

Maleimide-Functionalized Derivatives of Natural Chlorins: Synthesis and Spectral Properties

Anastasia S. Pukhova, and Nikita S. Kirin[@]

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "MIREA - Russian Technological University", 119454 Moscow, Russian Federation

[@]Corresponding author E-mail: n-kirin97@mail.ru

The functionalization of natural chlorins by maleimide-containing linkers makes it possible to create a universal platform for targeted conjugation with biological targets. The developed methods ensure the selective attachment of the maleimide linker to various positions of the chlorin's skeleton. As a result, new conjugates have been obtained that combine the photoactive properties of chlorin with the ability to covalently bind to thiol groups of proteins, which opens up prospects for the creation of targeted photosensitizers and fluorescent labels. The purpose of this study was to develop methods for the directed functionalization of natural chlorins by maleimide-containing linkers. The use of activated derivatives of maleimidocaproic acid and its hydrazone made it possible to obtain modified chlorin's derivatives by forming an amide bond or synthesizing hydrazones. In this way, conjugates based on the aminoamide derivative of chlorin and 3-formylchlorin, designed for selective labeling of proteins, were obtained.

Keywords: Photosensitizers, natural chlorins, maleimides, protein labeling, immunoconjugates.

Малеимид-функционализированные производные природных хлоринов: синтез и спектральные свойства

А. С. Пухова, Н. С. Кири́н[@]

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет", 119454 Москва, Российская Федерация

[@]E-mail: n-kirin97@mail.ru

Функционализация природных хлоринов малеимид-содержащими линкерами позволяет создать универсальную платформу для направленной конъюгации с биологическими мишенями. Разработанные методы обеспечивают селективное присоединение малеимидного линкера к различным позициям хлоринового скелета. В результате, получены новые конъюгаты, сочетающие фотоактивные свойства хлорина со способностью ковалентно связываться с тиольными группами белков, что открывает перспективы для создания таргетных фотосенсибилизаторов и флуоресцентных меток. Целью настоящего исследования явилась разработка методов направленной функционализации природных хлоринов малеимид-содержащими линкерами. Использование активированных производных малеимидокапроновой кислоты и её гидразона позволило получить модифицированные производные хлоринов путем образования амидной связи или синтеза гидразонов. Таким путем были получены конъюгаты на основе аминоксидного производного хлорина и 3-формилхлорина, предназначенные для селективного мечения белков.

Ключевые слова: Фотосенсибилизаторы, природные хлорины, малеимиды, мечение белков, иммуноконъюгаты.

Введение

Природные хлорины, как гидрированные аналоги порфиринов, представляют собой перспективную платформу для создания фотосенсибилизаторов и флуоресцентных зондов, что обусловлено их уникальными фотофизическими характеристиками.^[1-6] Однако для многих биомедицинских приложений, таких как таргетная доставка или селективное мечение, ключевое значение приобретает возможность направленной ковалентной фиксации молекулы на биологической мишени, например, на белковой структуре.^[7-11]

Для направленного ковалентного мечения белковых структур в настоящее время применяется ряд селективных биоортогональных подходов, включающих модификацию первичных аминогрупп (лизин) NHS-эфирами,^[12-14] образование гидразонов по альдегидным функциям,^[15,16] малеимидную химию,^[17-19] а также использование «клик-химии» на основе азид-алкинового циклоприсоединения.^[20,21] Малеимидная группа является одним из наиболее востребованных инструментов в современной биоконъюгационной химии благодаря уникальному сочетанию реакционной способности и селективности.

Малеимиды демонстрируют высокую реакционную способность в реакциях Михаэлевского присоединения,^[22,23] селективно и с высоким выходом образуя стабильные связи с сульфгидрильными группами остатков цистеина в физиологических условиях.^[24] Относительная редкость цистеина в белках наряду с высокой нуклеофильностью его тиольной группы делает такое связывание идеальным для селективной конъюгации. Кроме того, малеимидный каркас может придавать итоговому соединению дополнительные виды биологической активности, такие как противоопухолевая и противовоспалительная. Это позволяет рассчитывать на синергетический эффект при его сочетании с фотоактивным хлориновым макроциклом.^[25-28]

Таким образом, комбинация хлорина как фотосенсибилизирующего агента и малеимида как селективного биоконъюгирующего линкера открывает путь к созданию новых гибридных молекул с улучшенными характеристиками для терапистики. В данной работе реализован направленный синтез конъюгатов хлорина *e*₆ с малеимидсодержащими линкерами: разработаны методы получения линкеров и исследованы стратегии их присоединения через амидную и гидразоновую связи. Полученные структуры перспективны для дальнейшего использования в селективном мечении белков.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Растворители были очищены и приготовлены по стандартным методикам. В работе использованы реагенты следующей квалификации: калия гидроокись, соляная кислота (х.ч.), *N*-метил-*N*-нитрозомочевина, натрия периодат, тетраоксид осмия, тионилхлорид, малеиновый ангидрид, 6-аминогексановая кислота, триэтиламин, DIPEA, 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметил-урония гексафторфосфат (HBTU), этилен-1,2-диамин, уксусный ангидрид, моногидрат гидроокиси лития, тетрагидрофуран (х.ч.), хлороформ

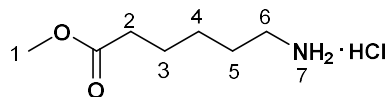
(х.ч.), *N*-Вос-гидразид, *N,N*-диметилформамид (х.ч.), 1,4-диоксан (х.ч.), ацетонитрил (х.ч.), хлористый метилен (х.ч.), а также коммерчески доступный метилфеофорбид *a* (ООО «Химфармсинтез»). Все растворители и реагенты использовали без дополнительной очистки.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель 40/60 («Merck», Германия). Для препаративной ТСХ использовали силикагель 5/40 («Вектон», Россия). Аналитическую ТСХ проводили на пластинах Kieselgel 60 F₂₄₅ («Merck», Германия).

ЯМР-спектры регистрировали в дейтерированных растворителях CDCl₃, DMSO-*d*₆ на ЯМР-спектрометре «Bruker DPX300» с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт – тетраметилсилан. Значения химических сдвигов (δ) приведены в миллионных долях (м.д.). Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на Масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, США) и на приборе Bruker (Германия) micrOTOF II с использованием ESI-ионизации. Масс-спектры (ГХ-МС) получены на приборе Agilent 7820A/5977B (Agilent Technologies, США), ионизация ЭУ, 70 эВ. Электронные спектры поглощения получены на спектрофотометре Shimadzu UV1800 UV/VIS (Shimadzu, Япония), в кварцевых кюветках с оптической длиной пути 10 мм. Все спектральные исследования выполняли при 25 °С. Осаждение было проведено на центрифуге Hermle Z 206 A («Hermle», Германия).

Синтез

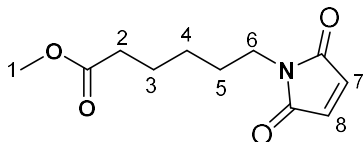
Гидрохлорид метилового эфира 6-аминогексановой кислоты (2). Безводный метанол 7.71 мл (190.5 ммоль) охладили в течение 30 мин на ледяной бане при непрерывном перемешивании. По истечении указанного времени к охлажденному метанолу при перемешивании медленно, по каплям, добавили 1.218 мл тионилхлорида (16.76 ммоль). После завершения добавления тионилхлорида, реакционную смесь продолжили охлаждать на ледяной бане в течение еще 20 мин. К полученному раствору добавили 6-аминогексановую кислоту (1.0 г, 7.62 ммоль). Реакционную массу довели до комнатной температуры и оставили при интенсивном перемешивании на 24 ч. Растворитель отгоняли под вакуумом. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход соединения **2** составил 1.362 г (98%). Продукт представляет собой белое твердое вещество. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ м.д.: 6.68 (с, 2H, (7) -NH₂), 3.66 (с, 3H, (1) -OCH₃), 3.51 (т, *J* = 7.3 Гц, 2H, (6) NCH₂-CH₂), 2.30 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H, (2) COCH₂-), 1.61 (м, *J* = 7.5 Гц, 4H, (3, 5) -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.31 (кв, *J* = 8.3 Гц, 2H, (4) CH₂-CH₂-CH₂-). Масс-спектр (ESI-GCMS) *m/z*: для C₆H₁₂NO рассчитано 114.090; найдено: 114.000 [M].



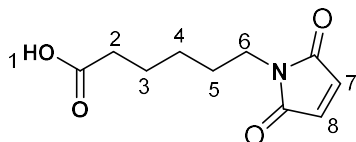
Метилловый эфир 6-малеимидокапроновой кислоты (4). К 100 мг (5.5×10^{-4} моль) гидрохлорида метилового эфира 6-аминокапроновой кислоты добавили 108 мг (11.0×10^{-4} моль) малеинового ангидрида, предварительно суспензированного в 0.5 мл ацетонитрила. В колбу с реакционной массой прилили 153 мкл (11.0×10^{-4} моль) триэтиламина. Реакцию проводили при перемешивании в инертной среде аргона при температуре 45 °С в течение 2 ч. Продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлороформ – метанол (10:1)). Растворитель отгоняли под вакуумом. Выход соединения **3** составил 70.8 мг (52.8%). Продукт представляет собой белое твердое вещество. Масс-спектр соединения **3** (ESI) *m/z*: для C₁₂H₁₉NO₄⁺ рассчитано: 243.259 и 244.262, найдено: 242.100 [M]⁺ и 243.100 [M+H]⁺.

К 70.8 мг (2.91×10^{-4} моль) соединения **3**, добавили 20 мл хлороформа и 755 мкл (4.37 ммоль) DIPEA, через 5 мин по-

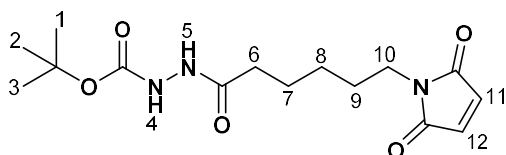
сле этого добавили 815 мкл (8.74 ммоль) уксусного ангидрида. Реакцию проводили при температуре 70 °С в течение 24 ч при интенсивном перемешивании. Растворитель отгоняли под вакуумом. Полученный продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлороформ – метанол (10:1)). Выход соединения **4** составил 50.3 мг (71.0 %). Продукт представляет собой белое твердое вещество. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ м.д.: 6.68 (д, *J* = 0.8 Гц, 2H, (7, 8) -CH=CH-), 3.66 (д, *J* = 0.9 Гц, 3H, (1) -OCH₃), 3.51 (т, *J* = 7.3 Гц, 2H, (6) -CH₂-), 2.30 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H, (2) -CH₂-), 1.61 (м, *J* = 7.5 Гц, 4H, (3, 5) -CH₂-), 1.31 (кв, *J* = 8.2 Гц, 2H, (4) -CH₂-).



6-Малеимидокапроновая кислота (5). 40 мг (2.7×10⁻⁴ моль) гидроксида лития растворили в смеси метанол-вода в соотношении 4:1, для улучшения растворимости смесь подвергли ультразвуку. Растворили 21.9 мг (9.0×10⁻⁵ моль) соединения **4** в 1 мл тетрагидрофурана. При перемешивании добавили суспензию гидроксида лития в смеси метанола и воды. Реакцию проводили при комнатной температуре при перемешивании в течение 3 ч. Растворитель отгоняли под вакуумом. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход соединения **5** составил 17 мг (89.5%). Продукт представляет собой белое твердое вещество. ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-*d*₆) δ м.д.: 11.99 (с, 1H, (1) -COOH), 7.00 (с, 2H, (7, 8) -CH₂=CH-), 3.37 (т, *J* = 7.0 Гц, 2H, (6) NCH₂-CH₂), 2.17 (т, *J* = 7.3 Гц, 2H, (2) COCH₂-), 1.48 (кв, *J* = 7.4 Гц, 4H, (3, 5) -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.28–1.14 (м, 2H, (4) -CH₂-CH₂-CH₂-).

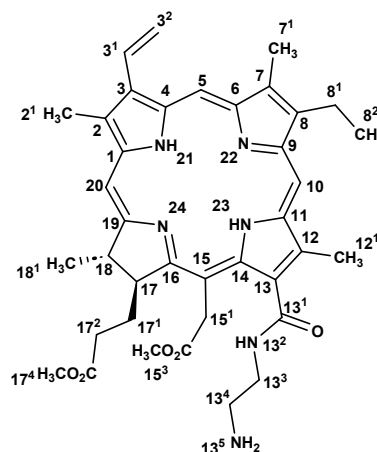


N-Вос-Гидразид 6-малеимидокапроновой кислоты (7). К 100 мг (4.7×10⁻⁴ моль) малеимидокапроновой кислоты (**5**), растворенной в 3 мл ДМФА, добавили 215.4 мг (5.7×10⁻⁴ моль) HBTU и 98 мкл (7.1×10⁻⁴ моль) триэтиламина. Реакцию проводили при перемешивании в атмосфере аргона в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавили 93.8 мг (7.1×10⁻⁴ моль) ВОС-гидразина **6** и перемешивали еще 12 ч. Реакционную смесь разбавили хлористым метиленом (50 мл) и промыли органическую фазу 3 раза водой. Полученный органический экстракт высушили безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли под вакуумом. Полученный продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлористый метилен-метанол (30:1)). Выход соединения **7** составил 94.4 мг (61.3%). Продукт представляет собой вязкое бледно-желтое масло. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ м.д.: 8.35 (с, 1H, (4) NH), 6.94 (с, 1H, (5) NH), 6.63 (с, 2H, (11, 12) малеимид), 3.42 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H, (10) -NCH₂), 2.18 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H, (6) -COCH₂), 1.64–1.46 (м, 4H, (7, 9) -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.37 (с, 9H, (1, 2, 3) -ВОС), 1.29–1.18 (м, 2H, (8) -CH₂-CH₂-CH₂-).



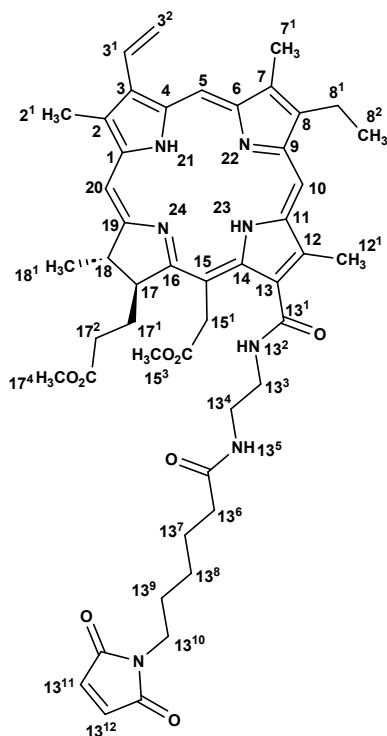
Гидрохлорид гидразид 6-малеимидокапроновой кислоты (8). К 30 мг N-Вос-гидразид 6-малеимидокапроновой кислоты (**7**), растворенного в 2 мл хлористого метилена, добавили 1 мл 17% соляной кислоты в 1,4-диоксане. Реакцию проводили при перемешивании в атмосфере аргона в течение 1 часа. По окончании реакции растворитель отгоняли под вакуумом. Полученный продукт не требовал дополнительной очистки. Выход соединения **8** составил 29.7 мг (98%). Продукт представляет собой белое твердое вещество.

Аминоамидное производное хлорина e₆ (10). 200 мг (3.3×10⁻⁴ моль) метилового эфира феофорбида **a** растворили в 10 мл хлористого метилена. В реакционную массу добавили 665 мкл (9.9×10⁻³ моль) этилен-1,2-диамина, после чего осуществили дегазацию в течение 20 мин. Реакцию проводили при перемешивании, в инертной среде аргона без доступа света при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавили хлористым метиленом (50 мл) и промыли органическую фазу 3 раза насыщенным раствором хлорида натрия. Полученный органический экстракт высушили безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли под вакуумом. Очистку осуществляли методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм). Побочные продукты и исходный непрореагировавший метиловый эфир феофорбида **a** элюировали хлористым метиленом - метанолом (20:1), а целевое аминоамидное производное хлористым метиленом - метанолом - триэтиламинам (10:1:0.1). Выход соединения **10** составил 176 мг (86%). После кристаллизации получены темно-зеленые кристаллы. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ м.д.: 9.56 (с, 1H, мезо, 10-H), 9.50 (с, 1H, мезо 5-H), 8.81 (с, 1H, мезо 20-H), 7.87 (дд, *J*=17.6, 11.5 Гц, 1H, (3¹) CH=CH₂), 6.79 (с, 1H, (13²) -NH), 6.17 (дд, *J*=18.0 Гц, 1H, (3²) CH=CH₂ (транс)), 5.96 (дд, *J*=11.5 Гц, 1H, (3²) CH=CH₂ (цис)), 5.38 (д, *J*=19.1 Гц, 1H, (15¹) -CH₂), 5.15 (д, *J*=18.8 Гц, 1H, (15¹) -CH₂), 4.53–4.33 (м, 2H, 18-H, 17-H), 3.62–3.54 (м, 2H, 8¹-H), 3.68 (с, 3H, (15³) -CH₃), 3.49–3.41 (м, 2H, 13⁴-H), 3.63 (с, 3H, (17⁴) -CH₃), 3.39 (с, 3H, (12¹) -CH₃), 3.30 (с, 3H, (2¹) -CH₃), 3.13 (с, 3H, (7¹) -CH₃), 3.25 (м, 2H, 13³-CH₂), 2.71 (т, *J*=5.8 Гц, 2H, -NH₂), 2.58 (м, 1H, 17¹-CH₂), 2.23 (м, 2H, 17²-CH₂), 1.84 (м, 1H, 17²-CH₂), 1.74 (д, *J*=7.0 Гц, 3H, 18¹-CH₃), 1.67 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H, 8²-CH₃), -1.60 (уш с, 1H, 21-NH), -1.83 (с, 1H, 23-NH). ЭСП (CH₂Cl₂) λ_{max} нм (lg ε, диапазон концентраций 10⁻⁵ моль/л): 404(5.14), 502(4.14), 529(3.55), 558(3.21), 608(3.65), 663(4.72). Масс-спектр (HPLC-MS) *m/z*: Для C₃₈H₄₆N₆O₅⁺ рассчитано 666.353 и 667.360; найдено 667.360 [M+H]⁺ и 665.346 [M-H]⁻.



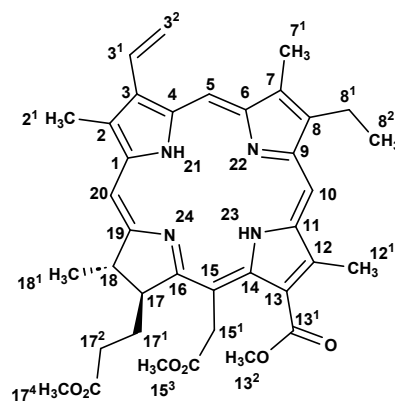
Малеимидное производное диметилового эфира хлорина e₆ (11). 4.5 мл ДМФА дегазировали в течение 20 мин, после чего добавили 57 мг (0.27 ммоль) соединения **5**, 102.4 мг (0.27 ммоль) HBTU и 12.5 мкл (0.09 ммоль) триэтиламина. Реакционную массу перемешивали без доступа воздуха при

комнатной температуре в течение 1.5 ч. Через 1.5 ч добавили 30 мг (0.045 ммоль) соединения **10**. Реакцию проводили в течение 12 ч без доступа света при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили хлористым метилом (50 мл) и промыли органическую фазу 3 раза насыщенным раствором хлорида натрия. Полученный органический экстракт высушили безводным сульфатом натрия, растворитель отогнали под вакуумом. Продукт очистили методом препаративной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлороформ – метанол (15:1)). Выход соединения **11** составил 31.2 мг (80.6%). После кристаллизации получены темно-зеленые кристаллы. ^1H ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 9.63 (с, 1H, мезо 10-H), 9.54 (с, 1H, мезо 5-H), 8.81 (с, 1H, мезо 20-H), 7.97 (дд, $J = 17.8, 11.5$ Гц, 1H, 3^1-CH), 7.06 (с, 1H, 13^2-NH), 6.58 (с, 1H, 13^5-NH), 6.28 (д, $J = 2.7$ Гц, 3H, 3^2-CH_2 (транс)), $13^{11}, 13^{12}$ -малеимид, 6.05 (дд, $J = 11.6, 1.5$ Гц, 1H, 3^2-CH_2 (цис)), 5.45 (д, $J = 18.7$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 5.22 (д, $J = 19.1$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 4.48 (м, $J = 7.2$ Гц, 1H, 18-H), 4.42 – 4.33 (м, 1H, 17-H), 3.72 (м, 2H, 13^{10}-CH_2), 3.69 (с, 3H, 15^3-CH_3), 3.63 (с, 3H, 17^4-CH_3), 3.43 (с, 3H, 12^1-CH_3), 3.39 (м, $J = 7.2$ Гц, 2H, 8^1-H , 13^3-CH_2), 3.35 (с, $J = 5.8$ Гц, 3H, 2^1-CH_3), 3.18 (с, 3H, 7^1-CH_3), 3.12 (т, $J = 7.1$ Гц, 2H, 13^6-CH_2), 2.64 – 2.51 (м, 1H, 17^1-CH_2), 2.22 (м, $J = 6.1$ Гц, 2H, 17^2-CH_2), 2.16 (м, $J = 7.5$ Гц, 2H, 13^6-CH_2), 1.83 (т, $J = 8.7$ Гц, 1H, 17^1-CH_2), 1.72 (м, $J = 7.3, 4.8$ Гц, 6H, $18^1\text{-CH}_3, 8^2\text{-CH}_3$), 1.26 (м, $J = 15.5, 8.0$ Гц, 6H, $13^7, 13^8, 13^9\text{-CH}_2$), –1.84 (с, 1H, 21,23-NH). ЭСП (CH_2Cl_2) λ_{max} нм (lg ϵ , диапазон концентраций 10^{-5} моль/л): 402(4.91), 501(3.90), 528(3.37), 558(3.00), 607(3.44), 663(4.45). Масс-спектр (ESI) m/z : для $\text{C}_{48}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_8$ рассчитано 859.423; найдено: 860.434 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

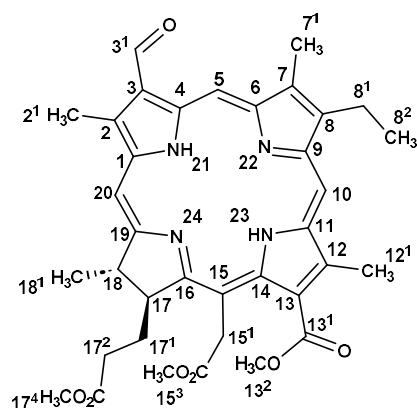


Триметилловый эфир хлорофилла *a* (**12**). Метилловый эфир феофорбида *a* (**9**), использованный в работе, был коммерчески доступным соединением (ООО «ХИМФАРСИНТЕЗ»). Для проведения реакции деацетилирования предварительно дегазировали 50 мл ацетона и раствор 7.4 г (0.132 моль) гидроксида калия в 50 мл воды. В дегазированный ацетон добавили 500 мг (0.825 ммоль) соединения **9** и добавили раствор щелочи. Гидролиз проводили при интенсивном перемешивании и температуре 50 °C в течение 1.5 ч, оснастив реакционный сосуд обратным холодильником. После завершения

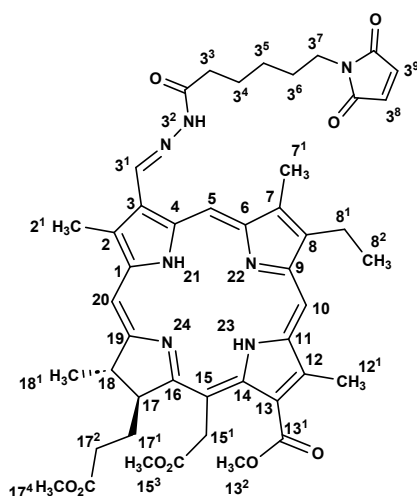
реакции смесь разбавили водой в 2 раза по объему и подкислили 1 М раствором HCl до pH 4.5, при этом выпал осадок. Образовавшуюся суспензию центрифугировали, осадок выделили фильтрованием, растворили в ацетоне и упарили досуха. Полученный продукт растворили в хлористом метиле и добавили 4-кратный избыток эфирного раствора диазометана, поддерживая температуру смеси с помощью ледяной бани. Растворитель отогнали под вакуумом. Продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлористый метил-метанол (150:1)). Выход соединения **12** составил 498 мг (94.8%). После кристаллизации получены темно-зеленые кристаллы. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 1.62–1.81 (м, 6H, 8^2-CH_3 , 18^3-CH_3), 2.06–2.31 (м, 2H, 17^2-CH_2), 2.45–2.67 (м, 2H, 17^1-CH_2), 3.29 (с, 3H, 7^1-CH_3), 3.46 (с, 3H, 2^1-CH_3), 3.56 (п, $J = 7.2$ Гц, 2H, 8^1-CH_2), 3.62 (с, 3H, 12^1-CH_3), 3.75 (с, 3H, 15^3-CH_3), 3.78 (с, 3H, 17^4-CH_3), 4.24 (с, 3H, 13^2-CH_3), 4.32–4.49 (м, 2H, 17-H, 18-H), 5.21 (д, $J = 18.4$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 5.34 (д, $J = 18.8$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 6.13 (дд, $J = 1.3, 11.7$ Гц, 1H, 3^2-CH (цис-), 6.34 (дд, $J = 1.3, 18.9$ Гц, 1H, 3^2-CH (транс-), 8.05 (дд, $J = 17.9, 11.6$ Гц, 1H, 3^1-CH), 8.72 (с, 1H, 20-H), 9.55 (с, 1H, 5-H), 9.68 (с, 1H, 10-H). ЭСП (CH_2Cl_2) λ_{max} нм (lg ϵ , диапазон концентраций 10^{-5} моль/л): 403(5.17), 501(4.09), 530(3.78), 613(3.72), 664(4.63).



Триметилловый эфир 3-формилхлорофилла *e*₆ (**13**). К 498 мг (0.780 ммоль) триметилового эфира хлорофилла *e*₆ (**12**) растворенного в 20 мл тетрагидрофурана, добавили раствор периодата натрия (670 мг, 3.133 ммоль) в воде (5 мл) и раствор 2.3% тетраоксида осмия в метиле (300 мкл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при охлаждении в течение 3 ч. После чего к смеси добавили насыщенный раствор гидросульфита натрия в метаноле (10 мл) и перемешивали в течение 15 мин. Реакционную смесь разбавили хлористым метилом (50 мл) и промыли органическую фазу 3 раза насыщенным раствором хлорида натрия. Полученный органический экстракт высушили безводным сульфатом натрия, растворитель отогнали под вакуумом. Продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: гексан-этилацетат (2:1)). Выход соединения **13** составил 206 мг (41.0%). После кристаллизации получены темно-зеленые кристаллы. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 1.66–1.79 (м, 6H, 8^2-CH_3 , 18^3-CH_3), 2.12–2.30 (м, 2H, 17^2-CH_2), 2.50–2.66 (м, 1H, 17^1-CH_2), 3.33 (с, 3H, 7^1-CH_3), 3.57 (с, 3H, 2^1-CH_3), 3.59 (п, $J = 7.2$ Гц, 2H, 8^1-CH_2), 3.64 (с, 3H, 12^1-CH_3), 3.80 (с, 3H, 15^3-CH_3), 3.83 (с, 3H, 17^4-CH_3), 4.27 (с, 3H, 13^2-CH_3), 4.39–4.52 (м, 2H, 17-H, 18-H), 5.25 (д, $J = 18.8$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 5.38 (д, $J = 18.8$ Гц, 1H, 15^1-CH_2), 8.94 (с, 1H, 20-H), 9.67 (с, 1H, 5-H), 10.27 (с, 1H, 10-H), 11.55 (с, 1H, 3^1-CH). Масс-спектр (MALDI-TOF) m/z : для $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7^+$ рассчитано 640.290; найдено 640.909 $[\text{M}]^+$. ЭСП (CH_2Cl_2) λ_{max} нм (lg ϵ , диапазон концентраций 10^{-5} моль/л): 416(4.24), 512(3.28), 547(3.36), 634(3.06), 691(3.98).



Малеимидное производное 3-формилхлорина e_6 (**14**). К 20 мг (0.031 моль) триметилового эфира 3-формилхлорина e_6 (**13**), растворенного в 2 мл хлористого метилена, добавили 21.1 мг (0.094 моль) гидрохлорида гидразида малеимидапроновой кислоты (**8**), 4.3 мкл (0.031 моль) триэтиламина и 10 мкл ТФК. Реакцию проводили при перемешивании в атмосфере аргона и охлаждении в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавили хлористым метилом (50 мл) и промыли органическую фазу 3 раза водой. Полученный органический экстракт высушили безводным сульфатом натрия, растворитель отогнали под вакуумом. Продукт очистили методом колоночной хроматографии (сорбент: силикагель 40/60 мкм; элюент: хлористый метилен-метанол (20:1)). Выход соединения **14** составил 21.8 мг (91.0%). После кристаллизации получены темно-зеленые кристаллы. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 9.96 (с, 1H, 10-H), 9.67 (с, 1H, 3²-NH), 9.60 (с, 1H, 5-H), 8.76 (с, 1H, 3¹-CH), 8.71 (с, 1H, 20-H), 6.43 (с, 2H, 3^{8,9}-малеимид), 5.34 (м, $J = 16.1$ Гц, 2H, 15¹-CH₂), 4.44 (м, $J = 8.6$ Гц, 2H, 17-H, 18-H), 4.29 (с, 3H, 13²-CO₂CH₃), 3.82 (с, 3H, 15²-CO₂CH₃), 3.67 (с, 3H, 17³-CO₂CH₃), 3.65 – 3.53 (м, 7H, 12-CH₃, 8¹-CH₂, 3⁷-CH₂), 3.35 (с, 3H, 7-CH₃), 3.11 (с, 4H, 2-CH₃), 2.64 – 2.55 (м, 1H, 17¹-CH₂), 2.34 – 2.18 (м, 2H, 3³-COCH₂), 1.94 (м, $J = 7.5$ Гц, 2H, 17¹-CH₂, 17²-CH₂), 1.82 – 1.48 (м, 14H, 18-CH₃, 3^{4,5}, 3⁶-CH₂-CH₂-CH₂, 17²-CH₂, 8²-CH₃), -1.37 (уш. с, 1H, 21-NH), -1.55 (уш. с, 1H, 23-NH). ЭСП (CH_2Cl_2) λ_{max} нм (lg ϵ , диапазон концентраций 10^{-5} моль/л): 415 (4.71), 508 (3.72), 541 (3.65), 571 (2.98), 625 (3.34), 681 (4.40). Для $\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_9^+$ рассчитано: 848.3978, найдено: 848.4022 [M]⁺.



Результаты и обсуждения

В рамках стратегии функционализации природных хлоринов малеимидной группой были получены и охарактеризованы 6-малеимидапроновая кислота (**5**) и её гидразидное производное (6-малеимидапроилгидразид) (**8**), предназначенные для последующей конъюгации. Целевое соединение, 6-малеимидапроновую кислоту, получили в соответствии с многостадийной стратегией синтеза, ключевым элементом которой явилась временная защита карбоксильной группы (Схема 1). Для этого была проведена этерификация исходной 6-аминогексановой кислоты метанолом в присутствии тионилхлорида, который использовали для генерации безводного хлороводорода *in situ* в качестве катализатора.^[29] Образовавшийся метиловый эфир далее вводили в реакцию с малеиновым ангидридом по известной методике.^[30]

Ключевой этап синтеза – образование малеимидного цикла – осуществили в условиях существенного разбавления реагентов и при контролируемой температуре (не выше 50 °С), что позволило минимизировать побочные процессы полимеризации, характерные для данного класса соединений.^[31] Завершающая стадия синтеза заключалась в количественном удалении защитной группы с карбоксильной функции под действием гидроксида лития по известной методике.^[32] Все промежуточные продукты и целевое соединение охарактеризованы методами ^1H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, что однозначно подтвердило их структуру и высокую чистоту.

Синтез целевого гидразидного производного малеимидапроновой кислоты (соединение **8**) был осуществлен по двухстадийной схеме (Схема 2). На первом этапе карбоксильная группа кислоты была активирована в условиях пептидной конденсации с последующим взаимодействием с *N*-Вос-гидразидом.^[33] Защищенный промежуточный продукт был выделен с помощью экстракции и очищен методом колоночной хроматографии.

На заключительной стадии удаляли защитные группы с использованием 17% соляной кислоты в 1,4-диоксане. Деблокирование протекало количественно, что позволило получить целевой гидразид с высоким выходом без необходимости дополнительной очистки.^[34] Структура конечного соединения подтверждена стандартными спектральными методами.

В работе использовали коммерчески доступный метиловый эфир феофорбида *a* в качестве субстрата для получения малеимидного производного (Схема 3). На первом этапе проведена модификация макроцикла путем присоединения этилен-1,2-диамина, сопровождающегося раскрытием пентанового цикла в положении 13 и образованием амидной связи.^[35] Синтезированное аминоксидное производное хлорина e_6 (соединение **10**) очищено колоночной хроматографией и охарактеризовано комплексом физико-химических методов анализа (^1H ЯМР, хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия), которые совпали с литературными данными.^[35]

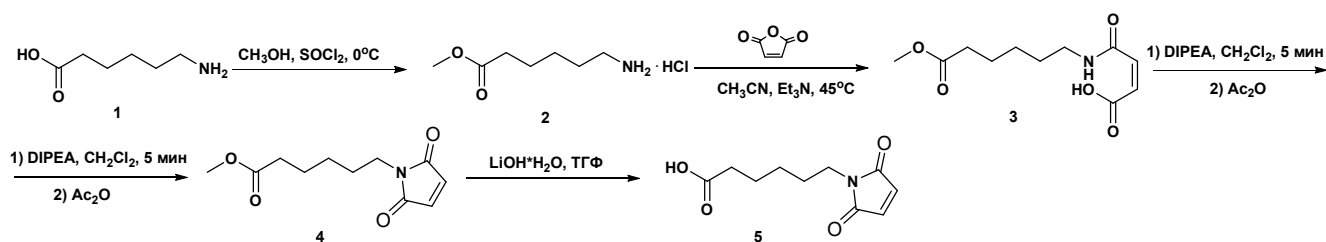


Схема 1. Получение малеимидакапроновой кислоты (5).

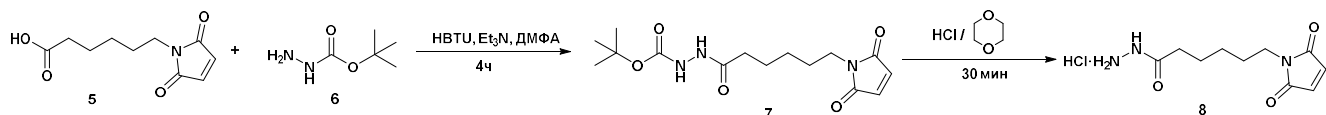
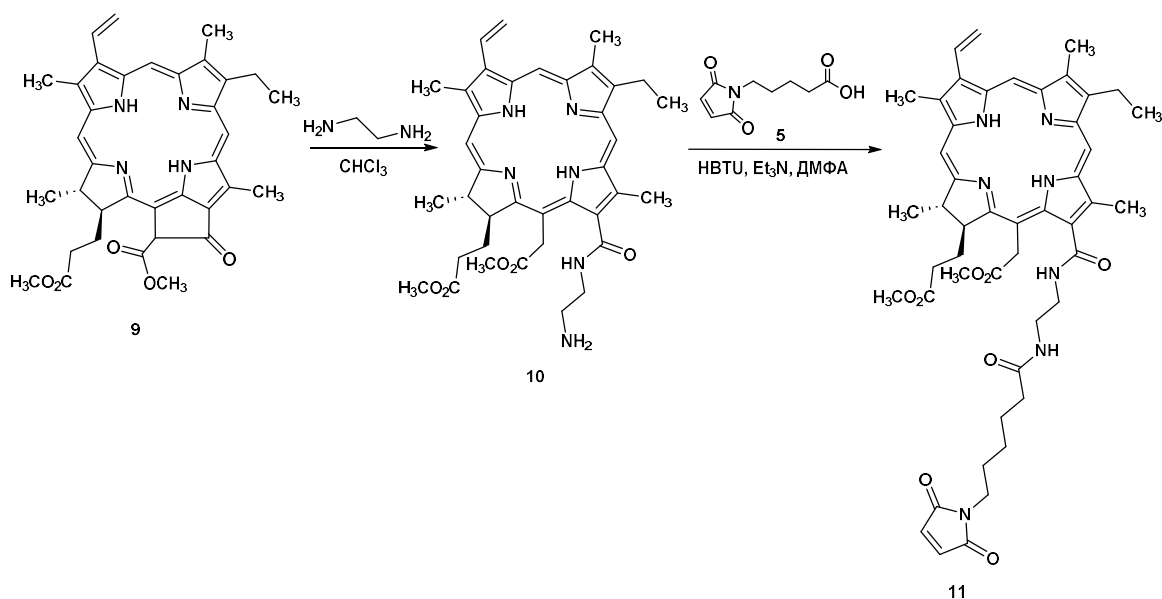


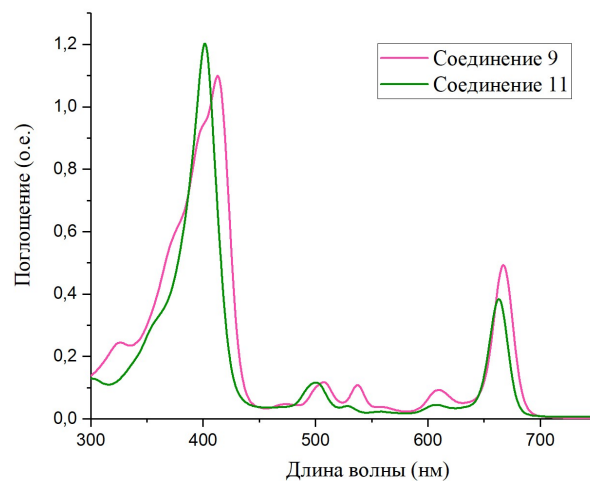
Схема 2. Получение (6-малеимидакапроил)гидразона (8).

Схема 3. Получение малеимидного производного диметилового эфира хлорина e_6 (11).

Ключевой стадией синтеза являлась конъюгация полученного аминоксодержащего хлорина **10** с малеимидакапроновой кислотой (**5**). Реакцию проводили в условиях активации карбоксильной группы HBTU с образованием амидной связи. Структура целевого малеимидного производного (соединение **11**) подтверждена данными ^1H ЯМР, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Характерный сигнал протонов малеимидного цикла наблюдается в виде синглета при 6.28 м.д., что согласуется с литературными данными для подобных структур.^[40,41] Экспериментально найденное значение m/z 860.434 соответствует протонированному иону $[\text{M}+\text{H}]^+$ и хорошо согласуется с рассчитанной молекулярной массой 859.423 для $\text{C}_{48}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_8$.

В ходе реакции у конечного соединения **11** наблюдался небольшой гипсохромный сдвиг полос поглощения на 4 нм по сравнению с исходным метилфеофорбидом **9** (Рисунок 1). Чистота и идентификация соединения **11** проводилась с помощью хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (Рисунок 2), а

также масс-спектрометрией MALDI-TOF и ^1H ЯМР-спектроскопией.

Рисунок 1. Спектры поглощения соединений **9** и **11**.

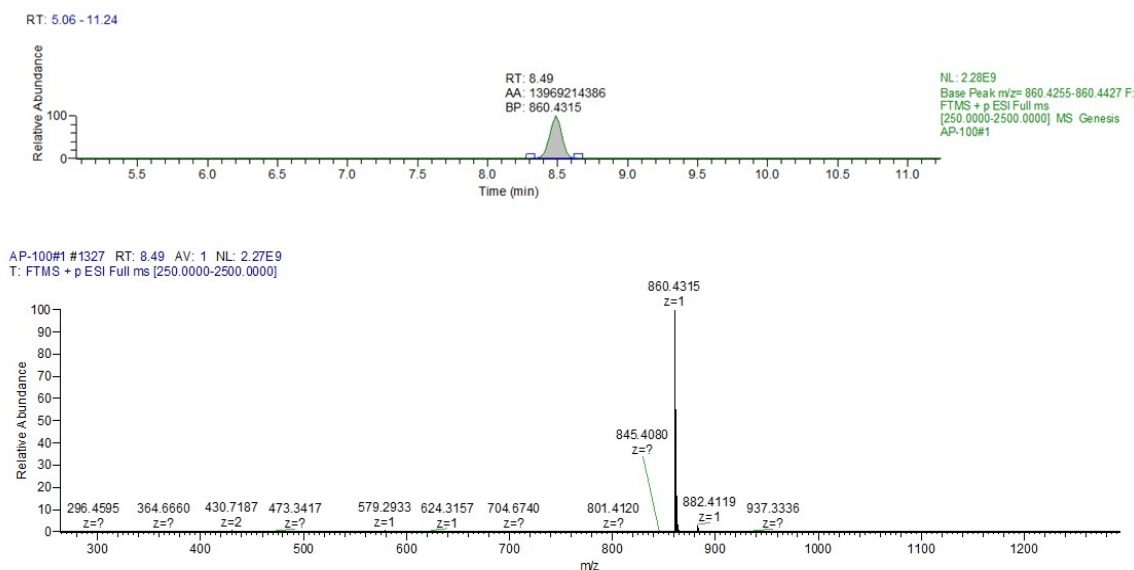
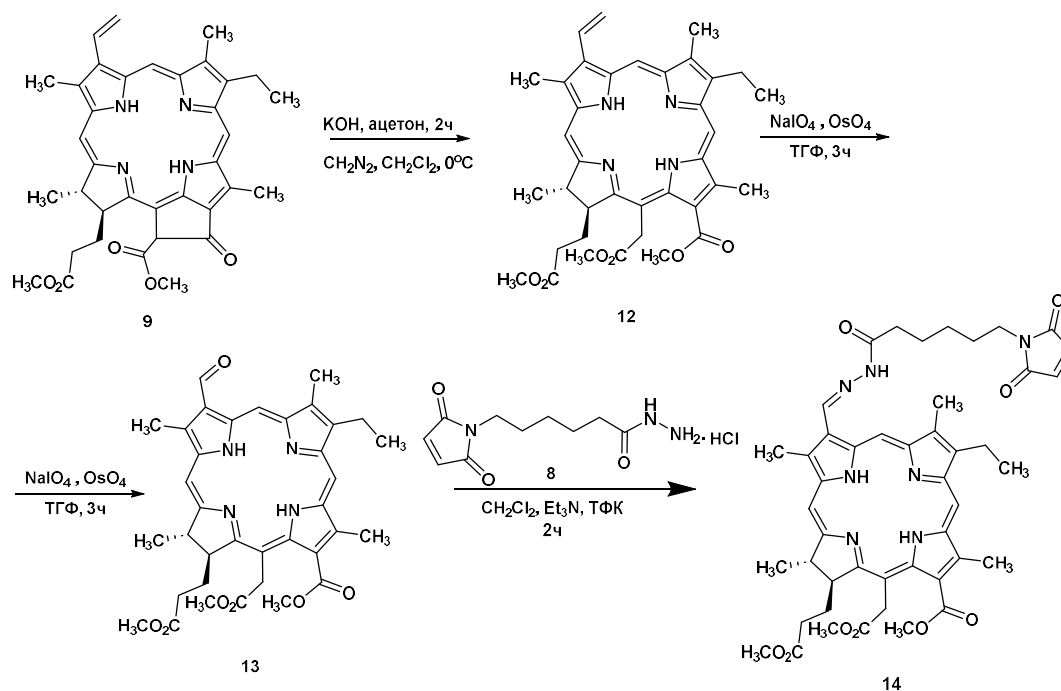


Рисунок 2. Хромато-масс-спектр соединения 11.

Схема 4. Получение малеимидного производного 3-формилхлорина e_6 14.

Целевой конъюгат (соединение 14) получен из коммерчески доступного метилового эфира феофорбида *a* (9) последовательно из трех стадий (Схема 4). На первом этапе проведен гидролиз сложноэфирной группы с последующим метилированием диазометаном, что позволило получить триметилловый эфир хлорина e_6 (12).^[36,37] Последующее окислительное расщепление винильной группы в положении 3 с использованием раствора тетраоксида осмия в хлористом метиле и периодата натрия привело к образованию 3-формилпроизводного 13.^[38,39]

Ключевая стадия синтеза заключалась в модификации формильного производного хлорина (соедине-

ние 13) (6-малеимидокапроил)гидразидом в условиях кислотного катализа. Таким образом, был осуществлен трехстадийный синтез целевого конъюгата, характеризующийся высокими выходами на каждой стадии.

В ходе реакции у конечного соединения 14 наблюдался батохромный сдвиг полос поглощения на 14 нм по сравнению с исходным метилфеофорбидом 9 (Рисунок 3). Чистота и идентификация соединения 14 проводилась с помощью хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (Рисунок 4), а также масс-спектрометрией MALDI-TOF и ^1H ЯМР-спектроскопией. В спектре ^1H ЯМР наблюдается синглет в области 6.43 м.д., соответствующий двум эквивалентным прото-

нам малеимидного фрагмента. Экспериментально определенное значение m/z 848.4022 соответствует иону $[M]^+$ с расчетной массой 848.3978 для состава $C_{46}H_{54}N_7O_9$.

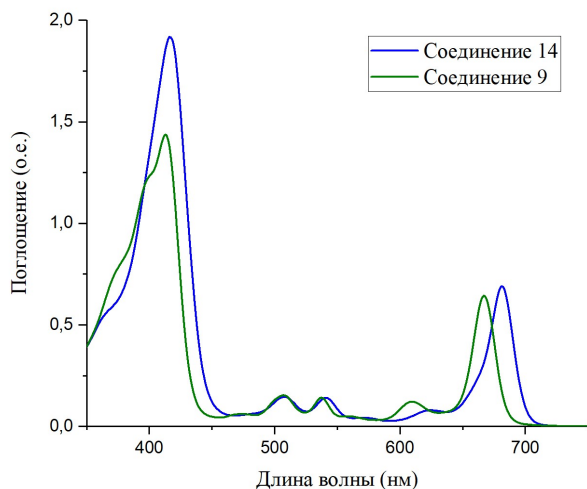


Рисунок 3. Спектры поглощения соединений 9 и 14.

Закключение

Таким образом, в рамках настоящей работы разработана и реализована стратегия направленной функционализации производных природного хлорина e_6 малеимид-содержащими линкерами для целей селек-

тивного мечения белков. Впервые синтезированы новые конъюгаты, содержащие ковалентно связанные малеимидокапроновую кислоту и её гидразид, при помощи двух подходов: образования амидной связи и синтеза гидразона.

Полученные соединения охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа (1H ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, ТСХ), что однозначно подтвердило их структуру и высокую чистоту. Разработанные методы обеспечивают получение целевых конъюгатов с высокими выходами на всех стадиях синтеза.

Разработанная модульная схема позволяет получать конъюгаты хлорина e_6 с малеимидсодержащими линкерами. Полученные соединения сочетают флуоресцентные свойства хлоринового хромофора с реакционноспособной малеимидной функцией, которая, как известно, способна к взаимодействию с тиольными группами белков.^[42,43] Это делает их перспективными кандидатами для последующего изучения в задачах направленного мечения и визуализации белков *in vitro* и *in vivo*.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FSFZ-2025-0020). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения №075-15-2025-548 от 18.06.2025 г.

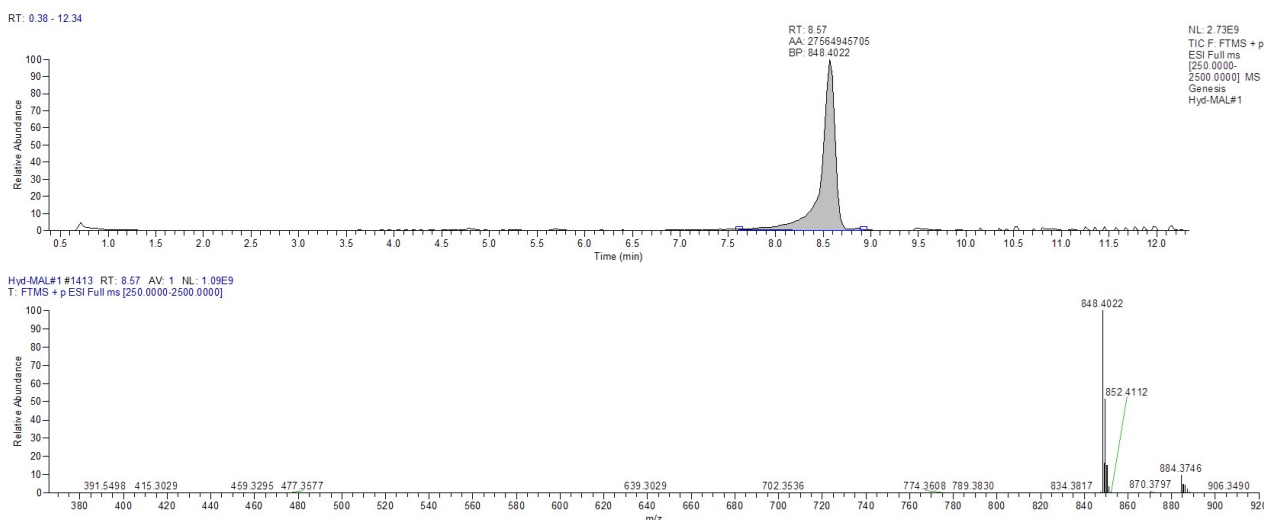


Рисунок 4. Хромато-масс-спектр соединения 14.

Литература

References

1. Bandyopadhyay S., Forzano J. A., Dirak M., Chan J. *JACS Au* **2025**, 5(1), 42–54. doi: 10.1021/jacsau.4c01108.
2. Kwon N., Weng H., Rajora M.A., Zheng G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, 64, e202423348. doi: 10.1002/anie. 202423348.
3. a) Belykh D.V., Pylina Y.I., Kustov A.V., Startseva O.M., Belykh E.S., Smirnova N.L., Berezin D.B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2024**, 23(3), 409–420. doi: 10.1007/s43630-023-00527-w; b) Kustov A.V. *ChemChemTech* **2023**, 66(12), 32–40. doi: 10.6060/ivkkt.20236612.6902
4. Abrahamse H., Hamblin M. R. *Biochem. J.* **2016**, 473, 347–364. doi: 10.1042/BJ20150942.
5. Kirin N.S., Ostroverkhov P.V., Usachev M.N., Birin K.P., Grin M.A. *Fine Chem. Technol.* **2024**, 19, 310–326. doi: 10.32362/2410-6593-2024-19-4-310-326.

6. Yoon I., Li J.Z., Shim Y.K. *Clinical Endoscopy* **2013**, 46(1), 7. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.
7. Enzian P., Kleineberg N., Kirchert E., Schell C., Rahman-zadeh R. *Mol. Pharmaceut.* **2024**, 21, 609–621. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00749.
8. Pathak P., Zarandi M. A., Zhou X., Jayawickramarajah J. *Front. Chem.* **2021**, 9, 764137. doi: 10.3389/fchem.2021.764137.
9. Deonarain M., Stamati I., Yahioğlu G. *Mol. Cell. Ther.* **2012**, 103–124. doi: 10.1002/9781119967309.ch4.
10. Giuntini F., Alonso C.M., Boyle R.W. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10(5), 759–791. doi: 10.1039/c0pp00366b.
11. Li X.G., Li J., Chen J., Rao L., Zheng L., Yu F., Ma J. *Biomater. Sci.* **2024**, 12(11), 2766–2785. doi: 10.1039/d4bm00214h.
12. Dempsey D.R., Jiang H., Kalin J.H., Chen Z., Cole P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140(30), 9374–9378. doi: 10.1021/jacs.8b05098.
13. Demant E.J., Jensen P.B., Sehested M. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1118, 83–90. doi: 10.1016/0003-2697(88)90192-3.
14. Talukder A., Chowdhury S.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2025**, 36, 721–731. doi: 10.1021/jasms.4c00398.
15. Li B., Zhang Z., Situmorang D.P., Lim Q.N., Liang Y., Qiao Y., Loh T.P. *CCS Chemistry* **2026**, 8(2), 781–792. doi: 10.31635/ccschem.025.202506216.
16. Alves A.M.B., Romão I.C., Souza R.J., Marinho E.S., Marinho M.M., Rocha M.N., Dos Santos H.S. *ACS Omega* **2025**, 10(39), 45152–45164. doi: 10.1021/acsomega.5c04279.
17. Wang X.W., Zhang X., Cui C.Y., Li B., Goldfarb D., Yang Y., Su X.C. *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202301350. doi: 10.1002/chem.202301350.
18. Pearce A.K., Parkinson S.J., Akar I., Derry M.J., Topham P.D., Mathers R.T., O'Reilly R.K. *Macromolecules* **2023**, 56, 9443–9454. doi: 10.1021/acs.macromol.3c01451.
19. Ni J., Singh S., Wang L.X. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14(1), 232–238. doi: 10.1021/bc025617f.
20. Pickens C.J., Johnson S.N., Pressnall M.M., Leon M.A., Berkland C.J. *Bioconjugate Chem.* **2017**, 29(3), 686–701. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00633.
21. Avti P.K., Maysinger D., Kakkar A. *Molecules* **2013**, 18, 9531–9549. doi: 10.3390/molecules18089531.
22. Ravasco J.M., Faustino H., Trindade A., Gois P.M. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 43–59. doi: 10.1002/chem.201803174.
23. Xu K., Li J., Zhang Z., Loh T.P. *Synlett* **2025**, 36, 1847–1867. doi: 10.1055/a-2594-9636.
24. Barker J.E., Tibbetts J.D., Ferguson C.T., Xie Y., O'Reilly R.K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202410550. doi: 10.1002/anie.202410550.
25. Wang Y., Xie F., Liu L., Xu X., Fan S., Zhong W., Zhou X. *Drug Delivery* **2022**, 29(1), 754–766. doi: 10.1080/10717544.2022.2039807.
26. Ingram N., Abou-Saleh R.H., Race A.D., Loadman P.M., Bushby R.J., Evans S.D., Coletta P.L. *Pharmaceutics* **2024**, 16, 434. doi: 10.3390/pharmaceutics16030434.
27. Ferhati X., Jiménez-Moreno E., Hoyt E.A., Salluce G., Cabeza-Cabrerizo M., Navo C.D., Corzana F. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 5284–5294. doi: 10.1021/jacs.1c07675.
28. Tiwatane A.K., Khandave P.Y., Kulkarni S.S., Oisaki K., Pande A.H. *Curr. Oncol. Rep.* **2025**, 27, 1287–1311. doi: 10.1007/s11912-025-01713-y.
29. Baltina Jr L.A., Stolyarova O.V., Baltina L.A., Kondratenko R.M., Fedorova V.A., Orshanskaya Y.A., Zarubaev V.V. *Chemistry of Natural Compounds* **2014**, 50, 317–320. doi: 10.1007/s10600-014-0941-9.
30. Borzenkov M., Mitina N., Lobaz V., Hevus O. *J. Surfact. Deterg.* **2015**, 18, 133–144. doi: 10.1007/s11743-014-1640-z.
31. Tobaldi E., Dovgan I., Mosser M., Becht J.M., Wagner A. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 9305–9310. doi: 10.1039/c7ob01757j.
32. Fajar M., Naini A.A., Maharani R., Supratman U., Siahaan T.J. *Vietnam Journal of Chemistry* **2026**, 1. doi: 10.1002/vjch.70122.
33. Suzhou Highfine Biotech Co., Ltd. *Hydrazide-containing bifunctional protein crosslinking agent, its preparation method*. China Patent CN109535058 A, **2019**.
34. Han G., Tamaki M., Hruby V.J. *J. Pept. Res.* **2001**, 58, 338–341. doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.00935.x.
35. Belykh D.V., Mal'shakova M.V., Kuchin A.V. In: *Yearbook of the Institute of Chemistry of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences 2006*. Syktyvkar, **2007**. pp. 43–50 [Белых Д.В., Мальшакова М.В., Кучин А.В. В кн.: *Ежегодник Института химии Коми НЦ УрО РАН 2006*. Сыктывкар, **2007**. с. 43–50]. <https://chemi.komisc.ru/content/menu/126/Eghegodnik-2006.pdf>.
36. Bauer D., Nghiem H.V., Tien D.D., Stelten J., Montforts F.P. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, 23, 243–250. doi: 10.1142/S1088424618501183.
37. Zhang G., Yang J., Hu C., Zhang X., Li X., Gao S., Wei H. *J. For. Res.* **2019**, 30(6), 2349–2356. doi: 10.1007/s11676-018-0756-9.
38. Travis B.R., Narayan R.S., Borhan B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3824–3825. doi: 10.1021/ja017295g.
39. Senge M.O., Wiehe A., Rypa C. *Synthesis, Reactivity and Structure of Chlorophylls*. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 25* (Grimm B., Porra R.J., Rüdiger W., Scheer H., Eds.) Springer, Dordrecht, **2006**. pp. 27–37. doi: 10.1007/1-4020-4516-6_2.
40. Tomé J.P., Tomé A.C., Neves M.G., Paz F.A.A., Gates P.J., Klinowski J., Cavaleiro J.A. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7907–7913. doi: 10.1016/j.tet.2003.08.013.
41. Ol'shevskaya V., Makarenkov A., Korotkova N., Kononova E., Kononova N., Kalinin V. *Dokl. Chem.* **2014**, 458, 165–168. doi: 10.1134/S0012500814090018.
42. Dudchak R., Podolak M., Holota S., Szewczyk-Roszczenko O., Roszczenko P., Bielawska A., Bielawski K. *Bioorg. Chem.* **2024**, 143, 106982. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106982.
43. Pathak P., Zarandi M.A., Zhou X., Jayawickramarajah J. *Front. Chem.* **2021**, 9, 764137. doi: 10.3389/fchem.2021.764137.

Received 28.01.2026

Accepted 16.03.2026