоля овцы после инкубации с комплексом **26a** и последующего осаждения из раствора сульфатом протамина (поглощение в отн. ед., МСТ-приемник) [111]

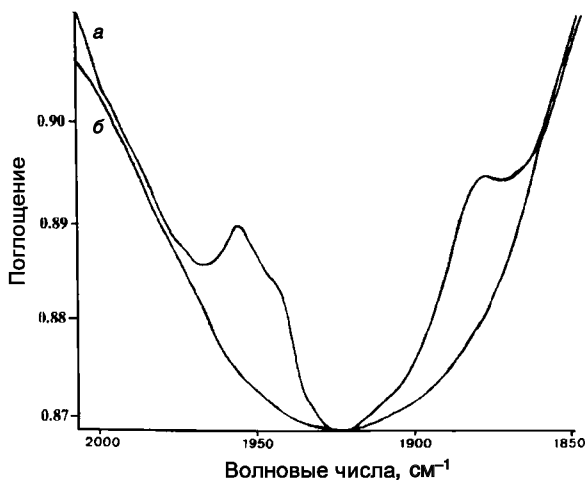


Рис. 1.5. Фурье-ИК-спектр маточного цитозоля овцы в области поглощения карбониллов металлов после инкубации: а – с 10 нМ комплекса **26a** и б – с 10 нМ комплекса **26a** с 500-кратным избытком эстрогена диэтилстильбэстрола (26 000 сканов, InSb-приемник) [110]

[108] – уровня, полностью соответствующего области чувствительности, требуемой для анализа многих медикаментозных средств, а также запрещенных к применению наркотиков. Такая возможность привела к развитию

метода СМИА* для анализа противоэпилептических лекарственных препаратов [101, 112–114] и кортизола [115]. В данном методе существует возможность одновременного проведения тройного иммуноанализа, благодаря четким и непрерывающимся полосам в ИК-спектре тщательно подобранных металло-зондов на базе карбониллов металлов [116]. Полосы валентных колебаний ν_{CO} в спектре можно смещать, меняя электронную плотность на атоме металла путем замещения связанных с металлом лигандов L или Cr^{**} [117]. Кроме того, сдвиг ν_{CO} может быть вызван изменением характера сольватации и другими эффектами, связанными с окружающими комплекс молекулами. Эти эффекты описаны в гл. 7.

1.5. Природные металлоорганические соединения и синтетические модели

Исторические «заслуги» металлоорганических соединений в происхождении Земли предполагаются давно. За последние несколько десятилетий были обнаружены сложные взаимосвязи на новом уровне.

В настоящее время считается, что наша планета образовалась 4,6 миллиарда лет тому назад. Недавно на острове Акилия (к юго-западу от Гренландии) были обнаружены самые древние осадочные породы, содержащие углерод биологического происхождения (что можно установить по изотопному составу, несколько отличному от пород минерального происхождения). Было установлено, что возраст этих пород составляет 3,85 миллиарда лет [118]. Это означает, что живые организмы, скорее всего, очень примитивные и, по-видимому, микроскопические по размерам, должны были циклически кратковременно появляться-исчезать на нашей планете, все еще подвергающейся интенсивному ультрафиолетовому облучению и не имеющей кислородной атмосферы. Простыми молекулами, которые в то время присутствовали на Земле, были: H_2 , CH_4 , H_2O , H_2S , N_2 , NH_3 , HCN , CO , CO_2 , которые образовывали восстановительную атмосферу, весьма подходящую для процессов с участием металлоорганических соединений [119]. Вопрос о том, как вспыхнула первая искра жизни, остается без ответа, но возможно, что в «мост» между неорганическим и биологическим мирами были включены сульфидные кластеры железа. В этом «мосту» вполне могло найтись место и металлоорганическим соединениям [120]. Известна способность FeS и NiS катализировать синтез ацетилметилсульфида из CO и диметилсульфида, входящих в состав гидротермальных источников. Этот факт свидетельствует в пользу того, что пребиотические синтезы могли происходить во внутреннем пространстве своеобразных ячеек с металлосульфидными стенками. При этом образовывались достаточные концентрации реагентов для обеспечения перехода от геохимии к биохимии [121].

Переходя к современности, надо сказать, что исследования соединений со связями углерод–металл в природных системах развивались медленно и лишь

* СМИА – Carbonyl Metalloimmuno Assay. – Прим. перев.

** Cr – циклопентадиенил. – Прим. перев.

постепенно утвердились как самостоятельное направление [23, 122]. Исторически здесь первое место принадлежит витамину B_{12} , его коферменту и метилкобаламину [16, 123, 124]. Долгое время считалось, что в живой природе существуют только эти соединения со связью металл–углерод. История начинается с наблюдения, что сырая печень является единственным средством лечения злокачественной анемии – заболевания, которое без применения этого средства приводит к летальному исходу. Активное вещество, выделенное из печени путем экстракции, впервые было получено в индивидуальном, а затем и в кристаллическом состоянии в 1948 г. Дороти Ходжкин впервые установила кристаллографическую структуру цианокобаламина с тетрапиррольным лигандом корринового типа, расположенным в горизонтальной* плоскости. В зависимости от конкретного случая, одно из аксиальных положений может занимать связанный через атом углерода органический лиганд (метильная группа в случае метилкобаламина, аденозил в случае кофермента витамина B_{12}) – см. схему 1.14.

Установление структуры витамина B_{12} действительно было проявлением мастерства экспериментаторов в начальном периоде развития рентгеноструктурного анализа и оценено присуждением Дороти Ходжкин Нобелевской премии в 1964 г. Кофермент B_{12} действует совместно с многими ферментами, которые катализируют реакции трех основных типов. К одному из них относятся реакции, в которых меняются местами два соседних заместителя –X и –H. Эти реакции катализируются изомеразам. В реакциях другого типа происходит метилирование субстрата под действием метилкобаламина, например, превращение гомоцистеина в метионин. Наконец, витамин B_{12} участвует в превращении фуранозного кольца рибозы в кольцо дезоксирибозы, которое встречается в нуклеотидах. Кофермент B_{12} нужен в небольших количествах: в организме человека он присутствует в количестве 2–5 мг. Одним из первых признаков его недостаточности является неспособность организма образовывать эритроциты – красные кровяные клетки.

Кофермент B_{12} , содержащий связь кобальт(III)–алкил, может выступать в роли природного реактива Гриньяра (источник анионов R_3C^-), реагента Меервейна** (источник катионов R_3C^+) или служить источником радикальных частиц R_3C^{\bullet} (последние встречаются в важных 1,2-перегруппировках, например, глутаминовой кислоты). Природные функции кофермента B_{12} составляют одну из наиболее изученных областей бионеорганической химии (схема 1.15) и поэтому не будут рассмотрены в настоящей книге.

Были разработаны многие модели витамина B_{12} , например, кобалоксимы Шрауцера [125]. Метилкобаламин является реагентом, способным реагировать с соединениями металлов с образованием метильных производных, например, $[CH_3Hg]^+$ (схема 1.16). Интересно отметить, что некоторые бактерии (вырабатывающие меркур-лиазы***) могут расщеплять связь ртуть–углерод.

* Точнее в экваториальной плоскости, перпендикулярной линии, на которой расположены цианогруппа, атом кобальта и атом азота бензимидазольного фрагмента. – *Прим. перев.*

** То есть алкилирующего агента. – *Прим. перев.*

*** Точнее, алкилмеркур-лиазы – ферменты, расщепляющие связь алкил–ртуть. – *Прим. перев.*

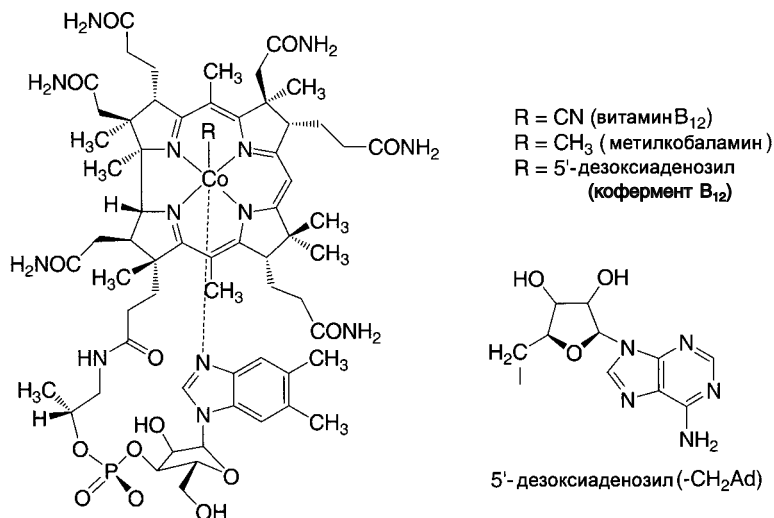
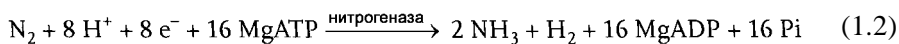


Схема 1.14. Витамин B_{12} , метилкобаламин и кофермент B_{12}

Этот тип расщепления связи, а также восстановление металлоорганических соединений биокатализаторами рассмотрен в обзоре Рябова [4].

Хотя кофермент B_{12} все еще привлекает к себе интерес [126–128], исследования последних лет сосредоточились на кофакторах других металлосо-державших ферментов. Некоторые из этих кофакторов своими удивительными свойствами обязаны не до конца понятной реакционной способности, обусловленной их металлоорганической природой. Одним из ключевых моментов успеха в этом направлении были структурные методы. Здесь можно сослаться на установление структуры активных сайтов нитрогеназы [129, 130], гидрогеназы и CO -дегидрогеназы/ацетил-коэнзим А-синтазы [131–134]. В настоящей книге Дж. Фонтецийе-Камп, одна из лидеров в этой области, написала обзор последних достижений, касающихся механизмов (гл. 11), а Т. Роушфусс и Р. Линк сосредоточились на металлоорганических моделях – аналогах биологических систем (гл. 12). Эти два направления сейчас с заметным успехом развиваются параллельно, дополняя друг друга.

Нитрогеназа благодаря своей способности в мягких условиях синтезировать NH_3 (уравнение (1.2)) долгое время является предметом изучения в области металлоорганической химии.



Жесткие условия процесса Габера* производства аммиака с применением катализатора на основе железа хорошо известны. Кроме этого, известно,

* Фриц Габер (1868–1934) – немецкий химик; совместно с К. Бошем разработал промышленный синтез аммиака на железных катализаторах. – *Прим. перев.*

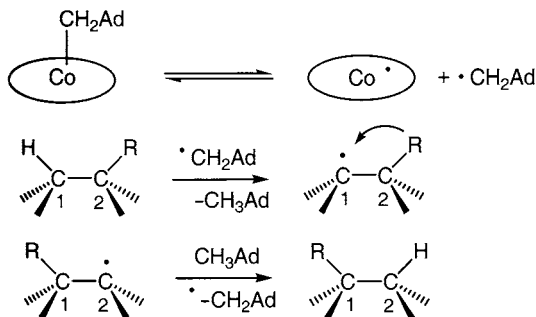
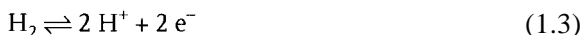


Схема 1.15. 1,2-Перегруппировка, катализируемая коферментом B₁₂

что молекулярный азот не лучший лиганд для образования связи с металлом. Первым комплексом с молекулярным азотом, для которого была определена структура, был $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{N}_2)]^{2+}$, полученный Алленом и Сеноффом в Торонто лишь в 1960-х гг. [135]. Смелые и успешные попытки синтетиков активировать молекулярный азот с помощью металлоорганических соединений были предприняты и другими исследователями: группой Шилова в России, а также Чаттом и Широком [136–140]. Несмотря на проведенные структурные исследования с разрешением порядка 1 \AA , все еще не полностью понятно ни то, как водород восстанавливается нитрогеназой, ни даже то, как он первоначально связывается с FeMo-кофактором. Большинство мнений сходится на предположении о том, что связывание и восстановление азота происходят на одной из сторон кластера Fe_4S_4 .

Гидрогеназы подразделяются на два основных семейства: содержащие железо и никель (Ni–Fe-ферменты) и содержащие только железо (Fe–Fe-ферменты). Действие ферментов первого семейства направлено в основном на окисление водорода, а ферменты второго семейства участвуют в образовании H_2 . Последний аспект представляет интерес в контексте новых источников топлива.

Происходящие химические реакции можно выразить следующим уравнением:



Этот класс ферментов впервые был описан в 1931 г. Стефенсоном и Стикландом [141]. В статье, опубликованной в 1995 г., сообщалось об установлении структуры фермента Ni–Fe-гидрогеназы из *Desulfovibrio gigas** методом рентгеноструктурного анализа [142, 143]. В качестве примеров интересных структурных особенностей этого фермента можно привести следующие: наличие активного гетеробиметаллического Fe–Ni-сайта, лигандов CO и CN, связанных с атомом железа, и железосульфидных кластеров в одной из субъединиц димера. Гидрогеназа, содержащая только атомы железа, эволюционно

* Бактерия, выделенная из шлама установок по переработке сточных вод. – Прим. перев.

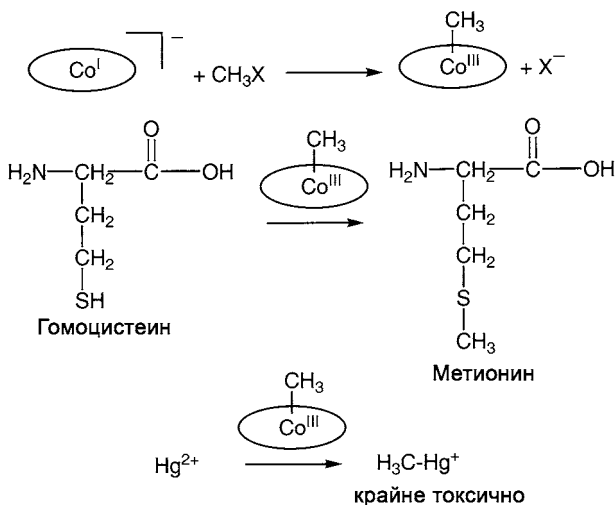


Схема 1.16. Биометилирование с помощью метилкобаламина

отлична от Ni-Fe-гидрогеназы, но у этих ферментов все же есть некие общие черты, например, наличие лигандов CO и CN. Концептуально интересное строение *Cl. pasteurianum* (Cp) [144] и *Desulfovibrio desulfuricans* [145–147] сфокусировало исследовательскую работу на молекулярных моделях. Вопрос о том, насколько это уместно, остается открытым, но ситуация постепенно изменяется к лучшему [4, 148–154]. У родоначальных комплексов $(\text{OC})_3\text{Fe}(\mu\text{-SR})_2\text{Fe}(\text{CO})_3$ долгая и продолжающаяся по сей день история [155–164], которая началась 75 лет тому назад (схема 1.17).

Природную эволюцию CO-мобилизованного сульфида железа, которая привела к [Fe]-гидрогеназам, можно уподобить биомиметическим синтезам, осуществленным за последние 60 лет. Большой интерес к химии металлоорганических соединений, содержащих серу, в настоящее время по большей части основывается на выгодном положении биологии, экономический потенциал которой начинает реализовываться [150]. Последняя модель молекулы Fe-Fe-гидрогеназы – это действительно результат мастерства экспериментаторов, связавших малый Fe-Fe-кластер с большим Fe_4S_4 -кластером мостиковой цистеинильной группой [165]. Мы уже говорили о том, что реакции металлоорганических ферментов в природе обычно протекают в анаэробных условиях, точно так же, как для химика-металлоорганика привычно проводить реакции при полном исключении доступа кислорода.

Бактериальный металлофермент ацетил-коэнзимА-синтаза/CO-дегидрогеназа (ACS/CODH) катализирует два очень важных биохимических процесса: 1) восстановление атмосферного CO_2 до CO и 2) синтез ацетил-коэнзима А из CO, метильной группы (из метилированного корриноидного комплекса железа, связанного с белком) и HS-CoA [166–168]. Этот бифункциональный фермент является ключевым в анаэробном пути фиксации CO_2 по Вуду–Льюнгдалу (схема 1.18) и главным участником круговорота углерода

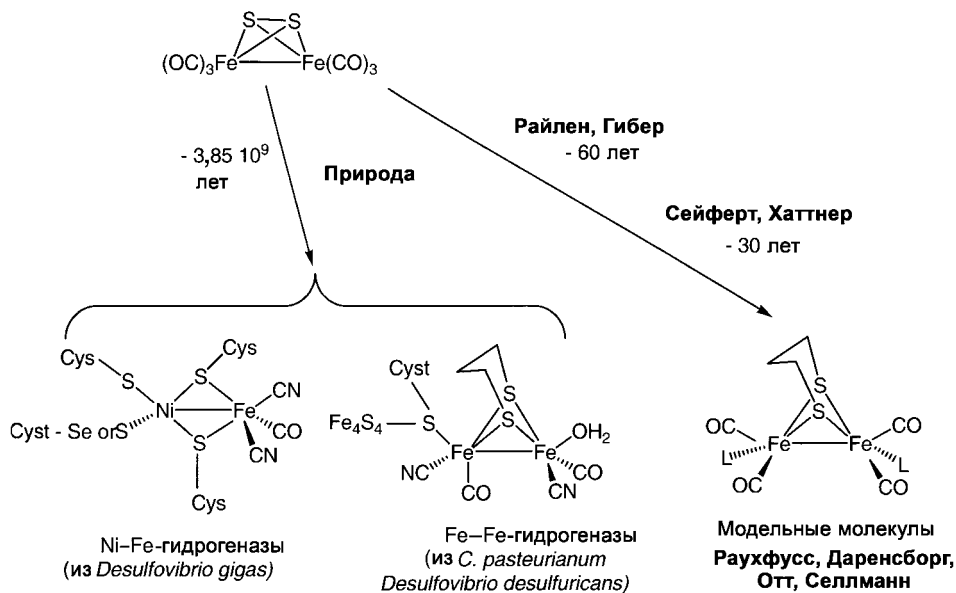
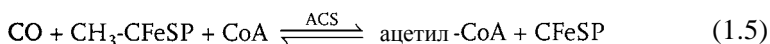
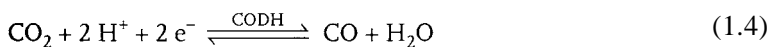


Схема 1.17. Эволюция CO-мобилизованного сульфида железа в активные сайты Fe-Fe-гидрогеназ и Ni-Fe-гидрогеназ (заимствовано из [148])

на Земле. Реакции, катализируемые CODH и ACS, показаны ниже в уравнениях (1.4) и (1.5).



В этих реакциях видно сходство с другими хорошо известными каталитическими процессами с участием металлоорганических соединений. Тауэр, пионер исследований никельсодержащих ферментов, в своих лекциях подчеркивал аналогию между биохимией бактерий, в которой участвуют металлоорганические соединения, и промышленными процессами Реппе и Монсанто производства уксусной кислоты. Во всех этих процессах участвуют связи металл-CO, металл-метил и металл-ацетил [169]. В процессе Монсанто реакция карбонилирования дает CH_3COI , который быстро реагирует с водой с образованием CH_3COOH . В биологических системах сложный тиозфир** также неустойчив в водной среде и легко гидролизуется.

Природа активного сайта ACS недавно была предметом многочисленных споров [131, 132, 170, 171]. Сейчас установлено, что этот сайт содержит два атома никеля [131], хотя механизм его работы все еще дискутируется

* По отношению к кластеру Fe_4S_4 . – Прим. перев.

** Имеется в виду ацетил-CoA. – Прим. перев.

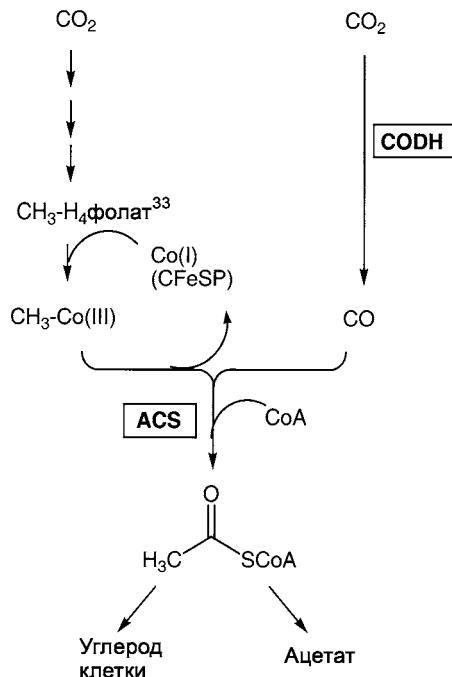


Схема 1.18. Диаграмма пути Вуда–Льюнгадала, используемого в одноуглеродном метаболизме анаэробных организмов [167]. CODH обозначает СО-дегидрогеназу, а ASC – ацетил-КоА-синтазу (заимствовано из [134])

[172]. Обзор ситуации на сегодня дан в статьях Хегга [134, 173]. Моментами, которые должны быть прояснены, являются *inter alia** последовательность внедрения фрагментов CO и CH₃, механизм миграции группы CH₃, природа источника электронов, степень окисления атома никеля (схема 1.19), а также вопрос о том, содержит реакционный сайт один или два атома никеля. Фонтецийе предполагает, что в процессе участвуют соединения Ni(0) и реакционный сайт содержит один атом металла [131] Вэхтерсоейром [174] был предложен родственный механизм образования активированного тиоэфира CH₃-C(CO)-SCH₃ из CO и CH₃SH на поверхности соосажденных NiS и FeS. Данное сочетание с образованием связи C–C можно рассматривать как модельную реакцию для пребиотического образования активированной уксусной кислоты при возникновении жизни. Недавно Вейганд, Крейзель и др. [156] наблюдали образование аммиака из азота и сероводорода на поверхности FeS, причем при атмосферном давлении азота. Это важная модельная реакция для пребиотического процесса образования аммиака.

Другой пример близкой аналогии между биохимией и металлоорганической химией представляет собой СО-дегидрогеназа (CODH), которая играет

* Между прочим (лат.). – Прим. перев.

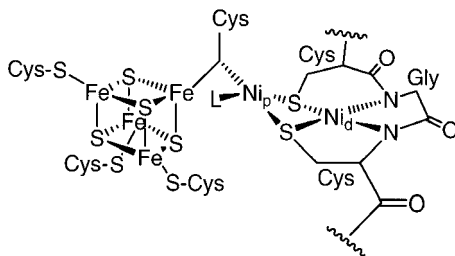
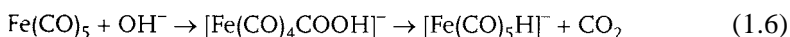


Схема 1.19. Схематическое изображение активного сайта ацетил-коэнзим А-синтазы (ACS). В положении, удаленном от кластера Fe_4S_4 , находится ион Ni(II) в плоско-квадратном лигандном окружении (Ni_d). Значимый для катализа другой ион никеля (Ni_p) находится в проксимальном положении, но его степень окисления неизвестна. Координационное окружение атома (Ni_p) дополняется неизвестным экзогенным лигандом L (заимствовано из [134]).

важную экологическую роль [175]. Почвенные микроорганизмы используют СО в качестве источника углерода и энергии и с помощью CODH могут удалять этот токсичный газ из окружающей среды со скоростью $3 \cdot 10^8$ тонн в год. По аналогии с синтезом карбонилгидридов по Гиберу*, предполагают, что гидроксид-ион (с поверхности железа) атакует СО-лиганд, координированный атомом Ni, давая металлокарбоную кислоту, которая разлагается с образованием CO_2 [133]. Собственно реакция Гибера включает взаимодействие Fe(CO)_5 с гидроксид-ионом [176]:



Эта реакция была опубликована в 1932 г. и привела к синтезу первого карбонилгидрида металла $\text{H}_2\text{Fe(CO)}_4$. Реакция Гибера впервые была интерпретирована Круком [177] и в настоящее время положена в основу механизма катализируемого металлом процесса образования водяного газа (уравнение 1.7).

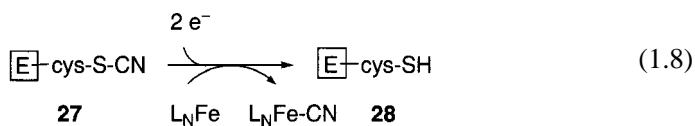


Двадцать пять лет тому назад Тауэр [178] сообщил о том, что деятельность бактерий, вырабатывающих метан (из H_2 и CO_2), регулирует микротрубочка, содержащая никель. Это наблюдение, в конце концов, привело к выделению из метаногенных бактерий макроциклических комплексов никеля (кофактор F_{430}), лигандом в которых является восстановленный порфириноподобный цикл [179]. Активный фермент содержит атом Ni(I) , к которому может происходить окислительное присоединение метильных групп. Высвобождение метана происходит при протонировании фрагмента Ni-CH_3 . Известно большое число примеров присоединения метилирующих агентов к металлам в низких

* В англоязычной литературе – «Hieber base reaction». Вальтер Гибер (1895–1976) – немецкий химик, известен своим вкладом в химию карбониллов металлов. – *Прим. перев.*

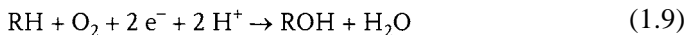
степенях окисления; образование метана из метильных производных металлов также хорошо известно [180]. Важность микроорганизмов, вырабатывающих метан, следует уже из того, что эти микроорганизмы поставляют в атмосферу 10^9 тонн метана в год. Имеются также сообщения об анаэробном окислении метана [1796].

Поиск хороших моделей металлоорганических соединений, способных учитывать поведение металлоферментов, остается насущной задачей химика, работающего в данной области. В настоящее время ключевым моментом обсуждения часто является само соответствие выбранной модели изучаемому процессу. Однако начинают возникать новые междисциплинарные подходы, и их сложность может служить новым источником вдохновения для исследований. Например, Бёк недавно сформулировал следующий вопрос: «Как Природа «приручила» токсичные лиганды CO и CN^- для того, чтобы фиксировать их на атомах железа гидрогеназы?» [181]. Бёк показал, что в процессе биосинтеза цианидных лигандов на Ni-Fe-гидрогеназах ион CN^- никогда не появляется в свободном состоянии. Ключевой стадией после синтеза **27** с последующим синтезом **28** (уравнение (1.8)) является химический перенос группы CN к активному центру белка Ni-Fe-гидрогеназы (L_N в уравнении изображает координационную сферу активного сайта).



Сначала происходит транспортировка тиоцианатной группы к активному центру, и далее перенос электрофильного фрагмента CN к нуклеофильному центру – атому железа (или наоборот), что приводит к образованию структурному фрагменту Fe-CN в ферменте. Эта плодотворная работа Бёка потребовала комбинированного подхода: использования радиоизотопных меток, масс-спектрометрии и моделирования реакций. Так, обработка фенилтиоцианата комплексом $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})_2\text{Br}]$ с хорошим выходом в мягких условиях приводит к комплексу $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})_2\text{CN}]$ [15].

Моноксигеназы – широко распространенные ферменты, которые участвуют в активации молекулы O_2 . При этом один из атомов кислорода внедряется в окисляемый субстрат и образуется вода в соответствии с уравнением (1.9). В процессе участвуют два электрона и два протона.



В состав большого числа моноксигеназ входит гем-содержащий белок, называемый цитохромом P-450, который и служит активным центром для молекулы кислорода. Такие цитохром-P-450-зависимые моноксигеназы вовлечены во многие стадии биосинтеза и биodeградации эндогенных соединений, таких как стероиды, жирные кислоты, простагландины и лейкотриены. Они также играют ключевую роль в окислительном метаболизме экзогенных соединений, таких как лекарственные препараты и другие вещества из окружающей среды,

способствуя их удалению из живых организмов. Вследствие широкого распространения в живых организмах и очень важной роли в биохимии, фармакологии и токсикологии, цитохромы P-450 являются предметом многочисленных исследований в течение последних 20 лет [182, 183]. По этой причине изложение химии цитохромов P-450 как металлоорганических соединений можно найти во многих источниках, и здесь мы ее касаться не будем. Начало химии цитохромов было положено в работах Д. Мансуи по карбеновым комплексам порфириновых производных железа [6] и Р. Гиларда по σ -алкильным комплексам [184]. Наиболее важные работы в этой области см. [185–191].

Атом железа в цитохроме P-450 и порфиринах железа проявляет способность образовывать стабильные комплексы с нитренами и карбенами, которые являются формальными эквивалентами оксокомплексов железа. Многие карбеновые комплексы железа $\text{Fe}=\text{CRR}'$ были получены либо восстановлением *in situ* полигалогенированных производных порфиринов железа(II) в присутствии избытка восстанавливающего агента, либо реакцией порфиринов железа(II) с некоторыми предшественниками карбенов, такими как диазосоединения. Было найдено, что к немногим металлопорфиринам, способным давать устойчивые металл-карбеновые комплексы указанного выше типа, относятся порфирины Ru и Os. Напротив, порфирины Ni(II), Co(II) и Rh(III) образуют лишь мостиковые карбеновые комплексы при взаимодействии с донорами карбенов. Образование этих комплексов формально является результатом внедрения карбена по связи металл-азот (пиррольный). Другие модельные реакции указывают на важность металлоорганических производных цитохрома P-450, где могут возникать также σ -связи металл-углерод.

Большое число соединений, молекулы которых содержат связь углерод-галоген, такие как CCl_4 , CF_3CHClBr (анестетик, называемый галотаном), бензилгалогениды и т. д., образуют карбеновые или σ -комплексы, в зависимости от природы реагента. Цитохром P-450 может образовывать также металлоорганические комплексы других типов, возникающие как интермедиаты в процессе окисления различных субстратов, например, при эпоксидировании пропена. Наконец, модельные системы на основе комплексов Fe и Mn являются эффективными катализаторами окисления, устойчивыми к некоторым лекарственным препаратам и ксенобиотикам. Такие комплексы используются в тонком органическом синтезе (схема 1.20).

1.6. Металлоорганическая химия и водные растворители

Совместимость металлоорганических соединений с водой, важнейшим биологическим растворителем, является одним из условий прогресса в рассматриваемой здесь области знаний. Это было четко показано в случае анаэробных металлоферментов. От химиков это условие потребовало изменения «культуры мышления», даже несмотря на то что коммерчески доступны водорастворимые «оксокатализаторы» на основе комплексов Ru с таким лигандом, как $\text{P}(\text{m-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})_3$. Металлоорганическая химия в водной среде [192] – это

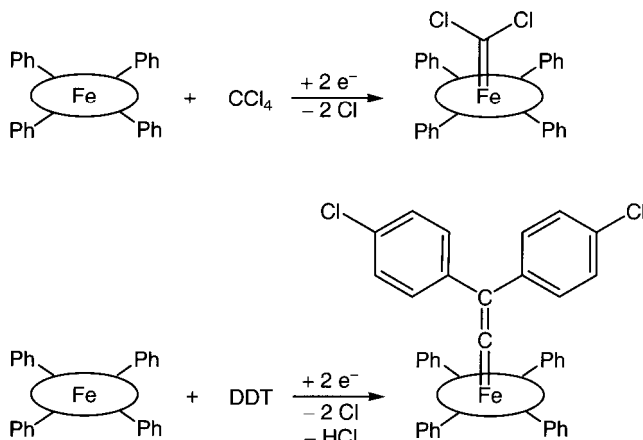


Схема 1.20. Комплекс (тетрафенилпорфирин)Fe=CCl₂ был получен исходя из (TPP) Fe и CCl₄ в присутствии восстановителя; сообщалось также о карбеновом комплексе железа, полученном из ДДТ

новая и интересная область, которая включает в себя исследования в различных дисциплинах: от науки о жизни до катализа [198]. Важность требования совместимости с водной средой особенно хорошо видна на примере металлоорганических радиофармацевтических препаратов. Данному вопросу посвящена гл. 4, которую написал Р. Альберто – один из ведущих исследователей в этой области.

Здесь же мы напомним всего о двух достижениях в области радиофармацевтических препаратов за последние несколько лет. Яркий пример металлоорганического фармацевтического препарата, который был успешно внедрен в производство – это технеций-^{99m} сестамиби* – гексакисалкилизотиоцианидный комплекс ⁹⁹Tc(I) **29**, который стал наиболее важным агентом для визуализации миокарда. Успех этого соединения, известного под торговым названием Кардиолит®, вдохновил исследователей на создание новых радиофармацевтических препаратов на основе изотопа ⁹⁹Tc [193–197].

Получение биоактивных металлоорганических соединений, содержащих ⁹⁹Tc, должно происходить в воде исходя из легкодоступного предшественника [⁹⁹TcO₄]⁻, а синтез должен быть непродолжительным по времени, поскольку период полураспада изотопа ⁹⁹Tc составляет примерно 6 ч. Кроме того, синтез должен проходить с количественным выходом и так, чтобы полученные растворы были готовыми для проведения инъекции пациенту.

Альберто разработал прямой метод превращения [⁹⁹TcO₄]⁻ в комплексный ион [⁹⁹Tc(OH)₂(CO)₃]⁺ **30**, который привлек большой интерес как универсальный предшественник радиофармацевтических препаратов на базе ⁹⁹Tc. Этот устойчивый к действию воды и воздуха аквакарбонильный комплекс

* Принятое в нашей стране название – ^{99m}Tc-технетрил. – Прим. перев.

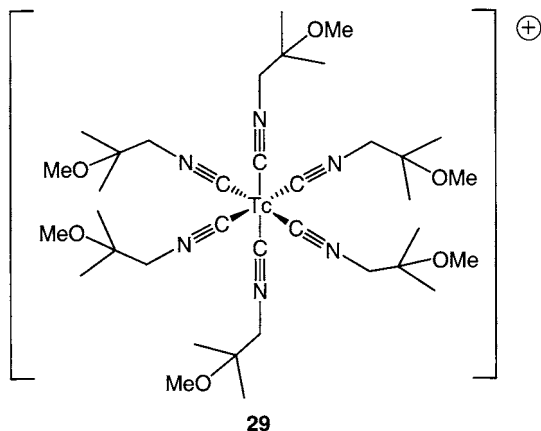


Схема 1.21. Молекулярная структура ^{99m}Tc -сестамиби (Кардиолиит® 29)

30 содержит три лабильных лиганда – молекулы воды. Их легко можно заместить на различные органические лиганды, обеспечивая тем самым доступ к семейству карбонильных комплексов, которые можно использовать в биологии и в медицине [198–202].

Что касается металлоорганических производных аминокислот, модифицированных ими пептидов и, более того, белков и углеводов, – растворимость этих веществ в воде является характеристикой первостепенной важности с точки зрения их использования.

Первое сообщение о металлоорганическом соединении, содержащем фрагмент α -аминокислоты – $\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{цистеинат})_2$, было сделано Кремером в 1929 г. [203]. Этот комплекс позже был охарактеризован Шубертом [204]. Первая аминокислота, содержащая ферроценильную группу, была получена еще в 1957 г. Шлэглем [205], а также Посоном. Исчерпывающий обзор по ферроценильным производным биологически важных соединений можно найти в работе [207]. Пионерская работа Шлэгля была затем развита Сергерэтом и Тартаром [208], а также другими исследователями [7, 209]. Гибер и др. [210] использовали комплексы с мостиковыми атомами галогена $[\text{M}(\text{NO})_2\text{Br}]_2$ и аминокислоты для синтеза соответствующих N,O-аминокарбоксилатов. Реакция комплексов с мостиковыми атомами галогена оказалась крайне полезной для получения многих металлоорганических комплексов с биолигандами [7, 209]. Среди первых полученных металлоорганических комплексов α -аминокислот были комплексы палладия и платины $(\text{NH}_2\text{CHRCOO})\text{Pd}(\text{аллил})$ [211] и $[(\text{NH}_2\text{CHRCOO})\text{Pt}(\text{Cl})(\text{олефин})]$, полусэндвичевые комплексы с α -аминокарбоксилатным лигандом $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{NH}_2\text{CHRCOO})\text{Mo}(\eta^3\text{-аллил})]$ [212], и $\text{CpMo}(\text{CO})_2(\text{NH}_2\text{CHRCOO})^*$ [214], а также комплексы $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{NH}_2\text{CHRCOO})]^+$ [215] и $(\text{NH}_2\text{CHRCOO})_2\text{Rh}(\text{диен})$ [216]. Шелдрик

* Cp – $(\eta^5\text{-циклопентадиенил})$. – Прим. перев.

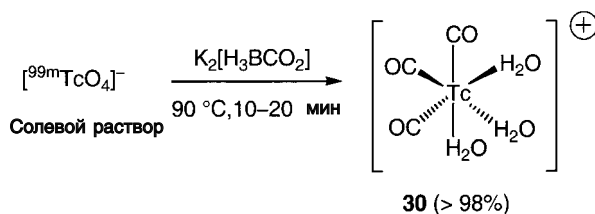


Схема 1.22. Одностадийный синтез реагента Альберто (**30**)

и Гиб [217], как и группы Кармоны, Гротьяна, Вернера и Бека [7], успешно получили и охарактеризовали структуры полусэндвичевых комплексов α -аминокислот и коротких пептидов. В этих комплексах «бруннеровского типа» [218] металл является хиральным центром, так что в случае оптически активных α -аминокислот получаются диастереомеры (схема 1.23).

Данные по комплексам карбониллов металлов с лигандами биологического происхождения (аминокислотами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями*), которые были описаны до 1985 г., представлены в обзоре Иогансона [219], а по металлоорганической химии аминокислот и коротких пептидов – в обзоре Бека, Бергса и Северина [7]. Группа Бека в Мюнхене опубликовала более 150 статей в этой области; один пример из этих работ приведен на схеме 1.24. В гл. 5 и 6 даны дополнительные примеры металлоорганических производных пептидов и белков, синтезированных для химических, биохимических и биологических исследований.

К первым металлоорганическим комплексам с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями относится серия комплексов, образованных карбонилами металлов [220–222]. Структуры родиевых комплексов такого типа с мостиковыми азотистыми основаниями были установлены Шелдриком [223], который также получил серию полусэндвичевых комплексов рутения с пуриновыми основаниями (схема 1.25) [224–226].

В большинстве первоначальных работ с биолигандами целью был собственно синтез, в них не ставилась цель биологического применения. Однако они проложили путь для последующих исследований. Так, ионные аминокислотные производные титаноцена $[\text{Cr}_2\text{Ti}(\text{NH}_2\text{CH(R)COO})_2]^+$ проявляют противоопухолевую активность [227, 228], хотя и меньшую чем Cr_2TiCl_2 [227]. Недавно Садлер и др. [229] изучили противоопухолевую активность металлоорганических комплексов рутения, которую впервые наблюдал Шелдрик [230]. В гл. 10 есть и другие примеры комплексов с азотистыми гетероциклами, которые проявляют необычную способность распознавания типа «гость – хозяин» на супрамолекулярном уровне.

* Авторы используют термин «nucleobases», что неоправданно. Азотистые гетероциклы, входящие в состав нуклеиновых кислот, не принято называть нуклеиновыми основаниями. – *Прим. перев.*

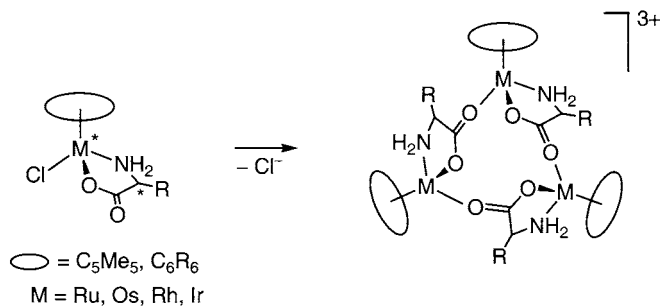


Схема 1.23. Тримеризация комплексов металлов с аминокислотами

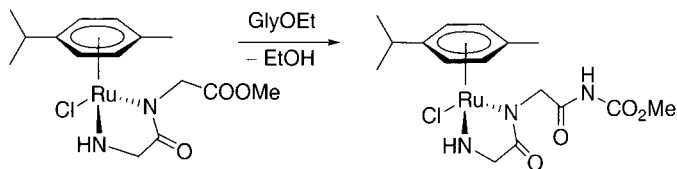


Схема 1.24. Металлоорганические комплексы ди- и триглицина

Среди первых комплексов углеводов с переходными металлами (исключая соединения Hg^*), в молекулах которых имеются σ -связи металл–углерод, были комплексы, образованные карбонилем кобальта, а также фрагментом $\text{CrFe}(\text{CO})_2$ [231–234]. Такие комплексы изучались как интермедиаты в реакциях окисгенирования ненасыщенных сахаров [235–237]. Позже были синтезированы карбеновые комплексы металлов, содержащие углеводы [238–242]. В серии работ Дётца и др. [12, 243] сообщалось о введении функциональных фрагментов «типа карбенов Фишера» в углеводы с использованием большого числа различных синтетических подходов. Полученные Дётцем комплексы могут быть использованы для модификации сахаров. Циклопентадиенильные комплексы титана с хиральными σ -координированными лигандами – производные глюкозы – применяются в качестве стереоселективных реагентов в органическом синтезе [244, 245]. Большое число хиральных лигандов – производных углеводов, в основном фосфины, используются в асимметрическом катализе [246–248]. Оказалось, что катион триметилплатины очень хорошо подходит для координации с незащищенными моносахаридами (схема 1.26) [248].

Еще один аспект, родственньй проблеме совместимости воды и металлоорганических соединений, был развит Фишем, который является автором гл. 10. В частности, Фиш попробовал преодолеть трудности, возникающие в биокатализе, которые связаны с регенерацией кофактора. По крайней мере, треть из всех известных ферментов, катализирующих окисление или восстановление, нуждается в кофакторах, таких как NAD^+ (никотинамид-адениндинуклеотид) и его восстановленная форма 1,4-NADH. Однако эти

* Здесь авторы неточны: ртуть не относится к переходным металлам. – Прим. перев.

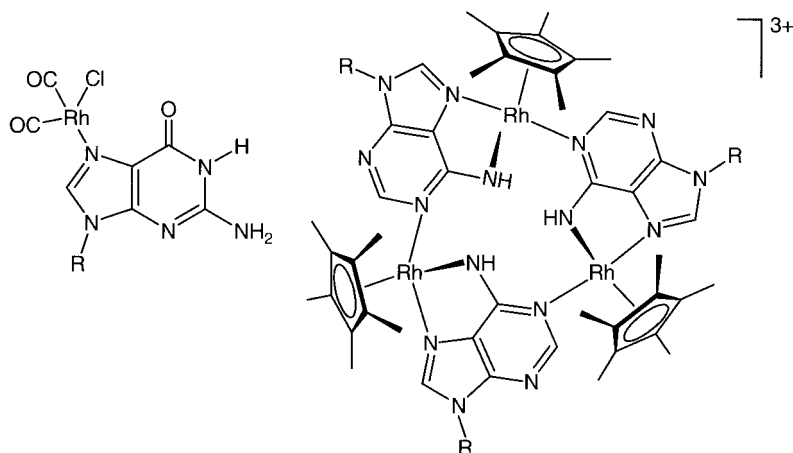


Схема 1.25. Комплексы родия с пуриновыми основаниями: моноядерный комплекс с гуанином (слева) и катионный трехядерный с аденином (справа)

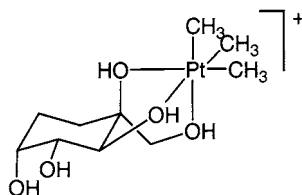
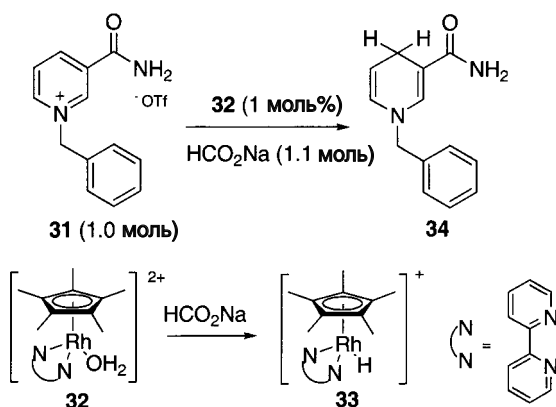


Схема 1.26. Комплекс платины с углеводом

кофакторы дорогостоящи, а их молекулы имеют весьма сложное строение. Было показано, что в водных растворах некоторые металлоорганические биомиметические модели ведут себя подобно NAD^+ и способны отщеплять гидрид-ион от субстрата [249]. Пример приведен на схеме 1.27,



Катализатор-предшественник Образование гидрида

Схема 1.27. Модель металлоорганического кофактора

где показано, что гидридный комплекс **33** восстанавливает соединение **31** с образованием **34**.

1.7. Заключение

Из представленного здесь «панорамного» обзора, который впервые включает в себя разнообразные аспекты биометаллоорганической химии, становится понятным, что данная область знаний в настоящее время имеет прочные основы. Можно с уверенностью ожидать, что в течение предстоящих десятилетий эти основы получат широкое развитие, включающее многие дисциплины. Многие факторы самым положительным образом сказываются на развитии данной области знаний. Среди таких факторов и возможность гармоничного соединения сложности и разнообразия объектов, и подход к научным исследованиям сразу в двух направлениях, и важность тех задач, которые предстоит решить. Уровень развития современной металлоорганической химии, эволюция химического мышления в отношении междисциплинарных проблем и число нетронутых «земель», которые предстоит разведать, – все это также относится к факторам, благоприятствующим развитию обсуждаемой области науки. Но, пожалуй, прежде всего, наиболее положительным фактором является возможность, предоставленная воображению химика, работающего в данной области, которая, говоря словами Бертло, «сама создает свою цель».

Биометаллоорганическая химия уже шагнула далеко вперед, однако на горизонте виднеется еще очень многое. Нет сомнений в том, что в обозримом будущем эта широкая дорога исследований сможет дать источник вдохновения и стимулировать творчество химиков. Действительно, некоторые очевидные препятствия применению в биологии и медицине (водные растворители, ограничения во времени для радиофармацевтических препаратов, инертная атмосфера и т. д.) можно рассматривать не как тормоз, они должны стимулировать поиск оригинальных решений.

Общественная значимость, предсказанная для данной области науки, является еще одним фактором, поддерживающим ее развитие. Возможности коммерческого применения выглядят весьма обещающими: от экологических исследований и биоанализа до энзимологии, далее – биомиметический катализ, модели которого становятся все более эффективными, и, наконец, развитие новых терапевтических подходов. Вместе с фундаментальными исследованиями одним из двигателей в этой области будет создание новых рынков, способствующих решению тех задач, которые еще предстоит сформулировать.

Последующие главы книги иллюстрируют перечисленные моменты на нескольких быстро разворачивающихся «фронтах». Ясно, что эти темы уже только по этой причине заслуживают внимания. Конечно, выбор тематики изложения в какой-то мере субъективен, но это уравнивается той возможностью, которая дается читателю изложением идей в одной книге – возможностью, которая в будущем станет менее реальной, поскольку данная дисциплина быстро расширяется. Это подчеркивает важность регулярного проведения

международных конференций, таких как те, что состоялись в 2002 г. в Париже и в 2004 г. в Цюрихе. Такие конференции могут создавать гораздо более широкую среду общения для наблюдения за динамикой развития биометаллоорганической химии.

Благодарности

Мы хотим поблагодарить А. Вессьер, С. Топа и М. Зальман за конструктивное обсуждение и помощь в издании рукописи, Б. Макглинчи за значительную лингвистическую правку. Ж. Жауэн приносит благодарность фонду Гумбольдта и Институту университета Франции за благотворительные гранты.

Литература

1. G. Jaouen, A. Vessières, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 1865–1874.
2. S. Top, G. Jaouen, A. Vessières, J. P. Abjean, D. Davoust, C. A. Rodger, B. G. Sayer, M. J. McGlinchey, *Organometallics* **1985**, 4, 2143–2150.
3. G. Jaouen, A. Vessières, I. S. Butler, *Ac. Chem. Res.* **1993**, 26, 361–369.
4. A. D. Ryabov, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 931–941.
5. R. H. Fish, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185–186, 569–584.
6. D. Mansuy, *Pure Appl. Chem.* **1980**, 52, 681–690.
7. K. Severin, R. Berge, W. Beck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1634–1654.
8. J. C. Fontecilla-Camps, S. W. Bagnall, *Adv. Inorg. Chem.* **1999**, 47, 283–333.
9. G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, R. Alberto, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 600, 23–36.
10. M. Y. Darensbourg, E. J. Lyon, J. S. Mee, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 206, 533–561.
11. F. Gloaguen, J. D. Lawrence, T. B. Raynffuss, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9476–9477.
12. K. H. Dörz, C. Jäckel, W. C. Haase, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 617–618, 119–132.
13. W. Beck, K. Severin, *Chemie in unserer Zeit* **2002**, 6, 356–365.
14. R. H. Fish, G. Jaouen, *Organometallics* **2003**, 22, 2166–2177.
15. L. D. Slep, F. Neese, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2942–2945.
16. D. C. Hodgkin, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1965**, 294.
17. W. Kaim, B. Schwederski, in *Bioinorganic Chemistry Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, J. Wiley and Sons, **1994**.
18. P. G. Lenhart, *Proc. R. Soc. London. Ser. A* **1968**, 303, 45.
19. T. J. Kealy, P. L. Pauson, *Nature* **1951**, 168, 1039–1040.
20. G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whitting, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2125–2126.
21. F. A. Cotton, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637–639, 18–26.
22. F. A. Cotton, G. Wilkinson, in *Advanced Inorganic Chemistry*, Wiley, **1962**.
23. R. H. Crabtree, in *The Organometallic Chemistry of the Transition Elements*, Chap. 16, 2nd edition, J. Wiley and Sons, New York, **1994**.
24. C. Elschenbroich, A. Salzer, in *Organometallics: a concise introduction*, VCH, Weinheim, **1989**.
25. In *Acad. Roy. Sci. «Mémoires de mathématiques et de physiques»*, presented by various scientists, and read in their meetings, **1760**, t. III, pp. 623–637.

26. *J. Flahaut*, in Charles-Louis Cadet de Gassicourt (1761–1821), royal bastard, pharmacist to the Emperor, Ed. Historiques Tesseidre, Paris, **2001**.
27. *J. S. Thayer*, Adv. Organomet. Chem. **1975**, 13, 1–45.
28. *L. G. Toraude*, Ann. Sci. Chim. Phys. **1920**, 1, 1–12.
29. *R. W. Bunsen*, Ann. Pharm. **1842**, 42, 15.
30. *W. R. Cullen*, Adv. Organomet. Chem. **1966**, 4, 145–242.
31. *J. B. Dumas*, in his presentation of R. W. Bunsen as a foreign member of the Académie des Sciences in Paris (18 December **1882**).
32. *F. Himmelweit*, in The collected papers of Paul Ehrlich, Vol. 3, Pergamon, London, **1960**.
33. *J. Mann*, in The Elusive Magic Bullet: the search for the perfect drug, Oxford University Press, Oxford, **1999**.
34. *J. E. Moored*, in The Modern Treatment of Syphilis, 2nd edition, Thomas, pp. 64–133, Baltimore, **1941**.
35. *G. W. Raiziss, J. L. Gavron*, in Organic Arsenical Compounds, Chem. Catalog. Co., pp. 492–513, New York, **1923**.
36. *D. W. Robertson*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, **1963**, 57, 122–133.
37. *B. Schmid, S. Nkunku, A. Merolle, P. Voyatsou, C. Burri*, Lancet **2004**, 364, 789–790.
38. *A. Astier, S. Gebaud*, French Patent, 0311919, **2003**.
39. *A. König, L. Wrazel, R. P. Warrell, R. Rivi, P. P. Pandolfi, A. Jakubowski, J. L. Gabrilove*, Blood **1997**, 90, 562–570.
40. *Z. G. Wang, R. Rivi, L. Delva, A. König, D. A. Scheinberg, C. Gambacorti-Passerini, J. L. Gabrilove, R. P. Warrell Jr., P. P. Pandolfi*, Blood **1998**, 92, 1497–1504.
41. *C. E. Carraher, C. U. Pittman*, in Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements, Vol. 3, pp. 2–16, John Wiley & Sons, **2004**.
42. *B. Holmstedt, G. Liljestrand*, in Readings in Pharmacology, pp. 22–30, Raven Press, New York, **1981**.
43. *F. C. Wguthire*, in Organic Compounds of Mercury, Chem. Catalog. Co., pp. 368–372, New York, **1921**.
44. *J. S. Thayer*, in Organometallic Compounds and Living Organisms, Academic Press, Orlando, **1984**.
45. *M. Peyrone*, Ann. Chem. Pharm. **1844**, Band LI, 1 ff.
46. *B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas*, Nature **1965**, 205, 698–699.
47. *B. Rosenberg, L. Vancamp, J. E. Troski, V. H. Mansour*, Nature **1969**, 222, 385–386.
48. *B. Lippert*, in Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Lending Anticancer Drug. John Wiley and Sons, New York, **1999**.
49. *B. K. Keppler*, in Metal Complexes in Cancer Chemotherapy, VCH, Weinheim, 1993.
50. *Z. Guno, P. J. Sadler*, Adv. Inorg. Chem. **2000**, 49, 183–305.
51. *M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2511–2533.
52. *J. Reedijk*, Chem. Commun. **1996**, 801–806. 52b. *D. Wang, S. J. Lippard*, Nat. Rev. Drug Discov. **2005**, 4, 307–320.
53. *D. Carmona, M. P. Lamata, L. A. Oro*, Eur. J. Inorg. Chem. **2002**, 2239–2251.
54. *A. H. Velders, A. Bergamo, E. Alessto, E. Zangrando, J. G. Hasnoot, C. Casarsa, M. Cocchietto, S. Zorget, G. Sava*, J. Med. Chem. **2004**, 47, 1110–1121.
55. *A. Bergamo, G. Stocco, C. Cararsa, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, S. Zorget, G. Sava*, Int. J. Oncol. **2004**, 24, 373–379.
56. *M. M. Harsing, G. Mokdsi*, Curr. Med. Chem. **2000**, 7, 1289–1303.
57. *P. Köpf-Maier*, Eur. J. Clin. Pharmacol, **1994**, 47, 1–16.

58. P. Köpf-Maier, H. Köpf, *Chem. Revl* **1987**, 87, 1137–1152.
59. J. B. Waern, M. M. Harding, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4655–4668.
60. S. Top, E. B. Kaloun, A. Vessièrès, I. Laios, G. Leclercq, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643–644, 350–356.
61. M. Tacke, L. T. Allen, L. Cuffe, W. M. Gallagher, Y. Loiu, O. Mendoza, H. Müller-Bunz, F. J. K. Renmann, N. Sweeney, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 2242–2249.
62. M. Tacke, L. Cuffe, W. M. Gallagher, Y. Lou, O. Mensoza, H. Müller-Bunz, F. J. K. Rehmann, N. Sweeney, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1987–1994.
63. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, E. D. J. S. L. Heath, *Chem. Commun.* **2000**, 1396–1397.
64. F. Wand, H. M. Chen, J. A. Parkinson, P. S. Murdoch, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 4509–4523.
65. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellio, P. A. Salter, R. Scopelliti, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 35–42.
66. G. Jaouen, S. Top, J. P. Raynaud, French Patent 2725720–AI, **1994**.
67. S. Top, J. Tang, A. Vessièrès, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, *Chem. Commun.* **1996**, 955–956.
68. S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché, G. Jaouen, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5223–5236.
69. G. Jaouen, S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, M. J. McGlinchey, *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 2505–2517.
70. J. Brocard, J. Lebib, L. Maciejewski, French Patent 2733985–A1, **1996**.
71. C. Biot, G. Clorian, L. A. Maciejewski, J. S. Brocard, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3715–3718.
72. C. Biot, L. Delhaes, H. Abessolo, O. Domarle, L. Maciejewski, M. Mortuaire, P. Delcourt, P. Deloron, D. Camus, D. Dive, J. Brocard, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 569, 59–65.
73. C. Biot, *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* **2004**, 3, 135–147.
74. P. J. Craig, in *Organometallic Compounds in the Environment*, 2nd ed., Wiley, Chichester, **2003**.
75. T. Tsubaki, K. Irukayama, in *Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata Japan*, Kodansha, Tokyo, **1977**.
76. P. A. D'Itrici, F. M. D'Itrici, in *Mercury Contamination: a Human Tragedy*, Wiley, New York, **1997**.
77. K. E. Jackson, M. A. Jackson, *Chem. Rev.* **1935**, 16, 439–452.
78. F. W. Oehme, *Clin. Toxicol.* **1972**, 5, 215–222.
79. R. A. Peters, L. A. Stockton, R. H. S. Thompson, *Nature* **1945**, 156, 616.
80. C. J. Löwig, *J. P. Chem.* **1853**, LX, 304.
81. S. K. Hall, *Environ. Sci. Technol.* **1972**, 6, 30–35.
82. T. Alojouanine, L. Derbert, S. Thieffrey, *Rev. Neurol.* **1958**, 98, 85.
83. J. E. Gruner, *Rev. Neurol.* **1958**, 98, 104.
84. R. J. Fessenden, J. S. Fessenden, *Adv. Organomet. Chem.* **1980**, 18, 275.
85. A. J. Growe, *Chem. Int. (London)* **1983**, 304–310.
86. M. Tsutsui, N. Kakimoto, D. D. Axtell, H. Oikawa, K. Asat, *J. Ann. Chem. Soc.* **1976**, 98, 8287–8289.
87. J. S. Thayer, *J. Organomet. Chem.* **1974**, 76, 265–295.
88. F. Challenger, *Chem. Rev.* **1945**, 36, 315–361.
89. F. Challenger, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1955**, 9, 255.

90. R. S. Yalow, S. A. Berson, *J. Clin. Invest.* **1960**, 39, 1157–1175.
91. R. S. Yalow, S. A. Berson, *Nature* **1959**, 84, 1648–1649.
92. R. Edwards, in *Immonoassay*, William Heinermann Medical Books, London, **1985**.
93. T. J. Gill, L. T. Mann, *J. Immunol.* **1965**, 96, 906–912.
94. J. P. Gosling, *Clin. Chem.* **1990**, 36, 1408–1427.
95. L. J. Kricka, in *Ligand-Binder Assay*, Marcel Dekker, New York, **1985**.
96. M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Issacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin, L. Snarsky, *Nature* **1977**, 270, 534–535.
97. J. F. Hainfield, *Science* **1987**, 236, 450–453.
98. J. H. W. Leuvers, B. C. Goverde, P. J. Thal, A. H. Schuurs, *J. Immunol. Methods* **1983**, 60, 9–23.
99. P. Cheret, P. Brossier, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1986**, 54, 237–253.
100. K. Dr Gleria, H. A. O. Holl, C. J. McNell, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1203–1205.
101. M. Salmain, A. Vessièrès, P. Brossier, I. S. Butler, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1992**, 148, 65–75.
102. M. Cais, N. Tirosh, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1980**, 90, 27–35.
103. P. Cheret, Ph D thesis, Université de Bourgogne, Dijon, 1987.
104. B. Limoges, C. Degrand, P. Brossier, R. L. Blankespoor, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1054–1060.
105. D. H. Farkas, *Clin. Chem.* **2001**, 47, 1871–1872.
106. S. D. Vernon, D. H. Farkas, E. R. Unger, V. Chan, D. L. Miller, Y. P. Chen, G. F. Blackburn, W. C. Reeves, *BMC Infections Diseases* **2003**, 3/12 open access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/12>.
107. C. J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M. D. James, C. L. Tan, G. F. Blackburn, T. J. Meade, *J. Ann. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11155–11161.
108. M. Salmain, A. Vessièrès, G. Jaouen, I. S. Butler, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2323–2329.
109. I. S. Butler, A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43, 1497–1498.
110. A. Vessièrès, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, M. Loüer, G. Jaouen, *Biochemistry* **1988**, 27, 6659–6666.
111. G. Jaouen, A. Vessièrès, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4778–4780.
112. A. Varenne, A. Vessièrès, P. Brossier, G. Jaouen, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1994**, 84, 81–92.
113. A. Varenne, A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1995**, 186, 195–204.
114. A. Vessièrès, K. Kowalski, J. Zakrzewski, A. Stepien, M. Grabowski, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 379–385.
115. V. Philomin, A. Vessièrès, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1994**, 171, 201–210.
116. A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 625–633.
117. Z. Wang, B. A. Roe, K. M. Nicholas, R. L. While, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4399–4400.
118. Y. Ueno, H. Yurimoto, H. Yoshioka, T. Komiya, S. Maruyama, *Geochimica Cosmochimica Acta* **2002**, 66, 1257–1268.
119. R. J. P. Williams, J. J. R. Frausto Da Silva, *J. Theor. Biol.* **2003**, 220, 323–343.
120. D. C. Rees, J. B. Howard, *Science*, **2003**, 300, 929–931.

121. W. Martin, M. J. Russell, *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **2003**, 358, 59–85.
122. J. A. Kovacs, S. C. Shoner, J. J. Ellison, *Science* **1995**, 270, 587–588.
123. D. Dolphin, in *B12*, Vol. 1 and 2, Wiley Interscience, New York, **1982**.
124. S. J. Lippard, J. M. Berg, in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Mill Valley, USA, **1994**.
125. G. N. Schrauzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 15, 417.
126. S. Gschösser, R. B. Hannak, R. Konrat, K. Gruber, C. Mikl, C. Kratky, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 81–93.
127. B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding, in *Vitamin B12 and B12 proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **1998**.
128. L. Randaccio, *Comments Inorg. Chem.* **2000**, 21, 327–376.
129. O. Einsle, F. A. Tezcan, S. L. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2002**, 297, 1696–1700.
130. J. Kim, D. C. Rees, *Science* **1992**, 257, 1677–1682.
131. C. Darnault, A. Volbeda, E. Kim, P. Legrand, X. Vernede, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 446–451.
132. T. I. Doukov, T. Iverson, J. Sevaralli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Science* **2002**, 298, 567–572.
133. C. L. Drennan, J. W. Peters, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 220–226.
134. E. L. Hegg, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 775–783.
135. A. D. Allen, F. Bottomley, *Acc. Chem. Res.* **1968**, 2, 360–365.
136. J. Chatt, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, 1, 121.
137. J. Chatt, *J. Organomet. Chem.* **1975**, 100, 17–28.
138. J. Chatt, J. R. Dilworth, R. L. Richards, *Chem. Rev.* **1978**, 78, 589–625.
139. W. E. Newton, W. H. Orme-Johnson, in *Nitrogen Fixation*, University Park Press, Baltimore, **1980**.
140. R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4331–4338.
141. M. Stephenson, L. H. Strickland, *Biochem. J. (London)* **1931**, 25, 205.
142. M. W. W. Adams, E. I. Stiefel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 214–220.
143. A. Volbeda, M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, 373, 580–587.
144. J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt, *Science* **1998**, 282, 1853–1858.
145. H. Frey, *ChemBioChem* **2002**, 3, 153–160.
146. Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, *Structure* **1999**, 7, 13–23.
147. A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, *Dalton Trans.* **2003**, 4030–4038.
148. M. Y. Darensbourg, E. J. Lyon, X. Zhao, P. Georgakaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3683–3688.
149. S. Ott, M. Kritikos, B. Akermark, L. Sum, R. Lomoth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1006–1009.
150. T. B. Rauchfuss, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 14–26.
151. D. Sellman, F. Geipel, F. Lauderbach, F. W. Heinemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 632–634.
152. D. Sellmann, F. Lauderbach, F. Geipel, F. W. Heinemann, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3203–3206.
153. D. Sellmann, R. Prakash, F. W. Heinemann, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 1847–1858.

154. T. D. Weatherill, T. B. Rauchfuss, R. A. Scott, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 1466–1472.
155. L. F. Dahl, C. H. Wei, *Inorg. Chem.* **1963**, 2, 334–336.
156. M. Dörr, J. Kässbohrer, R. Grunert, G. Kreisel, W. A. Brand, R. A. Werner, H. Geilmann, C. Apfel, C. Robl, W. Weigand, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1540–1543.
157. W. Hieber, W. Beck, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1960**, 305, 265.
158. W. Hieber, J. Brendel, J. Gruber, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1958**, 296, 68.
159. W. Hieber, P. Spacu, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1937**, 233, 353.
160. W. Hieber, A. Zeidler, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1964**, 329, 92.
161. R. B. King, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 2460.
162. H. Reihlen, A. Gruhl, G. Hessling, *Liebigs Ann. Chem.* **1929**, 472, 268.
163. D. Seyferth, R. S. Henderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 508–509.
164. D. Seyferth, R. S. Henderson, L. C. Song, *Organometallics* **1982**, 1, 125–133.
165. C. Tard, X. Liu, S. K. Ibrahim, M. Brushi, L. De Gioia, S. C. Davies, X. Yang, L. S. Wang, G. Sawers, C. J. Pickett, *Nature* **2005**, 433, 610–613.
166. P. A. Lindahl, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 516–524.
167. S. W. Ragsdale, *Biofactors* **1997**, 6, 3–9.
168. S. W. Ragsdale, M. Kumar, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2515–2539.
169. R. K. Thauer, *Science* **2001**, 293, 1264–1265.
170. J. Feng, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9094–9100.
171. J. Feng, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **2004**, 43, 1552–1559.
172. Y. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Roner, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 446–451.
173. S. S. Mansy, J. A. Conan, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 719–725.
174. C. Huber, G. Wüsthäuser, *Science* **1997**, 276, 245–247.
175. G. M. King, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 7266–7272.
176. W. Hieber, F. Leutert, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1932**, 204, 145.
177. T. Kruck, M. Höfler, M. Noack, *Chem. Ber.* **1966**, 99, 1153.
178. P. Schönheit, J. Moll, R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* **1979**, 123, 105–107.
- 179a. R. K. Thauer, *Microbiology* 1998, 144, 2377–2406.
- 179b. M. Krüger, A. Meyerdlers, R. K. Thauer *et al.*, *Nature* **2003**, 426, 878–881.
180. W. Beck, K. Sünkel, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 1405–1421.
181. S. Reissmann, E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Böck, *Science* **2003**, 299, 1067–1070.
182. D. Mansuy, J. P. Many, in F. Montanari, L. Casella (Eds.), *Metalloporphyrins Catalyzed Oxidations*, p. 175–206, Springer, **1994**.
183. P. R. Ortiz de Montelliano, in *Cytochrome P450*, Plenum Predd, New York, **1995**.
184. P. Cocolios, G. Lagrange, R. Guilard, *J. Organomet. Chem.* **1983**, 253, 65–79.
185. R. Guilard, K. M. Kadish, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 1121–1146.
186. R. Guilard, A. Tabard, E. van Caemelbecke, K. M. Kadish, in K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guliard (Eds.), *The Prophyrin Handbook*, Vol. 3, p. 295–345, Academic Press, **2000**.
187. D. Mansuy, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 756–744.
188. D. Mansuy, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 737–744.
189. D. Mansuy, M. Lange, J. C. Chottard, P. Guérin, P. Morlière, D. Brault, M. Rougee, *Chem. Commun.* **1977**, 648–649.
190. D. Mansuy, W. Nastainczyk, V. Ullrich, *Arch. Pharmacol.* **1974**, 285, 315–324.

191. V. Ullrich, *Top. Curr. Chem.* **1979**, 83, 67–104.
192. U. Koelle, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 135–136, 623–650.
193. L. I. Delmon-Moingeon, D. Piwnica-Worms, A. D. van den Abbeele, B. L. Holman, A. Davison, A. G. Jones, *Cancer Res.* **1990**, 50, 2198–2202.
194. B. L. Holman, V. Sporn, A. G. Jones, S. T. Benjamin-Sia, N. Perez-Balino, A. Davison, J. Lister-James, J. F. Kronauge, A. E. A. Mirra, L. L. Camin, S. Cambell, S. J. Williams, A. T. Carpenter, *J. Nucl. Med.* **1987**, 28, 13–18.
195. A. G. Jones, M. J. Abrams, A. Davison, US Patent, N 4,452,774, Issued 6/5/84/ **1984**.
196. A. G. Jones, M. J. Abrams, A. Davison, US Patent, N 4,707,544, Issued 11/17/87, **1987**.
197. A. G. Jones, M. J. Abrams, A. Davison, US Patent, N 4,826,961, Issued 5/2/89/ **1989**.
198. R. Alberto, *Chimia* **2003**, 57, 56.
199. R. Alberto, K. Ortner, N. Wheatley, R. Schibli, A. P. Schubiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3135–3136.
200. R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A. P. Schubiger, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 192, 901–919.
201. J. K. Pak, P. Benny, B. Spingler, K. Ortner, R. Alberto, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 2053–2061.
202. B. Salignac, P. V. Grundler, S. Cayemites, U. Frey, R. Scopelliti, A. E. Merbach, R. Hechinger, K. Hegetschweiler, R. Alberto, U. Prinz, G. Raabe, U. Koelle, S. Hall, *Inorg. Chem.* **2002**, 42, 3516–3526.
203. W. Cremer, *Biochem. Z.* **1229**, 206, 208.
204. M. P. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 4563–4570.
205. K. Schlögl, *Monatsh. Chem.* **1957**, 88, 601.
206. J. M. Osgerby, P. L. Pauson, *J. Chem. Soc.* **1958**, 656–660.
207. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5931–5985.
208. E. Cuingnet, C. Sergheraert, A. Tartar, M. Dautrevaux, *J. Organomet. Chem.* **1960**, 195, 325–329.
209. K. Severin, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1515–1518.
210. W. Hieber, H. Führling, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1971**, 381, 235.
211. E. Benetti, G. Maglio, R. Palumbo, C. Pedone, *J. Organomet. Chem.* **1973**, 60, 189–195.
212. M. I. H. Green, L. C. Mitchard, W. E. Silverthorn, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1973**, 1403–1408.
213. D. F. Dersnah, M. C. Baird, *J. Organomet. Chem.* **1977**, 127, C55–C58.
214. W. Beck, W. Petri, *J. Organomet. Chem.* **1977**, 127, C40–C44.
215. E. S. Gore, M. L. H. Green, *J. Chem. Soc. A* **1970**, 2315–2319.
216. C. Potvin, L. Davignon, G. Pannetier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1975**, 507–511.
217. W. S. Sheldrick, S. Heeb, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 377, 357–366.
218. H. Brunner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1194–1208.
219. A. A. Ioganson, *Russ. Chem. Rev.* **1985**, 54, 277.
220. D. W. Abbott, C. Watts, *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 597–602.
221. W. Beck, K. Kottmair, *Chem. Ber.* **1976**, 109, 970–993.
222. M. M. Singh, Y. Rosopulos, W. Beck, *Chem. Ber.* **1983**, 116, 1364.
223. W. S. Sheldrick, B. Guenther, *Inorg. Chim. Acta* **1988**, 151, 237–241.
224. P. Annen, S. Schildberg, W. S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 307, 115–124.
225. D. Herebian, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 966–974.
226. S. Korn, W. S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 254, 85–91.
227. P. Köpf-Maier, H. Köpf, in *Metal Complexes in Cancer Therapy*, Chapman Hall, London, **1994**.

228. P. Köpf-Maier, I. C. Torniporth-Oetting, *Biometals* **1996**, 9, 267–271.
229. F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5810–5820.
230. W. S. Sheldrick, S. Heeb, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 168, 93–100.
231. H. H. Baer, H. R. Hanna, *Carbohydr. Res.* **1982**, 102, 169–183.
232. J. M. Beau, T. Gallagher, *Top. Curr. Chem.* **1977**, 187, 1–54.
233. A. Rosenthal, H. J. Koch, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 871–874.
234. G. L. Trainor, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 282, C43–C45.
235. I. Arai, G. D. Daves, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7683.
236. L. Jessen, E. T. K. Haupt, J. Heck, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3791–3797.
237. Y. Nagel, W. Beck, *Z. Naturforsch.* **1985**, 40b, 1181.
238. R. Aumann, *Chem. Ber.* **1992**, 125, 2773–2778.
239. R. Aumann, *Chem. Ber.* **1994**, 127, 725–729.
240. H. Fischer, J. Schleu, G. Roth, *Chem. Ber.* **1995**, 128, 373–378.
241. S. Krawielitzki, W. Beck, *Chem. Ber. Rec.* **1997**, 130, 1659.
242. T. Pili, K. Polborn, W. Beck, *Chem. Ber.* **1990**, 123, 11–17.
243. K. H. Dötz, E. Gomes de Silva, *Synthesis* **2003**, 1787–1789.
244. R. O. Duthaler, A. Hafner, P. L. Alsters, P. Rothe-Streit, G. Rihs, *Pure Appl. Chem.* **1992**, 64, 1897–1910.
245. M. Riediker, R. O. Duthaler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 494–495.
246. M. Diéguez, O. Pamies, C. Clever, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3189–3216.
247. H. Junicke, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, 346, 129–136.
248. D. Steinborn, H. Junicke, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4283–4318.
249. H. C. Lo, C. Leiva, O. Buriez, J. B. Kerr, M. M. Olmstead, R. H. Fish, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 6705–6716.

2 Ареновые комплексы рутения с противораковой активностью

*М. Мелчарт, П. Садлер (Michael Melchart, Peter J. Sadler,
University of Edinburgh, Department of Chemistry, UK)*

2.1. Введение

Большинство новых лекарственных препаратов представляют собой органические соединения (соединения углерода). Однако становится все более понятным, что ионы многих металлов участвуют в природных биологических процессах и что существуют большие возможности для создания терапевтических средств как на основе ионов металлов, играющих важную биологическую роль, так и на основе ионов других металлов. Комплексы металлов с их широким интервалом координационных чисел, разнообразием геометрии координационного окружения, термодинамических и кинетических требований (которые могут меняться в широких пределах) по отношению к атомам лигандов, а в некоторых случаях окислительно-восстановительной активности обладают механизмом действия*, не характерным для органических соединений. Проблема состоит в том, чтобы контролировать эти свойства при введении комплекса металла в организм; разрешению этой проблемы помогает новый взгляд на молекулярные основы действия биологически важных ионов металлов, например, механизм транспорта калия через белковые каналы в мембранах [1]. Сюда же относится механизм прохождения электронов через железо- и медьсодержащие белки по электрон-транспортным каналам [2], а также молекулярные основы контроля транскрипции цинк-пальцевыми белками [3]. В дополнение, современная геномика** должна осуществить расшифровку кодов ДНК, которые контролируют отбор, потребление и распределение металлов.

Успешное применение в клинике противораковых препаратов на основе платины показывает, что комплексы металлов могут быть сконструированы так, что они будут обладать специфической биологической активностью. Например, не все комплексы платины являются активными противораковыми агентами. Некоторые комплексы платины инертны в этом отношении и относительно нетоксичны, одни действуют на ДНК, а другие – нет.

* На живой организм. – *Прим. перев.*

** Раздел молекулярной генетики, который изучает геномы, особенно идентификацию и секвенирование генов, входящих в их состав. – *Прим. перев.*

В общем, сама природа иона металла, степень окисления, природа и число связанных с металлом лигандов – все это может иметь определяющее значение в проявлении биологической активности [4, 5].

Ртутьорганические соединения около 40 лет тому назад использовались в качестве диуретиков [6], но только недавно сделаны попытки разработать металлоорганические комплексы (производные металлоценов) в качестве терапевтических средств [7–9]. Хотя ареновые комплексы металлов предоставляют большие возможности для разработки лекарственных средств, ни один из таких комплексов не проходил клинических испытаний. Здесь описаны наши работы по ареновым комплексам рутения(II) и показано большое разнообразие структур и электронных свойств, присущее этому классу металлоорганических комплексов. Природа арена и трех других лигандов, связанных с атомом рутения, может существенно сказываться на протекании химических реакций. Это, в свою очередь, может иметь прямое влияние на биологическую активность, окислительно-восстановительные процессы и легкость замещения лигандов, особенно при гидратации хлоридных комплексов. Природа лигандов может сказываться также на величине pK_a аква-аддуктов, на распознавание (поли)нуклеотидов и аминокислот (белков). Некоторые из таких ареновых комплексов Ru(II) проявляют перспективную противораковую активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

2.2. Противораковые комплексы на основе металлов

Интерес к использованию комплексов металлов для лечения рака был инициирован открытием Розенберга в 1969 г. противоопухолевой активности амминных комплексов Pt(II) [10]. Сейчас, по крайней мере, четыре комплекса платины оказались пригодными для клинического использования (комплексы 1–4, рис. 2.1), и именно комплексы платины наиболее широко используются как противораковые лекарства. Толчком к созданию комплексов металлов, отличных от платины, в качестве новых противораковых препаратов послужили устойчивость клеток к платине, с чем иногда сталкиваются в клинической практике, побочные эффекты, связанные с токсичностью цисплатина 1, которые могут быть существенными, а также ограниченный спектр активности против различных форм рака [11].

Вначале был исследован металлоорганический комплекс титана – титаноцендихлорид Cp_2TiCl_2 (5, где Cp – цикlopентадиенил, рис. 2.2), поскольку думали, что фрагмент *цис*- TiCl_2 должен взаимодействовать с ДНК подобно цисплатину и приводить к образованию бифункциональных кросс-связей, что могло, в свою очередь, индуцировать апоптоз и гибель раковой клетки. Титаноцендихлорид слабо связывается с основаниями, входящими в состав ДНК, но значительно сильнее с фосфатным остовом [12]. Вследствие легкости гидролиза Cp_2TiCl_2 и образования гидрокси- и оксимостиковых структур, на его основе трудно создать препарат для лекарственного применения. В клинических испытаниях не было получено обнадеживающих результатов для титаноцендихлорида, и испытания были прекращены [13, 14].

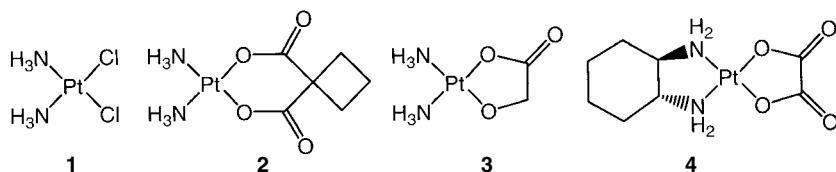


Рис. 2.1. Комплексы платины(II), допущенные к использованию в клинике в качестве противораковых лекарственных препаратов: **1** – цисплатин, **2** – карбоплатин, **3** – недаплатин, **4** – оксалиплатин

Другие соединения оказались активными *in vitro*, например Cr_2VCl_2 и Cr_2NbCl_2 [7], но не дошли до клинических испытаний. В нескольких лабораториях предпринимаются интенсивные попытки изменить растворимость в воде и устойчивость производных титаноцена [15, 16]. Другой комплекс титана, будотитан (**6**, рис. 2.2), был первым комплексом, не содержащим платины, который дошел до клинических испытаний, но его низкая растворимость и гидролитическая неустойчивость затрудняли приготовление лекарственной формы на его основе даже в мицеллах, и испытания также были остановлены [17].

Интерес биологов к соединениям рутения привлекло использование рутениевого красного для ингибирования захвата ионов Ca^{2+} , а также использование комплексов рутения в качестве акцепторов окиси азота, иммунодепрессантов, радиофармацевтических препаратов (радиоактивные изотопы рутения являются γ -излучателями: для ^{97}Ru $t_{1/2}$ 2,9 суток, энергия излучения 216 кэВ; для ^{103}Ru $t_{1/2}$ 39 суток, энергия излучения 497 кэВ), а также противораковых препаратов [18]. Ранний интерес к противораковой активности комплексов рутения основывался на противораковой активности амминных комплексов рутения, обнаруженной Кларком [19] (например, комплекс **7**, рис. 2.3). Однако эти комплексы были слишком малорастворимы для их использования.

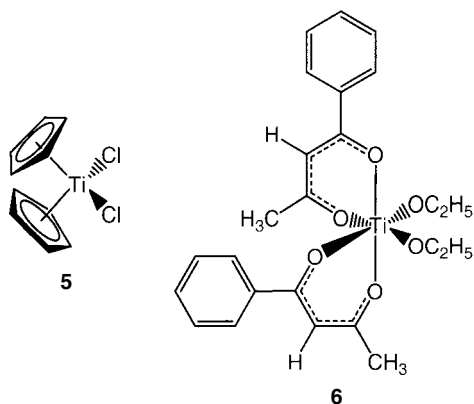


Рис. 2.2. Титановые противораковые препараты, прошедшие клинические испытания: **5** – титаноцендихлорид, **6** – будотитан

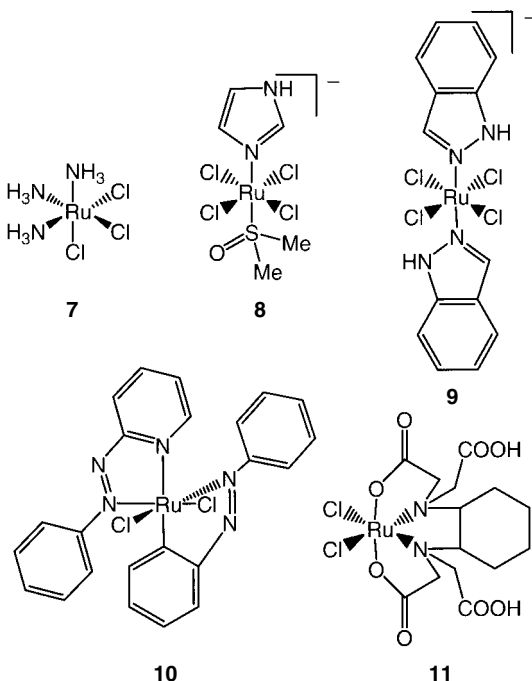


Рис. 2.3. Комплексы рутения, обладающие противоопухолевой активностью: **7** – $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$, **8** – Ru(III) -антиметастатический препарат NAMI-A, **9** – комплекс Ru(III) , KP1019, **10** – азопиридиновый комплекс Ru(II) , **11** – комплекс Ru(IV) с CDТА*

Два других комплекса Ru(III) , а именно: *транс*- $[\text{RuCl}_4(\text{DMCO})(\text{Im})]\text{ImH}$ (NAMI-A, **8**, где Im – имидазол) [20] и *транс*- $[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{IndH}$ (KP1019, **9**, где Ind – индазол) [21] находятся сейчас на стадии испытаний. Соединение KP1019 является цитотоксичным по отношению к раковым клеткам, в то время как NAMI-A относительно нетоксичен, но обладает антиметастатическим действием и предотвращает распространение опухоли по организму.*

Недавно несколько других комплексов рутения зарекомендовали себя как противораковые агенты [22, 23], например α - $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ (**10**, где azpy – 2-фенилазопиридин) и $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{CDTA})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**11**, где H_2CDTA – 1,2-циклогександиаминотетрауксусная кислота, рис. 2.3).

Кларк предположил, что активность комплексов Ru(III) , которые обычно относительно устойчивы по отношению к замещению лигандов, зависит от восстановления *in vivo* до более лабильных комплексов Ru(II) [19, 24]. Руководствуясь этим, мы исследовали активность комплексов Ru(II) . Мы нашли, что аминоксифиновые комплексы Ru(II) являются цитотоксичными по отношению к раковым клеткам [25], но эти комплексы плохо растворяются

* CDТА – в данном случае дианион циклогександиаминотетрауксусной кислоты. – Прим. перев.

в воде и их трудно выделить и очистить в больших количествах. Поскольку известно, что арены стабилизируют степень окисления рутения +2, мы изучили потенциальные противораковые свойства ареновых комплексов Ru(II) и химию этих комплексов в водной среде. Мы нашли, что «полусэндвичевые» моноареновые комплексы Ru(II) зачастую обладают хорошей растворимостью в воде (что является преимуществом для использования в медицинской практике) и что связи Ru(II)–арен весьма прочны.

2.3. Химия ареновых комплексов рутения

2.3.1. Синтез

Синтез ареновых комплексов Ru(II) обычно нельзя осуществить простым взаимодействием соединения Ru(II) с ареном, для этого синтеза нужны восстановительные условия. Первый ареновый комплекс Ru(II) был синтезирован Фишером и Бётхером в 1957 г. [26]. Они получили сэндвичевый комплекс с мезитилом $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_3\text{Me}_3)_2\text{Ru}](\text{BPh}_4)_2$ (**12**, рис. 2.4) и аналогичный комплекс с бензолом перемешиванием RuCl_3 с безводным AlCl_3 , порошком алюминия и соответствующим ареном в атмосфере N_2 при 130 °C в течение 8–10 ч. В 1967 г. Фишер и др. [27] сообщили о синтезе комплекса с нафталином $[(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_8)_2\text{Ru}](\text{PF}_6)_2$, а Винкхаус и Сингер [28] синтезировали полимерный моноареновый комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_x$ реакцией RuCl_3 с 1,3-циклогексадиеном в этаноле. Позднее Беннетт и др. с помощью рентгеноструктурного анализа установили [29], что комплексы $[(\eta^6\text{-арен})\text{RuCl}_2(\text{PMePh}_2)]$, где арен = бензол или *n*-цимол*, имеют геометрию типа «фортепианной табуретки» (например, **13**, рис. 2.4). Зелонка и Бэйрд [30] обнаружили, что димерный комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$ (**14**, рис. 2.4) под действием электрофильных и нуклеофильных реагентов образует мономерные комплексы, например $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{PR}_3)]$. В комплексах типа «фортепианной табуретки» ареновый лиганд является «сиденьем» табуретки, а другие три лиганда – ее «ножками». Для комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{PMePh}_2)]$ было обнаружено искажение бензольного кольца (**13**, рис. 2.4): длины четырех связей Ru–C составляют около 2,19 Å, двух других – 2,27 Å. Более длинные связи Ru–C в этом комплексе находятся в *транс*-положении по отношению к атому фосфора. Небольшой изгиб бензольного кольца (двугранный угол составляет 5°) может быть вызван частичной локализацией π -электронов бензольного кольца. Из результатов более поздних исследований других соединений следовало, что в них тоже может иметь место локализация π -электронной плотности, причем сопровождаемая альтернированием длинных и коротких связей C–C в кольце [31, 32]. Общие структурные, стереохимические и электронные характеристики ареновых комплексов металлов обоснуются в обзоре [33].

Взаимодействие хлорида RuCl_3 с предшественником арена – 1,4-циклогексадиеном приводит к димерному комплексу рутения(II) **14** (рис. 2.4).

* 4-Изопропилтолуол. – Прим. перев.

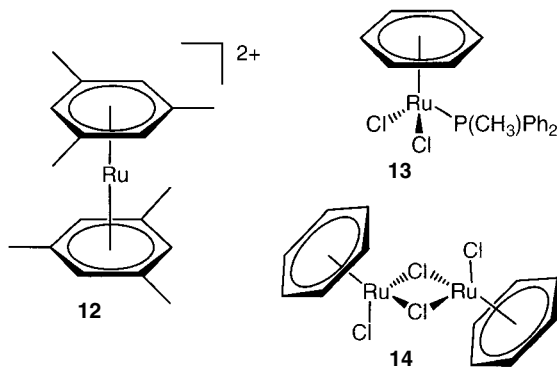


Рис. 2.4. Ранние примеры сэндвичевых и полусэндвичевых комплексов Ru(II): **12** – $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_3\text{Me}_3)_2\text{Ru}]^{2+}$; **13** – $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{PMePh}_2)]$; **14** – $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$ – удобный реагент в синтезе других комплексов рутения

Такой подход часто служит удобным методом синтеза ареновых комплексов Ru(II); для нескольких таких димерных комплексов определена молекулярная структура [34–36]. Современный интерес к разработке синтеза ареновых комплексов рутения в качестве предшественников катализаторов привел к использованию разнообразных способов синтеза для получения комплексов с различными замещенными аренами, содержащих другие лиганды, такие как гидридный водород, фосфины, σ -алкильные и σ -арильные группы [37].

Синтетические подходы, использующие димерные комплексы рутения(II), могут давать высокие выходы относительно чистых полусэндвичевых комплексов, однако эти подходы ограничены доступностью соответствующих диенов – предшественников аренов. Альтернативные пути синтеза включают, например, замещение слабо связанного нафталина в комплексе нульвалентного рутения $[(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_8)\text{Ru}(\eta^4\text{-COD})]$ (где COD – 1,5-циклооктадиен) на другой арен [38] с последующим превращением в димерный комплекс Ru(II) при добавлении HCl [39]. Этот вариант синтеза может сделать доступными комплексы Ru(II) с ареновыми лигандами, содержащими функциональные группы в боковых цепях [40]. Другие способы синтеза включают термическое замещение координированного *n*-цимола на пространственно-затрудненный арен, такой как гексаметилбензол [41], фотоиндуцированное замещение, например, бензола в $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{амидинат})(\text{Cl})]^*$ [42], модификацию координированных аренов в комплексах $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{Cp})]^+$ [43] и стехиометрическую циклотримеризацию ацетиленов с использованием нафталинового комплекса $[(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_8)\text{Ru}(\eta^4\text{-COD})]$ [44, 45]. Возможен также синтез моно- и бисареновых комплексов Ru(II), исходя из аквакомплекса $[\text{Ru(II)}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, который может ароматизировать циклические олефины при нагревании в воде или другом подходящем протонном растворителе [46, 47].

* амидинат = -NC(=N)-R . – Прим. перев.

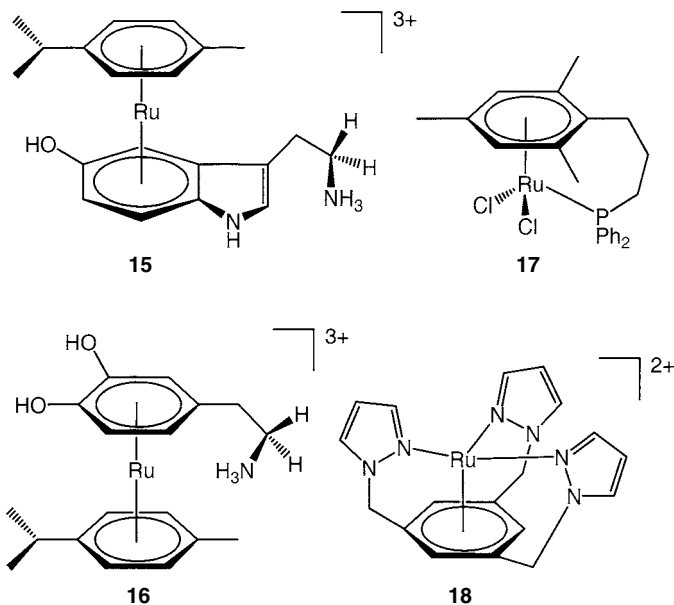


Рис. 2.5. Примеры сэндвичевых (**15**, **16**), «привязного» (внутримолекулярно связанного **17**) и инкапсулированного (**18**) ареновых комплексов Ru(II)

Бисареновые сэндвичевые комплексы Ru(II) можно синтезировать, например, путем удаления хлоридных лигандов из комплексов типа $[(\eta^6\text{-арен})\text{RuCl}_2]_2$ действием солей серебра в ацетоне с последующей реакцией с ареном в CF_3COOH [48], либо непосредственным взаимодействием моноаренового димерного комплекса Ru(II) с ареном в CF_3COOH [49]. Сэндвичевые комплексы с производными индола и пирокатехина (**15** и **16** на рис. 2.5) были получены первым способом [50].

Связанный арен можно ввести в комплекс как часть хелатного цикла в случае «привязных» комплексов [51, 52]. Такие синтезы часто требуют высокого давления, а «привязные» комплексы типа **17** (рис. 2.5) привлекли к себе особый интерес исследователей в области катализа [53, 54]. Могут быть синтезированы также сэндвичевые комплексы с «подвешенными» ареновыми лигандами (*анса*-комплексы) [55]. Более того, можно инкапсулировать атом рутения в систему η^6 -аренового лиганда с тройной стяжкой (**18**, рис. 2.5) [56, 57].

Интерес к каталитическим свойствам моноареновых комплексов Ru(II) простирается от гидрирования алкенов и ароматических углеводородов до реакции Дильса–Альдера, метатезиса алкенов и асимметрического восстановления кетонов и иминов [58]. Каталитическая активность обычно требует наличия лабильного координационного сайта на атоме рутения(II) и/или замещения арена [59, 60]. Подобные катализаторы, скорее всего, должны легко отравляться в биологических средах ввиду доступности лигандов, способных к прочной координации. Однако вызывает огромный интерес допущение,

что каталитическая активность все же могла бы существовать в биологических структурах, в которые не могут проникать дезактивирующие молекулы, например, в мембранах.

В данной главе мы сосредоточимся в основном на биохимии η^6 -ареновых комплексов рутения(II).

2.3.2. Структура

Типичная структура полусэндвичевого аренового комплекса с геометрией типа «фортепианной табуретки» $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ показана на рис. 2.6.

Строение комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{--C}_6\text{H}_5)\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ (RM175, где en – этилендиамин), установленное рентгеноструктурным анализом, показано на рис. 2.7 (см. цветную вклейку).

Структурные характеристики комплекса обычны для моноареновых комплексов Ru(II). К ним относятся изменение длин связей C–C в координированном арене и неодинаковые расстояния Ru–C: самое большое расстояние составляет 2,244 Å (самое короткое – 2,137 Å) между атомом Ru и атомом углерода, связанным с фенильной группой. У координированных аренов с несколькими кольцевыми системами структура может быть нежесткой, что видно в случае дигидроантраценового (ДНА) комплекса, приведенного в табл. 2.2 (см. ниже). Такая нежесткость аренового лиганда может играть определенную роль при взаимодействии ареновых комплексов Ru(II) с ДНК.

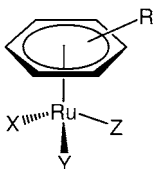


Рис. 2.6. Типичная структура полусэндвичевого комплекса рутения с геометрией «фортепианной табуретки». Координационное положение лигандов X, Y и Z и заместителя(ей) R в ареновом лиганде определяют границы для исследования связи структура – противораковая активность

2.3.3. Хиральность

Ареновые комплексы Ru(II) с тремя различными лигандами, связанными с остатком $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}]^{2+}$, содержат стереогенный центр*. Вообще говоря, энантиомеры могут обладать различным биологическим действием. Отсюда следует важность изучения скоростей инверсии при таком центре и, если это возможно, разделение энантиомеров для биологических испытаний. Стере-

* Которым является атом рутения. – Прим. перев.

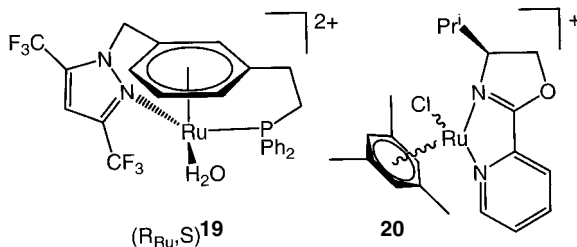


Рис. 2.8. Хиральные ареновые комплексы Ru(II)

химическая лабильность оптически активных ареновых комплексов Ru(II) зависит от природы входящих в его состав лигандов [62]. Известны оптически активные «привязные»* ареновые комплексы Ru(II), например **19** (рис. 2.8), которые обладают высокой конфигурационной стабильностью и рацемизируются с трудом [63].

Дэвенпорт и др. [64] сообщили о том, что комплекс $[(\eta^6\text{-}1,3,5\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_3)\text{Ru}(\text{py-ox-N,N'})\text{Cl}]^+$ (py-ox – 2-(оксазолинил-2)пиридин) **20** (рис. 2.8) устойчив в дихлорметане, но медленно эпитеримизируется в метаноле или ацетоне. Они предположили, что эпитеримизация аквакомплексов в растворителях, содержащих воду, происходит быстрее, чем в случае хлоридного комплекса. Конфигурационная стабильность подобных комплексов, похоже, зависит от природы бидентатного хелатирующего донорного лиганда в следующем порядке [65]: нейтральный N,N'-донорный лиганд > моноанионный N,N'-донорный лиганд > моноанионный N,O-донорный лиганд.

Комплексы с аминокислотами $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{aa})\text{Cl}]$, где aa – N,O-хелатирующая аминокислота, быстро претерпевают эпитеримизацию даже при температурах ниже 0°C [66, 67]. Сходная лабильность и эпитеримизация были обнаружены для комплексов с салицилальдимидами [68]. Напротив, комплексы с имидами $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{Ru}(\text{имин})\text{Cl}]^+$ конфигурационно стабильны, если их не нагревать до высокой температуры в полярных растворителях [69]. Конфигурационно стабильные полусэндвичевые ареновые комплексы рутения(II) представляют большой интерес как потенциальные асимметрические катализаторы (например, в реакциях Дильса–Альдера и Мукаймы) [63]. Для того чтобы комплекс мог выступать в роли кислоты Льюиса как катализатора, обычно требуется отщепление хлоридного лиганда, а обмен координированной воды в комплексе $[(\eta^6\text{-}1,3,5\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_3)\text{Ru}(\text{py-ox-N,N'})\text{(H}_2\text{O})]^{2+}$ происходит медленно в шкале времени ЯМР (растворитель – водный ацетон) [70]. Хиральные ареновые хлоридные комплексы Ru(II) как катализаторы для асимметрического переноса водорода в реакциях гидрирования можно активировать *in situ* обработкой КОН в 2-пропанолу [71].

* Авторы используют для комплексов типа **19** термин «tethered». В русскоязычной литературе по металлоорганической химии соответствующий термин отсутствует. Использованный при переводе термин «привязные» не является общепринятым. – *Прим. перев.*

Хиральность, связанная с лигандом, может реализоваться, например, за счет вторичного амина, координированного по атому азота [72], либо за счет планарной хиральности, обусловленной несимметричными аренами [50].

2.4. Биологическая активность

2.4.1. Антибактериальная активность

О противомикробной активности ареновых комплексов Ru(II) сообщений в литературе мало. Точер и др. [73] обнаружили, что координация метронидазола с образованием комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{метронидазол})]$ **21** (рис. 2.9) не изменяет электронного сродства метронидазола, но уменьшает время жизни продукта одноэлектронного восстановления (нитроанион-радикала) и увеличивает дифференциальную цитотоксичность по отношению к клеткам *E. coli*, выращенным в условиях гипоксии.

Шетинкая и др. [74] сообщили об антибактериальной и противогрибковой активности комплексов типа $[(\eta^6\text{-арен})\text{RuCl}_2(\text{X})]$, где арен – *n*-цимол или гексаметилбензол, а X – азот- или углерод-донорные лиганды. Было найдено, что соединения, содержащие производные карбенов, активны в отношении грам-положительных бактерий и грибов, включая *Staphylococcus aureus* в интервале концентраций 25–50 мкг/мл. Азотсодержащие комплексы значительно менее активны. Был сделан вывод о том, что соединения, содержащие гидрофобные заместители (например, **22**, рис. 2.9) проявляют значительно большую активность вследствие большей способности проникать через клеточную мембрану.

Аллардис и др. [36] обратили внимание на то, что некоторые фосфиновые комплексы типа $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{RuX}_2(\text{pta})]$ (**23**, рис. 2.9, где X – Cl, NCS и pta – 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1]декана) проявляют антибактериальную активность, но не указали действующих концентраций. Они предположили, что мишенями действия препаратов являются скорее белки, но не ДНК. Эти комплексы неактивны в отношении вирусов герпеса и полиомиелита, а вот кластер $[\text{H}_4\text{Ru}_4(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)_4]^{2+}$ оказался активным в отношении полиовируса.

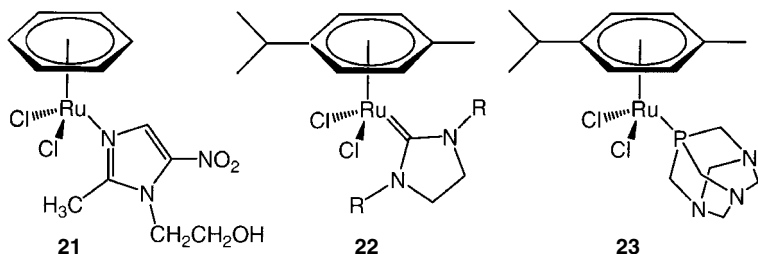


Рис. 2.9. Антимикробные ареновые комплексы Ru(II) [36, 73, 74]

2.4.2. Противоопухолевая активность

В своих первых работах [61] мы нашли, что ареновые комплексы Ru(II) с тремя монодентатными лигандами $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$, где X, Y или Z – галогенид, ацетонитрил или изоникотинамид, неактивны в отношении клеток рака яичников человека A2780 *in vitro*. Эти комплексы могут быть слишком реакционноспособны по отношению к компонентам клеточной культуральной среды и/или клеток и могут дезактивироваться биомолекулами до того, как они достигнут мишени.

На клетках рака яичников человека A2780 мы получили [61] воспроизводимые результаты по цитотоксичности хелатных диаминных комплексов типа $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{N},\text{N})(\text{X})]^+$, где N,N – в основном этилендиамин, X – хлорид (рис. 2.10). Клетки подвергались инкубации в присутствии препарата в течение 24 ч и промывались. Затем определялось число клеток после роста на свежей среде в течение последующих трех дней.

Активность комплексов увеличивалась с увеличением размера координированного арена:

бензол < *n*-цимол < бифенил < дигидроантрацен < тетрагидроантрацен.

На клетках этой линии комплекс бифенила проявляет цитотоксичность, сходную с таковой противоракового препарата карбоплатина (IC_{50} – доза, которая ингибирует рост 50% клеток, равна 6 мкМ), а комплекс тетрагидроантрацена оказался столь же активен, как и цисплатин (IC_{50} 0,6 мкМ) (см. табл. 2.1) [75]. Замещение хлорида другими лигандами, такими как иодид, оказывало слабое влияние на цитотоксичность.

Важным открытием [75] было то, что комплексы $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{N},\text{N})(\text{Cl})]^+$ столь же эффективны в культуре клеток против различных видов рака, в том числе и устойчивых к цисплатину. Отсюда следует предположение, что ме-

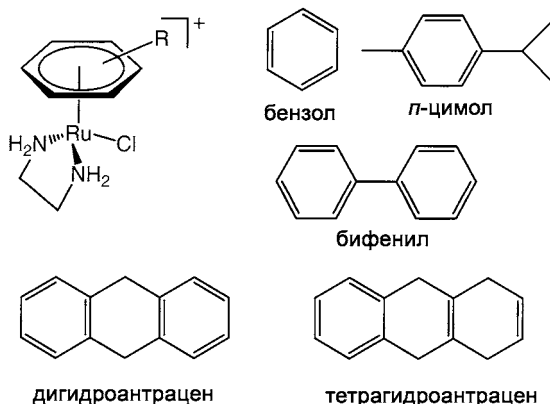


Рис. 2.10. Пять ареновых комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ (арены показаны отдельно), для которых была изучена активность в отношении клеток рака яичников человека A2780 [75]

Таблица 2.1. Значения IC₅₀ для ареновых комплексов Ru(II) [(η⁶-арен)Ru(X)(Y)(Cl)]A (для катионных комплексов A=PF₆) относительно раковых клеток яичников человека A2780 через 24 ч после введения препарата и сравнение с карбоплатином и цисплатином [75]

Арен/комплекс Pt	X	Y	IC ₅₀ , мкМ
n-Цимол	CH ₃ CN	CH ₃ CN	>100
n-Цимол	Cl	изоникотинамид	>100
C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₃	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		56
Бензол	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		17
n-Цимол	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		10
Карбоплатин			6
C ₆ H ₅ -C ₆ H ₅	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH(Et)		6
C ₆ H ₅ -C ₆ H ₅	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		5
Дигидроантрацен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		2
Цисплатин			0,6
Тетрагидроантрацен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		0,5

ханизм действия комплексов рутения отличен от механизма действия цисплатина.

Однако сравнение природного типа клеток A2780 с адриамицинорезистентными клетками A2780^{AD} показало разную степень перекрестной резистентности у ареновых комплексов Ru(II) и адриамицина. Адриамицин (доксорубицин) является признанным и широко используемым противораковым лекарственным средством. Клетки A2780^{AD} проявляют повышенную экспрессию плазменно-мембранного гликопротеина P-gr (молекулярная масса 170 кДальтон), который отвечает за элиминирование лекарственного препарата из клетки и имеет выраженное сродство к гидрофобным положительно заряженным ионам, каковыми являются комплексы [(η⁶-арен)Ru(N,N)(Cl/H₂O)]⁺²⁺. Знание активных сайтов таких белков, ответственных за множественную лекарственную устойчивость [76], могло бы помочь в создании ареновых комплексов Ru(II), которые не вовлекались бы в этот защитный механизм элиминирования. Введение верапамила – известного ингибитора P-gr – в клетки полностью восстанавливает чувствительность к ареновым комплексам Ru(II). Белок P-gr не участвует в транспорте цисплатина.

Ясно, что ареновые комплексы рутения имеют широкий спектр цитотоксического действия по отношению к раковым клеткам. Например, комплексы [(η⁶-C₆H₅-C₆H₅)Ru(en)Cl]PF₆ и [(η⁶-C₁₄H₁₂)Ru(en)Cl]PF₆, где C₁₄H₁₂ – 9,10-дигидроантрацен, активны не только по отношению к клеткам рака яичников человека A2780, но также по отношению к клеткам HT29 рака кишечника, Рапс-1 поджелудочной железы и NX02 клеткам рака легкого с величинами IC₅₀ в области 1–13 мкМ [77].

Мыши оказались способными переносить введение до 25 мг/кг комплекса $[\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{-C}_6\text{H}_5\text{Ru(en)Cl}]\text{PF}_6$ (RM175) на 1-й и на 5-й день без значительной потери веса тела по сравнению с 25 мг/кг цисплатина в виде одноразовой внутривенной инъекции. Препарат RM175 был активен в отношении рака яичников человека A2780 на ксенографической модели [75], давая значительное замедление роста, представляемое отношением Т/С (обработанный/контрольный)*, величина которого составляла 46% на 16-й день, по сравнению со значением Т/С 23% для цисплатина также на 16-й день.

Ингибирование роста этим комплексом рутения поддерживалось в A2780cis-ксенографической модели (Т/С 51% на 13-й день). Это ингибирование было значительно более высоким, чем в случае цисплатина. Однако препарат RM175 показал перекрестную резистентность с адриамицином *in vivo*, как это наблюдалось и *in vitro*.

2.4.3. Распределение в организме и метаболизм

Важно получить как можно больше сведений о метаболизме *in vivo* ареновых комплексов рутения(II), представляющих интерес как потенциальные лекарственные средства. Сейчас об этом известно мало, хотя и сообщалось об исследованиях циклопентадиенильных (Cp) комплексов металлов. В случае ферроцена $[(\text{Cp})_2\text{Fe}]$ координированный Cp-лиганд подвергается гидроксилированию в печени ферментной системой цитохрома P-450 (рис. 2.11) [78].

Комплексы рутеноцена изучались главным образом с целью маркировки биомолекул изотопами рутения, которые обладают выгодными радиоактивными свойствами.

Основным метаболитом, присутствующим как в желчи, так и в моче, после орального введения крысам ^{103}Ru -ацетилрутеноцена, $[(\text{Cp})\text{Ru}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-CH}_3)]$, является глюкуронид $[(\text{Cp})\text{Ru}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_9\text{O}_6)]$,

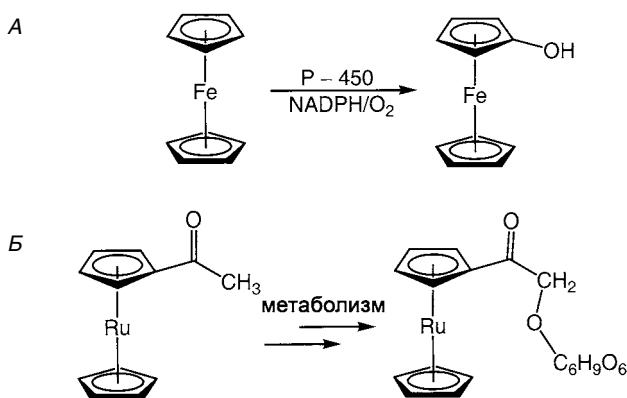


Рис. 2.11. Окисление ферроцена (А) и ацетилрутеноцена (Б) *in vivo* [78, 79]

* Т/С – treated/control (англ.) – Прим. перев.

образующийся при окислении метильной группы с образованием спирта и последующей этерификации глюкуроновой кислотой (рис. 2.11) [79]. Исходя из $^{103,106}\text{RuCl}_3$, был получен $[^{103,106}\text{Ru}]$ -рутеноценилаланин без носителя, который был предложен как препарат для визуализации поджелудочной железы. Однако никакого селективного удерживания этого препарата поджелудочной железой не наблюдалось [80]. γ -Излучающий радиоизотоп ^{103}Ru использовали для отслеживания действия блеомицина – противоракового препарата, который, как полагают, активируется железом *in vivo* [81].

Остается выяснить, может ли *in vivo* происходить нуклеофильная атака по координированному ареновому кольцу. В некоторых химических реакциях комплексы $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{N},\text{N})(\text{PR}_3)]^{2+}$ (где N,N – 1,10-фенантролин или 2,2'-бипиридил) реагируют с ионами H^- , CN^- и OH^- , давая η^5 -циклогексацикленильные комплексы [82].

2.5. Механизм действия

ДНК и белки являются одними из возможных мишеней для ареновых комплексов рутения в раковых клетках. Представляет интерес способность $\text{Ru}(\text{II})$ блокировать транспорт $\text{Fe}(\text{II})$, но это еще предстоит изучить.

2.5.1. Связывание с ДНК и входящими в их состав основаниями

Мы изучили [83] реакции комплексов рутения $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^{n+}$, где арен = бифенил (Bip), тетрагидроантрацен (ТНА), дигидроантрацен (ДНА)*, *n*-цимол (Сум) и бензол (Ben); $\text{X} = \text{Cl}^-$ или H_2O , с производными нуклеиновых кислот, используя ^1H , ^{31}P и ^{15}N ($^{15}\text{N}\text{-en}$) ЯМР-спектроскопию. В случае моонуклеозидов** комплекс $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ (рис. 2.12) связывается только с N7 гуанозина (Г), с N7 и N1 инозина (И) и с N3 тимидина (Т). Связывание с N3 цитидина (Ц) слабое, а с аденозином (А) связывание практически не наблюдается.

Реакционная способность различных участков связывания пуриновых и пиримидиновых оснований по отношению к $\text{Ru}(\text{II})$ при нейтральном значении pH уменьшается в следующем порядке:



Следовательно, ареновые комплексы $\text{Ru}(\text{II})$ с диаминными лигандами могут в большей степени проводить дифференциацию между основаниями Г и А, чем плоско-квадратные комплексы $\text{Pt}(\text{II})$. Селективность связывания, по-видимому, контролируется группами en-NH_2 , которые образуют водородные связи с экзоциклическими атомами кислорода (например, с С6О гуанозина,

* Речь идет о 1,4,9,10-тетрагидроантрацене и 9,10-дигидроантрацене. – Прим. перев.

** Точнее нуклеозидов. – Прим. перев.

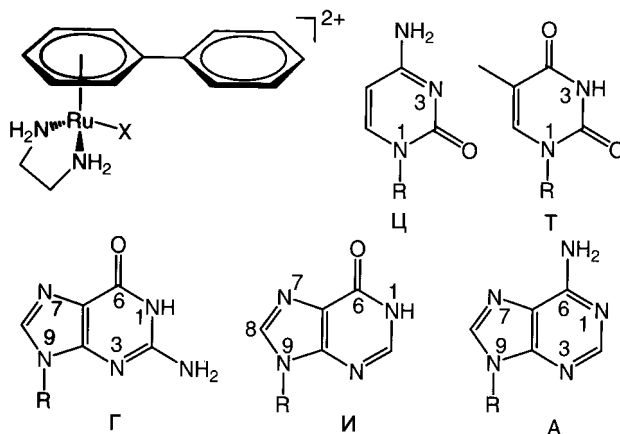


Рис. 2.12. Изображенный η^6 -бифенильный комплекс Ru(II) ($X = H_2O$) связывается с N7 гуанозина (Г), N7 и N1 инозина (И), N3 тимидина (Т) и лишь очень слабо с N3 цитозина (Ц), а также N7 аденозина (А) [83]. В конкурентных экспериментах с Г-, А- и Т-нуклеотидами (R – фосфат входящего в нуклеозид сахара) связывание наблюдается лишь с Г по атому N7

рис. 2.13), но не образуют связи и даже отталкиваются от экзоциклических аминогрупп пуриновых оснований (например, от C6NH₂ аденозина, рис. 2.13). Для мононуклеотидов наблюдается тот же характер селективности: в случае 5'-ТМФ, 5'-ЦМФ и 5'-АМФ в равновесии присутствуют значительные количества 5'-фосфатсвязанных частиц (40–60%). В случае 3',5'-циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), а также цАМФ никакого связывания с фосфодиэфирными группами обнаружено не было.

Реакции с нуклеотидами протекают путем гидратации комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ с последующим быстрым связыванием с 5'-фосфатной группой,

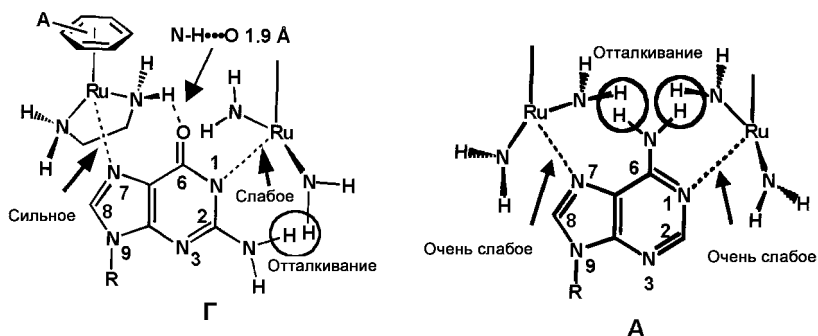


Рис. 2.13. Водородные связи и пространственные препятствия, дающие в результате сильное связывание комплекса $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ с гуанином, но очень слабое связывание с аденином [83]. Для ясности в правой структуре (А) показаны арен и хелатное кольцо диамина (en)

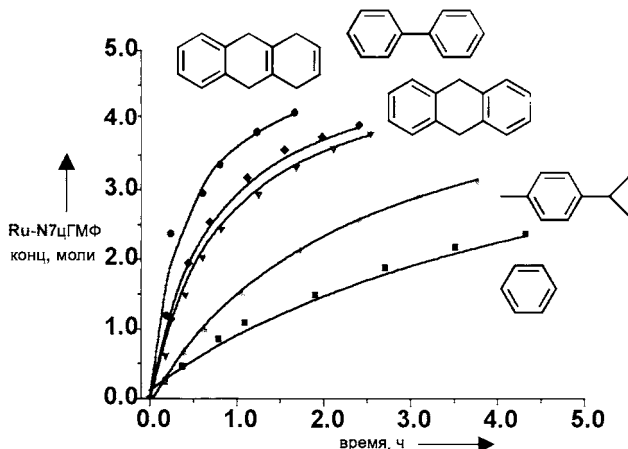


Рис. 2.14. Зависимость скорости реакции 3',5'-циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) от природы арена в комплексах $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, определенная по интегрированию сигнала H8 нуклеотида в спектре ^1H ЯМР для продукта $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})(\text{цГМФ-N7})]^+$ [83]. Можно видеть, что реакция идет быстрее в случае аренов, способных образовать π -комплексы с пуриновым основанием. Сходная зависимость от природы арена наблюдается для реакции хлоридного комплекса, хотя последняя реакция происходит медленнее

а затем перегруппировкой, приводящей к N7-, N1- или N3-связанным продуктам [83]. В конкурирующих реакциях $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ с 5'-ГМФ, 5'-АМФ, 5'-ЦМФ и 5'-ТМФ единственным конечным продуктом был комплекс $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{N7-ГМФ})]$. По-видимому, аквааддукты обладают большей реакционной способностью по сравнению с гидроксоаддуктами. Поэтому знание величин pK_a для аквааддуктов могло бы быть полезным в разработке лекарственных препаратов.

Связывание $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ с атомом N7 нуклеотида 5'-ГМФ снижает pK_a амидного фрагмента N1H на 1,4 единицы. Такое же уменьшение наблюдалось для аддуктов Pt(II) с Г [84, 85]. Следовательно, металлизирование по атому N7 гуанозина (Г), доступного в большой бороздке В-ДНК, может привести к значительным электронным возмущениям на атоме N1, который является Н-донором в паре оснований Г-Ц двойной спирали Уотсона-Крика. Такое возмущение может повлиять на устойчивость дуплекса.

В кинетических исследованиях (pH 7,0, 298 K, 100 mM NaClO₄) скорость реакции циклического диэфира цГМФ с $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^{n+}$ (где X – Cl или H₂O) уменьшалась, в зависимости от природы аренового лиганда в следующем порядке:

ТНА (14,7) > Bip (8,1) > ДНА (7,1) \gg Cym (2,5) > Ben (1,1 mM⁻¹c⁻¹).

Это позволяет предположить, что связыванию с атомом N7 способствуют гидрофобные взаимодействия между ареном и пуриновым основанием в ассоциативном переходном состоянии. Подобные эксперименты показали, что группы NH₂ диаминолиганда, природа арена и хлорид как уходящая

группа могут играть важную роль в реакциях нуклеиновых кислот с ареновыми комплексами Ru(II).

Мы изучили структуры [86] монофункциональных аддуктов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (где арен = Bip, ТНА или ДНА) с производными гуанина с помощью рентгеноструктурного анализа, а также в растворе методом 2D ЯМР-спектроскопии. В кристаллическом состоянии в комплексах 9-этилгуанина (9-EtG), $[(\eta^6\text{-ДНА})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})](\text{PF}_6)_2 \cdot (\text{MeOH})$ (рис. 2.15 А, см. вклейку) и $[(\eta^6\text{-ТНА})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2(\text{MeOH})$ выявляется сильное π - π стэкинг-взаимодействие между ареном и пуриновым основанием.

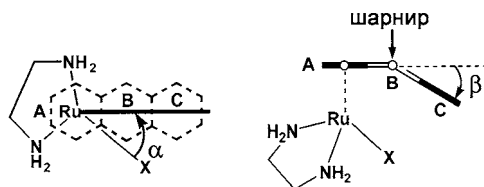
Внешнее кольцо дигидроантрацена располагается над пуриновым основанием на расстоянии 3,45 Å, а тетрагидроантрацена – 3,31 Å с двугранными углами 3,3° и 3,1° соответственно. В кристаллической структуре $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})](\text{PF}_6)_2 \cdot (\text{MeOH})$ существует межмолекулярный стэкинг между нависающим фенильным кольцом и шестичленным кольцом пурина на расстоянии 4,0 Å (двугранный угол 4,5°). Этот стэкинг стабилизирует циклическую тетрамерную структуру элементарной ячейки. В гуанозиновом (Guo) аддукте $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{Guo-N7})](\text{PF}_6)_2 \cdot 3,75(\text{H}_2\text{O})$ выявляется внутримолекулярный стэкинг нависающего фенильного кольца и пятичленного кольца пурина (3,8 Å, 23,8°). Чередование этих стэкинг-взаимодействий приводит к стопочной структуре. Хотя в кристаллической структуре комплекса $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})](\text{PF}_6)_2 \cdot (\text{MeOH})$ наблюдается *анти*-ориентация арена и пурина, в растворе преобладает *син*-ориентация для всех комплексов бифенила, как показывают спектры ЯМР-NOE. Преобладание *син*-ориентации может быть вызвано гидрофобными взаимодействиями между ареном и кольцами пурина.

В кристаллическом состоянии комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})]^{2+}$ обнаружена значительная переориентация ареновых лигандов и конформационные изменения по сравнению с исходными хлоридными комплексами $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ [86], см. табл. 2.2. Ареновые лиганды оказываются подвижными за счет вращения вокруг π -связей арен–Ru, пропеллерного твиста бифенила и «шарнирного» складывания лигандов ТНА и ДНА.

Пропеллерный твист бифенила уменьшается примерно на 10°, что делает максимальным внутри- и межмолекулярный стэкинг с пуриновым кольцом, а стэкинг пуринового кольца с ТНА и ДНА оптимален в том случае, когда эти трициклические системы «согнуты» примерно на 30°, что заключается в увеличении «перегиба» ТНА и уплощении ДНА. Чашеобразная конформация координированного ТНА наблюдалась в случае комплекса $[(\eta^6\text{-ТНА})\text{RuCl}_2(\text{DMCO-S})]$ [87].

Прочные стереоспецифичные водородные связи между протоном NH лиганда en, направленным в сторону от арена, и карбонильной группой C6O гуанозина присутствуют в кристаллических структурах аддуктов с гуанином [86] (рис. 2.15 А; средняя величина расстояния N...O составляет 2,8 Å, а угла N–H...O – 163°). Из данных ЯМР в растворе следует, что протоны группы NH₂ лиганда en образуют в сильную водородную связь с 5'-фосфатом и C6O в аддукте с 5'-ГМФ. Сильное Н-связывание между C6O гуанина и протонами NH₂-группы этилендиамина отчасти объясняет то, что комплекс

Таблица 2.2. Сравнение ориентации и «шарнирного» сгибания арена в комплексах $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^{n+}$, где арен – дигидро- или тетрагидроантрацен и $\text{X} = \text{Cl}$, H_2O или N7-связанный 9-этилгуанин [86, 106]



Арен	Угол ориентации α , °			Угол сгиба шарнира β , °		
	X =			X =		
	Cl	H ₂ O	9EtG	Cl	H ₂ O	9EtG
Дигидроантрацен	64,4	34,0 ^a	20,1	40,6	35,1 ^a	31,9
Тетрагидроантрацен	45,1	63,7	25,6	-7,5	-1,8	27,8

^a Среднее значение для двух независимых катионов в элементарной ячейке.

$[(\eta^6\text{-DHA})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ предпочитает давать аддукт с гуанином, а не с аденином. Таким образом, прямая координация с основаниями, интеркаляция и стереоспецифическое образование Н-связи – все это положительные моменты, которые следует учесть при дизайне ареновых комплексов Ru(II) с целью распознавания ДНК (рис. 2.15 Б). Явное предпочтение по отношению к Г-основаниям может позволить комплексам Ru(II) прочно связываться с Г-обогащенными теломерами ДНК, которые играют ключевую роль в процессе деления клеток.

Концепция индуцировано-подогнанного распознавания ДНК металлоорганическими комплексами Ru(II), содержащими динамические стереогенные центры путем динамической эпимеризации, интеркалирования и кросс-связывания может оказаться полезной в распознавании противораковых лекарственных препаратов [72]. Диастереомеры R_{Ru}^* , R_{N}^* и S_{Ru}^* , S_{N}^* комплекса $[(\eta^6\text{-Bip})\text{RuCl}(\text{Et-en})]^+$ (рис. 2.16) претерпевают медленное взаимопревращение в воде ($t_{1/2}$ около 2 ч, 298 К, pH 6,2), а реакция с 9-EtG селективно приводит к диастереомерам S_{Ru}^* , R_{N}^* . Динамическое хиральное распознавание гуанина может привести к связыванию ДНК с высокой диастереоселективностью. Биядерный комплекс $[(\eta^6\text{-Bip})\text{RuCl}(\text{en}))_2\text{-(CH}_2\text{)}_6]^+$ (рис. 2.16) имеет сходные динамические характеристики, вызывает значительное раскручивание (31°) плазмидной ДНК и эффективно ингибирует *in vitro* ДНК-зависимый синтез РНК. Угол раскручивания в данном случае более чем вдвое превышает угол раскручивания при действии моноядерного комплекса $[(\eta^6\text{-Bip})\text{RuCl}(\text{Et-en})]^+$ (табл. 2.3) и приписывается кросс-связыванию ДНК и нарушению структуры ДНК из-за нависающих фенильных колец.

Следует отметить, что комплексы Ru(II), содержащие арены, которые не могут внедряться в ДНК (например, $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$), дают очень малые

* В оригинале – рацемические пары. – Прим. перев.

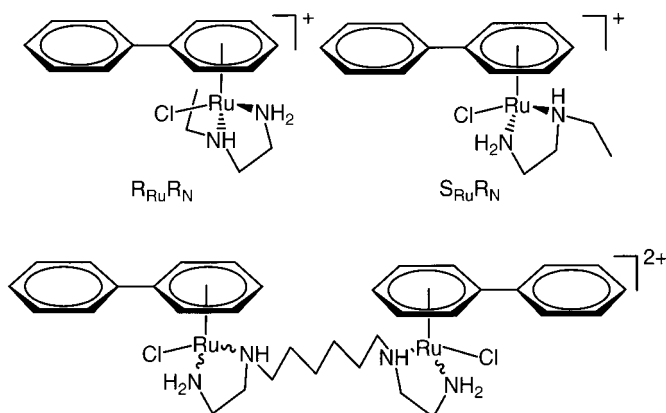


Рис. 2.16. Моно- и биядерные комплексы с хиральными центрами на атомах рутения и азота. Для биядерного комплекса существуют 10 возможных конфигураций: 4 пары энантиомеров* ($R^*R^*R^*R^*$)-(±), ($S^*R^*R^*R^*$)-(±), ($R^*S^*R^*R^*$)-(±), ($S^*R^*R^*S^*$)-(±) и две мезо-формы $SSRR$ и $SRSR$. Синтез моноядерного комплекса дает два диастереомера в соотношении (R^*_{Ru}, R^*_N) : (S^*_{Ru}, R^*_N) = 74 : 26. Каждая единица биядерного комплекса имеет одну и ту же заселенность диастереомеров [72]

Таблица 2.3. Раскручивание сверхскрученной pSP73KB ДНК ареновыми комплексами Ru(II) на основании данных по электрофоретическим подвижностям сверхскрученной и одноцепочечной форм [72, 88, 89].

Комплекс	Угол раскручивания, °
$[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$	7
$[\text{Pt}(\text{диен})\text{Cl}]^+$	6
$[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$	14
$[(\eta^6\text{-THA})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$	14
$[(\eta^6\text{-DHA})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$	14
$[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{Et-en})\text{Cl}]^+$	14
$[(\eta^6\text{-Bip})\text{RuCl}(\text{en})_2\text{-(CH}_2)_6]^{2+}$	31

углы раскручивания, сходные с углами, которые дает монофункциональный комплекс Pt(II), $[\text{Pt}(\text{диен})\text{Cl}]^+$ (6° [88]). Биядерный комплекс дает также межтяжевые кросс-связи в ДНК в 213-бр плазмидном фрагменте с эффективностью, сходной с эффективностью бифункционального цисплатина и 1,3-ГГ, как и 1,2-ГГ и 1,3-ГТГ-межтяжевые кросс-связи в сайто-специфично рутенированных 20-мерах. Этот комплекс также эффективно блокирует внедрение этидиум-бромид*.

* 3,8-Диамино-5-этил-6-фенилфенантридиний-бромид, краситель для окраски ДНК при ПЦР- или ЛЦР-анализе. – Прим. перев.

Сравнительные исследования [89] показали, что комплексы $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$, где арен = Bp, DNA, TNA или Cym – относительно быстро связываются с ДНК из тимуса теленка при 310 К, давая 50%-ное связывание в течение 3 ч для *n*-цимолowego комплекса и в течение 10–15 мин – для остальных комплексов. Главные стоп-сайты в тестовых синтезах РНК с помощью РНК-полимераз *in vitro* на ДНК-темплатах, модифицированных этими ареновыми комплексами Ru(II), сходны с теми, которые выявляют аддукты цисплатина с ДНК, хотя и меньше по сравнению с аддуктами цисплатина. Эффективность *n*-цимолowego комплекса значительно ниже, чем эффективность других комплексов.

Из исследований кругового дихроизма (CD) и дифференциальной импульсной полярографии [89] следует предположение о том, что комплексы бифенила и антрацена вызывают неденатурирующие изменения в конформации ДНК, в противоположность комплексам бензола и *n*-цимола. Например, связывание первых комплексов с ДНК вызывает появление полосы CD около 375 нм, вызванной переносом заряда с Ru(II) на π^* -орбиталь арена. Такая же полоса наблюдается при связывании с поли(dГ-dЦ), но не с поли(dА-dТ). На основании данных по поточному линейному дихроизму (LD) можно предположить, что эти ареновые комплексы Ru(II) вызывают сгибание ДНК. Данные по LD находятся в соответствии также с частичным внедрением (интеркаляцией) комплексов бифенила и антрацена в ДНК. В соответствии с этим, данные комплексы вызывали потерю флуоресценции аддуктов ДНК с этидиум-бромидом, что согласуется с замещением интеркалированного этидиума на ареновые комплексы Ru(II) с расширенными системами колец. Интересно, что комплекс *n*-цимола, который содержит метильный и изопропильный заместители в ароматическом кольце, искажал двойную спираль ДНК и дестабилизировал ее по отношению к термическому воздействию значительно сильнее, чем комплексы бифенила и антрацена. Все эти данные согласуются с уникальным характером связывания ареновых комплексов рутения с ДНК.

Гопаль и др. [90] установили, что бифункциональный комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{DMCO})]$ ингибирует релаксирующую ДНК активность топоизомеразы II и образует лекарственно-зависимый комплекс деления. Такое ингибирование может быть следствием прямого связывания комплекса деления одновременно с рутением и с ферментом. Комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2(\text{DMCO})]$, использованный в анализе, растворяли в смеси воды и ДМСО, так что вероятно участие в процессе продуктов гидролиза. Цитотоксичность комплекса по отношению к клеткам Crit-2 (лимфома человека не типа Ходжкин) оказалась умеренной (IC_{50} около 150 мкМ). Моррис и др. [61] не обнаружили никакого ингибирования топоизомераз I и II монофункциональными комплексами $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^+$, где арен = *n*-цимол, X = Cl или I, либо арен = Bp или PhCOOMe, X = Cl.

Растворимый в воде тетраядерный кластер $[\text{H}_4\text{Ru}_4(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)_4][\text{BF}_4]_2$ связывается с плазмидной ДНК [91], однако характер этого взаимодействия неизвестен. Фосфиновый комплекс $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{RuCl}_2(\text{pta})]$ (соединение **23** на рис. 2.9) связывается с ДНК в кислой среде ($\text{pH} < 7$), но не в щелочной,

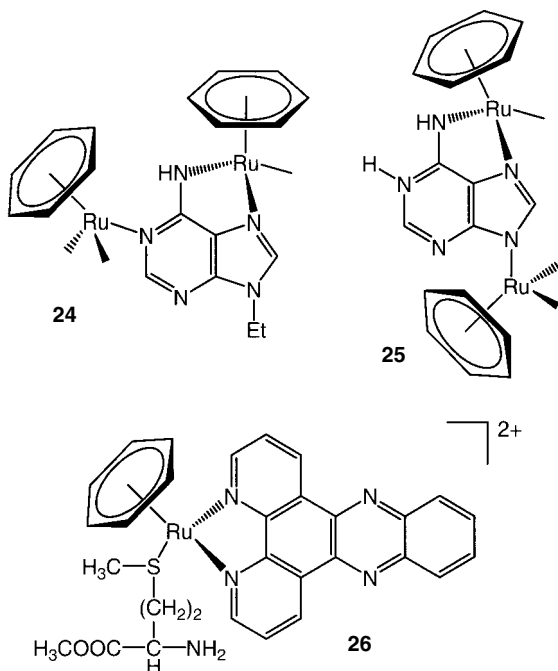


Рис. 2.17. Мостиковый тип связывания 9-этиладенина в циклическом тримере (**24**) и аденина в тетрамере (**25**). Комплекс **26** содержит диаминовый фрагмент в качестве ДНК-интеркалятора

что согласуется с необходимостью протонирования атома азота лиганда рта (pK_a 6,5) для более эффективного взаимодействия комплекса с ДНК [92]. Обсуждаемое протонирование может усиливаться вблизи ДНК, где значение рН может быть пониженным.

Хелатирование фрагмента $\{(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}\}^{2+}$ атомом N7 и депротонированным атомом N6 производных аденина с образованием 5-членных колец происходит легко, давая трехъядерные (или четырехъядерные, если доступен атом N9) аддукты (комплексы **24** и **25** на рис. 2.17) [93].

Реакция комплексов $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{D}_2\text{O})_3]^{2+}$ с 5'-АМФ приводит к диастереомерным циклическим тримерам $[\{(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(5'\text{-AMP})_3\}]$, в которых 5'-АМФ координирован с Ru посредством атомов N1, N7 и депротонированного атома N6 [94]. Интересно, что реакция упомянутого аренового триаквакомплекса Ru(II) с 5'-АДФ первоначально приводит к макрохелатированию за счет атома N7 дифосфата, а затем – к отщеплению β -фосфата и образованию устойчивого тримерного комплекса с 5'-АМФ. Такое же отщепление наблюдалось в случае другого дифосфата – 5'-ГДФ, но для монофосфата – 5'-ГМФ происходит лишь связывание по атому N7 с образованием аддуктов состава 1:1 и 2:1.

Фродль и др. [95] использовали ДНК-интеркалятор dppz (дипиридо-[3,2-*a*:2'3'-*c*]феназин) в качестве хелатирующего диамина в комплексах $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{Aa})(\text{dppz})]^{n+}$ (Aa – L-цистеин или L-метионин) (например,

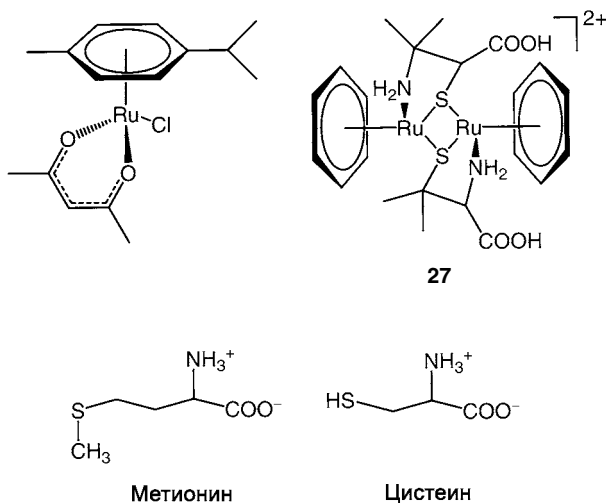


Рис. 2.18. Вверху слева: ацетилацетонатный комплекс, который одинаково хорошо связывается как с аденином, так и с гуанином. Этот комплекс демонстрирует, что хелатный лиганд может быть использован для улучшения селективности связывания с основаниями ДНК (по сравнению с комплексом этилендиамина) [96]. Вверху справа: биядерный комплекс (**27**) с мостиковыми атомами серы пенициллина. Внизу: структурные формулы аминокислот метионина и цистеина.

комплекс **26** на рис. 2.17). При этом наблюдалось стабильное связывание за счет интеркалирования с константами устойчивости, которые возрастали примерно от 10^5 до 10^7 с увеличением заряда комплексов от +1 до +3.

Явное предпочтительное связывание комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{II})(\text{en})]^{2+}$ с атомом N7 гуанина вызывается как высокой электронной плотностью на атоме N7, так и сильным Н-связыванием между группой NH лиганда en и группой C6O гуанина, а также возможным стэкингом арен–пурин. Поэтому мы заменили донорную составляющую водородной связи в этилендиаминовом лиганде на акцепторную в ацетилацетонатном (асас) лиганде с целью изменить селективность по отношению к основаниям, входящим в состав нуклеиновых кислот. Цель была достигнута: комплекс $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{Ru}(\text{асас})\text{Cl}]$ (рис. 2.18) одинаково хорошо связывается как с аденозином, так и с гуанозином [96], и противораковая активность комплекса *in vitro* (по отношению к клеткам рака яичников человека A2780) сохраняется.

2.5.2. Аминокислоты и белки

Рентгеноструктурные исследования аминокислотных и пептидных комплексов $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{aa})\text{Cl}]^{n+}$, где aa – пеницилламин, метиловый эфир гистидина или триглицин, выявляют ряд интересных особенностей [97]. Пеницилламин образует хелат за счет аминогруппы и тиолатного атома S,

который является мостиком между двумя атомами Ru, так что образуется 4-членный Ru–S–Ru–S цикл (27, рис. 2.18). Гистидин образует хелат за счет аминогруппы и атома азота имидазола, а в триглициновом комплексе (полученном в водной среде реакцией с димером $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$) трипептид образует хелат за счет терминальной аминогруппы и депротонированного пептидного атома N.

Шелдрик и Хиб [98] сообщили о получении комплекса с аминокислотой $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L-аланин-N,O})\text{Cl}]$. Кристаллы этого вещества содержали энантиомеры с противоположной хиральностью при атоме Ru как стереогенном центре. Этот комплекс реагирует с 9-EtG, давая другой комплекс, $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L-аланин})(9\text{-Et-G})]^+$, который содержит 9-EtG, связанный через атом N7, и стабилизированный водородной связью $\text{C6O}\dots\text{H-N}$. Реакция комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L-аланин-OMe})\text{Cl}_2]$, где L-аланин-OMe – метиловый эфир L-аланина, с 9-EtG привела к замещению координированного монодентатного метилового эфира L-аланина. Эти исследователи обнаружили, что в воде легко протекает гидролиз комплексов по связям Ru–Cl, как это отмечали также Дерсна и Бэйрд [99].

Сообщалось [98], что комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{пролин})\text{Cl}]$ проявляет значительную противораковую активность по отношению к лейкемии P388 *in vivo*, однако, новых сообщений об этой активности не появилось. Мы же нашли, что сходные комплексы аминокислот неактивны в отношении клеток рака яичников человека A2780 [77].

Реакции ареновых противораковых комплексов рутения(II) с серосодержащими аминокислотами цистеином и метионином (рис. 2.18) представляют большой интерес с точки зрения сильного влияния серосодержащих аминокислот на внутриклеточную химию лекарственных препаратов на основе платины, на их участие в процессах детоксикации и резистентности [100]. Мы установили [101], что комплекс $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ реагирует с аминокислотой, содержащей тиольную группу, L-цистеином, в водном растворе при 310 K, pH 2–5 медленно, и реакция проходит лишь на 50% при мольном соотношении реагентов 1:2. Предположительно на первой стадии образуется гидрат, а затем – аддукт 1:1 путем замещения воды на S- или O-связанный цистеин. В продуктах реакции были обнаружены также два биядерных комплекса. В этих случаях половина или даже все хелатирующие этилендиаминовые лиганды были замещены и в комплексе присутствовали одна или две мостиковые молекулы цистеина. Происходило также образование необычных кластеров $\{(\text{Bip})\text{Ru}\}_8$, особенно при более высоких концентрациях цистеина. Реакция подавлялась в 50 mM растворе ацетата триэтиламмония при pH > 5 или в 100 mM растворе NaCl, откуда следует предположение о том, что в плазме крови или в клетке ареновые комплексы Ru(II)–en вовсе не обязательно дезактивируются тиолами. Аналогично, реакции по тиоэфирному атому серы метионина идут относительно плохо. Комплекс $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ прореагировал с L-метионином (L-MetH) при начальном значении pH 5,7 в течение 48 ч при 310 K лишь на 27% и дал только один аддукт – $[(\eta^6\text{-Bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{L-MetH-S})]^{2+}$.

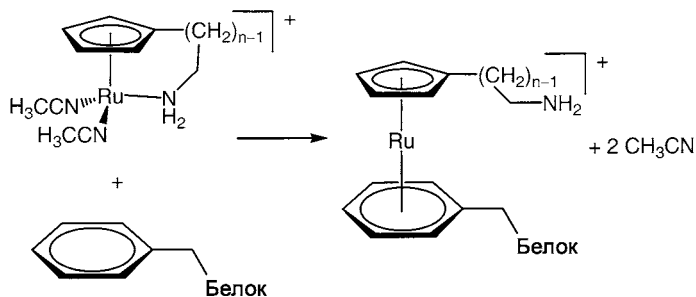


Рис. 2.19. Образование η^6 -аддукта боковой цепью фенилаланина в белке секретине реакцией с производным CpRu(II) [103]

Реакции полусэндвичевых комплексов Ru (Rh и Ir) с эфирами аминокислот использовались для пептидного синтеза с заданной последовательностью аминокислот. В пептидах, координированных по атомам N и N', происходит удлинение цепи при терминальном атоме N в реакции с эфирами α -аминокислот (например, в MeOH в присутствии NEt_3). Цепи длиной до 9 аминокислот могут быть созданы с применением комплексов, содержащих фрагмент $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{RuCl}]^+$ [102].

Тот факт, что Ru(II) может образовывать π -комплексы с ароматическими боковыми цепями белков представляет собой интересную возможность. Такие комплексы известны для простых производных аминокислот, например, триптофана [50], но их существование еще предстоит доказать для аддуктов белков с ареновыми комплексами Ru(II). Такие комплексы известны для циклопентадиенильных производных. Реакции «привязных»* циклопентадиенильных комплексов $\{[(\eta^5\text{-C}_5, \eta^1\text{-N})\text{-C}_5\text{H}_4(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2]\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_2\}^+$ ($n = 2, 3$) с белками, такими как гормон секретин, в воде могут привести к сэндвичевым комплексам путем координации атома рутения по арену, находящемуся в боковой цепи остатка фенилаланина (рис. 2.19) [103].

2.5.3. Гидратация

Поскольку ясно [83, 101], что гидратация может быть скоростью определяющей стадией в реакциях ареновых комплексов Ru(II) как с аминокислотами, так и с нуклеотидами, мы приступили к подробному изучению факторов, которые влияют на скорость и степень гидратации и величину pK_a образующегося аква-аддукта.

Таубе и др. [104] первыми изучили химию аквааддуктов ареновых комплексов Ru(II) и нашли, что величина pK_a для комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{-}$

* Авторы используют для комплексов этого типа термин «strapped» (ремешковые). В русскоязычной литературе по металлоорганической химии соответствующий термин отсутствует. При переводе вновь, как и на с. 61, использован термин «привязные», не являющийся общепринятым. – Прим. перев.

$\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})^{2+}$ равна 6,3, а для его этилендиаминового аналога 7,9. Они отметили увеличение сродства $\text{Ru}(\text{II})$ к хлорид-иону при замещении аммиака на бензол (из сравнения сродства к хлорид-иону комплексов $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ и $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$), что объясняется электроноакцепторными свойствами η^6 -связанного арена*. Дадси и др. [105] сообщили о том, что введение бензола в гексагидрат $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ увеличивает скорость обмена молекул воды в 640 раз, в то время как при дополнительном введении дипиридила в комплекс $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ с образованием $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ скорость этого обмена уменьшается в 174 раза и становится лишь в 4 раза большей, чем в гексааква-ионе.

Мы сообщили [106] о результатах рентгеноструктурного анализа аквакомплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Y}][\text{PF}_6]_n$, где арен – бифенил (Bip), $\text{Y} = 0,5 \text{ H}_2\text{O}/0,5 \text{ OH}$, $n = 1,5$; арен – тетрагидроантрацен (ТНА), $\text{Y} = 0,5 \text{ H}_2\text{O}/0,5 \text{ OH}$, $n = 1,5$; арен – ТНА, $\text{Y} = \text{H}_2\text{O}$, $n = 2$ и арен – дигидроантрацен (ДНА), $\text{Y} = \text{H}_2\text{O}$, $n = 2$. В комплексе бифенила наблюдается большой пропеллерный твист (45°) между связанным с металлом фенильным кольцом и некоординированным кольцом. В этих аквакомплексах трициклический лиганд ТНА является относительно плоским, а для системы колец лиганда ДНА наблюдается заметный изгиб (изгиб «шарнира» порядка 35°), как и в хлоридном комплексе (41°) (см. табл. 2.2). Скорости гидратации хлоридных комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, где арен = Bip, ДНА и ТНА ($1,23\text{--}2,59 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ при 298 К, $I = 0,1 \text{ М}$) более чем в 20 раз превосходят соответствующие величины для цисплатина. При добавлении NaCl в концентрации 100 мМ (близкой к концентрации NaCl в плазме крови) очень быстро происходит обратная реакция – введение аниона в комплекс. Как гидратация, так и обмен с анионом происходят примерно вдвое быстрее в случае комплексов с ДНА и ТНА по сравнению с комплексами бифенила. Реакции гидролиза, по-видимому, протекают по ассоциативному механизму. Для аквакомплексов с лигандами Bip, ДНА и ТНА величины pK_a составляют 7,71, 7,89 и 8,01 соответственно. Скорость гидролиза комплексов $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^+$ можно очень сильно уменьшить, заместив $\text{X} = \text{хлорид}$ на иодид или азид [107].

При физиологически значимых концентрациях комплекса (0,5–5 мкМ), значении pH 7,4 и температуре, равной температуре тела (310 К) ареновые комплексы рутения(II) должны присутствовать в плазме крови в основном в виде хлоридных комплексов (>89%). В то же время, в ядре клетки ($[\text{Cl}^-] = 4 \text{ мМ}$) должны образовываться значительные количества (45–65%) более реакционноспособных аквааддуктов, а также – в меньших количествах – гидроксокомплексы (9–25%).

Интересно, что ацетилацетонатный (асас) комплекс, $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{Ru}(\text{асас})\text{Cl}]$ (см. рис. 2.18), гидролизуетсЯ значительно быстрее, чем этилендиаминовый аналог [96]. Значение pK_a аквалиганда в ацетилацетонатном комплексе (9,4) значительно больше, чем в комплексе с этилендиамином (8,24, [83]).

* Точнее, обратным донированием электронной плотности с металла на η^6 -связанный лиганд. – *Прим. перев.*

Следовательно, «вспомогательные» лиганды в ареновых комплексах Ru(II) можно использовать для «тонкой настройки» электронных свойств и, таким образом, гидролитического поведения комплексов – характеристик, которые могут быть важными при создании лекарственных препаратов.

2.6. Заключение

Диамминные комплексы платины сейчас широко используются в лечении рака, но развитие резистентности к платине и отсутствие активности соединений платины по отношению к нескольким разновидностям рака являются проблемой для медиков, которые предстоит разрешить. Открытие противораковой активности в ряду комплексов других металлов может привести к дальнейшим успехам в лечении рака. Металлоорганические комплексы являются перспективными для исследований в качестве противораковых препаратов. Только один металлоорганический комплекс, титаноцендихлорид, прошел клинические испытания. Однако эти испытания оказались неудачными ввиду нестабильности комплекса в воде и трудности изготовления лекарственной формы, удобной для введения пациентам. Наши работы выявили обнадеживающую противоопухолевую активность некоторых ареновых комплексов рутения(II) *in vitro* и *in vivo*. Эти комплексы устойчивы и растворимы в воде. Структуру их молекул можно в значительной степени варьировать для оптимизации биологической активности и сведения к минимуму побочных эффектов путем замены арена и трех других координированных по металлу лигандов. Из результатов первоначальных исследований с участием аминокислот и нуклеотидов следует, что в различных реакциях ареновых комплексов Ru(II) может наблюдаться как кинетический, так и термодинамический контроль. По-видимому, по характеру биологической активности ареновые комплексы Ru(II) отличаются от тех металлосодержащих противораковых комплексов, которые в настоящее время используются в клинике или находятся на стадии клинических испытаний.

Благодарности

Мы благодарим Эдинбургский технологический фонд, ЕС (программы COST и Мари Кюри)*, а также Wellcome Trust и Oncosense Ltd** за поддержку исследований. Наша работа по противораковым металлоорганическим комплексам стала возможной благодаря замечательному вкладу наших коллег, в том числе

* Программа COST (European Cooperation in the field of Scientific and Technical research) – программа ЕС в области развития науки и техники. Программа Мари Кюри – часть программы ЕС по улучшению исследовательского потенциала человека и социально-экономических основ. – *Прим. ред.*

** Wellcom Trust – Британский фонд инновационных исследований в области медицины. Oncosense Ltd. – британская компания, обладающая лицензией на использование препаратов на основе рутения в химиотерапии. – *Прим. ред.*

доктора Дункана Джодрелля и его сотрудников из онкологического отделения Западного главного госпиталя в Эдинбурге и других, имена которых перечислены в наших публикациях. Полученные в нашей лаборатории ареновые комплексы рутения(II), описанные в настоящем обзоре, защищены патентами PCT/GB2003/02879, PCT/GB01/02824 и PCT/GB00/04144.

Литература

1. R. MacKinnon, FEBS Lett. **2003**, 555, 62–65.
2. For example see articles in Chem. Rev. **2004**, 104, pp. 347–1200.
3. M. Isalan, A. Klug, Y. Choo, Biochemistry **1998**, 37, 12026–12033.
4. Z. Guo, P. J. Sadler, Angew. Chem. Int. Ed. **1999**, 38, 1512–1531.
5. Z. Guo, P. J. Sadler, Adv. Inorg. Chem. **2000**, 49, 183–306.
6. P. Agre, D. Kozono, FEBS Lett. **2003**, 555, 72–78.
7. P. Köpf-Maier, H. Köpf, in S. P. Fricker (ed.), Metal Compounds in Cancer Therapy, Chapman & Hall, London, **1994**, pp. 109–146.
8. G. Jaouen, A. Vessières, I. S. Butler, Accr. Chem. Res. **1993**, 26, 361–369.
9. R. H. Fish, G. Jaouen, Organometallics **2003**, 22, 2166–2177.
10. B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, Nature (London) **1969**, 222, 385–386.
11. H. M. Pinedo, J. H. Schornagel (Eds.), Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy, Plenum, New York, **1996**.
12. M. Guo, Z. Guo, P. J. Sadler, J. Biol. Inorg. Chem. **2001**, 6, 698–707.
13. K. Mross, P. Robben-Bathe, L. Edler, J. Baumgart, W. E. Berdel, H. Fiebig, C. Unger, Onkologie **2000**, 23, 576–579.
14. N. Kröger, U. R. Kleeberg, K. Mross, L. Edler, G. Sass, D. K. Hossfeld, Onkologie **2000**, 23, 60–62.
15. M. M. Harding, G. Morksi, Curr. Med. Chem. **2000**, 7, 1289–1303.
16. O. R. Allen, L. Croll, A. L. Gott, R. J. Knox, P. C. McGowan, Organometallics **2004**, 23, 288–292.
17. T. Pieper, K. Borsky, B. K. Keppler, in M. J. Clarke, P. J. Sadler (Eds.), Topics in Biological Inorganic Chemistry, Vol. 1, Springer Verlag, Berlin, **1999**, pp. 171–199.
18. M. J. Clarke, Coord. Chem. Rev. **2003**, 236, 209–233.
19. M. J. Clarke, Met. Ions. Biol. Syst. **1980**, 11, 231–283.
20. G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo, G. Mestroni, in M. J. Clarke, P. J. Sadler (Eds.), Topics in Biological Inorganic Chemistry, Vol. 1, Springer Verlag, Berlin, **1999**, pp. 143–169.
21. M. Galanski, V. B. Arion, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, Curr. Pharm. Des. **2003**, 9, 2078–2089.
22. A.H. Velders, H. Koijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. de Vos, J. Reedijk, Inorg. Chem. **2000**, 39, 2966–2967.
23. R. A. Vilapiana, F. González-Vílchez, E. Gutierrez-Puebla, C. Ruiz-Valero, Inorg. Chim. Acta **1994**, 224, 15–18.
24. M. J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A. D. Kelman, J. Inorg. Biochem. **1980**, 12, 79–87.
25. Z. Guo, A. Habremariam, P. J. Sadler, B. R. James, Inorg. Chim. Acta **1998**, 273, 1–7.

26. E. O. Fischer, R. Böttcher, Z. Anorg. Allgem. Chem. **1957**, 291, 305–309.
27. E. O. Fischer, C. Elschenbroich, C. G. Kreiter, J. Organomet. Chem. **1967**, 7, 481–485.
28. G. Winkhaus, H. Singer, J. Organomet. Chem. **1967**, 7, 487–491.
29. M. A. Bennett, G. B. Robertson, A. K. Smith, J. Organomet. Chem. **1972**, 43, C41–C43.
30. R. A. Zelonka, M. C. Baird, J. Organomet. Chem. **1972**, 35, C43–C46.
31. S. Suravajjala, J. R. Polam, L. C. Porter, J. Organomet. Chem. **1993**, 461, 201–205.
32. S. Bhambri, D. A. Tucher, Polyhedron **1996**, 15, 2763–2770.
33. E. L. Muetterties, J. R. Bleeke, E. J. Wucherer, T. A. Albright, Chem. Rev. **1982**, 82, 499–525.
34. D. Braga, A. Abati, L. Scaccianoce, B. F.G. Johnson, F. Grepioni, Solid State Sci. **2001**, 3, 783–788.
35. R. Baldwin, M. A. Bennett, D. C. R. Hockless, P. Pertici, A. Verrazzani, G. Uccello Barretta, F. Marchetti, P. Salvandori, J. Chem. Soc., Dalton Trans. **2002**, 4488–4496.
36. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, P. A. Salter, R. Scopelliti, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 35–42.
37. H. Le Bozec, D. Touchard, P. H. Dixneuf, Adv. Organomet. Chem. **1989**, 29, 163–247.
38. G. Vitulli, P. Pertici, P. Salvadori, J. Chem. Soc., Dalton Trans. **1984**, 2255–2257.
39. P. Pertici, G. Vitulli, R. Lazzaroni, P. Salvadori, P. L. Barili, J. Chem. Soc., Dalton Trans. **1982**, 1019–1022.
40. G. Bodes, F. W. Heinemann, G. Jobi, J. Klodwig, S. Neumann, U. Zenneck, Eur. J. Inorg. Chem. **2003**, 281–292.
41. M. A. Bennett, T. N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, Inorg. Synth. **1982**, 21, 74–78.
42. T. Hayashida, H. Hagashima, Organometallics **2002**, 21, 3884–3888.
43. J. W. Janetka, D. H. Rich, J. Am. Chem. Soc. **1997**, 119, 6488–6495.
44. P. Pertici, A. Verrazzani, G. Vitulli, R. Baldwin, M. A. Bennett, J. Organomet. Chem. **1998**, 551, 37–47.
45. P. Pertici, A. Verrazzani, E. Pitzalis, A. M. Caporusso, G. Vitulli, J. Organomet. Chem. **2001**, 621, 246–253.
46. M. Stebler-Röthlisberger, A. Ludi, Polyhedron **1986**, 5, 1217–1221.
47. U. Koelle, C. Weisschädel, U. Englert, J. Organomet. Chem. **1995**, 490, 101–109.
48. M. A. Bennett, T. W. Matheson, J. Organomet. Chem. **1979**, 175, 87–93.
49. M. I. Rybinskaya, A. R. Kudinov, V. S. Kaganovich, J. Organomet. Chem. **1983**, 246, 279–285.
50. A. Schlüter, K. Bieber, W. S. Sheldrick, Inorg. Chim. Acta **2002**, 340, 35–43.
51. B. Therrien, T. R. Ward, M. Pilkington, C. Hoffmann, F. Gilardoni, J. Weber, Organometallics **1998**, 17, 330–337.
52. M. A. Bennett, A. J. Edwards, J. R. Harper, T. Khimyak, A. C. Willis, J. Organomet. Chem. **2001**, 629, 7–18.
53. F. Simal, D. Jan, A. Demonceau, A. F. Noels, Tetrahedron Letters **1999**, 40, 1653–1656.
54. Y. Miyaki, T. Onishi, S. Ogoshi, H. Kurosawa, J. Organomet. Chem. **2000**, 616, 135–139.
55. J. R. Miura, J. B. Davidson, G. C. Hincapié, D. J. Burke, Organometallics **2002**, 21, 584–586.
56. C. M. Hartshorn, P. J. Steel, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1996**, 35, 2655–2657.
57. W. Y. Sun, J. Xie, T. Okamura, C. K. Huang, N. Ueyama, Chem. Commun. **2000**, 1429–1430.
58. J. Soleimannejad, A. Sisson, C. White, Inorg. Chim. Acta **2003**, 352, 121–128.

59. M. Bassetti, F. Centola, D. Sémeril, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Organometallics* **2003**, 22, 4459–4466.
60. D. Jan, L. Delaude, F. Simal, A. Demonceau, A. F. Noels, J. *Organomet. Chem.* **2000**, 606, 55–64.
61. R. E. Morris, R. E. Aird, P. del S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N.S. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3616–3621.
62. H. Brunner, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 905–912.
63. B. Therrien, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 405–408.
64. A. J. Davenport, D. L. Davies, J. Fawcett, S. A. Garratt, D. R. Russell, *Chem. Commun.* **1999**, 2331–2332.
65. D. L. Davies, J. Fawcett, R. Krafczyk, D. R. Russell, *J. Organomet. Chem.* **1997**, 545–546, 581–585.
66. D. Carmona, C. Vega, F. J. Lahoz, R. Atencio, L. A. Oro, M. P. Lamata, F. Viguri, E. San José, *Organometallics* **2000**, 19, 2273–2280.
67. D. Carmona, A. Mendoza, F. J. Lahoz, L. A. Oro, M. P. Lamata, E. San José, *J. Organomet. Chem.* **1990**, 396, C17–C21.
68. H. Brunner, R. Oeschey, B. Nuber, *Organometallics* **1996**, 15, 3616–3624.
69. D. Carmona, C. Vega, F. J. Lahoz, S. Elípe, L. A. Oro, M. P. Lamata, F. Viguri, R. García-Correas, C. Caiviela, M. P. López-Ram de VÍu, *Organometallics* **1999**, 18, 3364–3371.
70. D. L. Davies, J. Fawcett, S. A. Garratt, D. R. Russell, *Chem. Commun.* **1997**, 1351–1352.
71. K. Matsumura, S. Hashiguchi, T. Irariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8738–8739.
72. H. Chen, J. A. Parkinson, O. Novakova, J. Bella, F. Wang, A. Dawson, R. Gould, S. Parsons, V. Brabec, P. J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 14623–14628.
73. L. D. Dale, J. H. Tocher, T. M. Dyson, D. I. Edwards, D. A. Tocher, *Anti-Cancer Drug Design* **1992**, 7, 3–14.
74. B. Çetinkaya, I. Özdemir, B. Binbasioglu, R. Durmaz, S. Günel, *Arzneim.-Forsh./Drug Res.* **1999**, 49, 538–540.
75. R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 1652–1657.
76. S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, A. Yamaguchi, *Nature* **2002**, 419, 587–593.
77. A. Habtemariam, R. Fernández, M. Melchart, H. Chen, E. P. L. van der Geer, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, unpublished results.
78. R. P. Hanzlik, W. H. Soine, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 1290–1291.
79. A. J. Taylor, M. Wenzel, *Biochem. J.* **1978**, 172, 77–82.
80. W. H. Soine, C. E. Guyer, F. F. Knapp Jr., *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 803–806.
81. P. H. Stern, S. E. Halpern, P. L. Hagan, S. B. Howell, J. E. Dabbs, R. M. Gordon, *J. Nat. Cancer Inst.* **1981**, 66, 807–811.
82. D. R. Robertson, I. W. Robertson, T. A. Stephenson, *J. Organomet. Chem.* **1980**, 202, 209–318.
83. H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 173–186.
84. K. Inagaki, Y. Kidani, *J. Inorg. Biochem.* **1979**, 11, 39–47.

85. G. Schröder, B. Lippert, M. Sabar, C. J. L. Lock, R. Faggiani, B. Song, H. Sigel, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 3767–3776.
86. H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3064–3082.
87. T. J. Beasley, R. D. Brost, C. K. Chu, S. L. Grundy, S. R. Stobart, *Organometallics* **1993**, 12, 4599–4606.
88. M. V. Keck, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3386–3390.
89. O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P. J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry* **2003**, 42, 11544–11554.
90. Y. N. V. Gopal, D. Jayaraju, A. K. Kondapi, *Biochemistry* **1999**, 38, 4382–4388.
91. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *J. Cluster Sci.* **2001**, 12, 563–569.
92. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, S. L. Heath, *Chem Commun.* **2001**, 1396–1397.
93. S. Korn, W. S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 254, 85–91.
94. S. Kown, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 2191–2199.
95. A. Frodl, D. Herebian, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 3664–3673.
96. R. Fernández, M. Melchart, I. Hanson, S. Parsons, R. E. Aird, J. Cummings, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *ISBOMC'02* (First international Symposium on Bioorganometallic Chemistry), Paris, 18–20 July **2002**, Abs. PB6, p. 122.
97. W. S. Sheldrick, S. Heeb, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 377, 357–366.
98. W. S. Sheldrick, S. Heeb, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 168, 93–100.
99. D. F. Dersnah, M. C. Baird, *J. Organomet. Chem.* **1977**, 127, C55–C58.
100. J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3611–3616.
101. F. Wang, H. Chen, J. A. Parkinson, P. del S. Murdoch, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 4509–4523.
102. K. Severin, R. Bergs, W. Beck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1634–1654.
103. D. B. Grotjahn, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 190–192, 1125–1141.
104. Y. Hung, W. J. Kong, H. Taube, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 457–463.
105. L. Dadci, H. Elias, U. Frey, A. Hörnig, U. Koelle, A. E. Merbach, H. Paulus, J. S. Schneider, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 306–315.
106. F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5810–5820.
107. R. Fernández, M. Melchart, E. P. L. van der Geer, F. Wang, A. Habtemariam, P. J. Sadler, unpublished results.

3 Металлоорганические соединения для специфических биологических мишеней: развитие новых терапевтических подходов

Ж. Жауэн, С. Тон, А. Вессьер (Gérard Jaouen, Siden Top, Anne Vessières, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Laboratoire de Chimie Organométallique (UMR CNRS 7576), France)

3.1. Введение

Современное состояние медицинской неорганической химии уже рассмотрено в ряде недавних обзоров и книг [1–10]. До сих пор предметом исследований в данной области были в основном координационные соединения.

Первое успешное использование металлоорганических соединений (т. е. соединений с непосредственной связью М–С) в терапии можно рассматривать как социальный, так и научный прорыв. В ходе работы, которая привела в 1910 г. к созданию противосифилитического препарата Сальварсана® и родственных соединений, Пауль Эрлих (1854–1915) ввел такие термины, как «химиотерапия», «волшебные пули», «рецепторы», – и принцип *«corpora non agunt nisi fixata»** [11]. Он также показал большие возможности этого раздела химии, который позволяет извлечь пользу из почти безграничного набора органических лигандов с целью модуляции активности, растворимости и токсичности препарата. Однако в 1940-х гг. еще более мощным прорывом явилось открытие пенициллина.

Во второй половине XX в. два научных достижения привели к бурному развитию в области биомедицинской металлоорганической химии. Этими достижениями являются открытие Розенбергом противоопухолевой активности неорганического комплекса цисплатина **1** (схема 3.1) [12, 13] и развитие теоретических представлений о новых типах связи в металлоорганических соединениях. Последнее обстоятельство сделало доступным целый ряд новых комплексов и позволило более эффективно управлять кинетической стабильностью этих комплексов в воде – важнейшем биологическом растворителе [14–16].

* «Препарат не действует, пока он не связан» (лат.) – Прим. перев.

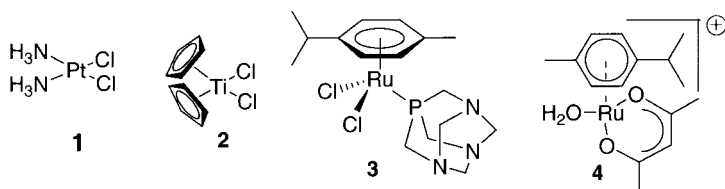


Схема 3.1. Из сравнения структур 1–4 видна «эволюция» молекул металлоорганических соединений, которые были протестированы в качестве фармацевтических препаратов

Хотя цисплатин **1** сам по себе является чисто неорганическим соединением, обладающим, к сожалению, высокой общей токсичностью, вскоре стала понятной его структурная аналогия с комплексами металлоценового типа, образуемыми и другими металлами: Ti, Fe, V, Mo, Re, Nb, Hf [17–28]. Титаноцендихлорид **2** являлся предметом многочисленных исследований, но клинические испытания этого соединения недавно были остановлены в основном из-за формальных разногласий [29, 30].

Недавно сообщалось о металлоорганических комплексах других типов, в том числе о нескольких комплексах рутения, таких как **3** и **4** [31–35]. Комплекс **3** проявляет антибактериальную и противовирусную активность, в то время как несколько комплексов типа $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{хелат})\text{Cl}]^{n+}$ (например, **4**) проявляют противораковую активность как *in vitro*, так и *in vivo* [31], включая активность против раковых клеток, устойчивых к цисплатину. Модификация лигандов, например, применением хелатирующих лигандов, предоставляет возможность тонкой регулировки свойств этих молекул путем модуляции их взаимодействия с ДНК. Такой подход представляется многообещающим для дизайна новых клинически активных молекул, преимуществом которых является более низкий уровень общей токсичности. Подробный анализ этих идей можно найти в гл. 2 данной книги. Недавно был опубликован обзор, описывающий терапевтическое применение металлоорганических соединений [36].

В этой главе описан подход к лечению тех или иных болезней, а именно: инфекционных, онкологических или паразитарных – с применением металлоорганических препаратов, точно «наведенных на цель», что позволяет решить проблемы, связанные с общей токсичностью. Подход заключается в том, чтобы использовать некий вектор* в качестве троянского коня для доставки металлоорганического агента в мишень клетки.

* Под вектором в данном случае подразумевается транспортное средство направленного действия, переносящее лекарственный препарат в нужную мишень клетки. Вектором может быть какой-либо биологический объект или химическое соединение, имеющее выраженное сродство к мишени в клетке. – Прим. перев.

Схема 3.2. Ферроценилпенициллины (5) и ферроценилцефалоспорины (6)

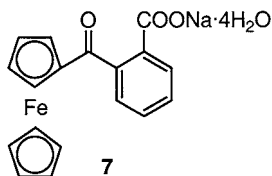


Схема 3.3. Ферроцерон **7** – лекарственный препарат на основе ферроцена, применяемый для лечения анемии, вызванной недостатком железа

о-карбоксибензоилферроцена, схема 3.3), разработанный в СССР для лечения железо-недостаточной анемии, представляет собой один из редких случаев, когда препарат был доведен до применения [42]. Этот препарат хорошо переносится при пероральном приеме; его прописывают также для лечения заболеваний десен.

Благодаря своей липофильности, ферроцен рассматривался как интересная альтернатива солям железа для ведения пациентам соединений Fe(II). По этой причине для производных ферроцена были проведены токсикологические исследования *in vivo* [43–45]. В большинстве этих работ была выявлена очень низкая токсичность [46], несмотря на известные проблемы, связанные с печенью [47]. Результаты, полученные в случае уже упомянутого ферроцерона **7**, служат хорошим предзнаменованием будущего развития лекарств, содержащих ферроценильную группу.

Вслед за пионерской работой Эдвардса и др. были проведены исследования по модификации ферроценом таких антибиотиков, как пенициллины, цефалоспорины и рифамицины [48–50]. Некоторые из модифицированных антибиотиков показали хорошую активность по отношению к грамположительным бактериям, в то время как активность в отношении грамотрицательных бактерий оказалась крайне низкой. Тем не менее в последнее десятилетие появился интерес преимущественно к другим биологическим системам, особенно металлоорганическим противоопухолевым средствам, медиаторами которых служат рецепторы гормонов, а также металлоорганическим противопаразитарным препаратам.

3.3. Комплексы металлов – селективные модуляторы эстрогенных рецепторов (SERM)*

В западных странах рак груди встречается у каждой восьмой женщины и, несмотря на все более раннюю диагностику, остается наиболее частой причиной летального исхода при онкологических заболеваниях у женщин во многих странах, включая Францию. В двух третях случаев рост этих опухолей, которые содержат альфа-форму эстрогенного рецептора (ER_α),

* Selective Estrogen Receptor Modulator (англ.).

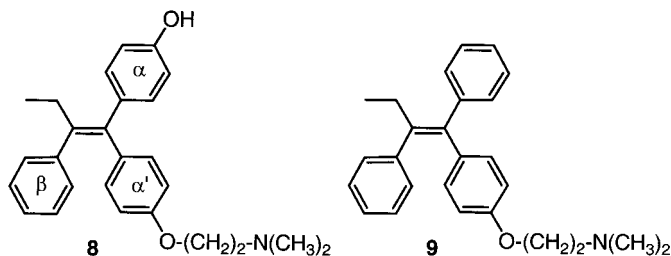


Схема 3.4. Тамоксифен (9) и его активный метаболит гидрокситамоксифен (8)

ускоряется эстрогенами. Механизм действия эстрогенов при раке груди обусловлен специфическим взаимодействием гормона с данным рецептором, который принадлежит к семейству нуклеарных (ядерных) рецепторов. После связывания гормона с его рецептором происходит следующая последовательность событий: димеризация, присоединение специфических коактиваторов, взаимодействие с элементом эстрогенного отклика (ERE^{*}) – специфическим участком ДНК, который вызывает экспрессию большого числа специфических генов, ответственных за различные процессы, включая рост клеток [51, 52]. Аджьювантное лечение этих гормон-зависимых видов рака включает воздействие антиэстрогенов, известных как SERM или, позже – как антиароматазы [53]. Стандартным антиэстрогеном в последние 20 лет является гидрокситамоксифен (ОН-Tam, 8), который по причинам биодоступности назначается в форме негидроксированного соединения тамоксифена 9 (схема 3.4).

Однако известно, что треть случаев гормон-зависимых опухолей нечувствительна к тамоксифену, а еще одна треть становится резистентной к нему через более или менее короткий отрезок времени. Таким образом, существует реальная потребность в поиске новых SERM либо соединений, которые поражают другие мишени, для того чтобы обеспечить надлежащий терапевтический эффект у большей части пациентов.

Обычно считают, что для проявления действия через эстрогенный рецептор соединение должно распознаваться данным рецептором. Распознавание численно выражается величиной относительного сродства к связыванию (RBA^{**}) соединения к ER относительно сродства эстрадиола (для которого принимают RBA = 100%). Следует также отметить, что недавно в разных тканях, в том числе и в ткани раковых опухолей груди, была обнаружена вторая, гормон-независимая форма эстрогенного рецептора – ERβ. Однако роль этого рецептора в клетке до сих пор окончательно не выяснена и является предметом дискуссии [54, 55].

* Estrogen Response Element (англ.).

** Relative Binding Affinity (англ.).

3.3.1. Неорганические* комплексы платины

Идея использования молекул, имеющих сродство к эстрогенным рецепторам, в качестве вектора (т. е. целенаправленного переносчика) для цитотоксических агентов возникла в 1970-х гг. Впервые данная идея была использована в случае азотистых ипритов (N-иприт) [56], а затем – цисплатина. С той же целью были получены несколько комплексов платины с производными эстрадиола, эстрона и синтетического эстрогена гексэстрола (схема 3.5) [57–63].

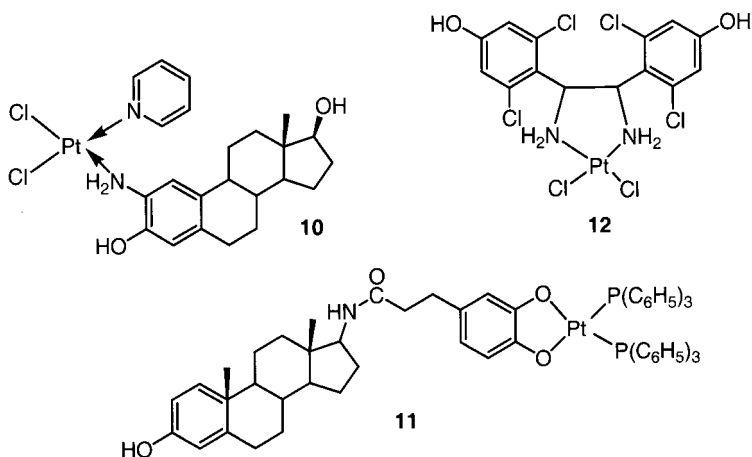


Схема 3.5. Некоторые содержащие платину производные эстрадиола (**10**, **11**) и гексэстрола (**12**)

Некоторые из этих комплексов в высоких молярных концентрациях (около 5 мкМ) оказывают антипролиферативное действие на клетки рака груди разных линий: **10** и **11** – в случае MCF7, **10** – в случае EVSA-T, **12** – в случае рака груди крыс, вызванного DMBA. Однако это действие очень близко к тому, которое оказывают соответствующие комплексы платины, не содержащие эстрогенов, и, таким образом, непосредственно связано с цитотоксичностью этих комплексов. Исследования вышеперечисленных неорганических комплексов платины, насколько нам известно, не получили дальнейшего развития.

Недавно были получены комплексы **13** и **14**. Они представляют собой продукты сочетания DACH-Pt – [(*R,R*)-*транс*-1,2-диаминоциклогексан-Pt(II)] – активного фрагмента оксалиплатина – препарата, используемого для лечения рака прямой кишки [64, 65], с тамоксифеном (схема 3.6) [66].

Комплекс **14** достаточно хорошо распознает рецептор эстрадиола (RBA = 6,4%). Однако в настоящее время ясно, что антипролиферативный эффект этого комплекса, наблюдаемый *in vitro* на клетках MCF7, выделенных из гормон-зависимых опухолевых клеток рака груди, является

* Имеются в виду комплексы, не содержащие связи металл-углерод. – Прим. перев.

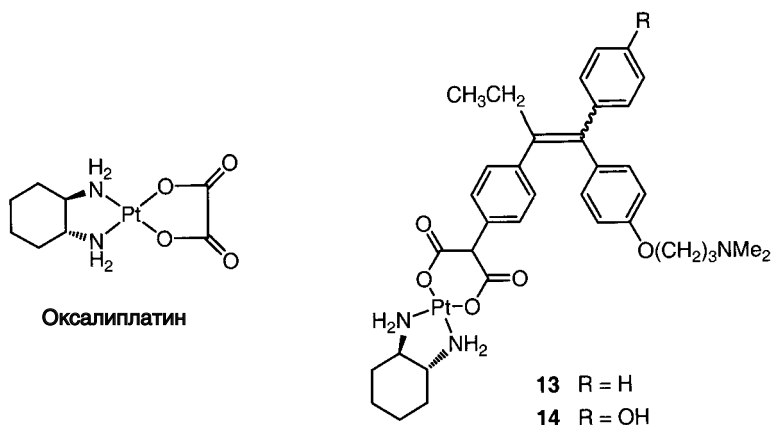


Схема 3.6. Структура производных тамоксифена (**12**), содержащих фрагмент DACH-Pt

антигормональным. В то же время комплекс $(DACH)PtCl_2$ сам по себе проявляет лишь небольшую цитотоксичность по отношению к данным клеткам.

Отсюда следует, что в случае рака груди неорганические комплексы платины все же не являются теми цитотоксическими агентами, которые способны к успешному связыванию с системой транспорта гормонов.

3.3.2. Производные карборанов с эстрогенными свойствами

В последние несколько лет значительный интерес исследователей был вызван введением в опухоль атомов бора с целью проведения нейтрон-борзахватной терапии (BNCT)* [67]. Известно, что под воздействием потока нейтронов клетки, содержащие бор, разрушаются, не вызывая серьезных повреждений в близлежащих здоровых тканях. Эндо и др., исследуя модуляторы рецепторов SERM, получили соединение **18** (1-гидроксиметил-12-(4-гидроксифенил)-1,12-дикарба-клозо-додекаборан), в котором гидрофобная карборановая «клетка» имитирует C и D кольца эстрадиола (схема 3.7) [68].

Это соединение было получено, исходя из 1,12-дикарба-клозо-додекаборана, **15**. Сочетание C-медного производного карборана **15** с 4-метоксиидбензолом привело к моноариллизованному по атому углерода соединению **16**, которое превратили в C-метоксикарбонильное соединение **17** реакцией литиевого производного соединения **16** с метилхлорформиатом. После восстановления **17** с помощью $LiAlH_4$ удаление метоксигруппы привело к **18** (схема 3.8).

Молекулярная структура этого соединения, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, весьма близка к структуре эстрадиола, особенно

* Boron Neutron Capture Therapy. (англ.).

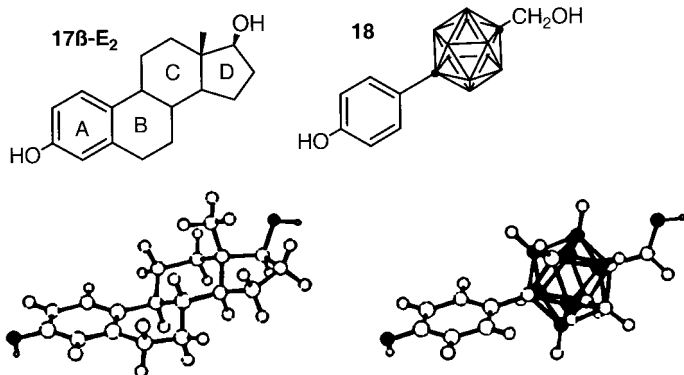


Схема 3.7. Сравнение структурных формул и данных рентгеноструктурного анализа 17β-эстрадиола (17β-E₂) и производного карборана (**18**) [69]

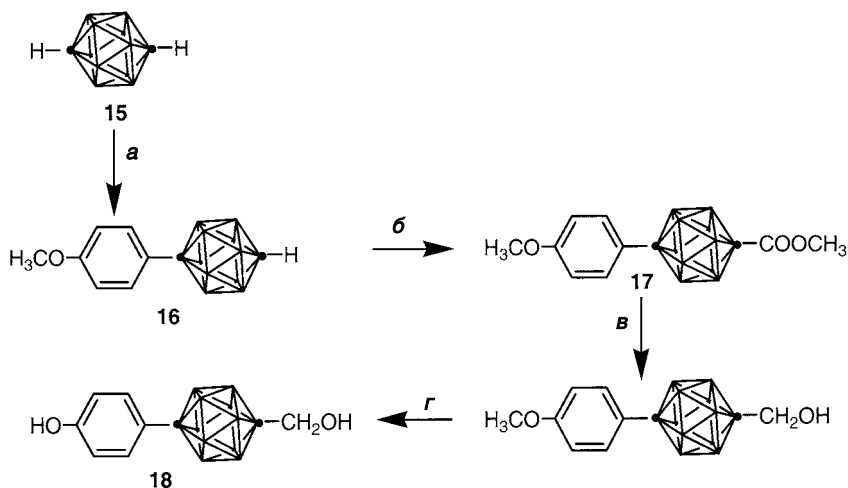


Схема 3.8. Получение производного карборана (**18**) [68]. *a* – 1. *n*-BuLi, CuCl/DME, 2. *p*-иоданизол/пиридин, кипячение; *б* – 1. *n*-BuLi/бензол-Et₂O, 2. ClCOOCH₃; *в* – LiAlH₄; *г* – BBr₃/CH₂Cl₂

в отношении положений двух OH-групп, которые, как известно, играют существенную роль при взаимодействии этого гормона с его специфическим рецептором [69]. Данное соединение *in vitro* оказывается более мощным эстрогеном, чем сам эстрадиол. Эстрогенный эффект обнаруживается также *in vivo*. Так, у мыши с удаленными яичниками при введении соединения **18** в количестве 10 нг в день наблюдается как увеличение массы матки, так и повышение содержания минеральных веществ в костях. В добавок к подходящему расположению двух OH-групп, которое определяет удобное расположение молекулы внутри активного сайта рецептора, данный эффект можно объяснить также гидрофобными взаимодействиями между карборановой

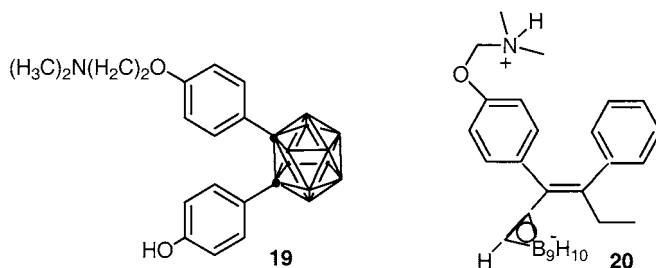


Схема 3.9. Структура карборановых аналогов гидрокситамоксифена и тамоксифена

«клеткой» и внутренней поверхностью активного сайта. Эти гидрофобные взаимодействия оказываются более сильными, чем взаимодействия, наблюдаемые в случае эстрадиола. Последнее подтверждается соответствующим докингом.

Тот же остов карборана был использован для получения соединения **19**, которое как и тамоксифен, содержит в молекуле диметиламиноалкильную цепочку, и действует как эффективный антиэстроген [68]. В то же время соединение **20**, в основе которого лежит структура (Z)-тамоксифена [70] и которое не содержит группу OH, не проявляет сродства к рецептору эстрадиола [71].

Результаты, полученные в экспериментах *in vivo*, показывают, что эти эстрогенные карбораны все же способны к специфическому взаимодействию с рецепторами эстрогенов. Однако в клетках тканей-мишеней содержание рецепторов эстрадиола низкое, что оказывается причиной ограниченного терапевтического использования этих соединений. Действительно, учитывая, что рецепторная плотность клетки* равна примерно 10^4 – 10^5 , в данную клетку можно ввести максимум 10^5 – 10^6 атомов ^{10}B , т. е. на 3 порядка меньше числа атомов бора, которое нужно для смерти опухолевой клетки [67].

3.3.3. Производное тамоксифена, содержащее фрагмент титаноцендихлорида

Первоначальная идея, которая привела к синтезу комплекса **25**, состояла в том, чтобы использовать тамоксифен в качестве вектора** для потенциально цитотоксичного Cr_2TiCl_2 **2** (см. гл. 2). Получение комплекса **25**, в молекуле которого β -ароматическое ядро тамоксифена замещено на фрагмент Cr_2TiCl_2 , потребовало разработки нового синтеза (схема 3.10) [72]. Синтез начинается с сочетания по Макмури между пропионильным производным циклопентадиенилтрикарбонилмарганца **21** и кетоном **22**, что позволило получить производное дифенилэтилена **23**. Это соединение путем фотохимической

* Число рецепторов, приходящихся на одну клетку. – Прим. перев.

** См. сноску на с. 84.

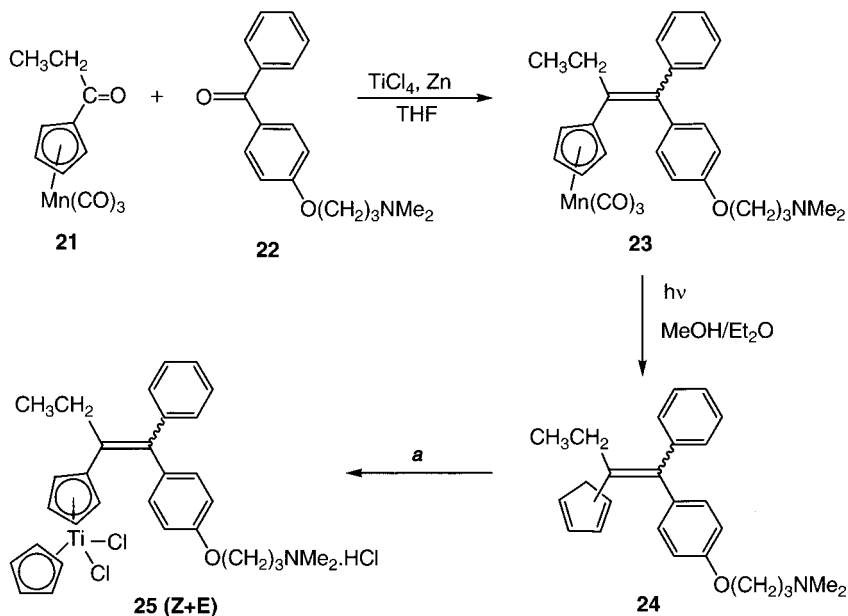


Схема 3.10. Синтез титаноценового производного тамоксифена **25** [72].
 а – 1. *n*-BuLi, ТГФ, -70°C ; 2. CrTiCl_3 ; 3. HCl

деструкции комплекса марганца превратили в замещенный циклопентадиен **24**, который в присутствии CrTiCl_3 сразу же образовал комплекс **25**, выделенный в виде гидрохлорида.

Этот комплекс имеет высокое сродство к эстрогенному рецептору ($\text{RBA} = 8,5\%$) и, что более важно, оказывает неожиданное эстрогенное действие *in vitro* на гормон-зависимые клетки рака груди (MCF7), столь же сильное, как и сам эстрадиол (рис. 3.1). Эстрогенная активность наблюдается при очень низких молярных концентрациях (10 нМ и 0,1 мкМ). Эта активность обнаружена и для самого комплекса Cr_2TiCl_2 , что говорит об эффективности встройки данного титансодержащего фрагмента в молекулу тамоксифена. Действительно, гидролиз комплекса Cr_2TiCl_2 представляет собой сложный процесс, который являлся предметом многих исследований [73, 74]. Этот процесс сильно зависит от условий эксперимента. Недавнее исследование Садлера показало, что гидролиз приводит к частицам, содержащим Ti(IV), который по свойствам близок Fe(III) и быстро захватывается трансферрином – одним из переносчиков железа в крови [75].

Хотя титан все еще не изучен в контексте эстрогенных рецепторов, роль ионов некоторых металлов в этом плане время от времени становилась предметом исследования. Так, воздействие ионов Cd^{2+} в очень низкой концентрации (1 нМ) на эти рецепторы приводит к координации кадмия на уровне лиганд-связывающего домена ER [76–78]. Комплекс, образуемый с этим экзогенным металлом, активирует α -эстрогенный рецептор так же, как это

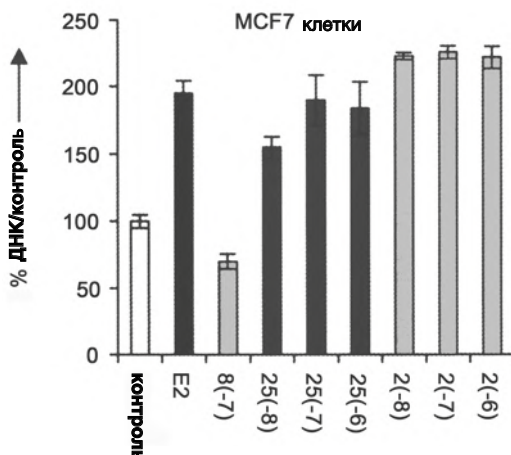


Рис. 3.1. Влияние E_2 (17 β -эстрадиол), **8** (ОН-тамоксифен), **25** и **2** (Cp_2TiCl_2) на пролиферацию клеток MCF7 (эстрогенорецептор-позитивные клетки). Изображено процентное содержание ДНК в клетках образцов относительно контрольного эксперимента. Величины в скобках соответствуют логарифму молярности инкубации [72]. Значения ординаты больше 100% указывают на наличие эстрогенного действия

было бы в случае связывания с эстрадиолом. Действительно, кадмий способен координироваться с аминокислотными остатками: цистеина (381 и 447), глутаминовой кислоты (523), гистидина (524), аспарагиновой кислоты (538) – входящими в состав лиганд-связывающего домена рецептора. Можно полагать, что координация такого типа способна вызвать работу рецептора так же, как это делает естественный лиганд, т. е. защелкивая ловушку лиганда, расположенную между спиралями Н4 и Н12 и вызывая активацию механизма транскрипции и пролиферацию гормон-зависимых клеток раковой опухоли груди. Эта гипотеза, будучи примененной в случае Ti(IV), могла бы объяснить удивительное эстрогенное действие Cp_2TiCl_2 .

В целом же, эти результаты указывают на невозможность использования вышеупомянутых комплексов Ti(IV) для лечения рака груди и поднимают вопрос о возможной роли солей титана как эндокринных разрушителей.

3.3.4. Производные тамоксифена, содержащие фрагмент цикlopентадиенил(трикарбонил)рения

Производные этого типа были получены путем введения устойчивого фрагмента $CpRe(CO)_3$ в остов тамоксифена [79, 80]. Замещение фенольного фрагмента на более объемную группу $CpRe(CO)_3$ скорее всего должно привести к изменениям в характере взаимодействия диметиламиногруппы в боковой цепи тамоксифена с внутренней частью активного сайта рецептора. Как известно, такое взаимодействие ответственно за антиэстрогенный эффект тамоксифена. По этой причине были получены несколько комплексов,

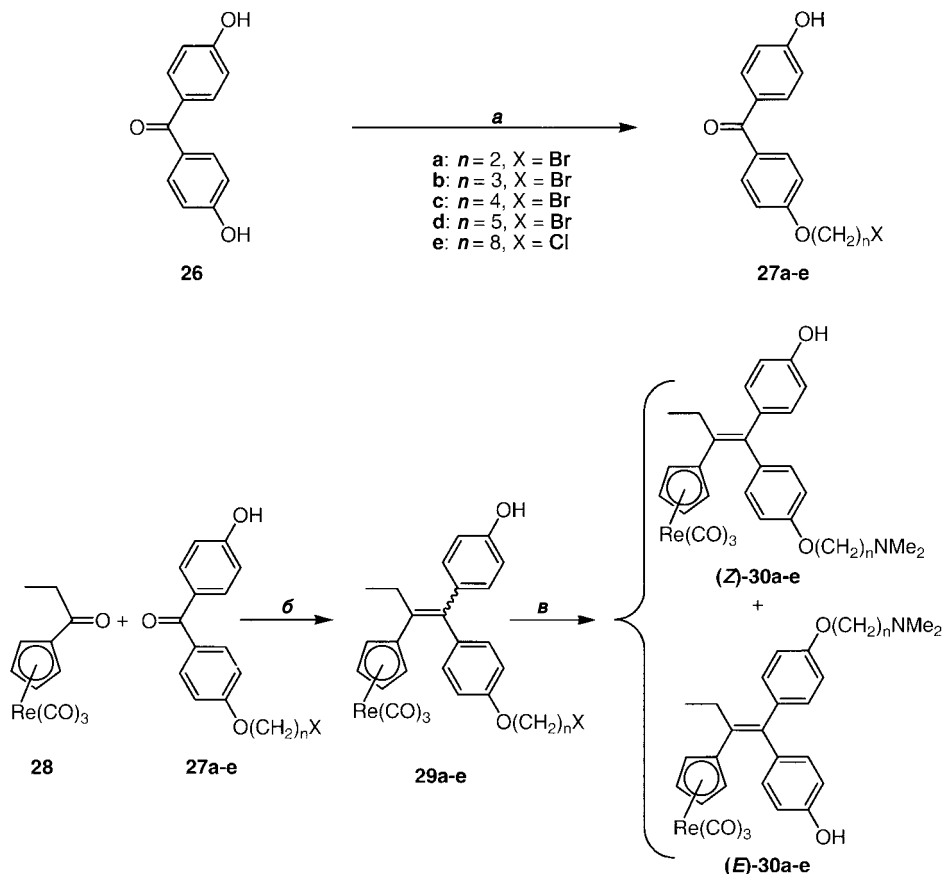


Схема 3.11. Синтез циклопентадиенил(трикарбонил)рениевых производных ОН-тамоксифена кросс-сочетанием по Макмурри. *a* – 1. КН, ТГФ; 2. $\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{X}$; *b* – TiCl_4/Zn , кипячение; *c* – $\text{NHMe}_2/\text{MeOH}$, 60°C, автоклав. *Z*- и *E*-Изомеры разделены с помощью микропрепаративной ВЭЖХ [79]

содержащих боковую цепь $-(\text{CH}_2)_n$ – различной длины ($n = 2-5$ и 8). Эти комплексы могут быть получены реакцией сочетания по Макмурри, как это показано на схеме 3.11.

На первой стадии в 4,4'-дигидроксибензофенон **26** ввели выбранную галогеналкильную цепочку путем моноалкилирования монокалийевой соли соединения **26** соответствующим дигалогенидом. Сочетание соответствующих кетонов **27a-e** с кетоном **26** по Макмурри дало алкены **29a-e** с хорошим выходом (более 60%). Эти алкены превратили в амины **30a-e** обработкой диметиламином при 60°C в автоклаве. Реакция сочетания по Макмурри дает смесь *Z*- и *E*-изомеров с преобладанием последнего. Эти изомеры можно разделить с помощью микропрепаративной ВЭЖХ. Они не изомеризуются в растворе, что сделало возможным изучить биологическую активность *Z*- и *E*-изомеров в отдельности [79]. Было найдено, что введение в молекулу

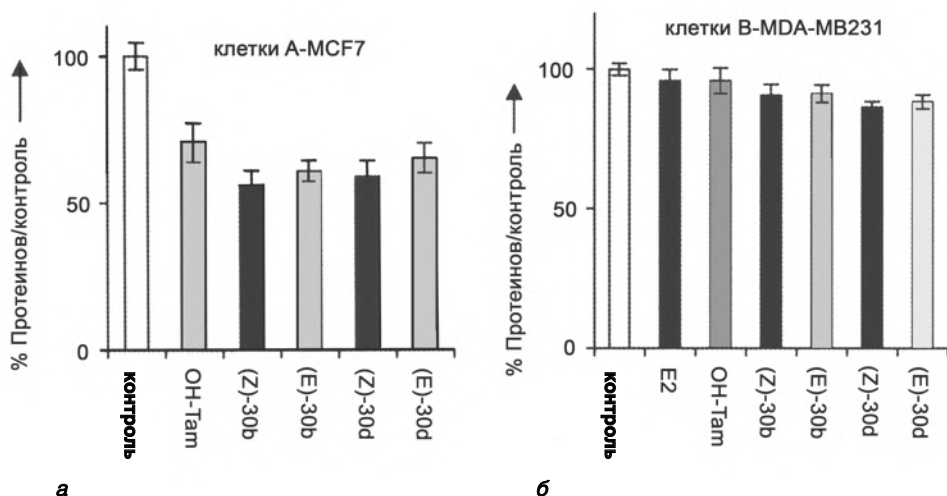


Рис. 3.2. Действие **ОН-Tam**, **(Z)-30b**, **(E)-30b**, **(Z)-30d**, **(E)-30d** в концентрации 1 мкМ на: клетки MCF7 (клетки, с рецептором эстрогенов, а) и клетки MDA-MB231 (клетки без рецептора эстрогенов, б). Представлено процентное содержание белка в образце в сравнении с содержанием в контрольном эксперименте [79]

группы $\text{CpRe}(\text{CO})_3$ увеличивает липофильность соединения – важный момент с точки зрения способности данного соединения проникать сквозь липидную мембрану клетки. Распознаваемость комплексов одной из форм эстрогенного рецептора измеряется величиной RBA. Введение структурного фрагмента $\text{CpRe}(\text{CO})_3$ приводит к уменьшению абсолютной величины RBA (38,5 и 6,4 для (Z+E)-ОН-тамоксифена и (Z+E)-**30a** ($n = 2$) соответственно). Эта величина равномерно возрастает по мере увеличения длины боковой цепи соединений. Так, в случае $n = 5$ значение RBA равно 2%. Однако, величина RBA не является определяющим фактором для антипролиферативного действия комплексов рассматриваемого типа. Антипролиферативный эффект, наблюдаемый на клетках рака груди типа MCF7 весьма сходен для соединений с разной длиной боковой цепи (n от 3 до 5), а также для Z и E изомеров соединений (рис. 3.2, а). Этот эффект несколько более выражен, чем эффект, наблюдаемый в случае ОН-тамоксифена, стандартного антиэстрогена. По отношению к гормон-независимым клеткам рака груди (MDA-MB231), т. е. к клеткам, не имеющим α -формы эстрогенного рецептора, эстрадиол и ОН-тамоксифен неактивны, а комплексы рения проявляют лишь слабое действие (рис. 3.2, б).

При замещении фенильной группы на более объемный и не столь легко окисляемый, но более липофильный ($\lg P_{0W} = 4,3$ для (Z)-**30d** и 3,2 для (Z)-ОН-тамоксифена) фрагмент $\text{CpRe}(\text{CO})_3$ получают комплексы с антиэстрогенным эффектом сходным с эффектом самого тамоксифена. На этот эффект не влияют ни длина боковой цепи молекулы, ни конфигурация изомера. Радиоактивные формы этих комплексов могут рассматриваться в плане

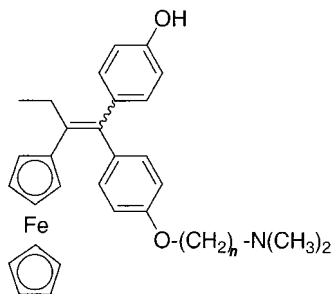
использования в качестве источников β -излучения (^{188}Re) в радиотерапии. Поскольку химические свойства технеция, как известно, сходны со свойствами рения, аналогичные комплексы технеция могут служить γ -эмиттерами для использования в радиационных исследованиях структуры биологических объектов. Поскольку для медицинского применения требуются радиоизотопы с очень маленьким периодом полураспада, нужен поиск новых путей синтеза, которые позволят легко и с высоким выходом вводить в молекулу радиоизотоп на конечной стадии синтеза.

3.3.5. Ферроценильные производные тамоксифена (ферроцифены)

В данном разделе речь пойдет о продуктах замещения β -фенильного кольца на ферроценильную группу, что приводит к комплексам **31a–e** (схема 3.12), называемых также ферроцифенами.

Синтез этих комплексов включает реакции сочетания по Макмурри [81–85], как и в случае описанных выше комплексов рутения. Эти комплексы получаются в виде смеси изомеров (*Z* + *E*), которые можно разделить с помощью ВЭЖХ. Однако, поскольку эти комплексы легко изомеризуются в растворе, большинство биологических испытаний было проведено на смесях двух изомеров.

Комплексы с самыми короткими боковыми углеводородными цепочками, несущими диметиламиногруппу ($n = 2, 3, 4$) имеют наибольшее сродство к обеим формам рецептора эстрогенов (RBA равны соответственно 14,6; 11,5; 12). Замещение фенильной группы на более липофильную ферроценильную, совместно с увеличением числа групп CH_2 в боковой цепи приводит, как и ожидалось, к соответствующему повышению липофильности комплексов по сравнению с тамоксифеном ($\lg P_{0/w} = 3,8$ для (*Z*)-**31a** и 6,0 для (*Z*)-**31e**). Антипролиферативное действие этих комплексов с числом метиленовых звеньев $n = 3$ и 5 (комплексы **31b** и **31d**) при молярной концентрации 1 мкМ на гормон-зависимые клетки рака груди MCF7 несколько сильнее, чем действие ОН-Tam (рис. 3.3).



(*Z*+*E*)-**31a-e** ($n = 2-5, 8$)

Схема 3.12. Общая формула гидроксиферроцифенов

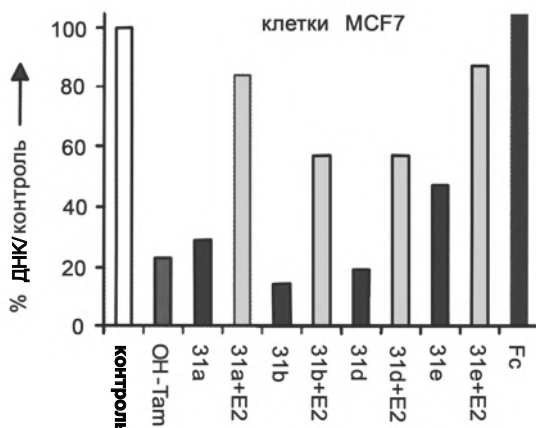


Рис. 3.3. Антипролиферативное действие ОН-тамоксифена (ОН-Tam), ферроцена (Fc), ферроцифенов **31a** ($n = 2$), **31b** ($n = 3$), **31d** ($n = 5$) и **31e** ($n = 8$) в молярной концентрации 1 мкМ в присутствии и в отсутствие 10 нМ 17β -эстрадиола (E_2) на гормон-зависимые клетки рака груди (клетки MCF7 с высоким уровнем $ER\alpha$) через 5 дней культивации (заимствовано из [85])

Данное действие не устраняется полностью добавлением эстрадиола. Это, вероятно, указывает на то, что наблюдаемый антипролиферативный эффект вызван сочетанием противогормонального действия, связанного с остовом тамоксифена, медиатором которого является рецептор эстрадиола, и цитотоксического эффекта, вызванного присутствием ферроценильного заместителя. Действительно, цитотоксические свойства катиона ферроцена (Fc^+), который легко образуется в биологических средах, хорошо известны [18, 25, 86, 87]. Следует, однако, отметить, что сам по себе ферроцен не оказывает цитотоксического действия, хотя липофильность этого соединения ($\lg P_{0/W} = 3,3$) позволяет ему без затруднений проникать внутрь клетки.

Новым в случае ферроцифенов является сильное цитотоксическое действие, наблюдающееся на клетках MDA-MB231, которые являются гормон-независимыми клетками рака груди (рис. 3.4). На эти клетки, не имеющие рецептора $ER\alpha$, не оказывает действия тамоксифен, в то время как ферроцифены **31b** и **31d** проявляют выраженный антипролиферативный эффект ($IC_{50} = 0,5$ мкМ).

И вновь сам по себе ферроцен цитотоксичности не проявляет. К тому же, было показано, что производные эстрадиола, содержащие ферроценильный заместитель в положении 17α , а именно: **32** и **33** – проявляют эстрогенное действие *in vitro*, но совершенно лишены цитотоксической активности как на гормон-зависимых, так и на гормон-независимых клетках [71]. Простая доставка внутрь клетки-мишени эстрогенной молекулы, несущей ферроценильный заместитель как некий «ценный груз», еще недостаточна для получения цитотоксического эффекта. Оказывается, что получение такого эффекта связано со специфической структурой, позволяющей участвовать в процессе

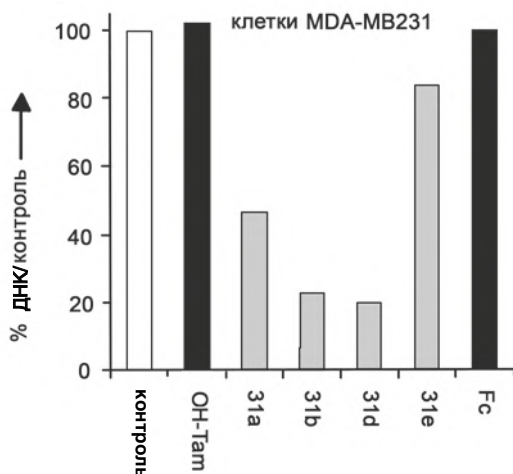


Рис. 3.4. Влияние 1 мкМ тамоксифена (ОН-Там), **31a** ($n = 2$), **31b** ($n = 3$), **31d** ($n = 5$) и **31e** ($n = 8$) и ферроцена (Fc) на клетки гормон-независимого рака груди (MDA-MB231 клетки ER α -независимого) [85]

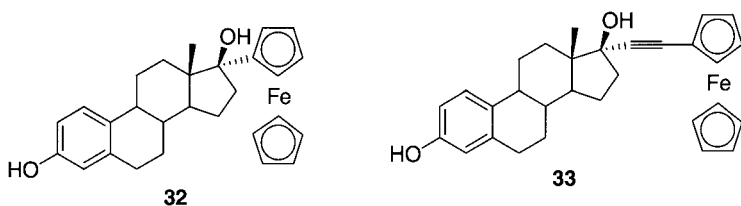


Схема 3.13. Ферроценильные производные эстрогена

темплату, в состав которого входят: ферроценильная группа, двойная связь и фенольный фрагмент.

Механизм действия ферроцифенов в клетке все еще неизвестен. Однако исследования с помощью молекулярного моделирования показали, что ферроцифены, такие как (*Z*)-**31b**, могут внедряться в активный сайт рецептора эстрогенов, а именно в его антагонистическую часть (рис. 3.5, *слева*, см. цветную вклейку). Внутреннее пространство активного сайта имеет достаточно большие размеры для того, чтобы в него вошла ферроценильная группа, превосходящая по размерам фенильную (соответствующие объемы соединения (*Z*)-**31b** и ОН-Там равны 572 и 413 Å³). При этом взаимодействия между His524 и ферроценильной группой, а также между Asp351 и атомом азота основной цепи дают возможность реализоваться правильному расположению металлоорганического гормона и особенно – боковой цепи, содержащей диметиламиногруппу, что, как известно, и отвечает за антигормональное действие. Перечисленные факты объясняют причину того, что наблюдаемое антиэстрогенное действие ферроцифенов сравнимо с действием ОН-Там. Что же касается

цитотоксического действия этих соединений, ясно, что оно связано с наличием в молекуле ферроценильного заместителя, который в определенных условиях подвергается обратимому окислению. В целом же последовательность событий, которая начинается с окисления ферроцена и приводит в конце концов к апоптозу или старению клеток, до сих пор не установлена. Неизвестна, прежде всего, та клеточная структура, на которую, собственно, нацелено действие препаратов. Цитотоксический эффект, возможно, связан с наличием второй формы рецептора ($ER\beta$), который участвует в процессах окисления, протекающих в клетке [88, 89]. Но может быть, этот эффект включает регуляцию особых ферментов или белков, задействованных в цикле функционирования клетки? Исследования, проводимые в настоящее время, помогут дать ответ на этот вопрос. Наиболее перспективные ферроцифены – соединения **31b** и **31c** ($n = 3$ и 4) – сейчас находятся на стадии доклинических испытаний.

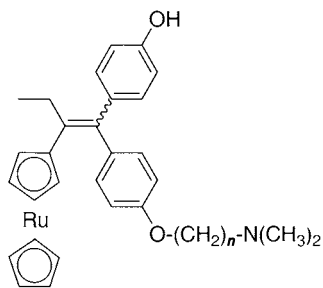
3.3.6. Рутеноценильные производные тамоксифена

Для проверки гипотезы о механизме действия ферроцифенов, основанном на окислении атома железа, были получены рутениевые аналоги этих соединений – рутеноцифены **34a–d** (схема 3.14) [94].

Действительно, положение рутения в VIII группе Периодической системы под железом предполагает, что соответствующие комплексы должны окисляться легче и, таким образом, обладать более выраженным антипролиферативным действием по сравнению с ферроцифенами. Комплексы рутения были синтезированы сочетанием по Макмурри так же, как комплексы железа и рения.

Они получены в виде смеси двух изомеров ($Z + E$). Эту смесь нельзя разделить с помощью ВЭЖХ, по-видимому, из-за слишком быстрого взаимопревращения изомеров. Комплексы с $n = 2$ или 3 имеют очень большие значения RBA по отношению к рецептору $ER\alpha$ (85 и 53% соответственно), что значительно превышает значение RBA для ОН-Там (38,5%).

Комплексы **34b** и **34c** оказывают *in vitro* несколько более сильное антипролиферативное действие по сравнению с ОН-Там в случае гормон-зависимых клеток MCF7 и совсем не действуют на гормон-независимые клетки MDA-MB231.



($Z+E$)-**34a-d** ($n = 2-5$)

Схема 3.14. Общая формула рутеноцифенов [93]

Таким образом, в отличие от ферроцифенов комплексы рутения ведут себя в основном как антиэстрогены. Возможное объяснение такого различия могут дать электрохимические исследования этих комплексов. Эти исследования показали, что ферроценильная группа окисляется обратимо, в то время как рутиноценильная – необратимо: окисление последней приводит к быстрой деструкции металлоорганического фрагмента [94].

3.3.7. SERM: выводы

Синтез металлоорганических производных тамоксифена – селективных модуляторов эстрогенных рецепторов (SERM) – привел к открытию препаратов с новой, порой неожиданной биологической активностью [95]. Одним из примеров такой активности служит эстрогенное действие комплексов титана, которое присуще самому дихлориду титаноцена Cp_2TiCl_2 . Следует учитывать потенциальную опасность применения соединений данного типа, поскольку они способны нарушать работу эндокринной системы. Наличие металлоорганического фрагмента в комплексах рения, как и в комплексах рутения, не дает преимуществ в отношении антипролиферативного действия, однако причины этого для двух металлов различны. Так, устойчивый фрагмент $\text{CpRe}(\text{CO})_3$ выступает в роли «простого наблюдателя», в то время как фрагмент CpRuCp^* – в роли «жертвы» необратимой окислительной деструкции комплекса. Однако возможно использование комплексов рения в качестве радиофармацевтических препаратов. У ферроцифенов металлоорганическая структурная единица ведет себя как цитотоксический агент в дополнение к антиэстрогенным свойствам вектора. Молекулы такого типа улучшают свойства препаратов семейства SERM, что может оказаться полезным в лечении видов рака, резистентных к тамоксифену. В этом плане ферроцифены заслуживают тщательного изучения.

3.4. Алкиновые комплексы карбонила кобальта

Биомолекулы, содержащие метку (алкин) $[\text{Co}_2(\text{CO})_6]$, являются одними из наиболее изученных соединений в биометаллоорганической химии благодаря легкости их получения и устойчивости [96]. Поэтому не удивительно, что в литературе представлены примеры соединений, меченных этим кобальт-содержащим фрагментом: пептиды [97, 98], белки [99], лекарственные препараты [100], abortивные средства, такие как RU486 **35** [101], кортикоиды и андрогены [102], метотрексат **37** [103], микотоксин зеараленон **36** [104, 105], эстрогены [106–110] и пестициды [111] (схема 3.15).

Значительная часть работ по изучению этих комплексов обусловлена интересом к аналитическим зондам такого типа в биологических анализах. Особенно это относится к применению в металлокарбонильном иммуноанализе

* Имеется в виду фрагмент $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4)$. – *Прим. перев.*

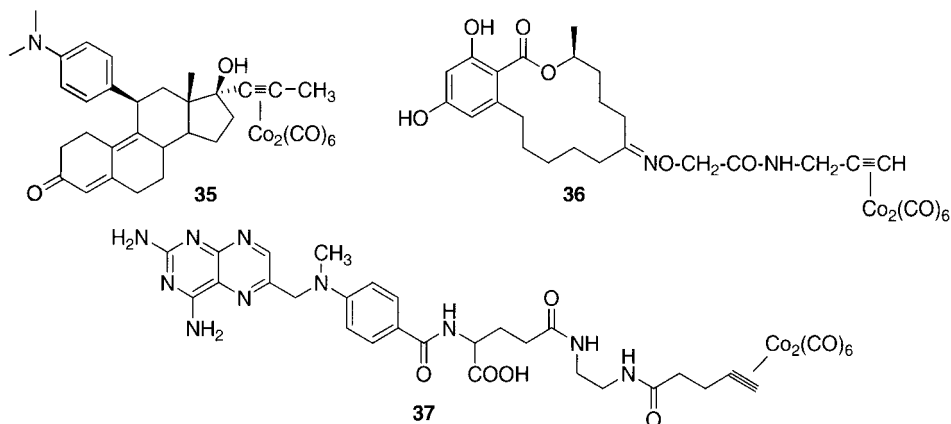


Схема 3.15. Алкиновые комплексы карбонила кобальта и стероида RU 486 (**35**), зеараленона (**36**), метотрексата (**37**)

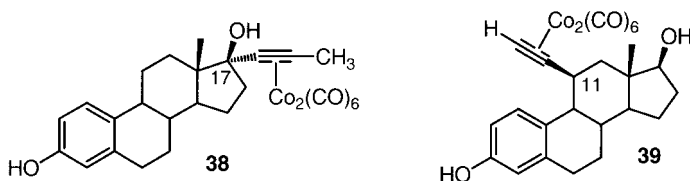


Схема 3.16. Алкиновые комплексы карбонила кобальта и 17α-пропинилэстрадиола (**38**) и 11β-этинилэстрадиола (**39**)

(СМИА), который основан на интенсивном поглощении в инфракрасном спектре, вызванном колебаниями карбонильной группы фрагмента М–СО в области частот около 2000 см^{-1} , в которой белки не имеют полос поглощения [112] (см. гл. 8).

В ряду стероидных производных наиболее интересны комплексы карбонила кобальта **38** и **39** с эстрогенами, замещенными в положениях 17α и 11β (схема 3.16). Эти комплексы хорошо распознаются α-рецептором эстрогенов ERα (RBA = 12 и 18% соответственно) и проявляют сильное эстрогенное действие при концентрациях 0,1 нМ – 1 мкМ. Заслуживает внимания необычный характер взаимодействия этих комплексов с рецептором ERα [106, 109, 113]. Соединение **38**, которое содержит в положении 17α алкиновый фрагмент, связанный с карбонилем кобальта, имеет аномально большое время пребывания в активном сайте рецептора. Это соединение ведет себя как маркер сродства. Предложено объяснение такой аномалии, состоящее в том, что из комплекса **38** *in situ* генерируется карбениевый ион, стабилизированный соседним металлоорганическим фрагментом. Карбениевый ион, который легко генерируется под действием ионов Zn^{2+} , входящих

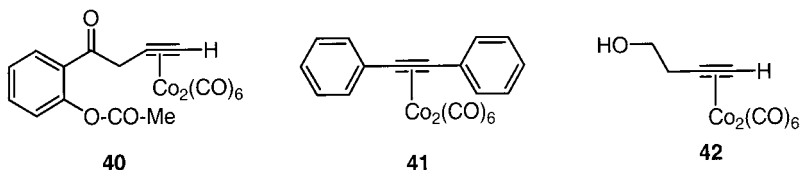


Схема 3.17. Алкиновые комплексы карбонила кобальта на основе аспирина (**40**), дифенилацетилена (**41**) и 2-пропин-1-ола (**42**)

в состав рецептора, может алкилировать цистеин в положении 530, который, как известно, является субстратом алкилирования для азиридиновых маркеров сродства [114]. Можно также рассматривать кластер $C_2/Co_2(CO)_6$ как *нидо*-структуру*, в которой 12 электронов делокализованы по остову полиэдра. Такой кластер имеет вакантное координационное место, что делает возможным в зависимости от локального окружения увеличивать время пребывания гормона на рецепторе. Такое увеличение времени может быть вызвано, например, взаимодействием с фрагментами метионина в положениях 343 и 421, которые пространственно способны к контакту с кластером, находящимся в положении 17а [115].

Данный вариант механизма, основанный на специфических взаимодействиях, связанных с *нидо*-структурой кластера мог бы также объяснить необычное поведение комплекса **39**, для которого величина RBA при 25°C имеет значение 65%, что значительно больше 18% при 0°C. Кроме того, для этого комплекса характерно большое время пребывания на рецепторе [106]. Отсюда понятно, что взаимодействие между гормоном, меченым фрагментом $Co_2(CO)_6$, и белком рецептора может привести к удивительным результатам и уже по этой причине заслуживает пристального внимания.

Юнг и др. [116], а также Гаст и др. [117–119] синтезировали серию алкиновых комплексов карбонила кобальта, например комплексы $Co_2(CO)_8$ на основе аспирина **40**, дифенилацетилена **41** и 2-пропин-1-ола **42** (схема 3.17).

Антипролиферативное действие этих соединений было изучено на клетках различных линий, включая клетки меланомы и рака легких [116], лейкемии и лимфомы [118], а также (недавно) на гормон-зависимых (MCF7) и гормон-независимых (MDA-MB231) линиях клеток рака груди [119]. Наиболее активным из этих соединений является производное аспирина **40**, для которого значения IC_{50} лежат в пределах между 1,4 и 10 мкМ. Это соединение все же менее активно, чем цисплатин, за исключением активности по отношению к клеткам рака груди, для которых, впрочем, цисплатин не является оптимальным препаратом. Ясно, что цитотоксическое действие комплексов кобальта не вызвано ни накоплением кобальта в клетках, ни связыванием этого металла с ДНК. С другой стороны, комплекс **40**, наиболее активное

* Приставка *нидо* заимствована из химии карборанов и используется для обозначения полиэдра, у которого отсутствует одна из вершин. – *Прим. перев.*

из этих соединений, является мощным ингибитором циклооксигеназы (типов COX-1 и COX-2), что могло бы объяснить механизм действия данного комплекса. Впрочем, этот механизм все еще не подтвержден [119].

Вне всякого сомнения, эти предварительные результаты вселяют надежду на то, что дополнительные исследования рассмотренных комплексов кобальта либо соединений кобальта других типов приведут к лучшему пониманию их поведения в биологических средах.

3.5. Феррохин – новое оружие в борьбе с малярией. Архетипический биометаллоорганический подход

3.5.1. Проблема малярии

Поиск новых противомаларийных препаратов является актуальным в настоящее время и вклад, который внесен в решение этой проблемы подходом на основе металлоорганических соединений, хорошо известен [120].

Малярия остается наиболее распространенной паразитарным заболеванием в мире. От нее умирает 1 млн человек в год, по большей части дети до 5-летнего возраста; 90% из них составляют жители африканских стран, расположенных южнее Сахары. Ежегодно сообщается более чем о 300 млн клинических случаев малярии, что в пять раз больше, чем случаев туберкулеза, СПИДа, кори и проказы вместе взятых. Влияние туризма и глобального потепления также может привести к увеличению числа случаев малярии в западных странах.

Возбудитель болезни – паразит *Plasmodium falciparum* – очень легко адаптируется, приобретая резистентность ко всему набору имеющихся сейчас лекарственных препаратов, включая хлорохин **43**, и эта резистентность распространяется по всему миру [121–124].

Ясно, что множественная резистентность является серьезной проблемой. Открытие нового противомаларийного препарата, который в конце

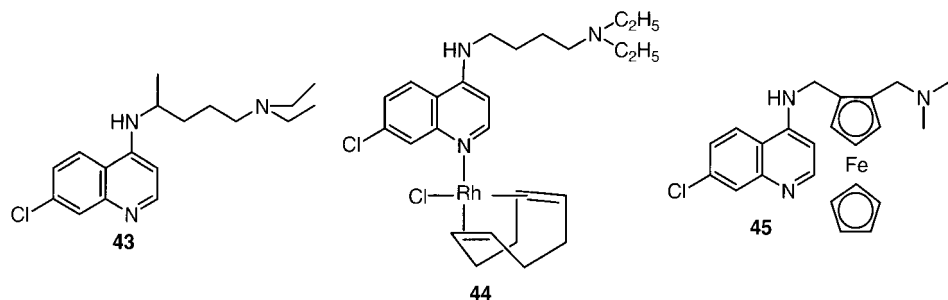


Схема 3.18. Хлорохин (**43**), его родиевое (**44**) и ферроценильное (**45**) производные

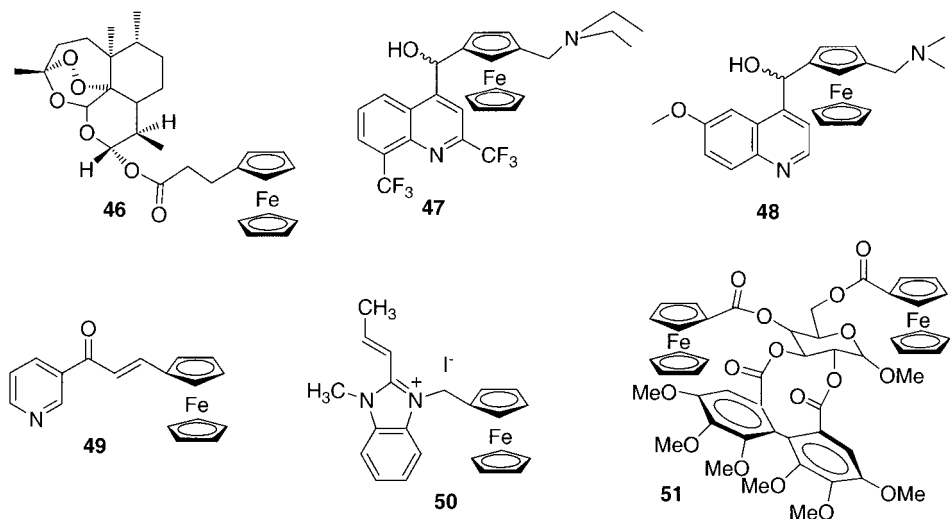


Схема 3.19. Производные ферроцена, испытанные на противомаларийную активность

концов преодолеть резистентность, представляется недостижимой целью. Несмотря на это, разработаны новые стратегии лечения, основанные на успехах биометаллоорганической химии. Эти стратегии могут помочь «держать оборону» до тех пор, пока не станет доступной вакцина [125].

Недавно были получены ферроценильные производные на основе артемизина **46** [126], хинина **47** и мефлохина **48** [127], халконов **49** [128], солей бензимидазолия **50** [129], а также сахаров **51** [130] с целью изучения их противомаларийных свойств (схема 3.19).

Наиболее полно изучены преимущества модификации соединений введением в молекулу металлоорганических фрагментов в случае производных хлорохина [120, 131]. Так, Санчес-Дельгадо и др. получили комплекс родия **44** путем прямого комплексообразования с хлорохином (схема 3.19) [131]. Действие этого комплекса *in vitro* сравнимо с действием хлорохина ($IC_{50} = 72$ и 73 нМ соответственно), но наиболее впечатляющие результаты получены для производных ферроцена.

3.5.2. Феррохин: биометаллоорганический подход

Результаты, полученные ранее для ферроцифенов [81], побудили Брокерда и др., используя тот же подход для модификации хлорохина, получить его аналог – феррохин **45**, структура которого близка к структуре хлорохина **43** [132, 133].

Синтез феррохина дешев и прост, что весьма важно, если рассматривать этот препарат как перспективный для использования в развивающихся странах. Синтез представлен на схеме 3.20.

Из коммерчески доступного диметиламинометилферроцена **52** путем металлирования и последующего формилирования получили

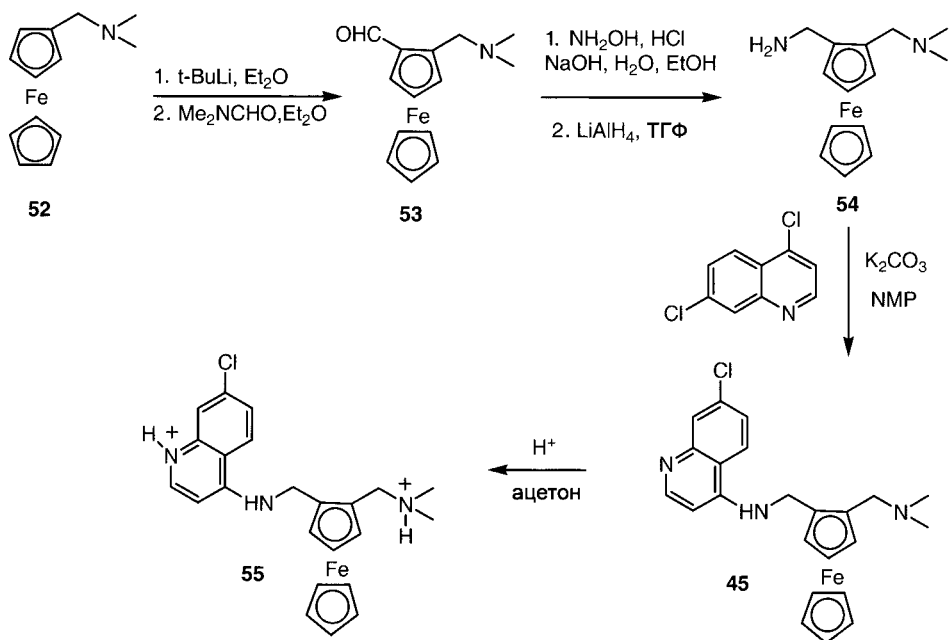


Схема 3.20. Синтез феррохина (45) и его соли (55)

2-диметиламинотетилфор-милферроцен **53**. Этот альдегид превратили в оксим, а затем восстановили до первичного амина **54**. Реакция $\text{S}_\text{N}\text{Ag}$ между этим амином и 4,7-дихлорхинолином привела к ожидаемому продукту – феррохину **45**, представляющему собой твердое вещество желтого цвета. Наконец, свободное основание **45** превратили в соли **55** действием L -(+)-винной кислоты или HCl . Эти соли растворимы в воде и, следовательно, более удобны для применения.

Противомалярийная активность феррохина была изучена *in vitro* в сравнении с активностью хлорохина на хлорохин-чувствительном штамме *P. falciparum* HB3 5CQS. В этом случае было показано, что феррохин и хлорохин имеют сравнимый уровень активности. Однако иная ситуация наблюдается в том случае, когда активность двух соединений сравнивается на хлорохин-резистентных штаммах, таких как Dd2. В этом случае для феррохина было получено значение IC_{50} 22 нМ, а для хлорохина 130 нМ [134]. Этот интересный эффект производных ферроцена наблюдался также на других образцах *P. falciparum*, обнаруженных в Габоне [135, 136] и Сенегале [137]. *In vivo* феррохин, вводимый мышам в течение 4 дней в дозе 8,4 мг/кг, защищает их от летальной инфекции [138].

Следует заметить, что молекула феррохина обладает планарной хиральностью благодаря несимметричному 1,2-дизамещению в ферроценовом фрагменте. Чистые энантиомеры (+)**45** и (–)**45** были получены ферментативным расщеплением с использованием на ключевой стадии в качестве биокатализатора липазы из *Candida rugosa* [134] (схема 3.21). Полученные значения энантиомерной чистоты превысили 98%.

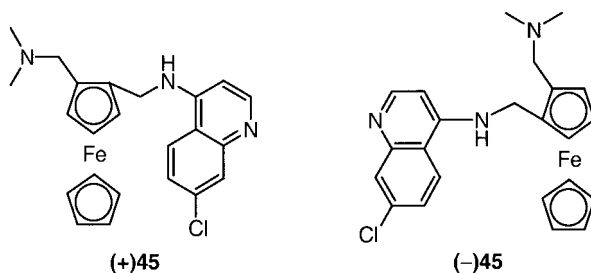


Схема 3.21. Два энантиомера феррохина (**45**)

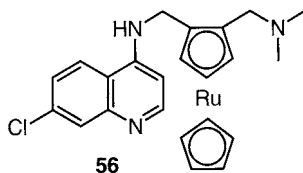


Схема 3.22. Рутеноценильное производное хлорохина (**56**)

Оба оптических изомера проявляют одинаковую активность *in vitro* на нано-молекулярном уровне. Однако *in vivo* каждый из энантиомеров сам по себе менее активен, чем рацемическая смесь, по отношению как к хлорохин-чувствительным, так и хлорохин-резистентным штаммам плазмодиев. Надо сказать, что изомер(+) **45** обладает более выраженным лечебным эффектом, чем изомер(–) **45**, предположительно за счет различных фармакокинетических свойств.

Причины более сильного действия рацемического феррохина пока не установлены. Все еще неясно, окисляется ли соединение **45** паразитом, давая ферроцениевый ион и инициируя таким образом реакции, характерные для реагента Фентона. Существует явная потребность в получении дополнительной информации о редокс-свойствах соединения **45** в пищеварительных вакуолях паразита.

Для изучения распределения феррохина был синтезирован его аналог – рутенохин **56**, в котором железо замещено на рутений – хорошо известный контрастный агент для электронной микроскопии (схема 3.22) [139]. Рутенохин является химическим аналогом феррохина и обладает сходной противомаларийной активностью. В организме инфицированной мыши, подвергнутой воздействию рутенохина, атомы Ru были обнаружены в пищеварительной вакуоли не только вблизи малярийного пигмента, но также в мембране клетки паразита. Это явное отличие от хлорохина, который никогда не обнаруживается в мембране, возможно и есть причина различия в активности препаратов.

3.5.3. Феррохин: выводы

Ниже перечислены специфические особенности феррохина. В некоторых из них реализуется предполагавшаяся для хлорохина [140] взаимосвязь между структурой и свойствами.

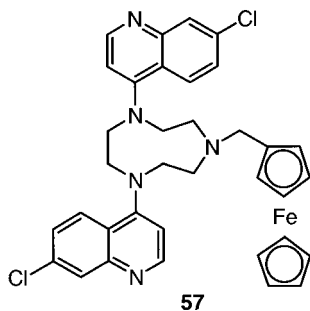


Схема 3.23. Ферроценильное производное триазациклононана (**57**)

- 1) Поддержание способности 4-аминохинолинового фрагмента к аккумуляции в вакуоли путем регулирования величины pH и ассоциации гематина.
- 2) Наличие боковой цепи, включающей основную аминогруппу, что обеспечивает сильную антиплазмодальную активность.
- 3) Наличие ферроценильной группы, обладающей липофильными ($IgPo/w = 3,3$) и окислительно-восстановительными (для пары ферроцен/ферроцений $E_0 = +460$ мВ) свойствами.
- 4) Быстрый и дешевый метод синтеза, состоящий из небольшого числа стадий.

На основе этих принципов были разработаны несколько аналогов феррохина [120, 141, 142]. Структура одного из них – **57**, приведена на схеме 3.23. В этом соединении ферроценовый фрагмент соединен с фрагментом триазациклононана. Соединение **57** активно в отношении хлорохин-резистентного штамма *P. falciparum* Dd2 [143], что служит хорошим признаком правильного подхода к выбору структуры препаратов.

3.6. Другие примеры металлоорганических комплексов, испытанных на биологическую активность

Ферроцифены и феррохины в настоящее время являются наилучшими примерами прицельно действующих металлоорганических соединений для терапевтического применения. Феррохин уже находится на 1-й стадии клинических испытаний, проводимых фирмой Sanofi-Aventis, а ферроцифены – на стадии доклинических испытаний. Эти успехи являются хорошей научной основой, которая обеспечивает доверительное отношение к проводимым в настоящее время исследованиям, направленным на модификацию структур с известными биологическими свойствами с помощью металлоорганических соединений. Назовем лишь те металлоорганические комплексы, биологические свойства которых уже изучены.

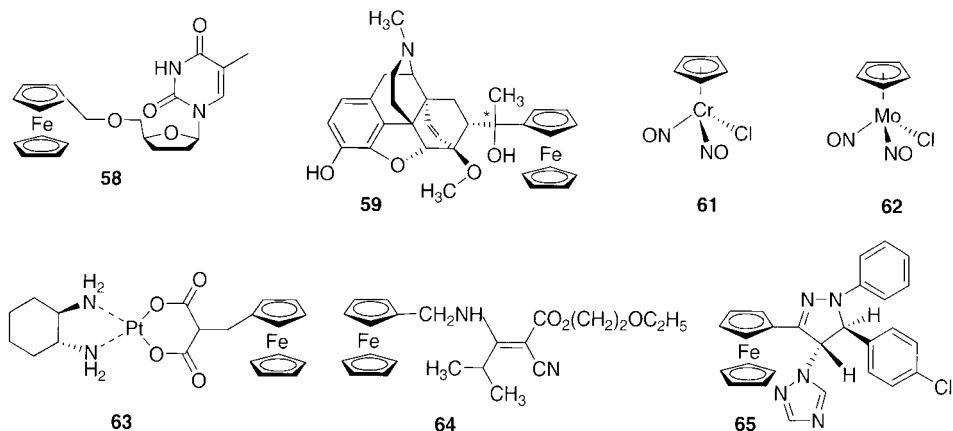


Схема 3.24. Примеры металлоорганических соединений с установленной биологической активностью

В дополнение ко многим примерам противомаларийных препаратов, о которых уже было сказано (схема 3.19), изучены металлоорганические производные AZT **58** [144], алкалоидов **59** [145], вазодилаторов **61** и **62** [146], производные противоракового препарата оксалиплатина **63** [147], антибактериальные препараты – производные дигидропиразола **65** [148], гербициды – производные цианоакрилата **64** [149] (схема 3.24).

Биологическое действие перечисленных комплексов в лучшем случае такое же, как действие соответствующих органических соединений. Отсюда ясно, что сама по себе доставка металлоорганического объекта к биологической мишени недостаточна для достижения лечебного эффекта либо для усиления действия исходного органического препарата. Очень важно при исследовании препаратов, проявляющих выраженный эффект, изучать механизм их действия.

3.7. Заключение

Следующий пример иллюстрирует важность правильного расположения металлоорганической группы в молекуле для получения антипролиферативного действия.

Органические дифенолы **66** (диэтилстильбэстрол) и **67** (схема 3.25) являются эстрогенами и воздействуют на специфический рецептор эстрогенов (ER). С целью придать этим соединениям цитотоксическое действие были получены дифенолы **68** и **69** [150].

Удивительно, но эти комплексы, которые отличаются всего лишь относительным расположением двух фенольных групп, действуют совершенно по-разному *in vitro* на линии клеток рака груди. Так, комплекс **68** проявляет очень выраженное антипролиферативное действие как на гормон-зависимые

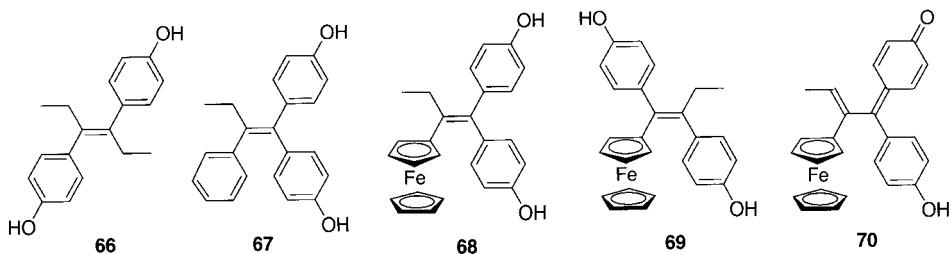


Схема 3.25. Некоторые органические дифенолы и соответствующие им ферроценовые производные, а также ферроценилхинонметид (**70**)

клетки MCF7 ($IC_{50} = 0,7$ мкМ), так и на гормон-независимые клетки MDA-MB231 ($IC_{50} = 0,6$ мкМ). В то же время комплекс **69** проявляет эстрогенный эффект на клетки MCF7 и лишь слабое антипролиферативное действие на клетки MDA-MB231 (рис. 3.6, а и б).

Ключом к решению данной проблемы, по-видимому, является структура соединения **68**. Действительно, электрохимические исследования показали, что «спусковым крючком» биологического эффекта является обратимое окисление ферроценового фрагмента, за которым может следовать быстрое превращение фенола через промежуточное образование карбениевого иона, приводящее к достаточно стабильному хинонметиду **70** [94]. Хорошо известно, что электрофильные частицы, такие как хинонметиды, способны алкилировать макромолекулы клеток, что приводит к цитотоксическому эффекту [151–153]. Комплекс **69**, выделенный в форме стабильного *транс*-изомера,

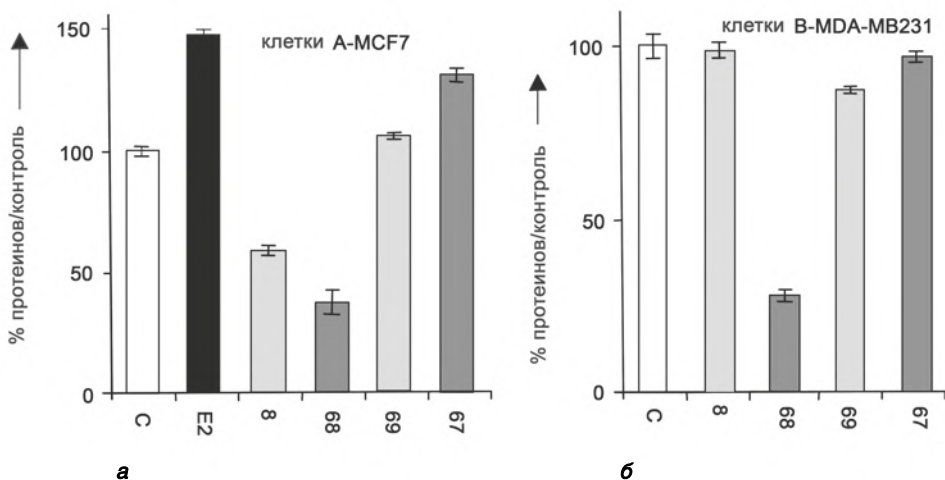


Рис. 3.6. Эффект ОН-тамоксифена (**8**), ферроценосодержащих дифенолов (**68** и **69**), органического дифенола (**67**) (все в концентрации 1 мкМ), а также 17β-эстрадиола (**E₂**) в концентрации 10 нМ в сравнении с контролем (**С**) на клетки: MCF7 (а) и MDA-MB231 (б) через 5 дней культивирования

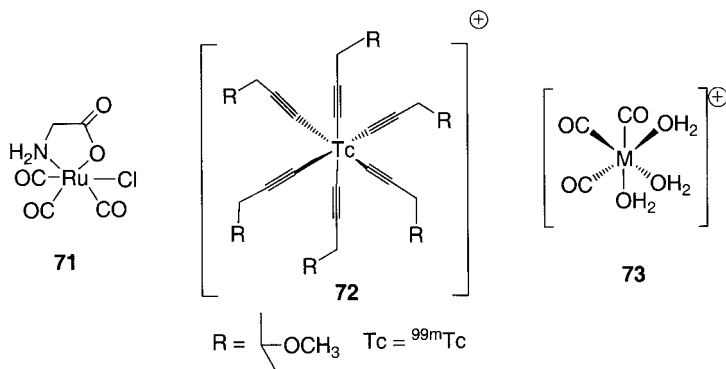


Схема 3.26. $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{gly})$ (**71**), $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}\text{-сестамиби}]$ (Кардиолит®) (**72**), реагент Альберто (**73**)

напротив, не может превратиться в стабилизированный хинонметид. Таким образом, понятно, что для металлоорганических комплексов, нацеленных на клетку-мишень, таких как **68** и **69**, структурные особенности выступают на первый план.

Действительно, появляются все новые аспекты использования металлоорганических соединений для терапевтических целей. Особо многообещающим является пример некоторых карбониллов металлов в направленном биологическом транспорте CO [154]. Известно, что монооксид углерода, образующийся в организме млекопитающих в процессе разрушения гема под действием фермента гем-оксигеназы, является важным сигнальным медиатором, в некоторой степени сходным с молекулой-посланником, которой является NO, несмотря на ее высокую токсичность [155, 156]. Сообщалось об использовании $\text{Fe}(\text{CO})_5$, $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ и $[\text{RuCl}_2(\text{CO})_3]_2$ в качестве молекул, поставляющих CO [151, 152]. В случае $\text{Fe}(\text{CO})_5$ и $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ для доставки CO требовалось воздействие света, но в случае $[\text{RuCl}_2(\text{CO})_3]_2$ монооксид углерода поставлялся непосредственно миоглобину (Mb) с образованием CO-Mb. Среди исследованных к настоящему времени соединений рутения глицинатный комплекс $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{gly})$ **71** (схема 3.26), как было показано, подавляет отторжение пересаженных органов и защищает ткани от ишемических повреждений и апоптоза [154]. Данный подход, как и подход направленного действия нитрозильных комплексов металлов [157, 158], безусловно будет развиваться в ближайшие несколько лет.

В области создания металлоорганических радиофармацевтических препаратов идея селективного достижения цели вновь стала источником прогресса. Хорошо известно, сколь важен Кардиолит® **72** для визуализации сердечной мышцы [159], а недавнее исследование допускает, что область использования этого препарата может быть расширена до молекулярной визуализации молочной железы [160]. Другим важным достижением в данной области является реагент Альберто $[(\text{H}_2\text{O})_3\text{M}(\text{CO})_3]^+$ **73**, который в низких концентрациях в воде позволяет получать биомолекулы, селективно меченные металлоорганическими соединениями, а именно фрагментами карбониллов ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ и ${}^{188}\text{Re}$ [161].

Эта работа обсуждается в гл. 4. Число исследованных объектов быстро возрастает [162–164]. Один из примеров – фоллиатный рецептор (FR) – мембранный белок с высоким сродством к фолиевой кислоте. Во многих раковых клетках наблюдается повышенная экспрессия этого белка, в то время как в нормальных тканях он находится в подавленном состоянии, что было обнаружено в недавних исследованиях радиофармацевтическими методами. Этот белок был назван троянским конем [162]. В ближайшем времени число таких примеров сильно возрастет. Будущее в этом отношении видится ясным и зависит в основном от воображения химика.

Требования к металлоорганическим соединениям, предназначенным для биологических исследований, и соответствующие ограничения (водные растворители, относительная устойчивость, малое время реакции с радиоизотопами, селективность, распознавание биологических объектов и т. п.) следует рассматривать не как препятствия для развития данного направления, но, скорее, как стимул для творческого подхода. Химик должен быть готов покинуть проторенную дорогу и искать новые пути к желаемой цели [161, 165]. Наиболее яркие свидетельства в этом отношении – комплексы тамоксифена с титаноцендихлоридом [72] и комплекс $[(\text{H}_2\text{O})_3 {}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Исследования такого типа способствуют развитию синтетической металлоорганической химии.

Благодарности

Мы хотим поблагодарить Барбару Макглинчи за талантливо проделанную работу по лигвистическому оформлению и наших коллег, перечисленных в цитируемой литературе. Мы благодарим Майклу Дж. Макглинчи (Колледж университета Дублина, Ирландия), Доменико Оселла, (Университет Восточного Пьемонта, Алессандрия, Италия), Гая Леклерка (Институт Жюль Бордэ, Брюссель, Бельгия), Роджера Альберто (Университет Цюриха, Швейцария) и Патрицию де Кремо (Институт Кюри, Париж) за плодотворное сотрудничество. Ж. Жауэн хочет поблагодарить Institut Universitaire de France, Бертрана Частенэ (4M), Ipsen* и группу COST D20** (соединения металлов в лечении рака и вирусных болезней) за финансовую поддержку.

Литература

1. M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2511–2533.
- 2a. M. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1513–1531.
- 2б. M. Guo, P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* **2000**, 49, 183–305.
3. H. T. Chifotides, K. R. Dunbar, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 146–156.

* Ipsen – международная фармацевтическая группа. – *Прим. ред.*

** См. сноску на с. 78.

4. R. H. Holm, E. I. Solomon, Chem. Rev. **1996**, 96 (7), Issue dedicated to Bioinorganic Enzymology.
5. H. E. Howard-Lock, C. J. L. Lock, in G. Wilkinson, R. Gillard, J. McCleverty (Eds.), Comprehensive Coordination Chemistry, 755–778, Pergamon, Oxford, **1987**.
6. B. K. Keppler, in Metal Compoxes in Cancer Chemotherapy, VCH, Weinheim, **1993**.
7. B. Lippert, in Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, John Wiley and Sons, New York, **1999**.
8. C. Orvig, M. J. Abrams, Chem. Rev. **1999**, 99 (5), Issue dedicated to Medicinal Inorganic Chemistry.
9. P. J. Sadler, Adv. Inorg. Chem. **1991**, 36, 1–48.
10. L. J. Ming, Med. Res. Rev. **2003**, 23, 697–762 (for a recent review on inorganic metalloantibiotics).
11. J. Mann, in The Elusive Magic Bullet: the search for the perfect drug. Oxford University Press, Oxford, **1999**.
12. B. Rosenberg, L. Van Camp, Cancer Res. **1970**, 30, 1799–1802.
13. B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, Nature **1965**, 205, 698–699.
14. W. Beck, K. Severin, Chemie in unserer Zeit **2002**, 6, 356–365.
15. C. Elschenbroich, A. Salzer, in Organometallics: a concise introduction, VCH, Weinheim, **1989**.
16. R. H. Fish, G. Jaouen, Organometallics **2003**, 22, 2166–2177.
17. J. Aubrecht, R. K. Narla, P. Ghosh, J. Stanek, F. M. Uckun, Organometallics **1999**, 154, 228–235.
18. G. Caldwell, M. G. Meirim, E. W. Neuse, C. E. J. van Rensburg, Appl. Organomet. Chem. **1998**, 12, 793–799.
19. C. V. Christodoulou, A. G. Eliopoulos, L. S. Young, L. Hodgkins, D. R. Ferry, D. J. Kerr, Br. J. Cancer **1998**, 77, 2088–2097.
20. P. Ghosh, O. J. D'Cruz, R. K. Nasia, F. M. Uckun, Clin. Cancer Res. **2000**, 6, 1536–1545.
21. M. M. Harding, M. Prodigaudad, M. J. Lynch, J. Med. Chem. **1996**, 39, 5012–5016.
22. M. M. Harding, G. Mokdsi, Curr. Med. Chem. **2000**, 7, 1289–1303.
23. P. Köpf-Maier, Eur. J. Clin. Pharmacol. **1994**, 47, 1–16.
24. P. Köpf-Maier, T. Klapotke, Cancer Chemother. Pharmacol. **1992**, 29, 361–366.
25. P. Köpf-Maier, H. Köpf, E. W. Neuse, Arigew. Chem. Int. Ed. Engl. **1984**, 23, 456–457.
26. E. W. Neuse, F. Kanzawa, Appl. Organomet. Chem. **1990**, 4, 19–26.
27. J. H. Toney, M. S. Murthy, T. J. Marks, Chem. Biol. Interact. **1985**, 56, 45–54.
28. J. B. Waern, M. M. Harding, J. Organomet. Chem. **2004**, 689, 4655–4668.
29. N. Kröger, U. R. Kleeberg, K. Mross, L. Edler, D. K. Hossfeld, Onkologie **2000**, 23, 60–62.
30. K. Mross, P. Robben-Bathe, L. Edler, J. Baumgart, W. E. Berdel, H. Fiebig, C. Unger, Onkologie **2000**, 23, 576–579.
31. R. E. Aird, P. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, Br. J. Cancer **2002**, 86, 1652–1657.
32. D. N. Akbayeva, L. Gonsalvi, W. Oberhauser, M. Peruzzini, F. Vizza, P. Brueggeller, A. Romerosa, G. Sava, A. Bergamo, Chem. Commun. **2003**, 264–265.
33. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellio, P. A. Salter, R. Scopelliti, J. Organomet. Chem. **2003**, 66S, 35–42.
34. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, E. D. J. S. L. Heath, Chem. Commun. **2001**, 1396–1397.

35. L. D. Dale, J. H. Tocher, T. M. Dyson, D. I. Edwards, D. A. Tocher, *Anti-Cancer Drug Des.* **1992**, 7, 3–14.
36. C. S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, P. J. Dyson, *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, 19, 1–10.
37. K. E. Dombrowski, W. Baldwin, J. E. Sheats, *J. Organomet. Chem.* **1986**, 302, 281–306 (for a review covering all the initial period).
38. E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *J. Organomet. Chem.* **1979**, 168, 259–272.
39. E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *J. Organomet. Chem.* **1976**, 122, C49–C53.
40. E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *J. Organomet. Chem.* **1978**, 85, C23–C25.
41. E. I. Edwards, R. Epton, G. Marr, *J. Organomet. Chem.* **1976**, 107, 351–357.
42. N. Nesmeyanov, L. G. Bogomijlova, V. Viltchevskaya, N. Palitsyne, I. Andrianova, O. Belozeroва, *US Patent*. 119 356, **1971**.
43. L. L. Gershbein, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1980**, 27, 139–145.
44. R. W. Mason, K. McGruther, P. R. R. Rnatonge-Bandarage, B. H. Robinson, J. Simpson, *Appl. Organomet. Chem.* **1999**, 13, 163–173.
45. R. A. Yeary, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**, 15, 666–676.
46. J. T. Yarrington, K. W. Huffman, G. A. Lesson, D. J. Sprinkle, D. E. Loudy, C. Hampton, G. J. Wright, J. P. Gibson, *Fundam. Appl. Toxicol.* **1983**, 3, 86–94.
47. N. P. Buu-Hoi, D. P. Hien, H.T. Hieu, C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D **1970**, 270, 217–219.
48. D. Scutaru, I. Mazilu, L. Tataru, M. Vata, T. Lixandru, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 406, 183–187.
49. D. Scutaru, I. Mazilu, M. Vata, L. Tataru, A. Vlase, T. Lixandru, C. Simionescu, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 401, 87–90.
50. D. Scutaru, L. Tataru, I. Mazilu, E. Diaconu, T. Lixandru, C. Simionescu, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 401, 81–85.
51. H. Charpentier, A. K. Bednarek, R. L. Daniel, K. A. Hawkins, L. J. S. Gaddis, M. C. MacLeod, C. M. Aldaz, *Cancer Res.* **2000**, 60, 5977–5983.
52. K. Osborne, H. Zhao, S. A. W. Fuqua, *J. Clin. Oncol.* **2000**, 18, 3172–3186.
53. V. C. Jordan, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 883–908.
54. E. A. Vladusic, A. E. Hornby, F. K. Guerra-Vladusic, R. Lupu, *Cancer Res.* **1998**, 58, 210–214.
55. C. Palmieri, G. J. Cheng, S. Saji, M. Zelada-Hedman, A. Wärr, Z. Weihua, S. Van Noorden, T. Wahlstrom, R. C. Coombes, M. Warne, L. A. Gustafsson, *Endocr. Relat. Cancer* **2002**, 9, 1–3.
56. J. Raus, H. Martens, G. Leclercq, in *Cytotoxic estrogens in hormone receptive tumors*. Academic Press, London, **1980**.
57. C. Chesne, G. Leclercq, P. Pointeau, H. Patin, *Eur. J. Mod. Chem.* **1986**, 21, 321–327.
58. R. Gust, H. Schönenberger, U. Klement, K. J. Range, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1993**, 326, 967–976.
59. J. Karl, R. Gust, T. Spruss, M. R. Schneider, H. Schönenberger, J. Engel, K. H. Wrobel, F. Lux, S. Tebert Haeberlin, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 72–83.
60. O. Gandolfi, J. Blum, F. Mandelbaum-Shavit, *Inorg. Chim. Acta* **1984**, 91, 257–261.
61. E. von Angerer, *Platinum complexes with specific activity against hormondependent tumors*, in B. K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, 73–83, VCH, Weinheim (Germany), **1993**.
62. Jackson, J. Davis, R. J. Pither, A. Rodger, M. J. Hannon, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 3964–3973.

63. G. Grenier, G. Bérube, C. Gicquaud, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 1480–1483.
64. S. G. Chaney, *J. Oncology* **1995**, 6, 1291–1305.
65. Y. Kidani, K. Inagaki, M. Igo, A. Hashi, K. Kuretani, *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315–1318.
66. S. Top, E. B. Kaloun, A. Vessièrès, G. Leclercq, I. Laios, M. Ourevitch, C. Deuschel, M. J. McGlinchey, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2003**, 4, 754–761.
67. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. F. G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1515–1562.
68. Y. Endo, T. Iijima, Y. Yamakoshi, M. Yamaguchi, H. Fukasawa, K. Shudo, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1501–1504.
69. Y. Endo, T. Iijima, Y. Yamakoshi, H. Fukasawa, C. Miyaura, M. Inada, A. Kubo, A. Itai, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 341–355.
70. J. F. Valliant, P. Schaffer, K. A. Stephenson, J. F. Britten, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 383–387.
71. A. Vessièrès, unpublished results.
72. S. Top, E. B. Kaloun, A. Vessièrès, I. Laios, G. Leclercq, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643–644, 350–356.
73. G. Mokdsi, M. M. Harding, *J. Organomet. Chem.* **1998**, 565, 29–35.
74. J. H. Toney, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 207, 947–953.
75. M. Guo, H. Sun, H. J. McAldle, L. K. Gambling, P. J. Sadler, *Biochemistry* **2000**, 39, 10023–10033.
76. A. Stoica, B. S. Katzenellenbogen, M. B. Martin, *Mol. Endo.* **2000**, 14, 545–553.
77. M. D. Johnson, N. Kenney, A. Stoica, L. Hilakivi-Clarke, B. Singh, G. Chepko, R. Clarke, P. F. Sholler, A. A. Lirio, C. Foss, R. Reiter, B. Trock, S. Paik, M. B. Martin, *Nat. Med.* **2003**, 9, 1081–1084.
78. M. B. Martin, R. Reiter, T. Pham, Y. R. Avellanet, J. Camara, M. Lahm, E. Pentecost, K. Pratap, B. A. Gilmore, S. Divekar, R. S. Dagata, J. L. Bull, A. Stoica, *Endocrinology* **2003**, 144, 2425–2436.
79. S. Top, A. Vessièrès, P. Pigeon, M. N. Rager, M. Huché, E. Salomon, C. Cabestaing, J. Vaissermann, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1104–1113.
80. G. Jaouen, S. Top, A. Vessièrès, P. Pigeon, G. Leclercq, I. Laios, *Chem. Commun.* **2001**, 383–384.
81. S. Top, J. Tang, A. Vessièrès, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, *Chem. Commun.* **1996**, 955–956.
82. S. Top, B. Dauer, A. Vessièrès, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1997**, 541, 355–361.
83. G. Jaouen, S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, J. Quivy, L. Jin, A. Croisy, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **2000**, Série IIc, 89–93.
84. S. Top, A. Vessièrès, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637, 500–506.
85. S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché, G. Jaouen, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5223–5236.
86. D. Osella, M. Ferrali, P. Zanello, F. Laschi, M. Fontani, C. Nervi, G. Cavigiolio, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 306, 42–48.
87. G. Tabbi, C. Cassino, G. Cavigiolio, D. Coiangelo, A. Ghiglia, I. Viano, D. Oselia, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5786–5796.
88. M. M. Montano, A. K. Jaiswal, B. S. Katzenellenbogen, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 25443–25449.

89. S. H. Yang, R. Liu, E. J. Perez, Y. Wen, S. M. Stevens, T. Valencia, A. M. Brun-Zinkernagel, L. Prokai, Y. Will, J. Dykens, P. Koulen, J. W. Simpkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 4130–4135.
90. K. Shiau, D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard, G. L. Greene, *Cell* **1998**, 95, 927–937.
91. Mac Spartam Pro, Wavefunction Co., Irvine CA 92612, USA.
92. J. M. Cense, *Phys. Theor. Chem.* **1990**, 71, 763–766.
93. P. Pigeon, S. Top, A. Vessièrès, M. Huché, E. A. Hillard, E. Salomon. G. Jaouen, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2814–2821.
94. C. Amatore, E. A. Hillard, G. Jaouen, L. Thouin, A. Vessièrès, Manuscript in preparation.
95. G. Jaouen, S. Top, A. Vessièrès, G. Leclercq, M. J. McGlinchey, *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 2505–2517.
96. H. Greenfield, H. W. Sternberg, R. A. Fkiedel, J. H. wotiz, R. Markby, I. Wender, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 120–124.
97. N. A. Sasaki, P. Potier, M. Savignac, G. Jaouen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5759–5762.
98. M. Savignac, N. A. Sasaki, P. Potier, G. Jaouen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 615–617.
99. A. Varenne, M. Salmain, C. Brisson, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 471–476.
100. A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 625–633.
101. A. Vessièrès, S. Tondou, G. Jaouen, S. Top, A. A. Ismail, G. Teutsch, M. Moguilewsky, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 1850–1852.
102. V. Philomin, A. Vessièrès, M. Gruselle, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 419–424.
103. M. Salmain, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 445, 237–243.
104. M. Gruselle, J. L. Rossignol, A. Vessièrès, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1987**, 328, C12–C15.
105. M. Gruselle, P. Deprez, A. Vessièrès, S. Greenfield, G. Jaouen, J. P. Larue, D. Thouvenot, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 359, C53–C56.
106. D. Osella, G. Cavigliolo, M. incenti, A. Vessièrès, I. Laics, G. :eclercq, E. Napolitano, R. Fiaschi, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 596, 242–247.
107. G. Palyi, G. Varadi, A. Viziorosz, L. Marko, *J. Organomet. Chem.* **1975**, 90, 85–91k.
108. A. Vessièrès, G. Jaouen, M. Gruselle, J. L. Rossignol, M. Savignac, S. Top, S. Greenfield, *J. Steroid Biochem.* **1988**, 30, 301–306.
109. A. Vessièrès, S. Top, C. Vaillant, D. Osella, J. P. Mornon, C. Jaouen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 753–755.
110. A. Vessièrès, C. Vaillant, M. Slmain, G. Jouen, *J. Steroid Biochem.* **1989**, 34, 301–305.
111. N. Fischer-Durand, A. Vessièrès, J. M. Heldt, F. Le Bideau, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 59–66.
112. M. Salmain, A. Vessièrès, G. Jaouen, I. S. Butler, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2323–2329.
113. Vessièrès, C. Vaillant, M. Gruselle, D. Vichard, G. Jaouen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 837–839.
114. K. W. Harlow, D. N. Smith, J. A. Katzenellenbogen, G. L. Greene, B. S. Katzenellenbogen, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 17476–17485.
115. S. Top, H. El Hafa, A. Vessièrès, M. Huché, J. Vaissermann, G. Jaouen, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 5241–5249.
116. M. Jung, D. E. Kerr, P. D. Senter, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1997**, 330, 173–176.
117. R. Gust, I. Ott, P. D. K. Sommer, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5837–5846.

118. Ott, B. Kircher, R. Gust, J. Inorg. Biochem. **2004**, 98, 485–489.
119. L. Ott, K. Schmidt, B. Kircher, P. Schumacher, T. Wiglenda, R. Gust. J. Med. Chem. **2005**, 48, 622–629.
120. C. Biot, Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents **2004**, 3, 135–147.
121. R. G. Ridley, Curr. Biol. **1998**, 8, R346–349.
122. P. Sanchez, P. Horrocks, M. Lanzer, Cell **1998**, 92, 601–602.
123. J. Sullivan Jr., H. Matile, R. G. Ridley, D. E. Goldberg, J. Biol. Chem. **1998**, 273, 31103–31107.
124. P. A. Winstanley, Parasitol. Today **2000**, 16, 146–153.
125. T. L. Richie, A. Saul, Nature **2002**, 425, 694–701.
126. L. Delhaes, C. Biot, L. Berry, L. Maciejewski, D. Camus, J. Brocard, D. Dive, Bioorg. Med. Chem. **2000**, 8, 2739–2745.
127. Biot, L. Delhaes, L. A. Maciejewski, M. Mortuaire, D. Camus, D. Dive, J. S. Brocard, Eur. J. Med. Chem. **2000**, 35, 707–714.
128. X. Wu, P. Wilairat, M. L. Go, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2002**, 12, 2299–2302.
129. J. Howarth, K. Hanlon, Tetrahedron Lett. **2001**, 42, 751–754.
130. T. Itoh, S. Shirakami, N. Ishida, Y. Yamashita, T. Yoshida, H. S. Kim, Y. Wataya, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2000**, 10, 1657–1659.
131. R. A. Sanchez-Delgado, M. Navarro, H. Pérez, J. A. Urbina, J. Med. Chem. **1996**, 39, 1095–1099.
132. C. Biot, G. Glorian, L. A. Maciejewski, J. S. Brocard, J. Med. Chem. **1997**, 40, 3715–3718.
133. O. Domarle, G. Blampain, H. Agnani, T. Nzadiyabi, J. Lebib, J. Brocard, L. Maciejewski, C. Biot, A. J. Georges, P. Millet, Antimicrob. Agents Chemother. **1998**, 42, 540–544.
134. L. Delhaes, C. Biot, L. Berry, P. Delcourt, L. A. Maciejewski, D. Camus, J. S. Brocard, D. Dive, ChemBioChem **2002**, 3, 418–423.
135. C. Atteke, J. M. Ndong, A. Aubouy, L. Maciejewski, J. Brocard, J. Lebib, P. Deloron, J. Antimicrob. Chemother. **2003**, 51, 1021–1024. Epub.
136. B. Pradines, T. Fusai, W. Daries, V. Laloge, C. Rogier, P. Milet, E. Panconi, M. Kombila, D. Parzy, J. Antimicrob. Chemother. **2001**, 48, 179–184.
137. B. Pradines, A. Tall, C. Rogies, A. Spiegel, J. Mosnier, L. Makrama, T. Fusai, P. Millet, E. Panconi, J. F. Trape, D. Parzy, Trop. Med. Int. Health **2002**, 7, 265–270.
138. L. Delhaes, H. Abessolo, C. Viot, L. Berry, P. Delcourt, L. Maciejewski, J. Brocard, D. Camus, D. Dive, Parasitol. Res. **2001**, 87, 239–244.
139. H. Abessolo, PhD thesis. University of Ullel, Villeneuve-d'Ascq, France, 2000.
140. T. J. Wgan, R. Hunter, C. H. Kaschula, H. M. Marques, A. Mispion, J. Walden, J. Med. Chem. **2000**, 43, 283–291.
141. M. Blackie, P. Beagley, K. Chibale, C. Clarkson, J. R. Moss, P. J. Smith, J. Organomet. Chem. **2003**, 688, 144–152.
142. K. Chibale, J. R. Moss, M. Blackie, v. S. D. P. J. Smith, Tetrahedron Lett. **2000**, 41, 6231–6235.
143. C. Biot, J. Dessolin, I. Ricard, D. Dive, J. Organomet. Chem. **2004**, 689, 4678–4682.
144. M. de Champdoré, G. Di Fabio, A. Messere, D. Montesarchio, G. Piccialli, R. Loddo, M. la Colla, P. la Colla. Tetrahedron **2004**, 60, 6555–6563.
145. G. Laus, J. Schutz, H. Shottenberger, M. Andre, K. Worst, M. Spetea, K. H. Ongania, A. G. Muller, H. Schmidhammer, Helv. Chim. Acta **2003**, 86, 3274–3280.

146. Y. X. Wang, P. Legzdins, J. S. Poon, C. C. Pang, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, 35, 73–77.
147. A. Rosenfeld, J. Blum, D. Gibson, A. Ramu, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, 201, 219–221.
148. J. Fang, Z. Jin, Z. Li, W. Liu, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 674, 1–9.
149. S. Huikai, W. Qingmin, H. Runqiu, L. Heng, L. Yonghong, *J. Organomet. Chem.* **2002**, 655, 182–185.
150. A. Vessières, S. Top, P. Pigeon, E. A. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3937–3940.
151. W. Fan, K. Zhang, J. L. Bolton, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 45–52.
152. L. Yu, H. Liu, W. Li, F. Zhang, C. Luckie, R. B. Van Breemen, G. R. Thatches, J. L. Bolton, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 879–888.
153. Zhang, P. W. Fan, X. Liu, L. Shen, R. B. van Breeman, J. L. Bolton, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 53–62.
154. T. R. Johnson, B. E. Mann, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3722–3729.
155. R. Motterlini, R. Foresti, C. I. Green, in R. E. Wang (Ed.), *Carbon monoxide and cardiovascular functions*, CRC. Boca Raton. FL, **2002**.
156. L. E. Otterbein, *Antioxid. Redox Signaling* **2002**, 4, 309–319.
157. Rattat, A. P. Schubiger, H. Berke, H. Schmalle, R. Alberto, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2001**, 16, 339–343.
158. D. Rattat, A. Verbruggen, H. Schmalle, H. Berke, R. Alberto, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4089–4092.
159. L. I. Delmon-Moingeon, D. Piwnica-Worms, A. D. van den Abbeele, B. L. Holman, A. Davison, A. G. Jones, *Cancer Res.* **1990**, 50, 2198–2202.
160. D. J. Rhodes, M. K. O'Connor, S. W. Phillips, R. L. Smith, D. A. Collins, *Mayo Clin. Proc.* **2005**, 80, 24–30.
161. G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, R. Alberto, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 600, 23–36.
162. C. Müller, C. Dumas, U. Hoffmann, P. A. Schubiger, R. Schibli, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4712–4721.
163. S. Mundwiler, M. Kundig, K. Ortner, R. Alberto, *Dalton Trans.* **2004**, 1320–1328.
164. D. R. van Staveren, S. Mundwiler, U. Hoffmanns, J. K. Pak, B. Spingler, N. Metzler-Nolte, R. Alberto, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2593–2603.
165. S. Top, E. B. Kaloun, G. Jaouen, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 736–737.

4 Радиофармацевтические препараты

Р. Альберто (Roger Alberto, University of Zürich, Institute of Inorganic Chemistry, Switzerland)

4.1. Что такое радиофармацевтические препараты?

В современной медицине ранняя диагностика распространенных заболеваний имеет определяющее значение для улучшения качества жизни и уменьшения расходов общества на сохранение здоровья. Столь же важна оценка прогресса в лечении после терапевтического воздействия на заболевание пациента, например регрессия рака после химиотерапии или влияние фармацевтических препаратов на некоторые нейродегенеративные процессы, такие как болезнь Альцгеймера или сходные заболевания [1, 2]. Биохимические аналитические методы на молекулярном уровне сейчас разработаны хорошо. Со времени открытия рентгеновских лучей методы визуализации становятся все более и более важными, а рутинная рентгеновская диагностика в настоящее время дополняется визуализацией с помощью ядерного магнитного резонанса (МРТ, или *англ.* MRI)*, ультразвуковой диагностикой и радиоизотопной сцинтиграфией**. Рентгеновские методы исследования и метод MRI – методы, основанные на исследованиях структуры. В то же время методы позитронно-эмиссионной томографии (PET) и компьютерной томографии эмиссии одного фотона (SPECT)***, которые позволяют визуализировать функционирование органов, относятся к функционально-диагностическим методам. Хотя разрешение, достигаемое с помощью MRI, значительно улучшилось за последние годы, существующие контрастные агенты все же не позволяют с достаточной надежностью поставить функциональный диагноз. Два других метода, PET и SPECT, основаны на использовании радиоизотопов и относятся к методам радиофармацевтики. Соединения, используемые в этих методах, радиоактивны, а радиофармацевтические препараты – это не что иное, как комбинация радиоактивного изотопа

* MRI – Magnetic Resonance Imaging. (*англ.*).

** Метод исследования внутренних органов, основанный на визуализации распределения введенного в организм радиофармацевтического препарата с помощью сцинтилляционной гамма-камеры. – *Прим. перев.*

*** PET – Positron Emission Tomography, SPECT – Single Photon Emission Computed Tomography (*англ.*).

элемента с новой молекулой (комплексы, используемые в качестве перфузионных препаратов) или с молекулой, биологическое поведение которой хорошо известно (по принципу «наведения на цель» – см. гл. 1). Если радиоизотоп – это, например, ^{11}C , то при замене ^{12}C на ^{11}C исходная структура фармацевтического (ведущего) препарата остается неизменной. На практике часто оказывается невозможным осуществить подобное «замещение» за короткий отрезок времени, поэтому изотоп ^{11}C вводят, например, в составе группы CH_3 , которая может в некоторой степени изменить (но может и не изменить) биологическое поведение ведущей структуры. Недавно появились обзоры на эту тему [3]. Здесь они рассматриваться не будут.

Как известно, изотоп $^{99\text{m}}\text{Tc}$ является предпочтительным радиоизотопом для метода СPECT с экономической точки зрения, однако и другие факторы, такие как доступность и обработка отходов в данном случае, также имеют существенное значение. Более того, для генерирования изображений (визуализации) почти идеально подходят характеристики распада данного изотопа. Весьма благоприятны также другие его свойства, такие как время полураспада. В самом деле, наиболее широкое применение в радио медицине находит именно этот радиоизотоп, несмотря на возрастающую конкуренцию со стороны других методов. Радиофармацевтические препараты, основанные на изотопе $^{99\text{m}}\text{Tc}$, можно разделить на два класса. Соединения первого класса, хорошо известные на рынке лекарств – это так называемые перфузионные агенты – комплексы металлов, которые по каким-то причинам следуют по определенным биологическим путям и способны аккумулироваться в определенных органах, где и могут быть визуализированы. Комплексы этого типа обнаружены более или менее случайно и не представляют интереса для дальнейших исследований. Некоторые из них представлены на схеме 4.1.

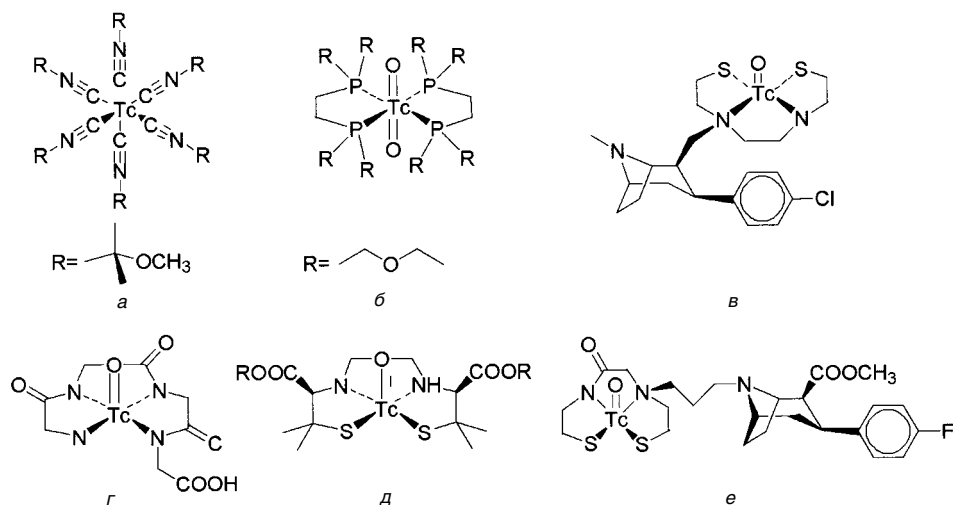


Схема 4.1. Набор комплексов, подходящих для радиофармацевтики: *a* – Кардиолит® (DuPont, $\text{R} = \text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OCH}_3$), *б* – Миовью® (Nycomed-Amersham, $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5$), *в* – TRODAT-1, *г* – Технескан® MAG3 (Mallinckrodt), *д* – Tc-ECD Нейролит, *е* – разновидность TRODAT-1

Второй класс основанных на изотопе ^{99m}Tc радиофармацевтических препаратов – это меченые для конкретных мишеней агенты. Большинство из них – органические молекулы природного или искусственного происхождения, которые имеют высокое сродство к связыванию со специфическими рецепторами в организме [4–6]. Такие молекулы называются также векторами или «наводящими на цель» агентами, поскольку считается, что они аккумулируются на специфических рецепторах в раковых клетках. Эти агенты могут использоваться в обычной терапии заболеваний, важными примерами служат антитела или пептиды, также являющиеся радиофармацевтическими агентами. Маркеры апоптоза – молекулы, связывающиеся с рецепторами центральной нервной системы (ЦНС), являются примерами других перспективных векторов для диагностической радиомедицины. Эти «наводящие на цель» молекулы являются «активной» составной частью радиофармацевтических препаратов второго поколения. Они связываются с комплексом, содержащим изотоп ^{99m}Tc , с помощью бифункциональных хелатирующих лигандов. Такие лиганды являются бифункциональными, поскольку одной из их функций является ковалентное связывание с вектором, в то время как вторая функция – это координация с ^{99m}Tc . Как и ожидалось, введение хелатирующего лиганда (а, следовательно, и комплекса) значительно изменяет поведение векторов (главным образом в нежелательном направлении). Решение этой сложной проблемы является задачей для химии радиофармацевтических препаратов в общем и имеет важное значение для биометаллоорганической химии, в частности.

Радиофармацевтические препараты на основе ^{99m}Tc для специфических мишеней все же с трудом вышли на рынок. Это удивительно, потому что не только в научных институтах, но и в коммерческих фирмах много усилий было затрачено на развитие этого направления. Очевидно, как и в обычной фармацевтической химии, физиологическое поведение соединений должно быть оптимизировано. Процедура оптимизации описывается хорошо известным термином «поиск лекарства и/или его усовершенствование».

Данная глава посвящена обзору и рассмотрению химии металлоорганических комплексов ^{99m}Tc в плане их применимости для химии радиофармацевтических препаратов. Кроме того, более детально будет дано обсуждение различных вопросов, связанных синтезом новых комплексов как таковых либо присоединенных к «наводящим на цель» молекулам.

4.1.1. Поиск и разработка радиофармацевтических препаратов

В «нормальном» варианте разработки лекарственных препаратов известная – ведущая – структура молекулы модифицируется с помощью библиотек функциональных групп, что дает возможность систематически и рационально оптимизировать соотношение структура – активность. При этом оптимизируется взаимодействие с мишенью (например, ингибирование какого-либо фермента), а судьба молекулы в организме в целом имеет меньшее значение до тех пор, пока не проявятся побочные эффекты препарата, ограничивающие

терапевтический индекс лекарства. Ситуация в случае радиофармацевтической химии совершенно иная и делает разработку лекарственных препаратов несравненно более сложной, поскольку биораспределение в такой системе, как организм, лимитируется биологически. В противоположность обычным фармацевтическим препаратам, которые в идеале неактивны в мишенях, радиофармацевтические препараты активны повсюду, что обусловлено их радиоактивностью. Таким образом, помимо требования точной локализации в мишени, препарат должен как можно быстрее выводиться из организма, что позволит визуализировать орган с высоким отношением мишень/немишень и, таким образом, поставить точный диагноз во благо пациента. Высокая аккумуляция в мишени и быстрое выведение из организма – это факторы, вступающие в противоречие. В связи с этим всегда требуется искать компромисс.

Лимитирующие органы для достижения высокого разрешения визуализации – это депо крови, почки и печень. Для оптимизации биологического поведения радиофармацевтических препаратов доза препарата в пересчете на комплекс металла должна варьироваться. Ведущая структура, вектор, обычно уже оптимизирована, однако существуют примеры, когда должна быть оптимизирована биомолекула при наличии постоянной радиоактивной метки.

Систематическая модификация комплекса металла отнюдь не рутинная процедура. Для конкретного металла существует определенный набор донорных лигандов, обеспечивающих стабильность комплекса в физиологических условиях. Метка должна быть устойчивой и биологически неактивной либо должна отщепляться от вектора предсказуемым фармакокинетическим путем, а затем быстро удаляться из организма для того, чтобы визуализация была четкой. Все это определяет принцип выбора металлоорганических комплексов или частей молекул для применения в радиофармацевтике. Разработка радиофармацевтического препарата возможна лишь в том случае, если лигандная сфера может быть систематически изменяемой при постоянном наборе доноров. Чем больше набор потенциальных доноров, дающих устойчивые комплексы, тем больше соответствующих комбинаций доноров и, следовательно, больше число лигандов, структуру которых можно изменять. Это также определяет выбор металлоорганических комплексов, поскольку они, в общем, имеют замкнутые электронные оболочки и, следовательно, лиганды замещаются с трудом, т. е. можно ожидать, что они будут стабильными (жесткими). Систематическое варьирование лигандной сферы с широким набором (легко доступных) лигандов дает возможность определить соотношения структура – активность – важнейшую базу для разработки любого лекарственного препарата. Существующая процедура разработки радиофармацевтических препаратов на базе металлоорганических комплексов основана на создании комплекса-предшественника, содержащего определенный набор лигандов, предпочтительно молекулы воды, которые можно заместить на бифункциональный хелатирующий лиганд. Ниже мы поговорим о комплексе $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, который является прототипом такой базовой структуры, но опытный химик быстро поймет, что CO не единственный лиганд, который мог бы являться частью подобного базового остова.

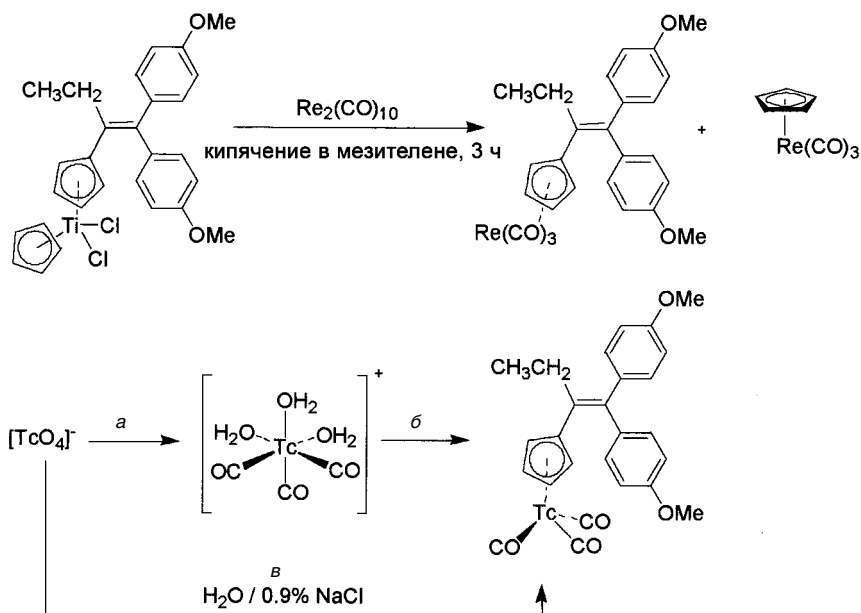


Схема 4.2. Получение* биометаллоорганического радиофармацевтического препарата (вверху) и радиофармацевтического препарата (внизу); а – CO (1 атм), NaBH_4 , H_2O , 0,9% NaCl, 75°C, 30 мин. Реакция (а) находится в стадии разработки, в то время как реакция (в) идеально выполнима для рутинного применения

Другой и, возможно, более важный момент в поиске радиофармацевтического препарата и его разработке состоит в том, что синтез этого препарата должен осуществляться в клинике непосредственно перед его использованием. Это означает, что синтез металлоорганического предшественника должен проводиться в практически осуществимых условиях в физиологическом растворе, а сам предшественник – быть высокочистым.* Химики, знакомые с металлоорганической химией, хорошо понимают трудность этой задачи, поскольку в условиях реакции обычно образуются несколько конечных продуктов и непредсказуемая смесь молекул, способных к координации, а также воды. На второй стадии (или, в идеале, – в одной реакции) требуемая молекула должна быть помечена по координирующей функции бифункционального хелатирующего лиганда (хелатора) с образованием высоко устойчивого радиофармацевтического препарата с количественным выходом. Конечно, эта процедура должна быть хорошо воспроизводимой, иначе данное соединение не будет удовлетворять требованиям компетентных медицинских органов. В случае изотопа $^{99\text{m}}\text{Tc}$ вся процедура должна начинаться с иона $[\text{^{99m}TcO}_4]^-$ – единственной химической формы данного изотопа, обычно доступной в клинике.

* Имеется в виду химическое поведение комплексов. – Прим. перев.

Эти требования отличают радиофармацевтическую биометаллоорганическую химию от большинства других направлений в данной области. Молекулы некоторых металлоорганических соединений, таких как ферроцен Fc или комплекс $[(\text{C}_5\text{H}_5)\text{Re}(\text{CO})_3]$, присоединяются к вектору для тех или иных целей. При этом нет нужды проводить синтез в воде из труднодоступных исходных веществ. Поведение этих металлоорганических комплексов, конечно, подчиняется тем же правилам, что и поведение радиофармацевтических препаратов, но их синтез не является лимитирующим и существенным моментом для применения в биометаллоорганической химии. Биометаллоорганическая химия «холодных»^{*} соединений все еще является важным фактором в разработке радиофармацевтических препаратов, поскольку биологическое поведение, например связывание с рецептором, определяет поиск структур этих препаратов. Поведение цикlopentadiенильного кольца в комплексе $[(\text{C}_5\text{H}_5)\text{Re}(\text{CO})_3]$ подобно поведению фенильного заместителя в ведущей структуре. Этот факт инициировал исследования, направленные на синтез соединений такого класса с изотопом $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [8]. Различные подходы и требования к разработке радиофармацевтических препаратов представлены на схеме 4.2.

4.1.2. Металлоорганические комплексы в радиофармацевтической практике

К настоящему времени единственным металлоорганическим комплексом $^{99\text{m}}\text{Tc}$, который был внедрен для практического использования, является $[\text{Tc}(\text{CN-R})_6]^+$, где $\text{R} = -\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{OCH}_3)$ (Сестамиби, или Кардиолит[®] фирмы DuPont). Лиганд известен под названием MIBI, или метоксиизобутилизотиоцианид. Комплекс содержит шесть связей $\text{M}-\text{C}$, а центральным ионом металла является $\text{Tc}(\text{I})$. Пионерская работа Дэвисона и др. в начале 1980-х гг. доказала, сколь важным является преодоление устоявшихся идей в химии, поскольку он синтезировал металлоорганический комплекс металла в низкой степени окисления удобным способом непосредственно в воде, в одну стадию и с количественным выходом [9]. Несмотря на удобство этого метода, который был быстро использован в клинических условиях, реальное радиофармацевтическое средство попало на рынок лишь в декабре 1990 г., что подчеркивает сложность разработки лекарства, производства набора реагентов и регистрации процессов даже в случае «простых» комплексов. Для синтеза необходима кипящая вода, что указывает, насколько данный комплекс устойчив. Это также указывает на важность кинетической устойчивости комплекса. Энергия связи $\text{Tc}-\text{C}$ лишь немного превышает 150 кДж/моль^{**}. Обычные координационные соединения без эффекта хелатирования в этих условиях быстро разлагаются, поскольку их термодинамическая стабильность недостаточна.

^{*} Подразумевается пониженная реакционная способность. – *Прим. перев.*

^{**} Для сравнения: энергия прочной связи $\text{O}-\text{O}$ в пероксидах составляет 146 кДж/моль. – *Прим. перев.*

Разработка фармацевтических препаратов, о которых идет речь, состоит в варьировании органических остатков, присоединенных к изонитрильной группе для оптимизации захвата в целевом органе. Данный комплекс принадлежит к перфузионным препаратам и в настоящее время является наиболее широко используемым радиофармацевтическим препаратом для визуализации миокарда с рыночным потенциалом несколько сотен миллионов долларов. Многое еще можно сделать в химии комплекса $[\text{Tc}(\text{CN-R})_6]^+$, несмотря на то что этот комплекс очень стабилен и в нем с трудом замещаются лиганды до тех пор, пока металл не переведен в более высокую степень окисления.

К сожалению, устойчивость данного комплекса делает невозможным его использование в качестве предшественника для получения меток для векторов, однако это служит примером того, насколько важна особая природа металлоорганических комплексов для биологического применения. До сих пор сестамиби остается единственным неорганическим радиофармацевтическим препаратом, который занимает собственную позицию на рынке лекарств и остается прототипом для последующего успешного развития биометаллоорганической химии.

Существуют еще два соединения, которые не вышли на рынок лекарственных препаратов. Однако о них следует кратко упомянуть, поскольку оба эти вещества служат дополнительными примерами, показывающими, как происходит поиск и совершенствование лекарственных препаратов; это прототипы необычных, но успешных химических подходов. Первое соединение принадлежит к тому же классу, что и бисареновый катионный комплекс технеция(I), $[\text{Tc}(\text{C}_6\text{H}_6)_2]^+$, синтез которого был предпринят для получения конкурента сестамиби благодаря его липофильному характеру и положительному заряду +1 [10]. Естественно, что Вестер и др. синтезировали эти комплексы с разными аренами в условиях, не соответствующих будущему рутинному использованию, а только для того, чтобы исследовать биологические свойства комплексов. Реакцию $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ с лигандом провели без растворителя под действием ультразвукового воздействия в присутствии металлического алюминия в качестве восстановителя. Эта необычная реакция действительно привела к образованию сэндвичевых комплексов с очень хорошим выходом. Поскольку полученные соединения не проявили ожидаемого поведения *in vivo* (аккумуляция в сердце), дальнейшие исследования не проводились. Существуют два важных момента в биометаллоорганической радиофармацевтической химии. Во-первых, соединение следует синтезировать в каких-либо условиях и испытать до того, как адаптировать условия синтеза к требованиям пользователя (например, проведение синтеза $[\text{Tc}(\text{C}_6\text{H}_6)_2]^+$ в воде). Во-вторых, металлоорганическое соединение должно быть устойчиво в физиологических условиях и, следовательно, являться потенциальным предшественником для дальнейших химических превращений (в метки). Так, возможно, что один из ареновых лигандов в этом комплексе может быть замещен, и гипотетический металлоорганический акваион $[\text{Tc}(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{OH}_2)_3]^+$ мог бы представлять собой крайне притягательную цель не только для радиофармацевтики, но также для химии технеция (и рения). Несмотря на устойчивость комплекса $[\text{Tc}(\text{C}_6\text{H}_6)_2]^+$ в воде, попытки развить далее химию этого комплекса не делались.

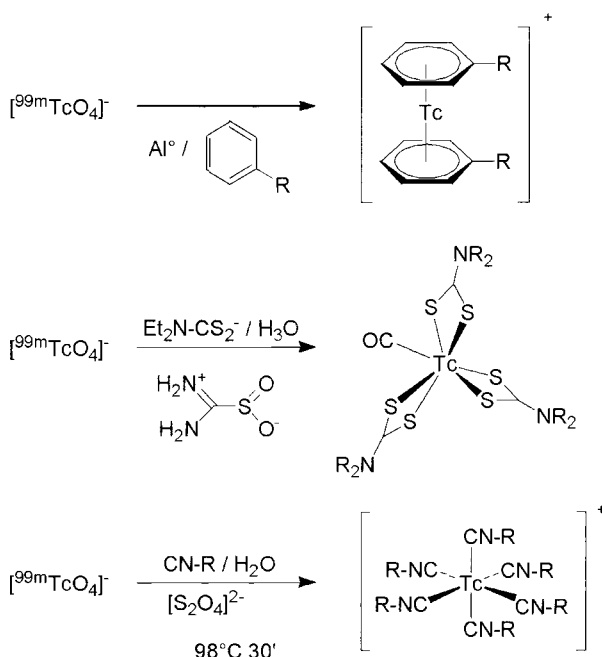


Схема 4.3. Важные металлоорганические радиофармацевтические комплексы или их предшественники [9–11]

Второй комплекс – комплекс гептакоординированного Tc(III), который содержит один лиганд CO, был генерирован *in situ*. Балдас и др. в начале 1980-х гг. провели реакцию $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ с дитиокарбаматами в присутствии формамидинсульфиновой кислоты. Они получили комплекс $[\text{Tc}(\text{dtc})_3(\text{CO})]$, в котором* содержался один лиганд CO, образующийся при разложении восстанавливающего агента [11]. Хотя данная реакция не нашла дальнейшего применения, она служит примером возможности генерирования лигандов, приводящих к металлоорганическим комплексам, при разложении органического предшественника (лиганда). Как будет показано ниже в данной главе, такая возможность имеет огромное значение. Большинство лигандов, используемых в металлоорганической химии, должны получаться таким путем, поскольку они по большей части недостаточно устойчивы для того, чтобы оставаться неизменными в тех условиях, которые требуются для проведения реакции. В синтезе комплексов $[\text{Tc}(\text{CN-R})_6]^+$, осуществленном Дэвисоном, изоцианидный лиганд присутствует в форме комплекса с Cu(I), что также является разновидностью защитной группы и источником этого чувствительного к воде лиганда *in situ*. Наиболее важные результаты и реакции в данной области резюмированы на схеме 4.3.

* dtc – дитиокарбамат. – Прим. перев.

4.2. Металлоорганические аква-ионы

До сих пор речь шла о синтезе и некоторых свойствах биометаллоорганических комплексов. Как сказано во вводной части, для радиофармацевтической химии требуются комплексы-предшественники, содержащие лиганды, которые могут быть замещены донорами из хелаторов, прикрепленных к «наводящей на цель» молекуле. Соответствующие химические превращения происходят в биологической среде, следовательно, таким замещаемым лигандом предпочтительно должна быть сама вода. Помимо устойчивых к воде металлоорганических соединений, описанных в других главах, в настоящий момент мы обращаемся к редкому классу комплексов, а именно смешанным металлоорганическим акваионам. Несмотря на то что вода не принимается во внимание в общей металлоорганической химии, ее необходимо учитывать в биометаллоорганической или радиофармацевтической химии. Большинство классических углеродных лигандов выдерживают действие воды, если они не склонны к протонированию и последующему расщеплению. С другой стороны, вода как источник протона может окислять комплексы низковалентных металлов с последующим разложением и образованием H_2 . Поэтому типичные лиганды, для которых можно ожидать устойчивости в присутствии воды, – это CO , $(\eta^5-C_5H_5)$, $(\eta^3-C_3H_5)$, C_6H_6 и некоторые другие, такие как изоцианиды. Однако существование алкильных производных (за исключением метилкобаламина и кофермента B_{12}) в водной среде менее вероятно. Возможно, в принципе, использование карбеновых и карбиновых лигандов, однако на сегодняшний день описан лишь один такой пример [12, 13]. Центральный ион металла с такой организацией S -связанных лигандов и молекул H_2O находится преимущественно не в очень низкой степени окисления и несет положительный заряд, что затрудняет его окисление. Действительно, металлоорганические акваионы имеют почти исключительно d^6 - или d^3 -электронную конфигурацию и образуют комплексы с перечисленными выше лигандами. Существуют обзоры по химии таких предшественников [14, 15]. Если целью является разработка новых предшественников, надо принимать во внимание упомянутые свойства этих комплексов. Химик действительно может предсказать существование до сих пор неизвестных комплексов, которые могут оказаться устойчивыми и которые с большой вероятностью могут обладать интересными химическими свойствами. Некоторые из наиболее важных металлоорганических акваионов представлены на схеме 4.4. Недавно был опубликован исчерпывающий обзор по использованию комплекса $[Cr^*Rh(OH_2)_3]^{2+}$ в биологических целях [16].

Во всех этих примерах предпочтительными оказываются лиганды CO , поскольку их способность стабилизировать низкие степени окисления металла путем обратного π -донирования приводит к тому, что металл в комплексе окисляется труднее, чем можно было бы ожидать для данной степени окисления. Прекрасный пример – комплекс $[^{99}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$, окисление которого в воде происходит при потенциале 1,5 В отн. НКЭ. Обеднение металла электронами приводит к увеличению кислотности по Льюису металлического ядра, комплексы, показанные на схеме 4.4, в действительности являются сильными или средними по силе кислотами Бренстеда. Этого нельзя

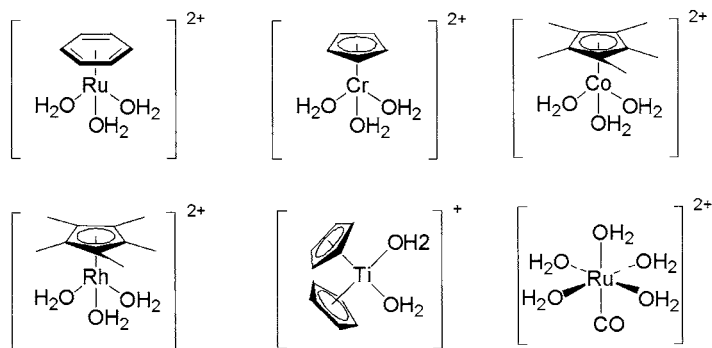


Схема 4.4. Наиболее важные металлоорганические аква-ионы: $[(C_6H_5)Ru(OH_2)_3]^{2+}$ [17, 18]; $[CrCr(OH_2)_3]^{2+}$ [19]; $[Cr^*Co(OH_2)_3]^{2+}$ [20]; $[Cr^*Rh(OH_2)_3]^{2+}$ [21, 22]; $[(Cr^*)_2Ti(OH_2)_2]^{2+}$ [23] и $[Ru(CO)(OH_2)_5]^{2+}$ [24]

было ожидать, основываясь на заряде комплексов или на положении металла в Периодической таблице. Все эти металлоорганические аква-ионы являются представителями весьма многостороннего класса комплексов, подходящего для поиска радиофармацевтических препаратов, если соответствующий элемент имеет радиоизотоп с соответствующими характеристиками. ^{105}Rh и ^{97}Ru принадлежат к этому классу, но мало исследовались даже в биометаллоорганической химии.

Следует отметить две особенности металлоорганических аква-ионов. С одной стороны, в их структуре можно выделить полусферу (обычно одна из сторон координационного октаэдра), которая защищена по отношению к замещению. С другой стороны, в лигандном окружении они имеют достаточное число молекул воды, которые могут быть замещены другими лигандами. Позиции, занимаемые молекулами воды, представляют вариабельную часть комплекса. Замещение их на внешние хелаторы позволяет конструировать метки, которые соответствуют свойствам вектора, к которому эти хелаторы присоединены. Поскольку образующиеся комплексы являются 18-электронными и имеют заполненную электронную оболочку, они будут инертными независимо от природы лигандов, которые замещают координированные молекулы воды. Механизм замещения монокоординированного лиганда в общем случае является диссоциативным (D) либо обменно-диссоциативным в случае d^6 -комплексов. Соответствующие активационные энергетические барьеры высокие, и обменные реакции протекают медленно. Это находит экспериментальное подтверждение для некоторых аква-ионов, изображенных на схеме 4.4, особенно для ионов $[^{99}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$.

Более того, вода проявляет слабую тенденцию координироваться с электронно-богатыми ионами металлов, что также подтверждает малую реакционную способность комплекса на первой стадии предполагаемого механизма диссоциации при замещении одного из лигандов на воду. Основные черты описываемых процессов обобщены на схеме 4.5.

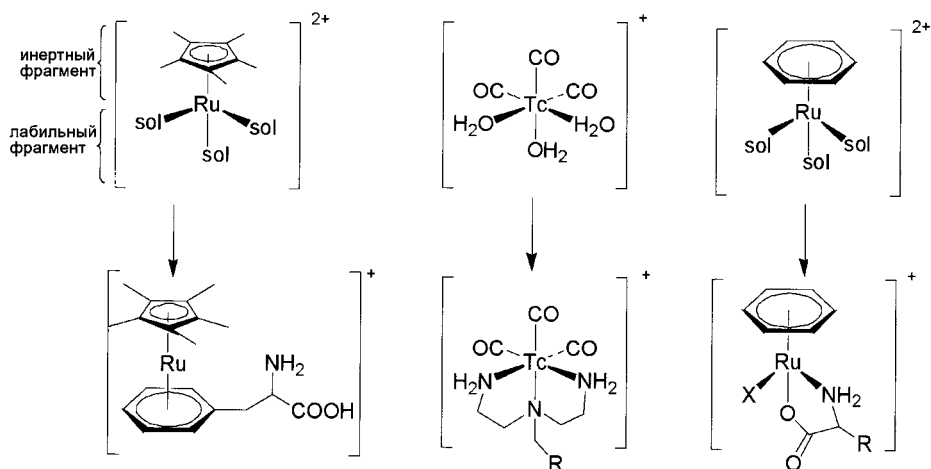


Схема 4.5. Общие схемы реакций металлоорганических аква- (или сольвато-) ионов, приводящих к новым биометаллоорганическим соединениям и/или радиофармацевтическим препаратам [15, 25]

Возвращаясь вновь к аргументам, подчеркивающим преимущества комплексов, упомянутых в начале данной главы, следует отметить то, что свойства металлоорганических акваионов позволяют сделать разработку радиофармацевтических препаратов на их основе более систематизированной, чем на основе классических предшественников. Если принять за основу кинетическую устойчивость комплексов, становится понятным, что металл может связываться с самыми разнообразными лигандами: от «классических» вернеровских до «неклассических» лигандов, реализующих связь $M-C^*$. Лиганды могут быть моно- и полидентатными, могут быть бифункциональными хелаторами, либо являться частью самого вектора. Их можно выбрать так, чтобы они имитировали часть структуры вектора, либо были совершенно иными и, наконец, можно варьировать их физико-химические свойства, такие как заряд. Очевидно, такая возможность основывается на металлоорганической природе предшественника, поскольку аналогичное поведение для фрагментов «классических» комплексов встречается редко.

Хотя свойства металлоорганических соединений и выглядят многообещающими, нельзя игнорировать те ограничения, которые налагает инвариантная часть комплекса. Желательно, чтобы *fac*-координированными лигандами были C_6H_6 или $[C_5H_5]^-$, поскольку они не являются стерически затрудненными и имеют низкую молекулярную массу. Три лиганда CO имеют малые размеры, но они окружают центральный атом металла и делают весь комплекс относительно стерически затрудненным. Не будучи реализованными в радио-

* Здесь трудно согласиться с терминологией авторов. Число известных комплексов металлов, в которых лиганды образуют связи углерод–металл столь велико, что такие комплексы в настоящее время уже нельзя рассматривать как «неклассические». – Прим. перев.

фармацевтике, рассмотренные принципы дают импульс для разработки новых предшественников препаратов.

4.3. Прототип $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$: синтез и свойства

Комплексы, содержащие лиганд СО, в общем случае получают из бинарных карбониллов, которые синтезируют в условиях высокого давления и температуры. Лиганды СО, кроме того, могут быть введены в электронно-дефицитные комплексы в мягких условиях. Бинарные карбонилы очень редко получают в таких условиях. Бинарные карбонилы металлов являются термодинамически конечными продуктами, в которых определенное число групп СО можно заместить другими лигандами для получения тех или иных целевых комплексов. Для получения комплексов переходных элементов в низкой степени окисления универсальными исходными соединениями являются смешанные карбонилгалогенидные комплексы, поскольку атом галогена также может быть легко замещен на другие лиганды. Металлоорганическая химия технеция развита относительно слабо, поскольку такой комплекс, как $[\text{Tc}_2(\text{CO})_{10}]$, практически невозможно синтезировать по причинам радиационной безопасности. Еще 20 лет тому назад Маззи и др. описали получение смешанных фосфиногалогенидных СО-комплексов Тс(I) и Тс(III) [26, 27]. В концентрированном растворе НХ с использованием муравьиной кислоты как источника СО был получен комплекс $[\text{ReCl}(\text{CO})_3]$ и, по-видимому, его технециевый аналог. Для этих комплексов не было изучено поведение в водных растворах, поскольку для этого не было побудительных причин. Для получения комплексов Тс(I) нужен удобный путь синтеза устойчивых и, в то же время, достаточно реакционноспособных предшественников. Некоторые базовые структуры комплексов низковалентного Тс, получаемых при обычном давлении, представлены на схеме 4.6.

Понятно, что для синтеза нужен более удобный метод. Помимо обычных восстанавливающих агентов, иногда в таком качестве по отношению к переходным металлам использовались бораны, хотя с ними удобно работать и они очень оксофильны. Мы провели реакцию $[\text{}^{99}\text{TcO}_4]^-$ с $\text{BH}_3 \times \text{ТГФ}$ при давлении СО 1 атм и в присутствии ионов Cl^- как потенциальных противоионов. При проведении реакции в течение относительно небольшого времени и давлении СО 1 атм с хорошим выходом был выделен комплекс $[\text{}^{99}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]^{2-}$ [29, 30]. Неизвестно, как протекает реакция, поскольку не были зафиксированы какие-либо интермедиаты. За исключением небольших количеств $[\text{TcH}(\text{CO})_4]_3$, не были выделены или обнаружены комплексы с большим содержанием СО [30]. Катион *fac*- $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ является термодинамически наиболее устойчивым интермедиатом, поскольку связь дополнительного лиганда СО с металлом в *транс*-расположении к другому лиганду СО весьма лабильна, и такой лиганд легко отщепляется. Механизм реакции в настоящее время все еще остается невыясненным, так как требуется точный контроль концентрации СО в растворе. Кроме того, в реакционной среде могут присутствовать другие комплексы, наличие которых объяснило бы механизм реакции.

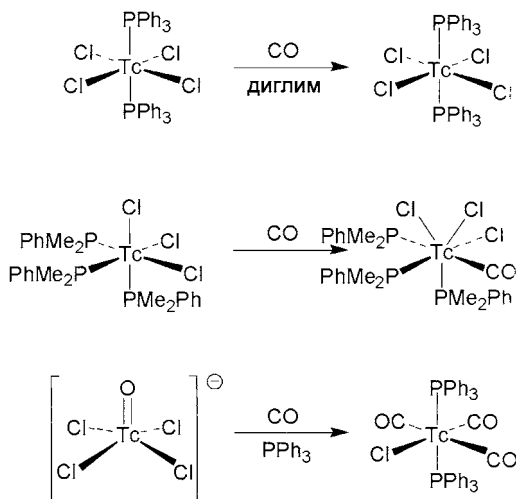


Схема 4.6. Получение некоторых базовых карбонильных комплексов технеция при давлении 1 атм [26–28]

Удивительно, что при растворении в воде соединения, содержащего ионы $[\text{}^{99}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]^{2-}$, три хлоридных лиганда замещаются молекулами воды с образованием металлоорганического акваиона $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Именно этот момент является точкой поворота в сторону биометаллоорганической химии. Само по себе исследование металлоорганического объекта в биологически значимых условиях (вода и воздух) было ключевым решением. Подобные испытания, по-видимому, следовало бы провести и с другими металлоорганическими комплексами, поскольку при этом могли бы появиться новые или биологически значимые металлоорганические акваионы. Комплекс $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ оказался исключительно устойчивым и не разлагался в присутствии воздуха как в сильнощелочной, так и в сильнокислой среде [31]. Природа комплекса $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ является той существенной основой, которая позволяет использовать этот комплекс в биометаллоорганической химии. Особенности комплексов технеция, о которых сказано выше, создают прекрасные возможности для разработки фармацевтических препаратов на основе катиона $\text{fac-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Три координационных положения в комплексе «блокированы» лигандами CO, а три других доступны для координации самых разнообразных лигандов и хелаторов.

В этом отношении комплекс $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ является триаква-ионом. Его можно сравнить, например, с гидратированными ионами лантанидов, в которых молекулы H_2O должны быть замещены на другие лиганды для получения радиофармацевтических препаратов.

Нам не удалось провести замещение одного лиганда CO. В недавней работе описано отщепление одного лиганда CO при высокой температуре в присутствии лигандов CN–R, проявляющих транс-эффект, что приводит к соединениям общей формулы $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_2(\text{CN-R})_4]^+$ [32]. С другой стороны, лиганды CO обмениваются с ^{13}CO в такие промежутки времени, что все

интермедиаты типа $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_n(^{13}\text{CO})_{3-n}]^{+}$, где $n = 0-3$, могут быть обнаружены с помощью спектроскопии ЯМР [33]. Обменной реакцией получен бинарный катион, содержащий технеций(I) $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{CO})_6]^{+}$, который был выделен после проведения реакции в течение длительного времени. Этот результат предполагает участие в реакции комплексов $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_4]^{+}$ и $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_5]^{+}$ в качестве реальных интермедиатов, а не переходных состояний. Помимо синтеза, существование таких интермедиатов было подтверждено теоретическими расчетами [34].

Несмотря на многие усилия, получить соли катиона $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^{+}$ в кристаллическом состоянии не удалось, однако спектральные данные подтверждают предложенный состав комплекса. С этими данными согласуются также рентгеноструктурные исследования других комплексов. Некоторые из структур будут описаны ниже.

Упомянутый синтез комплекса $[\text{}^{99}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]^{2-}$ дал возможность дальнейшего развития химии соединений Tc(I), но не предоставил возможности получения хорошего предшественника для радиофармацевтических препаратов. Синтез все еще требует использования ТГФ в качестве растворителя, что невозможно в рутинной процедуре. Поэтому был разработан синтез комплекса $^{99\text{m}}\text{Tc}$ в исключительно водной среде. Замена $\text{BH}_3 \times \text{ТГФ}$ на NaBH_4 , а также тетрагидрофурана на физиологический раствор (0,9% раствор NaCl в воде) привела к получению комплекса $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^{+}$ с выходом более 98% при атмосферном давлении CO в течение 35 мин при 75°C [35]. Механизм этой реакции неизвестен. Он требует 6-электронного восстановления технеция* и координацию трех молекул CO при низкой концентрации монооксида углерода. Чистота препарата, по-видимому, определяется очень большим разбавлением (обычно $< 10^{-6}$ М изотопа ^{99}Tc), что предотвращает образование полимеров, таких как TcO_2 – термодинамической «ловушки» при проведении восстановления в воде. Важность разбавления определяется также тем, что при больших концентрациях ^{99}Tc комплекс $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^{+}$ образуется с выходом менее 20%. Остальной технеций выделяется в виде черного осадка $\text{TcO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$. Итак, комплексы со связью Tc–CO могут быть получены. Заслуживают внимания исследования того, может ли быть увеличен их выход и можно ли использовать данный подход для синтеза новых смешанных CO- и H_2O -содержащих комплексов других переходных металлов.

Условия, описанные здесь, все же не подходят для рутинного синтеза, поскольку использование свободного монооксида углерода в сочетании с другими реагентами проблематично. Мы использовали другое соединение (восстановитель), которое было описано еще в начале развития химии соединений бора, но затем не нашло применения [36–39]. Весьма привлекателен в этом отношении боранокарбонат $[\text{H}_3\text{BCOOH}]^{-}$ (BC), поскольку он содержит связь B–H, необходимую для восстановления, и монооксид углерода, образующийся *in situ*. Карбоксилатный фрагмент в этом комплексном гидриде бора высвобождает CO при протонировании аналогично тому, как это происходит

* Исходное соединение – ион $[\text{}^{99}\text{TcO}_4]^{-}$. – Прим. перев.

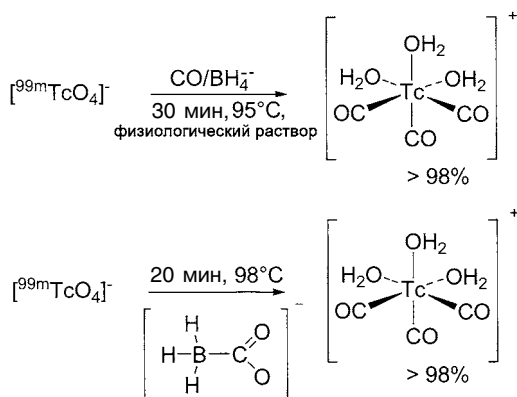


Схема 4.7. Различные пути образования комплекса $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

с другими металлокарбоксилатами. Комплексный гидрид ВС реагирует с $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ при 95°C в течение 20 мин и дает с количественным выходом комплекс $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ [40]. Удобство этого подхода обусловило производство набора реагентов для рутинного синтеза комплекса $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ в условиях клинического использования. Название этого набора – Изолинк® (Mallinckrodt Med. BV, Petten NL). Упомянутые реакции обобщены на схеме 4.7.

Комплекс $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ очень гидрофилен и элюируется в условиях ВЭЖХ почти с тем же временем удерживания, что и $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$. Этот комплекс устойчив как в щелочной, так и в кислой среде, если только воздействие не слишком длительное. После приготовления комплекса раствор имеет pH ~10 и должен быть нейтрализован фосфорной кислотой для достижения физиологических значений pH и образования буфера. В то же время происходит распад избытка восстановителя (ВС). Оба эти момента являются недостатками, требующими внимания при дальнейшем совершенствовании системы.

4.3.1. Координационная химия комплекса $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

При разработке новых радиофармацевтических препаратов необходимым требованием является то, чтобы остов радиоактивного комплекса мог связываться с различными лигандами с образованием устойчивых комплексов различного размера, отличающихся зарядом и гидрофильностью. Это позволит проводить исследования соотношений структура – активность, в которых биораспределение комплексов металлов можно исследовать как функцию их физико-химических свойств. С этой точки зрения возникает важный вопрос доступности таких структурных единиц комплексов, которые могут имитировать биологические структуры, например, соединения Tc(V) по отношению к стероидным гормонам [41–43].

Предваряя общее рассмотрение, следует сказать, что ядро «*fac*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ » способно к координации почти с любым донорным центром хелатора. Были

описаны многие примеры таких комплексов [44–48]. Несмотря на пространственную затрудненность, эти комплексы кинетически устойчивы и не разлагаются в течение времени, необходимого для обследования пациента. Лиганды, однако, сильно отличаются по способности замещать молекулы воды в комплексе $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$. Для мечения векторов или для синтеза модельных комплексов решающими факторами являются скорость замещения, так же как и минимально возможные концентрации хелатора (а, следовательно, и «наводящего на цель» агента), используемые для количественного образования комплекса. Если создание метки происходит медленно либо требует высокой концентрации лиганда, такой радиофармацевтический препарат может быть использован лишь после очистки, например, с помощью ВЭЖХ. Такую процедуру обычно нельзя выполнить в условиях больницы. Приемлемый верхний предел концентрации для рецепторных «наводящих на цель» биомолекул составляет 10^{-5} М. Концентрация изотопа ^{99m}Tc , получаемая в генераторе и используемая для приготовления радиофармацевтического препарата, находится обычно в пределах 10^{-6} – 10^{-7} М. Эти цифры означают, что биомолекула берется в 100-кратном избытке по отношению к изотопу технеция. Обычное количество радиофармацевтического препарата, вводимого пациенту, не приводит к насыщению рецепторов «холодным» материалом, поскольку теоретически доступно большее число рецепторов, для того чтобы препятствовать конкуренции «холодных» и «горячих» рецепторных лигандов. При таких низких концентрациях почти всегда требуется нагревание для достижения удовлетворительной скорости введения метки.

Мы установили, что многие тридентатные лиганды являются весьма эффективными и приводят к количественному образованию комплексов при концентрациях 10^{-6} М, а в некоторых случаях – вплоть до концентрации 10^{-7} М, т. е. при стехиометрических отношениях [49]. Недостатком тридентатных хелаторов является необходимость введения второй функциональной группы для ковалентного связывания с биомолекулой. Иногда такая функциональная группа уже может присутствовать в исходном лиганде, например, в нитрилотриуксусной кислоте, но «сшитые» хелаторы требуют отдельных методов для сочетания фрагментов. Для достижения селективности в процессе сочетания приходится использовать защитные группы, что в ряде случаев делает получение конечного лиганда многостадийным синтезом. Примеры тридентатных лигандов и низшие пороги концентраций для реакции введения метки при 98°C и проведении реакции в течение 30 мин приведены на схеме 4.8.

Высокая температура является следствием сильного разбавления компонентов реакции, однако наиболее активные лиганды реагируют количественно при концентрации 10^{-4} М при комнатной температуре. Такие условия проведения реакции вполне могут быть использованы, если связывание рецептора не является лимитирующим фактором. Наиболее эффективные лиганды – это гистидин, алифатические или смешанные ароматическо-алифатические триамины, а также метионин. Еще более эффективными хелаторами являются смешанные имидазолтионы в комбинации с борогидридом [50]. Введение связывающей функциональной группы в молекулу гистидина и ее конъюгация с биомолекулой представлены на схеме 4.9 [51].

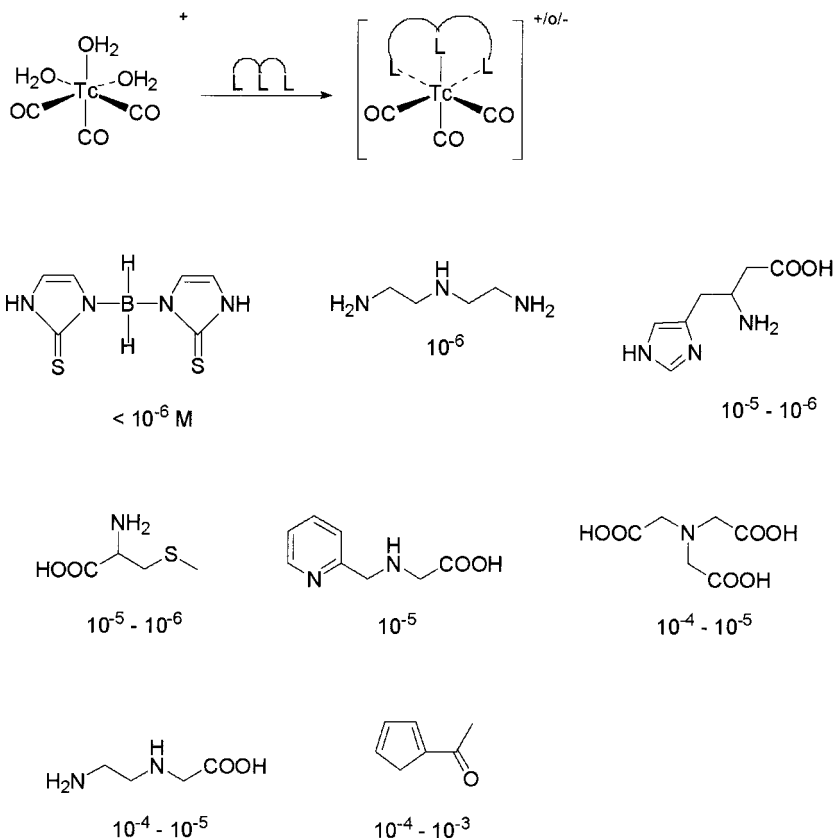
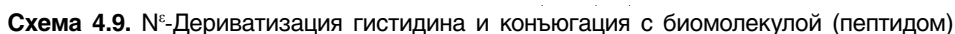
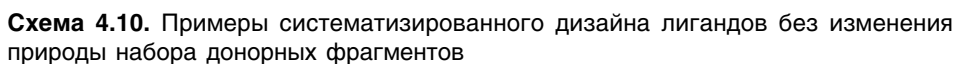


Схема 4.8. Типичные тридентатные лиганды (хелаторы) и низшие пороги концентрации, при которых комплекс образуется количественно в течение 30 мин при 98°C

Очевидно, получение хелаторов является многостадийным синтезом, однако, в случае производных гистидина эффективность и универсальность получаемого хелатора оправдывает сложность синтеза. Наиболее удобной, но не общепринятой, является защита гистидина собственно металлоорганическим фрагментом $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$. Использование металлоорганического компонента для защиты функциональных групп в молекулах органических соединений в литературе известна. Однако число таких примеров невелико, а сами примеры весьма специфичны. В комплексе $[\text{Re}(\text{his})(\text{CO})_3]$ (his – фрагмент гистидина), полученном одностадийным синтезом, легко идет алкилирование гистидина по положению N^{ϵ} . Таким путем в гистидин может быть введена, например, карбоксильная группа, необходимая для последующего сочетания с биомолекулой. Затем комплекс связывают с вектором, например, пептидом, а защитную группу $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ удаляют при низком значении pH в присутствии окислителя, такого как H_2O_2 . Конечно, биомолекула должна быть устойчивой в этих условиях. Что касается пептидов, то они не очень



Для того чтобы обойти относительно сложные пути модификации, одну из функциональных групп в тридентатных хелаторах можно непосредственно



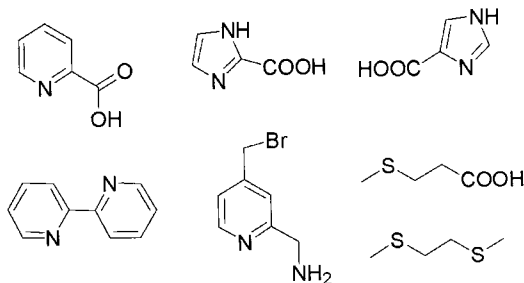


Схема 4.11. Высокоэффективные бидентатные хелаторы, вводимые в биомолекулы

использовать для сочетания. Это приведет, в общем, к бидентатным хелаторам. В качестве альтернативы в бидентатные хелаторы можно ввести функциональную группу, с помощью которой их можно сочетать с биомолекулами. Некоторые примеры бидентатных хелаторов приведены на схеме 4.11.

Природные аминокислоты, имеющие две функциональные группы, способные к координации (одна из них – в боковой цепи), могут сочетаться с N-концом пептидов. После этого они становятся потенциальными бидентатными хелаторами, которые могут быть мечены в низких концентрациях. Их можно сочетать также с C-концом посредством N^α-аминогруппы, однако комбинация функциональной группы в боковой цепи и карбоксилата не приводит к очень эффективным хелаторам, поскольку хелатный цикл в этом случае получается больше 6-членного. Лучше всего таким путем вступают в сочетание гистидин и метионин, давая бидентатные N,N- и N,S-лиганды. В случае нейтральных бидентатных лигандов оставшееся координационное положение на атоме металла занимает ион Cl⁻ по электростатическим причинам, так что общий заряд комплекса равен нулю. Природа бидентатного лиганда зачастую обуславливает липофильность этих комплексов. В противоположность лиганду, ион Cl⁻ склонен к медленному обмену, и потенциальные его конкуренты – координационные сайты биомолекул (например, белки плазмы) – могут связываться с металлом вместо него. Это может приводить к нежелательно долгому присутствию комплекса в крови и к высокому фоновому излучению в процессе визуализации. Лабильность иона Cl⁻ зависит от природы бидентатного хелатора, однако систематические исследования этого вопроса до сих пор не проводились [52]. Типичные хелаторы представлены на схеме 4.12.

В противоположность ионам галогена, бидентатные хелаторы совсем не участвуют в обменных процессах в физиологических условиях, что еще раз демонстрирует важность кинетической устойчивости. Многие из этих лигандов могут быть мечены при концентрации 10⁻⁵ М, но все же они менее эффективны, чем тридентатные хелаторы.

Монодентатные лиганды, такие как имидазол, тиоэфиры, пиридин, образуют комплексы со стехиометрией 1:1, 1:2 и 1:3. В присутствии монодентатных лигандов реакция замещения останавливается на образовании комплексов состава [^{99m}TcCl(L)₂(CO)₃], но продолжительное время проведения реакции или более высокие концентрации лиганда приводят также

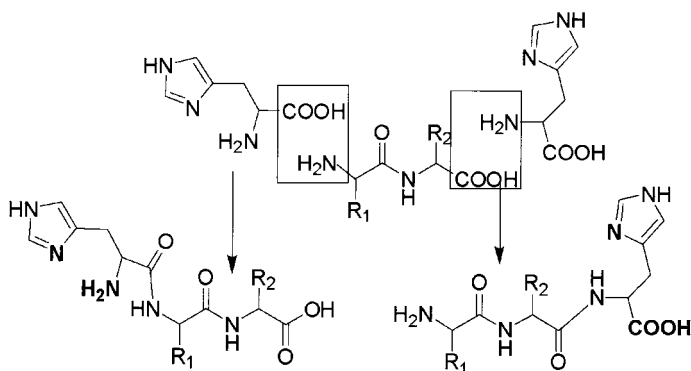


Схема 4.12. Дериватизация пептида гистидином по N- и C-концам с образованием бидентатного N,O- и N,N-лигандов соответственно

к комплексам $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{L})_3(\text{CO})_3]^+$. Лучше всего было бы модифицировать биомолекулы, используя комплекс с монодентатным лигандом. Однако, поскольку такой комплекс координируется с двумя другими молекулами, реакция часто приводит к кросс-связыванию за счет координации двух разных биомолекул. Это нежелательный аспект применения монодентатных лигандов, следовательно, такие лиганды не считаются хорошими для использования в радиофармацевтике.

Интересна одна особенность взаимодействия природных монодентатных лигандов с комплексом $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Имидазольная и тиоэфирная боковые цепи в гистидине и метионине соответственно представляют собой монодентатные координационные центры. Если несколько таких функциональных групп находятся поблизости в биомолекуле, эти монодентатные лиганды можно использовать для мультикоординации без хелатного эффекта. Эти группы, принадлежащие одной и той же биомолекуле, занимают более одного положения в координационной сфере металла, препятствуя тем самым описанному выше образованию кросс-связей. В такой ситуации можно представить себе прямое мечение биомолекулы, если соответствующие координационные сайты этой молекулы могут связываться с одним и тем же центром – металлом. Этот вариант встречается в меченых гистидином рекомбинантных антителах, в которых на C-конце содержится до пяти гистидиновых участков. Эти участки могут предоставить для координации имидазольные фрагменты, находящиеся в непосредственной близости друг от друга. Такие белки, действительно, могут быть мечены непосредственно. Хотя координационный сайт и лигандная сфера точно не известны (и, по-видимому, они построены не единственным возможным способом), тот факт, что не наблюдается кросс-связывания, подтверждает гипотезу о мультиплетной координации одной и той же биомолекулы без хелатного эффекта [53].

Другим примером является взаимодействие катиона $\text{fac-}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ с пуриновым основанием гуанозином (Г). При проведении реакции в макроскопическом масштабе этот катион связывается с Г через атом N7, давая комплекс $[\text{M}(\text{OH}_2)_2(9\text{-MeG})_2(\text{CO})_3]^+$ (9-MeG – 9-метилгуанин), в котором два

гуаниновых фрагмента расположены по отношению друг к другу либо по типу «голова к голове», либо по типу «голова к хвосту» [54]. Это также дает возможность прямого мечения Γ соответствующим предшественником, содержащим ^{99m}Tc . Атом N7 гуанина, однако, является не очень хорошим донором. Поэтому при низких концентрациях реагентов получается комплекс только с одной молекулой лиганда $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_2(\Gamma)(\text{CO})_3]^+$. Было установлено, что плазмидная ДНК денатурирует под действием небольших концентраций комплекса $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Это подтверждает сродство данного комплекса не только к свободному гуанозину, но также к гуанозину, входящему в состав ДНК. Цисплатин также вызывает денатурацию даже при меньших концентрациях, чем комплекс $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. На данном этапе можно заключить, что этот комплекс может образовывать как меж-, так и внутривязевые кросс-связи в ДНК, хотя точный характер соответствующих взаимодействий еще предстоит установить.

Хотя моно- и бидентатные лиганды имеют недостатки в плане приготовления новых радиофармацевтических препаратов, комбинация тех и других лигандов дала начало новой концепции смешанно-лигандных комплексов [55]. Реакция иона $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ с анионными бидентатными лигандами приводит к комплексам состава $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\eta^2\text{-L}^2)(\text{CO})_3]$. С атомом металла остается связанной одна молекула воды, причем комплексообразование со вторым бидентатным лигандом никогда не наблюдалось, вероятно, по стерическим причинам. Молекула воды может быть замещена на монодентатный лиганд, что приводит к нейтральным комплексам состава $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{L}^1)(\text{L}^2)(\text{CO})_3]$. В качестве лиганда L^1 могут выступать имидазол, пиридин, тиоэферы, изоцианиды и многие другие соединения, давая комплексы одного структурного типа, отличающиеся природой лиганда L^1 . Если L^2 – это бидентатный хелатор, присоединенный к «наводящей на цель» молекуле, то замена лиганда L^1 приведет к комплексам, различающимся своими характеристиками. Следовательно, могут быть проведены систематические исследования биораспределения комплексов. Такой подход называют $[2_B+1]$ -подходом; его иллюстрирует схема 4.13.

Комбинация моно- и бидентатного лиганда – это продуктивный подход, который может получить дальнейшее развитие. Предположим, что монодентатный лиганд присоединен к биомолекуле (ВМ), а варибельной частью является бидентатный хелатор. Тогда мы имеем дело с так называемым $[2+1_B]$ -подходом, особенно удобным, поскольку непосредственный предшественник для мечения – $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\eta^2\text{-L}^2)(\text{CO})_3]$ – может быть приготовлен прямо из имеющегося набора реактивов. Бидентатный лиганд добавляется к раствору карбонильного производного технеция, и в одну стадию образуется комплекс $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\eta^2\text{-L}^2)(\text{CO})_3]$. Затем этот предшественник взаимодействует с биомолекулой, несущей монодентатный лиганд, с образованием радиофармацевтического препарата. В $[2+1_B]$ -подходе заключен потенциал, который необходим для совершенствования фармацевтических препаратов. Если биомолекула, содержащая монодентатный лиганд, остается неизменной, то варьируется бидентатный лиганд, а многие подходящие бидентатные лиганды коммерчески доступны. Как было сказано в начале, монодентатные

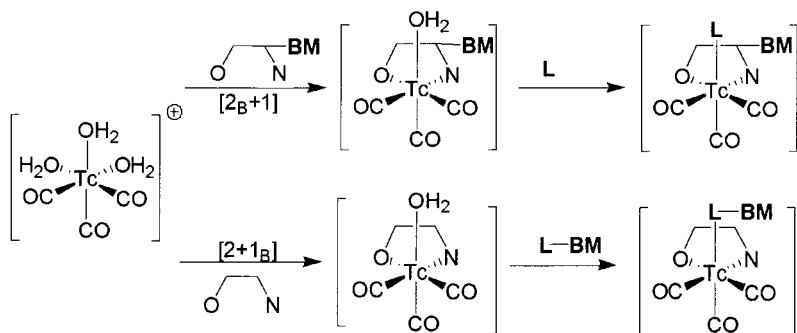


Схема 4.13. Смешанно-лигандные подходы $[2_B+1]$ и $[2+1_B]$ к синтезу комплексов на основе фрагмента $\text{fac}-[\text{}^{99(\text{m})}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

лиганды не очень эффективны в рассматриваемом аспекте, если иметь в виду концентрации, необходимые для образования комплекса и скорость образования этого комплекса. Следовательно, этот подход требует относительно высоких концентраций (биомолекул) для того, чтобы реакция прошла до конца. Исключение составляют, пожалуй, изоцианиды. По нашему опыту, изоцианиды – очень эффективные лиганды и образуют комплексы по схеме подхода $[2+1_B]$ при таких низких концентрациях, как 10^{-5} М. Изоцианиды могут содержать дополнительную функциональную группу, которая позволит сочетать их с биомолекулами. Изучены далеко не все возможные лиганды и в настоящее время остается еще много работы для того, чтобы найти наилучший вариант монодентатного лиганда.

Хотя описанный здесь смешанно-лигандный подход не изучен детально, все же он мог бы позволить комбинировать «наводящие на цель» молекулы двух разных типов с биологическими функциями разных видов. Два принципа биологического действия могут быть соединены воедино с помощью металлосодержащего ядра как центрального связывающего мостика. Одной из функций может быть, например, нацеливание на мишень, а второй – внутриклеточный захват. Разумеется, получение подобных конъюгатов возможно сочетанием двух органических молекул с помощью обычных ковалентных связей. Однако разделение таких связанных молекул в меньшей степени отразится на присущих им функциях.

4.3.2. Металлоорганическая химия $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ в водной среде

Из предыдущих разделов понятно, что для координации с фрагментом $\text{fac}-[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ можно использовать природные лиганды, такие как аминокислоты. Известна способность данных лигандов координироваться с металлом и выполнять при этом роль «щита» по отношению к металлу. Все же эти лиганды обладают достаточно большими размерами, и желательнее сконструировать лиганды меньшего размера, может быть, имитируя

при этом структурные особенности, характерные для природных соединений. Можно полагать, что одним из самых маленьких по размеру лигандов является анион $[\text{Cr}^-]$. Помимо размера, топология (координированного) Cr^- соответствует топологии бензольного кольца. Поэтому соответствующие комплексы технеция типа «фортепианной табуретки» в принципе могут заместить бензол в биологических молекулах, таких как фенилаланин, если исходить из предположения, что поверхность молекулы более значима, чем 3D-форма. Это потенциальное замещение можно продемонстрировать на различных примерах в биометаллоорганической химии и его примеры приведены в разных главах. Уменьшенный размер желателен для дизайна лигандов для меченых рецепторов ЦНС и для имитации бензольных колец при мечении, например стероидных гормонов и цитотоксических агентов. Поскольку рассматриваемые рецептор-связывающие молекулы важны для современной диагностики или терапии, получение соответствующих радиофармацевтических препаратов явилось мощным стимулом для разработки стратегий синтеза комплексов с лигандом Cr^- . Из классической биометаллоорганической химии многое известно о взаимосвязи структура – активность, и можно показать, что для эстрадиола, модифицированного с помощью $[\text{CrRe}(\text{CO})_3]$ в некоторой степени снижается эффективность относительного сродства к связыванию РВА по сравнению с природным эстадиолом, но все же этот модифицированный препарат остается достаточно эффективным для того, чтобы исследования соответствующего аналога, содержащего $^{99\text{m}}\text{Tc}$, заслуживали внимания [56, 57].

Было сделано много попыток использования лиганда Cr^- в химии радиофармацевтических препаратов. Лимитирующим фактором здесь является необходимость проведения синтеза соответствующих комплексов из $[\text{Cr}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ в водной среде. Циклопентадиенил-анион – классический лиганд в металлоорганической химии – и вода исключают друг друга, поскольку Cr^- легко протонируется и быстро претерпевает ди- или полимеризацию. Высокое значение кислотности среды (pK_a около 14*) эффективно препятствует существованию депротонированной формы – Cr^- , несмотря на то, что ее образование выгодно. Многие попытки провести в наших исследованиях реакцию комплекса $[\text{Cr}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ с CrN или с Cr^*N оказались неудачными. В этих опытах были зафиксированы лишь совсем небольшие количества $[(\text{Cr})^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$. Венцель и др. в начале 1990-х гг. попытались осуществить реакцию двойного переноса лиганда (ДПЛ) и доказали возможность синтеза комплекса $[(\text{Cr})^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$. В некоторых предварительных биологических экспериментах была также показана возможность многостороннего использования этого комплекса в радиофармацевтике [58, 59]. Реакция ДПЛ Венцеля представляет собой реакцию в расплаве. Дальнейшее развитие она получила в работах Катценелленбогена и др. [60, 61]. Эти работы основывались на ДПЛ по Венцелю,

* Число 14 соответствует отрицательному логарифму ионного произведения воды. На самом деле pK_a воды и циклопентадиена в водной среде близки и составляют 15,7 и 15,5 соответственно. – *Прим. перев.*

но реакции проводились в CH_3OH или других органических растворителях, где серьезным недостатком были довольно жесткие условия. Комплексы типа «фортепианной табуретки» в работах Катценелленбогена, присоединенные к биомолекулам, вновь подтвердили многосторонность использования комплекса $[(\text{Cr})^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ для целей радиофармацевтики [62, 63].

Протонированная форма – циклопентадиен (CrH) – является слабым лигандом, поскольку образование из него η^5 -координированного с металлом лиганда требует предварительного связывания металла с алкеном (циклопентадиеном), а алкены – плохие конкуренты в случае большого количества растворителя, такого как вода, для всех известных предшественников комплексов $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Отрицательный заряд лиганда должен способствовать координации с металлом по электростатическим причинам. Функциональная группа, связанная с Cr -кольцом, может помочь координации CrH с металлом и индуцировать склонность лиганда к координации по η^5 -типу. Основываясь на этом, циклопентадиенил-анион был модифицирован введением ацетильной группы с образованием хорошо известного ацетилциклопентадиена (ACr). Кислотность ACr возросла на шесть порядков (по сравнению с кислотностью CrH), и для него $\text{p}K_{\text{a}} \approx 8,4$ [64]. В депротонированной или в протонированной форме этот лиганд достаточно устойчив в водном растворе, и его можно рассматривать как лиганд вернеровского типа. Ацетилциклопентадиен (ACr) непосредственно реагирует в воде с комплексом $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, давая соответствующий комплекс типа «фортепианной табуретки» – $[\text{ACr}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Различные подходы к синтезу циклопентадиенильных комплексов показаны на схеме 4.14.

Выход комплекса в случае макроскопических количеств $[\text{}^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ составляет 20–40%. Причина, по которой выход отличается от количественного, не связана с неустойчивостью лиганда ACr . Она вызвана конкурирующей побочной реакцией образования продукта гидролиза: часть исходного вещества превращается в кластер $[\text{}^{99}\text{Tc}(\mu^3\text{-OH})(\text{CO})_3]_4$. Поскольку соответствующая реакция с изотопом $^{99\text{m}}\text{Tc}$ протекает при сильном разбавлении, образование тетраядерного кластера маловероятно и, действительно, не наблюдается. Как следствие, реакция с $^{99\text{m}}\text{Tc}$ протекает с количественным выходом в течение 30 мин при 90°C и концентрации лиганда в интервале 1–0,1 мМ, в зависимости от типа циклопентадиенильного производного [66].

Общий подход к синтезу ACr предоставляет удобную возможность присоединения тем же способом и биомолекул. Реакция CrNa со сложным эфиром приводит к кетонной группе, которая связывает Cr с биомолекулой. Таким путем мы получили лиганд на рецептор ЦНС, такой как лиганд серотонергического рецептора WAY. Циклопентадиенильные производные могут быть мечены с образованием биомолекулы, модифицированной фрагментом типа «фортепианной табуретки». Была подобрана такая длина спейсера, при которой сродство к рецептору полностью сохранилось, и соответствующие радиофармацевтические препараты сейчас находятся в стадии биологических испытаний. Один из меченых лигандов ЦНС-рецептора представлен на схеме 4.15. Помимо исследований комплексов $^{99\text{m}}\text{Tc}$ типа «фортепианной

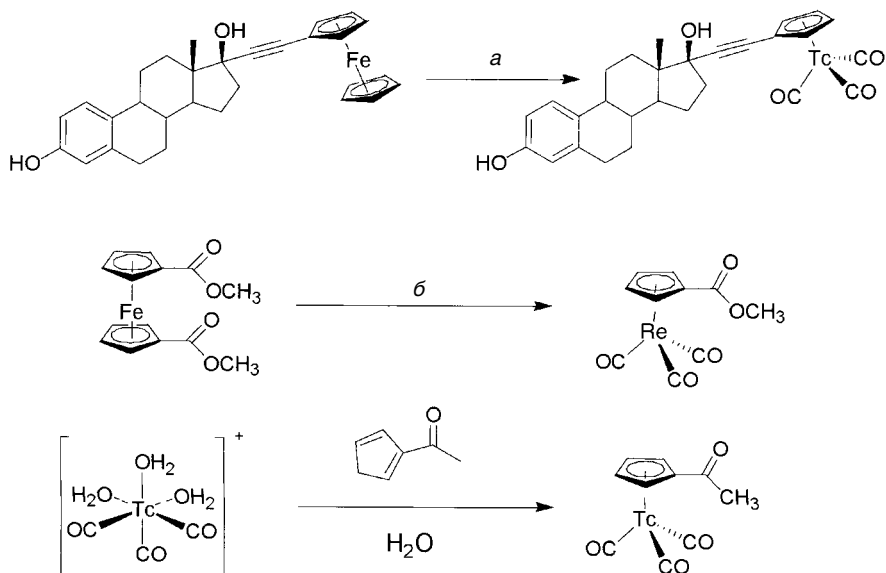


Схема 4.14. Различные подходы к синтезу комплексов типа «фортепианной табуретки»: *a* – TcO_4^- , $[\text{MnBr}(\text{CO})_5]/\text{ТГФ}$, 150°C [59] и *б* – KReO_4 , $[\text{Cr}(\text{CO})_6]/\text{CrCl}_3$, CH_3OH , 160°C , 1 ч [65]

табуретки», описан синтез соответствующих комплексов ^{188}Re в соответствии с методом ДПЛ [67].

Модификация Cp позволяет использовать этот классический для металлоорганической химии лиганд в водной среде. Поскольку в литературе, посвященной металлоорганической химии, описаны многие цикlopentadiенильные производные, кандидатами для дальнейшего развития химии цикlopentadiенильных соединений в плане радиофармацевтического использования могут быть многие соединения. Рассмотрение важности Cp -производных, подтвержденной уже существующими примерами, раскрывает преимущества этих производных. Следует подчеркнуть, что цикlopentadiенильные производные заслуживают широких и более тщательных исследований.

Недавно был описан альтернативный подход к введению комплексов $^{99\text{m}}\text{Tc}$ типа «фортепианной табуретки» в биомолекулы. Как уже было показано Венцелем, а также Катценелленбогеном и др., помимо Cp -фрагмента, присоединенного к биомолекуле, в качестве источника Cp можно использовать ферроцен. Трудность состоит в расщеплении очень стабильного фрагмента « $[\text{CpFe}]^+$ » в исходном производном ферроцена. Все же было показано, что катион $[\text{Re}(\text{CO})_6]^+$ в горячем ДМСО (возможно, присутствующий в виде $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{ДМСО})_3]^+$), может расщеплять ферроцен и давать комплексы $[(\text{R-Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$ (где R – это, например, фрагмент эстрадиола), приводя тем самым к соответствующему соединению рения. Было также найдено, что та же процедура в смеси ДМСО – вода при 98°C приводит к технициевому аналогу – радиофармацевтическому препарату на основе изотопа $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [68]. Понятно, что ДМСО не является «био-

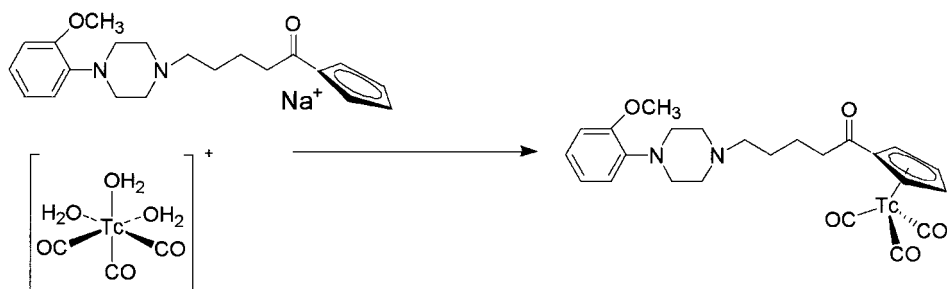


Схема 4.15. Комплекс $^{99\text{m}}\text{Tc}$ типа «фортепианной табуретки», конъюгированный с лигандом рецептора ЦНС

совместимым» растворителем. Он нужен для растворения высоколипофильных производных эстрадиола и вряд ли играет активную роль в механизме реакции. Для менее липофильных векторов этот подход мог бы служить хорошей альтернативой первой стратегии (схема 4.16).

Другими лигандами для металлоорганических соединений, которые реагируют с комплексом $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ в водном растворе, являются изоцианиды. Это удивительно эффективные лиганды, которые могут образовывать моно-, ди- и тризамещенные комплексы [29]. О них шла речь при обсуждении смешанно-лигандного подхода. Применение таких потенциально удобных для использования в биометаллоорганической химии лигандов, как алкены, диены, арены или другие π -лиганды, до сих пор не описано. Причиной этого может быть инертность этих лигандов по отношению к комплексу $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ либо то, что подобные исследования до сих пор просто не проводились. Другими крайне интересными лигандами являются *нидо*-карбораны типа $[\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{12}]^-$ и их производные [69]. Валлиан и др. показали недавно, что эти аналоги цикlopentadiенил-аниона реагируют в водной среде с образованием соответствующих комплексов технеция – $[(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})\text{Tc}(\text{CO})_3]^-$ [70, 71]. Эти авторы также ввели в карборановый остов функциональные группы, которые позволяют гладко проводить конъюгацию с биомолекулами [72]. Полученные комплексы абсолютно устойчивы в физиологических условиях. Можно предсказать,

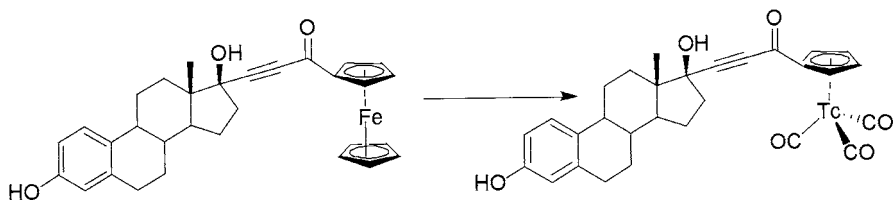


Схема 4.16. Синтез комплекса $^{99\text{m}}\text{Tc}$ типа «фортепианной табуретки» исходя из ферроценового конъюгата [68]

что радиофармацевтические препараты этого класса в будущем станут очень важны не только в биометаллоорганической радиофармацевтике, но также в боронейтронозахватной терапии.

4.4. Комбинации комплекса $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ с векторами

Несмотря на многие преимущества комплекса $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ для разработки радиофармацевтических препаратов, химия комплексов с «наводящими на цель» векторами находится лишь в самом начале своего развития, но польза этих комплексов уже признана [73]. Причины этого недавно достаточно подробно рассмотрены в [7, 74]. Одна из главных причин – новизна подхода. Надежные наборы были доступны для использования лишь в течение одного года. Новый метод требует времени для признания и оптимизации. Следует подчеркнуть, что развитие радиофармацевтики с использованием структурного блока $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ не рассматривается как единственное решение, но, скорее, как возможное дополнение этой области еще одним универсальным подходом. В нижеследующем тексте, не претендующем на полноту охвата работ, будут приведены результаты некоторых недавних исследований по мечению «наводящих на цель» векторов фрагментом *fac*- $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

Во всем мире активно изучается большое число белков, в особенности нейротензин, бомбесин [75, 76] и октреотид. Дериватизация нейротензина была осуществлена в соответствии с ранее описанными стратегиями. Оригинальная работа с бидентатным лигандом (донорными центрами в котором были гистидин и терминальный атом N другого фрагмента) дала очень хороший выход при мечении и стабильность продукта. Недостатком была высокая аккумуляция в нецелевых органах, возможно благодаря процессу обмена хлорида с конкурирующими группами в белках либо относительно высокой липофильности. *In vivo* проблемой оказалась также устойчивость белка, но эту проблему можно разрешить его химической стабилизацией. В более поздней работе был использован тридентатный гистидиновый лиганд, в котором гистидиновые фрагменты соединены путем алкилирования α -аминогруппы. Это улучшило характеристики мечения, стабильность и отношение показателя опухоль/неопухоль. В настоящее время некоторые производные нейротензина проходят доклинические испытания.

Аналогично, использование фрагмента *fac*- $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ было изучено на бомбесине [77–79], октреотиде и его производных [80] и на поверхностно-активных белках [81]. Если не принимать во внимание то, что при этом были выбраны не самые оптимальные хелаторы, исследования устойчивости и связывания показали, что поведение лиганда, соединенного с вектором, сопоставимо с поведением свободного лиганда. Отсюда следует, что исследования на модельных лигандах полезны и могут быть использованы для экстраполяции условий комплексообразования с векторами.

Исследования *in vivo* и *in vitro* были проведены с дериватизированной глюкозой [82], эстрадиолом [83–85], фолиевой кислотой [86], жирными кислотами

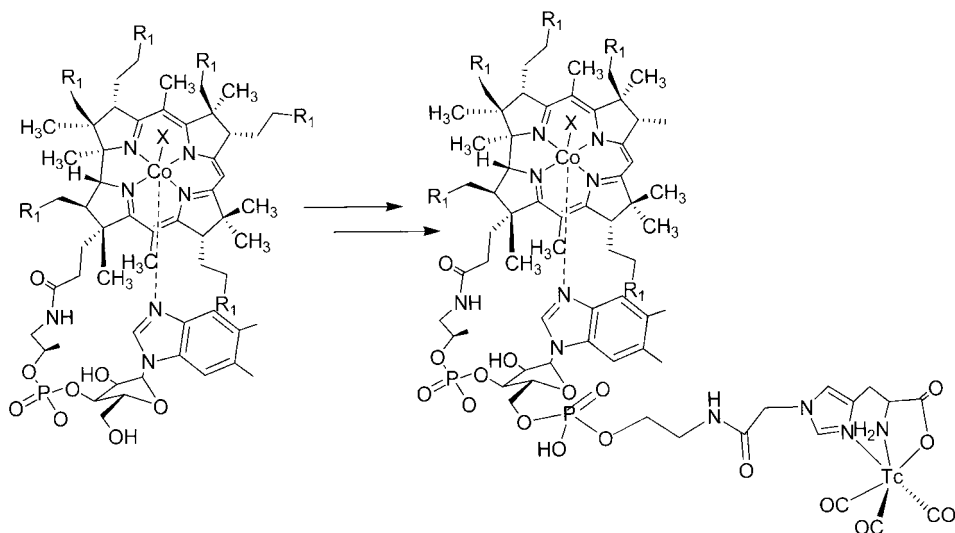


Схема 4.17. Модификация витамина B_{12} тридентатным хелатором по 5'-ОН-группе

[87], рекомбинантным одноцепочечным фрагментом scFv [88] и многими другими биомолекулами [89, 90]. Поскольку химия соответствующего мечения заимствована из химии модельных соединений, биологические результаты здесь обсуждаться не будут. Читателю предлагается ознакомиться с ними в соответствующей литературе.

Из наших собственных проектов мы хотели бы представить результаты последних исследований по витамину B_{12} . Витамин B_{12} является весьма привлекательным объектом, поскольку жизнедеятельность любых клеток человеческого организма вообще и быстро пролиферирующих раковых клеток, в особенности, сильно зависит от этого витамина. В последнее время в литературе появились несколько статей о мечении B_{12} изотопом ^{99m}Tc , и меченый витамин является предметом многих патентов. Мы изучили витамин B_{12} , используя подход карбонильных комплексов, проводя дериватизацию B_{12} по 5'-ОН-группе остатка рибозы. Синтетический подход к введению гистидина в соответствующую функциональную группу изображен на схеме 4.17.

Тридентатный гистидиновый лиганд оказался в данном случае вполне уместным, поскольку это мощный лиганд, требующий лишь небольших концентраций для образования комплекса. Витамин B_{12} чувствителен к повышенной температуре, следовательно хелатор должен улавливать катион $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ при температуре ниже 50°C . Производные метятся количественно при 50°C и концентрациях между 10^{-4} М и 10^{-5} М в течение 30 мин. При этом не наблюдается какое-либо неспецифическое мечение, а радиофармацевтический препарат устойчив в плазме крови. Оба соединения ферментно активны и связываются с внутренним фактором IF. Предварительные исследования *in vivo* на мышах показали выраженное поглощение препарата опухолью, но также высокую степень связывания с печенью и/или почками –

явление, наблюдавшееся ранее для других радиофармацевтических препаратов на основе витамина В₁₂. Все же, это хорошая отправная точка в исследованиях соотношений структура – активность. Налицо хорошее сродство к рецептору, правда биораспределение неудовлетворительно. Интересным представляется выяснение влияния на биораспределение небольших либо значительных изменений заряда или донорных атомов хелатора.

Итак, здесь была рассмотрена химия структурного фрагмента $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. В радиофармацевтике основополагающей идеей является потенциальная возможность использования для радиотерапевтических целей ренийевых (^{188}Re) аналогов технециевых (^{99m}Tc) радиофармацевтических препаратов. Однако, несмотря на то что технеций и рений принадлежат к одной и той же группе периодической системы, для этих двух элементов наблюдаются явные различия в свойствах. Особенно отличается поведение этих элементов в окислительно-восстановительных процессах. Рений окисляется гораздо труднее и реакции его соединений протекают в 10–100 раз медленнее, чем реакции соединений технеция. Поэтому синтезировать комплекс $[\text{Re}(\text{OH})_2)_3(\text{CO})_3]^+$, используя набор реагентов, аналогичный набору для синтеза технециевого (^{99m}Tc) комплекса, нельзя. Здесь нужно было найти совершенно иные условия, как это уже описано [91]. Выходы не столь хороши и воспроизводимы, как в случае ^{99m}Tc , но комплекс $[\text{Re}(\text{OH})_2)_3(\text{CO})_3]^+$, по крайней мере, доступен. Систематические исследования реакционной способности и химии меченых соединений встречаются не столь часто, как в случае ^{99m}Tc , что подтверждает необходимость использования в случае комплексов рения более жестких условий проведения реакций для достижения количественного меченного биомолекулы или модельного лиганда. Ясно, что для будущего развития радиофармацевтических препаратов остается нерешенной сложная задача нахождения такого способа синтеза комплекса $[\text{Re}(\text{OH})_2)_3(\text{CO})_3]^+$, который можно выполнять на основе рутинной процедуры. Ожидается, что такой успешный синтез должен протекать по реакции с механизмом, совершенно отличным от того, который реализуется в случае соединений ^{99m}Tc . Это может быть стимулом для инновационных работ химиков-неоргаников.

4.5. Перспективы

Биометаллоорганическая химия находится на ранней стадии своего развития в плане радиофармацевтического использования. Однако у металлоорганических соединений есть мощный потенциал для применения в этой области науки. Связанные с этим трудности получения и оптимизации новых предшественников препаратов или самих комплексов компенсируются разнообразием фундаментальной химии, которая развивается в результате поисков в данном направлении. Биометаллоорганическая химия не должна быть конечной самоцелью пользователя, но должна стимулировать химиков, проводящих базовые исследования, продолжить работу или использовать новые стратегии или соединения в своих исследованиях. Вещество, как мы здесь видели, может реагировать по нескольким направлениям, и его реакционную способность не следует ограничивать

какой-то одной определенной целью. Конечно, возникает вопрос, какие другие структурные фрагменты могут быть целью поиска. Один из ближайших потенциальных фрагментов уже исследуется. Замещение СО на изоэлектронный ему лиганд NO^+ значительно изменит электронные свойства металла и приведет к новой химии в водной среде, интересной как для радиофармацевтики, так и для других областей знания. Так, был получен комплекс $[\text{}^{99(\text{m})}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_2(\text{NO})]^{2+}$ и описаны некоторые его свойства [92]. Было бы интересно исследовать возможность использования этого комплекса для мечения биомолекул. Основываясь на структуре некоторых других металлоорганических аква-ионов (схема 4.4), можно ожидать, что гипотетический комплекс $[(\text{C}_6\text{H}_6)^{99(\text{m})}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3]^+$ может служить предшественником новых препаратов, либо другое соединение – $[(\text{C}_6\text{H}_6)^{99(\text{m})}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ – может быть комплексом, в котором к ареновому лиганду присоединена биомолекула. Последнее соединение было описано Фишером и др. как устойчивое в водной среде [93]; открытым остается вопрос о том, как это соединение может быть получено в водной среде. В биометаллоорганической химии широко используются аллильные комплексы молибдена. Можно ли также использовать аллильную группу для целей радиофармацевтики? Помимо всех этих интересных идей, химик-энтузиаст не должен забывать, что конечная цель исследований – довести, наконец, перспективное соединение до торговой сети ради сохранения здоровья людей. Здесь предстоит преодолеть длинный путь, на котором потрубуется тесное сотрудничество ученых, работающих в разных областях. Исследования в области биометаллоорганической химии трудны уже потому, что язык химиков-металлооргаников отличается от языка биолога или врача. В то же время для молодых студентов весьма привлекательной должна быть активная работа в кругу большого числа ученых. Такая работа дает возможность студенту, перенимая опыт этих ученых, достигнуть общей цели.

Благодарности

Автор хочет выразить благодарность своим коллегам в прошлом и настоящем, которые с энтузиазмом выполнили большую часть работы, представленной в данной главе, а именно: Сильвии Уисс, Паскалю Хафлигеру, Джекионгу Паку, Сюзанне Кунце, Полу Бенни, Фабио Цоби, Дейву ван Ставерену, Стефану Мундвилеру, Бернхарду Спинглеру, Никосу Агорастосу, Кирстин Ортнер, Йону Бернаруду, Иоахиму Вальду и Роджеру Шибли. Финансовая поддержка была получена от компаний Mallinckrodt Med. BV, Petten NL, Solidago AG (Швейцария) и от Университета Цюриха.

Литература

1. R. E. Weiner, M. L. Thakur, Appl. Radiat. Isot. **2002**, 57, 749–763.
2. H. F. Kung, M. P. Kung, S. R. Choi, Semin. Nucl. Med. **2003**, 33, 2–13.
3. A. Alavi, J. W. Kung, H. M. Zhuang, Semin. Nucl. Med. **2004**, 34, 56–69.
4. S. S. Jurisson, J. D. Lydon, Chem. Rev. **1999**, 99, 2205–2218.

5. J. R. Dilworth, S. J. Parrott, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 43–55.
6. R. C. Mease, C. Lambert, *Semin. Nucl. Med.* **2001**, 31, 278–285.
7. M. Welch, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* **2003**, 30, 1302–1304.
8. G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, R. Alberto, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 600, 23–36.
9. M. J. Abrams, A. Davison, A. G. Jones, C. E. Costello, H. Pang, *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 2798–2800.
10. D. W. Wester, J. R. Coveney, D. L. Mosco, M. S. Robbins, R. T. Dean, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3284–3290.
11. J. Beldas, J. Bonnyman, P. M. Pojer, G. A. Williams, M. F. Mackay, *J. Chem. Soc. Dalton* **1982**, 451–455.
12. H. Braband, U. Abram, *Chem. Commun.* **2003**, 2436–2437.
13. H. Braband, T. I. Zahn, U. Abram, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 6160–6162.
14. U. Koelle, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 135, 623–650.
15. K. Severin, R. Bergs, W. Beck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1637–1654.
16. R. H. Fish, G. Jaouen, *Organometallics* **2003**, 22, 2166–2177.
17. Y. Hung, W. J. Kung, H. Taube, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 457–463.
18. M. Stebler-Rothlisberg, W. Hummel, P. A. Pittet, H. B. Burgi, A. Ludi, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 1358–1363.
19. L. O. Spreer, I. Shah, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 4025–4027.
20. U. Koelle, B. Fuss, *Chem. Ber.-Recl.* **1984**, 117, 753–762.
21. A. Nutton, P. M. Bailey, P. M. Maitlis, *J. Chem. Soc. Dalton* **1981**, 1997–2002.
22. U. Koelle, W. Kläui, *Z. Naturforsch. B.* **1991**, 46, 75–83.
23. U. Thewalt, H. P. Klein, *J. Organomet. Chem.* **1980**, 194, 297–307.
24. U. Koelle, G. Flunkert, R. Gorissen, M. U. Schmidt, U. Englert, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1992**, 31, 440–442.
25. A. J. Gleichmann, J. M. Wolff, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 1549–1554.
26. U. Mazzi, A. Bismondo, N. Kotsev, D. A. Clemente, *J. Organomet. Chem.* **1977**, 135, 177–182.
27. G. Bandoli, D. A. Clemente, U. Mazzi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1978**, 373–380.
28. R. Alberto, W. A. Herrmann, P. Kiprof, F. Baumgärtner, *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 895–899.
29. R. Alberto, R. Schibli, P. A. Schubiger, *Polyhedron* **1996**, 15, 1079–1089.
30. R. Alberto, R. Schibli, U. Abram, R. Hubener, H. Berke, T. A. Kaden, P. A. Schubiger, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1996**, 1291–19\292.
31. A. Egli, K. Hargetschweiler, R. Alberto, U. Abram, R. Schibli, R. Hedinger, V. Gramlich, R. Kissner, P. A. Schubiger, *Organometallics* **1997**, 16, 1833–1840.
32. M. Dyszlewski, H. M. Blake, J. L. Dahlheimer, C. M. Pica, D. Piwnica-Dorms, *Molecular Imaging* **2002**, 1, 24–25.
33. N. Aebischer, R. Schibli, R. Alberto, A. E. Merbach, *Angew. Chem.* **2000**, 39, 254–256.
34. X. Y. Wang, Y. Wang, X. Q. Liu, T. W. Chu, S. W. Hu, X. H. Wei, B. L. Liu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 456–460.
35. R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, U. Abram, T. A. Kaden, P. A. Schubiger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7987–7988.
36. L. J. Malone, M. R. Manley, *Inorg. Chem.* **1967**, 6, 2260–2262.
37. L. J. Malone, R. W. Parry, *Inorg. Chem.* **1967**, 6, 817–822.
38. J. C. Carter, R. W. Parry, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 2354–2358.
39. E. Mayer, *Monatsh. Chem.* **1971**, 102, 940–945.

40. R. Alberto, K. Ortner, N. Wheatley, R. Schibli, A. P. Schubiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3135–3136.
41. D. Y. Chi, J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7045–7046.
42. D. Y. Chi, J. P. Oneil, C. J. Anderson, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 928–937.
43. R. K. Hom, J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6290–6297.
44. R. Alberto, R. Schibli, R. Weibel, U. Abram, A. P. Schubiger, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 192, 901–919.
45. R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, U. Abram, P. A. Schubiger, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 345–351.
46. H. J. Pietzsch, A. Gupta, M. Reisgys, R. Alberto, B. Johannsen, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 3, 414–424.
47. S. R. Banerjee, M. K. Levadala, N. Lazarova, L. H. Wei, J. F. Valliant, K. A. Stephenson, J. W. Babich, K. P. Maresca, J. Zubieta, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 6417–6425.
48. L. H. Wei, S. R. Banerjee, M. K. Levadala, J. Babich, J. Zubieta, *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, 6, 1099–1103.
49. R. Alberto, R. Schibli, A. P. Schubiger, U. Abram, H. J. Piersch, B. Johannsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2076–6077.
50. R. Garcia, A. Paulo, A. Dominsos, I. Santos, K. Ortner, R. Alberto, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11240–11241.
51. J. K. Pak, P. Benny, B. Spingler, K. Ortner, R. Alberto, *Chem-Eur. J.* **2003**, 9, 2053–2061.
52. S. Seifert, J.-U. Künstler, A. Gupta, H. Funke, T. Reich, C. Hennig, A. Rossberg, H. J. Pietzsch, R. Alberto, *Radiochim. Acta* **2000**, 3–4, 229–245.
53. R. Waibel, R. Stichelberger, R. Alberto, P. A. Schubiger, K. A. Chester, R. H. J. Begent, *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, 27, S86.
54. F. Zobi, B. Spingler, T. Fox, R. Alberto, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 2818–2820.
55. S. Mundwiler, M. Kündig, K. Ortner, R. Alberto, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 195–202.
56. S. Top, H. E. Hafa, A. Vessières, J. Quivy, J. Vaissermann, D. D. Hughes, M. J. McGlinchey, J.-P. Mornon, E. Thoreay, G. Jaouen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8372–8380.
57. G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, P. Pigeon, G. Leclercq, I. Laios, *Chem. Comm.* **2001**, 383–384.
58. M. Wenzel, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1992**, 31, 641–650.
59. M. Wenzel, C. Klinge, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1994**, 34, 981–987.
60. R. R. Cesari, C. Tamagnan, R. M. Baldwin, S. S. Zoghbi, R. B. Innis, J. A. Katzenellenbogen, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1999**, 42, 5150–5152.
61. R. R. Cesari, G. Tamagnan, R. M. Baldwin, S. S. Zoghbi, R. B. Innis, N. S. Kula-R, J. Baldessarini, J. A. Katzenellenbogen, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 29–39.
62. T. W. Spradau, W. B. Edwards, C. J. Anderson, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, *Nucl. Med. Biol.* **1999**, 26, 1–7.
63. E. S. Mull, V. J. Sattigeri, A. L. Rodriguez, J. A. Katzenellenbogen, *Bioorgan. Med. Chem.* **2002**, 10, 1381–1398.
64. J. Wald, R. Alberto, K. Ortner, L. Candreia, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, 40, 3062–2066.
65. T. W. Spradau, J. A. Katzenellenbogen, *Organometallics* **1998**, 17, 2009–2017.
66. J. Bernard, K. Ortner, B. Spingler, H. J. Pietzsch, R. Alberto, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 1014–1022.

67. T. Uehara, M. Koike, H. Nakata, S. Miyamoto, S. Motoishi, K. Hashimoto, N. Oku, M. Nakayama, Y. Arano, Nucl. Med. Biol. **2003**, 30, 327–334.
68. S. Masi, S. Top, L. Boubekeur, G. Jouen, S. Mundwiler, B. Spingler, R. Alberto, Eur. J. Inorg. Chem. **2004**, in press.
69. P. Morel, P. Schaffer, J. F. Walliant, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 25–30.
70. J. F. Wallant, P. Morel, P. Schaffer, J. H. Kaldis, Inorg. Chem. **2002**, 41, 628–630.
71. P. Schaffer, J. F. Brutten, A. Davison, A. G. Jones, J. E. Valliant, J. Organomet. Chem. **2003**, 680, 323–328.
72. J. F. Valliant, O. O. Sogbein, P. Morel, P. Schaffer, K. J. Guenther, A. D. Bain, Inorg. Chem. **2002**, 41, 2731–2737.
73. A. P. Sattelberger, R. W. Atcher, Nat. Biotechnol. **1999**, 17, 849–850.
74. R. Alberto, Eur. J. Nucl. Med. Mol. I. **2003**, 30, 1299–1302.
75. R. La Bella, E. Garcia-Garayoa, M. Bahler, P. Blauenstein, R. Schibli, P. Conrath, D. Tourwe, P. A. Schubiger, Bioconjugate Chem. **2002**, 13, 599–604.
76. S. R. Karra, R. Schibli, H. Gali, K. V. Katti, T. J. Hoffman, C. Higginbotham, G. L. Sieckman, W. A. Volkert, Bioconjugate Chem. **1999**, 10, 254–260.
77. J. Smith, S. Perez, P. A. Rushing, G. P. Smith, J. Gibbs, Peptides **1997**, 18, 1465–1467.
78. C. J. Smith, G. L. Sieckman, N. K. Owen, D. L. Hayes, D. Mazuru, W. A. Volkert, T. J. Hoffman, Anticancer Res. **2003**, 23, 63–70.
79. R. La Bella, E. Garcia-Garayoa, M. Langer, P. Blauenstein, A. G. Beck-Sickinger, P. A. Schubiger, Nucl. Med. Biol. **2002**, 29, 553–560.
80. J. Du, J. Hiltunen, M. Marquez, S. Nilsson, A. R. Holmberg, Appl. Radiat. Isotopes **2001**, 55, 181–187.
81. A. Amann, C. Decristoforo, I. Ott, M. Wenger, D. Bader, R. Alberto, G. Putz, Nucl. Med. Biol. **2001**, 28, 243–250.
82. J. Petrig, R. Schibli, C. Dumas, R. Alberto, P. A. Schubiger, Chem-Eur. J. **2001**, 7, 1868–1873.
83. M. Reisgys, F. Wust, R. Alberto, R. Schibli, P. A. Schubiger, H. J. Pietzsch, H. Spies, B. Johansen, Bioorg. Med. Chem. Lett. **1997**, 7, 2243–2246.
84. L. G. Luyt, H. M. Bigott, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, Bioorgan. Med. Chem. **2003**, 11, 4977–4989.
85. J. B. Arterburn, C. Corona, K. V. Rao, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, J. Org. Chem. **2003**, 68, 7063–7070.
86. D. P. Trump, C. J. Mathias, Z. F. Yang, P. S. W. Low, M. Marmion, M. A. Green, Nucl. Med. Biol. **2002**, 29, 569–573.
87. C. M. Jung, W. Kraus, P. Leibnitz, H. J. Pietzsch, J. Kropp, H. Spies, Eur. J. Inorg. Chem. **2002**, 1219–1225.
88. J. Kriangkum, B. W. Xu, L. P. Nagata, R. E. Fulton, M. R. Suresh, Biomol. Eng. **2001**, 18, 31–40.
89. J. F. Tait, D. S. Brown, D. F. Gibson, F. G. Blankenbert, H. W. Strauss, Bioconjugate Chem. **2000**, 11, 918–925.
90. S. Hamilton, J. Odili, O. Gundogdu, G. D. Wilson, J. M. Kupsch, Hybridoma Hybridom. **2001**, 20, 351–360.
91. R. Schibli, R. Schwarzbach, R. Alberto, K. Ortner, H. Schmalle, C. Dumas, A. Egli, P. A. Schubiger, Bioconjugate Chem. **2002**, 13, 750–756.
92. D. Rattat, P. A. Schubiger, H. G. Berke, H. Schmalle, R. Alberto, Cancer Biother. Radio. **2001**, 16, 339–343.
93. E. O. Fischer, M. W. Schmidt, Chem. Ber. **1969**, 102, 1954–1960.

5 Конъюгаты пептидов и пептидных нуклеиновых кислот с металлоорганическими комплексами: синтез и применение

Н. Мецлер-Нольте (Nils Metzler, Universität Heidelberg, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Germany)

5.1. Введение

Эта глава описывает введение в пептиды и пептидные нуклеиновые кислоты меток на основе органических соединений переходных металлов. Первый металлоорганический биоконъюгат ферроцена был описан уже в 1957 г. [1] спустя всего шесть лет после первого упоминания о ферроцене. В этой статье Шлегль описал синтез и свойства различных ферроценсодержащих аминокислот, включая ферроценилаланин и *n*-ферроценилфенилаланин. В статье была описана не только реакция ферроценсодержащей карбоновой кислоты с эфирами аминокислот, но также упомянуто первое N-ферроценилметильное (Fem) производное аминокислоты. Позже было опубликовано множество статей, описывающих эти три группы соединений, некоторые из этих работ рассмотрены в данной главе. Совершенно удивительно, что первая статья охватывала три самые важные группы ферроценсодержащих аминокислот производных пептидов. С того времени огромное количество работ было посвящено конъюгатам металлоорганических соединений с аминокислотами. Все эти соединения не будут рассматриваться в данной главе, которая посвящена пептидам. Кроме того, конъюгаты металлоорганических соединений с ди- и трипептидами будут исключены, так как они часто являются лишь аналогами простых аминокислот. Этот вопрос рассмотрен в обзоре Бека [2].

Для того чтобы металлоорганические соединения подходили для введения меток в пептиды, должны быть выполнены некоторые общие требования [3]. Прежде всего, эти соединения должны быть стабильны на воздухе и в воде, чтобы они потенциально могли использоваться в физиологических условиях. С синтетической точки зрения металлосодержащие фрагменты в большинстве случаев должны быть стабильны в стандартных условиях реакций химии пептидов, т. е. в реакции образования пептидной связи и удаления защитных

групп. Кроме того, по крайней мере некоторые из пептидных конъюгатов получены с использованием твердофазного метода синтеза. В этом случае металлоорганические соединения должны также выдерживать условия реакции удаления пептида с носителя. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является дополнительным мощным методом очистки металлоорганических биоконъюгатов вдобавок к основным способам очистки, таким как сублимация или перекристаллизация, используемым в металлоорганической химии. В разд. 5.5 рассмотрены некоторые примеры того, как в действительности использование металлоорганических соединений способствует получению пептидов, а также облегчает их очистку методом ВЭЖХ.

Формально существует несколько способов, с использованием которых металлоорганические группы могут быть присоединены к аминокислотам или пептидам. Металл может быть непосредственно связан с основной цепью пептида, т. е. через N-концевую аминогруппу, азот или кислород амидной группы, C-концевую карбоксильную группу или даже α -атом углерода. Металлосодержащий фрагмент может также координироваться с функциональными группами в боковой цепи аминокислот, например тиольной группой цистеина, аминогруппой лизина или даже ароматическим кольцом как π -донором. Описано много случаев, в которых функционализированный металлосодержащий фрагмент (например, циклопентадиенильное кольцо ферроцена) присоединен к пептиду через подходящий органический мостик (линкер), связанный с α -атомом углерода, одним из концевых (чаще всего N-концевым) атомов или с функциональной боковой цепью как в случае аминогруппы лизина.

Металлоорганические соединения известны уже в течение длительного времени, начиная с соли Цейзе, открытия Франкландом диэтилцинка, исследований огромного класса карбонильных комплексов металлов. Несмотря на это, истинное рождение металлоорганической химии связано, вероятно, с открытием ферроцена [4, 5] и установлением его структуры Уилкинсоном [6] и Фишером [7]. Ферроцен обладает значительной химической и физической стабильностью [8]. Его химические свойства всесторонне исследованы, а ряд производных, таких как ферроценкарбоновая кислота или ферроценкарбальдегид, коммерчески доступны. В этом смысле он почти идеально подходит для получения биоконъюгатов в соответствии с приведенным выше критерием. Поэтому больше чем половина всех конъюгатов, описанных в этой главе, содержит ферроцен в качестве металлоорганического фрагмента.

В настоящем обзоре отражена биометаллоорганическая химия ферроцена почти во всех аспектах [9]. В разд. 5.2 обсуждаются конъюгаты металлоорганических соединений с малыми пептидами, не обладающими какой-либо установленной физиологической активностью; в разд. 5.3 рассмотрены работы по металлоорганическим биоконъюгатам с биологически активными пептидами, такими как пептидные гормоны и нейропептиды; здесь же представлены специальные аспекты твердофазного синтеза с использованием металлоорганических соединений; в разд. 5.4 рассмотрены металлоорганические конъюгаты с аналогами ДНК – пептидными нуклеиновыми кислотами (ПНК), которые представляют собой топологический аналог ДНК. Олигомеры ПНК

взаимодействуют с комплементарными ДНК и РНК в соответствии с принципами парных оснований Уотсона–Крика и Хьюсгена также как это делают гомологи ДНК. Металлоорганические производные ДНК рассмотрены в других главах этой книги. Несмотря на это, металлоорганические производные ПНК включены в эту главу, так как химия ПНК, содержащих концевые amino- и карбоксильную группы, в основе своей и есть химия пептидов. В разд. 5.5 рассмотрены области применения металлоорганических соединений в химии пептидов.

5.2. Конъюгаты металлоорганических соединений с короткими пептидами

Связывание карбоксильной группы металлоорганического соединения с аминокислотами и пептидами посредством образования амида является, вероятно, наиболее изученной реакцией получения конъюгатов. Первые ферроценильные производные такого рода Fc-CO-Aaa-OEt ($\text{Fc} = (\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$, C_5H_5 , $\text{Aaa} = \text{Gly, Leu, Phe, Met}$), Fc-CO-Gly-OH и Fc-CO-Gly-Leu-OEt , были описаны Шлеглем уже в 1957 г. [1]. С того времени, исходя из ферроценкарбоновой кислоты **3** и аминокислот, ди-, три-, и тетрапептидов было получено множество аналогичных ферроценильных амидов. Эти соединения, как показано на примере производного глицина Fc-CO-Gly-OH (**4**, схема 5.1), широко изучены, в том числе исследованы их электрохимические свойства и структура в твердой фазе и в растворе. Всеобъемлющее обсуждение этого вопроса читатель найдет в свежем обзоре Мецлер-Нольте [9]. Краац недавно также суммировал результаты своих исследований в этой области [9].

Был исследован также спиральный пептид, содержащий 21 аминокислотный остаток, в том числе шесть фрагментов лизина Lys [11, 12]. Lys-N^ϵ -аминогруппы были модифицированы ферроценоильными группами, чтобы исследовать изменение общей конформации пептида при введении этих липофильных групп. Согласно спектральным данным, конъюгат приобретает спиральную конформацию, аналогичную немодифицированному пептиду. Похожие результаты наблюдались при модификации этого пептида, содержащего 21 остаток, под действием ферроценкарбальдегида **2**. Это привело к образованию основания Шиффа с аминогруппой лизина (схема 5.1).

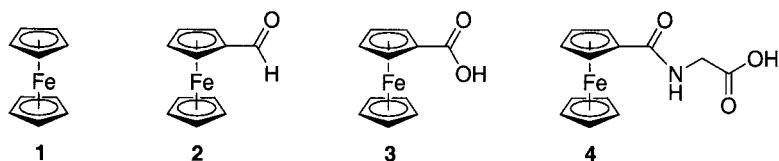


Схема 5.1. Структурные формулы ферроцена (**1**), ферроценкарбальдегида (**2**), ферроценкарбоновой кислоты (**3**) и метилового эфира ферроценоилглицина (**4**, Fc-CO-Gly-OMe)

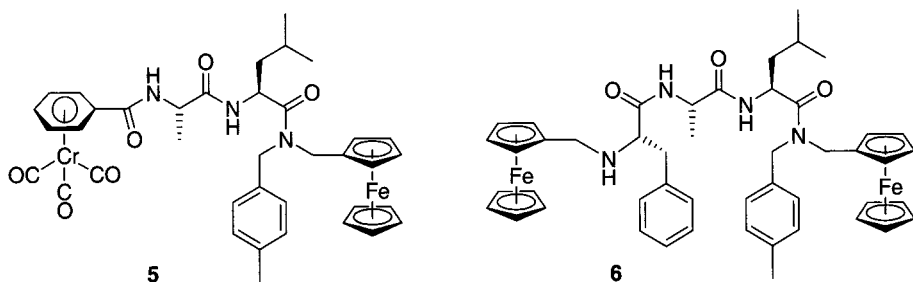


Схема 5.2. Биметаллические конъюгаты дипептида Ala-Leu и трипептида Phe-Ala-Leu

В другой статье описана реакция полимера на основе *L*-лизина (средняя молекулярная масса равна 126,2 кДа) с **3** [13]. В этом случае около 6% остатков лизина несли ферроценоильный фрагмент. В той же статье сополимер на основе лизина (средняя молекулярная масса равна 52,1 кДа), в котором молярное соотношение Lys:Ala:Glu:Тур = 34:45:14:7, также вводили в реакцию с **3**. Это привело к модификации 14% аминогрупп лизина. Два этих водорастворимых ферроценоильных полимера были использованы для создания амперометрического глюкозочувствительного электрода путем иммобилизации полимеров вместе с таким ферментом, как глюкозооксидаза на поверхности стеклоуглеродного электрода.

Также был описан ряд биметаллических аминокислотных производных. В научной группе Мецлер-Нольте синтезированы ди- и трипептиды **5** и **6**, содержащие металлоорганические группы при концевых атомах азота и углерода [14, 15]. На схеме 5.2 приведены структурные формулы этих соединений, причем получены они были при связывании карбоксибензол(трикарбонил)хрома **7** или ферроценилметилфенилаланина **8** с концевой аминогруппой ферроценилметильного дипептидного производного.

5.2.1. Металлоорганические соединения как темплаты для введения вторичных структурных элементов в пептиды

5.2.1.1. Производные 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты

Помимо обсуждавшихся выше монозамещенных ферроценсодержащих производных аминокислот, описано большое число 1,1'-дизамещенных аминокислотных производных. Не все соединения будут представлены в этой главе. Основное внимание будет сконцентрировано на соединениях с длинной пептидной цепью и их особых свойствах. В 1996 г. Херрик и др. показали, что соединения общей формулы $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Aaa-OMe})_2$, где аминокислотный фрагмент Ааа отличен от остатка пролина, обладают упорядоченной структурой в CH_2Cl_2 и CHCl_3 (схема 5.3) [16]. В такой упорядоченной структуре между амидной группой NH и карбонилем COOMe, входящим в состав соседней цепи, образуются две эквивалентные водородные связи,

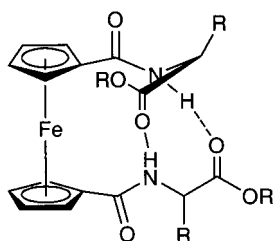


Схема 5.3. Упорядоченная конформация, обнаруженная в $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Aaa-OMe})_2$ в твердой фазе и в растворе в неполярных растворителях

при этом строение молекулы можно условно обозначить как «конформация Херрика». Геометрически подобное расположение напоминает твист-структуру в пептидах, что является не только общим структурным мотивом важным для биологической функции, но также является основной структурой лекарств [17]. Эти данные стимулировали исследования, целью которых было показать необходимость использования металлоорганических соединений в качестве фиксаторов структуры, аналогичной структуре изгиба в пептидах. Соединения, в которых каждое Cr -кольцо имеет, по крайней мере, дипептидный заместитель, представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1. Дипептидные производные 1,1'-металлоцендикарбоновых кислот $\text{M}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Заместитель 1})(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Заместитель 2})$, исследованные методом рентгеноструктурного анализа.

Металл М	Заместитель 1	Заместитель 2	Хиральность аминокислотных фрагментов	Хиральность металлоцена	Литература
Fe	Ala-Pro-OMe	Ala-Pro-OMe	все <i>L</i>	<i>P</i>	[19]
Fe	Ala-Pro-OEt	Ala-Pro-OEt	все <i>L</i>	<i>P</i>	[18–20]
Fe	<i>D</i> -Ala- <i>D</i> -Pro-OEt	<i>D</i> -Ala- <i>D</i> -Pro-OEt	все <i>D</i>	<i>M</i>	[20]
Fe	Ala-Pro-OPr	Ala-Pro-OPr	все <i>L</i>	<i>P</i>	[19]
Fe	Ala-Pro-OBz	Ala-Pro-OBz	все <i>L</i>	<i>P</i>	[19]
Fe	Ala-Pro-NHpy	Ala-Pro-NHpy	все <i>L</i>	<i>P</i>	[32]
Fe	Ala-Pro-NHpy(PdCl_2)	Ala-Pro-NHpy	все <i>L</i>	<i>P</i>	[32]
Fe	Ala-Pro-NHpyMe	Ala-Pro-NHpyMe	все <i>L</i>	<i>P</i>	[34]
Fe	Gly-Pro-OEt	Gly-Pro-OEt	все <i>L</i>	<i>P</i>	[22]
Fe	Gly-Phe-OEt	Gly-Phe-OEt	все <i>L</i>	<i>P</i>	[20]
Fe	Gly-Leu-OEt	Gly-Leu-OEt	все <i>L</i>	<i>P</i>	[20]
Fe	Ala-Phe-OMe	Ala-Phe-OMe	все <i>L</i>	<i>P</i>	[23]
Co^+	Ala-Phe-OMe	Ala-Phe-OMe	все <i>L</i>	<i>P</i>	[23]

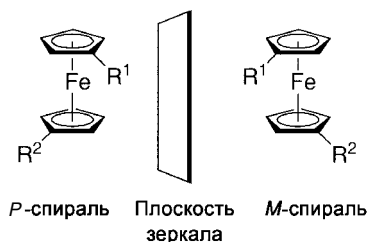


Схема 5.4. Спиральная хиральность 1,1'-дизамещенных ферроценов

Хирао и др. первыми исследовали соединения с общей формулой $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Pro-OR})_2$, где $\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, n\text{-Pr}, \text{Bn}$ [18, 19]. В качестве характерного примера на рис. 5.1 представлена молекулярная структура **9**, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Pro-OEt})_2$, установленная методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [18, 20]. В твердой фазе молекула обладает упорядоченной конформацией, аналогичной приведенной на схеме 5.3. Структура характеризуется наличием внутримолекулярной водородной связи между группами Ala-NH и Ala-CO пептидных фрагментов, связанных с разными Cr -кольцами одной молекулы. Длина $\text{NH}\cdots\text{OC}$ водородной связи составляет $2,06 \text{ \AA}$ («конформация Херрика»).

Все эти производные, в которых варьируются группы R , обладают сходной упорядоченной структурой как в твердой фазе, так и в растворе в апротонных растворителях, таких как CDCl_3 или CH_3CN . Подобный вывод был сделан на основании данных исследований ЯМР, ИК-спектроскопии и кругового дихроизма (КД) [19, 20]. Незамещенный ферроцен, как известно, является ахиральным соединением. Однако 1,1'-дизамещенные производные могут существовать в виде двух энантиомерных форм, представленных на схеме 5.4. Две эти формы представляют пример спиральной хиральности и имеют разные конфигурации. В ферроцене энергетический барьер вращения вокруг оси металл – Cr -кольцо составляет всего несколько ккал/моль, и поэтому такое вращение осуществляется очень быстро, приводя к быстрому взаимному переходу энантиомерных форм [21]. Эта ситуация меняется при образовании водородной связи между двумя пептидными цепочками одной молекулы, что позволяет закрепить Cr -кольца в одном положении. Методом КД установлено, что такая упорядоченная структура действительно реализуется в растворе, как следует из появления около 420 нм хиральных полос поглощения, соответствующих поглощению ферроцена [19, 20]. В рассматриваемом случае ориентация двух заместителей в ферроценовом ядре (M или P) задается хиральностью аминокислотных фрагментов. Интересно отметить, что за исключением единственного случая все соединения, перечисленные в табл. 5.1, получены на основе природных L -аминокислот. Вследствие этого все приведенные производные имеют P -конфигурацию. Хирао и др. получили и структурно охарактеризовали соединение на основе D -аминокислоты $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-}D\text{-Ala-}D\text{-Pro-OEt})_2$ [20]. Это соединение является энантиомером по отношению к упоминавшемуся выше $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-}L\text{-Ala-}L\text{-Pro-OEt})_2$ **9**,

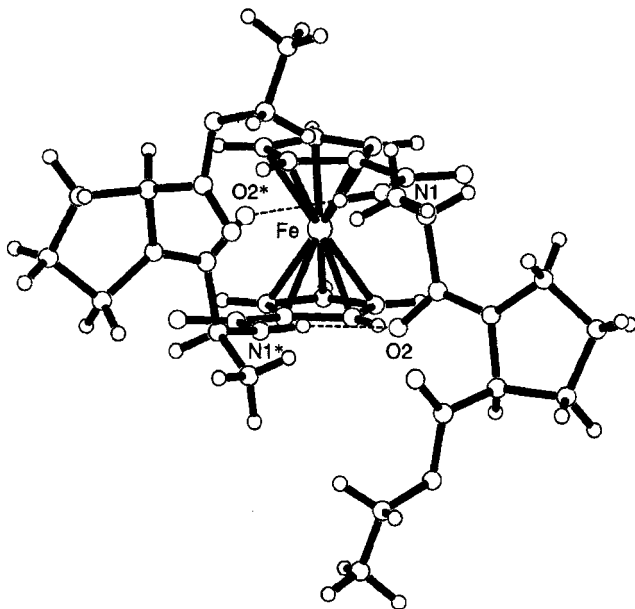


Рис. 5.1. Молекулярная структура $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Pro-OEt})_2$ в твердой фазе. (Воспроизведено с незначительными изменениями из работы [20] с разрешения The American Chemical Society).

что показано с помощью КД: оба соединения характеризуются одинаковым по величине, но разным по знаку эффектом Коттона (рис. 5.2).

Соединения $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Pro-OR})_2$ ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, \text{Pr}$ и Bn) и $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Gly-Pro-OEt})_2$ [20] содержат только одну NH-группу в каждой пептидной цепочке, так как пролин является единственной природной аминокислотой, содержащей вторичную аминогруппу. Кроме того, были получены производные пептидов с двумя амидными фрагментами NH. Эта группа соединений включает $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Gly-Leu-OEt})_2$, $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Gly-Phe-OEt})_2$ [20] и $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Phe-OMe})_2$ [23]. Амидные компоненты NH второй аминокислоты не участвуют в образовании дополнительной водородной связи, так как в твердой фазе они ориентированы таким образом, что пептидные цепочки направлены в стороны друг от друга. Эти NH-группы участвуют в образовании межмолекулярных водородных связей, что приводит к образованию супрамолекулярных структур.

В $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Phe-OMe})_2$ была исследована также прочность водородных связей **10** в сравнении с аналогичным положительно заряженным производным кобальтоценния [23]. Оказалось, что водородные связи в соединении кобальта немного прочнее, чем в производном ферроцена **10**. Однако отличия слишком малы, а результаты чувствительны к экспериментальным условиям. Это согласуется с тем фактом, что положительно заряженные аминокислоты (такие как Lys или Arg) чаще всего не участвуют в образовании твист-структуры в пептидах [24].

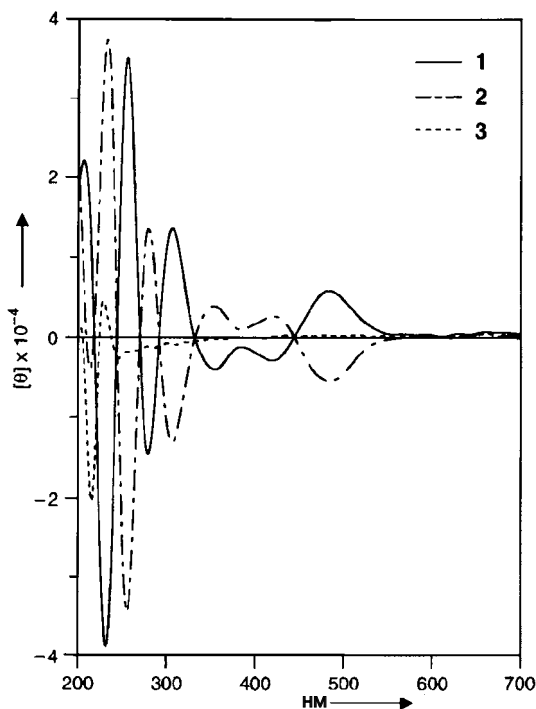


Рис. 5.2. Спектры КД $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-L-Ala-L-Pro-OMe})_2$ (жирная линия, 1), $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-D-Ala-D-Pro-OMe})_2$ (штриховая линия, 2) и $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-C}_3\text{H}_5\text{-L-Ala-L-Pro-OMe})_2$ (пунктирная линия, 3) в MeCN (0,1 мМ). Пропильная группа в **3** препятствует образованию сильных внутримолекулярных водородных связей, и, следовательно, это соединение не обладает закрепленной хиральной конформацией ферроцена. (Воспроизведено из работы [20] с разрешения The American Chemical Society)

В некоторой степени обсуждавшиеся выше структуры напоминают твист-структуру в пептидах. Типичная структура изгиба в пептидах представлена на схеме 5.5. Циклические структуры, возникающие при образовании водородных связей, характеризуются как γ -поворот (7-членный цикл) или β -изгиб (10-членный цикл), тогда как 13-членные циклы представляют собой α -спираль. До и после изгиба пептид вытягивается в антипараллельные цепочки, часто в β -складчатые листы [25]. Во всех пептидных производных, полученных на основе 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты, параллельная ориентация пептидных цепочек является вынужденной. Хотя эти соединения и не могут рассматриваться в качестве действительных аналогов соединений, имеющих структуру β -изгиба [16], все же остается геометрическое сходство. На основании этих данных для подобных структур была разработана терминология [23], рассмотренная ниже на примере исследованных методом РСА структур **10** и **11** (схема 5.5). Для **11** наблюдается необычная конформация, которую можно определить как конформацию «ван Ставерена». 8-Членный цикл включает водородную связь ($\text{H-N-C}_{\text{C=O}}\text{-C}_{\text{Ср-ипсо}}\text{-Fe-C}_{\text{Ср-ипсо}}\text{-C}_{\alpha}\text{-O}$). Только

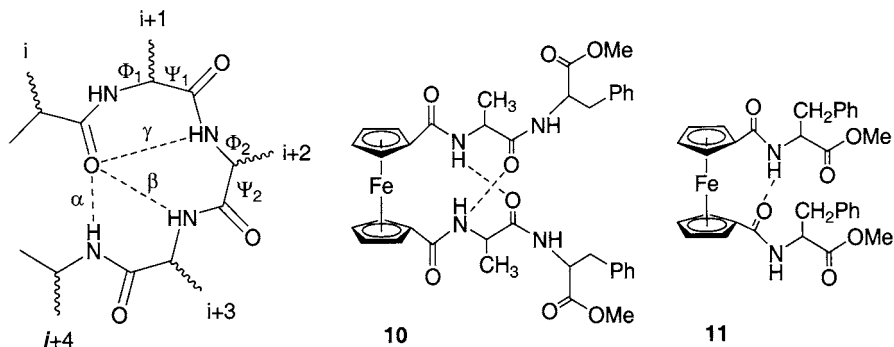


Схема 5.5. Встречающаяся в природных пептидах структура изгиба, стабилизированная водородными связями, в сравнении с внутримолекулярными водородными связями в **10** и **11**

одна водородная связь образуется между аминокислотами i ($\text{C}=\text{O}$) и $i+2$ (NH). Этот тип связывания обозначают как псевдо- γ_p поворот (p , так как группы параллельны). Применяя тот же формализм, легко увидеть, что **10** образует 11-членные циклы, включающие внутримолекулярную водородную связь между аминокислотами i и $i+3$, что можно обозначить как псевдо- β_p изгиб. Те же правила применимы к обоим Сr-кольцам и их заместителям, потому что в целом молекула обладает приблизительно C_2 -симметрией.

Недавно Краатц и др. получили олигопролин с общей формулой $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Pro}_n\text{-OBn})_2$, где $n = 1-4$ [26]. Как и в случае монозамещенного производного $\text{Fc-CO-(Pro)}_n\text{-OBn}$ [27], цепочки пролина в 1,1'-дизамещенных соединениях располагаются в пространстве, образуя левозакрученную спираль, характерную для полипролина II. В соединении $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-(Pro)}_2\text{-OBn})_2$ упорядоченная конформация, типичная для других 1,1'-дизамещенных производных, обсуждавшихся выше, не реализуется, так как Pro-амидная связь не содержит фрагмента NH . Окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-R})_2/\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-R})_2^+$, как оказалось, в малой степени смещается к менее положительным значениям при переходе от $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Pro-OBn})_2$ к $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Pro}_4\text{-OBn})_2$. Аналогичная тенденция наблюдалась в случае монозамещенных производных $\text{Fc-CO-(Pro)}_n\text{-OBn}$ [27].

Интересно отметить, что синтез $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Pro}_n\text{-OBn})_2$, где $n = 2, 3$ или 4, приводит к новому классу соединений, так называемым «неполностью замещенным» производным $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Pro}_n\text{-OBn})(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-OBt})$ [26]. В одной из последующих статей Краатц и др. провели реакцию «неполностью замещенного» производного, в котором $n = 3$ и 4, с аналогом пепстатина, что привело к конъюгату, представленному на схеме 5.6 [27]. Пепстатин является природным потенциально активным ингибитором протеазы аспарагиновой кислоты, включая ВИЧ-1 протеазу и пепсин [29–31]. Было бы очень интересно исследовать физиологическое действие этих ферроценсодержащих пептидных конъюгатов (см. также разд. 5.3).

При введении в структуру подходящей координирующей группы пептиды могут выступать в качестве лигандов для различных переходных металлов.

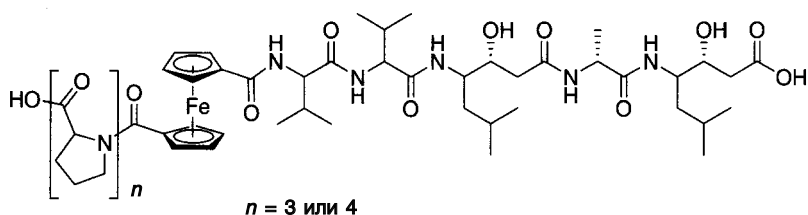


Схема 5.6. Строение ферроценосодержащего производного 1-олигопропил-1'-пепстатина

Введение в спиральные пептиды таких потенциальных лигандов для синтеза металлоорганических соединений как фосфиновые группы будет обсуждаться позже в этой главе. В соответствии с той же идеей Хирао и др. получили соединение $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-Ala-Pro-NHPy})_2$ (**12**, где NHPy обозначает амид 2-аминопиридина) и впоследствии превратили его в комплекс с PdCl_2 **13**. В этом комплексе атомы азота пиридинового цикла координированы по атому палладия, причем лиганды в координационной сфере металла располагаются в *транс*-положениях [32–34]. Для обоих соединений было проведено рентгеноструктурное исследование; молекулярная структура **13** приведена на рис. 5.3. В твердой фазе и в растворе комплексы **12** и **13** существуют в «конформации Херика», причем группы Ala-NH участвуют в образовании внутримолекулярной водородной связи с компонентом Ala-CO пептидной

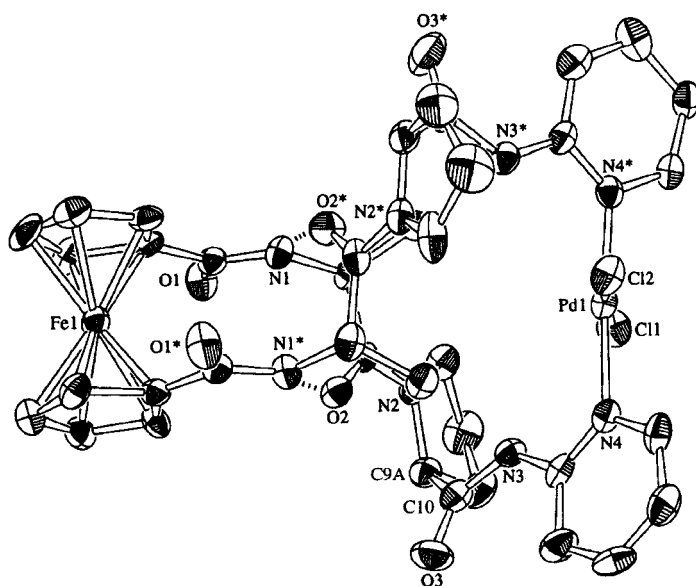


Рис. 5.3. Молекулярная структура монокристалла комплекса **13**, установленная методом РСА. (Воспроизведено из работы [32] с разрешения The American Chemical Society.)

цепочки, связанной со вторым Ср-кольцом ферроценового ядра. Фактически координация пиридиновых колец с атомом палладия стабилизирует внутримолекулярные водородные связи в растворе и твердой фазе.

5.2.1.2. Другие производные

Как говорилось выше, в случае 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты почти всегда наблюдается параллельная ориентация пептидных цепочек. Антипараллельная ориентация пептидных цепочек, которая в действительности наиболее часто встречается в природе, может реализоваться при модификации 1'-амино-1-ферроценкарбоновой кислоты (Fca, **14**) (схема 5.7). Это интересное соединение представляет собой простейшую ферроценсодержащую аминокислоту. Впервые оно упоминается в 1998 г., причем, как указывалось в работах Рэйпик и др. смогли получить **14** наряду с различными производными, исходя из 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты [37]. Совсем недавно Хайнце и Шленкер опубликовали усовершенствованный метод синтеза **14** [38]. На основании полученных данных позже был исследован ряд производных пептидов, в которых **14** выступает в роли псевдоаминокислоты [39]. В растворе и в твердой фазе эти пептиды содержат внутримолекулярную водородную связь. Один из примеров приведен на рис. 5.4. Это соединение, которое формально является псевдотетрапептидом с последовательностью Вос-Ala-Fca-Ala-Ala-OMe, было получено последовательным сочетанием в растворе и может закристаллизоваться после очистки методом препаративной тонкослойной хроматографии. Как показано на рис. 5.4, образуются две внутримолекулярные водородные связи, которые также стабилизируют эту конформацию в растворе. Данное соединение имеет *P* конфигурацию спирали на металлоцене. В отличие от обсуждавшихся выше производных 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты в рассматриваемом случае пептидные цепочки, идущие от С- и N-концевых атомов в **14**, находятся в антипараллельной ориентации. В общем, **14** представляет собой не только металлоорганическую аминокислоту, но и первое настоящее металлоорганическое соединение, имитирующее твист-структуру в пептидах.

Бек, Штеглих и др. получили другую интересную молекулу. Эта молекула имеет C_3 симметрию и представляет собой пептидный пучок, в котором пептидные цепочки объединены металлоорганическим фрагментом той же

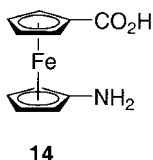


Схема 5.7. Металлоорганическая аминокислота 1'-аминоферроцен-1-карбоновая кислота (**14**)

Затем в результате реакции пептида с Sr^*TiCl_3 было получено соединение **15** (схема 5.8) [40]. Неполарные аминокислоты, такие как Leu, Phe и Gly, были использованы для синтеза пептидных пучков, состоящих либо из псевдононапептидов ($n = 2$) или даже псевдопентадекапептидов ($n = 4$). В зависимости от длины пептидов ($n = 2$ или 4 для **15**) образуются макробициклические системы высокой симметрии [41]. Стереохимия пептидных пучков зависит от темплата и может быть установлена в растворе с помощью КД. В этих соединениях присутствуют очень сильные водородные связи между отдельными пептидными цепочками, так как данные молекулы получены на основе жесткого темплата, а цепочки пептидов связаны жестким фрагментом Sr^*Ti .

5.2.2. Пептиды в качестве лигандов для металлоорганических соединений

Очевидно, что аминокислоты в белках могут выступать в качестве лигандов для комплексов металлов. Поэтому удивительно, что химики только недавно начали разрабатывать сложные пептиды в качестве лигандов для различных металлов. Совсем немного попыток было сделано для того, чтобы использовать природные пептиды в качестве лигандов для металлов в металлоорганических соединениях. Одним из редких примеров является введение во фрагмент одиночной цепи антитела группы $\text{Tc}(\text{CO})_3$, связанной с $(\text{His})_6$ -концом антитела (см. разд. 5.3.2). Типичные случаи, когда природные белки действительно выступают как лиганды для металлоорганических групп, например, в некоторых гидрогеназах, будет описано в других разделах этой книги.

Гильберстон и др. опубликовали цикл статей, в которых они близко подошли к использованию пептидов в качестве лигандов для металлов в металлоорганических соединениях [42–49]. Для получения пептидов методом твердофазного синтеза авторы применяли аминокислоты, содержащие фосфиногруппы. После расщепления и снятия защиты фосфиногруппы могут выступать в роли лигандов для поздних переходных металлов, таких как Rh и Pd. Изначально последовательность пептидов была выбрана таким образом, чтобы получить высокую степень спиральности конечного пептида [42–46]. Фосфиноаминокислоты, для синтеза которых предложено несколько путей [42, 44, 50, 46, 51, 48], вводятся в позиции i и $i+4$. Это способствует тому, что два фосфиновых лиганда оказываются расположенными близко друг к другу в структуре α -спирали и могут легко координироваться с металлом (схема 5.9). Реакция с $[\text{Rh}(\text{NBD})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ приводит к комплексу металла, что подтверждено методом ЯМР спектроскопии ^{31}P [42–44]. Хотя координацию атома Rh различными пептидными цепочками и нельзя исключить, разбавление и ЯМР эксперименты при различной температуре, а также масс-спектрометрические данные указывают на хелатный тип координации, схематически показанный на схеме 5.9.

Совсем недавно методом PCA была установлена молекулярная структура додекапептида $\text{Ac-Ala-Aib-Ala-Pps(S)-Ala-Ala-Aib-Pps(S)-Ala-Ala-Aib-Ala-OH}$ **16** [45]. В этой структуре несколько начальных фрагментов находятся

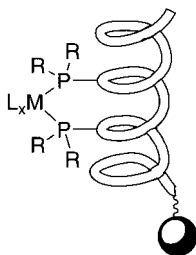


Схема 5.9. Схематическое изображение спирального пептида с двумя не природными фосфиноаминокислотами, способствующими координации металла (ML_x). Пептид нанесен на твердую подложку

в 3_{10} -спиральной конформации. Фрагменты в середине последовательности представляют собой α -спираль, в то время как последние два С-концевых остатка находятся в распрямленной конформации. Как и ожидалось, две фосфиногруппы располагаются друг над другом вдоль оси спирали, что способствует хелатной координации металла. Аналогичное строение установлено и в растворе методом ЯМР [45]. Однако конформация, как оказалось, несколько меняется при координации Rh с фосфиногруппами. К сожалению, до сих пор не удалось получить монокристалл, пригодный для проведения РСА. В то же время данные ЯМР не позволяют однозначно определить структуру такого металлизированного фосфинопептида в растворе.

Дифосфинопептидный комплекс родия, содержащий лиганды, аналогичные незамещенному **16**, был изучен в реакции гидрирования прохирального метилового эфира 2-(ацетиламино)акриловой кислоты, из которого с количественным выходом был получен метиловый эфир N-ацетилаланина. На начальной стадии энантиомерный избыток (*ee*) продукта реакции не превышал 10%. Интересно отметить, что реакция приводит к близким результатам как в растворе, так и в случае, когда дифосфинопептидный комплекс родия закреплен на полимерном носителе, используемом изначально для синтеза пептида [43]. Позже пептидные лиганды были оптимизированы в параллельном комбинаторном подходе, а значения *ee* выросли почти до 40% для асимметрического гидрирования енамидов [46]. Кроме того, близкая селективность наблюдалась в случае очищенных пептидных лигандов в растворе, а также с пептидами, связанными с полимерной подложкой. Методики твердофазного синтеза пептидов оптимизированы для получения продуктов высокой чистоты с высокими выходами, поэтому использованный Гильбертсоном подход предусматривает как быстрое развитие селективных катализаторов для специфических реакций, так и получение индивидуальных субстратов параллельным синтезом. Это подтверждается последовательной оптимизацией пептидных лигандов, имеющих структуру β -изгиба, для асимметрического аллильного присоединения малонового эфира к ацетоксициклопентену, что обеспечивает 75% *ee* [47]. Дальнейшая оптимизация, в том числе введение фосфиновых лигандов, приводит к 95% *ee* для лиганда **17** в растворе (схема 5.10) [48].

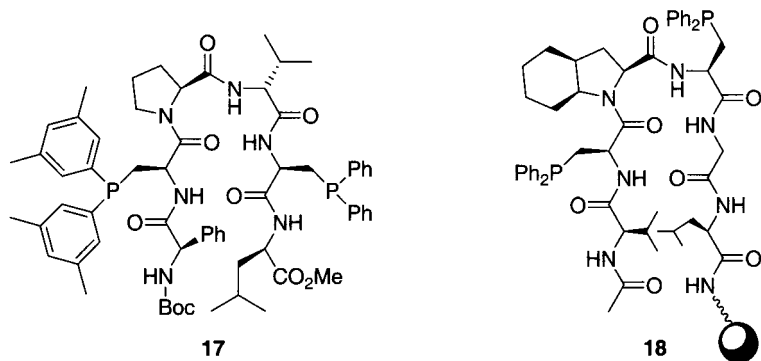


Схема 5.10. Оптимизированные пептидные лиганды для катализируемых палладием реакций аллильного присоединения и десимметризации.

Слева: Boc-D-Phg-Xps-Pro-D-Val-Pps-D-Leu-OMe (**17**).

Справа: Ac-D-Val-Pps-Oic-Pps-Gly-D-Leu-NH-полимер (**18**)

Структура пептидных лигандов также оптимизирована для катализируемой палладием реакции десимметризации 2,4-циклопентандиола [49]. В этом случае структура β -изгиба приводит только к умеренной селективности (37% *ee*). Лучшая селективность достигается при использовании фрагмента Pps-Pro-Pps. Поэтапный скрининг среди 75 лигандов показал, что пептид **18** является лучшим лигандом на твердом носителе, позволяющим получать продукт с 76% *ee*. Можно считать, что дополнительная оптимизация условий реакций, проводимых в растворе, в дальнейшем улучшит этот показатель. Стоит отметить, что эти пептидные лиганды специально были разработаны для единичных реакций. Даже малое изменение в субстрате, например, переход от ацетоксициклопентена к ацетоксициклогексену в реакции с лигандом **17**, приводит к падению селективности с 95 до 81% *ee* в растворе при прочих равных условиях [48].

Эркер и др. использовали иной подход. Они исследовали реакцию металлоорганических катионов $[\text{Cr}_2\text{MCH}_3(\text{TГФ})]^+$ ($\text{M} = \text{Ti}$, **19**; Zr , **20** – катион Джодана) с защищенными ди- и трипептидами и их производными. В случае Zr аддукт **21** образуется в условиях кинетического контроля при низкой температуре, при этом атом металла координирован с атомом кислорода одной из карбонильных групп [52]. При нагревании выше 0°C в исходном аддукте **21** происходит элиминирование CH_4 и фрагмент Cr_2Zr координируется пептидом, образуя продукт **22** хелатного типа. Уравнение реакции приведено на схеме 5.11 для дипептида Boc-Ala-Val-OMe. Координация с концевым атомом N приводит к термодинамически более стабильному продукту, что показано на схеме 5.11 для **22**, хотя при исследовании методом ЯМР в качестве переходных состояний наблюдались и другие типы координации. Реакция $[\text{Cr}_2\text{ZrCH}_3(\text{TГФ})]^+$ **20** с олигопептидными изоцианатными производными приводит к N-ацетилолигопептидам при переносе метильной группы к изоцианатному атому углерода [53]. В этом случае наблюдается координация с N-концевой группой, как и в **22**.

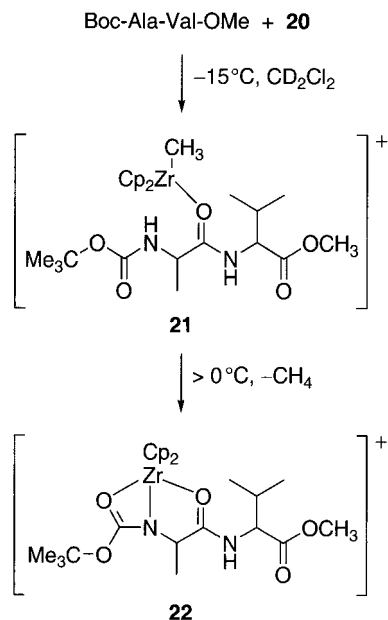


Схема 5.11. Реакция дипептида Вос-Ala-Val-OMe с металлоорганическим катионом Zr

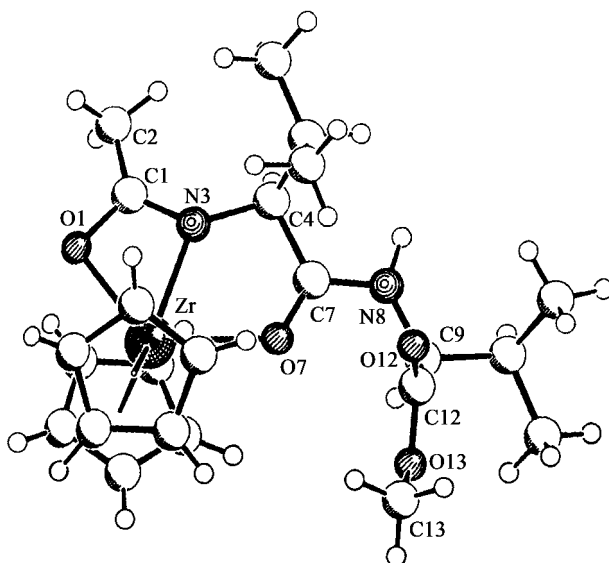


Рис. 5.5. Установленная методом РСА молекулярная структура дипептида Ас-Val-Val-OMe, содержащего координированный фрагмент Cp_2Zr . (Воспроизведено из работы [53].)

На рис. 5.5 приведена установленная методом РСА молекулярная структура продукта реакции **20** с изоцианатным Val-Val-OMe производным. Подробно была изучена реакция **19** с 16 трипептидами [54]. В принципе, продукты реакций аналогичны полученным ранее для случая соединения **20**. По сравнению с Zr-содержащим соединением **20** титановый аналог **19** менее реакционноспособен. Поэтому в этом случае можно зафиксировать большее количество интермедиатов, а соединения с N-концевым типом координации не во всех случаях являются наиболее термодинамически стабильными продуктами реакции.

5.3. Конъюгаты металлоорганических соединений с природными пептидами

В настоящее время весьма интересной задачей является введение в природные пептиды меток на основе металлоорганических соединений. Для решения этой задачи можно выделить две основных стратегии. Во-первых, одну или несколько аминокислот в пептиде заменить металлоорганическим производным. На схеме 5.12 приведены металлоорганические аминокислоты, которые использовались для получения аналогов природных пептидов. Так, ферроценилаланин **23** может заместить фенилаланин. Бек и сотрудники описали синтез нескольких других металлоорганических аминокислот, причем ключевой стадией являлась реакция бромглицина с металлоанионами [55]. Во-вторых, интактный пептид можно пометить подходящим металлоорганическим производным по N-концевому, C-концевому атомам или боковой цепи. Среди этих возможностей первая (модификация N-концевого атома) используется наиболее часто, в то время как вторая (модификация C-концевого атома) описана в литературе очень скудно. В этом разделе описаны, главным образом, пептиды, имеющие хотя бы некоторую биологическую значимость. Вдобавок к обсуждавшимся в разд. 5.2 соединениям также описаны ферроценсодержащие производные с пептидами, не имеющие биологической функции. К ним относятся цикло(*D*-ферроценилаланил-*L*-пролил), цикло(*L*-ферроценилаланил-*L*-пролил) [56] и полипептиды, содержащие повторяющиеся фрагменты *L*-Fer-[Glu(OBzl)]₄ или *L*-Fer₂-[Glu(OBzl)]₄ [57].

5.3.1. Металлоорганические производные энкефалинов

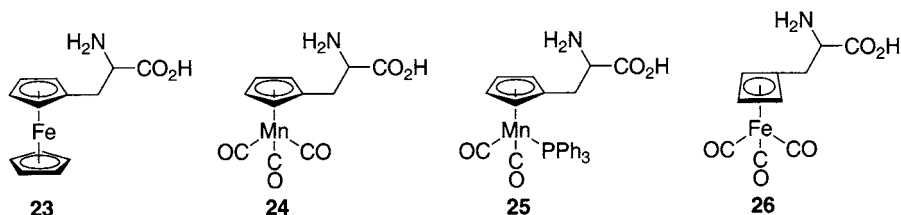
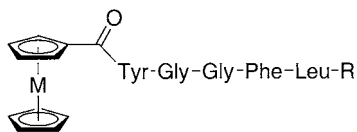


Схема 5.12. Металлоорганические аминокислоты: ферроценилаланин (Fer, **19**), цимантренилаланин (Сум, **20**), трифенилфосфинцимантренилаланин (Сум(PPh₃), **21**), циклобутadiенжелезо(трикарбонил)аланин (**22**)

Пентапептид [Leu⁵]-энкефалин стал первым биогенным пептидом, модифицированным металлоорганическим фрагментом. С тех пор он остается наиболее популярным пептидом для модификации при действии металлоорганических соединений. [Leu⁵]-Энкефалин имеет первичную структуру H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH. Хьюгс и др. впервые выделили [Leu⁵]-энкефалин в 1975 г. из мозга свиньи, причем образец представлял собой смесь [Leu⁵]-энкефалина с его аналогом, содержащим метионин в положении 5 ([Met⁵]-энкефалин) [58]. Эти пентапептиды обнаружены в различных тканях организма человека, но главным образом содержатся в мозге и центральной нервной системе (ЦНС) [59]. Энкефалины являются нейропептидами, действие которых аналогично действию морфина, что проявляется в высоком родстве к опиоидным рецепторам [60]. В отличие от морфина, который обладает наибольшей активностью по отношению к μ - и κ -подтипам рецепторов, энкефалины преимущественно связываются с δ -подтипом. Отличия в специфичности связывания приводят к различному физиологическому действию.

Мецлер-Нольте и др. получили ряд производных [Leu⁵]-энкефалина, содержащих металлоорганический фрагмент, связанный с концевым атомом N через амидную связь. Дополнительно к ферроценоильному производному **27** и родственному производному кобальтоцения **28** [61] также описан синтез двух производных молибдена **29** и **30** (см. схемы 5.13 и 5.14) [62]. Во всех случаях энкефалины получены с использованием стандартного твердофазного синтеза пептидов (SPPS)*, использующего Fmoc-стратегию. В синтезе соединений **27–29** металлоорганический фрагмент присоединяли к N-концевому атому пептида на конечной стадии синтеза. Последующее снятие с носителя достигается под действием концентрированного раствора NH₃ в MeOH (**27** и **29**) или трифторуксусной кислоты (TFA) (**28**) в соответствии с химической стабильностью металлоорганических комплексов. Естественно, что носители и линкеры выбраны аналогичным образом. Напротив, соединение **30** получили на носителе, содержащем в качестве лиганда только биспиколиламин (bpa), связанный с N-концевым атомом пептида. Производное bpa-Enk **31** снимали с носителя и затем очищали методом ВЭЖХ. После этого соединение **31** вводили в раствор в реакцию с Mo(CO)₃(CH₃CH₂CN)₃, который является реагентом для введения фрагмента Mo(CO)₃ [63]. Конъюгат **30** осаждается из раствора и, согласно данным ВЭЖХ, имеет чистоту > 95%. Таким образом, показаны две различные стратегии модификации энкефалина, которые можно назвать как «твердофазное мечение» (для **27–29**) или «пост-твердофазное (пост-SPPS) мечение» (для **26**). Первая стратегия для синтеза комплексов металлов позволяет применить преимущества твердофазного синтеза, такие как высокий выход связывания и чистота конъюгата. Подход с использованием «пост-твердофазного мечения» подходит для высоколабильных комплексов металлов, а также приемлем в тех случаях, когда мечение (введение металлоорганического фрагмента) необходимо непосредственно перед

* Список сокращений, используемых в данной главе, см. в конце главы.



27: M = Fe, R = NH₂

28: M = Co⁺, R = OH

Схема 5.13. Производные энкефалина, содержащие N-концевые металлоценовые фрагменты

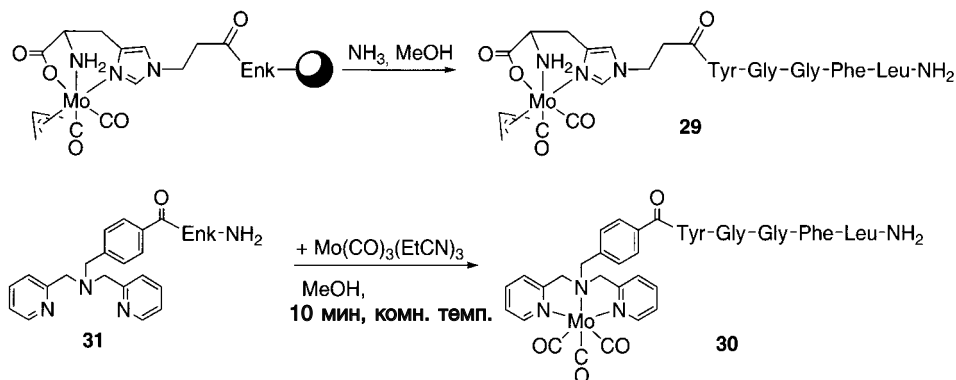


Схема 5.14. Два металлоорганических производных энкефалина, содержащие фрагмент карбонила Mo (Enk = Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)

использованием конъюгата, например, в радиационной медицине (см. также разд. 5.3.2). Гистидинсодержащий комплекс Mo, используемый в синтезе **29**, обладает интересными спектральными характеристиками [64, 65]. Удалось установить по меньшей мере два независимых динамических процесса, включающих *эндо-экзо* переход аллильного лиганда, а также тригональный поворот плоскости, включающей аллильный лиганд и две карбонильные группы, относительно гистидинатного лиганда. Эти процессы пртекают как в нейтральной, так и в окисленной форме данного комплекса. Кроме того, получены энантиомерно чистые изомеры, содержащие *L*- и *D*-His, которые были использованы для мечения энкефалина [66].

Для всех конъюгатов энкефалина определены коэффициенты распределения ($\lg P$) для системы вода/октанол [61]. Эти значения можно рассматривать как относительную меру липофильности соединения. Необходимо отметить, что энкефалин как таковой не может проходить через гематоэнцефалический барьер (BBB), наиболее вероятно из-за своей высокой полярности. Он образуется в ЦНС только в непосредственной близости от рецепторов из более крупного пептида, называемого презэнкефалином. По сравнению с этим соединением конъюгаты **27–29** более липофильны. Так, например, для **27** значение $\lg P$ превышает 3,5, а для Mo-содержащего комплекса **29** – 3,0. Не найдено отличий в значениях $\lg P$ для диастереомеров энкефалина, содержащих Mo-фрагмент, полученных на основе *L*- или *D*-гистидина.

Другой класс производных энкефалина включает соединения, в которых фенилаланин в положении 4 замещен ферроценилаланином (Fer, **23**) или цимантренилаланином (Сум, **24**, см. схему 5.12). Как указывалось выше, Шлегль получил **23** еще в 1957 г. [1]. Позже был описан усовершенствованный синтез как рацемических, так и энантиомерно чистых форм соединений Fer [56, 57, 67, 68]. По сравнению с Phe имеющий цилиндрическую форму Fer является более объемным и липофильным. Производное Сум, содержащее фрагмент трикарбонилмарганца, также оказалось более липофильным, чем Phe [69]. Благодаря этим отличиям результаты анализа связывания, проведенного для модифицированных пептидов в сравнении с данными, полученными для природных пептидов, могут выявить важную информацию о взаимодействиях субстрат – рецептор.

В трех статьях, вышедших одна за другой, описан синтез $[\text{Fer}^4, \text{Leu}^5]$ -энкефалина [70–72]. Соединения получены методом SPPS на твердом носителе с использованием классической методики Меррифилда, включая введение Вос защиты/удаление защиты под действием TFA и снятие пептида с носителя под действием HF. Необходимо отметить, что в жестких условиях снятия с носителя ферроцен окисляется в зеленый катион ферроцена, который в то же время можно легко восстановить при добавлении аскорбиновой кислоты [72]. Окислительное разложение не представляет проблему для $[\text{Сум}^4, \text{Leu}^5]$ -энкефалина, который все же необходимо защитить от прямого солнечного света. Диастереомерно чистые $[D\text{-Fer}^4]$ - и $[L\text{-Fer}^4]$ -энкефалины получены как при разделении рацемической смеси $[DL\text{-Fer}^4, \text{Leu}^5]$ -энкефалина методом ВЭЖХ в случае производных Сум [72], так и проведением твердофазного синтеза пептидов с использованием энантиомерно чистых $D\text{-Fer}$ и $L\text{-Fer}$ [71]. Все металлсодержащие энкефалины проявляют пониженное сродство к энкефалиновым рецепторам по сравнению с природным $[\text{Leu}^5]$ -энкефалином, при этом $[D\text{-Fer}^4]$ -диастереомер эффективнее, чем $L\text{-Fer}$ -аналог [70, 72]. Из двух диастереомеров $[\text{Сум}^4, \text{Leu}^5]$ -энкефалина один изомер (предположительно $D\text{-Сум}$) действительно связывается на порядок лучше, чем Fer-производное, в то время как другой (предположительно $L\text{-Сум}$) сопоставим с $D\text{-Fer}$ [72].

Сержераерт и др. предприняли попытку синтеза производного энкефалина, модифицированного металлоорганической аминокислотой, содержащей циклобутadiенжелезо(трикарбонил)аланин **26** [73]. Однако это соединение не выдерживает условий твердофазного синтеза пептидов и не может быть выделено в чистом виде.

5.3.2. Металлоорганические производные пептидных гормонов

5.3.2.1. Вещество Р и нейрокинин А

Вещество Р (SP) представляет собой ундекапептид, принадлежащий к классу тахикининов, с двумя следующими друг за другом остатками Phe в положениях 7 и 8 (схема 5.15). Фон Ойлер и Гаддум обнаружили этот пептид в 1931 г. [74], но потребовалось еще 40 лет, чтобы Чанг и др. смогли установить первичную последовательность этого соединения [75, 76]. SP участвует в нескольких важных

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Xxx-Yyy-Gly-Leu-Met-NH₂

Xxx = Phe, Yyy = Phe : SP

Xxx = Fer, Yyy = Phe : [Fer⁷]-SP

Xxx = Phe, Yyy = Fer : [Fer⁸]-SP

Xxx = Fer, Yyy = Ile : [Fer⁷, Ile⁸]-SP

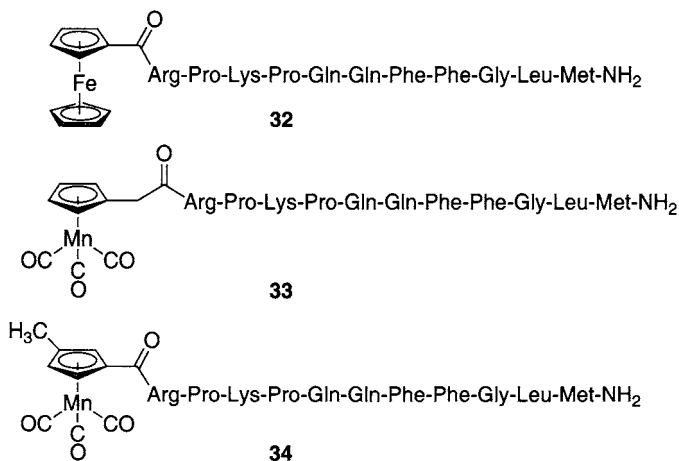


Схема 5.15. Металлоорганические аналоги вещества P (SP)

физиологических процессах, таких как сокращение гладкой мускулатуры, передача боли и активация иммунной системы [77]. Тартар и др. синтезировали с использованием SPPS следующие три Fer-модифицированных производных SP, в которых один или два остатка Phe замещены на Fer: [DL-Fer⁷]-SP, [DL-Fer⁸]-SP и [DL-Fer⁷, Ile⁸]-SP (схема 5.15) [73]. Для синтеза использовали рацемический Fer, что приводило к смесям диастереомеров, которые в данном случае не удалось разделить методом ВЭЖХ. Результаты, полученные при анализе связывания, показали пониженную активность пептида, содержащего ферроценилаланин, по сравнению с нативным SP, причем активность уменьшается в следующем порядке: [DL-Fer⁸]-SP ($2 \cdot 10^{-2}$ относительно SP) > [DL-Fer⁷]-SP ($3 \cdot 10^{-3}$ относительно SP) > [DL-Fer⁷, Ile⁸]-SP ($6 \cdot 10^{-4}$ относительно SP) .

Дополнительно к обсуждавшимся выше Fer-производным также были получены три металлоорганических производных SP, для синтеза которых использовали классический SPPS по Меррифилду. При этом N-концевую аминогруппу ацилировали под действием производного металлоценкарбоновой кислоты (схема 5.15) [78]. В отличие от представленного выше производного ферроценилаланина в случае ферроценоильного конъюгата **32** не наблюдалось заметного окисления или разложения при снятии с носителя под действием HF. Большая устойчивость **32** объясняется увеличением окислительного потенциала ферроценового ядра вследствие электроноакцепторного эффекта амидной группы. Исследование влияния структуры SP на активность показало, что только семь C-концевых аминокислот обуславливают биологическую

активность. В отличие от энкефалина, в котором N-концевая аминогруппа важна для связывания с рецептором, наличие свободной аминогруппы необязательно для проявления биологической активности в случае SP. Поэтому спазмогенная способность всех трех металлоценоильных производных близка к активности незамещенного SP ($0,93 \pm 0,10$ для **32** (Fc-CO), $0,51 \pm 0,10$ для **33** (Сум-CH₂-CO), и даже $1,32 \pm 0,10$ для **34** (3-Me-Сум-CO) по отношению к незамещенному SP), установленной при анализе подвздошной кишки морской свинки [78].

Алкиновые комплексы гексакабонилдикобальта представляют другой класс металлоорганических соединений, обладающих высокой стабильностью в физиологических условиях. Комплексообразование с алкином гладко протекает в мягких условиях при реакции с Co₂(CO)₈, сопровождающейся потерей двух молекул CO [79]. Жауэн и др. установили возможность применения этой реакции для синтеза пептидов при проведении реакции Co₂(CO)₈ с защищенной 2-амино-4-гексиновой кислотой (Aha) и дипептидами, в частности Boc-Phe-Aha-OMe и Ac-Aha-Phe-OMe [80]. Аналогичным образом были получены комплексы этих же алкинов, содержащие фрагмент Cr₂Mo₂(CO)₄. Показано, что С-концевой Met¹¹ в SP можно заменить аналогом без существенной потери физиологической активности. Это же справедливо для С-концевого Met¹⁰ в нейрокине А (NKA), другом пептидном гормоне группы тахикина (схема 5.16). Алкиновые аналоги SP и NKA получены при замене указанных остатков метионина на остатки норлейцинацетилена. Аналогично Lys² в NKA можно заменить алкиновым производным, которое

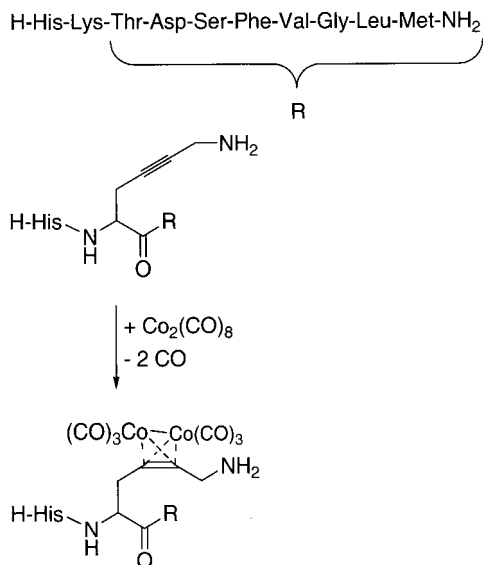


Схема 5.16. Первичная структура нейрокина А; модификация алкинового производного NKA под действием октакарбонилдикобальта

также может образовать комплекс с $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, как показано на схеме 5.16. Комплексообразование с $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ протекает с выходом 50% для всех производных [81]. После очистки методом ВЭЖХ эти кобальтсодержащие алкиновые пептиды всесторонне исследованы спектроскопическими методами. Характерно, что они проявляют типичное для карбониллов металлов ИК-поглощение в области 2000–2100 см^{-1} [3]. В последнее время наблюдается повышение интереса к комплексам вида $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ (алкин) благодаря их цитотоксичности [82–84].

5.3.2.2. Ангиотензин

Тартар и др. также исследовали группу родственных ангиотензину II (АТ II) соединений [85, 86]. Аминокислотную последовательность АТ II можно представить в виде $\text{H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH}$, где фенилаланин находится в положении 8. Этот октапептид вызывает значительное повышение кровяного давления у млекопитающих [87]. Некоторые производные ангиотензина II, такие как агонист $[\text{Asn}^1, \text{Val}^5]\text{-AT II}$ (Гипертензин[®]), нашли применение в медицинской практике. Препарат Гипертензин[®] используют для быстрой нормализации кровяного давления после шока или во время острой сердечной недостаточности. С другой стороны, антагонист $[\text{Sar}^1, \text{Val}^5, \text{Ala}^8]\text{-AT II}$ (Саралазин[®]) применяют при диагностировании зависимых от АТ II форм гипертонии. В табл. 5.2 приведен сравнительный анализ активности производных АТ II: производное ферроценилаланина $[\text{Sar}^1, \text{Fer}^8]\text{-AT II}$, производное цимантренилаланина $[\text{Sar}^1, \text{Cym}^8]\text{-AT II}$ и $[\text{Sar}^1, \text{Cym}(\text{PPh}_3)^8]\text{-AT II}$, в котором один карбонильный лиганд замещен на трифенилфосфин при действии ультрафиолетового света [86]. Синтез всех металлосодержащих аналогов АТ II проводился с использованием рацемических смесей аминокислот металлоценового ряда. Физиологические исследования на примере образцов аорты кролика осуществлялись после разделения диастереомеров с помощью ВЭЖХ [86]. Из данных табл. 5.2 следует, что по сравнению с саралазином

Таблица 5.2. Относительная биологическая активность металлоорганических производных ангиотензина II. Относительная биологическая активность выражена в % от ID_{50} относительно саралазина ($\text{ID}_{50} = 2,57$ нмоль), выбранного в качестве стандарта [86].

Производное ангиотензина II	Относительное сродство (L)	Относительное сродство (D)
$[\text{Sar}^1, \text{Val}^5, \text{Ala}^8]\text{-AT II}$ (саралазин)	100	–
$[\text{Sar}^1, \text{Phe}^8]\text{-AT II}$	Агонист	38
$[\text{Sar}^1, \text{Fer}^8]\text{-AT II}$	1,3	1,3
$[\text{Sar}^1, \text{Cym}^8]\text{-AT II}$	8,5	5,6
$[\text{Sar}^1, \text{Cym}(\text{PPh}_3)^8]\text{-AT II}$	12	7,8
$[\text{Sar}^1, \text{Car}^8]\text{-AT II}$	0,15	–

оба диастереомера Fer-аналога приблизительно в 100 раз менее активны. С другой стороны, в серии экспериментов с коровьими адренокортикальными мембранами установлено, что активность диастереомерной смеси составляет 6,1% по отношению к [Sar¹]-АТ II [85]. К сожалению, непонятно, преобладает ли в этом случае неожиданный аддитивный эффект, так как для индивидуальных диастереомеров данные отсутствуют. Однако даже в этом случае значение активности намного меньше, чем для производного [Sar¹, D-Phe⁸]-АТ II. Интересно, что диастереомер [Sar¹, L-Phe⁸]-АТ II является агонистом. Такое поведение не характерно для металлоценовых L-аналогов. Производное [Sar¹, Cym⁸]-АТ II обладает немного повышенным сродством, а между диастереомерами наблюдается некоторое различие. По-видимому, стерически более объемное ферроценильное производное уменьшает сродство к связыванию, а фрагмент Mn(CO)₃ лучше связывается с активным центром. Такое представление подтверждается очень низким сродством к связыванию для производного карборанилаланина [Sar¹, Car⁸]-АТ II, который является более объемным, чем производное ферроцена. С другой стороны, фотохимическое замещение одного СО-лиганда в Cym на PPh₃ приводит к значительному увеличению гидрофобности и стерического объема молекулы, хотя полученное соединение обладает бóльшим сродством. Эти результаты находятся в качественном соответствии с исследованиями соотношений структура – активность, которые доказывают, что положения 1–7 ответственны за специфичность, длительность и интенсивность биологического эффекта, в то время как остаток в положении 8 не оказывает влияния на эти параметры, но определяет, будет ли конкретное производное гормона агонистом или антагонистом. Эти результаты также согласуются с данными, приведенными выше для энкефалина, особенно с той точки зрения, что более предпочтительной является замена Phe на Cym, чем на Fer.

5.3.2.3. Брадикинин

Ферроценилаланиновые аналоги брадикинина, представленные на схеме 5.17, были получены той же исследовательской группой [73]. Нонапептид брадикинин (БК) представляет собой тканевый гормон, участвующий в процессе свертывания крови. Когда этот гормон образуется из своего предшественника кининогена, он вызывает понижение кровяного давления посредством расширения кровеносных сосудов [88, 89]. Каждый из остатков Phe в положениях 5 или 8 был замещен на DL-Fer, что привело к конъюгатам, представленным на схеме 5.17. Хотя разделение диастереомеров было осуществлено с помощью ВЭЖХ, установить их абсолютную конфигурацию не представлялось возможным. Кроме того, изучение связывания показало значительное уменьшение активности при замещении Phe на Fer. По отношению к незамещенному БК диастереомеры [Fer⁵]-БК обладали активностью $7 \cdot 10^{-2}$ и $3,5 \cdot 10^{-2}$, а [Fer⁸]-БК – $1,8 \cdot 10^{-2}$ и $1,7 \cdot 10^{-2}$. Эти результаты соответствуют тенденции, которую установил Кутюр и др. Они обнаружили, что введение такой объемной аминокислоты как карборанилаланин в положение 8 приводит к более

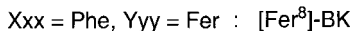
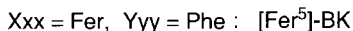
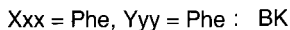
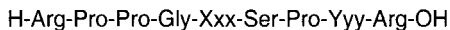


Схема 5.17. Металлоорганические аналоги брадикинина (BK)

сильному влиянию на активность, чем аналогичное замещение остатка Phe в положении 5 [90, 91]. Учитывая низкую активность диастереомерных [Fer]-BK аналогов, очевидно, что ферроценильный фрагмент слабо взаимодействует с рецептором.

5.3.2.4. Гонадотропин-рилизинг-фактор

Цимантренилаланин также был введен в состав гонадотропин-рилизинг-фактора (GnRH), также известного как рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH) (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) [69]. Установлено, что замена Gly в положении 6 на объемную гидрофобную аминокислоту приводит к увеличению биологической активности. В этом случае основную роль играет стереохимия. Так, [D-Phe⁶]GnRH в 10 раз более активен, чем GnRH [92]. Диастереомеры [Cym⁶]GnRH и [Cym(PPh₃)⁶]GnRH можно разделить с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе. В каждом из указанных случаев большей биологической активностью обладает менее подвижный изомер. По-видимому, следует предположить, что это D-изомер, это соответствует тому факту, что D-диастереомер металлоценсодержащего пептида обычно элюируется медленнее, чем L-диастереомер. С другой стороны, активность этих металлоорганических производных составляет только 147 ([Cym⁶]GnRH) и 193% ([Cym(PPh₃)⁶]GnRH) относительно GnRH. Хотя более гидрофобное трифенилфосфиновое производное действительно более активно, стерические препятствия также являются существенным фактором, что подтверждается более низкой активностью по отношению к [D-Phe⁶]GnRH. Интересно отметить, что замещение PPh₃ на Cym в пептиде нельзя провести с высоким выходом. Аминокислоту предпочтительнее получать путем облучения N-Вос-Cym-ОМе в присутствии избытка PPh₃ в среде бензол/циклогексан с последующим гидролизом сложного эфира. Возможно, однако, ввести Cym(PPh₃) в пептид с использованием твердофазного метода синтеза пептидов. Эту аминокислоту необходимо защитить от действия солнечного света.

5.3.2.5. Секретин

Фрагмент [CrRu]⁺ прочно связывается с ароматическим кольцом, например, с молекулой бензола. Подобное высокое сродство к ароматической системе было использовано для введения в состав аминокислот [CrRu]⁺, что представлено на схеме 5.18 [93–96]. Для мечения секретина Гротьян и др.

недавно установили, что эта реакция также высокоселективна в присутствии других пептидных цепочек, склонных к связыванию с металлом, таких как His, Ser, Arg или Glu [97, 98]. Секретин представляет собой желудочно-кишечный пептидный гормон, содержащий остатки 27 аминокислот. Молекулярная масса секретина ~3 кДа. Секретин содержит один остаток фенилаланина в положении 6 наряду с N-концевым His, четырьмя Arg, одним Asp и двумя Glu. Во время эксперимента по мечению комплекс **35** добавляют при комнатной температуре к водному раствору секретина, находящемуся в ампуле для ЯМР (схема 5.19). Через 8 ч при комнатной температуре был получен относительно чистый ЯМР спектр. Самым значительным является то, что сигналы фенилаланина в ароматической области сдвинулись в более сильное поле (химический сдвиг ~6,2 ppm), что является доказательством координации арена с $[\text{CrRu}]^+$ -фрагментом. Полученный конъюгат можно очистить с помощью ВЭЖХ и охарактеризовать методом ESI-MS. Дегградация Эдмана является дополнительным доказательством того, что произошло мечение именно фенильного кольца в Phe, так как пик фенилтиогидантоина Phe отсутствует в хроматограмме (ВЭЖХ) частично укороченного рутенийсодержащего секретина. Удивительным является сайт-специфичность этой реакции, протекающей при наличии еще более 25 амидных связей, карбоксилатных групп и даже имидазольного кольца His. Гротьян и др. наблюдали «эффект воды» в том, что миграция фрагмента $[\text{CrRu}]^+$ от первичного продукта с N-, S- или O-координацией к термодинамически более стабильному π -комплексу осуществляется значительно быстрее для секретина в воде, чем для модельных пептидов, таких как Boc-Phe-His-OMe, в среде вода/метанол. Еще один интересный пример

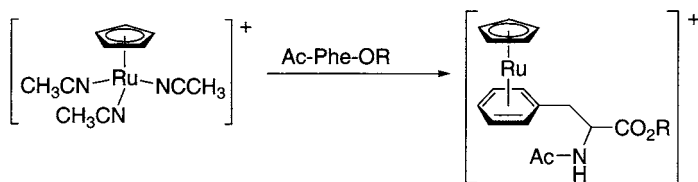


Схема 5.18. Координация фрагмента $[\text{CrRu}]^+$ с ароматическими аминокислотами, рассмотренная на примере реакции $[\text{CrRu}(\text{CH}_3\text{CN})_3]^+$ с фенилаланином

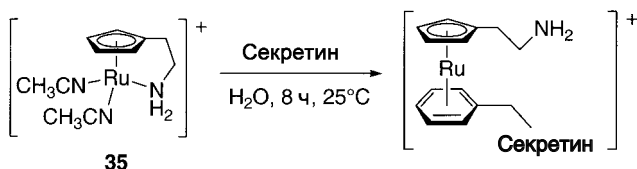


Схема 5.19. Введение метки $[\text{CrRu}]^+$ в боковую цепь секретина

применения ареновых комплексов Ru в синтезе (псевдо)пептидов будет обсуждаться ниже в разд. 5.5.2.3.

5.3.3. Металлоорганические производные других пептидов

5.3.3.1. Сигналы ядерной локализации

Необходимо отметить, что все производные металлоценов, рассматриваемые в этом разделе, представляют собой пептидные гормоны. Мецлер-Нольте и др. недавно начали проводить исследования, направленные на использование клеточных сигнальных пептидов для прямой доставки металлоорганических компонентов внутрь клетки. Получены металлоценоильные производные сигналов ядерной локализации (NLS) (схема 5.20) [99]. Конъюгаты NLS с N-концевой ферроценоильной **36** или кобальтоценовой карбонильной группой **37** синтезировали с использованием метода SPPS.

Разумный выбор подходящей защитной группы для боковых цепей, содержащих Lys и Arg, представляет большую сложность, особенно в сочетании с невысокой химической стабильностью металлоценов и доступностью носителей для SPPS. Для исследования проникновения в клетку и локализации в ядрах живых клеток также получены модифицированные производные **36** и **37**, содержащие связанный с пептидом флуоресцирующий краситель. Клеточную проницаемость и локализацию этих конъюгатов исследовали для различных клеточных линий с помощью флуоресцентной микроскопии.

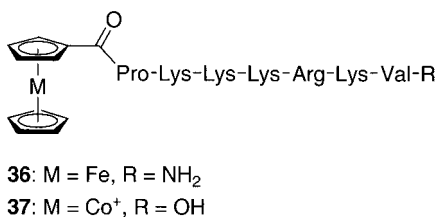


Схема 5.20. Два металлоценовых производных внутриклеточных сигнальных пептидов NLS

Эта работа представляет собой первый пример изучения внутриклеточной локализации металлоорганических производных пептидов с нерадиоактивными металлами (см. также разд. 5.5.3.2, где приведены примеры пептидов, меченных радиоактивными металлами и флуоресцирующими веществами).

5.3.3.2. Глутатион

Модификацию тиольных групп остатков цистеина в глутатионе (γ -глутамил-цистеинилглицине, GSH) осуществили под действием $\text{CrFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-N-сукцинимидата})$ **38** (схема 5.21) [100, 101]. Тиольная группа присоединяется к двойной связи сукцинимидата **38**, что показано на примере взаимодействия

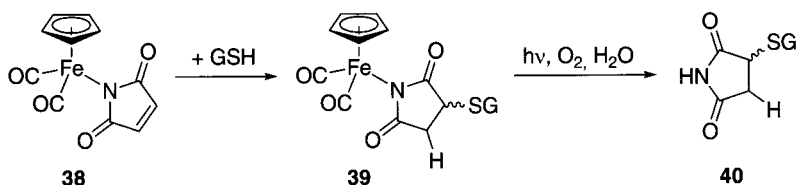


Схема 5.21. Введение метки $\text{CrFe}(\text{CO})_2$ (имидат) в глутатион под действием и фотохимическое разложение комплекса

с GSH. Аналогично результатам, описанным выше для защитной группы Fed (разд. 5.1.1), реакция не селективна для остатков цистеина. При более высоких значениях температуры и соотношения металл/белок с комплексом **38** также реагируют остатки лизина, что установлено в подробном исследовании реакционной способности **38** в реакции с бычьим сывороточным альбумином (BSA) [100]. Интересно отметить, что конъюгат глутатиона **39** (**38**-GS) оказался конкурентным ингибитором такого фермента как глутатион-(S)-трансфераза (GST). Этот фермент катализирует нуклеофильное присоединение глутатиона к электрофилам. В случае 1-хлор-2,4-динитробензола, выступающего в роли модельного электрофила, металлоорганический конъюгат **39** является конкурентным ингибитором с K_i приблизительно равной 30 мкМ (GST печени лошади) [101]. Напротив, конкурентный ингибитор (S)-гексилглутатион характеризовался $K_i = 1,1$ мкМ. При облучении видимым светом от обычной вольфрамовой лампы комплекс **39** разлагается. Образующийся при этом фрагмент **40** уже не является эффективным ингибитором GST. Проведенное исследование представляет собой первый пример того, что ингибирующее влияние на ферменты обусловлено присутствием в пептидной структуре металлоорганического фрагмента, причем ингибирующее влияние исчезает после фотохимического удаления этого фрагмента [101].

5.3.3.3. Ингибиторы папаина

Папаин представляет собой состоящую из 212 остатков аминокислот протеазу, выделенную из плодов папайи. Методом РСА установлена молекулярная структура нескольких ингибирующих папаин комплексов [102–104]. Кайзер и др. обнаружили, что действие папаина можно ингибировать с помощью тетрапептида H-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH [105]. Для ингибирования оптимальное значение pH составляет 6,2. Кроме того, ингибитор можно иммобилизовать на полимерном носителе, при этом не происходит уменьшения его сродства к связыванию с папаином. В целях разработки электрохимических сенсоров Краац и др. получили N-ферроценоилсодержащий пептид $\text{FcCO-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH}$ (**41**), при конденсации Woc-Gly-Gly-OH и $\text{H-Tyr(Bzl)-Arg(NO}_2\text{)-OMe}$ с последующим снятием Woc-защиты, связыванием с $\text{Fc-CO}_2\text{H}$, омылением сложного эфира и восстановительным удалением защитной группы под действием H_2 на Pd/C в среде $\text{MeOH/H}_2\text{O}$ (3:1) [106]. Сырой продукт выделили в чистом виде с помощью колоночной хроматографии, а затем всесторонне исследовали.

Соединение **41** действительно является конкурентным ингибитором папаина с константой ингибирования $K_i = 9$ мкМ при pH 6,2. По сравнению с результатами, полученными Кайзером, присутствие N-концевой ферроценоильной группы приводит к увеличению сродства к папаину. Значительные изменения на циклической вольтамперограмме **41** в присутствии папаина также могут служить подтверждением связывания этого соединения с папаином. Во-первых, наблюдается сдвиг катодной волны приблизительно на 30 мВ. Во-вторых, максимальный ток обеих волн уменьшается вследствие уменьшения коэффициента диффузии **41**, связанного с крупной молекулой папаина. И, наконец, увеличение в разнесении пиков связано с замедлением процесса переноса электрона от комплекса **41** с папаином к электроду. Та же научная группа исследовала перенос электрона в спиральных конъюгатах на основе ферроценоилолигопролинцистамина, связанных с поверхностью золота [107]. Весьма интересным представляется продолжение развития темы иммобилизованных на поверхности электрохимических белковых сенсоров на основе конъюгатов металлоценов с пептидами.

5.3.3.4. Аламетицин

Еще одно интересное применение электрохимических свойств ферроцена связано с формированием ионных каналов. Айзенталь и др. получили два ферроценоильных производных каналаобразующего белка аламетицина (ALM) [108]. Аламетицин продуцируется грибом *Trichoderma viride*; он относится к классу пептаиболов. Аламетицин самоорганизуется в липидном бислое, образуя таким образом зависимый от потенциала ионный канал [109–111]. Одни из производных были получены из ферроценкарбоновой кислоты, в то время как другие – из 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты. По этой причине соединения различаются заместителями в циклопентадиенильном кольце; одни соединения характеризуются незамещенным Ср-кольцом ($R = H$), а прочие содержат фрагмент η -C₅H₄-COOH (схема 5.22). В обоих случаях ферроценоильные фрагменты присоединены через сложноэфирную группу к С-концу пептида, состоящего из 20 аминокислот. Это один из редких примеров модификации С-концевой аминокислоты.

В восстановленной (нейтральной) форме оба ферроценоильных производных аламетицина образуют потенциалозависимые каналы в планарных липидных бислоях при положительных потенциалах, причем электропроводящие свойства данных соединений аналогичны немодифицированному аламетицину. Когда они встраиваются в липидный бислой, окисление

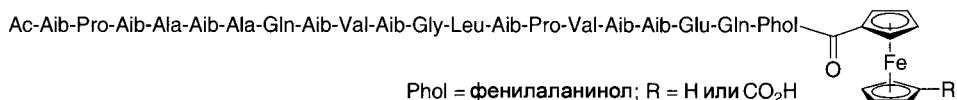


Схема 5.22. Ферроценсодержащее производное аламетицина. Необходимо заметить, что ферроценоильная группа связана с С-концевым атомом посредством образования сложного эфира

ферроценоилпептида ALM-CO-CpFe(Cp-COOH) приводит к быстро закрывающемуся каналу, в то время как окисление ALM-CO-Fe вызывает зависящее от времени открытие канала щели, которое можно изменять при увеличении межслойного потенциала. Предварительная обработка ферроценоилпептидов окислителями меняет их одноканальные свойства похожим образом.

5.3.3.5. Другие производные

Помимо ферроценилаланина описаны также дизамещенные производные 1,1'-ферроценил-бис-аланина **42** (схема 5.23) [68, 112–117]. Используя весьма сложный синтетический подход, Фрейд и др. получили энантиомерно чистое производное 1,1'-ферроценил-бис-аланина **43**, содержащее четыре защитные группы (схема 5.24) [115–118]. Каталитическим гидрированием

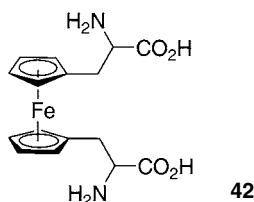


Схема 5.23. Химическая формула 1,1'-ферроценил-бис-аланина

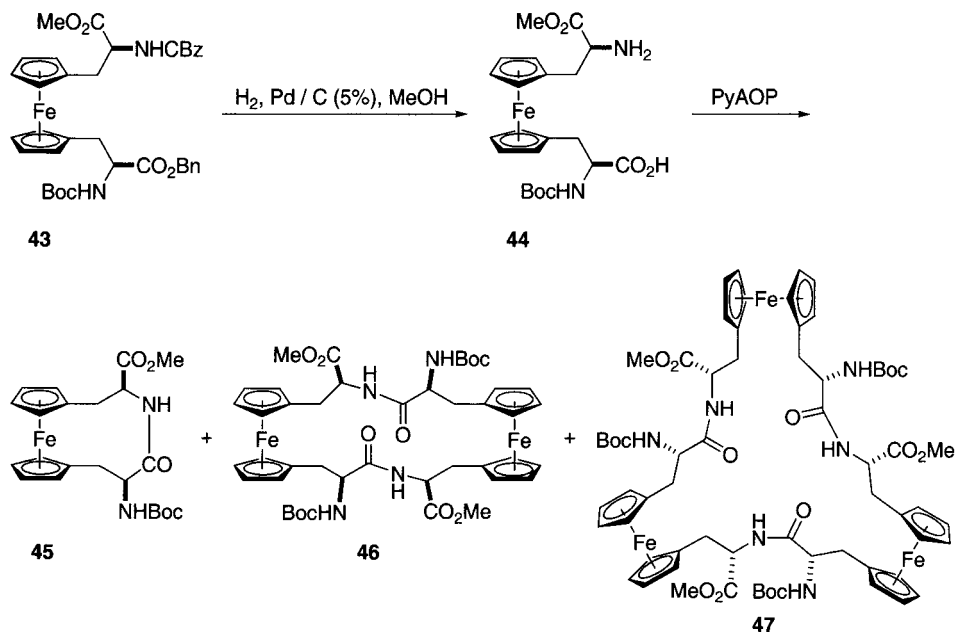


Схема 5.24. Синтез метилового эфира N-Бос-1,1'-ферроценил-бис-аланина (**44**) и образование циклических пептидов

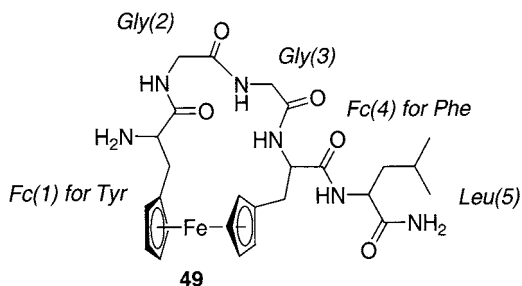
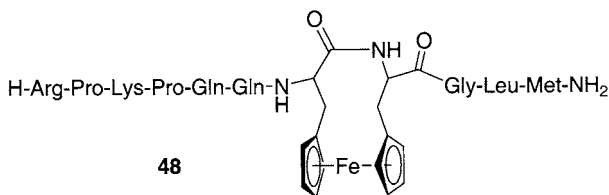


Схема 5.25. Введение производного 1,1'-ферроцен-бис-аланина **42** в качестве аналога дипептида в вещество *P* (вверху, **48**) и энкефалин (внизу, **49**)

оптически чистое **43** легко превращается в (*S,S*)-**44**. Это соединение представляет собой метиловый эфир N-Вос-1,1'-ферроцен-бис-аланина, в котором присутствуют свободные карбоксильная и аминогруппа. В реакции образования пептидной связи при взаимодействии **44** с реагентом РуАОР* получают смесь, состоящую из 1,1'-ферроценофанового лактама **45** и двух макроциклических пептидов – димера **46** и тримера **47** [118].

Фрейд и др. использовали затем лактам **45** в качестве структурного аналога Н-Phe-Phe-ОН в пептидах [116]. Предполагали, что полученный конъюгат **48** должен действовать как структурный аналог вещества Р (SP) (схема 5.25). Однако данные КД показали, что ограничения, наложенные 1,1'-ферроценофаном, мешают пептиду принять характерную α-спиральную структуру, типичную для немодифицированного SP в биомиметической мицеллярной среде SDS (*n*-додецилсульфат натрия). В другой статье Фрейд и сотрудники получили аналог [Leu⁵]-энкефалина, в котором Н-Tyr-Gly-Gly-Phe-фрагмент замещен на замкнутый в цикл остаток Gly-Gly-1,1'-ферроцен-бис-аланина (**49**, схема 5.25) [117]. Ср-кольцо ферроценового фрагмента в этом структурно жестком соединении представляет собой заместитель фенольного (Tyr) и фенильного (Phe) колец. Данные ЯМР-исследований показали, что этот конъюгат характеризуется наличием водородной связи между группами CO и NH разных колец Fe. Подобную структуру можно рассматривать в качестве модельной для немодифицированного [Leu⁵]-энкефалина, находящегося в однократно загнутой конформации, которая стабилизирована β-изгибом [119, 120]. К сожалению, исследования связывания этого соединения с опиоидными рецепторами еще не проводились.

* Гексафторфосфат (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинфосфония.

5.3.4. Ферментативное разложение металлоорганических производных пептидов

Была исследована устойчивость двух металлоорганических производных пентапептида H-Lys-Gly-Phe-Gln-Gly-ОН по отношению к гидролитическому разложению под действием химотрипсина [73]. Химотрипсин наряду с трипсином и эластазой относится к классу серинпротеаз. В организме человека он вырабатывается в поджелудочной железе. Высокая селективность фермента химотрипсина по расщеплению пептидных связей, следующих за ароматическими аминокислотами Phe, Trp или Tyr, объясняется на основании анализа данных РСА структуры бычьего химотрипсина [121, 122]. Ароматическую аминокислоту Phe заменили на Fer и Cym, что привело к пептидам H-Lys-Gly-Fer-Gln-Gly-ОН и Lys-Gly-Cym-Gln-Gly-ОН соответственно. При действии химотрипсина природный Phe-содержащий пентапептид гидролизуетс \bar{a} с $K_m = 3,85$ мМ, в то время как Fer-аналог стабилен и не гидролизуетс \bar{a} вовсе. Интересно, что аналог, содержащий неприродную аминокислоту цимантренилаланин, гидролизуетс \bar{a} , хотя и с меньшим сродством ($K_m = 37$ мМ, но с неизменной V_{max}), чем природное Phe-производное [73].

5.4. Конъюгаты металлоорганических соединений с ПНК

5.4.1. Конъюгаты мономеров ПНК

Пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) представляют собой группу аналогов ДНК, обладающих перспективными свойствами для применения в молекулярной биотехнологии и медицине. В ПНК в отличие от ДНК фосфорилированные остатки дезоксирибозы замещены псевдопептидным остовом (схема 5.26). Нуклеиновые основания связаны с этим остовом через карбоксиметиленовые мостики [123, 124]. Таким образом, химически ПНК больше похожи на пептиды, чем на ДНК. Именно поэтому ПНК рассматриваются в этой главе. В то же время топологически ПНК аналогичны ДНК и РНК [125]. ПНК связывается с комплементарными олигомерами ДНК или РНК в соответствии с правилами Уотсона–Крика, образуя высокостабильные соединения [126–129]. В отличие от гомологической ДНК, представляющей собой двойную спираль, в интервале температуры 1–3°С для дуплекса ПНК · ДНК наблюдается повышение стабильности в расчете на комплементарную пару оснований в соответствии с температурой плавления ($УФ-T_m$). Это значение, конечно же, сильно зависит от длины и аминокислотной последовательности используемого олигомера ПНК. Кроме того, в отличие от ДНК, имеющей строение двойной спирали, ПНК характеризуется большей чувствительностью к ошибочному спариванию с некомплементарной ДНК [130, 131]. Наличие таких ценных свойств привело к широкому применению олигомеров ПНК в биотехнологии, а также их использованию в качестве

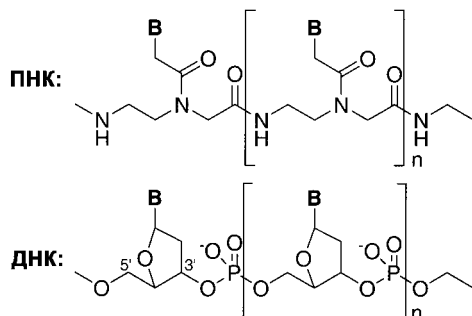


Схема 5.26. Аналогия между ПНК (вверху) и ДНК (внизу). В обозначает нуклеиновое основание аденин (А), цитозин (Ц), гуанин (Г) и тимин (Т, ДНК) или урацил (У, РНК)

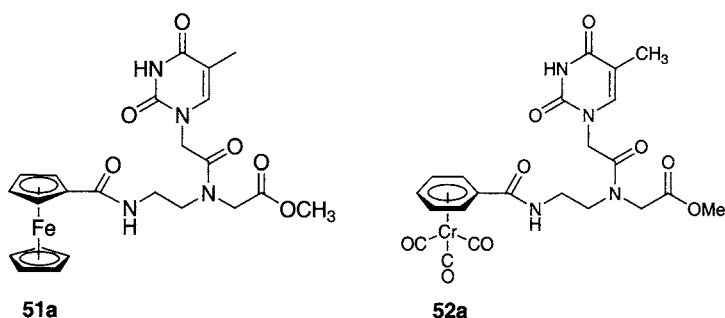


Схема 5.27. Два примера мономерных Т-ПНК. Получены также производные, содержащие другие нуклеиновые основания (см. текст).

антисмысловых агентов [132–136]. В настоящее время описано большое количество различных по структуре ПНК [137].

Мецлер-Нольте и др. получили первое металлоорганическое производное мономера ПНК [138]. Ферроценкарбоновую кислоту **3** и карбоксибензол(трикарбонил)хром **50** связывали с аминогруппами мономеров ПНК под действием НВТУ* как связывающего агента, что приводило соответственно к соединениям **51** и **52**. Необходимо отметить, что ПНК в этом случае содержат также остатки нуклеиновых оснований (Тимин (Т) **a** и Z-защищенный цитозин (Z-Ц) **b**) (схема 5.27). В производном Т-ПНК **51a** барьер активации ΔG^\ddagger для вращения вокруг связи N–CO, образованной вторичным амином, составляет $75 \pm 0,5$ кДж/моль. Для того же соединения **51a** методом ЯМР ^1H в экспериментах по разбавления в CDCl_3 установили константу Т–Т самоассоциации $K_{\text{TT}} = 2,5 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}$. Интересно, что константа ассоциации K_{AT} для обычной А–Т пары оснований по Уотсону–Крику, измеренная тем же методом, составляет $78 \pm 9 \text{ M}^{-1}$

* *o*-Бензотриазол-1-ил-N,N,N',N'-тетраметилурионгексафосфат.

(в сухом CDCl_3) при использовании **51a** и трис(изопропил)аденозина в качестве растворимого производного аденина. В настоящее время в научной литературе описаны только эти значения констант ассоциации для ПНК [139]. В пределах эксперимента оба значения хорошо согласуются с литературными данными для оснований ДНК. Это означает, следующее: а) не возникает дополнительной стабилизации или дестабилизации при спаривании оснований с участием амидного фрагмента ПНК; б) спаривание оснований по Уотсону–Крику не ослабляется при введении остатка металлоцена по концевому атому N.

Представляется также возможным синтез мономеров ПНК, содержащих металлоорганический фрагмент на С-концевом атоме. Полученное на основе ферроцена производное вторичного амина, которое использовали для синтеза биметаллических производных пептидов **5** и **6** (см. выше), присоединяли к С-концу мономера N-Fmoc-T-ПНК, что приводило к **54** (схема 5.28). Защитную группу N-Fmoc легко удаляют в мягких условиях, в результате чего становится вероятным введение второго мономера Т-ПНК. Данная модификация приводит к получению ферроценилированного димера ПНК **55** [139].

Алкиновая группа представляет собой широко используемый лиганд для связывания металлоорганического фрагмента, как уже было показано в разд. 5.3.2.1. Мецлер-Нольте и др. получили алкиновое производное Т-ПНК **56**. При добавлении $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ образуются темно-красные кристаллы комплекса $\text{Co}_2(\text{алкин})(\text{CO})_6$ **57** (схема 5.29) [139]. Это соединение однозначно охарактеризовано методами ЯМР и масс-спектрометрии. Типичные полосы группы $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ проявляются в ИК спектре **57** при 2018 и 2093 см^{-1} . Исходя из **56**, также получено первое биметаллическое производное мономера ПНК (схема 5.29). После удаления Вос-защиты **56** связывали с ферроценкарбоновой кислотой, что приводило к образованию ферроценоилалкиновому производному Т-ПНК **58**. Координация фрагмента $\text{Pt}(\text{PPh}_3)_2$ с **58** дает в результате биметаллический ферроцен-Pt мономер ПНК **59**, всесторонне охарактеризованный спектральными методами [139]. Необходимо отметить, что это соединение обладает отличительным спектром ЯМР ^{31}P вследствие спин-спинового взаимодействия двух неэквивалентных ядер ^{31}P и ядра Pt. Кроме того, данные сигналы расщепляются на два благодаря вращению вокруг центральной амидной связи, которая связывает нуклеиновое основание с остовом ПНК. Указанный процесс вращения является весьма медленным, поэтому для всех сигналов наблюдается типичная картина присутствия мажорного/минорного изомеров.

Бальдоли, Ликандро, Майорана и др. также выделили весьма интересный металлоорганический мономер ПНК [140–142]. Четырехкомпонентную реакцию Уги (U-4CR , см. также ниже в разд. 5.5.2.2) использовали для получения металлоорганической мономерной ПНК **60** в ходе «in one-pot» синтеза, что привело к продукту с 20% выходом (схема 5.30, $\text{R} = \text{H}$) [140]. Выход можно увеличить до 50%, если использовать в реакции конденсации непосредственно бензальдимин, полученный из бензальдегид(трикарбонил)хрома и защищенного группой Cbz

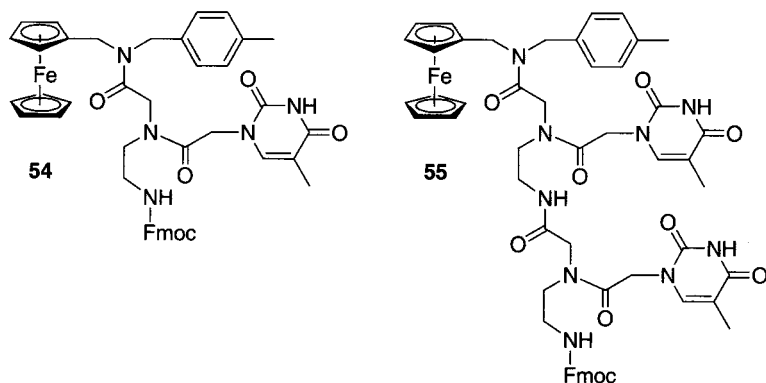


Схема 5.28. Производные ПНК, меченные металлоорганическими фрагментами по С-концу

этилендиамина. Ранее реакцию Ути применяли для получения мономерных ПНК [143, 144]. Хиральные комплексы бензальдегид(трикарбонил)хрома легко доступны в энантимерно чистой форме, а их применение в синтезе обычно приводит к высокой стереоселективности. Исключительно интересным представлялось получение хирального металлоорганического мономера ПНК в ходе асимметрического «in one-pot» синтеза при использовании

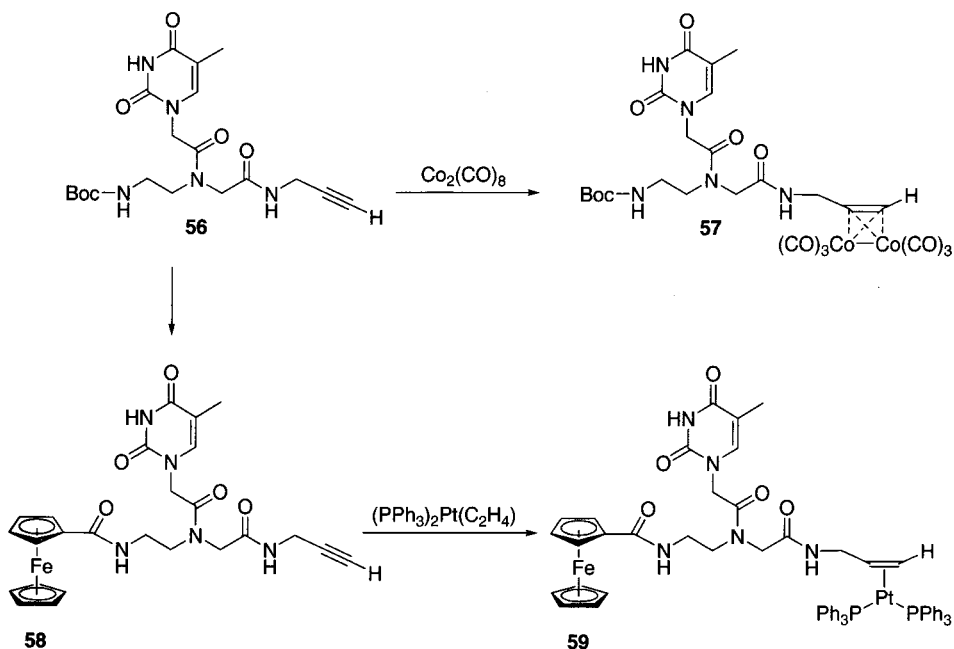


Схема 5.29. Производное ПНК (56), содержащее алкиновый фрагмент, его комплекс с $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ (57, *вверху справа*) и первый биметаллический мономер ПНК (59, *внизу справа*)

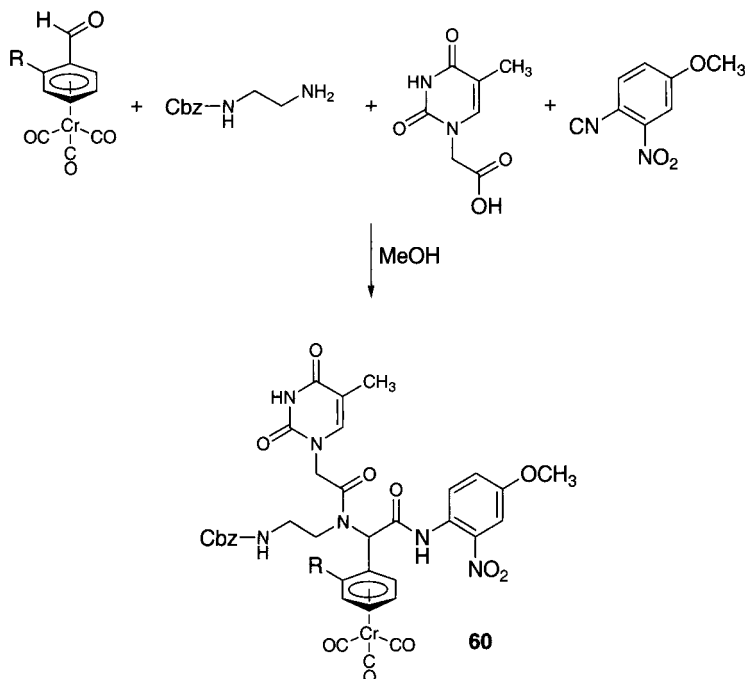


Схема 5.30. Получение металлоорганических мономерных ПНК в ходе четырехкомпонентной реакции Уги. Соединение является хиральным, если $R \neq H$

энантимерно чистого производного бензальдегид(трикарбонил)хрома ($R \neq H$). К сожалению, в данных экспериментальных условиях получили почти эквимольное соотношение двух диастереомеров, независимо от заместителя R [140]. Следует заметить, что эти диастереомеры можно разделить колоночной хроматографией, что приводит к впервые полученным энантимерно чистым металлоорганическим мономерам ПНК. Совсем недавно приведенную выше последовательность превращений применили для синтеза металлоорганических димеров ПНК, например, **62**. Это соединение получено в ходе изящного синтеза непосредственно из бензальдимин(трикарбонил)хрома, тиминуксусной кислоты и изонитрила мономера ПНК **61** (схема 5.31) [142]. Хотя в оригинальной работе был получен только *tt*-димер, указанная последовательность реакций, безусловно, применима в комбинаторной химии, что может привести ко всевозможным комбинациям.

Недавно та же научная группа описала применение реакций Ru-катализируемого кросс-метатезиса для получения мономерных ПНК, содержащих фрагмент карбена Фишера (схема 5.32) [141]. Из рацемического аллилглицина получена соответствующая мономерная ПНК **63**, которую позже вводили в катализируемую металлом реакцию метатезиса с карбеновым комплексом $Cr(CO)_4$ **64**. Целевая мономерная ПНК **65** получена с 40% выходом. Так как оба энантиомера аллилглицина коммерчески доступны, приведенную

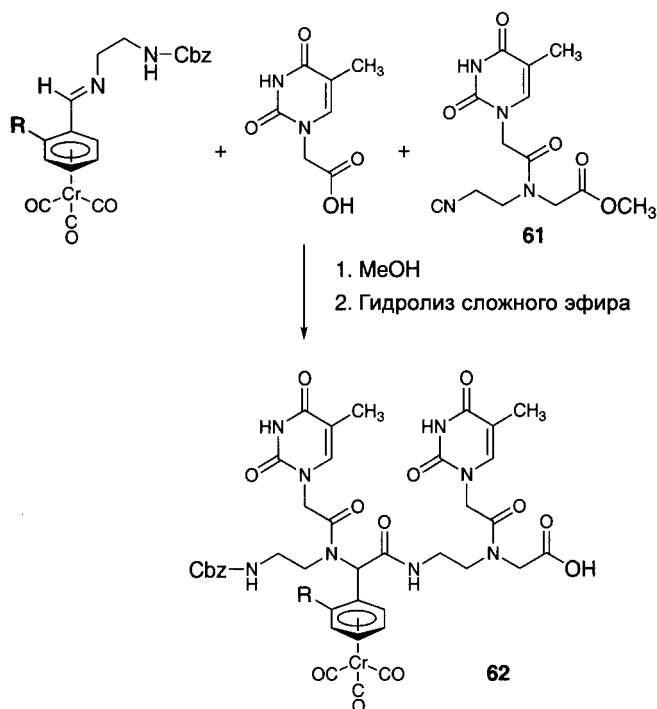


Схема 5.31. Синтез металлоорганических димерных ПНК в ходе четырехкомпонентной реакции Уги

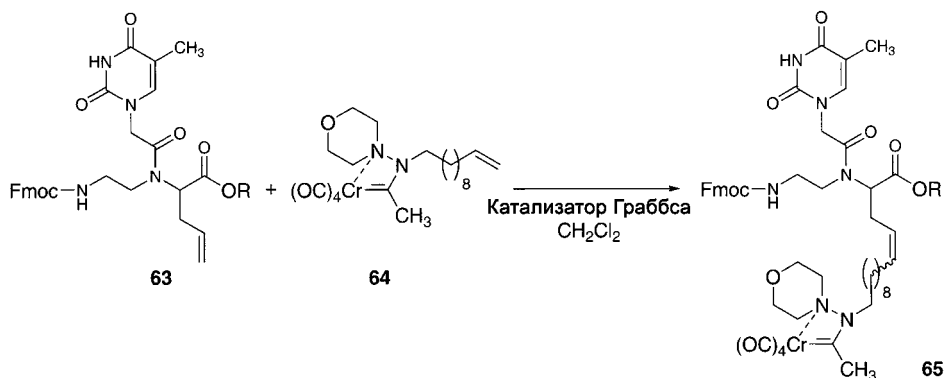


Схема 5.32. Применение реакции метатезиса алкенов для синтеза мономерных ПНК, содержащих фрагмент карбенового комплекса хрома

последовательность реакций можно рассматривать в качестве альтернативного подхода к синтезу энантиомерно чистых хиральных металлоорганических мономерных ПНК. В случае органических олигомерных ПНК установлено,

что хиральность остова ПНК действительно может влиять на стабильность и строение дуплекса ПНК · ДНК [145–147].

5.4.2. Конъюгаты олигомеров ПНК

Мецлер-Нольте и др. получили первое металлоорганическое производное олигомерной ПНК [148, 149]. Первоначально ферроценкарбоновую кислоту и карбоксибензол(трикарбонил)хром вводили в состав олигомерных ПНК с помощью твердофазного синтеза пептидов [148]. Гептамер пептидной нуклеиновой кислоты H-tgg atc g-Gly [*Замечание:* в соответствии с общепринятыми сокращениями для кодирования ПНК используются те же четыре буквы, что и в случае ДНК.] получили на твердом носителе с использованием стандартного синтеза Fmoc-ПНК. После удаления последней защитной группы Fmoc гептамер вводили в реакцию с активированной ферроценкарбоновой кислотой или карбоксибензол(трикарбонил)хромом, связанными с полимерным носителем. Снятие с носителя осуществляли при действии раствора аммиака в метаноле, при этом происходило одновременное удаление экзоциклических защитных групп. С помощью ВЭЖХ на обращенной фазе установили, что реакционная смесь содержит только одно соединение (>90%). Несмотря на то, что конъюгат Fc-CO-tgg atc g-Gly-NH₂ **66** выделили в чистом виде с помощью ВЭЖХ, и как показано масс-спектрометрически, соединение имеет требуемую массу, хромтрикарбонильное производное нельзя получить в чистом виде.

По сравнению с трис(бипиридил)Ru и ацетильным производным той же серии [148] **66** значительно менее гидрофильно и, соответственно, плохо растворимо в водных средах. С того времени Мецлер-Нольте и др. также изучили введение кобальтоценийкарбоновой кислоты в олигомерные ПНК с использованием твердофазного синтеза [149]. Кобальтоцений и ферроцен почти идентичны по структуре. Первый, однако, имеет положительный заряд, поэтому следует ожидать, что конъюгаты ПНК на основе кобальтоцения более растворимы в воде, чем гомологичные производные ферроцена. Продолжая начальные исследования по оптимизации условий связывания и удаления защитных групп для малых олигомеров, твердофазным синтезом удалось получить декамер $\text{CrCo}^+\text{C}_5\text{H}_4\text{-CO-acc ctg tta t-Lys-OH}$ **67**. Этот конъюгат, который можно очистить препаративной ВЭЖХ, охарактеризован методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Квадратноволновая вольтамперограмма указывает на присутствие кобальтоцениевого фрагмента, что проявляется в наличии обратимой волны при $-1,51$ В (по отношению к FcH/FcH⁺). Данный конъюгат также исследовали в реакции с комплементарной ДНК. Так, температура плавления двухцепочечной молекулы, полученной на основе 18-звенной ДНК, содержащей комплементарную последовательность, оказалась 46,2°C. По сравнению с ацилированной ПНК той же длины и последовательности для кобальтоцениевого конъюгата **67** наблюдается незначительная стабилизация (на ~1°C), что может быть связано с силами притяжения между положительно заряженной группой кобальтоцения и отрицательно заряженной цепью ДНК [149].

5.5. Применение

5.5.1. Металлоорганические защитные группы для пептидного синтеза

5.5.1.1. Ферроценсодержащие защитные группы

Экерт и др. внедрили в синтетическую практику ферроценилметильную (Fem) группу, которая представляет собой липофильный заместитель, маскирующий сильно полярный глицинамидный фрагмент в ходе пептидного синтеза в растворе [150–152]. Fem-защищенный глицин (см. схему 5.33) можно синтезировать посредством образования имина глицина с ферроценкарбальдегидом с его последующим восстановлением. Пептидное связывание этого модифицированного глицина с другими аминокислотами или пептидными фрагментами легко осуществимо при использовании стандартного карбодиимидного метода, применяемого для синтеза пептидов в растворе [153, 154]. Использование этого маскированного производного глицина для пептидного синтеза в растворе имеет ряд преимуществ. Во-первых, полупродукты и целевые вещества обладают повышенной растворимостью в неполярных органических растворителях, что является следствием наличия в молекуле липофильной Fem-группы. Это приводит к завершению реакций и повышению выходов. Кроме того, возможна хроматографическая очистка на силикагеле, так как продукты реакции можно элюировать малополярными смесями растворителей. Во-вторых, ферроценовый хромофор, присутствующий в полупродуктах и конечных веществах, облегчает идентификацию продуктов и выделение во время хроматографической очистки. В-третьих, растущий пептид менее склонен к рацемизации в ходе стадий наращивания цепи, когда он постепенно удлиняется с С-конца. Удаляют Fem-группу только после получения требуемой аминокислотной последовательности. Снятие защиты происходит под действием трифторуксусной кислоты/β-тионафтола в CH_2Cl_2 при комнатной температуре в течение 2–4 ч. В этих условиях также удаляются Вос- и *трет*-бутильная защитные группы [150–152]. Преимущества использования Fem-Gly-производных для пептидного синтеза в растворе иллюстрируются успешным синтезом [Leu⁵]-энкефалина и H-(Gly)₆-OH в растворе [152]. Аналогичным образом Fem-группу также применяли в качестве защиты для остатков Asn [151] и Cys [155, 156] в пептидном синтезе.

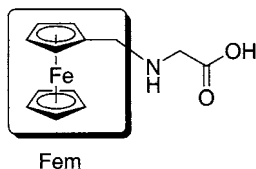
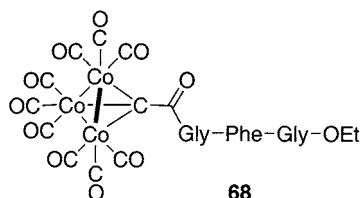


Схема 5.33. Ферроценилметилглицин. Ферроценилметильная (Fem) группа выделена

Кан-Магир и др. предложили использовать (трикарбонил)железоциклогексациенильный катион ($[\text{Fe}(\text{CO})_3(\text{C}_6\text{H}_7)]^+$, Fed) в качестве альтернативы защитной группе Fem [157]. Fed-группу можно использовать как маскирующую для концевой аминогруппы в пептидном синтезе, упрощая таким образом очистку пептида [157]. Данную группу можно легко удалить под действием трифторуксусной кислоты, при этом реагент $[\text{Fe}(\text{CO})_3(\text{C}_6\text{H}_7)]^+$ регенерируется. В аминокислоты Fed-группу легко ввести с помощью реакции этого катиона с нуклеофильным субстратом, таким как указанная выше концевая аминогруппа. Для этого превращения можно составить следующий ряд изменения реакционной способности: $-\text{SH}$ (Cys) $>$ $-\text{N}=\text{}$ (His) $>$ CO_2^- (Glu) \gg NH_2 ($\alpha\text{-NH}_2$ для любой аминокислоты или $\varepsilon\text{-NH}_2$ для Lys), $-\text{OH}$ (Ser), $-\text{CONH}$ (Asp) [158]. Следовательно, именно эта группа является наиболее подходящей для селективного мечения или защиты боковых цепей Cys или His. Например, Fed образует аддукт с трипептидом глутатионом ($\gamma\text{-Gly-Cys-Glu}$) при pH 3,1 (изоэлектрическая точка глутатиона) в течение нескольких минут, причем аддукт выпадает в чистом виде из раствора. Сравнительный эксперимент, проведенный с Cys-11 производным рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys-OH, см. разд. 5.3.2.4), подчеркнул селективность Fed. Эксперименты ЯМР подтвердили селективность реакции с тиольной группой, относящейся к C-концевому Cys, а также отсутствие реакции с имидазольным кольцом His [158]. Механизм присоединения этого реагента к сложным эфирам аминокислот подробно исследован [159].

5.5.1.2. Защитные группы на основе аминокарбенов

В настоящее время металлоорганические фрагменты находят широкое применение в качестве защиты для аминогрупп. Трикобальт(нонакарбонил)ацилиевый катион $[(\text{OC})_9\text{Co}_3\text{CCO}]^+$ реагирует с аминогруппой аминокислот и пептидов. В одной из таких реакций образуется производное кобальта **68** (схема 5.34) [160]. Металлический кластер в **68** можно рассматривать как защиту аминогруппы или как N-концевую метку, содержащую карбонил металла. К сожалению, исследование дальнейших превращений этой группы не были проведены. Лукехарт и др. предложили использовать β -кетоимины рения в качестве содержащих тяжелые атомы меток при кристаллографическом исследовании белков [161]. Одно из таких соединений получили при реакции рена- β -дикетона с этиловым эфиром глицина.



68

Схема 5.34. Трипептид, содержащий N-концевую группу октакарбонилтрикобальта

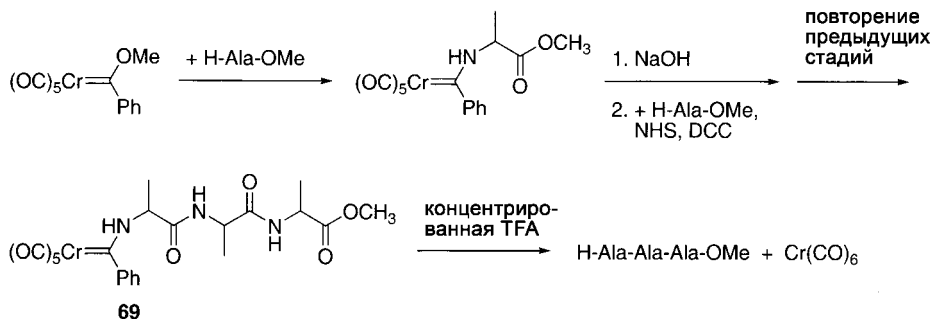


Схема 5.35. Пептидный синтез в растворе с использованием металлкарбеновой защитной группы на примере синтеза трипептида Ala-Ala-Ala-OMe

Аминолиз метоксикарбеновых комплексов пентакарбониллов металлов подгруппы хрома приводит к аминокарбеновым соединениям. Если осуществлять аминолиз сложных эфиров аминокислот, то можно получить аминокарбеновые производные аминокислот [162, 163]. Карбены металлов относительно стабильны в различных условиях, однако их легко удалить при действии трифторуксусной кислоты. Поэтому данные группы рассматривают как защитные для аминогрупп в пептидном синтезе. Аминокислоту, содержащую фрагмент аминокарбена металла, можно активировать и ввести в пептидный синтез со сложным эфиром другой аминокислоты. В соответствии с вышеизложенным Вайс и Фишер получили различные дипептиды, трипептид $(\text{OC})_5\text{Cr}(\text{Ph})\text{-Ala-Ala-Ala-OMe}$ **69** [162] и тетрапептид $(\text{OC})_5\text{Cr}(\text{Ph})\text{-Gly-Gly-Pro-Gly-OMe}$ **70** (схема 5.35) [163]. Обработка концентрированной трифторуксусной кислотой при 20°C в течение 10 мин сопровождается удалением металлкарбеновой группы и приводит к эфиру пептида и $\text{Cr}(\text{CO})_6$. Удаление металлкарбенового фрагмента также возможно под действием 80% уксусной кислоты (80°C, 30 мин), при этом защитная группа Вос не затрагивается. Кроме того, действие BBr_3 на аминокарбен пентакарбонилвольфрама также приводит к сложному эфиру аминокислоты или пептида наряду с *транс*-бром(тетракарбонил)фенилкарбеном вольфрама $(\text{OC})_4\text{W}(\text{Br})\text{CPh}$ [163].

Недавно Хегедус и др. на основании описанного подхода разработали уникальный метод синтеза неприродных аминокислот [164]. Фотолиз аминокарбена пентакарбонилхрома **71** приводит к образованию реакционноспособного металлосодержащего аминокетена **72**. Интермедиат **72** реагирует со сложным эфиром аминокислоты с образованием дипептида **73**. В этой реакции одновременно образуются новая пептидная связь и стереогенный центр в появившейся N-концевой аминокислоте (схема 5.36). Применение подходящей хиральной вспомогательной группы на аминокарбеновом атоме в общем приводит к энантиомерной чистоте >95%* для нового стерео-

* Имеется в виду диастереоселективность реакции. – Прим. перев.

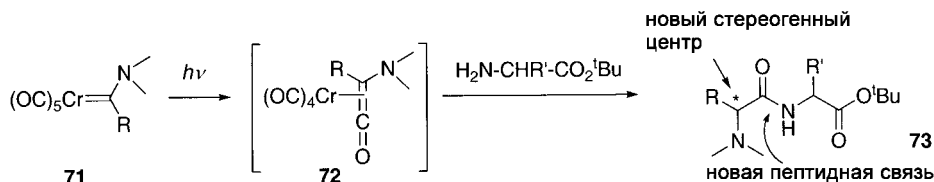


Схема 5.36. Стереоконтролируемое образование пептида при фотолизе аминокрбена хрома

генного атома углерода. Можно также провести подобные реакции на полимерных носителях с использованием метода SPPS. Однако технические сложности при фотохимических реакциях на твердой подложке заставляют осуществлять этот процесс все же именно в растворе. Этот метод особенно удобно использовать для синтеза неприродных аминокислот, которые образуются в ходе пептидного синтеза. Согласно Хегедусу, идеальное применение этой методологии заключается, по-видимому, в сегментной конденсации полипептидов. Комплексы карбена хрома применяют для синтеза в растворе малых необычных пептидных фрагментов, которые затем вводятся в состав больших пептидов с использованием стандартного метода SPPS [164]. Одним из успешных примеров использования этого подхода является синтез октапептида Boc-Gly-Ala-*D*-(гомо-Phe)-*D*-Ala-Phe-Val-Leu-Gly-OMe (гомо-Phe – гомо-фенилаланин) [165]. В этом соединении центральный трипептид *D*-(гомо-Phe)-*D*-Ala-Phe (выделен) синтезирован в растворе при фотохимическом разложении производного карбена хрома. Его добавляли к трипептиду Val-Leu-Gly, связанному с полимерным носителем, и синтез завершался после введения методом SPPS двух N-концевых аминокислот. Сырой продукт получают с выходом 72% в расчете на содержащий карбен хрома трипептид. В дальнейшем его можно легко очистить и охарактеризовать.

5.5.2 Пептидный синтез

Почти во всех представленных выше разделах пептиды синтезировали с помощью реакций активированной карбоновой кислоты с амином. Во многих случаях карбоновая кислота на самом деле входит в состав металлоорганического фрагмента, приводя таким образом к металлоорганическому пептидному или ПНК-конъюгату. Эту реакцию также можно проводить с использованием твердой подложки как одну из стадий стандартного твердофазного синтеза пептидов. Однако синтез пептидов также можно осуществить принципиально другими реакциями. В следующих разделах будут обсуждаться три разные стратегии. Безусловно, они не столь глубоко разработаны, как методы SPPS, но представляют собой концептуально привлекательные альтернативы. Во всех случаях металлоорганические соединения играют ключевую роль и как катализаторы, а как хиральные вспомогательные вещества. Другой общий признак заключается в том, что металлоорганические интермедиаты были выделены и охарактеризо-

ваны по меньшей мере в нескольких случаях, и поэтому с уверенностью можно говорить о синтезе металлоорганических пептидных конъюгатов. Существует множество других методов получения аминокислот и простых дипептидов с использованием металлоорганических соединений в качестве катализаторов или вспомогательных веществ. Как отмечено во введении, в данной главе эти случаи не рассматриваются.

5.5.2.1. Темплатный синтез пептидов с использованием металлоорганических соединений

Проведение реакций конденсации пептидов в координационной сфере металлов было предложено в 1967 г. [166–168]. Хотя этот подход и представляет собой привлекательную альтернативу стандартному пептидному синтезу, проводимому в растворе, ему никогда не уделяли особого внимания. Почти 30 лет спустя Бек и др. разработали проводимый в растворе пептидный метод синтеза с использованием Rh, Ir и Ru, специфичный к последовательности аминокислот [169–175]. В этой реакции N,N'-координированные пептиды удлиняются по N-концу посредством конденсации со сложными эфирами аминокислот. На схеме 5.37 приведена предполагаемая последовательность реакций [171]. Необходимо отметить, что для образования пептидной связи в этом случае не требуется применение активирующих реагентов или защитных групп. Ключевая стадия представляет собой нуклеофильную атаку депротонированной концевой аминогруппы на карбонильную группу сложного эфира. Повторное присоединение сложного эфира аминокислоты приведет к росту пептида в координационной сфере металла. В заключение пептид снимают с темплата под действием раствора HCl в метаноле. Несколько полупродуктов было выделено и охарактеризовано как спектрально, так и с помощью метода PCA [170, 171]. На рис. 5.6 представлена молекулярная структура тетрапептида Ala-Gly-Gly-Gly-OMe, координирующегося с фрагментом (C₆Me₆)Ru. Все реакции протекают в относительно мягких условиях в координационной сфере хирального фрагмента полусэндвича металла, рацемизации при этом не наблюдается. В одной из статей описано даже образование нонапептида H-(Gly)₉-OMe в процессе, катализируемом [(n-цимол)RuCl]-фрагментом [172]. Описано также образование цикли-

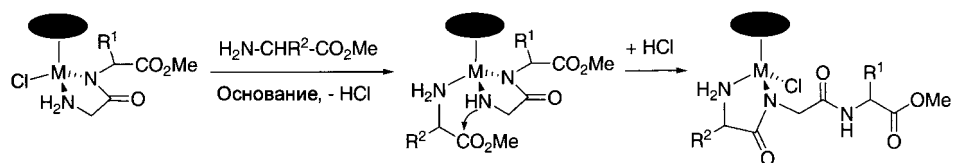


Схема 5.37. Специфичный к последовательности аминокислот пептидный синтез в координационной сфере хирального полусэндвичевого комплекса (M = Rh, Ir, π-донор = Cr⁺; M = Ru, π-донор = C₆Me₆ или цимол)

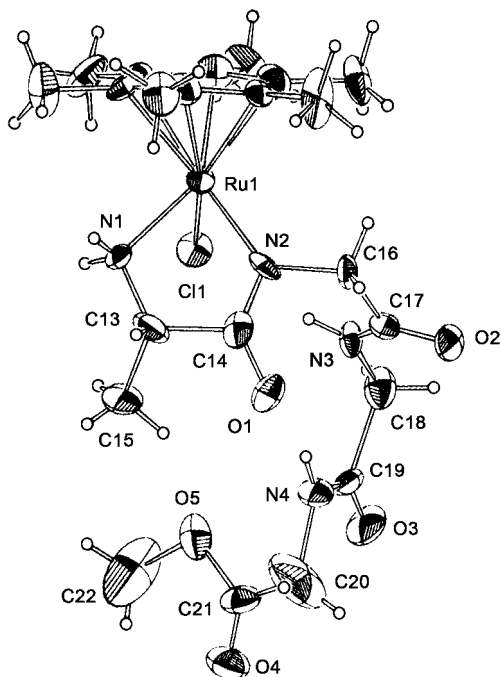


Рис. 5.6. Молекулярная структура монокристалла тетрапептида Ala-Gly-Gly-Gly*, координирующегося с фрагментом полусэндвича (C₆Me₆)Ru

ческих тетрапептидов на темплатах металлов в результате протекания похожей реакции [173].

5.5.2.2. Четырехкомпонентная реакция Уги

Четырехкомпонентная конденсация изоцианидов (также называемых изонитрилами),* открытая Уги в конце 1950-х гг. (четырехкомпонентная реакция Уги, Ugi-4CR) [176], представляет собой альтернативу классическому методу пептидного синтеза в растворе [177–180]. Реакция Ugi-4CR широко исследована во всевозможных аспектах; разработано несколько вариантов общей схемы, которые приводят к различным продуктам. В одном из вариантов, который особенно важен для обсуждаемой темы, в реакцию вводится N-защищенный пептид или аминокислота, хиральный первичный амин, альдегид и изонитрильный фрагмент пептида, что приводит к соединению **74**, в котором образуется новый пептидный сегмент (схема 5.38; см. также

* Реакцией Уги называется конденсация карбоновых кислот, изоцианидов, аминов и карбонильных соединений. – Прим. перев.

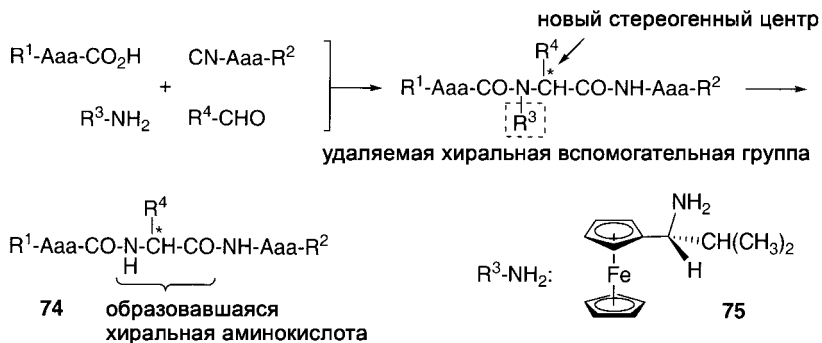


Схема 5.38. Четырехкомпонентная реакция Уги (Ugi-4CR) для синтеза пептидов. Соединение **75** ((*R*)-1-ферроценил-2-метилпропиламин) является мощным хиральным вспомогательным веществом R^3-NH_2 .

разд. 5.4.1 выше, где описано применение Ugi-4CR для синтеза ПНК). Данное превращение осуществляется через спонтанную перегруппировку нестабильного α -аддукта.

Необходимо использовать хиральный первичный амин в качестве хирального вспомогательного вещества, для того чтобы образовавшийся пептидный сегмент содержал остаток оптически чистой аминокислоты. Хиральные α -ферроценилалкиламины, в частности (*R*)-1-ферроценил-2-метилпропиламин **75**, приведенный на схеме 5.38, нашли широкое применение в стереоселективной четырехкомпонентной конденсации [179, 181, 182–186]. Это обусловлено тем, что **75** характеризуется высокой асимметрической индукцией и легко удаляется при действии кислоты. Фактически хиральный первичный амин можно легко регенерировать без рацемизации, делая эту реакцию экономически выгодной [183, 187, 188]. В качестве подтверждения приведенной концепции с высокой энантиомерной чистотой в ходе стереоселективной Ugi-4CR были синтезированы тетравалин и глутатион, при этом в качестве вспомогательного вещества использовали хиральный ферроценилалкиламин [182, 186, 189].

5.5.2.3 Сочетание ариловых эфиров в синтезе циклических пептидов с участием медиатора на основе рутения

Хлорароматические соединения можно активировать для проведения реакций нуклеофильного ароматического замещения путем комплексообразования с переходными металлами. Фрагменты $[CrRu]^+$ особенно удобны для реакций S_NAr с синтетической точки зрения, так как их можно использовать для получения ариловых эфиров, что представлено на схеме 5.39 [175]. В настоящий момент каталитический вариант этой реакции еще не разработан. Комплексы $[CrRu(арен)]^+$ стабильны на воздухе и в воде; их можно легко выделить, очистить и охарактеризовать. Удаление фрагмента металла достигается при фотолизе соединений в CH_3CN .

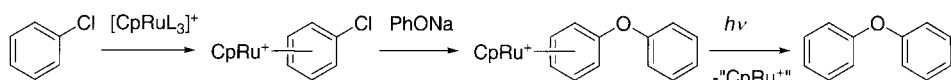


Схема 5.39. Схема образования ариловых эфиров при активации комплексообразованием с соединениями Ru

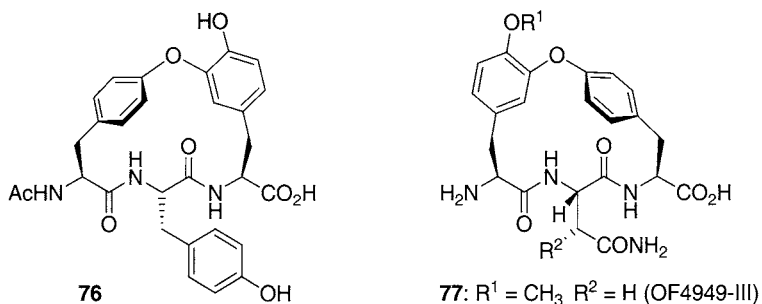


Схема 5.40. Структурные формулы циклических ариловых эфиров пептидов К-13 (слева) и OF-4949-III (справа). Другие представители семейства OF-4949 различаются заместителями R¹ и R²

Следует отметить, что эта реакция обратна реакции комплексообразования, упомянутой в разд. 5.3.2.5. Образование ариловых эфиров при участии комплексов рутения является ключевой стадией в опубликованном полном синтезе некоторых природных соединений, например, ингибиторов протеазы К-13 (**76**) и OF-4949-III (**77**, схема 5.40). Этим способом также были получены модельные соединения для некоторых антибиотиков, таких как ванкомицин.

Соединения К-13 и OF-4949-III представляют собой макроциклические трипептиды, которые содержат бисарильный эфир диаминодикислоты изодитирозина.

Трипептид К-13 выделен из культуральной жидкости *Micromospora halophytica*. Он является потенциальным ингибитором ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [190]. OF-4949 представляет собой группу из четырех конкурентных ингибиторов аминопептидазы В (OF-4949 I–IV) [191]. Оба соединения полностью теряют свою активность, если простая эфирная связь разрывается. Внешне очень похожие, эти соединения, тем не менее, различаются, если смотреть в направлении от N- к С-концевому атомам. В К-13 два ароматических кольца имеют *пара-мета*-замещение, в то время как OF-4949 – *мета-пара*. Формальный полный синтез обоих соединений предложен Пирсоном и др. [192, 193], впоследствии Янетка и Рих описали конвергентную схему синтеза [194, 195]. Ключевые стадии полного синтеза К-13 представлены на схеме 5.41 в качестве одного из примеров приведенного метода. Промежуточные соединения рутения, такие как **78** и **79**, можно вы-

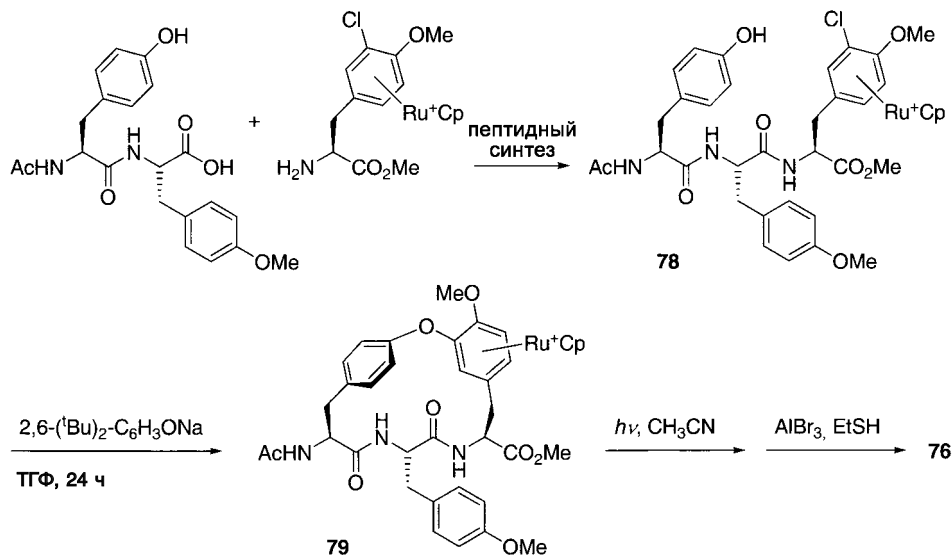


Схема 5.41. Ключевые стадии полного синтеза K-13 (**76**)

делить в индивидуальном состоянии с помощью колоночной хроматографии и всесторонне охарактеризовать. Они используются в стехиометрических количествах для замыкания макроциклов.

Линдел и др. установили возможность применения реакции сочетания ариловых эфиров при активации комплексообразованием с соединениями рутения для синтеза пептидоподобных («пептоидных») структур, в которых чередуются пептидные и диарилэфирные связи. Этот подход включает четыре стадии наращивания цепи и, в принципе, пригоден для автоматизированного твердофазного синтеза и комбинаторной химии [196].

5.5.3. Метки для пептидов

5.5.3.1. ВЭЖХ с электрохимическим детектированием

В двух статьях и патенте Экерт и Коллер описали различные соединения ферроцена, используемые для модификации N-конца аминокислот и аминогруппы лизина в белках, например в BSA [197–199]. Цель исследования заключалась в подборе наиболее подходящего реагента для введения метки и последующего электрохимического определения конъюгатов методом ВЭЖХ-ЭД (высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием). Среди природных аминокислот только метионин, тирозин и триптофан обладают электрохимической активностью, но их окислительно-восстановительные потенциалы слишком высоки для получения хорошей селективности ($> +0,5$ В по отношению к FcH/FcH^+). Напротив, ферроцен обладает по крайней мере на несколько сотен мВ меньшим окислительно-восстановительным потенциалом, что, в свою очередь,

зависит от функциональных групп в обоих Сp-кольцах. Такое уменьшение окислительно-восстановительного потенциала приводит к улучшению селективности.

Реагенты для ВЭЖХ-ЭД модификации, исследованные Экертом и Колером, включают, например, $\text{Fc-SO}_2\text{-Cl}$, Fc-CO-Cl , ангидрид ферроценкарбоновой кислоты, ангидрид ферроценилпропионовой кислоты и ферроценилметилизоцианат. Среди этих производных ангидрид ферроценилпропионовой кислоты оказался наиболее подходящим как для введения металлоорганического фрагмента, так и для электрохимического обнаружения конъюгатов [198]. В отличие от Экерта и Колера Копанг и др. считают, что $\text{Fc-SO}_2\text{-Cl}$ и Fc-CO-Cl также являются хорошими модифицирующими реагентами для ВЭЖХ-ЭД [200]. В родственном исследовании Шимада и др. предложили использовать ферроценилэтилизоотиоцианат для определения 4-аминомасляной кислоты в биологических образцах методом ВЭЖХ-ЭД [201].

Большинство рассмотренных ранее соединений подходят для модификации аминокрупп в пептидах и аминокислотах. В данном случае можно говорить о введении металлоорганических меток в природные молекулы. Кроме того, описаны селективные метки для тиольных групп цистеина [202–204]. Для мечения глутатиона **80** весьма эффективными оказались ферроценилэтилмалеинимид **81** и ферроценилиодацетамид **82**, приводящие к **83** и **84** соответственно (схема 5.42) [202, 204]. Родственное малеинимиду производное также использовали для мечения гексапептида $\text{Ac-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Cys-OH}$. Этот меченый гексапептид использовали для определения электрохимическими методами фосфорилирования серина под действием киназы А [203].

Недавно был описан интересный пример введения метки по двойной связи в пептиде при действии тиольного производного ферроцена. Микроцисти-

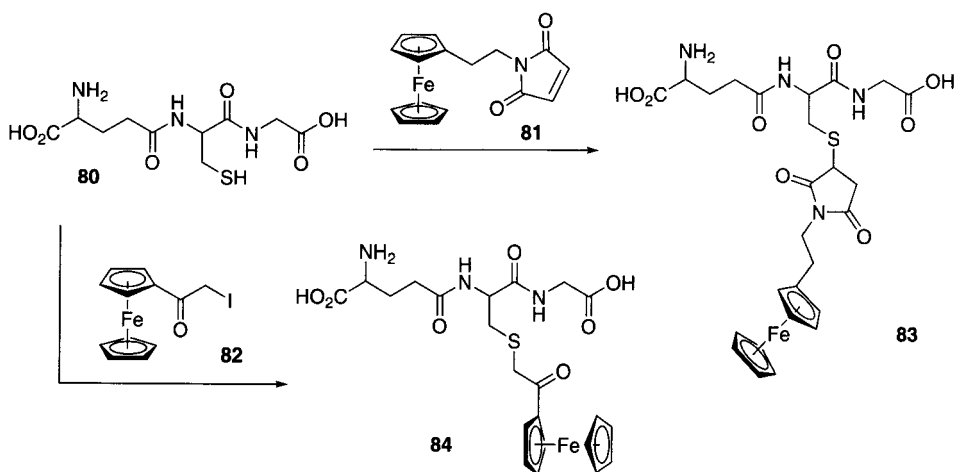


Схема 5.42. Введение в глутатион (**80**) меток ферроценилэтилмалеинимида (**81**) и ферроценилиодацетамида (**82**)

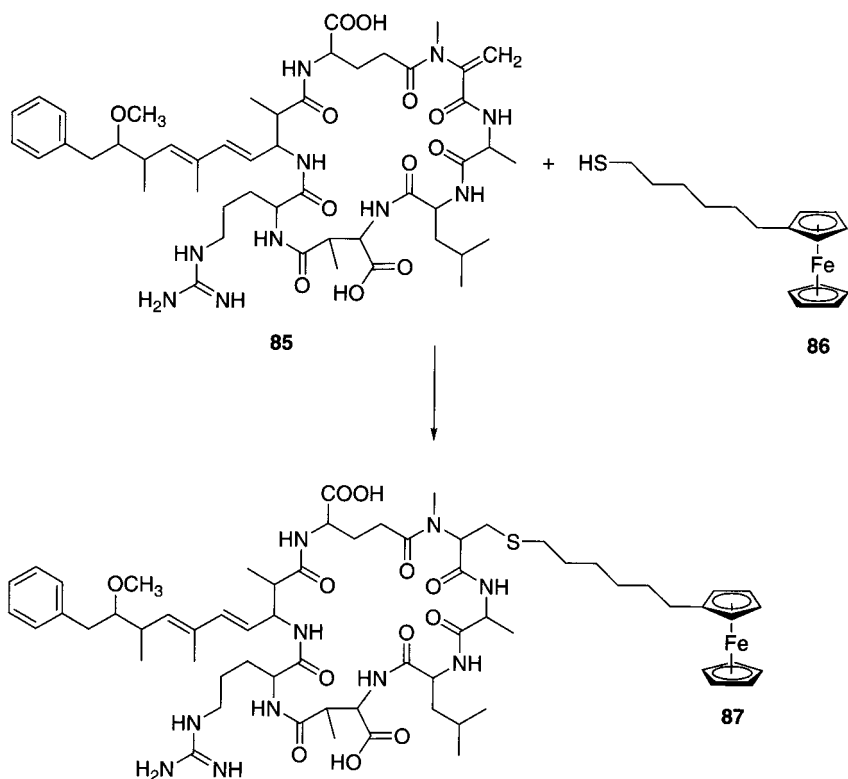


Схема 5.43. Введение в микроцистин-LR метки ферроценилгексантиола (**86**)

ны представляют собой класс низкомолекулярных циклических пептидных гепатотоксинов. Микроцистины продуцируются в эвтрофированных озерах и водохранилищах, особенно в жарких и относительно сухих регионах, например, в Китае, Австралии и Южной Африке [205]. Данные вещества опасны для крупного рогатого скота, диких животных и человека, поэтому существует очевидная необходимость быстрого и недорогого определения этих токсинов. Ло, Лэм и др. разработали оригинальный метод, с помощью которого при быстром электрохимическом измерении возможно обнаружение особого микроцистина, называемого микроцистином-LR [206]. Этот метод основан на особой модификации экзоциклической двойной связи микроцистина-LR **85**, которая сопряжена с карбонильной группой, под действием ферроценилгексантиола **86** (схема 5.43) с последующим электрохимическим детектированием ферроценовой метки в конъюгате **87**. Оказалось, что предел обнаружения **87** ~18 нг. Намного меньшее содержание микроцистина можно определить посредством более дорогостоящих методов, таких как флуоресцентная спектроскопия и ВЭЖХ-МС. С другой стороны, чувствительность данного нового электрохимического определения находится в пределах, характерных для других

общих методов детектирования, например, тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ с УФ-детектированием. Кроме того, электрохимические методы быстры, специфичны и недороги.

5.5.3.2. Радиоактивные метки

Использование металлоорганических радиофармацевтических препаратов в целях визуализации, включая фрагмент $\text{Tc}(\text{CO})_3$, который в последние годы стал весьма востребованным, будет рассмотрено в других разделах данной книги. Поэтому в этой главе обсуждение довольно краткое и в основном будет касаться современных металлоорганических радиометок для пептидов.

Предпочтительным является изотоп $^{99\text{m}}\text{Tc}$, так как его свойства благоприятны для радиовизуализации. С использованием этого изотопа получено и широко используется большое количество конъюгатов, в том числе и пептидных [207]. Обычно атом Tc находится в высоких степенях окисления и координируется с N- и S-лигандами. Низкоспиновый фрагмент $d^6\text{-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ представляет интересную альтернативу [208]. Его можно легко получить из TcO_4^- , который обычно синтезируют во многих клиниках с использованием ^{99}Mo -генератора. Этот фрагмент ввели в клиническую практику Альберто и Шубигер [209]. Его применяют для введения радиоактивных изотопов в серотониновые рецепторы [210] и в однопочечные фрагменты антител [211], что будет описано в других разделах этого издания. Та же научная группа описала использование гистидинилуксусной кислоты в качестве хелатной группы для $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ в укороченных нейропептидах, например, в гексапептидном фрагменте, полученном из нейротензина (NT 8–13) [212]. Бек-Сикинжер и др. синтезировали аналоги нейропептида Y (NPY), содержащие лиганды, способные к комплексообразованию с $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ [213]. Нейропептид Y представляет собой пептид, содержащий остатки 36 аминокислот [214]. Он образуется в периферической, а также в центральной нервной системе и, вероятно, является одним из самых распространенных нейропептидов в мозге. Он выполняет различные физиологические функции, а его рецепторы сверхэкспрессированы в нескольких нейробластомах. Это делает нейропептид Y привлекательным объектом для опухолевой сцинтиграфии [215]. $\text{Ala}^{26}\text{-NPY}$, также как центрально укороченное производное, получен с помощью SPSS. Оба пептида имеют лиганд PADA (2-пиколиламин-N,N-диуксусная кислота), связанный с Lys^4 . После снятия с носителя и очистки реакция с $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ приводит к стабильным конъюгатам. Из двух конъюгатов только укороченный пептид специфически интернализуется в экспрессированные клетки рецептора. Исследования биораспределения на мышах показали, что даже такой небольшой пептид не способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, обладая при этом высокой биологической стабильностью.

Каценелленбоген и др. использовали ранее неизвестную реакцию с двойным переносом лиганда для мечения октреотида при введении циклопентадиенил- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ [216]. Октреотид – это физиологически стабильный аналог циклического тетрадекапептида соматостатина. Рецепторы сомато-

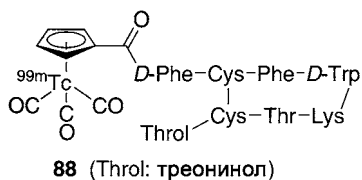


Схема 5.44. Введение в октреотид радиоактивной метки $\text{Cr}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$

статинов часто сверхэкспрессированы в некоторых типах раковых клеток. ¹¹¹In-модифицированный октреотид уже широко используется как радиофармацевтический препарат для рецептора соматостатина (Октреоскан®). Меченный радиоактивным изотопом комплекс ^{99m}Tc(CO)₃(C₅H₄-CO₂H) получен при обмене металлов из диметилового эфира 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты с последующим гидролизом. Кислоту затем активируют и связывают с октреотидом, что приводит к конъюгату **88** (схема 5.44) с 15%-ным выходом при учете поправки на распад. Для крыс конъюгат **88** показал опосредствованное рецептором поглощение в поджелудочной железе и надпочечниках.

Большинство предшествующих работ основано на введении металлоорганического фрагмента к N-концевому атому. Совсем недавно ван Ставерен и др. описали применение N^ε-замещенного гистидина в качестве лиганда для модификации пептидов по C-концевому атому. Этот лиганд был введен в состав биотина и витамина B₁₂, а также в пентапептид энкефалин. Данный пептид получен методом SPPS с использованием высоколабильного линкера; снят с носителя в защищенной форме и очищен. Активация и реакция защищенного пептида с соответствующим аминопропильным производным His приводит к C-концевому замещенному конъюгату, с которого полностью удаляются защитные группы после добавления сильной кислоты. Взаимо-

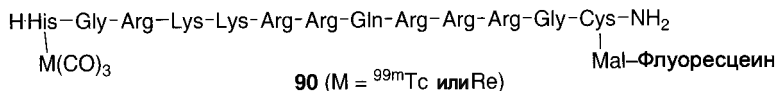
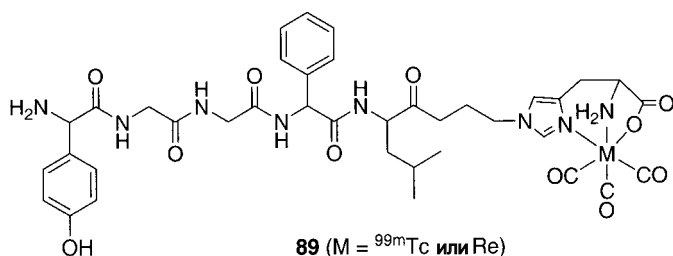


Схема 5.45. Пептидное производное энкефалина (**89**), меченное по С-концевому атому; Tat-пептидное производное (**90**), содержащее два вида меток

действие в растворе с $\text{Re}(\text{CO})_3$ или с меченым радиоактивным изотопом $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ приводит к конъюгатам **89** (схема 5.45) [217].

Пивника-Вормс и др. проделали весьма интересную работу. Они получили Tat-пептидные производные, например, **90**, содержащие два вида меток: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ и флуоресцеин, для сцинтиграфии и флуоресцентной микроскопии (схема 5.45) [218]. Основные области Tat-пептидов интенсивно исследовались из-за их способности перемещаться вдоль клеточной мембраны, по-видимому, независимо от опосредованного рецепторами эндоцитоза. Пептиды с N-концевым лигандом His получены методом SPPS. В растворе эти пептиды после снятия с носителя и очистки координируются с $\text{Tc}(\text{CO})_3$ или $\text{Re}(\text{CO})_3$. В качестве альтернативы гистидину также используют диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA) как N-концевой комплексон металлов. С-концевой цистеин вводили в реакцию с флуоресцеин-5-малеинимидом, иммобилизованным на полимерном носителе, вводя таким образом два вида меток в один пептид, что показано для **90** на схеме 5.45. Клеточная локализация этих пептидов подтверждена флуоресцентной микроскопией. Биораспределение в мышцах линии balb/c исследовано с помощью сцинтиграфии. Данные радиометрической и флуоресцентной микроскопии хорошо согласуются. Например, для этих конъюгатов наблюдается низкая мозговая проницаемость через гематоэнцефалический барьер.

5.5.4. Химия комплексов «гость – хозяин» и биосенсоры

Хан и др. получили макроциклические соединения, исходя из хлорангидрида 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты и производных псевдоцистина, содержащих различные линкеры между атомами серы [219]. Данный синтез привел к получению производных 1,1'-ферроценофана **91** и циклодимеров (схема 5.46). Окислительно-восстановительный потенциал для пары $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-R})_2/\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4\text{-R})_2^+$ в производных 1,1'-ферроценофана зависит от природы аниона. Так, в частности, добавление фторида приводит к четко выраженному сдвигу окислительно-восстановительного потенциала к положительным значениям примерно на 120–150 мВ. Появление этого

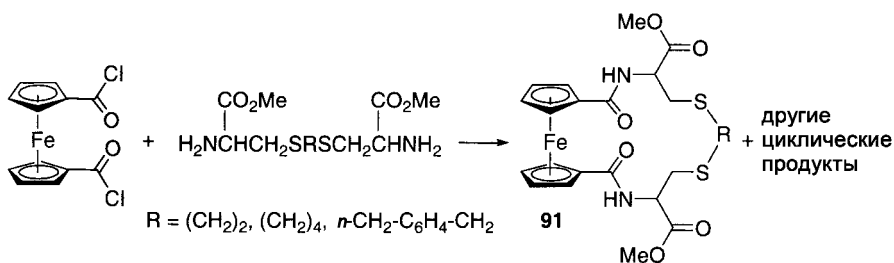


Схема 5.46. Синтез пептидного 1,1'-ферроценофана (**91**), который является эффективным «хозяином» для связывания галогенид-анионов

сдвига окислительно-восстановительного потенциала позволяет предположить, что галогенид-ионы находятся во внутримолекулярной полости 1,1'-ферроценофана. Связывание стабилизируется водородными связями с двумя NH-фрагментами, а в случае ферроцена – дополнительными электростатическими взаимодействиями между галогенидом и атомом железа. Позднее были синтезированы ди- и трипептиды цистина ((Aaa)_n-Cys)₂ (Aaa = Gly, Ala, Leu, Met, Pro; *n* = 0, 1, 2), которые вводили в реакцию с хлорангидридом 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты, что приводило к образованию ферроценофанов с различным размером полости [220]. В эту полость могут включаться и удерживаться там ионы щелочных и щелочноземельных металлов. Для определения констант связывания применяют КД и циклическую вольтамперометрию. Для одного из производных наблюдается высокое сродство к Mg²⁺ и Ca²⁺ наряду с высоким предпочтением к Ca²⁺ по сравнению с K⁺, при этом оно даже лучше, чем в случае природного ионофора валиномицина. В другом примере Тониоло, Мажини и др. получили нонапептид в 3₁₀-спиральной конформации, в котором два фенольных кольца тирозина связаны с ферроценкарбоновой кислотой посредством образования сложного эфира. Установлено, что эти спиральные пептиды образуют гидрофобную внутримолекулярную полость, которая может выступать как эффективный «хозяин» [60] для фуллерена [221].

Ван Котен и др. описали другой интересный сенсор для малых молекул, таких как SiO₂ или иод. Можно легко получить производные тридентатных органических соединений Pt(II), содержащие лиганд «пинцера» NCN-типа, при окислительном присоединении тетраakis(фосфина) Pt(0) по связи углерод-галоген лиганда NCN [222]. Полученная платинаорганическая молекула оказалась неожиданно стабильной на воздухе и в воде. Pt-центр может координировать малые молекулы наподобие SiO₂ и иода, причем в случае координации происходит изменение окраски на темно-красную или коричневую [223, 224]. Кроме того, при координации малых молекул в спектрах ЯМР ¹⁹⁵Pt наблюдается значительный сдвиг. Производное комплекса Pt-NCN **92**, содержащего остатки валина (схема 5.47), можно связать с аминокислотами или пептидами [222–224]. Его также присоединяют с помощью твердофазного синтеза к N-концу серии малых пептидов [225]. Успешное сочетание Pt-комплекса с пептидом можно легко проверить при добавлении I₂ и мониторинге изменения цвета, который можно изменить на первоначальный при промывании DMF/NEt₃. Кроме того факта, что этот процесс представляет собой реакцию

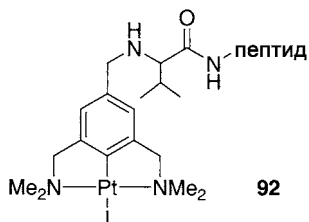


Схема 5.47. Органическое Pt(II)-производное валина (**92**), применимое для введения металлоорганических меток к N-концу аминокислот и пептидов

обычного окислительного присоединения для введения металлоорганической метки, он также предоставляет возможность использования интересной биометаллоорганической метки как альтернативы существующим чисто органическим красителям, используемым в твердофазном скрининге [226].

Благодарности

Я благодарен за плодотворное обсуждение своим коллегам; всем, кто свободно делился предварительной информацией, включенной в эту главу. Особенно я хотел бы поблагодарить: Рожера Альберто, Хайнц-Бернхарда Крааца, Торбьёрна Фрейда, Эмануэлу Ликандро, Стефано Майорана, Владимира Рапика, Кая Северина, Дэйва ван Ставерена. Дискуссии с Каем Северином были особенно полезны на последнем этапе подготовки рукописи. Вся моя научная группа была вовлечена в исследования, описанные в этой главе, поэтому я хотел бы поблагодарить всех сотрудников и приглашенных исследователей за их вклад и энтузиазм. И, наконец, я признателен Карин Вейс за ее неоценимую помощь, за поддержку в подготовке этого обзора, а также усилия по поддержанию эффективной работы научной группы. Более того, моя семья заслуживает уважения за предоставленное мне время (особенно в ночное время и по выходным) и место для завершения этого и других проектов.

Сокращения

Aaa	Любая аминокислота
Aib	Изо-аминомасляная кислота
AT	Ангиотенсин
BBB	Гематоэнцефалический барьер
BK	Брадикинин
bpa	Бис(пиколил)амин
Boc	<i>трет</i> -Бутоксикарбонил
BSA	Бычий сывороточный альбумин
Car	Карборанилаланин
Cym	Цимантренилаланин
Enk	Энкефалин
ESI-MS	Масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией
Fac	1-Амино-1'-ферроценкарбоновая кислота
Fc	Ферроценил (CpFeC_5H_4)
Fc-CO-	Ферроценоил ($\text{CpFeC}_5\text{H}_4\text{-CO-}$)
Fed	Катион циклогексадиенил(трикарбонил)железа $[(\text{Fe}(\text{CO})_3(\text{C}_6\text{H}_7))]^+$
Fem	Ферроценилметил
Fer	Ферроценилаланин

Fmoc	Флуоренил(метокси)карбонил
GnRH	Гонадолиберин (то же, что LHRH)
Glp	Пироглутаминовая кислота (также обозначается как pGlu)
GSH	Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин)
GST	Глутатион-(S)-трансфераза
LHRH	Рилинг-фактор лютеинизирующего гормона (то же, что GnRH)
MALDI-TOF	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (временнóй масс-спектрометрия)
NBD	Норборнадиен
NKA	Нейрокинин А
NLS	Сигнал ядерной локализации
NT	Нейротензин
NPY	Нейропептид Y
Oic	Октагидроиндол-2-карбоновая кислота
Phg	Фенилглицин
Pps	Дифенилфосфинсерин
Pps(S)	Дифенилфосфинсеринсульфид
Sar	Саркозин
SP	Вещество P
SPPS	Твердофазный синтез пептидов
TFA	Трифторуксусная кислота
Ugi-4CR	Четырехкомпонентная реакция Уги
Xps	Бис(3,5-диметилфенил)фосфиносерин

Для обозначения аминокислот используются стандартные трехбуквенные коды. Если не указано особо, подразумевается, что все аминокислоты имеют *L*-конфигурацию. Пептиды обозначены последовательностью, написанной от N- к C-концу, согласно стандартной пептидной номенклатуре. Запись «Gly» в пептиде соответствует фрагменту «HN-CH₂-CO». Например, H-Gly-NH₂ обозначает амид глицина (H₂N-CH₂-CONH₂), Ac-Gly-Ala-OH – N-ацилированный глицилаланин.

Литература

1. K. Schlögl, *Monatsh. Chem.* **1957**, 88, 601–621.
2. K. Severin, R. Bergs, W. Beck, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1722–1743; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1634–1654.
3. N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 1040–1044; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1072–1076.
4. T. J. Kealy, P. L. Pusey, *Nature* **1951**, 168, 1039–1040.
5. S. A. Miller, J. A. Tebb, J. F. Tremaine, *J. Chem. Soc.* **1952**, 632–635.

6. G. Wikinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, R. B. Woodward, J. Am. Chem. Soc. **1952**, 74, 2125–2126.
7. E. O. Fischer, W. Pfab, Z. Naturforsch. **1952**, 7b, 377–379.
8. R. B. Woodward, M. Rosenblum, M. C. Whiting, J. Am. Chem. Soc. **1952**, 74, 3458–3459.
9. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, Chem. Rev. **2004**, 5931–5985.
10. H.-B. Kraatz, M. Galka, Metal Ions in Biological Systems, **2001**, 38, 385–409.
11. M. Pitraszkiewicz, A. Wieckowska, R. Bilewicz, A. Misicka, L. Piela, K. Bajdor, Mat. Science Eng. C **2001**, 18, 121–124.
12. A. Wieckowska, R. Bilewicz, A. Misicka, M. Pietraszkiewicz, K. Bajdor, L. Piela, Chem. Phys. Lett, **2001**, 350, 447–458.
13. S. Iijima, F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Tanaka, M. Asai, T. Katsura, S. Hosaka, M. Ibonai, Anal. Chem. Acta **1993**, 281, 483–487.
14. A. Hess, J. Sehnert, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, Inorg. Chem. **2000**, 39, 5437–5443.
15. J. Sehnert, A. Hess, N. Metzler-Nolte, J. Organomet. Chem. **2001**, 637–639, 349–355.
16. R. S. Herrick, R. M. Jarret, T. P. Curran, D. R. Dragoli, M. B. Flaherty, S. E. Lindyberg, R. A. Slate, L. C. Thornton, Tetrahedron Lett. **1996**, 37, 5289–5292.
17. D. P. Fairlie, M. L. West, A. K. Wong, Curr. Med. Chem. **1998**, 5, 29–62.
18. A. Nomoto, T. Moriuchi, S. Yamazaki, A. Ogawa, T. Hirao, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1998**, 1963–1964.
19. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, J. Organomet. Chem. **1999**, 589, 50–58.
20. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, A. Ogawa, T. Hirao, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 69–75.
21. N. J. Long, Metallocenes, Blackwell Science, Oxford, **1998**.
22. T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, T. Hirao, Organometallics **2001**, 20, 1008–1013.
23. D. R. van Staveren, N. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, J. Chem. Soc., Dalton Trans. **2003**, 210–220.
24. E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, Protein Sci. **1994**, 3, 2207–2216.
25. C. M. Venkatachalam, Biopolym. **1968**, 6, 1425–1434.
26. Y. Xu, P. Saweczko, H.-B. Kraatz, J. Organomet. Chem. **2001**, 637–639, 335–342.
27. H. B. Kraatz, D. M. Leek, A. Houmam, G. D. Enright, J. Luszyk, D. D. M. Wayner, J. Organomet. Chem. **1999**, 589, 38–49.
28. Y. Xu, H.-B. Krratz, Tetrahedron Lett. **2001**, 42, 2601–2603.
29. H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, J. Antibiot. **1970**, 23, 259–262.
30. I. Katoh, T. Yasunaga, Y. Ikawa, Y. Yoshinaka, Nature **1987**, 329, 654–656.
31. R. E. Babine, S. L. Bender, Chem. Rev. **1997**, 97, 1359–1472.
32. T. Moriuchi, K. Yoshida, T. Hirao, Organometallics **2001**, 20, 3101–3105.
33. T. Moriuchi, K. Yoshida, T. Hirao, J. Organomet. Chem. **2001**, 637–639, 75–79.
34. T. Moriuchi, K. Yoshida, T. Hirao, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 31–34.
35. I. R. Butler, S. C. Quayle, J. Organomet. Chem. **1998**, 552, 63–68.
36. T. Okamura, K. Sakaue, N. Ueyama, A. Nakamura, Inorg. Chem. **1998**, 37, 6731–6736.
37. L. Barisic, V. Rapic, V. Kovac, Croat. Chem. Acta **2002**, 75, 199–210.
38. K. Heinze, M. Schlenker, Eur. J. Inorg. Chem. **2004**, 2974–2988.
39. L. Barisic, M. Dropucic, V. Rapic, H. Pritzkow, S. Kirin, N. Metzler-Molte, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **2004**, 2004–2005.
40. K. Severin, W. Beck, G. Trojandt, K. Polborn, W. Steglich, Angew. Chem. **1995**, 107, 1570–1572; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1995**, 34, 1449–1451.

41. G. Trojandt, U. Herr, K. Polborn, W. Steglich, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1254–1268.
42. S. R. Gilbertson, G. Chen, M. McLoughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4481–4482.
43. S. R. Gilbertson, X. Wang, G. S. Hoge, C. A. Klug, J. Schaefer, *Organometallics* **1996**, 15, 4678–4680.
44. S. R. Gilbertson, X. Wang, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 434–435.
45. S. R. Gilbertson, G. H. Chen, J. Kao, A. Beatty, C. F. Campana, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5557–5566.
46. S. R. Gilbertson, X. F. Wang, *Tetrahedron* **1999**, 55, 11609–11618.
47. S. R. Gilbertson, S. E. Collibee, A. Agarkov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6522–6523.
48. S. Greenfield, A. Agarkov, S. R. Gilbertson, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3069–3072.
49. A. Agarkov, E. W. Uffmann, S. R. Gilbertson, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2091–2094.
50. S. R. Gilbertson, G. W. Starkey, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2922–2923.
51. M. Tepper, O. Stelzer, T. Häusler, W. S. Sheldrick, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2257–2258.
52. J. Wonnemann, M. Oberhoff, G. Erker, R. Frohlich, K. Bergander, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1111–1120.
53. M. Oberhoff, G. Erker, R. Frohlich, *Chem. Eur. J.* **1997**, 1, 1521–1525.
54. D. Harmsen, G. Erker, R. Frohlich, G. Kehr, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 3156–2171.
55. B. Kayser, K. Polborn, W. Steglich, W. Beck, *Chem. Ber.* **1997**, 130, 171–177.
56. J. Pospisek, S. Toma, I. Fric, K. Bláha, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1980**, 45, 435–441.
57. M. Kira, T. Matsubara, H. Shinohara, M. Sisido, *Chem. Lett.* **1997**, 89–90.
58. J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris, *Nature* **1975**, 258, 577–579.
59. V. Clement-Jones, G. M. Besser, in S. Udenfried, J. Meienhofer (Eds.), *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York, **1984**, Vol. 6, 323–389.
60. S. J. Paterson, L. E. Robson, H. W. Kosterlitz, in S. Udenfried, J. Meienhofer (Eds.), *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York, **1984**, Vol. 6, 147–189.
61. U. Hoffmanns, M. Doria, N. Metzler-Nolte, unpublished data **2003**.
62. D. R. van Staveren, N. Meitzler-Nolte, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2002**, 1406–1407.
63. D. R. van Staveren, E. Bothe, T. Weyhermüller, N. Meizler-Nolte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 1518–1529.
64. D. R. van Staveren, E. Bothe, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2001**, 131–132.
65. D. R. van Staveren, E. Bill, E. Bothe, M. Bühl, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1649–1662.
66. D. R. van Staveren, T. Weyhermüller, N. Metzler-Nolte, **2004**, unpublished data.
67. H. Brunner, W. König, B. Nuber, *Tetrahedron Asym.* **1993**, 4, 699–707.
68. R. F. W. Jackson, D. Turner, M. H. Block, *Synlett* **1996**, 862–864.
69. A. Ricouart, P. Maes, T. Battmann, B. Kerdelhue, A. Tartar, C. Sergheraert, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, 32, 56–63.
70. E. Cuignet, C. Sergheraert, A. Tartar, M. Dautrevaux, *J. Organomet. Chem.* **1980**, 195, 325–329.
71. R. Epton, G. Marr, G. A. Willmore, D. Hudson, P. H. Snell, C. R. Snell, *Int. J. Biol. Macromol.* **1981**, 3, 395–396.
72. E. Cuignet, M. Dautrevaux, C. Sergheraert, A. Tartar, B. Attali, J. Cros, *Eur. J. Med. Chem.* **1982**, 17, 203–206.
73. J. C. Brunet, E. Cuignet, M. Dautrevaux, A. Demarly, H. Gras, P. Marcincal, C. Sergheraert, A. Tartar, J. C. Vanvoorde, M. Vanpoucke, in K. Brunfeldt (Ed.), *Peptides*

1980. Proceedings of the 16th European Peptide Symposium, Scriptor, Copenhagen, **1981**, 603–607.
74. U. S. von Euler, J. H. Gaddum, *J. Physiol.* **1931**, 72, 74–87.
75. M. M. Chang, S. E. Leeman, H. D. Niall, *Nature New Biol.* **1971**, 232, 86–89.
76. G. W. Tregear, H. D. Niall, J. T. Potts Jun., S. E. Leeman, M. M. Chang, *Nature New Biol.* **1971**, 232, 87–89.
77. M. Otsuka, K. Yoshioka, *Physiol. Rev.* **1993**, 73, 229–308.
78. P. Hublau, C. Sergheraert, L. Ballester, M. Dautrevaux, *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, 18, 131–133.
79. W. G. Sly, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 18–20.
80. N. A. Sasaki, P. Potter, M. Savignac, G. Jaouen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5859–5762.
81. F. Le Borgne, J. P. Beaucourt, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5649–5652.
82. M. Jung, D.E. Kerr, P. D. Senter, *Arch. Pharmazie* **1997**, 330, 173–176.
83. T. Roth, C. Eckert, H.-H. Fiebig, M. Jung, *Anticancer Res.* **2002**, 22, 2281–2284.
84. I. Ott, B. Kircher, R. Gust, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 485–489.
85. A. Tartar, A. Demarly, C. Sergheraert, E. Escher, in V. J. Hruby, D. H. Rich (Eds.), *Proceedings of the 8th American Peptide Symposium*, Pierce Chemical, Rockford, Ill, **1983**, 377–380.
86. P. Maes, A. Ricouart, E. Escher, A. Tartar, C. Sergheraert, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1988**, 53, 2914–2919.
87. J. M. Saavedra, *Endocrine Rev.* **1992**, 13, 329–380.
88. J. E. Taylor, F. V. DeFeudis, J. P. Moreau, *Drug Dev. Res.* **1989**, 16, 1–11.
89. N.-E. Rhaleb, G. Drapeau, S. Dion, D. Jokic, N. Rouissi, D. Regoli, *British J. Pharmacol.* **1990**, 99, 445–448.
90. R. Couture, J.-N. Drouin, O. Leukart, D. Regoli, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1979**, 57, 1237–1442.
91. R. Couture, A. Fournier, J. Magnan, S. St-Piere, D. Regoli, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1979**, 57, 1427–1436.
92. D. M. Coy, J. A. Vilchez-Martinez, E. J. Coy, A. V. Schally, *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 423–432.
93. R. M. Moriarty, Y. Y. Ku, U.S. Gill, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 362, 187–191.
94. W. S. Sheldrick, S. Heer, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 377, 357–366.
95. W. S. Sheldrick, A. J. Gleichmann, *J. Organomet. Chem.* **1994**, 470, 183–187.
96. A. J. Gleichmann, J. M. Wolff, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 1549–1554.
97. D. B. Grotjahn, C. Joubran, D. Combs, D. C. Brune, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11814–11815.
98. D. B. Grotjahn, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 192, 1125–1141.
99. F. Noor, A. Wüstholtz, R. Kinscherf, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2429–2432; *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2481–2485.
100. B. Rudolf, J. Zakrzewski, M. Salmain, G. Jaouen, *New J. Chem.* **1998**, 813–818.
101. M. Salmain, G. Jaouen, B. Rudolf, J. Zakrzewski, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 589, 98–102.
102. D. Yamamoto, K. Matsumoto, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Kitamura, H. Mizuna, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 14771–14777.
103. K. Mastumoto, M. Murata, S. Sumiya, K. Kitamura, T. Ishida, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1208, 268–276.

104. K. Mastumoto, M. Murata, S. Sumiya, K. Mizoue, K. Kitamura, T. Ishida, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1383, 93–100.
105. M. O. Funk, Y. Nakagawa, J. Skochdopole, E. T. Kaiser, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, 13, 296–303.
106. K. Plumb, H.-B. Kraatz, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 601–606.
107. M. M. Galka, H.-B. Kraatz, *ChemPhysChem* **2002**, 356–359.
108. J. D. Schmitt, M. S. P. Sansom, I. D. Kerr, G. G. Luni, R. Eisenthal, *Biochemistry* **1997**, 36, 1115–1122.
109. R. Latorre, O. Alvarez, *Physiol. Rev.* **1981**, 61, 77–150.
110. R. O. Fox Jr., F. M. Richards, *Nature* **1982**, 300, 325–330.
111. G. A. Woolley, B. A. Wallace, *Biochemistry* **1993**, 32, 9819–9825.
112. S. Kaluz, S. Toma, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1988**, 53, 638–642.
113. A.-S. Carlström, T. Frejd, *Synthesis* **1989**, 414–418.
114. A.-S. Cariström, T. Frejd, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4175–4180.
115. B. Basu, S. K. Chattopadhyay, A. Ritzen, T. Frejd, *Tetrahedron Asym.* **1997**, 8, 1841–1846.
116. S. Maricic, A. Ritzen, U. Berg, T. Frejd, *Tetrahedron* **2001**, 57, 6523–6529.
117. S. Maricic, U. Berg, T. Frejd, *Tetrahedron* **2002**, 58, 3085–3093.
118. S. Maricic, T. Frejd, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7600–7606.
119. G. D. Smith, J. F. Griffin, *Science* **1978**, 199, 1214–1216.
120. D. Picone, A. D'Ursi, A. Motta, T. Tancredi, P. A. Temussi, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 192, 433–439.
121. T. A. Steitz, R. Henderson, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **1969**, 46, 337–348.
122. D. M. Blow, *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9, 145–152.
123. R. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500.
124. K. L. Dueholm, M. Engholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpous, P. K. H., R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardy, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5767–5773.
125. P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 624–630.
126. M. Egholm, O. Buchardy, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, 365, 566–568.
127. M. Leijon, A. Gräslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Nordén, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry* **1994**, 33, 9820–9825.
128. M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biol.* **1996**, 3, 410–413.
129. V. Menshise, G. D. Simone, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, R. Marchelli, D. Capasso, M. Saviano, C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12021–12026.
130. T. Ratilainen, A. Holmén, E. Tuite, G. Haaima, L. Christensen, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **1998**, 31, 12331–12342.
131. T. Ratilainen, A. Holmén, E. Tuite, P. E. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **2000**, 39, 7781–7791.
132. P. E. Nielsen, *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1996**, 4, 76–84.
133. L. Good, P. E. Nielsen, *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **1997**, 7, 431–437.
134. H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Anti-Cancer Drugs* **1997**, 8, 113–118.
135. H. J. Jarsen, T. Bentin, P. E. Nielsen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1489, 159–166.
136. P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 71–75.
137. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2796–2823.
138. A. Hess, N. Metzler-Nolte, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1999**, 885–886.

139. A. Hess. PhD Thesis, Ruhr-Universität, Bochum, **1999**.
140. C. Baldoli, S. Maiorana, E. Licandro, G. Zinzalla, D. Perdicchia, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4341–4344.
141. S. Maigrana, E. Licandro, D. Perdicchia, C. Baldoli, B. Vandoni, C. Giannini, M. Salmain, *J. Mol. Catal. A* **2003**, 204–205, 165–175.
142. C. Baldoli, C. Glannini, E. Licandro, S. Maiorana, G. Zinzalla, *Synlett.* **2004**, 1044–1048.
143. A. Dömling, K. Z. Chi, M. Barrère, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3871–2874.
144. W. Maison, I. Schlemminger, O. Westerhoff, J. Martens, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 581–584.
145. K. L. Dueholm, K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1077–1080.
146. S. Sforza, G. Haaima, R. Marchelli, P. E. Nielsen, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 197–204.
147. G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2068–2070; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1939–1942.
148. J. C. Verheijen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, N. Metzler-Nolte, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 741–743.
149. A. Maurer, H.-B. Krautz, N. Netzler-Nolte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, published as Early View article, DOI: 10.1002/ejic.200500316.
150. H. Eckert, C. Seidel, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 168–170; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 159–161.
151. H. Eckert, Y. Kiesel, C. Seidel, C. Kaulberg, H. Brinkmann, in W. Woelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, T. Ivanov (Eds.), *Chemistry of Peptides and Proteins*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1986**, Vol. 3, 19–28.
152. H. Eckert, B. Forster, C. Seisel, *Z. Naturforsch. B* **1991**, 46, 339–352.
153. M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, **1984**.
154. J. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford, **1991**.
155. C. N. C. Drey, A. S. J. Stewart, in D. Theodoropoulos (Ed.), *Peptides* **1986**, Walter de Gruyter, Berlin, **1987**, 65–68.
156. A. S. J. Stewart, C. N. C. Drey, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 1753–1756.
157. L. A. P. Kane-Maguire, R. Kanitz, *J. Organomet. Chem.* **1988**, 153, C33–C34.
158. J. A. Carver, B. Fates, L. A. P. Kane-Maguire, *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, **1993**, 928–929.
159. L. A. P. Kane-Maguire, R. Kanitz, P. Jones, P. A. Williams, *J. Organomet. Chem.* **1994**, 464, 203–213.
160. J. E. Hallgren, C. S. Eschbach, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2547–2549.
161. A. J. Baskar, C. M. Lukehart, K. Srinivasan, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1467–1472.
162. K. Weiss, E. O. Fischer, *Chem. Ber.* **1973**, 106, 1277–1284.
163. K. Weiss, E. O. Fischer, *Chem. Ber.* **1976**, 109, 1868–1886.
164. L. S. Hegedus, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 299–305.
165. S. R. Pulley, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9037–9047.
166. D. A. Buckingham, L. G. Marzilli, A. M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2772–2773.
167. J. P. Collman, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6096–6103.
168. R. J. Browne, D. A. Buckingham, C. R. Clark, P. A. Sutton, *Adv. Inorg. Chem.* **2000**, 49, 307.

169. W. Beck, R. Krämer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1492–1493; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1467–1468.
170. R. Krämer, M. Maurus, R. Bergs, K. Polborn, K. Sünkel, B. Wagner, W. Beck, *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1969–1980.
171. R. Krämer, M. Maurus, K. Polborn, K. Sünkel, C. Robl, W. Beck, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1518–1526.
172. W. Hoffmüller, M. Maurus, K. Severin, W. Beck, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 729–731.
173. K. Haas, W. Ponikvar, H. Nöth, W. Beck, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1200–1203; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1086–1089.
174. K. Haas, E. M. Ennenstorfer-Schafers, K. Polborn, W. Beck, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 108.
175. R. Krämer, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1287–1289; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1197–1199.
176. I. Ugi, *Angew. Chem.* **1959**, 71, 386.
177. I. Ugi, in W. Foerst (Ed.), *Neuere, Methoden der präparativen organischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1966**, 1.
178. G. Gorel, P. Hoffmann, H. Kleimann, H. Klusacek, G. Lüdke, D. Marquarding, I. Ugi, in I. Ugi (Ed.), *Isonitrile Chemistry*, Academic Press, New York, **1971**, 201–215.
179. R. Urban, I. Ugi, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 67–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 492–493.
180. L. Ugi, D. Marquarding, R. Urban, in B. Weinstein (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Amino acids, Peptides and Proteins*, Marcel Dekker, New York, **1982**, Vol. 6, 245–289.
181. D. Marquarding, P. Hoffmann, H. Heitzer, I. Ugi, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1969–1971.
182. R. Urban, G. Eberle, D. Marquarding, D. Rehn, H. Rehn, I. Ugi, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 644–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 627–629.
183. G. Eberle, I. Ugi, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 509–510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 492–493.
184. R. Herrmann, G. Hübener, F. Siglmüller, I. Ugi, *Liebigs Ann.* **1986**, 251–268.
185. F. Siglmüller, R. Herrmann, I. Ugi, *Tetrahedron* **1986**, 42, 5931–5940.
186. R. Urban, D. Marquarding, I. Ugi, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1978**, 359, 1541–1552.
187. A. Ratajczak, B. Misterkiewicz, *J. Organomet. Chem.* **1975**, 91, 73–79.
188. A. Ratajczak, A. Czech, *Bull. Acad. Pol. Sci., Serie sci. chim.* **1979**, 27, 661–664.
189. R. Urban, *Tetrahedron* **1979**, 35, 1841–1843.
190. H. Kase, M. Kaneko, K. Yamada, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 450.
191. S. Sano, K. Irai, Y. Yoshikawa, T. Nakamura, A. Obayashi, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 512.
192. A. J. Pearson, K. Lee, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2304–2313.
193. A. J. Pearson, P. Zhang, K. Lee, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6581–6586.
194. J. W. Janetka, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10585–10586.
195. J. W. Janetka, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6488–6495.
196. A. Schmid, T. Lindel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1581–1583; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1607–1609.
197. H. Eckert, M. Koller, *Z. Naturforsch. B* **1990**, 45, 1709–1714.
198. H. Eckert, M. Koller, *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, 13, 3399–3414.
199. German Patent 39193178-A1, **1990**; *Chem. Abstr.* **1991**, 115, 25536.
200. R. L. Cox, T. W. Schneider, M. D. Koppang, *Anal. Chim. Acta* **1992**, 262, 145–159.

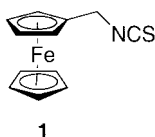
201. K. Shimada, Y. Kawai, T. Oe, T. Nambara, J. Liq. Chromatogr. **1989**, 12, 359–371.
202. K. DrGleria, H. A. O. Hill, L. L. Wong, FEBS Lett. **1996**, 390, 142–144.
203. Y. Katayama, S. Sakakihara, M. Maeda, Anal. Sci. **2001**, 17, 17–19.
204. K. K. W. Lo, J. S.-Y. Lau, D. C.-M. Ng, N. Zhu, Dalton Transactions **2002**, 1753–1756.
205. T. N. Duy, P. K. S. Lam, G. R. Shaw, D. W. Connell, Rev. Environ. Contam. Toxicol. **2000**, 163, 113–186.
206. K. K.-W. Lo, D. C.-M. Ng, J. S.-Y. Lau, R. S.-S. Wo, P. K.-S. Lam, New J. Chem. **2003**, 27, 274–279.
207. S. Liu, D. S. Edwards, J. A. Barrett, Bioconjugate Chem. **1997**, 8, 621–636.
208. R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A. P. Schubiger, Coord. Chem. Rev. **1999**, 192, 901–919.
209. R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A. P. Schubiger, U. Abram, T. A. Kaden, J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 7987–7988.
210. R. Alberto, R. Schibli, A. P. Schubiger, U. Abram, H. J. Pietzsch, B. Johannsen, J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 6076–6077.
211. R. Waibel, R. Alberto, J. Willuda, R. Finnern, R. Schibli, A. Stichelberger, A. Egli, U. Abram, J. P. Mach, A. Pluckthun, P. A. Schubiger, Nature Biotechnol. **1999**, 17, 897–901.
212. A. Egli, R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwe, L. Jeannin, K. Itebeke, P. A. Schubiger, J. Nucl. Med. **1999**, 40, 1913–1917.
213. M. Langer, R. La Bella, E. Garcia-Carayoa, A. G. Beck-Sickinger, Bioconjugate. Chem. **2001**, **2001**, 1028–1034.
214. K. Tatemoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1982**, 79, 5485–5489.
215. L. Grundemar, S. R. Bloom, Neuropeptide Y and drug developments, Academic Press, San Diego, **1997**.
216. T. W. Spradau, W. B. Edwards, C. J. Anderson, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, Nucl. Med. Biol. **1999**, 26, 1–7.
217. D. R. van Staveren, S. Mundwiler, U. Hoffmanns, J. Kroung Pak, B. Spingler, N. Metzler-Nolte, R. Alberto, Org. Biomol. Chem. **2004**, 2, 2593–2603.
218. K. E. Bullok, M. Dyszlewski, J. L. Brior, C. M. Pica, V. Sharma, D. Piwnica-Worms, Bioconjugate Chem. **2002**, 13, 1226–1237.
219. Q.-W. Han, X.-Q. Zhu, X.-B. Hu, J.-P. Cheng, Chem. J. Chin. Univ. **2002**, 23, 2076–2079.
220. H. Huang, L. Mu, J. He, J.-P. Cheng, J. Org. Chem. **2003**, 68, 7605–7611.
221. A. Bianco, C. Corvaja, M. Sartori, C. Toniolo, Chem. Eur. J. **2002**, 8, 1544–1553.
222. M. Albrecht, G. Rodriguez, J. Schoenmaker, G. van Koten, Org. Lett. **2000**, 2, 3461–3464.
223. G. Guillena, G. Rodriguez, G. van Koten, Tetrahedron Lett. **2002**, 43, 3895–3898.
224. G. Guillena, G. Rodriguez, M. Albrecht, G. van Koten, Chem. Eur. J. **2002**, 8, 5368–5376.
225. G. Guillena, K. M. Halkes, G. Rodriguez, G. D. Batema, G. van Koten, J. P. Kamerling, Org. Lett. **2003**, 5, 2021–2024.
226. M. Albrecht, G. van Koten, Angew. Chem. Int. Ed. **2001**, 40, 3750–3781; Angew. Chem. **2001**, 113, 3866–3898.

6 Введение меток в белки с помощью металлоорганических комплексов: стратегия и применение

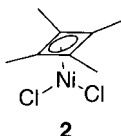
М. Зальман (Michèle Salmain, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Laboratoire de Chimie Organométallique (UMR CNRS 7576), France)

6.1. Введение

Использование металлоорганических π -комплексов в биохимии обсуждается в научном сообществе с конца 1960-х гг., спустя почти 20 лет после открытия ферроцена [1]. Действительно, первый пример введения органического комплекса переходного металла в биологическую молекулу был описан в 1966 г. Конъюгацию ферроцена с синтетическим полипептидом осуществили при взаимодействии с (ферроценилметил)изотиоцианатом **1**. Этот комплекс выбрали для того, чтобы использовать данное соединение как радиоактивный индикатор [2].



Спустя несколько лет был описан первый пример реакции полусэндвичевого комплекса с белком: взаимодействие дихлорида (тетраметилциклобутadien)никеля(II) **2** с ферментом алкогольдегидрогеназой, выделенным из печени лошади. При этом получили модифицированный фермент, не содержащий цинка и не обладающий ферментативной активностью, но содержащий 8 моль Ni / моль белка. Тип связывания этого металлоорганического комплекса в то время не был полностью определен, но, как предполагали, произошло замещение хлоридов под действием нуклеофильных остатков [3].



Многогранная химия органических соединений переходных металлов, их установленная биологическая стабильность и уникальные физические свойства открыли путь к ряду инновационных применений в различных

областях биохимии. В этой главе рассмотрены различные стратегии синтеза, а также применение органических соединений переходных металлов в биохимии. При этом подразумевается, что металлоорганические соединения химически связаны с белками. Стратегии модификации, специально разработанные для мечення пептидов и белков радиоактивными металлоорганическими комплексами, рассмотрены в гл. 4, разд. 4.4 и гл. 5, разд. 5.5.3.2.

6.2. Окислительно-восстановительные индикаторы

6.2.1. Амперометрические биосенсоры

В большинстве работ по ковалентному мечению белков металлоорганическими окислительно-восстановительными зондами описаны амперометрические биосенсоры на основе ферментов и антител. Кратко говоря, амперометрические биосенсоры представляют собой аналитические устройства, объединяющие биохимическое молекулярное распознавание ферментами или антителами с амперометрической трансдукцией, т. е. мониторингом тока, связанного с окислением или восстановлением электроактивных частиц [4]. К сожалению, для большинства оксидоредуктаз окислительно-восстановительные центр/центры (кофактор/кофакторы) сосредоточены достаточно далеко от внешней поверхности белка, поэтому они электрически недоступны. Следовательно, прямой электронный перенос* (ЕТ) между адсорбированным ферментом и электродом не возможен. Это препятствие обошли при связывании фермента с окислительно-восстановительным переносчиком, т. е. электроактивной частицей, способной к быстрому обмену электронами с электродом. Таким образом, были предложены три варианта опосредованных ферментами амперометрических биосенсоров (рис. 6.1) [5].

В варианте *а* ЕТ от окислительно-восстановительного центра фермента к электроду становится возможным при добавлении диффузионного электронного переносчика (медиатора), который быстро перемещает электрон/электроны к электроду и от него. В варианте *б* редокс-метки ковалентно связаны с поверхностью фермента и передают электроны к электроду и от него. В варианте *в* фермент иммобилизован на поперечно сшитом окислительно-восстановительном полимере, адсорбированном на поверхности электрода.

Неудивительно, что ферроценильные (Fc) производные широко используются как диффузионные или недиффузионные посредники переноса заряда из-за их почти идеальных электрохимических свойств, т. е. высокой скорости ЕТ, низкого окислительно-восстановительного потенциала и высокой химической стабильности окисленной и восстановленной форм. Примеры использования в области амперометрических биосенсоров белков, содержащих фрагмент ферроцена, представлены ниже.

* Список сокращений, используемых в данной главе, см. в конце главы.

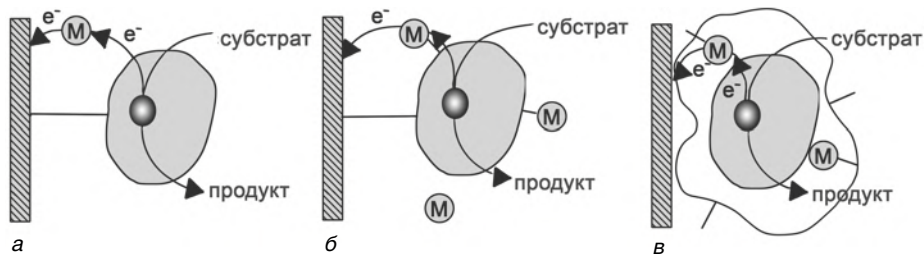
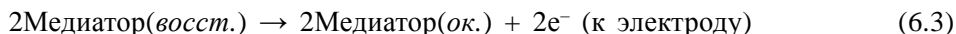
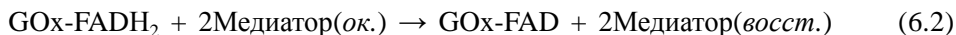


Рис. 6.1. Основные варианты амперометрических биосенсоров. а – в присутствии диффузионного медиатора; б – переносчик, ковалентно связанный с биологически распознающим элементом; в – иммобилизация биологически распознающего элемента на редокс-полимере

6.2.1.1 Диффузионные медиаторы

Перенос заряда между окислительно-восстановительным ферментом глюкозооксидазой (GOx), содержащей два скрытых кофактора FAD, и электродом достигается посредством использования диффузионной окислительно-восстановительной пары 1,1'-диметилферроцен/1,1'-диметилферроциний (медиатор) [6]. Эти данные позволили сформулировать основные принципы нечувствительного к кислороду амперометрического биосенсора глюкозы. Указанные принципы основаны на следующих окислительно-восстановительных реакциях.



Данная работа привела к разработке первого широко доступного ферментного биосенсора глюкозы разового применения, получившего наименование «ручка», EhasTECH™ pen (Medisense, Абингтон, Великобритания) [7].

Однако медленная потеря растворимой формы окислительно-восстановительного медиатора (ферроцениевого иона) может привести к повреждению биосенсора и препятствовать его использованию для оперативного мониторинга. Применение растворимых высокомолекулярных диффузионных переносчиков в принципе позволило бы ограничить это явление. Для этой цели белок BSA метят Fc группами восстановительным аминированием ферроцен-карбальдегида **3** в присутствии боргидрида натрия (схема 6.1). Как оказалось, меченый белок ведет себя как окислительно-восстановительный переносчик (медиатор) в электрокатализе глюкозы при действии GOx [8].

BSA химически модифицировали ферроцеиноилпропионовой кислотой **4** в присутствии водорастворимого карбодиимида EDAC (схема 6.2), что привело к конъюгатам с 5 или 23 Fc-фрагментами, ковалентно связанными с белком.

Оксидоредуктаза адсорбирована вместе с дегидрогеназой фруктозы на электроде. Таким образом был получен биосенсор для фруктозы [9].

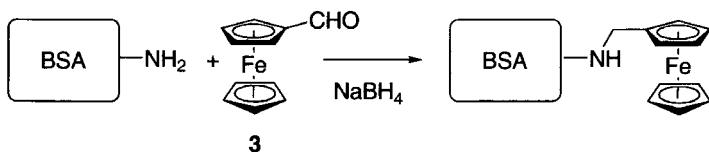


Схема 6.1. Введение метки в BSA восстановительным аминированием **3**

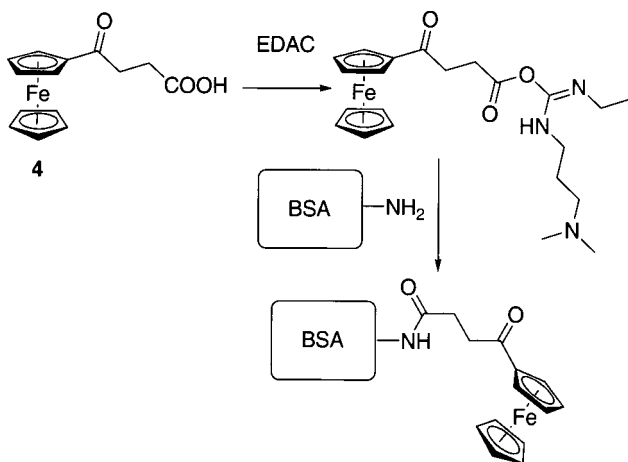


Схема 6.2. Введение метки в BSA ацилированием **4**

Ферроценильное производное N-(ферроценил)иодацетамид **5** синтезировали из аминоферроцена и использовали для мечения модифицированного тиольными группами BSA, как показано на схеме 6.3. Соотношение Fc/BSA в полученном конъюгате белка приблизительно равно 40:1.

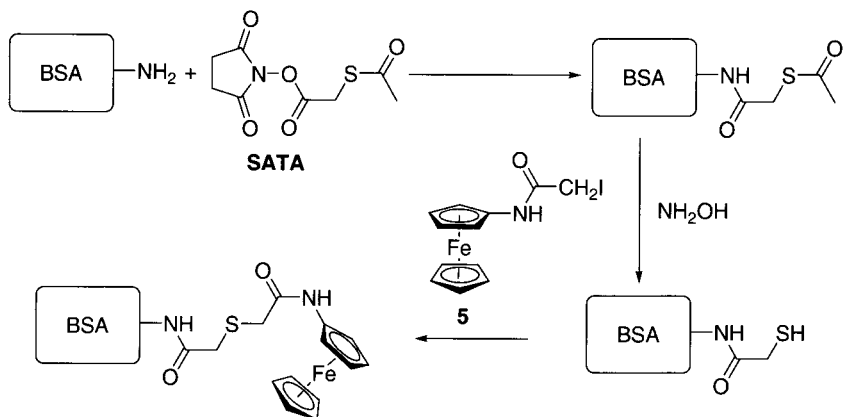


Схема 6.3. Тиолирование BSA под действием SATA и мечение N-(ферроценил)-иодацетамидом (**5**)

Данный конъюгат характеризуется обратимыми электрохимическими свойствами, но, по-видимому, не способен электрокатализировать окисление глюкозы под действием глюкозооксидазы на стеклоуглеродном электроде. Такое поведение объясняется большим размером молекулы конъюгата [10].

6.2.1.2. Электронные реле

Хеллер и др. впервые использовали ковалентное связывание Fc окислительно-восстановительных групп с оксидоредуктазами, такими как GOx, содержащими скрытые окислительно-восстановительные центры. Именно они случайно ввели так называемые «электронные реле» на поверхность этих ферментов (рис. 6.1, вариант б) [11]. Как указано выше, GOx составляет основу амперометрических биосенсоров глюкозы, которые весьма полезны для контроля уровня глюкозы в крови пациентов, страдающих от диабета. Химическая модификация GOx при введении Fc-фрагментов осуществляется при взаимодействии фермента с ферроценсодержащими реагентами **6–12** (рис. 6.2) в различных условиях. Методы мечения и ферментативная активность ферроценсодержащих конъюгатов GOx представлены в табл. 6.1.

Изначально мечение GOx достигалось при активации ферроценкарбоновой кислоты **6** или ферроценилуксусной кислоты **7** под действием EDAC и последующим связыванием с GOx в частично денатурирующих

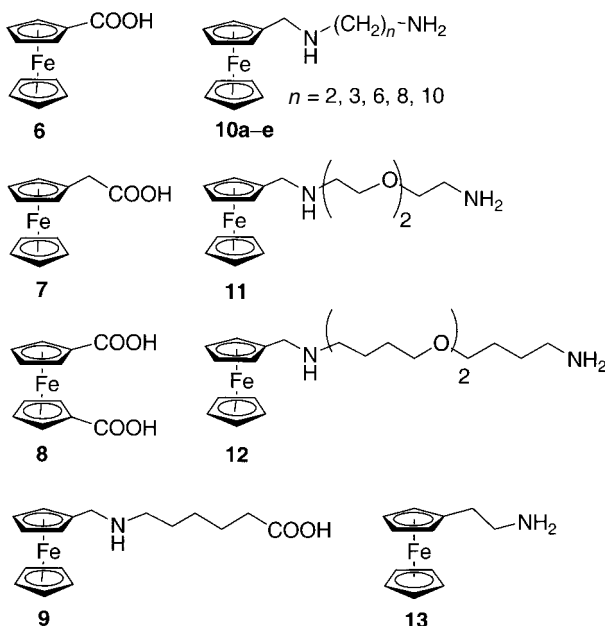


Рис. 6.2. Ферроценильные комплексы (**6–13**)

Таблица 6.1. Введение ферроценильных меток в GOx

Ферроценильное производное	Сореагент(ы)	Центр связывания в белке	Fc/GOx	Примечания	Литература
6	3 М мочевина, EDAC	Лизины ?	12 ± 1	60% активности относительно GOx	[11, 12]
7	3 М мочевина, EDAC		13 ± 1	60% активности относительно GOx	
10a–e	NaIO ₄ , NaBH ₄	Полисахаридная оболочка	1–1,5	27–49% активности относительно GOx	[17]
3	NaBH ₄	Лизины	4,2	Активность не определяли	[16]
	NaBH ₄ , 400 МПа		27,5	Обратимая денатурация GOx под давлением	
	NaBH ₄ , 3 М мочевина		8,1		
6	NHS, EDAC	Лизины	12	64% активности относительно GOx	[13]
7	NHS, EDAC		7,5	69% активности относительно GOx	
8	NHS, EDAC		10	60% активности относительно GOx	
3	NaBH ₄	Лизины	1 –6	30% активности относительно GOx	[14]
6	EDAC	Лизины ?			
11	NaIO ₄ , затем NaBH ₄ и глюкоза	Полисахаридная оболочка	не определяли	21% активности относительно GOx	[18]
11	EDAC и глюкоза	Аспартаты, глутаматы	не определяли	11% активности относительно GOx	
12	EDAC и глюкоза		не определяли	30% активности относительно GOx	
9	NHS, DCC	Лизины	21	Активность не определяли	[20]
	NHS, EDAC, 1 М мочевина		8		
6	EDAC, 2 М мочевина	Лизины	не определяли	90% активности относительно GOx	[21]
				Генетически модифицированная GOx	

условиях. Получены ферментные конъюгаты, содержащие 12–13 Fc-групп и обладающие, как сообщается, 60% ферментативной активности относительно немодифицированного фермента [12–13]. Впоследствии усовершенствованная методика, включающая NHS без использования денатурирующего агента, позволила получить стабильные конъюгаты, в которых Fc-группы связаны исключительно с остатками фермента лизина. Максимальное количество Fc-групп, равное 12, химически связывали с GOx в оптимизированных условиях реакции. Интересно, что для электрокаталитической активности более важно положение нескольких Fc-фрагментов относительно окислительно-восстановительного центра и поверхности белка, чем количество Fc-групп, введенных в состав белка [14].

Мечение GOx ферроценильными группами в результате реакции остатков лизина также провели при восстановительном аминировании соединения **3** [15, 16]. С помощью этого метода можно ввести меньшее количество Fc-групп (от 1 до 6 Fc/GOx). Увеличения числа Fc-фрагментов достигают, применяя повышенное давление во время реакции [17]. При этом наблюдается частичная потеря ферментативной активности.

Иная стратегия мечения заключается в модификации олигосахаридной оболочки GOx, которая составляет приблизительно 12% массы фермента. Оптимальное окисление этих остатков сахаров под действием периодата натрия приводит к образованию 6,4 альдегидных групп на каждую молекулу фермента. Ферроцениламины **10a–e** содержат боковые хелатные группы (спейсеры) различной длины, которые соединяют Fc фрагмент с амином. Эти соединения связывали с окисленной GOx, что приводило к основаниям Шиффа, из которых затем получали вторичные амины при восстановлении под действием NaBH_4 . В среднем от 1 до 1,5 Fc-фрагмента приходится на молекулу фермента. Показано, что увеличение длины спейсера приводит к возрастанию электрокаталитического тока окисления глюкозы при внутримолекулярном процессе ET [18]. Получены содержащие более гибкие гидрофильные спейсерные ножки ферроцениламины **11** и **12**, которые применяются для мечения GOx. Введение этих меток осуществляют как с использованием карбоксилатных остатков GOx (аспартаты и глутаматы), так и остатков сахаров. Установлено, что полученные конъюгаты даже более эффективны [19]. Нагата и др. предложили модифицированную стратегию введения меток [20]. Внешние цепочки сахаров GOx окисляли под действием периодата, что приводило к получению альдегидных групп. Эти группы превращали в гидразоны гидразидов при реакции с адипилгидразидом (схема 6.4). Затем модифицированный фермент обрабатывали смесью **6** и EDAC. Это приводит к связыванию 20 окислительно-восстановительных групп.

Производное ферроценкарбоновой кислоты, N-(ферроценилметил)капроновая кислота **9**, после активации при действии DCC и NHS ковалентно связывали с остатками лизина GOx. Полученный ферроценсодержащий фермент использовался как часть модельного устройства, представляющего собой иммуносенсор антител против DNP, основанного на изоляции электрического

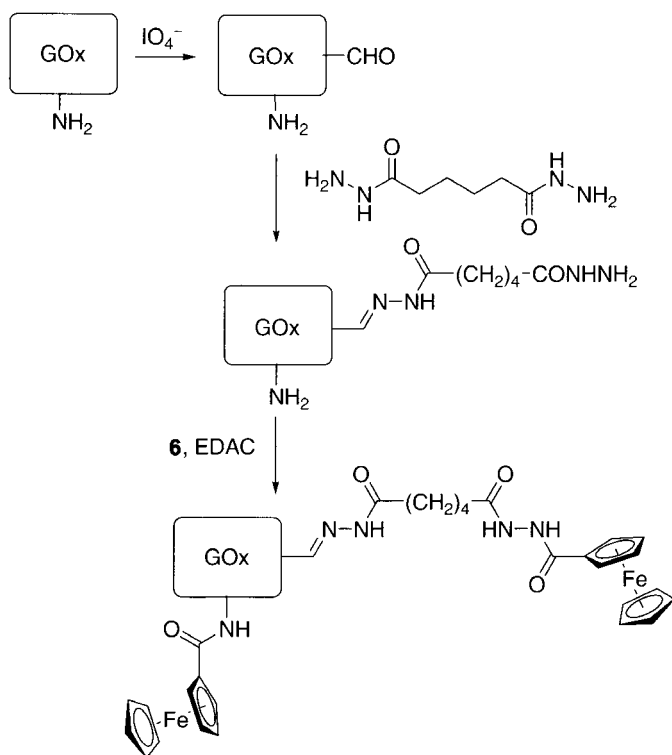


Схема 6.4. Мечение GOx под действием **6** (согласно Нагата и др. [19])

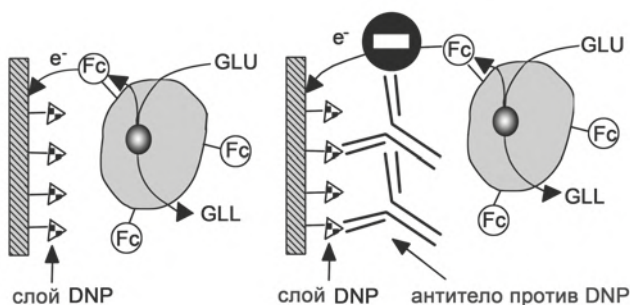


Рис. 6.3. Принципы работы амперометрического иммуносенсора для DNP. Ингибирование амперометрического определения глюкозы в присутствии специфического антитела против DNP

контакта между Fc-содержащей GOx и электродом посредством ассоциации антиген-антитело, показанной на рис. 6.3 [21].

GOx генетически модифицирована таким образом, что полилизин-цепочка присоединена к С-концу ферментного мутанта. Связывание

ферроценильных групп осуществляли при взаимодействии **6** и EDAC в присутствии 2 М мочевины. Полученный фермент, как оказалось, сохраняет 90% ферментативной активности относительно немодифицированной GOx [22].

6.2.1.3 Проводники электричества

Иммобилизация оксидоредуктазы на проводящем полимере является другим способом электросвязи между ферментом и электродом (см. рис. 6.1, в). Неорганизованный полислой ферроценсодержащих GOx создан на поверхности золотого электрода при перекрестном сшивании GOx и (2-аминоэтил) ферроцена **13** с глутаральдегидом (рис. 6.4). Установлено, что молярное соотношение между ферроценом и GOx в пленке приблизительно равно 10, а чувствительность реакции на глюкозу пропорциональна количеству GOx [23].

Многослойная сетчатая структура GOx в ходе ступенчатого синтеза создается на золотом электроде, изначально покрытом самоорганизованным монослоем (SAM) цистамина. Ферроценовые группы вводятся в эту структуру при реакции с **9** в присутствии EDAC, NHS и 1 М мочевины. Среднее число Fc-фрагментов на молекулу GOx в пленке приблизительно равно 8. Установлено, что амперометрический отклик на глюкозу контролируется количеством слоев белка [24].

Аналог белка, дендример полиамидоамина четвертого поколения (PAMAM G4), метили фрагментами ферроцена при восстановительном аминировании соединения **4**. Безреагентный биосенсор глюкозы создан альтернативным послойным осаждением активированной периодатом GOx и PAMAM G4 ферроценсодержащего конъюгата на золотом электроде, который изначально покрыт SAM цистамина. Исследование чувствительности на глюкозу коррелирует с количеством Fc-групп, связанных с PAMAM G4, и числом нанесенных слоев [25].

PAMAM G4, меченный ферроценильными группами, также был иммобилизован на поверхности золотого электрода, покрытого монослоем DTSP [26] или MUA, активированной действием EDAC и пентафторфенола [27]. Этот монослой ферроценсодержащего конъюгата PAMAM G4 был обработан биотином. Оказалось, что биоэлектрокаталитическое окисление глюкозы под действием

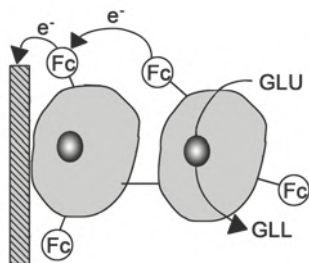


Рис. 6.4. Полислой ферроценсодержащих GOx создан при перекрестном сшивании GOx и **13** в присутствии глутаральдегида на поверхности золотого электрода

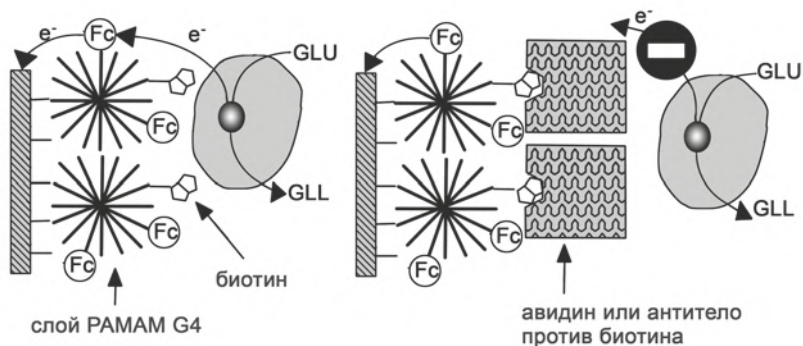


Рис. 6.5. Принцип работы амперометрического биосенсора для биотина. Ингибирование окисления глюкозы в присутствии специфического антитела против биотина или авидина

GOx ингибируется добавлением авидина, а также моноклональным антителом против биотина по причине поверхностного экранирования (рис. 6.5).

Авидин реагирует с соединением **9** в присутствии NHS и EDAC, что приводит к получению конъюгата, в котором с молекулой белка связано 16 Fc-фрагментов. Этот ферроценсодержащий конъюгат иммобилизован ковалентным образом на самоорганизованном монослое DTSP на золотом электроде. Полученный окислительно-восстановительный слой использовали, в свою очередь, как платформу для иммобилизации в результате биоаффинного процесса некоторых биотинилированных ферментов, включая микропероксидазу 11 [28], GOx и лактатоксидазу [29]. Полученную чувствительную платформу можно использовать для измерения H_2O_2 , глюкозы и лактата соответственно. Та же научная группа описала мечение стрептавицина ферроценовыми группами и исследовала перенос заряда на электродах, покрытых полислоями конъюгатов Fc-стрептавидин [30].

6.2.2. ВЭЖХ и иммуноанализ

Ферроцен также можно рассматривать как окислительно-восстановительный датчик, который легко обнаружить подходящим электрохимическим методом. Данное соединение используется как таковое в гомогенном (т. е. без разделения) или гетерогенном иммуноанализе, а также для электрохимического определения соединений, разделение которых проведено методом ВЭЖХ.

Ряд ферроценовых производных **14–21** (рис. 6.6) использовался для химической модификации белка BSA, чтобы определять пептиды и белки в биологических жидкостях методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Наиболее эффективным агентом, позволяющим ввести метку, является ангидрид **21**, так как он характеризуется медленной скоростью гидролиза и оптимальным расстоянием между окисляющейся группой и ядром белка [31].

Ферроценкарбальдегид **3** и окисленный периодатом дигоксигенин присоединяли к остаткам лизина BSA в ходе восстановительного аминирования, что приводило к конъюгату, ведущему себя как поливалентный антиген.

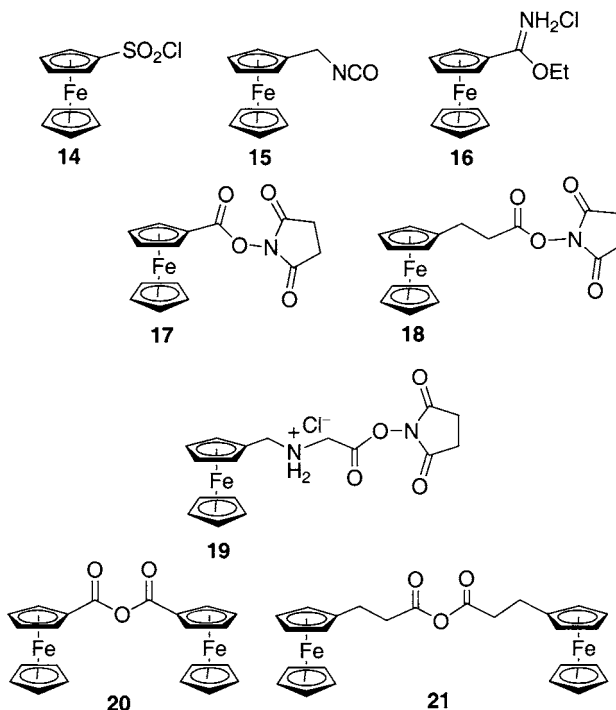


Рис. 6.6. Реагенты – производные ферроцена (14–21)

Присоединение антитела против диоксигенина привело к связанному с концентрацией понижению тока окисления ферроценильных групп [32].

Моноклональные антитела против HCG или против гистамина мечены ферроценсодержащей карбоновой кислотой **7** в присутствии только EDAC [33, 34] или в присутствии EDAC и сульфо-NHS [35], что привело к иммуноконъюгатам с приемлемой иммунологической активностью. Они используются в амперометрическом иммунохимическом анализе HCG и гистамина соответственно (см. гл. 8, разд. 8.4.1 и 8.5.3).

Ферроценкарбоновую кислоту **6** вводили в состав антител против IgG мышей в присутствии EDAC и использовали в гетерогенном электрохимическом иммуноанализе с отделением иммунных комплексов с помощью электрофореза (см. гл. 8, разд. 8.5.3) [36].

Зальман и др. недавно описали реакцию BSA с (цимантренил)метилимидатом **22**, которая привела к белковым конъюгатам в результате взаимодействия некоторых остатков лизина BSA (схема 6.5).

Интересно, что хотя соединение **21** необратимо восстанавливается в кислой среде ($E_p = -1,1$ В относительно Ag/AgCl), зонд на его основе, полученный при ковалентном связывании с белком, участвует в обратимом и быстром редокс-процессе ($E_p = -1,7$ В относительно Ag/AgCl) вследствие защиты, вызванной белковым окружением. Вольтамперометрические методы, использующие постоянный ток как аналитический сигнал, как оказалось,

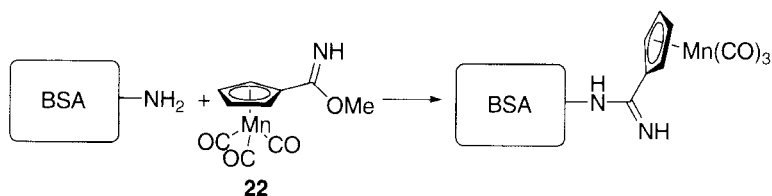


Схема 6.5. Мечение BSA с образованием амидина под действием **22**

не подходят, так как при этом потенциале происходит одновременное выделение водорода, катализируемое белком. Лучшие результаты получены при использовании фазочувствительной АС вольтамперометрии с накоплением меченого белка при соответствующем образом выбранном потенциале электрода. Предел обнаружения конъюгата BSA, содержащего фрагмент цимантрена, равен 200 нМ в водной среде [37]. Добавление возрастающих количеств антител против BSA, ковалентно связанных с гранулами агарозы, приводит к постепенному падению интенсивности волны восстановления, тогда как она остается постоянной при использовании чужеродных антител. Таким образом, удалось установить образование иммунных комплексов при использовании металлоорганического зонда и электрохимического детектирования (Хромадова, Поспишил, Зальман, Жауэн, рукопись готовится к изданию).

6.2.3. Структурные исследования ферментов

Папаин, фермент, относящийся к семейству цистеинпротеаз, быстро, специфически и необратимо инактивируется (хлорацетил)ферроценом **23** [38]. Это свойство обусловлено нековалентным связыванием металлоорганического комплекса с каталитическим центром, за которым следует селективное алкилирование цистеина 25, как показано на схеме 6.6.

Цистеинспецифическую электроактивную метку N-(2-ферроценилэтил)-малеинимид **24** синтезировали [39] и применили для мечения нескольких ферментов, содержащих остатки цистеина как в их нативной последовательности, так и введенных сайт-специфическим мутагенезом.

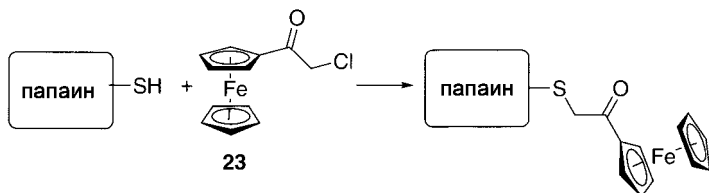
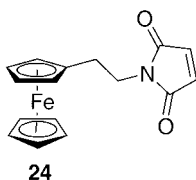
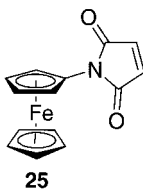


Схема 6.6. Мечение папаина алкилированием под действием **23**



Например, обработка монооксигеназы цитохрома P450_{cam} соединением **24** приводит к быстрому внедрению Fc редокс-фрагментов, что подтверждено циклической вольтамперометрией [39]. Мутант неэлектроактивного фермента β-лактамазы, в котором остаток Tyr105, расположенный вблизи активного центра, замещен цистеином сайт-специфическим мутагенезом, удалось успешно пометить соединением **24**. Окислительно-восстановительный потенциал полученного конъюгата сдвигается на 20 мВ в присутствии субстрата-самоубийцы в активном центре фермента [40]. Мечение соединением **24** мутантного цитохрома P450_{cam}, в котором доступный Cys334 замещен аланином, приводит к ферментному аддукту с двумя ковалентно связанными ферроценильными группами. Как показано методом рентгеноструктурного анализа (РСА) одна из групп находится на Cys85, другая – на Cys136 [41]. Присутствие Fc-группы на Cys85 приводит к значительному изменению в электрохимическом и биохимическом поведении фермента, так как он располагается вблизи от гема. Возможные механизмы связывания ферроценильного фрагмента в активном центре фермента постулируются. Один из них основан на сродстве активного центра к ферроцену, в то время как для реализации другого требуется «интернализация» Fc фрагмента, присоединенного к тиолятной группе Cys85.

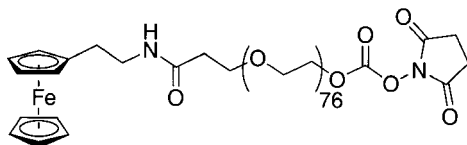
Мутантный цитохром P450_{cam} получен методами генной инженерии с тем, чтобы ввести поверхностный остаток цистеина в положение 344, мечен родственным соединением (N-ферроценил)малеинимидом **25**.



Методом циклической вольтамперометрии установлено, что между атомом железа гема и ферроценильной «репортерной» группой может существовать взаимодействие [42].

6.2.4. Другое применение

Линейное производное полиэтиленгликоля (PEG) **26**, в котором на одном конце располагается Fc-группа, а на другом – сложноэфирная N-сукцинимидная, было введено в состав антител мыши против IgG козы и антител козы против IgG мыши.



26

Полислои чередующихся антител мыши против IgG козы и антител козы против IgG мыши созданы ступенчатой иммобилизацией обоих антител на стеклоуглеродном электроде. Меченые IgG конъюгаты иммобилизованы сверху на эти молекулярные слои изменяющейся толщины. Количественный анализ динамики окислительно-восстановительных зондов, привитых на самоорганизованной конструкции через линейную и гибкую PEG цепь, проводился с применением циклической вольтамперометрии [43].

6.3. Люминесцентные зонды

6.3.1. Долгоживущие зонды

В 1970-х гг. было установлено, что комплексы рения(I) с общей формулой, представленной на рис. 6.7, обладают интересными фотолюминесцентными свойствами [44, 45].

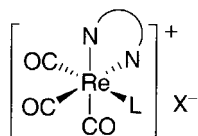
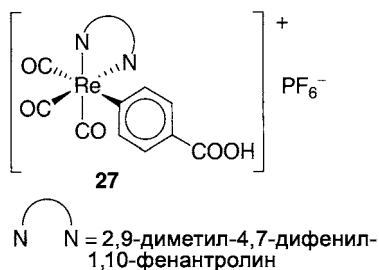


Рис. 6.7. Общая формула долгоживущих люминесцентных комплексов рения (I)

Эти характерные свойства связаны с низко лежащим MLCT возбужденным состоянием, в котором $d\pi$ -орбитали центрированы на металле, а π^* – на α -диимине. Данные переходы осуществляются в видимой области спектра. Любопытно, что параметры возбужденного состояния, такие как квантовый выход люминесценции, время затухания и окислительно-восстановительный потенциал, сильно зависят от дополнительных лигандов, полярности растворителя и других факторов среды [46].

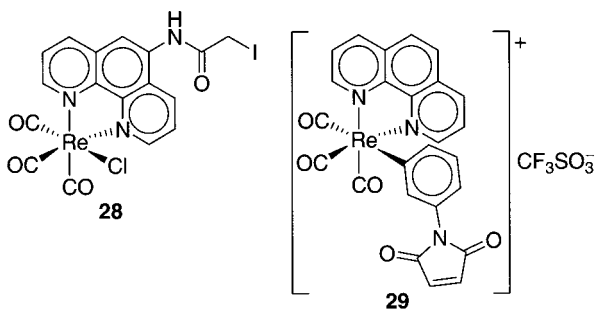
Указанные фотофизические свойства использовались при создании химических сенсоров O_2 [47], катионов [46] и анионов [48]. Некоторые полипиридиновые комплексы рения(I), содержащие биотин, характеризуются почти 3-кратным увеличением интенсивности эмиссии при связывании с авидином [49].

В последнее время исследования направлены на конъюгирование этого класса комплексов с белками, чтобы использовать преимущества их исключительных фотофизических свойств. Лаковиц и др. первыми установили, что люминесцентный комплекс рения(I) **27** ковалентно связывается с белками BSA и бычьим IgG при взаимодействии с некоторыми остатками лизина, карбоксильные группы которых активируются смесью DCC и NHS (см. гл. 8, разд. 8.4.7) [50].



Исходное вещество характеризуется большим сдвигом (100 нм) в соответствии с законом Стокса, посредством которого, вероятно, минимизируется самотушение, время затухания более 100 мкс и квантовый выход 0,27 в глицерине, выдержанном на воздухе. Этот комплекс также характеризуется высокополяризованным излучением (с максимальной степенью поляризации ~0,4 и максимальной анизотропией ~0,3) в отсутствии вращательной диффузии. Будучи ковалентно связанным с белком (BSA, IgG, HSA), люминофор обладает временем затухания фотолюминесценции, равным приблизительно 2,7 мкс в буфере, выдержанном на воздухе. Это свойство открывает новые возможности для исследования флуоресцентной поляризации антигенов с большой молекулярной массой (см. гл. 8, разд. 8.5.4) [51].

Для модификации тиольных групп получены два полипиридиновых комплекса рения(I) **28** и **29**, которые вводили в состав цистеинсодержащих белков.



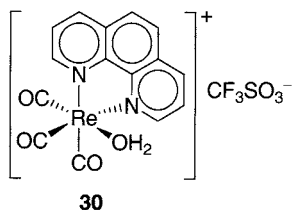
Комплекс **28** конъюгирован в соотношении краситель:белок = 0,7. Он характеризуется временем затухания фотолюминесцентного излучения 1,1 мкс, при этом анизотропия 0,34. Такое большое время затухания делает данное соединение подходящим для измерения времен корреляции больших

и средних по размерам белков [52]. Соединение **29** также вводили в состав различных белков. Полученные конъюгаты обладали большим временем затухания люминесценции, а также малым излучением, вызванным тушением O_2 , благодаря слабому воздействию растворителя на люминофор, когда тот связан с белком [53].

6.3.2. Исследование электронного туннелирования

Перенос электрона в биологических системах, в которых донор и акцептор электрона разделены большим (в молекулярном масштабе) расстоянием, встречается в весьма важных процессах, таких как фотосинтез и дыхание [54]. Так как живые системы не подходят для подобных исследований, Грэй и др. использовали белки, химически меченные комплексами переходных металлов, для измерения скоростей ЕТ в металлопротеинах. В частности, они установили, что долгоживущие люминесцентные зонды способствуют более широкому диапазону измерений ЕТ, чем это возможно при использовании не люминесцентных комплексов [55]. Голубой медьсодержащий белок азурин представляет собой подходящую модель для исследования ЕТ в белках, имеющих структуру β -листов. В действительности этот металлопротеин имеет третичную структуру β -баррели, причем центральный атом Cu характеризуется тригональной плоской координацией с Cys112(S), His117(N) и His46(N) [56].

Немутантный азурин, включающий единственный находящийся на поверхности остаток гистидина в положении 83, а также мутантный Gln107His/His83Gln азурин были химически модифицированы при действии люминесцентного фенантролинового комплекса рения(I) **30**.



Сообщалось, что это соединение ковалентно связывается с поверхностными остатками гистидина при замещении лабильного лиганда – воды. Однако реакция с **30** не является селективной по отношению только к поверхностному гистидину, так как связывание с другими неустановленными остатками регистрируется вместе с нековалентным связыванием. Очистка аффинной хроматографией с последующей катионообменной хроматографией приводит к Cu(I)-азуринам, содержащим рений(I). Zn(II)-азурины получены аналогичным образом [57].

Благодаря подходящим фотофизическим свойствам фенантролинового комплекса Re(I), фотоокисление $[Re(CO)_3(phen)(His107)]^+ AzCu^+$ проводили в присутствии $[Ru(NH_3)_6]^+$, что привело к $[Re(CO)_3(phen)(His107)]^{2+} AzCu^+$. Вместо прямого ЕТ $Cu^+ \rightarrow Re^{2+}$ наблюдается многостадийное ЕТ туннелирование,

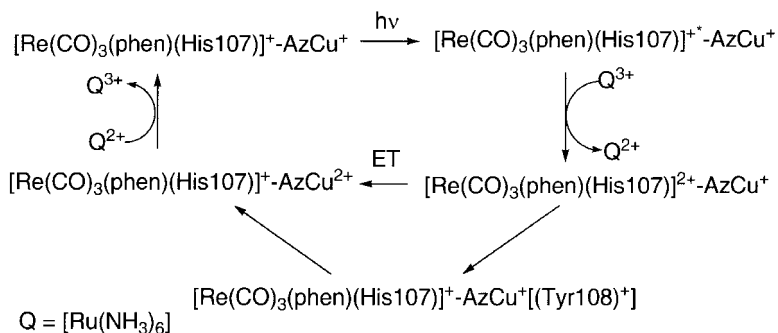


Схема 6.7. ET по механизму $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Re}^{2+}$ в $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{His107})]^+ \text{AzCu}^+$ посредством многостадийного туннелирования с участием Tyr108

включающее соседний остаток Tyr108, который быстро окисляется в Tyr108⁺. За этим следует лимитирующее скорость $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Tyr108}^+$ туннелирование ($k = 2 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$) (схема 6.7) [58].

Фотоиницированное окисление $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{His107})]^+ \text{AzZn}^+$ и $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{His83})]^+ \text{AzZn}^{2+}$ под действием $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ приводит к радикалам ароматических аминокислот Tyr108⁺ и Trp48⁺, соответственно. Эти частицы быстро депротонируются соседними аминокислотными остатками, результатом чего является генерация радикалов Tyr108[•] и Trp48[•] образование которых установлено методом ЭПР [57].

Молекулярная структура $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{His83})]^+ \text{AzCu}^{2+}$ установлена методом PCA. Скорость окисления Cu^+ под действием фотовозбужденного Re^+ измерена в кристалле белка методом нестационарной абсорбционной спектроскопии. Установлено, что она того же порядка, что и скорость ET, измеренная в растворе. Можно сделать вывод, что молекулы воды, вероятно, оказывают минимальное влияние на реакции ET в азурине [59].

Совсем недавно мутантный Gln107/His/Trp48Phe/Tyr42Phe/His83Gln/Tyr108Trp азурин М(II) (М = Cu или Zn) поместили соединением **30**, что привело после очистки к $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{His107})]\text{AzM}^{2+}$, содержащему одиночный Trp в положении 108. Радикал Trp108[•], генерированный необратимым флеш-фотолизом, согласно данным ЭПР и оптической спектроскопии, исключительно стабилен [60].

6.4. Тяжелые металлы как зонды

6.4.1. Структурный анализ белков методом PCA

В настоящее время метод PCA является самым мощным аналитическим методом, с помощью которого с высоким разрешением можно получить трехмерную структуру биологической макромолекулы. Однако применение этого метода, во-первых, ограничено получением монокристалла, пригодного для проведения PCA. Во-вторых, ограничение касается так называемой

«проблемы начальных фаз», т. е. вычисления начальных фаз дифракционного луча. Для решения последней проблемы существует несколько подходов. Наиболее часто используемыми методами являются многократное и однократное изоморфное замещение (MIR, SIR). Для применения этих методов, а также многоволнового аномального рассеяния (MAD) требуется получение производных тяжелых атомов, что обычно достигается введением богатых электронами атомов в определенные положения кристаллической решетки. В большинстве случаев это достигается экспериментами с кристаллами в растворе.

Чтобы можно было применять MIR, SIR и MAD фазовые методы, производные, содержащие тяжелые атомы, должны, во-первых, быть изоморфными нативным кристаллам. Иначе говоря, после связывания не должно происходить изменение упаковки и размеров элементарной ячейки. Во-вторых, число центров связывания тяжелых атомов должно быть малым, чтобы облегчить определение их положения на картах Паттерсона. В конце концов, относительное увеличение интенсивности дифрагированных пучков, вызванное связыванием тяжелых атомов/атома, будет намного больше, чем допустимая погрешность измеренных интенсивностей. Крик и Магдов установили, что относительное изменение интенсивности ΔI можно выразить следующим образом:

$$\Delta I = \sqrt{2} \cdot \sqrt{\frac{N_E}{N_P}} \cdot \frac{Z_E}{Z_P} \quad (6.4)$$

где N_E – количество атомов с атомным номером Z_E в элементарной ячейке, содержащей N_P белковых атомов со средним атомным номером Z_P [61]. Идеальный случай реализуется, когда один тяжелый атом связан с каждой молекулой белка в одном и том же месте в кристалле. В этом случае коэффициент степени занятости равен одному. Если этот коэффициент меньше единицы, то Z_E должен уменьшиться пропорционально количеству белковых молекул, имеющих связанный с ними тяжелый атом.

Для получения производных, содержащих тяжелые атомы, доступен широкий набор реагентов [62, 63]. Эти реагенты собраны вместе в базе данных, доступной в интернете (<http://www.sbg.bio.ie.ac.uk/had>) [64]. В этой базе представлены также металлоорганические соединения переходных металлов, комплексы Pd(II), Pt(II), Pd(IV), Pt(IV), Au(I) и Au(III) с цианогруппами и ртутьорганические соединения. Так как ион $[\text{Pt}(\text{CN})_4]^{2-}$ обладает высокой термодинамической стабильностью, он инертен к нуклеофильному замещению лигандов. Этот комплексный дианион устойчив в разных условиях и связывается с положительно заряженными остатками белков за счет электростатического взаимодействия [63]. Таким образом, вещество, содержащее этот комплексный анион, нельзя рассматривать как металлоорганический реагент для мечения белков. В то же время анионный комплекс $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$ ведет себя по-другому. Действительно, взаимодействие белка β -лактоглобулина (β -LG) с $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$ протекает с замещением одного цианидного лиганда остатком цистеина, находящимся в положении 121, что приводит к образованию стабильного аддукта (схема 6.8).

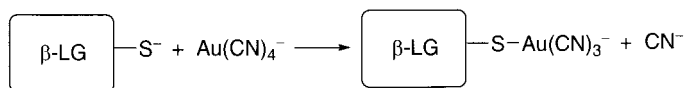


Схема 6.8. Взаимодействие тетратианоаурата(III) с β -лактоглобулином

К сожалению, кристаллы β -LG, обработанные $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$, не изоморфны нативным кристаллам [65].

Предполагается, что ртутьорганические соединения проявляют сродство к остаткам цистеина и гистидина. Малые алкильные заместители ртутьорганических соединений позволяют им взаимодействовать со скрытыми участками белка, в то время как большие ароматические заместители проявляют большую стерическую селективность. В любом случае селективность этих реагентов все же остается низкой и весьма часто неконтролируемой. Например, *n*-хлормеркурфенилсульфонат связывается с ферментом куриного яичного белка лизоцимом только через положительно заряженный остаток Arg68 посредством взаимодействия с сульфонатной группой, хотя этот белок имеет доступный остаток гистидина [66].

Появление молекулярной инженерии стимулировало открытия в области структурного анализа белков при получении белковых мутантов посредством сайт-направленного мутагенеза. Таким образом, остаток реакционноспособной аминокислоты, в основном цистеина, можно ввести в заданное положение, что в общем приводит к появлению центра связывания тяжелого атома. Следовательно, необходимо разрабатывать содержащие тяжелые атомы реагенты, которые специфически связывались бы с выбранными остатками белка.

Первый металлоорганический комплекс переходного металла, предназначенный для специфического связывания с остатками цистеина, описан в 1989 г. [67]. Этот монофункциональный тетраиридиевый кластер **31**, синтез которого представлен на схеме 6.9, предназначен для модификации рибосомной частицы. Так как эти биологические системы чрезвычайно крупные, для фазирования необходимо использовать совсем небольшие и тяжелые группы (см. уравнение (6.4)).

Мечение одного из белков в рибосоме 50S можно осуществить количественно в растворе при взаимодействии с **31**. Кристаллы реконструированной рибосомной частицы изоморфны кристаллам нативной частицы [68]. Для того чтобы провести надежное отнесение различных компонентов малой рибосомной субъединицы T30S, эту частицу пометили соединением **31**. Дифракционная карта 7,2 Å MIR построена на основании данных рентгеноструктурного анализа, полученных для кристаллов нативной и модифицированной рибосомной субъединицы. Выявлены один основной и один второстепенный центры связывания. Данное иридиевое производное оказалось, таким образом, весьма полезным для биологических частиц при создании карты MIR со средним разрешением [69].

Зальман и др. разработали и/или исследовали несколько классов моно- и полиядерных металлоорганических комплексов, предназначенных для селективной химической модификации белков при ковалентном связывании с остатками лизина. Хронологически первый реагент содержал функциональную

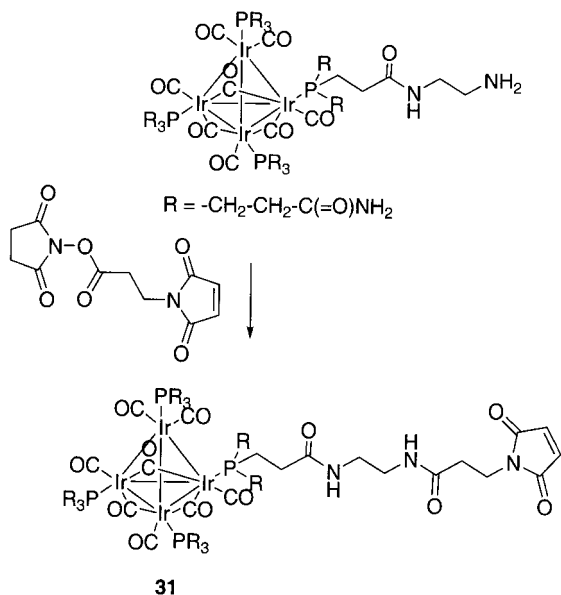


Схема 6.9. Синтез тетраиридиевого кластера (**31**)

сложноэфирную N-гидроксисукцинимидную группу, которая, как известно из классической химии белка, селективно ацилирует первичные амины пептидов и белков (см. схему 6.13). Соединения **32–39** (рис. 6.8) действительно

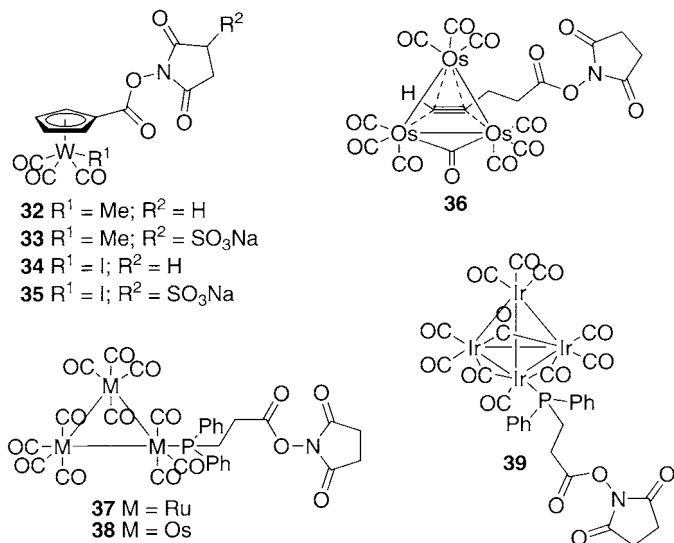


Рис. 6.8. Предназначенные для ковалентного связывания с остатками лизина металлоорганические комплексы переходных металлов, которые используются как реагенты для мечения белков тяжелыми атомами

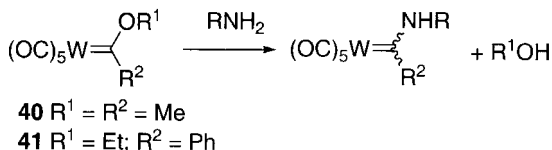


Схема 6.10. Взаимодействие алкоксикарбеновых комплексов металлов (карбенов Фишера) с первичными аминами

ковалентно связываются с белком BSA в растворе при ацилировании некоторых из его остатков лизина, что подтверждают данные видимой, УФ- и ИК-спектроскопии [70–72]. Мечение легко кристаллизующегося фермента лизоцима соединениями **32** и **34** также проходит с высоким выходом [73].

Алкоксикарбеновые комплексы вольфрама **40**, **41** (карбены Фишера) содержат карбениевый атом углерода, который, как известно, является в значительной степени электрофильным. Простой аминолиз проходит с первичными и вторичными аминами, приводя к стабильным аминокарбенам (схема 6.10) [74].

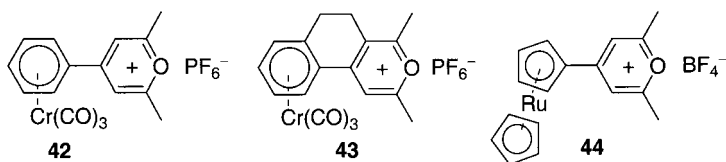
Эти соединения, как оказалось, являются перспективными для мечения белков тяжелыми атомами, так как могут быть нацелены на определенные остатки белков и способны образовывать стабильные ковалентные аддукты. Более того, скорость их аминолиза намного выше скорости гидролиза [75]. Взаимодействие **40** с рядом сложных эфиров α -аминокислот всегда приводит к ожидаемым аминокарбеновым аддуктам даже в присутствии конкурирующего нуклеофила в боковой цепи. Реакция **40** и **41** с белком BSA в растворе приводит к конъюгатам, спектральные характеристики которых подобны характеристикам аминокарбенов [76].

Аддукты аминокарбенов вольфрама с лизоцимом были получены в растворе и выделены препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ, а в дальнейшем проанализированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. К сожалению, полученные металлоорганические аддукты не стабильны в условиях проведения масс-спектрального анализа, так что в спектре наблюдаются пики меньших масс, чем ожидалось. Для того чтобы установить, какой из шести остатков лизина лизоцима прореагировал с соединением **40**, конъюгат аминокарбена вольфрама подвергли протеолизу под действием трипсина, а полученные пептиды разделили методом обращеннофазовой ВЭЖХ. Пептиды, содержащие аминокарбеновый фрагмент, идентифицировали спектроскопически и исследовали методом MALDI-TOF. Установлено, что в растворе центрами связывания металлоорганических соединений являются лизины 13, 33, 97 и 116 [77].

Аддукт $[\text{W}(\text{CO})_5(\text{C-Me})(\text{Lys13})]$ лизоцим, который в большинстве случаев образуется в растворе, очищали препаративной обращеннофазовой ВЭЖХ. Кристаллизацию проводили с применением метода висячей капли. К сожалению, все попытки получить монокристаллы этого белка до сих пор были неудачными и приводили только к аморфным осадкам (неопубликованные данные). Это подтверждает тот факт, что выращивание кристаллов в растворе является лучшим подходом для получения производных тяжелых атомов, необходимых для проведения PCA белков. Однако малая растворимость как металлоорганических сложных эфиров N-гидроксисукцинимидов, так и карбенов

Фишера препятствует проведению экспериментов по выращиванию кристаллов с лизоцимом.

Сальмэн и др. исследовали водорастворимые металлоорганические реагенты, предназначенные для мечения белков. Установлено, что соли пирилия представляют собой перспективный класс реагентов. Эти соединения (по крайней мере, 2,6-диметильные производные) растворяются в воде и реагируют с остатками лизина белка, что приводит к пиридиновым аддуктам (см. разд. 6.5). Были проведены эксперименты по выращиванию кристаллов лизоцима с замещенными солями 4-((фенил)хромтрикарбонил)пирилия **42** и **43**, а также с солью 4-(рутеноценил)пирилия **44**. Методами ИК спектроскопии (для производных, содержащих (бензол)хромтрикарбонильный фрагмент) и MALDI-TOF масс-спектрометрии (для рутеноценильного производного) доказано, что эти комплексы реагируют с доступными остатками лизина внутри кристаллической решетки, приводя к пиридиновым аддуктам [78, 79]. Кристалл лизоцима, обработанный соединением **44**, подвергся протеолизу под действием трипсина, после чего был проведен анализ полученной смеси пептидов методом MALDI-TOF. Установлено, что лизины 1, 13, 33, 96 и 97 участвуют в реакции, причем это согласуется с высокой доступностью указанных остатков на поверхности белка [79].



Таким образом, установлено, что соли пирилия, содержащие металлоорганический фрагмент, являются наиболее перспективными реагентами для введения тяжелых атомов в белки, так как эти соединения растворяются в воде и могут использоваться в экспериментах по выращиванию кристаллов. Однако до сих пор ни одна кристаллическая структура не была установлена с применением этого нового класса реагентов. Проблемы также могут возникать по причине наличия большого количества поверхностных остатков лизина, которые присутствуют в большинстве белков, что приводит к появлению множества центров связывания. Создание металлоорганических реагентов, нацеленных на связывание с цистеином, можно рассматривать в качестве альтернативы реагентам, предназначенным для лизина.

Совсем недавно Сэдлер и др. получили производное лизоцима, содержащее фрагмент полусэндвичевого аренрутениевого(II) комплекса, при медленной диффузии $[(\eta^6\text{-}n\text{-цимол})\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})]$ в тетрагональные кристаллы лизоцима [80]. РСА высокого разрешения, проведенный для модифицированных кристаллов, неожиданно показал, что только один аренрутениевый фрагмент координируется с ферментом, причем эта координация осуществляется взаимодействием с имидазольным кольцом, принадлежащим остатку HIS15. Это первый в научной литературе пример такого рода структуры белка.

6.4.2. Криоэлектронная микроскопия

Монофункциональный тетраиридиевый кластер **45**, синтез которого представлен на схеме 6.11, использовали для мечения капсида HBV, полученного из мутантного белка, в котором цистеины природного белка замещены аланином, а к С-концу присоединен дополнительный остаток цистеина.

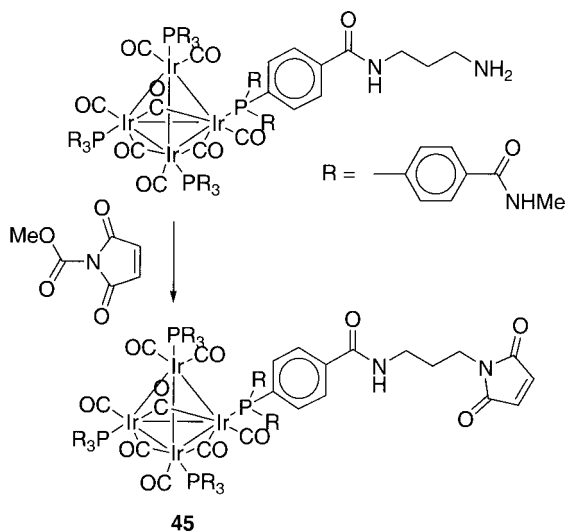
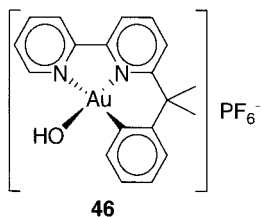


Схема 6.11. Синтез тетраиридиевого кластера **45**

Согласно спектральным исследованиям, эффективность метки приблизительно равна 11%. Тетраиридиевый кластер четко проявляется на трехмерных картах электронной плотности с хорошим разрешением, несмотря на относительно низкое содержание. Интересно, что остатки цистеина, недоступные ундеказолотому реагенту, легко взаимодействуют с намного меньшим тетраиридиевым комплексом **45** [81].

6.4.3. Фармакологические исследования

Взаимодействие металлоорганического комплекса золота(III) **46** с BSA было исследовано с использованием различных методик.



Установлено, что этот комплекс прочно координируется с белком и может быть замещен только при действии избытка цианид-иона. Предполагают, что связывание данного комплекса с BSA осуществляется при координации имидазольной группы одного из остатков гистидина с одновременной потерей выступающей в качестве лиганда молекулы воды. Интересно, что и исходное вещество и аддукт с BSA проявляют значительную цитотоксическую активность против некоторых линий опухолевых клеток человека [82].

6.5. Зонды на основе карбониллов металлов для инфракрасной спектроскопии

Давно известно, что комплексы переходных металлов с карбонильными лигандами (карбонилы металлов) имеют характеристичные полосы поглощения в среднечастотной ИК-области. Это свойство обусловлено валентными колебаниями ν_{CO} тройной связи углерод–кислород (см. гл. 7, разд. 7.4). Они проявляются в той области спектра, в которой поглощают немногие другие органические и неорганические группы. Интенсивности полос поглощения весьма значительны. Они в 4–10 раз более интенсивны, чем полосы поглощения обычных органических групп.

Первый пример введения металлокарбонильной группы в белок было описано в 1972 г. В качестве реагента выступал комплекс малеинового ангидрида с тетракарбонилжелезом **47**, в котором двойная связь малеинового ангидрида выступает лигандом для атома железа во фрагменте $Fe(CO)_4$ (схема 6.12). Взаимодействие этого комплекса с бычьей панкреатической рибонуклеазой А (РНКазой), за которым следует эксклюзионная хроматография, приводит к получению желтого соединения. Производное РНКазы, содержащее 4 г-атомов Fe/моль фермента, как оказалось, обладает только 2–6% от активности нативного фермента, в то время как связывание 2,4 г-атомов Fe на моль РНКазы уменьшает ее каталитическую активность на 70%. Интересно, что в ИК-спектре меченой РНКазы характеристические полосы поглощения наблюдаются в области 1900–2200 cm^{-1} . Количество и положение этих полос весьма сильно отличается от ν_{CO} , наблюдаемых для соединения **47**. В то же время не предпринимались попытки определить центр(ы) связывания металлокарбонильного комплекса [83]. Позднее было установлено, что взаимодействие РНКазы как с комплексом **47**, так и с малеиновым ангидридом протекает с участием некоторых из десяти остатков лизина РНКазы, как представлено на схеме 6.12. Очевидно, реакция **47** с РНКазой не является специфической по отношению к какому-нибудь определенному остатку лизина, но, вероятно, включает взаимодействие с несколькими остатками лизина. Селективное введение металлокарбонильной группы в остаток Lys41 активного центра РНКазы осуществили двухстадийным синтезом. Во-первых, взаимодействие РНКазы с малеиновым ангидридом в присутствии конкурентного ингибитора фермента как средства защиты каталитического участка привело к производному фермента, в котором в среднем блокировано 3,7 остатка лизина. Удаление конкурентного ингибитора диализом, за которым следует

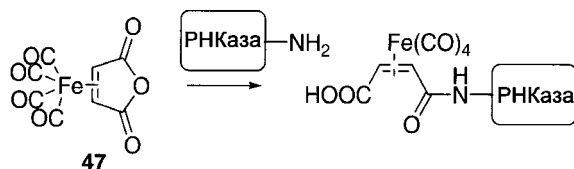
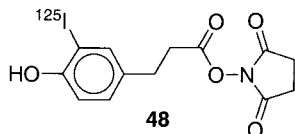


Схема 6.12. Взаимодействие РНКаза с соединением (47)

взаимодействие с соединением **47**, привело к новому производному фермента, которое содержит 1,1 г-атом Fe/моль РНКаза, но проявляет только 29% каталитической активности немодифицированного белка [84].

Сальмэн и др. получили и/или исследовали реакционную способность трех групп металлокарбонильных комплексов, предназначенных для взаимодействия с остатками лизина и цистеина, а также образованных ими конъюгатов с некоторыми белками, включая BSA, моноклональное антитело против TSH и авидин. Их свойства и ИК-спектры меченых белков представлены в табл. 6.2.

Первая группа металлокарбонильных реагентов для мечения белков создана на основе широко используемого реагента Болтона–Хантера **48**, содержащего атом радиоактивного иода. Этот реагент предназначен для введения радиоактивных изотопов в антитела [85].



Как было сказано выше, сложные эфиры N-гидроксисукцинимид легко ацилируют первичные аминогруппы белков (т. е. остатки лизина боковой цепи, а также N-концевые остатки). Высокие выходы ацилирования достигаются при щелочных pH, что обусловлено более быстрым аминолизом сложного эфира N-гидроксисукцинимид по сравнению с его гидролизом (схема 6.13).

Металлокарбонильные сложные эфиры N-гидроксисукцинимид **49** [86], **50** [87] и **51–53** [88] получены и охарактеризованы классическими спектральными методами (рис. 6.9).

Мечение некоторых белков осуществляли под действием этих комплексов [88–91]. В каждом случае ИК-анализ с преобразованием Фурье, проведенный для белковых конъюгатов, показал присутствие нескольких полос поглощения ν_{CO} , которые являются типичными для металлокарбонильного фрагмента. В данном случае не наблюдался значительный сдвиг их положения относительно исходного реагента, так как химическая реакция проходит вдалеке от металлокарбонильной группы. Незначительная потеря иммунной реакционной способности антитела против TSH наблюдалась при модификации под действием (алкин)гексакарбонилкобальта [89] и (циклопентадиенил)трикарбонилрения [88]. Это особенно важно в том случае, когда антитела, меченные таким способом, будут, как планировалось, применяться в качестве или аналитических реагентов в иммунологическом анализе или переносчиков радиоизотопов ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re или ^{188}Re) к биологическим мишеням *in vivo*.

Таблица 6.2. Мечение белков металлокарбонильными фрагментами

Комплекс	Центр связывания в белке	$\nu_{\text{Co}}, \text{см}^{-1}$	Литература
49	Лизины	2095, 2054, 2023	[82] (синтез) [85] (мечение BSA и антитела против TSH) [86] (мечение авидина)
50	Лизины	2053, 2000	[83] (синтез) [83] (мечение BSA)
51–52	Лизины	2025, 1931	[84] (синтез, мечение BSA и антитела против TSH)
53	Лизины	2020, 1978	
56	Лизины	2048, 2002	[89] (синтез, мечение BSA)
59–60	Лизины	не определяли	[98] (синтез) [100] (мечение BSA)
61	Лизины	не определяли	[101] (синтез, мечение BSA)
63	Цистеины (нейтральный pH, комнатная температура) Цистеины и гистидины (нейтральный pH, 35°C) Цистеины, гистидины и лизины (щелочной pH, 35°C)	2050, 2000	[102] (синтез) [87] (мечение BSA) [90, 115] (мечение дендримера PAMAM G4)
64	Лизины и/или гистидины	2058, 1993	[104] (мечение химотрипсина, РНКазы, липазы, щелочной фосфатазы)
65	Гистидин	2050, 1978	[104] (мечение лизоцима)

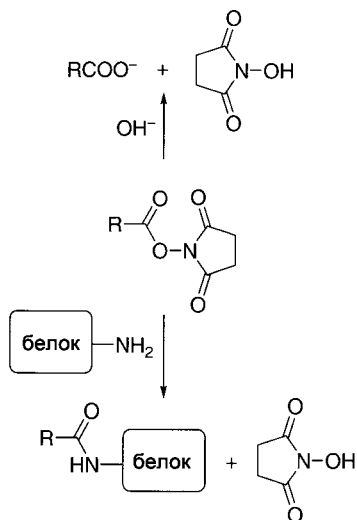


Схема 6.13. Гидролиз и аминолиз сложных эфиров N-гидроксисукцинимиды

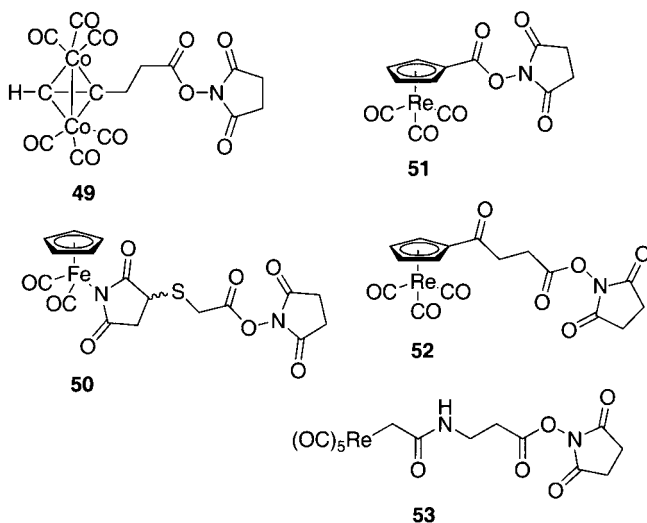
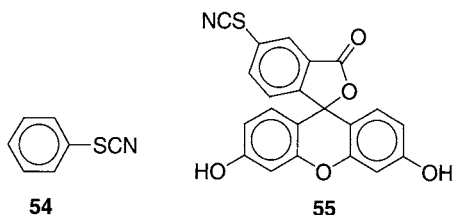


Рис. 6.9. Предназначенные для связывания с остатками лизина и цистеина металлоорганические реагенты, позволяющие вводить в белки фрагменты карбониллов переходных металлов

Другим популярным классом органических реагентов, предназначенных для химической модификации белков, является группа изотиоцианатов. Эти соединения находят широкое применение в химии пептидов и белков [92]. Самыми известными примерами являются фенилизотиоцианат **54** (реагент деградации по Эдману) и флуоресцинизотиоцианат **55**.



К данной группе производных относится соединение **56**, которое, как оказалось, позволяет метить BSA при щелочных pH с хорошим выходом. Это осуществляется при взаимодействии некоторых белковых аминогрупп и приводит к производному тиомочевины (схема 6.14) [93].

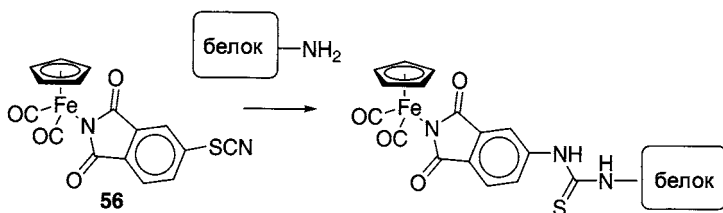


Схема 6.14. Взаимодействие BSA с соединением **56**

Соли пирилия представляют собой ароматические гетероциклические соединения с атомом кислорода в цикле. В этих веществах атомы углерода в *орто*- и *пара*-положениях кольца обладают значительным электрофильным характером. Ди- и тризамещенные соединения довольно стабильны. Они реагируют с первичными аминами, давая соли пиридиния (схема 6.15) [74]. В водном растворе пирилиевая форма находится в равновесии с открытой формой («псевдооснованием»).

В 1970-х гг. О'Лиари и Самберг описали взаимодействие перхлората 2,4,6-триметилпирилия **57** с α -химотрипсином с образованием конъюгата белка с солью пиридиния [94]. Позднее была описана реакция тризамещенной пирилиевой соли **58** с такими белками как желатин и α -химотрипсин [95], гликофорин [96, 97] и транспортный белок Na^+ /глюкоза [98]. Во всех случаях наблюдается взаимодействие только с лизиновыми остатками белков, что приводит к образованию соответствующих пиридиниевых аддуктов.

Также были получены соли пирилия, содержащие различные металлокарбонильные фрагменты в *пара*-положении гетероцикла [99–103]. Пирилиевые

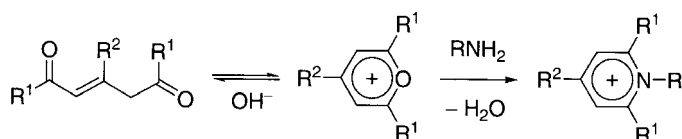
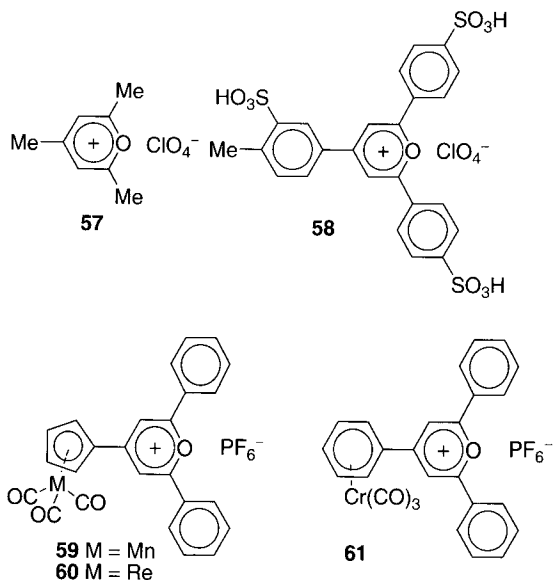


Схема 6.15. Реакция ионов пирилия с первичными аминами и гидроксид-анионом

соли марганца и рения **59–60** [104], а также хрома **42, 43** и **61** [105] успешно использовали для мечения белка BSA, что привело к соответствующим пиридиниевым аддуктам. Это подтверждается сравнением со спектроскопическими данными для модельных производных пиридиния. Следует отметить, что за ходом реакции можно легко следить, используя УФ-видимую спектроскопию.



Известно, что N-замещенные малеинимиды являются алкилирующими агентами, которые реагируют с тиолами с образованием стабильных тиоэфиров при нейтральных значениях pH (схема 6.16). Также возможен гидролиз, однако его скорость зависит от природы заместителей [106].

Например, N-этилмалеинимид **62** является широко используемым реагентом для блокирования цистеиновых остатков [107]. В 1994 г. Рудольф и Закржевский синтезировали N-замещенные малеинимиды, содержащие фрагмент (циклопентадиенил)дикарбонилжелеза **63** [108].

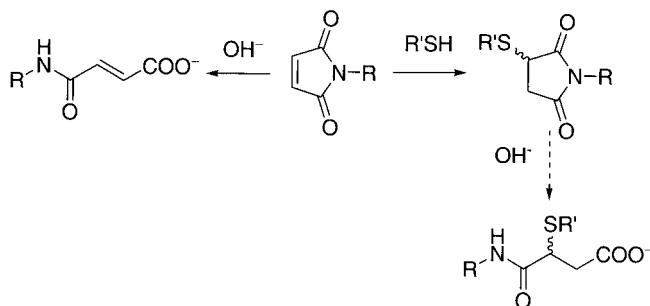
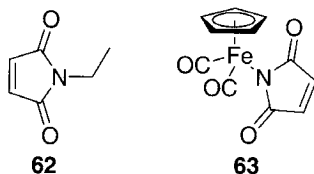


Схема 6.16. Гидролиз N-замещенных малеинимидов, а также алкилирование тиолов под действием N-замещенных малеинимидов



В различных условиях было проведено сравнение реакционной способности соединений **62** и **63** по отношению к BSA. Оказалось, что за исключением случая, когда реакцию проводили при комнатной температуре и нейтральном pH, число металлокарбонильных фрагментов, связанных с белком, всегда превышает исходное количество тиольных групп, определенное методом Элмана. При определенных условиях также происходит алкилирование остатков гистидина и лизина [91].

В водной среде для мечения некоторых ферментов использовали обладающие электрофильным характером комплекс (диенил)трикарбонилжелеза **65** как таковой [109] или маскированный в форме лабильного пиридиниевого соединения **64** [110]. Согласно спектральным данным, происходит нуклеофильное присоединение имидазольного кольца остатков гистидина и/или первичного амина лизиновых остатков (в зависимости от их доступности) (схема 6.17).

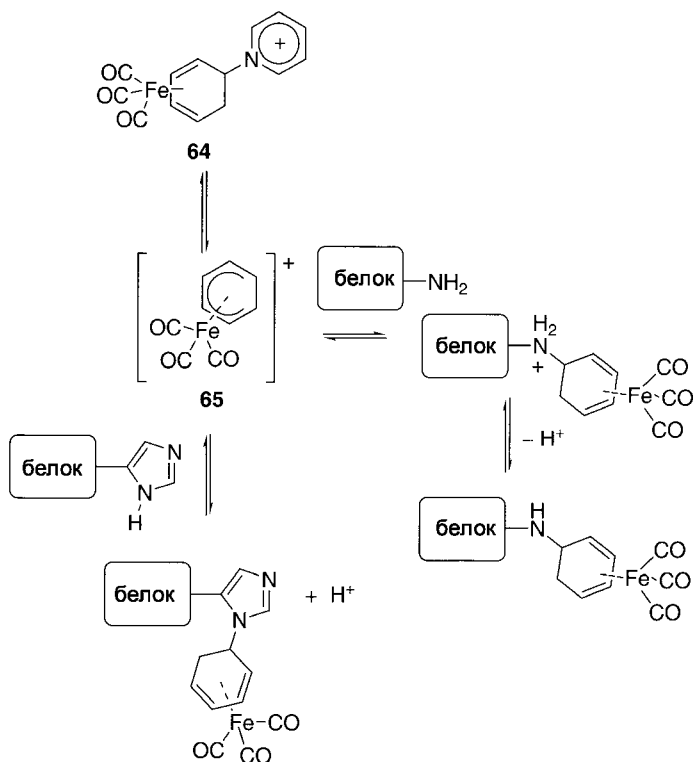


Схема 6.17. Взаимодействие соединений **64** и **65** с белками

Образование протонированных или непротонированных форм аддуктов с остатками гистидина и лизина предоставляет информацию о pK_a индивидуальных белковых остатков (см. гл. 7, разд. 7.7).

6.6. Выводы и перспективы

В настоящее время существует множество методов получения металлоорганических производных белков. Селективное мечение боковых цепей осуществляется только под действием тех металлоорганических реагентов, в которых один из органических лигандов содержит функциональную группу, способную специфически связываться с определенным остатком. В любом случае цель заключается в использовании уникальных *физических* свойств (главным образом, спектроскопических и электрохимических) этих особых комплексов металлов. Большинство рассмотренных металлоорганических комплексов переходных металлов, по-видимому, вполне устойчиво в воде, которая используется в качестве растворителя, причем эта стабильность сохраняется в течение длительного срока.

Помимо этих индикаторных свойств металлоорганические комплексы, как известно, обладают весьма примечательными *химическими* свойствами. Некоторые из них, в частности, способны катализировать большое количество органических процессов (включая реакции полимеризации). Предметом некоторых исследований являлось создание *de novo* способных катализировать ряд химических превращений металлоферментов, содержащих металлоорганический фрагмент, ковалентно [111] или нековалентно [112, 113] связанный с нативными или генетически модифицированными белками. Недавно была предложена идея сочетания направленного выделения ферментов и ковалентной модификации лигандами, что приводит к образованию гибридных катализаторов [114]. Несомненно, эти концепции открывают новые перспективы получения более эффективных катализаторов синтеза новых молекул и материалов.

Благодарности

Искренняя благодарность за финансовую поддержку выражается министерству науки Франции, Национальному центру научных исследований (CNRS) и European COST (грант D8 «Металлы в медицине»).

Сокращения

AC	Переменный ток
Az	Азурин
BSA	Бычий сывороточный альбумин

DCC	N,N'-дициклогексилкарбодиимид
DNP	Динитрофенол
DTSP	Ди(N-сукцинимидил)-3,3'-дитиодипропионат
EDAC	N-(3-диметиламинопропил)N'-этилкарбодиимид
ET	Электронный перенос
FAD	Флавинадениндинуклеотид
Fc	Ферроценил
GLL	Глюконолактон
GLU	Глюкоза
GOx	Глюкозооксидаза
HBV	Вирус гепатита В
HCG	Хорионический гонадотропин человека
HSA	Сывороточный альбумин человека
IgG	Иммуноглобулин G
MAD	Множественное аномальное рассеяние*
MIR	Множественное изоморфное замещение
MLCT	Перенос заряда от металла к лиганду
MUA	11-Меркаптоундекановая кислота
NHS	N-гидроксисукцинимид
PAMAM G4	Полиамидамин четвертого поколения
SAM	Самоорганизованный монослой
SATA	S-ацетилтиоацетат
SIR	Одиночное изоморфное замещение

Литература

1. W. A. Kornicker, B. I. Vallee, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, 153, 689–705.*
2. T. J. Gill III, L. T. Mann Jr., *J. Immunol.* **1966**, 96, 906–912.
3. R. W. Giese, W. Kornicker, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 746, 97–100.
4. J. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, 47–53.
5. I. I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1180–1218.
6. A. E. G. Cass, G. Davies, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 667–671.
7. J. E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama, *Ann. Clin. Biochem.* **2000**, 37, 119–145.
8. F. Mizutani, M. Asai, *Denki Kagaku* **1988**, 56, 1100–1101.
9. H. Shinonara, T. Kusaka, E. Yokota, R. Monden, M. Sisido, *Sens. Actuators B* **2000**, 65, 144–146.
10. K. K.-W. Lo, J. S.-Y. Lau, D. C.-M. Ng, N. Zhu, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 1753–1756.
11. A. Haller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 128–134.
12. Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 1285–1289.

* По-видимому, имеется в виду многоволновое аномальное рассеяние. – *Прим. перев.*

13. Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2615–2620.
14. A. Badia, R. Carlini, A. Fernandez, F. Battaglini, S. R. Mikkelsen, A. M. English, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7053–7060.
15. T. Suzawa, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3889–3894.
16. M. Imamura, T. Haruyama, E. Kobatake, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *Sens. Actuators B* **1995**, 24, 113–116.
17. S. Kunugi, Y. Murakami, K. Ikeda, N. Itoh, *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, 14, 210–214.
18. W. Schuhmann, T. J. Ohara, H. L. Schmidt, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1394–1397.
19. W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 181–193.
20. R. Nagata, S. A. Clark, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 304, 157–164.
21. R. Blonder, E. Karz, Y. Cohen, N. Itzhak, A. Riklin, I. Willner, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3151–3157.
22. L.-Q. Cjem, X.-E. Zhang, W.-H. Xie, Y.-F. Zhou, Z.-P. Zhang, A. E. G. Cass, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 851–857.
23. S. Kuwabata, T. Okamoto, Y. Kajiya, H. Yoneyama, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1684–1690.
24. A. Riklin, J. Willner, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4118–4126.
25. H. C. Yoon, M. Y. Hong, H. S. Kim, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4420–4427.
26. H. C. Yoon, M. Y. Hong, H. S. Kim, *Anal. Biochem.* **2000**, 282, 121–128.
27. H. C. Yoon, D. Lee, H.-S. Kim, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 456, 209–218.
28. C. Padeste, A. Grubelnik, L. Tiefenauer, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 431–438.
29. C. Padeste, B. Steliger, A. Grubelnik, L. Tiefenauer, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 19, 239–247.
30. B. Steiger, C. Padeste, A. Grubelnik, L. Tiefenauer, *Electrochim. Acta* **2003**, 48, 761–769.
31. H. Eckert, M. Koller, J. Liq. Chromatog. **1990**, 13, 3399–3414.
32. T. Suzawa, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *Bull. Soc. Chem. Jpn.* **1995**, 68, 167.
33. T. K. Lim, T. Matsunaga, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 1063–1069.
34. T. K. Lim, S. Imai, T. Matsunaga, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 77, 758–763.
35. T. K. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2984–2989.
36. J. Wang, A. Ibanez, M. P. Chatrathi, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3744–3749.
37. M. Hromadova, M. Salmay, R. Sokolova, L. Pospisil, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 17–24.
38. K. T. Douglas, O. S. Ejim, K. Taylor, *J. Inhibition* **1992**, 6, 233–242.
39. K. Di Gleria, H. A. Hill, L. L. Wong, *FEBS Lett.* **1996**, 390, 142–144.
40. K. Di Gleria, C. M. Halliwell, C. Jacob, H. A. Hill, *FEBS Lett.* **1997**, 400, 155–157.
41. K. Di Gleria, D. P. Nickerson, H. A. O. Hill, L.-L. Wong, V. Fulop, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 46–52.
42. K. K.-W. Lo, L. L. Wong, H. A. Hill, *FEBS Lett.* **1999**, 451, 342–346.
43. A. Anne, C. Demaille, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4817–4825.
44. S. M. Fredericks, J. C. Luong, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 7415–7417.
45. L. Sacksteder, M. Lee, J. N. Demas, B. A. DeGraff, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8230–8238.
46. Y. Chen, B. P. Sullivan, *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 685–689.
47. L. Sacksteder, J. N. Demas, B. A. DeGraff, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3480–3483.

48. S. S. Dun, A. J. Lees, P. Y. Zavalij, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 3445–3453.
49. K. K. Lo, W. K. Hui, D. C. Ng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9344–9345.
50. X. Q. Guo, F. N. Castellano, L. Li, H. Szmazinski, J. R. Lakowicz, J. Sipior, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 179–186.
51. X.-Q. Guo, F.N. Castellano, L. Li, J. R. Lakowicz, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 632–637.
52. J. D. Dattelbaum, O. O. Abugo, J. R. Lakowicz, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 533–536.
53. K. K. Lo, W. K. Hui, D. C. Ng, K. K. Cheung, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 40–46.
54. H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 537–561.
55. I. J. Chang, H. B. Gray, J. R. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7056–7057.
56. E. T. Adman, L. H. Jensen, *Isr. J. Chem.* **1981**, 21, 8.
57. A. K. Dr Bilio, B. R. Crane, W. A. Wehbi, C. N. Kiser, M. M. Abu-Omar, R. M. Carlos, J. H. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3181–3182.
58. J. R. Winkler, A. J. Dr Bilio, N. A. Rarrow, J. H. Richards, H. B. Gray, *Pure & Appl. Chem.* **1999**, 71, 1753–1764.
59. B. R. Crane, A. J. Dr Bilio, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11623–11631.
60. J. E. Miller, C. Gradinaru, B. R. Crane, A. J. Dr Bilio, W. A. Wehbi, S. Un, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14220–14221.
61. F. C. H. Crick, B. S. Mardoff, *Acta Cryst.* **1956**, 9, 901–908.
62. T. L. Blundell, L. N. Johnson, *Protein crystallography*, Academic Press, London, **1976**.
63. G. A. Petsko, *Methods Enzymol.* **1985**, 114, 147–156.
64. S. A. Islam, D. Carvin, M. J. Sternberg, T. L. Blundell, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1998**, 54, 1199–1206.
65. L. Sawyer, D. W. Green, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 579, 234–239.
66. C. C. F. Blake, *Adv. Protein Chem.* **1968**, 23, 59–120.
67. W. Jahn, *Z. Naturforsch.* **1989**, 44b, 79–82.
68. S. Weinstein, W. Jahn, H. Hansen, H. G. Wittmann, A. Yonath, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 19138–19142.
69. S. Weinstein, W. Jahn, C. Glotz, F. Schlunzen, I. Levin, D. Janell, J. Harms, I. Kolln, H. A. Hansen, M. Gluhmann, W. S. Bennett, H. Bartels, A. Bashan, I. Agmon, M. Kessler, M. Pioletti, H. Avila, T. Auerbach, F. Franceschi, A. Yonath, *J. Struct. Biol.* **1999**, 127, 141–151.
70. D. Osella, P. Pollone, M. Ravera, M. Salmain, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 607–612.
71. D. Osella, M. Ravera, M. Vigenti, M. Salmain, G. Jaouen, *Organometallics* **1996**, 15, 3037–3041.
72. A. Gorfti, M. Salmain, G. Jaouen, M. J. McGlinchey, A. Bennouna, A. Mousser, *Organometallics* **1996**, 15, 142–151.
73. M. Salmain, A. Gorfti, G. Jaouen, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 258, 192–199.
74. A. T. Balaban, G. W. Fischer, A. Dinulescu, A. V. Koblik, C. N. Dorofeenko, V. V. Mezhritski, W. Schroth, in A. R. Katritzky (Ed.), *Advances in heterocyclic chemistry*, Suppl. II Academic Press, New York, **1982**, pp. 114–127.
75. C. F. Bernasconi, M. W. Stronach, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1341–1346.
76. M. Salmain, E. Licandro, S. Maiorana, H. Tran-Huy, G. Jaouen, *J. Oranomet. Chem.* **2001**, 617–618, 376–382.
77. M. Salmain, J. C. Blais, H. Tran Hoy, C. Compain, G. Jaouen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 5479–5487.

78. D. P. Egan, M. Salmmain, P. McArdle, G. Jaouen, B. Caro, *Spectrochim. Acta A* **2002**, 58, 941–951.
79. M. Salmmain, B. Caro, F. Le Guen-Robin, J.-C. Blais, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2004**, 5, 99–109.
80. I. W. McNae, K. Fishburne, A. Habtemariam, T. M. Hunter, M. Melchart, F. Wang, M. D. Walkinshaw, P. J. Sadler, *Chem. Commun.* **2004**, 1786–1787.
81. N. Cheng, J. F. Conway, N. R. Watts, J. F. Hainfeld, V. Joshi, R. D. Powell, S. J. Stahl, P. E. Wingfield, A. C. Steven, *J. Struct. Biol.* **1999**, 127, 169–179.
82. G. Marcon, L. Messori, P. Orioli, M. A. Cinellu, G. Minghetti, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 4655–4661.
83. R. W. Giese, B. L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6199–6200.
84. R. W. Giese, *J. Inorg. Biochem.* **1983**, 18, 301–311.
85. A. E. Bolton, W. M. Hunter, *Biochem. J.* **1973**, 133, 529–539.
86. M. Salmmain, A. Vessières, I. S. Butler, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 13–15.
87. B. Rudolf, J. Zakrzewski, M. Salmmain, G. Jaouen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4281–4282.
88. M. Salmmain, M. Gunn, A. Gorfii, S. Top, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 425–433.
89. A. Varenne, M. Salmmain, C. Brisson, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 471–476.
90. M. Salmmain, N. Fischer-Durand, L. Cavaller, B. Rudolf, J. Zakrzewski, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 693–698.
91. B. Rudolf, J. Zakrzewski, M. Salmmain, G. Jaouen, *New J. Chem.* **1998**, 813–818.
92. S. S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Boca Raton (FL), 1991.
93. A. Kazimierzczak, J. Zakrzewski, M. Salmmain, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 489–494.
94. M. H. O'Leary, G. A. Samberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 3530.
95. A. R. Katritzky, J. L. Mokrosz, M. L. Lopez-Rodriguez, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, 875–878.
96. K. Dill, S. Hu, A. R. Katritzky, M. Sutharchanadevi, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1988**, 17, 75–78.
97. L. Dill, S. H. Hu, M. Sutharchanadevi, A. R. Katritzky, *J. Protein Chem.* **1988**, 7, 341–348.
98. A. Fernandez, A. R. Katritzky, M. Sutharchanadevi, B. R. Stevens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 163, 1356–1363.
99. B. Caro, D. Sénéchal, M.-C. Sénéchal-Tocquer, P. Marrec, J.-Y. Sallard, C. Trikim S. Kahial, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7259–7262.
100. B. Caro, F. Robin-Le Guen, M.-C. Sénéchal-Tocquer, V. Prat, J. Vaissermann, *J. Organomet. Chem.* **1997**, 543, 87–92.
101. P. Haquette, M. Salmmain, Y. Marchal, Y. Marsac, G. Jaouen, D. Cunningham, D. P. Egan, P. McArdle, *Chem. Commun.* **2001**, 1504–1505.
102. K. L. Malisza, S. Top, J. Vaissermann, M.-C. Sénéchal-Tocquer, D. Sénéchal, J. Y. Saillard, S. Triki, S. Kahlal, J. F. Britten, M. J. McGlinchey, G. Jaouen, *Organometallics* **1995**, 14, 5273–5280.
103. А. Г. Милаев, О. Ю. Охлобыстин *Хим. гетероцикл. соед.* **1985**, 5, 593–597.
104. M. Salmmain, K. L. Malisza, S. Top, G. Jaouen, M.-C. Sénéchal-Tocquer, D. Sénéchal, B. Caro, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 655–659.
105. B. Caro, F. Le Guen-Robin, M. Salmmain, G. Jaouen, *Tetrahedron* **2000**, 56, 257–263.

106. G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, New York, **1996**.
107. D. G. Smyth, A. Nagamatsu, J. S. Fruton, *Biochem. J.* **1960**, 91, 589.
108. B. Rudolf, J. Zakrzewski, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9611–9612.
109. J. G. Carver, B. Fates, L. A. P. Kane-Maguire, *Chem. Commun.* **1993**, 928.
110. C. E. Anson, C. S. Creaser, O. Egyed, G. R. Stephenson, *Spectrochim. Acta A* **1997**, 53, 1867–1877.
111. D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Dr Stefano, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3081–3111.
112. J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9030–9031.
113. M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 306–307.
114. M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5716–5722.
115. N. Fischer-Durand, M. Salmain, B. Rudolf, A. Vessières, J. Zakrzewski, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2004**, 5, 519–525.

7 Металлоорганические биозонды

Р. Стефенсон (G. Richard Stephenson, Wolfson Materials and Catalysis Centre, School of Chemical Sciences and Pharmacy, University of East Anglia, UK)

7.1. Введение

Взаимодействие между химией и биологией становится все более и более важным. На молекулярном уровне органические соединения могут взаимодействовать с природными соединениями, биополимерами, супрабиомолекулярными образованиями в высокой точности. Изучение этих взаимодействий, их дизайн в течение последнего десятилетия являлись приоритетным направлением исследований в области молекулярного распознавания. Здесь были достигнуты значительные успехи. В самом деле, важность молекулярного распознавания в биологических системах является одним из ключевых моментов, определяющих столь большое внимание к данной области. Процессы распознавания, происходящие между малыми биомолекулами, между малыми молекулами и биологическими макромолекулами, а также между самими макромолекулами являются ключевыми в функционировании природных систем, в естественном либо патологическом росте клеток и организмов. Исследование процессов молекулярного распознавания может быть мотивировано желанием контролировать эти процессы, как в случае поиска новых лекарств и антибиотиков, либо разработкой инструментов воздействия, использующих в глубинных деталях совершенную работу природных объектов.

7.2. Определение терминов «биозонды» и «молекулярные биозонды»

В общем случае термин «биозонды» определяется следующим образом [1]: «Биозонды – это молекулы или молекулярные устройства, которые предоставляют информацию о состоянии биологических систем. Они могут работать как на макроскопическом уровне, так и на микроскопическом или субмикроскопическом уровне (бионанометрология и наблюдение биологических систем на молекулярном уровне)». В настоящей главе термин «биозонд» используется для случая молекулярных структур, которые могут функционировать в качестве зондов, предоставляющих информацию о биологических системах. Это *молекулярные* биозонды, например микроэлектроды или другие макро-

скопические приспособления. В данной главе речь идет о *функциональных молекулах* и о том, как металлоорганическая химия помогает новому дизайну функциональных молекул, способных отвечать на биологические вопросы. То же определение справедливо и в других аспектах аналитической науки. Так, сенсоры могут быть макроскопическими устройствами (хорошей иллюстрацией служат, например, устройства типа «лаборатория на чипе» [2]) либо могут быть функциональными молекулами, обладающими «чувствительностью» в молекулярном масштабе. Термин «молекулярный сенсор» иногда неверно используется или неправильно понимается. Наиболее правильно использовать этот термин в случае приспособлений молекулярного масштаба, которые дают отклик и предоставляют информацию об аналитах или других внешних измеряемых параметрах (более общие термины «хемосенсор» или «химический сенсор» [3] соответствуют сенсорам, дающим отклик на химические вещества). Точно так же, «молекулярные биозонды», которые являются предметом данной главы – это не просто приспособления, дающие отклик на биологические молекулы, но материалы, функционирующие в молекулярном масштабе и использующие работу биологических систем.

Важно также подчеркнуть, что химия молекулярных биозондов не является подразделом химии молекулярного распознавания (т. е. химии «гость – хозяин» [4]). В последней (рис. 7.1) «молекула-гость» связывается с сайтом искусственного рецептора («хозяина»), что обеспечивает эффект «распознавания» путем селективных взаимодействий. Химия молекулярных биозондов является скорее *применением* молекулярного распознавания.

Биозонды призваны делать больше, чем просто распознавать соответствующие черты биологических молекул. Они должны также включать в себя метод считывания информации, доступной в результате акта молекулярного распознавания.

В этом отношении дизайн молекулярных биозондов аналогичен дизайну молекулярных сенсоров. Последнему посвящены многие обзоры [5]. Эти сенсоры обычно содержат три компонента (рис. 7.2): сайт связывания в молекуле

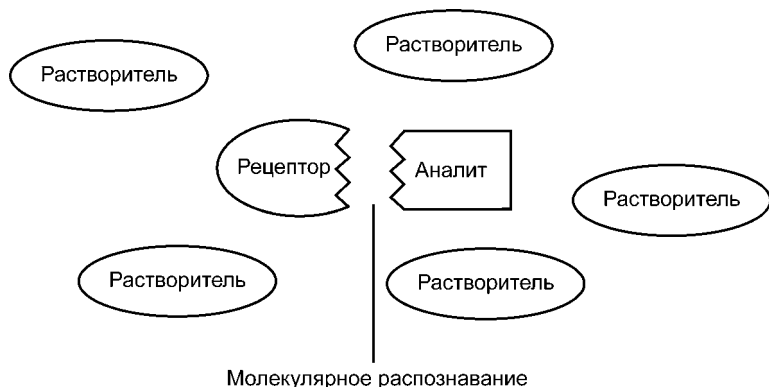


Рис. 7.1. Молекулярное распознавание в химии «гость – хозяин»

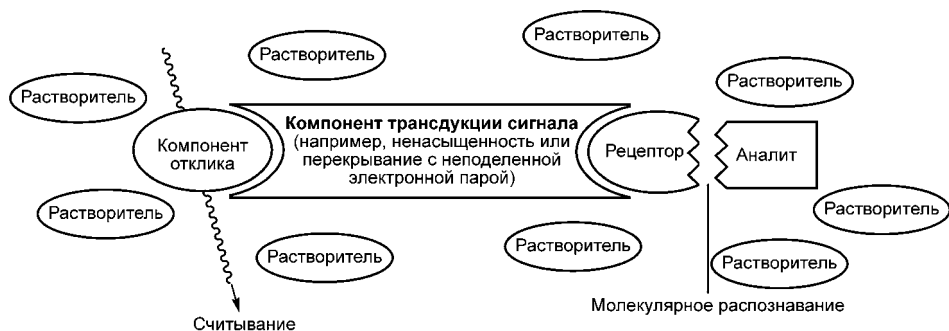


Рис. 7.2. Схема работы молекулярных сенсоров, в которых присутствие компонента трансдукции сигнала позволяет спектроскопически активной группе откликаться на связывание молекулы аналита с рецептором

аналита; молекулярный компонент трансдукции сигнала; сигнальную часть молекулы, которая позволяет считывать информацию.

Таким образом, распознавание, трансдукция и отклик – все это важно для правильного функционирования биозонда, однако эффективность работы подобных устройств обычно ограничена селективностью рецептора. Если несколько аналитов конкурируют за связывание с рецептором, зачастую наблюдается недостаточная дискриминация связывания в сенсоре. Поэтому даже при современном уровне развития этой области, оптимизация взаимодействий рецептора типа «гость–хозяин» для данного аналита – задача далеко непростая. Более того, данный подход требует дизайна и синтеза оптимального рецептора для каждого аналита, что требует времени. При этом не получается универсальный сенсор, который может быть применен к набору сходных аналитов. Подход к дизайну биозондов, обсуждаемый в данной главе, основан на новой стратегии для достижения дополнительной селективности – стратегии использования множественных комплементарных откликов. Для изучения биологических задач с высокой точностью в прикладных целях потребуются высокая селективность.

7.3. Стратегии отклика для считывания информации

В подходах к реализации трансдукции сигнала и считывания информации, типичных и популярных в настоящее время, используются как спектральные методы, основанные на УФ- и флуоресцентной спектроскопии, так и электрохимические методы. В простейшем случае связывание молекулы-гостя рецептором изменяет спектральные характеристики хромофора и, таким образом, изменяется спектр молекулы в УФ/видимой области [6]. Измерение УФ-спектра в присутствии и в отсутствие аналита и сравнение полученных результатов может дать основу построения градуировочных кривых и для аналитических измерений. В случае хорошо исследованных систем может

быть достаточным измерение соотношения двух сигналов (максимумов абсорбции, например, для «свободной» молекулы-хозяина и для комплекса гость – хозяин) с последующим построением градуировочного графика как зависимости отношения сигналов и концентрации аналита (молекулы-гостя). В более точных приложениях при проверке достоверности метода могут быть найдены длины волн, при которых помехи, вызванные поглощением других хромофоров, минимальны. Тогда градуировку можно произвести именно при этих длинах волн. Использование спектров первых производных [7] и метода отношения спектров [8] может дать дополнительное улучшение качества определения. Так же, как спектроскопию в УФ/видимой области, можно использовать флуоресцентную спектроскопию [9], которая имеет большую чувствительность. Хотя и существуют биомолекулы, которые флуоресцируют, влияние фоновой флуоресценции на спектр намного меньше, чем влияние конкурентного поглощения природных хромофоров в биологическом образце при использовании спектроскопии в УФ/видимой области.

Методы, основанные на флуоресценции, таким образом, дают более высокую чувствительность и более низкий уровень помех, но устройство приборов для флуоресцентной спектроскопии часто гораздо более сложное. Пример, приведенный на рис. 7.2, типичен для сенсоров, использующих флуоресценцию как метод считывания информации. Флуорофор («компонент отклика») должен быть ковалентно связан с рецептором молекулы так, чтобы конструкция связывающего компонента и метод считывания могли быть разделены. Для правильной работы молекулярного сенсора важна трансдукция сигнала между этими двумя частями сенсора. Часто наилучшим вариантом оказываются сопряженные π -системы. Как для систем, основанных на поглощении в УФ/видимой области, так и базирующихся на флуоресцентных методах, в основе спектроскопии лежат электронные переходы между заполненными и вакантными π/π^* -орбиталями (или n/π^* -орбиталями). Изменения в молекуле, направленные на оптимизацию трансдукции сигнала могут вызвать также изменения спектральных или флуоресцентных характеристик молекулы. Несмотря на возможные недостатки, как методы, основанные на спектроскопии в УФ/видимой области, так и флуориметрические методы считывания информации используются на практике и на основе этих методов были развиты многие успешные и элегантные приложения. Более того, в случае флуоресцентных методов, в которых используется гашение флуоресценции [10], уникальные преимущества могут иметь утонченные конструкции, создаваемые для трансдукции сигнала и считывания информации. При этом, однако, в случае биологических систем образец должен быть прозрачен как для возбуждающего, так и для испускаемого излучения.

Интенсивно изучались электрохимические методы считывания информации [11]. В данном случае механизмом идентификации гостя-аналита является обнаружение изменений окислительно-восстановительных потенциалов. Редокс-активную часть системы можно выбирать так, чтобы избежать влияния естественных фоновых электрохимических явлений. Дизайн такой системы часто аналогичен дизайну системы, основывающейся на измерении флуоресценции, поскольку лишь небольшое число рецепторных

молекул имеют естественную окислительно-восстановительную активность. И вновь, лучше разделять две функции, связывая их компонентом трансдукции сигнала. Преимущество редокс-химии состоит в том, что многие тонкие молекулярные факторы могут влиять на электрохимические отклики электрофора, причем могут быть использованы различные стратегии трансдукции. Металлоорганические структуры зачастую могут дать сильные и отчетливые электрохимические отклики. Поэтому ясно, что в случае методов, базирующихся на окислительно-восстановительных реакциях (в большей степени, чем для флуоресцентных методов и методов, базирующихся на спектрах в УФ/видимой области), весьма выгодным оказывается введение металлоорганического фрагмента в качестве сектора отклика молекулярного сенсора. Типичным примером является ферроцен [12], который одновременно обладает высокой химической устойчивостью, позволяющей проводить разнообразные синтетические процедуры модификации, и характеристическими электрохимическими откликами. Не только ферроцен, но и многие другие металлоорганические соединения могут быть основой создания полезных систем. Так, связывание лития и натрия азкараун-эфирами было изучено с помощью циклической вольтамперометрии кобальтоцениевых комплексов [13]. Были разработаны эффективные биозонды с использованием ферроцена, обеспечивающего электрохимическое считывание информации. Пожалуй, наиболее типичными случаями являются исследования путей переноса электрона в редокс-активных белках путем присоединения к их поверхности производных ферроцена [14]. В электрохимических исследованиях был использован конъюгат циклопентадиенил(трикарбонил)марганца и альбумина плазмы бычьей крови [15]. В качестве геносенсоров применялись ферроценильные производные олигонуклеотидов [16] с использованием импульсных вольтамперограмм в качестве метода считывания информации.

Считается, что ИК-спектроскопию обычно нельзя использовать в молекулярных сенсорах в качестве метода считывания, поскольку спектроскопические отклики от остальных компонентов анализируемого образца слишком сильны и разнообразны. При изучении биологических систем фоновое поглощение воды маскирует большую область ИК-спектра, который вследствие этого неприменим как стратегия считывания информации. Однако в небольшой области около 2000 см^{-1} имеется «окно» в фоновом поглощении воды, где возможна прекрасная передача ИК-излучения [17]. Полосы поглощения большинства органических функциональных групп не попадают в это «окно». Поэтому конкуренция со стороны фонового спектра самих биологических образцов (например, белков, нуклеиновых кислот и даже препаратов целой клетки) не будет мешать спектральному считыванию через упомянутое «окно» (следует, однако, заметить, что металлокарбонильные производные металлоферментов [18, 19] дают полосы поглощения в «окне»). Поскольку ИК-спектроскопия – это колебательная спектроскопия, спектральные переходы осуществляются между колебательными состояниями функциональных групп молекулы. Хотя такие переходы могут быть связанными (колебательное спаривание), все же, по большей части, отдельные функциональные группы дают отдельные отклики в ИК-спектроскопии. Для достижения хорошей

трансдукции сигнала между сайтом рецептора и группой отклика в биозонд могут вводиться модифицирующие его молекулярные фрагменты. Такие фрагменты не так сильно мешают друг другу, если методом считывания служит ИК-спектроскопия по сравнению, например со случаем, когда рецептор и откликающийся хромофор связываются друг с другом π -системами, а процесс считывания осуществляется с помощью спектроскопии в УФ/видимой области. Концептуальным преимуществом ИК-спектроскопии, таким образом, является минимальное фоновое поглощение функциональных групп биологических объектов в «окне» фонового спектра воды. Вдобавок, отсутствуют проблемы компромиссов между методом считывания, продиктованным изменениями молекулярного дизайна, которые внесены для достижения эффективной трансдукции сигнала от связанного аналита к рецепторной части молекулярного сенсора, и биозондом. Кроме того, ИК-спектроскопия – это быстрый метод в спектроскопической шкале времени и, следовательно, с ее помощью можно наблюдать детали быстро происходящих процессов.

Заслуживает упоминания еще один метод считывания информации, хотя его использование довольно специфично, а необходимые спектрометры более дороги. Спин электрона является утонченным и чувствительным инструментом исследования биологических систем [20], и считывание с помощью спектроскопии ЭПР (электронного парамагнитного резонанса) представляет собой мощный метод. Концептуальные преимущества, описанные выше для методов, основанных на ИК-спектроскопии, относятся также к считыванию, основанному на ЭПР в том смысле, что для типичных биологических образцов можно ожидать низкого уровня фоновых сигналов. К этому следует добавить высокое разрешение, достигаемое методом ЭПР и то, что спектральные переходы, на которых основан метод (переходы между электронными спиновыми состояниями) сильно отличаются по своей природе от общих свойств большинства органических функциональных групп. В таких работах используются особые органические соединения, которые являются стабильными радикалами. Так же, как электрохимия, основанная на производных ферроцена, использовалась для изучения путей переноса электрона между поверхностью белков и редокс-активными группами в структуре белков (см. выше) при помощи методов, неоснованных на спине электрона, можно получить детальную информацию, используя закрепленные на поверхности стабильные свободные радикалы. Чувствительность и отсутствие фоновых сигналов, свойственные методу ЭПР, делает этот метод более привлекательным, нежели другие методы, основанные на спиновых состояниях (например, ядерный магнитный резонанс). Однако в общем случае трансдукция сигнала между рецептором и считывающей системой, основанной на электронных спиновых состояниях, будет осложняться взаимодействием электрона с компонентами рецептора и системой трансдукции. То, что является мощным инструментом для изучения электронных переходов в белках, не может быть так просто распространено на дизайн биозондов в случае более общих приложений. Аналогично, методы, основанные на ЯМР с «нетипичными» ядрами (например, спектроскопия ЯМР ^{19}F фторуглеродных групп [21]), лишенные концептуальных недостатков, связанных с «размыванием» спина в рецепторе

и компонентах трансдукции, уступают другим методам в общей чувствительности. Благодаря высокой чувствительности, метод ЭПР используется широко. В этом методе, также как в электрохимических методах, важную роль могут играть металлоорганические структуры, предоставляющие собой стабильные парамагнитные металлоорганические компоненты для использования с той же целью, что и стабильные органические радикалы.

В заключение отметим некоторые факторы, важные для разработки биозондов. Критическим является высокая чувствительность спектрального отклика, поскольку чем выше чувствительность, тем большее число биологических задач может быть решено данным методом. Важна также низкая конкуренция со стороны фоновых спектральных переходов. На практике чувствительность отклика не совпадает с чувствительностью, присущей данному спектральному методу. Она определяется способностью выявить изменяющиеся сигналы считывающей системы в присутствии фонового спектра биологического образца. Более специфичные методы считывания, однако, приводят к таким молекулярным устройствам, в которых участки, обеспечивающие распознавание и создающие спектральный отклик, разделены. Преимуществом в таком случае является возможность независимо оптимизировать эти два участка молекулярного устройства. Следовательно, могут возникать осложнения в тех случаях, когда значительные изменения в спектральном отклике системы вызываются изменениями химии «гость–хозяин» рецептора за счет изменений структуры молекулы-хозяина, либо изменениями компонента трансдукции сигнала, который передает информацию на группу отклика. Наилучшие результаты дадут независимые методы считывания, чувствительные к различию в свойствах между «хозяином» и комплексом «гость–хозяин», но нечувствительные к другим аспектам молекулярной архитектуры как «хозяина», так и компонентов трансдукции сигнала. В этом отношении многообещающими являются методы, базирующиеся на ИК-спектроскопии, поскольку они отвечают всем критериям.

7.4. Металлоорганические компоненты металлоорганических биозондов: новые преимущества методов считывания, основанных на ИК-спектроскопии

Тот же самый фактор, который освобождает ИК-спектр, записанный в области «окна» фонового спектра воды, от наложения полос поглощения образца, одновременно ставит задачу выбора функциональных групп для разработки техники считывания информации. Функциональные группы органических соединений не дают полос поглощения в области $1900\text{--}2100\text{ см}^{-1}$. В этой спектральной области наблюдаются лишь очень слабые полосы обертонов деформационных колебаний органических функциональных групп. Решение этой проблемы предлагает металлоорганическая химия, поскольку валентные колебания монооксида углерода (наблюдающиеся при 2143 см^{-1}) смещаются в низкочастотную сторону в спектрах карбонильных комплексов переходных металлов. Большинство

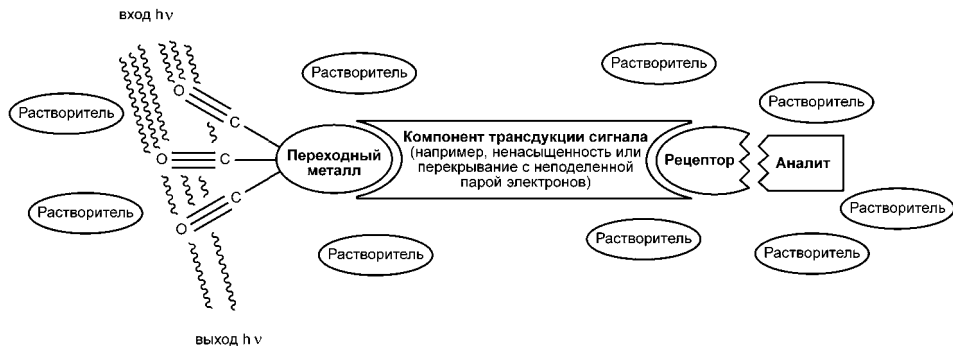


Рис. 7.3. Схема действия сенсора на основе карбонильного комплекса металла. Связывание аналита с рецептором влияет на частоту колебаний карбонильных групп при атоме металла путем изменения распределения плотности заряда в органическом лиганде, что позволяет измерять отклик с помощью ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием

карбонильных комплексов металлов – бинарные карбонилы и комплексы, содержащие другие лиганды (помимо CO), имеют интенсивные полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям в «окне» фонового спектра воды. Если такой фрагмент присоединить к рецепторной функции с помощью компонента трансдукции сигнала (рис. 7.3), то можно сконструировать биозонд и, использовать ИК-спектроскопию как метод считывания информации.

Химия органических лигандов очень хорошо развита и поэтому предоставляет широкие возможности для соединения компонента отклика – карбонильного комплекса металла, участка трансдукции сигнала и рецепторной части молекулярного устройства. В карбонильных комплексах металлов сложная колебательно-вращательная структура полосы поглощения газообразного монооксида углерода упрощается до одной интенсивной колебательной моды (валентные колебания CO в комплексе M-CO) в области $1800\text{--}2100\text{ см}^{-1}$.

Причина сдвига частоты колебаний CO в область $1800\text{--}2100\text{ см}^{-1}$ при образовании комплекса с металлом хорошо известна [22, 23]. Связь между атомом углерода молекулы CO и атомом металла (рис. 7.4) представляет собой сочетание σ -связи (образованной перекрыванием симметричной орбитали металла с sp -гибридной орбиталью атома углерода, которая в свободной молекуле CO содержит неподеленную пару электронов на атоме углерода [24]) и π -орбитали, образованной перекрыванием π^* -орбитали тройной связи молекулы CO с подходящей по симметрии (антисимметричной) орбиталью атома металла. Хотя эта π^* -орбиталь и является антисвязывающей по отношению к CO, она участвует в связывающем взаимодействии между карбонильным лигандом и атомом металла.

При образовании комплекса первоначально неподеленная пара электронов атома углерода CO-лиганда становится частью занятых электронами связывающих орбиталей комплекса металла, и участие неподеленной пары электронов CO в образовании связи с металлом часто называют σ -донированием. Аналогично, поскольку π^* -антисвязывающая орбиталь является вакантной

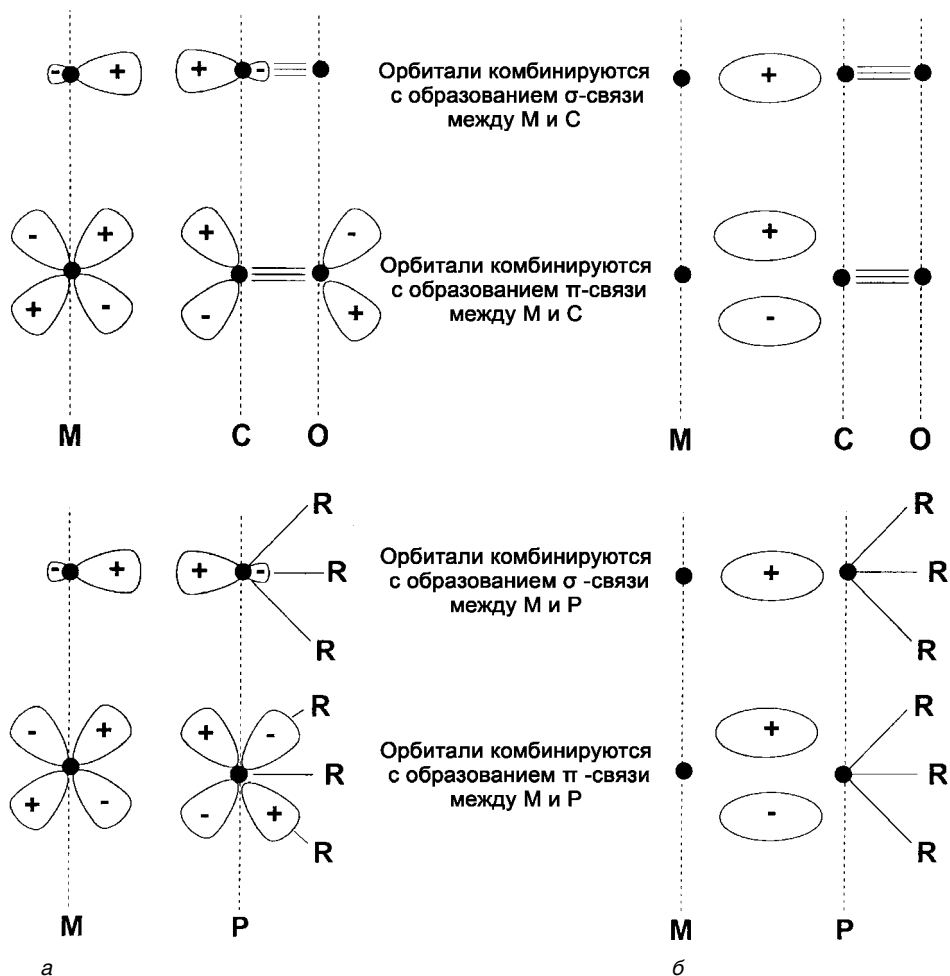


Рис. 7.4. Перекрытие орбиталей при образовании связи между атомом переходного металла и оксидом углерода (а) и фосфиновыми лигандами (б) (по [23])

в лиганде CO, ее участие в образовании связи с металлом можно рассматривать как π -акцепторное [25].

Для того чтобы знать реальную картину связывания в комплексе, важны величины орбитальных коэффициентов атомов металла и углерода в σ - и π -связывающих компонентах структурного фрагмента M-CO. Однако сама концепция σ -донорных и π -акцепторных свойств карбонильного лиганда удобна для построения качественной модели влияния комплексообразования как на прочность связи с CO, так и на относительный сдвиг частоты валентных колебаний $[v_{CO}]$. В общем случае в катионных комплексах карбониллов металлов v_{CO} выше, чем в нейтральных и, тем более, в анионных комплексах. Электронная плотность на атоме металла в анионных комплексах больше по сравнению с нейтральными структурами, причем π -акцепторные свойства

лигандов способствуют делокализации заряда. Повышенная электронная плотность на орбиталях, включающей π^* -антисвязывающую орбиталь карбонильного лиганда, ослабляет тройную связь CO в лиганде и, таким образом, понижает частоту валентных колебаний CO. Сходные выводы относятся к катионным структурам, в которых пониженная электронная плотность на атоме металла соответствует меньшей тенденции к переносу электронной плотности на орбитали π -акцептора.

Поэтому связь $\text{C}\equiv\text{O}$ ослабляется в меньшей степени, и валентным колебаниям ν_{CO} соответствует более высокая энергия (большие волновые числа в спектре). Если рассматриваются частичные заряды, применимы те же принципы. На этом основано объяснение действия биозондов, которые изображены на рис. 7.3. Связывание аналита с рецептором может изменить плотность заряда на рецепторе. Это изменение будет передано компонентом трансдукции сигнала, что приведет к соответствующему изменению плотности заряда на атоме переходного металла и, таким образом, к изменению баланса между σ -донорными и π -акцепторными свойствами лиганда CO. Примеры структур карбонильных комплексов металлов [26–29], которые способны откликаться на простые химические изменения, приведены на рис. 7.5.

Природа связи в фосфиновых (PR_3) и карбонильных комплексах металлов обнаруживают определенное сходство (рис. 7.4). Оба эти лиганда – π -акцепторы и относятся к серии изолиобальных [30] лигандов (наряду с карбенами, изонитрилами, нитрилами), которые в комплексе с переходным металлом оттягивают электронную плотность с атома металла. Если эти два

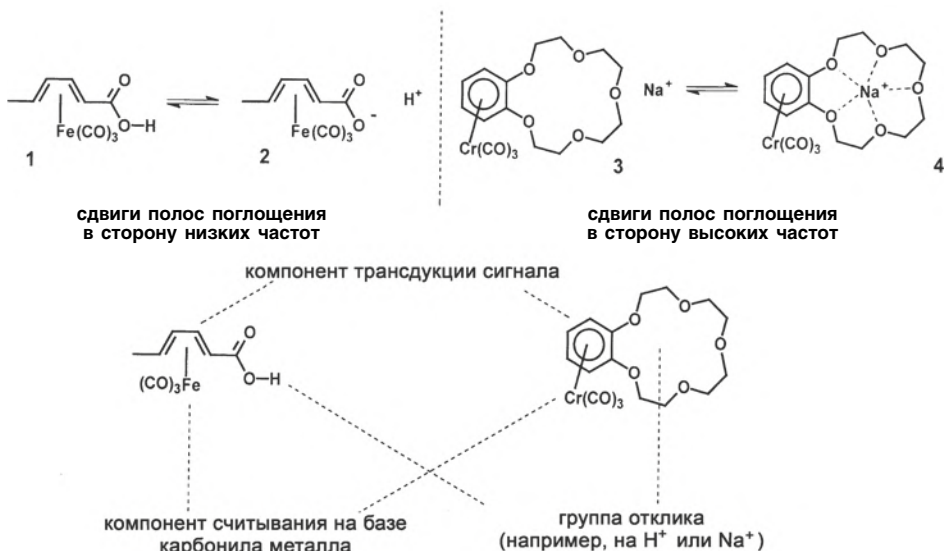


Рис. 7.5. Примеры структур на основе карбонильных комплексов металлов, влияющих на ИК-спектры в ответ на изменения концентрации протонов или ионов щелочного металла

лиганда связаны с одним и тем же атомом металла, это влияет на положение полос поглощения карбонильных групп. Например, при замене карбонильного лиганда фосфиновым колебания любого остающегося карбонильного лиганда сдвигаются в низкочастотную область, поскольку фосфины являются более слабыми π -акцепторами по сравнению с монооксидом углерода.

Если в комплексе присутствуют несколько карбонильных лигандов одного типа, наблюдается наложение валентных колебаний [23], что значительно усложняет ИК-спектр в области $1900\text{--}2100\text{ см}^{-1}$ (рис. 7.6).

В то время как изолированная группа $\text{M}(\text{CO})$ дает в спектре одну четкую узкую полосу валентных колебаний ν_{CO} , наличие группы $\text{M}(\text{CO})_2$ всегда приводит (рис. 7.6, а) к двум полосам поглощения (рис. 7.6, б). Было бы неправильно считать, что эти полосы соответствуют каждой карбонильной группе по отдельности. Большая по энергии полоса поглощения соответствует симметричным валентным колебаниям группы $\text{M}(\text{CO})_2$ в целом, а более низкая по энергии (низкочастотная) полоса поглощения соответствует антисимметричным колебаниям. Степень разделения двух полос ($\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$) в спектре зависит от эффективности взаимодействия колебаний. Так, в биозондах, содержащих группу $\text{M}(\text{CO})_2$ в качестве группы отклика, информацию дает как положение, так и степень разделения полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$. В то время как положение полос (точнее говоря, положение центральной точки между двумя максимумами полос) сильно зависит от заряда на атоме металла, на взаимодействие колебаний (а, следовательно, и степень разделения полос) сильно влияют изменения геометрии комплекса. Группа отклика, представляющая собой фрагмент $\text{M}(\text{CO})_2$, более информативна, чем группа $\text{M}(\text{CO})$. В том случае, если группой отклика служит фрагмент $\text{M}(\text{CO})_3$, появляется уникальное симметричное валентное колебание, которое дает в спектре полосу поглощения с максимальным волновым числом. Для фрагмента $\text{M}(\text{CO})_3$, однако, существуют два возможных антисимметричных валентных колебания, которые часто дегенерируют (т. е. имеют одну и ту же энергию колебательного перехода). Полосы поглощения этих дегенерированных колебаний, следовательно, появляются в ИК-спектре в одном и том же месте, и результатом (рис. 7.6, в) является слабая полоса $\nu_{\text{симм.CO}}$, сопровождаемая единственной полосой $\nu_{\text{антисимм.CO}}$, примерно вдвое более интенсивной (на соотношение интенсивностей влияет также степень колебательного взаимодействия [32, 33]). Число колебательных мод для структурного фрагмента $\text{LM}(\text{CO})_n$ может быть определено [44] из симметрии комплекса и числа CO -лигандов (n). Так если симметрия комплекса низкая, дегенерация антисимметричных $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ полос исчезает. На практике это часто проявляется только в слабом уширении (и уменьшении интенсивности) полосы $\nu_{\text{антисимм.CO}}$, но в неполярных растворителях, таких как циклогексан, полосы $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ могут быть частично разрешены (рис. 7.6, г). В применении биозондов значение может иметь даже перекрывание полос $\nu_{\text{антисимм.CO}}$, поскольку исчезновение дегенерации и разделение двух вкладов в форму полосы являются следствием тонких изменений структуры комплекса. В ИК-спектре положение всей группы сигналов на частотной шкале (центральной точкой является средневесовое

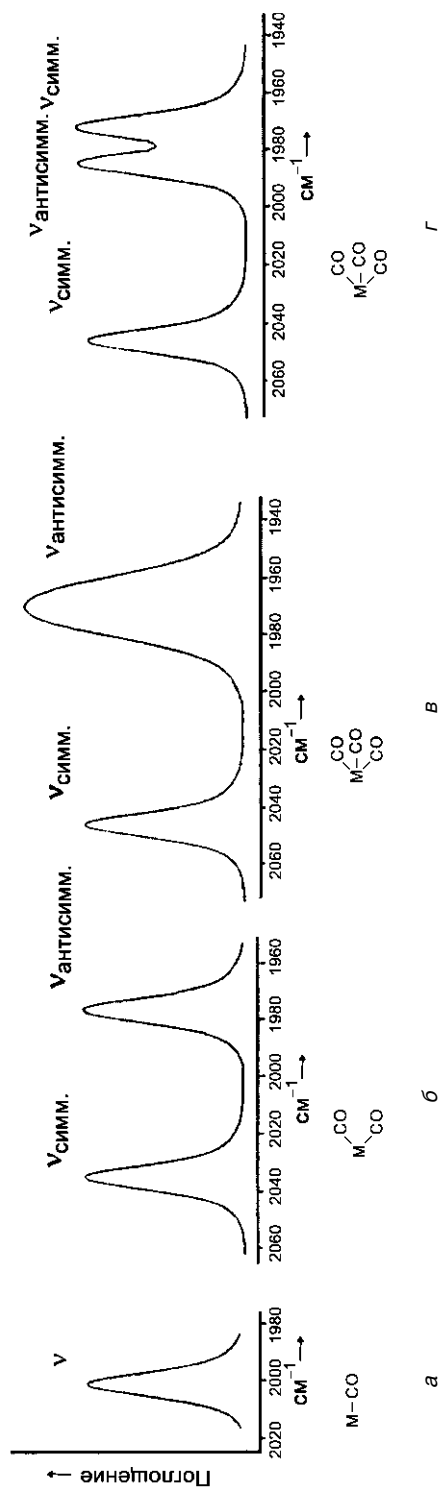


Рис. 7.6. Идеализированное представление типичных ИК-спектров, в которых проявляются $\nu_{\text{симм}}(\text{CO})$ и $\nu_{\text{антисимм}}(\text{CO})$ валентные колебания карбонильных групп, связанных с металлом $[\text{M}(\text{CO})]_n$; $a - n = 1$; $б - n = 2$; $в, г - n = 3$

положение составляющих полос), разделение полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ и форма поглощения модулированных колебаний $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ – все это представляет информацию [35], и на все это в разной степени оказывают влияние изменения в характере связывания, геометрии и распределении заряда в молекуле. Из ИК-спектра комплексов состава $\text{LM}(\text{CO})_n$ можно получить гораздо больше информации, чем может показаться на первый взгляд. Количество получаемой информации возрастает с увеличением n .

Из изложенного выше видно, что считывание информации, основанное на ИК-спектроскопии металлоорганических биозондов, содержащих карбонильные лиганды, путем анализа формы полос колебаний, наблюдаемых через «окно» в фоновом спектре воды, имеет много особенностей. Положение интенсивных и узких полос ν_{CO} на шкале частот может изменяться при изменении других (помимо CO) лигандов и давать отклик на различные эффекты заряда и/или структуры комплекса. Существенным преимуществом использования ИК-спектроскопии в случае карбонильных лигандов металлоорганических биозондов является то, что полосы поглощения нескольких металлоорганических комплексов могут быть выявлены независимо, причем в одном спектроскопическом эксперименте. Колебательные полосы достаточно узкие, так что может быть использована комбинация нескольких комплексов, которые дают неперекрывающиеся полосы – речь идет о «металлополикарбонильном» методе [26, 36]. При изучении биологических систем, где приходится разделять многие конкурирующие друг с другом факторы, упомянутый метод может иметь решающее значение. Можно представить себе системы, основанные на поликарбонильных металлоорганических комплексах, которые будут давать отклик на один и тот же анализируемый фактор (это увеличит точность измерения или поможет отличить конкурентные побочные влияния от действительных откликов, вызываемых интересующим фактором). Наоборот, комплексы с различными рецепторами могут быть использованы совместно для одновременного определения двух факторов. Подход, основанный на поликарбонильных металлоорганических комплексах, включает в себе концептуально важное преимущество методов, основанных на ИК-спектроскопии. Этот метод весьма удобен с практической точки зрения ввиду очень узкой формы полос ν_{CO} и снимает ограничения в селективности рецептора в тех случаях, когда биозонды построены из компонентов рецептора, фрагмента $\text{M}(\text{CO})_n$ в качестве группы отклика и η^n -органических лигандов с расширенными π -системами в качестве компонента трансдукции сигнала (рис. 7.3). Проблема развития практических методов, базирующихся на этом подходе, заключается в поиске комплементарных пар (или высших комбинаций, см. разд. 7.5.1, уравнение (7.2)) к ключевому интересующему фактору. Однако на решение этой проблемы влияют также другие, конкурирующие эффекты, вклад которых мог бы быть дифференцирован от желаемого эффекта. Метод количественной дифференциации откликов упомянутых пар (а позже и мультиплетных комбинаций) комплексов металлов должен быть важным инструментом в оптимизации дизайна биозондов. К настоящему моменту с помощью этих методов были продемонстрированы только эффекты растворителя

(см. разд. 7.5.1), но проводимые сейчас в Норидже* исследования имеют своей целью распространить данный метод на аналиты, представляющие собой сахара, дисахариды и олигосахариды [37].

7.5. Селективность откликов в методах считывания, основанных на ИК-спектроскопии

Теперь, когда описаны возможности ИК-считывания с помощью групп отклика типа $LM(CO)_n$, можно более подробно рассмотреть проблемы дизайна биозондов, представленных на рис. 7.3. Ранее было установлено [22, 38], что изменения в сольватном окружении сильно влияют на частоты полос ν_{CO} в ИК-спектре (рис. 7.7, а).

Переход от неполярных к полярным растворителям приводит к сдвигу и уширению полос поглощения [33, 39]. Отчасти это может быть связано с изменениями в распределении заряда внутри структуры (вызванное лучшей сольватацией заряженной функциональной группы более полярным растворителем). Однако такие изменения могут быть прямым следствием более сильных диполь-дипольных взаимодействий между колеблющимся диполем группы считывания и диполями молекул растворителя. Оба эти эффекта важны, и изменения в колебательном спектре за счет различий в сольватном окружении могут быть достаточно большими (порядка нескольких волновых чисел). Так, были описаны вызванные растворителями сдвиги полос поглощения в комплексах карбониллов рутения с тетрафенилпорфиринами, причем было найдено, что эти сдвиги коррелируют с временем жизни колебательных состояний карбонильной группы [40]. Было показано также, что ширина колебательных полос коррелирует с частотой колебаний [33] и зависит от эффектов растворителей [41]. Описанные эффекты можно оценить количественно [42]. Они могут быть связаны с межмолекулярными взаимодействиями [43] и с эффектами дипольных моментов перехода [44].

7.5.1. Эффекты растворителя

В наших первоначальных исследованиях [45] чувствительности к окружающей среде активных в ИК-области карбонильных комплексов металлов были использованы диаграммы Беллами [46] в координатах колебательных мод $\nu_{\text{симм.CO}} - \nu_{\text{антисимм.CO}}$ [22]. Это преследовало цель показать, что в спектрах, полученных в растворителях различной полярности, положения центров колебательных полос существенно смещены относительно друг друга, но наблюдается линейная корреляция, и отклик на каждый растворитель находится на диагонали между гексаном и диметилацетамидом (ДМА) [данные

* Главный город графства Норфолк в Великобритании. – Прим. перев.

для трикарбонил(1-метоксициклогексадиен)железа **6**, рис. 7.7, б). Степень дифференциации той или иной окружающей среды, свойственная каждому комплексу, была оценена в нашей первоначальной работе [45] путем расчета диагонального разделения δ точек экстремумов на графике, соответствующих полярным растворителям, таким как диметилформамид (ДМФА) и ДМА и неполярным растворителям, таким как гексан и циклогексан. Параметр δ определялся как:

$$\delta = \{[v_{\text{с. (гексан)}} - v_{\text{с. (ДМА)}}]^2 + [v_{\text{ас. (гексан)}} - v_{\text{ас. (ДМА)}}]^2\}^{1/2} \quad (7.1)$$

в случаях, когда колебательные полосы при измерениях в гексане и ДМА находились на экстремумах диаграммы Беллами.

Целью нашей работы является применение этих измерений к биологическим объектам, поэтому выявление сдвигов в ИК-спектре, вызванных окружением объекта имеет особенное значение. Концы диагоналей на диаграммах Беллами соответствуют гидрофильному и гидрофобному окружениям. Однако и более тонкие факторы, которые влияют на относительное положение полос поглощения в различных растворителях, могут, в конце концов, оказаться более важными в случае вопросов, связанных с биологией. Поэтому более подробно мы исследовали те факторы, которые вносят вклад в высшие эффекты дискриминации [47]. Здесь простое вычисление параметра δ (уравнение (7.1)) [45] не может само по себе оказать адекватную помощь ввиду сильных вариаций в расположении полос поглощения. Однако если спектр одного комплекса сравнивается со спектром другого, эти вычисления могут иметь столь же большое значение, что и вычисление дискриминации в методе поликарбонильных металлоорганических комплексов.

Для того чтобы это реализовать, выбирают стандартный растворитель (растворитель сравнения, позволяющий вычислить $\Delta_R S$ [47]). Для каждой комбинации комплекса и растворителя рассчитывают нормализованную разницу ($\Delta_{N(\text{растворитель})(\text{комплекс})}$), учитывая диагональное смещение относительно стандартного растворителя и разброс значений, которые вносят вклад в диаграмму Беллами. Для двух комплексов (a и b) и для двух растворителей (m и n) в качестве меры дифференциальной дискриминации растворителя было использовано отношение $\Delta_N S$ [47] (уравнение (7.2) и рис. 7.7, в; данные для комплексов **6** и **7**).

$$\frac{\Delta_{N(\text{комплекс } a)}}{\Delta_{N(\text{комплекс } b)}} = \frac{\Delta_R(\text{растворитель } n)(\text{комплекс } a) - \Delta_R(\text{растворитель } m)(\text{комплекс } a)}{\Delta_R(\text{растворитель } n)(\text{комплекс } b) - \Delta_R(\text{растворитель } m)(\text{комплекс } b)} \times \frac{\Delta_R(\text{ДМА})(\text{комплекс } b)}{\Delta_R(\text{ДМА})(\text{комплекс } a)} \quad (7.2)$$

Анализ главных компонент (АГК) оказался мощным статистическим методом для установления различия вкладов множественных эффектов в случае каждого конкретного комплекса. Данные для циклогексадиен(трикарбонил)-железа **5** приводят к АГК-диаграмме, показанной на рис. 7.7, г. Величины, соответствующие чистым растворителям, расположены по углам этой диаграммы, данные для бинарных смесей определяют ее границы, а данные для тройных смесей образуют точки, которые лежат внутри контура [45].

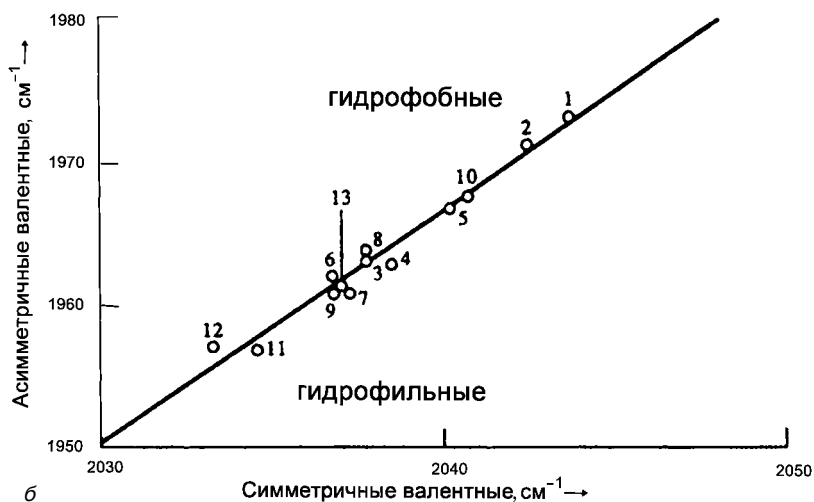
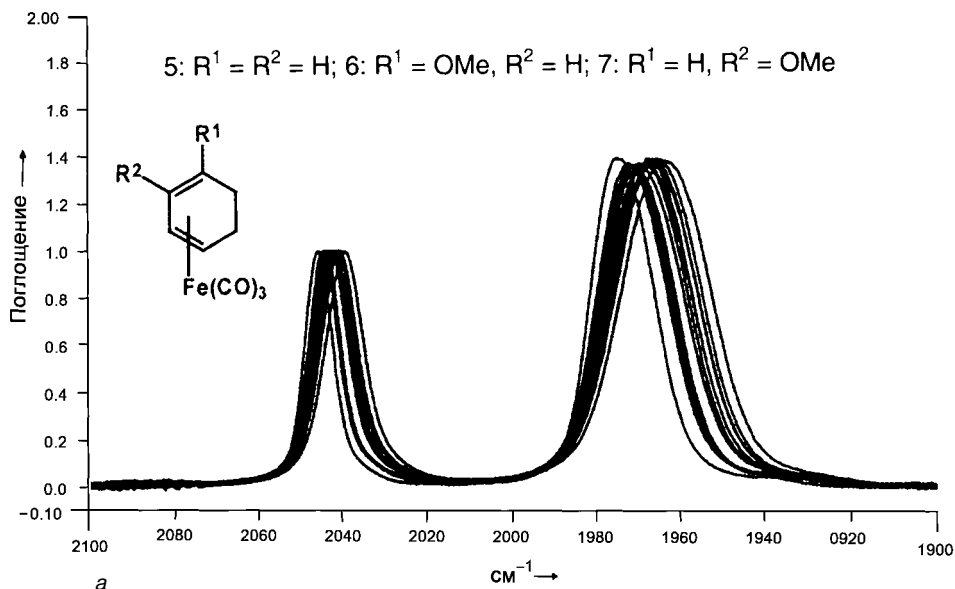
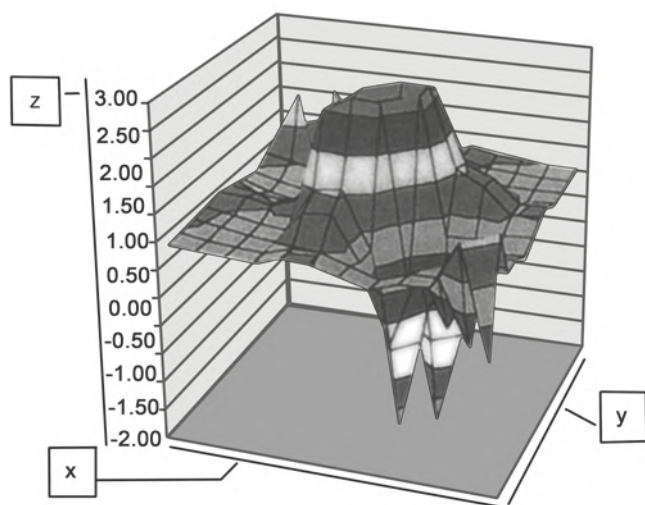
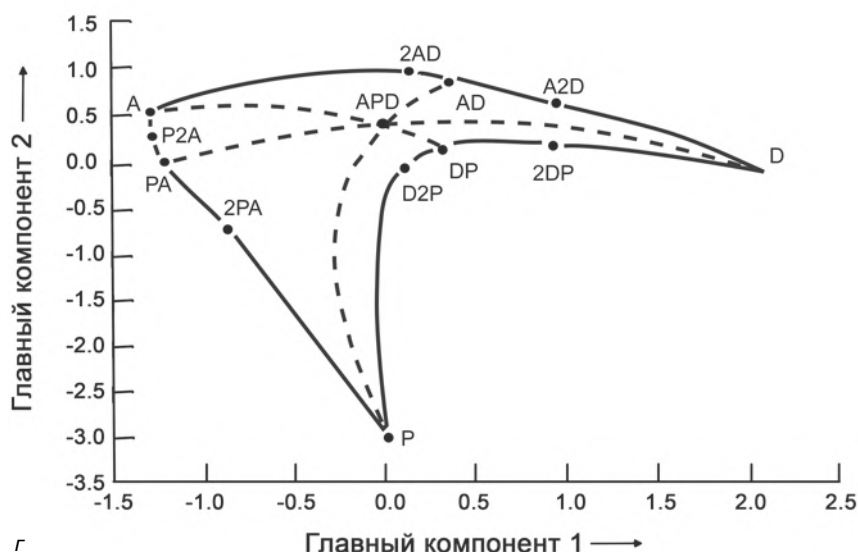


Рис. 7.7. а – ИК-спектры с фурье-преобразованием комплекса трикарбонил-железа **6** в разных растворителях (нормализованные расположением максимумов полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ на одной и той же высоте по шкале поглощения). б – Диаграмма Беллами для $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ для данных, взятых из работы [45]: гидрофобные растворители проявляют тенденцию давать точки на диагонали вверх справа (высокие волновые числа), а гидрофильные – внизу слева (низкие волновые числа). (Продолжение на следующей странице)



в



г

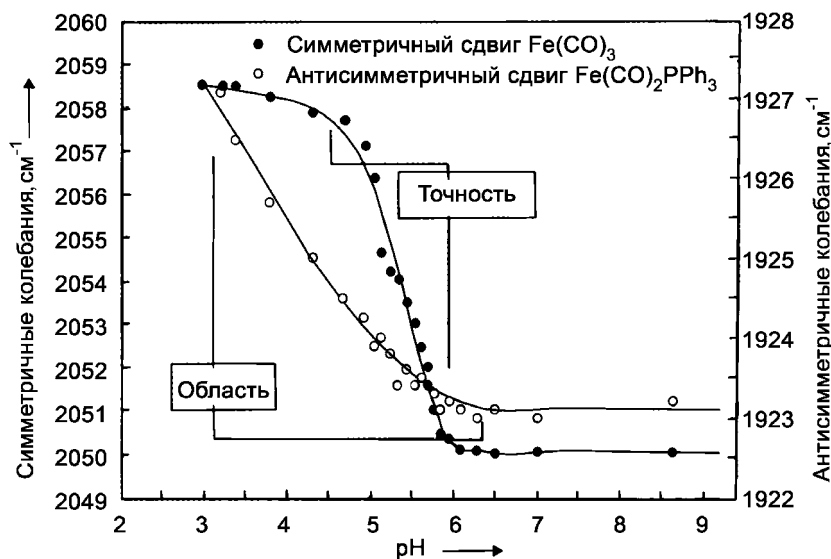
Рис. 7.7. (Окончание) в – Двумерная диаграмма сравнения откликов от разных растворителей для комплексов **6** и **7** (большие положительные или отрицательные величины по оси z определяют пары растворителей (считываются по осям x, y [47]), которые хорошо дифференцируются при сравнении данных для комплексов **6** и **7**. г – Пример анализа главного компонента с помощью диаграммы «факторных множеств» («главных компонент» 1 и 2), полученной при статистическом анализе данных для комплекса **5** в смесях трех растворителей (А – этилацетат; D – диметилацетамид; Р – пропанол-2). Данные для чистых растворителей помещены в углы диаграммы, а данные для бинарных смесей находятся вдоль ее границ.

Описанные данные относятся к единичным комплексам и числу растворителей вплоть до трех. Однако комбинирование данных, полученных для двух комплексов, дающих разные отклики (см. рис. 7.7, *в*) в подходе, основанном на поликарбонильных металлоорганических комплексах, должно давать совершенно четкие характеристики свойств гидрофильного и гидрофобного окружения в случае применения биозондов.

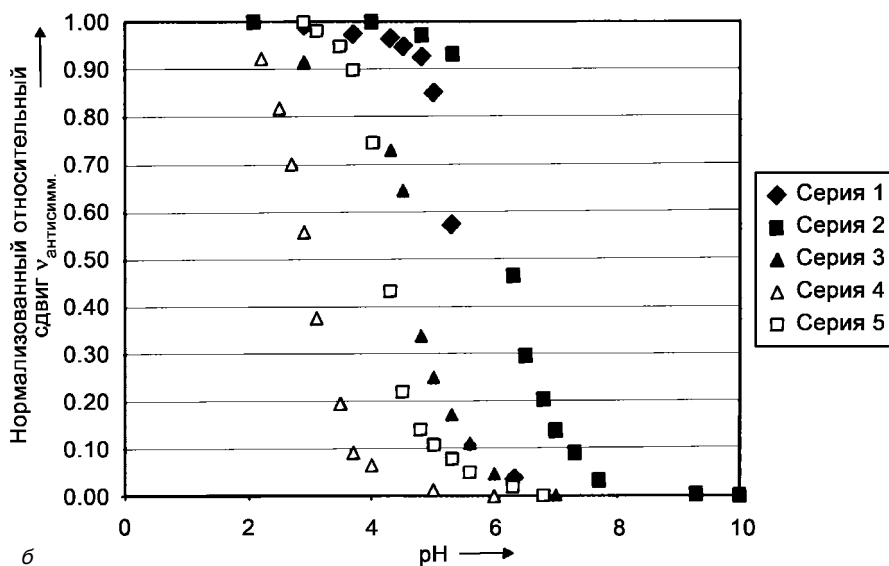
7.5.2. Отклики на pH

Принципы, на которых основывается ИК-спектральный метод считывания изменений величины pH, базирующийся на карбонилах металлов [26], уже описаны в разд. 7.4. Типичным примером является гексациеноатный комплекс **1**, в котором как симметричные, так и антисимметричные колебательные моды откликаются на изменения pH. Однако полосы $\nu_{\text{симм.CO}}$ представляют собой наиболее простой случай, поскольку полосы $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ в этом случае являются результатом перекрывания полос, соответствующих двум антисимметричным колебательным модам. Частота $\nu_{\text{симм.CO}}$ может быть определена просто по положению соответствующего максимума в спектре. На рис. 7.8, *а* результаты, изображенные зачерненными кружками (отсчет по левой вертикальной шкале) отражают положение $\nu_{\text{симм.CO}}$ комплекса **1/2** в области значений pH между 3 и 8,6 [26].

В этом случае для использования метода поликарбонильных металлоорганических комплексов был синтезирован аналог комплекса **1**, содержащий фрагмент $\text{Fe}(\text{CO})_2\text{PPh}_3$. Замена лиганда CO на PPh_3 приводит к сдвигу колебательных полос (см. разд. 7.4) и одновременно влияет на величину pK_a кислоты (PPh_3 является более слабым π -акцептором по сравнению с CO, поэтому фрагмент $\text{Fe}(\text{CO})_2\text{PPh}_3$ стабилизирует анион в меньшей степени, чем $\text{Fe}(\text{CO})_3$). Незачерненными кружками на рис. 7.8, *а* (им соответствуют величины на вертикальной шкале справа) представлены данные для полос $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ в фосфиновом комплексе. Данные для фосфинового и не содержащего фосфин комплексов вместе определяют как область, так и точность измерений в одном эксперименте. Другие карбонильные комплексы металлов ведут себя сходным образом. Их можно сравнивать (рис. 7.9, *б*), помещая на графике нормализованные величины, рассчитанные путем коррекции изменений положения полос в целом при низких и высоких значениях pH. Спектры, приведенные на рис. 7.9, *а*, дают возможность провести интересное сравнение со спектрами, представленными выше на рис. 7.7, *а*. Разные растворители или смеси растворителей (рис. 7.7, *а*) вызывают постепенное смещение полосы поглощения в целом. В то же время, отклик комплексов, содержащих ионизируемую группу, на величину pH четкими изобестическими точками выявляет взаимопревращение двух дискретных объектов (ионизированной и неионизированной форм комплекса). Для оценки положения равновесия можно использовать интенсивности полос поглощения в ИК-спектре, которые дают четкие логарифмические прямые относительно величины pH (рис. 7.9, *б*) в тех областях, в которых комплекс не полностью диссоциирован.

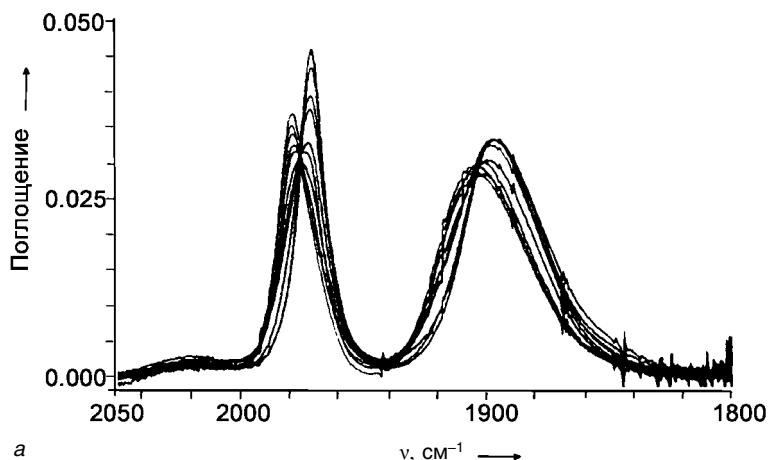


а

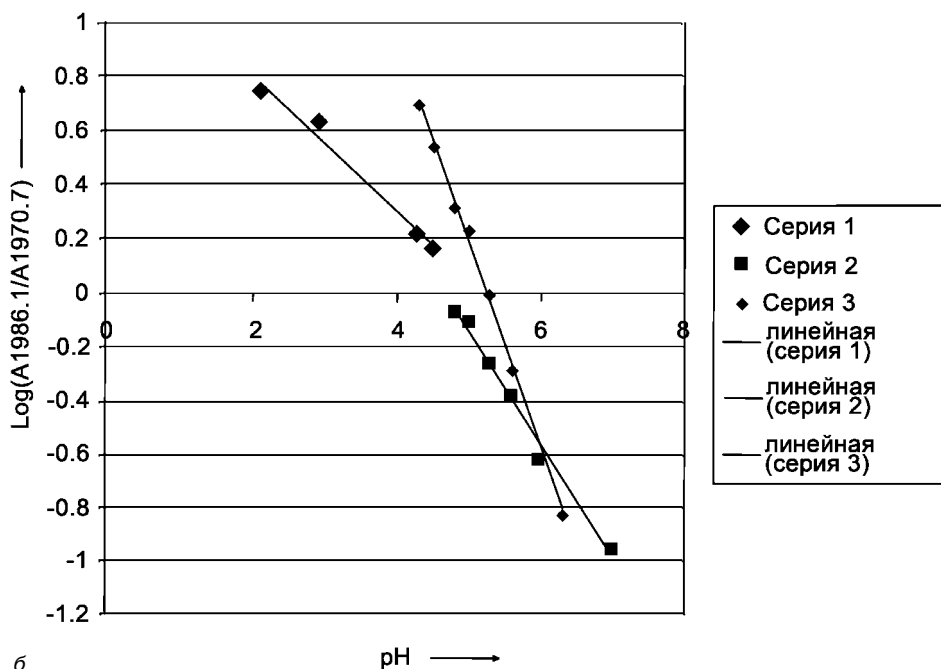


б

Рис. 7.8. а – График зависимости положения спектральных линий трикарбонил-железо-(η^4 -2,4гексадиеновой кислоты) **1** (шкала с большими волновыми числами) и дикарбонил(трифенилфосфин)железо-(η^4 -2,4гексадиеновой кислоты) (шкала с меньшими волновыми числами) при pH 3–9. б – Кривые титрования для: (4-гидроксиметилбензоато) $\text{Cr}(\text{CO})_3$ (серия 1); (4-гидрокситолуол) $\text{Cr}(\text{CO})_3$ (серия 2); (*o*-фталевая кислота) $\text{Cr}(\text{CO})_3$ (серия 3); комплекса **1** (серия 4); (бензойная кислота)- $\text{Cr}(\text{CO})_3$ (серия 5) (данные из работы [26]). Относительные сдвиги для каждого спектра рассчитаны путем вычитания предельного значения при высоком pH из измеренных величин и нормализованы путем деления полученных величин на расстояние в волновых числах между предельными значениями при высоком и низком pH



а



б

Рис. 7.9. а – Перекрытие спектров, полученных для комплекса (бензойная кислота) $\text{Cr}(\text{CO})_3$ в буферных растворах с pH от 2,1 до 6,0 (соответствует серии 5 на рис. 7.8, б). б – Логарифмические диаграммы зависимости отношений поглощения диссоциированной и недиссоциированной форм комплексов от величины pH [серия 1: первая ступень диссоциации комплекса (о-фталевая кислота) $\text{Cr}(\text{CO})_3$; серия 2: вторая ступень диссоциации комплекса (о-фталевая кислота) $\text{Cr}(\text{CO})_3$; серия 3: (4-гидроксиметилбензоат) $\text{Cr}(\text{CO})_3$]

7.5.3. Отклики на концентрацию ионов щелочных металлов

Общий подход, который был рассмотрен выше (рис. 7.3 и 7.5), работает [28] и в случае сенсоров на щелочные металлы с использованием классических [48] краун-эфиров для связывания ионов. Как и в случае зависимости от величины pH, наблюдаются два дискретных состояния (**3** и **4**), а графики зависимости положения полос поглощения от $[M^+]$ представляют собой кривые, поднимающиеся до предельных значений, при которых краун-эфир насыщен ионами.

Важно отметить, что хорошее соответствие (например, случай **8**) между ионом металла и краун-эфиром вовсе не обязательно дает хороший сенсор. Несмотря на хорошую точность при низких концентрациях (0–3 мМ: рис. 7.10, а), краун-эфир в этом случае слишком быстро насыщается, что не дает возможность получить широкую область отклика. Краун-эфиру меньшего размера, который хуже соответствует большому иону калия, соответствует меньшая константа связывания и более широкая область отклика (рис. 7.10, б). Так, было показано, что комплекс **3** хорошо откликается на ионы Rb^+ , Cs^+ и Ba^{2+} , так же как на ионы Li^+ , Na^+ и K^+ [49].

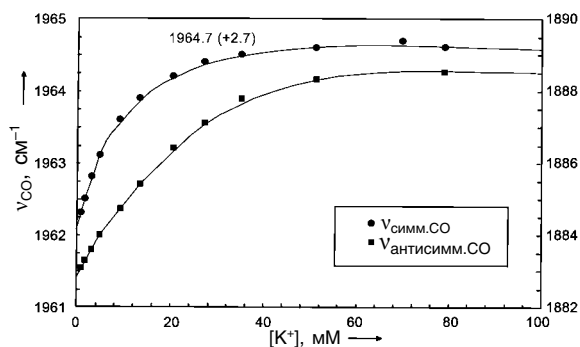
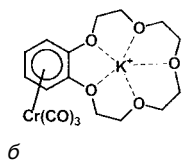
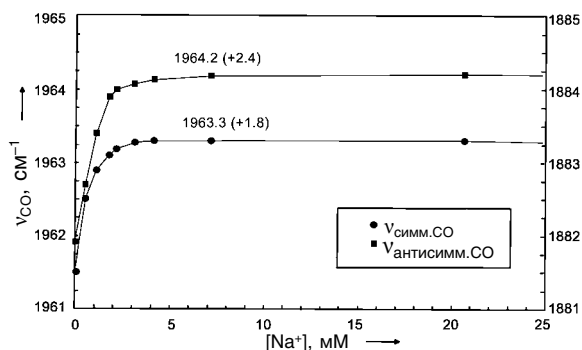
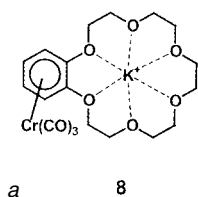


Рис. 7.10. Графики, показывающие положение симметричных (высокие волновые числа) и антисимметричных (низкие волновые числа) колебательных мод комплексов трикарбонилхрома с бензо-18-краун-6 (а) и бензо-15-краун-5 (б) в зависимости от концентрации ионов щелочных металлов

Применение неселективных рецепторов, о которых шла речь выше, для ионов Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ или Ba^{2+} , упрощает дизайн сенсоров, уменьшает сложности синтеза и дает сенсоры для общего применения. Однако такие сенсоры могут создать проблемы при измерении концентрации ионов Li^+ , Na^+ и K^+ вследствие взаимного влияния этих ионов при их совместном присутствии в растворе. Однако, на самом деле, эти проблемы исчезают при использовании методов, основанных на ИК-спектроскопии металлокарбонильных комплексов, которые описаны в разд. 7.4. В этом случае неселективный рецептор может дать информацию, различающую отклики на различные аналиты. Вновь повторим, что именно характер трансдукции сигнала, а не селективность рецептора является ключевым фактором в методах, основанных на применении металлокарбонильных комплексов. Действительно, определение ионов металлов в их смесях представляет собой один из лучших примеров использования метода АГК (анализ главных компонент – см. выше) [28] для дифференциации откликов по профилю полос в ИК-спектре. Эта процедура аналогична методу, описанному в разд. 7.5.1 для растворителей различной полярности, но в данном случае (ионы металлов) основывается на различии в природе взаимодействия металла с краун-эфиром. Как сказано выше, ион Na^+ особенно эффективно связывается с краун-5-эфиром, в то время как ион Li^+ (который «приспосабливается» к внутренней полости краун-эфира) и ион K^+ (который вытесняется из центра краун-эфира) связываются с краун-эфиром отлично от иона Na^+ и отлично друг от друга. На рис. 7.11 показана точечная факторная диаграмма, которую можно построить на основе анализа смесей ионов Li^+ , Na^+ и K^+ [28].

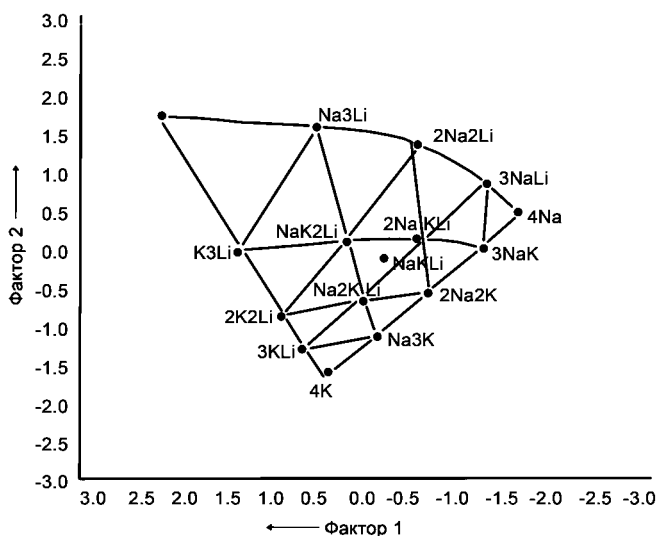


Рис. 7.11. Точечная факторная диаграмма анализа главных компонент, рассчитанная по колебательным полосам комплекса **3** с различным соотношением ионов щелочных металлов. Данные для ионов Li^+ , Na^+ и K^+ определяют углы диаграммы, а бинарным смесям соответствуют границы контура (относительные количества ионов указаны рядом с каждой точкой)

В настоящее время данный метод не является строго количественным, поскольку трудно точно определить соотношение концентраций двух ионов в присутствии третьего иона в высокой концентрации. Однако, комбинируя дизайн поликарбонильных металлоорганических комплексов с методом АГК и дополнительно – с факторными точками для построения 3D-диаграммы (с чистым растворителем, находящимся в четвертом ее углу) можно получить более точный вариант данного метода. Уже описанная процедура может быть применима в приложениях биозондов, например, для измерения соотношения концентраций ионов Na^+ : K^+ или для определения $[\text{Li}^+]$ в биологических средах в присутствии других ионов.

7.5.4. Отклики на π -стэкинг-взаимодействия между фрагментами органических молекул

В связи с опасениями, связанными с канцерогенностью, в качестве растворителя не использовался бензол как в начальных систематических исследованиях откликов комплексов трикарбонилжелеза и трикарбонилхрома на растворитель (см. разд. 7.5.1), так и в более поздних работах по дифференциальным индуцированным растворителем сдвигам, где использовали толуол. Было установлено, что полученные данные попадают на диагональ диаграммы Беллами, и исследования с толуолом проводились только на комплексах трикарбонилжелеза. Поскольку внимание привлекли применения биозондов, основанных на металлокарбонильных системах, были начаты поиски зондов на эффекты π -стэкинга [50] благодаря важности π - π -взаимодействий с ароматическими структурами в боковых цепях белков и между соседними основаниями в нуклеиновых кислотах. Для этих целей подходящими могли оказаться ареновые комплексы металлов. Ароматическое кольцо остается плоским при образовании η^6 -комплекса, а вакантные антисвязывающие орбитали системы связей М–С расположены над ареном, связанным в комплекс, на стороне, противоположной атому металла. Эти орбитали должны подходить для того, чтобы возникли взаимодействия по типу переноса заряда с обогащенными электронами ароматическими кольцами. Действительно, хорошо известно, что колебательные полосы комплексов трикарбонилхрома смещаются в сторону более низких волновых чисел при измерениях в бензоле (по сравнению с циклогексаном). Полагают, что это смещение, по крайней мере отчасти, является следствием π -стэкинга [51]. Для изучения подобных эффектов целесообразно ввести электронодонорные заместители в арен, не входящий в состав комплекса с металлом, поскольку повышение электронной плотности в этом арене должно способствовать образованию комплекса с переносом заряда между ареном и η^6 -связанным с металлом лигандом. Действительно, противоположный эффект описан в литературе для бензол(трикарбонил)хрома **9**, который, как было показано, взаимодействует с 1,3,5-тринитробензолом посредством карбонильных лигандов [52].

В нашей работе были использованы компьютерные методы идентификации отдельных вкладов в перекрывающиеся полосы спектров (рис. 7.12, *а*), записанных для смесей диметоксибензола и циклогексана. На рис. 7.12, *б* показано,

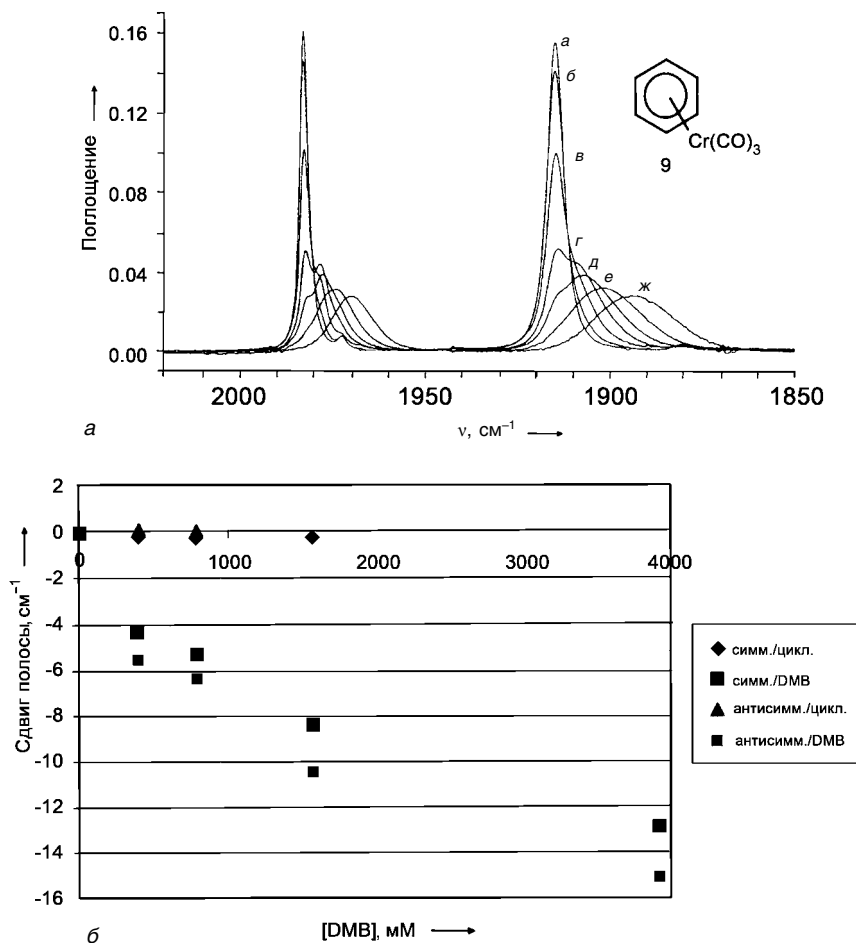


Рис. 7.12. а – Перекрытие спектров $(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cr}(\text{CO})_3$ в циклогексане (кривая а) и в присутствии 1,2-диметоксибензола (кривая б: 39 мМ; кривая в: 79 мМ; кривая г: 392 мМ; кривая д: 785 мМ; кривая е: 1,57 М; кривая ж: 3,92 М). б – Компьютерный анализ очертаний полос поглощения (показанных на рисунке а) из работы [50], определяет вклады окружения в случае циклогексана и 1,2-диметоксибензола (DMB). Показаны сдвиги положения полос в зависимости от концентрации 1,2-диметоксибензола: «симм./цикл.» – $\nu_{\text{симм.CO}}$ в окружении циклогексана; «симм./DMB» – $\nu_{\text{симм.CO}}$ в окружении 1,2-диметоксибензола; «антисимм./цикл.» – $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ в окружении циклогексана; «антисимм./DMB» – $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ в окружении 1,2-диметоксибензола

что положение полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$, которым отвечают высокие волновые числа, практически не изменяется, в то время как новая пара полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ смещается в сторону более низких волновых чисел по мере возрастания вклада π -стэкинга [50]. Это явление согласуется либо с дополнительным π -стэкингом, приводящим к образованию более высоких стопок [53], либо со стохастическими эффектами растворителя в окружении, образованном

смесью циклогексан–арен. Полосы $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$, составляющие новую пару, кроме того, уширяются тем в большей степени, чем сильнее они смещаются. Этот эффект может быть вызван постепенным добавлением более полярного растворителя к неполярному, такому как циклогексан.

Имеющаяся на сегодняшний день информация свидетельствует о том, что арены, комплексно связанные с фрагментом $\text{Cr}(\text{CO})_3$, являются подходящими кандидатами для зондов на эффекты π -стэкинга. Сольватированные структуры и структуры с π -стэкингом отличаются положением полос поглощения в ИК-спектре, причем по мере увеличения тенденции к π -стэкингу облегчается взаимное превращение этих двух структур. Такое поведение более похоже на взаимопревращение диссоциированной и недиссоциированной форм в измерениях зависимости от pH (разд. 7.5.2 и рис. 7.9, а) либо свободного и координированного с металлом краун-эфира при измерениях концентрации металлов (разд. 7.5.3), нежели на смещение полос поглощения, наблюдаемое при смешении разных растворителей (разд. 7.5.1 и рис. 7.7, а). Это само по себе служит свидетельством в пользу специфического характера взаимодействия в тех случаях, когда арены могут приблизиться к стороне комплекса (арен) $\text{Cr}(\text{CO})_3$ со стороны, противоположной атому металла. Более того, прямым доказательством взаимодействия между свободным и связанным в комплекс аренами по типу «лицом к лицу» служат исследования комплексов циклофанов. В кристаллическом состоянии расстояние между ареновыми кольцами уменьшается, если одно из ареновых колец становится связанным в комплекс с фрагментом $\text{Cr}(\text{CO})_3$, что было показано рентгеноструктурным анализом [54].

7.6. Примеры структур биозондов на основе карбонильных комплексов металлов

Для разработки структур металлоорганических биозондов были использованы два подхода. Металлоорганический компонент может быть присоединен к небольшой молекуле, которая взаимодействует с биологической рецепторной системой (рис. 7.13) или связан непосредственно с биологической макромолекулярной структурой.

Первоначальные исследования Жауэна и Вессьер по эстрогенам [55] являются типичными для первого подхода, в котором, например, стероидные соединения дериватизировались по различным положениям в поисках систем, которые сохраняли бы свою биологическую активность. Эта работа явилась основой для дальнейшего развития метода CMIA (металлоиммуноанализ [56]; металлокарбонильный иммуноанализ (CMIA) [57, 58]; см. разд. 8.5.2). Типичными примерами являются соединения **10** [59, 60], **11** [61] и **12** [62]. Для комплексов **10** и **11** ожидается различный характер действия, поскольку соединение **10** должно конкурентно связываться с рецептором, а у комплекса **11** есть возможность ковалентного связывания путем генерирования [63] электрофила, стабилизированного металлом за счет замещения ОН-группы в пропаргильном положении. Кластер **12** имеет больший размер и может

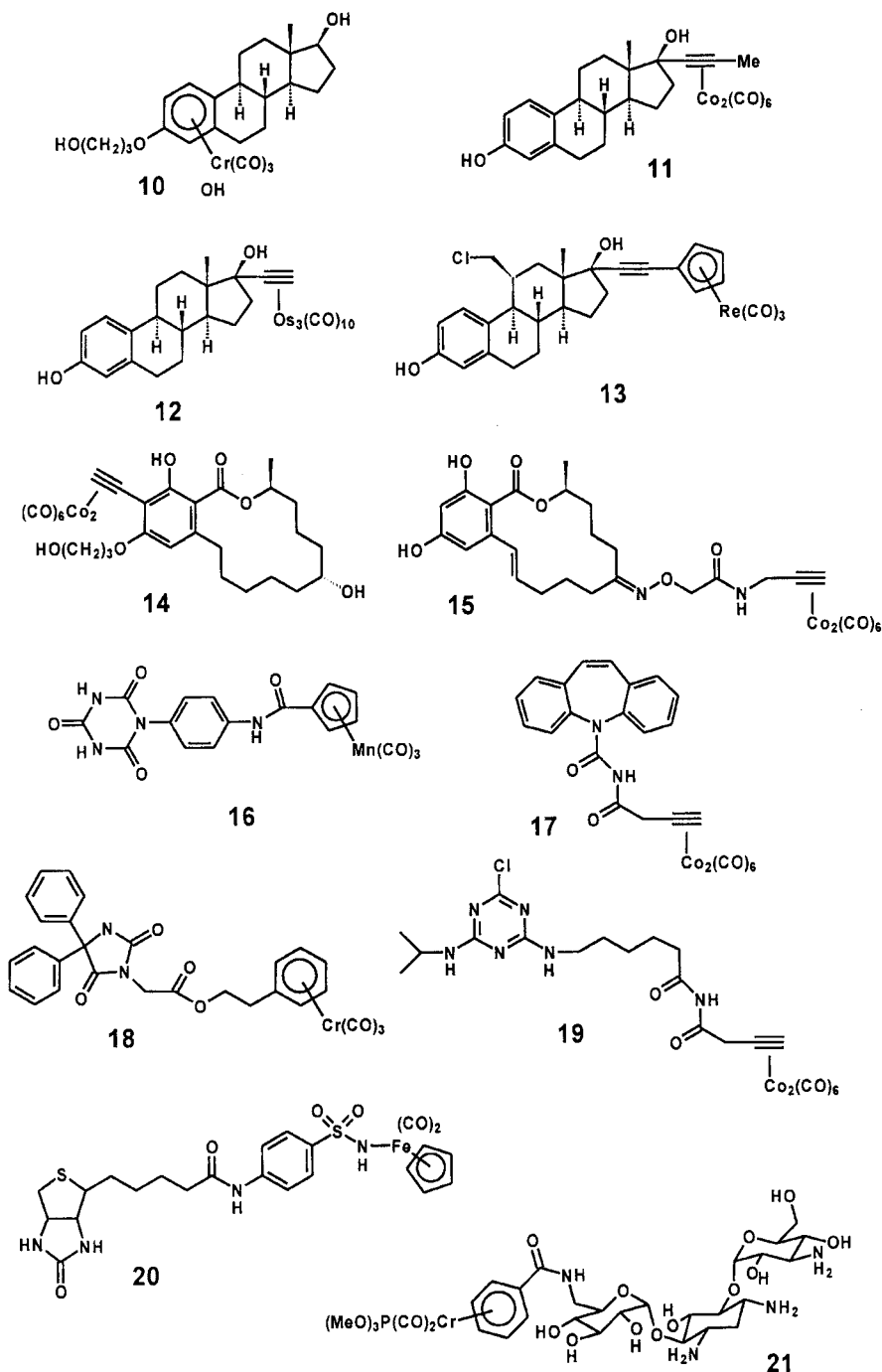


Рис. 7.13. Примеры металлоорганических производных биологически активных молекул, полученных для применения в конкурентном анализе и в качестве биозондов. (Продолжение на следующей странице)

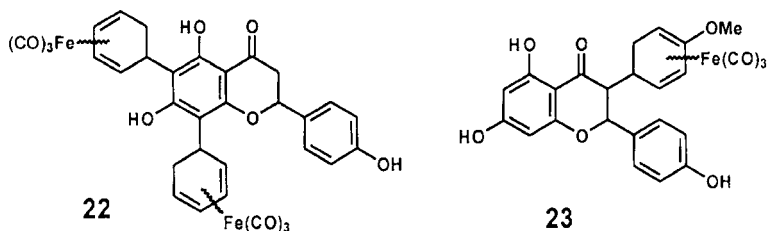


Рис. 7.13. (Окончание)

предоставить дополнительные лиганды СО для увеличения чувствительности метода при очень низких концентрациях. Применение ИК-спектрометров с фурье-преобразованием позволило определять фемтомольные количества металлокарбонильных комплексов [64]. Моделированием [65] было показано, что цикlopentadiенилрениевый комплекс **13** хорошо соответствует гормон-связывающему домену рецептора эстрадиола [66]. С целью поиска систем для биологического распознавания структур типа зеранола и природного микотоксина зераленона были получены производные зеранола [67] и зераленона, такие как **14** и **15** [68]. Было изучено производное фенобарбитала, содержащее фрагмент трикарбонилмарганца **16** [69], в качестве соединения-трейсера [70] и было показано, что предел определения для этого соединения (64 скана при разрешении 4 см^{-1}) составляет 10 пмоль в клетке микрополости [71]. Производные карбамазепина и фенитоина **17** и **18** также могут быть определены в области концентраций 10–100 пмоль. Такие соединения, как **16**, **17** и **18**, имеют неперекрывающиеся полосы в ИК-спектре и поэтому могут быть определены при одновременном присутствии в одном спектральном эксперименте.

Металлокарбонильный комплекс кобальта **19** является металлоорганическим трейсером – производным гербицида атразина [73]. Комплекс **20** – производное биотина [74] – был получен для исследования связывания авидина. Из канамицина А были получены его комплексы, содержащие фрагмент трикарбонилхрома и дикарбонил(фосфит)хрома (например, **21**) методом активированного сложного эфира, разработанным для белков (см. следующий раздел). Аналогично были получены комплексы тобрамицина [75]. Соединения этих типов были синтезированы для конкурентных анализов, в которых поглощение в ИК-области используется так же, как и эмиссия радиоизотопа в традиционных иммуноанализах. Тот же самый подход – превращение биологически активного вещества в активное металлоорганическое производное – был использован для получения биозондов на основе флавоноидов, что обсуждается в разд. 7.8. Однако принцип использования комплексов металлов в случае биозондов отличен от принципа, на котором основан конкурентный анализ. Предназначение биозондов – поиск изменений в спектроскопическом отклике при связывании с мишенью. В то же время принцип конкурентного анализа состоит в том, чтобы установить сродство к связыванию путем оценки относительных количеств связанного

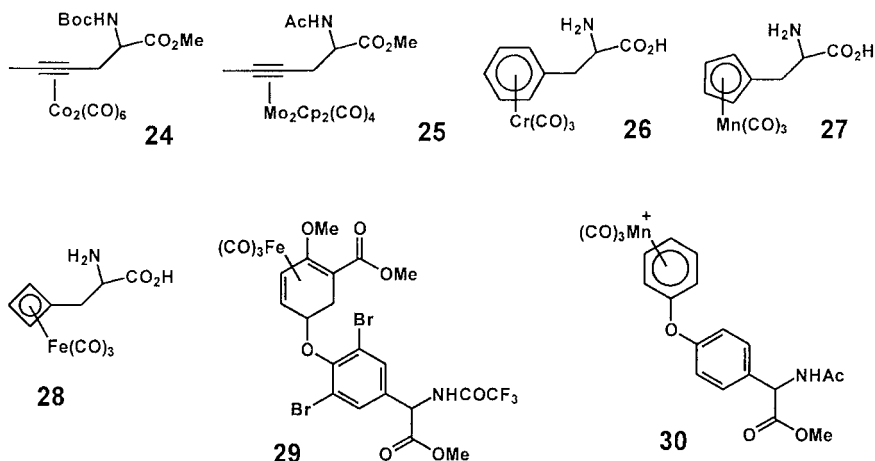


Рис. 7.14. Примеры металлокарбонильных производных аминокислот

и свободного вещества. В обоих случаях, однако, требуются эффективные спектрометры и металлоорганические соединения, которые все еще проявляют биологическую активность, так что необходим еще и хороший скрининг на биологическую активность. Флавоноиды, представленные на рис. 7.13, служат примерами большого ряда соединений [76, 77], полученных для исследования возможности связывания с белком (см. разд. 7.8). Этот белок, как полагают, является регуляторным в индукции генов, задействованных в механизме образования корневых узелков, фиксирующих азот, в растениях семейства бобовых. Соединение **22** [76] оказалось неактивным [78], в то время как комплекс **23** [77] способен вызывать экспрессию генов [78].

Альтернативой использования комплексов с малыми молекулами является присоединение металлокарбонильного компонента к биологической макромолекуле – подход, который был опробован несколькими группами исследователей. Еще в 1988 г. Ле Борн и Бьюкор, а также Сасаки, Потье, Савиньяк и Жауэн [79, 80] присоединили карбонильные комплексы кобальта к коротким пептидам за счет аминокислоты, содержащей тройную связь углерод–углерод. Были использованы также цикlopentadiенилкарбонильные комплексы марганца [80]. Получился хороший набор доступных аминокислот, содержащих металлокарбонильные фрагменты (например, **24–28** на рис. 7.14). Этот набор включает комплекс фенилаланина с фрагментом $\eta^6\text{-Cr}(\text{CO})_3$ (**26**) [81] и родственные структуры с фрагментами $\eta^5\text{-Cr}(\text{CO})_3$ и $\eta^4\text{-Fe}(\text{CO})_3$ (**27** и **28**) [82].

Другими примерами являются комплекс **29** $\text{Fe}(\text{CO})_3$ с SK&F L-94901 – аналогом тироксина [83] и катионное производное тирозина **30** [84]. Позже группа Жауэна дополнила эту серию соединений, включив в нее (рис. 7.15) сукцинимидильную группу как фрагмент транспортной системы [85] для связывания металлокарбонильных комплексов с интактными белками. Вначале был исследован комплекс кобальта [86], затем – соединения марганца, рения [87] и вольфрама [88] (**31–34**). Аналогично для доставки к биологическим

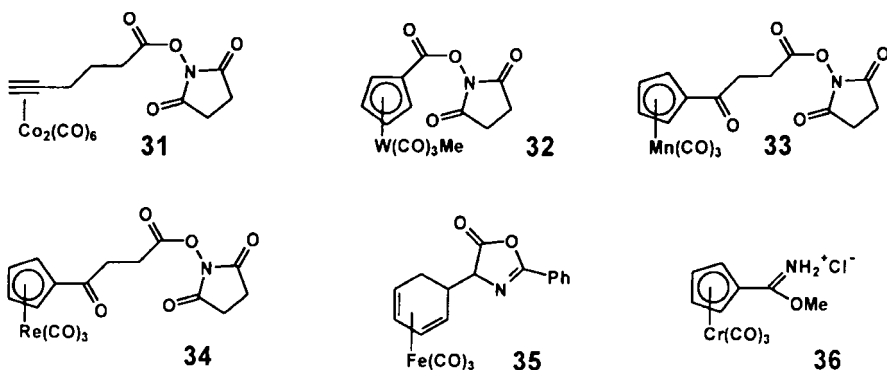


Рис. 7.15. Транспортные реагенты, содержащие карбонилы металлов, предназначенные для дериватизации белков органическими металлокарбонильными группами

объектам карбонильных комплексов железа и хрома были использованы производные оксазолинона [89] и имидоэфира [90] **35** и **36** соответственно. Для дериватизации белков использовались также карбеновые комплексы Фишера [91]. Синтез производных аминокислот с использованием электрофильных металлоорганических соединений [92] представляет собой альтернативный путь к металлокарбонильным комплексам, которые потенциально могут использоваться в биологических исследованиях. Именно электрофильность металлоорганических структур была использована как фактор, способствующий прямому связыванию металлокарбонильных комплексов реакцией с нуклеофильными группами на поверхности пептидов и белков (см. разд. 7.7) [93–97].

Дериватизация оснований, входящих в состав нуклеотидов (рис. 7.16), была проведена электрофильными железоорганическими комплексами. Типичными примерами служат железокарбонильные аддукты **37** и **38** [98]. Последние достижения в этой области привели к созданию широкого набора структур [99], включающему комплекс **39**, который более соответствует структуре нуклеозида. Производное тимидина **40** является ингибитором тимидинкиназы человека [100]. В случае соединения **41** металлокарбонильный компонент присоединен к гетероциклическому основанию [101]. Металлокарбонильный компонент может быть присоединен также к динуклеотидам за счет координации с фосфитом, находящимся (как в случае комплекса **42**) в том месте молекулы, где должна находиться фосфатная связь, соединяющая рибозные кольца [102]. Описано также присоединение металлокарбонильных меток к олигонуклеотидам для анализа с помощью ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием. В случае нуклеотидов стратегия транспорта, основанная на сукцинимидильных производных, точно такая же, как и в случае белков. При этом линкерный фрагмент $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OP}(\text{O})_2\text{O}$ присоединяется к универсальному праймеру – олигонуклеотидной последовательности (ГТТТТЦЦЦАГТЦАЦГАЦ) [103]. Такой подход был использован в отношении ДНК-полимеразы *Bacillus*

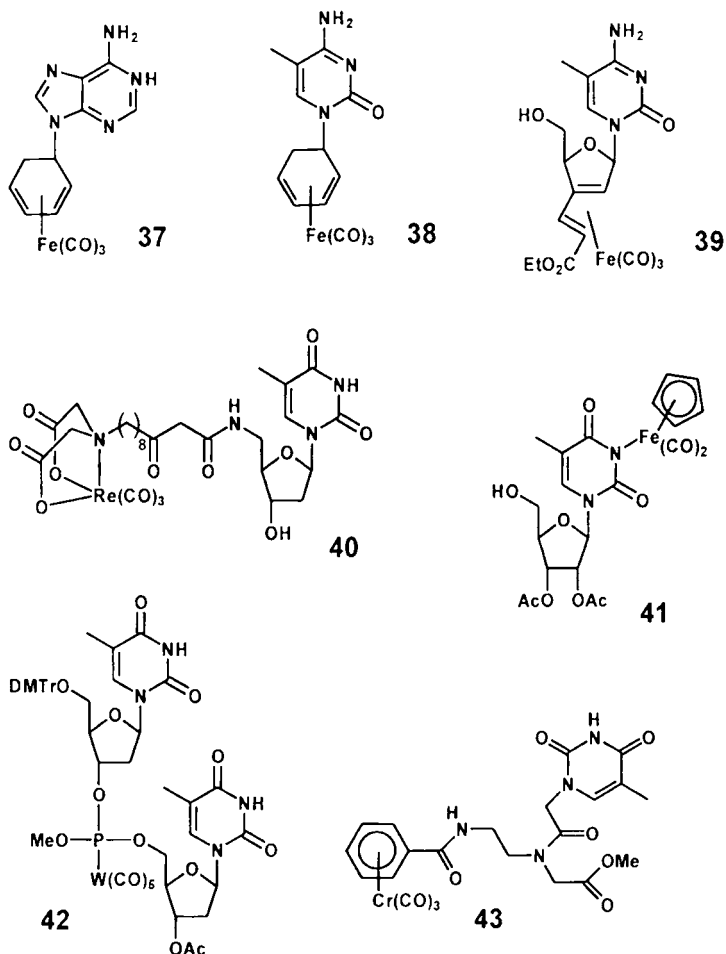


Рис. 7.16. Примеры металлокарбонильных производных нуклеотидов и нуклеиновых оснований

stearotherophilus (BST). В ходе исследования металлокарбонильных меток для мономеров ПНК (пептидных нуклеиновых кислот) [104] был получен карбонильный комплекс хрома **43**.

7.7. Использование металлоорганических биозондов, связанных с белками

В работе по присоединению металлокарбонильных биозондов к поверхности белков, которая проводилась в Норвиче [95, 105], была использована электрофильность солей трикарбонил(циклогексадиенил)железа(1+) в реакциях с нуклеофильными группами белка (см. разд. 7.6), например поверхностных групп NH_2 лизина (рис. 7.17).

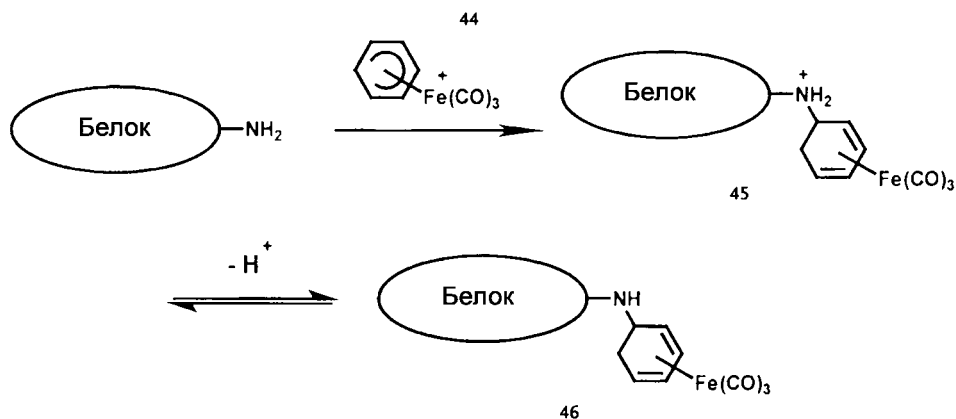


Рис. 7.17. Использование электрофильных металлоорганических реагентов (например, 44) для дериватизации белков

В первоначальных исследованиях в этом направлении [93] для введения металлоорганического электрофила в водные препараты фермента было использовано пиридиниевое производное, растворенное в метаноле, однако реальной активной частицей при этом, скорее всего, был циклогексаденильный катион 44. Действительно, в то же время в Австралии группа Кэйн-Магура [94] использовала комплекс 44 непосредственно в реакциях с белками, и этот подход, по-видимому, наилучший. В исследованиях, проводимых в Норвиче [95, 105], впервые были изучены реакции этого электрофила с белком α -химотрипсином. Мониторинг реакции с помощью ИК-спектроскопии показал, что интенсивность полос поглощения при 2051,3 и 1979,5 см^{-1} (которые приписывают двум перекрывающимся колебательным полосам $\nu_{\text{антисимм. CO}}$ при 1981,5 и 1973,8 см^{-1}) постепенно уменьшалась и появились более высокочастотные «плечи» при 2058 и 1993 см^{-1} .

Спустя некоторое время (100 мин) интенсивность новых полос поглощения при 2058 и 1993 см^{-1} заметно возросла (рис. 7.18). Это интерпретировали как свидетельство связывания комплекса трикарбонилжелеза с поверхностными лизиновыми фрагментами с образованием аммониевых ионов при алкилировании групп NH_2 . Увеличение концентрации фермента должно было привести к возрастанию скорости появления новых полос поглощения, и это на самом деле оказалось так. На рис. 7.18, а показано увеличение интенсивности полосы $\nu_{\text{симм. CO}}$ при 2058 см^{-1} при четырех различных концентрациях α -химотрипсина (1,96, 2,52, 3,32 и 4,82 мМ). Кривая, расположенная выше других на графике, соответствует самому большому вкладу новой полосы при 2058 см^{-1} и самой высокой концентрации химотрипсина. Таким образом подтверждено то, что связывание с химотрипсином является причиной появления новых полос в ИК-спектре [105].

Сходные результаты были получены в экспериментах с рибонуклеазой А, щелочной фосфатазой и триацилглицеринлипазой (рис. 7.18, б). В последних двух экспериментах, однако, в области более низких волновых чисел

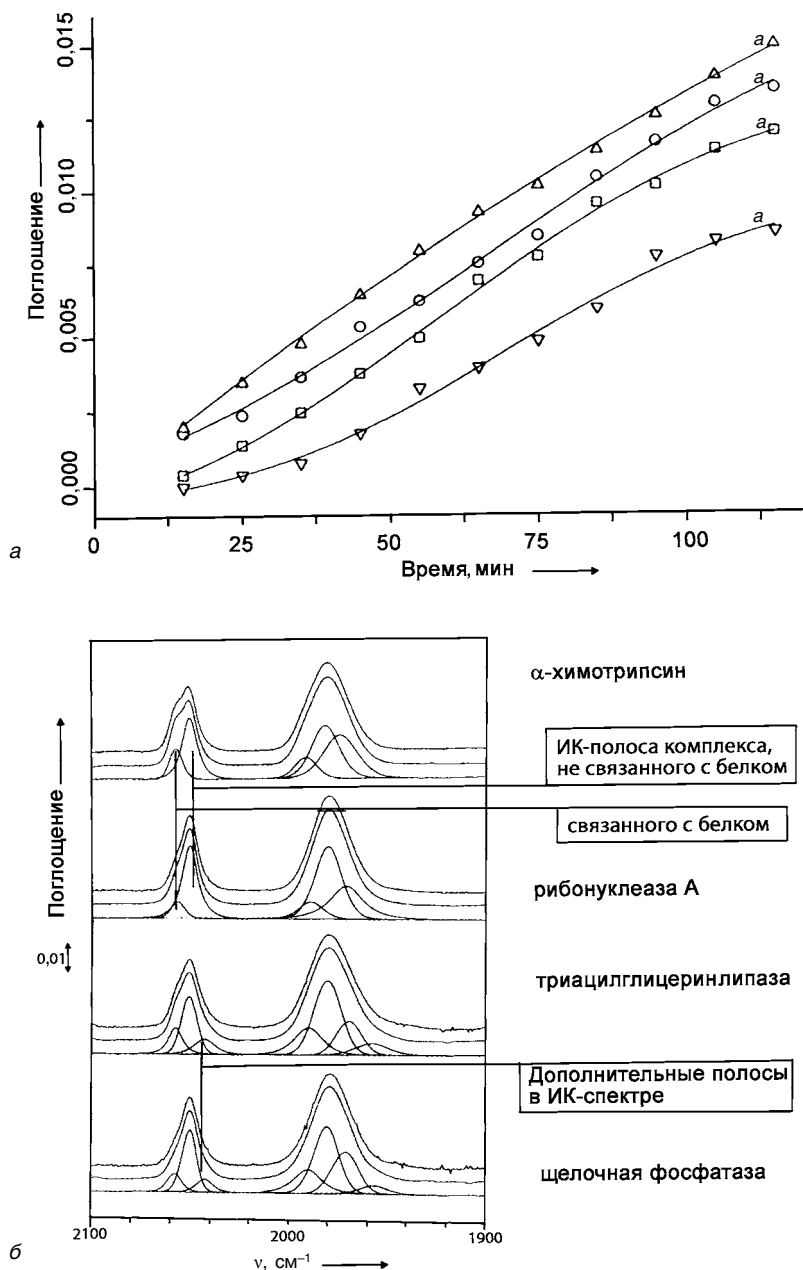


Рис. 7.18. Данные ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием для органических металлокарбонильных производных белков. а – Графики, показывающие зависимость интенсивности $\nu_{\text{симм. CO}}$ при 2058 cm^{-1} от времени реакции при различных концентрациях α -химотрипсина (случай а: 1,96 мМ; случай б: 2,52 мМ; случай в: 3,32 мМ; случай г: 4,82 мМ). б – ИК-спектральные полосы, полученные для α -химотрипсина, рибонуклеазы А, триацилглицеринлипазы и щелочной фосфатазы (образцы 30–120 мг, растворенные в 1 мл 0,2 М фосфатного буфера)

появилась вторая пара новых полос $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$. Этот процесс происходит быстро и достигает предельного значения тогда, когда интенсивность высокочастотных полос продолжает увеличиваться свою, а реакция протекает уже медленно.

Объяснение такого поведения исследованных систем заключается в том, что некоторые из поверхностно расположенных фрагментов лизина в триацетилглицеринлипазе и щелочной фосфатазе находятся в таком окружении, которое приводит к их существованию в начальной стадии эксперимента преимущественно в NH_2 -форме, т. е. в форме доступного нуклеофила. Остальные лизиновые группы, располагаемые в боковых цепях, находятся в основном в протонированной форме NH_3^+ и поэтому реагируют медленнее, поскольку стадии нуклеофильного присоединения должна предшествовать диссоциация иона аммония. В случае быстрой реакции аммониевый ион **45**, образующийся в результате нуклеофильного присоединения, сразу же депротонируется, давая комплекс **46**. Такая схема согласуется с зависимым от времени изменением низкочастотных полос поглощения, которые быстро появляются в начале реакции, а затем не изменяются во времени. Эти данные свидетельствуют о том, что в таких случаях на поверхность белка можно помещать металлоорганические биозонды двух разных типов. Вначале можно селективно алкилировать быстро реагирующие группы небольшим количеством электрофильного комплекса трикарбонилжелеза в течение короткого периода времени, а затем добавить второй, спектроскопически комплементарный комплекс (например, комплекс дикарбонил(трифенилфосфин)железа). Такие методики с использованием поликарбонильных меток сделают доступными для спектральных исследований новые полимеченые белки.

Реакции, о которых речь шла выше, свидетельствуют о возможности мониторинга реакций на поверхности белков с помощью ИК-отклика зондовых групп. Такая возможность уже была показана [105] в случае α -химотрипсина для равновесия кислота/основание (т. е. взаимопревращений комплексов **45** и **46**). При добавлении достаточного количества 0,2 М раствора гидроксида натрия для достижения величины pH 10 высокочастотная полоса значительно уменьшается, а ее форма уширяется и искажается в направлении меньших волновых чисел. Это изменение обратимо, и при возвращении к pH 7,5 путем добавления этанольного раствора кислоты появляется первоначальное высокочастотное «плечо» (изменение интенсивности является следствием разбавления, вызванного добавлением растворов).

Исследования, выполненные к настоящему времени для аддуктов трикарбонил(циклогексадиенил)железа с ферментами четко показывают, что эксперименты, основанные на ИК-спектроскопии, могут быть использованы для изучения реакционной способности и свойств функциональных групп на поверхности ферментов. Однако в этой области еще многое предстоит сделать. Для того чтобы подсчитать число поверхностных групп, которые подверглись дериватизации, нужны данные масс-спектрометрических исследований в варианте электроспрея (см., например, ссылку [97]). Это позволило бы установить, является ли постепенное увеличение интенсивности полосы поглощения аддукта результатом случайной дериватизации доступных

поверхностных лизиновых фрагментов или оно отражает некий последовательный порядок кинетической реакционной способности лизиновых фрагментов в различном окружении. При этом все же можно различить лишь быстро реагирующее и медленно реагирующее окружения, которые, как было показано, обладают различием в свойствах, связанных с pK_a . Следует еще провести эксперименты по деградации и масс-спектрометрическому определению того, какие именно аминокислотные остатки боковых цепей подвергаются алкилированию. Однако уже были проведены эксперименты, основанные на ИК-спектроскопии, позволяющие с достаточной уверенностью говорить о том, что именно поверхностные лизиновые фрагменты являются мишенью реакций дериватизации. Тем же самым путем была проведена дериватизация выборки индивидуальных аминокислот и определено положение полос поглощения в соответствующих ИК-спектрах [105]. Все выбранные субстраты имеют доступные аминогруппы и почти во всех случаях (исключения составляют цистеин и гистидин) наблюдались полосы поглощения при 2058–9 и 1991–2 см^{-1} ($\nu_{\text{симм.CO}}/\nu_{\text{антисимм.CO}}$ соответственно). Для аспарагиновой, глутаминовой кислот и серина проявлялись дополнительные полосы при 2043–5 и 1956–60 см^{-1} , приписываемые образованию связи C–O между кислотной и гидроксидной функциональными группами. В случае гистидина наблюдались полосы поглощения при 2057,1 и 1990,6 см^{-1} . Эти частоты близки к величинам, ожидаемым в случае реакции по NH_2 -группам. Поэтому эксперимент был повторен для N-ацетилгистидина, в котором NH_2 -группа ацилирована и поэтому значительно менее нуклеофильна. При этом наблюдались близкие по частотам полосы – при 2057,9 и 1990,0 см^{-1} , появление которых было приписано образованию аддуктов имидазола в гистидиновых боковых цепях. Эти эксперименты сделали доступными набор диагностических ИК-характеристик (рис. 7.19) для аминокислотных групп, находящихся в боковых цепях в серии комплексов трикарбонилжелеза.

Эти выводы нашли подтверждение в случае таких групп, как карбоксильная, гуанидиновая и аминогруппа, при изучении дериватизации полимеров глутаминовой кислоты, лизина и аргинина, для которых эффект терминальной группы NH_2 незначителен по сравнению с эффектом повторяющейся функциональности в боковых цепях. Полилизин дает типичные полосы поглощения при 2058,2 и 1994,2 см^{-1} , вновь сходные по частоте с полосами, возникающими при присоединении к лизиновым фрагментам на поверхности белка с образованием групп $\text{RR}'\text{NH}_2^+$. Частоты характеристичных $\nu_{\text{симм.CO}}$ колебаний для кислотной и гуанидиновой групп также приведены на рис. 7.19.

Данные для SH-групп цистеина не показаны на этом рисунке, поскольку не всегда возможно сделать строгое отнесение соответствующих полос в спектре, но реакция с цистеином приводит к появлению только двух новых полос: 2043,4/1955,9 см^{-1} ($\nu_{\text{симм.CO}}/\nu_{\text{антисимм.CO}}$, соответственно). Ясно, что появление этих полос не вызвано образованием связи C–N аминогруппой аминокислотной единицы и, если учесть низкую реакционную способность карбоксильных групп (см. ниже), кажется маловероятным, что в этом случае карбоксильная группа алкилируется быстрее аминогруппы. На основании приведенных рассуждений полосы при 2043,4 и 1955,9 см^{-1} должны относиться аддукту RSR' ,

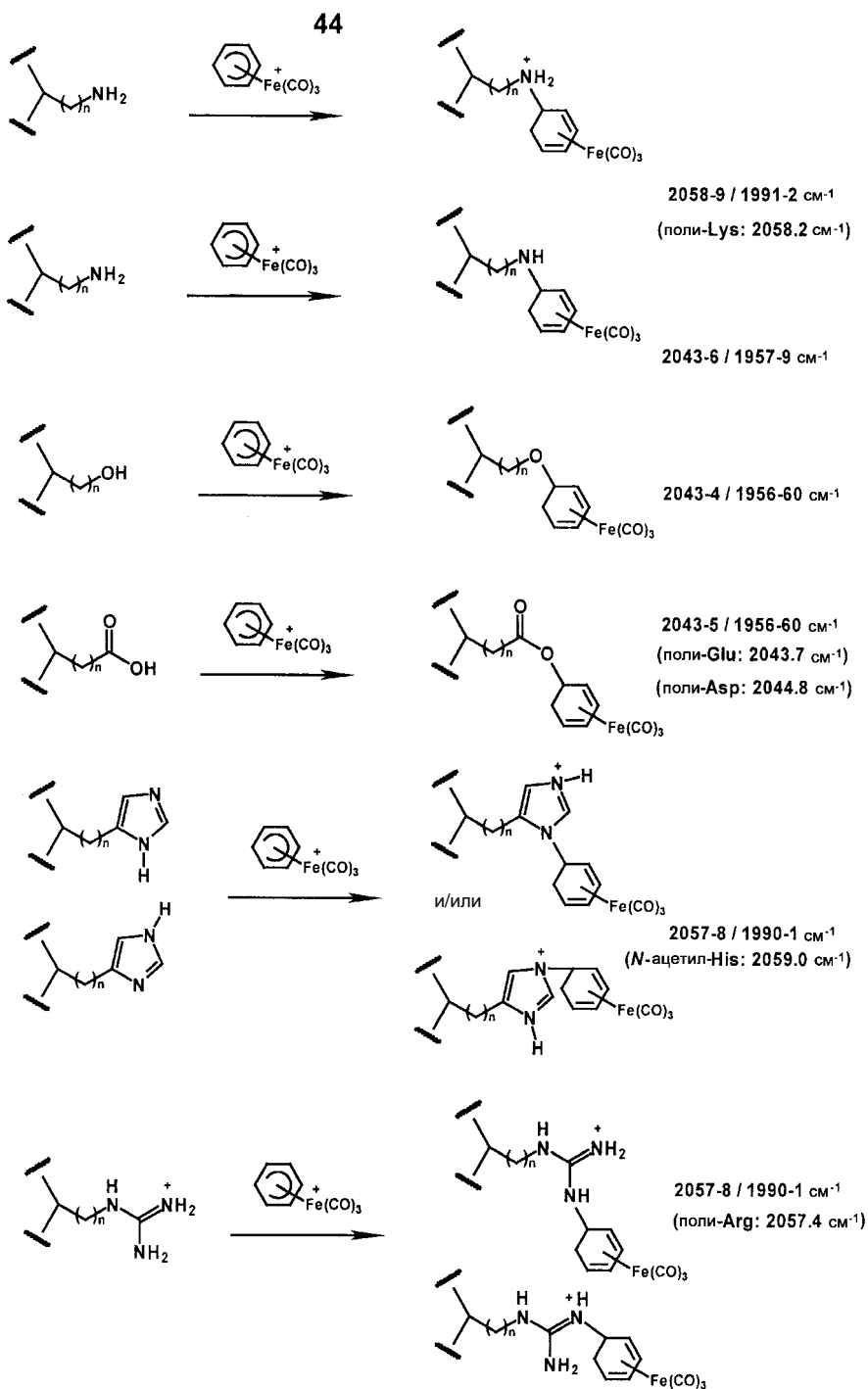


Рис. 7.19. Типичные частоты полос поглощения $\nu_{\text{симм}\cdot\text{CO}}/\nu_{\text{антисимм}\cdot\text{CO}}$ для аминокислот, дериватизированных реакцией с комплексом **44**

образующемуся за счет SH-групп в боковых цепях, содержащих цистеин. Сравнивая серин (OH) и цистеин (SH), можно сказать, что в конкуренции за нуклеофил в случае серина преимущество находится на стороне группы NH_2 , а в случае цистеина – группы SH. В серии комплексов трикарбонилжелеза поведение вторичных аминов, простых и сложных эфиров и тиоэфиров ($\text{RR}'\text{NH}$, ROR' , $\text{RCO}_2\text{R}'$ и RSR') слишком сходно, для того чтобы различать их только по положению полос колебаний. Аналогично, аддукты, образованные имидазолом и гуанидином, проявляют сходные свойства и дают близкие значения для $\text{RR}'\text{NH}_2^+$. Для того чтобы сделать библиотеку диагностических средств полной, требуются дополнительные эксперименты с другими комплементарными металлоорганическими электрофилами. Однако скорость реакции с электрофилом уже дает некоторую информацию. Так, сравнивая производные $\text{RR}'\text{NH}$ и $\text{RCO}_2\text{R}'$, можно сказать, что приводящие к ним реакции группы NH идут быстрее, чем соответствующие реакции карбоксильной группы COOH. Это положение подтвердили, исследуя реакцию сополимера аланина, лизина, глутаминовой кислоты и тирозина. В этом случае в спектре появляются полосы поглощения, типичные для аддуктов, содержащих фрагмент NH_2^+ ($2058,2/1991,6 \text{ см}^{-1}$), что показывает кинетическую селективность для реакции, идущей по фрагментам лизина.

Строгость описанных выше экспериментов по кислотно-основному титрованию поверхностных лизиновых групп была подтверждена в модельных опытах. С этой целью к электрофильному комплексу циклогексадиенилжелеза был добавлен диизопропиламин, что привело к образованию соответствующей аммониевой соли. При этом реакцию можно было довести до конца, и вновь наблюдались характерные высокочастотные полосы, соответствующие аммониевому иону. Характерные частоты $\nu_{\text{симм.CO}}/\nu_{\text{антисимм.CO}}$ в случае диизопропиламмониевого иона наблюдались при $2058,7/1988,6 \text{ см}^{-1}$. Постепенное повышение значения pH до 10,5 привело к новому спектру, в котором вместо полос поглощения при $2058,7/1988,6 \text{ см}^{-1}$ появились новые полосы – при $2046,2/1974,8 \text{ см}^{-1}$. В этом случае четкие изобестические точки свидетельствуют о гладко протекающем взаимопревращении заряженных и нейтральных частиц, что является дополнительным свидетельством правильности отнесения колебательных частот в районе 2046 и 1975 см^{-1} в ИК-спектре нейтральной NH-формы аддукта лизина как в модельных экспериментах, так и в опытах с α -химотрипсином.

Несмотря на то, что многое еще предстоит сделать по исследованию и характеристике металлокарбонильных комплексов с аминокислотами, полиаминокислотами и поверхностными группами ферментов, общие принципы уже установлены и хорошо понятны. Электрофильные комплексы циклогексадиенилжелеза можно доставлять к поверхности белков, проводить мониторинг их присоединения к поверхностным функциональным группам боковых цепей и получать информацию о тех группах, которые принимают участие в реакции, рассматривая характеристичные частоты колебаний и скорость образования аддуктов. Опубликованы подробности практического проведения ИК-исследований производных белков в реальных условиях водных фосфатных буферов [94–96, 105]. Более того, в работе [105] была показана

возможность обнаружения связанного зонда в присутствии несвязанного зонда (что важно для приложений, обсуждаемых в разд. 7.8.2). За прохождением реакций функциональных групп на поверхности белка можно следить с помощью ИК-спектроскопии. Данные, доступные на данный момент, позволяют изучать локальные изменения рН на этой поверхности или кислотно-основные свойства биологического окружения белка. Можно также устанавливать различия в активных сайтах. Проводя измерения в 50:50 глицериново-фосфатных буферных смесях, определили [19] разницу в ν_{CO} для металлокарбонильных комплексов различных мутантных гем-содержащих белков.

7.8. Возможности генетики в дизайне экспериментов с биозондами

Металлоорганические производные флавоноидов **22** и **23**, о которых речь шла в разд. 7.6 (рис. 7.13), являются частью набора соединений, которые предназначались для исследования биологических пусковых механизмов образования корневых клубеньков в бобовых растениях [106]. Это представляет собой хороший пример того, как важна может быть генетика в планировании экспериментов с участием металлокарбонильных биозондов, обладающих ИК-откликом, что и является предметом данной главы. Здесь можно говорить о концепциях «функциональных и дисфункциональных зондов», «возможностей отдаленного и локального откликов» и использовании генетики для создания «функциональных и дисфункциональных рецепторов». Однако окончательные ИК-спектральные эксперименты, предусмотренные для изучения гена образования клубеньков, ожидают появления более прочно связывающихся зондовых структур. Определение и обсуждение этих концепций завершает главу и представляет общий подход, который можно было бы применить к решению разнообразных биологических проблем.

7.8.1. Возможности отдаленного и локального откликов

В разд. 7.5.1–7.5.4 были приведены примеры двух разных типов взаимодействий, которые оказывают влияние на колебательные отклики металлокарбонильных групп. Первые – это эффекты взаимодействия растворенного вещества и растворителя, или эффекты, вызванные окружением (растворенного вещества), которые приводят к постепенному смещению положения полос поглощения. Напротив, на металлокарбонильную часть молекулы могут оказывать влияние специфические взаимодействия, если имеется возможность передачи электронных влияний. Сравнение этих двух эффектов может предоставить важную информацию, позволяющую интерпретировать результаты спектроскопических исследований с биологической точки зрения.

Данный метод анализа иллюстрирует рис. 7.20. Примеры *a* и *б* показывают специфический эффект и результат случайного распределения при проникновении металлоорганической структуры в связывающий сайт.

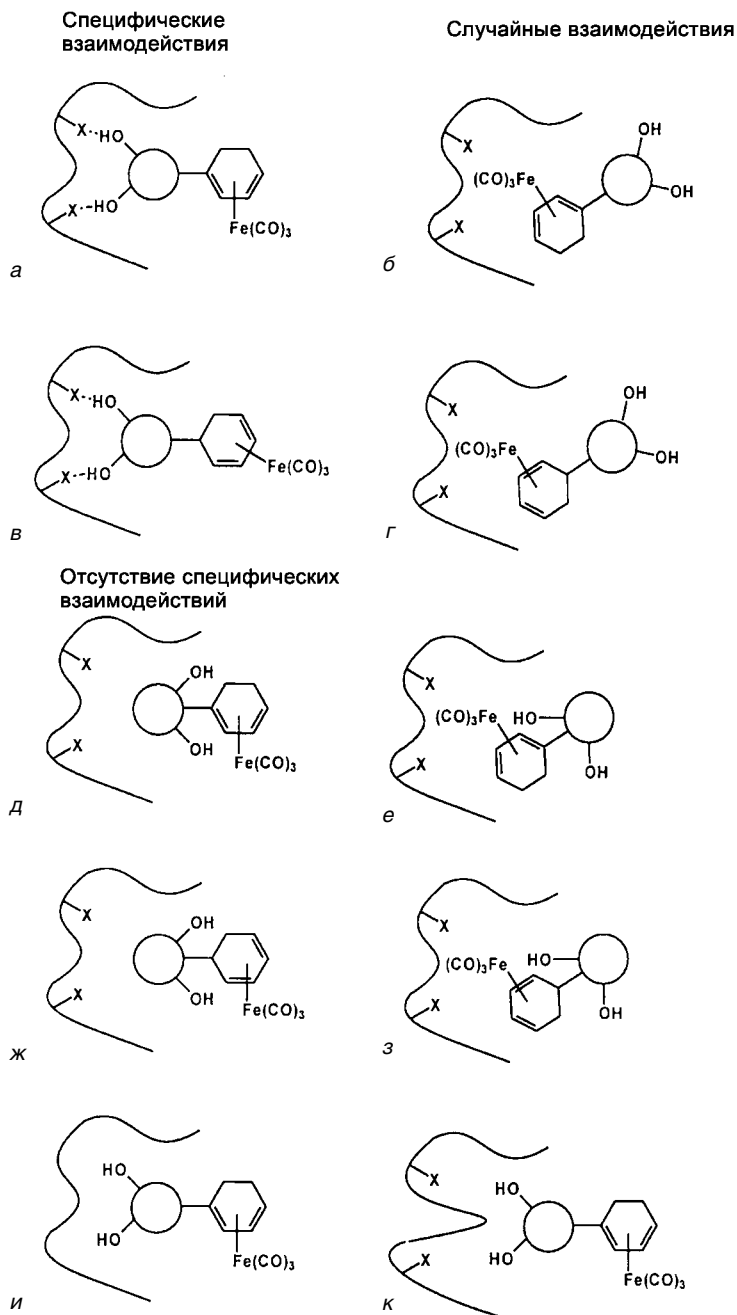


Рис. 7.20. Влияние специфических и неспецифических взаимодействий на колебательные моды ν_{CO} металлокарбонильных производных, внедренных в биологические рецепторные структуры, и металло-органические структуры, которые проявляют отдаленную и/или локальную чувствительность к таким эффектам их окружения

Специфические взаимодействия между группами ОН, связанными, например, с ароматическим кольцом и фрагментами рецепторов показаны на рис. 7.20, *а*. Такие взаимодействия должны влиять на распределение заряда в молекуле и, таким образом, вызывать изменения в колебательных свойствах групп М-СО. Та же молекула может расположиться рядом с активным сайтом иначе (рис. 7.20, *б*), что приведет к случайным (неспецифическим) взаимодействиям. В случаях, подобным только что описанным, биозонд является функциональным (см. разд. 7.8.2). При анализе таких случаев должны учитываться как взаимодействия зонда, связанного с рецептором по типу, показанному на рис. 7.20, *а* или *б*, так и взаимодействия свободного зонда с растворителем. Поскольку существуют электронные взаимодействия металлоорганического фрагмента и связывающей части молекулы, взаимодействия с активным сайтом по типу водородных связей должны приводить к значительному эффекту за счет возмущения распределения заряда в комплексе. Этот эффект является следствием взаимодействий, происходящих на некотором удалении от металлокарбонильного комплекса, что и называется «отдаленной чувствительностью». Тот же тип взаимодействия показан на рис. 7.20, *в*, за исключением того, что сопряжение между связывающей частью и металлокарбонильным комплексом в этом случае отсутствует. В этом случае изменения в водородных связях будут существенно меньше влиять на колебательные полосы поглощения комплекса. На ИК-спектры при этом будут оказывать влияние только локальные эффекты («локальная чувствительность»). Эти эффекты представляют собой неспецифические взаимодействия зонда с рецептором (рис. 7.20, *г*) и неспецифические взаимодействия свободного зонда со средой. Зонды с «отдаленной чувствительностью» дают отклик на отдаленные и на локальные эффекты, в то время как зонды с «локальной чувствительностью» откликаются только на локальные эффекты. Сравнение этих двух систем служит мощным методом обнаружения и количественной оценки отдаленных эффектов.

7.8.2. Функциональные и дисфункциональные зонды

В случаях, изображенных на рисунке 7.20, *д* и *е*, биозонд уже подходит для связывания с рецептором (например, ввиду того, что фрагмент зонда, к которому присоединен металлоорганический комплекс, может пространственно блокировать возможность связывания). Подобные зонды являются «дисфункциональными», но они все же могут вступать в какой-то мере во взаимодействия, характерные для «функциональных» зондов, показанные на рисунке 7.20, *а–г*. Сравнение спектроскопических откликов «дисфункционального» и «локально чувствительного» зондов дает дополнительную информацию, которая позволяет идентифицировать действительный отдаленный отклик, реализующийся по рисунку 7.20, *а*. Если быть более точным, зонд, изображенный на рисунке 7.20, *д*, является и «дисфункциональным», и «отдаленно чувствительным», так что изменения рН, которые могут влиять на степень диссоциации групп ОН, могут влиять и на спектроскопические характеристики (в случаях *е* и *б* ситуация сходная). Если группы ОН входят в состав фенольных групп, подобные эффекты могут быть существенными.

Однако в случае, изображающем только «локальную чувствительность» (рис. 7.20, *з*), изменения pH могут быть гораздо менее важными. Сравнение случаев *б*, *з*, *д* и *е*, а также локально чувствительных аналогов дисфункциональных структур (*ж* и *з*) даст информацию, позволяющую различать pH-зависимые изменения во взаимодействиях активного сайта с окружающей его макроскопической средой и специфические взаимодействия, обусловленные водородными связями.

7.8.3. Функциональные и дисфункциональные рецепторы

Два последних примера (*и* и *к*) на рис. 7.20 соответствуют ситуациям, в которых рецептор сам не способен связываться с молекулой биозонда. Из рецептора может быть удалена (случай *и*) ключевая структура (например, за счет мутации в гене, который кодирует фермент), либо такая структура может быть блокирована (например, необратимым ковалентным связыванием с ингибитором). Кроме того (случай *к*), мутации могут так изменить очертания активного сайта, что приближение биозонда к активному сайту будет заблокировано. В случаях *и* и *к* даже «функциональные отдаленно чувствительные» биозонды будут неспособны дать отклик, свойственный отдаленным взаимодействиям. Это хороший тест на то, что методу, основанному на описанных принципах, можно доверять. Специфическое различие между отдаленной и локальной чувствительностью, характерное для функциональных рецепторов, должно отсутствовать, если те же самые зондовые структуры используются в случае дисфункционального рецептора.

7.8.4. Функциональные и дисфункциональные зонды и рецепторы для исследования индукции экспрессии узелкового гена

Принципы, рассмотренные в разд. 7.8.1–7.8.3, могут быть применимы для активных сайтов ферментов и других биологических рецепторных структур. В любом случае, важным критерием в выборе биологической задачи для исследования методом биозондов с ИК-откликом является доступность хорошего теста на правильное связывание с рецептором. В случае ферментов подобные анализы, как правило, являются достаточно прямыми, поскольку возможность измерять степень превращения субстрата в продукт позволяет определить как $k_{\text{кат.}}$, так и k_i , и предоставляют средства для отличия функциональных и дисфункциональных зондов и рецепторов. В случае других биологических рецепторных структур необходимы либо прямое измерение биологических следствий процесса связывания, либо косвенный анализ. Кроме того, требуется также большая тщательность в развитии метода и выборе самой биологической системы.

Проект в Норвиче, направленный на исследование молекулярных событий, которые приводят к индукции гена и появлению корневых узелков в растениях семейства бобовых, и, таким образом, к аккумуляции бактерий, фиксирующих

азот в узелках, был выбран с целью разработки методов, описанных в данной главе. Ключевым моментом здесь было сотрудничество с генетиками, и эти исследования оказались возможными благодаря тесным связям между Университетом Восточной Англии и Институтом Джона Иннеса в Норвичском исследовательском центре. Это сотрудничество позволило как проводить анализы на индукцию гена [107], так и разрабатывать подходы к функциональным и дисфункциональным биологическим образцам. Описание того, как были спланированы эти эксперименты, будет приведено в конце данной главы. Мы хорошо понимали, что только в том случае, если все факторы, влияющие на эксперимент, подобраны удачно, можно было надеяться расшифровать информацию, полученную при использовании подхода биозондов, дающих ИК-отклик, и прийти к ясному пониманию тех стадий молекулярного распознавания, которые и образуют основу биологических процессов. Можно полагать, что, несмотря на сложность исследуемых систем, существует возможность выделить специфический спектроскопический отклик и доказать правомерность его отнесения к той биологической проблеме, на решение которой направлен данный метод в том случае, если есть все необходимые инструменты с точными по своей природе сравнениями. Эти сравнения могут быть сделаны, благодаря мощи методов, основанных на АГК, позволяющих различить сходные спектроскопические эффекты (см. разд. 7.5.1 и 7.5.3), а также перспективности разных металлокарбонильных методов со спектроскопически комплементарными зондовыми группами (см. разд. 7.5.2).

Некоторые ключевые моменты ранних стадий химической биологии образования корневых узелков бобовых показаны на рис. 7.21. Корни бобовых растений подают сигнал молекулами флавоноидов [108], в ответ на который почвенная бактерия *Rhizobium* [107, 109–111] приближается к корням и проникает в них, образуя узелки [106]. В этом процессе задействована специфическая часть генома *Rhizobium*, и основным является один из генов (*nodD*) [109] (т. е. происходит постоянная транскрипция этого гена, и белок, кодируемый им, всегда доступен). В присутствии флавоноидов происходит транскрипция всех генов [112–114], и эта индукция экспрессии *нодального* (узелкового) гена требует присутствия гена *nodD* (*nodD*(–)-штаммы не реагируют на флавоноиды). Поэтому предположили, что белок, кодируемый *nodD*, является регуляторным белком, который связывает флавоноиды и затем «включает» работу остальных *нодальных* генов. Было также известно, что для проявления биологической активности необходимо наличие групп ОН в обоих ароматических кольцах флавоноидов [115] (типичные примеры – высокооксигенированные флавоноиды, такие как нарингинин **47** и эриодиктиол **48**). Поэтому были получены и тестированы производные оксигенированных флавоноидов, содержащие металлокарбонильные группы.

Действительно, в исследованиях такого рода легко определяются «дисфункциональные зонды» [76, 78], поскольку наиболее вероятным результатом при добавлении комплекса циклогексадиенилжелеза должно быть отсутствие специфических взаимодействий между флавоноидом и предполагаемым рецептором (примером служит соединение **22** на рис. 7.13). Однако следует подчеркнуть, что даже такие отрицательные результаты

важны и способствуют развитию проекта, поскольку для окончательных выводов необходимо выбрать хорошие примеры дисфункциональных зондов, чтобы иметь набор для спектроскопических сравнений. Главная задача заключается все же в поиске активных металлоорганических производных, а для выявления отличий активных соединений от неактивных требуется хороший скрининг. В данном случае в участок генной последовательности *Rhizobium nodA-nodB-nodC* был встроен дополнительный ген рядом с *nodD*. Этот дополнительный ген (*lacZ*), который кодирует β-галактозидазу, был взят из *E. coli*, а не из *Rhizobium*. Когда происходит индукция гена, дополнительный ген также транскрибируется, и мутантный *Rhizobium* производит β-галактозидазу [107]. Это легко определяется колориметрическим анализом [116] по гидролизу *n*-нитрофенолгалактозида. В этом случае весьма важна генетическая экспертиза для того, чтобы был возможен соответствующий скрининг. Без такой возможности проблема индукции гена *Rhizobium* не могла бы стать задачей для решения с помощью биозондов с ИК-откликом. Комплекс **23** (рис. 7.13) служит примером флавоноидного производного, которое сохраняет способность к индукции экспрессии *нодального* гена.

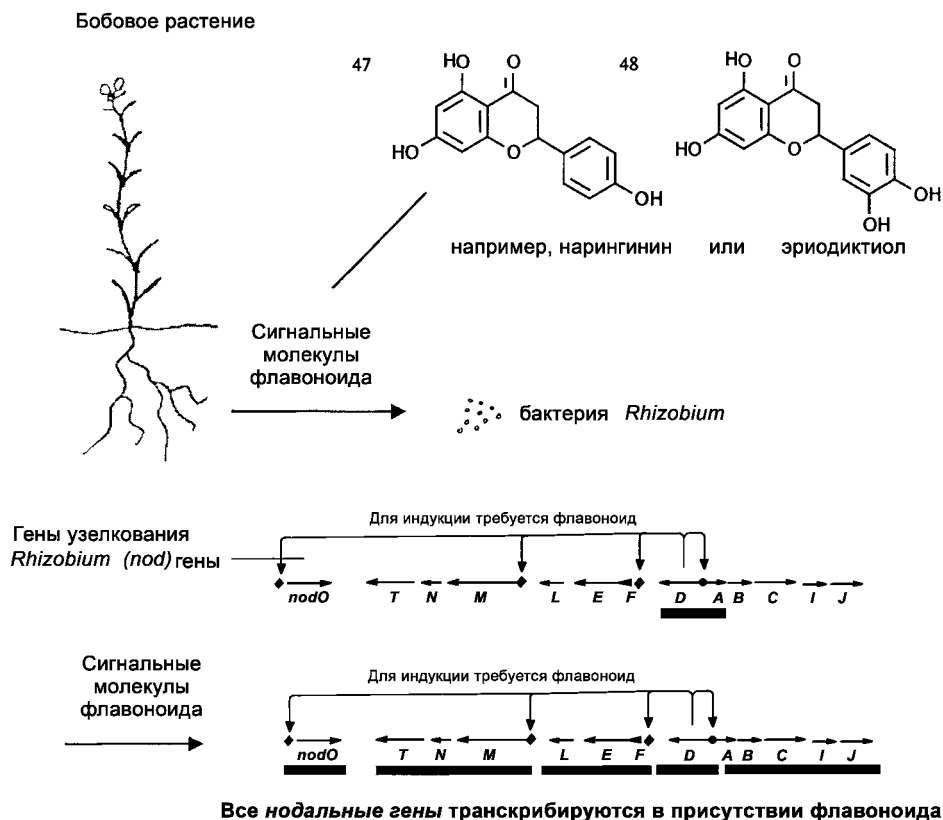


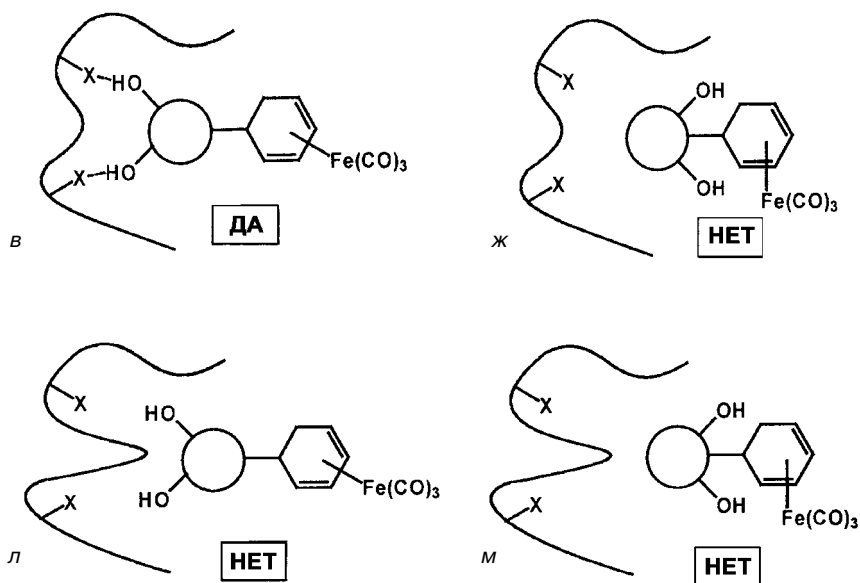
Рис. 7.21. Иллюстрация роли сигнальных молекул флавоноидов (например, **47** и **48**) в образовании корневых узелков в бобовых растениях

Заключительная роль генетиков в данном проекте состояла в том, чтобы провести функциональное/дисфункциональное сравнение [78] в биологическом образце. Простой подход к дисфункциональному случаю очевиден, поскольку ему соответствует *nodD*(–)-мутант, о котором было сказано выше. В качестве функционального случая можно было использовать дикий тип, но гораздо лучший подход основан на изогенном штамме, в котором наблюдается суперэкспрессия гена *nodD*. При культивировании такой штамм будет создавать значительно более высокие концентрации D-белка, чем дикий тип, увеличивая тем самым вероятность спектроскопического детектирования взаимодействия D-белок–флавоноид. Были использованы *nodD*(–)-штамм *Rhizobium leguminosarum* WT(8400pRL1) и тот же мутант, несущий множественные копии гена *nodD* на плазмиде pIJ1518. Поскольку эти два штамма идентичны, за исключением продуцирования белка D, любое различие в ИК-спектрах должно быть вызвано именно белком D.

Эксперимент спланирован таким образом, что он имеет три степени контроля и позволяет интерпретировать различия между функциональным и дисфункциональным зондами (на рис. 7.22 сравните случаи *в* и *жс*) как следствие связывания функционального зонда с рецептором. Если такие различия не детектируются, тогда используется дисфункциональный биологический образец (рис. 7.22: белок D отсутствует).

Аналогично, можно различить функциональный и дисфункциональный рецепторы (рис. 7.22: сравните *в* и *л*), поскольку один и тот же эффект не будет наблюдаться как в случае *жс*, так и в случае *и*. Это не является критерием того, что *жс*, *л* и *м* относятся к одному и тому же случаю, а *в* – к какому-то уникально отличному. Вопрос является более тонким, и для успеха эксперимента необходимо, чтобы любое наблюдаемое различие исчезало при использовании дисфункционального компонента вместо функционального. Это должно иметь место для каждой комбинации, в которой используются дисфункциональные компоненты.

На данный момент полный набор сравнений, доступных для структур с «локальным откликом», таких как **23** (рис. 7.13) и для соответствующих аналогов с «отдаленным откликом» ждет дальнейшей работы по синтезу. В качестве конечного эксперимента [78] с соединениями, доступными сейчас, мы проверили применимость требуемых спектроскопических измерений на соединении **23** при концентрациях столь низких, как 50 мкМ. Даже при столь низком уровне концентраций в присутствии осколков лизированных клеток *Rhizobium leguminosarum* WT(8400pRL1).pIJ1518 были обнаружены вполне различимые валентные колебательные моды $\nu_{\text{симм.CO}}$ и $\nu_{\text{антисимм.CO}}$ при 2045 и 1965 см⁻¹. Существующие сейчас синтетический [76, 78], спектроскопический [78], генетический [78, 107] и концептуальный (настоящая глава) методы, все же диктуют необходимость синтеза более прочно связывающихся металлоорганических производных и аналогов отдаленного отклика (см. разд. 7.8.1) со структурами, обладающими более высокой активностью. Эта проблема сходна с задачами, с которыми столкнулась группа Жауэна в их успешной пионерской работе, направленной на изучение рецепторов эстрогенов (см. разд. 7.6 и гл. 3).



ожидаемый отклик	функциональная проба	дисфункциональная проба
функциональный рецептор	ДА	НЕТ
дисфункциональный рецептор	НЕТ	НЕТ

Рис. 7.22. Сравнение функциональных и дисфункциональных систем [сравните в и ж с рис. 7.20; л и м – новые примеры случая к], позволяющее провести спектроскопическую идентификацию специфических эффектов, вызванных взаимодействием металлокарбонильного биозонда с биологическим рецептором

7.9. Заключение

Работа, описанная здесь, является частью продолжающейся в настоящее время программы по разработке металлокарбонильных молекулярных биозондов для использования в анализе биологических объектов. Начав с простых комбинаций молекулярных рецепторов и металлокарбонильных комплексов, которые позволяли осуществлять ИК-считывание, мы пришли

мультиметодам на основе карбониллов металлов [26, 36] и молекулярным чувствительным устройствам на подложке [117–119]. Когда в биоанализе применяются такие методы, в одном и том же спектральном эксперименте оказываются доступными несколько независимых источников информации. При этом прямые специфические эффекты, возникающие в результате трансдукции сигнала от комплекса рецептора типа гость–хозяин и передающиеся на колебательный спектр металлокарбонильного компонента, можно отличить от общих эффектов, возникающих в результате случайных взаимодействий с различными веществами в непосредственном окружении зондовой группы в биологической среде. Это является существенным требованием к анализу биологических систем в случае применения методологии био-зонда с ИК-откликом.

Благодарности

Данная глава является частью лекции, прочитанной на первом Международном симпозиуме по биометаллоорганической химии [1], и Г. Р. Стефенсон благодарит организаторов Симпозиума за финансовую поддержку для участия в «ISBOMC'02» (о части лекции, которая посвящена синтетической химии – см. ссылки [76, 78]). Обсужденная здесь работа была задумана и осуществлена в сотрудничестве с профессором К. С. Крейзером, Ноттингемский Трент-Университет, Ноттингем, Великобритания. Это сотрудничество между Норвичем и Ноттингемом было поддержано грантом EPSRC (GR/L75719), начало работы – BBSRC-грантом PG83/547, AFRC-грантами PG83/503, PG83/519, EPSRC-грантом GR/J83068 и SERC-грантом GR/G49852. Генетические исследования находятся в компетенции исследовательской группы Института Джона Иннеса в Норвиче, особенно доктора Дж. А. Доуни, чье руководство концептуальными аспектами генетики *Rhizobium* и помощь в практическом осуществлении данной работы признаются с благодарностью. Мы благодарны также К. Е. Вильсон за помощь в генетических исследованиях и экспериментах на культурах клеток, проведенных при скрининге металлоорганических производных флавоноидов. Мы благодарим BBSRC ISIS и Королевское общество за поддержку, EPSRC Национальный масс-спектрометрический центр обслуживания в университете Уэльса, Суанси, Великобритания за масс-спектрометрические измерения высокого разрешения, Дж. Варга и Дж. Лейтович (Центр химических исследований Венгерской академии наук) за использование неопубликованных программ анализа кривых. Мы с благодарностью отзываемся также о важном обзоре Северина, Бергса и Бека [120], охватывающем литературу по биометаллоорганической химии производных аминокислот и пептидов вплоть до 1998 г. (см. также [121]), и обзорах, цитируемых в ссылках [55, 63, 65].

Литература

1. The definitions of the terms bioprobes and bionanometrology were presented at the First International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, Paris, 18–20 July, **2002**.
2. R. B. M. Schasfoort, Expert Review of Anticancer Therapy **2004**, 1, 123–132; B. H. Weigl, R. L. Bardell, C. R. Cabrera, Adv. Drug Delivery Rev. **2003**, 55, 349–377; G. M. Walker, H. C. Zeringue, D. J. Beebe, Lab on a Chip **2004**, 4, 91–97; E. Verpoorte, Lab on a Chip **2003**, 3, 60N; V. Srinivasan, V. K. Pamula, R. B. Fair, Anal. Chim. Acta **2004**, 507, 145–150.
3. J. Janata, M. Josowicz, P. Vanýsek, D. M. DeVaney, Anal. Chem. **1998**, 70, 179R–208R.
4. Reviews: D. J. Cram, Science, **1988**, 240, 760–7; H.-J. Sshneider, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1991**, 30, 1417; D. J. Cram, From Design to Discovery, Oxford University Press, Oxford, **1990**; T. Wang, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, J. Heterocycl. Chem. **1994**, 31, 1097–1114; examples: E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokal, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram, J. Am. Chem. Soc. **1977**, 99, 2564–2571; R. Arnecke, V. Böhmer, R. Cacciapaglia, A. D. Cort, L. Mandolini, Tetrahedron **1997**, 53, 4901–4908; S. Roelens, R. Torriti, Supramolecular Chem., **1999**, 10, 225–232; S. C. Zimmerman, C. M. Van Zyl, G. S. Hamilton, J. Am. Chem. Soc., **1989**, 111, 1373–1381; G. Arena, A. Casnati, A. Contino, G. G. Lombardo, D. Sciotto, R. Ungaro, Chem. Eur. J. **1999**, 5, 738–744.
5. J.-H. Schneider, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1993**, 32, 848–850; W. Simon, Chimia, **1990**, 44, 395; R. Murray, R. Dessy, W. Heineman, F. Janta, W. R. Seitz (Eds.), Chemical Sensors and Microinstrumentation, ACS symposium Series, **1988**, 403; O. S. Wolfbeis, J. Anal. Chem. **1990**, 337, 522–527.
6. Reviews: P. M. Saito, K. Kikushi, Opt. Rev. **1997**, 5, 527; M. N. Taib, R. Narayanaswamy, Analyst, **1995**, 120, 1617–1627; O. S. Wolfbeis, Anal. Chem. **2000**, 72, 81R–90R; examples: T. Hao, X. Xing, C. C. Liu, Sens. Actuators B **1993**, 10, 155; M. Takeuchi, M. Taguchi, H. Shinmori, S. Shinkai, Bull. Chem. Soc. Jap. **1996**, 69, 2613; C. J. Dacis, P. T. Lewis, M. E. Carroll, M. W. Read, R. Cueto, R. M. Strongin, Org. Lett. **1999**, 1, 331–334; K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, Chem. Commun. **1994**, 1083; C. J. Ward, P. Patel, P. R. Ashton, T. D. James, Chem. Commun. **2000**, 229–230; L. A. Cabell, M. K. Monahan, E. V. Anslyn, Tetrahedron Lett. **1999**, 40, 7753–7756; J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1999**, 38, 3666; R. Narayanaswamy, Analyst, **1993**, 118, 317–322; T. Hao, X. Xing, C. C. Lui, Sens. Actuators B **1994**, 10, 155.
7. B. Morelli, J. Phannaceut. Biomed. Anal. **2003**, 32, 257.
8. B. Morelli, Anal. Lett. **1994**, 41, 673.
9. Reviews: A. W. Czarnik, Acc. Chem. Res. **1994**, 27, 302; T. D. James, P. Linnana, S. Shinkai, Chem. Commun. **1996**, 281–288; E. N. Brody, L. Gold, Rev. Mol. Biotechnol. **2000**, 74, 5–13; J. Heisselberth, M. P. Robertson, S. Jhaveri, A. D. Ellington, Rev. Mol. Biotechnol. **2000**, 74, 15–25; A. W. Czarnik (Ed.), Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition, American Chemical Society, Washington DC, **1993**, 538; examples: A. W. Czarnik, Chem. Biol. **1995**, 2, 423–428; A. Miyawaki, J. Llopis, R. Helm, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, Nature **1997**, 388, 882–887; R. B. Thompson, B. P. Miliwal, V. L. Fellicia, C. A. Fierke, K. McCall, Anal. Chem. **1988**, 70, 4717–4723; K. Yamana, T. Mitsui, H. Nakano, Tetrahedron **1998**, 55, 9143–9150; R. R. France, I. Cumpstey, T. D. Butters, A. J. Fairbanks, M. R. Wormakd, Tetrahedron Asym. **2000**, 11, 4985–4994; B. Wetz, M. Gruber, B. Oswald, A. Dürkop, B. Weidgans, M. Probst, O. S. Wolfbeis, J. Chromatogr. **2003**, 793, 83–92; C. Amosti, J. Chromatogr. **2003**, 793, 181–191; R. Kenoth, S. S. Komath, M. J. Swamy, Arch. Biochem.

- Biophys. **2003**, 413, 131–138; G. K. Walkup, B. Imperiali, J. Am. Chem. Soc. **1996**, 138, 3053–3054; S. Deo, H. A. Godwin, J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 174–175; H. A. Godwin, J. M. Berg, J. Am. Chem. Soc. **1996**, 118, 6514–6515; S. D. Jayasena, Clin. Chem. **1999**, 45, 1628–1650; G. A. Soukup, R. R. Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol. **2000**, 10, 318–325; R. R. Breaker, Curr. Opin. Struct. Biol. **2002**, 13, 31–39; M. J. P. Leiner, Anal. Chim. Acta **1990**, 225, 209.
10. Reviews: A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsosn, C. P. McCoy, P. R. S. Maxwell, J. T. Rademacher, T. E. Rice, Pure Appl. Chem. **1996**, 68, 443; A. P. De Silva, T. Gunnlaugsosn, C. P. McCoy, J. Chem. Educ. **1997**, 74, 53; R. Narayanaswamy, Chem. Eng. News **1985**, 204; R. Bissel, A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaranta, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sananayake, Chem. Soc. Rev. **1992**, 21, 187; examples: M. Irie, T. Yorozu, K. Hayashi, J. Am. Chem. Soc. **1978**, 100, 2236; A. P. De Silva, T. Gunnlaugsosn, T. E. Rice, Analyst, **1996**, 121, 1759; A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsosn, P. L. M. Lynch, New J. Chem. **1996**, 20, 871; A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, C. P. McCoy, J. Am. Chem. Soc. **1997**, 119, 7891; T. D. James, K. R. A. S. Sananayake, R. Iguchi, S. Shinkai, J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 8982; M. Bielecki, H. Eggert, J. C. Norrild, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 **1999**, 449; Y. Shiomi, M. Saisho, K. Tsukagoshi, S. Shinkai, Supra. Mol. Chem. **1993**, 2, 11; Y. Shiomi, M. Saisho, K. Tsukagoshi, S. Shinkai, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 **1993**, 2111; A. J. Brian, A. P. De Silva, S. A. De Silva, R. A. D. Rupasingha, K. R. A. S. Sananayake, Biosensors **1989**, 4, 169; S. A. De Silva, A. P. De Silva, Chem. Commun. **1986**, 1709; . D. James, K. R. A. S. Sananayake, S. Shinkai, Nature **1995**, 374, 345; C. R. Cooper, T. D. James, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **2000**, 963–969.
11. Reviews: S. Takenaka, Small Mol. DNA RNA Binders **2003**, 1, 234; S. Subrahmanyam, S. A. Piletski, A. P. F. Turner, Anal. Chem. **2002**, 74, 3942; C. N. Campbell, A. Heller, D. J. Caruana, D. W. Sschmidtke, Electroanal. Meth. Biol. Mater. **2002**, 439; R. I. Stafan, H. Y. Aboul-Enein, J. F. van Staden, Sens. Update **2002**, 10, 123; S. O. Kelley, Electroanal. Meth. Biol. Mater. **2002**, 1; M. Foja, Electroanalysis, **2002**, 14, 1449; R. P. Buck, V. Cosofret, Pure Appl. Chem. **1993**, 65, 1849; examples: R. Iyer, V. Pavlov, I. Katakis, L. G. Bachas, Anal. Chem. **2003**, 75, 3898; C. J. Yu, H. Yowanto, Y. Wan, T. J. Meade, Y. Chong, M. Strong, L. H. Donilon, J. F. Kayyem, M. Gozin, G. F. Blackburn, J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 6767; O. W. Sshuhmann, H.-L. Schmidt, Adv. Biosensors **1992**, 2, 79; O. Kazunori, R. Naganawa, H. Radecka, M. Kataoka, E. Kimura, T. Koike, K. Tohda, H. Furuta, Supramol. Chem. **1994**, 4, 101; O. Kazunori, R. Naganawa, H. Radecka, M. Kataoka, E. Kimura, T. Koike, K. Tohda, M. Tange, H. Furuta, Supramol. Chem. **1994**, 4, 101.
12. Reviews: A. Heller, Acc. Chem. Res. **1990**, 23, 128; A. D. Ryabov, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1991**, 23, 931; A. N. J. Moore, D. D. M. Wayner, Can. J. Chem. **1999**, 77, 681; examples: A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. O. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, Anal. Chem. **1984**, 56, 667; A. E. G. Cass, G. Davis, M. J. Green, H. A. O. Hill, Electroanal. Chem. **1985**, 117; P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, T. Inagaki, H. L. Karan, H. S. Lee, T. A. Skotheim, Y. Okamoto, Anal. Chem. **1991**, 63, 677; H.-Z. Bu, S. R. Mikkelsen, A. M. English, Anal. Chem. **1995**, 67, 4071; L. Gordon, Electroanalysis **1995**, 7, 23; Y. Xu, H. B. Kraatz, Tetrahedron Lett. **2001**, 42, 2601; B. Schmidt, Clin. Chim. Acta **1997**, 266, 33; J. A. Duine, J. Biosci. Bioeng. **1999**, 88, 231; V. Laurinavicius, J. Razumiene, B. Kurtinaitiene, I. Lapenaite, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, A. Ramanavicius, Bioelectrochem. **2002**, 55, 29; M. Smolander, H. L. Livio, L. Rasanen, Biosens. Bioelectron. **1992**, 637.
13. H. Plenio, D. Burth, Organometallics **1996**, 15, 1151–1156.

14. A. M. Abeysekera, J. Grimshaw, S. D. Perera, *Chem. Commun.* **1990**, 1797–1800; H. Eckert, M. Koller, *Z. Naturforsch.* **1990**, 45, 1709–1714; I. Lavastre, J. Besançon, C. Moïse, P. Brossier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 188–195; K. Di Gleria, H. A. O. Hill, L. L. Wong, *FEBS Lett.* **1996**, 390, 142–144; H. B. Kraatz, J. Luestyk, G. D. Enright, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2400–2405.
15. M. Hromadovč, M. Salmain, R. Sosolova, L. Pospíšil, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 17–24.
16. T. Ihara, M. Nanayama, M. Murata, K. Nakano, M. Maeda, *Chem. Commun.* **1997**, 1609.
17. G. Jaouen, A. Vessières, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4778–4780.
18. J. O. Alben, W. S. Caughey, *Biochemistry* **1968**, 7, 175–183; J. C. Owirutski, M. Li, B. Locke, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 4842; J. R. Hill, D. D. Dlott, M. D. Payer, K. A. Peterson, C. W. Rella, M. M. Rosenblatt, K. S. Ssuslick, C. J. Ziegler, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 244, 218; J. R. Hill, D. D. Dlott, C. W. Rella, T. A. Smith, H. A. Schwetman, K. A. Peterson, A. Kwok Rector, M. D. Fayer, *Biospectroscopy* **1996**, 2, 277; R. B. Dyer, K. A. Peterson, P. O. Stoutland, W. H. Woofruff, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6276–6277.
19. J. R. Hill, D. D. Dlott, C. W. Rella, K. A. Peterson, S. M. Dacatur, S. G. Boxer, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 12100–12107.
20. Reviews: D. Marsh, L. I. Horváth, M. J. Swamy, S. Mantripragasa, J. H. Kleinschmidt, *Mol. Membrane Biol.* **2002**, 19, 247–255; P. P. Borbat, A. J. Costa-Filho, K. A. Earle, J. K. Moscicki, J. H. Freed, *Science* **2001**, 291, 266–269; examples: M. B. Sankaram, P. J. Brophy, D. Marsh, *Biochem.* **1989**, 28, 9699–9707; D. Marsh, L. I. Horváth, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1376, 267–296; A. Spaltenstein, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1299; S. Burgard, M. Harada, Y. Kagawa, W. E. Trommer, P. D. Vogel, *Cell Biochem. Biophys.* **2003**, 39, 175–182; M. J. Swamy, D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1513, 122–130; M. J. Swamy, L. I. Horváth, P. J. Brophy, D. Marsh, *Biochemistry* **1999**, 38, 16333–16339; M. Ramakrishnan, V. Anbazhagan, T. V. Pratap, D. Marsh, M. J. Swamy, *Biophys. J.* **2001**, 81, 2215–2225; S.-C. Hung, W. Wang, S. I. Chan, H. M. Chen, *Biophys. J.* **1999**, 77, 3120–3133.
21. Reviews: L. Feilding, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 39–53; J. T. Gerig, *Prog. Nucl. Mag. Resort. Spectrosc.* **1994**, 26, 293; M. A. Danielson, J. J. Falke, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 163–195; examples: J. Feeney, J. E. McCormick, C. J. Bauer, B. Birdsall, C. M. Moody, B. A. Starkman, D. W. Young, P. Franis, R. H. Havin, W. D. Arnold, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8700–8706; J. Scheuring, J. Lee, M. Cushman, H. Patel, D. A. Patrick, A. Bacher, *Biochemistry* **1994**, 33, 7634–7640; B. Saloper-Sondi, M. D. Vaughan, M. C. Skeels, J. F. Honek, I. A. Luck, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2003**, 21, 235–246; J. T. Gerig, *Prog. NMR Spectrosc.* **1994**, 26, 293–370; J. G. Pearson, B. Montez, H. Le, E. Oldfield, E. Y. T. Chien, S. G. Sugar, *Biochemistry* **1997**, 36, 3590–3599; H. Duewel, E. Daub V. Robinson, J. F. Honek, *Biochem.* **1997**, 36, 3404–3416; C. Lian, H. Le, B. Montez, J. Patterson, S. Harrell, D. Laws, I. Matsumura, J. Pearson, E. Oldfield, *Biochemistry* **1994**, 33, 5238–5245; S. D. Hoeltzli, C. Fieden, *Biochemistry* **1994**, 33, 5502–5509; H. S. Duewel, J. F. Honek, *J. Protein Chem.* **1998**, 17, 337.
22. D. A. Brown, H. Sloan, *J. Chem. Soc.* **1962**, 3849–3854.
23. F. A. Cotton, R. M. Wing, *Inorg. Chem.* **1965**, 4, 314; F. A. Cotton, *Helv. Chim. Acta* **1967**, Fasc. Extraord. (A. Werner Commemoration Vol., Vergal) 117; M. B. Hall, R. F. Fenske, *Inorg. Chem.* **1972**, 11, 1619; F. A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 2nd edition, Wiley Interscience, New York, **1966**, 730–735;

- F. J. McQuillin, D. G. Parker, G. R. Stephenson*, Transition Metal Organometallics for Organic Synthesis, Cambridge University Press, Cambridge, **1991**, 19–20.
24. *S. P. Walsh, W. A. Goddard*, J. Am. Chem. Soc. **1976**, 98, 7908; *J. B. Johnson, W. G. Klemperer*, J. Am. Chem. Soc. **1977**, 99, 7132.
25. *L. Pauling*, Nature of the Chemical Bond, 3rd edition, Cornell University Press, Ithaca, N. Y, **1964**.
26. *C. E. Anson, T. J. Baldwin, C. S. Greaser, G. R. Stephenson*, Organometallics **1996**, 15, 1451–1456.
27. *R. Eiss*, Inorg. Chem. **1970**, 9, 1650–1655; *A. Musco, G. Pairo, R. Palumbo*, Chem. Ind. (Milan) **1968**, 50, 550.
28. *C. E. Anson, C. S. Greaser, G. R. Stephenson*, Chem. Commun. **1994**, 2175–2176.
29. *K. J. Odell, E. M. Hyde, B. L. Shaw, I. Shepherd*, J. Organomet. Chem. **1979**, 168, 103.
30. *R. Hoffmann*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1982**, 21, 711; *F. G. A. Stone*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1984**, 23, 89.
31. *P. S. Braterman*, Metal Carbonyl Spectra, Academic Press, New York, **1975**; *E. Maslowsky Jr.*, Vibrational Spectra of Organometallic Compounds, Wiley, London, **1977**; *P. S. Braterman, R. Bau, H. D. Kaesz*, Inorg. Chem. **1967**, 6, 2097–2102.
32. *W. P. Anderson, T. L. Brown*, J. Organomet. Chem. **1971**, 32, 343.
33. *D. J. Darensbourg*, Inorg. Chem. **1972**, 11, 1606–1609.
34. *F. A. Cotton*, Chemical Applications of Group Theory, Wiley-Interscience, New York, 2nd edition, **1971**, Chapter 10; *K. Nakamoto*, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Wiley-Interscience, New York, 2nd edition, **1970**.
35. *J. K. Burdett*, Inorg. Chem. **1981**, 20, 2607–2615.
36. *M. Salmain, A. Vessières, A. Varenne, P. Brossier, G. Jaouen*, J. Organomet. Chem. **1999**, 589, 92–97; *A. Varenne, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen*, Immunoanal., Biol. Spec. **1994**, 9, 205–214; *M. Salmain, A. Vessières, P. Brossier, G. Jaouen*, Anal. Biochem. **1993**, 208, 117–120.
37. *G. R. Stephenson, S. Sudhakaran-Pillai*, unpublished results.
38. *C. C. Barraclough, J. Lewis, R. S. Nyholm*, J. Chem. Soc. **1961**, 2582–2584; *W. Beck, K. Lottes*, Z. Naturforsch. **1964**, 19b, 987.
39. *L. M. Haines, M. H. B. Stiddard*, Adv. Inorg. Chem. Radiochem. **1970**, 12, 53.
40. *J. R. Hill, C. J. Ziegler, K. S. Ssuslick, D. D. Dlott, C. W. Rella, M. D. Payer*, J. Phys. Chem. **1996**, 100, 18023–18032.
41. *I. P. Clark, M. W. George, J. J. Turner*, J. Phys. Chem. A **1997**, 101, 8367–8370.
42. *P. C. Painter, G. J. Pehlert, Y. Hu, M. M. Colman*, Macromol. **1999**, 32, 2055–2057.
43. *E. J. Hutchinson, D. Ben-Amotz*, J. Phys. Chem. B **1988**, 102, 3354.
44. *T. C. Cheam, S. Krimm*, Chem. Phys. Lett. **1984**, 107, 613.
45. *C. S. Greaser, M. A. Fey, G. R. Stephenson*, Spectrochim. Acta **1994**, 50A, 1295–1299.
46. *L. J. Bellamy, R. L. Williams*, J. Chem. Soc. **1957**, 863; *L. J. Bellamy, H. E. Hallam, R. L. Williams*, Trans. Faraday Soc. **1958**, 54, 1120; *L. J. Bellamy, R. L. Williams*, Trans. Faraday Soc. **1959**, 55, 14; *A. D. E. Pullin*, Proc. Roy. Soc. A **1960**, 255, 39–43; *C. Reichert*, Solvent effects in Organic Chemistry, in H. F. Ebel (Ed.), Monographs in Modern Chemistry, Vol. 13, Verlag Chemie, Weinheim, **1979**.
47. *C. E. Anson, T. J. Baldwin, N. J. Clayden, C. S. Greaser, O. Egyed, M. A. Fey, W. E. Hutchinson, A. Kavanagh, G. R. Stephenson, P. I. Walker*, J. Optoelectronics and Adv. Mat. **2003**, 5, 533–554.
48. *R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening*, Chem. Rev. **1991**, 91, 1721–2085.

49. C. E. Anson, C. S. Greaser, G. R. Stephenson, unpublished results.
50. C. E. Anson, C. S. Greaser, G. R. Stephenson, *Spectrochim. Acta*, **1996**, 52A, 1183–1191.
51. M. J. Aroney, M. K. Cooper, R. K. Pierens, S. J. Prattem, S. W. Filipczuk, *J. Organomet. Chem.* **1982**, 234, C20.
52. H. Kobayashi, K. Kobayashi, Y. Kaizu, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 4135; O. L. Carter, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Chem. Soc. A* **1966**, 822.
53. D. J. Cram, D. I. Wilkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5721; H. Ohno, H. Horita, T. Otsubo, Y. Sakata, S. Misumi, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 265; E. Langer, H. Lehner, *J. Organomet. Chem.* **1979**, 173, 47.
54. Y. Kai, N. Yasuoka, N. Kasai, *Acta Ctyst.* **1978**, B34, 2840; H. Oike, Y. Kai, K. Miki, N. Tanaka, N. Kasai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 1993–1999; A. de Meijere, O. Reiser, M. Stobbe, J. Kopf, G. Adiwidjaja, V. Sinnwell, S. I. Khan, *Acta Chem. Scand.* **1988**, A42, 611.
55. G. Jaouen, A. Vessières, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 1865–1874.
56. M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephi, Y. Sarr, E. Slovin, L. Snarsky, *Nature* **1977**, 534–535.
57. A. Vessières, M. Salmain, V. Philomin, G. Jaouen, *Immunoanal. Biol. Spec.* **1992**, 31, 9.
58. M. Salmain, A. Vessières, I. S. Butler, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 1, 59.
59. G. Jaouen, A. Vessières, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4780–4781.
60. A. Vessières, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, M. Louer, G. Jaouen, *Biochemistry* **1988**, 27, 6659–6666.
61. M. Savignac, G. Jaouen, C. A. Rodger, R. E. Perrier, E. G. Sayer, M. J. McGlinch, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2328–2332.
62. A. Vessières, S. Top, C. Vaillant, D. Osella, J.-P. Mornon, G. Jaouen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 753–755.
63. G. Jaouen, A. Vessières, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 565–572.
64. I. S. Butler, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43, 1497.
65. G. Jaouen, A. Vessières, I. S. Butler, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 361–369.
66. S. Green, P. Waiter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos, P. Chambon, *Nature* **1986**, 320, 134.
67. M. Gruselle, J.-L. Rossignol, A. Vessières, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1987**, 328, C12–C15.
68. M. Gruselle, P. Deprez, A. Vessières, S. Greenfield, G. Jaouen, J.-P. Larue, D. Thouvenot, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 359, C53–C56.
69. I. Lavastre, J. Besançon, P. Brossier, C. Moise, *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, 4, 9.
70. M. Salmain, A. Vessières, P. Brossier, I. S. Butler, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1992**, 148, 56–75.
71. M. Salmain, A. Vessières, G. Jaouen, I. S. Butler, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2323–2329.
72. M. Salmain, A. Vessières, P. Brossier, G. Jaouen, *Anal. Biochem.* **1993**, 208, 117.
73. N. Fischer-Durand, A. Vessières, J.-M. Heldt, F. Le Bideau, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 59–66.
74. B. Rudolf, M. Makowska, A. Domagala, A. Rubarczyk-Pirek, J. Zakrzewski, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 95–100.
75. J. Szymoniak, B. El Mouatassim, J. Besançon, C. Moïse, P. Brossier, *Tetrahedron* **1993**, 49, 3109–3116.

76. A. V. Malkov, L. Mojovic, G. R. Stephenson, A. T. Turner, C. S. Creaser, J. Organomet. Chem. **1999**, 589, 103–110.
77. C. E. Anson, C. S. Greaser, A. V. Malkov, L. Mojovic, G. R. Stephenson, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 101–122.
78. C. E. Anson, C. S. Creaser, J. A. Dewnie, O. Egyed, A. V. Malkov, L. Mojovic, G. R. Stephenson, A. T. Turner, K. E. Wilson, Bioorg. Med. Chem. Lett. **1998**, 8, 3549–3554.
79. F. Le Borgne, J. P. Beaucourt, Tetrahedron Lett. **1988**, 29, 5649–5652.
80. N. A. Sasaki, P. Potier, M. Savignac, G. Jaouen, Tetrahedron Lett. **1988**, 29, 5759–5762.
81. C. Sergheraert, J. C. Brunet, A. Tartar, Chem. Commun. **1982**, 1417–1418; C. Sergheraert, A. Tartar, J. Organomet. Chem. **1982**, 240, 163–168.
82. J. C. Brunet, E. Cuingnet, H. Gras, P. Marcincal, A. Mocz, C. Sergheraert, A. Tartar, J. Organomet. Chem. **1981**, 216, 73–77.
83. F. Hosner, M. Voyle, J. Organomet. Chem. **1988**, 347, 365.
84. A. J. Pearson, S. H. Lee, F. Gouzoules, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **1990**, 2251–2254.
85. A. E. Bolton, W. M. Hunter, Biochem. J. **1973**, 133, 529–539.
86. A. Varenne, M. Salmmain, C. Brisson, G. Jaouen, Bioconjugate Chem. **1992**, 3, 471–476.
87. M. Salmmain, M. Gunn, A. Goreti, S. Top, G. Jaouen, Bioconjugate Chem. **1993**, 4, 425–433.
88. A. Gorfti, S. Top, G. Jaouen, Chem. Commun. **1994**, 433–434,
89. W. Bauer, M. Prem, K. Polborn, K. Sünkel, W. Steglich, W. Beck, Eur. J. Inorg. Chem. **1998**, 485–493.
90. S. Blanalt, M. Salmmain, B. Malézieux G. Jaouen, Tetrahedron Lett. **1996**, 37, 6561–6564.
91. M. Salmmain, E. Licandro, C. Baldoli, S. Maiorana, H. Tran-Huy, G. Jaouen, J. Organomet. Chem. **2001**, 617, 376–382.
92. M. Chaari, J. P. Lavergne, P. Vailfont, Synth. Commun. **1989**, 19, 1211–1216; F. Rose-Munch, K. Aniss, E. Rose, J. Organomet. Chem. **1990**, 1S5, C1–C3; F. Rose-Munch, K. Aniss, Tetrahedron Lett., **1990**, 31, 6351–6354; M. Chaari, A. Jenhi, J. P. Lavergne, P. Vailfont, J. Organomet. Chem. **1991**, 401, C10–C13; M. Chaari, A. Jenhi, J. P. Laverigne, P. Vailfont, Tetrahedron **1991**, 47, 4619–4630; F. Rose-Munch, K. Aniss, E. Rose, J. Vaisserman, J. Organomet. Chem. **1991**, 415, 223–255; M. J. Dunn, R. F. W. Jackson, G. R. Stephenson, Synlett **1992**, 905–906; J.-P. Genet, R. D. A. Hudspm, W.-B. Meng, E. Roberts, G. R. Stephenson, S. Thorimbert, Synlett **1994**, 631–634; R. D. A. Hudson, S. A. Osborne, G. R. Stephenson, Synlett **1996**, 845–846.
93. M. A. Fey, PhD Thesis, University of East Anglia, Norwich, **1992**.
94. J. A. Carver, B. Fates, L. A. P. Kane-Maguire, Chem. Commun. **1993**, 928–929.
95. C. E. Anson, C. S. Greases, O. Egyed, M. A. Fey, G. R. Stephenson, Chem. Commun. **1994**, 39–40.
96. L. A. P. Kane-Maguire, R. Kanitz, P. Jones, P. A. Williams, J. Organomet. Chem. **1994**, 464, 203–213.
97. K. L. Bennet, J. A. Carver, D. M. David, L. A. P. Kane-Maguire, M. M. Sheil, J. Coord. Chem. **1995**, 34, 351–355.
98. F. Franke, I. D. Jenkins, Aust. J. Chem. **1978**, 31, 595–603.
99. D. Schlawe, A. Majdalani, J. Velicky, E. Hessler, T. Wiedler, A. Prokop, H.-G. Schalz, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2004**, 43, 1731–1734.
100. S. Schibli, M. Netter, L. Scapozza, M. Bierringer, P. Schielling, C. Dumas, J. Schoch, P. A. Schubiger, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 67–74.
101. K. Kowalski, J. Zakrzewski, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 91–94.
102. J. M. Dalla Riva Toma, D. E. Bergstrom, J. Org. Chem. **1994**, 59, 2418–2422.

103. Z. Wang, B. A. Roe, K. M. Nicholas, R. L. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4399–4400.
104. A. Hess, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **1999**, 885–S86.
105. E. Anson, C. S. Greaser, O. Egyed, G. R. Stephenson, *Spectrochim. Acta* **1997**, 53A, 1867–1877.
106. A. W. B. Johnston, Nodulation, in J. Kendrew, E. Lawrence (Eds.), *Encyclopaedia of Molecular Biology* **1994**, 741–745; A. W. B. Johnston, Biological Nitrogen Fixation, in J. L. Marx (Ed.), *A Revolution in Biotechnology* **1989**, 103–118; J. A. Downie, A. W. B. Johnston, *Plant Cell and Environment* **1988**, 11, 403–412; L. Rossen, E. O. Davis, A. W. B. Johnston, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 430–433; L. Rossen, A. W. B. Johnston, J. A. Downie, *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 9497–9508; J. A. Downie, C. D. Knight, A. W. B. Johnston, *Mol. Gen. Genet.* **1985**, 198, 225; J. A. Downie, S. A. Walker, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1999**, 2, 483–489; M. R. Bladergroen, H. P. Spaink, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, 1, 353–359; A. W. B. Johnston, E. O. Davis, A. Economou, J. E. Burn, J. A. Downie, The Complexity of the Regulation of Expression of Nodulation Genes of *Rhizobium*, in G. W. Lycett, D. Grierson (Eds.), *Genetic Engineering of Crop Plants* **1990**, pp. 249–258; J. A. Downie, C. Marie, A.-K. Schieu, J. L. Firmin, K. E. Wilson, A. E. Davies, T. M. Cubo, A. Mavridou, A. W. B. Johnston, A. Economou, Genetic and Biochemical Studies on the Modulation Genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, in H. Hennecke, D. P. S. Verma (Eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* 1990, pp. 134–141; A. W. B. Johnston, The Symbiosis between *Rhizobium* and Legumes, in D. A. Hopwood, K. F. Chater (Eds.), *Genetics of Bacterial Diversity* **1989**, pp. 393–414.
107. J. L. Firmin, K. E. Wilson, L. Rossen, A. W. B. Johnston, *Nature* **1986**, 324, 90.
108. H. R. M. Schlaman, R. J. H. Okker, B. J. J. Lugtenberg, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 5177–5182; C. A. Shearman, L. Rossan, A. W. B. Johnston, J. A. Downie, *EMBO J.* **1986**, 5, 647; K. Recourt, J. Schripsema, J. W. Kijne A. A. N. van Brussel, B. J. J. Lugtenberg, *Plant Mol. Biol.* **1991**, 16, 841–852; S. A. J. Zaat, C. A. Wiffelman, I. H. M. Mulders, A. A. N. van Brussel, B. J. J. Lugtenberg, *Plant Physiol.* **1988**, 86, 1298–1303.
109. L. Rossen, C. A. Shearman, A. W. B. Johnston, J. A. Downie, *EMBO J.* **1985**, 4, 3369.
110. H. P. Spaink, R. J. H. Okker, C. A. Wiffelman, E. Pees, B. J. J. Lugtenberg, *Plant Mol. Biol.* **1987**, 9, 27–39.
111. A. O. Ovtysna, G. J. Rademaker, E. Esser, J. Weinmann, B. G. Rolfe, I. A. Tirhonovich, B. J. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates, H. P. Spaink, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1999**, 12, 252–258; M. Hungria, A. W. B. Johnston, D. A. Phillips, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1992**, 5, 199–203; M. Schultze, B. Quillet-Sire, E. Kondorosi, H. Virelizier, J. N. Glushka, G. Endre, S. D. Gero, A. Kondorosi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 192; P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Prome, J. Dearie, *Nature* **1990**, 344, 781.
112. J. E. Burn, L. Rossen, A. W. B. Johnston, *Genes and Development* **1987**, 1, 456–464; A. A. Begum, S. Leibovitch, P. Migner, F. Zhang, *J. Exp. Bot.* **2001**, 52, 1537–1543.
113. J. A. Downie, C. D. Knight, A. W. B. Johnston, L. Rossen, *Mol. Gen. Genet.* **1985**, 198, 255–262; J. E. Burn, W. D. Hamilton, J. C. Wootton, A. W. B. Johnston, *Mol. Microbiol.* **1989**, 3, 1567–1577.
114. G.-F. Hong, J. E. Burn, A. W. B. Johnston, *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15, 9677–9691; E. O. Davis, A. W. B. Johnston, *Mol. Microbiol.* **1990**, 4, 933–941; C. A. Shearman, L. Rossen, A. W. B. Johnston, J. A. Downie, *EMBO J.* **1986**, 5, 647–652; J. McIver, M. A. Djordjevic, J. J. Weinman, G. L. Bender, B. G. Rolfe, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1989**, 2, 97–106; H. P. Spaink, R. J. H. Okker, C. A. Wiffelman, T. Tak,

- L. Goosen-deRoo, E. Dees, A. A. N. van Brussel, B. J. J. Lugtenberg*, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 4045–4053.
- 115.** *S. A. J. Zaat, J. Scripsema, C. A. Wijffelman, A. A. N. van Brussel, B. J. J. Lugtenberg*, *Plant. Mol. Biol.* **1989**, 13, 175–188.
- 116.** *J. H. Miller*, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, **1972**, 82, p. 6609.
- 117.** *C. S. Creaser, W. E. Hutchinson, G. R. Stephenson*, *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 1624–1628.
- 118.** *C. S. Creaser, W. E. Hutchinson, G. R. Stephenson*, *Analyst* **2001**, 126, 647–651.
- 119.** *C. S. Creaser, W. E. Hutchinson, G. R. Stephenson*, *Sens. Actuators B* **2002**, 82, 150–157.
- 120.** *K. Severin, R. Berge, W. Beck*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1634–1654.
- 121.** *R. Stephenson*, *Transition Metal Organometallic Methods for the Synthesis of Amino Acids*, in *Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Product Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 16, **1995**.

8 Металлоорганические комплексы в качестве трейсеров для неизотопного иммуноанализа

М. Зальман, А. Вессьер (M. Salmain, Anne Vessières, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Laboratoire de Chimie Organométallique (UMR CNRS 7576), France)

8.1. Введение

Идея использования ионов металлов в молекулах металлоорганических или координационных соединений в качестве меток для гаптенов или белков (антигенов) в иммуноанализах была впервые предложена Кэйсом в 1977 г. [1]. Кэйс назвал эту методику металлоорганическим иммуноанализом (MIA*) по аналогии с термином «радиоиммуноанализ» (RIA), введенным в практику в 1960 г. Ялоу и Берсоном [2] для описания иммуноанализа инсулина. Ялоу и Берсон впервые использовали радиоактивные трейсеры и антитела [3], за что они были удостоены Нобелевской премии по медицине в 1977 г. Использование радиоактивных трейсеров с β - (^{14}C , ^3H) или γ - (^{131}I) излучением существенно увеличило чувствительность иммуноанализа, и позволило количественно в низких (пикомолярных) концентрациях определять присутствующие в организме вещества, такие как циркулирующие гормоны (стероидные и белковые), лекарства и наркотики [4, 5]. Однако скоро стали очевидными ограничения в применении радиоактивных трейсеров. Прежде всего потому, что работа с радиоактивными субстанциями, в первую очередь для гамма-излучателей, и проблема утилизации радиоактивных отходов представляли риск для здоровья. Возрастающие ограничения по применению радиоизотопов и сокращение их использования привело к тому, что они стали занимать только малую часть рынка реагентов для иммуноанализа. В противоположность этим ограничениям различные неизотопные методики применяются все шире, начиная с конца 1960-х гг. [6]. В них используются ферменты [7–9], флуоресцентные [10–12] или люминесцентные соединения [13–15]. В основе этих методов лежит объединение трейсера и аналитической методики, достаточно чувствительной для количественного определения аналитов на пикомолярном уровне.

Пионерская работа Кэйса сыграла ключевую роль в поисках новых трейсеров, которые могли бы использоваться вместо радиоактивных меток. Когда эта работа началась в конце 1970-х гг., уже 20 лет была известна структура ферроцена [16–17], стали доступны и другие стабильные металлоорганические

* Список сокращений, используемых в данной главе, приведен в конце главы.

комплексы. Кэйс и др. использовали преимущества металл-углеродной π -связи нового типа (открытой на примере ферроцена) для синтеза новых молекул, которые могли бы стать кандидатами для использования в качестве неизотопных трейсеров для детектирования при очень низких концентрациях. Цель этой главы состоит в обобщении последних достижений применения металлоорганических комплексов в неизотопном иммуноанализе. Этот анализ продолжает развиваться, расширяться для проведения мониторинга окружающей среды, для поиска новых методов детектирования, подходящих для миниатюризации, и новых трейсеров, основанных на металлоорганических каркасах (дендримерах) [18, 19].

Так как иммуноанализ может быть не основным предметом исследований для читателей, интерес которых лежит в области металлоорганической химии, мы начнем эту главу с краткого обзора принципов иммуноанализа, начиная с описания синтеза металлоорганических трейсеров, и различных методов детектирования, которые инициируют создание новых методов иммуноанализа.

8.2. Принцип иммуноанализа

Иммуноанализ – непрямой метод определения концентрации аналита в образце (крови, плазме, моче, питьевой воде и т. д.) на уровне нескольких микрограммов в литре. Метод основан на специфическом взаимодействии между тремя компонентами (рис. 8.1): аналита (антигена), который анализируется, специфическими (поликлональными или моноклональными) антителами на аналит и трейсером, представляющим собой аналит (антиген) или антитело, модифицированные путем введения метки. Такая метка может быть обнаружена на уровне наномолей (или еще лучше пикомолей) аналитической методикой, основанной на радиоактивности, ферментативном детектировании, электрохимическом детектировании, а также с помощью атомной абсорбционной спектроскопии (ААС), ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием (фурье-ИКС) или поляризации флуоресценции (ПФ).

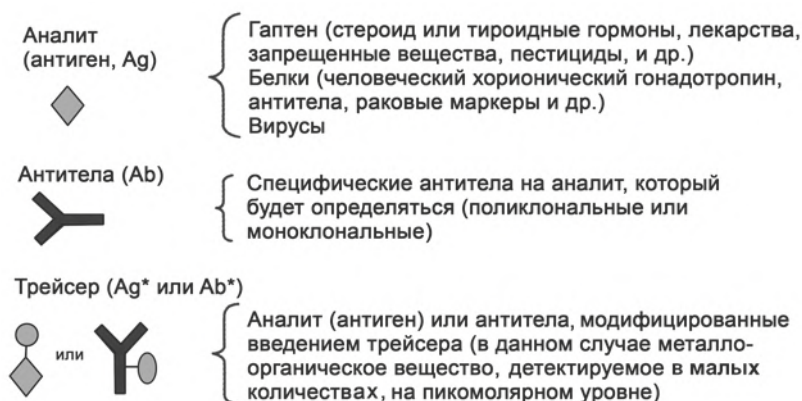


Рис. 8.1. Компоненты иммуноанализа

Вещества, которые надо анализировать, можно подразделить на три категории: (1) гаптены, то есть молекулы с молекулярной массой менее 1 кДа – к ним относятся стероиды, лекарства, запрещенные вещества, пестициды; (2) белки – такие как раковые маркеры, антитела, хорионический гонадотропин (HCG) человека; (3) вирусы.

Методы иммуноанализа можно разделить на два основных типа: конкурентный и неконкурентный. Они схематично приведены на рис. 8.2.

Для конкурентного иммуноанализа фиксированное количество трейсера инкубируется в присутствии фиксированного (недостаточного) количества антител и различных количеств аналита. После инкубации связанная и свободная фракции трейсера разделяются. Количественное определение одной или другой фракции позволяет рассчитать количество присутствующего аналита. Эта методика прежде всего подходит для анализа гаптенных. Такой метод анализа, требующий стадии разделения, известен как гетерогенный анализ. В некоторых редких случаях, свободная и связанная фракции трейсера дают различные сигналы, что устраняет необходимость стадии разделения. Такой метод известен как гомогенный анализ.

В случае неконкурентного иммуноанализа избыток специфических антител на аналит связывают с твердой фазой, такой как стенки лунок микротитровального планшета, затем добавляется раствор, содержащий аналит. После инкубации и промывки к раствору добавляют вторичные меченные антитела. После второй инкубации фаза со свободными антителами удаляется, и количественно детектируется связанная фракция. Ее количество прямо пропорционально присутствующему аналиту. Эта методика имеет существенные преимущества, если доступны моноклональные антитела, так как это делает возможным получить неограниченное количество антител с хорошо определенными характеристиками [20]. Такой второй метод анализа также известен как «сэндвич-иммуноанализ» – наиболее подходит для анализа белков, чем для гаптенных. Наиболее распространенный метод

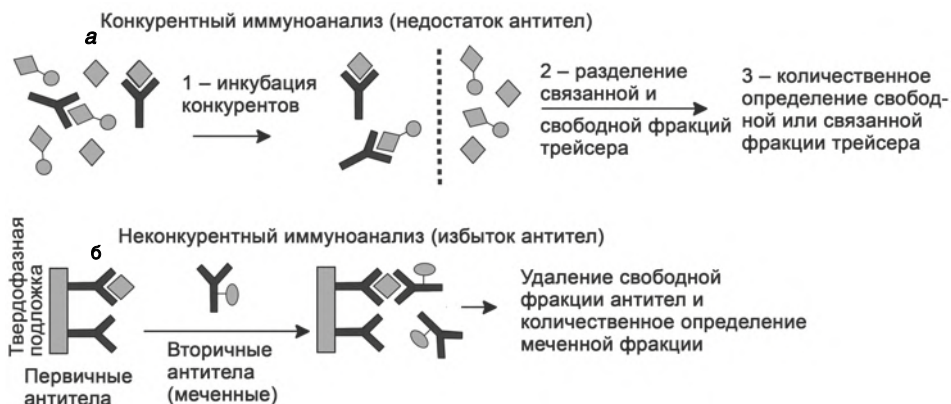


Рис. 8.2. Два метода иммуноанализа

ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) как раз и относится к этим методам [21–24].

Во всех случаях разработка нового неизотопного иммуноанализа включает следующие стадии: (1) получение специфических поликлональных или моноклональных антител для вещества, которое надо анализировать, (2) приготовление трейсера, который может быть или аналитом, или антителами, модифицированными меткой, детектируемой при очень низких концентрациях, (3) выбор метода разделения для свободной и связанной фракции трейсера, за исключением частных случаев гомогенного анализа (подробнее рассмотренного ниже), (4) выбор метода для количественного определения трейсера, (5) выполнение методики иммуноанализа для количественного определения аналита, включая построение градуированного графика.

Эта глава касается только методов неизотопного иммуноанализа с использованием металлоорганических трейсеров, т. е. трейсеров, которые содержат истинную связь металл–углерод. Методы неизотопного иммуноанализа с использованием координационных соединений, в частности хелатов, также разрабатываются, но их рассмотрение выходит за рамки этой главы [10, 11]. Создание нового метода иммуноанализа – это междисциплинарное исследование, которое требует вклада как металлоорганической химии, так и аналитической химии. Для этого необходимо решить несколько задач, что возможно и объясняет тот факт, что новые методы анализа создаются относительно редко. Однако такое междисциплинарное исследование и определяет высокий интерес к этим разработкам.

8.3. Получение специфических антител

Первый шаг при разработке нового метода иммуноанализа – это получение специфических антител. Так как иммуноанализы с использованием металлоорганических трейсеров наиболее часто применяют для анализа аналитов типа гаптен, т. е. молекул с низкой молекулярной массой (меньше 1 кДа), которые сами по себе не могут индуцировать производство специфических антител, то прежде всего должен быть приготовлен иммуноген путем «пришивки» гаптена к белку-носителю, такому как бычий сывороточный альбумин (BSA). Инъекция такого иммуногена животному (кролику, овце или лошади) ежемесячно в течение нескольких месяцев стимулирует производство поликлональных антител, специфических к субстанции, которая будет анализироваться, которые затем становятся доступными в сыворотке крови животного (сыворотка, содержащая антитела, называется антисывороткой). Различные методики получения иммуногенов описаны в литературе [25]. Большинство из них базируются на следующем принципе: аналит модифицируют путем добавления к нему функциональных групп (таких, как карбоксильная группа), которые затем пришиваются через амидную связь к лизиновым остаткам белка-носителя. Для того чтобы получить наилучший иммунный ответ против гаптена, последний часто отделяют от белка-носителя цепочкой различной длины. Несколько молекул гаптена присоединяют к белку-носителю,

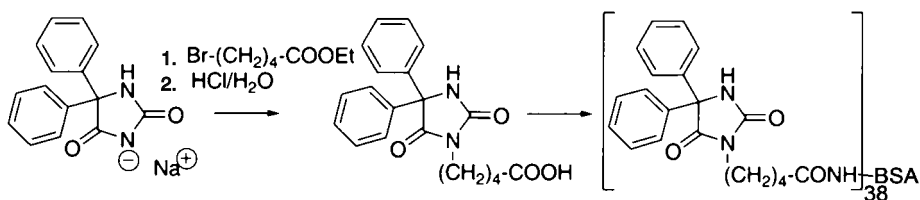


Схема 8.1. Приготовление иммуногена **2** для дифенилгидантоина

однако число остатков в диапазоне 8–25 обычно считается оптимальным для наилучших результатов, если в качестве белка-носителя используется BSA. Пример приготовления иммуногена показан на схеме 8.1. Этот метод используется для получения антидифенилгидантоин (антидифенин)-специфических антител [26].

Для иммуноанализа гаптенов, которым в основном уделено внимание в этой главе, было показано, что моноклональные антитела не имеют преимуществ, и поэтому до сих пор довольно часто используются поликлональные антитела.

8.4. Синтез металлоорганических трейсеров

В подавляющем большинстве примеров металлоорганических иммуноанализов металлоорганические трейсеры используют молекулы, полученные из аналита, который будет анализироваться (структуры приведены в табл. 8.1) и к которому присоединен металлоорганический фрагмент. Аналит обычно является гаптенем (ср. с определением, приведенным выше).

Стратегия приготовления трейсера должна принимать во внимание ту роль, которую он будет играть в конкурентном иммуноанализе, как показано на схеме 8.2, которая наиболее часто используется в формате MIA.

В этом случае происходит конкуренция между аналитом и трейсером за связывание с ограниченным количеством антител. Это означает, что трейсер должен распознаваться антителами, но и аналит также должен быть способен вытеснять его из связи антитело–трейсер. Поэтому аффинность трейсера к антителам должна быть не выше, чем для аналита для тех же антител.

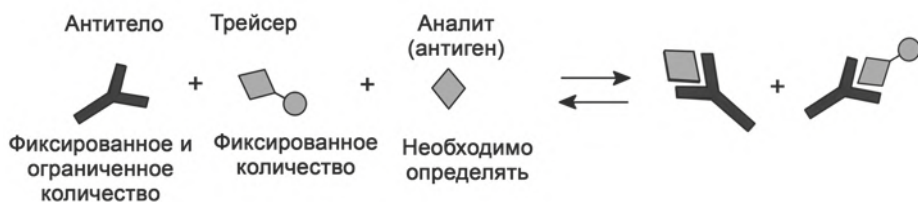


Схема 8.2. Конкурентный иммуноанализ

Таблица 8.1. (продолжение)

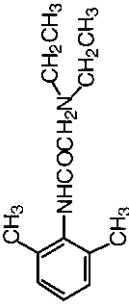
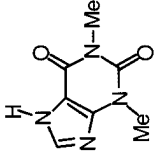
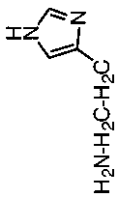
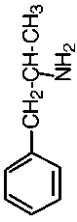
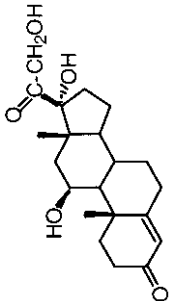
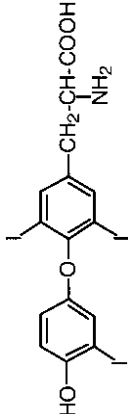
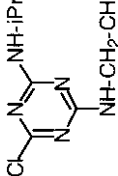
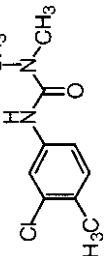
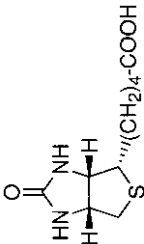
Аналит	Трейсер, МО-фрагмент	Аналитический метод	Литература
<i>Лекарственные препараты (различные)</i>			
Лидокаин (сердечная аритмия)		Электрохимия (Циклическая вольтамперометрия)	27
Теофиллин (стимуляция сердечной деятельности)		Электрохимия (Циклическая вольтамперометрия)	28
Гистамин (аллергические реакции)		Электрохимия	30
<i>Наркотики</i>			
Амфетамин		Электрохимия (КВВ)	48

Таблица 8.1. (окончание)

Аналит	Трейсер, МО-фрагмент	Аналитический метод	Литература
Гормоны			
Гидрокортизон	 27; [Co ₂ CO ₆] (Схема 8.13)	Фурье-ИКС	70
3,3',5-L-Триодтиронин (Т ₃)	 8; Fc (Схема 8.5)	Электрохимия (Амперометрия)	29
Пестициды			
Атразин (ATZ)	 30; [Co ₂ CO ₆] (Схема 8.14)	Фурье-ИКС	44
Хлортолурон	 19; Cu (Схема 8.10)	Фурье-ИКС	39
Разное			
Биотин	 21; Cu (Схема 8.11)	AAC	65

Сокращения: AAC – атомная абсорбционная спектроскопия; Фурье-ИКС – ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием; КВВ – квадратно-волновая вольтамперометрия.

По этой причине металлоорганическая часть обычно «пришивается» к тому же самому участку, который использовался для приготовления иммуногена. Для оптимальной чувствительности анализа требуется «тонкая настройка», что достигается путем варьирования природы и длины углеродной цепи. Наконец, трейсер должен быть стабильным на воздухе и в биологической среде, он не должен требовать сверхдопустимых предосторожностей при работе, таких как дегазация растворителей, и должен сохранять физические и химические свойства. Принимая во внимание все вышеперечисленное, только относительно небольшое число металлоорганических соединений может удовлетворять этим требованиям. Эти соединения будут рассмотрены по типу комплексов.

8.4.1. Получение трейсеров, меченных ферроценом

Можно присоединить остаток ферроцена к гаптену или антителям путем образования амидной связи между ферроценкарбоновой кислотой или одним из его производных и аминогруппой (или уже присутствующей, или присоединенной к гаптену) или аминогруппой лизинового остатка антител.

8.4.1.1. Получение трейсеров для лидокаина

Ферроценильный трейсер **4**, полученный из лидокаина, лекарства используемого при лечении сердечной аритмии, был получен путем ацилирования *n*-аминолидокаина хлорангидридом диметилферроценкарбоновой кислоты **3** (схема 8.3) [27]. Этот трейсер был использован для разработки одного из первых вариантов металлоорганического иммуноанализа [27].

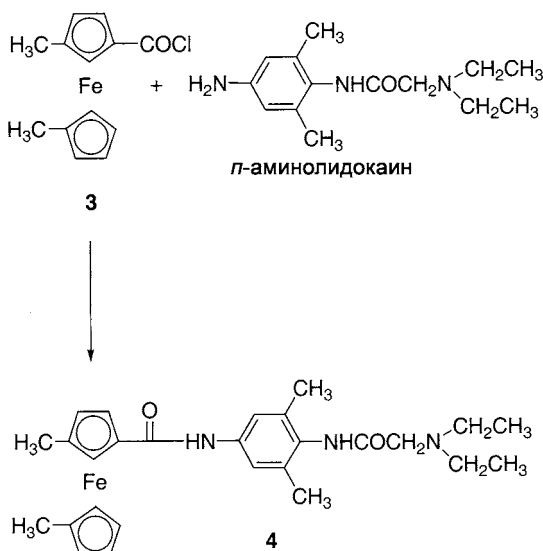


Схема 8.3. Синтез ферроценильного трейсера лидокаина (**4**)

8.4.1.2. Получение трейсера для теофиллина

Теофиллин используется для стимуляции сердечной деятельности. Приготовление 8-(ферроценилметил)теофиллина – трейсера **6** было выполнено путем конденсации 5,6-амино-1,3-диметилаурацила с ферроценилукусной кислотой **5** при кипячении в N,N'-диметиланилине и последующей циклизации в среде основания (схема 8.4) [28].

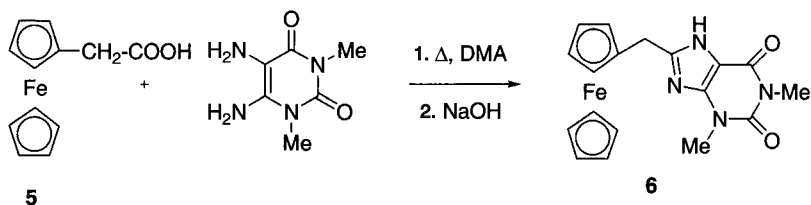


Схема 8.4. Синтез ферроценильного трейсера теофиллина (**6**)

8.4.1.3. Получение трейсера для триодтиронина

Синтез трейсера **8**, полученного из триодтиронина (природного гормона), был выполнен путем прямого пептидного синтеза с участием аминогруппы триодтиронина и ферроценкарбоновой кислоты **7**, предварительно активированной с помощью водорастворимого карбодиимида EDAC (схема 8.5) [29].

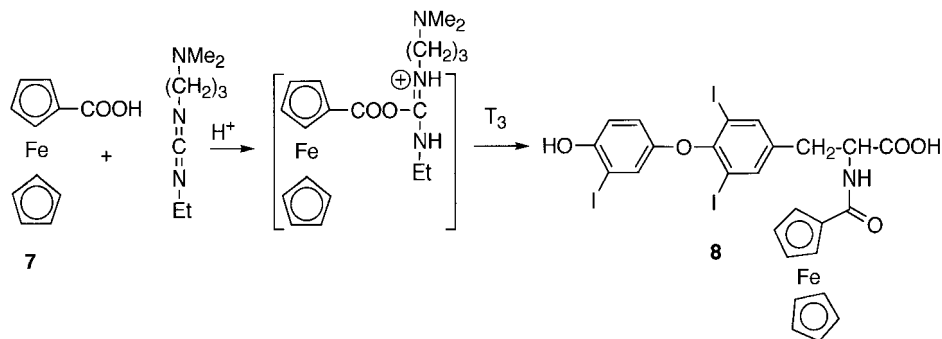


Схема 8.5. Синтез ферроценильного трейсера триодтиронина (**8**)

8.4.1.4. Введение метки в антитела (IgG)

Два вида моноклональных антител (IgG) были помечены ферроценом. Первые – антитела, специфичные к гистамину [30], участвующему в аллергических реакциях, а вторые – антитела, специфичные к гормону HCG (хорионический гонадотропин человека) [31], гликопротеину биосинтезируемому тканью плаценты во время беременности. Процедура введения метки,

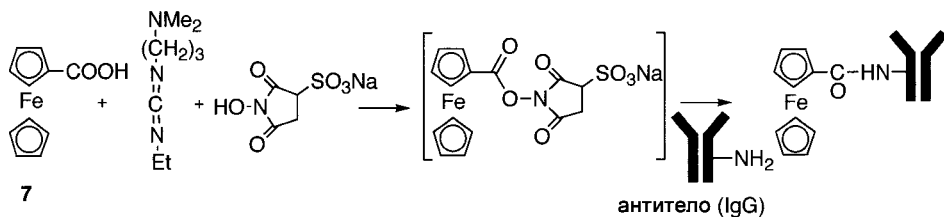


Схема 8.6. Синтез ферроцен-меченных антител ($n = 4-11$)

включающая использование лизиновых остатков антител, очень похожа на ту, которая использовалась для трийодтиронина, за исключением того факта, что активация ферроценкарбоновой кислоты **7** достигается под действием водорастворимого EDAC и NHSS, что приводит к образованию интермедиата – сульфосукцинимидилового эфира (схема 8.6). Число ферроценовых остатков, присоединенных к антителам, варьировалось от 4 до 11.

8.4.2. Получение трейсера для дифенилгидантоина, меченного циклопентадиенил(дикарбонил)железом (Fp)

Металлоорганический трейсер для дифенилгидантоина (DPH) **10**, включающий метку Fp, был получен в одну стадию (схема 8.7) [32] путем использования возможности легкого замещения (под действием света) иода в лиганде иодидциклопентадиенил(дикарбонил)железа(II) (соединение **9**) на имидато(–)-лиганд, генерируемый *in situ* с использованием диизопропиламина [33].

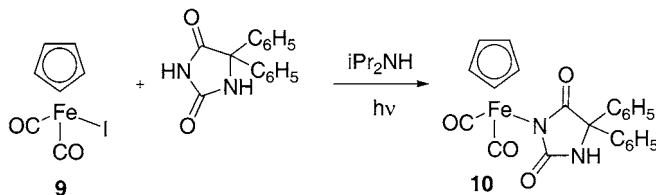


Схема 8.7. Синтез Fp-дифенилгидантоина (**10**)

8.4.3. Синтез трейсеров, меченных цимантреном (циклопентадиенил(трикарбонил)марганцем)

8.4.3.1. Получение трейсеров для нортриптилина и фенобарбитала

Нортриптилин – лекарство класса трициклических антидепрессантов, был прямо помечен в одну стадию путем ацилирования его вторичной аминогруппы под действием ацилхлорида цимантрена (схема 8.8) [34].

Введение метки в фенобарбитал (барбитурат, используемый для лечения конвульсий) было проведено путем ацилирования *n*-аминофенобарбитала **15** с помощью ацилхлорида цимантрена **11** (схема 8.8) [34]. Синтез вещества **15**

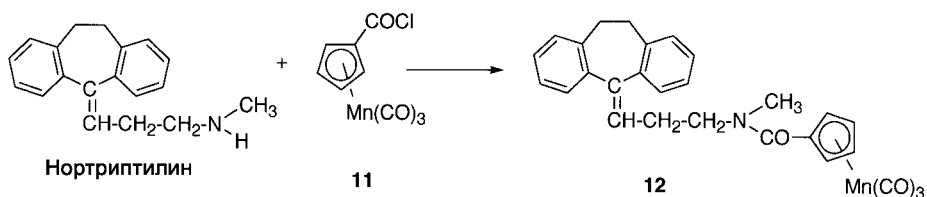


Схема 8.8. Синтез цимантренильного трейсера (12) для нортриптилина

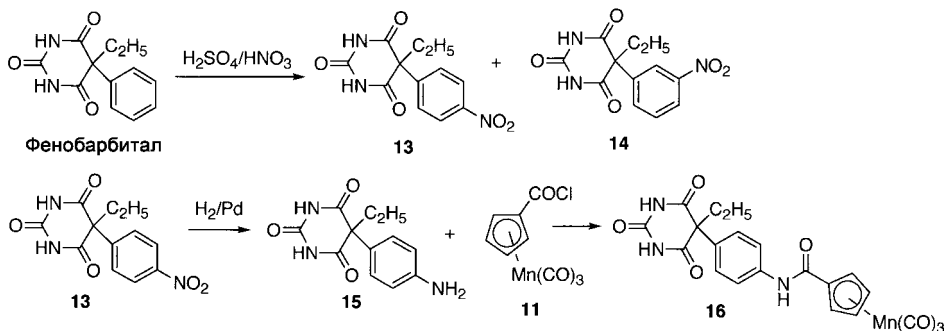


Схема 8.9. Синтез цимантренильного трейсера (16) для фенобарбитала

был осуществлен путем нитрования бензольного кольца фенобарбитала [35] с образованием смеси *м*- и *п*-нитрофенобарбитала **13** и **14** и последующего гидрирования *п*-нитрофенобарбитала в присутствии палладия на угле [36].

8.4.3.2 Получение трейсера для хлортолурана

Хлортолуран – гербицид, широко используемый при выращивании озимого ячменя для контроля четырех типов дикого овса и лисохвоста полевого [37]. Исходным компонентом для синтеза трейсера для хлортолурана, содержащего цимантреновый фрагмент, является аминопроизводное 3-хлор-4-метиланилида аминокaproновой кислоты **17**. Это соединение синтезировали пептидным методом при сшивании 3-хлор-4-метиланилина и 6-аминокaproновой кислоты, превращенной *in situ* в хлорангидрид, реакцией с тионилхлоридом в среде диметилформамида. Полученная таким образом аммонийная соль в дальнейшем депротонируется при добавлении диизопропилэтиламина. Затем β-цимантроноилпропионовая кислота, полученная методом, описанным Дабардом и Ле Плуженнеком [38], превращается в сукцинимидильный эфир под действием тетрафторобората TSTU и диизопропилэтиламина. Сочетание двух полученных веществ дает трейсер для хлорсульфурона **19** (схема 8.10) [39].

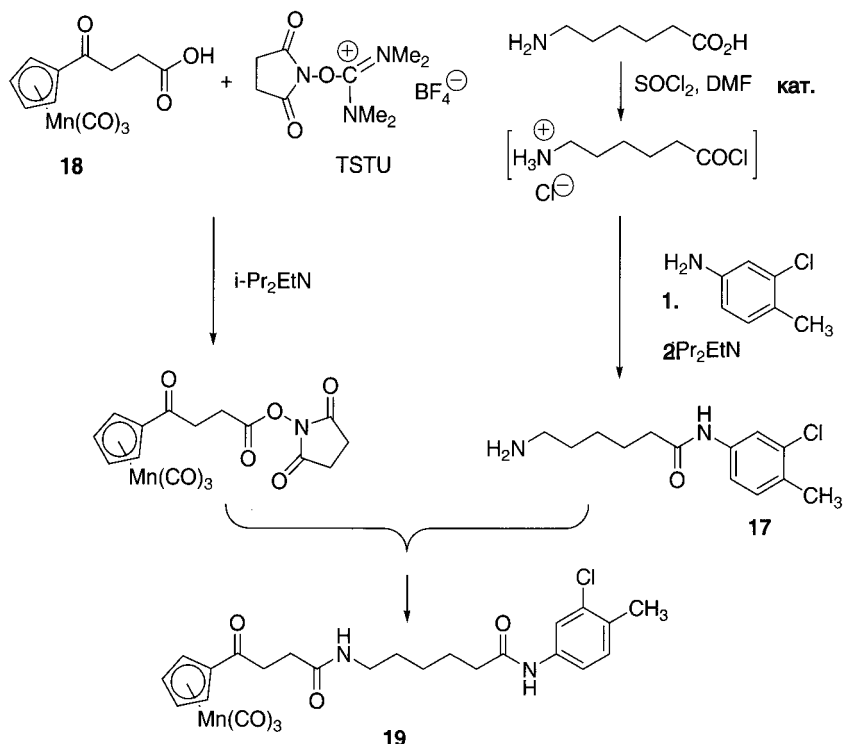


Схема 8.10. Синтез цимантренильного производного хлортолурина (19)

8.4.3.3. Получение трейсера для биотина

Цимантренил-биотиновый трейсер **21** синтезирован взаимодействием цимантренилкарбоксальдегида **20**, полученного по методу Леблана и др. [40], с гидразидом биотина (схема 8.11) [41].

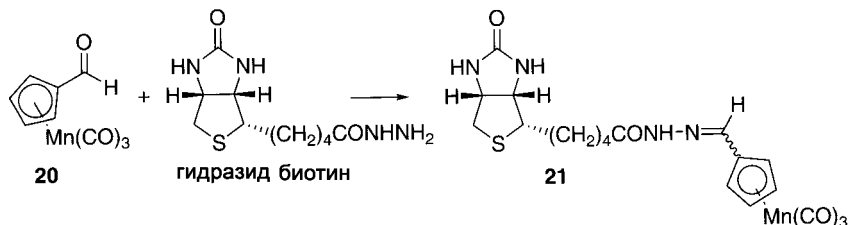


Схема 8.11. Синтез цимантренильного трейсера для биотина

8.4.4. Синтез дифенилгидантоина, связанного с остатком бенхротрена (бензол(трикарбонил)хрома)

Дифенилгидантоин – это лекарство, используемое при лечении эпилепсии. Трейсер **24** для этого вещества был синтезирован этерификацией

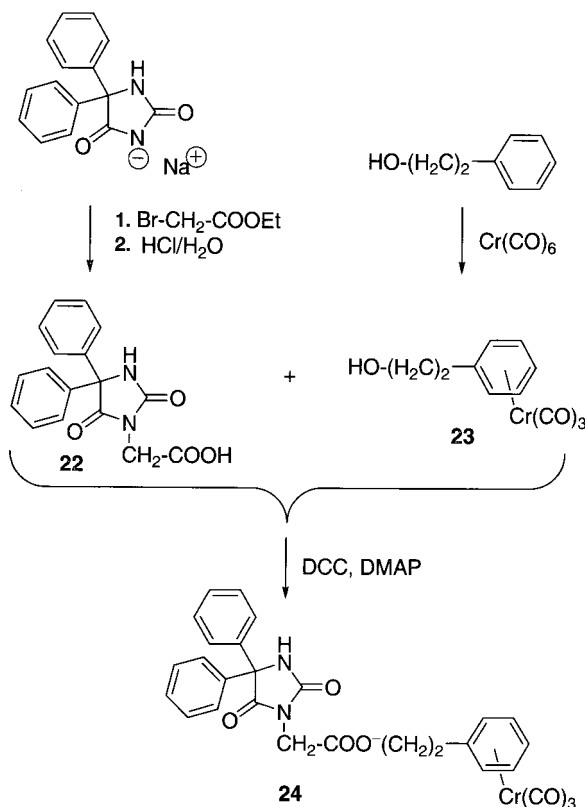


Схема 8.12. Синтез бенхротренильного трейсера для дифенилгидатоина (**24**)

2-фенилэтанол(трикарбонил)хрома **23** дифенилгидантоин-3-уксусной кислотой **22** (схема 8.12) [26], которая, в свою очередь, была получена в две стадии: алкилированием натриевой соли дифенилгидантоина этиловым эфиром бромуксусной кислоты и последующим кислотным гидролизом этилового эфира.

8.4.5. Синтез трейсеров, содержащих фрагмент алкин(гексакарбонил)дикоальта

8.4.5.1 Получение трейсеров для гидрокортизона и атразина

Нижеприведенный общий принцип мечения этих молекул меткой алкин(гексакарбонил)дикоальта заключается во ведении метки путем пептидного синтеза алкина, а именно: присоединением карбоксильного производного аналита с пропаргиламином с последующим комплексованием алкина с фрагментом гексакарбонилдикоальта.

Для гидрокортизона (природного стероидного гормона) кетогруппа в положении 3 была выбрана в качестве сайта присоединения металлоорганического

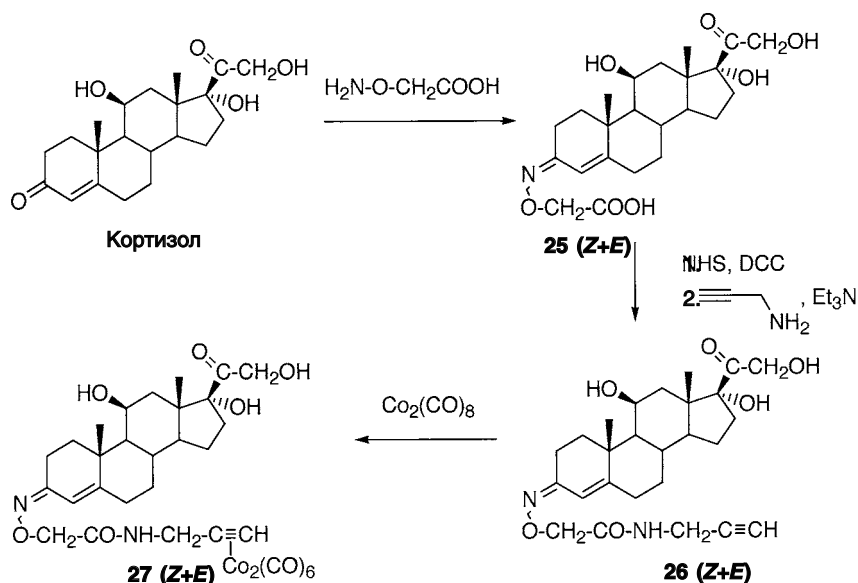


Схема 8.13. Синтез алкин(гексакарбонил)дикобальтового трейсера для гидрокортизона (**27**)

фрагмента, так как этот сайт также использовался для получения иммуногена, применявшегося в этом анализе для получения антител. Стратегия синтеза приведена на схеме 8.13.

Оксим **25**, содержащий карбоксильную группу, был синтезирован региоселективно из гидрокортизона и получен в виде смеси (Z+E)-изомеров. Алкин был соединен пептидным синтезом с пропаргиламином, давая соединение **26**. Затем по тройной связи соединения **26** при добавлении $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ образовался комплекс **27** в виде смеси двух разделяемых изомеров [42].

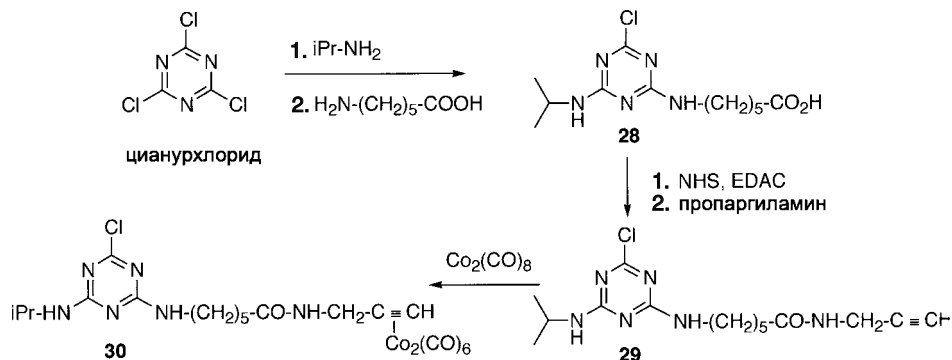


Схема 8.14. Синтез алкин(гексакарбонил)дикобальтового трейсера для атразина (**30**)

Для атразина (гербицида семейства триазиновых соединений) синтез карбоксильного производного осуществляли исходя из цианурхлорида двойным замещением атомов хлора под действием изопропиламина и затем 6-аминокапроновой кислоты по методу, описанному в [43]. Это производное затем связывали с пропаргиламином путем пептидного синтеза в присутствии NHS и EDAC, после чего происходило комплексобразование по тройной связи с $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ с образованием трейсера для атразина **30** (схема 8.14) [44].

8.4.5.2. Получение трейсера для карбамазепина

Мечение карбамазепина (антиэпилептик) проводили связыванием алкин(гексакарбонил)дикообальта с аминопроизводным анализа **31** методом пептидного синтеза с (N-сукцинимидил-4-пентиноат)(гексакарбонил)дикообальта **32** (схема 8.15) [45]. Аминопроизводное карбамазепина **31** было получено в одну стадию из иминостильбена. Соединение **32** было синтезировано в две стадии путем этерификации 4-пентиновой кислоты N-гидроксисукцинимидом (NHS) в присутствии DCC с последующим образованием комплекса фрагментом $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ по тройной связи, что и приводит к трейсеру **33** [46].

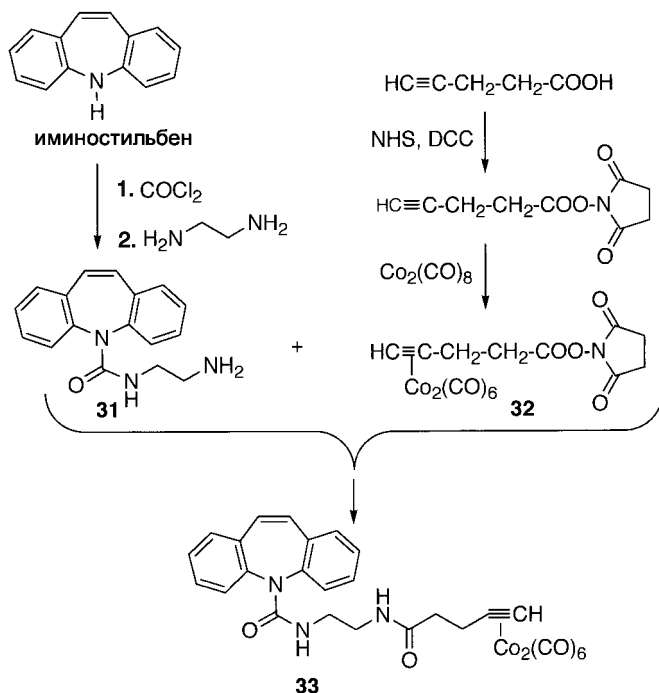


Схема 8.15. Синтез алкин(гексакарбонил)дикообальтового трейсера для карбамазепина (**33**)

8.4.6. Синтез катионных трейсеров

8.4.6.1. Трейсеры, меченные остатком кобальтоцена

Три трейсера, содержащие кобальтоцениевые фрагменты, описаны и применялись для МИА. Это трейсеры, для амфетамина (психостимулятора), дифенилгидантоина и фенобарбитала, терапевтические свойства которых упоминались выше. Общая процедура заключается в использовании пептидного синтеза с участием аминогруппы, которая уже имела в анализе или вводилась в него, с хлорангидридом – гексафторфосфатом хлорокарбонилкобальтоцена **34**, приготовленного в соответствии с методом Шитса [47] (схема 8.16).

В случае амфетамина введение метки осуществляли непосредственно по первичной аминогруппе [48]. Мечение дифенилгидантоина выполнялось путем связывания по аминогруппе 3-(2-аминоэтил)-5,5-дифенилгидантоина **36** [49], который был получен по методу, описанному О'Нилом [50]. В случае фенобарбитала мечение осуществлялось путем связывания *м*-аминофенобарбитала **38** с гексафторфосфатом кобальтоценийкарбоновой кислоты **39** в присутствии DCC [51]. Приготовление *м*-аминофенобарбитала **38** было проведено путем электрохимического восстановления нитропроизводного **14** [51], которое синтезировали, как показано на схеме 8.9.

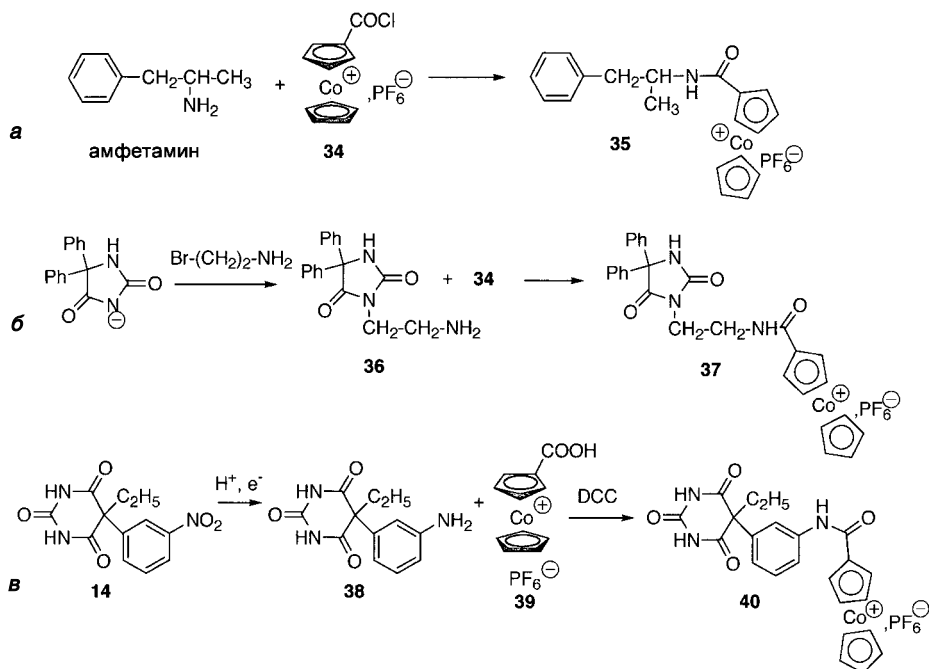


Схема 8.16. Синтез кобальтоцениевых трейсеров для амфетамина (**35**, а) дифенилгидантоина (**37**, б) и фенобарбитала (**40**, в)

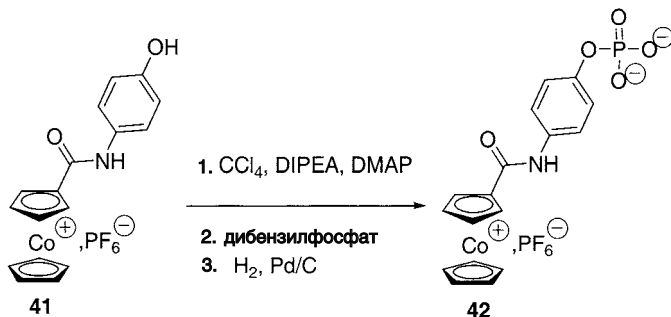


Схема 8.17. Синтез кобальтоцениевого трейсера для субстрата щелочной фосфатазы

Кобальтоцениевое производное, работающее как субстрат для фермента щелочной фосфатазы (AP) и известное как гексафторфосфат [(4-гидроксифенил)-амино]карбонилкобальтоцения **42**, было получено исходя из гексафторфосфата [(4-гидроксифенил)амино]карбонилкобальтоцения **41** по методике, описанной Сильвербергом др. [52]. Соединение **41** ранее было получено Биром др. [53] и показано на схеме 8.17 [54].

8.4.6.2. Катионные трейсеры, содержащие ферроценовый фрагмент

Катионный трейсер для дифенилгидантоина, включающий ферроценовый фрагмент, был синтезирован в два этапа, начиная с натриевой соли дифенилгидантоина. Вначале в положение 3 был введен 3-бромпропильный радикал реакцией нуклеофильного замещения с 1,3-дибромпропаном. N,N-Диметиламинометилферроцен **44** затем алкилировали бромпроизводным дифенилгидантоина, что дало трейсер **45** в виде его четвертичной аммонийной соли (схема 8.18) [55].

Для повышения растворимости в воде трейсера для теофиллина и для понижения уровня неспецифических взаимодействий между трейсером и антителом провели аминотилирование замещенного цикlopentadiенильного лиганда реакцией Манниха в присутствии диметиламинометана, после чего третичный амин был переведен в соль реакцией с метилиодидом (схема 8.19) [28].

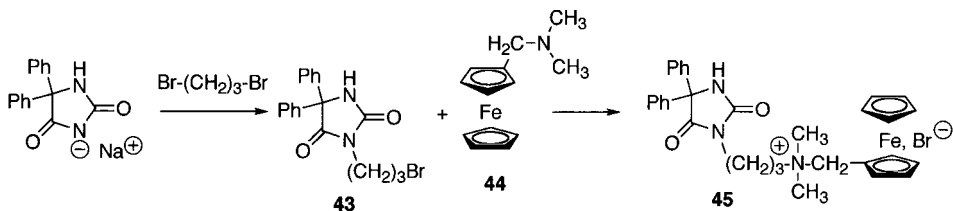


Схема 8.18. Синтез катионного трейсера для дифенилгидантоина (**45**)

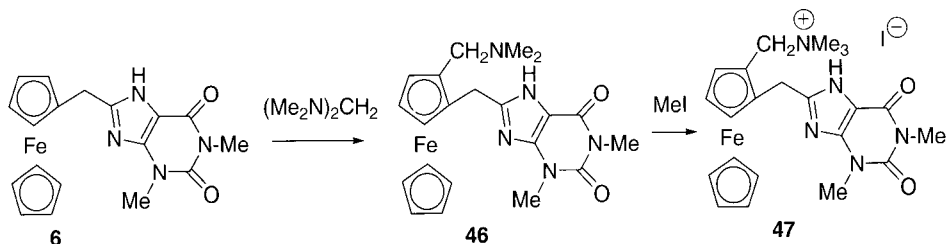


Схема 8.19. Синтез катионного трейсера для теофиллина (**47**)

8.4.7. Синтез трейсеров, содержащих фрагмент трикарбонилрения

Мечение сывороточного альбумина человека (HSA) проводили путем ацилирования его лизиновых остатков под действием N-сукцимидильного эфира комплекса $[\text{Re}(\text{bcp})(\text{CO})_3(4\text{-COONPy})]\text{ClO}_4^-$, где bcp – 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролин, а 4-COONPy – изоникотиновая кислота. Такой ренийсодержащий эфир **Re-L 48**, был синтезирован в три стадии исходя из bcp , как показано на схеме 8.20. Затем этот эфир «пришивали» к HSA и получали комплекс $(\text{Re-L})_n\text{-HSA}$ [56]. В среднем на молекулу HSA приходилось два фрагмента $\text{Re}(\text{CO})_3$.

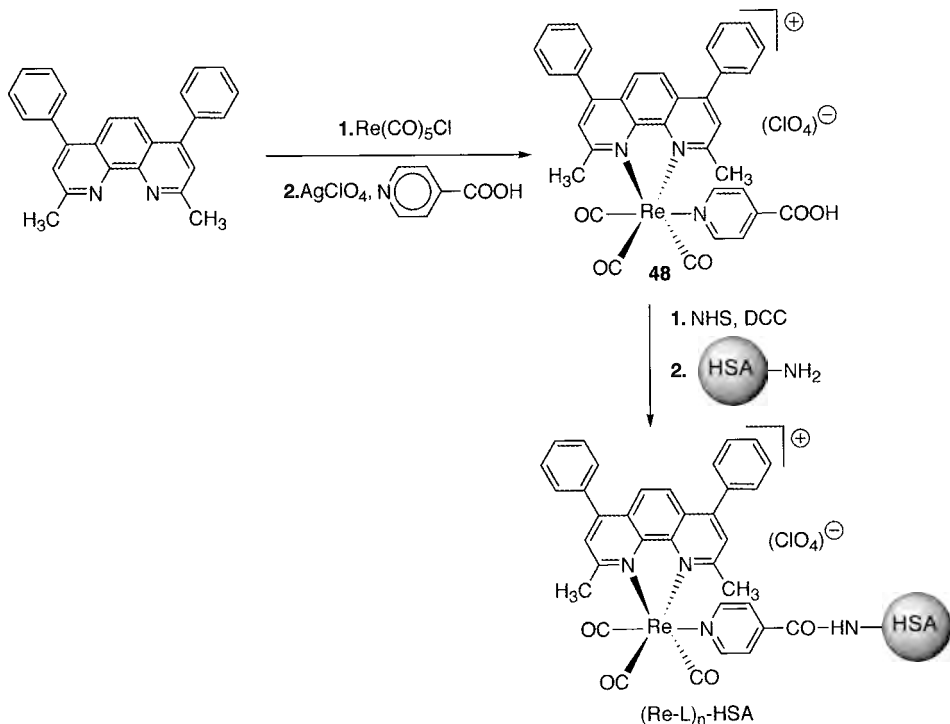


Схема 8.20. Синтез сывороточного альбумина человека, меченного фрагментом трикарбонилрения (HSA – сывороточный альбумин человека)

8.5. Примеры моно- и мультиметаллоиммуноанализов (MIA)

Как только получены специфические антитела на предполагаемый аналит и трейсер, должен быть выбран аналитический метод для количественного определения трейсера. Следующий шаг в разработке метода иммуноанализа состоит в определении кривой титрования антител, которую получают инкубацией фиксированного количества трейсера с различными разведениями антител. Из этих экспериментов определяют титр антител (обратная величина разведения антител, которая дает 50% связывания трейсера), что является показателем количества специфических антител для аналита, содержащихся в антисыворотке. В завершении разработки метода должен быть получен градуировочный график, по которому количественно определяют аналит. В случае конкурентного иммуноанализа, такой график получают при инкубации фиксированного количества антител (эквивалентного титру) в присутствии фиксированного количества трейсера (способного связать ~50% антител) и различного количества анализируемого аналита.

Примечание. Большинство описанных здесь металлоорганических комплексов нерастворимы в воде и в используемых для иммуноанализов буферных растворах, но их растворимость в этих средах может быть легко достигнута путем добавления небольшого количества спирта (примерно 5%).

8.5.1. Металлоиммуноанализ с использованием атомно-абсорбционной спектроскопии

Кэйс ввел термин «металлоорганический иммуноанализ» и получил серию металлоорганических маркеров (металлогаптенов), потенциально пригодных для использования в иммуноанализе. Среди них были производные стероидов (эстрадиол, эстриол), наркотиков (амфетамин и кокаин) или лекарств (морфин и барбитураты), которые были помечены ферроценом, кобальтоценом и цимантреном [57–59]. Затем он применил использование колонки с сефарозой 4В для разделения свободной и связанной фракций трейсера и количественного определения трейсера методом атомно-абсорбционной спектроскопии [58].

Фактически П. Бросье был первым, кто успешно объединил все стадии металлоорганического иммуноанализа этого типа (MIA), разработав иммуноанализ для нортриптилина и фенобарбитала [60–62]. Это были негомогенные конкурентные иммуноанализы с использованием поликлональных антител

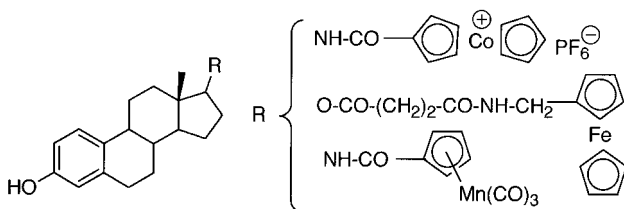


Рис. 8.3. Первые примеры металлогаптенов

[63]. В качестве металлогаптенов использовались циматренильные комплексы нортриптилина **12** и фенобарбитала **16**, а разделение свободной и связанной фракций достигалось путем селективной экстракции свободной фракции с помощью органического растворителя [64] и количественного определения металла в трейсере (в данном случае марганца) методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) с использованием эффекта Зеемана.

Первые метки на основе ферроцена были быстро неудачны и не использовались в дальнейшем, так как следовое количество ионов железа было найдено в используемых буферных растворах, что привело к неправильным результатам количественного определения методом ААС. Следующей попыткой были маркеры на основе цимантрена, поскольку марганец содержится в природных средах в значительно меньших количествах. На рис. 8.4 приведен МИА для нортриптилина [62]. Кривые титрования антисыворотки были получены в присутствии трейсера **12** (12,5–50,0 нг на пробирку) (рис. 8.4, а).

Возможность проведения анализа была продемонстрирована градуировочным графиком, показанном на рис. 8.4, б. Диапазон определяемых содержаний составляет от 10 до 240 нг/мл нортриптилина. Это вполне сопоставимо с его концентрацией в крови, которая находится на уровне мкг/мл (табл. 8.2). Для повышения чувствительности анализа было получено усиление сигнала с применением системы биотин/стрептавидин. Принцип такого 4-стадийного анализа приведен на рис. 8.5. Это твердофазный непрямой конкурентный иммуноанализ бычьего сывороточного альбумина (BSA) на твердой фазе. На первой стадии осуществляется конкуренция за связывание фиксированного количества кроличьих антител против BSA с анализируемым BSA и BSA, нанесенным на твердую фазу. На второй стадии добавляются биотинилированные вторичные антитела (против кроличьих IgG), которые связываются с первичными антителами. На третьей стадии добавляется стрептавидин, который связывается с биотинилированными антителами, а на последней четвертой

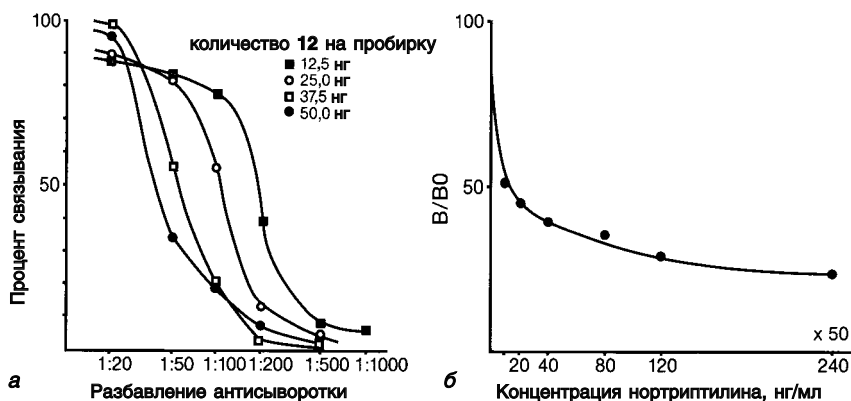


Рис. 8.4. Металлоорганический иммуноанализ нортриптилина с использованием в качестве трейсера соединения **12** и атомно-абсорбционной спектроскопии как метода детектирования. а – Кривые титрования антител; б – градуировочный график [62]

Таблица 8.2. Диапазон определяемых содержаний в СМИА

Аналит	Трейсер	Терапевтический диапазон	(B/B ₀) ₅₀	Литература
Карбамазенин	33 [Co ₂ (CO) ₆]-карбамазелин	7–42 мкМ	0,2 мкМ	45
Фенобарбитал	16 [Cu]-фенобарбитал	43–172 мкМ	0,4 мкМ	71
Дифенил-гидантрон	10 [Fp]-DPH	10–200 мкМ	0,046 мкМ	32
	24 [Cr(CO) ₃]-DPH		0,06 мкМ	26
Кортизол	27 [Co ₂ (CO) ₆]-кортизол	0,14–0,69 мкМ	0,1 мкМ	70
Хлортолурун	19 [Mn(CO) ₃]-хлортолурун	MAC ^a : мкг/л (5 нМ)	100 нМ	39
Агразин	30 [Co ₂ (CO) ₆]-агразин	MAC ^a : мкг/л (5 нМ)	400 нМ	44

^a MAC – максимально допустимая концентрация, установленная ЕС для питьевой воды.

стадии добавляется фиксированное количество цимантренил-биотинового трейсера **21**, который получен, как показано на схеме 8.11. Каждая молекула стрептавидина содержит 4 центра связывания и поэтому несколько молекул трейсера может присоединяться к каждому антителу, что приводит к усилению сигнала. Количественное определение трейсера проводится методом ААС для свободной фракции цимантренил-биотинового трейсера **21**. В этом случае градуировочный график был получен для количественного

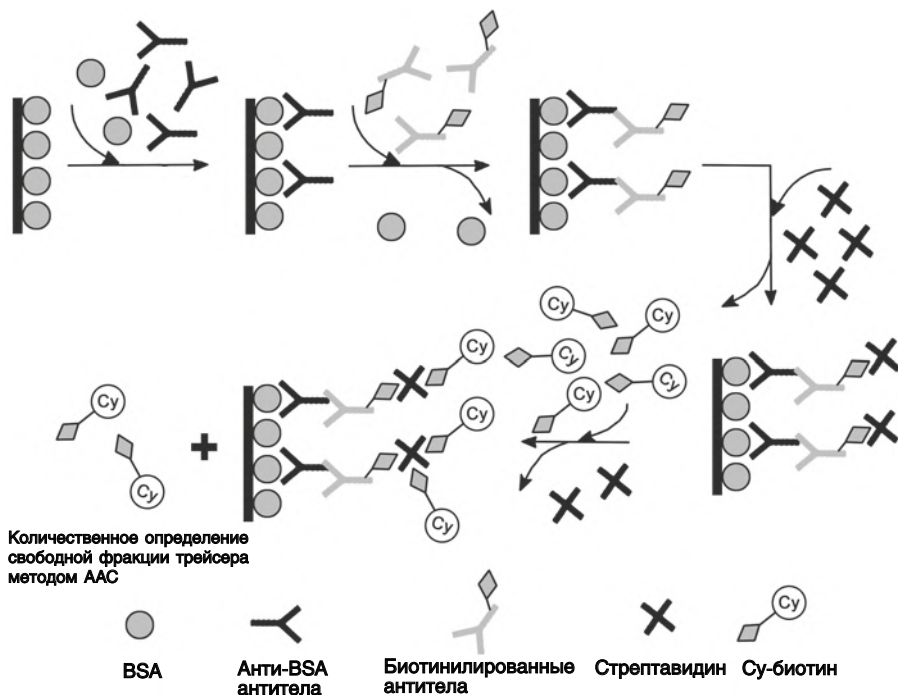


Рис. 8.5. Принцип твердофазного стрептавидин-цимантренил-биотинового конкурентного иммуноанализа [65]

определения BSA в диапазоне от 0 до 200 мг/л. Предел обнаружения марганца методом ААС составляет 125 фг на анализ для образца объемом 25 мкл (т. е. 92 нМ) [65, 66].

8.5.2. Детектирование с помощью ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием (металлокарбонильный иммуноанализ, СМІА)

Металлокарбонильный иммуноанализ (СМІА) – гетерогенный конкурентный метод металлоорганического иммуноанализа с использованием карбонильных комплексов металлов в качестве трейсеров, органических растворителей (этилацетат, изопропиловый эфир) для разделения связанной и свободной фракций и ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием (фурье-ИКС) для количественного определения. Выбор фурье-ИКС в качестве аналитического метода основан на хорошо известном свойстве комплексов карбониллов металлов давать характеристические полосы поглощения в средней ИК-области между 1850 и 2200 см^{-1} , то есть в той части спектра, где большинство белков и органических молекул не поглощают (более подробно описано в гл. 7). Кроме того, эти полосы в 8–10 раз более интенсивные, чем все другие полосы спектра. Каждый комплекс карбониллов металлов имеет различные и характеристические полосы поглощения, как показано для трейсеров:

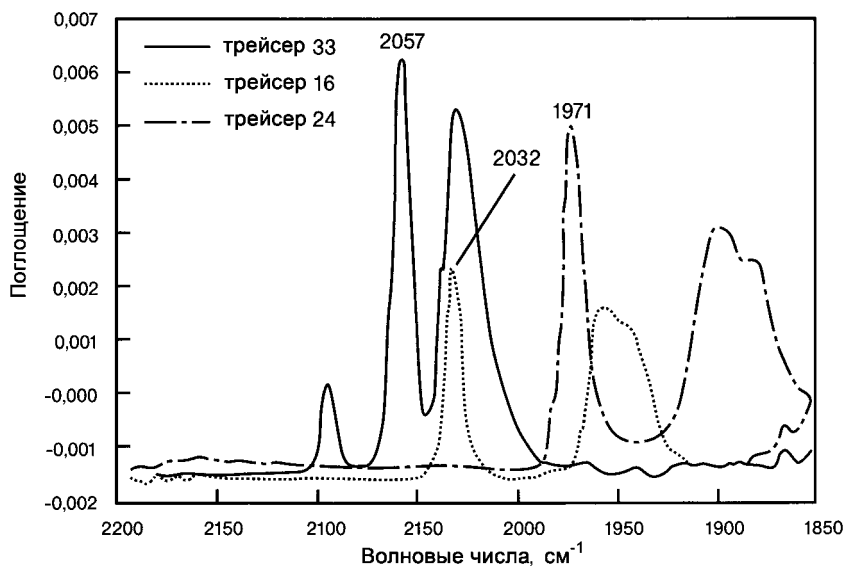


Рис. 8.6. Наложение ИК-спектров (20 повторов, разрешение 4 см^{-1}) трех металлокарбонильных трейсеров **33**, **24** и **16** в растворе хлороформа, записанных на MB100 FT-спектрометре (Bomem), снабженном InSb-детектором и ячейкой световода. Для каждого трейсера приведены частоты аналитических полос, используемых при количественном анализе

алкин(гексакарбонил)дикобальтового трейсера для кармазепина **33**; цимантренильного трейсера для фенобарбитала **24** и бенхротренильного производного дифенилгидантоина **16**, инфракрасные спектры которых показаны на рис. 8.6. Это уникальное свойство комплексов с фрагментом М–СО обеспечивает возможность выполнять одновременное количественное определение двух или трех трейсеров, что важно для одновременного мультииммуноанализа, который будет обсужден ниже в этом разделе [67].

Использование ИК-спектроскопии для количественного определения стало возможным только в 1980-х гг., когда недорогой и простой в использовании настольный фурье-спектрометр стал доступным. Чувствительность фурье-ИКС спектроскопии была, однако, недостаточной для требований иммуноанализа. Для решения этой проблемы прибор был снабжен охлаждаемым жидким азотом детектором, сделанным из полупроводниковых материалов, например МСТ (ртуть-кадмий-теллурид) или InSb (антимонид индия), что позволило увеличить чувствительность в 20 раз по сравнению с термодетектором DTGS, стандартно применяемым в фурье-ИКС приборах. Использование так называемых «light-pipe» ячеек световодов с длинной оптической частью (20 мм) для полного объема всего в 30 мкл также повысило чувствительность спектрометра в 200 раз [68]. Высота регистрируемых пиков пропорциональна количеству трейсера, что позволяет проводить его количественное определение (рис. 8.7). Для каждого комплекса аналитический пик,

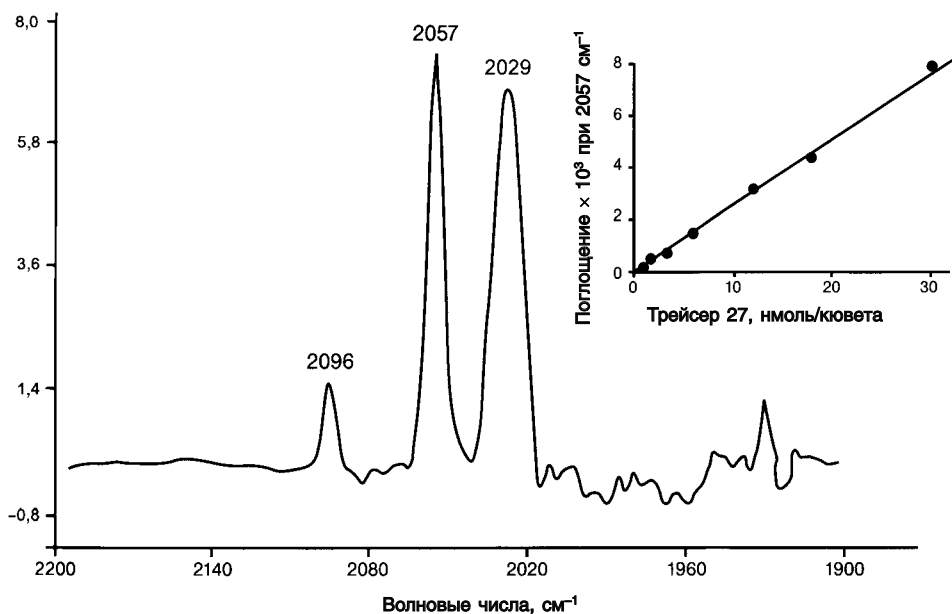


Рис. 8.7. Фурье-ИК-спектр 30 пмоль трейсера **27** в четыреххлористом углероде (10 повторов, разрешение 4 см^{-1}). Приведена область спектра 2200–1900 см^{-1} . На вставке график зависимости по закону Бугера–Ламберта–Бера для трейсера **27** в диапазоне от 1,25 до 30 пмоль на кювету. Поглощение при 2057 см^{-1} ($r = 0,997$) [70]

т. е. полоса, которая дает наиболее чувствительный отклик, идентифицируется. Например, аналитический пик – это пик при 2057 см^{-1} для трейсера **33**, при 2032 см^{-1} для трейсера **16** и при 1971 см^{-1} для трейсера **24**. Трейсера на основе карбонила кобальта показали самый низкий предел обнаружения, который позволил детектировать 300 фмоль при анализе трейсера **33** в 30 мкл четыреххлористого углерода [69].

8.5.2.1. Моноиммуноанализ СМИА

Было разработано шесть методик моноиммуноанализа (см. табл. 8.1). Впервые эти разработки были опробованы для клинических анализов антиэпилептиков, таких как карбамазепин [45], фенобарбитал [71], дифенилгидантоин [26, 32] и стероидного гормона гидрокортизона [70]. Недавно этот иммуноанализ СМИА был применен и в области охраны окружающей среды для определения пестицидов атразина [44] и хлортолулона [39]. Все эти анализы использовали поликлональные антитела. Для каждого аналита были получены кривые титрования антител и градуировочные графики. На рис. 8.8 показаны такие кривые для карбамазепина, которые представляют собой образец результатов для всех этих веществ.

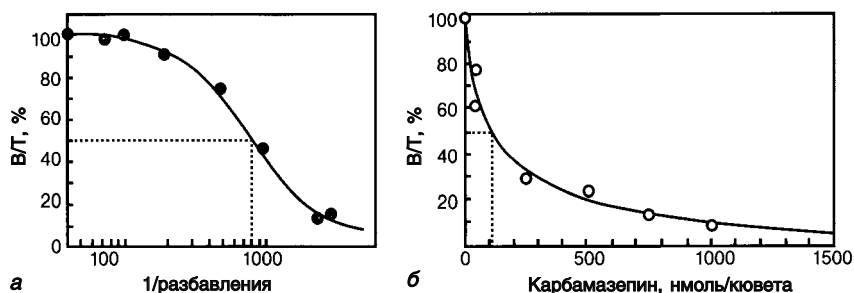


Рис. 8.8. СМИА для карбамазепина. а – Кривая титрования антител; б – градуировочный график определения карбамазепина. Обе кривые получены в присутствии 30 пмоль трейсера **33** [45]

Диапазон чувствительности иммуноанализа оценивается значением $(B/B_0)_{50}$, которое соответствует количеству аналита, которое вытесняет 50% трейсера. Величины, полученные методом СМИА для антиэпилептиков и кортизола, приведены в табл. 8.2.

Для определения антиэпилептиков в терапевтическом диапазоне для метода СМИА требуется всего несколько микролитров сыворотки пациента, для определения кортизола в сыворотке пациентов, страдающих гиперандрогенизмом*, необходимо 50 мкл сыворотки. Было проведено сравнение результатов и показано, что чувствительность метода СМИА сходна с той, что получена методом RIA с использованием трейсера, меченного изотопом ^{14}C .

* Гормональная гиперфункция. – Прим. перев.

Два принципиальных достоинства метода СМИА – отсутствие неспецифических сигналов в инфракрасной спектральной области (благодаря особой природе трейсера) и возможность выполнения одновременного определения нескольких иммуноанализов.

8.5.2.2. Мультииммуноанализ СМИА

Возможность проведения нескольких иммуноанализов одновременно экономически целесообразна, так как это экономит и время, и реагенты. Это особенно важно для выполнения сложной диагностики, которая включает определение нескольких биохимических параметров (диагностику эндокринных болезней, тесты на фертильность, раковые маркеры, определение тиреоидной функции, диагностические процедуры для синдрома Дауна) [72]. Однако недостаток таких одновременно определяемых трейсеров означает то, что число мультииммуноанализов, основанных на одновременном детектировании нескольких трейсеров, остается очень ограниченным. Коммерческая система Delfia, которая использует хелаты редкоземельных элементов в качестве трейсеров и флуоресценцию с временным разрешением в качестве метода, позволяет одновременно проводить иммуноанализ двух веществ [73, 74], и даже иммуноанализ четырех веществ с использованием четырех хелатов [Eu(III), Tb(III), Sm(III) и Dy(III)] [75]. Это уникальный пример, опубликованный в литературе. Металлокарбонильные метки с характеристическими полосами поглощения, которые различны для каждого трейсера, дают другую возможность для одновременного мультииммуноанализа нескольких аналитов в одном образце. Пример иммуноанализа для определения двух веществ был опубликован для случая смеси двух антиэпилептиков – карбамазепина и дифенилгидантоина с использованием смеси трейсеров **33** и **24** [76]. Так как

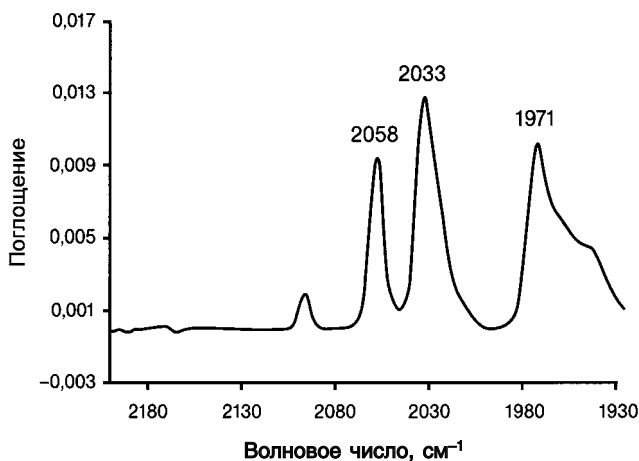


Рис. 8.9. ИК-спектр смеси трех трейсеров **33**, **16** и **24**. (Данные из работы [77])

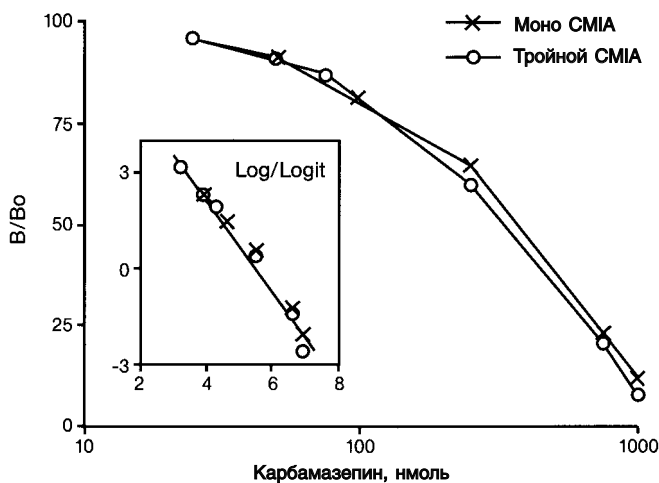


Рис. 8.10. Суперпозиция (наложение) градуировочных графиков для определения карбамазепина в моно- и тройном иммуноанализе CMIA. (Данные из работы [77])

полосы в ИК-спектре этих двух трейсеров не перекрываются (см. рис. 8.6), количественное определение сводится к простому измерению высоты полосы при 2057 см^{-1} для трейсера **33** и полосы при 1971 см^{-1} для трейсера **24**. Одновременный тройной иммуноанализ для трех антиэпилептиков (карбамазепина, фенобарбитала и дифенилгидантоина) был также описан [77]. В случае смеси трех трейсеров **33**, **16** и **24** есть некоторое перекрывание полос (рис. 8.9), за исключением одной полосы для комплекса кобальта при 2058 см^{-1} .

Методы расчета, такие как мультивариабельный метод, основанный на методе наименьших квадратов, алгоритмах частичного метода наименьших квадратов [78] или одновариантный метод [77], позволяют количественно определять каждый трейсер в диапазоне 10–100 пмоль. Градуировочные графики для определения карбамазепина в моно- и тройном иммуноанализе CMIA приведены на рис. 8.10.

8.5.2.3 Новые усовершенствования метода CMIA

Чувствительность метода CMIA хорошо подходит для количественного определения лекарств в сыворотке крови, но это не подходит для случая, когда работают с пестицидами, которые требуют чувствительности, отвечающей требованиям ЕС для пестицидов в питьевой воде (максимально допустимая концентрация $0,1\text{ мкг/л}$). Последние исследования направлены на повышение чувствительности метода CMIA путем присоединения нескольких M–CO на пробах, образованных РАМAM-дендримерами антител [19], или путем применения авидина, который может быть затем использован для связывания с биотинилированными антителами [18]. Детектирование таких меченых

антител может быть проведено на мембранах, тем самым исключается стадия экстрагирования свободной фракции с помощью растворителя.

8.5.3. Электрохимическое детектирование

Электрохимическое детектирование является дешевым аналитическим методом, который может быть использован для непрозрачных образцов и малых количеств. Ранее считалось, что это идеальный подход для разработки простых и чувствительных неизотопных иммуноанализов [79]. Кроме того, было хорошо известно, что ферроцен является отличным редокс-медиатором, (см. гл. 6 и 9). Пример – коммерческий биосенсор – портативный глюкозиметр, используемый диабетиками при определении уровня сахара в цельной крови [80]. Поэтому нет ничего удивительного в том, что в некоторых давно известных и хорошо разработанных методиках MIA применяются электрохимические методы для количественного определения трейсера.

8.5.3.1. Гомогенный амперометрический иммуноанализ с ферроценом в качестве медиатора

Потенциал ферроцена как электрохимической метки в иммуноанализах впервые был оценен Вебером и Парди [81], которые приготовили ферроцен-морфиновый конъюгат и продемонстрировали, что он электрохимически изменяется при связывании с антителами. Поэтому стало возможным создание гомогенного конкурентного анализа, в котором нет необходимости разделения свободной и связанной антителами метки. Эти идеи были развиты Макнейлом и привели к разработке методики иммуноанализа лидокаина, одна из первых опубликованных методик MIA [27]. Используемый в этом иммуноанализе трейсер – это лидокаин, меченный диметилферроценом **4** (схема 8.3), который детектируется методом циклической вольтамперометрии. Меченый лидокаин действует как акцептор электронов для глюкозооксидазы (GOD), не зависит от присутствия кислорода [82] и дает значительное усиление сигнала, как показано на рис. 8.11 [28].

Так как связывание трейсера **4** со специфическими антителами приводит к электрохимически инертному состоянию, то интенсивность тока будет пропорциональна количеству свободного трейсера в среде, и это будет обратно пропорционально количеству присутствующего аналита. Это так называемый конкурентный гомогенный иммуноанализ, в котором не требуется проводить разделение свободной и связанной фракций трейсера (рис. 8.12).

Градуировочный график для лидокаина был получен в диапазоне 5–50 мкМ, который хорошо соответствует его терапевтическому диапазону (6–21 мкМ). Достоинства этого анализа недавно вновь были использованы Форроу (Forrow) с сотр. для определения теофиллина. В качестве трейсера в этом случае применили производное теофиллина, меченное четвертичной аммонийной солью ферроцена **6** (схема 8.17) [28]. Использование катионной формы повысило растворимость трейсера в биологической среде и уменьшило неспецифическое гидрофобное связывание между незаряженными производными ферроцена и антителами.

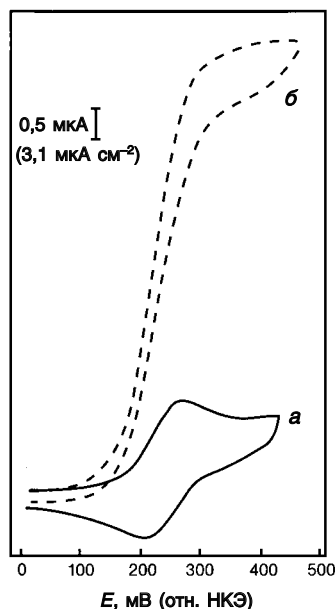


Рис. 8.11. а – Циклическая вольтамперограмма (при 5 мВ/с) трейсера **6** (0,25 мМ) в 0,6 мл фосфатного буфера на золотом электроде (площадь 0,16 см²); б – так же как для а, но при добавлении 100 мкл раствора глюкозооксидазы до конечной концентрации 2,1 мМ. (Данные из работы [28])



Рис. 8.12. Ферроцен-медиаторный амперометрический гомогенный иммуноанализ лидокаина. Только свободный ферроценил-лидокаиновый трейсер **4** является электрохимически активным [28]

8.5.3.2. Гомогенный электрохимический иммуноанализ (квадратно-волновая вольтамперометрия)

Принцип этого конкурентного иммуноанализа без разделения, разработанный Деграндом и Лиможем, основан на электрохимическом определении катионной электроактивной метки – кобальтоцениевых солей, а также на специфических свойствах Нафiona[™] – полианионного перфторсульфоната,

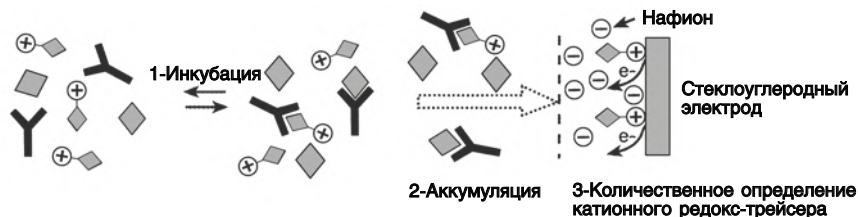


Рис. 8.13. Принцип гомогенного электрохимического иммуноанализа с использованием в качестве детектора для катионного металлоорганического трейсера электрода, покрытого нафийоном

имеющего высокое сродство к небольшим по размерам катионным органическим молекулам. Этот эффект позволяет разделить молекулы в смеси по их размеру и заряду [48].

При иммуноанализе (рис. 8.13) только свободная фракция катионного трейсера экстрагируется из смеси и аккумулируется на поверхности электрода, где и детектируется электрохимическим методом. Комплексы антитело – катионный трейсер слишком велики для проникновения через полимер и поэтому не детектируются. Такое элегантное разделение свободной и связанной фракций трейсеров позволяет создать гомогеннофазовый иммуноанализ.

Трейсер количественно детектируется методом квадратно-волновой вольтамперометрии: интенсивность пика тока пропорциональна концентрации свободного трейсера, который адсорбируется на поверхности электрода, и обратно пропорциональна количеству аналита, присутствующему в растворе. Амплификация сигнала (интенсивности тока), полученная при использовании

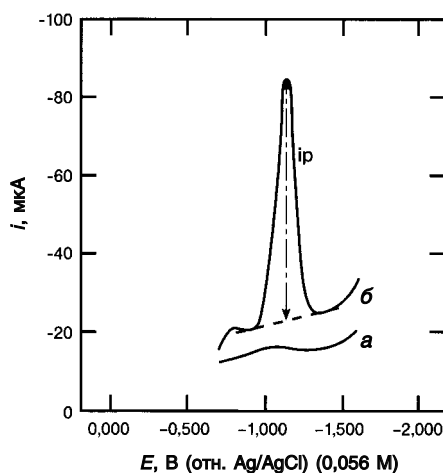


Рис. 8.14. Квадратно-волновая вольтамперометрия (частота = 100 Гц, $E_{sw} = 50$ мВ) для $[Co]^+$ в комплексе **35** на стеклоуглеродном электроде (а) и на электроде, покрытом нафийоном (б) (толщина слоя 0,4 мкм); 5 мин при 600 об/мин и температуре 22°C. (Данные из работы [48])

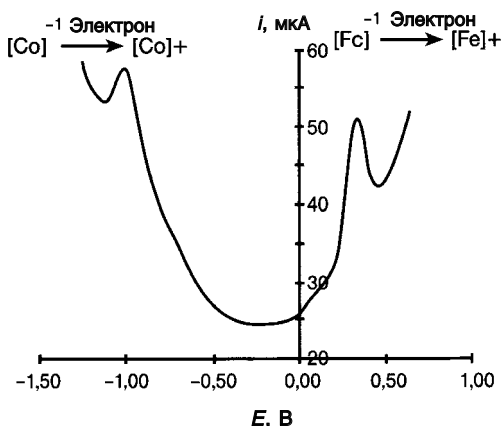


Рис. 8.15. Кривая квадратно-волновой вольтамперометрии $[\text{Co}]^+$ -комплекса **35** (1×10^{-6} М) и $[\text{Fc}]^+$ -комплекса **39** (12×10^{-6} М) на углеродном электроде, покрытом нафтоном, в буфере, содержащем 1% этанола и 10% нормальной кроличьей сыворотки. (Данные из работы [55])

покрытия нафтоном, четко видна на рис. 8.14. Кобальтоцениевые трейсеры для амфетамина **35** и дифенилгидантоина **37** (схемы 8.16, а и б) были использованы для разработки иммуноанализов на эти вещества [49, 83]. Этот метод позволяет определять аналиты в диапазоне 2–4 мкМ.

Одним из достоинств этих методов является потенциальная возможность выполнения одновременного двойного иммуноанализа при комбинировании трейсеров с двумя различными катионными электроактивными маркерами. Первый маркер **40** – это кобальтоцений, присоединенный к фенобарбиталу (схема 8.16, в), а второй трейсер **45** – это дифенилгидантоин, присоединенный к ферроцену (схема 8.18). Эти два электроактивных трейсера дают уникальную возможность детектирования, так как имеют значительно различающиеся стандартные потенциалы ($E^\circ = 0,26$ В для пары ферроцений/ферроцен и $E^\circ = -1,05$ В для пары кобальтоцений/кобальтоцен), что позволяет одновременно количественно определять два трейсера (рис. 8.15). Это позволило разработать двойной одновременный иммуноанализ двух лекарств – фенобарбитала и дифенилгидантоина [55]. Таким образом, можно проводить иммуноанализ этих антиэпилептических лекарств с пределом обнаружения 0,5 мкмоль/л.

8.5.3.3. Система для проточного электрохимического иммуноанализа

Два варианта иммуноанализа этого типа были описаны для различных методов разделения свободной и связанной фракций трейсера. В методике, описанной Матсунага, используемый метод основан на различии в значениях изоэлектрической точки (pI) для свободных и связанных антител, позволяющем проводить их разделение на ионообменной капиллярной колонке [84–86]. Связанная фракция антител ($pI = 5,6$) не задерживается на колонке

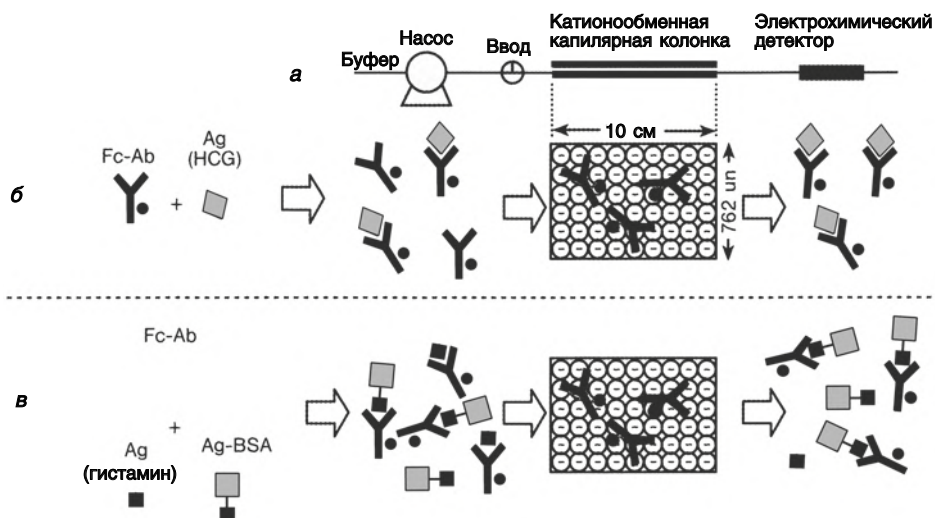


Рис. 8.16. а – Схематическая диаграмма электрохимического капиллярного иммуноанализа в проточной системе. Принцип электрохимического капиллярного иммуноанализа в проточной системе для белка (хорионического гонадотропина человека, б), для гаптена (гистамина, в). (Заимствовано из [31])

и количественно определяется при постоянном амперометрическом проточном анализе, а затем свободная фракция ($pI = 7$) элюируется с колонки с использованием буфера (pH 6,0 с 50 мМ малоната), и колонка может снова использоваться до 8 раз (рис. 8.16).

Разделение, основанное на различии в изоэлектрических точках, может быть достигнуто и на стеклянной фибровой мембране, модифицированной анионом [87], или на мультиканальной матричной колонке, покрытой катионообменной смолой [30]. Такой электрохимический проточный иммуноанализ был использован для определения хорионического гонадотропина человека (HCG). В качестве трейсера были использованы моноклональные антитела, меченые ферроценом, как показано на схеме 8.6 [31, 87]. Линейная зависимость наблюдалась для концентраций HCG между 10 и 2000 м.ед./мл, что свидетельствует о пригодности иммуноанализа для диагностики беременности и/или опухоли гонад в клинической практике. Такой иммуноанализ был также описан для определения гаптена гистамина (рис. 8.16, в). В этом случае существует конкуренция за связывание с ферроцен-мечеными антителами (Fc-Ab) между анализируемым гистамином и гистамином, связанным с BSA. Образующийся комплекс (Fc-Ab)–(BSA-гистамин) становится трейсером и количественно определяется электрохимически [30]. Анализ показывает хорошую зависимость тока от концентрации гистамина в диапазоне 200–2000 нг/мл и позволяет определять гистамин в цельной крови за 2 мин. Описанная система была миниатюризирована и стала доступной на чипе размером с кредитную карту.

Второй вариант анализа описан Вангом и состоит в разделении связанной и свободной фракций методом капиллярного электрофореза (рис. 8.17) [29].

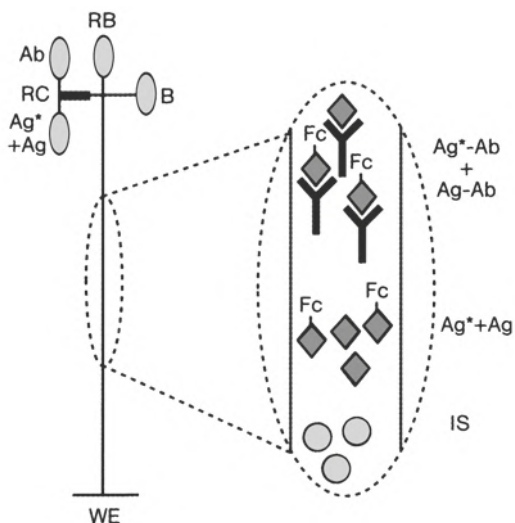


Рис. 8.17. Схематический протокол конкурентного электрохимического иммуноанализа на микрочипе, описанный Вангом и др. [29]. RB – проточный буфер, B – неиспользованный буферный резервуар, Ag* – ферроцен-меченный антиген, Ag – антиген, Ab – антитела, RC – реакционная камера, IS – внутренний стандарт, WE – скрин-принтовый рабочий электрод

Применимость этого анализа показана для миниатюризированного конкурентного анализа гаптена (трийодтиронина, T_3), в котором трейсер **8** – это меченный ферроценом гаптен, полученный, как показано на схеме 8.5. Свободные и связанные фракции трейсеров количественно определяются амперометрическим детектированием после прохождения электрофоретической колонки с использованием золотого электрода на скрин-принтовом углеродном рабочем электроде. Предел обнаружения составляет 1 мкг/мл T_3 .

8.5.4. Поляризационный флуоресцентный анализ

Применение флуоресцентных меток оказалось весьма успешным в случае неорганических комплексов, таких как хелаты европия, которые в настоящее время используются в коммерческих наборах Delfia®. Однако флуоресценция довольно редко использовалась для металлоорганических трейсеров и только в методе иммуноанализа, разработанном Лаковичем, такой трейсер был применен [88]. В этом варианте гомогенного конкурентного иммуноанализа в качестве трейсера **48** использовался комплекс $(Re-L)_n$ -HSA, полученный, как показано на схеме 8.20, а детектирование проводили с помощью поляризации флуоресценции (ПФ). Соединение **48** показало высокую степень поляризации света флуоресценции (с максимумом поляризации ~0,4 и максимумом

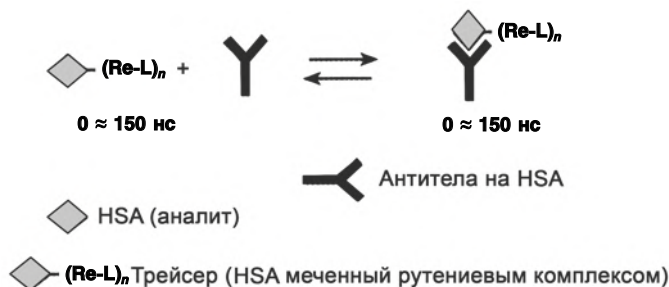


Рис. 8.18. Принцип поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA). Корреляционное время вращения θ различается для свободной $(\text{Re-L})_n$ -HSA и связанной антителами фракции трейсера $(\text{Re-L})_n$ -HSA-анти-HSA

анизотропии $\sim 0,3$) при отсутствии вращательной диффузии и среднем времени жизни 2,7 мкс, когда оно связывается с белками в насыщенном водном растворе. Начальная поляризация $(\text{Re-L})_n$ -HSA оказалась чувствительной к связыванию с антителами против HSA, что приводило к значительному повышению поляризации свечения. Следовательно, $(\text{Re-L})_n$ -HSA может быть использован в качестве трейсера в конкурентном иммуноанализе с немеченым HSA, выступающим в роли антигена (рис. 8.18).

Чувствительность анализа составляет 100 нМ. Использование этого металлоорганического рутениевого трейсера расширило область использования иммуноанализа с поляризацией флуоресценции, который широко применялся для определения гаптенов, сделало возможным определять также высокомолекулярные аналиты (10^5 – 10^8 Да).

8.6. Применение металлоорганических комплексов в качестве субстратов и косубстратов для ферментного иммуноанализа

В середине 1970-х гг. чувствительность иммуноанализа была существенно улучшена применением иммуноферментных анализов (EIA) [21–24]. В этом типе анализа, фермент связывали с антителами (см. рис. 8.2, б) или с аналитом, что позволяло амплифицировать сигнал. В настоящее время наиболее широко используется именно такой тип анализа. Производные ферроцена (некоторые из них обсуждены ниже) также применяли в иммуноанализе этого типа. В действительности, это пример расширения самого понятия МИА. Фактически, металлоорганический комплекс, используемый в этом случае, не является трейсером, но является субстратом или косубстратом (редокс-медиатором) для фермента.

8.6.1. Металлоорганические комплексы, используемые в качестве субстратов для ферментов

Ниже приведен пример иммуноанализа, в котором происходит конкуренция между аналитом, т. е. веществом, которое должно быть определено, и меченым аналитом, который присоединен к ферменту – щелочной фосфатазе (AP), за связывание со специфическими антителами, иммобилизованными на магнитных гранулах (рис. 8.19).

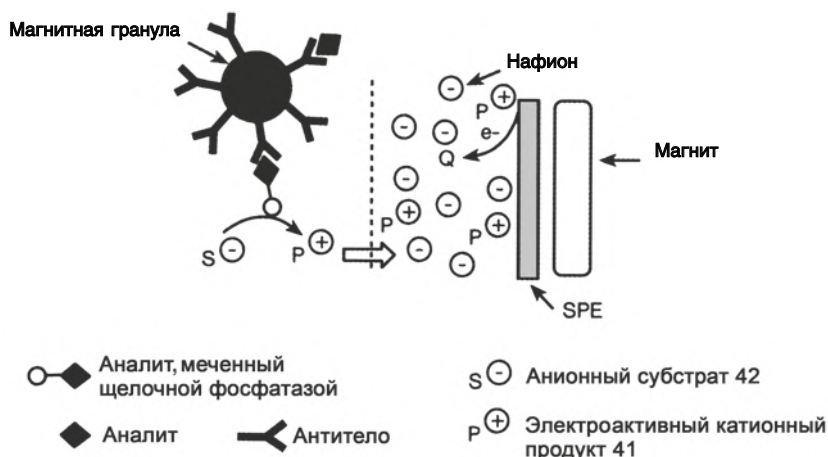


Рис. 8.19. Ключевой этап магнитного электрохимического анализа с использованием металлоорганического комплекса (S^-) в качестве субстрата для фермента (щелочной фосфатазы), который присоединен к аналиту и скрин-принтерному электроду (SPE), покрытому нафийоном для электрохимического определения катионного продукта P^+ (заимствовано из [89])

После инкубации на магните около электрода образуется кластер магнитных частиц и измеряется активность фермента, соединенного с частицами, с использованием в качестве субстрата металлоорганического комплекса 42,

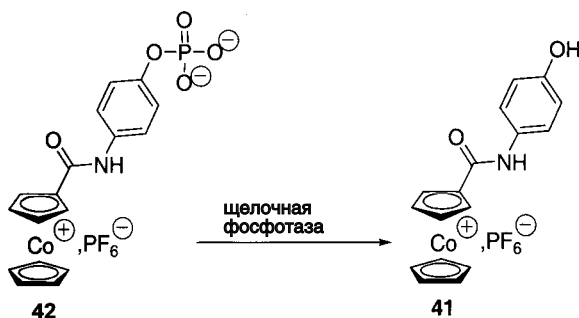


Схема 8.21. Гидролиз эфира фосфорной кислоты (42), катализируемый щелочной фосфатазой

полученного, как показано на схеме 8.17. Такой анионный субстрат **42** под действием щелочной фосфатазы превращается в катионное фенольное производное **41** (схема 8.21).

Затем оно концентрируется в полианионной пленке нафiona, которой покрыт электрод, и количественно детектируется с помощью циклической вольтамперометрии, как показано на рис. 8.19. Пригодность такого иммуно_анализа была продемонстрирована для гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) с пределом обнаружения 0,01 мкг/л [89].

8.6.2. Металлоорганические комплексы, используемые в качестве косубстратов для ферментов (редокс-медиаторы)

8.6.2.1. Проточно-инжекционный иммуноанализ с электрохимическим детектированием

И таком иммуносенсорном типе анализа используется ферроценилметанол в качестве косубстрата (редокс-метиатора) для глюкозооксидазы (GOD). Различные этапы анализа, показанные на рис. 8.20, состоят в следующем: (1) ковалентная иммобилизация белка А на графит-полистироловом скрин-принтерном электроде (SPE); (2) добавление кроличьих IgG, которые должны количественно определяться и которые специфически связываются с белком А; (3) добавление биотинилированных антикроличьих антител козы; (4) добавление конъюгата авидин–GOD; (5) добавление глюкозы и ферроценилметанола; (6) измерение каталитического тока в проточно-инжекционном

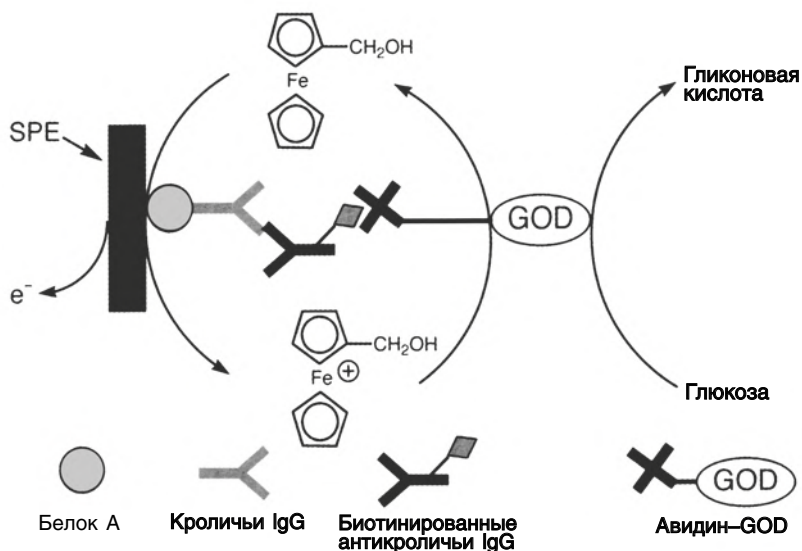


Рис. 8.20. Принцип иммуноферментного анализа с использованием ферроценилметанола в качестве редокс-медиатора для глюкозооксидазы (GOD)

иммуноанализе. Наблюдаемый на вольтамперограмме ток соответствует одноэлектронному окислению ферроценильной группы до ферроценя. Электрод может в последствии регенерироваться до 30 раз. Применимость анализа была продемонстрирована для определения моноклональных мышинных антител против пролактина человека (PL) с пределом обнаружения 0,02 мкг/мл [90].

8.6.2.2. Двойной ферментный иммуноанализ с амперометрическим детектированием

В такой разновидности неконкурентного иммуноанализа используется ферроценкарбоновая кислота **7** в качестве редокс-медиатора для пероксидазы хрена (POD), которая для определения присоединена к антителам (рис. 8.21) [91]. Когда на анод подается потенциал, то на поверхности электрода генерируется каталитический ток с интенсивностью, пропорциональной количеству фермента POD, локализованного очень близко от поверхности электродов, и этот ток пропорционален количеству связанного аналита. Присоединяя последовательно несколько антител на один и тот же электрод, можно создать двойной иммуноанализ для определения двух гормонов LH и FSH с пределом обнаружения 2,1 и 1,8 МЕ/л соответственно.

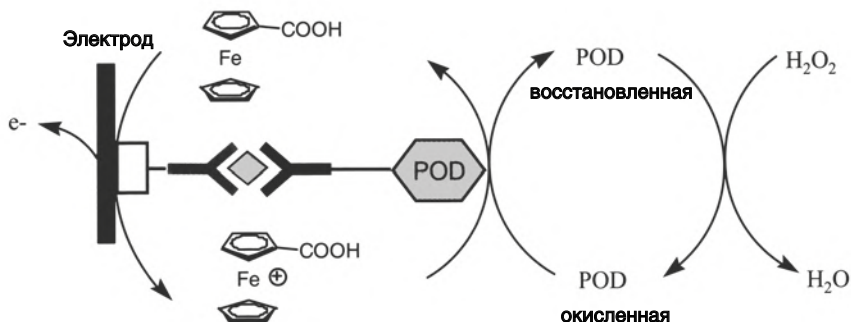


Рис. 8.21. Принцип неконкурентного иммуноанализа с использованием ферроценкарбоновой кислоты в качестве редокс-медиатора для пероксидазы хрена (POD)

8.6.2.3. Двойной ферментный иммуноанализ с использованием электрохимической микроскопии для детектирования

Еще один пример неконкурентного иммуноанализа демонстрирует определение антител, меченных пероксидазой хрена (POD) с ферроценилметанолом в качестве редокс-медиатора. В этом методе используют электрохимический сканирующий микроскоп [91], который, как показано на рис. 8.22, включает использование микроэлектрода диаметром 3 мкм для сканирования гладкой твердой фазы, на которой распределены определенные микрозоны детектирования (50 мкм × 50 мкм) специфических антител на вещества, которые

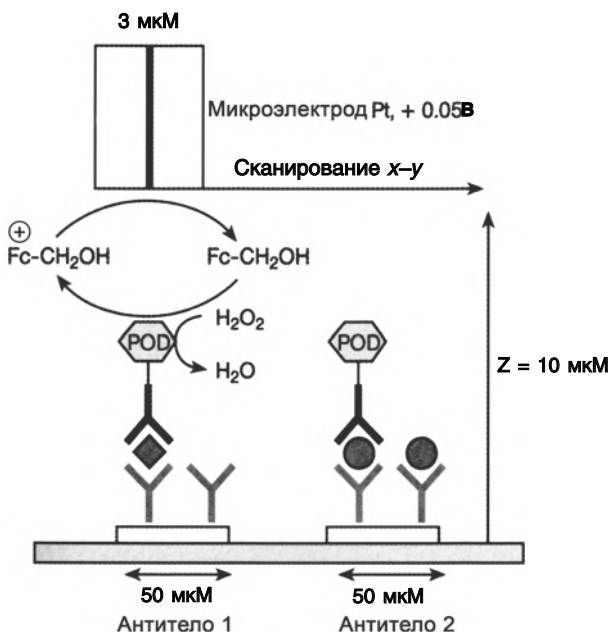


Рис. 8.22. Принцип двойного иммуноанализа с использованием ферроценилметанола в качестве редокс-медиатора для пероксидазы хрена (POD) и электрохимическим микроскопическим детектированием (заимствовано из [91])

должны анализироваться (в данном случае белки HCG и PL). Микроэлектрод действует как микропробник, способный идентифицировать и локально количественно фиксировать электрохимические реакции, которые генерируются на поверхности твердой фазы.

С использованием двумерного x - y -сканирования был получен трехмерный образ электрохимического процесса на поверхности. В этом случае стало возможным получать количественно образ ферментных конъюгатов, зафиксированных на поверхности микрозон антител, и тем самым анализировать непрямой методом аналиты, которые зажаты между ними по типу сэндвича. Предел обнаружения 0,1 МЕ/мл и 3 нг/мл для HCG и PL соответственно.

8.7. Заключение

Когда наши исследования по использованию биометаллоорганических соединений в иммуноанализах биологических сред только начинались, фоточувствительность комплексов карбониллов металлов и их нерастворимость в водных растворах казались основными препятствиями для их использования. В сотрудничестве с другими учеными, прежде всего с П. Бросье из Дижона, а также с С. Деграндом и Б. Лиможем из Клермон-Феррана мы частично

освоили эту область, что позволило этому новому и междисциплинарному подходу в пограничных областях металлоорганики, аналитики и биомедицинской химии достичь хороших успехов и разработать новые неизотопные методы иммуноанализа. Сейчас, четверть века спустя, два подхода в использовании «трейсер-системы детектирования» кажутся наиболее приемлемыми, поскольку (1) ферроценовые комплексы, которые из-за своих необычных редокс-потенциалов, могут детектироваться электрохимически, а это экономичный метод, так как его можно миниатюризировать и автоматизировать; (2) для комплексов карбониллов металлов, частота колебаний $M(CO)$ может определяться методом ИК-спектроскопии. Необходимость оптимизировать технику ИК-спектроскопического определения помогла нам достичь предела обнаружения ~ 300 фмоль, и этот предел, как мы знаем, с тех пор не был улучшен. Это еще не тот порог чувствительности, который требуется, но и он уже позволяет анализировать загрязнители в окружающей среде без предварительного концентрирования. Последние исследования направлены на усиление инфракрасного сигнала путем мультимечения антител с использованием металлоорганических дендримеров, что может дать новый стимул развития этого метода, а также позволит устранить необходимость проведения стадий разделения. Основными достоинствами СМИА до сих пор является то, что благодаря необычной природе трейсеров нет неспецифических сигналов и есть потенциальная возможность проведения одновременного мультииммуноанализа, что редко достигается другими методами.

В Европе потребность в иммуноанализе оценивалась в 1,76 миллионов евро в 2003 г. [92]. Система Delfia[®], в которой используются метки на основе хелатов европия, является одной из немногих, вышедших на конкурентный рынок. Ферментный иммуноанализ, благодаря своей легкости в постановке, бесспорно является наиболее широко используемой системой, но и он не лучшим образом адаптирован для анализа гаптенов, что особенно необходимо для мультииммуноанализа, и поэтому нет ничего, что помешало бы биометаллоорганической химии внести большой вклад в новую технологию, такую как микроанализ [93]. Вероятность этого усиливается благодаря тому, что чувствительность ИК-фурье-спектрометров должна увеличиться еще больше ввиду применения новых детекторов и разделителей потоков, что определит новые технологические возможности рынка.

Благодарности

Мы хотели бы особо поблагодарить: профессора М. Кэйса (Technicon; Институт технологии Израиля), который во время своего годовичного научного визита в Ренни в 1978–1979 гг. помог нам сделать первые шаги по разработке металлоорганического иммуноанализа, профессора Я. С. Батлера (университет Макгилла) и профессора Р. Броссье (университет Бурже) за основной вклад в разработку метода СМИА; профессора Батлера также за возможность с 1981 г. работать на ИК-фурье-спектрометре, профессора Броссье за его энтузиазм, сотрудничество и за его кроликов «Fauves de Bourgogne», кото-

рые были нашими источниками специфических антител и без которых это исследование было бы невозможным. Мы также не хотим забыть и наших студентов и сотрудников, которые участвуют или участвовали в наших исследованиях: Н. Фишер-Дюрана, Дж. М. Хельдта, Ф. Лебидье, В. Филомина, А. Верена, а также Б. Макглинчи, которая значительно помогла при переводе наших статей. Мы также хотим выразить благодарность ассоциации France-Quebec, Region de Bourgogne, CNRS и MRT за финансовую помощь.

Список сокращений

AAC	Атомно-адсорбционная спектроскопия
KVB	Квадратно-волновая вольтамперометрия
ПФ	Поляризация флуоресценции
Фурье-ИКС	ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием
Ab	Антитела
Ag	Антиген
Ag-M	Металлоорганический антиген
AP	Щелочная фосфатаза
BSA	Бычий сывороточный альбумин
CPE	Угольный пастовый электрод
CMIA	Металлокарбонильный иммуноанализ
Sy	Цимантренил
DCC	N,N'-диизопропилкарбодиимид
DMA	N,N-диметиланилин
DMAP	N,N-диметиламинопиридин
DPH	Дифенилгидантоин или дифенин
EDAC	N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EIA	Ферментный иммуноанализ
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
Fc	Ферроцен
FIA	Проточно-инжекционный анализ
Fr	Циклопентадиенил(дикарбонил)железо
FPIA	Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ
GC	Стеклоуглерод
GOD	Глюкозооксидаза
HCG	Хорионический гонадотропин человека
HSA	Сывороточный альбумин человека
IgG	Иммуноглобулин G
MIA	Металлоорганический иммуноанализ
NHS	N-гидроксисукциновый ангидрид
NHSS	N-гидроксисульфосукциновый ангидрид

PL	Пролактин
POD	Пероксидаза хрена
RIA	Радиоиммуноанализ
TSTU	N,N,N',N'-тетраметил-О-(N-сукцинимидил)урания тетрафторборат

Литература

1. M. Cais, S. Dani, Y Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin, L. Snarsky, *Nature* **1977**, 270, 534–535.
2. R. S. Yalow, S. A. Berson, *J. Clin. Invest.* **1960**, 39, 1157.
3. R. S. Yalow, S. A. Berson, *Nature* **1959**, 84, 1648.
4. R. Edwards, *Immunoassay*, William Heinemann Medical Books, London, **1935**.
5. T. Chard, *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, **1978**.
6. J. P. Gosling, *Clin. Chem.* **1990**, 36, 1408–1427.
7. G. B. Wisdom, *Ligand Rev.* **1981**, 3, 44–49.
8. M. Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1984**, 22, 895–904.
9. E. Ishikawa, *Clin. Biochem.* **1987**, 20, 375–385.
10. E. P. Diamadis, *Clin. Biochem.* **1988**, **1983**, 139–150.
11. I. Hemmilä, *Clin. Chem.* **1985**, 31, 359–370.
12. D. S. Smith, M. H. H. Al-Hakim, J. A. Landon, *Ann. Clin. Biochem.* **1981**, 18, 253–274.
13. I. Weeks, J. S. Woodhead, *J. Clin. Immunoassay* **1984**, 7, 82–89.
14. W. R. Seitz, *Clin. Biochem.* **1984**, 17, 120–125.
15. L. J. Kricka, G. H. G. Thorpe, *Ligand Rev.* **1981**, 3, 17–24.
16. E. O. Fischer, W. Pfab, *Z. Naturforsch.* **1952**, 7b, 377.
17. G. Wilkinson, A. Stone, E. W. Abel, *Comprehensive organometallic chemistry. The synthesis, reactions and structures of organometallics compounds*, Pergamon Press, New York, **1982**.
18. J. M. Heldt, N. Fischer-Durand, M. Salman, A. Vessières, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4775–4782.
19. N. Fischer-Durand, M. Salman, B. Rudolf, A. Vessières, J. Zakrzewski, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2004**, 5, 519–525.
20. G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495–497.
21. E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, 8, 871–874.
22. L. Wide, Solid-phase antigen-antibody systems, in K. E. Kirkham, W. M. Hunter (Eds.), *Radioimmunoassay Methods*, pp. 405–412, Churchill Livingstone, Edinburgh, **1971**.
23. L. Bélanger, C. Sylvestre, D. Dufour, *Clin. Chim. Acta* **1973**, 48, 15–18.
24. R. Maiolini, R. Messeyeff, *J. Immunol. Methods* **1975**, 8, 223–234.
25. B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 85–104.
26. A. Varenne, A. Vessières, P. Brossier, G. Jaouen, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1994**, 84, 81–92.
27. K. Di Gleria, H. A. O. Hill, C. J. McNell, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1203–1205.
28. N. J. Forrow, N. C. Foulds, J. E. Frew, J. T. Law, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 137–144.
29. J. Wang, A. Ibanez, M. P. Chatrathi, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3744–3749.

30. T. K. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3316–3321.
31. T. K. Lim, T. Matsunaga, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 1063–1069.
32. A. Vessières, K. Kowalski, J. Zakrzewski, A. Stepien, M. Grabowski, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 379–385.
33. J. Zakrzewski, *J. Organomet. Chem.* **1989**, 359, 215–219.
34. I. Lavastre, J. Besançon, P. Brossier, C. Moise, *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, 4, 9–17.
35. E. W. Bousquet, R. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, 52, 224.
36. P. Brossier, C. Moise, Exemples d'utilisation d'un complexe organometallique comme marqueur de molecules therapeutiques, in *Radioimmunoassay and related procedures in medicine* **1982**, pp. 779–786, International Atomic Energy Agency, Vienna, **1982**.
37. M. Katmen; G. Frost, W. Aherne, D. Stevenson, *Analyst* **1994**, 119, 431.
38. R. Dabard, M. Le Plouzennec, *Bull. Soc. Chim.* **1972**, 3594.
39. A. Vessières, N. Fischer-Durand, F. Le Bideau, P. Janvier, J. M. Heldt, S. Ben Rejeb, G. Jaouen, *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 669–674.
40. J. C. Leblanc, C. Moise, J. Tirouflet, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 292, 225–228.
41. I. Rémy, P. Brossier, I. Lavastre, J. Besançon, C. Moise, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, 965–967.
42. V. Philomin, A. Vessières, M. Gruselle, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 419–424.
43. B. Dunbar, B. Riggle, G. Niswender, *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 433.
44. N. Fischer-Durand, A. Vessières, J. M. Heldt, F. Le Bideau, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 59–66.
45. A. Varenne, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1995**, 186, 195–204.
46. M. Salmain, A. Vessières, I. S. Butler, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 13–15.
47. J. E. Sheats, M. D. Rausch, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 3245.
48. B. Limoges, C. Degrand, P. Brossier, R. L. Blankespoor, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1054–1060.
49. A. Ie Gal La Salle, B. Limoges, J. Y. Anizon, C. Degrand, P. Brossier, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 350, 329–335.
50. J. S. O'Neal, S. G. Sshulman, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2588.
51. A. L. Bordes, B. Schöllhorn, B. Limoges, C. Degrand, *Appl. Organomet. Chem.* **1998**, 12, 59–65.
52. L. J. Silverberg, J. L. Dillon, P. Vemishetti, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 771–774.
53. P. D. Beeb, C. Haziewood, D. Heseck, J. Hodacova, S. E. Stokes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 1327–1332.
54. O. Bagel, B. Limoges, B. Schöllhorn, C. Degrand, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4688–4694.
55. A. L. Bordes, B. Limoges, P. Brossier, C. Degrand, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 356, 195–203.
56. X. Q. Guo, F. N. Castellano, L. Li, H. Szmazinski, J. R. Lakowicz, J. Sipior, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 179–186.
57. M. Cais, *Methods Enzymol.* **1983**, 92, 445–458.
58. M. Cais, N. Tirosh, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1980**, 90, 27–35.
59. M. Cais, *L'Actualité Chimique* **1979**, 14–26.
60. F. Mariet, Ph D Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, **1990**.
61. P. Cheret, Ph D thesis, Université de Bourgogne, Dijon, **1987**.
62. P. Cheret, P. Brossier, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1986**, 54, 237–253.
63. F. Mariet, P. Brossier, *Pharm. Acta Helv.* **1991**, 66, 60–64.
64. F. Mariet, P. Brossier, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1990**, 68, 251–262.

65. I. Rémy, P. Brossier, *Analyst* **1993**, 118, 1021–1025.
66. P. Brossier, I. Rémy, *Immunoanal. Biol. Spec.* **1992**, 34, 17–24.
67. A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 625–633.
68. A. Vessièrès, G. Jaouen, M. Salmain, I. S. Butler, *Appl. Spectrosc.* **1990**, 44, 1092–1094.
69. M. Salmain, A. Vessièrès, G. Jaouen, I. S. Butler, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2323–2329.
70. V. Philomin, A. Vessièrès, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1994**, 171, 201–210.
71. M. Salmain, A. Vessièrès, P. Brossier, I. S. Butler, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1992**, 148, 65–75.
72. P. Brossier, G. Jaouen, B. Limoges, M. Salmain, A. Vessièrès -Jaouen, J. P. Yvert, *Ann. Biol. Clin.* **2001**, 59, 677–691.
73. J. Leinonen, T. Lovgren, T. Vornanen, U. H. Stenman, *Clin. Chem.* **1993**, 39, 2098–2103.
74. K. Pettersson, H. Alfthan, U. H. Stenman, U. Turpeinen, M. Suonpaa, J. Soderholm, S. O. Larsen, B. Norgaard-Pedersen, *Clin. Chem.* **1993**, 39, 2084–2089.
75. Y. Y. Xu, K. Pettersson, K. Blomberg, I. Hemmälä, H. Mikola, T. Lovgren, *Clin. Chem.* **1992**, 38, 2038–2043.
76. A. Varenne, A. Vessièrès, M. Salmain, S. Durand, P. Brossier, G. Jaouen, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 172–179.
77. M. Salmain, A. Vessièrès, A. Varenne, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 589, 92–97.
78. M. Salmain, A. Varenne, A. Vessièrès, G. Jaouen, *Appl. Spectrosc.* **1998**, 52, 1383–1390.
79. W. R. Heineman, H. B. Halsall, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1321 A–1331 A.
80. R. Lehmann, S. Kayrooz, H. Greuter, G. A. Spinass, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2001**, 53, 121–128.
81. S. Weber, W. Purdy, *Anal. Lett.* **1979**, 12, 1–9.
82. A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scorr, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 667–671.
83. B. Limoges, C. Degrand, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4141–4148.
84. T. K. Lim, Y. Komoda, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1298–1302.
85. T. K. Lim, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 354, 29–34.
86. T. K. Lim, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 370, 207–214.
87. T. K. Lim, S. Imai, T. Matsumaga, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 77, 758–763.
88. X. Q. Guo, F. N. Castellano, L. Li, J. R. Lakowicz, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 632–637.
89. M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2571–2577.
90. C. Valat, B. Limoges, D. Huet, J. L. Romette, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 404, 187–194.
91. D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 320, 251–256.
92. SFRL, Chiffres clefs de l'industrie du diagnostic in vitro 2004, www.sfrl.fr, **2004**.
93. C. A. K. Borrebaeck, *Immunol. Today* **2000**, 21, 379–382.

9 Геносенсоры на основе комплексов металлов

Ш. Такенака (Shigeori Takenaka, Department of Materials Science, Faculty of Engineering, Kyushu Institute of Technology, Japan)

9.1. Введение

Биосенсоры представляют собой аналитические устройства, используемые для наблюдения за биомолекулами. Контроль осуществляется на основании специфических взаимодействий биомолекул, таких как взаимодействия антиген – антитело, фермент – субстрат, ДНК – ДНК или белок – белок [1]. Информацию, полученную при исследовании этих взаимодействий, можно легко конвертировать в оптические, электрохимические или магнитные сигналы с помощью специально разработанных передатчиков. С недавнего времени большое внимание уделяется таким биосенсорам, как ДНК-сенсоры, также называемым геносенсорами. После расшифровки генома человека возникла потребность в анализе специфических генов, ответственных за различные заболевания [2–7]. Биосенсоры, работающие на основе электрохимических методов, особенно привлекательны, так как их легко автоматизировать и сделать компактными, сохранив при этом высокую чувствительность. В обычных условиях молекула ДНК является электрохимически неактивной, хотя она и обладает некоторыми электрохимическими свойствами в особых условиях при использовании специфических электродов и электролитов [8–12]. Поэтому молекулу ДНК необходимо метить электрохимически активными группами, чтобы получить возможность электрохимического детектирования данной молекулы. Комплексы металлов, обладающие обратимыми окислительно-восстановительными свойствами, также эффективны в качестве меток для ДНК. В качестве электрохимических геносенсоров могут выступать водорастворимые комплексы металлов, предпочтительные для двухцепочечной ДНК, или электрохимически активные ДНК-зонды, ковалентно связанные с комплексом металла. В этой главе кратко рассмотрены электрохимические геносенсоры на основе комплексов металлов.

9.2. Комплексы металлов в качестве зондов для ДНК

9.2.1. Катионные комплексы металлов

В обычных условиях молекула ДНК является электрохимически неактивной. Известно, что многие катионные комплексы металлов образуют

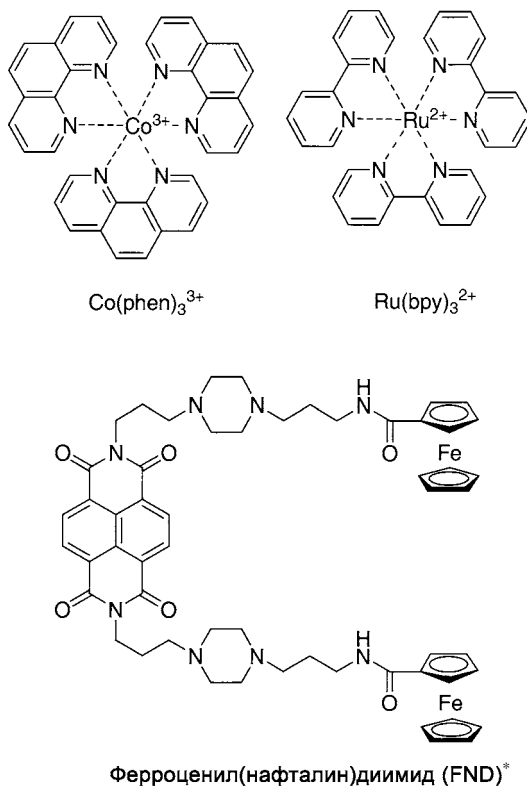


Рис. 9.1. Типичные примеры комплексов металлов, связывающихся с ДНК

координационные соединения с ДНК [13–46]. Условно такие комплексы можно назвать «ДНК-связывающие лиганды». Типичные примеры подобных катионных комплексов, которые могут связываться с ДНК, представлены на рис. 9.1. В тех случаях, когда для определения ДНК используются ДНК-связывающие лиганды, количество ДНК можно определить по величине электрохимического отклика, полученного для данного связывающего лиганда, пока существует некоторая корреляция между количествами связанного лиганда и ДНК.*

Бард и др. исследовали электрохимическими методами взаимодействие комплексов металлов CoL_3^{3+} и FeL_2^{2+} ($\text{L} = \text{phen}$ или bpy , где phen обозначает 1,10-фенантролин, а bpy – бипиридил) с ДНК [13, 14]. Оказалось, что данное связывание обусловлено как гидрофобными, так и электростатическими взаимодействиями фосфатных групп ДНК с комплексами металлов, причем это зависит от природы заместителей в «лиганде» и при металле. Так, например, электростатическое взаимодействие с Fe(bpy)_3^{2+} является основной

* Сокращенное название ферроценильного производного диимиды 1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты. – Прим. перев.

причиной связывания двухцепочечной ДНК, в то время как гидрофобное взаимодействие $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$ особенно важно в связывании бороздок спирали ДНК. Кроме того, Бартон и др. установили, что Δ и Λ изомеры $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ образуют более стабильный комплекс с лево- и правозакрученным дуплексом ДНК соответственно, так что конфигурация комплекса Ru особенно важна при связывании бороздок спирали ДНК [44]. Махардеван и др. подтвердили данную отличительную способность комплексов Ru с помощью электрохимических методов [45].

9.2.2. Комплексы металлов, конъюгированные с фрагментом ДНК или ДНК-связывающим лигандом

Метод ДНК-зондов используется для определения целевой ДНК или гена. ДНК может иметь структуру дуплекса, которая образуется при комплементарном связывании посредством водородных связей между нуклеиновыми основаниями, такими как аденин (А) и тимин (Т). Полученные таким образом две комплементарные одиночные цепочки могут распасться при нагревании (тепловая денатурация) и вновь формировать дуплекс при охлаждении (ренатурация). Последний процесс, при реализации которого образуется дуплекс ДНК, также называется «гибридизация». Так, последовательность ДНК вида 5'-ЦГАТГЦ-3' образует дуплекс ДНК с комплементарной последовательностью 3'-ГЦАТЦГ-5'. Для того чтобы определить некоторые гены, получают ДНК, имеющую последовательность, комплементарную целевой ДНК. При этом полученную таким образом молекулу, ДНК-зонд, связывают с меткой, например, флуорофором, а затем гибридируют с пробой ДНК. Целевой фрагмент ДНК в образце, представляющем собой смесь ДНК, можно определить с помощью метки, введенной в ДНК-зонд. В качестве меток обычно применяют флуоресцентные группы, но в тех случаях, когда такую группу замещают на электрохимически активную, целевую ДНК можно определить электрохимически. При электрохимическом определении комплексы металлов связывают с короткими фрагментами ДНК или олигонуклеотидами для того, чтобы получить электрохимически активные ДНК зонды [47–65]. Типичные примеры таких комплексов металлов, присоединенных к олигонуклеотидам, которые работают как электрохимически активные ДНК-зонды, представлены на рис. 9.2.

В тех случаях, когда комплексы металлов взаимодействуют с основаниями нуклеиновых кислот одноцепочечной ДНК, такие ДНК можно использовать в качестве альтернативных электрохимически активных ДНК-связывающих лигандов. Например, Палесек и др. описали образование комплекса, обладающего обратимыми окислительно-восстановительными свойствами, при взаимодействии пиридината тетраоксида осмия с тиминовым (Т) основанием одноцепочечной ДНК. Кроме того, авторы разработали методику электрохимического определения генов, основанную на данном модифицированном олигонуклеотиде как ДНК-зонде [3].

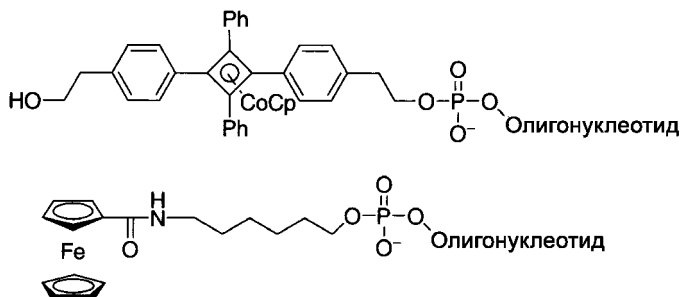


Рис. 9.2. Примеры олигонуклеотидов, содержащих фрагмент электрохимически активных комплексов металлов

В альтернативном электрохимическому определению ДНК подходе используют комплексы металлов, конъюгированные с ДНК-связывающими лигандами, например интеркаляторы. Метод определения генов основан на электрохимически активных комплексах металлов, которые предпочтительны для двухцепочечной ДНК [16, 21–24, 29, 32–43]. Принципы этого метода представлены на рис. 9.3.

ДНК-зонд иммобилизуют на поверхности электрода и гибридизируют с пробой ДНК. После гибридизации электрод погружают в электролит, содержащий связанный с ДНК комплекс металла, а затем проводят электрохимические измерения. Если целевая ДНК присутствует в пробе, комплекс металла концентрируется в дуплексе ДНК, образованном с участием целевой ДНК на электроде. Содержание целевого гена можно определить из величины данного электрохимического сигнала комплекса металла, сконцентрированного на электроде. В этом отношении эти комплексы называются «электрохимические индикаторы гибридизации». Ключевым моментом для успешного осуществления анализа является способность этих комплексов отличать двухцепочечные ДНК от их одноцепочечных аналогов. С этой целью были исследованы многие типы органических лигандов, включая интеркаляторы, хотя они еще не претерпевают обратимых окислительно-восстановительных

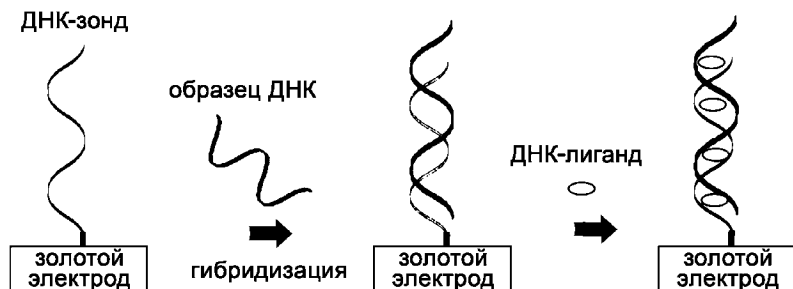


Рис. 9.3. Определение целевой ДНК с помощью комплексов металлов, связывающих двухцепочечные ДНК

превращений, в отличие от связывающих ДНК комплексов металлов [13–46]. Описано также применение комплексов металлов, например упомянутого выше комплекса Co(phen)_3^{3+} [19–24]. Недавно был описан комплекс на основе ферроцена, связанного с диимидом 1,4,5,8-нафталинтетракарбоновой кислоты (диимидом нафталина), который является первым примером комплекса металла, конъюгированного с ДНК-связывающим лигандом. Это ферроцен-содержащее соединение является высокоэффективным электрохимическим индикатором гибридизации [32–43]. Известно, что производные диимида нафталина связываются с двухцепочечной ДНК нитевой интеркаляцией. В случае одноцепочечной ДНК подобные взаимодействия отсутствуют, а эту способность интеркаляторов можно использовать для того, чтобы отличить двухцепочечную ДНК от одноцепочечной.

9.3. Электрохимический анализ взаимодействия комплексов металлов с двухцепочечной ДНК

Бард и др. разработали электрохимический метод анализа, основанный на взаимодействии комплексов металлов с двухцепочечной ДНК [13, 14]. Циклическая вольтамперограмма Co(phen)_3^{3+} на стеклоуглеродном электроде характеризуется редокс-пиками $E_{\text{pc}} = 0,107$ и $E_{\text{pa}} = 0,137$ В (хлорсеребряный электрод сравнения) соответственно. При добавлении ДНК к раствору электролита пики вольтамперограммы сдвигаются в анодную область на 0,120 и 0,182 В (Ag/AgCl) с уменьшением токов, как показано на рис. 9.4.

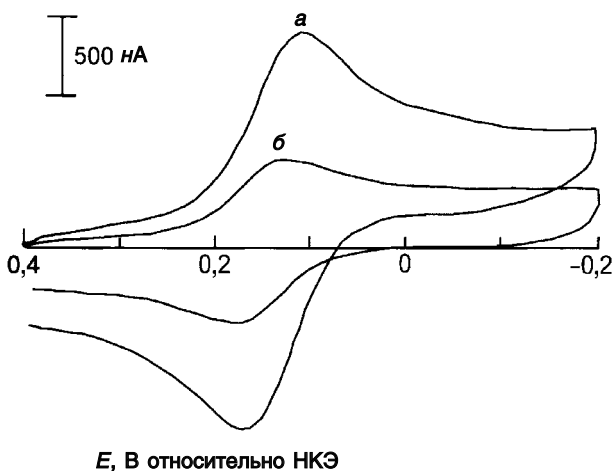


Рис. 9.4. Циклическая вольтамперограмма для $1.0 \times 10^{-4} \text{ M Co(phen)}_3^{3+}$ в отсутствие (а) и в присутствии ДНК из тимуса теленка (б) в 5 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, pH 7,1. Скорость развертки 100 мВ/с

Такое снижение величины тока может быть обусловлено увеличением кажущегося размера Co(phen)_3^{3+} связанного с ДНК. Поскольку токи i_{pa} и i_{pc} возрастают линейно и зависят от квадратного корня скорости сканирования в вольтамперограмме, наблюдаемый редокс-сигнал Co(phen)_3^{3+} , по всей видимости, связан с диффузией Co(phen)_3^{3+} из раствора к электроду. Наклон кривой для свободной и связанной форм Co(phen)_3^{3+} дает коэффициенты диффузии $D_f = 5,0 (\pm 0,6) \times 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ и $D_b = 3,2 (\pm 1,21) \times 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. После связывания с дс-ДНК коэффициент диффузии Co(phen)_3^{3+} уменьшается в 16 раз. Бард и др. оценили отношение констант связывания для окисленной и восстановленной форм Co(phen)_3^{3+} (K_{2+}/K_{3+}) равное 1,74, исходя из сдвига потенциала при связывании с двухцепочечной ДНК. Двухзарядный комплекс связывается сильнее, что свидетельствует о преобладании гидрофобного, а не электростатического взаимодействия. Электростатическое взаимодействие является доминирующим в случае Fe(bpy)_3^{2+} . Константа связывания была рассчитана из изменения пика потенциала вольтамперограммы в зависимости от концентрации двухцепочечной ДНК, исходя из следующих уравнений в координатах Скэтчарда:

$$C_b = b - \{b^2 - (2K^2 C_t [\text{DNA}]/s)^{1/2}/2K,$$

$$b = 1 + KC_t + K[\text{DNA}]/2s$$

где s – размер сайта в парах оснований, занимаемый связанным лигандным комплексом, а C_b и C_t – концентрации лиганда (связанного и общая соответственно). В наблюдаемый ток вносят вклад как связанный, так и свободный лигандные комплексы. Поэтому необходимо исследовать, возможен ли взаимный переход одной формы в другую в измеряемых временных интервалах. В статическом случае (S) при отсутствии взаимных переходов корень квадратный из коэффициента диффузии является суммой свободной и связанной форм лиганда, нормированных на собственные мольные доли, как показано в следующем уравнении:

$$i_{\text{pc}} = B(D_f^{1/2} C_f + D_b^{1/2} C_b),$$

где C_f – концентрация свободного лиганда.

В случае взаимных переходов (мобильный вариант, M) уравнение записывается в следующем виде:

$$i_{\text{pc}} = BC_f(D_f C_f/C_t + D_b C_b/C_t)^{1/2}$$

Для реакции Нернста в вольтамперограмме при 25°C значение переменной B выражается как $2,69 \times 10^5 n^{3/2} A v^{1/2}$, где n – число электронов, переносимых металлокомплексом, а A – площадь поверхности электрода. Константа связывания для Co(phen)_3^{3+} с ДНК из тимуса теленка была определена для статической модели (S): $K = 1,6(+0,2) \times 10^4 \text{ М}^{-1}$ (S , $s = 6$ пар оснований) и мобильного случая (M): $K = 2,6(+0,4) \times 10^4 \text{ М}^{-1}$ (S , $s = 5$ пар оснований) соответственно.

9.4. Определение ДНК с использованием ДНК-связывающих лигандов, конъюгированных с катионными комплексами металлов

Комплексы металлов, в частности катионные комплексы, конъюгированные с ДНК-связывающими лигандами, дают более высокие значения пиков тока на вольтамперограмме, когда на электроде иммобилизована двухцепочечная ДНК по сравнению с одноцепочечной. В группе Миккельсена был проведен следующий эксперимент с использованием Co(phen)_3^{3+} в качестве ДНК-связывающего катионного металлокомплекса [19–21]. 18-Членный олигонуклеотид (5'-ЦАА АЦА ЦЦА АТГ АТА ТТТ-3', ΔF508 – делеция фенилаланина в гене CFTR, ответственная за муковисцидоз (наследственное заболевание)) – участок последовательности – был присоединен ферментативным путем к последовательности dG_{25} и иммобилизован на угольном пастовом электроде [21]. После гибридизации с образцом комплементарной ДНК наблюдалось увеличение пика тока (рис. 9.5).

Наблюдаемые значения по току обусловлены комплексами Co(phen)_3^{3+} , сконцентрированными на электроде, причем количество таких комплексов в случае двухцепочечной ДНК выше, чем для одноцепочечной. Таким образом, для электрохимического детектирования ДНК предпочтительно использовать металлокомплексы, обладающие избирательной способностью связываться с двухцепочечной ДНК. Для иммобилизации ДНК-пробы

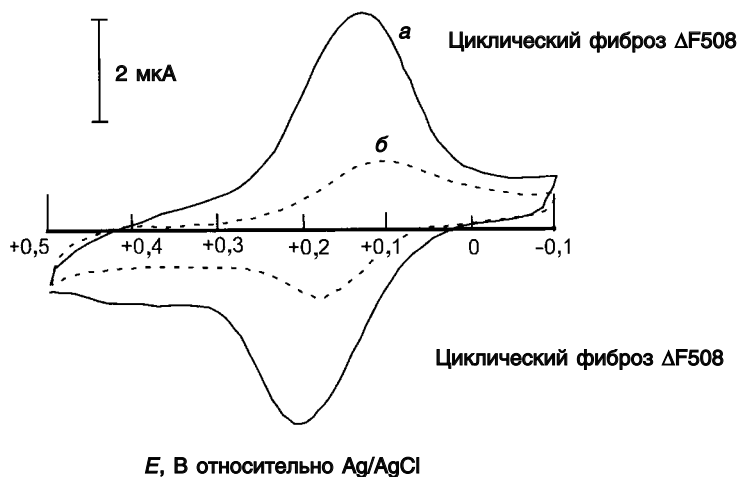


Рис. 9.5. Циклическая вольтамперограмма ΔF олигонуклеотида (5'-ЦАА АЦА ЦЦА АТГ АТА ТТТ-3'), иммобилизованного на угольном пастовом электроде до (а) и после (б) гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом с 0,12 мМ Co(phen)_3^{3+} , 5 мМ Tris-HCl , 20 мМ NaCl , pH 7,0 [21]

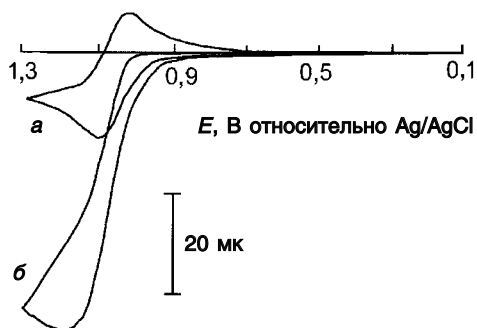


Рис. 9.6. Циклическая вольтамперограмма для комплекса $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ в отсутствие (а) и в присутствии ДНК из тимуса телят (б) в натрий-фосфатном буфере, (рН 6,8) и 700 мМ NaCl. Скорость развертки 25 мВ/с [26]

на поверхности угольного пастового электрода проводили ковалентную пришивку аминогруппы одноцепочечной ДНК к карбоксильным группам, предварительно окисленной поверхности угольного пастового электрода [20]. Такой способ оказался эффективным в случае гуаниновых оснований однотяжевой ДНК пределом обнаружения 2,5 нг для поли-(dA)₄₀₀₀ [20]. Ванг и др. разработали высокочувствительный способ определения ДНК, используя потенциометрический метод, при котором количество $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$, сконцентрированное на электроде измеряется с помощью хронопотенциометрии [22–24]. Этот металлокомплекс широко применяется для определения олигонуклеотидов, относящихся к последовательностям ДНК патогенов бактериального и вирусного происхождения [22]. Метод PSA* с использованием комплекса $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ позволяет достичь предела обнаружения 0,05 мкг/мл целевой олигонуклеотидной последовательности. Был разработан также метод определения нуклеотидных замен (мутаций) в целевой последовательности, основанный на уменьшении стабильности таких дуплексов ДНК [23, 24]. Различие в количестве таких комплексов, образующихся на поверхности электрода, зависит от условий гибридизации и последующей отмывки. Для увеличения точности определения таких одонуклеотидных замен было предложено использовать пептид–ДНК-пробу вместо ДНК-пробы [23, 24]. В работе Торпа (Thorp) был предложен метод определения ДНК на основе комплекса $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, являющегося медиатором электрохимического окисления гуаниновых оснований [25–30]. На рис. 9.6 представлена вольтамперограмма окисления гуаниновых оснований целевой ДНК в присутствии электролита, содержащего комплекс рутения. Медиаторный ток окисления пропорционален количеству целевой ДНК. Следует отметить, что наблюдаемый ток зависит от природы ДНК с различным ГЦ составом.

* Pressure Swing Adsorption. – Прим. перев.

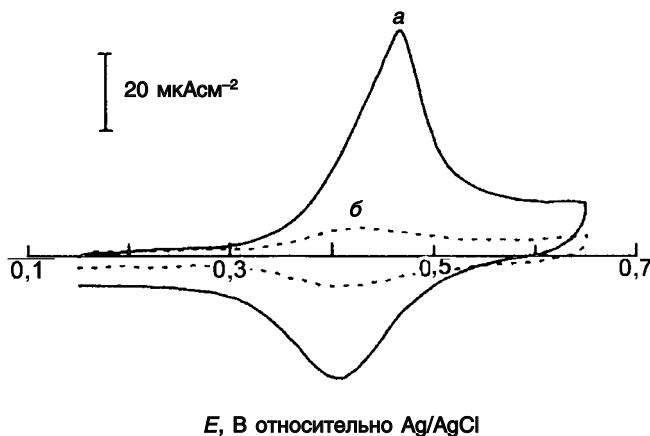


Рис. 9.7. Циклическая вольтамперограмма для dT_{20} -модифицированного золотого электрода в электролите после гибридизации с комплементарной – олиго-(dA_{20}) (а) или некомплементарной – (dT_{20}) (б) нуклеотидными последовательностями после погружения в раствор ферроценилнафталиндиимида

Такенака и др. впервые синтезировали ферроценилнафталиндиимид (ФНД) в качестве металлокомплекса, конъюгированного с ДНК-связывающим лигандом (индикатор гибридизации), обладающий сильным избирательным связыванием с дс-ДНК и характеризующийся обратимым редокс-откликом при анодном потенциале [32–43]. Олигонуклеотид-(dT_{20}), модифицированный сульфгидрильной группой, был иммобилизован на золотом электроде в качестве ДНК-зонда через сульфогруппу; модифицированный таким образом электрод гибридизовали с комплементарной – олиго-(dA_{20}) или некомплементарной – (dT_{20}) нуклеотидными последовательностями [32–33]. После погружения в раствор, содержащий ФНД, электрод помещали в раствор электролита, не содержащего ФНД, и измеряли вольтамперограмму. На рис. 9.7 представлена циклическая вольтамперограмма электрода до и после гибридизации с dA_{20} . Отклик по току наблюдался только в случае комплементарной олигонуклеотидной последовательности (dA_{20}), в случае некомплементарной последовательности (dT_{20}) интенсивность сигнала едва превышала фоновый уровень. Полученные результаты обусловлены образованием стабильного комплекса ФНД с двухцепочечной формой ДНК за счет интеркаляции и отсутствием такового в случае одноцепочечной формы. Предложенный авторами подход успешно был использован для определения ДНК при анализе экспрессии генов.

Метод, основанный на избирательном связывании ФНД с двухцепочечной формой ДНК, может быть использован для анализа нуклеотидных замен в последовательности молекулы ДНК [35–43]. Сродство ФНД к области, содержащей такие нуклеотидные замены, значительно ниже по сравнению с комплементарной структурой [38, 41] и, как следствие,

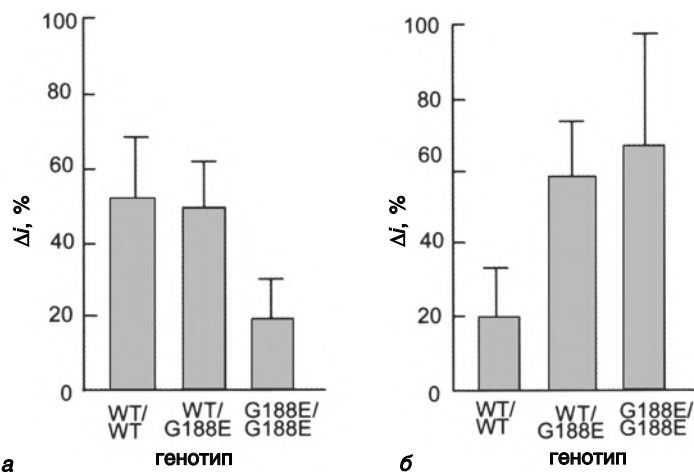


Рис. 9.8. Электрохимическое определение гетерозиготного гена липопротеина липазы. Для гетерозиготного типа (WT/G188) значительный электрохимический сигнал наблюдается для электродов с иммобилизованными ДНК-зондами как дикого (а), так и мутантного типа (б)

приводит к снижению уровня регистрируемого сигнала. Методом кварцевых микровесов (QCM*) было показано, что такое снижение тока обусловлено уменьшением количества ФНД в пересчете на молекулу двухцепочечной ДНК на золотом электроде. На золотую поверхность чипа для QCM был иммобилизован олигонуклеотид, модифицированный сульфгидрильной группой, в качестве ДНК-зонда и аналогично описанному выше методу была проведена гибридизация в электролите, содержащем комплементарную ДНК-зонду олигонуклеотидную последовательность, и такую же последовательность с однонуклеотидной заменой. Падение частоты наблюдалось как при добавлении олигонуклеотидов к раствору электролита, так и при последующем добавлении ФНД. Было показано, что с двухцепочечной ДНК, состоящей из 20 пар оснований, в среднем связывается 9 молекул ФНД, в то время как с такой же ДНК, содержащей однонуклеотидную замену, связывается 7 молекул ФНД. Данный метод был использован при анализе однонуклеотидного полиморфизма гена липопротеинлипазы [42, 43]. В геноме человека может быть два разных аллеля одного гена, в таком случае ген называется гетерозиготным. В том случае, когда мутантная форма аллеля ассоциирована с заболеваниями, актуальной становится ранняя ДНК-диагностика для своевременного лечения. Когда два ДНК-зонда (для дикого и мутантного типа) иммобилизованы на электроде, электрохимический сигнал регистрируется для каждой из них при анализе гетерозиготных образцов. На рис. 9.8 представлен пример определения гетерозиготного гена липопротеина липазы [42].

* Quartz Crystal Microbalance (англ.)

Когда на нескольких электродах иммобилизованы разные ДНК-зонды, появляется возможность одновременно анализировать несколько ДНК последовательностей/генов. Такая система называется ДНК-чипом. На основе такого инновационного подхода, разработанного группой Такенаки (компания TUM Gene Inc.), была создана система электрохимических массивов (ЕСА*), состоящая из множества интегрированных электродов, позволяющая параллельно анализировать много образцов ДНК/генов [35]. Для визуализации результатов анализа используют сканирующую электрохимическую микроскопию (SECM)** с использованием ФНД [40]. Для этого ДНК-чип погружают в раствор, содержащий ФНД, и проводят измерение методом SECM. ФНД концентрируется на двухцепочечной ДНК, что приводит к возрастанию измеряемого сигнала. Для иммобилизации ДНК-проб также можно использовать непроводящие поверхности, такие как стекло, что открывает новые возможности для электрохимической визуализации ДНК-чипов.

9.5. Детектирование генов с помощью олигонуклеотидов, меченных ферроценами, в качестве комплексов металлов, конъюгированных с фрагментами ДНК

В качестве электрохимически активных реагентов можно использовать также производные олигонуклеотидов с ферроценами в качестве комплексов, конъюгированных с фрагментами ДНК [47–65]. Электрохимическое определение генов с использованием меченых ферроценом олигонуклеотидов, совмещенное с ВЭЖХ, описано в работе [47]. После гибридизации несвязавшаяся часть ферроцен-олигонуклеотида удаляется с помощью ВЭЖХ, а электрохимический сигнал, обусловленный связанной с целевой ДНК ферроценовой группой, детектируется с помощью ЭХД (электрохимического детектора). Так, после гибридизации образца ДНК, содержащего дрожжевой ген переносчика холина, с комбинированной последовательностью ДНК-праймера, несущей ферроценовую группу, несвязавшуюся часть отделяли с помощью ВЭЖХ на гидроксипатитовой колонке, а сигнал регистрировали ЭХД. Интенсивность электрохимического сигнала пропорциональна количеству целевого гена, а предел обнаружения составляет несколько десятков фемтомолей. Как известно, эукариотическая мРНК содержит так называемый поли-А хвост на 3'-конце и может быть определена с использованием олиго-dT20 последовательности, меченой ферроценами. Таким образом определяли дрожжевую мРНК. Олигонуклеотиды, меченые ферроценами, также могут использоваться в качестве праймеров для ПЦР. Полученный ПЦР-продукт, содержащий ферроценовые группы, можно определять электрохимически. Так, разница между мужской (имеющей 1 аллель в данном случае) и женской

* Electrochemical array. – *Прим. перев.*

** Scanning ElectroChemical Microscopy (*англ.*)

Праймер Т3: 5'-A'ATTAACЦЦТЦАЦТАААГГГ-3'

где A' =

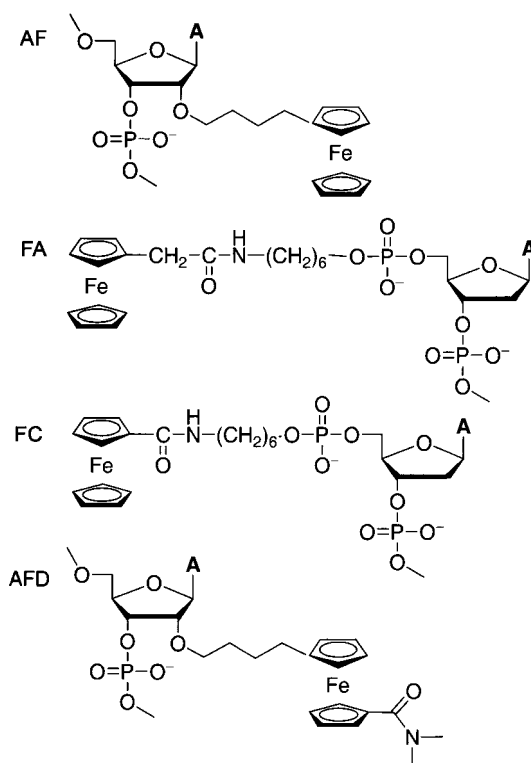


Рис. 9.9. Олигонуклеотидные праймеры Т3, меченные алкилферроценом (AF), ферроценилацетатом (FA), ферроценилкарбоксилатом (FC) и алкилферроцендиметилкарбоксамидом (AFD), были синтезированы присоединением соответствующих редокс активных групп к 5'-аденозину 20-членного олигонуклеотида праймера Т3 (5'-AATTAACЦЦТЦАЦТАААГГГ-3') [55]

(2 аллеля) разновидностями гена дистрофии может быть обнаружена с помощью количественной ПЦР [49]. Кур и др. синтезировали 4 различных комплекса ферроценов с олигонуклеотидами, обладающими разными редокс-откликами при четырех различных потенциалах, путем присоединения разных электроноакцепторных и донорных групп к ферроценовой части комплекса рис. 9.9 [55]. Эти комплексы можно разделить с помощью капиллярного гель-электрофореза и детектировать методом переменного тока вольтамперометрии. Таким образом, полученные соединения можно использовать в качестве четырех «цветных меток» при секвенировании ДНК.

Кроме того, авторам удалось показать возможность детектировать однонуклеотидный полиморфизм (SNP)* с использованием техники ферментативного

* Single Nucleotide Polymorphism (англ.)



Рис. 9.10. Модельная система для реакции однонуклеотидной элонгации с использованием 5'-ферроцен-меченного праймера на примере SNP Т-типа [62]

однонуклеотидной элонгации [62]. В этом случае последовательность ферроцен-олигонуклеотида идентична анализируемой ДНК вблизи SNP вплоть до самой замены (рис. 9.10). Так, в случае SNP с Т-заменой детектирование осуществляется при использовании ддАТФ* и фермента элонгации (ДНК полимеразы). Полученный продукт анализировали гель-электрофорезом с вольтамперометрией переменного тока. Кур и др. усовершенствовали эту методику с помощью новых синтезированных ферроцен-ацикло-АТФ [63]. В этом случае (рис. 9.11) используется немеченый олигонуклеотид, а вместо ддАТФ – ферроцен-ацикло-АТФ. В случае соответствующего SNP (в рассматриваемом примере Т-типа) был получен олигонуклеотид с ферроценильным фрагментом. Для разделения ферроценильных олигонуклеотидов, различающихся одним из оснований, нужна старая экспериментальная техника (гель-электрофорез). Обсуждаемая методика позволяет получать олигонуклеотид с ферроценильным фрагментом, не прибегая к гель-электрофорезу.

На рис. 9.12 показан принцип электрохимического детектирования кольцевой одноцепочечной ДНК фага М13 с использованием ферроцен-dУТФ в качестве субстрата полимеразы [65]. ДНК фага М13 гибридизуется с соответствующей ДНК-пробой, иммобилизованной на электроде. ПЦР проводят на электроде в присутствии dЦТФ, dАТФ, dГТФ и ферроцен-dУТФ вместо dТТФ. Комплементарная цепь (2749 оснований М13 мр18ДНК), образованная в ходе реакции, содержит ферроценил урацил вместо аденозина. Количество встроенного ферроцена определяли в ходе реакции переноса электрона между электродом и восстановленной формой глюкозооксидазы с использованием глюкозы в качестве субстрата. Предел обнаружения этого метода составляет меньше пикомоля ДНК фага М13.

Ферроцен-dУТФ и ddУТФ с другим типом химической сшивки были получены в работах [60, 64]. Умтек и др. разработали способы детектирования последовательностей ДНК, обнаружения мутаций, анализа

* Дидезоксиаденозинтрифосфат. – Прим. перев.

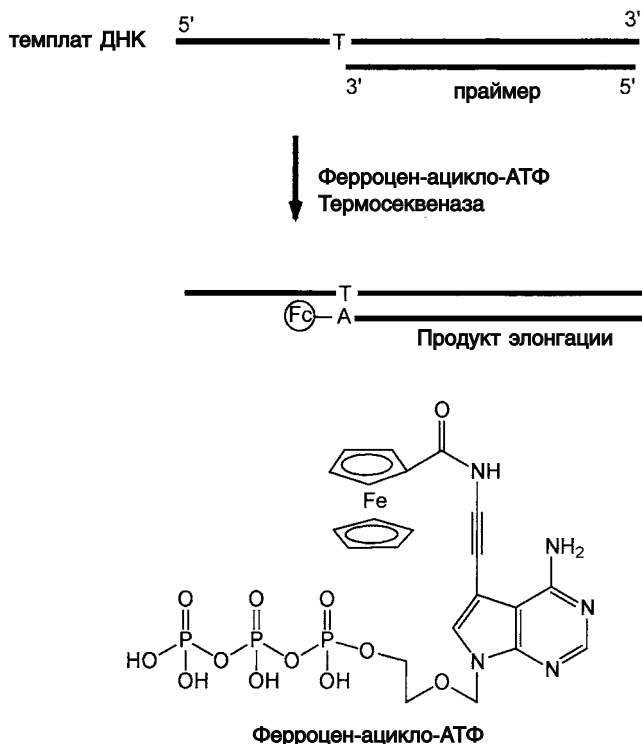


Рис. 9.11. Модельная система для реакции однонуклеотидной элонгации с использованием ферроцен-ацикло-АТФ терминатора. Ациклический АТФ, меченый ферроценом, встраивается в случае SNP Т-типа [63]

экспрессии генов на основе сэндвич-схемы анализа с использованием ферроцен-олигонуклеотидов [58]. Две разные ДНК-пробы, комплементарные разным участкам анализируемой ДНК, были использованы, как это показано на рис. 9.13.

Одна из проб иммобилизована на электроде, а другая мечена ферроценом. Если в анализируемом образце присутствует целевая ДНК, то в результате гибридизации на электроде образуется тройной комплекс, содержащий ферроценовые группы. Для определения был использован метод переменноточковой вольтамперометрии. Были определены также вставки/делеции в 16-м интроне гена ангиотензин-превращающего фермента, как ДНК фрагмент размером 192 п.о. Ампликоны, полученные в ходе асимметричной ПЦР гена Hfe человека (ген гемохроматоза), также были генотипированы на основе пониженной термостабильности ДНК с однонуклеотидными заменами. Последовательности (fas, p53, box, p21 и bcl-2) гена, регулирующего апоптоз, полученные обратной транскрипцией из суммарной РНК лейкоцитов с последующей амплификацией асимметричной ПЦР, определяли с помощью ДНК-чипа (массив электродов). Для увеличения скорости и точности определения однонуклеотидных замен, использовали две разные сигнальные

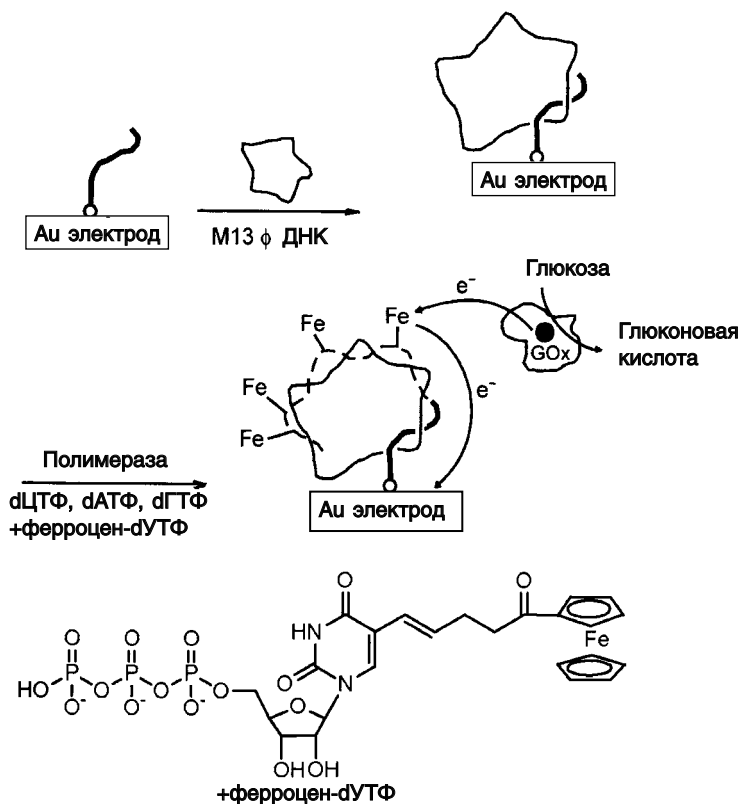


Рис. 9.12. Введение ферроцена в комплементарную цепь ДНК фага M13 с помощью ПЦР на электроде с последующим электрохимическим детектированием на основе медиаторной реакции ферроцена [65]

последовательности, меченные ферроценами, для последовательности дикого типа и мутантной, характеризующиеся разными редокс-потенциалами. Этот подход нашел коммерческое применение как CMS e-sensor™ компании Motorola Inc. Там был получен амид, содержащий ферроцениладениновое основание, и синтезирован мультиферроцен-меченный ДНК-зонд на ДНК-синтезаторе.

Альтернативный способ введения нескольких ферроценовых групп в целевую ДНК основан на сильном биотин-авидиновом взаимодействии [67]. Биотинилированный ДНК-зонд иммобилизуют на электроде с помощью гибридизации с целевой ДНК, как показано на рис. 9.14. Далее к этому комплексу добавляют авидин и биотинилированные наночастицы золота, несущие несколько ферроценовых групп. Количество анализируемой ДНК определяется по редокс-потенциалу этих ферроценовых групп.

В работе [66] Фэн и др. предложили способ определения ДНК с помощью олигонуклеотидов, меченных ферроценовыми и тиоловыми группами на обоих (5', 3') концах. Принцип этого метода представлен на рис. 9.15.

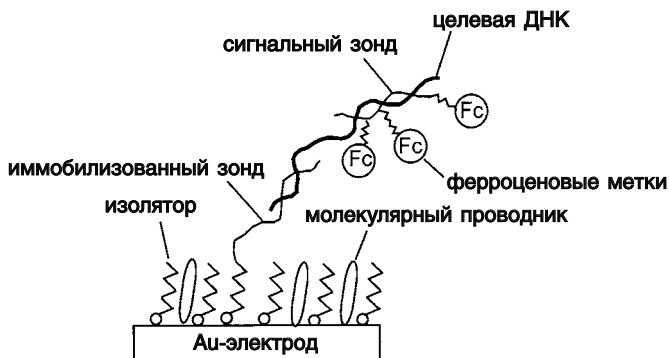


Рис. 9.13. Электрохимическое определение ДНК биосенсором на основе сэндвич-анализа. Целевая ДНК образует комплекс с ДНК-зондом, иммобилизованным на электроде, и ферроцен-меченым сигнальным ДНК-зондом [58]. Молекулы олигофенилацетилена с тиольной группой на конце выполняют роль проводника и обеспечивают перенос электрона между фрагментами ферроцена и золотым электродом. Этиленгликоль с алкантиольными группами на конце служит в качестве изолятора, блокируя доступ редокс-соединений, находящихся в растворе, к электроду, включая свободные сигнальные зонды ДНК

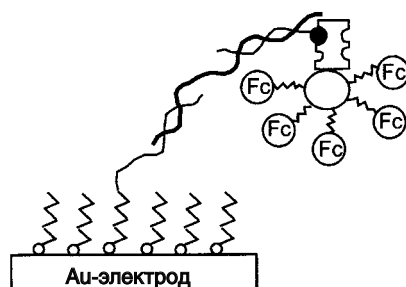


Рис. 9.14. Схематическое изображение усиленного электрохимического детектирования гибридизации ДНК посредством окисления ферроценовых групп на поверхности наночастиц золота, конъюгированных с авидином [67]

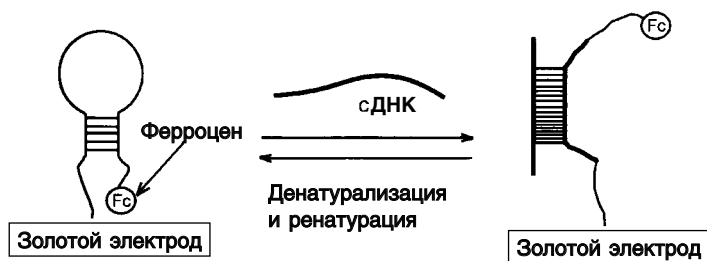


Рис. 9.15. Локализация ферроцена в непосредственной близости от поверхности золотого электрода посредством шпильчатой структуры ДНК. При гибридизации с целевой ДНК шпильчатая структура нарушается, и расстояние между ферроценом и электродом увеличивается [66]

Олигонуклеотидная проба обладает комплементарными последовательностями на концах, в результате образуется шпильчатая структура, у которой один конец тиольной группой связывается с золотым электродом, а ферроценовая группа на другом конце ДНК-зонда оказывается в непосредственной близости от поверхности электрода. В результате редокс-реакции ферроценовых групп наблюдается ток. При гибридизации целевой ДНК расстояние между ферроценом и электродом увеличивается, что приводит к уменьшению тока. Такая система не зависит от лиганда и представляет собой удобный способ детектирования генов.

9.6. Заключение

Комплексы металлов могут быть использованы в качестве электрохимически активных ДНК-связывающих лигандов, так как их обратимые редокс-превращения более стабильны по сравнению с превращениями других органических лигандов, применяемых для электрохимического детектирования ДНК. Кроме того, металлокомплексы, обладающие разными редокс-потенциалами, легко могут быть синтезированы с использованием молекулярного дизайна. Эта особенность обеспечивает преимущества использования металлокомплексов в электрохимических ДНК/гено-сенсорах, такие как производительность, высокая чувствительность и низкая стоимость. С недавних пор в результате успешного осуществления проекта по секвенированию генома человека, ДНК-чипы применяются для генной диагностики болезней. Электрохимический ДНК-чип на основе комплексов металлов, состоящий из множества электродов, расположенных на небольшой поверхности, как ожидается, будет использоваться для этих диагностических целей. Концепция электрохимического ДНК-чипа может быть успешно использована в других биочипах, таких как белковые или углеводные чипы.

Литература

1. B. Eggins, *Biosensors: An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd, New York, **1997**.
2. S. Takenaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, 74, 217–224.
3. E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 75A–83A.
4. E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, V. Vetterl, in G. S. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Electrochemistry*, Vol. 9, Bioelectrochemistry, Wiley-VCH, **2002**, pp. 365–429.
5. I. Willner, *Science* **2002**, 298, 2407–2408.
6. F. Lucarelli, G. Marrazza, A. P. F. Turner, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 515–530.
7. T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotech.* **2003**, 21, 1192–1199.
8. H. Berg, in S. Srinivasan, Y. J. Chizmadznev, O. M. Bockris, B. E. Conway, E. Yeager (Eds.), *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, Plenum Press, New York. **1985**, pp. 189–229.
9. E. Palecek, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1986**, 15, 275–295.

10. D.-W. Pang, Y. P. Qi, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng, J.-W. Wang, *Electroanalysis* **1995**, 7, 774–777.
11. E. Palecek, F. Jelen, C. Teijeiro, *Anal. Chim. Acta* **1993**, 273, 175–186.
12. E. Palecek, *Electroanalysis* **1996**, 8, 7–14.
13. M. T. Carter, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7528–7530.
14. M. T. Carter, M. Rodriguez, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8901–8911.
15. Y.-D. Zhao, D.-W. Pang, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng, Y.-P. Qi, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 431, 203–209.
16. Y. Mishima, J. Motonaka, S. Ikeda, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 345, 45–50.
17. M. Fojta, L. Havan, J. Fulneckova, T. Kubicarova, *Electroanalysis* **2000**, 12, 926–934.
18. M. Aslanoglu, C. J. Isaac, A. Houlton, B. R. Horrocks, *Analyst* **2000**, 125, 1791–1798.
19. K. M. Millan, A. J. Spurmanis, S. R. Mikkelsen, *Electroanalysis* **1992**, 4, 929–932.
20. K. M. Millan, S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2317–2323.
21. K. M. Millan, A. Saraullo, S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2943–2948.
22. J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2629–2634.
23. J. Wang, G. Rivas, X. Cai, M. Chicharro, C. Parrado, N. Dontha, A. Begleiter, M. Mowat, E. Palecek, P. E. Nielsen, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 344, 111–118.
24. J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Hiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. Farias, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7667–7670.
25. T. W. Welch, A. H. Corbett, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 11757–11763.
26. D. H. Johnston, K. C. Glasgow, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8933–8938.
27. T. W. Welch, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13829–13836.
28. M. E. Napier, C. R. Loomis, M. F. Sistare, J. Kim, A. E. Eckhardt, H. H. Thorp, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 906–913.
29. M. E. Napier, H. H. Thorp, *Langumir* **1997**, 13, 6342–6344.
30. P. M. Amistead, H. H. Thorp, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 558–564.
31. S. O. Kelly, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem. Intern. Eng. Ed.* **1999**, 3S, 941–945.
32. S. Takenaka, Y. Uto, H. Saita, M. Yokoyama, H. Kondo, W. D. Wilson, *Chem. Comm.* **1998**, 1111–1112.
33. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1334–1341.
34. S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637–639, 476–483.
35. H. Miyahara, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Trans. IEE of Jpn.* **2001**, 121E, 187–191.
36. S. Takenaka, H. Miyahara, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, *Nucleosides, Nucleotides of Nucleic Acids* **2001**, 20, 1429–1432.
37. H. Miyahara, K. Yamashita, M. Kanai, K. Uchida, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Talanta* **2002**, 56, 829–835.
38. K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Chem. Lett.* **2000**, 1038–1039.
39. S. Takenaka, Y. Uto, M. Takagi, H. Kondo, *Chem. Lett.* **1988**, 989–990.
40. K. Yamashita, M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo, S. Takenaka, *Analyst* **2001**, 126, 1210–1211.
41. K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Biochem.* **2002**, 306, 188–196.

42. K. Yamashita, A. Takagi, M. Takagi, H. Kondo, Y. Ikeda, S. Takenaka, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 1193–1199.
43. T. Nojima, K. Yamashita, M. Takagi, A. Takagi, Y. Ikeda, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Sci.* **2003**, 19, 79–83.
44. J. K. Barton, A. T. Danishefsky, J. M. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 206, 2172–2176.
45. S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 138–143.
46. C. J. Waybright, C. P. Singleton, J. M. Tour, C. J. Murphy, U. H. F. Bunz, *Organometallics* **2000**, 19, 368–370.
47. S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, M. Takagi, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 436–443.
48. T. Ihara, Y. Maruo, S. Takenaka, M. Takagi, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4273–4280.
49. Y. Uto, H. Kondo, M. Abe, T. Suzuki, S. Takenaka, *Anal. Biochem.* **1997**, 250, 122–124.
50. K. B. Jacobson, H. F. Arlinghaus, H. W. Schmitt, R. A. Sacleben, G. M. Brown, N. Thonnard, F. V. Sloop, R. S. Foote, F. W. Larimer, R. P. Woychik, M. W. England, K. L. Burchett, D. A. Jacobson, *Genomics* **1991**, 9, 51–59.
51. F. V. Sloop, G. M. Brown, R. A. Sacleben, M. L. Garrity, J. E. Elert, *New J. Chem.* **1994**, 18, 317–326.
52. R. C. Mucic, M. K. Herrlein, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Chem. Comm.* **1996**, 555–557.
53. C. Xu, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 411, 31–36.
54. A. E. Beilstein, M. W. Grinstaff, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637–639, 398–406.
55. S. A. Brazill, P. H. Kim, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4882–4890.
56. C. J. Yu, H. Wang, Y. Wan, H. Yowanto, J. C. Kim, L. H. Donilon, C. Tao, M. Strong, Y. Chong, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2937–2942.
57. C. J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M. D. James, C. L. Tan, G. F. Blackburn, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11155–11161.
58. R. M. Umek, S. W. Lin, J. Vielmetter, R. H. Terbrueggen, B. Irvine, C. J. Yu, J. F. Kayyem, H. Yowanto, G. F. Blackburn, D. H. Farkas, Y.-P. Chtn, *J. Mol. Diagn.* **2001**, 3, 74–84.
59. A. Anne, A. Bouchardon, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1112–1113.
60. Y.-T. Long, C.-Z. Li, T. C. Sutherland, M. Chahma, J. S. Lee, H.-B. Kraatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8724–8725.
61. A. Anne, B. Blanc, J. Moiroux, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 396–405.
62. S. A. Brazill, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3421–3428.
63. S. A. Brazill, N. E. Hebert, W. G. Kuhr, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2749–2757.
64. W. A. Wlassoff, G. C. King, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, e58 (1–7).
65. F. Patoisky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770–772.
66. C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *PNAS* **2003**, 100, 9134–9137.
67. J. Wang, J. Li, A. J. Baca, J. Hu, F. Zhou, W. Yan, D.-W. Pang, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3941–3945.

10

Процессы супрамолекулярного распознавания «хозяина» природными соединениями, металлоорганическими лекарственными препаратами и щелочными металлами в качестве «гостя»

Р. Фиш (Richard H. Fish, University of California, Laurence Berkeley National Institute, USA)

10.1. Введение

Супрамолекулярные взаимодействия, которые включают с себя распознавание, реакции, транспорт и т. д. – фундаментальные явления в биологических системах, некоторые из множества процессов между биологически важными молекулами, такими как двойные и одинарные цепочки ДНК/РНК и белки, лекарства и метки на основе ионов металлов [1]. Химики-органики стали также придавать большое значение этому уникальному феномену. Для изучения роли данных взаимодействий было синтезировано много супрамолекулярных молекул-«хозяев», которые исследовались путем молекулярного распознавания «гостей», таких как нуклеозиды, нуклеотиды, аминокислоты, пептиды и малые органические молекулы, в основном за счет нековалентных водородных связей, π - π - и гидрофобных взаимодействий [2].

Удивительно, что было предпринято мало попыток изучения молекулярного распознавания металлоорганических «хозяев», в то время как большинство работ было посвящено неорганическим системам [3]. Подходящим примером металлоорганических соединений «хозяев» служили палладийорганические макроциклиды, синтезированные Лозбом и др. [3а], которые распознают нуклеиновые основания путем одновременной координации первой и второй сферы, т. е. σ -донирования на Pd и водородного связывания с гетероатомами макроцикла. Важно отметить, что последние исследования в области химии «гость – хозяин» были выполнены в *неводной* среде, преимущественно из-за нестабильности макроциклических металлоорганических «хозяев» в воде или из-за их недостаточной растворимости. Кроме того, хиральные металлопорфириновые органические рецепторы, которые изучались в органических растворителях, преимущественно связывались с аминокислотами [36]. Стэнг и др. синтезировали серию платиновых и палладиевых макроциклических с квадратной

геометрией для изучения комплексообразования «гость – хозяин» также в органических растворителях с использованием, например, дигидроксинафталена [3в]. Важный обзор по неорганической и металлоорганической химии «гость – хозяин» был опубликован Кэнэри и Гиббом [3з].

Среди ограниченного количества изученных неорганических и металлоорганических супрамолекулярных «хозяев» [3] ни один, однако, не был построен путем введения нуклеиновых оснований, нуклеозидной или нуклеотидной молекулы как ключевых компонентов решетки «хозяина».

Не так давно Фиш и др. сообщили о молекулярном распознавании ароматических и алифатических аминокислот, а также ароматических и алифатических карбоновых кислот-«гостей» при помощи Cr^*Rh -нуклеотидных циклических тримерных «хозяев», таких как **1**, в водном растворе при pH 7 [4а–г].

Этот тип химии «гость – хозяин» в водном растворе очень важен, так как считается, что он мог бы рассматриваться как простейшая модель взаимодействия между ДНК/РНК и связывающимися с ними белками, такими как те, что управляют генами. Более того, нековалентный гидрофобный эффект наиболее полно проявляется в воде, где сольватобонные силы усиливают взаимодействия «гость – хозяин» [5].

В этой главе будут рассмотрены наши исследования по молекулярному распознаванию с помощью двух металлоорганических «хозяев» на примерах различных «гостей», от ароматических и алифатических аминокислот до замещенных ароматических и алифатических карбоновых кислот, а также ди- и трипептидов (табл. 10.1), определяя при этом важность π - π - и гидрофобного эффектов и водородных связей как функции стерических, электронных и конформационных параметров, значений K_a (константы ассоциации) и ΔG° (свободных энергий образования). Более того, будут представлены новые супрамолекулярные металлоорганические комплексы как модели для ионофоров, биологических макроциклических лигандов, которые селективно связывают и переносят ионы щелочных металлов (Na^+ и Li^+) [6]. Наконец, будет рассмотрено, как с помощью рентгеновского структурного анализа были полностью охарактеризованы структуры протеинов гормональных рецепторов – эстрогенного рецептора и $\text{ER}\alpha$, эстрадиол-связывающего сайта, которые, очевидно, играют ключевую роль в распространении рака груди [4г]. Докинг-эксперименты с металлоорганическими лекарствами показывают значительные изменения в ключевых спиралевидных белках в сайте эстрогенного рецептора и $\text{ER}\alpha$ в сравнении с гидрокситамоксифеном, лекарством, которое используется для лечения рака груди. Далее будет рассмотрено, какое отношение имеют эти конформационные изменения к антагонисту и к цитотоксичной активности.

10.2. «Хозяин»-1

10.2.1. Синтез, структура и устойчивость в водной среде

«Хозяин»-1 (рис. 10.1, *слева* – модель Дрейдинга, вид сбоку), полусферическая СРК-модель (*справа* – вид снизу) был получен ранее в процессе самосборки, включающей реакцию $[\text{Cr}^*\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_3](\text{OTf})_2$ с 2'-дезоксиаденозином

при pH 10,5 [4a–г]. Тример **1** является смесью диастереомеров, в то время как ранее методом рентгеновской дифракции была исследована структура монокристалла энантиомера 9-метиладенинового производного циклического тримера. Было показано, что он имеет трехгранную куполообразную структуру, в которой три Cr-группы вытянуты в сторону от вершины купола, три метильные группы направлены к дну, три адениновые плоскости образуют окружающую оболочку, а три атома родия встроены в вершину купола (рис. 10.2) [4a, г]. Молекула также имеет ось C_3 , которая проходит от вершины купола до его дна. Расстояние между соседними метильными группами в основании купола, т. е. на входе в полость этого молекулярного рецептора,

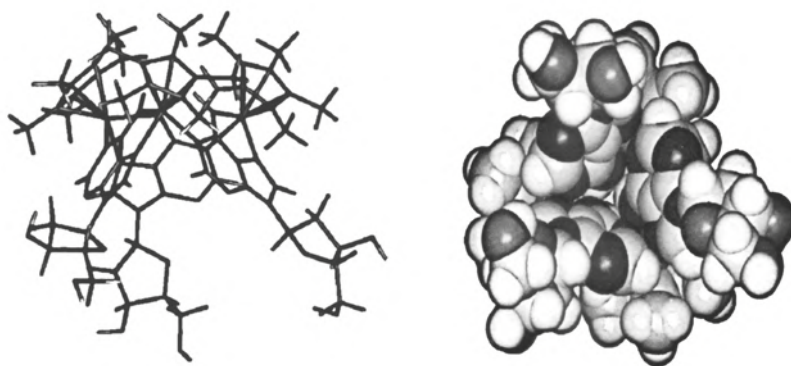


Рис. 10.1. $[\text{Cr}^*\text{Rh}(2'\text{-деоксиаденин})]_3(\text{OTf})_3$, **1**

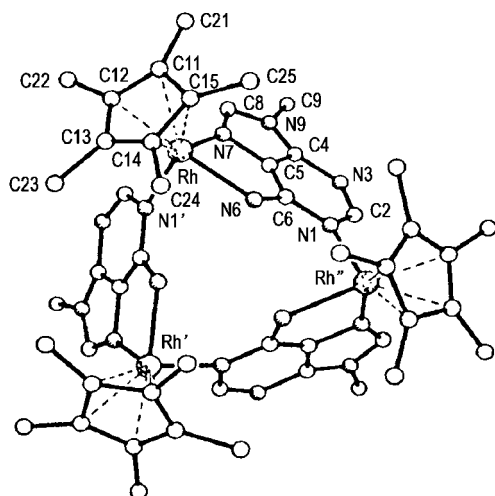


Рис. 10.2. Молекулярная структура $[\text{Cr}^*\text{Rh}(\mu\text{-}\eta^1(\text{N}1):\eta^2(\text{N}6,\text{N}7)\text{-9-метиладенин})]_3(\text{OTf})_3$, установленная методом PCA

около 7,5 Å, тогда как глубина полости зависит от заместителя в положении N9 нуклеинового основания, нуклеозиды или нуклеотиды и равна около 4 Å.

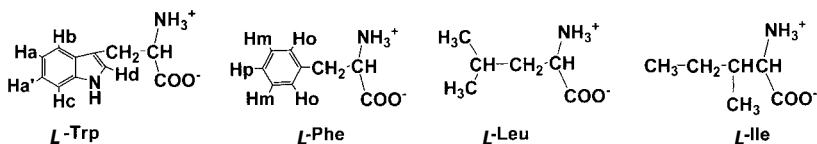
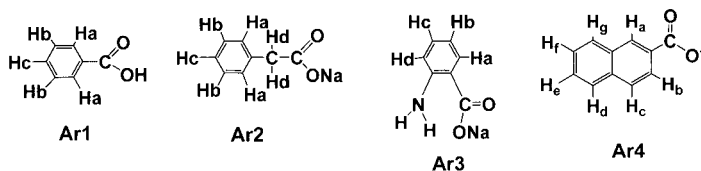
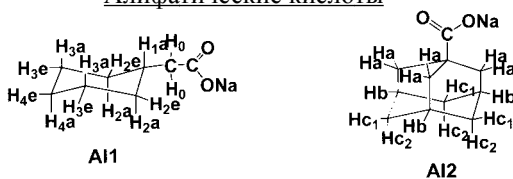
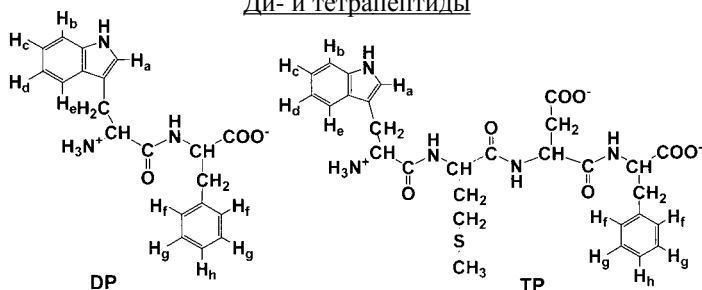
Эти производные Cr^*Rh циклических тримеров довольно стабильны в водном растворе, например комплекс **1** регистрировали с помощью ^1H -ЯМР спектроскопии в течение двух недель при pH 6–9, при этом не наблюдалось видимых признаков его разложения [4а, б]. Поэтому все критические параметры для химии «гость – хозяин», такие как форма супрамолекулярной чаши, большой размер полости и стабильность в воде циклических тримеров Cr^*Rh -нуклеиновое основание/нуклеозид, нуклеотид дали возможность использовать их в качестве молекулярных рецепторов для распознавания подходящих биологических молекул в водной среде при физиологических значениях pH 7 [4а, б].

10.2.2. Молекулярное распознавание ароматических и алифатических аминокислот

Для изучения молекулярного распознавания было выбрано около половины из 20 незаменимых аминокислот. В процессе выбора руководствовались несколькими критериями: (1) растворимость в воде; (2) представительность; (3) стабильность «хозяев» в присутствии аминокислот. В соответствии с этим были исключены тирозин, цистеин и метионин, так как первый нерастворим в воде, а два других по-видимому вызывают слабое разложение «хозяев». Структуры ключевых ароматических и алифатических аминокислот, ароматических и алифатических карбоновых кислот, ди- и трипептидов показаны на с. 368, также обозначены протоны, на которые влияет «хозяин»-1 [4а, б]. Значения pK_a этих аминокислот свидетельствуют о том, что они находятся в форме цвиттер-ионов, которые преобладают при pH 7 [4а, б, 7].

Процесс молекулярного распознавания разных аминокислот-«гостей» «хозяином»-1 изучался с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР при комнатной температуре [4а, б]. Химические сдвиги (CICS*) для молекул «гостей» и аминокислот-«хозяев», обусловленные комплексообразованием, использовались для распознавания нековалентных взаимодействий. Наличие сильнополюсных химических сдвигов для любых «гостей», изучаемых с помощью «хозяина»-1, служило признаком возможного взаимодействия «гость – хозяин». Варьируя концентрацию «хозяина»-1 в диапазоне 0–1 моль экв. в присутствии подходящей аминокислоты-«гостя» при постоянной концентрации 1 моль экв., мы обнаружили, что химические сдвиги для «гостей» максимальны при концентрации ~0,8–1,0 моль экв. Поэтому во всех последующих экспериментах «хозяин – аминокислотный гость» мы использовали 1 экв. каждого «хозяина» и 1,2 экв. каждого «гостя». Более того, данные показывают, что циклический тример **1** может распознавать только ароматические (*L*-Phe, *L*-Trp) и некоторые алифатические аминокислоты с относительно длинными гидрофобными боковыми цепочками (*L*-Leu, *L*-Ile), что указывает на возможность классических π - π - и/или

* Complexation Induced Chemical Shifts (англ.).

АМИНОКИСЛОТЫАроматические кислотыАлифатические кислотыДи- и тетрапептиды**Примеры «гостей» для «хозяина»-1 при исследовании молекулярного распознавания**

гидрофобных взаимодействий. Другие аминокислоты, такие как *L*-валин, *L*-глицин, *L*-гистидин, *L*-аланин и *L*-пролин (здесь не показанные), однако явно не взаимодействуют с этими «хозяевами». Важно отметить, что в спектрах ^1H -ЯМР в реакциях молекулярного распознавания для «хозяина»-1 не наблюдалось ни энантио-, ни диастереоселективности, по-видимому, все стереоизомеры реагируют схожим образом.

Эти наблюдения могут быть объяснены следующими тремя факторами:

1. Стерически размер полости «хозяина»-1 был достаточен для помещения в нее *L*-Trp без значительных затруднений, и, более того, *L*-Trp входил в полость в наиболее предпочтительной стерической ориентации. Необходимо отметить, что основная часть молекулы *L*-Trp, которая вошла в полость рецептора, представляла собой бензольное кольцо, что сходно

- с вариантом *L*-Phe, в связи с чем стерическое влияние *L*-Тгр и *L*-Phe в процессе распознавания практически одинаково.
2. Свободная электронная пара на атоме азота пятичленного гетероциклического кольца *L*-Тгр могла донировать электронную плотность на близлежащее бензольное кольцо, делая его более электронно-избыточным по сравнению с *L*-Phe. По-видимому, увеличение электронной плотности – одна из причин того, что *L*-Тгр имеет сильные π - π -взаимодействия с электронодефицитной π -системой «хозяина»-1 [26, 56].
 3. Большая гидрофобность *L*-Тгр (растворимость = 0,01 г в 1 г воды, коэффициент распределения Ганча, $\lg P_{\text{октанол}} = -1,04$), очевидно, служит еще одной важной причиной в сумме с сольватобным эффектом воды как движущей силы для этого довольно легкого процесса молекулярного распознавания. Сильное взаимодействие *L*-Тгр с **1** должно быть многокомпонентным, направляемым π - π -, гидрофобным эффектами и эффектом растворимости, так как некоторые аминокислоты, такие как *L*-Leu и *L*-Phe, имеют относительно длинные гидрофобные цепи и проявляют слабую ассоциацию с «хозяином»-1, они также более растворимы в воде по сравнению с *L*-Тгр. *L*-Глицин не взаимодействует с **1**, что тоже подчеркивает важность сольватобного эффекта.

Для нуклеозидного «хозяина»-1 роль гидроксильных групп рибозы может быть понята путем сравнения их взаимодействий с «гостями», *L*-Тгр и *L*-Phe. «Хозяин»-1 имеет одну ОН-группу на одну молекулу рибозы, и поэтому на входе в полость «хозяина» гидрофобность увеличивается, но при этом существует тонкий баланс между гидрофобностью и гидрофильностью. Еще более важным является то, что стерическая затрудненность сахара из нуклеотида может уменьшить нековалентные взаимодействия с «гостями». Например, три единицы рибозы с двумя ОН-группами и монофосфатным метиловым эфиром в положении 5' имеют склонность взаимодействовать с окружающими молекулами H_2O , и, чтобы минимизировать это нежелательное взаимодействие (десольватировать), три рибозные единицы сдвигаются близко друг к другу. Возможно, этот эффект ведет к увеличению стерической затрудненности на входе в полость «хозяина». С другой стороны, две ОН-группы на каждой рибозе должны взаимодействовать с окружающими молекулами воды и, следовательно, обеспечивать меньшие стерические затруднения на входе в полость «хозяина». Такое обоснование подтверждалось сравнением химических сдвигов для *L*-Phe, что показало наиболее высокие значения для наименее пространственно затрудненного «хозяина» и наименьшие значения для наиболее пространственно затрудненного «хозяина». В случае *L*-Тгр ситуация более сложная, так как химические сдвиги для *L*-Тгр с **1** были самыми высокими. Это можно объяснить вкладом гидрофобных свойств «хозяина», или гидрофобного эффекта комплексообразования «гость – хозяин». Как было сказано ранее, *L*-Тгр более гидрофобен по сравнению с *L*-Phe и, следовательно, именно гидрофобные взаимодействия между *L*-Тгр и **1** играют важную роль в ходе молекулярного распознавания, помимо π - π -взаимодействий и стерического эффекта на входе в полость «хозяина».

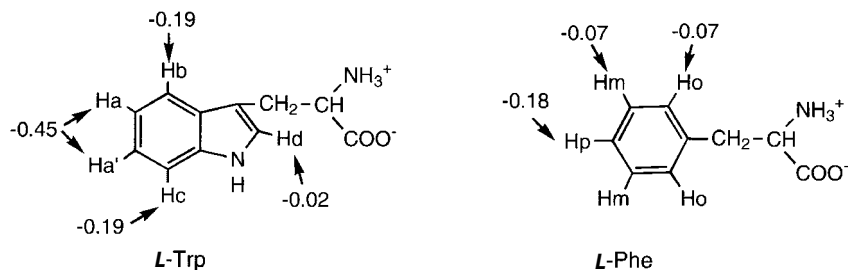


Рис. 10.3. Химические сдвиги для *L*-Trp и *L*-Phe, связанных с «хозяином»-1

С уменьшением числа ОН-групп на рибозе растет гидрофобность, но в то же время растет стерическая затрудненность. Эти два фактора, которые разнонаправленно влияют на процесс распознавания *L*-Trp, очевидно, обуславливают оптимальное взаимодействие между *L*-Trp и **1**.

На сигналы в спектре ^1H -ЯМР протонов Ha и Ha' триптофана сильно влияет «хозяин»-**1** [1a, 2, 5б], сдвиг в сильное поле составляет 0,45 м. д., в то время как сигналы двух других протонов, Hb и Hc, сдвигаются на значительно меньшую величину (0,19 м. д.). На ^1H -резонансы протона Hd пятичленного кольца, асимметрических CH_2 -протонов и протона $^*\text{C}-\text{H}$ при хиральном центре влияние незначительно (сдвиг в сильное поле равен 0,01 – 0,02 м. д.). Очевидно, что химические сдвиги «хозяина»-**1** значительно не изменяются; наблюдаются только слабые сдвиги в сильное поле – от 0,01 до 0,08 м. д. На рис. 10.3 приведены значения CICS «гостей» *L*-Trp и *L*-Phe в комплексе с «хозяином»-**1**.

На основании этих результатов можно сделать несколько заключений: (1) сторона молекулы *L*-Trp, где находятся Ha и Ha', которая может быть названа «головой гостя», глубоко проникает в полость **1** и испытывает на себе самое сильное π - π -влияние; (2) гидрофильный цвиттер-ионный конец *L*-Trp, который может быть назван «хвостом» этой молекулы, остается вне полости в контакте с H_2O и (3) очевидно, что полость **1** очень неглубока.

Эти три момента могут быть легко обоснованы, так как «голова», которая имеет самую высокую электронную плотность, весьма гидрофобна. В водном растворе этот гидрофобный конец стремится взаимодействовать с другими гидрофобными группами, такими как полость **1**, чтобы минимизировать термодинамически невыгодные взаимодействия с молекулами H_2O . С другой стороны, гидрофильный цвиттер-ионный «хвост» *L*-Trp возможно мог бы связываться водородными связями с окружающими молекулами H_2O , которые в большинстве своем находятся вне полости **1**.

Этот тип взаимодействия в воде напоминает белковые молекулы, основная часть которых гидрофильна, полярные аминокислотные остатки при контакте с водой находятся на поверхности этих биополимеров, а гидрофобные остатки в основном находятся внутри полимеров, взаимодействуя друг с другом. Наконец, глубина полости **1** может быть легко оценена с помощью модели СРК (рис. 10.1), поэтому можно судить о существенно меньшем сильнополюсном сдвиге Hb и Hc, которые не так сильно экранированы π -электронной плот-

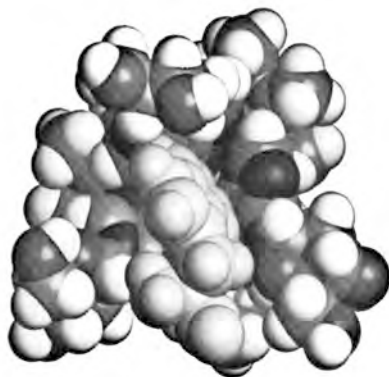


Рис. 10.4. Компьютерный докинг «хозяина»-1 с *L*-Трп

ностью «хозяина»-1, как Ha и Ha' . Такое описание процесса молекулярного распознавания *L*-Трп с помощью **1** было показано докингом *L*-Трп и модели **1** с пространственным заполнением и минимальной энергией (рис. 10.4).

Полученные результаты позволяют предположить, что молекулярное распознавание *L*-Трп с помощью **1** может быть описано следующим образом: ароматические кольца *L*-Трп располагаются внутри полости «хозяина», взаимодействуя с ароматической плоскостью, или более точно, по линии, лежащей между группами $\text{C}-\text{H}(\text{a})$ и $\text{C}-\text{H}(\text{a}')$ параллельно оси C_3 «хозяина»-1.

Для того чтобы подтвердить эти выводы была оценена константа ассоциации (K_a) для комплексообразования «гость – хозяин» с использованием стандартного метода ЯМР [4а, б, 8]. Полученные значения K_a , которые включают в себя и вклад диастереомеров **1**, находятся в диапазоне $500\text{--}1000\text{ M}^{-1}$, в то время как свободные энергии комплексообразования «гость – хозяин» (значения ΔG°) находятся в диапазоне от -4 до -6 ккал/моль. Следует отметить, что *L*-Трп с его оптимизированной стерической ориентацией, электронодонорным атомом азота и гидрофобными эффектами имеет значения K_a и ΔG° с «хозяином»-1, сравнимые со значениями для *L*-Phe [4б].

Процесс молекулярного распознавания также был изучен в экспериментах по внутримолекулярному ядерному эффекту Оверхаузера (ЯЭО) с **1** и *L*-Трп. Параметр уширения линии был выставлен на значении 4 Гц для минимизации ошибки при вычитании. При облучении атома Н8 молекулы **1**, наблюдались слабые отрицательные сигналы внутримолекулярного ЯЭО ароматических протонов Ha , Ha' , Hb и Hc . Важно отметить, что не был обнаружен сигнал внутримолекулярного ЯЭО между **1** и растворителем D_2O , что исключает возможность представления данных ЯЭО как артефакта. Считалось, что средние значения констант ассоциации ($K_a = 607$) для **1** и *L*-Трп по сравнению с литературными [2а, 2и, 3б] – от 10 до 10^6 M^{-1} – были частично ответственны за слабые сигналы внутримолекулярного ЯЭО. Отрицательные сигналы внутримолекулярного ЯЭО для протонов $\text{H1}'$, H2 , $\text{H2}'$, $\text{H2}''$, $\text{H3}'$ и $\text{H4}'$ также наблюдались при облучении Н8, а интенсивности этих сигналов варьировались в зависимости от расстояний до Н8. Похожие результаты были получены при облучении протона Н2 «хозяина»-1.

10.2.3. Молекулярное распознавание замещенных ароматических карбоновых кислот

Три замещенные ароматические карбоновые кислоты, *о*-, *м*- и *п*-аминобензойные кислоты, были выбраны в качестве «гостей» для расширения границ наших экспериментов по молекулярному распознаванию при взаимодействии с **1**. Все три «гостя» имеют одинаковые функциональные группы, а именно, электронодонорную NH_2 -группу и электроноакцепторную COO^- -группу, однако, они находятся на разных расстояниях друг от друга (позиционные изомеры). При pH 7 в соответствии со значениями pK_a в растворе преобладают анионные формы *о*-, *м*- и *п*-аминобензойных кислот [4а, б]. Химические сдвиги для этих трех «гостей» при взаимодействии с «хозяином»-**1** представлены на рис. 10.5, сильнополюсные химсдвиги отмечены на структурах молекул, расстояния между NH_2 и COO^- -группами указаны в ангстремах.

Интересно, что небольшие изменения в замещении дают очень разные значения CICS и взаимосвязанные значения K_a и ΔG° из-за π - π - и гидрофобных взаимодействий с **1**. Наибольшие значения CICS для *о*-(Hc) и *м*-(Hc) в 14 и 7 раз больше значения для *п*-(Ha). Это может быть объяснено стерическими эффектами «гостей», так как двум гидрофильным функциональным группам, которые образуют водородные связи с водой, нужно избежать нежелательного контакта с гидрофильной полостью **1**. Более того, водородные связи с водой определяют ориентацию *о*-, *м*- и *п*-аминобензойных кислот, а также то, как они подходят к «хозяину»-**1**; внутрь полости **1** скорее всего входит гидрофобный конец «гостей». Поэтому «гости», такие как Ar3 , в которых гидрофобные фрагменты сильно выступают, должны иметь самые высокие значения CICS, что и наблюдается в эксперименте. Изучение молекулярного моделирования подтверждает, что расстояния между аминным атомом N и карбоксилатным атомом O для *о*-, *м*- и *п*-аминобензойных кислот равны 1,85, 4,98 и 6,87 Å соответственно. С увеличением расстояния между этими группами в ряду *о*-, *м*- и *п*-аминобензойных кислот сильно увеличивается стерическая затрудненность и в то же самое время уменьшается доступность гидрофобных фрагментов молекулы.

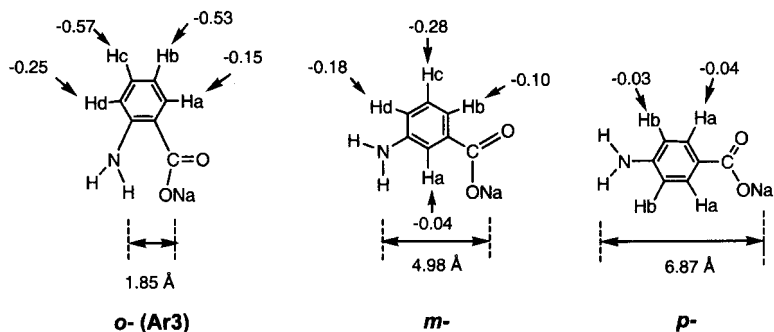


Рис. 10.5. Значения CICS для *о*-, *м*- и *п*-аминобензойных кислот при взаимодействии с «хозяином»-**1**

10.2.4. Молекулярное распознавание ароматических и алифатических карбоновых кислот

Три ароматические карбоновые кислоты, бензойная (Ar1), фенилуксусная кислота (Ar2) и 4-метоксифенилуксусная, были выбраны как «гости» для измерения глубины проникновения в молекулу «хозяина»-1, две алифатические карбоновые кислоты, циклогексилуксусная (Al1) и 1-адамантанкарбоновая кислоты (Al2), также были использованы для дальнейшего изучения важности гидрофобных эффектов в процессе молекулярного распознавания с помощью «хозяина»-1. В соответствии со значениями pK_a все три карбоновые кислоты при pH 7 существуют в виде анионов [4a, б]. Значения CICS для трех «гостей» (Ar1, Ar2 и 4-метоксифенилуксусной кислот) представлены в виде, сходном с описанным выше для замещенных ароматических карбоновых кислот (рис. 10.6).

Очевидно, что значения CICS для Ar1 и Ar2 практически одинаковы. Это подтверждает тот факт, что дополнительная CH_2 -группа между бензольным кольцом и карбоксильной группой имеет очень малое влияние на π - π /гидрофобный процесс распознавания или вообще его не имеет. CH_2 -группа близка к гидрофильной группе «гостя» и поэтому не вовлекается в процесс молекулярного распознавания. Значения CICS для 4-метоксифенилуксусной кислоты, которая имеет группу CH_3O в положении 4, сильно отличаются от значений для Ar1, Ar2. Значения CICS для 4-метоксифенилуксусной кислоты при взаимодействии с «хозяином»-1 равны $-0,36$, $-0,12$, $-0,03$ и $-0,02$ м. д. для Hc (метил), Hb (ароматический), Ha (ароматический) и Hd (CH_2) протонов соответственно. Малые значения CICS для ароматических протонов *n*-метоксифенилуксусной кислоты свидетельствуют о том, что гидрофобное взаимодействие – основной эффект распознавания, в то время как π - π -стэкинг имеет меньший вклад в этом примере молекулярного распознавания. Этот результат также показывает, что полость «хозяина»-1 неглубокая, что согласуется со значением оцененной глубины ≈ 4 Å.

Хотя структура «гостя» Ar2 похожа на структуру *L*-Phe, значения CICS для их комплексов с «хозяином»-1 сильно отличаются. Эта разница может быть объяснена рассмотрением их гидрофильных концов. «Гость» *L*-Phe имеет две

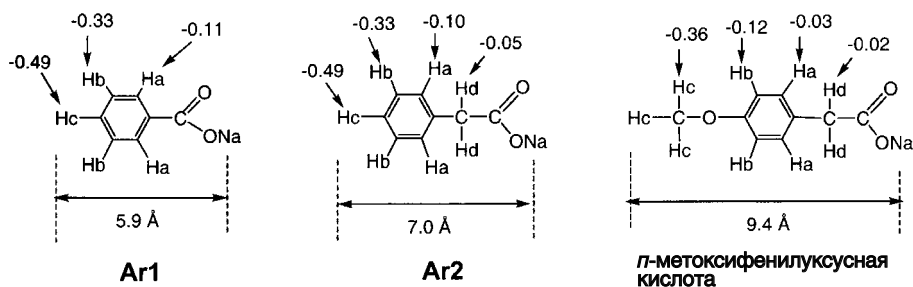


Рис. 10.6. Значения CICS для Ar1, Ar2 и 4-метоксифенилуксусной кислот с «хозяином»-1

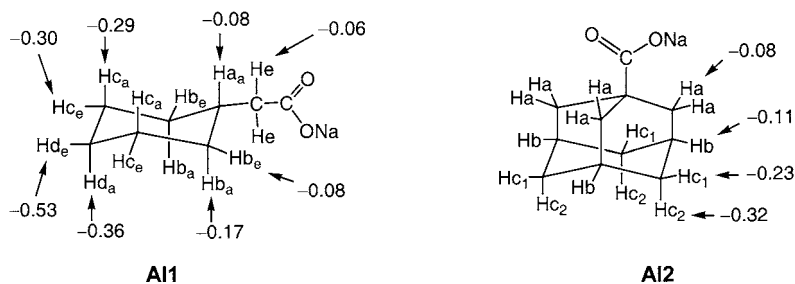


Рис. 10.7. Значения CICS для Al1 и Al2 в комплексах с «хозяином»-1

гидрофильные функциональные группы, в то время как Ar2 имеет только одну, и поэтому гидрофильный конец *L*-Phe образует более прочные водородные связи с окружающей его водой. Сильные водородные связи между *L*-Phe и H₂O должны удерживать *L*-Phe от вхождения в полость **1** слишком глубоко; очевидно, что энергии десольватации в этом случае выше.

Для алифатических карбоновых кислот Al1 и Al2 значения CICS в комплексах с «хозяином»-1 показаны на рис. 10.7.

Удивительно, что значения CICS для этих двух алифатических «гостей», особенно для Al1, сравнимы, а в некоторых случаях даже выше, чем для некоторых «гостей», ароматических карбоновых кислот. Эти данные резко отличаются от значений CICS для нескольких алифатических аминокислот, таких как *L*-Leu и *L*-Ile, которые обладают относительно длинными гидрофобными боковыми цепями. Это, в свою очередь, указывает на то, что конформация и число атомов C (гидрофобность, растворимость в H₂O) в молекулах-«гостях» очень важны для процесса молекулярного распознавания. В процессе взаимодействия «гость – хозяин» форма соединения Al1 типа «кресло» должна преобладать, будучи заблокированной в этой конформации относительно большой группой CH₃COO⁻. Следовательно, такая конформация должна быть менее стерически затрудненной, чем конформация «ванны». Процесс молекулярного распознавания Al1 с помощью **1** ($K_a \approx 760 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G^\circ = -3,9$) показан на примере докинга Al1 в объемной модели **1** с минимизированной энергией (рис. 10.8).

Для объемного и жесткого алифатического карбоксилатного «гостя» Al2 также характерны относительно большие значения CICS. Следовательно, конформационные параметры и гидрофобный эффект «гостя» важны в суммарном процессе молекулярного распознавания. Взаимодействия между Al1 и **1** ($K_a \approx 15 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G^\circ = -1,6$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ между Al1 и Al2 с **1** $\approx 2,3$ ккал/моль) могут также происходить благодаря подвижности трех 2'-дезоксирибозных групп, которые, возможно, могут вращаться, освобождая место для большого Al2. В общем, очевидный стерический эффект Al2 лимитирует этот процесс.

Для того чтобы определить относительную важность π - π - и гидрофобных эффектов в процессе молекулярного распознавания, было проведено изучение конкуренции между ароматическим «гостем» Ar2 и его аналогом, алифатическим «гостем» Al1. В ходе экспериментов концентрации обоих соединений-«гостей» были постоянными, тогда как концентрация **1** увеличивалась с 0 до 1 экв.

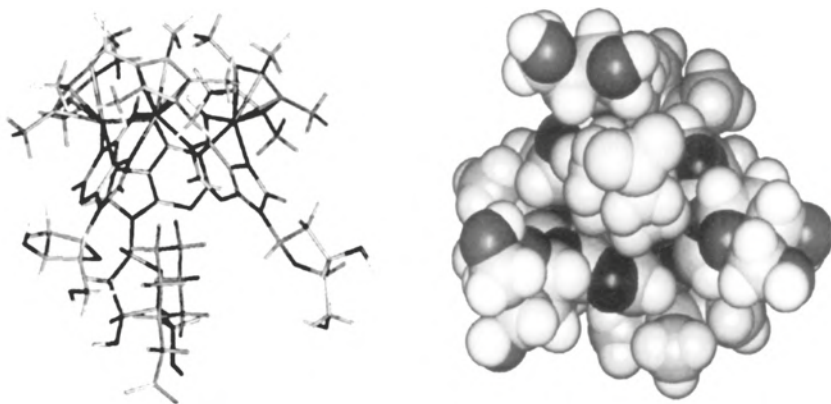


Рис. 10.8. Эксперименты по компьютерному докингу «гостя» – циклогексилуксусной кислоты и «хозяина»-1

Были выполнены также два контрольных эксперимента, в которых концентрация *одного* из «гостей» была постоянной, а концентрация **1** варьировалась. Результаты показывают похожие диаграммы в контрольном и конкурентном экспериментах для Ar2 и/или Al1, что свидетельствует о важности π - π и гидрофобного эффектов в водном растворе.

Две других молекулы-«гостя», *о*-метоксибензойная и *о*-нитробензойная кислоты, были выбраны для изучения влияния стерических и электронных эффектов различных функциональных групп в положении 2 бензойной кислоты при взаимодействии с «хозяином»-1. Значения CICS, а также значения для Ar3 и Ar1 представлены на рис. 10.9.

Ясно, что электронодонорные свойства четырех функциональных групп (показаны в квадратах), располагаются в ряду $\text{NH}_2 > \text{OCH}_3 > \text{H} > \text{NO}_2$, а порядок по стерической затрудненности: $\text{OCH}_3 \approx \text{NO}_2 > \text{NH}_2 > \text{H}$. Выгодные электронные и пространственные свойства Ar3 ($K_a \approx 810 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G^\circ = -4,0$) обеспечивают наибольшие значения CICS и следовательно высокие значения K_a и ΔG° , в то время как стерические преимущества Ar1 ($K_a \approx 710 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G^\circ = -3,9$, $\Delta(\Delta G^\circ)$ в сравнении Ar1 и Ar3 $\approx 0,1$ ккал/моль) обеспечивают увеличение значения CICS по сравнению с *о*-метоксибензойной кислотой

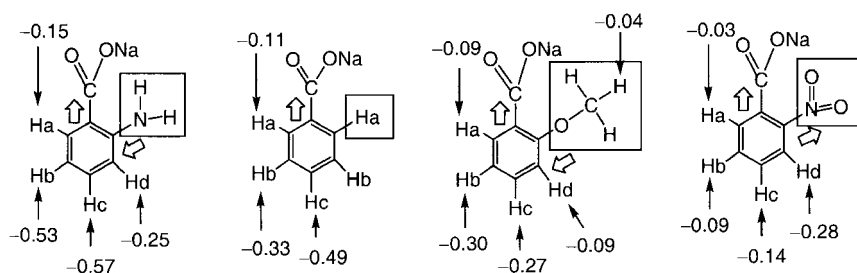


Рис. 10.9. Значения CICS для комплексов Ar1, Ar3, *о*-метоксибензойной и *о*-нитробензойной кислот с **1**

($K_a \approx 15 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G^\circ = -1,6$), несмотря на то что группа OCH_3 более электронодонорная, нежели Н. В связи с этим менее стерически затрудненные и имеющие избыточную электронную плотность ароматические «гости» должны иметь самые высокие значения CICS в процессе молекулярного распознавания.

10.2.5. Обсуждение процесса молекулярного распознавания с участием «хозяина»-1

Движущая сила нового процесса молекулярного распознавания, который мы представили в этом разделе для «хозяина»-1 (рис. 10.1) и специально созданных «гостей», (см. с. 368) напрямую связана с использованием воды в качестве растворителя. Как было четко указано Бреслоу [5a], вода максимизирует гидрофобный эффект, и энергии десольватации управляют степенью комплексообразования «гость – хозяин». Поэтому вода будет сольватировать гидрофильные концы «гостей», а десольватированный гидрофобный заместитель входит в полость «хозяина», реагируя по нековалентному типу.

Уникальная структура циклических тримерных «хозяев», которые могут быть модифицированы заместителями в положении N9 аденинового ядра, представляют собой супрамолекулярную молекулу в форме чаши с входом в полость $\sim 7,5 \text{ \AA}$, которая достаточно велика для принятия многих «гостей». Адениновые лиганды образуют внутреннюю оболочку чаши, а атомы родия в основном служат якорем для обоих куполов (Cr^*) и внутренней оболочки (аденина). Также ясно, что координационно насыщенные атомы родия в ходе процесса молекулярного распознавания являются «зрителями» и не принимают непосредственного участия в каких-либо нековалентных взаимодействиях «гость – хозяин».

Внутренняя адениновая оболочка, имея пониженную электронную плотность и образуя внутримолекулярные η^2 -связи с Cr^*Rh через N6 и N7 и межмолекулярную η^1 -связь с Rh через N1 другого аденина (механизм самоорганизации, который дает катионный Cr^*Rh циклический тримерный комплекс), могла бы взаимодействовать с ароматическими «гостями», такими как *L*-Tгp, Ar3 и *o*-метоксibenзойная кислота, которые имели электронодонорные группы. Казалось, этот результат обуславливает то, что π - π -взаимодействия преобладают в процессе молекулярного распознавания. Однако разумно модифицировав N9-заместитель 2-дезоксирибозной группой «хозяина»-1, можно усилить процесс взаимодействия «гость – хозяин» и показать, что алифатические карбоновые кислоты, такие как Al1, реагируют с «хозяином»-1 преимущественно так же, как это делают ароматические «гости», такие как *L*-Tгp, Ar3 и *n*-метоксифенилуксусная кислота. Более того, конкурентные эксперименты с Ar2 и Al1 для «хозяина»-1 послужили доказательством одинаковой важности как нековалентного π - π -, так и гидрофобного эффектов в общем процессе молекулярного распознавания.

Фиш и др. также изучили два других параметра процесса молекулярного распознавания, наряду с вышеупомянутым электронным эффектом, которые очевидно влияют на взаимодействие «гость – хозяин», а именно стерические и конформационные факторы. Важность стерического эффекта может проявиться во взаимодействии «гостей» – *o*-, *m*- и *n*-аминобензойной

кислот – с «хозяином»-1. При изменении положения заместителя с *орто*- на *мета*-, а затем и на *пара*- очень сильно уменьшается степень взаимодействия «гость – хозяин». Конформационный эффект виден при сравнении с алифатическими аминокислотными «гостями», такими как *L*-Leu и *L*-Phe, которые вероятно не реагируют с «хозяином»-1, и «гостями» Al1 и Al2, которые реагируют легко. Более того, сольватобонные эффекты не могут быть минимизированы, так как алифатические аминокислоты более растворимы в воде, их коэффициенты распределения Ганча $\lg P_{\text{октанол}}$ свидетельствуют о том, что они лучше растворяются в воде, чем в октанолу [5 б].

Таким образом, оказывается, что конформационно жесткие «гости», как было в случае с Al1 и Al2, способны к лучшему взаимодействию с «хозяином»-1, вероятно, из-за гидрофобного эффекта, хотя очевидный стерический эффект Al2 несколько ограничивает процесс молекулярного распознавания. В противоположность этому, алифатические аминокислоты *L*-Leu и *L*-Phe, *L*-глицин, валин, аланин и пролин обладают излишней конформационной подвижностью, и, что еще важнее, их повышенная растворимость в воде (по сравнению с *L*-Trp и *L*-Phe) существенно ограничивают образование комплекса «гость – хозяин». Еще раз отметим, что электронный эффект электронодонорных заместителей, например NH_2 - и *N*-гетероциклических колец, усиливают взаимодействие «гостя» с «хозяином», как это было показано на примере Ar3 и *L*-Trp. В то же время «гость» с электроноакцепторными заместителями, а именно *о*-нитробензойная кислота с NO_2 -группой в ядре бензойной кислоты, очевидно, взаимодействует с «хозяином»-1 более сложным образом. Интересно, что протон в *орто*-положении к NO_2 -группе в *о*-нитробензойной кислоте сдвинут в сильное поле в той же степени, что и *орто*-протон в «госте» Ar3, содержащем электронодонорную *о*- NH_2 -группу. Ясно, что *о*- NO_2 -группа располагается поблизости от входа в полость, и происходит это путем возможного нековалентного Н-связывания с 2'-дезоксирибозной группой, но это объяснение остается спорным по сей день.

В противоположность этому, «гость» *о*-метоксибензойная кислота с *о*- CH_3O -группой, которая имеет наибольшие стерические затруднения, будучи *орто*-замещенной, вероятно расположена по-другому, так как взаимодействие «хозяина» с «гостем» слабо влияет на протон в *орто*-положении. Последние рассуждения ясно показывают, что степень взаимодействий «гость – хозяин» – последовательность тонких изменений множества параметров, которые намного сложнее уровня нашего понимания в настоящее время.

10.2.6. Заключение, касающиеся «хозяина»-1: нековалентные взаимодействия с различными «гостями»

Фиш и др. обнаружили, что новый биометаллоорганический супрамолекулярный «хозяин»-1 может легко распознавать биологически важных «гостей» в результате множества нековалентных процессов. Сложность взаимосвязи этих процессов, а именно π - π - и гидрофобного эффектов, а также образования водородных

связей, с параметрами стерических, электронных и конформационных эффектов, и даже сольватобным эффектом в воде, указывает на необходимость дальнейших исследований этих уникальных «хозяев». Например, Фиш и др. смогли использовать «хозяина»-1 для распознавания некоторых белковых цепочек (с. 368, DP, TP) [46] с помощью концевых аминокислот через нековалентные процессы, которые мы попытались объяснить в этом разделе. Таким образом, сведения о конформации белка, полученные путем взаимодействия с супрамолекулярным биометаллоорганическим «хозяином», не должны оставаться без внимания химиков-металлооргаников, работающих в этой области.

10.3. Новый «хозяин»-2 *транс*-[Cr^{*}Rh-(η¹-(N3)-1-метилцитозин)- (μ-OH)]₂(OTf)₂

10.3.1. Молекулярное распознавание ароматическими аминокислотами: водородная связь как решающий параметр распознавания

В предыдущих разделах этой главы было описано, что процесс молекулярного распознавания включает в себя π-π-, гидрофобный и, возможно не столь очевидный, эффект образования водородных связей. Сейчас хотелось бы обсудить новый процесс молекулярного распознавания, основанный преимущественно на селективно образующихся водородных связях между «хозяином»-2 *транс*-[Cr^{*}Rh-(η¹-(N3)-1-метилцитозин)(μ-OH)]₂(OTf)₂ и несколькими примерами молекул ароматических аминокислот: *L*-триптофана, *L*-фенилаланина (*L*-Trp и *L*-Phe) в воде при pH 7,0 [2].

Структура «хозяина»-2, установленная методом РСА(рис. 10.10) [7, 8], четко показывает уникальные свойства лиганда 1-метилцитозина, связанного внутримолекулярными водородными связями с центром Rh₂(μ-OH)₂. Таким образом, μ-OH-группы действуют одновременно и как Н-доноры, и как акцепторы 2-карбонильных (OH-O=C, 1,96(1) Å) и NH₂-групп (OH-NHN, 1,93(1) Å) соответственно.

Более того, можно было предположить, что процесс межмолекулярного распознавания также основан на Н-связывании с μ-OH-группами, а группы NH₂ и C=O цитозина могли бы сопрягаться с группами NH₃⁺ и COO⁻ ароматических аминокислот без существенного нарушения состояния внутримолекулярных водородных связей, показанного на рис. 10.10.

Для определения химических сдвигов (CICS), вызванных комплексообразованием, для «гостей» и «хозяина» снова был использован метод ¹H-ЯМР. В табл. 10.1 приведены результаты с применением *L*-Trp как «гостя» в присутствии «хозяина»-2.

Для *L*-Trp действительно очевидно, что значения CICS для H_d (Δδ = -0,34), H_e (Δδ = -0,15), H_f (Δδ = -0,07), H_g (Δδ = -0,12) прямо противоположны результатам, полученным в ходе изучения процесса молекулярного распознавания

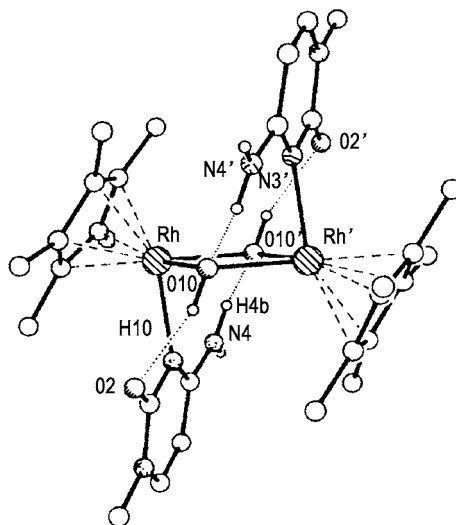
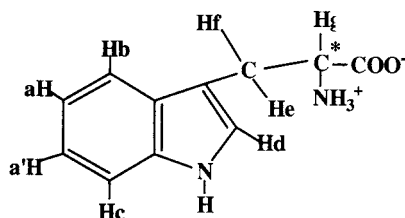


Рис. 10.10. Молекулярная структура «хозяина»-2, установленная методом PCA [7]

Таблица 10.1. CICS в процессе распознавания «гость – хозяин»^a



Свободный триптофан (δ)	Комплекс с «хозяином»-2 (δ)	Δδ
a 7,13	7,02	-0,11
a' 7,05	6,89	-0,16
b 7,58	7,16	-0,42
c 7,39	7,14	-0,25
d 7,16	6,82	-0,34
e 3,15	3,00	-0,15
f 3,34	3,26	-0,07
g 3,90	3,77	-0,12

^a Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H при pH 7,0, 300 МГц, соотношение «хозяин – гость» равно 1 : 1

с использованием Cr^*Rh -2'-деоксиаденозинового циклического тримера, когда не наблюдалось сильнополюсных CICS для этих протонов. В том процессе было обнаружено, что индольное кольцо находится внутри гидрофобного рецептора, тогда как гидрофильные группы NH_3^+ и COO^- ароматических аминокислот

находятся в водной среде, а магнитная анизотропия внутренней оболочки адеинозных лигандов «хозяина» не влияет на хиральный центр C–H, связанный с этими группами, так же как и на соседнюю CH₂-группу.

Более важно то, что также наблюдались два набора сигналов для лиганда «хозяина» 1-метилцитозина, связанного с Cr^{*}Rh, группы N–CH₃, протонов H₅ и H₆. Значение CICS для одного из 1-метилцитозиновых лигандов, теперь уже очевидно асимметрического, было похоже на значение для комплекса **2**, в то время как другой имел сдвиг CICS в сильное поле для N–CH₃ ($\Delta\delta = -0,41$), H₅ ($\Delta\delta = -0,31$), H₆ ($\Delta\delta = -0,18$). Ясно, что на значения CICS для одного из 1-метилцитозиновых лигандов влияли нековалентные взаимодействия с индольным кольцом *L*-Trp и наоборот. Таким образом, правдоподобным является то, что первичный процесс взаимодействия «гость – хозяин» ведет свое происхождение от процесса H-связывания групп NH₃⁺ и COO[–] с **2**, усиливая нековалентные взаимодействия 1-метилцитозинового лиганда с *L*-Trp.

Для того чтобы лучше понять эти H-связывающие и нековалентные взаимодействия между «гостем» и «хозяином», Фиш и др. провели эксперименты по компьютерному докингу с целью получения объемной/шаро-стержневой модели **2** с минимальной энергией с шаро-стержневой моделью «гостя» *L*-Trp, как показано на рис. 10.11 (см. цветную вклейку). Верхняя часть на рис. 10.11 демонстрирует H-связывание группы NH₃⁺ с одним μ-O и группой C=O одного из 1-метилцитозиновых лигандов, в то время как COO[–]-группа образует водородную связь с NH₂-группой 1-метилцитозинового лиганда. Эта схема H-связывания **2** с *L*-Trp обеспечивает тот результат, что оставшаяся структура «гостя» зафиксирована относительно «хозяина», как показано на средней и нижней части рис. 10.11.

В связи с этим индольная группа расположена ортогонально к плоскости 1-метилцитозиновых лигандов «хозяина»-**2**, селективно влияя на одну из двух 1-метилцитозиновых групп, отвечая тем самым за асимметричность лиганда. При этом наблюдаются сильнополюсные сдвиги CICS. На рис. 10.11 также представлена возможная причину того, что эффекты CICS более заметно влияют на H_b, чем на H_f (табл. 10.1). Интересно отметить также заметный сильнополюсный сдвиг для H_d ($\Delta\delta = -0,34$), который приписывается близости к одному из Cr^{*}-лигандов, реализуемой путем возможного CH–π-нековалентного взаимодействия (средняя часть рис. 10.11). Более того, потенциально асимметрические группы Cr^{*}Rh проявляются в спектре ЯМР, даже если азотсодержащее кольцо индольного ядра оказывается отчасти ортогональным одному из Cr^{*}-лигандов.

Далее Фиш и др. изучили поведение *L*-фенилаланина (*L*-Phe) во взаимодействии с «хозяином»-**2** (табл. 10.3) и обнаружили поразительную разницу в значениях CICS для 1-метилцитозиновых лигандов, которая совершенно не походила на данные для *L*-Trp. В присутствии *L*-Phe для 1-метилцитозиновых лигандов наблюдались относительно меньшие значения CICS. Взаимодействие «гостя» с «хозяином» не сильно повлияло на один из 1-метилцитозиновых лигандов, значения сильнополюсных хмсдвигов для протонов N–CH₃, H₅ и H₆ были невысоки и составляли $\Delta\delta \approx 0,017$ (табл. 10.2). Протоны N–CH₃, H₅ и H₆ другого 1-метилцитозинового лиганда имели сильнополюсные сдвиги $\Delta\delta = -0,11$, $-0,01$ и $-0,09$, соответственно (табл. 10.3).

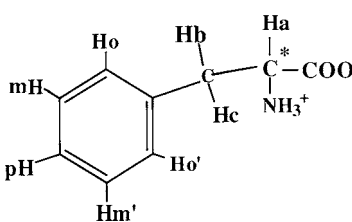
Таблица 10.2. Данные спектроскопии ЯМР ^1H для «хозяина»-2 с «гостями» *L*-Trp и *L*-Phe^a

2

Свободный «хозяин»-2 (δ)		«Гость» <i>L</i> -Trp (δ)				«Гость» <i>L</i> -Phe (δ)			
		$\Delta\delta$		$\Delta\delta$		$\Delta\delta$		$\Delta\delta$	
N-CH ₃	3,24	2,83	-0,41	3,22	-0,02	3,23	-0,01	3,13	-0,11
H6	7,44	7,26	-0,18	7,41	-0,03	7,42	-0,02	7,35	-0,09
H5	5,83	5,52	-0,31	5,81	-0,02	5,81	-0,02	5,82	-0,01
Cr*	1,46	1,35	-0,12	1,35	-0,12	1,40	-0,06	1,40	-0,06

^a Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H при pH 7,0, 300 МГц, соотношение «хозяин – гость» равно 1:1

Таблица 10.3. CICS в процессе распознавания «гость-хозяин»^a

			
Свободный <i>L</i> -Phe (δ)	Взаимодействие с «хозяином»-2 (δ)		$\Delta\delta$
a 3,85	3,79		-0,07
b 2,98	2,69		-0,29
c 3,15	2,73		-0,42
o, o' 7,13	6,84		-0,35
m, m' 7,271	6,91		-0,36
p 7,273	7,00		-0,28

^a Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H при pH 7,0, 300 МГц, соотношение «хозяин – гость» равно 1:1

На рис. 10.11 (внизу) представлены результаты экспериментов по докингу **2** и *L*-Phe. Ясно, что происходит сходный процесс Н-связывания NH_3^+ -группы с одним из атомов кислорода ассоциата $\text{Rh}(\mu\text{-OH})$ и группой $\text{C}=\text{O}$ одного из 1-метилцитозиновых лигандов, тогда как взаимодействие группы COO^- с NH_2 -группой на основании структуры с минимальной энергией, показанной вверху на рис. 10.11, считалось само собой разумеющимся. Критический аспект взаимодействия «гость – хозяин», по аналогии с протоном азотного кольца H_d в *L*-триптофана, состоял в том, что протоны H_r , H_m и H_o при 7,273, 7,271 и 7,19 ΔD были сдвинуты в сильное поле, $\Delta\delta = -0,28$, $-0,36$ и $-0,35$, соответственно (табл. 10.3).

Ясно, что ароматические протоны «гостя» *L*-Phe сдвигаются в более сильное поле из-за близости как к $\text{C}=\text{O}$ -группе 1-метилцитозина, так и к Cr^* -лигандам. Также необходимо отметить, что сигналы диастереотопных протонов CH_2 -группы также весьма значительно сдвигаются в сильное поле на величину $\Delta\delta = -0,29$ и $-0,42$ соответственно. При этом наблюдается только один сигнал Cr^* -лиганда, который также смещается в сильное поле на величину $\Delta\delta = -0,06$, аналогично тому, что наблюдалось в комплексе «гость – хозяин» соединения **2** с *L*-Tyr.

10.3.2. Заключение, касающиеся молекулярного распознавания «хозяином»-2

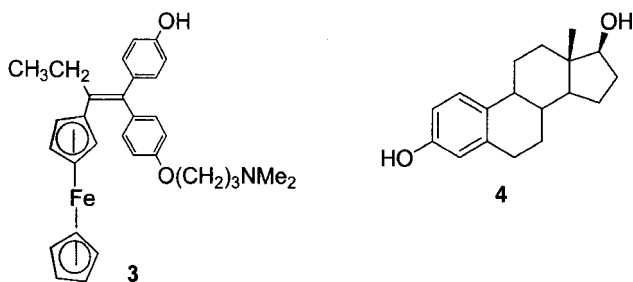
В этом разделе приведены примеры нового процесса биометаллоорганического распознавания «хозяином»-2 нескольких ароматических аминокислот-«гостей». Данный процесс определяется селективным образованием в воде при pH 7,0 водородных связей между NH_3^+ - и COO^- -группами ароматических аминокислот, *L*-Tyr и *L*-Phe с атомом кислорода одного из $\text{Rh}(\mu\text{-OH})$ -фрагментов, а также между $\text{C}=\text{O}$ - и NH_2 -группами 1-метилцитозина, являющегося лигандом при атоме родия. Значение описанного здесь нового высокоселективного процесса заключается в том, что он может рассматриваться в качестве модельного при исследовании образования водородных связей биологически важных молекул «гостей» с металлоферментами и ДНК/РНК [1а, 4а, б].

10.4. Эксперименты по компьютерному докингу металлоорганических лекарственных препаратов в связывающем сайте рецепторов эстрогенов: селективные нековалентные взаимодействия с белковыми гормонами

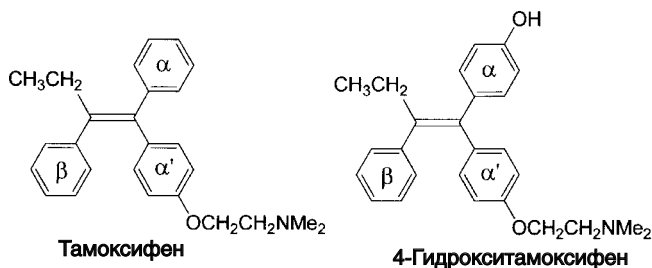
Сравнительно недавно Жауэн и др. установили, что металлоорганическое производное широко используемого при лечении рака груди препарата Тамоксифена (гидрокситамоксифен, метаболит печени, является активным

лекарством) – ферроцифен **3**, а также его аналоги являются потенциальными кандидатами для терапии как рака груди, так и других видов рака [4ж, 9]. Это открытие легло в основу нового раздела химии – химии металлоорганических лекарственных препаратов [9, 10]. Установление методом рентгеноструктурного анализа молекулярной структуры связывающего сайта рецептора эстрогенов (ER α), который, как полагают, является основным рецептором белков, содержащимся в гормон-зависимых клетках рака груди, позволит, используя эксперименты по компьютерному докингу/минимизации энергии в сайте рецептора, определить конформацию и нековалентные взаимодействия ферроцифена **3** и других металлоорганических лекарственных препаратов с окружающей истинной структурой белка [4ж, 9, 10].

Более того, установление новых мишеней действия эстрогена открывает возрастающую степень сложности понимания механизмов, при реализации которых этот гормон оказывает как нормальный, так и патологический эффекты. Эстрадиол **4**, прототип эстрогенов важен при рассмотрении ряда проблем, начиная от вопросов рождаемости и заканчивая некоторыми видами рака, также включая распространенные заболевания, такие как остеопороз, сердечно-сосудистые заболевания или нарушение обмена веществ. Широко известно, что действие эстрадиола осуществляется благодаря его способности связываться с сайтом рецепторов гормонов эстрогенового ряда.



Молекулярная картина связывания, осуществляющаяся как с агонистом (**4**), так и с антагонистом (тамоксифеном, 4-гидрокситамоксифеном, фрагментами эстрадиола из сайта рецептора) с сходными расстояниями в нанометрах, составленная на основе данных рентгеноструктурного анализа, в настоящий момент может использоваться для проверки последствий присоединения металлоорганического фрагмента, например соединения **3**, к модифицированному остатку лекарственного препарата, т. е. гидрокситамоксифена, модифицированного под действием **3** (отметим оптимальную биологическую активность **3** в случае именно (CH₂)₃-фрагмента при атоме кислорода) по отношению к связывающему сайту рецептора. Так как в нашем распоряжении находятся две группы металлоорганических лекарственных препаратов, основанных как на эстрогенном (комплекс **5**), так и на антиэстрогенном (комплекс **3**) структурном эффекте, в дальнейшем будут представлены различные нековалентные способы связывания с примерами каждого типа поведения.



На рис. 10.12 (см. цветную вклейку) представлен антиэстрогенный металлоорганический комплекс **3** в конформации, полученной в процессе компьютерного докинга при минимизации энергии в белках эстрогенного сайта, и демонстрирует важные нековалентные взаимодействия с аминокислотами, указанными на рисунке. Таким образом, некоторые Н-связывающие состояния различимы, например между карбоксилатом аспарагиновой кислоты 351 (1,868 Å) и одной из N-CH₃-групп в боковой эфирной цепи, O(CH₂)₃N(CH₃)₂, карбоксилатом глутаминовой кислоты 353 и фенольным атомом водорода (1,577 Å), NH аргинина 394 и фенольным атомом кислорода (2,061 Å). Более того, для одного из Ср-лигандов ферроценовой группы характерно нековалентное СН-π-взаимодействие с имидазольным кольцом гистидина 524.

В противоположность антиэстрогену **3** (Z-изомер), связывающемуся с белками сайта эстрогенного рецептора, лиганд-связывающий домен для эстрогена **5** был похож на эстрадиол **4**, за исключением того, что рутеноценовый Ср-лиганд соединен с жестким ацетиленовым мостиком. На рис. 10.13 (см. цветную вклейку) показана значительная разница в конформации и нековалентном связывании с эстроген-связывающим сайтом между металлоорганическими модифицированными лекарствами **3** и **5**. Важно то, что одно из Ср-колец рутеноценовой группы находится теперь в нековалентном π-π-взаимодействии (3,211 Å) с имидазольной группой гистидина 524, в то время как NH-группа имидазольного кольца находится в Н-связывании (2,722 Å) с 17α-ОН-группой. Другие подходящие водородные связи – это связи фенольной ОН-группы А-кольца с карбоксилатом глутаминовой кислоты 353 (2,722 Å) и NH-группой аргинина 394 (3,101 Å).

Таким образом, обнаружение того, что согласно биологическим тестам металлоорганическое лекарство **3** – потенциальное противораковое средство, а металлоорганический модифицированный эстрадиол **5** – нет, может быть отнесено к конформационным изменениям в эстрогеновом рецепторе в процессе связывания лекарства. Как видно из рис. 10.14 (см. цветную вклейку), в более сложном сайте рецептора с **3** явные стерические эффекты боковой цепи O(CH₂)₃N(CH₃)₂, очевидно, вызывают появление разрыва между спиралью 4 и спиралью 12. Это противоположно случаю с комплексом **5**, где нет промежутка (похожего на «мышеловку») между спиралью 4 и спиралью 12, и эта возможная причина (среди многих других) возможно может объяснить, почему **3** – потенциальное лекарство против рака груди, а **5** – нет. Другой важный факт заключается в том, что соединение **3**, содержащее ферроце-

нильные лиганды, может легко окисляться в ферроцениевый ион и в процессе разложения до Cr и Fe(III) может генерировать радикальные частицы кислорода, которые обладают цитотоксическим эффектом, реагируя с ДНК вблизи связывающего домена в сайте эстрогенного рецептора [11].

10.5. Металлоорганические ионофоры

10.5.1. Структура и селективность по отношению к ионам щелочных металлов

На основе синтетического подхода, аналогичному примененному ранее для самоорганизующихся трехмерных циклических структур Cr^*Rh , таких как **1**, которые использовались в качестве «хозяев» для биомолекул, Северин и др. разработали новый метод получения самоорганизующихся металлоорганических ионофоров – биомолекулярных металлоорганических макроциклов, которые селективны к ионам щелочных металлов. Северин и др. применили метод самоорганизации к синтетическим мишеням с целью потенциального медицинского и аналитического применения [12]. Схема 10.1 демонстрирует разнообразие исходных веществ: лигандов и π -металлоорганических фрагментов.

Процесс самоорганизации начинается с комплексов с мостиковыми атомами хлора $[(\pi\text{-лиганд})\text{MCl}_2]_2$ ($\text{M} = \text{Ru}, \text{Rh}, \text{Ir}$), которые реагируют с лигандами L1-L3 в присутствии основания. 3-Оксопиридонатный лиганд L1 образует металлоорганический макроцикл общей формулы $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ с раз-

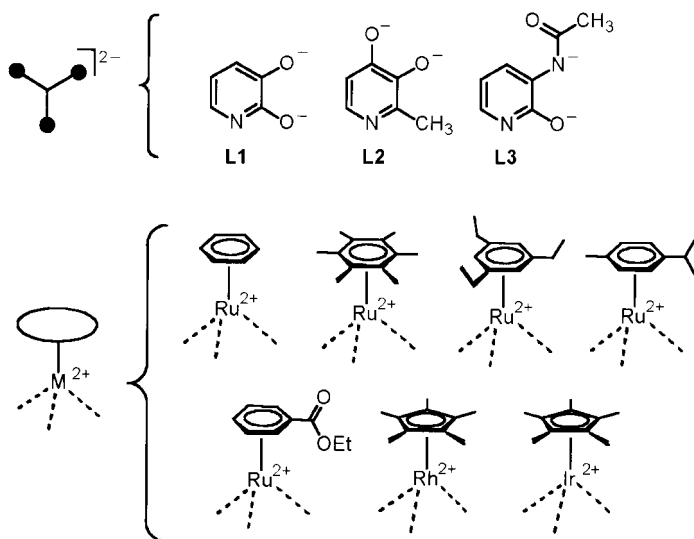


Схема 10.1. Лиганды L1-L3 и металлоорганические фрагменты для синтеза потенциальных металлоорганических ионофоров

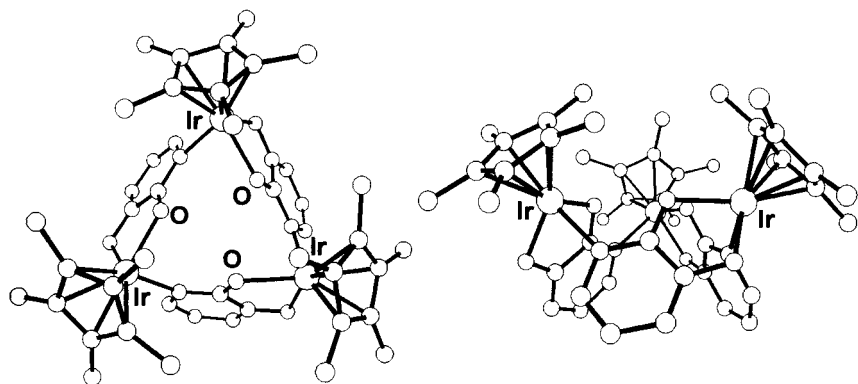


Рис. 10.15. Молекулярная структура $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L1})]_3$, установленная методом РСА. Слева: вид вдоль псевдо-оси C_3 . Справа: вид сбоку

личными ареновыми лигандами, например с C_6H_6 , C_6Me_6 , 1,3,5- C_6H_3 , цимолом, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{Et}$ и Cr^* -лигандами (рис. 10.15). Трехядерные комплексы схожим образом получаются и с мостиковыми лигандами L2 и L3 в комбинации с фрагментами (цимол) $\text{Ru}^{2+}(\text{L2}, \text{L3})$ и $\text{Cr}^*\text{Ir}^{2+}(\text{L2})$.

Триденантный лиганд L1 связывается с металлами путем координации с оксогруппами и атомом азота пиридина. 12-Членные металлоорганические макроциклы содержат три атома кислорода, расположенных близко друг к другу, и поэтому их можно считать металлоорганическими аналогами 12-краун-3.

Комплексы с L2, подобно комплексам с L1, обладают (*псевдо*) C_3 -симметрией с тремя тетраэдрическими (цимол) Ru или Cr^*Ir в углах (рис. 10.16). Лиганд связан с атомами металлов за счет атомов кислорода и кольцевого атома азота. Плоскости, образованные гетероциклическим лигандом, практически перпендикулярны плоскости атомов металла, в результате чего макроцикл расширен и расстояния М...М составляют 7,24 Å.

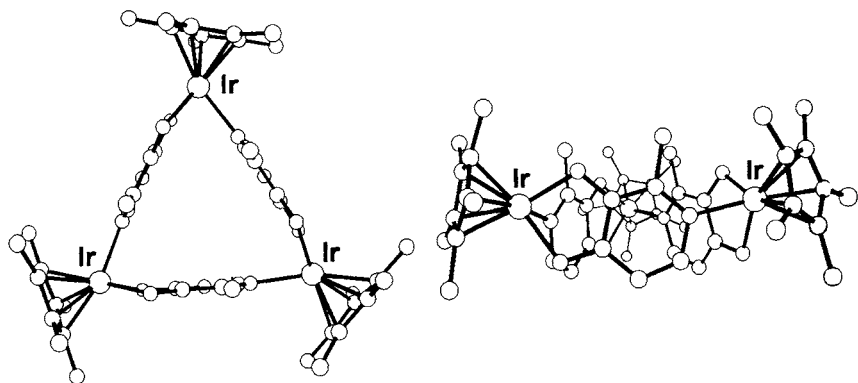


Рис. 10.16. Молекулярная структура $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L2})]_3$, установленная методом РСА. Слева: вид вдоль оси C_3 . Справа: вид сбоку

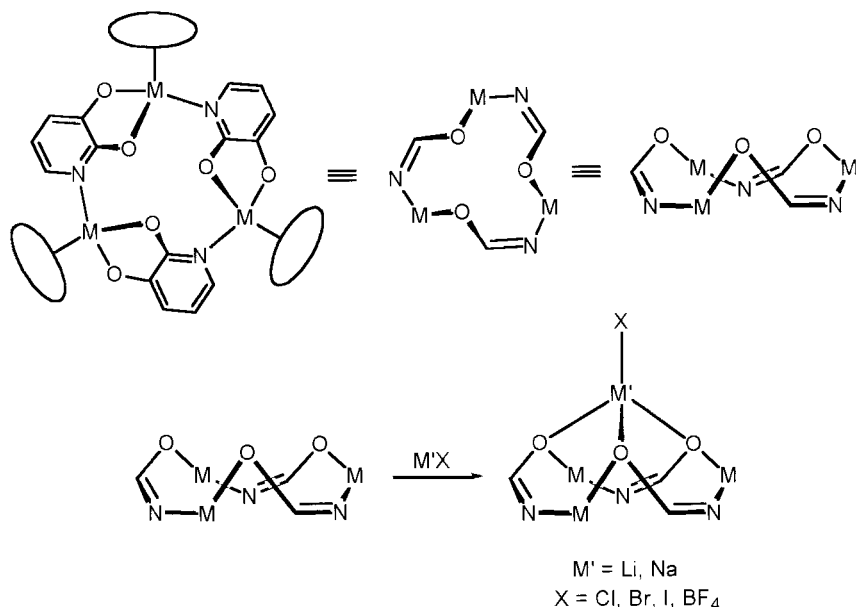


Схема 10.2. Металлоорганические комплексы общей формулы $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ как рецепторы для солей лития и натрия

Соединения $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ представляют собой первые синтезированные *металлоорганические краун-комплексы* [6]. Как и их органические аналоги, металлоорганические краун-комплексы способны связывать катионы щелочных металлов. Северин и др. смогли выделить и структурно охарактеризовать аддукты $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ с LiCl, LiBF₄, LiFHF, NaCl, NaBr и NaI [12]. Во всех изученных случаях ион металла M' был связан с тремя ближайшими атомами кислорода рецептора. Четвертое координационное место обычно занято анионом X (схема 10.2).

Координация с молекулой-«гостем» могла быть легко определена при помощи ¹H-ЯМР-спектроскопии: после связывания с солями лития или натрия сигналы пиридонатных лигандов и сигналы π-лиганда сместились в слабое поле (рис. 10.17). Если «гость» M'X добавляется в количествах, близких к стехиометрическим, наблюдается два набора сигналов, показывающих невысокую скорость обмена во временной шкале ЯМР, что значительно облегчает определение количества образовавшегося аддукта.

Стабильность комплексов «гость – хозяин» необыкновенно высока. Если аддукт $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3 \cdot \text{M}'\text{X}$ растворяли в CDCl₃ (*c* = 10 мМ), в ¹H-ЯМР-спектре наблюдался только комплекс «гость – хозяин». Следовательно константа ассоциации должна быть больше 10⁵ л/моль. Для количественной оценки стабильности были выполнены эксперименты по конкурентному связыванию различными эфирами и криптандами. Результаты показали, что значения констант ассоциации металлоорганических макроциклических рецепторов $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ существенно превышают

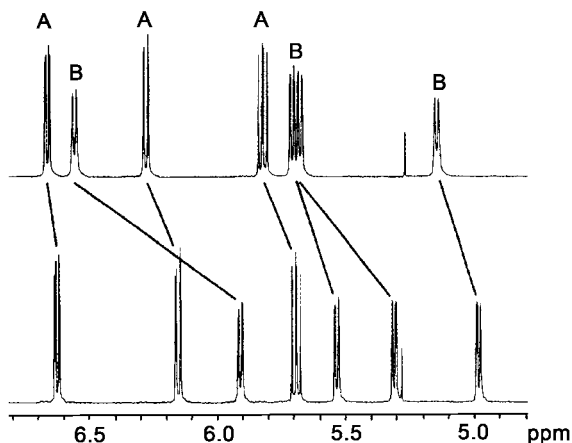


Рис. 10.17. Спектры ЯМР ^1H (CDCl_3) рецептора $[(\text{цимол})\text{Ru}(\text{L1})]_3$ (внизу) и соответствующего аддукта с NaCl (вверху). Сигналы π -лиганда цимол обозначены как «В», сигналы мостикового пиридонатного лиганда L1 обозначены как «А»

значения для краун-эфиров, в то же время они похожи на значения для макробизицических ионофоров, таких как 2.2.1-криптан (для аддуктов с NaCl) и 2.1.1-криптан (для аддуктов с LiCl).

Как обычно, при использовании более полярных растворителей были получены более низкие значения констант. Когда аддукты NaX растворяли в CD_3OD , методом ^1H -ЯМР можно было наблюдать сигналы для свободного и связанного рецептора $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$. Следовательно, возможным стало прямое вычисление K_a . Для галогенидов (солей) были получены значения в интервале $K_a = 1,1 \pm 0,5 \times 10^2$ л/моль ($\text{X} = \text{Cl}$, $(\pi\text{-лиганд})\text{M} = (\text{C}_6\text{H}_6)\text{Ru}$) и $K_a = 3,5 \pm 0,5 \times 10^3$ л/моль ($\text{X} = \text{Cl}$, $(\pi\text{-лиганд})\text{M} = (\text{цимол})\text{Ru}$). Более того, стабильность комплексов Na^+ зависит от природы аниона. Таким образом, аддукты с NaI показали меньшие значения K_a , чем аддукты с NaCl . Аддукты Li^+ с рецепторами $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ в общем случае показывают большую стабильность, чем соответствующие аддукты с Na^+ , даже в полярных растворителях, таких как метанол, в спектре ЯМР наблюдался только комплекс «гость – хозяин» (система $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3 \cdot \text{LiCl}$), что свидетельствует о значении $K_a > 10^5$ л/моль. Рентгеновская структура аддукта NaBr с $[(\pi\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L1})]_3$ показана на рис. 10.18.

Удивительно высокая стабильность комплексов LiX и NaX может быть обусловлена несколькими факторами: (1) рецепторы очень жесткие и строго организованы для связывания ионов лития и натрия; когда связываются молекулы-«гости», длины связей и углы лишь слегка изменяются; (2) соли связаны в виде ионных пар, существование которых энергетически выгодно в органических растворителях, таких как хлороформ; (3) энергетические затраты на десольватацию были очень низки, так как максимум одна молекула воды могла входить внутрь связывающей полости.

Рецепторы $[(\pi\text{-лиганд})\text{M}(\text{L1})]_3$ не только обладают очень высоким сродством к определенным ионам щелочных металлов, но и очень высо-

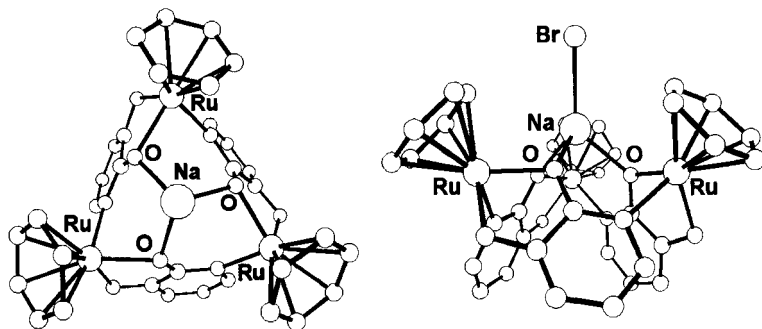


Рис. 10.18. Установленная методом PCA молекулярная структура рецептора $[(\pi\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L1})]_3$ с молекулой-«гостем» NaBr. *Слева:* вид вдоль псевдо-оси C_3 , атом брома не показан. *Справа:* вид молекулы сбоку

кой селективностью. Li^+ -аддукты образовывались со всеми рецепторами. Na^+ -аддукты, однако, образовывались только с комплексами типа (π -лиганд) М $[(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Ru}$, (цимол) Ru и $(\text{C}_6\text{H}_5\text{COOEt})\text{Ru}]$, тогда как аддукты K^+ вообще не наблюдались. Подобная селективность может быть объяснена особенностью геометрии металлоорганических краун-комплексов: π -лиганды образуют стенки достаточно жесткой связывающей полости. В случае малых π -лигандов, таких как бензол, ионы натрия входят легко. Большие ионы, такие как гексаметилбензол, эффективно блокируют связывающую полость, что приводит к получению Li^+ -специфических рецепторов.

Химия «гость – хозяин» комплекса рутения $[(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{Et})\text{Ru}(\text{L1})]_3$ оказалась очень интересной. Хотя этот рецептор принципиально способен связывать ионы Na^+ , он проявляет исключительную склонность и селективность по отношению к солям Li^+ [126]. Об этом свидетельствовали следующие эксперименты: водный раствор, содержащий LiCl (50 мМ), вместе с большим избытком NaCl , KCl , CsCl , MgCl_2 и CaCl_2 (1 М каждый) смешивали с раствором рецептора в хлороформе, при этом наблюдалась избирательная и количественная экстракция LiCl (схема 10.3). Это важно по двум причинам. Во-первых, экстракцию LiCl из воды в принципе очень сложно провести из-за высокой энтальпии гидратации Li^+ (-521 кДж/моль) и Cl^- (-363 кДж/моль). Во-вторых, энтальпия гидратации других ионов щелочных металлов значительно ниже. Таким образом, образование исключительно аддуктов с LiCl свидетельствует о необычайно высокой селективности в ряду ионов щелочных металлов.

Как показано на схеме 10.3, $[(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{Et})\text{Ru}(\text{L1})]_3$ является макроциклом, высокоселективным по отношению к ионам Li^+ при наличии в растворе более высокой концентрации ионов Na^+ [12]. СРК-модели этого ионофора и его комплекса с Li показаны на рис. 10.19 (см. цветную вклейку) (атомы Cl для ясности не показаны).

В связи с этим следует отметить, что литиевые соли, такие как Li_2CO_3 , относятся к наиболее часто используемым лекарствам для лечения маниакальной депрессии. Из-за узкого терапевтического диапазона нужно постоянно следить за концентрацией Li^+ в крови пациентов. Так как в крови относитель-

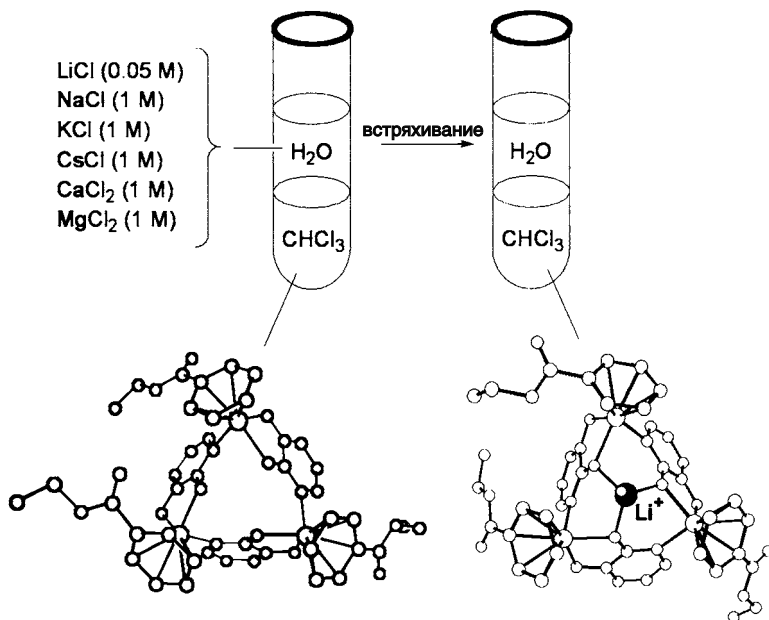


Схема 10.3. Селективная экстракция LiCl из водного раствора, содержащего большой избыток солей щелочных и щелочноземельных металлов, с использованием рецептора $[(C_6H_5CO_2Et)Ru(L1)]_3$

но велика концентрация Na^+ по сравнению с Li^+ , использование хемосенсоров пока что не привело к большому успеху. Следовательно, применение этих металлоорганических макроциклов наряду с использованием электрохимических методов для их работы в качестве хемосенсоров в настоящее время является целью исследований Северина и др. [12в].

10.5.2. Специфические рецепторы для фторид-ионов

Так как координация ионных пар с рецепторами типа $[(\pi\text{-лиганд})M(L1)]_3$ энергетически выгодна, была изучена возможность использования таких комплексов как специфичных рецепторов для фторид-ионов. Основная идея схематически показана на схеме 10.4. Литиевый ион, служащий связывающим сайтом, координирован внутри рецептора $[(\pi\text{-лиганд})M(L1)]_3$. Доступность центра Li^+ контролируется стерическими особенностями π -лиганда. Если применялись большие лиганды, только маленькие фторид-ионы были способны войти в полость, тогда как вход больших анионов эффективно блокировался. Высокоспецифичный рецептор был получен, поскольку радиус фторид-иона существенно меньше, чем у большинства других анионов.

Для понимания этой концепции подошел комплекс $[Cr^*Ir(L1)]_3 \cdot LiBF_4$, который оказался высокоспецифичным рецептором на фторид-ион. Данные ЯМР показали, что в растворе ($CDCl_3/CD_3CN$, 2:1) слабо связанный ион BF_4^- не координирован с ионом лития. Если в этот раствор добавляли Bu_4NF , сигналы

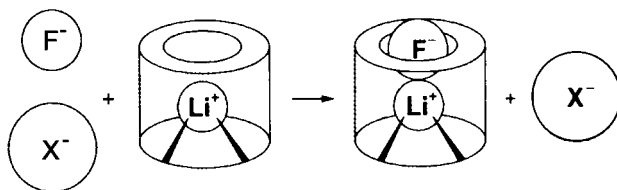


Схема 10.4. Схематическое представление специфического фторидного рецептора на основе Li^+ -содержащего металлоорганического макроцикла

ионных пар $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L}1)]_3 \cdot \text{LiF}$ сразу же обнаруживались с помощью спектроскопии ^{19}F и ^7Li ЯМР. Комплекс с LiF образовывался даже в присутствии большого избытка других анионов X ($\text{X} = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-, \text{NO}_3^-$). Это означает, что селективность F^-/X^- превышает 10^3 .

СРК-модель рентгеновской структуры $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L}1)]_3 \cdot \text{LiF}$ дает объяснение этой селективности (рис. 10.20). Обнаружено, что фторид-ион располагается на входе полости, тесно окруженный тремя Cr^* -лигандами. В результате, можно наблюдать четыре очень коротких контакта $\text{CH} \dots \text{F}$ между Cr^* -лигандами и F^- ($\text{CH} \dots \text{F} = 2,15\text{--}2,28 \text{ \AA}$). По-видимому, такое плотное внедрение фторид-иона вносит вклад в общую стабильность комплекса «гость – хозяин» и предотвращает координацию больших анионов.

Для раствора комплекса $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L}1)]_3 \cdot \text{LiF}$ в $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1) по данным дифференциальной импульсной вольтамперометрии, при $890(\pm 3) \text{ мВ}$ (относительно Ag/AgCl) наблюдается первый пик окисления. После добавления пяти эквивалентов F^- комплекс окисляется существенно легче ($\Delta E = -203 \text{ мВ}$), что объясняется изменением электронно-дефицитного характера «гостя» LiF , находящегося в виде ионной пары, в отличие от сольватированного иона лития. После добавления Cl^- , Br^- , NO_3^- , HSO_4^- или ClO_4^- ($\Delta E < 24 \text{ мВ}$) наблюдались лишь малые изменения, что полностью согласуется с данными ЯМР.

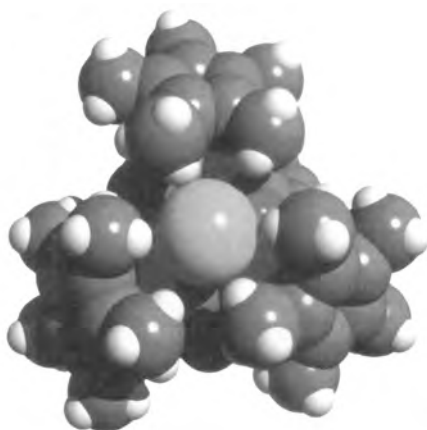


Рис. 10.20. СРК-модель установленной методом РСА структуры $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L}1)]_3 \cdot \text{LiF}$ (вид вдоль псевдо-оси C_3). Фторид-анион плотно окружен Cr^* -лигандами

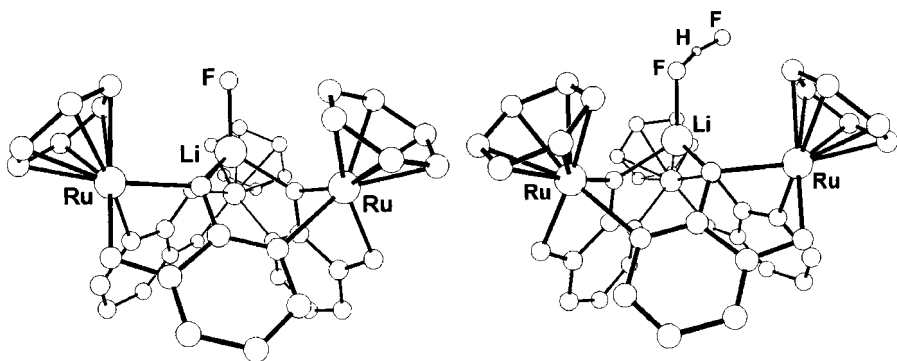


Рис. 10.21. Установленные методом PCA молекулярные структуры комплексов LiF (слева) и LiF...HF (справа) с рецептором $[(\text{цимол})\text{Ru}(\text{L1})]_3$. Боковые группы цимола опущены

Похожие результаты также были получены в растворах, содержащих метанол. Следовательно, комплекс $[\text{Cr}^*\text{Ir}(\text{L1})]_3 \cdot \text{LiF}$ является высокоселективным хемосенсором, который позволяет определить фторид-анион электрохимическими методами даже в полярных растворителях [6].

Несколько других комплексов с LiF и LiH...HF были также охарактеризованы PCA монокристаллов (рис. 10.21). Как и ожидалось, катион лития координирован тремя атомами кислорода рецепторов. Четвертое координационное место занято фторид-ионом или анионом HF_2^- . В комплексах LiF значение длины связи Li–F находилось в диапазоне 1,77–1,81 Å. Эти значения были самыми малыми из тех, какие когда-либо встречались, что подчеркивает уникальность наблюдаемого случая расположения молекулы LiF внутри металлоорганических макроциклических «хозяев». Для сравнения в кристаллическом LiF расстояние Li...F составляет 2,009 Å. Также было обнаружено, что дифторидные анионы координируются с литием в изогнутом виде (Li–F–F = 123–159°). Наблюдавшиеся расстояния F...F (2,25–2,30 Å) похожи на расстояния в кристаллах водород-дифторидных солей (2,24–2,28 Å).

10.5.3. Заключение, касающиеся металлоорганических ионофоров

Очевидно, что существует значительный интерес к синтетическим рецепторам с высоким сродством и селективностью к ионам щелочных металлов. В настоящее время подходы к этой цели часто требуют серьезных синтетических усилий, которым не хватает методик для осуществления процессов самоорганизации. Северин и др. синтезировали новые рецепторы для малых катионов и анионов путем самоорганизации металлоорганических макроциклических комплексов [6, 12]. По сравнению с другими методами получения синтетических ионофоров подход Северина имеет следующие основные преимущества: (1) данные синтетические схемы могут включать только одну стадию с использованием простых исходных веществ; (2) присутствие молекул-«гостей»

может быть зафиксировано электрохимически; (3) благодаря высокой степени организации наблюдаются отличная аффинность и селективность.

Модульная природа этих ансамблей позволяет включить различные структурные вариации в металлоорганические макроциклические комплексы. Из-за исключительной эффективности этих металлоорганических макроциклических рецепторов по сравнению с классическими ионофорами, такими как краун-эфиры и криптанды, в будущем для них могут найтись различные области применения, включая исследования в воде [6, 12d].

10.6. Общие выводы, касающиеся молекулярного распознавания

Работы по молекулярному распознаванию с помощью металлоорганических супрамолекулярных «хозяев», в состав которых входят биологические лиганды, такие как ДНК/РНК-основания и группы Cr^*Rh , критически важные для суперструктуры, были рассмотрены с позиций нековалентных, π - π - и гидрофобных взаимодействий с различными биологическими молекулами, такими как аминокислоты. Более того, самоорганизующиеся металлоорганические макроциклические ионофоры, которые селективно связывают ионы щелочных металлов, такие как ионы Li^+ , потенциально применимы в аналитических методах для оценки психических расстройств.

Кроме того, было показано, что сайты гормональных рецепторов, которые действуют как супрамолекулярные «хозяева», нековалентным образом связывают металлоорганические лекарства за счет образования специфических водородных связей, π - π - и C-H-взаимодействий, модифицируя при этом конформацию спиралевидных белков, что должно иметь положительное влияние на их биологическую активность в терапии рака груди. Этот раздел представляет собой новые возможности в металлоорганической биохимии, сконцентрированной на структурном разнообразии супрамолекулярных «хозяев» и изучении молекулярного распознавания. Следует надеяться, что представленные данные в области биометаллоорганической химии откроют путь к новым направлениям и замечательным возможностям для будущих работ. Нам, как химикам-металлоорганикам, отведена важная роль в исследованиях на границе между химией и биологией для создания новых направлений фундаментальных исследований и, например, для медицинского применения, для совершенствования мирового сообщества.

Благодарности

Исследования, проведенные в Национальной лаборатории им. Лоуренса в Беркли, осуществлялись при финансовой поддержке грантов Национальной лаборатории им. Лоуренса в Беркли и Министерства энергетики (контракт No. DE AC03-76SF00098). Благодарность следует выразить также научным сотрудникам и студентам Национальной лаборатории им. Лоуренса в Беркли, проводившим эксперименты по молекулярному ЯМР-распознаванию и опре-

делявшим структуры металлоорганических «гостей». Все они упомянуты в ссылках; хотелось бы также выразить благодарность коллегам из Японии, Испании и Израиля, также перечисленным в списке литературы, за их вклад в исследования. При выполнении программы по биометаллоорганической химии в Национальной лаборатории им. Лоуренса Ричард Х. Фиш был приглашенным профессором в Институте неорганической химии Университета Сарагосы (Сарагоса, Испания), а также в Институте имени Вейцмана (Реховот, Израиль). Ричард Х. Фиш хотел бы поблагодарить своих коллег Жерара Жауэна и Кая Северина за большую помощь при написании этого обзора.

Литература

- (a) *J.-M. Lehn*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 90 и ссылки в данной работе; (б) *D. J. Cram*, *Science* **1988**, 240, 760 и ссылки в данной работе; (в) *B. Alberts*, *D. Bray*, *J. Lewis*, *M. Raff*, *K. Roberts*, *J. D. Watson*, *Molecular Biology of the Cell*, pp. 481–612, Garland Publishing, New York, **1989**; (г) *T. D. Tutnus*, in *T. D. Tutnus* (Ed.), *Metal-DNA Chemistry*, ACS Symposium Series, No. 402, American Chemical Society, Washington, D. C., **1989**, и ссылки в данной работе; (д) *J. K. Barton*, *Comments Inorg. Chem.* **1985**, 3, 321 и ссылки в данной работе.
- (a) *A. V. Eliseev*, *H.-J. Sshneider*, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6081 и ссылки в данной работе; (б) *C.-T. Chen*, *J. S. Suegek*, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5959; (в) *J. Kikuchi*, *K. Egami*, *K. Suehiro*, *Y. Murakami*, *Chem. Lett.* **1992**, 1685; (г) *S. C. Zimmerman*, *W. Wu*, *Z. Zeng*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 196 и ссылки в данной работе; (д) *A. Galan*, *D. Andreu*, *A. M. Echavarren*, *P. Prados*, *J. de Mendoza*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1511; (е) *G. Deslongchamps*, *A. Galan*, *J. de Mendoza*, *J. Rebek Jr.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 61 и ссылки в данной работе; (ж) *C. E. Osterberg*, *A. M. Arif*, *T. G. Richmond*, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6903; (з) *L. M. Torres*, *L. G. Marzukku*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4678; (и) *C. S. Wilcox*, *J. C. Adrian Jr.*, *T. H. Webb*, *F. J. Zzwacki*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10189; (к) *S. K. Kurdistani*, *R. C. Helgeson*, *D. J. Cram*, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1659; (л) *D. J. Cram*, *M. T. Bkanda*, *K. Paek*, *C. B. Knobler*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7765; (м) *G. M. Whitesides*, *J. P. Mathias*, *C. T. Sero*, *Science*, **1991**, 557, 173; (н) *H.-J. Schneider*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1417.
- (a) *J. E. Kickham*, *S. J. Loeb*, *S. L. Murphy*, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7031 и ссылки в данной работе; (б) *T. Mizutani*, *T. Ema*, *T. Tomita*, *Y. Kudora*, *H. Ogoshi*, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4240 и ссылки в данной работе; (в) *P. J. Stang*, *D. H. Cao*, *S. Saito*, *A. M. Arif*, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6273; (г) *P. J. Sstang*, *D. H. Cao*, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4981 и ссылки в данной работе; (д) *M. Fujita*, *J. Yazaki*, *K. Ogura*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5645; (е) *M. Fujita*, *S. Nagao*, *K. Ogura*, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1649; (ж) *J. E. Kickham*, *S. J. Loeb*, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 5656; (з) *J. W. Canary*, *B. Gibb*, *Prog. Inorg. Chem.* **1997**, 45, 1, и ссылки в данной работе; (и) *J. L. Atwood*, *J. E. Davies*, *D. D. Macnicol*, *F. Vögte*, *Comprehensive supramolecular chemistry*, Pergamon, **1996**.
- (a) *H. Chen*, *S. Ogo*, *R. H. Fish*, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4993; (б) *S. Ogo*, *S. Nakamura*, *H. Chen*, *K. Isobe*, *Y. Watanabe*, *R. H. Fish*, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7151; (в) *H. Chen*, *M. F. Maestre*, *R. H. Fish*, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3631; (г) *D. P. Smith*, *E. Baralt*, *B. Morales*, *M. M. Olmstead*, *M. F. Maestre*, *R. H. Fish*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10647; (д) *D. P. Smith*, *E. Kohen*,

- M. F. Maestre, R. H. Fish*, Inorg. Chem. **1993**, 32, 4119; (е) *R. H. Fish*, Coord. Chem. Rev. **1999**, 185/186, 569 и ссылки в данной работе; (ж) *R. H. Fish, G. Jaouen*, Organometallics, **2003**, 22, 2166 и ссылки в данной работе.
5. (а) *R. Breslow*, Acc. Chem. Res. **1991**, 24, 159; (б) *S. B. Ferguson, E. M. Sanford, E. M. Seward, F. Diederich*, J. Am. Chem. Soc. **1991**, 113, 5410.
6. (а) *K. Severin*, Coord. Chem. Rev. **2003**, 245, 3 и ссылки в данной работе; (б) *M. L. Lehaire, R. Scopelliti, L. Herdeis, K. Polborn, K. Severin*, Inorg. Chem. **2004**, 43, 1609.
7. *D. P. Smith, M. M. Olmstead, M. F. Maestre, R. H. Fish*, Organometallics **1993**, 12, 593.
8. *A. Elduque, D. Carmona, L. A. Oro, M. Eisenstein, R. H. Fish*, J. Organomet. Chem. **2003**, 668, 123.
9. (а) *G. Jaouen, S. Top, A. Vessières, R. Alberto*, J. Organomet. Chem. **2000**, 600, 25 и ссылки в данной работе; (б) *G. Jaouen*, Chemistry in Britain, **2001**, 36.
10. (а) *S. Top, H. El Hafa, A. Vessières, M. Huché, J. Vaissermann, G. Jaouen*, G. Chem. Eur. J. **2002**, 8, 5241; (б) *S. Top, A. Vessières, C. Cabestaing, I. Laïos, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen*, J. Organomet. Chem. **2001**, 639, 500.
11. *D. Osella, M. Ferrali, P. Zanello, F. Laschi, M. Fontani, C. Nervi, G. Cavigliolo*, Inorg. Chim. Ada. **2000**, 306, 42.
12. (а) *H. Piotrowski, K. Polborn, G. Hilt, K. Severin*, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 2699; (б) *H. Piotrowski, K. Severin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2002**, 99, 4997, и ссылки в данной работе; (в) *H. Piotrowski, G. Hilt, A. Schulz, P. Mayer, K. Polborn, K. Severin*, Chem. Eur. J. **2001**, 3196; (г) *M.-L. Lehaire, R. Scopelliti, H. Piotrowski, K. Severin*, Angew. Chem. Int. Ed. **2002**, 41, 1419; (д) *Z. Grote, M.-L. Lehaire, R. Scopelliti, K. Severin*, J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 13638.

11 Структура и механизм действия активных сайтов металлоферментов

Ж. Фонтесийе-Кэмп (Juan C. Fontecilla-Camps, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Laboratoire de Chimie Organometallique (UMR CNRS 7576), France)

11.1. Введение

Медиаторами многих важных реакций, протекающих в биологических системах, служат белки, содержащие металлы в качестве кофакторов. Это особенно справедливо для процессов, в которых участвуют газы, например восстановления инертного N_2 в аммиак, необходимый для биологических процессов, окисления и продуцирования молекулярного водорода, различных реакций окисления, включающих O_2 , либо в которых участвуют CO_2 и CO в качестве источников углерода. Многие реакции, в которых участвуют металлы, типичны для ферментов анаэробных микроорганизмов, а соответствующие активные центры очень чувствительны к дезактивации под действием O_2 . Это явление интерпретируется как следствие увеличения содержания O_2 в результате фотосинтеза в течение геологических периодов. Так, общепринятым является мнение о том, что катализируемые металлами окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием CO , H_2 , CO_2 и некоторых других газов, имели место при возникновении жизни. К тому же, поскольку металлы могут вести себя как кислоты Льюиса – свойство, которое позволяет им активировать такие молекулы, как молекулы воды, – они принимают участие во многих основополагающих реакциях, не являющихся окислительно-восстановительными, которые не смогли бы катализировать аминокислоты.

Когда имеешь дело с такой обширной областью знаний, следует оговорить некоторые ограничения, относящиеся к предмету данной краткой главы. Здесь будут рассмотрены лишь некоторые ферменты, содержащие переходные металлы, такие как медь, железо, марганец, молибден/вольфрам, никель и родственный им цинк. Мы рассмотрим только те рентгеноструктурные данные для активных центров, которые были опубликованы сравнительно недавно, причем для этих центров приведем рассуждения о механизме каталитического действия. Кратко будет рассмотрен также кобальт в контексте корриновых комплексов и железо-серных белков, которые взаимодействуют с ацетил-коэнзим А-синтазой в процессе синтеза или расщепления ацетил-КоА. За некоторыми исключениями структура белков вне координационной сферы металла обсуждаться не будет, если только она не влияет на механизм катализа.

Есть факторы, которые усложняют изучение металлоферментов. Во многих случаях металлы оказываются неизбирательными, по крайней мере, *in vitro*, так как с ними могут связываться различные ионы, приводя к разной степени остаточной каталитической активности. Это делает затруднительным определение, какой же металл является физиологически значимым. В других случаях было показано, что ион биологически значимого металла может эффективно замещаться другими ионами в процессе очистки или кристаллизации, давая неактивный фермент. (Внутри клетки, где концентрация свободных ионов металлов пренебрежимо мала, такое замещение маловероятно. Однако если белок выделен, следы ионов металлов, присутствующих в буферных растворах, заместят первоначальный ион, если их сродство к данному центру велико.) Другая проблема возникает, когда кристаллы металлоферментов подвергаются воздействию рентгеновских лучей, поскольку фотоэлектроны могут изменить первоначальную степень окисления металла. Без эффективного способа мониторинга степени окисления металла в кристалле, такого как спектральные изменения, вызванные восстановлением хромофора, трудно быть уверенным даже в том, что непродолжительная рентгеновская экспозиция устранил данную проблему.

Разделы данной главы соответствуют природе ионов металлов, и в каждом случае рассмотрены наиболее представительные примеры в плане структуры активного центра и механизма катализа*.

11.2. Медь

Этот металл важен для функционирования организма человека и в то же время, токсичен. Нарушение метаболизма меди приводит к патологическим состояниям, таким как болезни Менкеса, Вильсона и Альцгеймера [1]. Известно, что содержащие медь ферменты участвуют в нескольких процессах, в которых задействован кислород. Биологически доступной медь может быть в двух состояниях окисления: Cu(I) и Cu(II) с выраженными изменениями в координационной сфере [2, 3]. Тем не менее Cu(I) избирательно связывается с остатками цистеина и метионина, а Cu(II) предпочтительно координируется с гистидином, серином, треонином, тирозином или с водой. Для Cu(I) характерна тетраэдрическая координация, в то время как для Cu(II) – плоско-квадратная [4]. Спектральные свойства медных центров в ферментах варьируемы, и здесь можно выделить три типа спектральных характеристик. Для центров типа I характерно интенсивное поглощение при 600 нм, обуславливающее темно-синюю окраску ряда оксидаз. Координационным полиэдром является либо тригональная бипирамида, либо искаженный тетраэдр. Другой класс медьсодержащих центров находится как в моно-, так и в диоксигеназах, «несиних» оксидазах и в CuZn-супероксид-дисмутазе. Наиболее

* Следует обратить внимание читателя на то, что в данной главе рассматриваются координационные соединения, не содержащие связи металл–углерод. – *Прим. перев.*

типичным лигандом медных центров для этого типа II является гистидин. Медный центр типа III является биядерным и встречается как в гемоцианинах, так и в тирозиназах. Этот центр связан с окислительно-восстановительными процессами, и для него характерно интенсивное поглощение при 300 нм [4]. Некоторые примеры Cu-содержащих ферментов обсуждаются ниже.

11.2.1. Кверцетин-2,3-диоксигеназа

Недавно опубликованная структура этого димерного фермента, в котором на одну мономерную единицу приходится один Cu(II)-каталитический центр типа II, показывает, что данный фермент принадлежит к купиново-подсемейству, в которое входят также Fe-гомогентизат-1,2-диоксигеназа и Mn-оксалат-оксидаза – ферменты, эволюционно родственные, несмотря на различие в природе металлического центра [4]. Структурные данные говорят о том, что ион Cu имеет два разных типа координации. Первый тип координационного окружения атома меди, который встречается примерно в 70% активных центров, образован тремя остатками гистидина и молекулой воды, в то время как в другом типе молекула воды замещена остатком глутаминовой кислоты, находящимся в иной позиции. Это первый пример координации Cu(II) с карбоксилатной группой. Карбоксилат глутаминового остатка может быть вовлечен в катализ за счет депротонирования группы OH субстрата. Поскольку для ионов Cu(II) нельзя было ожидать ни тетраэдрическую, ни плоскую тригональную координацию, авторы рассматривают возможность восстановления меди до Cu(I) в кристалле фотоэлектронами, возникающими под действием пучка рентгеновских лучей в процессе накопления отражений [4]. Никаких изменений координации меди не было обнаружено при накоплении нескольких наборов данных с того же кристалла на Европейской синхротронной установке в Гренобле (Франция). Нельзя, однако, исключить возможность того, что ионы меди были полностью восстановлены при первом воздействии рентгеновских лучей.

11.2.2. Аминооксидазы

Эти гомодимерные ферменты, встречающиеся как в организмах прокариот, так и у эукариот, содержат один ион меди и один редокс-активный кофактор топахион (TPQ) на мономерную единицу [5, 6]. Они катализируют окислительное дезаминирование первичных аминов [7–9]. Ион Cu(II) координирован с тремя остатками гистидина и тремя молекулами воды (рис. 11.1). Кофактор TPQ расположен вблизи от иона меди. Процесс можно разделить на первоначальную реакцию восстановления и последующую стадию окисления, в зависимости от окислительного состояния TPQ. Считают, что ион меди задействован в образовании семихинона из TPQ путем восстановления Cu(II) до Cu(I). Недавно была высказана альтернативная гипотеза о том, что ион меди остается в состоянии Cu(II), а одноэлектронное восстановление O₂ осуществляется модифицированным аминорезорциновым TPQ-кофактором. В таком случае Cu(II) обеспечивает электростатическую стабилизацию

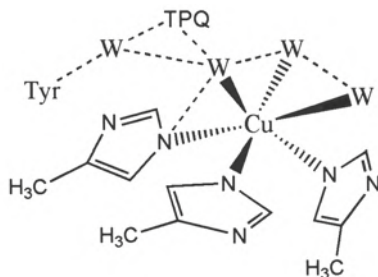


Рис. 11.1. Активный центр аминоксидазы. TPQ является редокс-активным то-похиновым кофактором. Буквой W обозначены молекулы воды. Все рисунки сделаны с помощью ChemDraw

супероксид-аниона как интермедиата [10–12]. Восстановление молекулярного кислорода приводит к гидропероксиду, слабо связанному с медью, который в дальнейшем замещается молекулой воды, протонируется и элиминируется в виде пероксида водорода. Завершение реакции (стадия восстановления) является металл-независимой, и ее медиаторами служат различные модифицированные формы TPQ [13].

11.2.3. CuZn-Зависимые супероксиддисмутазы

В защите клеток эукариотов от разрушения, которое может быть вызвано кислородом, важнейшую роль играют ферменты, содержащие цинк и медь [14]. Эти ферменты представляют собой димеры и содержат по одному иону Cu(II) и Zn(II) на мономерную единицу [15]. Супероксиддисмутазы (SOD) катализируют превращение супероксид-анион-радикала в пероксид водорода и кислород, которое происходит в результате последовательных реакций восстановления и окисления меди в соответствии со следующими уравнениями [16]:



Известны несколько структур Cu(II)-формы SOD в кристаллическом состоянии [17–20]. Во всех Cu(II)Zn-зависимых ферментах SOD ионы металлов связаны мостиками из боковых фрагментов гистидина. Ион меди дополнительно координирован с тремя такими фрагментами и молекулой воды, что создает искаженную геометрию координационного полиэдра типа квадратной пирамиды (рис. 11.2). Координационная сфера иона Zn дополняется двумя другими фрагментами гистидина и боковой цепью аспартата, что образует координационный полиэдр типа искаженного тетраэдра. Было показано, что в восстановленных формах дрожжевых или бычьих Cu(I)Zn-SOD ион меди координирован только тремя фрагментами гистидина [17, 21]. Следовательно, ключевым моментом перехода от Cu(II) к Cu(I) является изменение координационного числа меди от 5 до 3 [22]. Это можно объяснить следующим образом. Когда Cu(II) восстанавливается супероксид-ионом (уравнение (11.1)),

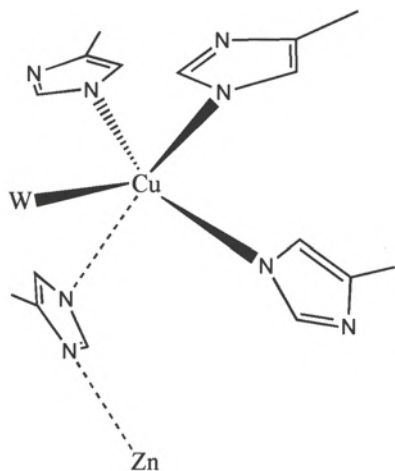


Рис. 11.2. Активный центр CuZn-супероксиддисмутазы. Молекулы воды обозначены как W

происходит диссоциация связи меди с мостиковым фрагментом гистидина, протонирование его и замещение молекулы воды, что приводит к трехкоординированной меди. Затем Cu(I) вновь окисляется до Cu(II) второй молекулой супероксида (уравнение (11.2)). Продукт восстановления супероксида связывает два протона, приходящих соответственно от гистидина, прежде выполнявшего роль мостика, и от растворителя и, наконец, элиминирует из активного центра фермента в виде пероксида водорода.

Недавно была определена структура бычьего фермента при разрешении 1,7 Å. Из результатов этой работы следует, что переход Cu(I)/Cu(II), как и связанные с этим переходом изменения координационной сферы, модулируются белковой петлей, которая очерчивает полость активного центра фермента [15]. Здесь вновь рассматривалась возможность фотовосстановления при воздействии рентгеновских лучей. Эта возможность (вероятно) была исключена исследованием карт электронной плотности и температурных факторов, соответствующих атомам в активном центре.

11.2.4. Мультимедные оксидазы

Эти белки составляют довольно большую и гетерогенную группу ферментов, содержащих кластер медных ионов, координированных как с белковыми, так и с небелковыми лигандами. Синие медные оксидазы часто включены в метаболизм железа и в медный гомеостаз. Хорошо изученным примером является церулоплазмин млекопитающих – фермент, который катализирует превращение Fe(II) в Fe(III) и является наиболее распространенным медь-содержащим белком плазмы крови [23–25]. В растениях как аскорбатоксидазы, так и лакказы являются родственными ферментами, способными к окислению различных фенольных субстратов, что приводит к полимерным продуктам [26]. Ниже следует краткое описание некоторых ферментов этой группы.

11.2.4.1. Лакказы

Эти ферменты связывают четырехэлектронное окисление субстрата и четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды [23]. Молекулярный кислород связывается с трехядерным активным центром, построенным из одного иона меди с координацией типа II и двух ионов меди с координацией типа III, и восстанавливается до воды посредством четырех последовательных одноэлектронных переносов со стороны медного центра типа I, удаленного на расстояние примерно 13 Å [27]. Лакказы участвуют как в синтезе лигнина в растениях, так и в его деградации под действием грибов [28–30]. Несмотря на то что пространственное строение лакказы уже было установлено некоторое время назад, лишь недавно две группы исследователей сообщили о структуре этого фермента, выделенного из гриба *Trametes versicolor*, в которой полностью установлено окружение атомов меди [28, 29]. В одной из этих структур [29] лакказа связана с ариламином, который использовался в качестве индуктора при культивировании. Этот довольно слабый субстрат расположен близко к атому меди типа I, но не связан с ним непосредственно. Хотя характер связывания субстрата с родственным ферментом – церулоплазмином – был установлен с помощью рентгеноструктурного анализа, эти исследования были выполнены со средней степенью разрешения, и не было проведено кристаллографического уточнения структуры активного центра [25]. Структура грибковой лакказы объясняет также, почему структура медного центра типа II является лабильной по сравнению со структурой двух центров типа III. В центре типа II атом меди координирован только с двумя фрагментами гистидина и молекулой воды, в то время как в центрах типа III каждый ион меди связан с тремя гистидиновыми фрагментами и растворителем (рис. 11.3). Реакция, катализируемая лакказами, включает захват одного электрона из субстрата гистидиновым фрагментом, который связан с ионом

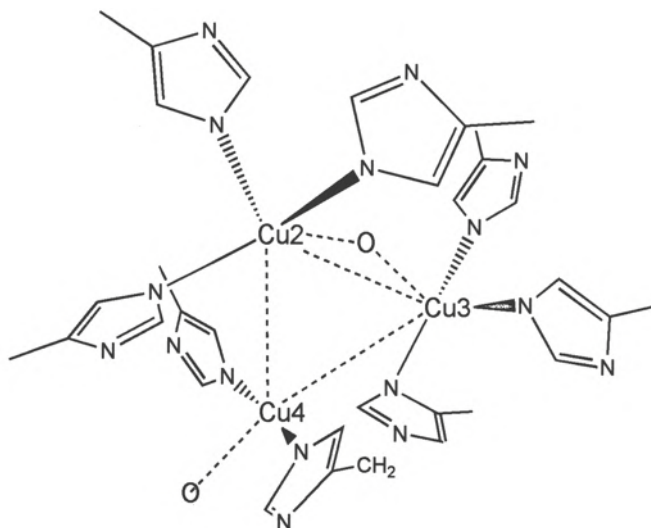


Рис. 11.3. Трехядерный активный центр лакказы

Cu типа I. Затем происходит перенос электрона к одному из двух атомов меди типа III, удаленных на расстояние около 12 Å либо через боковые цепи гистидина, либо через пространство. В результате восстанавливается молекулярный кислород. Лакказы могут выполнять свою функцию при значениях потенциалов от средних до очень высоких: от 500 до 800 мВ относительно нормального водородного электрода. В противоположность другим синим медным оксидазам, содержащим тетракоординированный атом меди типа I, в лакказах атом меди имеет планарную тригональную координацию. Ранее считали, что структурная основа для модуляции окислительно-восстановительного потенциала заключается в природе лиганда, находящегося в аксиальном положении координационного полиэдра Cu [31, 32]. Однако из структуры лакказы, установленной позже с высоким разрешением, следует, что редокс-потенциал увеличивается за счет удлинения связи Cu-лиганд, приводящего к уменьшению электронной плотности на атоме металла [28].

11.2.4.2. N_2O -Редуктазы (NOR)

Многие организмы используют окисленный азот как акцептор электронов в процессе анаэробного дыхания [33, 34]. Этот процесс денитрификации может быть описан как серия последовательных реакций восстановления: $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$.

Недавно было показано, что фермент, катализирующий последнюю реакцию в этой последовательности, содержит новый многоядерный медный центр [35, 36]. Некоторое время считалось, что NOR содержит четыре иона меди, образующих пару биядерных металлических центров, причем один из них имеет свойства близкие к Cu_A в цитохром С-оксидазе, а второй является каталитическим центром типа Cu_Z . Рентгеноструктурный анализ показывает, что в NOR Cu_A является симметричным сайтом, координированным с двумя мостиковыми цистеинами, двумя терминальными гистидинами, терминальным метионином и карбонильным кислородом из основной цепи. Хотя структура этого медного центра предсказана с использованием ряда подходов и на самом деле похожа на структуру Cu_A в цитохром С-оксидазе, строение сайта Cu_Z в NOR оказалось полной неожиданностью [35]. Показано, что он состоит из четырех ионов меди, расположенных «бабочкой», лигандами ионов являются боковые цепи гистидина (рис. 11.4). Три из этих ионов меди координированы с двумя остатками гистидина каждый, а четвертый – только с одним гистидином. Также в структуре присутствуют три внешних лиганда. Один из них является лигандом типа μ^4 и координирован со всеми четырьмя ионами меди. Хотя первоначально считалось, что этот лиганд – OH^- [35], элементный анализ и спектроскопия комбинационного рассеяния изотопно-замещенного фермента показали, что это сульфид-ион [37]. Две дополнительные молекулы воды (или гидроксогруппы) конкурируют за координацию с кластером Cu_Z . Самая важная проблема – каким образом связывается N_2O , до сих пор не решена. Хотя четвертый ион меди в кластере и является привлекательным кандидатом на эту роль, необходимы дополнительные доказательства в виде структур комплексов субстрата-аналога или ингибитора, связанных с ферментом.

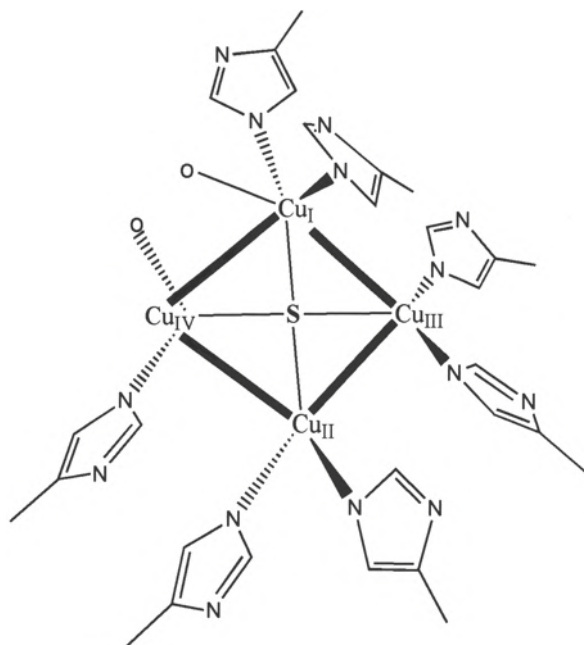


Рис. 11.4. Активный сайт N_2O -редуктазы. Центральный сульфид-ион [37] первоначально рассматривался как молекула воды [35]

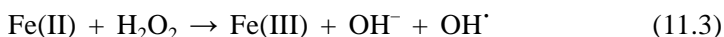
11.2.4.3. Гомеостаз меди

Недавно полученная с высоким разрешением структура CueO-фермента, необходимого для гомеостаза меди в кишечной бактерии *Escherichia coli*, представляет на данный момент наиболее полную структуру четырехядерного медного активного сайта [27]. Например, было показано, что сайт T1 Cu, который обычно описывался как искаженный тетраэдр [24], на самом деле имеет тригонально-бипирамидальную координационную сферу с отсутствующим лигандом, аналогичную хорошо описанным азуринам. Однако степень окисления ионов меди в кристаллической структуре не была установлена.

11.3. Железо

Железо – это наиболее распространенный в большинстве организмов микроэлемент. В составе гема железо участвует в хранении и транспорте O_2 и дыхании, оно также способствует электронному переносу, образуя кластеры FeS , и катализирует большое количество реакций, во многих из которых участвуют промежуточные продукты восстановления молекулярного кислорода до воды и присоединения атомов кислорода к субстрату [38]. В восстановительной среде клетки железо и другие редокс-активные ионы металлов

могут катализировать одноэлектронное восстановление пероксида водорода с образованием высокоактивного окислителя – гидроксильного радикала.



Комплексообразование железа с белками позволяет предотвратить эту реакцию. Другим способом избежать образования агрессивного гидроксил-радикала является понижение концентрации пероксида водорода при действии каталаз и пероксидаз [38]. Другие ферменты, такие как супероксиддисмутазы, нейтрализующие активный ион O_2^- , также являются частью механизма детоксикации клетки. Ниже описано несколько примеров железосодержащих ферментов.

11.3.1. Цитохром с-оксидаза

Этот фермент, присутствующий во всех животных и растениях, аэробных дрожжах и некоторых бактериях, участвует в предпоследней стадии окислительного фосфорилирования – процессе, который сочетает перенос электронов с синтезом АТФ; цитохром с (cytc) переносит электроны к конечному компоненту дыхательной цепи – цитохром с-оксидазе (COX), которая восстанавливает O_2 до воды [39, 40]. Известны кристаллические структуры как бактериальной, так и митохондриальной COX, связанной с мембраной и состоящей из нескольких субъединиц [41–45]. Этот фермент содержит два гемовых фрагмента и три иона Cu. Из них один гем и один атом Cu (так называемый a_3/Cu_B -центр) образуют каталитический центр (рис. 11.5),

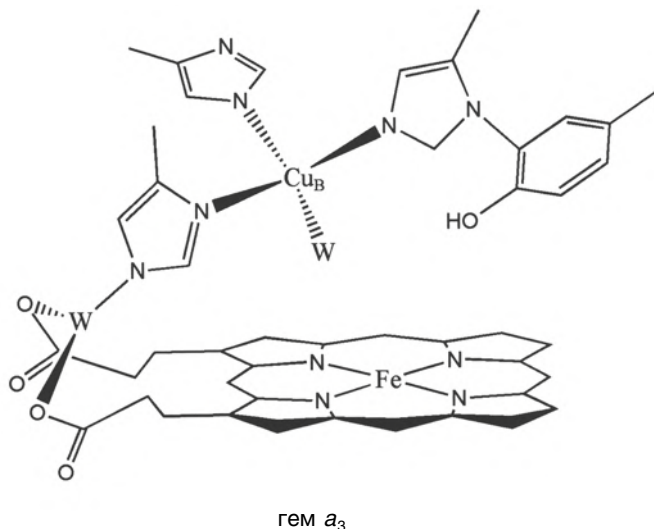
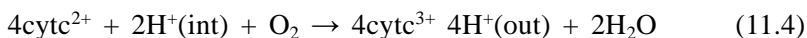


Рис. 11.5. Каталитический центр a_3/Cu_B цитохром с-оксидазы. Группа гема показана без двойных связей. W – молекула воды. Обратите внимание на тирозин-гистидиновый димер

оставшийся гем *a* и биядерный центр Cu_A участвуют в электронном переносе. Восстановление O_2 протекает в соответствии со следующим уравнением:



где индекс (int) относится к протонам, находящимся внутри митохондрии или бактерии, а индекс (out) – к протонам, выделяемым во внешнюю среду. В целом через мембрану происходит перенос протонов и механизм этого процесса широко обсуждался [46]. Некоторые постулированные ключевые интермедиаты этой реакции рассмотрены в работе [47].

11.3.2. Оксигеназы

Существует два класса ферментов, катализирующих реакции O_2 с органическими субстратами: диоксигеназы, внедряющие оба атома кислорода в продукт, и монооксигеназы, которые передают продукту один атом кислорода, а другой элиминируют с образованием молекулы воды [38]. Примером первых являются бактериальные катехолдиоксигеназы. Эти ферменты разрывают связи в ароматических кольцах, внедряя оба атома из молекулы кислорода в кольцо [48–51]. Они играют важную роль в деградации лигнина и терпенов, а также в катаболизме триптофана и тирозина. Со структурной точки зрения, наиболее изученным ферментом этой группы является протокатехоат-3,4-диоксигеназа (3,4-PCD), окисляющая катехольные субстраты с образованием производных муконовой кислоты [52]. Ион железа активного центра 3,4-PCD имеет конфигурацию искаженной тригональной бипирамиды: аксиальные позиции заняты гистидином и тирозином, а экваториальная плоскость образована гистидином, тирозином и молекулой воды (или OH^-) (рис. 11.6). Кристаллографическое исследование комплексов слабо и сильно связывающихся монодентатных ингибиторов с ферментом показало, что

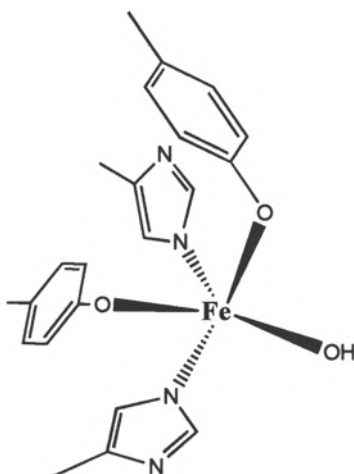


Рис. 11.6. Активный сайт протокатехоат-3,4-диоксигеназы

первые замещают гидроксид-ион, в то время как последние связываются в экваториальной области с образованием октаэдрически-координированного железа [53]. Бидентатные субстраты замещают аксиальный тирозин и гидроксидный лиганд, образуя квадратно-пирамидальный комплекс.

Другой группой субстрат-активирующих ферментов с известной структурой являются липооксигеназы [54–57], которые наряду с циклооксидазами реагируют с жирными кислотами и образуют частицы, являющиеся предшественниками биосинтеза эйкозаноидов. Эти молекулы участвуют в патологических воспалительных процессах, и поэтому привлекают к себе повышенное внимание [58]. Хотя было постулировано, что интермедиатом в этой реакции является пероксидный комплекс железа (III), структурных данных для ферментов, содержащих активный сайт Fe(III) до последнего времени не было. Недавно было показано, что при обработке избытком гидропероксида липида раствор соевой липооксигеназы-3 приобретает отчетливый пурпурный цвет, который, по данным ЭПР, обусловлен образованием высокоспинового Fe(III). Этот метастабильный и фотолabile продукт был закристаллизован, и его структура была определена с разрешением 2,0 Å [59]. По способу связывания с субстратом было предположено, что пурпурная липооксигеназа содержит пероксокомплекс железа (рис. 11.7).

Монооксигеназы могут содержать как гемовое, так и негемовое железо, также известны медьсодержащие ферменты, такие как тирозиназы. Представительной и хорошо изученной группой содержащих гемовое железо монооксигеназ является семейство ферментов цитохромов P-450 [60]. Они катализируют разнообразные реакции, такие как гидроксилирование алифатических соединений и ароматических колец, окисление аминов в оксиды аминов,

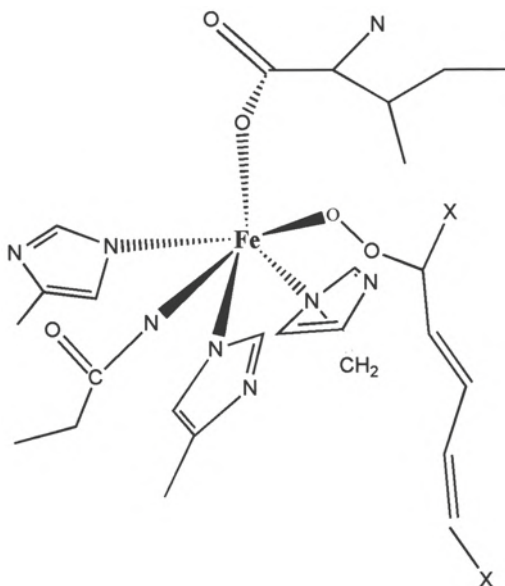


Рис. 11.7. Активный сайт липооксигеназы

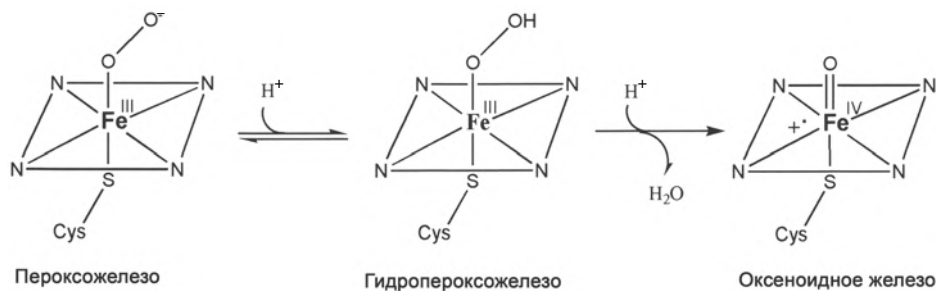


Рис. 11.8. Интерmediаты в катализируемых цитохромом P-450 реакциях [62]

окисление сульфидов в сульфоксиды, дегалогенирование и окислительное деалкилирование [61]. Наиболее изученным членом группы является фермент из бактерии *Pseudomonas putida*, поскольку, в отличие от других похожих ферментов, он является растворимым, а не мембранно-ассоциированным. Возможные интерmediаты в нескольких катализируемых цитохромами P-450 реакциях представлены на рис. 11.8 [62].

11.3.3. Рибонуклеотидредуктаза

Восстановление рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды является важной стадией в синтезе ДНК. В этой реакции происходит замещение гидроксильной группы в положении 2' рибозного остатка на водород как в нуклеозиддифосфатах, так и в нуклеозидтрифосфатах. Существует несколько классов рибонуклеотидредуктаз (RR), отличающихся по природе кофактора и последовательности аминокислот, но все они содержат ион металла и реакция всегда происходит по радикальному механизму [63]. К классу I относятся тетрамерные ферменты, содержащие α_2 - и β_2 -гомодимеры, называемые соответственно R1 и R2 [64, 65]. R1 содержит связывающий сайт, а R2 – двухядерный активный центр, содержащий негемовое железо и стабильный тирозильный радикал, участвующий в каталитическом механизме [66]. В восстановленном состоянии (Fe(II)–Fe(II)) каждый тетракоординированный ион металла связан с двумя бидентатными остатками глутамата, одним монодентатным карбоксилатом из остатков аспартата или глутамата, и гистидином (рис. 11.9, а). В окисленном состоянии (Fe(III)–Fe(III)) один из атомов железа гексакоординирован с одним остатком гистидина, двумя монодентатными и одним мостиковым глутаматом, молекулой растворителя и μ -оксо-лигандом (рис. 11.9, б). Второй ион железа также гексакоординирован с одним гистидином, бидентатным аспартатом, одним мостиковым глутаматом, молекулой растворителя и μ -оксолигандом. Генерирование тирозильного радикала требует связывания O_2 с двухядерным комплексом железа. В большинстве механизмов предполагается образование пероксо-интерmediата Р [67–69], также было показано, что комплекс μ -1,2-пероксодижелеза(III) накапливается в мутанте *E. coli* R2-D84E. Остаток 84 является лигандом железа в ферменте [70]. Реакция протекает через образование интерmediата X, представляющего

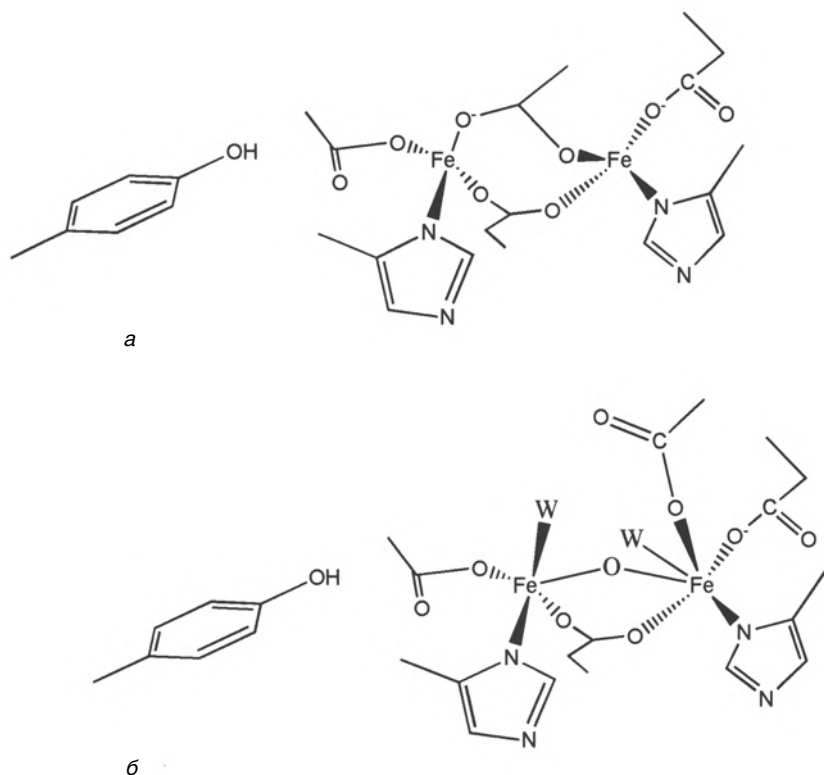


Рис. 11.9. Активный сайт рибонуклеотидредуктазы. *а* – Восстановленное состояние (Fe(II) – Fe(II)); *б* – окисленное состояние (Fe(III) – Fe(III))

собой пару Fe(III)–Fe(IV), которая разлагается с образованием оксо-мостика и стабильного непротонированного тирозильного радикала [71].

Было показано, что кристаллическая структура рибонуклеотидредуктазы R2 мыши содержит только один ион железа, возможно, это связано с тем, что в этом ферменте активный центр более доступен растворителю [72]. Недавно описанная кристаллическая структура того же самого фермента с двухядерным кобальтовым центром вместо железного отличается от бактериального фермента ориентацией одного из глутаматных лигандов [73]. Это может объяснить повышенную лабильность одного из железных центров. Поскольку связывающий субстрат сайт R1 и генерирующий радикал сайт R2 находятся на удалении друг от друга, то должен существовать механизм переноса генерируемого радикала. Считается, что радикал H[•] переносится через систему связанных водородными связями аминокислот [74–77].

В рибонуклеотидредуктазах класса II, являющихся гомодимерными ферментами, радикальные частицы генерируются аденозилкобаламином. Этот класс ферментов может работать как аэробно, так и анаэробно, и не встречается в высших организмах [78]. Анаэробные рибонуклеотидредуктазы класса III имеют четвертичную структуру $\alpha_2\beta_2$, они содержат кластер FeS

и глициновый радикал и принадлежат к классу радикальных ферментов, описанных ниже. Структура рибонуклеотидредуктаз класса III не описана [79].

11.3.4. S-Аденозилметионин. (SAM)-зависимые радикальные ферменты

SAM-зависимые железо-серные ферменты могут катализировать большое количество радикальных реакций, приводящих к образованию 5'-деоксиаденозина, метионина и окисленного белка или радикала субстрата (рис. 11.10) [80, 81]. Все эти ферменты содержат необычный кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ и последовательность аминокислот SxxxSxxC , но в остальном имеют очень низкую гомологию аминокислотных остатков [82]. В большинстве случаев разложение SAM необратимо и протекает стехиометрично, однако известны некоторые реакции, в которых он участвует в каталитических количествах [83]. Только недавно удалось получить данные о кристаллической структуре первых двух

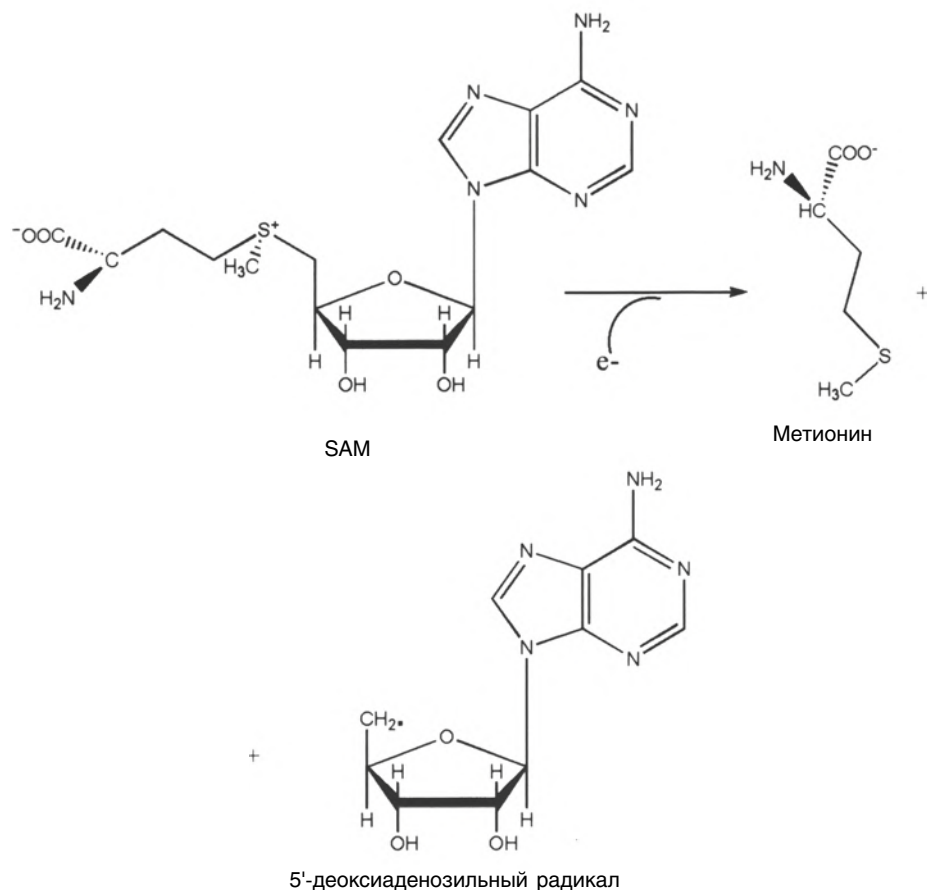


Рис. 11.10. Кофактор S-аденозилметионин. Генерирование радикалов инициируется одноэлектронным восстановлением

представителей этого класса ферментов – копропорфириноген III оксидазы (HemN) [84] и биотинсинтазы (BioB) [85]. Первый из них катализирует окислительное декарбоксилирование копропорфириногена III в протопорфириноген IX, преобразуя пропионильные боковые цепи в винильные группы [84]. Неожиданным является то, что HemN связывается с двумя молекулами SAM. Одна из них напрямую связана с одним из ионов железа в кластере $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ через amino, карбоксил и сульфониевый остаток SAM. Это позволяет предположить, что перенос электрона происходит вследствие выгодного электронного взаимодействия между сульфониевым атомом серы и кластером $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$. Вторая молекула SAM находится рядом, однако остается неясным, является ли она частично разложившейся, или просто неупорядоченной. Молекулярная модель позволяет предположить, что вторая молекула SAM занимает центр связывания субстрата, однако возможным является и одновременное связывание субстрата и двух молекул SAM с HemN [84].

BioB катализирует превращение детиобиотина (DTB) в биотин путем внедрения атома серы между двух атомов углерода [85, 86]. Было предложено два разных механизма: первый предполагает участие кластера $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ в качестве источника серы в биотине [87, 88], в то время как во втором механизме атом серы предоставляется связанным с ферментом персульфидом, образующимся за счет действия пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимой цистеиндесульфуразы [89, 90]. Положение двух кластеров FeS и ориентация связанных SAM и DTB в кристаллической структуре BioB подтверждает первую гипотезу. В структуре BioB не было найдено типичного сайта связывания PLP [85].

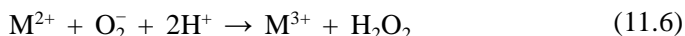
11.4. Марганец

Биохимия марганца во многих аспектах напоминает биохимию железа, и часто, но не всегда эти металлы взаимозаменяемы. Примером этого является камбиалистическая супероксиддисмутаза (SOD) из *Porphyromonas gingivalis*, проявляющая максимальную активность как с Fe, так и с Mn [93, 94]. Это неудивительно, поскольку и Fe-SOD, и Mn-SOD принадлежат к одному семейству белков и обладают одинаковым аминокислотным составом и конформацией активного центра. Соотношение Fe/Mn в SOD из *P. gingivalis* зависит от количества воздуха, доступного культуре клеток [94]. Крайний пример замещения Fe на Mn проявляется в паразитическом патогене *Borrelia burgdorferi*, вызывающем болезнь Лайма [95]. В этом организме, вообще не содержащем железа, марганец наряду с цинком и магнием является важнейшим элементом, обеспечивающим рост клеток. Замена железозависимых ферментов на их марганецсодержащие аналоги подчеркивается наличием SOD с >50%-гомологией к камбиалистическому ферменту из *P. gingivalis*. Причина этой адаптации заключается в том, что обычным механизмом защиты клеток-хозяев от инфекции является уменьшение доступности железа для патогена и поддержание количества несвязанного железа на уровне 10^{-18} М. Это в 10^{11} раз меньше, чем концентрация, необходимая для роста микробов [96].

Как и некоторые другие металлы, Mn может действовать как кислота Льюиса или участвовать в редокс-процессах. По-видимому, одним из наиболее изученных и привлекательных свойств Mn является его участие в расщеплении воды до кислорода, происходящей под действием фотосистемы II (PS II). Недавнее рентгеноструктурное исследование (со средним разрешением) структуры PS II [97] неожиданно показало наличие кластера Mn_3Ca , который, наряду с некоторыми другими представительными Mn-содержащими активными сайтами, будет рассмотрен далее.

11.4.1. Супероксиддисмутазы

Эти ферменты катализируют следующее превращение:



где M – ион металла.

Как говорилось выше, некоторые SOD камбиалистичны и проявляют равную активность в случае связывания с активным центром как Fe, так и Mn [92]. С другой стороны, природная Mn-зависимая SOD из *E. coli* проявляет активность, только связываясь с Mn. Этот фермент может также содержать Fe, но при этом каталитическая активность пропадает. Это удивительно, поскольку родственные Mn- и Fe-SOD из *E. coli* имеют очень похожие первые координационные сферы (рис. 11.11), содержащие три остатка гистидина, одну боковую цепь аспартата и H_2O/OH^- (в зависимости от степени окисления) в качестве лигандов [98–102]. Координационная сфера иона – почти идеальная тригональная бипирамида. Соотношение между связыванием металла и каталитической активностью похоже контролируется внешнесферными лигандами. В Mn-SOD растворитель связан

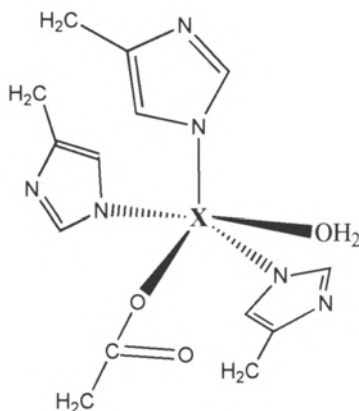


Рис. 11.11. Координационная сфера ионов Fe/Mn (обозначен как X) в супероксиддисмутазах

водородными связями с остатком глутамина из С-терминального фрагмента, в то время как в Fe-SOD аналогичный остаток глутамина предоставляется N-терминальным концом фермента. Mn-SOD часто выделяют в виде смеси Fe/Mn и *apo*-комплексов, хотя полностью активный димарганецсодержащий фермент может быть получен при добавлении в культуральную среду солей марганца. Интересно отметить, что внешнесферным лигандом-растворителем в камбиалистичной Mn/Fe-SOD является гистидин [92]. Это может представлять собой ответ эволюции на отсутствие металлоспецифичности, наблюдаемой для Mn-SOD.

11.4.2. Фосфопротеинфосфатазы

Обратимое фосфорилирование является необходимым элементом в регуляции метаболизма во всех организмах [103]. Присоединение фосфорильной (PO_3^-) группы к некоторым аминокислотам катализируется киназами, а обратный процесс – протеинфосфатазами. Эти ферменты классифицируются в соответствии с их субстратоспецифичностью и природой иона металла. Общий «фосфодиэстеразный мотив» с последовательностью $\text{DXH(X)}_n\text{GDXXD(X)}_m\text{GNHD/E}$ был обнаружен в нескольких представителях этого класса ферментов [104–106]; он соответствует вторичной структуре типа $\beta\alpha\beta\alpha$, определяющей архитектуру связывающего два иона металла каталитического центра. Остатки, выделенные жирным шрифтом, являются лигандами металлических центров M1 и M2. Центр M1 координирован с первым аспартатом и гистидином из приведенной выше общей последовательности, а центр M2 связывается с гистидином из этой же последовательности и, кроме того, с двумя боковыми цепями гистидина, находящимися перед С-концом общей последовательности. Оставшийся аспартат является μ -1,1-лигандом для двух ионов металла. Ранее исследование Mn-содержащей фосфопротеинфосфатазы (PPP) из бактериофага λ (λPP) показало, что два сайта металла имеют неодинаковое сродство к Mn [107]. На основании кристаллографических данных и ЭПР-спектроскопии λPP Уайт и др. [103] предложили механизм, в котором более прочно связанный Mn остается в активном центре во время каталитического цикла, в то время как второй ион Mn входит в активный сайт, в котором связывается субстрат, и отщепляется в виде MnHPO_4 (рис. 11.12). Важным вопросом является то, каким образом лигандное поле двух ионов Mn(II) способствует катализируемому кислотами Льюиса гидролизу, а не редокс-процессам, подобным наблюдаемым в Mn-зависимых каталазах, имеющих сходные активные сайты.

11.4.3. Оксалакдексакарбоксилазы (пируваткарбоксилазы)

Щавелевая кислота является общей проблемой как для растений, так и для позвоночных, поскольку эти организмы не способны ее катаболизировать [108]. Хотя накопление оксалата приводит к стрессу у растений, у позвоночных эта молекула метаболизируется бактериями, присутствующими в кишечном тракте [109]. Оксалат может катаболизироваться разными

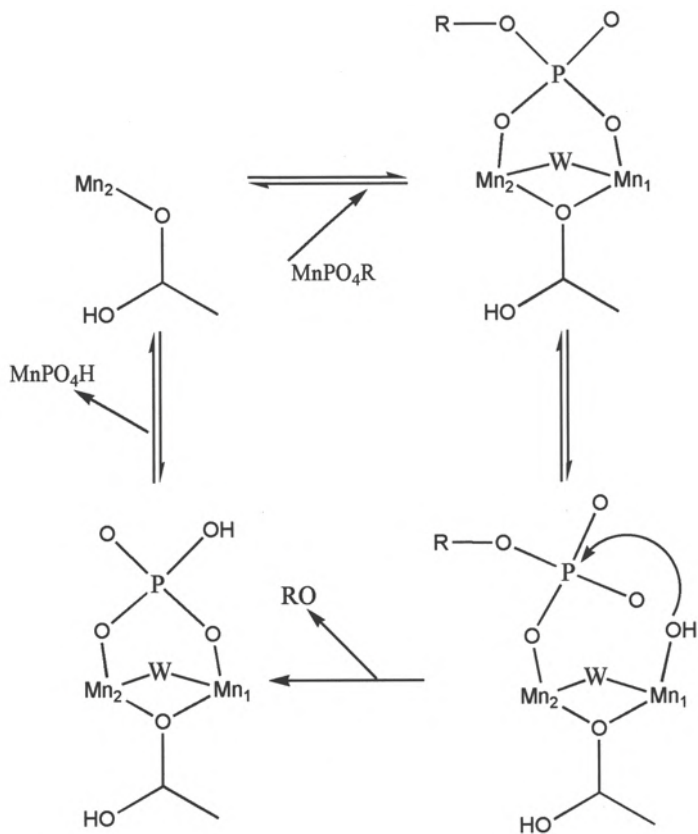


Рис. 11.12. Предложенный каталитический цикл для фосфопроteinфосфатазы из бактериофага λ [103]

путями: окислением, декарбоксилированием оксалилкоэнзима А или прямым декарбоксилированием. Как окисление, так и декарбоксилирование оксалата катализируется Mn-содержащими ферментами. Здесь обсуждается декарбоксилирование оксалата с образованием формиата и CO_2 . Недавно с разрешением 1,75 Å была определена кристаллическая структура связанной с формиатом оксалатоксидазы из *Bacillus subtilis*. Фермент содержит два гомологичных домена, каждый из которых связывает по одному иону Mn. Два атома металла находятся на расстоянии 26 Å друг от друга и имеют октаэдрическое окружение, образованное предоставленными белком тремя остатками гистидина и одним глутаматом [108]. Ион Mn в домене 1 дополнительно координирован с формиат-ионом и молекулой воды, в то время как второй ион Mn связан с двумя молекулами воды. Наложение активных центров оксалатдекарбоксилазы и оксалатоксидазы показывает их близкое сходство, и опять возникает вопрос, какие элементы в координационной сфере обуславливают различие между окислительным и неокислительным декарбоксилированием. Замена некоторых аминокислот, приводящая к удалению доноров протонов

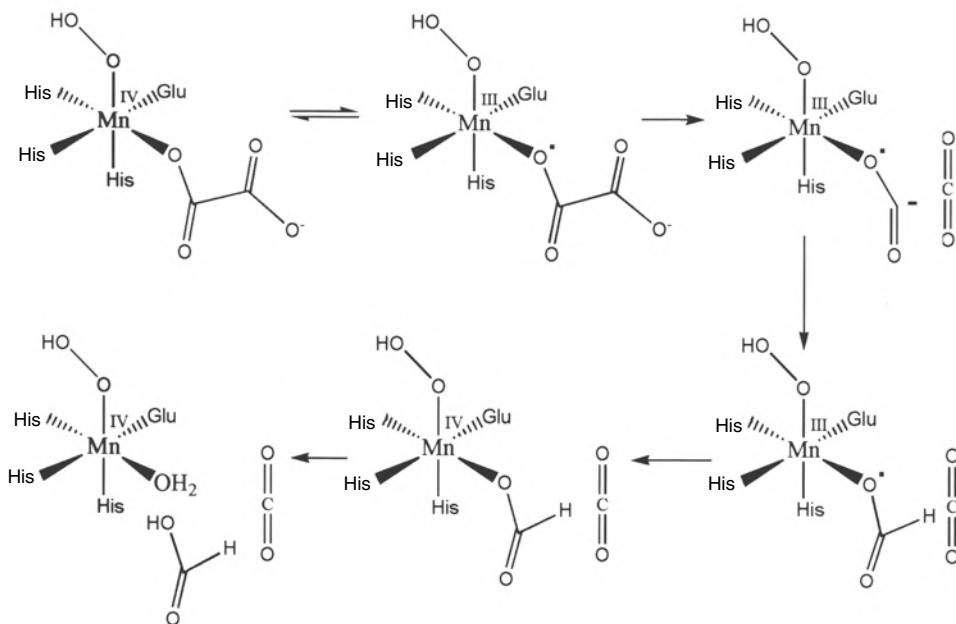


Рис. 11.13. Возможный механизм действия оксалатдекарбоксилазы

из оксалатоксидазы, может предотвращать реакцию, приводящую к формату. Возможный механизм катализа представлен на рис. 11.13.

11.4.4. Аргиназы

Эти ферменты катализируют гидролиз *L*-аргинина с образованием *L*-орнитина и мочевины. Аргиназы млекопитающих разделяют на классы I и II по их местонахождению: аргиназы I в основном обнаружены в печени, а аргиназы II обнаружены в других тканях и участвуют в основном в гомеостазе *L*-аргинина [110]. Было показано, что активный центр аргиназы I крысы содержит двухядерный Mn-центр. Находящиеся на расстоянии 3,3 Å ионы $Mn(II)_A$ и $Mn(II)_B$ координированы с одним остатком гистидина, тремя – аспартата и молекулой растворителя, связывающей два иона металла, и образующей водородную связь с одним из аспартатных лигандов $Mn(II)_A$ (рис. 11.14). Было определено, что для катализа необходим неизмененный активный центр [111]. В общепринятом механизме два иона марганца поляризуют и ориентируют мостиковый гидроксид для нуклеофильной атаки на гуанидиновый углерод субстрата.

Аргиназа II была обнаружена в почках, тонкой кишке, молочных железах и в *corpus cavernosus*. Она играет очень важную роль в обеспечении биодоступности *L*-аргинина для NO-синтазы, поскольку эти ферменты конкурируют за один и тот же субстрат. И действительно, было показано, что биосинтез NO ускоряется при ингибировании аргиназы II производными борных

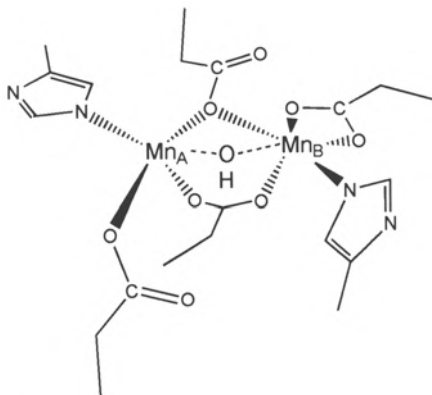


Рис. 11.14. Активный сайт аргиназы

кислот, что открывает новый путь к лечению половых расстройств [112]. Биядерный марганцевый активный сайт аргиназы II практически идентичен сайту аргиназы I, а различия в их активности определяется различием в их местонахождении.

11.4.5. Фотосинтетический кислород-генерирующий центр (OEC) фотосистемы II (PSII)

Невозможно переоценить определяющую роль, которую кислородный фотосинтез играл в формировании состава атмосферы и биологической эволюции Земли. Ключевой реакцией фотосинтеза является фотоиндуцируемое окисление воды, одним из термодинамически наиболее проблематичных процессов в природе. Известно выражение: «Если вы можете расщепить воду, то вы можете расщепить все» [113]. Уже достаточно давно известно, что металлический сайт, ответственный за эту ключевую реакцию, содержит ионы кальция и марганца. Совсем недавно Барбер, Ивата и др. [97] опубликовали структуру PSII из цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* с разрешением 3,5 Å. Хотя ранее были определены структуры PSII с более низким разрешением, структура Mn-содержащего центра оставалась неясной. Модель Барбера–Иваты основана на рентгеновских картах аномальной электронной плотности, рассчитанных из данных, полученных как на краю рассеяния Mn, так и при длине волны 2,25 Å, при которой Ca(II) имеет более сильный аномальный сигнал f'', чем марганец, и предполагает, что активный сайт состоит из кубанообразного кластера Mn(3)CaO(4) и иона марганца, соединенного с ним через один из оксолигандов (рис. 11.15). Было предложено несколько механизмов, в которых пара Ca–Mn является необходимой для окисления воды. Они включают связывание молекулы воды с одним из ионов Mn, который перед образованием молекулы кислорода образует высокоэлектрофильный интермедиат, предположительно оксильный радикал Mn(IV) или оксочастицу Mn(V). Связь O=O образуется при нуклеофильной атаке второй молекулы воды, связанной с ионом Ca. В этой реакции

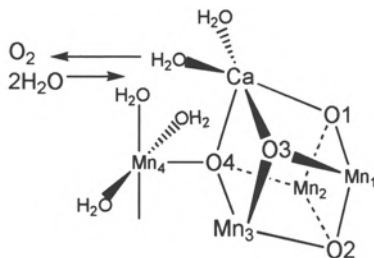


Рис. 11.15. Постулированный кубанообразный кластер Mn_3CaO_4 в кислород-генерирующем центре фотосистемы II [97]

Ca(II) может действовать как слабая кислота Льюиса, при помощи кластера Mn_3 и хлорид-иона [97].

11.5. Молибден и вольфрам

Молибден и вольфрам являются элементами шестой группы Периодической системы. Они имеют близкие атомные и ионные радиусы, а также степени окисления; это относительно редкие элементы – 53-е и 54-е места по распространенности в природе [114]. Мо и W – это единственные представители второго и третьего ряда переходных элементов, являющиеся необходимыми для роста по крайней мере некоторых организмов. Молибден встречается в каталитическом центре нитрогеназы, где он является частью кластера, также содержащего железо и серу (FeMo-co), и, как связанный с белком молибденовый кофактор (Mo-co), во многих других ферментах. Молибденовые (и вольфрамовые) кофакторы содержат моноядерный комплекс металла и органическую молекулу, называемую молибдоптерин (MPT) (рис. 11.16). Хотя структура FeMo-co известна уже более 10 лет [115], механизм реакции, катализируемой нитрогеназой, до сих пор известен не полностью. Кофактор FeMo-co усиленно изучался, и не будет обсуждаться далее.

Молибдоптеринсодержащие ферменты можно разделить на две группы, в зависимости от катализируемой реакции: те, которые катализируют перенос атома кислорода, такие как ДМСО-редуктаза и сульфитоксидаза (SO), и те, которые катализируют гидроксилирование ароматических гетероциклических соединений и альдегидов [116], например ксантиноксидоредуктаза (XOR) и альдегидоксидоредуктаза (AOR). Однако, эта функциональная классификация не совпадает со структурной, которая предполагает, что эти ферменты можно разделить на пять семейств, наиболее представительными членами которых являются: (1) ДМСО-редуктаза, (2) ксантиноксидоредуктаза, (3) сульфитоксидаза, (4) альдегидферредоксиноксидоредуктаза и (5) СО-дегидрогеназа (CODH). Эукариотические молибденсодержащие ферменты характеризуются наличием связи Мо–молибдоптерин, в то время как в бактериях молибденовый кофактор может включать второй нуклеотид – ГМФ, АМФ, ИМФ или ЦМФ [117]. Функциональная роль этой модификации не ясна. Все ферменты,

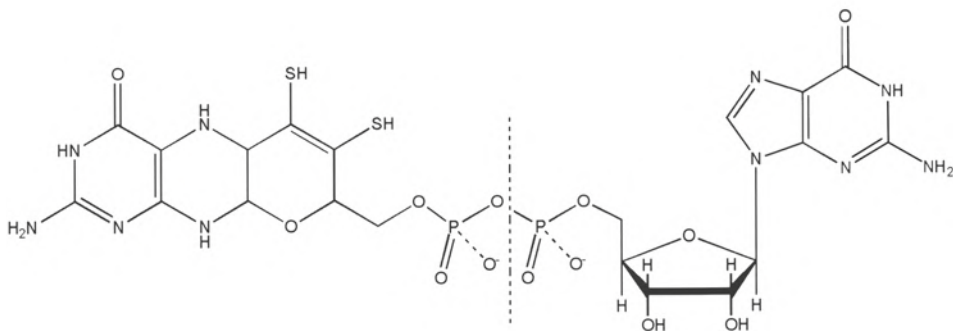


Рис. 11.16. Молибдоптериновый кофактор. В прокариотах кофактор содержит нуклеотид (справа от вертикальной черты), в эукариотах этот фрагмент отсутствует

содержащие молибденовый кофактор, даже если они могли бы быть более или менее филогенетически связаны, характеризуются тем, что кофактор находится в белковой матрице и воронкообразная полость соединяет активный сайт с молекулярной поверхностью. Именно размер, форма и общий заряд этой области белка определяет субстратоспецифичность. Каталитический механизм в остальном очень похож для всех молибденсодержащих ферментов и включает ионы молибдена и вольфрама в степенях окисления +4, +5 и +6. Различные семейства ферментов обсуждаются далее.

11.5.1. Семейство ДМСО-редуктаз

ДМСО-редуктаза катализирует следующую реакцию:



Перенос атома кислорода от субстрата к продукту (воде) был подтвержден с помощью экспериментов с изотопом кислорода ^{17}O [118]. Похожий перенос атома кислорода катализируется родственной триметиламин-N-оксидредуктазой (ТМАО), биотинсульфоксидредуктазой (BSO), мономерными и димерными диссимиляторными нитратредуктазами (NR) [119, 120], молибден- и вольфрамсодержащими формиатдегидрогеназами и вольфрамсодержащей N-формилметанофурандегидрогеназой. Все эти ферменты содержат бис(MGD)-молибденовую форму кофактора. Четыре тиолята, наряду с O_γ из серина в ДМСО- и BSO-редуктазах (рис. 11.17, а), S_γ из цистеина в NR, или селеноцистеин в формиатдегидрогеназах из *E. coli*, координируют ион металла [116, 121, 122]. Кроме того, из кристаллических структур следует дополнительная координация Мо оксолигандами [122–125].

Однако некоторые из этих структур имеют необычное строение и «перегруженный» активный сайт. Изучение ДМСО-редуктазы из *Rhodobacter capsulatus* с помощью EXAFS показало наличие четырех ожидаемых лигандов Мо–S и одной связи Мо–O из остатка серина и дополнительно одну связь Мо=O в восстановленном состоянии активного сайта (Мо(IV)).

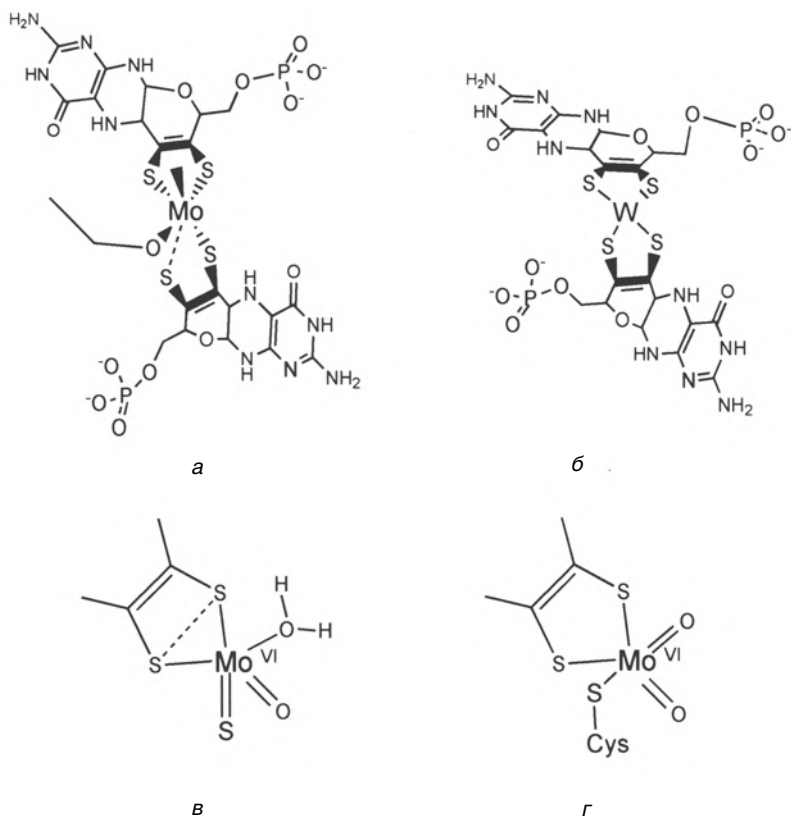
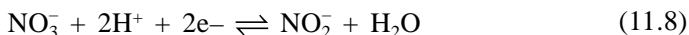


Рис. 11.17. а – Бис(MGD)-молибдоптерин; б – координационная сфера W (протеиновые лиганды не обнаружены); в – сульфидная форма активного сайта AOR; г – координационная сфера Mo в сульфидоксидазах

Этот оксолиганд удаляется при окислении иона металла до Mo(VI). В окисленной форме постулирована координация молекулы воды с ионом молибдена (рис. 11.17, в) [126–128]. Эквивалентный результат был опубликован для BSO, катализирующей восстановление *D*-сульфоксида *D*-биотина в *D*-биотин [129]. Похожий каталитический механизм ожидается для нитратредуктаз (рис. 11.18), катализирующих следующую реакцию:



Эти ферменты присутствуют как в эукариотах, так и в прокариотах и играют важную роль в ассимиляции и диссимиляции азота [130, 131]. Были опубликованы кристаллические структуры для мономерной NR из *Desulfovibrio desulfuricans* [119] и гетеродимерного фермента из *R. sphaeroides* [120]. Первая содержит Mo, связанный с бис(MGD)-кофактором и кластер [Fe₄S₄], находящийся на расстоянии 12 Å от него [119]. Большая субъединица димерного фермента гомологична ферменту из *D. desulfuricans*, а малая субъединица содержит два гема с-типа, действующих как переносчики электронов [120].

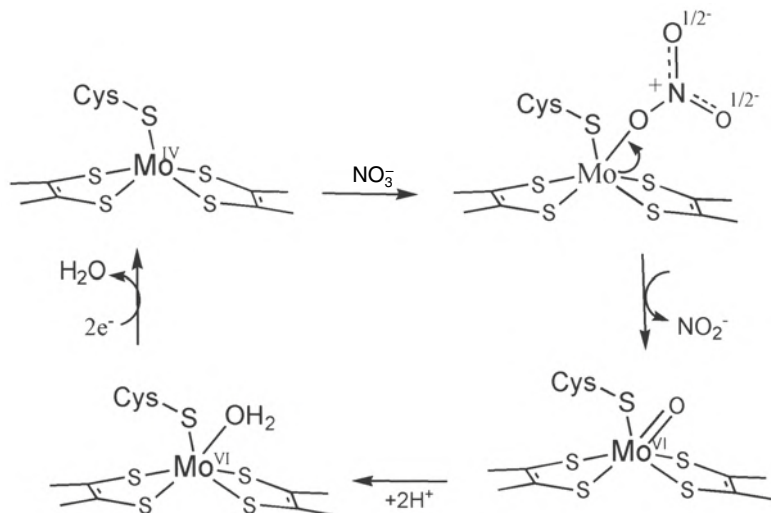


Рис. 11.18. Каталитический цикл нитратредуктазы [119]

Как и в окисленной ДМСО-редуктазе, ион Мо координирован с четырьмя тиолятами из бис(MGD)-кофактора, протеиновой боковой цепью (в этом случае через цистеин) и гидроксо-лигандом (или водой). Отсюда каталитический механизм аналогичен предложенному для ДМСО-редуктазы [119].

11.5.2. Семейство ксантиноксидоредуктаз (XOR)

XOR катализируют гидроксилирование пуринов, пиримидинов, птеринов и альдегидов [132]. В организме человека этот фермент катализирует две последние стадии катаболизма пурина: окисление гипоксантина в ксантин, а затем в мочевую кислоту. Неожиданной особенностью этого фермента (но не всех ксантиноксидоредуктаз) [133] является способность проявлять как ксантиндегидрогеназную, так и ксантиноксидазную активность, что подразумевает использование либо NAD⁺, либо молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [134]. Структурные исследования позволяют предположить, что это переключение активности, которое может быть проведено необратимо путем протеолиза [135], связано с конформационными изменениями, которые приводят к ограничению доступа кофактора NAD к связывающему его сайту, а также к изменению редокс-потенциала кофактора FAD [136].

Другие члены семейства XOR – альдегидоксидазы и альдегидоксидоредуктазы (AOR) из *D. gigas*. Все эти ферменты являются гомодимерами и, за исключением AOR, обнаружены только в эукариотах. В общем случае они содержат четыре домена, начинающихся с N-конца с двумя участками, содержащими кластер [Fe₂S₂], за которым следует домен связывания флавина (отсутствующий в бактериальном ферменте) [122], и завершающихся отрезком, содержащим молибденовый кофактор. Белки, обнаруженные в млекопитающих, имеют

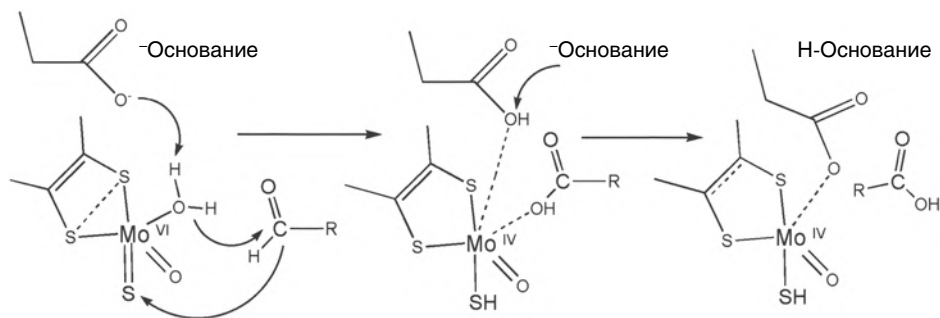
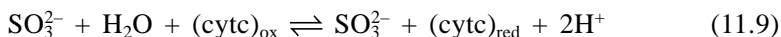


Рис. 11.19. Предложенный механизм действия AOR из *D. gigas*

общее обозначение MFE* [134]. Впервые кристаллическая структура для этого семейства была определена на примере AOR из *D. gigas*. Активный молибденовый центр координирован с двумя дитиолоновыми атомами серы из одного молибдоптерин-цитозинового динуклеотида (MCD), и тремя небелковыми кислородсодержащими лигандами. Поскольку из данных EXAFS следует, что активный фермент содержит связь молибден-сульфидный лиганд, описанная кристаллическая структура вероятно соответствует десульфированной неактивной форме. Несмотря на это, описанная структура является первым примером молибденового кофактора, ковалентно связанного с нуклеотидом, и ассоциированного с белком. Другой важной особенностью, обнаруженной в структуре AOR является то, что MPT принимает трициклическую структуру, которая наблюдалась ранее в W-содержащей AOR из *Pyrococcus furiosus*, подчеркивая таким образом уже отмеченное выше сходство между W- и Mo-содержащими ферментами [116]. Предложенный механизм для AOR из *D. gigas*, включающий связанный с Mo сульфидный лиганд, показан на рис. 11.19. Он отличается от механизма, предложенного для других Mo-содержащих ферментов, таких как DMSO-редуктазы, поскольку в нем к субстрату переносится атом кислорода из молекулы воды, а не связанная с Mo оксогруппа.

11.5.3. Семейство сульфитоксидаз

Ассимиляторные нитратредуктазы (ANR), катализирующие восстановление нитрата в нитрит, впоследствии превращаемый в NH_4^+ нитритредуктазами, также являются членами этого семейства [137, 138]. Обычно сульфитоксидаза (SO) находится во внутренней мембране митохондрии и катализирует биологически важное окисление сульфита в сульфат – последнюю реакцию в окислительной деградации серосодержащих аминокислот – метионина и цистеина.



Сравнение аминокислотных последовательностей показало, что ANR и SO структурно не связаны с вышеупомянутой группой MFE. Хотя оба этих

* Mammalian Molybdo-Flavo Enzymes (англ.).

фермента гомодимерны и имеют близкую молекулярную массу, они отличаются по организации доменов и числу связанных кофакторов. ANR состоит из трех доменов: N-конец связывает молибденовый кофактор, центральный домен связывает цитохром b-типа, а C-конец содержит сайт связывания FAD и NAD(P)^+ [139]. Хотя кристаллическая структура SO из печени цыпленка [140] показывает, что этот протеин тоже разделен на три домена, он связывает другие кофакторы: в SO гемсодержащий N-терминальный участок, на 31% гомологичный центральному домену ANR из шпината, структурно схож с бычьим цитохромом b_5 ; второй домен, имеющий гомологию 38% с N-терминальным доменом ANR, связывает молибденовый кофактор в ранее никогда не наблюдаемой белковой складке, а C-терминальный участок, не связанный ни с каким кофактором, напоминает складку в молекулах клеточной адгезии [141]. Активный сайт SO по данным рентгеноструктурного анализа можно описать следующим образом. Молибденовый кофактор содержит только одну молекулу MPT, образующую, как и в других структурах, трициклическую систему с пирановым кольцом сконденсированным с пиразиновым кольцом птерина [142]. В соответствии с эукариотическим происхождением, MPT в SO не содержит связанного нуклеотида. Мо координирован с пятью лигандами с образованием искаженной квадратной пирамиды. Терминальный оксолиганд занимает аксиальную позицию, экваториальная плоскость состоит из двух атомов серы дитиолонового фрагмента молибдоптерина, тиолятного лиганда из остатка цистеина и молекулы воды (или гидроксолиганда) [140]. Цистеиновый лиганд характерен для этого семейства и его замена на серин приводит к потере активности фермента [143]. Этот способ координации металла по данным EXAFS соответствует восстановленной форме Mo(IV) , а не полностью окисленному закристаллизованному ферменту, который должен был содержать ион Mo(VI) [144]. Вероятно, во время рентгеноструктурного эксперимента происходит фотовосстановление молибдена. Подобные процессы известны и в некоторых других случаях [145].

В организме человека генетически обусловленный дефицит SO, происходящий вследствие мутаций в механизме, обеспечивающем синтез MPT, или из-за изменений в гене, кодирующем SO, имеет драматические последствия. Среди них – серьезные нервные расстройства, неправильно расположенные глазные линзы и заторможенное умственное развитие [146]. Из четырех идентифицированных человеческих мутаций, две влияли на активный сайт, а остальные могли влиять на связывание димера [140].

11.5.4. Семейство альдегидферредоксиноксидоредуктаз

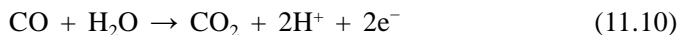
В соответствии со своим названием ферменты этой группы катализируют взаимопревращение альдегидов в карбоксилаты. Другими ферментами этого семейства (AFOR) являются формиатдегидрогеназа, формальдегидферредоксиноксидоредуктаза, ацетиленгидратаза и редуктаза карбоновых кислот. За исключением последнего фермента, эти вольфрамсодержащие ферменты были обнаружены в гипертермофильных простейших. В отличие от большинства Mo-содержащих ферментов, в которых этот ион металла может быть заменен

на W с более или менее значительной потерей каталитической активности, вышеупомянутые ферменты активны только в сочетании с вольфрамом [147]. Такая абсолютная необходимость в W в этих предположительно очень древних ферментах может быть связана с большей растворимостью WS_2 в воде, по сравнению с MoS_2 , что приводило к большей доступности W для живых организмов в аноксических условиях древней Земли.

Прототипная AFOR из *Pyrococcus furiosus* была первым содержащим молибденовый кофактор ферментом, охарактеризованным с помощью рентгеноструктурного анализа [148]. Она является гомодимером с тремя различными типами металлических центров: двумя W-коферментами, двумя кластерами $[Fe_4S_4]$ и одним ионом металла (предположительно Fe), обнаруженным в месте образования димера. AFOR имеют уникальную третичную структуру, не наблюдаемую ни в ДМСО-редуктазах, ни в АО. Ион W координирован с частицей бис(MPT); протеиновые и оксолиганды не были обнаружены при рентгеноструктурном исследовании, возможно вследствие наличия нескольких форм фермента в кристалле [148]. Таким образом, координационная сфера вольфрама является искаженной планарно-квадратной (рис. 11.17b). О каталитическом механизме AOR известно очень мало, хотя были идентифицированы возможные интермедиаты, содержащие W(IV), W(V) и W(VI) [149].

11.5.5. СО-Дегидрогеназа ($CODH_{Mo}$)

Хотя структурно фермент $CODH_{Mo}$ из аэробного организма *Oligotropha carboxydovorans* является членом семейства ксантиноксидаз, его необычный биядерный каталитический центр предполагает необычный механизм катализа. Как и его анаэробные никельсодержащие аналоги (см. раздел, посвященный Ni), этот фермент катализирует следующую реакцию:



Протоны, образующиеся в процессе окисления СО, используются для создания градиента в цитоплазматической мембране и переноса электронов в нечувствительный к СО дыхательный цикл [150]. Затем клетка использует цикл Кальвина для фиксации CO_2 . $CODH_{Mo}$ является димером гетеротримеров, а каждый тример состоит из большой (L), средней (M) и малой (S) субъединиц. Субъединица L содержит мооядерный комплекс Mo с MCD [151], субъединица M связывает FAD, а субъединица S содержит два кластера $[Fe_2S_2]$. Четыре кофактора расположены приблизительно в такой последовательности: FAD- $[Fe_2S_2]$ - $[Fe_2S_2]$ -MCD-Mo (см. рис. 2 в [152]). Субъединицы L и S существенно гомологичны C- и N-терминальным доменам AOR из *D. gigas* соответственно [153, 154]. Субъединица M принадлежит к семейству флавинсодержащих алкогольоксидаз. Как и во всех других молибденсодержащих ферментах, в $CODH_{Mo}$ кофактор находится в глубине белковой молекулы. Однако канал относительно узкий и гидрофобный, что скорее всего предотвращает доступ к активному центру более крупных, чем СО, субстратов [152].

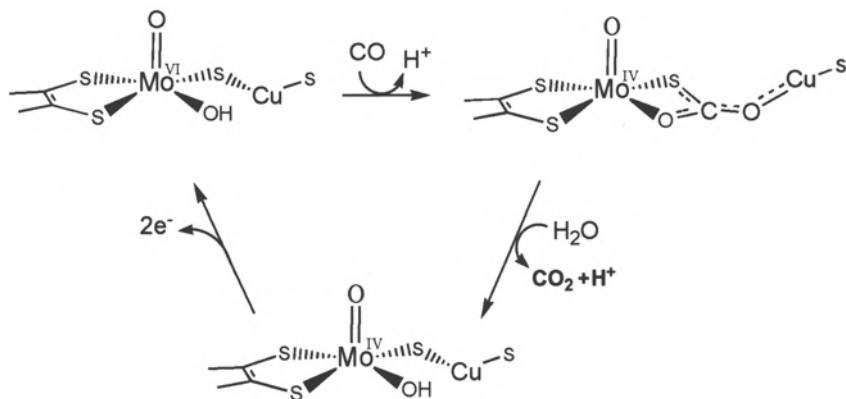


Рис. 11.20. Пересмотренный механизм действия CODH_{Mo} [155]

Сначала предполагалось, что активный сайт фермента содержит модифицированный S-селенилцистеин [152]. Однако в последующей работе тех же авторов с использованием эффекта аномального рассеяния при большем разрешении было показано, что ион Cu(I) в активном центре был ошибочно интерпретирован как группа SeH. Таким образом, активный центр CODH_{Mo} на самом деле является биядерным кластером (CuSMo(=O)OH) [155]. В пересмотренной структуре активного центра ион Мо экваториально координирован с двумя тиолятами из птеринового кофактора, гидроксо- и мостиковым сульфидолигандом. Координационная сфера Мо завершается апикальным оксолигандом, что приводит к искаженному квадратно-пирамидальному комплексу. Недавно предложенный пересмотренный каталитический механизм для CODH_{Mo} представлен на рис. 11.20 [155].

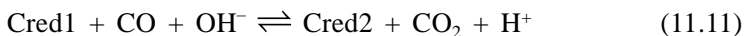
11.6. Никель

Никель редко встречается в биологических системах. Известно, что только некоторые ферменты содержат этот ион. Наиболее часто никель встречается в природе в виде Ni(II). В уреазах никель действует как кислота Льюиса, но для других ферментов рассматривалось и его участие в редокс-процессах. Поскольку никель одновременно является токсичным и крайне необходимым элементом для многих микроорганизмов, его транспорт в клетке строго регулируется. Подчеркивая свою возможную роль в первоначальных биологических процессах, никель присутствует в активных сайтах ферментов, связанных с метаболизмом H₂, CO, CO₂ и CH₄, то есть тех газов, которые были распространены на ранних стадиях атмосферной эволюции Земли. В этом разделе особое внимание будет уделено недавно определенным структурам никельсодержащих ацетил-коэнзим А-синтазы (ACS) и CO-дегидрогеназы [156, 157], а также дискуссии, посвященной связыванию трех различных ионов каталитическим центром первого из этих ферментов.

11.6.1. СО-Дегидрогеназа

Образующие гомодимеры СО-дегидрогеназы могут ассоциироваться с другими ферментами; в метаногенах, где этот фермент обозначается α , он связывается с четырьмя другими белками $\beta\gamma\delta\epsilon$, образуя пентамер, олигомеризующийся с образованием кластеров $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon_8$ [158]. В ацетогенах СО-дегидрогеназа, обозначаемая β , образует гетеротетрамеры $\alpha_2\beta_2$ с ацетил-коэнзим А-синтазой. Изолированные гомодимерные СО-дегидрогеназы были охарактеризованы в *Rhodospirillum rubrum* и *Carboxidotropha hydrogenoformans*. Кристаллические структуры этих двух белков показывают, что димер СО-дегидрогеназы имеет два В-кластера, два С-кластера и один D-кластер [159, 160]. Активным сайтом, ответственным за обратимое окисление СО в СО₂, является С-кластер, который, как предполагается, состоит из одного иона никеля и нескольких ионов железа, возможно, образуя центр Ni-X-[Fe₄S₄], похожий на А-кластер ацетил-коэнзим А-синтазы, рассмотренный далее.

С-Кластер СО-дегидрогеназы и ацетил-коэнзим А-синтазы характеризуется двумя сигналами в спектре ЭПР с g_{av} 1,82 (также называемый Cred1) и 1,86 (Cred2). Предполагается, что Cred1 на два электрона более окислен, чем Cred2 [161, 162] и что оба состояния участвуют в катализе.



Мессбауэровская спектроскопия показала, что в С-кластере присутствуют необычные частицы Fe, называемые железистым компонентом II (FeCII), находящиеся как в Cred1, так и в Cred2, но не в С-кластере, из которого удален никель [163]. При переходе от Cred1 в Cred2 в УФ-спектре не наблюдается изменений, что говорит о том, что два электрона не расположены в железосодержащей части С-кластера. Из этого следует, что никель, возможно, ассоциированный в активном сайте с не содержащим металла редокс-активными частицами, ответствен за окислительное присоединение СО₂. К настоящему моменту опубликовано четыре различные структуры С-кластера: (1) структура из *C. hydrogenoformans* [159], (2) структура с низким разрешением из *R. rubrum* [160] и две различные конформации С-кластера из *M. thermoacetica* [156, 157]. Структура (1), определенная с высоким разрешением, содержит квадратно-планарный комплекс никеля с тремя лабильными сульфидами и одним тиолятным лигандом (рис. 11.21, а). Сама по себе структура не содержит двух вакантных позиций, необходимых для связывания СО и ОН⁻. Две конформации структуры (3) содержат возможное объяснение этой проблемы: один из лабильных сульфидов (тот, который связывает Ni и особый атом железа, обозначаемый Fe_u (считается, что это FCII, см. далее) в этих структурах отсутствует (рис. 11.21, б). Поскольку COS также является субстратом для CODH, ион SH⁻ должен быть продуктом этой реакции.

Таким образом, структура CODH из *C. hydrogenoformans* позволяет предположить, что ионы SH⁻ и ОН⁻ являются мостиками между Ni и Fe_u. Поскольку ион никеля имеет квадратно-планарное окружение, то скорее всего это Ni(II). В обеих структурах из *M. thermoacetica* координационное окружение никеля – искаженное тетраэдрическое. В обработанном СО ферменте [157] никель частично связывается с СО (или СО₂) и сдвигается из плоскости

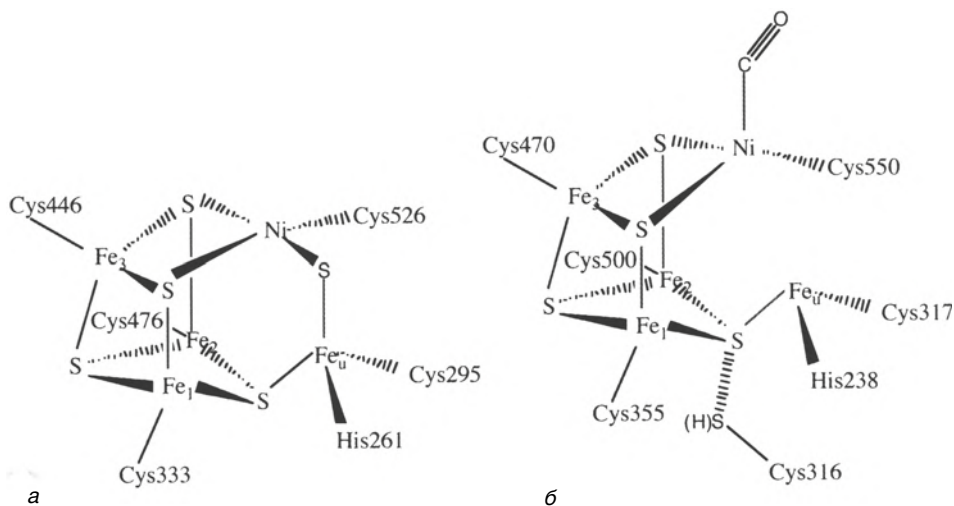


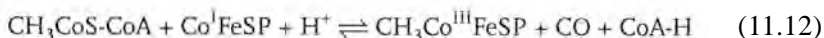
Рис. 11.21. а – С-кластер CODH из *C. hydrogeniformans* с тетракоординированным ионом никеля; б – кластер из *Moorella thermoacetica* [157]

по направлению к газовому каналу. В структуре, определенной Дреннаном и др. [156], никель смещен к Fe_u , формально образуя связь Ni-Fe . Таким образом, присутствие CO/CO_2 определяет геометрию координационного окружения никеля. В обработанном CO ферменте никель, по всей видимости, восстанавливается за счет избытка электронов высвобождаемых при окислении CO в отсутствие акцепторов электронов. В недавней работе предполагается, что при обработке фермента избытком CO мостиковый сульфид, связывающий Fe и Ni , диссоциирует, возможно, образуя COS [164].

Углекислый газ, являющийся продуктом или субстратом в этих процессах, связывается с кластерами как в состоянии Cred1 , так и в состоянии Cred2 . Однако способ связывания в этих двух случаях различается, поскольку CO_2 не влияет на сигнал $g_{av} = 1,86$, но изменяет сигнал $g_{av} = 1,82$ [162]. Простейшая интерпретация этого факта заключается в том, что CO_2 связывается терминально с Ni(0) и является мостиковым лигандом между Fe_u и квадратно-планарным Ni(II) .

11.6.2. Ацетил-коэнзим А-синтаза

Ацетил-коэнзим А-синтазы (ацетил- CoA -синтазы, ACS) присутствуют в метаногенах, ацетогенах и карбоксидотрофических микроорганизмах, в которых они катализируют синтез и/или декарбонилирование ацетил- CoA в соответствии со следующим уравнением, где CoFeS – корреноидный кобальтсодержащий железо-серный белок [158, 165].

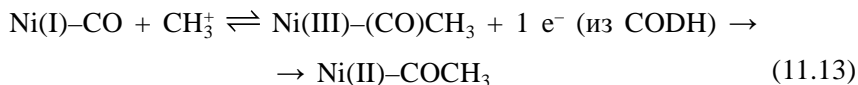


Олигомерная ассоциация субъединиц ACS варьируется в зависимости от их функций. В ACDS из метаногенов они являются частью пентамера $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ [166].

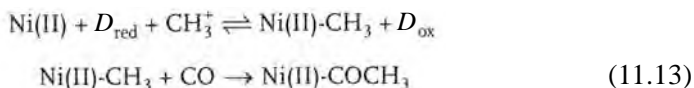
В ацетогенах ассоциированная с CODH ACS существует в виде гетеротетрамера $\alpha_2\beta_2$ [167]. В карбоксидотрофических бактериях, которые могут существовать, используя угарный газ как единственный источник углерода, можно выделить ACS в виде мономера (однако недавно был выделен ее предполагаемый партнер – CODH [168]). Таким образом, хотя CODH может функционировать в виде гомодимера при использовании CO в качестве источника углерода и восстановителя (см. раздел, посвященный Mo), похоже, что ACS всегда ассоциирована с CODH.

Несколькими методами было показано, что А-кластер содержит Ni и Fe. Мессбауэровская спектроскопия показала, что железо образует классический кубан $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$, а Ni, вероятно, связан с этим кластером через неизвестный лиганд [169]. Часть никеля может быть извлечена *орто*-фенантролином и образующийся никель-дефицитный фермент совершенно не активен. Извлеченные ионы, называемые лабильным никелем, могут быть введены в фермент обработкой его хлоридом никеля [170–172]. Как метилирование, так и восстановление предотвращают экстракцию лабильного Ni. Сообщалось, что оставшийся никель имеет плоско-квадратное окружение и диамагнитен, его состояние должно соответствовать Ni(II) [173]. Существование никелевого сайта в нескольких очень различающихся состояниях и тот факт, что разные образцы фермента содержат разное количество лабильного активного Ni требует объяснения.

Порядок связывания субстрата был предметом ожесточенных дискуссий; в синтезе ацетил-СоА CO может связываться с А-кластером с образованием ЭПР-активных частиц [156, 174, 175]. Связывание требует наличия восстановителя в *M. thermoacetica*, но, вероятно, не в обработанном NiCl_2 рекомбинантном фрагменте β^* из *Methanosarcina thermophila*, в котором образование видимых в ЭПР частиц наблюдается просто при добавлении CO [175]. Изотопное замещение с использованием ^{61}Ni , ^{57}Fe и ^{13}C приводит к изменению сигнала «NiFeC» в спектре ЭПР, что позволяет предположить, что свободный электрон находится на одном из этих атомов и что они находятся близко друг к другу. Этот сигнал исчезает при добавлении метилирующего агента в реакционную среду. Этому есть несколько объяснений. По Рагсдэйлу и др. [176] протекает следующая реакция:



По Линсдалу и др. [177] интермедиат Ni(I)–CO не участвует в каталитическом цикле; комплексы Ni(I), которые метилируются с образованием Ni(III)–CH₃, не известны. Линсдал и др. не наблюдали восстановление кластеров В и С СО-дегидрогеназы в процессе метилирования, и они предположили, что вместо переноса электрона между ферментами сайт D (возможно, паратиолятных групп цистеина) предоставляет два электрона, необходимых для окислительного метилирования [177].



В этом случае, если комплекс Ni(I)–CO уже образовался, он должен диссоциировать и Ni должен окислиться до Ni(II) до метилирования. Грэхэм и др. также изучали сигнал NiFeC на ферменте из *M. barkeri* и пришли к такому же выводу: комплекс с CO не участвует в каталитическом цикле [175]. Несомненно, основным препятствием для промежуточного образования ЭПР-активного комплекса является тот факт, что после метилирования – двухэлектронной реакции, сигнал в спектре ЭПР исчезает. Совсем недавно Грэхэм, Крамер и др. опубликовали результаты XAS никельсодержащего β^* и пришли к выводу, что сигнал NiFeC связан не с соединениями Ni(I), а с низкоспиновым комплексом Ni(II)–CO, в котором свободный радикал локализован на атоме углерода [178, 179]. Кроме синтеза ацетильного фрагмента (и образования ацетил-КоА) А-кластер способен *in vitro* проводить обмен CO/ацетил-КоА и переацетилирование. Было показано, что CO является неконкурентным ингибитором реакции переацетилирования, возможно, связываясь с А-кластером в сайте, не участвующем в переносе ацетильной группы. Хотя CO и не ингибирует обмен CO/ацетил-КоА, он также является ингибитором ацетилирования в относительно высоких концентрациях, предотвращая метилирование А-кластера.

Прорывом в этой области стала публикация трехмерной структуры CODH/ACS из *M. thermoacetica* Дреннаном и др. [156]. Как это часто случается с кристаллическими структурами, в структуре активного сайта оказалось несколько удивительных особенностей. Хотя, как и предсказывалось из спектроскопических данных, А-кластер содержит и кубан $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ и ион Ni, он также содержит дополнительный металлический сайт, занятый ионом Cu(I). Таким образом, кластер имеет следующее строение: $[\text{Fe}_4\text{S}_4]\text{-S-Cu-S}_2\text{-Ni}$, источником атомов серы являются цистеиновые фрагменты. Ион Cu(I) имеет тетраэдрическое окружение, а Ni – плоско-квадратное. Такой неожиданный биядерный кластер Cu–Ni требовал необычного каталитического механизма, включающего карбонилирование иона Cu(I) с последующим метилированием иона Ni. Было предположено, что два электрона, требуемые для окислительного присоединения метильного катиона, образуются при окислении кластера $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ от состояния +1 до +2 и никеля – от Ni(I) до Ni(II). Следующая стадия в реакции предполагает миграцию метильной группы к тетраэдрическому иону Cu(I) с последующим синтезом ацетильного фрагмента.

Удивительно, что эта гипотеза оказалась столь короткоживущей. Первое возражение, выдвинутое Генсиком и Грэхэмом, основывалось на исследовании фрагмента β^* [175]. Воссоздание этой экспрессированной *E. coli* молекулы приводит к активному протеину только при добавлении ионов Fe и Ni, связывающихся с β^* в соотношении 2:1. Другие ионы, такие как Mn^{2+} , Cu^{1+} и Co^{2+} , были неэффективны для воссоздания активности рекомбинантного фрагмента. Следует, однако, отметить, что его активность в синтезе ацетил-КоА составляла только 1/3000 от активности природного фермента [175]. Впоследствии повторное определение структуры CODH/ACS из *M. thermoacetica* [157] показало, что А-кластеры могут содержать Zn или Ni вместо Cu в ближнем (по отношению к кластеру $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$) сайте (рис. 11.22). Используя мономерную субъединицу α_{M} , Линдал и др. показали, что инкубация

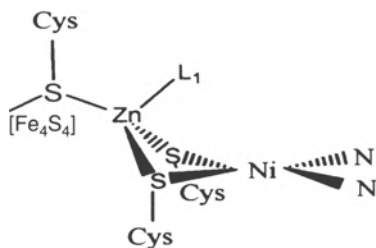


Рис. 11.22. Zn/Ni-содержащий кластер в закрытой форме ACS из *M. thermoacetica*

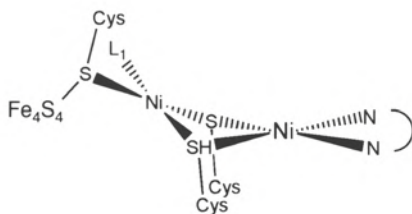


Рис. 11.23. Ni/Ni-содержащий кластер в открытой форме ACS из *M. thermoacetica*

apo-белка с Cu на самом деле предотвращала последующую активацию с использованием NiCl_2 [180]. Таким образом, Cu не только не является нормальным компонентом активного сайта, но служит ингибитором связывания Ni с А-кластером. Отсутствие селективности у ближнего металлического сайта может быть объяснено тем, что фермент может принимать открытую и закрытую конформации [157]. В последней близко расположенный ион Ni (Ni_p) имеет плоско-квадратное окружение (рис. 11.23) и весьма доступен для растворителя. Отсюда легко предположить, что он может легко обмениваться на Cu(I) или Zn(II), которые образуют тетраэдрические комплексы с сайтом, наблюдаемые только в закрытой форме ACS, что приводит к инактивации фермента. В то же время плоско-квадратный комплекс Ni_p был обнаружен в недавно определенной структуре мономерной ACS из *C. hydrogeniformans* [168]. Мы предложили механизм, в котором тетраэдрическая координация Ni_p соответствует закрытой форме ACS, а плоско-квадратная – открытой форме фермента [157].

Кристаллическая структура ACS_{Mt} показала наличие развитой системы каналов, соединяющих все четыре активных сайта (два А и два С-кластера гетеротетрамера). Их существование было предсказано в экспериментах, в которых CO, синтезированный из CO_2 , и электроны в С-кластере не переходили в растворитель, а оказывались в составе карбонильной группы ацетил-СоА [181, 182]. Даже в присутствии насыщающей концентрации поставляемого извне CO, только образующийся в С-кластере CO реагировал в А-кластере [182, 183]. Напротив, CO_2 из ацетил-СоА подвергается более быстрому обмену, чем CO_2 из раствора. Это может быть объяснено тем, что канал, соединяющий С-кластер с А-кластером, находится непосредственно рядом с ближним металлосодержащим сайтом последнего. Таким образом, образующийся CO мигрирует через канал, а затем аксиально связывается с Ni_p , завершая тетраэдрическое или квадратно-пирамидальное окружение металла (в зависимости от того, CO или метильная группа связывается первоначально в каталитическом цикле). Внешний CO, скорее всего, связывается экваториально с квадратно-планарным Ni_p , по крайней мере первоначально, что следует из структуры открытой конформации ACS_{Mt} [157]. CO_{ext} может ингибировать синтез ацетил-СоА, предотвращая, по всей видимости, метилирование Ni_p . Это вполне разумно, так как метилирование также должно

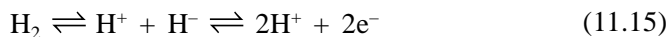
протекать по свободной экваториальной позиции металла. Исследование кристаллической структуры А-кластера показывает, что СО на самом деле может связываться с тремя различными сайтами: одним аксиальным, одним экваториальным сайтом Ni_p и доступным аксиальным сайтом у удаленного атома Ni (рис. 11.23).

Исследования, посвященные связыванию экзогенного СО с ACS значительно усложнили общую картину катализа, поскольку стало ясно, что источник СО (внешний или внутренний) влияет на ход реакции. В связи с этим мы предположили, что диффузия СО через канал, связывающий А и С-кластеры, контролируется закрытием и открытием ACS [157]. Ни фрагмент β^* , ни мономерная субъединица α из *M. thermoacetica*, не связываются с СО таким же образом, как природный фермент, ассоциированный с соответствующими субъединицами CODH.

Кристаллографические данные, подтверждающие существование молекулярных ворот, контролирующих диффузию СО из С-кластера, где он синтезируется в А-кластер, могут быть использованы для критического анализа ранее высказанных гипотез. Например, Линдал и сотр. предположили что С- и А-кластеры, которые, как известно, магнитно изолированы, на самом деле связаны через конформационные изменения [184]. Теперь это можно интерпретировать в терминах доступности СО, синтезированного на С-кластере, для А-кластера. Предложенные «редуктазный» (синтез СО) и «синтазный» (синтез ацетил-СоА) режимы работы CODH/ACS были основаны на наблюдении, что когда восстановление CO_2 проводилось в отсутствие субстратов для синтеза ацетил-СоА, процесс образования СО из CO_2 и восстановителя имел более низкие значения k_{cat} и более высокие K_m , чем при наличии субстратов. Теперь это можно объяснить накоплением СО в каналах в отсутствие синтеза ацетил-СоА, поскольку ACS будет в основном находиться в «закрытом» состоянии. Однако при наличии подходящего субстрата внутренний СО наряду с метильными группами, предоставляемыми FeSCP, используется для синтеза ацетил-СоА, и синтез СО должен происходить с большей скоростью, что и наблюдается [184].

11.6.3. NiFe-Гидрогеназы

Многие микроорганизмы способны использовать водород в качестве восстановителя или источника протонов в соответствии со следующим уравнением:



Эта реакция катализируется двумя основными классами ферментов: NiFe- и Fe-гидрогеназами [185, 186]. В этом разделе будет обсуждаться только первый класс ферментов (структура активного сайта Fe-гидрогеназ обсуждается в гл. 12). Как показано в уравнении (11.15), поглощение водорода является гетеролитическим процессом с образованием протона и гидрид-иона. Кристаллическая структура NiFe-гидрогеназы из *D. gigas* [187] и соответствующие данные ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием показывают,

что активный сайт этих ферментов состоит из фрагмента $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$, связанного с ионом никеля через два тиолятных мостика [188, 189]. Никелевый центр дополнительно координирован с двумя терминальными цистеиновыми тиолятами (см. гл. 12). Активный сайт находится внутри белковой глобулы и по расчетым данным, основанным на описанной кристаллической структуре, соединен с молекулярной поверхностью несколькими каналами [190]. Эксперименты по связыванию Хе кристаллами гидрогеназы при высоком давлении показали, что благородный газ связывается в каналах, и моделирование системы с водородом, помещенным в места связывания ксенона, с помощью молекулярной динамики подтвердило, что каналы являются единственно доступным путем для субстрата, связывающегося с каталитическим центром [190]. Более того, каналы направлены к незанятой позиции в координационной сфере никеля, что позволяет предположить, что белковое окружение контролирует связывание водорода с активным сайтом. С помощью спектроскопии ЭПР удалось идентифицировать три основных парамагнитных частицы, называемых Ni–A, Ni–B и Ni–C, поскольку с помощью изотопного (^{61}Ni) замещения было показано, что они содержат Ni [191–194]. Из этих трех частиц только Ni–C участвует в каталитическом цикле. Частицы Ni–A и Ni–B образуются при действии на фермент окислителей и называются «неготовым» и «готовым» состоянием соответственно [186, 193, 194]. Ni–B очень быстро реагирует с водородом, в то время как Ni–A требует длительной восстановительной активации, которая может быть ускорена нагреванием. Ni–B может также непосредственно взаимодействовать с водородом, чего не наблюдается для Ni–A. Кристаллографический анализ показал, что фермент в состоянии Ni–A содержит мостиковые лиганды, связывающие Ni и Fe, и первоначально предполагалось, что это оксо- или гидроксочастицы [188, 195]. Однако последние результаты, полученные в нашей лаборатории, показывают, что в состоянии Ni–B фермент также содержит мостиковый лиганд, и таким образом структурно состояния Ni–A и Ni–B различить трудно. Недавно нами была повторно интерпретирована структура состояния Ni–A, и было предположено, что мостиковый лиганд в нем должен быть двухатомной частицей, возможно (гидро)пероксидом [195]. Различный результат окисления в состоянии Ni–A и Ni–B, по-видимому, зависит от количества первоначально доступных электронов [196]. При наличии четырех электронов на молекулу гидрогеназы окисление кислорода может происходить с образованием молекулы воды и предположительно мостикового гидроксида, что приводит к образованию частиц Ni–B. Однако если доступны только два электрона на молекулу фермента, реакция останавливается после образования гидропероксида. В настоящее время предполагается либо диссоциация этого лиганда, либо восстановление пероксида до воды, ответственных за медленную активацию состояния Ni–A [195].

ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием оказалась необычайно полезным инструментом для изучения редокс-состояний NiFe-гидрогеназ, включая диамагнитные, поскольку полосы поглощения CO и CN^- , связанных с активным сайтом, изменяются при изменении степени окисления. Этим методом были идентифицированы несколько ЭПР-неактивных состояний [189, 197]: (1) из состояния Ni–A образуется восстановленное на 1 электрон состояние Ni–SU;

(2) после активации удалось обнаружить две диамагнитные восстановленные частицы – NiSI_I и NiSI_{II} . В работе Фернандеса и др. было показано, что два последних состояния отличаются на H^+ [189]. Кроме того, одноэлектронное восстановление приводит к состоянию $\text{Ni}-\text{C}$, которое может быть в дальнейшем восстановлено в диамагнитное $\text{Ni}-\text{R}$ (3). Хотя это и являлось ранее предметом дискуссий, сейчас считается общепринятым, что сигналы $\text{Ni}-\text{A}$, $\text{Ni}-\text{B}$ и $\text{Ni}-\text{C}$ в ЭПР связаны с (формальными) комплексами Ni(III) . Это вполне разумно для окисленных состояний $\text{Ni}-\text{A}$ и $\text{Ni}-\text{B}$. Однако в случае состояния $\text{Ni}-\text{C}$ формальную частицу $\text{Ni(III)}-\text{H}^-$ можно рассматривать как изоэлектронный комплекс $\text{Ni(I)}-\text{H}^+$. *Bona fide* Ni(I) может образовываться при фотолизе и депротонировании $\text{Ni}-\text{C}$. Каталитический цикл описан на рис. 12.11 [QQQ].

Наличие лигандов CO и CN^- в активном центре NiFe -гидрогеназ поднимает вопрос о том, каким образом эти двухатомные молекулы образовались. Значительный успех в решении этой проблемы достигнут в работе Бека и др., в которой был идентифицирован карбамоилфосфат, являющийся их предшественником [198].

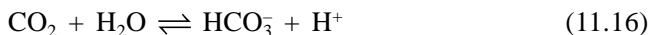
11.7. Цинк

Цинк необходим для роста всего живого. В организме человека это второй по распространенности микроэлемент после железа [199, 200]. Существует более 300 охарактеризованных цинк-зависимых ферментов, разделяемых на 6 групп [201, 202]. Поскольку цинк является d^{10} -элементом, он не участвует в окислительно-восстановительных реакциях в биологически доступных условиях [203], что не дает изучить его реакционную способность с помощью ЭПР или оптической спектроскопии [204]. С другой стороны, отсутствие редокс-активности делает Zn(II) устойчивым в биологических системах с изменяющимся потенциалом. В белках цинк наиболее часто связывается с гистидином, аспаргатом, глутаматом и цистеином [205]. Во всех случаях каталитически активный ион цинка действует как кислота Льюиса [206], часто связывая молекулу воды, превращающуюся при депротонировании в нуклеофильную частицу OH^- . Zn(II) похоже действует на цистеин-тиоляты, и ферменты, содержащие связи $\text{Zn}-\text{S}$, в последнее время привлекали повышенное внимание [207]. Энергия стабилизации лигандным полем для Zn(II) равна нулю для всех координационных окружений, поэтому этот ион не имеет предпочтительного координационного окружения [208]. Однако в цинксодержащих металлоферментах с известной трехмерной структурой, ион часто принимает конфигурацию искаженного тетраэдра (хотя, как описано далее, также наблюдаются и искаженные тригонально-бипирамидальные комплексы). Изменения в координации играют центральную роль в каталитических свойствах Zn(II) . Типичными и широко изученными цинксодержащими ферментами являются карбоангидразы, β -лактамазы, алкогольдегидрогеназы, щелочные фосфатазы, нуклеазы и пептидазы. Дополнительно цинк может быть частью гетеробиядерных активных центров, таких как в CuZn -супероксиддисмутазах, ферментах, которые были рассмотрены в разделе, посвященном меди. Здесь

мы рассмотрим структуру активных центров и, где возможно, постулированный каталитический механизм типичных представителей упомянутых выше классов ферментов. Обсудим также некоторые наиболее новые структуры других менее изученных цинксодержащих ферментов.

11.7.1. Карбоангидразы (СА)

Эти белки, которые были первыми охарактеризованными цинксодержащими ферментами, широко распространены в природе, где они участвуют в таких процессах, как дыхание, фотосинтез, транспорт ионов и поддержание pH [209, 210]. СА катализируют те реакции, где перенос протона к растворителю является скоростьлимитирующей стадией.



Существуют три разных класса карбоангидраз, называемых α , β и γ . В α -СА, обнаруженных в млекопитающих, водорослях и прокариотах, и в γ -СА, выделенных из метаногенов, ион Zn тетраэдрически координирован тремя остатками His и частицей $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ [211, 212]. В обоих случаях Zn(II) действует как электростатический катализатор, понижающий pK_a связанной молекулы растворителя и стабилизирующий отрицательный заряд в переходном состоянии. Следует отметить, что хотя в этих двух классах ферментов активные сайты похожи, их вторичные структуры различаются. В соответствии с последними данными, в ферментах β -СА ион цинка тетраэдрически координирован с двумя остатками Cys, одним His и одним Asp (рис. 11.24) [213]. Неожиданным оказалось то, что в первой координационной сфере металла нет молекулы растворителя, хотя карта электронной плотности показывает ее вероятное наличие недалеко от активного центра [213]. Было предположено, что во время катализа эта молекула воды замещает карбоксилат Asp, связывается с ионом Zn и активируется депротонированием, как и в других цинксодержащих ферментах. Это позволяет предположить, что хотя механизм действия β -СА и отличается как минимум координационным окружением цинка от уже хорошо изученных ферментов α - и β -типа, химически они очень схожи.

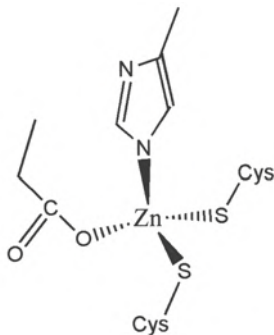


Рис. 11.24. Активный сайт β -карбоангидразы

11.7.2. Алкогольдегидрогеназы (ADH)

Эти широко распространенные оксидоредуктазы требуют наличия кофактора NAD(H) или NADP(H) для катализа обратимого превращения спиртов в альдегиды или кетоны. Они проявляют различную субстратную специфичность и разделяются на три класса в соответствии с их молекулярной массой [214–216]. Короткие и длинноцепочечные алкогольдегидрогеназы с длиной приблизительно 250 и 385 аминокислотных остатков соответственно, не содержат ионов металлов и не будут обсуждаться далее. ADH средней длины (около 350 остатков) по большей части являются цинксодержащими ферментами. К настоящему моменту они были обнаружены в бактериях, грибах, растениях, моллюсках и позвоночных. Наиболее изученным со структурной точки зрения ферментом является алкогольдегидрогеназа, выделенная из печени лошади (HLADH) [217–220], – димер, как и все другие ADH, выделенные из растений и животных. В кристалле HLADH принимает открытую конформацию в отсутствие кофактора NAD и закрытую – в его присутствии [218, 221, 222]. В последнем случае активный сайт становится более гидрофобным, как и требуется для гидридного переноса от субстрата к кофактору в процессе катализа. В *apo*-форме (без NAD) ADH из *Sulfolobus solfataricus* ион цинка координирован двумя остатками цистеина и гистидином, искаженная тетраэдрическая конфигурация дополняется молекулой воды [223]. Вторая координационная сфера металла содержит карбоксилатную группу из остатка глутаминовой кислоты, расположенную напротив от центра связывания субстрата. Предполагается, что этот карбоксилат координируется с ионом Zn, когда вода или спирт диссоциирует в процессе протекания каталитического цикла (хотя эта точка зрения оспаривается). Соответственно было предложено два механизма, объясняющие удаление двух атомов водорода из субстрата, необходимое для окисления спирта. Первый механизм предполагает, что связанная с цинком вода замещается субстратом, и ион металла в активном центре остается тетраэдрическим в процессе катализа [224, 225]. Во втором механизме субстрат связывается с тетраэдрическим ионом цинка без замещения лигандов, приводя к пентакоординированному комплексу [226, 227]. До недавнего времени было тяжело различить эти два механизма, поскольку не было проведено исследование кинетики процесса. Новое исследование временно-зависимым XAS тетрамерной NADP-зависимой ADH (эволюционно-несвязанной) из гипертермофильной бактерии *Thermoanaerobacter brockii* (TbADH) позволяет отдать предпочтение второй гипотезе, поскольку оно показывает наличие двух пентакоординированных цинковых интермедиатов в каталитическом цикле [204]. В одной частице первая координационная сфера иона цинка должна состоять из молекулы воды и остатков Glu, Asp, His и Cys из TbADH (рис. 11.25). Похожий интермедиат может присутствовать и в HLADH, где, как указано выше, карбоксилатная группа глутаминовой кислоты находится близко от иона Zn(II) и может образовывать пентакоординированное окружение вокруг иона металла, состоящее из одной молекулы воды вместе с двумя цистеинами, одним гистидином и одним глутаматом из фермента [223]. Второй возможный пентакоординированный аддукт из TbADH соответствует иону Zn(II),

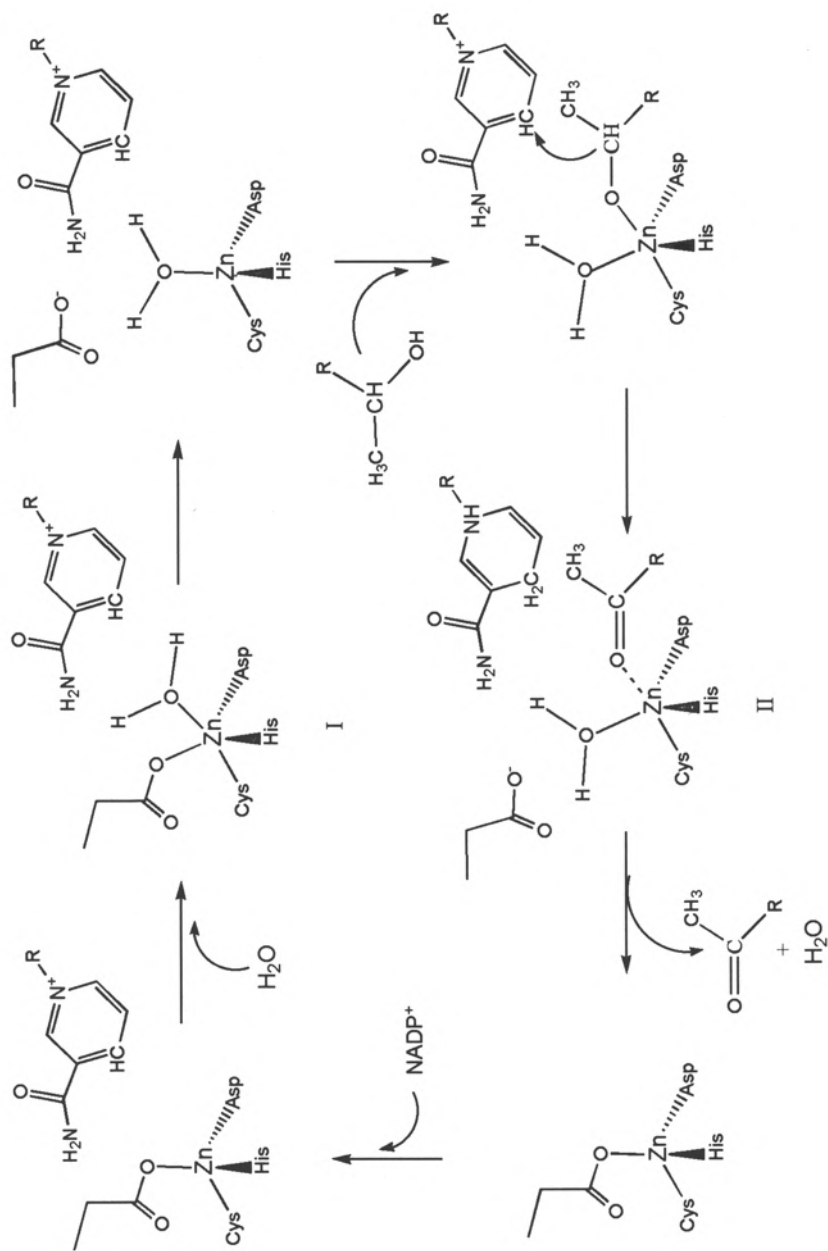


Рис. 11.25. Каталитический цикл алкогольдегидрогеназы из *T. brockii* [204]

координированному с продуктом, молекулой воды и боковыми цепями Cys, His и Asp. Последующая диссоциация молекулы воды и продукта восстанавливает тетраэдрическое окружение иона цинка со связанным глутаматом, и каталитический цикл начинается заново (рис. 11.25). TbADH была использована в нескольких хиральных синтезах, что обусловлено ее термостабильностью и устойчивостью к органическим растворителям [228].

Фермент из гипертермофильного *Sulfolobus sulfataricus* (SsADH) похож на TbADH, хотя как фермент позвоночного он использует NADP(H) в качестве кофактора вместо NAD(H). В общем SsADH имеет 24–26% гомологию с HlADH и TbADH. Эти три фермента принадлежат к А-специфичному семейству дегидрогеназ, которые при использовании их для восстановления переносят в процессе синтеза спирта *pro*-R водородный атом кофактора на *re*-сторону кетона-субстрата, приводя таким образом к (S)-спирту [223].

11.7.3. Металло-β-лактамазы

Поскольку больше половины коммерчески доступных антибиотиков являются β-лактамами и в последнее время устойчивость бактерий к этим веществам значительно повысилась (некоторые инфекции стало невозможно лечить), металло-β-лактамазы оказываются не только интересными для металлоорганика, но и чрезвычайно важными ферментами для здоровья человека [229]. Большинство изученных к настоящему времени β-лактамаз принадлежат к серингидролазам классов А, С и D [230–233]. Ферменты класса В требуют присутствия двухвалентного иона металла (Zn, Co, Cd или Mn) для проявления каталитической активности [234, 235]. Поскольку только 10% из почти двухсот β-лактамаз являются металлоферментами, то этим белкам уделялось мало внимания как потенциальной угрозе для терапии антибиотиками [236, 237]. Однако металло-β-лактамазы способны гидролизовать соединения, устойчивые к серин-β-лактамазам и частично или полностью нечувствительны к традиционным ингибиторам β-лактамаз [238, 239]. Это привело к неэффективному использованию большинства доступных антибиотиков в бактериях, способных продуцировать металло-β-лактамазы [240, 241].

В целом, эти ферменты катализируют гидролитическое расщепление β-лактамного цикла в соответствии с реакцией, приведенной на рис. 11.26. Продукт гидролиза, в отличие от исходного β-лактама, не способен препятствовать синтезу стенок бактериальных клеток – ключевому эффекту антибиотиков [229]. Кристаллическая структура некоторых металло-β-лактамаз показывает, что активный центр может содержать один или два иона Zn(II) (Zn1 и Zn2), находящихся в последнем случае на расстоянии 3,5 Å [242–247]. В этих структурах Zn1 находится в тетраэдрическом окружении трех His и одной молекулы воды. Ион Zn2, если он присутствует, либо пентакоординирован с остатками Cys, His и Asp и двумя молекулами воды, либо с двумя остатками His, одним остатком Asp и двумя молекулами воды, с образованием тригональной бипирамиды. В структуре, в которой активный сайт содержит двухядерный комплекс Zn, молекула воды или OH[–] связывает два иона металла. Как и в других биядерных центрах с мостиковыми молекулами

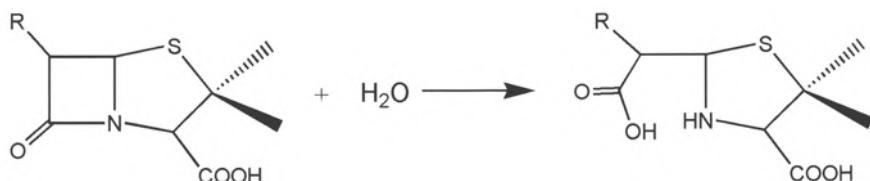


Рис. 11.26. Гидролиз β -лактамного цикла β -лактамазами

растворителя, их активация приводит к образованию нуклеофильной частицы OH^- , участвующей в реакции [248]. Следует отметить, что не все β -лактамные антибиотики связываются с активным сайтом одинаковым образом, так что механизм для них может отличаться.

11.7.4. Щелочные фосфатазы

Эти гомодимерные ферменты катализируют гидролиз различных моноэфиров фосфорной кислоты. В присутствии акцептора фосфата они осуществляют реакцию трансфосфорилирования [249]. В реакции участвует ковалентный фосфосериновый интермедиат, который превращается либо в неорганический фосфат, либо переносит фосфорильную группу на спирты. Щелочные фосфатазы присутствуют как в прокариотах, так и в эукариотах. В первых они могут участвовать в связывании фосфата, в то время как в организме человека и в других высших организмах они могут участвовать в минерализации. Наиболее изученный фермент был изолирован из *E. coli* [250], и уже давно было показано, что он содержит три связывающих металл-сайта в каталитическом центре. Обычно они заняты двумя ионами цинка и одним – магния. Однако последний может быть замещен на цинк что приводит к снижению активности фермента [249]. В общих чертах каталитическая триада металлов напоминает аналогичные триады, найденные в фосфолипазе C и P1-нуклеазе [251, 252]. Ион Zn1 координирован с аспаргатом, двумя гистидинами и двумя атомами кислорода из связанного с активным сайтом фосфат-иона. Ион Zn2 тетраэдрически связан с двумя аспартатами, гистидином и либо с нуклеофильным остатком серина (SAP), либо атомом кислорода из ингибитора фосфата (ECAP, PLAP). Наконец, металл в третьем сайте может быть координирован либо с аспаргатом, треонином, глутаматом, гистидином и молекулой воды (Zn), либо аспаргатом, глутаматом, треонином/серином и тремя молекулами воды с образованием октаэдрического комплекса. Возможный каталитический механизм представлен в работе [253].

11.7.5. Металлопептидазы

Эти ферменты характеризуются наличием коротких характерных последовательностей связывающих цинк аминокислот, содержащих глутаматные и гистидиновые остатки. Наиболее распространенной последовательностью

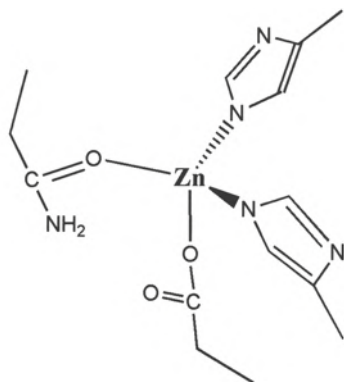


Рис. 11.27. Предложенная «неактивная» структура сайта аутолизина LytM

является HExxH, характерная для «цинкинов», одним из представителей которых является хорошо изученный термоллизин, но были описаны и другие последовательности, такие как HxxEH (инверцинкины), HxxE (карбоксипептидазы) или HxH [254]. В цинкинах два гистидиновых остатка, содержащихся в характерном фрагменте, всегда связаны с Zn(II), и вместе с His или Gly и молекулой воды образуют тригонально-бипирамидальную координационную сферу каталитического активного иона металла [254, 255]. Считается, что каталитический механизм этого класса ферментов основан на поляризации как карбонильной группы разрываемой амидной связи (ионом Zn), так и молекулы воды (ионом Zn(II) и глутаматом) с образованием реакционноспособного нуклеофильного иона OH⁻ [255]. Недавнее рентгеноструктурное исследование содержащего последовательность типа HxH аутолизина LytM из человеческого патогена *Staphylococcus aureus* показало, что первый гистидин из последовательности, в отличие от второго, не связан с цинком [256]. Предполагается, что это скрытая неактивная форма фермента; в ней нет упорядоченной молекулы воды, которая могла бы связываться с ионом цинка (рис. 11.27). Кроме того, тетраэдрическое окружение цинка четырьмя протеиновыми лигандами не оставляет места для координации субстрата или воды. И действительно, направленная мутация первого гистидина в последовательности HxH полностью уничтожает ферментативную активность, подтверждая, что кристаллическая структура не соответствует реально работающему ферменту.

Недавно опубликованная кристаллическая структура термоллизин-подобного ангиотензин I-преобразующего фермента (AnCE*) из *Drosophila melanogaster* показала, что этот фермент принадлежит к семейству глюцинкинов, содержащему характерный фрагмент HxxH [257]. В AnCE ион цинка пентакоординирован с Glu и His, а также с двумя молекулами воды [258]. Для сравнения, в термоллизине, другом представителе этого семейства, ключевой остаток

* Angiotensin I Converting Enzyme (англ.).

глутамата играет центральную роль в поляризации нуклеофильной молекулы воды и в переносе протонов к субстрату. Дополнительно, остатки тирозина и гистидина способствуют образованию тетраэдрического интермедиата за счет стабилизации отрицательного заряда.

11.7.6. Другие Zn-зависимые ферменты

11.7.6.1. D-Аминоацилаза

D-аминоацилаза является необычным представителем подсемейства α/β -бочкообразных амидогидролаз (они также включают уреазу, фосфотриэстеразу и другие ферменты, содержащие биядерный металлический центр, а также нуклеозиддезаминазы, содержащие одноядерные активные центры [259]). Было определено, что фермент из *Alcaligenes fecalis* является моноядерным белком с биядерным активным центром [260].

Из двух Zn-связывающих сайтов, определенных по аномальному рассеянию рентгеновских лучей кристаллами, один занят полностью. Цинк в нем прочно связан и тетраэдрически координирован двумя цистеиновыми и одним гистидиновым фрагментами, а также ацетат-ионом из кристаллизационного раствора. Второй Zn-связывающий сайт, отделенный от первого на расстояние 3,1 Å, занят на 25%. В нем имеется тетраэдрическая координация иона цинка двумя гистидиновыми и одним цистеиновым остатками и вновь ацетат-ионом из кристаллизационной среды. Для проявления активности необходим ион Zn с тесным окружением. Присутствие биядерного Zn-связывающего сайта со значительными различиями в способности связывать металл напоминает ситуацию с β -лактамазой *Bacillus cereus*, которая также является моноцинковым металлоферментом, у которого есть два Zn-связывающих сайта [261, 262].

11.7.6.2. GPT-Циклогидролаза I

В растениях и нескольких микроорганизмах превращение GTP в дигидро-неоптеринтрифосфат представляет собой первую зафиксированную стадию в биосинтезе тетрагидрофолата [263]. В организме животных дигидронеоптеринтрифосфат превращается в тетрагидробиоптерин, который является важным кофактором NO-синтаз и монооксигеназ [264]. Считают, что активный Zn(II)-сайт, как и в других Zn-содержащих ферментах, поляризует связанную с ним молекулу воды, увеличивая ее кислотность, и как следствие генерируя гидроксильный нуклеофил в непосредственной близости от имидазольного кольца связанного субстрата.

11.7.6.3. Ферменты, содержащие связи Zn-S

Действуя как катализатор типа кислоты Льюиса, Zn(II) может превращать тиольный лиганд в эффективный нуклеофил, способный участвовать в реакциях алкилирования [265–267]. С другой стороны, цинк может придать окислительно-восстановительные свойства активным сайтам, воздействуя на тиолатные лиганды, поскольку это лиганды, а не инертный ион металла,

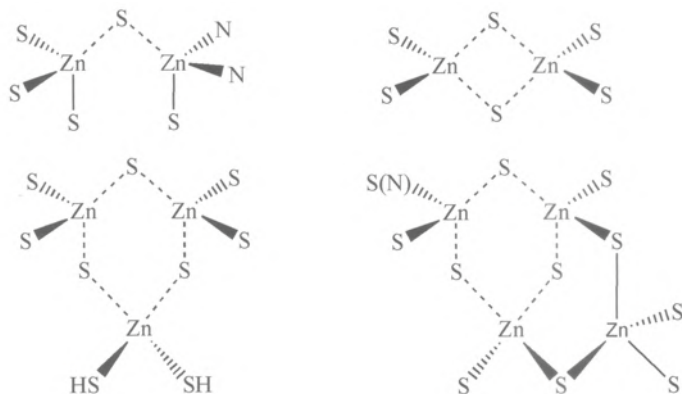


Рис. 11.28. Сульфидные кластеры цинка в белках [207]

и эти лиганды могут быть окислены и восстановлены [268]. Будучи окисленной, модифицированная цистеинсульфеновая кислота не связывает Zn(II) . Поэтому окислительно-восстановительные процессы организуют «цинковый выключатель», который может вызывать главные конформационные изменения. Примером окислительно-восстановительного «цинкового выключателя» служит конформационная перестройка, наблюдаемая при окислении тиолятного лиганда при тепловом ударе по белку Hsp-33 [269, 270]. Это изменение вызывает сопровождающую его активность. Другая фундаментальная роль связей Zn-S – контроль распределения иона металла в клетке [207]. Несколько сульфидных кластеров цинка изображены на рис. 11.28.

11.8. Заключение

В данной главе сделана попытка описать типичных представителей активных сайтов металлоферментов, содержащих различные металлы. Металлы могут выполнять каталитические функции, которые трудно либо невозможно выполнить с помощью аминокислотных функциональных групп или органических кофакторов. Этими функциями являются: активация молекул воды, реакции с газами и в некоторой степени окислительно-восстановительные процессы. Хотя последние по времени полученные результаты многое прояснили в этой области, все же следует быть осторожными при интерпретации структуры активных сайтов ферментов. С одной стороны, многие металлосодержащие сайты оказались достаточно разнородными, способными связывать разные ионы, порой даже с сохранением каталитической активности. С другой стороны, фотовосстановление под действием рентгеновских фотонов может оказаться совершенно обычным явлением. Без спектроскопического мониторинга возможных окислительно-восстановительных изменений под действием множественных рентгеновских отражений можно сделать лишь предварительные выводы о их влиянии.

Литература

1. C. Rensing, B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, B. P. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 652–656.
2. B. Abolmaali, H. V. Taylor, U. Weser, *Struct. Bond*, **1998**, 91, 91–190.
3. R. H. Holm, P. Kennepohl, E. L. Salomin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239–2314.
4. F. Fusetti, K. H. Schroter, R. A. Steiner, P. I. Van Noort, T. Pijnting, H. J. Rozeboom, K. H. Kaik, M. R. Egmond, B. W. Dijkstra, *Structure* **2002**, 10, 259–268.
5. S. Kishishita, T. Okajima, M. Kim, H. Yamaguchi, S. Hirota, S. Suzuki, S. Kuroda, K. Tanizawa, M. Mure, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1041–1055.
6. S. M. Janes, D. Mu, D. Wenner, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame, J. P. Klinman, *Science* **1990**, 248, 981–987.
7. W. S. McIntire, C. Hartman, V. L. Davidson, *Principles and Applications of Quinoproteins*, New York, **1993**, pp. 97–171.
8. J. P. Klinman, D. Mu, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 299–344.
9. P. F. Knowles, D. M. Dooley, G. Sigel, A. Sigel, in H. Sigel, A. Sigel (Eds.), *Metalloenzymes involving amino acid residue and related radicals*, Metal Ions in Biological Systems, Vol. 30, Marcel Dekker, New York, **1994**, pp. 361–403.
10. Q. Su, J. P. Klinman, *Biochemistry* **1998**, 37, 12513–12525.
11. S. A. Milis, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9897–9904.
12. B. Schwartz, A. Olgin, J. P. Klinman, *Biochemistry* **2001**, 40, 2954–2963.
13. Rinaldi, A. Gialtosio, G. Floris, A. Finazzi-Agro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120, 242–249.
14. I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.* **1975**, 44, 147–159.
15. M. A. Hough, R. Strange, W. H. S. Samar, *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 231–241.
16. R. W. Strange, S. Antonyuk, M. A. Hough, P. A. Doucette, J. A. Rodriguez, P. J. Hart, L. J. Hayward, J. S. Valentine, S. S. Hasnain, *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 877–891.
17. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature* **1983**, 306, 284–287.
18. K. Djinovic, A. Coda, L. Antolini, G. Pelosi, A. Desideri, M. Falconi, G. Rotilio, M. Bobognesi, *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 227–238.
19. K. Djinovic, G. Gatti, A. Coda, L. Antolini, G. Pelosi, A. Desideri, M. Falconi, F. Marmocchi, G. Rorilio, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **1992**, 225, 791–809.
20. K. Djinovic-Carugo, A. Battistoni, M. T. Carri, F. Poticelli, A. Desideri, G. Rotilio, A. Coda, K. S. Wilson, M. Bolognesi, *Acta Crystallog. Sect. D* **1996**, 52, 176–188.
21. J. Blackburn, S. S. Hasnain, N. Binsted, *Biochem. J.* **1984**, 219, 985–990.
22. E. McAdam, R. A. Fox, F. Lavelle, M. F. Fielden, *Biochem. J.* **1977**, 165, 71–79.
23. R. R. Crichton, J. L. Pierre, *BioMetals* **2001**, 14, 90–112.
24. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Manchonkin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563–2605.
25. I. Zaitseva, V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph, P. Lindley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1, 15–23.
26. M. Henson, M. J. Butler, A. W. Day, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1999**, 37, 447–471.
27. S. A. Roberts, A. Weighsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, W. R. Montfort, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 2766–2771.
28. K. Pionteck, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 37663–37669.
29. T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougin, *Biochemistry* **2002**, 41, 7325–7333.
30. A. McGuirl, D. Dooley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 138–144.

31. T. E. Machonkin, L. Quintanar, A. E. Palmer, R. Hassett, K. Severance, E. I. Salomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5507–5517.
32. B. G. Malinström, B. Reinhammar, T. Vanngard, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 205, 48–57.
33. B. C. Berks, S. J. Fergusson, J. W. B. Moir, D. J. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1232, 97–173.
34. W. G. Zumft, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, 61, 533–616.
35. K. Brown, M. Tegoni, M. Prudencio, A. S. Pereira, S. Besson, J. J. Moura, I. Moura, C. Cambillau, *Nature Struct. Biol.* **2000**, 7, 191–195.
36. C. Rosenzweig, *Nature Struct. Biol.* **2000**, 7, 169–171.
37. T. Rasmussen, B. C. Berks, J. Sanders-Loehr, D. M. Dooley, W. G. Zumft, A. J. Thomson, *Biochemistry* **2000**, 39, 12753–12756.
38. J. S. Valentine, in I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine (Eds.), *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, New York, **1994**, pp. 253–267.
39. M. Wikström, *Nature* **1977**, 266, 271–273.
40. P. Mitchell, *Nature* **1961**, 191, 144–148.
41. S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, 376, 660–669.
42. C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 10547–10553.
43. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, 269, 1069–1074.
44. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1996**, 272, 1136–1144.
45. S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Muzysheva, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, 280, 1723–1729.
46. D. M. Popovic, A. A. Stuchebrukhov, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1858–1871.
47. H. Michel, *Biochemistry* **1999**, 38, 15129–15140.
48. J. D. Lipscomb, A. M. Orville, in H. Sigel, A. Sigel (Eds.), *Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes, Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 28, Marcel Dekker, New York, **1992**, pp. 243–298.
49. T. D. H. Bugg, C. J. Winfield, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 513–530.
50. S. Dagley, *Am. Sci.* **1975**, 63, 681–689.
51. B. R. Glick, J. J. Pasternak (Eds.), *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, 2nd edition, American Society for Microbiology, Washington DC, **1998**.
52. E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. David, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Slulan, Y. S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 235–349.
53. J. D. Lipscomb, A. M. Orville, R. W. Frazee, K. B. Dolbeare, N. Elango, D. H. Ohlendorf, A. C. S. Symp. Ser. **1998**, 692, 387–402.
54. J. C. Bojington, B. J. Gaffney, L. M. Amzel, *Science* **1993**, 260, 1482–1486.
55. W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J. T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod, *Chemistry* **1996**, 35, 10687–10701.
56. E. Skrzupczak-Jankun, L. M. Amzel, B. Kroa, M. O. Funk, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1997**, 29, 15–31.
57. S. A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M. F. Browner, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 1003–1009.
58. G. Dannhardt, V. Kiefer, H. Eur, *J. Med. Chem.* **2001**, 36, 109–126.

59. E. Skrzypczak-Jankun, R. A. Bross, R. T. Carroll, W. R. Dunham, M. O. Funk, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 10814–10820.
60. M. Katagiri, B. N. Ganguli, I. C. Gunsalus, J. BioI. Chem. **1968**, 3543–3546.
61. F. M. Guengerich, Chem. Res. Toxicol. **2001**, 611–650.
62. M. J. Coon, A. D. N. Vaz, D. F. McGinnity, H. M. Peng, Drug Metabol. Dispos. **1998**, 26, 1190–1193.
63. P. Reichard, Science **1993**, 260, 1773–1777.
64. B. M. Sjöberg, Struct. Bond. **1997**, 88, 139–173.
65. P. Nordlund, B. M. Sjöberg, H. Eklund, Nature **1990**, 345, 593–598.
66. J. Srubbe, Curr. Opin. Chem. Biol. **2003**, 7, 183–188.
67. K. E. Liu, D. Wang, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, A. Salifoglou, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 7465–7466.
68. K. E. Liu, A. M. Valentine, D. Wang, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, A. Salifoglou, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 10174–10185.
69. M. Valentine, S. S. Stahl, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 3876–3887.
70. W. C. Voegli, N. Khidekel, J. Baldwin, B. A. Ley, J. M. Bollinger, A. C. Rozenzweig, J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 3255–3261.
71. J. M. Bollinger Jr., W. H. Tong, N. Ravi, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, J. Stubbe, J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 8015–8023.
72. B. Kauppi, B. B. Nielsen, S. Ramaswamy, I. Kjoller-Larsen, M. Thelander, L. Tjeland, J. Eklund, J. Mol. Biol. **1996**, 262, 706–720.
73. K. R. Strand, S. Karlsen, K. K. Andersson, J. Biol. Chem. **2002**, 277, 34229–34238.
74. U. Rova, K. Goodtzova, R. Ingemarsson, G. Behravan, A. Gräslund, L. Thelander, Biochemistry, **1995**, 4267–4275.
75. M. Ekberg, M. Sahlén, M. Eriksson, B. M. Sjöbert, J. Biol. Chem. **1996**, 271, 20655–20659.
76. E. M. Siegbahn, M. R. A. Blomberg, R. H. Crabtree, Theor. Chem. Acc. **1997**, 97, 289–300.
77. P. Schmidt, U. Rova, B. Katterle, L. Thelander, A. Gräslund, J. Biol. Chem. **1998**, 273, 21463–21472.
78. M. D. Sintghak, G. Arjara, A. Kellogg, J. Stubbe, L. Drennan. Nat. Struct. Biol. **2002**, 9, 293–300.
79. M. Fontecave, E. Mulliez, S. Ollagnier-des-Choudens, Curr. Opin. Chem. Biol. **2001**, 5, 506–511.
80. J. T. Jarrett, Curr. Opin. Chem. Biol. **2003**, 7, 174–172.
81. C. Rödenbeck, S. Houweling, M. Gloor, M. Heimann, Atm. Chem. Phys. Discuss. **2003**, 3, 2575.
82. H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hitzler, J. F. Peyes-Spindola, N. E. Miller, Nucleic Acids Res. **2001**, 29, 1097–1106.
83. J. Cheek, J. B. Braderick, J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 2860–2861.
84. G. Layer, J. Moser, D. W. Hienz, D. Jahn, W. D. Schubert, EMBO J. **2003**, 22, 6214–6224.
85. F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. I. Drennan, Science **2004**, 303, 76–79.
86. F. Escalettes, D. Florentin, B. Tse Sum Bui, D. Lesage, A. Marquet, J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 3571.

87. B. Tse Sum Bui, D. Florentin, F. Fournier, O. Ploux, A. Mejean, A. Matqiet, *FEBS Lett.* **1998**, 440, 226.
88. B. Tse Sum Bui, R. Nemda V. Schunemann, D. Florentin, A. X. Trautwein, A. Marqiet, *Biochemistry* **2003**, 42, 8791–8798.
89. S. Ollagnier-de-Choudens, E. Mulliez, S. Hewiston, M. Fontecave, *Biochemistry* **2002**, 41, 9145–9152.
90. S. Ollagnier-de-Choudens, E. Mulliez, M. Fontecave, *FEBS Lett.* **2002**, 532, 465–468.
91. J. W. Whittaker, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 1318–1321.
92. S. Sugio, B. Y. Hiraoka, F. Yamakura, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 3487–3495.
93. Y. Yakamura, R. L. Rardin, G. A. Petsko, D. Ringe, B. Y. Hiraoka, K. Nakayama, T. Fujimuta, H. Taka, K. Murayama, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 253, 49–56.
94. A. Amano, S. Shizukushi, H. Tamagawa, K. Iwakura, S. Tsunasawa, A. Tsunemitsu, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 1457–1463.
95. J. E. Posey, F. C. Gherardini, *Science* **2000**, 288, 1651–1653.
96. J. J. Bullen, *Rev. Infect. Dis.* **1981**, 3, 1127–1138.
97. K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, *Science* **2004**, 303, 1831–1838.
98. M. S. Lah, M. M. Dixon, K. A. Patridge, W. C. Stallings, J. A. Fee, M. L. Ludwig, *Biochemistry* **1995**, 34, 1646–1660.
99. B. L. Stoddard, P. L. Howell, D. Ringe, G. A. Petski, *Biochemistry* **1990**, 29, 8885–8893.
100. M. L. Ludwig, A. L. Metzger, K. A. Patridge, W. C. Stallings, *J. Mol. Biol.* **1991**, 219, 335–358.
101. J. B. Cooper, K. McIntyre, M. O. Badasso, S. P. Wood, Y. Zhang, T. R. Garbe, D. Young, *J. Mol. Biol.* **1995**, 246, 531–544.
102. M. Schmidt, B. Meier, F. Parak, J. Bioinorg. Chem. **1996**, 1, 532–541.
103. D. J. White, N. J. Reiter, R. A. Sikkink, L. Yu, F. Rusnak, *Biochemistry* **2001**, 40, 8918–8929.
104. E. V. Koonin, *Protein. Sci.* **1994**, 3, 256–358.
105. G. J. Barton, P. T. W. Cohen, D. Barford, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 220, 225–237.
106. S. Zhuo, J. C. Clemens, D. J. Hakes, D. Barford, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1775–17761.
107. F. Rusnak, L. Yu, S. Todorovic, P. Mertz, *Biochemistry* **1999**, 38, 6943–5952.
108. R. Anand, P. C. Dorrestein, C. Kinsland, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Biochemistry* **2002**, 41, 7659–7669.
109. P. C. Maloney, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, 6, 571–582.
110. E. Cama, F. A. Emig, D. E. Ash, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2003**, 42, 7748–7758.
111. R. S. Reczkowski, D. E. Ash, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10992–10994.
112. T. J. Bivalacqua, W. J. Hellstrom, P. J. Kadowitz, H. C. Champion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 283, 923–927.
113. N. Lane, *Oxygen*, Oxford University Press, Oxford, **2002**, p. 132.
114. Н. П. Львов, А. Н. Носиков, *Биохимия* **2002**, 67, 196–200.
115. J. Kim, D. C. Rees, *Nature* **1992**, 360, 553–560.
116. C. Kisker, H. Schindelin, D. C. Rees, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 233–67.
117. K. V. Rajagopalan, J. L. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10199–202.
118. B. E. Schultz, R. Hille, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 827–828.
119. J. M. Dias, M. E. Than, A. Humm, R. Huber, B. G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, S. Bursakov, J. Calvete, J. Caldeira, C. Carneiro, J. J. G. Moura, I. Moura, M. Romao, *Structure* **1999**, 7, 65–79.

120. P. Arnoux, M. Sabaty, J. Alric, B. Frangioni, B. Guigllarelli, J. M. Adriano, D. Pignol, *Nature Struct. Biol.* **2003**, 10, 929–934.
121. J. C. Hilton, K. V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 325, 139–143.
122. H. Schindelin, C. Kisker, J. Hilton, K. V. Rajagopalan, D. C. Rees, *Science* **1996**, 272, 1615–1621.
123. F. Schneider, J. Löwe, R. Huber, H. Schindelin, C. Kisker, J. Knäblein, *J. Mol. Biol.* **1996**, 263, 53–69.
124. A. S. McAlpine, A. G. McEean, A. L. Shaw, S. Bailey, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, 2, 690–701.
125. A. S. McAlpine, A. G. McEwan, A. L. Shaw, S. Bailey, *J. Mol. Biol.* **1998**, 275, 613–623.
126. G. N. George, J. Hilton, C. Temple, R. Prince, K. V. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1256–1266.
127. M. Czjzek, J. P. Dos Santos, J. Pommier, G. Giordano, V. Mejean, R. Haser, *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 435–447.
128. G. N. George, J. Hilton, K. V. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1113–1117.
129. C. A. Temple, G. N. George, J. C. Hilton, M. J. George, R. C. Prince, M. J. Barber, K. V. Rajagopalan, *Biochemistry*, **2000**, 39, 4046–4052.
130. J. T. Lin, V. Steward, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1998**, 39, 1–30.
131. W. H. Campbell, *Plant Physiol.* **1996**, 111, 355–361.
132. K. Okamoto, T. Eger Bryan, T. Nishino, S. Kondo, F. Pai Emil, T. Nishino, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 17, 1848–1855.
133. R. Hille, T. Nishino, *FASEB J.* **1995**, 995–1003.
134. E. Garattini, R. Mendel, M. J. Romao, R. Wright, M. Terao, *Biochem. J.* **2003**, 372, 15–32.
135. E. Della Corte, F. Stirpe, *FEBS Lett.* **1968**, 2, 83–94.
136. C. Enroch, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, E. F. Pai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 10723–10728.
137. J. C. Boyington, V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, T. C. Stadtman, P. D. Sun, *Science* **1997**, 275, 1305–1308.
138. J. C. Wooton, R. E. Nicholson, J. M. Cock, D. E. Walters, J. F. Burke, W. A. Doyle, R. C. Bray, *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, 1057, 157–185.
139. Y. Kubo, N. Ogura, H. Nakagawa, *J. Biol. Chem.* **1998**, 263, 19684–19689.
140. C. Kisker, H. Schindelin, A. Pacheco, W. A. Wehbi, R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, J. H. Enemark, D. C. Rees, *Cell* **1997**, Vol. 91, 973–983.
141. E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. J. Stuart, *Nature* **1995**, 373, 539–544.
142. J. C. Boyington, V. N. Gladyshev, S. V. Khangulow, T. C. Stadtman, P. D. Sun, *Science* **1997**, 275, 1305–1308.
143. R. M. Garrett, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7387–7391.
144. G. N. George, R. M. Garrett, R. C. Prince, K. V. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8588–8592.
145. E. Garman, *Current Op. Struct. Biol.* **2003**, 13, 545–561.
146. J. L. Johnson, S. K. Wadman, in C. R. Scriver (Ed.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition, McGraw-Hill Health Professions Division, New York, **1989**.
147. S. Mukund, M. W. W. Adams, *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 163–167.
148. M. K. Chan, S. Mukund, A. Kletzin, M. W. W. Adams, D. C. Rees, *Science* **1995**, 267, 1463–1469.

149. M. K. Johnson, D. C. Rees, M. W. W. Adams, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2817–2839.
150. V. Svetlitchnji, C. Peschel, G. Acker, O. Meyer, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 5134–5144.
151. O. Meyer, K. Frunzke, J. Tächil, J. M. Wolk, in E. I. Stiefel, D. Coucouvanis, W. E. Newton (Eds.). *Molybdenum Enzymes, Cofactors and Model Systems*, ACS Symposium Series No. 535, Washington DC, **1993**, pp. 433–459.
152. H. Dobbek, L. Gremer, O. Meyer, R. Huber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 8884–8889.
153. U. Schübel, M. Kraut, G. Mörsdorf, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 2197–2203.
154. M. J. Rorao, M. Archer, I. Moura, J. J. G. Moura, J. LeGall, R. Engh, M. Schneider, P. Hof, R. Huber, *Science* **1995**, 270, 1170–1176.
155. H. Dobbek, L. Gremer, R. Kiefersauer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 15971–15976.
156. T. I. Doukov, T. M. Iverson, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Science* **2000**, 298, 567–572.
157. C. Darnault, A. Volbeda, E. J. Kim, P. Legrand, X. Vermede, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 271–279.
158. B. Bhaskar, E. DeMoll, D. A. Grahame, *Biochemistry* **1998**, 37, 14491–14499.
159. H. Dobbek, V. Svetlitchnyi, L. Gramer, R. Huber, O. Meyer, *Science* **2001**, 293, 1281–1285.
160. C. L. Drennan, J. Heo, M. D. Sintchak, E. Schreiter, P. W. Ludden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11973–11978.
161. M. E. Anderson, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **1994**, 33, 8702–8711.
162. M. E. Anderson, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **1996**, 35, 8371–8380.
163. Z. G. Hu, N. J. Spangler, M. E. Anderson, J. Q. Xia, P. W. Ludden, P. A. Lindahl, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 830–845.
164. H. Dobbek, V. Svetlitchnyi, J. Liss, O. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5382–5387.
165. J. Chen, S. Huang, D. A. Grahame, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 22227–22233.
166. J. G. Ferry, *Biofactors* **1997**, 6, 25–35.
167. J. Xia, J. F. Sinclair, T. O. Baldwin, P. A. Lubdagk, *Biochemistry* **1996**, 35, 1965–1971.
168. V. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Romer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 446–451.
169. P. A. Lindahl, E. Munck, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 3873–3879.
170. W. Shin, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **1992**, 31, 12870–12875.
171. W. Shin, M. E. Anderson, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5522–5526.
173. W. K. Russel, C. M. B. Stallhanske, J. Xia, R. A. Scott, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7502–7510.
174. X. S. Tan, C. Sewell, Q. Yang, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 318–319.
175. S. Gencic, D. A. Grahame, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 6101–6110.
176. J. Chen, S. Huang, J. Seravalli, H. Gutzman Jr., D. J. Svartz, S. W. Ragsdale, K. A. Bagley, *Biochemistry*, **2003**, 42, 14822–14830.
177. D. P. Barondeau, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3959–3970.
178. W. Cu, S. Gencic, S. P. Cramer, D. A. Grahame, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15343–15351.
179. T. Funk, W. Gu, S. Friedrich, H. Wang, S. Gencic, D. A. Grahame, S. P. Cramer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 88–95.
180. M. R. Bramlett, X. Tan, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9316–9317.
181. E. L. Maynard, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9221–9222.

182. J. Seravalli, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* **2000**, 39, 1274–1277.
183. D. A. Grahame, E. DeMoll, *Biochemistry* **1995**, 34, 4617–4624.
184. E. L. Mynard, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **2001**, 40, 13262–13267.
185. M. W. W. Adams, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1020, 115–145.
186. S. P. J. Albracht, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1188, 167–204.
187. A. Volbeda, H. Charon, M. C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Fray, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, 373, 580–587.
188. A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12989–12996.
189. A. L. De Lacey, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, V. M. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7181–7189.
190. Y. Montet, P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. Field, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *C. Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 523–526.
191. R. Cammack, D. S. Patil, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 912, 98–109.
192. M. Teixeira, I. Moura, A. V. Xavier, J. J. G. Moura, J. LeGall, D. V. Der Vartanian, H. D. Peck, B. H. Huynh, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 16435–16450.
193. V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, N. R. Cammack, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 832, 69–79.
194. V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, D. S. Patil, R. Cammack, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 883, 145–154.
195. A. Volbeda, L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Rozeboom, S. P. J. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, 10, 239–249.
196. S. E. Lamle; S. P. J. Albrach, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6595–6604.
197. K. A. Bagley, E. C. Duin, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, W. H. Woodruff, *Biochemistry* **1995**, 34, 5527–5535.
198. S. Reissmann, E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Böck, *Science* **2003**, 299, 1067–1070.
199. B. L. Vallee, in I. Bertini, H. B. Gray (Eds.), *Zinc enzymes*, Birkhauser, Boston, **1986**.
200. R. A. McCance, C. W. Widdowson, *Biochem. J.* **1942**, 36, 692–693.
201. D. W. Christianson, *Adv. Prot. Chem.* **1991**, 42, 281–335.
202. J. E. Coleman, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, 897–946.
203. R. J. P. Williams, *Polyhedron* **1987**, 6, 61–69.
204. O. Kleifeld, A. Frenkel, J. M. L. Martin, I. Sagi, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 98–103.
205. D. S. Gregory, A. C. R. Martin, J. C. Cheetham, A. R. Rees, *Prot. Eng.* **1993**, 6, 29–35.
206. A. Butler, *Science* **1998**, 281, 207–209.
207. W. Maret, *Biochemistry* **2004**, 43, 3301–3309.
208. J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, *Inorganic chemistry: Principles of structure and reactivity*, 4th edition, Harper Collins College Publishers, New York, **1993**.
209. R. E. Tashian, *Bioessays* **1990**, 10, 186–192.
210. M. R. Badger, G. D. Price, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1994**, 45, 369–392.
211. A. Liljas, K. K. Kannan, P. C. Bergstén, I. Waara, K. Frodnprg, B. Stramdnerg, U. Carlbom, L. Järup, S. Lövgren, M. Petef, *Nat. New. Biol.* **1972**, 235, 131–137.
212. K. Hakansson, M. Carlsson, L. A. Svensson, A. Liljas, *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 1192–1204.

213. S. Mitsuhashi, T. Mizushima, E. Yamashita, M. Yamamoto, T. Kumasaka, H. Moriyama, T. Ueki, S. Miyachi, T. Tsukihara, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5521–5526.
214. B. Persson, M. Krook, H. Jörnvall, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 200, 537–543.
215. H. Jörnvall, J. O. Höög, *Alcohol*, **1995**, 30, 153–161.
216. T. Inoue, M. Sunagawa, A. Mori, C. Imai, M. Fukuda, M. Takagi, A. Mori, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 3115–3122.
217. H. Eklund, B. Nprström, E. Zeppezauer, G. Söderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe, *J. Mol. Biol.* **1976**, 102, 27–59.
218. H. Eklund, J. P. Samma, I. Wallen, C. I. Brändén, A. Akeson, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1981**, 146, 561–587.
219. H. Eklund, C. I. Brändén, in F. A. Jurnak, A. McPherson (Eds.), *Biological Macromolecules and Assemblies*, Vol. 3, John Wiley & Sons, New York, **1987**, pp. 73–142.
220. R. Meijers, R. J. Morris, H. W. Adolph, A. Merli, V. S. Lamzin, E. S. Cedergren-Zeppezauer, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9316–9321.
221. F. Colona-Cesari, D. Perahia, M. Karplus, H. Eklund, M. Brändén, O. Tapia, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 15273–15280.
222. S. Ramaswamy, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, 463, 275–284.
223. L. Esposito, F. Sica, C. A. Raia, A. Girdano, M. Rossi, L. Mazzarella, A. Zagari, *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 463–477.
224. M. F. Dunn, J. F. Biellmann, G. Branlant, *Biochemistry* **1975**, 14, 3176–3182.
225. H. Eklund, B. V. Plapp, J. P. Samama, C. I. Brändén, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14349–14358.
226. R. T. Dworschack, B. V. Plapp, *Biochemistry* **1977**, 16, 111–116.
227. M. W. Makinen, W. Maret, M. B. Yim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 2584–2588.
228. C. A. Raia, S. D'Auria, M. Rossi, *Biocatalysis* **1994**, 11, 143–150.
229. N. V. Kaminskaia, B. Spingler, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6411–6422.
230. K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 1211–1233.
231. S. J. Cartwright, A. F. W. Coulson, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **1980**, 289, 370–372.
232. S. J. Cartwright, A. K. Tan, A. L. Fink, *Biochem. J.* **1989**, 263, 905–912.
233. N. Strynadka, M. N. G. James, *Nature* **1992**, 359, 700–705.
234. M. I. Page, A. P. Laws, *Chem. Commun.* **1998**, 1609–1617.
235. R. B. Davies, E. P. Abraham, *Biochem. J.* **1974**, 143, 129–135.
236. B. A. Rasmussen, K. Bush, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 223–232.
237. T. R. Walsh, S. Gamblin, D. C. Emery, A. P. MacGowan, P. M. Bennett, *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, 37, 423–431.
238. K. Bush, *Clin. Infect. Diseases*, **1998**, 27, S48–S53.
239. D. M. Livermore, *J. Antimicrob. Chemother. Suppl. D*, **1998**, 41, 25–41.
240. G. G. Hammond, J. I. Huber, M. L. Greenlee, J. B. Laub, K. Young, L. L. Silver, J. Balkovec, K. D. Proyer, J. K. Wu, B. Leiting, D. L. Pompliano, J. H. Toney, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 179, 289–296.
241. J. H. Toney, P. M. D. Fitzgerald, N. Grover-Sharma, S. H. Olson, W. J. May, J. G. Sundelof, D. E. Vanderwall, K. A. Cleary, S. K. Grant, J. Wu, J. W. Kozatich, D. L. Pompliano, G. G. Hammond, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 185–196.
242. P. M. D. Fitzgerald, J. K. Wu, J. H. Toney, *Biochemistry* **1998**, 37, 6791–6800.

243. J. H. Toney, P. M. D. Fitzgerald, N. Groversharma, S. H. Olson, W. J. May, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 185–196.
244. A. Carfi, S. Parès, E. Duee, M. Galleni, C. Duez, J. M. Frère, O. Dideberg, *EMBO J.* **1995**, 14, 4914–4821.
245. A. Carfi, E. Duée, M. Calleni, C. I. Brändén, O. Dideberg, *Acta Crystallogr.* **1998**, D54, 313–323.
246. N. O. Concha, B. A. Rasmussen, K. Bush, O. Herzberg, *Structure* **1996**, 4, 823–836.
247. A. Carfi, E. Duée, R. Paulsoto, M. Galleni, J. M. Frère, O. Dideberg, *Acta Crystallogr.* **1998**, D54, 47–57.
248. D. E. Wilcox, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2435–2458.
249. M. Backer, S. McSweeney, H. B. Rasmussen, B. W. Riise, P. Lindley, E. Hough, *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 1265–1274.
250. J. R. Knox, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1973**, 74, 533–545.
251. E. Hough, L. K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, Z. Derewenda, *Nature* **1989**, 338, 357–360.
252. A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* **1991**, 10, 1607–1618.
253. B. Stec, K. M. Holtz, E. R. Kantrowitz, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 1303–1311.
254. N. M. Hooper, *FEBS Lett.* **1994**, 354, 1–6.
255. W. Bode, F. X. Gomis-Ruth, W. Stockler, *FEBS Lett.* **1993**, 331, 134–140.
256. S. G. Odintsov, I. Sabala, M. Marcyjaniak, M. Bochtler, *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 775–785.
257. W. N. Lipscomb, N. Strater, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375–2434.
258. H. M. Kim, D. R. Shin, O. J. Yoo, H. Lee, J.-O. Lee, *FEBS Lett.* **2003**, 538, 65–70.
259. E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Science* **1995**, 268, 998–1004.
260. S.-H. Liaw, S.-J. Chen, T.-P. Ki, C.-S. Hsu, C.-J. Chen, A. H.-J. Wang, Y.-C. Tsai, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4957–4962.
261. S. M. Fabiane, M. K. Sohi, T. Wan, D. J. Payne, J. H. Bateson, T. Mitchell, B. J. Sutton, *Biochemistry* **1998**, 37, 12404–12411.
262. L. Chantalat, E. Duee, M. Galleni, J. M. Frere, O. Dideberg, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1402–1406.
263. G. M. Brown, J. M. Williamson, in F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low (Eds.), *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington DC, **1987**, pp. 521–538.
264. S. Kaufman, *Annu. Rev. Nutr.* **1993**, 13, 261–286.
265. R. G. Matthews, C. W. Goulding, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 332–339.
266. K. E. Hightower, C. A. Fierke, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 176–181.
267. J. J. Wilker, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8682–8683.
268. W. Maret, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3478–3482.
269. U. Jacob, W. Muse, M. Eser, J. C. A. Bardwell, *Cell* **1999**, 96, 341–352.
270. P. C. F. Graf, U. Jacob, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1624–1631.

12 Синтетические модели биометаллоорганических реакционных центров

Р. Линк, Т. Роухфусс (Rachel C. Linck, Thomas B. Rauchfuss, University of Illinois at Urbana-Champaign, School of Chemical Sciences, USA)

12.1. Введение

Интерес к биометаллоорганическим реакционным центрам возник из-за обнаружения новых активных сайтов и необычных механизмов реакций металлоорганических ферментов. Область синтетического биометаллоорганического моделирования может вдохновить исследователей на создание новых подходов к старым реакциям, например, к C–H-активации, карбонилированию и гидрогенизированию. Более того, биомиметический подход может показать, как платиновый катализатор может быть заменен на катализатор на основе привычных металлов, таких как Ni и Fe [1].

Оказывается, что переходные металлы играют центральную роль во всех биологических процессах, в которых участвуют H_2 , CO, N_2 , CH_4 , которые сами по себе являются чрезвычайно важным сырьем для промышленности. В результате многолетних исследований было показано, что даже одно известное исключение, так называемые «гидрогеназы без металла», все же содержат Fe и ингибируются CO.

Граница между металлоорганической химией и энзимологией достаточно рыхла и проницаема.

В этом обзоре мы ограничили наше внимание только процессами, происходящими в природе, и исключили, например, взаимодействие металлоорганических соединений-ксенобиотиков (лекарств, содержащих металл; $HgMe_2$ и т. д.) с биологическими системами [3]. Мы также не обсуждаем витамин B_{12} и кобаламин-кофакторы, потому что эта огромная тема изучена лучше, нежели те системы, которые мы рассматриваем [4]. Химия, лежащая в основе действия витамина B_{12} , впечатляет своими механизмами и значением в применении в науке о здоровье.

Мы также решили не обсуждать смежные темы, включающие в себя белки-сенсоры этилена (например, ETR1) [5, 6], белки-сенсоры CO (например, CooA) [7] и нитрогеназу [8, 9].

12.2. Гидрогеназа, содержащая только железо

12.2.1. Общие сведения

Гидрогеназы катализируют взаимопревращение протонов и H_2 (уравнение 12.1.).



Они были обнаружены в бактериях, некоторых грибах и морских водорослях, но известно, что ген Fe- H_2 -азы широко распространен среди эукариот, включая человека [10]. Обычно биологическая роль железосодержащих гидрогеназ (Fe- H_2 -аз) состоит в восстановлении протонов до H_2 , хотя фермент может работать и в обратном направлении. Скорости катализа чрезвычайно велики: H_2 образуется и окисляется в количестве 6000–9000 и 28 000 молекул в секунду в расчете на 1 молекулу гидрогеназы (30°C) соответственно [11].

Структуры гидрогеназ, содержащих только железо, оказались похожими. Примером может служить периплазматический фермент, выделенный из сульфатовосстанавливающего микроорганизма, *Desulfovibrio desulfuricans*, $\alpha\beta$ гетеродимерный белок массой 53 кДа; большая субъединица (42 кДа) содержит активный центр [11, 14].

12.2.2. Структура активного центра

Активный центр содержит агрегат из шести атомов железа, называемый H-кластером. Характерной чертой H-кластера является необычный центр с двумя атомами железа, связанный с типичным кластером $Fe_4S_4(SR)_4$ (рис. 12.1). Одинарная связь Fe-S между биядерным и тетраядерным сайтами – единственный ковалентный мостик между биядерным активным центром и протеином, который, будучи эволюционно примитивным, связан с этим активным центром. Биядерный центр содержит необычный лигандный блок, в состав которого входят три CO-лиганда, два CN^- -лиганда и тиолятный мостик к Fe_4S_4 -кластеру. ИК-спектроскопия подтверждает наличие и карбонил-, и цианид-лигандов [15, 16].

Два атома железа соединены новым дитиолятным кофактором, в котором два атома серы связаны посредством цепочки из трех атомов. Постулируется, что данная цепочка – это фрагмент $-CH_2NHCH_2-$ [15]. Гетероатом X (в особен-

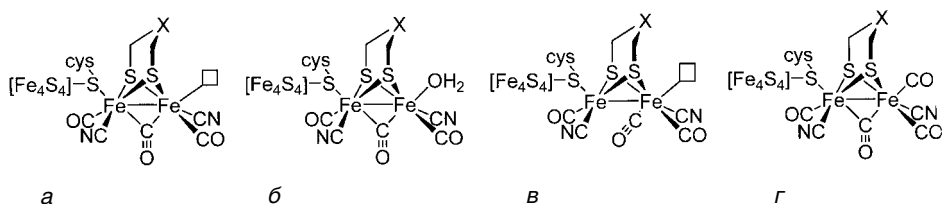
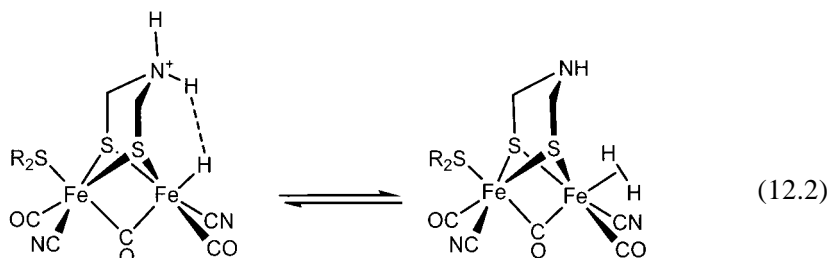


Рис. 12.1. Кристаллографически охарактеризованные структуры железосодержащих гидрогеназ из *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH) (а), окисленной формы гидрогеназы I из *Clostridium pasteurianum* (Cpl) (б), полностью восстановленной формы из DdH (в) и CO-ингибированной формы из Cpl (г). Вакантные или неразрешенные сайты лигандов обозначены на рисунке квадратом. X – NH_x , но также CH_2 или O [15]

ности, аминный азот) находится на расстоянии, характерном для образования водородной связи с близлежащей SH-группой цистеина. К примеру, атомы X и S цистеина-131 в DdH отделены друг от друга лишь на 3,1 Å – расстояние, которое подходит для образования водородной связи [15]. Азадитиолятный кофактор мог бы участвовать в образовании H_2 (уравнение (12.2.)).



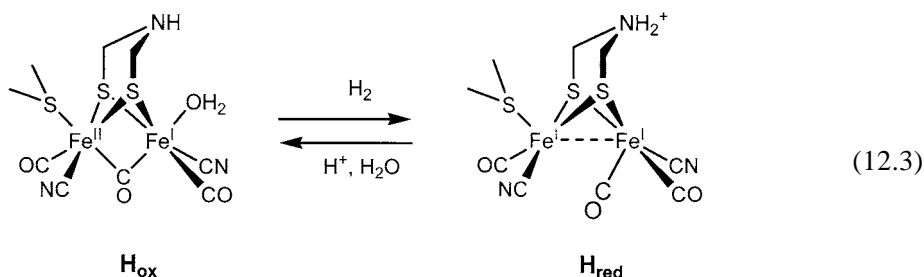
Считается, что биядерный центр существует в двух функциональных окислительных состояниях H_{red} и H_{ox} , есть также более окисленное, неактивное («как изолированное») состояние H_{ox}^{air} . Присутствие нескольких CO и CN лигандов фактически обеспечивает наличие низкоспиновых конфигураций. Мёссбауэрская спектроскопия подтвердила, что кластер $[Fe_4S_4]H$ сохраняет обычную степень окисления +2 [17], таким образом, изменения в мёссбауэрских спектрах и спектрах ЭПР, вызванные восстановительными процессами, относятся к биядерному сайту. Мёссбауэровский анализ диамагнитного состояния H_{red} в ферменте CrI показывает наличие и $[Fe(I)]_2$, и $[Fe(II)]_2$ [17]. Для окисления H_{red} в парамагнитное состояние H_{ox} требуется один электрон, при этом подразумевается, что H_{ox} переходит в смешанно-валентное состояние $S = 1/2$, в соответствии с ЭПР спектром [18]. H_{ox-CO} также будет системой с $S = 1/2$. Хотя первоначально данные мёссбауэрского и ИК-спектров интерпретировались в пользу того, что $H_{red} = [Fe(II)]_2$, ИК-спектр все же вероятнее указывает на присутствие $[Fe(I)]_2$ [19, 20]. Данные мёссбауэрского спектра показывают, что в состоянии H_{ox} атом Fe(II) расположен близко к кластеру $[4Fe-4S]$. Этот вывод согласуется с ИК-спектрами, свидетельствующими о том, что ингибирование CO происходит в лабильном сайте дальнего центра Fe(I) [21]. Если H_{red} – это $[Fe(I)]_2$ и H_{ox} – это $\{[Fe(I)][Fe(II)]\}$, то H_{ox}^{air} – это $[Fe(II)]_2$, что соответствует его диамагнитизму.

Главный механистический вывод, полученный из кристаллографических данных для биядерного центра в Fe-H₂-азе, состоит в варьированности координации по одному из сайтов на удаленном атоме Fe. Форма H_{red} в ферменте DdH характеризуется вероятным наличием свободного координационного положения на удаленном Fe-центре. Принимается, что этот сайт является местом расположения и активации H_2 . Если изучать кристалл более окисленного образца фермента CrI [15, 22], видно, что этот сайт занят молекулой воды, которая, как показано кристаллографическими исследованиями, может быть замещена на молекулу CO [23]. Ферменты характеризуются гидрофобным туннелем, располагающимся непосредственно от этого связывающего сайта до самой поверхности белка; этот канал обеспечивает транспорт H_2 (или CO) [14, 24]. Эксперименты с меченым ^{13}CO и методом ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием показывают, что экзогенные и эндогенные лиганды не обмениваются [19].

12.2.3. Предполагаемый механизм

Несколько очевидных фактов указывают на то, что на субстрат (H^+ и H_2) связывается с терминальным (а не с мостиковым) сайтом Fe-центра, удаленного от Fe_4 кластера: (1) ингибирование CO включает связывание с этим сайтом; (2) в состояниях H_{red} и H_{ox} этот сайт либо свободен, либо занят лигандами, способными к обмену; (3) центральный атом дитиолятного кофактора, который, как считается, имеет функциональную роль, наклонен в сторону этого сайта; (4) гидрофобный H_2 -транспортный туннель заканчивается на этом Fe-сайте.

Каталитический цикл начинается с одноэлектронного восстановления H_{ox} , в котором ближайший атом железа превращается в Fe(I) (уравнение 12.3). В процессе восстановления мостиковый CO-лиганд сдвигается в крайнее положение на дальнем атоме Fe.



Затем H_{red} -форма протонируется, и одновременно с протонированием или сразу после него поставляется электрон, предположительно перенесенный с помощью Fe_4S_4 -центра. Этот второй восстанавливающий эквивалент делает возможной вторую стадию протонирования вновь на удаленном атоме Fe, тем самым приводя к H_2 -лиганду. Известно, что некоторые гидридные комплексы металлов протонируются с образованием H_2 [25]. Предполагается, что азадитиолятный кофактор участвует в переносе протонов к металлу или в их удалении от него в случае образования H_2 или окисления H_2 соответственно [26]. Предположения о механизме, однако, должны рассматриваться скептически, так как необходимо дальнейшее изучение спектральных характеристик комплексов фермент – H_x ($x = 1, 2$) или аналогичные исследования на моделях с терминальными гидридными лигандами.

12.2.4. Основы химии комплексов $Fe_2(SR)_2(CO)_6$, включая цианопроизводные

Биядерный активный сайт Fe- H_2 -азы напоминает комплексы $Fe_2(SR)_2(CO)_6$, которые были открыты в 1920-х гг. [27, 28] и хорошо изучены в 1960–1980-х гг. [29–31]. Эти стабильные гексакарбонилы образуются различными путями, но общий синтез заключается в реакции карбониллов железа и соответствующего тиола или дисульфида.

Добавление двух эквивалентов CN^- к $Fe_2(SR)_2(CO)_6$ легко приводит к $[Fe_2(SR)_2(CN)_2(CO)_4]^{2-}$, причем заместители R могут сильно варьироваться

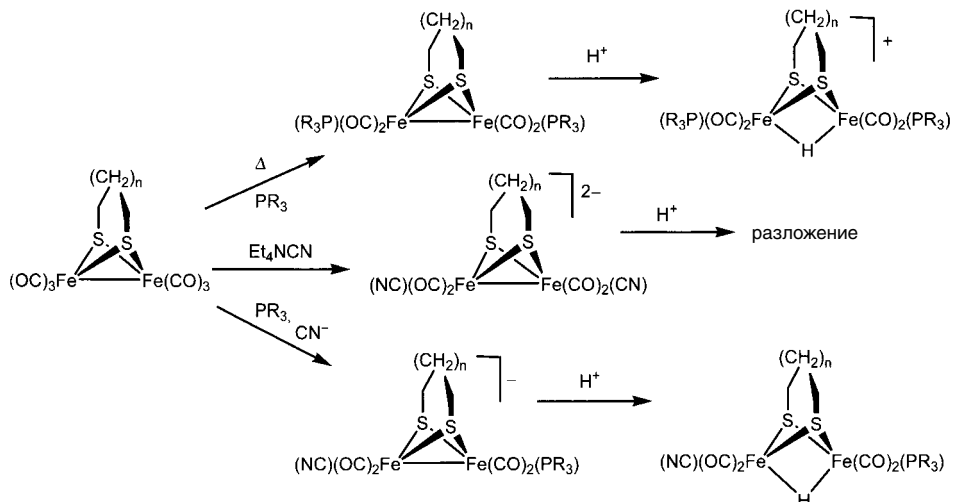
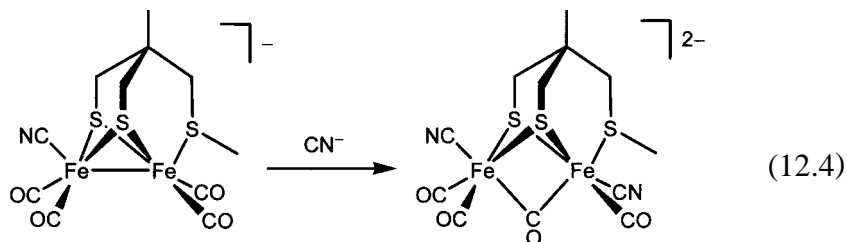


Рис. 12.2. Образование типичных производных $\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CO})_6$ [37]

и быть как хелатными, так и простыми тиолятами (рис. 12.2) [32–34]. Дицианиды образуются особенно быстро и с высокой чистотой, даже когда взятое соотношение $[\text{CN}^-]/[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CO})_6]$ меньше двух [35].

Как и другие реакции замещения CO в $\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CO})_6$, замещение CO на CN^- подчиняется законам ассоциативной кинетики [36]. Как и ожидалось, моноцианид $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CN})(\text{CO})_5]^-$ более медленно реагирует с Et_4NCN , чем исходный гексакарбонил (рис. 12.2) [20].

Способность цианид-иона индуцировать необычные пути замещения была продемонстрирована при изучении $\text{Fe}_2[(\text{SCH}_2)_2\text{C}(\text{Me})\text{CH}_2\text{SMe}](\text{CO})_5$, который содержит в качестве пendants тиоэфирный лиганд. Обработка пентакарбонила 2 экв. CN^- дает дициано-тетракарбонил-тиоэфирный комплекс. Этот дицианид 36е заслуживает особого внимания, поскольку содержит мостиковый CO-лиганд (уравнение (12.4)) и разлагается при температурах выше 0°C путем диссоциации тиоэфирного фрагмента с повторным образованием связи Fe–Fe [38, 39]. В дальнейшем необычная активность этих биядерных комплексов железа проявляется в том, что Et_4NCN ускоряет реакцию $\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_3\text{H}_6)(\text{CO})_6$ и PMe_3 с образованием $\text{Et}_4\text{N}[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_3\text{H}_6)(\text{CN})(\text{CO})_4(\text{PMe}_3)]$ [20]. Хорошо известны и другие фосфинзамещенные производные, например $\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_3\text{H}_6)(\text{CO})_4(\text{PMe}_3)_2$ [40].



12.2.5. Моделирование азадитиолятного кофактора

Предполагается, что дитиолятный кофактор – это $\text{SCH}_2\text{NHCH}_2\text{S}$ [15], хотя с помощью кристаллографического исследования белка нельзя отличить N от C и O. 1,3-Пропандитиол не встречается в живых организмах, так что, несмотря на его химическую простоту, как кофактор он не является более предпочтительным, чем его гетерозамещенные производные.

Биядерные комплексы железа с азадитиолятым лигандами могут быть получены при обработке $\text{Li}_2[\text{Fe}_2(\text{S})_2(\text{CO})_6]$ бис(хлорометил)аминами. В этом методе может использоваться широкий набор алкильных и арильных заместителей, включая тиоэфиры и алкены, которые способны координироваться с Fe-центром [41–43]. Более мягкий путь к азадитиолятным биядерным комплексам приводит к реакции CH_2O , RHN_2 с $\text{Fe}_2(\text{SH})_2(\text{CO})_6$, которая предположительно протекает через промежуточное образование $\text{Fe}_2(\text{SCH}_2\text{OH})(\text{CO})_6$. Другие железосодержащие реагенты также могут выступать в качестве исходных веществ: $\text{Fe}_3\text{S}_2(\text{CO})_9$ и даже свежеприготовленный FeS (в атмосфере CO), хотя последний реагирует значительно хуже карбониллов (рис. 12.3) [37].

Структурные и кислотно-основные исследования азадитиолятных комплексов показывают, что основность амина снижена по сравнению с Et_3N в том же растворителе [37, 42]. Теоретические расчеты позволяют предположить, что пониженная основность обусловлена электронным взаимодействием между неподеленной электронной парой азота и C–S σ^* -орбиталью (рис. 12.4).

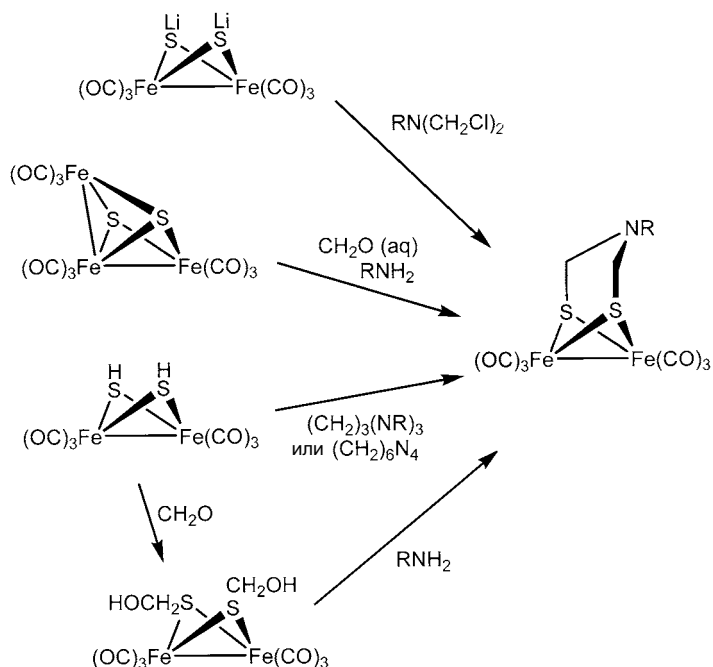


Рис. 12.3. Возможные пути образования азадитиолятных биядерных комплексов железа

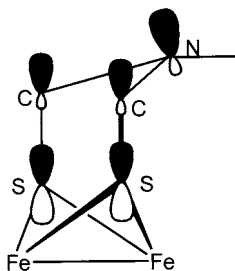


Рис. 12.4. Орбитальные взаимодействия, предложенные для азадитиолятного кофактора [42]

Кислота, сопряженная этому слабоосновному амину, была бы способна протонировать слабоосновный гидрид железа с образованием водорода.

Из классической металлоорганической химии хорошо известно, что некоординирующие аминные основания влияют на поведение комплексов H_2 [44]. Азадитиолятный мотив был использован в дизайне новых катализаторов окисления водорода, как описано в следующем разделе, посвященном NiFe-гидрогеназам [45].

12.2.6. Реакции модельных комплексов с H_2

Дизамещенные комплексы типа $Fe_2(SR)_2(CO)_4L_2$ легко протонируются по Fe–Fe-связи (рис. 12.3) [46, 47]. Однако в противоположность широко распространенным моделям $[Fe_2(\mu-H)(SR)_2(CO)_4L_2]^+$ считается, что гидридный лиганд в функционирующем ферменте является терминальным (см. уравнение (12.2)). Тем не менее фотохимически индуцированная реакция $[HFe_2(SR)_2(CO)_4L_2]$ с D_2 (H/D-обмен) интригует в первую очередь потому, что в ней подразумевается наличие интермедиатов типа $Fe_2(SR)_2-H_2$, хотя они никогда не наблюдались. Молекулы $[Fe_2(SMe)_2(CO)_4(PMe_3)_2]^+$ (36e) также фотокатализируют обмен между D_2 и H_2O , но в отличие от $[HFe_2(SR)_2(CO)_4L_2]$, не между D_2 и H_2 [48]. Ферменты-гидрогеназы обычно характеризуют с применением мониторинга H/D-обмена между водой-растворителем и D_2 [13].

12.2.7. Катализаторы получения H_2

Суммарный процесс образования водорода из протонов подразумевает промежуточное восстановление одного протона в гидрид, который затем протонируется, т. е. $H^+ + H^- \rightarrow H_2$. Превращение протона в гидридный фрагмент начинается с протонирования обогащенного электронами металлоцентра, которое сопровождается переносом заряда с металла. Часто получившийся гидрид металла спонтанно реагирует с дополнительным эквивалентом H^+ , давая H_2 , но обычно для протонирования требуется дальнейшее восстановление металл-гидридного интермедиата. Протонирование $[Fe_2(S_2C_3H_6)(CN)_2(CO)_4]^{2-}$ дает малые количества H_2 [32]. По-видимому, первоначально образующийся гидрид действительно является настолько сильным восстановителем,

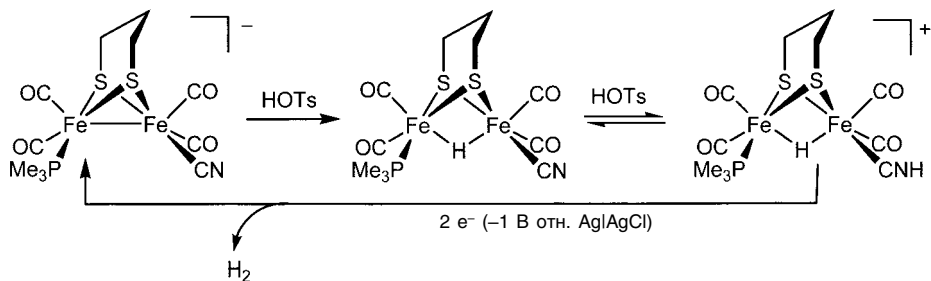


Рис. 12.5. Стадии, предложенные для биомиметического восстановления протона [49]

что подвергается дальнейшему протонированию. К сожалению, окисленный комплекс железа, полученный путем протонирования $[Fe_2(S_2C_3H_6)(CN)_2(CO)_4]^{2-}$ нерастворим и не может быть повторно восстановлен [32]. Образование H_2 , однако, демонстрирует сильную электроноизбыточную природу этих дианионных дицианидов.

Доказано, что комплекс со смешанными лигандами $[Fe_2(S_2C_3H_6)(CN)(CO)_4(PMe_3)]^-$ является эффективным катализатором биомиметического восстановления протонов до H_2 [46, 49]. Эти реакции обычно проводят в растворе MeCN с использованием HOTs ($pK_a = 8,0$ в растворе MeCN). Цикл начинается с протонирования Fe–Fe-связи с образованием гидрида $HFe_2(S_2C_3H_6)(CN)(CO)_4(PMe_3)$ (рис. 12.5), который был полностью охарактеризован. Следующие эквиваленты кислоты протонируют цианид, давая катион $[HFe_2(S_2C_3H_6)(CNH)(CO)_4(PMe_3)]^+$ [46, 49].

Этот катион восстанавливает протоны до H_2 при ~ 1 В (отн. Ag|AgCl) с высокой эффективностью. Соответствующий бисфосфиновый комплекс

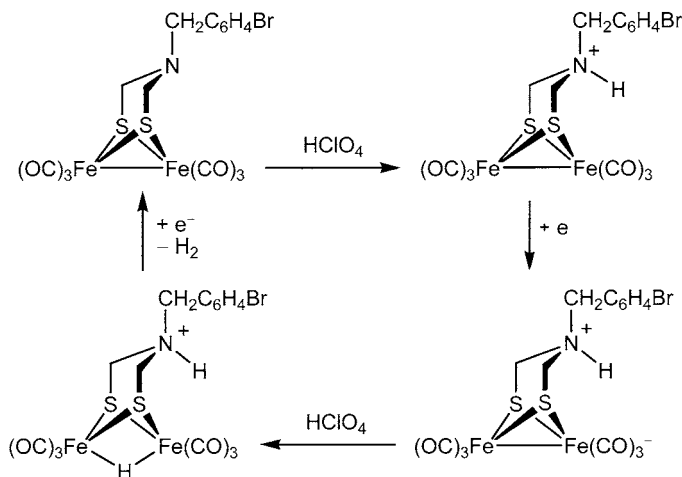


Рис. 12.6. Предполагаемый цикл образования H_2 , катализируемого гексакarbонил-ом дижелеза, модифицированным дитиолятом

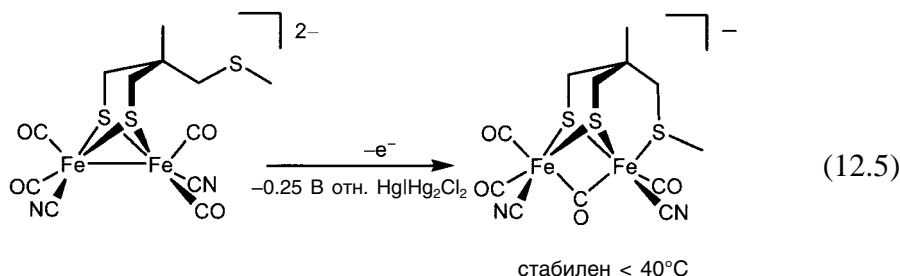
$\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{PMe}_3)_2(\text{CO})_4$ также проявляет хорошую каталитическую активность в присутствии избытка протонов [46]. Данные циклической вольтамперометрии показывают, что дифосфиновые производные обладают меньшей каталитической активностью по сравнению с фосфин-цианидным комплексом [46, 50]. Это различие, по-видимому, объясняется способностью CN^- переносить протон к группе Fe-H-Fe .

Карбонил $\text{Fe}_2[(\text{SCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}](\text{CO})_6$, содержащий азадитиолят, также катализирует превращение водорода [43]. Благодаря наличию шести лигандов CO этот комплекс легче восстанавливается по сравнению с замещенными производными, проявляя активность при 0,9 В (отн. $\text{Ag}|\text{AgCl}$) (рис. 12.6).

После протонирования пendants-амина катализ включает восстановление дижелезного фрагмента, который затем вновь подвергается протонированию с образованием гидрида железа, который, в свою очередь реагирует предположительно внутримолекулярно с аммонийным центром с высвобождением водорода.

12.2.8. Моделирование биядерных дитиолятных комплексов железа

Представляется маловероятным, что высокоспиновые биядерные тиолаты железа, например $[\text{Fe}_2(\text{SEt})_6]^{2-}$, будут обладать реакционной способностью, типичной для гидрогеназы, т. е. координировать CO, H_2 , H^+ [51, 52]. Гидриды $[\text{HFe}_2(\text{S}_2\text{C}_3\text{H}_6)(\text{CO})_4(\text{PR}_3)_2]^+$ формально являются биядерными комплексами, но, как было сказано ранее, гидрид занимает мостиковый, а не биологически важный терминальный сайт [53]. Эти соображения привели к новым подходам к изучению дитиолятов дижелеза. Одноэлектронное окисление тиоэфирных пendants $[\text{Fe}_2[(\text{SCH}_2)_2\text{C}(\text{Me})\text{CH}_2\text{SMe}](\text{CN})_2(\text{CO})_4]^{2-}$ дает производное Fe(I)-Fe(II) , которое обладает характерными ЭПР- и ИК-спектрами, похожими на спектры окисленных, ингибированных CO ферментов (уравнение (12.5)) [54]. Смешанно-валентные частицы, однако, быстро распадаются при комнатной температуре.



Как было установлено ранее, окисление $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CN})_2(\text{CO})_4]^{2-}$ необратимо приводит к образованию нерастворимых твердых веществ, которые считаются

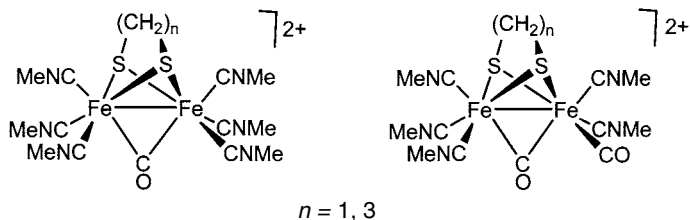


Рис. 12.7. Структуры $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_n\text{H}_{2n})(\mu\text{-CO})(\text{CO})_2(\text{CN})_4]^{2-}$ и $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_2\text{H}_4)(\mu\text{-CO})(\text{CNMe})_6]^{2+}$ [56]

полимерами с CN-мостиками. Однако стабильные дитиоляты дижелеза после окисления превращаются в полизамещенные производные $\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_n\text{H}_{2n})(\text{CO})_{6-x}\text{L}_x$, где $x \geq 2$ и $\text{L} = \text{RNC}$, PR_3 и CN^- . Такое окисление проводят в присутствии дополнительных лигандов-ловушек, таких как RNC , PR_3 и CN^- . Для подтверждения этого были получены карбонилы дижелеза $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_n\text{H}_{2n})(\mu\text{-CO})(\text{CO})_2(\text{CN})_4]^{2-}$ и $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{C}_2\text{H}_4)(\mu\text{-CO})(\text{CNMe})_6]^{2+}$. Наличие $\mu\text{-CO}$ -лиганда является характерным как для этих частиц, так и для состояния $\text{H}_{\text{ox}}^{\text{air}}$ (рис. 12.7) [55, 56].

12.3. NiFe-Гидрогеназы

12.3.1. Общие сведения

NiFe-гидрогеназы ($[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азы}$) хорошо известны и присутствуют во многих бактериях и грибах. Например, геном *E. coli* кодирует четыре различных $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азы}$ [11]. Чаще всего эти ферменты участвуют в окислении H_2 с образованием протонов и восстанавливающих эквивалентов. Микроорганизм, ответственный за возникновение язвы желудка, *H. pylori* применяет $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азу}$ для получения энергии, используя H_2 из желудочно-кишечного тракта [57]. Скорости как окисления H_2 , так и восстановления протонов равны 700 (на фермент в секунду) при 30°C , что в 10–100 раз ниже значений для $\text{Fe-H}_2\text{-аз}$. Аффинности этих ферментов по отношению к H_2 выше, чем для $\text{Fe-H}_2\text{-аз}$ [11]. $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-аза}$, адсорбированная на электродах, катализирует окисление H_2 со скоростью, по крайней мере сравнимой с металлической платиной, и менее чувствительна к отравлению CO [58]. NiFe-Зависимые белки также служат сенсорами на H_2 , в силу чего они индуцируют транскрипцию $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-аз}$.

12.3.2. Структура активного центра

Решающим этапом в развитии биометаллоорганической химии стало определение структуры $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азы}$ *D. gigas* при $2,54 \text{ \AA}$ с помощью ИК-спектроскопии, которая показала наличие CN^- - и CO -лигандов [59, 60]. Белок, который в дальнейшем был детально изучен, является гетеродимером (88 кДа), в котором большая субединица (60 кДа) связана с $[\text{NiFe}]\text{-активным}$

центром. Большинство кристаллографических исследований проводилось с дезактивированными воздухом формами, возможно, представляющими смесь А- и В-состояний (*vide infra*), где никель (предположительно в виде Ni(III)) находится в нерегулярном координационном окружении и связан как с четырьмя SH-группами цистеина, так и с гидроксид-ионом. Два из этих тиолятов и гидроксид связаны с октаэдрически координированным атомом железа, который далее окружен двумя цианидными и одним карбонильным лигандами [60, 62]. Анализ кристаллической структуры [NiFe]-H₂-азы, в которой один из двух терминальных цистеиновых остатков замещен на селеноцистеин, показал отсутствие мостикового кислородного лиганда и соответствующее сокращение расстояния Ni...Fe с 2,9 Å, в вышеупомянутой денатурированной форме, до 2,5 Å [63, 64]. Как и другие ферменты, которые реагируют с газообразными субстратами, [NiFe]-H₂-азы представляют собой на каналы, по которым проходят газы-субстраты с внешней поверхности белка к активному центру [65].

CN⁻-лиганды, необычные с биологической точки зрения, генерируются из цистеинил-тиоцианата, который образуется в реакции тиола с карбамоилфосфатом (H₂NC(O)OPO₃²⁻) с последующей дегидратацией S-цистеинилтиокарбамата [66]. Алкилтиоцианаты реагируют с анионными центрами металлов с образованием цианидов. Карбамоилфосфатный путь, вероятно, применим к образованию СО-лигандов за счет дезаминирования фрагментов Fe-C(O)NH₂ [67]. Непонятно, подходит ли этот биосинтетический путь для образования цианид- и СО-лигандов в Fe-H₂-азах.

Для того чтобы изучить важность связывания водородной связью ближайших серинового и аргининового остатков с CN⁻-лигандами, был использован метод мутагенеза. Замещение серинового остатка на аланиновый прошло успешно, но замещение аргинина, который, как ожидалось, будет образовывать более сильную водородную связь с цианидом, предотвращал экспрессию, демонстрируя тем самым свою роль в стабилизации активного центра [68].

12.3.3. Предполагаемый механизм

[NiFe]-H₂-азы могут существовать в семи состояниях, отличающихся друг от друга как спектрами ЭПР и ИК, так и реакционной способностью по отношению к H₂ (рис. 12.8) [61].

Эти состояния различны благодаря наличию μ-ОН лигандов, образующихся в аэробных условиях, протонированию терминального тиолятного лиганда, редокс-состоянию Ni-центра и наличию гидридных лигандов, связывающих Ni и Fe. В их ИК-спектрах ν_{CO} изменяются от 1914 до 1952 см⁻¹, узкий диапазон которых показывает, что большинство изменений происходит на Ni, так как СО связан с Fe. Существенные изменения в спектре вызваны фотолизом состояния Ni-C с образованием Ni-L, которое предположительно включает в себя депротонирование гидрида Ni(III) с образованием интермедиата Ni(I) [69].

Активация фермента начинается с восстановления Ni(III), характерно-го фрагмента состояний Ni-A и Ni-B [70]. Кристаллографический анализ

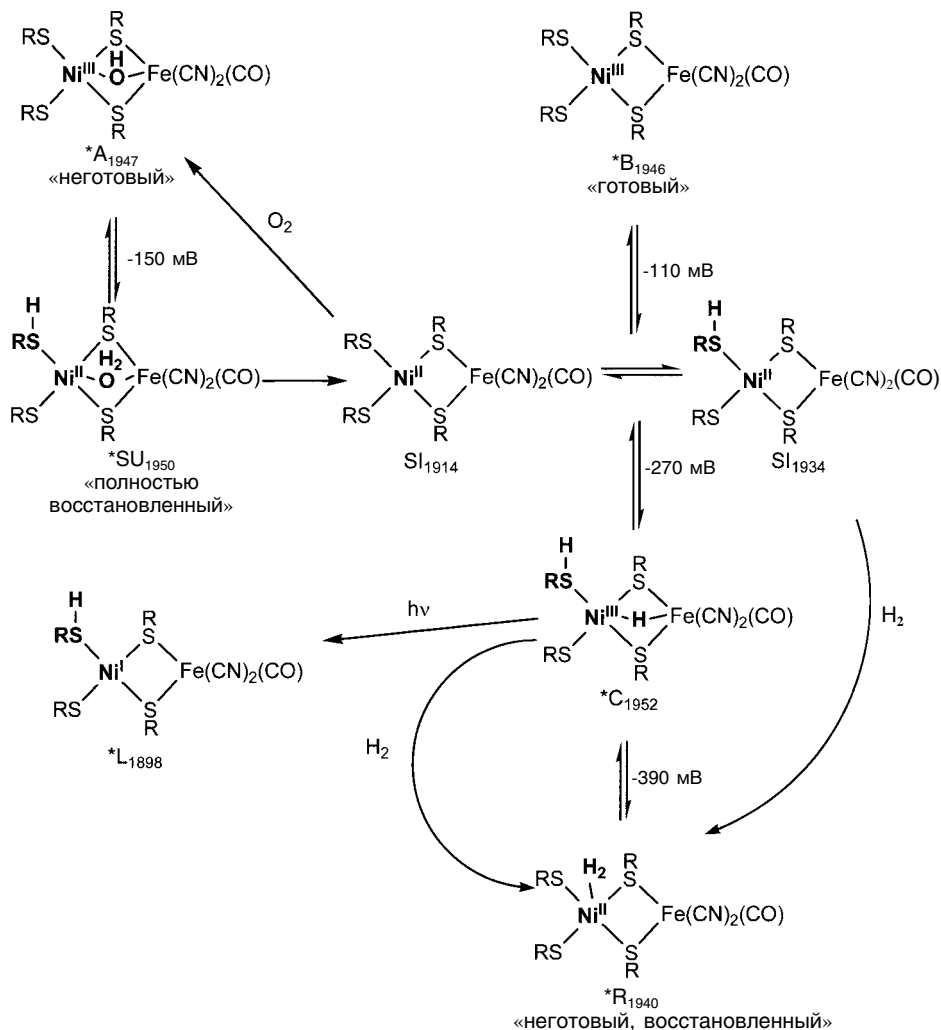


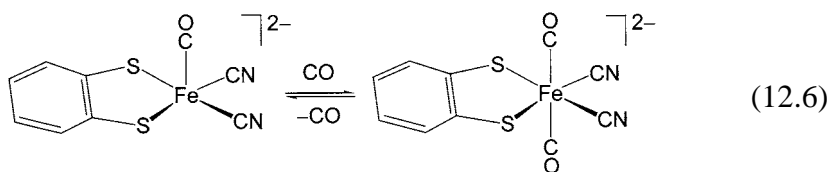
Рис. 12.8. Редокс-состояния NiFe-гидрогеназы, известные в литературе [26, 61, 69]. Нижние индексы обозначают низкочастотные полосы ν_{CO} для фермента из *D. gigas*. Состояния SI, C и R физиологически наиболее важные. Звездочками обозначены состояния, которые могут быть обнаружены с помощью ЭПР. Символ «Fe» обозначает железо в степени окисления +2 во всех состояниях

СО-ингибированной H₂-восстановленной формы [NiFe]-H₂-азы показывает, что СО связан с Ni, что соответствует и данным ЭПР [71]. Такой результат свидетельствует о том, что Ni является активным участником в процессе активации водорода. Терминальные тиолатные лиганды типично основны [72], поэтому следовало ожидать, что промежуточно образующийся H₂-лиганд переносит протон к координированному цистеинилтиолату, как это было продемонстрировано на модельных системах [73]. Однако это доказывает

трудность исследования процесса протонирования на тиоляте в обеих моделях и, в особенности, в белке. Понятно, что активация H_2 с образованием Ni–C состояния протекает через промежуточную структуру Ni–H–Fe (ср. Ni–OH_x–Fe подструктуры в неактивных состояниях). Эксперименты ENDOR–ESEEM (HYSCORE) были проведены на [NiFe]–H₂–азе, выделенной из *Ralstonia eutropha*. Она имеет кластеры Fe–S, что не мешает спектроскопическому детектированию центра NiFe. В ходе этих экспериментов обнаруживается сигнал Ni–H–Fe, который исчезает при действии 2H_2O , а после активации с помощью 2H_2 соответствующий сигнал появляется в области 2H –M [74]. Сигнал обратимо исчезает при фотолизе с образованием Ni–L формы [69]. Предполагается, что железный сайт $[Fe(SR)_2(CN)_2(CO)]_z$ не насыщен электронами (конфигурация с количеством электронов < 18), что способствует образованию мостиковых гидридных и гидроксидных лигандов.

12.3.4. Модели сайта, содержащего железо

Сложная модель Fe-сайта [NiFe]–H₂–азы может быть представлена в виде аниона $[«S3»Fe(CN)_2(CO)]^{2-}$, где «S3» – фронтально хелатированный тиоэфирдитиолят [75]. Фрагмент $Fe(CN)_2CO$ также может быть стабилизирован фронтальным триаминным лигандом и циклопентадиенил-лигандами с образованием более устойчивых спектральных моделей, например $[fac-L_3Fe(CN)_2(CO)]_z$ [76, 77]. ИК-спектры Ср-производного и дезактивированного на воздухе фермента в области 1900–2100 см^{–1} весьма схожи. Авторы заключают, что «донорный фрагмент $Ni(\mu-SCys)_2(\mu-OH)$ состояний Ni–А или Ni–В имеет то же самое электронное влияние на ИК-свойства пирамидального сайта $Fe(II)(CN)_2(CO)$... что и C_5H^- » [77]. Пятикоординированные центры $Fe(II)(CN)_2(CO)$ могут быть стабилизированы π -донорными лигандами (уравнение (12.6)) [78–80].



Координационная ненасыщенность таких фрагментов определяет их способность связывать CO, хотя активация H_2 не наблюдается.

12.3.5. Структурные модели биметаллического сайта

Несмотря на то что кристаллические структуры [NiFe]–H₂–азы с высоким разрешением доступны уже несколько лет, прогресс в создании точных биметаллических моделей незначителен. Определенную сложность вызывает никелевый подсайт, так как *тетраэдрические* молекулы типа $Ni(SR)_4$ встречаются редко [81, 82]. Особое внимание сосредоточено на молекулах, содержащих минимальный координационный фрагмент $(XY)Fe(\mu-SR)_2Ni$, где XY – NO,

СО или CN (рис. 12.9). Интересная модель получается в реакции дитиолята никеля и дитиолят-карбонила железа с образованием сайта $\text{Ni}(\text{SR})_4$, связанного с фрагментом $\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2$. Хотя дополнительное количество тиоэфира нежелательно, а никелевый сайт – плоско-квадратный, фрагмент $(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2$ адекватно аппроксимирует фрагмент $(\text{CO})(\text{CN})_2$ (и CN^- , и PMe_3 – сильные σ -донорные лиганды). Положение полосы ν_{CO} для этой $\text{Ni}(\text{II})$ – $\text{Fe}(\text{II})$ -модели близко к значению, характерному для $\text{Ni}(\text{II})$ – $\text{Fe}(\text{II})$ -сайта фермента в наиболее восстановленном состоянии «Ni–R» [83]. Реакция $\text{NiCl}_2(\text{Ph}_2\text{PC}_2\text{H}_4\text{PPh}_2)$ с анионом $[\text{Fe}(\text{NS}_3)\text{CO}]^-$ ($\text{NS}_3 = \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})_3$) в атмосфере СО также приводит к сложной структурной модели, характерным элементом которой является сайт (амин)(RS)(OC) $_2\text{Fe}(\mu\text{-SR})_2\text{NiCl}(\text{PR}_3)_2$ [84].

Вышеупомянутая работа отводит главное место исследованиям, связанным с контролем за координационным поведением Fe, как относительно его пятикоординированного состояния, так и одновременного присутствия СО и CN^- -лигандов. В последние годы были получены различные комплексы типа $[\text{Fe}(\text{CN})_{6-x}(\text{CO})_x]^{n-}$; эти исследования могли бы создать базу источников фрагмента $\{\text{Fe}(\text{CO})(\text{CN})_2\}$. Более того, спонтанная ассоциация таких Fe–CO–CN фрагментов потенциально может отвечать биосинтезу $[\text{NiFe}]\text{-H}_2$ -аз.

Если исходить из перспективы получения функциональных моделей, неясно, играют ли эти двухатомные лиганды какую-нибудь прямую роль в катализе; следовательно, влияние их электронного строения можно адекватно оценить, учитывая только граневый тридентатный лиганд.

Спорным является то, что, несмотря на присутствие трех атомов металла, лучшей структурной моделью активного центра служит молекула $[\text{Fe}(\text{NS}_3)_2\text{CO}]_2\text{Ni}$ (рис. 12.10). Каждый атом железа является пятикоординированным, содержит молекулу СО ($\nu_{\text{CO}} = 1933\text{см}^{-1}$) и связан с тетраэдрическим центром $\text{Ni}(\text{SR})_4$ посредством пары тиолятных лигандов [91].

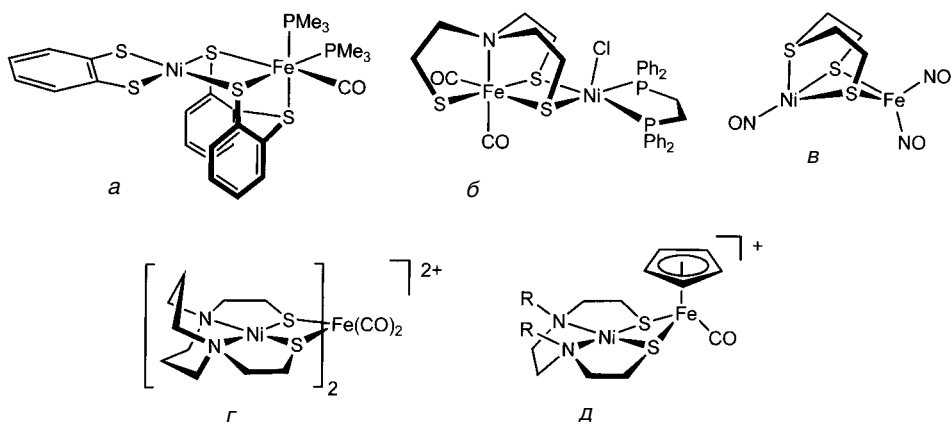


Рис. 12.9. Синтетические аналоги активного центра $[\text{NiFe}]\text{-H}_2$ -азы, целью получения которых было создание систем типа $(\text{OC})\text{Fe}(\mu\text{-SR})_2\text{Ni}$. Соединения в, г, д в тексте не обсуждались [88–90]

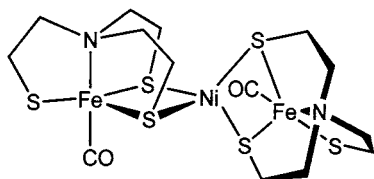


Рис. 12.10. Синтетический аналог активного центра $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азы}$ [91]

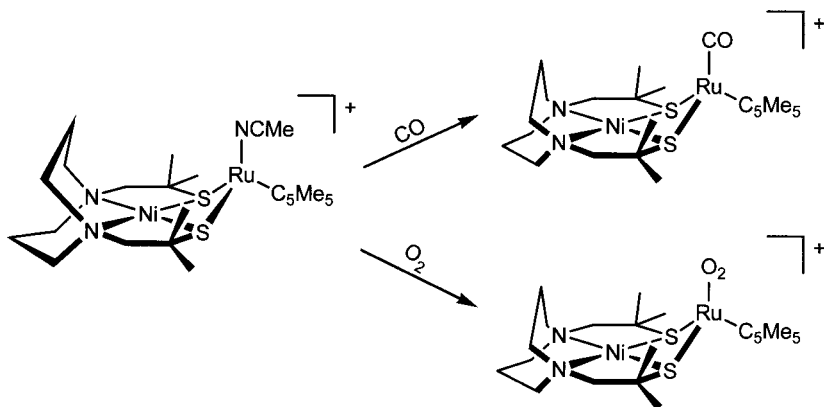


Рис. 12.11. Реакции комплексов $\text{Ru-Ni}(\text{S}_2\text{N}_2)$ с малыми молекулами, которые отравляют $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{-азу}$

Много моделей основано на применении комплексов $\text{Ni}(\text{SR})_2\text{L}_2$ (L = амин, фосфин, тиозфир) как металлолигандов, которые могут быть присоединены к компонентам, содержащим железо (рис. 12.9, ε и δ). В этом контексте мотив $\text{Ni}(\text{SR})_2\text{L}_2$ служит имитацией сайта $[\text{Ni}(\text{SR})_4]^{2-}$, наблюдаемого в ферменте. Главный недостаток такого подхода состоит в том, что никелевый сайт в ферменте бесспорно имеет неплоскую геометрию, в то время как строительные блоки $\text{Ni}(\text{SR})_2\text{L}_2$ – исключительно плоско-квадратные. К редкому семейству NiS_2N_2 -производных биметаллических комплексов, которые могут реагировать с малыми молекулами, относятся соединения типа $[(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{Ru}(\text{NiS}_2\text{N}_2)]^+$ (где S_2N_2 – тетраденантный диаминодитиолятный лиганд). Эти комплексы образуют аддукты с CO и MeCN и подвергаются аэробной «деактивации» путем необратимого связывания с O_2 и S_2 (рис. 12.11) [92].

12.3.6. Функциональные модели

Не было обнаружено ни одного комплекса Ni-Fe , который бы катализировал окислительно-восстановительное взаимопревращение H_2 и протонов. Относительная активность была, однако, достигнута при использовании моноядерных никелевых комплексов. Например, дитиолят-иминофосфиновый комплекс $\text{Ni}(\text{II})$ подвергается H/D -обмену при действии D_2 [93]. Катализ окисления H_2 требует присутствия внутримолекулярного основания-амин,

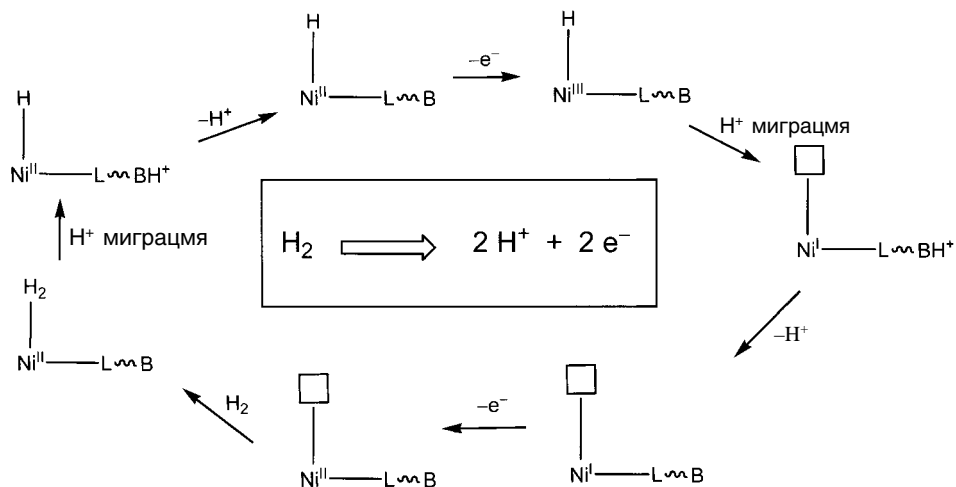
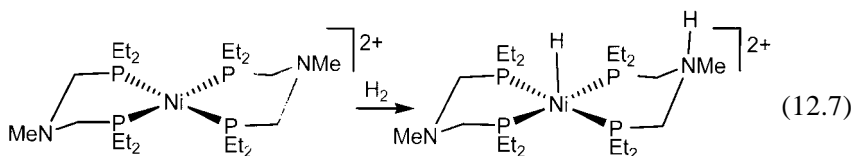


Рис. 12.12. Схематическое представление цикла окисления H_2 , катализируемого комплексами $[\text{Ni}(\text{PNP})_2]^{2+}$, см. также уравнение (12.7) [45]

которое депротонирует первоначально образующийся комплекс с H_2 (уравнение (12.7)). Поэтому катализ наблюдается для $[\text{Ni}(\text{Et}_2\text{PCH}_2\text{NMeCH}_2\text{PEt}_2)_2]^{2+}$, но не для сходного $[\text{Ni}(\text{Et}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PEt}_2)_2]^{2+}$, который не содержит амин как основание [45].



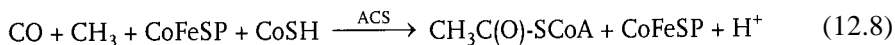
Обработка аминофосфинного комплекса водородом дает гидридный никелевый комплекс с аммонийным пendantsом. Предполагается, что катализ, который был подтвержден электрохимически, включает окисление гидрида $\text{Ni}(\text{II})$ в гидрид $\text{Ni}(\text{III})$. Это увеличивает кислотность гидридного лиганда в достаточной степени для его депротонирования амином-пendantsом (рис. 12.12). Перенос протона приводит к легко окисляемому интермедиату $\text{Ni}(\text{I})$. Катализ окисления H_2 моноядерными комплексами никеля открывает перспективы получения родственных биядерных комплексов с активностью гидрогеназы.

12.4. Ацетил-СоА-синтаза

12.4.1. Общие сведения

Играя центральную роль в ацетогенезисе [94], ацетил-СоА-синтаза (ACS) эффективно катализирует образование ацетил-СоА из CO и кобаламиноподобного

метильного переносчика, называемого корриноидным железо-серным, белком (CoFeSP* – corrinoid iron sulfur protein) (уравнение (12.8))



Введение метильных групп в CoFeSP происходит с участием N-метилированного гетероцикла, природа которого различна у бактерий и архей [95].

ACS-CODH обычно существует в виде $\alpha_2\beta_2$ -гетеротетрамера массой 320 кДа. А-кластеры – центры активности ACS занимают α -субъединицы (82 кДа каждая), а С-кластеры – центры активности CODH занимают β -субъединицы (73 кДа) [96]. Три кластера $[\text{4Fe+4S}]$ также находятся в β -субъединицах. Субъединицы α и β связаны посредством гидрофобного канала, по которому СО переносится между всеми четырьмя каталитическими кластерами. В то время как ACS обычно обнаруживается как часть бифункционального белка ACS-CODH, сам белок может быть получен в виде мономера [96].

Родственная ACS-CODH ацетил-КоА-декарбонилаза/синтаза (ACDS) находится в метаногенных археях (например, *Methanosarcina sp.*), которые извлекают энергию из разложения ацетата на CH_4 и CO_2 . Кластеры А и С в ACDS весьма сходны с кластерами в ACS-CODH, но белок ACDS имеет более сложную структуру ($\alpha_2\epsilon_2$) $_4\beta_8(\gamma\delta)_8$, а А-кластер находится в β -субъединицах [97, 98]. Важность того пути метаболизма, в котором участвует ACDS, доказывает тот факт, что в некоторых метаногенах ACDS составляет 25% от содержания растворимого белка.

12.4.2. Структура активного центра

Активный центр (рис. 12.13) представляет собой плоско-квадратный (периферический) никелевый центр, связанный посредством мостиковых тиолятов с внутренним атомом никеля, который в свою очередь соединен с тиолятом, прикрепленным к типичному кубану $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4$. Периферический Ni закреплен в тетраанионном диамидо-дитиолятном сайте, сформированном из последовательности Cys-Gly-Cys. Связывание металла с помощью депротонированного (пептидил)амида необычно, но уже встречалось в нитрилгидратазах [99]. Хотя кристаллографический анализ первоначально наводил на мысль, что периферический металл – это Cu [100], было продемонстрировано, что этот сайт занимает Ni в активной форме [101]. Внутренний металл лабилен (например, его можно удалить действием 1,10-фенантролина), поэтому внедрение случайных Cu^{2+} и Zn^{2+} протекает легко [102]. Суперструктура белка и геометрия этого металлоцентра может зависеть от металла, который занимает внутренний сайт [101].

Спектр ЭПР восстановленного фермента в атмосфере ^{13}CO характеризуется так называемым сигналом NiFeC, который характеризуется сверхтонким взаимодействием ^{61}Ni , ^{57}Fe и ^{13}CO [103, 104]. Спектр Мёссбауэра показывает, что эти частицы содержат диамагнитный кластер $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, находящийся в обменном взаимодействии с центром Ni(I)CO, который, как предполагается,

* Corrinoid iron sulfur Protein (англ.)

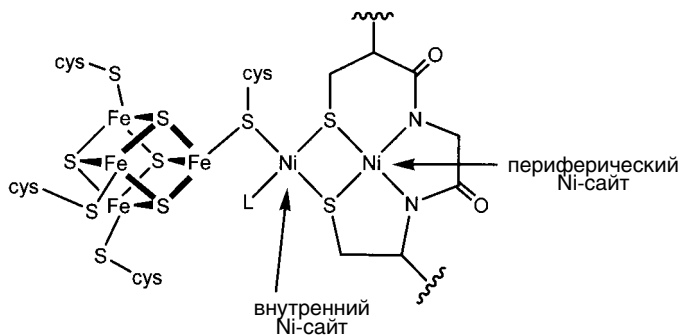


Рис. 12.13. Структура активного центра (А-кластер) ACS. Геометрия и непептидный лиганд (L) внутреннего атома никеля остаются неопределенными

относится к внутреннему сайту [105]. Остается неясным, ответственны ли они за то, что сигнал NiFeC важен для катализа [106, 107].

12.4.3. Предполагаемый механизм

ACS влияет на многие превращения: метилирование, связывание CO, сочетание метила и CO с образованием ацетила, перенос ацетильной группы к тиолу CoA, а также связанную с этими процессами редокс-химию. Принимается, что катализ происходит на внутреннем атоме Ni. Функциональная роль периферического никеля остается неясной: он просто может выполнять структурную роль, обеспечивая внутренний центр парой высокоосновных тиолятных лигандов, тем самым модулируя электронное окружение внутреннего атома никеля. Теоретические расчеты показывают малую вероятность того, что периферический никель связывает CO или принимает эквивалент CH_3^+ [108]. Хотя очередность карбонилирования и метилирования *in vivo* неясна, установлено, что восстановленный ($S = 1/2$) А-кластер может метилироваться MeCoFeSP с образованием частиц с $S \neq 1/2$. Обработка их CO и CoA количественно дает ацетил-CoA [109]. При работе этого цикла сигнал NiFeC не наблюдается. Один из более сложных вопросов понимания механизма состоит в том, что реакция MeCoFeSP, источника метильного катиона, с Ni(I) могла бы давать продукт типа Me–Ni(III). Однако в биологических исследованиях подразумевается существование фрагментов Me–Ni(II).

12.4.4. Спектроскопические модели внутреннего Ni-сайта

Информативные спектроскопические модели для CO-связанного восстановленного внутреннего Ni-сайта были получены с использованием анионного триподального лиганда PhTt^{tBu} , или фенил-трис(*трет*-бутилтиометил)бората (рис. 12.14).

ЭПР-спектр $[\text{PhTt}^{\text{tBu}}]\text{Ni}(\text{CO})$ родственен сигналу NiFeC, но в нем отсутствует сверхтонкое расщепление на ^{13}C . Это свидетельствует о том,

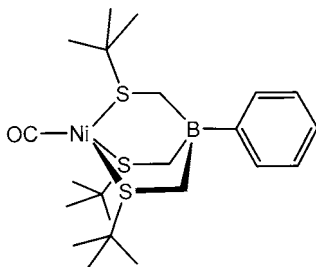


Рис. 12.14. Структура $\text{Ni}(\text{PhTt}^{\text{tBu}})\text{CO}$, спектроскопическая модель восстановленного CO-связанного внутреннего Ni-сайта в ACS

что структура модели не идеальна, хотя и близка к этому. Значения полос ν_{CO} для CO-восстановленного фермента и этого модельного комплекса одинаковы и составляют примерно 1995 см^{-1} .

12.4.5. Структурные модели сайта с двумя атомами никеля

Необычная структура активного центра ACS дала толчок активным исследованиям биметаллических комплексов, содержащих никель в плоско-квадратном окружении, связанный посредством тиолята с тетраэрическими металлоцентрами. Первые работы по моделированию были мотивированы неверным предположением, что активный фермент содержал медь во внутреннем сайте. Металлолиганды NiS_2N_2 , которые были упомянуты выше, реагируют с $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]^+$ с образованием большого числа производных [110, 111]. Однако фрагменты Cu–Ni не связывают CO. Некоторые ди- и триникелевые модели для ансамбля «периферический-внутренний» в ACS создаются путем использования билдинг-блоков NiS_2N_2 , показанных на рис. 12.15 [110–112]. Например, обработка диамидо-дитиолятного комплекса никеля ди(циклооктадиеном) никеля в присутствии CO дает смешанно-валентное производное $\text{Ni}^{\text{II}}\text{S}_2\text{N}_2\text{--Ni}^0(\text{CO})_2$.

Эти чувствительные к воздуху фрагменты в процессе аэробного окисления разлагаются до триметаллического дианиона Ni–Ni–Ni. Биметаллические дикарбонильные частицы также реагируют с двумя эквивалентами PPh_3 с образованием $\text{Ni}(\text{CO})_2(\text{PPh}_3)_2$ и исходного металлолиганда. Легкость протекания этого процесса демеаллирования согласуется с лабильностью внутреннего Ni-сайта, который может быть удален с использованием хелатирующих агентов, таких как 1,10-фенантролин [114]. Изучение модели подтверждает лабильность внутреннего атома металла [115]. Никель связывается с трипептидом Cys–Gly–Cys (защищенным по N- и O-концам) с ожидаемым образованием диамидо-дитиолятов, которые также связываются с никелем через тиолятные мостики [113].

Была описана система, содержащая два атома никеля (II), которая подвергается обратимому восстановлению на внутреннем Ni-сайте до состояния Ni(II)–Ni(I) и дальнейшему обратимому восстановлению до состояния Ni(II)–Ni(0) (рис. 12.15) [112]. Оба атома никеля в первоначальном комплексе

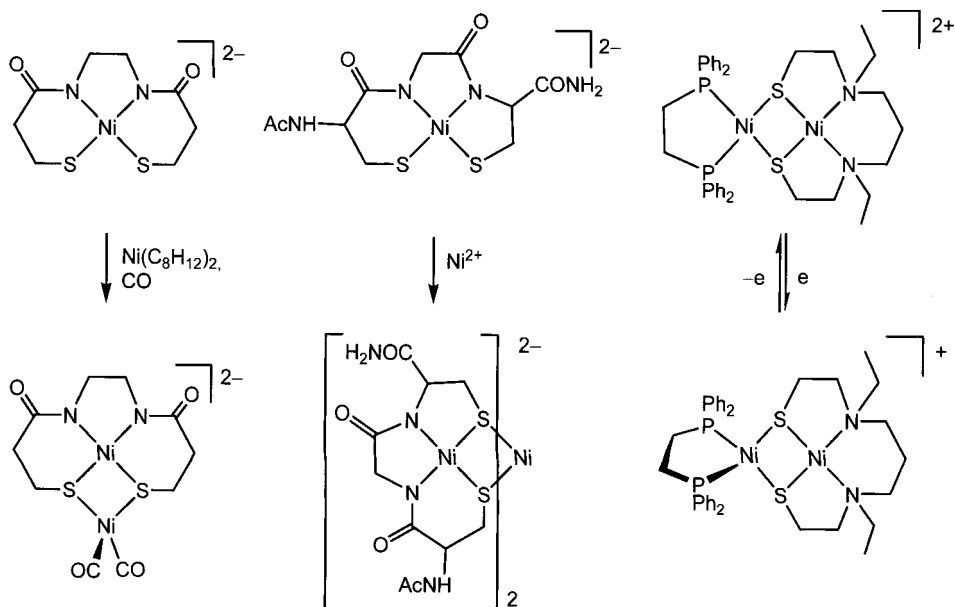


Рис. 12.15. Диникелевые комплексы, иллюстрирующие разные характерные черты ACS: связывание CO [110], пептидоимитирующее связывание [113] и восстановительную активность [112]

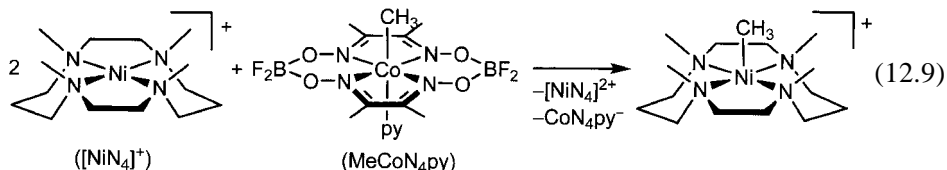
имеют плоско-квадратную геометрию, но по данным ЭПР-спектроскопии центр $\text{Ni}(\text{SR})_2(\text{PR}_3)_2$ становится тетраэдрическим в результате восстановления до состояния $\text{Ni}(\text{II})\text{--Ni}(\text{I})$. Было предположено относительное изменение геометрии энзима ACS в процессе каталитического цикла.

12.4.6. Функциональные модели

Очевидно, что моделирование функций ферментов является глобальной целью. Но некоторые из отдельных стадий их функционирования были смоделированы в растворе.

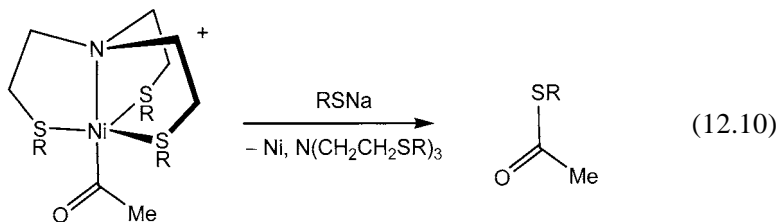
12.4.6.1. Трансметаллирование метильной группы

Для описания переноса метильного катиона от кобальт-корриноидного Fe-S-белка к внутреннему Ni-сайту была разработана элегантная модель. Катион метила переносится от Me-Co-фрагментов к комплексам $\text{Ni}(\text{I})$ с образованием стабильных фрагментов $\text{Ni}(\text{II})\text{--Me}$ и последующим окислением второго эквивалента комплекса $\text{Ni}(\text{I})$ (уравнение (12.9)). В этой системе фрагменты Me-Co равнозначны источнику метильных катионов, хотя изучение механизма также показывает участие метильных радикалов, образующихся путем гомолиза первоначально получающихся фрагментов Me-Co(II) [117].



12.4.6.2. Стадии образования тиоэфиров

Известно, что комплексы металлов встраивают CO в связь углерод—сера [118] и даже могут катализировать это процесс [119]. Существуют стехиометрические предшественники для образования тиоэфиров из Ni-Alk, CO и тиолов [120]. Например, NiMe₂(bipy) реагирует с тиолами, что приводит к метил-Ni(II)-тиолятам, которые карбонилируются с образованием ацетил-Ni(II)-тиолятов. Эти ацетил-Ni(II)-тиоляты восстановительно элиминируют тиоэфир в присутствии CO [121]. Активность ацилированных комплексов никеля по отношению к тиолятам, которая больше отвечает задачам биологии, приводит к тиоэфиру с последующим восстановлением до Ni(0) (уравнение (12.10)) [123]. Известно, что тиоляты восстанавливают Ni(II) до Ni(0) в атмосфере CO [123].

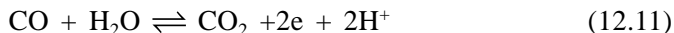


12.5. Анаэробная СО-дегидрогеназа

12.5.1. Общие сведения

В анаэробных условиях биологическое восстановление CO и CO₂ осуществляется с участием CO-дегидрогеназы (CODH), которая часто обнаруживается в комбинации со вторым ферментом, ацетил-СоА-синтазой (ACS, см. выше) [124]. В бифункциональных ферментах ACS/CODH две субстрат-связанные простетические группы А-кластер (сайт синтеза и декарбонилирования ацетил-СоА, см. предыдущий раздел) и С-кластер (сайт для взаимопревращения CO и CO₂) расположены в α- и β-субъединицах соответственно. CODH из *R. rubrum* не связана с ACS. CO, образовавшийся-

ся в С-кластере, проходит по туннелю через фермент к α -субъединице, где реагирует с ацетил-СоА-синтазой (А-кластер) [125]. CODH катализирует взаимопревращение CO_2 и CO (уравнение 12.11)



Это равновесие является ключевым в ацетогенезисе, то есть в мягкой экзотермической реакции $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}$. Дополнительно CODH утилизируется некоторыми метаногенными археонами для извлечения энергии путем диспропорционирования уксусной кислоты на CO_2 и CH_4 [126]. Очищенная CODH из *Moorella thermoacetica* – исключительный электрокатализатор для восстановления CO_2 (700 циклов/ч, 100% конверсии, – 0,57 В отн. НВЭ) [127].

12.5.2. Структура активного центра

Кристаллографические исследования, будучи в общем непротиворечащими, отличаются в описании деталей координационного окружения Ni и Fe_{ext} . Эти различия могут возникать из-за денатурации, что связано с чувствительностью фермента. Активный центр характеризуется необычным кластером $[\text{4Fe-Ni-5S}]$ (рис. 12.16), относящимся к С-кластеру. Этот кластер может быть представлен состоящим из двух субъединиц, внешней биметаллической пары $\text{Ni-Fe}_{\text{ext}}$ и кубического фрагмента Fe_3S_4 . Все пять атомов металла связаны цистеинил-тиолятами. Fe_{ext} и Ni соединены с Fe_3S_4 одним и двумя сульфидными мостиками соответственно. Fe_{ext} , который имеет искаженную тетраэдрическую геометрию с одним гистидиновым лигандом связан с никелем через неорганический атом серы [128]. Очевидно, что связь $\text{Fe}_{\text{ext}}\text{-S-Ni}$ лабильна, и некоторые кристаллографические исследования обнаружили связи Fe-S(Cys)-Ni [129].

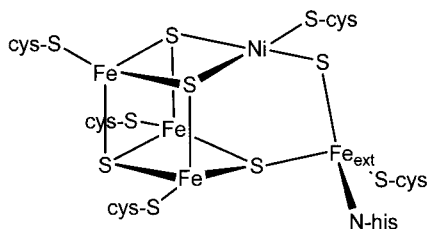


Рис. 12.16. Структура для предполагаемой активной формы С-кластера в анаэробной CODH на основе кристаллографического анализа. Другие структуры не имеют связи Ni-S-Fe [128]

12.5.3. Предполагаемый механизм

Существует несколько случаев окисления CO водой, например хорошо известная реакция OH^- и Fe(CO)_5 , которая дает CO_2 и $[\text{HFe(CO)}_4]^-$. Предполагается, хотя и не доказано, что катализ ферментами включает аналогичную реак-

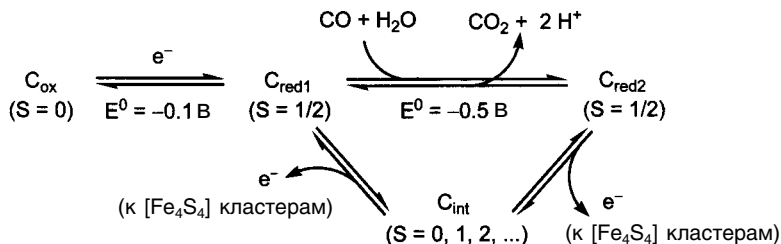


Рис. 12.17. Предполагаемые состояния и стадии для анаэробной CODH [132]

цию – атаку FeOH по связи Ni–OH [130, 131]. Ингибирование цианидом предположительно происходит путем блокирования координации субстрата по металлу, хотя неизвестен ни субстрат, ни металл. Атака OH^- по координированному СО генерировала бы металлокарбоновую кислоту ($M-CO_2H$), которая подвергалась бы депротонированию преимущественно с потерей CO_2 и формальным двухэлектронным восстановлением кластера (рис. 12.17).

Восстановленные состояния С-кластера, важные для каталитического окисления СО: C_{red1} , предположительно являющееся $\{(Ni^{2+}Fe^{2+}):[Fe^3S^4]^{1-}\}$, и C_{red2} , в котором на два электрона больше, чем в C_{red1} [125, 132]. Эти восстановленные состояния оба имеют $S = 1/2$, поэтому двухэлектронное восстановление может превращать C_{red1} в C_{red2} , хотя одноэлектронные стадии тоже вероятны.

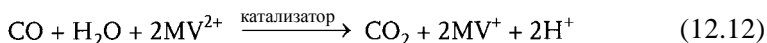
12.5.4. Функциональные исследования

Основная реакция, катализируемая CODH, относится к реакции сдвига водяного газа, которая используется в промышленности для получения H_2 в реакции СО и H_2O . В промышленности этот процесс катализируется железом, но многие металлоорганические комплексы могут влиять на эту реакцию [133]. Кроме того, плоско-квадратные комплексы Ni(II), включая $[Ni^{II}(\text{cyclam})]^{2+}$ (cyclam = 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан), порфирины и фталоцианины никеля, электрокатализируют восстановление CO_2 в СО. Кластер $[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$, и порфирины железа также катализируют эту реакцию [124].

Основная гипотеза, состоящая в том, что Ni – рецептор для СО, сфокусировала исследования на связывании и активации СО комплексами Ni^{II} . $Ni(II)$ не проявляет тенденции к связыванию с СО, но, будучи связанным, СО-лиганд мог бы стать электрофильным и, следовательно, восприимчивым к присоединению гидроксид-иона по атому углерода. Комплексы $Ni(II)$ с СО склонны быть нейтральными или анионными [93, 134].

В терминах функциональных моделей комплексы N–O–S с $Ni(II)$ катализируют окисление СО водой с образованием CO_2 , протонов и восстанавливающих эквивалентов (уравнение 12.8) [135]. Комплекс $[Ni(\text{tmtss})(\text{MeOH})]$ (tmtss = 2'-гидрокси-4',5'-диметилацетофенон-4-метилтиосемикарбанон) имеет четырехкоординированный никелевый центр, который стабилен в метаноле

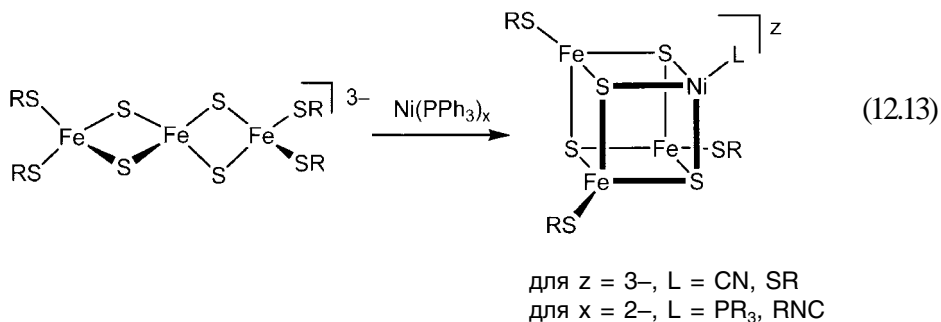
(уравнение (12.12)). Катализ протекает со скоростью 1,04 цикла в час и ингибируется CN^- и MeI , хотя эти реагенты ингибируют многие типы катализа.



Считается, что реакция протекает через образование CO -аддуктов, которые подвергаются нуклеофильной атаке воды с потерей CO_2 и образованием гидроксида никеля, который восстанавливает MV^{2+} (MV = метилвиологен). Каталитический цикл завершается переокислением полученного комплекса Ni(I) с помощью MV^{2+} .

12.5.5. Структурные модели

Фрагменты $[\text{3Fe-Ni-5S}]$ типа кубана, относящиеся к C -кластеру, были получены с использованием специально синтезированного трис(меркаптидного) лиганда, который позволяет стабилизировать активный металлосодержащий сайт – три Fe -центра, связанные с четвертым [136]. В качестве альтернативы без использования специальных лигандов, линейные трехядерные комплексы $[\text{Fe}_3\text{S}_4(\text{SR})_4]^{3-}$ реагируют с $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_4$ с образованием $[(\text{Ph}_3\text{P})\text{NiFe}_3\text{S}_4(\text{SR})_4]^{2-}$ (уравнение (12.13)). Полученный кубан NiFe_3 , который описывается как $\{[\text{Fe(III)}]_3\text{Ni(II)}\}$, вступает в селективные реакции с участием Ni -сайта, хотя обработка монооксидом углерода разрушает кластер, высвобождая $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{2-}$ [137, 138].



12.6. Аэробная CO -дегидрогеназа

12.6.1. Общие сведения

Семейство аэробных CODH ведет свое происхождение от аэробных бактерий. В целом CODH производят CO в количестве около 10^{11} кг в год. Электроны, полученные в процессе окисления CO , переносятся посредством электрон-транспортной цепи, что приводит к восстановлению кислорода. *In vitro* CODH также проявляет свойства катализатора окисления H_2 .

12.6.2. Структура активного центра и предполагаемые механизмы

Фермент из *O. carboxydovorans* охарактеризован кристаллографически с разрешением 1,1 Å и представляет собой димер гетеротримеров с массой 277 кДа. Каждый гетеротример состоит из молибдопротеина, флавопротеина и железо-серного белка. В молибдопротеине Мо связан с одним дитиолом на основе молибдоптерина, одним сульфидом и двумя оксо/гидроксолигандами. Медь, которая является участком окисления СО, линейно связана с Мо=S-центром с помощью цистеинил-тиолята (рис. 12.18, ранние сведения о сайте Mo-S-Se-S не должны приниматься во внимание) [139, 140]. Фрагмент «Мо-молибдопротеин» СО-дегидрогеназы весьма схож с ксантиноксидазой/дегидрогеназой. Показано, что другой белок с фрагментом Cu-Mo-S содержит $[S_2MoS_2CuS_2MoS_2]^{3-}$, хотя функция этого кофактора остается неясной [141].

Предполагаемый механизм действия подразумевает первоначальное связывание СО с двухкоординированным Cu-сайтом. Координированный таким образом СО подвергается атаке связанного с молибденом оксо- или гидроксо-лиганда с участием сульфидной группы. Важная информация о механизме получена путем кристаллографического исследования производного фермента с *t*-BuNC [139]. Изоцианид химически состоит в родстве с СО, если заменить кислород на N-*t*-Bu. При этом он является более сильным донорным лигандом и образует более прочные комплексы с Cu^+ , чем СО.

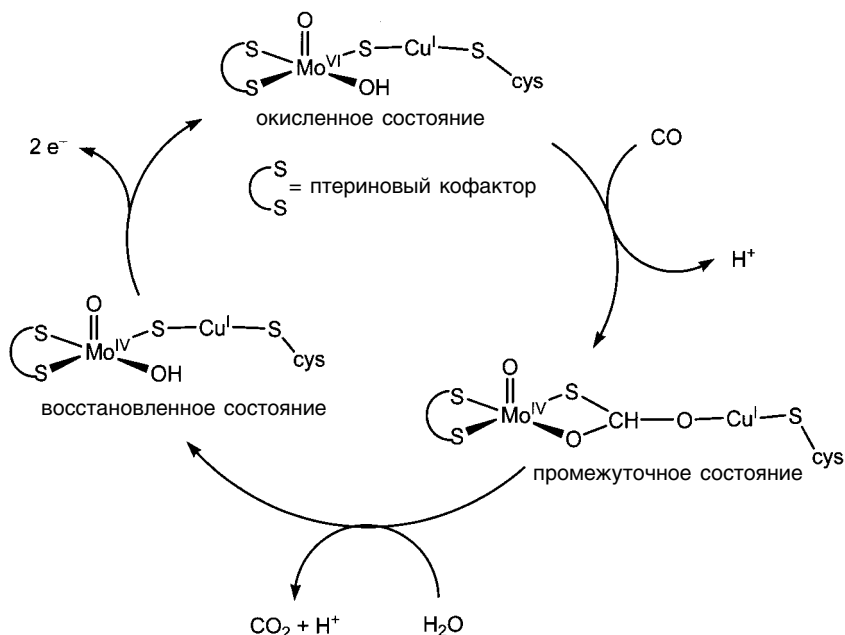
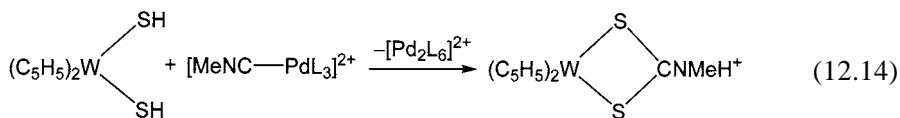


Рис. 12.18. Предполагаемый механизм действия Cu-Mo CODH (из [139])

В аддукте с *t*-BuNC углерод связан с сульфидо- и оксогруппами на молибдене, а азот присоединен к меди. Эта структура показывает, что восстановление молибдена происходит путем внедрения CO с образованием тиокарбонатного комплекса. Высвобождение CO₂ происходит следом за образованием связи Mo=S...Cu (рис. 12.18) [139].

12.6.3. Структурные и функциональные модели

Известно, что медь(I) связывает CO с образованием аддуктов, которые обычно имеют более высокие значения ν_{CO} , что предполагает возможность оценки чувствительности к атаке нуклеофила. Однако предполагается, что нуклеофильная атака по Cu–CO-связи в ферменте приводит к O-связанному тиокарбонату, что подразумевает разрыв первоначально образующейся Cu–CO-связи. Примером служит реакция комплексов Pd(II), содержащих MeCN, с частицами W–SH (уравнение (12.14)) [142].



Были описаны модели монодителиоеновых молибденовых частиц, присутствующих в ксантидиноксидазе и аэробной CODH, такие как $[\text{Mo}(\text{S}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2(\text{SR}))^-]$ [143]. Синтез аналогичных частиц с терминальными сульфидными лигандами мог бы сделать возможной агрегацию указанных ансамблей (дителиолен)MoO₂S–CuSR. Взаимодействие MoS₄²⁻ и Cu⁺ подробно изучалось, поскольку этот процесс связан со способностью Mo, поступающего с пищей, ингибировать потребление Cu у жвачных [144]. Образование ди-, три-, тетра- или полиядерных кластеров Cu–Mo следует из реакции MoS₄²⁻ и Cu⁺ в присутствии третичных фосфинов, аминов или цианида [144].

12.7. Метил-коэнзим М-редуктаза

12.7.1. Общие сведения

Метил-коэнзим М-редуктаза (MCR) – основной фермент в метогенезе [126], процессе, ответственном за обширные запасы природного газа (примерно 10¹⁷ л). Метаногенез остается до сих пор загадкой, по крайней мере, с молекулярной точки зрения, но биологические факты хорошо установлены. Протекая исключительно в археях, в процесс метаногенеза вовлечены семь уникальных кофакторов, что делает его одной из наиболее захватывающих и недооцененных областей в биохимии. Некоторые *archaeal genera* также содержат изозимы, которые отдельно кодируются. Предположительным является тот факт, что те же ферменты участвуют в потреблении метана, или обратном метаногенезе, когда организмы имеют доступ и к метану и субстратам, способным к восстановлению, таким как сульфат [145].

12.7.2. Структура активного центра

Инактивированные ферменты из *Methanobacter marburgensis* были охарактеризованы кристаллографически с разрешением 1,16 Å [146]. MCR при массе в 300 кДа имеет структуру $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ и несет два одинаковых никель-содержащих фермента F₄₃₀. Препараты фермента обычно также содержат и CoM (2-меркаптоэтилсульфоновая кислота), и CoB (7-тиогептаноилтреонинфосфат), расположенные рядом с кофактором F₄₃₀. Кофактор представляет собой комплекс никеля с замещенным корфиновым макроцилом (восстановленным порфириноидным макроцилом) (рис. 12.19). Никель связан с четырьмя пиррольным атомами азота. О-Связанный глицин соединен с никелем на той стороне макроцикла, которая недоступна для субстрата, и служит лишь для ковалентного связывания кофактора с протеином. Кристаллографический анализ показал, что занятость шестого положения зависит от способа приготовления образца. В качестве лигандов выступают тиол (или тиолят) HS-CoM с расстоянием Ni-S в 2,45 Å, сульфат в CoB-S-S-CoM или лиганд отсутствует. В структуре, содержащей HSCoM, два органических кофактора занимают смежные участки полости размером в 42 Å над шестым координационным положением атома никеля. Изучение методом EXAFS восстановленной активной формы комплекса фермент/HS-CoM показывает отсутствие связывания Ni...S [147]. Четыре аминокислоты, которые окружают полость активного центра, метилированы. В том же участке один остаток глицина вместо карбонильной группы содержит тиокарбонильную, которая могла бы участвовать в катализе [148].

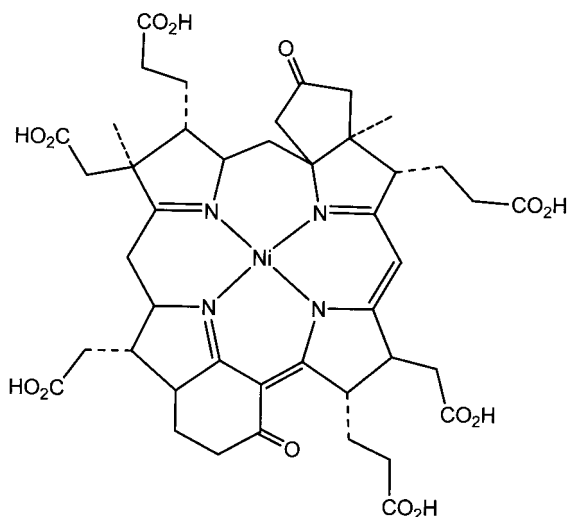
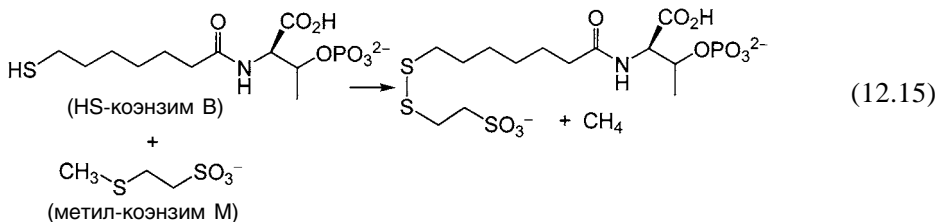


Рис. 12.19. Структура кофактора F₄₃₀ в MCR [126]

12.7.3. Предполагаемый механизм

MCR катализирует реакцию метил- CoM с HSCoB (уравнение (12.15))



HS-Коэнзим M – конкурентный ингибитор в реакции метил- CoM и HS-коэнзима B . Эксперименты с мечеными ^{33}S соединениями показывают, что когда оба HS-кофактора связаны, HS-коэнзим M связан с никелем [149]. Интересно то, что *оба* органических кофактора нужны для работы MCR. Их одновременная необходимость указывает на беспрецедентный механизм реакции, который, вероятно, сочетает образование гетеродисульфидного мостика с метилированием никеля. Субстратная специфичность субстрата очень высока, хотя фермент способен функционировать с *этил- CoM* . При использовании оптически активного $\text{CH}_3\text{CDT-CoM}$ (где D и T – дейтерий и тритий соответственно) было показано, что образование CH_3CHDT происходит с инверсией при атоме углерода, которая согласуется с атакой никельсодержащего нуклеофила (рис. 12.20).

Исследования ЭПР показали, что активный фермент содержит Ni(I) , что также подтверждается необходимостью присутствия восстановительных агентов для активации фермента [126]. Восстановительный потенциал (≈ -650 мВ) сравним с восстановительным потенциалом пары кобаламина (II/I). Метилированный кофактор F_{430} – производное $\text{CH}_3\text{-Ni(II)}$ – может быть получен действием CH_3I на восстановленный кофактор или алкилированием

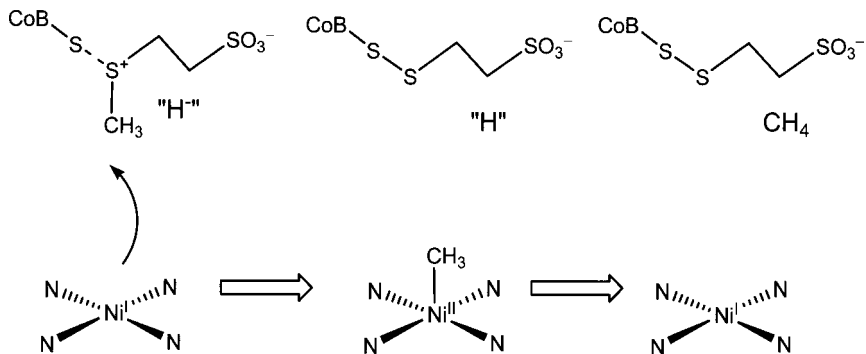


Рис. 12.20. Концептуальное описание реакции Me-CoM и HS-CoB с образованием метана, катализируемой MCR. Природа « H^- » и « H » неизвестна

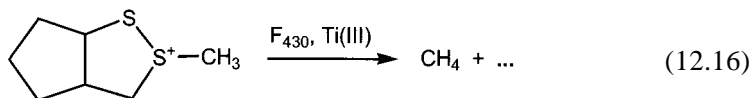
Ni(II)-формы с помощью $(\text{CH}_3)_2\text{Mg}$. Протонолиз производного $\text{CD}_3\text{-Ni(II)}$ дает CD_3H [151].

Однако были предложены механизмы, которые не включают образование связи метил-Ni; более того, первоначальное образование метана сопровождается образованием стабилизированных боковой цепью тиильных радикалов, которые затем рекомбинируют [152].

12.7.4. Структурные/функциональные модели

По своим химическим свойствам (восстановление-окисление и связывание аксиальных лигандов) изолированный кофактор F_{430} напоминает другие комплексы никеля (II) с тетрааминными макроциклами. Me-Ni- и RSNi- производные этих макроциклических комплексов представляют собой возможные модельные интермедиаты для изучения процесса расщепления связи C-S [134].

В модельных исследованиях руководствовались тремя главными допущениями: (1) важно наличие Ni(I), (2) оба органических кофактора нужны для катализа, (3) сульфонатная группа CoM не участвует в координации с металлом. Необходимость присутствия и CoM и CoB особенно интригует и указывает на новый механизм. Одна из гипотез, относящаяся к предполагаемой кооперативности кофакторов, состоит в том, что в процессе участвуют сульфониевые R_3S^+ катионы или радикалы. Кофактор F_{430} действительно катализирует восстановление Me_3S^+ , $(\text{CH}_2)_4\text{SMe}^+$ и метилированных циклических дисульфидов с образованием метана (уравнение (12.16)) [153, 154].



На восстановление соответствующих сульфониевых ионов, т.е. R_3S^+ до $\text{R}_2\text{S} + \text{RH}$, можно повлиять электрохимически и химически, используя $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SEt})_4]^{2-}$ [155].

Комплексы 3-метилтиозфирпропанэтиольных лигандов дают небольшой выход метана путем фотолиза с последующим образованием циклического дисульфида (рис. 12.21) [156].

Эффективность фотореакции увеличивается в присутствии дополнительного количества тиозфир-тиола. Даже если эти эксперименты основаны на фотореакциях (а биологические реакции – термические) для инициирования радикальных процессов, интересно наблюдать образование метана, которое сопровождается образованием дисульфида.

12.8. Заключение

Ясно, что ферменты, вступающие в экстремофильных и примитивных организмах для реализации метаболических процессов часто используют металллоорганическую химию. Область биометаллоорганической энзимологии

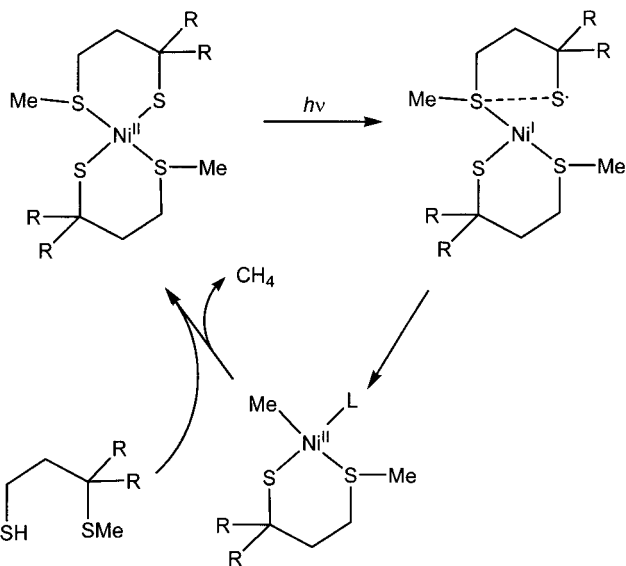


Рис. 12.21. Модельная система метаногенеза, иллюстрирующая предполагаемое взаимодействие между метилтиоэфиром и тиильным радикалом

открывает новые возможности для металлоорганической химии внести свой вклад в эту важную область. Методология металлоорганики необходима для синтеза и характеристики моделей активных центров с низкой молекулярной массой. В будущем будет интересно увидеть, в какой степени энзимология в свою очередь внесет вклад в развитие металлоорганического катализа для нужд промышленности и органического синтеза.

Примечание

Тацуми и др. недавно описали синтез сложной модели активного центра для NiFe-гидрогеназ путем присоединения сайта NiS_4 к центру $\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{CN})_2$: Z. Li, Y. Okhi, K. Tatsumi, J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 8950–8951. Пикетт и др. описали синтез сложной модели активного центра для H-кластера Fe–H₂-гидрогеназы путем присоединения кластера $[\text{4Fe–4S}]$ к центру $\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CO})_5$: C. Tard, X. Liu, S. R. Ibrahim, M Bruschi, L. De Goia, X. Yang, L.-S. Wang, G. Sawers, C.J. Pickett, Nature, **2005**, 433, 610–614.

Литература

1. R. Cammack, M. Frey, R. Robson, Hydrogen as a Fuel: Learning from Nature, Taylor & Francis, London, **2001**.
2. E. J. Lyon, S. Shima, G. Buurman, S. Chowdhuri, A. Batschauer, K. Steinbach, R. K. Thauer, Eur. J. Biochem. **2004**, 271, 195–204.

3. W. Beck, K. Severin, Chem. Unserer Zeit **2002**, 36, 356–365.
4. R. Banerjee, S. W. Ragsdale, Ann. Rev. Biochem. **2003**, 72, 209–247.
5. J. Hirsch, S. D. George, E. I. Solomon, B. Hedman, K. O. Hodgson, J. N. Burstyn, Inorg. Chem. **2001**, 40, 2439–2441.
6. A. B. Blecker, H. Kende, Ann. Rev. Cell Dev. Biol. **2000**, 16, 1–18.
7. S. Aono, Acc. Chem. Res. **2003**, 36, 825–831.
8. S. C. Lee, R. H. Holm, Chem. Rev. **2004**, 704, 1135–1157.
9. P. C. Dos Santos, D. R. Dean, Y. Hu, M. W. Ribbe, Chem. Rev. **2004**, 104, 1159–1173.
10. D. S. Horner, B. Heil, T. Happe, T. M. Embley, Trends Biochem. Sci. **2002**, 27, 148–153.
11. M. Frey, ChemBioChem **2002**, 3, 153–160.
12. J. W. Peters, Curr. Opin. Struct. Biol. **1999**, 9, 670–676.
13. M. W. W. Adams, Biochem. Biophys. Acta **1990**, 1020, 115–145.
14. Y. Nicolet, B. J. Lemon, J. C. Fontecilla-Camps, J. W. Peters, Trends Biochem. Sci. **2000**, 25, 138–143.
15. Y. Nicolet, A. L. de Lacey, X. Vernede, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, J. J. C. Fontecilla-Camps, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 1596–1601.
16. Z. Chen, B. J. Lemon, S. Huang, D. J. Swartz, J. W. Peters, K. A. Bagley, Biochemistry **2002**, 41, 2036–2043.
17. C. V. Popescu, E. Münck, J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 7877–7884.
18. G. Wang, M. J. Benceky, B. H. Huynh, J. F. Cline, M. W. Adams, L. E. Mortenson, B. M. Hoffman, E. Munck J. Biol. Chem. **1984**, 259, 14328–14331.
19. A. L. De Lacey, C. Stadler, C. Cavazza, E. G. Hatchikian, V. M. Fernandez, J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 11232–11233.
20. F. Gloaguen, J. D. Lawrence, M. Schmidt, S. R. Wilson, T. B. Rauchfuss, J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 12518–12527.
21. A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, C. Cavazza, E. C. Hatchikian, J. Biol. Inorg. Chem. **2003**, 8, 129–134.
22. J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt, Science **1998**, 282, 1853–1858.
23. B. J. Lemon, J. W. Peters, Biochemistry **1999**, 38, 12969–12973.
24. Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, Structure **1999**, 7, 13–23.
25. G. J. Kubas, Metal Dihydrogen and σ -Bond Complexes, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2001**.
26. D. J. Evans, C. J. Poclett, Chem. Soc. Rev. **2003**, 32, 268–275.
27. H. Reihlen, A. Gruhl, G. V. Hessling, Justus Liebigs Ann. Chem. **1929**, 472, 268–287.
28. W. Hieber, P. Spacu, Z. Anorg. Allgem. Chem. **1937**, 233, 852–864.
29. N. S. Nameikin, B. I. Kolobkov, V. D. Tyurin, A. N. Muratov, A. I. Nekhaev, M. Mavlonov, A. Y. Sideridu, G. G. Aleksandrov, A. V. Lebedev, J. Organomet. Chem. **1984**, 276, 393–7.
30. R. B. King, J. Am. Chem. Soc. **1962**, 84, 2460.
31. D. Seyferth, R. S. Henderson, L. C. Song, Organometallics **1982**, 1, 125–33.
32. M. Schmidt, S. M. Contakes, T. B. Rauchfuss, J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 9736–7.
33. E. J. Lyon, I. P. Georgakaki, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **1999**, 38, 3178–3180.
34. A. Le Cloirec, S. C. Davies, D. J. Evans, D. L. Hughes, C. J. Pickett, S. P. Best, S. Borg, Chem. Commun. **1999**, 2285–2286.

35. E. J. Lyon, I. P. Georgakaki, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3268–3278.
36. P. C. Ellgen, J. N. Gerlach, *Inorg. Chem.* **1973**, 12, 2526–2532.
37. H. Li, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 726–727.
38. S. J. George, Z. Gui, M. Razavet, C. J. Pickett, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4037–4046.
39. M. Razavet, S. C. Davies, D. L. Hughes, J. E. Barclay, D. J. Evans, S. A. Fairhurst, X. Liu, C. J. Pickett, *Dalton Trans.* **2003**, 586–595.
40. M. S. Arabi, R. Mathieu, R. Polblanc, *J. Organomet. Chem.* **1979**, 177, 199–209.
41. J. D. Lawrence H. Li, T. B. Rauchfuss, *Chem. Commun.* **2001**, 1482–1483.
42. J. D. Lawrence, H. Li, T. B. Rauchfuss, M. Bénard, M.-M. Rohmer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 1768–1771.
43. S. Ott, M. Kritikos, B. Akermark, L. Sun, R. Lomoth, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 1006–1009.
44. J. C. Lee Jr., E. Peris, A. L. Rheingold, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11014–11019.
45. C. J. Curtis, A. Miedaner, R. Ciancanelli, W. W. Ellis, B. C. Noll, M. Rakowski DuBois, D. L. DuBois, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 216–227.
46. F. Gloaguen, J. D. Lawrence, T. B. Rauchfuss, M. Bénard, M.-M. Rohmer, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 6573–6582.
47. X. Zhao, I. P. Georgakaki, M. L. Miller, J. C. Yarbrough, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9710–9711.
48. I. P. Georgakaki, M. L. Miller, M. Y. Darensbourg, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 2489–2494.
49. F. Gloaguen, J. D. Lawrence, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9476–9477.
50. D. Chong, I. P. Georgakaki, R. Mejia-Rodriguez, J. Sanabria-Chinchilla, M. P. Soriaga, M. Y. Darensbourg, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2003**, 4158–4163.
51. K. S. Hagen, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 418–427.
52. V. E. Kaasjager, R. K. Henderson, E. Bouwman, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1668–1670.
53. K. Fauvel, R. Mathieu, R. Poiblanç, *Inorg. Chem.* **1976**, 15, 976–978.
54. M. Razavet, S. J. Borg, S. J. George, S. P. Best, S. A. Fairhurst, C. J. Pickett, *Chem. Commun.* **2002**, 700–701.
55. J. D. Lawrence, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 6193–6195.
56. C. D. Boyke, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15151–15160.
57. J. W. Olson, R. J. Maier, *Science* **2002**, 298, 1788–1790.
58. A. K. Jones, E. Sillery, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2002**, 866–867.
59. A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12989–12996.
60. R. P. Happe, W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. J. Albracht, K. A. Bagley, *Nature* **1997**, 385, 126.
61. A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, *Dalton Trans.* **2003**, 4030–4038.
62. A. J. Pierik, W. Roseboom, R. P. Happe, K. A. Bagley, S. P. J. Albracht, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 3331–3337.
63. E. Garcin, X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Structure* **1999**, 7, 557–566.
64. Y. Huguichi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, T. Yagi, *Structure* **1999**, 1, 549–556.

65. Y. Montet, P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 523–526.
66. S. Reissmann, E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Böck, *Science* **2003**, 299, 1067–1070.
67. R. J. Angelici, *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 335–341.
68. A. Volbeda, Y. Montet, X. Vernede, E. C. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, *Int. J. Hydrogen Energy* **2002**, 27, 1449–1461.
69. M. Stein, W. Lubitz, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 862–877.
70. M. Carepo, D. L. Tierney, C. D. Brondino, T. C. Yang, A. Pamplona, A. J. Telser, I. Moura, J. J. G. Moura, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 281–286.
71. H. Ogata, Y. Mizoguchi, N. Mizumo, K. Miki, S.-I. Adachi, N. Yasuoka, T. Yagi, O. Yamauchi, S. Hirota, Y. Higuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11628–11635.
72. V. Autissier, W. Clegg, R. W. Harrington, R. A. Henderson, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 3098–3105.
73. M. Schlaf, A. J. Lough, R. H. Morris, *Organometallics* **1996**, 15, 4423–4436.
74. M. Brecht, M. van Gastel, T. Buhirke, B. Friedrich, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13075–13083.
75. D. Sellmann, F. Geipel, F. W. Heine-mann, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 958–966.
76. A. C. Moreland, T. B. Rauchfuss, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 3029–3036.
77. C.-H. Lai, W.-Z. Lee, M. L. Miller, J. H. Reibenspies, D. J. Darensbourg, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10103–10114.
78. T. B. Rauchfuss, S. M. Contakes, S. C. N. Hsu, M. A. Reynolds, S. R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6933–6934.
79. W.-F. Liaw, J.-H. Lee, H.-B. Gau, C.-H. Chen, S.-J. Jung, C.-H. Hung, W.-Y. Chen, C.-H. Hu, G.-H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1680–1688.
80. C.-H. Chen, Y.-S. Chang, C.-Y. Yang, T.-N. Chen, C.-M. Lee, W.-F. Liaw, *Dalton Trans.* **2004**, 137–143.
81. D. Swenson, N. C. Baenziger, D. Coucouvanis, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 1932–1934.
82. A. Muller, G. Henkel, *Z. Naturforsch., Teil B* **1995**, 50, 1464–1468.
83. D. Sellmann, F. Geipel, F. Lauderbach, F. W. Heinemann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 632–634.
84. S. D. Davies, D. J. Eevans, D. L. Hughes, S. Longhurst, J. R. Sanders, *Chem. Commun.* **1999**, 1935–1936.
85. S. M. Contakes, S. C. N. Hsu, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 1670–1678.
86. A. Kayal, T. B. Rauchfuss, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 5046–5048.
87. J. Jiang, S. A. Koch, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 158–160.
88. W.-F. Liaw, C.-Y. Chiang, G.-H. Lee, S.-M. Peng, C.-H. Lai, M. Y. Darensbourg, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 480–484.
89. C.-H. Lai, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2390–2393.
90. A. L. Eckermann, Ph.D. Dissertation, University of Illinois at Urbana – Champaign **2003**.
91. M. C. Smith, S. Longhurst, J. E. Barclay, S. P. Cramer, S. P. Davies, D. L. Hughes, W. W. Gu, D. J. Evans, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 1387–1388.
92. M. A. Reynolds, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Organometallics* **2003**, 22, 1619–1625.
93. D. Sellmann, P. Prakash, F. W. Heinemann, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 1847–1858.

94. H. L. Drake, *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York, **1994**.
95. B. E. H. Maden, *Biochem. J.* **2000**, 350, 609–629.
96. V. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Römer, R. Huber, O. Meyer, *O. Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **2004**, 101, 446–451.
97. S. Gencic, D. A. Grahame, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 6101–6110.
98. W. Gu, S. Genic, S. P. Cramer, D. A. Grahame, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15343–15351.
99. W. Huang, J. Jia, J. Cummings, M. Nelson, G. Schneider, Y. Lindqvist, *Structure* **1997**, 5, 691–699.
100. T. I. Doukov, T. M. Iverson, J. Seravalli, S. W. Ragsdale, C. L. Drennan, *Science* **2002**, 298, 567–572.
101. C. Darnault, A. Volbeda, E. J. Kim, P. Legrand, X. Vernede, P. A. Lindahl, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 271–279.
102. M. R. Bramlett, X. Tan, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9316–9317.
103. S. W. Ragsdale, H. G. Wood, W. E. Antholine, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **1985**, 82, 6811–6814.
104. J. L. Craft, B. S. Mandimutsira, K. Fujita, C. G. Riordan, T. C. Brunold, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 859–867.
105. J. Xia, Z. Hu, C. V. Popescu, P. A. Lindahl, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8301–8312.
106. J. Seravalli, M. Kumar, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* **2002**, 41, 1807–1819.
107. X. S. Tan, C. Sewell, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6277–6284.
108. C. E. Webster, M. Y. Darensbourg, P. A. Lindahl, M. B. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3410–3411.
109. D. P. Barondeau, P. A. Lindahl, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3959–3970.
110. R. C. Linck, C. W. Spahn, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8700–8701.
111. R. Krichnan, J. K. Voo, C. G. Riordan, L. Zahkarov, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4422–4423.
112. Q. Wang, A. J. Blake, E. S. Davies, E. J. L. McInnes, C. Wilson, M. Schroeder, *Chem. Commun.* **2003**, 3012–3013.
113. R. Krishnan C. G. Riordan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4484–4485.
114. W. Shin, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **1992**, 31, 12870–12875.
115. M. L. Golden, M. V. Rampersad, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *Chem. Comm.* **2003**, 1824–1825.
116. M. S. Ram, C. G. Riordan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2365–2366.
117. C. G. Riordan, M. S. Ram, G. P. A. Yap, L. Liable-Sands, A. L. Rheingold, A. Marchaj, J. R. Norton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1648–1655.
118. S. Antebi, H. Alper, *Organometallics* **1986**, 5, 596–598.
119. M. Furuya, S. Tsutsuminai, H. Nagasawa, N. Komine, M. Hirano, S. Komiya, *Chem. Commun.* **2003**, 2046–2047.
120. D. Sellmann, D. Haeussinger, F. Knoch, M. Moll, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5368–5374.
121. G. C. Tucci, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6489–6496.
122. P. Stavropoulos, M. C. Muettterties, M. Carrie, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8485–8492.
123. K. Tanaka, Y. Kawata, T. Tanaka, *Chem. Lett.* **1974**, 831–832.

124. S. W. Ragsdale, M. Kumar, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2515–2539.
125. P. A. Lindahl, *Biochemistry* **2002**, 41, 2097–2105.
126. R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, 144, 2377–2406.
127. W. Shin, S. H. Lee, J. W. Shin, S. P. Lee, Y. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14688–14689.
128. H. Dobbek, V. Svetlitchnyi, J. Liss, O. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5382–5387.
129. C. L. Drennan, J. W. Peters, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2003**, 13, 220–226.
130. C. L. Drennan, J. Heo, M. D. Sintchak, E. Schreiter, P. W. Ludden, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 11973–11978.
131. H. Dobbek, V. Svetlitchnyi, L. Gremer, R. Huber, O. Meyer, *Science* **2001**, 293, 1281–1285.
132. J. Feng, P. A. Lindahl, *Biochemistry* **2004**, 43, 1552–1559.
133. H. Arakawa, M. Aresta, J. N. Armor, M. A. Barteau, E. J. Beckman, A. T. Bell, J. E. Bercaw, C. Creutz, E. Dinjus, D. A. Dixon, K. Domen, D. L. DuBois, J. Eckert, E. Fujita, D. H. Gibson, W. A. Goddard, D. W. Goodman, J. Keller, G. J. Kubas, H. H. Kung, J. E. Lyons, L. E. Manzer, T. J. Marks, K. Morokuma, K. M. Nicholas, R. A. Periana, L. Que, J. Rostruf-Nielson, W. M. H. Sachtler, L. D. Schmidt, A. Sen, G. A. Somorjai, P. C. Stair, B. R. Stults, W. Tumas, *W. Chem. Rev.* **2001**, 101, 953–996.
134. C. G. Riordan, in T. J. Meyer, J. A. McCleverty (Eds.), *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Pergamon Press, London, **2004**, Vol. 8.
135. Z. Lu, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3994–3998.
136. J. Zhou, J. W. Raebiger, C. A. Crawford, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6242–6250.
137. S. Ciurli, P. K. Ross, M. J. Scott, S. B. Yu, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5415–5423.
138. R. Panda, Y. Zhang, C. R. McLauchlan, P. V. Rao, F. A. T. de Oliveira, E. Münck, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6448–6459.
139. H. Dobbek, L. Gremer, R. Kieffer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2002**, 99, 15971–15976.
140. M. Gnida, R. Ferner, L. Gremer, O. Meyer, W. Meyer-Klaucke, *Biochemistiy* **2003**, 42, 222–230.
141. G. N. George, I. J. Pickering, E. Y. Yu, R. C. Prince, S. A. Bursakov, O. Y. Gavel, I. Moura, J. J. G. Moura, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8321–8322.
142. C. J. Ruffing, T. B. Rauchfuss, *Organometallics* **1985**, 4, 524–528.
143. B. S. Lim, M. W. Willer, M. Miao, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8343–8349.
144. S. Sarkar, S. B. S. Mishra, *Coord. Chem. Rev.* **1984**, 59, 239–264.
145. M. Krüger, A. Meyerdieks, F. O. Glöckner, R. Amann, F. Widdel, M. Kube, R. Reinhardt, J. Kahnt, R. Böcher, R. K. Thauer, S. Shima, *Nature* **2003**, 426, 878–881.
146. W. Grabarse, F. Mählert, E. C. Duin, M. Goubeaud, S. Shima, R. K. Thauer, V. Lamzin, U. Ermler, *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 315–330.
147. E. C. Duin, N. J. Cosper, F. Mählert, R. K. Thauer, R. A. Scott, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, 141–148.
148. U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer, *Cur. Op. Struct. Biol.* **1998**, 8, 749–758.
149. C. Finazzo, J. Harmer, C. Bauer, B. Jaun, E. C. Duin, F. Mählert, M. Goenrich, R. K. Thauer, S. Van Doorslaer, A. Schweiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4988–4989.
150. Y. Ahn, J. A. Krzycki, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4700–4701.

- 151. S. K. Lin, B. Jaun, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1725–1738.
- 152. V. Pelmeshnikov, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4039–4049.
- 153. B. Jaun, A. Pfaltz, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 293–294.
- 154. A. Berkessel, *Bioinorg. Chem.* **1997**, 431–445.
- 155. C. J. A. Daley, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 2785–2793.
- 156. L. Signor, C. Knuppe, R. Hug, B. Schweizer, A. Pfaltz, B. Jaun, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3508–3516.

Оглавление

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	7
1. Новая область исследований: биометаллоорганическая химия. Истоки и основные принципы	9
1.1. Введение	9
1.2. Металлоорганические соединения и терапия	11
1.2.1. Отец-основатель	11
1.2.2. Первое эффективное металлоорганическое лекарство	13
1.2.3. Соединения мышьяка после Эрлиха	15
1.2.4. Ртутьорганические соединения	15
1.2.5. Современная оценка эффективности, токсичности и селективности	16
1.3. Токсикология и окружающая среда	20
1.4. Биоаналитические методы, основанные на особых свойствах металлоорганических комплексов	22
1.5. Природные металлоорганические соединения и синтетические модели	29
1.6. Металлоорганическая химия и водные растворители	38
1.7. Заключение	44
Благодарности	45
Литература	45
2. Ареновые комплексы рутения с противораковой активностью	53
2.1. Введение	53
2.2. Противораковые комплексы на основе металлов	54
2.3. Химия ареновых комплексов рутения	57
2.3.1. Синтез	57
2.3.2. Структура	60
2.3.3. Хиральность	60

2.4. Биологическая активность	62
2.4.1. Антибактериальная активность	62
2.4.2. Противоопухолевая активность	63
2.4.3. Распределение в организме и метаболизм	65
2.5. Механизм действия.	66
2.5.1. Связывание с ДНК и входящими в их состав основаниями	66
2.5.2. Аминокислоты и белки	74
2.5.3. Гидратация	76
2.6. Заключение	78
Благодарности	78
Литература	79
3. Металлоорганические соединения для специфических биологических мишеней: развитие новых терапевтических подходов	83
3.1. Введение	83
3.2. Обзор предыдущих достижений	85
3.3. Комплексы металлов – селективные модуляторы эстрогенных рецепторов (SERM)	86
3.3.1. Неорганические комплексы платины	88
3.3.2. Производные карборанов с эстрогенными свойствами	89
3.3.3. Производное тамоксифена, содержащее фрагмент титаноцендихлорида	91
3.3.4. Производные тамоксифена, содержащие фрагмент циклопентадиенил(трикарбонил)рения.	93
3.3.5. Ферроценильные производные тамоксифена (ферроцифены)	96
3.3.6. Рутеноценильные производные тамоксифена	99
3.3.7. SERM: выводы	100
3.4. Алкиновые комплексы карбонила кобальта	100
3.5. Феррохин – новое оружие в борьбе с малярией. Архетипический биометаллоорганический подход	103
3.5.1. Проблема малярии	103
3.5.2. Феррохин: биометаллоорганический подход	104
3.5.3. Феррохин: выводы	106
3.6. Другие примеры металлоорганических комплексов, испытанных на биологическую активность	107
3.7. Заключение	108
Благодарности	111
Литература	111

4. Радиофармацевтические препараты	118
4.1. Что такое радиофармацевтические препараты?	118
4.1.1. Поиск и разработка радиофармацевтических препаратов	120
4.1.2. Металлоорганические комплексы в радиофармацевтической практике	123
4.2. Металлоорганические аква-ионы	126
4.3. Прототип $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: синтез и свойства	129
4.3.1. Координационная химия комплекса $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	132
4.3.2. Металлоорганическая химия $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ в водной среде	139
4.4. Комбинации комплекса $[^{99}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ с векторами	144
4.5. Перспективы	146
Благодарности	147
Литература	147
5. Конъюгаты пептидов и пептидных нуклеиновых кислот с металлоорганическими комплексами: синтез и применение	151
5.1. Введение	151
5.2. Конъюгаты металлоорганических соединений с короткими пептидами	153
5.2.1. Металлоорганические соединения как темплаты для введения вторичных структурных элементов в пептиды	154
5.2.1.1. Производные 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты	154
5.2.1.2. Другие производные	161
5.2.2. Пептиды в качестве лигандов для металлоорганических соединений	163
5.3. Конъюгаты металлоорганических соединений с природными пептидами	167
5.3.1. Металлоорганические производные энкефалинов	167
5.3.2. Металлоорганические производные пептидных гормонов	170
5.3.2.1. Вещество Р и нейрокин А	170
5.3.2.2. Ангиотензин	173
5.3.2.3. Брадикинин	174
5.3.2.4. Гонадотропин-рилизинг фактор	175
5.3.2.5. Секретин	175
5.3.3. Металлоорганические производные других пептидов	177
5.3.3.1. Сигналы ядерной локализации	177
5.3.3.2. Глутатион	177
5.3.3.3. Ингибиторы папаина	178
5.3.3.4. Аламетин	179
5.3.3.5. Другие производные	180
5.3.4. Ферментативное разложение металлоорганических производных пептидов	182
5.4. Конъюгаты металлоорганических соединений с ПНК	182
5.4.1. Конъюгаты мономеров ПНК	182
5.4.2. Конъюгаты олигомеров ПНК	188

5.5. Применение	189
5.5.1. Металлоорганические защитные группы для пептидного синтеза	189
5.5.1.1. Ферроценсодержащие защитные группы	189
5.5.1.2. Защитные группы на основе аминокарбенов	190
5.5.2. Пептидный синтез	192
5.5.2.1. Темплатный синтез пептидов с использованием металлоорганических соединений	193
5.5.2.2. Четырехкомпонентная реакция Уги	194
5.5.2.3. Сочетание ариловых эфиров в синтезе циклических пептидов с участием медиатора на основе рутения	195
5.5.3. Метки для пептидов	197
5.5.3.1. ВЭЖХ с электрохимическим детектированием	197
5.5.3.2. Радиоактивные метки	200
5.5.4. Химия комплексов «гость – хозяин» и биосенсоры	202
Благодарности	204
Сокращения	204
Литература	205
6. Введение меток в белки с помощью металлоорганических комплексов: стратегия и применение	213
6.1. Введение	213
6.2. Окислительно-восстановительные индикаторы	214
6.2.1. Амперометрические биосенсоры	214
6.2.1.1. Диффузионные медиаторы	215
6.2.1.2. Электронные реле	217
6.2.1.3. Проводники электричества	221
6.2.2. ВЭЖХ и иммуноанализ	222
6.2.3. Структурные исследования ферментов	224
6.2.4. Другое применение	225
6.3. Люминесцентные зонды	226
6.3.1. Долгоживущие зонды	226
6.3.2. Исследование электронного туннелирования	228
6.4. Тяжелые металлы как зонды	229
6.4.1. Структурный анализ белков методом РСА	229
6.4.2. Криоэлектронная микроскопия	235
6.4.3. Фармакологические исследования	235
6.5. Зонды на основе карбониллов металлов для инфракрасной спектроскопии	236
6.6. Выводы и перспективы	243
Благодарности	243

Сокращения	243
Литература	244
7. Металлоорганические биозонды	249
7.1. Введение	249
7.2. Определение терминов «биозонды» и «молекулярные биозонды»	249
7.3. Стратегии отклика для считывания информации	251
7.4. Металлоорганические компоненты металлоорганических биозондов: новые преимущества методов считывания, основанных на ИК-спектроскопии	255
7.5. Селективность откликов в методах считывания, основанных на ИК-спектроскопии	262
7.5.1. Эффекты растворителя	262
7.5.2. Отклики на pH	266
7.5.3. Отклики на концентрацию ионов щелочных металлов	269
7.5.4. Отклики на π -стэкинг-взаимодействия между фрагментами органических молекул	271
7.6. Примеры структур биозондов на основе карбонильных комплексов металлов	273
7.7. Использование металлоорганических биозондов, связанных с белками	278
7.8. Возможности генетики в дизайне экспериментов с биозондами	285
7.8.1. Возможности отдаленного и локального откликов	285
7.8.2. Функциональные и дисфункциональные зонды	287
7.8.3. Функциональные и дисфункциональные рецепторы	288
7.8.4. Функциональные и дисфункциональные зонды и рецепторы для исследования индукции экспрессии узелкового гена	288
7.9. Заключение	292
Благодарности	293
Литература	294
8. Металлоорганические комплексы в качестве трейсеров для неизотопного иммуноанализа	302
8.1. Введение	302
8.2. Принцип иммуноанализа	303
8.3. Получение специфических антител	305
8.4. Синтез металлоорганических трейсеров	306
8.4.1. Получение трейсеров, меченных ферроценом	310
8.4.1.1. Получение трейсеров для лидокаина	310
8.4.1.2. Получение трейсера для теофиллина	311
8.4.1.3. Получение трейсера для триидтиронина	311
8.4.1.4. Введение метки в антитела (IgG)	311

8.4.2.	Получение трейсера для дифенилгидантоина, меченного цикlopentadiенил(дикарбонил)железом (Fr)	312
8.4.3.	Синтез трейсеров, меченных цимантреном (циклопентадиенил(трикарбонил)марганцем)	312
8.4.3.1.	Получение трейсеров для нортриптилина и фенobarбитала . . .	312
8.4.3.2.	Получение трейсера для хлортолурона	313
8.4.3.3.	Получение трейсера для биотина	314
8.4.4.	Синтез дифенилгидантоина, связанного с остатком бенхротрена (бензол(трикарбонил)хрома)	314
8.4.5.	Синтез трейсеров, содержащих фрагмент алкин(гексакарбонил)дикоальта	315
8.4.5.1.	Получение трейсеров для гидрокортизона и атразина	315
8.4.5.2.	Получение трейсера для карбамазепина	317
8.4.6.	Синтез катионных трейсеров	318
8.4.6.1.	Трейсеры, меченные остатком кобальтоцена	318
8.4.6.2.	Катионные трейсеры, содержащие ферроценовый фрагмент . . .	319
8.4.7.	Синтез трейсеров, содержащих фрагмент трикарбонилрения	320
8.5.	Примеры моно- и мультиметаллоиммуноанализа (MIA)	321
8.5.1.	Металлоиммуноанализ с использованием атомно-абсорбционной спектроскопии	321
8.5.2.	Детектирование с помощью инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием (металлокарбонильный иммуноанализ, CMIA) . . .	324
8.5.2.1.	Моноиммуноанализ CMIA	326
8.5.2.2.	Мультииммуноанализ CMIA	327
8.5.2.3.	Новые усовершенствования метода CMIA	328
8.5.3.	Электрохимическое детектирование	329
8.5.3.1.	Гомогенный амперометрический иммуноанализ с ферроценом в качестве медиатора	329
8.5.3.2.	Гомогенный электрохимический иммуноанализ (квадратно-волновая вольтамперометрия)	330
8.5.3.3.	Система для проточного электрохимического иммуноанализа	332
8.5.4.	Поляризационный флуоресцентный анализ	334
8.6.	Применение металлоорганических комплексов в качестве субстратов и косубстратов для ферментного иммуноанализа	335
8.6.1.	Металлоорганические комплексы, используемые в качестве субстратов для ферментов	336
8.6.2.	Металлоорганические комплексы используемые в качестве косубстратов для ферментов (редокс-медиаторы)	337
8.6.2.1.	Проточно-инжекционный иммуноанализ с электрохимическим детектированием	337
8.6.2.2.	Двойной ферментный иммуноанализ с амперометрическим детектированием	338
8.6.2.3.	Двойной ферментный иммуноанализ с использованием электрохимической микроскопии для детектирования	338
8.7.	Заключение	339

Благодарности	340
Список сокращений	341
Литература	342
9. Геносенсоры на основе комплексов металлов	345
9.1. Введение.	345
9.2. Комплексы металлов в качестве зондов для ДНК	345
9.2.1. Катионные комплексы металлов	345
9.2.2. Комплексы металлов, конъюгированные с фрагментом ДНК или ДНК-связывающим лигандом	347
9.3. Электрохимический анализ взаимодействия комплексов металлов с двухцепочечной ДНК	349
9.4. Определение ДНК с использованием ДНК-связывающих лигандов, конъюгированных с катионными комплексами металлов	351
9.5. Детектирование генов с помощью олигонуклеотидов, меченных ферроценами, в качестве комплексов металлов, конъюгированных с фрагментами ДНК	355
9.6. Заключение.	361
Литература	361
10. Процессы супрамолекулярного распознавания «хозяина» природными соединениями, металлоорганическими лекарственными препаратами и щелочными металлами в качестве «гостя»	364
10.1. Введение.	364
10.2. «Хозяин»-1	365
10.2.1. Синтез, структура и устойчивость в водной среде	365
10.2.2. Молекулярное распознавание ароматических и алифатических аминокислот	367
10.2.3. Молекулярное распознавание замещенных ароматических карбоновых кислот	372
10.2.4. Молекулярное распознавание ароматических и алифатических карбоновых кислот	373
10.2.5. Обсуждение процесса молекулярного распознавания с участием «хозяина»-1	376
10.2.6. Заключение, касающиеся «хозяина»-1: нековалентные взаимодействия с различными «гостями»	377
10.3. Новый «хозяин»-2 <i>транс</i> -[Cr*Rh-(η ¹ -(N3)-1-метилцитозин)-(μ-OH)] ₂ (OTf) ₂	378
10.3.1. Молекулярное распознавание ароматическими аминокислотами: водородная связь как решающий параметр распознавания	378
10.3.2. Заключение, касающиеся молекулярного распознавания «хозяином»-2	382

10.4. Эксперименты по компьютерному докингу металлоорганических лекарственных препаратов в связывающем сайте рецепторов эстрогенов: селективные нековалентные взаимодействия с белковыми гормонами	382
10.5. Металлоорганические ионофоры	385
10.5.1. Структура и селективность по отношению к ионам щелочных металлов	385
10.5.2. Специфические рецепторы для фторид-ионов	390
10.5.3. Заключение, касающиеся металлоорганических ионофоров	392
10.6. Общие выводы, касающиеся молекулярного распознавания	393
Благодарности	393
Литература	394
11. Структура и механизм действия активных сайтов металлоферментов	396
11.1. Введение	396
11.2. Медь	397
11.2.1. Кверцетин-2,3-диоксигеназа	398
11.2.2. Аминооксидазы	398
11.2.3. CuZn-Зависимые супероксиддисмутазы	399
11.2.4. Мультимедные оксидазы	400
11.2.4.1. Лакказы	401
11.2.4.2. N ₂ O-Редуктазы (NOR)	402
11.2.4.3. Гомеостаз меди	403
11.3. Железо	403
11.3.1. Цитохром с-оксидаза	404
11.3.2. Оксигеназы	405
11.3.3. Рибонуклеотидредуктаза	407
11.3.4. S-Аденозилметионин. (SAM)-зависимые радикальные ферменты	409
11.4. Марганец	410
11.4.1. Супероксиддисмутазы	411
11.4.2. Фосфопротеинфосфатазы	412
11.4.3. Оксалакдекарбоксилазы (пируваткарбоксилазы)	412
11.4.4. Аргиназы	414
11.4.5. Фотосинтетический кислород-генерирующий центр (ОЕС) фотосистемы II (PSII)	415
11.5. Молибден и вольфрам	416
11.5.1. Семейство ДМСО-редуктаз	417
11.5.2. Семейство ксантиноксидоредуктаз (XOR)	419
11.5.3. Семейство сульфитоксидаз	420
11.5.4. Семейство альдегидферредоксиноксидоредуктаз	421
11.5.5. СО-Дегидрогеназа (CODH _{Mo})	422

11.6. Никель	423
11.6.1. СО-Дегидрогеназа	424
11.6.2. Ацетил-коэнзим А-синтаза	425
11.6.3. NiFe-Гидрогеназы	429
11.7. Цинк	431
11.7.1. Карбоангидразы (CA)	432
11.7.2. Алкогольдегидрогеназы (ADH)	433
11.7.3. Металло-β-лактамазы	435
11.7.4. Щелочные фосфатазы	436
11.7.5. Металлопептидазы	436
11.7.6. Другие Zn-зависимые ферменты	438
11.7.6.1. D-Аминоацилаза	438
11.7.6.2. GPT-Циклогидролаза I	438
11.7.6.3. Ферменты, содержащие связи Zn-S	438
11.8. Заключение	439
Литература	440
12. Синтетические модели биометаллоорганических реакционных центров	449
12.1. Введение	449
12.2. Гидрогеназа, содержащая только железо	450
12.2.1. Общие сведения	450
12.2.2. Структура активного центра	450
12.2.3. Предполагаемый механизм	452
12.2.4. Основы химии комплексов $\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{CO})_6$, включая цианопроизводные	452
12.2.5. Моделирование азадитиолятного кофактора	454
12.2.6. Реакции модельных комплексов с H_2	455
12.2.7. Катализаторы получения H_2	455
12.2.8. Моделирование биядерных дитиолятных комплексов железа	457
12.3. NiFe-Гидрогеназы	458
12.3.1. Общие сведения	458
12.3.2. Структура активного центра	458
12.3.3. Предполагаемый механизм	459
12.3.4. Модели сайта, содержащего железо	461
12.3.5. Структурные модели биметаллического сайта	461
12.3.6. Функциональные модели	463
12.4. Ацетил-СоА-синтаза	464
12.4.1. Общие сведения	464
12.4.2. Структура активного центра	465

12.4.3. Предполагаемый механизм	466
12.4.4. Спектроскопические модели внутреннего Ni-сайта	466
12.4.5. Структурные модели сайта с двумя атомами никеля	467
12.4.6. Функциональные модели	468
12.4.6.1. Трансметаллирование метильной группы	468
12.4.6.2. Стадии образования тиоэфиров	469
12.5. Анаэробная СО-дегидрогеназа	469
12.5.1. Общие сведения	469
12.5.2. Структура активного центра	470
12.5.3. Предполагаемый механизм	470
12.5.4. Функциональные исследования	
12.5.5. Структурные модели	472
12.6. Аэробная СО-дегидрогеназа	472
12.6.1. Общие сведения	472
12.6.2. Структура активного центра и предполагаемые механизмы	473
12.6.3. Структурные и функциональные модели	474
12.7. Метил-коэнзим М-редуктаза	474
12.7.1. Общие сведения	474
12.7.2. Структура активного центра	475
12.7.3. Предполагаемый механизм	476
12.7.4. Структурные/функциональные модели	477
12.8. Заключение	477
Примечание	478
Литература	478



Два отца-основателя.

Вверху –Metalлоорганическая химия, французский ученый Л.-К. Каде де Гассикор (1713–1799; репродукция печатается с разрешения Ж. Флахо).

Внизу –Metalлоорганические лекарства, немецкий ученый П. Эрлих (1854–1915; с немецкой почтовой марки)

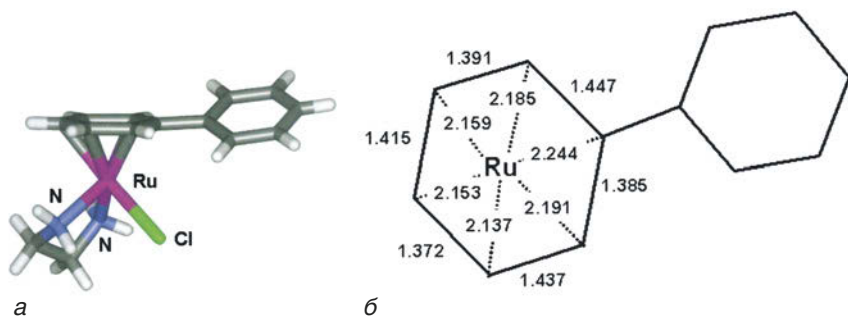


Рис. 2.7. а – Строение комплекса $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{-C}_6\text{H}_5)\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ с противораковой активностью, установленное рентгеноструктурным анализом [61]. Комплекс имеет характерную геометрию типа «фортепианной табуретки» с альтернированием длин связей C–C в координированном фенильном кольце и различающимися расстояниями Ru–C, как это показано на диаграмме (б)

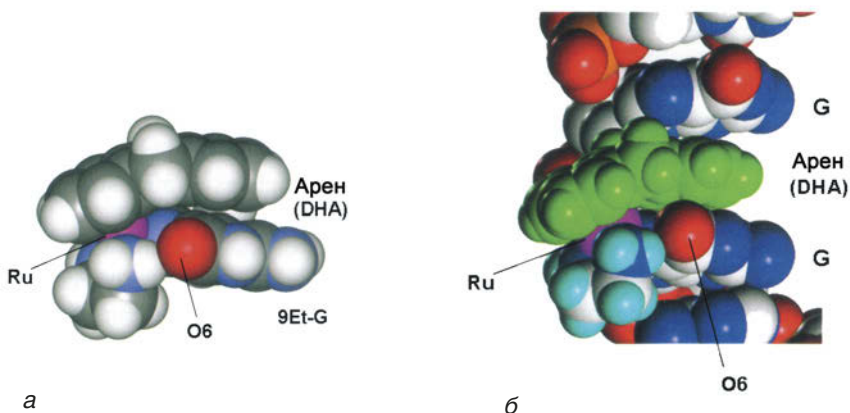


Рис. 2.15. а – π - π -Стэкинг между ареном и пурином в комплексе $[(\eta^6\text{-DHA})\text{Ru}(\text{en})(9\text{-EtG-N7})]^{2+}$ [86]. 9-Этилгуанин координирован с атомом Ru(II) атомами N7 и O6 и связан прочной водородной связью с фрагментом ep-NH. б – Модель тая В-ДНК, показывающая возможность взаимодействия координированного арена с парой Г-оснований (модель построена Дж. Э. Паркинсоном [86])

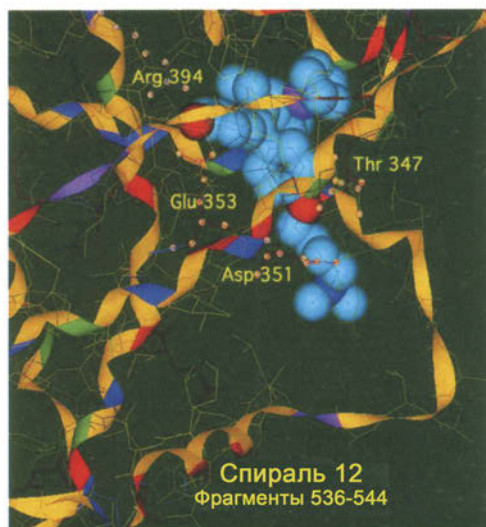
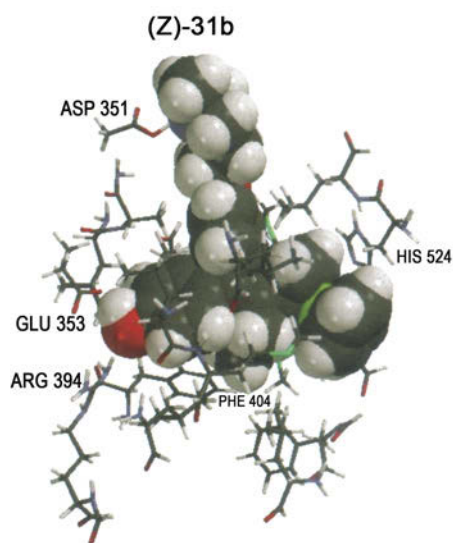


Рис. 3.5. Расположение молекул соединений (Z)-31b (слева) и (Z)-31c (справа) в связывающем сайте антагонистической формы лиганд-связывающего домена рецептора ER α . Расчет сайта основан на результатах рентгеноструктурного исследования Шиу и др. [90]. Исследования по моделированию выполнены с помощью программ Mac Spartan Pro Software [91] в случае (Z)-31b и Molview software [92] в случае (Z)-31c (данные заимствованы из работ [84, 85])

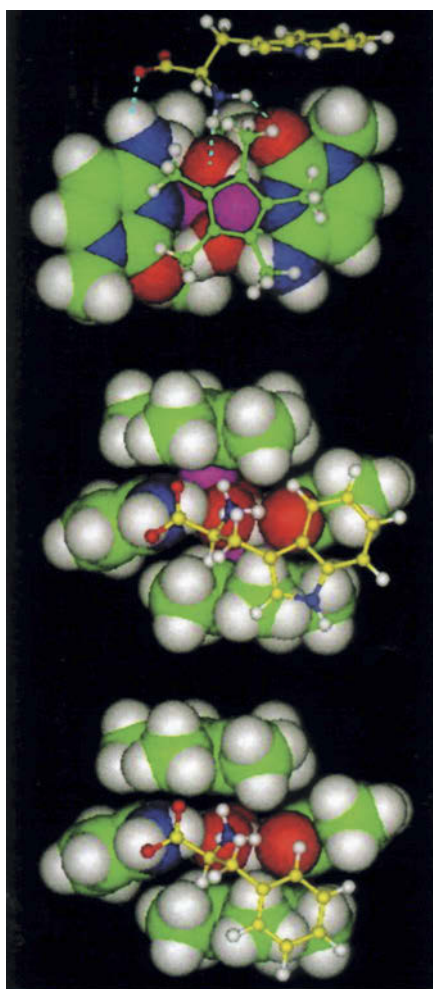


Рис. 10.11. Вверху – 2-*L*-Trp, вид сверху. Н-связывание NH_3^+ -группы с одним из $\mu\text{-OH}$ и с группой C=O одного из 1-метилцитозиновых лигандов, тогда как группа COO^- связывается водородными связями с NH_2 -группой другого 1-метилцитозинового лиганда. В центре – 2-*L*-Trp. Внизу – 2-*L*-Phe. N (синий); O (красный); H (белый); Rh (пурпурный)

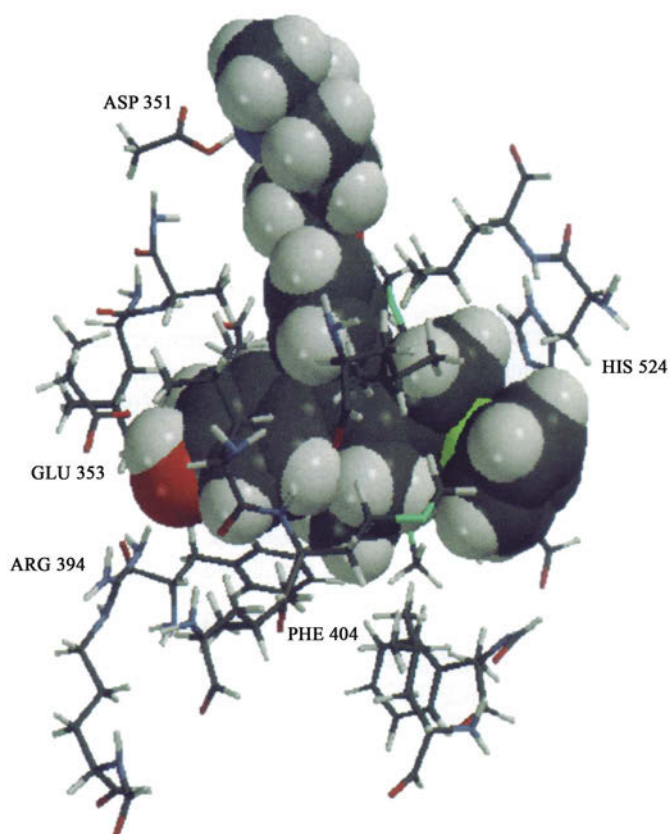


Рис. 10.12. Докинг производного ферроцифена (Z-изомер) **3** в сайте эстрогенового белкового рецептора. Показан металлоорганический комплекс внутри антагонист-связывающего сайта эстрогенного рецептора

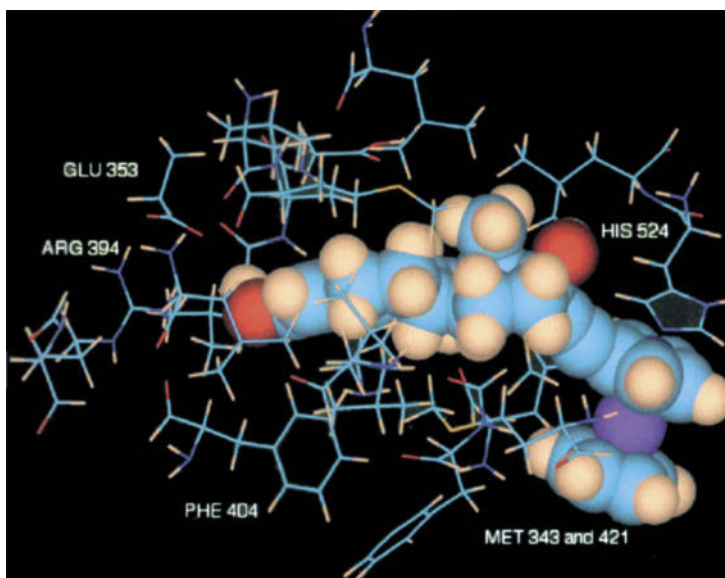


Рис. 10.13. Докинг 17α -рутеноценилэтинилэстрадиола **5** в сайт эстрогенового рецептора. Этинилрутеноценильная группа также граничит своей нижней частью с двумя гидрофобными аминокислотными остатками Met 343 и Met 421. Вблизи 17α -положения гормона можно легко увидеть сжатие, которое хорошо приспособлено для встраивания жесткой этинильной группы. Это позволяет рутеноценильной группе избежать стерических затруднений внутри полости

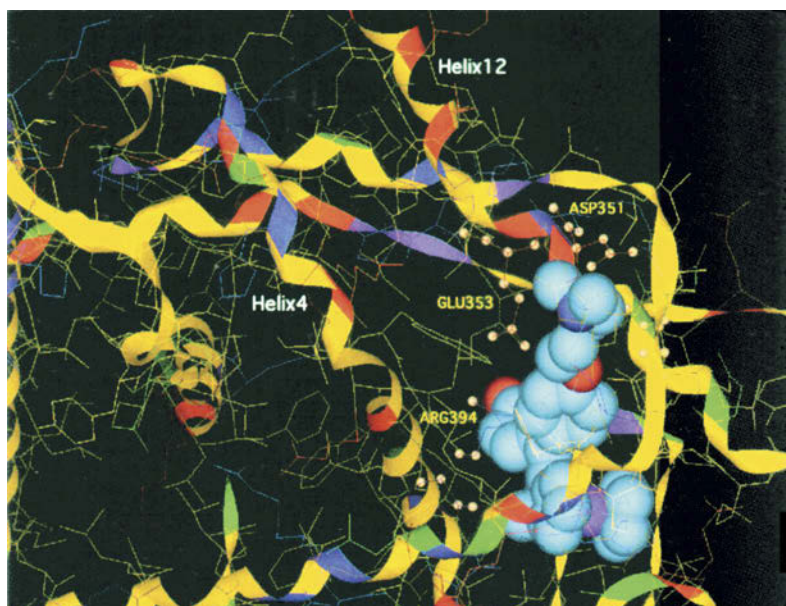


Рис 10.14. Лиганд-связывающий домен в сайте эстрогенного рецептора для потенциального металлоорганического лекарства **3**

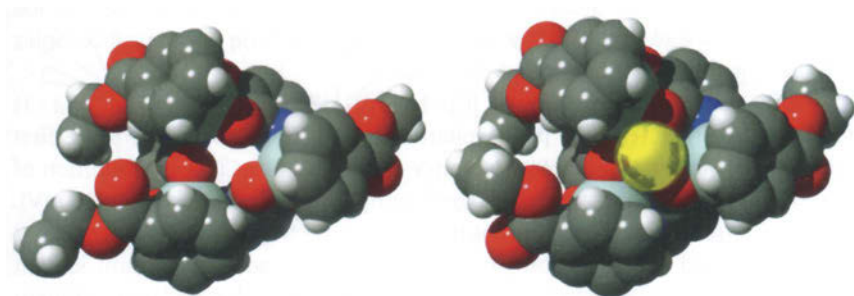


Рис. 10.19. Слева – металлоорганический ионофор $[(C_6H_5CO_2Et)Ru(L1)]_3$. Справа – комплекс лития

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"

Научное электронное издание

Серия: «Медицинская химия»

БИОМЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Редактор Ж. Жауэн

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редактор *Е. И. Тулина*

Художники *С. Инфантэ, Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *К. А. Мордвинцев*

Подписано к использованию 10.02.20.

Формат 145×225 мм

Издательство «Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>

Биометаллоорганическая химия изучает механизмы реакций с участием соединений металлов, молекулы которых содержат связь металл–углерод, при функционировании различных биологически важных объектов, осуществляет поиск, структурный дизайн и синтез потенциальных лекарственных веществ, а также разрабатывает биоматериалы, биозонды, радиофармацевтические препараты и биосенсоры на основе металлоорганических соединений.

Главная цель этой книги – помочь медикам преодолеть барьер консерватизма по отношению к органическим комплексам металлов и обратить внимание химиков на те возможности, которые открываются для медицинского применения устойчивых в водной среде металлоорганических соединений.

Для химиков, биохимиков, фармакологов, энзимологов и медиков, а также преподавателей химии, биохимии и биологии.



Некоторые из авторов данной книги

Слева направо: Дж. С. Фонтесийе-Камп, Ж. Жауэн, Ш. Такенака, Т. Б. Роухфусс, М. Зальман, Р. Х. Фиш, А. Весьер, Н. Мецлер-Нольте, Р. Альберто, П. Дж. Садлер