

На правах рукописи

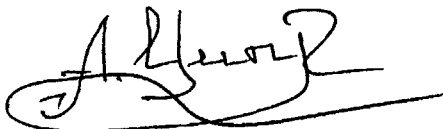
ЦИПРОВСКИЙ АЛЕКСАНДР ГЕННАДЬЕВИЧ

**«Синтез и изучение свойств циклических имидов в ряду
бактериохлорофилла а»**

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва — 2003

Работа выполнена на кафедре химии и технологии тонких органических соединений Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова.

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор

Миронов Андрей Фёдорович

Официальные оппоненты.

Доктор химических наук, профессор

Юркович Александр Морисович

Доктор химических наук, профессор

Смирнов Леонид Дмитриевич

Ведущая организация:

Центр фотохимии РАН

Защита состоится 22 декабря 2003 года в 15 часов на заседании Диссертационного Совета Д 212.120.01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им М. В. Ломоносова по адресу. 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им М. В. Ломоносова по адресу 119831, Москва, ул. М. Пироговская, 1.

Автореферат разослан 26 ноября 2003 года

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,
к.х.н., с.н.с.



Лютик А. И.

2003-A
19326

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

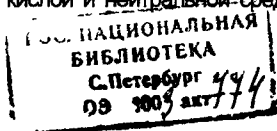
Актуальность работы. В последнее десятилетие во многих странах мира, в том числе и в России, активно разрабатываются новые методы диагностики и лечения злокачественных новообразований. Среди них особое место занимают флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия рака (ФДТ), основанные на применении фотосенсибилизаторов (ФС). Синтез фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака – это актуальное и бурно развивающееся направление химии тетрапиррольных соединений. Поиск новых фотосенсибилизаторов ведется как среди синтетических соединений порфириновой природы, так и среди природных пигментов.

Последние привлекают особое внимание, так как значительно быстрее выводятся из организма и подвергаются биодegradации, что существенно снижает побочные эффекты ФДТ. К настоящему времени большинство модификаций выполнено на производных хлорофилла *a*. Существенно медленнее развиваются исследования в области бактериохлорофилла *a*. Однако, спектральные свойства именно этого пигмента позволяют рассматривать его в качестве одного из перспективных источников для создания фотосенсибилизаторов нового поколения. При переходе к бактериохлоринам полоса Q в спектрах поглощения смещается в длинноволновую область, что способствует увеличению глубины проникновения возбуждающего света в ткани.

Природные бактериохлорины, благодаря интенсивному поглощению в области 770 нм, обладают высокой фотодинамической активностью. Известно использование в качестве потенциальных ФС Pd-комплексов бактериофеофорбида, бактериохлорина, а также их различных эфиров. Эти производные показали высокую активность как в экспериментах *in vivo* для диагностики и терапии злокачественных опухолей, так и *in vitro* для фотодинамического повреждения вирусов и микроорганизмов. Однако, лабильность соединений бактериохлоринового ряда ограничивает возможности использования последних в медицине.

Наличие дополнительного шестичленного ангидридного цикла, сопряженного с основным макроциклом в молекуле бактериопурпурина, приводит к батохромному сдвигу основной полосы поглощения в длинноволновую область спектра.

Тем не менее, бактериопурпурин имеет ограниченное применение в качестве фотосенсибилизатора, так как он устойчив лишь в кислой и нейтральной средах, а при



добавлении оснований для улучшения растворимости в воде, происходит быстрое раскрытие ангидридного цикла, и потеря привлекательных спектральных характеристик.

Структура бактериопурпурина представляет широкие возможности для проведения химических модификаций, что и было использовано в настоящей работе для решения двух основных задач.

Первая включала получение стабильных производных, устойчивых при щелочных значениях pH, с улучшенными спектральными свойствами.

Вторая состояла во введении в подобного рода производные заряженных групп для повышения гидрофильности молекулы и улучшения накопления фотосенсибилизатора в опухолях.

Настоящая работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры ХТТОС МИТХТ им. М. В. Ломоносова по теме № 1В-32-865 «Разработка методов получения циклоимидных производных бактериохлорофилла *a* для создания лекарственных препаратов для фотодинамической терапии рака» и при поддержке грантов РФФИ: № 01-03-32543, № 02-03-06630 «МАС», № 03-03-06670 «МАС»; INTAS № 01 – 0461.

Цель работы. Диссертационная работа посвящена исследованию направленных превращений в ряду производных бактериохлорофилла *a* и включает следующие разделы:

1. Разработка способов модификации ангидридного цикла бактериопурпурина (БП), позволяющих получать N-гидрокси- и N-аминоциклоимиды.
2. Синтез циклических имидов бактериопурпурина, содержащих различные функциональные группы при атоме азота экзоцикла, и обладающих повышенной стабильностью и улучшенными спектральными характеристиками.
3. Разработка методов синтеза катионных фотосенсибилизаторов бактериохлороинового ряда.
4. Оценка эффективности полученных циклоимидов на основе их фототоксической активности и внутриклеточного распределения.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые осуществлен синтез производных бактериохлороина *p₆* с добавочным циклоимидным кольцом, в которых при атоме азота находятся гидроксильная и аминогруппы и показана возможность

химической модификации последних. Изучена сравнительная активность ацетильного заместителя в положении 3 макроцикла и ангидридного цикла бактериопурпурина в реакциях с гидроксиламином и гидразином. Получена группа стабильных циклоимидов бактериохлоринового ряда, содержащих различные заместители при атоме азота экзоцикла и имеющих bathochrome смещение длинноволновой полосы поглощения в электронных спектрах до 830 нм. Синтезирован первый катионный фотосенсибилизатор бактериохлоринового ряда, растворимый в водноспиртовых растворах и обладающий противомикробной активностью. Оценена фототоксическая активность полученных циклоимидов на клетках аденокарциномы легкого человека A549 и показана перспективность использования некоторых из них в качестве эффективных фотосенсибилизаторов для ФДТ рака.

Практическая значимость работы. Исследованные в работе природные бактериохлорины с имидным экзоциклом могут быть использованы при синтезе новых высокоэффективных фотосенсибилизаторов. Полученные циклоимиды содержат в своей структуре гидроксильную и аминогруппы, которые могут быть модифицированы с целью присоединения белков, сахаров и других биологически активных молекул для повышения сродства к опухоли и увеличения селективности накопления в раковых клетках. Полученные циклоимиды показали высокую фототоксическую активность, на порядок превышающую аналогичные параметры для известных ФС, что открывает перспективу их дальнейшего продвижения до клинических испытаний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Химическая модификация бактериопурпурина по ангидриднему циклу, приводящая к получению N-гидрокси- и N-аминоциклоимидов.
2. Изучение реакционной способности экзоциклических гидроксильной и аминогрупп циклоимидов, включая получение их O- и N- алкильных и ацильных производных.
3. Синтез катионного циклического имида бактериохлоринового ряда и тестирование его антимикробной активности.
4. Оценка фотодинамической активности полученных циклоимидов и изучение их внутриклеточного распределения.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Всероссийской конференции «Горизонты физико-химической биологии», 2000 г., Пущино, на III Съезде биохимического общества, 2002 г., Санкт-Петербург, на IX Международной конференции по химии порфиринов и их аналогов, 2003 г., Суздаль.

Публикации. Результаты работы отражены в 3 статьях, 4 тезисах конференций и Заявке на изобретение № 2002123618/04(025072), приоритет 04. 09. 2002.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 17 схем, 1 таблиц, 21 рисунков. Она состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка используемой литературы (129 ссылок).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы наблюдается повышенный интерес к производным природных хлорофиллов, содержащим дополнительный шестичленный имидный экзоцикл. Отличительными особенностями этих соединений являются повышенная стабильность и улучшенные спектральные и фотофизические свойства.

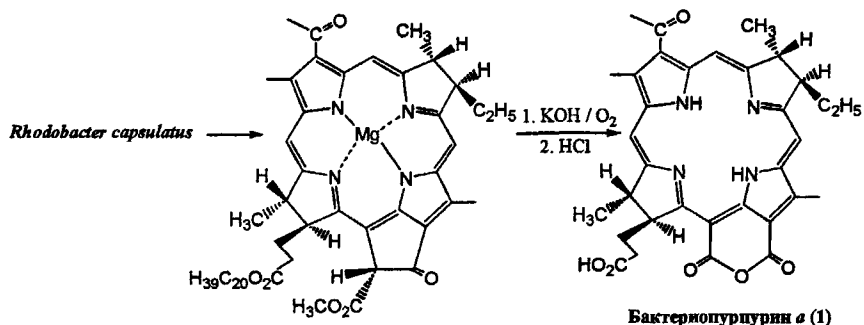
Известны два метода получения подобных циклоимидов. В обоих случаях в качестве исходных соединений используются ди- и тетрагидропорфирины с дополнительным ангидридным циклом, такие как пурпурин 18 и бактериопурпурин. В первом случае замена атома кислорода на азот осуществляется действием аминов с последующей циклизацией образующихся моноамидов под действием различных реагентов в соответствующие циклоимиды. Во втором методе, разработанном на кафедре ХТТОС, используется гидроксилламин, в результате чего циклоимиды образуются в одну стадию с высокими выходами.

Целью настоящей работы являлась разработка способов модификации ангидридного цикла бактериопурпурина и синтез производных, содержащих полярные группы для повышения общей гидрофильности молекулы пигмента.

1. ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОПУРПУРИНА

Ключевым соединением в синтезе циклоимидов являлся бактериопурпурин (БП). Для его получения был использован метод окисления бактериохлорофилла а, содержащегося в биомассе пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus** (схема 1).

Схема 1



Такой подход позволял превратить цикlopentanовый экзоцикл в молекулу бактериохлорофилла а в ангидридный, который далее может быть трансформирован в имидный

2. СИНТЕЗ N - ГИДРОЦИКЛОИМИДОВ В РЯДУ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА а

2.1. ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ БАКТЕРИОПУРПУРИНА С ГИДРОКСИЛАМИНОМ

В настоящей работе ранее разработанный на кафедре ХТТОС метод модификации ангидридного цикла пурпурина 18 под действием гидроксиламина был применен к бактериопурпурину. Наличие в структуре последнего ацетильной группы в пиррольном кольце А приводит к появлению дополнительного реакционного центра, что изменяет ход и состав продуктов реакции.

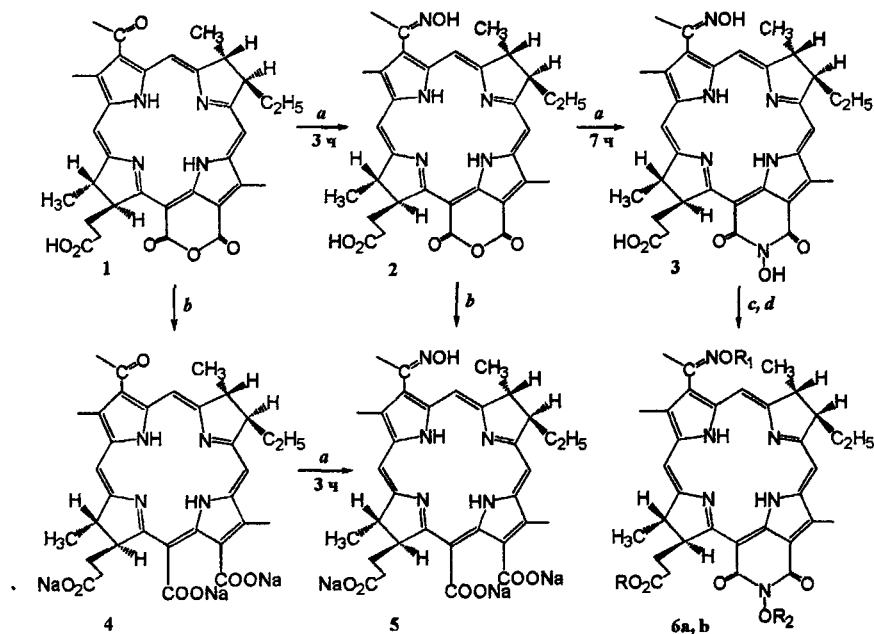
Нами было обнаружено, что в ходе реакции БП (1) с гидроксиламином первоначально образуется аддукт, молекулярная масса которого (M^+ 596) соответствует БП с одной присоединенной молекулой гидроксиламина.

*Биомассу *Rhodobacter capsulatus* выращивали в фотобиореакторе в Институте фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино., зав. лаб., д.б.н. А. А. Цыганков.

При этом в электронном спектре происходит гипсохромный сдвиг основной полосы Q с 818 нм, характерной для БП, до 792 нм.

На этом основании был сделан вывод о том, что ангидридный цикл на данном этапе реакции сохраняется, а гидроксилламин взаимодействует с ацетильной группой с образованием оксима **2** (схема 2).

Схема 2



6a: R = H; R₁ = R₂ = COCH₃

6b: R = R₂ = CH₃ (*син-*, *анти-*); R₁ = H

Реагенты: (a) - NH₂OH·HCl, C₅H₅N, 20°C; (b) - NaOH, CH₃OH, 20°C, 1 ч; (c) - Ac₂O, C₅H₅N, 20°C, 1 ч; (d) - CH₂N₂, Et₂O, 20°C, 20 мин.

Для подтверждения этого полученное соединение **2** было обработано водноспиртовым раствором щелочи. Гипсохромный сдвиг полосы Q до 745 нм и сильное уменьшение хроматографической подвижности указывают на раскрытие ангидридного цикла с образованием тринатриевой соли оксима бактериохлорина (**5**). Присоединение молекулы гидроксилламина по ацетильной группе БП было подтверждено реакцией тринатриевой соли бактериохлорина (**4**) с гидроксилламин.

Полученный оксим **5** имел спектральные характеристики и хроматографическую подвижность, идентичные с образцом, синтезированным из соединения **2**.

Анализ оксима **2** показал, что он состоит из двух соединений с одинаковой молекулярной массой и близкими значениями R_f . Данный факт связан, по нашему мнению, с образованием син- и анти- форм двух стереоизомерных оксимов, что возможно при взаимодействии кетонов с гидроксиламином.

Спектрофотометрический контроль за ходом реакции БП с гидроксиламином показал, что гипсохромное смещение полосы Q до 792 нм, соответствующее образованию оксима, происходит в течение первых 3 часов реакции, после чего эта полоса постепенно возвращается в длинноволновую область. Этот этап реакции связан с взаимодействием оксима **2** со второй молекулой гидроксилamina с образованием N-гидроксициклоимида (**3**). Реакция полностью проходит за 10 часов, что определяется по смещению длинноволновой полосы поглощения с 792 до 812 нм.

N-Гидроксициклоимид оксима бактериохлорина (**3**) охарактеризован электронным и масс-спектрами. Спектр ^1H ЯМР полученного соединения оказался малоинформативным из-за сильного уширения сигналов всех протонов. Аналогичный факт наблюдался также для N-гидроксициклоимида хлорина ρ_6 .

2.2. ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ N – ГИДРОКСИЦИКЛОИМИДА БАКТЕРИОХЛОРИНА

N-Гидроксициклоимид бактериохлорина (**3**), имея в своем составе подвижный атом водорода, легко вступал в реакции ацилирования и алкилирования. Обработка соединения **3** уксусным ангидридом привела к образованию диацетата **6a**, в масс-спектре которого имеется молекулярный ион с m/z 696.2 и интенсивные пики с m/z 638.1 и 580, соответствующие молекуле без одной или двух ацетатных групп. Данное соединение **6a** оказалось лабильным, и образование с течением времени моноацетата и исходного N-гидроксициклоимида (**3**) фиксировалось с помощью ТСХ.

Связь N-O-C в соединении **6b**, возникающая при обработке соединения **3** диазومتаном, оказалась значительно прочнее, что позволило охарактеризовать данное соединение спектром ^1H ЯМР.

В нем отчетливо виден синглет при 4.35 м.д. интенсивностью в 3H, который был отнесен к метоксильной группе, расположенной при атоме азота имидного экзоцикла.

Было показано, что продукт метилирования **6b** состоит из двух веществ с одинаковой молекулярной массой, незначительно отличающихся хроматографической подвижностью. Данные вещества были выделены в индивидуальном состоянии с помощью препаративной ТСХ и охарактеризованы спектрами ^1H ЯМР. За исключением положения сигналов протонов 2- CH_3 , 3 2 - CH_3 , 5-Н, расположенных близко к оксимной группе, эти спектры оказались практически идентичными, что позволяет сделать вывод о существовании стереоизомерных син- и анти- форм оксимов.

С помощью одномерной спектроскопии NOE были определены сигналы мезо-протонов бактериохлоринового макроцикла в каждом из них (рис. 1).

В данных экспериментах облучались CH_3 -группы, находящиеся во 2 и 12 положениях макроцикла, и наблюдалось изменение интенсивности сигналов мезо-протонов 20-Н и 10-Н, соответственно.

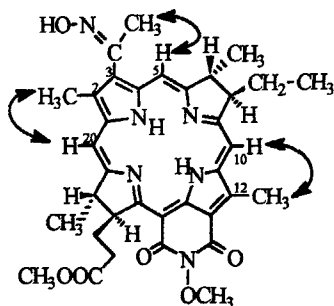


Рис. 1. Выявленные пространственные взаимодействия протонов циклоимида **6b**.

При облучении CH_3 -группы ацетильного заместителя оксима был получен аналогичный отклик для мезо-протона 5-Н, что свидетельствует об их пространственной сближенности. Облучение CH_3 -группы в метоксильном заместителе (4.35 м.д.) не привело к отклику ни одного сигнала в спектре ^1H ЯМР циклоимида, что подтверждает изолированное положение метоксильной группы в молекуле.

В настоящей работе впервые в ряду бактериохлоринов получены производные N-гидроxicиклоимидов, которые могут быть далее функционализированы с целью получения новых высокоэффективных ФС.

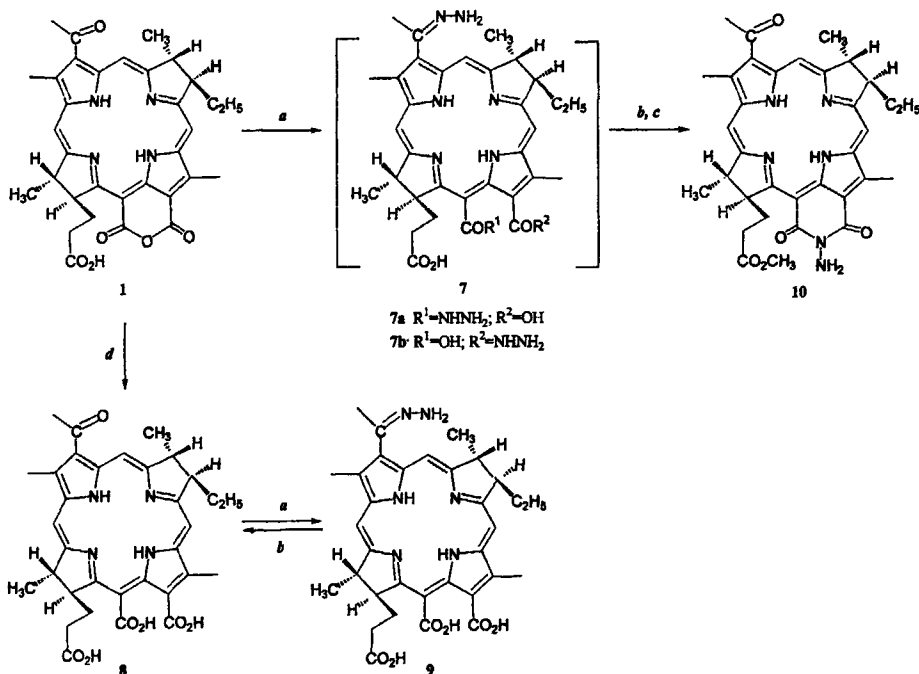
3. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a* С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ N - АМИНОИМИДНЫМ ЦИКЛОМ

3.1. ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ БАКТЕРИОПУРПУРИНА С ГИДРАЗИНОМ

В рамках исследования взаимодействия БП с сильными нуклеофильными агентами нами была изучена реакция БП с гидразином. Гидразин и его производные обнаруживают чрезвычайно высокую нуклеофильную активность по отношению к углеродным атомам с sp^2 -гибридизацией. В связи с этим ангидриды кислот являются удобными реагентами для ацилирования гидразина.

При добавлении к раствору бактериопурпурина (1) в пиридине гидразингидрата практически моментально происходит гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения в область 750 нм, что соответствует раскрытию ангидридного цикла и образованию смеси изомерных моногидразидов 7а и б (схема 3).

Схема 3



Реагенты: а - N_2H_4 , H_2O , пиридин; б - $1N\ HCl$; в - CH_2N_2 , Et_2O ; д - $NaOH$, CH_3OH .

Спектрофотометрический контроль за ходом реакции показал, что с течением времени появляется новая полоса поглощения при 834 нм, свидетельствующая о самопроизвольной циклизации моногидразидов. Добавление в реакционную среду соляной кислоты приводит к быстрому образованию экзоцикла. Конечный продукт **10** представлял собой не ожидаемый гидразон, а содержал свободную ацетильную группу в положении 3 макроцикла.

Предположение о возможном образовании гидразона в ходе реакции и последующем его гидролизе в кислой среде было подтверждено реакцией бактериохлорина p_6 (**8**) с гидразином. Продукт **9** выделяли, не используя кислот. Масс-спектр последнего, в котором присутствует молекулярный ион с m/z 614.4, подтвердил образование гидразона, последующий кислотный гидролиз которого привел к исходному бактериохлорину p_6 .

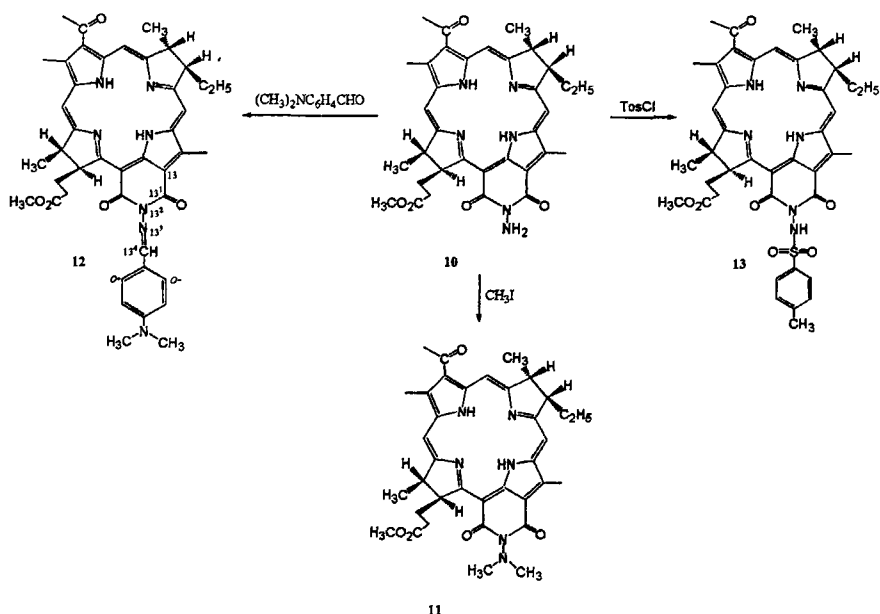
3.2. ГИДРАЗИДЫ БАКТЕРИОХЛОРИНА p_6

Особенностью реакции гидразина с ангидридами дикарбоновых кислот является возможность увеличения размера исходного цикла с образованием 1,2-дизамещенных гидразидов. В случае бактериопурпурина это могло приводить к образованию гидразида с шести- или семи-членным экзоциклом. Определение размера цикла в циклоимиде **10** проводилось с помощью химических модификаций последнего, а также с привлечением спектроскопии ЯМР.

Спектр ^1H ЯМР соединения **10** в CDCl_3 оказался неинформативен из-за отсутствия в нем сигналов протонов при атомах азота экзоцикла. Введение в экзоцикл двух дополнительных метильных групп путем обработки соединения **10** метилиодидом с образованием диметильного производного **11** (схема 4) привело к появлению в спектре ^1H ЯМР двух близко расположенных синглетов при 3.37 и 3.36 м.д. и позволило привлечь метод двумерной гетероядерной корреляции (НМВС) для выяснения вопроса о размере экзоцикла**.

В спектре НМВС отсутствуют кросс-пики протонов метильных групп при атоме азота с карбонильными атомами углерода, что свидетельствует о наличии между ними не менее четырех связей ($\text{C}13^1\text{--N}13^2\text{--N}13^3\text{--C}13^4\text{--H}13^5$) и подтверждает шести-членную структуру экзоцикла (рис. 2).

**ЯМР исследования выполнены в ИОХ им. Н. Д. Зелинского РАН, к.х.н. Ф. В. Тоукачем.



В случае семичленного цикла таких связей было бы три ($C13^1-N13^2-C13^3-N13^4$) и наблюдалось бы $^{13}C - ^1H$ взаимодействие.

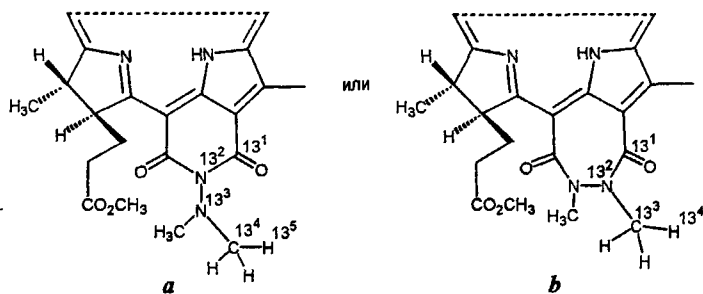


Рис. 2. Возможные варианты экзоцикла в гидразиде 11.

Различие химических сдвигов двух метильных групп является, по-видимому, следствием заторможенного вращения последних вокруг связи N-N.

Подтверждением этому являются данные спектра 1H ЯМР, снятого при нагревании образца до $50^\circ C$, в результате чего происходит слияние двух сигналов

CH₃-групп при атоме азота в один синглет интенсивностью в 6 протонов, что подтверждает наличие в молекуле N,N-диметиламиногруппы (рис. 3).

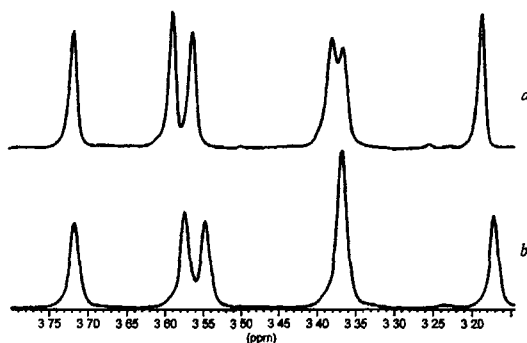


Рис. 3. Фрагмент ¹H ЯМР спектра соединения 11: а – при температуре 290К; б – при температуре 323К.

Химический подход к доказательству структуры циклоимида **10** включал его взаимодействие с 4-диметиламинобензальдегидом (схема 4). В спектре ¹H ЯМР полученного соединения **12** имеется добавочный сигнал атома водорода, находящийся в слабом поле рядом с сигналом 20-Н мезо-протона (8.64 и 8.61 м.д.).

Для их отнесения использовали спектроскопию 1D NOE, облучая протоны в орто-положениях фенильного кольца. В результате наблюдалось изменение интенсивности сигнала протона при ¹³C углеродном атоме (8.64 м.д.).

Обработка последнего триацетоксиборгидридом натрия (для сохранения ацетильной группы в макроцикле) не привела к восстановлению связи C=N и с течением времени он разрушался с образованием исходного циклоимида **10**.

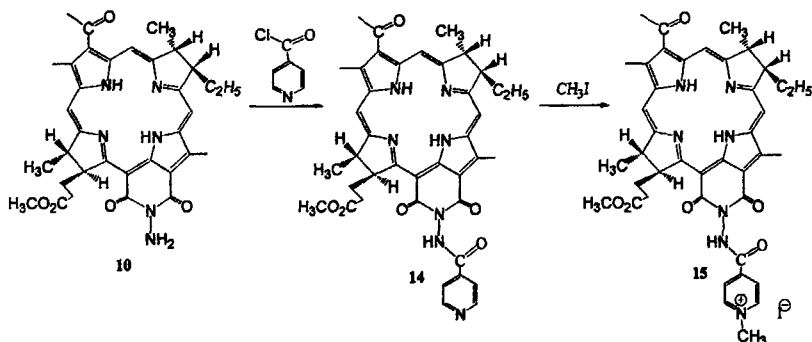
Более удачный вариант модификации циклоимида **10** имел место при обработке последнего тозилхлоридом (схема 4). Сульфамид **13** был получен с высоким выходом и являлся стабильным соединением, которое в дальнейшем может быть использовано для модификации молекулы пигмента.

Для N-гидрокси- и N-аминоциклоимидов и их производных характерно bathochromное смещение основной полосы поглощения в район 830-836 нм, что превосходит аналогичные характеристики для бактериопурпурина на 12-17 нм, при сохранении высоких значений коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon = 30000$).

4. СИНТЕЗ КАТИОННОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА

Для усиления гидрофильных свойств полученного N-аминоциклоимида **10** проводилась модификация аминогруппы за счет присоединения к ней заряженной пиридиновой группировки. С этой целью циклоимид **10** конденсировали с хлорангидридом изоникотиновой кислоты, а производное **14** обрабатывали метилиодидом (схема 5). Полученное соединение **15** обладало чрезвычайно низкой хроматографической подвижностью.

Схема 5



Для подтверждения структур циклоимидов **14** и **15** были сняты спектры ^1H ЯМР, в которых наблюдалось удвоение сигналов всех протонов, что указывало на присутствие в образце двух изомеров. Их существование, по-видимому, связано с затрудненным вращением вокруг связи $\text{C}(\text{O})\text{-N}$, которое возникает в результате сопряжения неподеленной электронной пары азота и π -электронов карбонильной группы.

В связи с этим были сняты спектры ^1H ЯМР соединений **14** и **15** при 50°C и подтверждены приведенные структуры циклоимидов **14** и **15**.

Катионный фотосенсибилизатор **15** обладает растворимостью в водноспиртовых растворах, что позволит в будущем окончательно отказаться от использования Кремофора при приготовлении водорастворимых форм пигмента для биологических испытаний.

5. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ И АНТИФУНГИЦИДНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ***

Тестирование катионного циклоимида **15** и его синтетического предшественника **14** проводилось по методу фотоиндуцированного подавления биолюминесценции генно-инженерного штамма светящихся грамотрицательных бактерий. В отличие от циклоимида **14**, не имеющего в структуре заряженных групп, ФС **15** вызывал фотоиндуцированное подавление биолюминесценции штамма бактерий, степень которого увеличивалась с ростом концентрации фотосенсибилизатора и дозы облучения (рис.4).

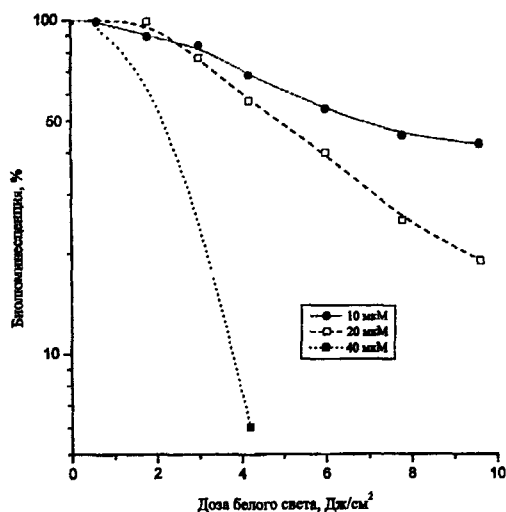


Рис. 4. Дозовые кривые подавления биолюминесценции биосенсора, проинкубированного 10 мин с различными концентрациями циклоимида **15**.

Следует отметить, что сам по себе белый свет во всем диапазоне используемых доз не оказывал влияния на интенсивность бактериальной биолюминесценции. С другой стороны, в отсутствии облучения фотосенсибилизаторы **14** и **15** не вызывали заметного подавления интенсивности биолюминесценции.

*** Исследования выполнены на кафедре биофизики МГУ им. М. В. Ломоносова под руководством с.н.с. М. Г. Страховской.

Полученные данные о фотосенсибилизирующей активности циклоимидов **14** и **15** хорошо согласуются с их физико-химическими свойствами, определяющими эффективность связывания с клетками-мишенями.

Как известно, внешняя поверхность бактериальных клеток имеет отрицательный заряд. Очевидно, что наиболее эффективного связывания с бактериальными клетками и, следовательно, фотодинамического действия, следует ожидать от катионного ФС, что и наблюдалось в случае использования циклоимида **15**.

Изучение антифунгицидной активности показало, что катионный фотосенсибилизатор **15** обладает не только антибактериальной активностью, но и проявляет высокую эффективность в инактивации дрожжей рода *Candida guilliermondii*. Фоточувствительность ($1/LD_{50}$) культур дрожжей при использовании 5 мкМ циклоимида **15** составляет около $0,42 \text{ см}^2/\text{Дж}$ (рис. 5).

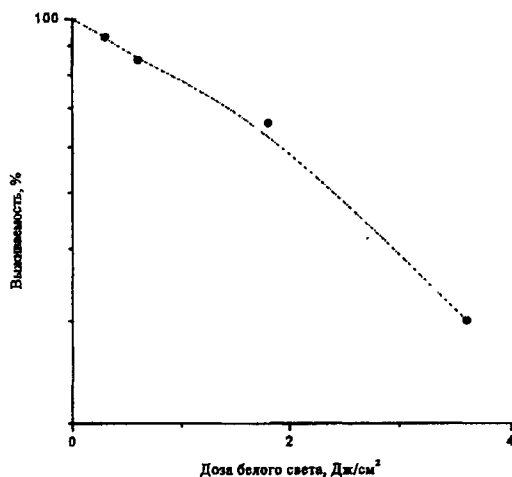


Рис. 5. Дозовая кривая инактивации дрожжей, проинкубированных 10 мин с 5 мкМ циклоимида **15**.

Учитывая тот факт, что длинноволновый максимум поглощения циклоимида **15** располагается при 830 нм (область высокой оптической проницаемости биологической среды), последний в сочетании с соответствующим лазерным источником излучения может быть использован для фотосенсибилизации плотных культур микроорганизмов.

Таким образом, катионный фотосенсибилизатор **15** имеет широкий спектр антимикробной активности и может быть использован для фотодинамической инактивации про- и эукариотных микроорганизмов.

6. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ N – ГИДРОКСИ- И N – АМИНОЦИКЛОИМИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Для анализа накопления, распределения и взаимодействий соединений в клетках был использован метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции двух- и трехмерных спектральных изображений (КОМИРСИ)****.

Показано, что с использованием эмульсии Кремофора в качестве стабилизатора мономерной формы удастся обеспечить высокое проникновение циклоимидов **6b**, **10** и **11** в клетки аденокарциномы легкого человека A549, эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEp2, рака шейки матки человека HeLa и в клетки эритроидной лейкемии человека K562.

Для исследуемых соединений **6b**, **10** и **11** характерно избирательное накопление в липидных каплях, клеточных органеллах, ответственных за хранение и метаболизм нейтральных липидов.

При облучении светом мембранно-связанные производные **6b** и **11** характеризуются достаточно высокими квантовыми выходами генерации синглетного кислорода (0.53 и 0.47, соответственно), что выше аналогичного параметра для бактериохлорина (0.33).

Вне зависимости от внутриклеточной локализации гидразиды бактериохлоринового ряда обладают высокой фотоцитотоксичностью*****.

Так, для соединений **10** и **11** ИК₅₀ и ИК₉₀ составили 0.3, 0.98 и 0.19, 0.44 мкмоль/л, соответственно.

****Исследования выполнены в ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, под руководством с.н.с. А. В. Феофанова.

*****Исследования выполнены в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П. А. Герцена под руководством профессора Р. И. Якубовской.

Тогда как для известных фотосенсибилизаторов, например, хлорина ρ_6 эти концентрации составили 2.8, 4.5; для формилхлорина ρ_6 – 6.7, 9.2, а для препарата Фотосенс – 5.0 и 9.8 мкмоль/л.

В отсутствии светового облучения гидразиды, в концентрациях многократно превышающих фототоксические, не влияют на рост клеточной культуры.

Таким образом, полученные гидразиды **10** и **11** являются высокоактивными фотосенсибилизаторами нового поколения, поглощающими в длинноволновой области спектра.

7. ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения циклических имидов бактериохлоринового ряда.
2. Получен ряд новых производных циклоимидов бактериохлоринового ряда, обладающих повышенной стабильностью, поглощающих в ближней ИК-области спектра с улучшенными фотофизическими свойствами.
3. Разработан метод получения катионных фотосенсибилизаторов бактериохлоринового типа, обладающих высокой антимикробной активностью.
4. Изучены фотодинамические свойства циклоимидов бактериохлоринового ряда.

Выражаю особую благодарность моему учителю доценту М. А. Грину и коллегам: профессору Р. И. Якубовской, д.б.н. А. А. Цыганкову, с.н.с. А. В. Феофанову, с.н.с. Т. А. Кармаковой, с.н.с. М. Г. Страховской и к.х.н. Ф. В. Тоукачу.

8. Список публикаций

1. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский, А.В. Сегеневич, Д.В. Дзарданов, К.В. Головин, А.А. Цыганков, Я.К. Шим. Разработка новых фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда для фотодинамической терапии рака. // *Биоорганическая химия*. – **2003**. – Т. 29. – № 2. – С. 214-221.
2. A.F. Mironov, M.A. Grin, A.G. Tsiprovskiy. Synthesis of the first N-hydroxycycloimide in the bacteriochlorophyll a series. // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – **2002**. – V.6. – № 5. – P. 358-361.
3. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский. Синтез N-гидроксициклоимидов в ряду бактериохлорофилла а. // Деп. в ВИНТИ № 1432-B2001. БУ«Депонированные научные работы». – **2001**. – № 8.
4. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский, С.А. Зыков. Разработка сенсибилизаторов на основе бактериохлорофилла а для направленного внутриклеточного транспорта. Школа-конференция «Горизонты физико-химической биологии». // Тезисы стендовых сообщений. - Пущино. - **2000**. - С.145.
5. М.А. Грин, А.Г. Ципровский, Д.В. Дзарданов, К.В. Головин. Синтез и изучение свойств гидрофильных производных бактериохлорофилла со спейсерными группами для направленного внутриклеточного транспорта. III Съезд биохимического общества. // Тезисы докладов. - Санкт-Петербург. - **2002**. - С. 151.
6. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский, К.В. Головин, А.Н. Бровкин. Амфифильные фотосенсибилизаторы бактериохлоринового ряда для фотодинамической терапии. IX Международная конференция по химии порфиринов и их аналогов. // Тезисы докладов. - Суздаль. - **2003**. - С. 308 – 309.
7. А.В. Феофанов, Т.А. Кармакова, Р.И. Якубовская, А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский, А.И. Гришин, Ж.-К. Моризо, П. Вини, И.Р. Кассис, К. Отто. Новые ИК – фотосенсибилизаторы на основе циклоимидных производных бактериохлорина. IX Международная конференция по химии порфиринов и их аналогов. // Тезисы докладов. - Суздаль. - **2003**. - С. 332 – 334.
8. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский, Д.В. Дзарданов, К.В. Головин, А.В. Феофанов, Т.А. Кармакова, Р.И. Якубовская. Гидразиды в ряду бактериохлорофилла а, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения. // Заявка на изобретение № 2002123618/04(025072), приоритет 04. 09. 2002.



Принято к исполнению 20/11/2003
Исполнено 21/11/2003

Заказ № 444
Тираж: 80 экз.

ООО «НАКРА ПРИНТ» ИНН 7727185283
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 318-40-68
www.autoreferat.ru

2003-A

19326

#19326