

Рузиев Рамзес Джауланович

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ
ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛОИМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ХЛОРИНА P_4**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**



Москва – 2005

Работа выполнена на кафедре химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор

Миронов Андрей Федорович

Официальные оппоненты:
доктор химических наук

Рудакова Инна Павловна

кандидат химических наук

Жестков Владимир Павлович

Ведущая организация: Ивановский государственный химико-технологический университет

Защита состоится «26» сентября 2005 г. 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, д. 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «18» августа 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник



Лютик А.И.

2006-4
11853

3

2169399

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

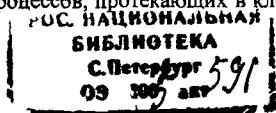
Актуальность проблемы. Успешное применение фотодинамической терапии (ФДТ) в клинике при лечении онкологических заболеваний стимулировало поиск новых высокоэффективных сенсibilизаторов, фотофизические характеристики которых, тропность к злокачественным новообразованиям, низкая фототоксичность и хорошее выведение из организма превосходили бы известные препараты первого поколения.

Одним из перспективных направлений при разработке подобных фотосенсибилизаторов является химическая модификация природных хлоринов, позволяющая оптимизировать гидрофильно-гидрофобный баланс заместителей в макроцикле, влияющий на накопление хлоринов в опухолевых клетках, а также улучшать их фотофизические свойства и растворимость в физиологических средах.

В ряду природных хлоринов особый интерес представляет пурпурин 18. Его отличительной чертой является наличие дополнительного ангидридного цикла и смещение основной полосы поглощения до 698 нм. Хорошие спектральные характеристики, доступность и высокая реакционная способность послужили основными критериями при выборе пурпурина 18 в качестве исходного соединения для разработки новых фотосенсибилизаторов второго поколения. Превращение ангидридного кольца пурпурина 18 в имидный цикл помимо смещения максимума поглощения в длинноволновую область, существенно повышает устойчивость данных соединений. Наиболее изученными представителями этого класса хлоринов являются гидрофобные *N*-алкилциклоимидные производные пурпурина 18, впервые полученные в группе К. Смита (США).

В связи с особым вниманием, проявляемым в последние годы к амфифильным сенсibilизаторам, представляло интерес расширить круг циклоимидов за счет гидроксилсодержащих производных и более глубоко изучить их химические и биологические свойства, включая накопление в раковых клетках и фотодинамическую активность *in vitro* и *in vivo*. К началу настоящей работы группа известных амфифильных циклоимидов была немногочисленна и их фотобиологические свойства мало изучены.

Данная работа является частью научных исследований, проводимых на кафедре ХТБАС в рамках темы № 1Б-4-865 "Синтез супрамолекулярных структур на основе порфиринов, липидов и углеводов с целью изучения процессов, протекающих в клетке



и создания препаратов для онкологии, генной терапии и других областей медицины” и гранта Президента РФ по поддержке Ведущих научных школ России НШ-2013.2003.3.

Цель работы. Целью настоящей работы явился синтез и изучение химических превращений *N*-гидрокси- и *N*-(ω -гидроксиалкил)циклоимидных производных хлорина p_6 . Основные направления исследования включали региоспецифическое введение гидроксильной группы в пиррольное кольцо D, модификацию винильной группы в пиррольном кольце A и окисление кольца B. В задачу исследования входило получение циклических имидов хлорина p_6 с интенсивным поглощением в красной области спектра, содержащих гидрофильные и гидрофобные группы в противоположных участках макроцикла, для выяснения влияния этих заместителей на накопление в раковых клетках и ФДТ активность.

Научная новизна. Изучена возможность введения дополнительной гидроксильной группы в пиррольное кольцо D циклоимидов хлорина p_6 , содержащих при атоме азота гидроксильную и ω -гидроксиалкильную группы. Показано, что раскрытие δ -лактонов циклоимидов в кислой и щелочной средах, а также под действием амина приводит к ранее неизвестным циклоимидам, содержащим гидроксильную группу в положении 18 макроцикла. Установлено, что гидролиз δ -лактонного кольца в *N*-(ω -гидроксиалкил)циклоимиде протекает с более высоким выходом в щелочной, а в циклоимиде с N-OR группой – в кислой средах. Получены ранее не описанные 18-гидрокси-*N*-(3-гидроксипропил)- и 18-гидрокси-*N*-ацетоксициклоимиды хлорина p_6 . Раскрытие δ -лактонного кольца *N*-(3-гидроксипропил)циклоимид хлорина p_6 под действием диэтанолamina приводит к образованию диэтанолamида 18-гидрокси-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимид хлорина p_6 . Показано, что для получения 18-гидрокси-*N*-гидроксициклоимид хлорина p_6 наиболее оптимальным является способ модификации 18-гидрокси-пурпурина 18 гидроксилaminом в пиридине. Взаимодействием пурпурина 18 и *O*-гликозилированного гидроксилamina – *O*- β -D-галактопиранозилгидроксилamina впервые получен *N*-гликозилоксициклоимид хлорина p_6 .

Окислением винильной группы пиррольного кольца A и двойной связи кольца B циклоимидов хлорина p_6 тетраоксидом осмия получены ранее неизвестные *N*-метокси- и *N*-(3-гидроксипропил)циклоимиды 3-формил-7,8-дигидроксибактериохлоринов с интенсивным поглощением в области 821-825 нм.

Показано, что при обработке комплексом Вильсмейера производных хлорофилла *a* формилирование протекает по винильной группе в положении 3, не затрагивая δ -мезо-мостик.

Практическая значимость. Разработанные методы получения амфифильных циклоимидов хлорина p_6 путем направленного введения гидроксильной группы в пиррольное кольцо D, формилирования винильной группы в пиррольном кольце A и окисления кольца B существенно расширяют возможности модификации *N*-гидрокси- и *N*-(ω -гидроксипалкил)циклоимидов хлорина p_6 . Реакция пурпурина 18 с *O*- β -D-галактопиранозилгидроксиламином представляет интерес как возможность введения углеводного остатка в молекулу циклоимида. Этот подход не требует дополнительной защиты гидроксильных групп углевода. *N*-Гликозилоксициклоимид хлорина p_6 представляет собой новый тип потенциальных сенситизаторов с повышенной специфичностью к раковым опухолям. Улучшен ранее известный способ получения *N*-(ω -гидроксипалкил)циклоимидов хлорина p_6 взаимодействием пурпурина 18 с аминокспиртами, что позволило наработать эти соединения в количествах, необходимых для более глубокого исследования их фотобиологических свойств. В ходе выполнения работы синтезированы циклоимиды хлорина p_6 и бактериохлорина с интенсивным поглощением в области 708-825 нм. Они различаются количеством и местоположением полярных групп в макроцикле. Направленная модификация хлоринового макроцикла создает возможность проведения исследований возможной зависимости биологической активности синтезированных циклоимидов хлорина p_6 от их структуры. Наличие в циклоимидах реакционноспособных групп позволяет проводить дальнейшие модификации данных соединений, в частности, использовать их в синтезе конъюгатов направленного транспорта к злокачественным опухолям.

Образцы полученных циклоимидов были переданы для исследования селективности накопления в опухолях и оценки фотодинамической активности в Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, а также в Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработка регио- и стереонаправленного метода введения гидроксильной группы в пиррольное кольцо D в ряду *N*-гидрокси- и *N*-(ω -гидроксипалкил)циклоимидов хлорина p_6 . Получение ранее неизвестных

хлоринов: *N*-(3-гидроксипропил)-, *N*-гидрокси-, *N*-ацетоксициклоимидов и диэтаноламида *N*-(3-гидроксипропил)циклоимида хлорина p_6 , содержащих гидроксильную группу в положении 18.

2. Взаимодействие метилового эфира пурпурина 18 с *O*- β -D-галактопиранозилгидроксиламином как один из способов синтеза *N*-гликозилоксидоимидов с использованием *O*-гликозилированных гидроксиламинов.
3. Селективное формилирование винильной группы в ряду циклоимидных производных хлорина p_6 под действием реагента Вильсмейера с образованием 3-(2-формилвинил)- *N*-гидрокси- и *N*-ацетоксициклоимидов хлорина p_6 .
4. Синтез ранее неизвестных *N*-(3-гидроксипропил)- и *N*-метоксициклоимидов 7,8-дигидроксибактериохлоринов с интенсивным поглощением в области 820 нм.
5. Изучение физико-химических свойств синтезированных амфифильных производных хлорина p_6 и оценка влияния заместителей на спектральные характеристики.

Апробация работы. Основные результаты опубликованы в 3 статьях, а также доложены на XX Международной конференции по фотохимии в 2001 г., г. Москва; III Съезде Биохимического общества в 2002 г., г. Санкт-Петербург; V Школе-конференции молодых ученых стран СНГ по химии порфиринов и родственных соединений в 2002 г., г. Звенигород; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Отечественные противоопухолевые препараты" в 2003 г., г. Москва; IX Международной конференции по химии порфиринов и их аналогов в 2003 г., г. Суздаль; X Конгрессе европейского общества по фотобиологии в 2003 г., г. Вена, X Международной научно-технической конференции "Наукоемкие химические технологии - 2004" в 2004 г., г. Волгоград.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных данных, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 99 источника. Работа содержит 27 схем и 2 таблиц.

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА *N*-ГИДРОКСИ- И *N*-(ω -ГИДРОКСИАЛКИЛ)ЦИКЛОИМИДОВ ХЛОРИНА P_6

Известно, что введение гидроксильных групп в гидрофобные производные природного хлорофилла *a* существенно изменяет их амфифильность. При этом гидроксильные группы могут находиться как непосредственно в макроцикле, так и в составе боковых заместителей. Известно, что амфифильные вещества хорошо накапливаются в опухолях. Особый интерес представляют соединения, в которых гидрофобные и гидрофильные заместители расположены в противоположных участках макроцикла. Они легче проникают в клетку и затем концентрируются в ее жизненно важных элементах. Создание новых сенситизаторов с различным расположением полярных (гидроксильных и карбоксильных) заместителей в хлориновом макроцикле представляет интерес для изучения механизмов накопления фотосенситизаторов в опухолях, выявления сайтов их локализации в раковых клетках и установления взаимосвязи между характером локализации и фотодинамической активностью сенситизатора.

В настоящей работе получение циклоимидов хлорина P_6 осуществлялось превращением ангидридного кольца пурпурина 18 в имидный цикл, содержащий при атоме азота гидрокси- и ω -гидроксильные группы. В целях улучшения спектральных характеристик и введения полярных групп в макроцикл осуществлялась дальнейшая их модификация гидроксильрованием пиррольного кольца D, окислением винильной группы пиррольного кольца A и двойной связи кольца B, а также формилированием винильной группы медных и никелевых комплексов циклоимидов комплексом Вильсмейера.

Пурпурин 18 получали окислением хлорофилла *a*, предварительно экстрагированного из сине-зеленых водорослей *Spirulina platensis*, кислородом воздуха в щелочных условиях по технологии, отработанной на кафедре ХТБАС МИТХТ им. М.В.Ломоносова. Метилловый эфир пурпурина 18 синтезирован обработкой пурпурина 18 диазومتаном.

1. Модификация ангидридного кольца пурпурина 18

Превращение ангидридного кольца пурпурина 18 (1a) (схема 1) в имидный цикл действием аминоспиртов позволяет легко варьировать ω -гидроксильные

заместители в хлориновом макроцикле. Для выяснения влияния длины данного фрагмента на биологическую активность циклоимидов хлорина p_6 нами были синтезированы как известные N -(2-гидроксиэтил)-, N -(3-гидроксипропил)-

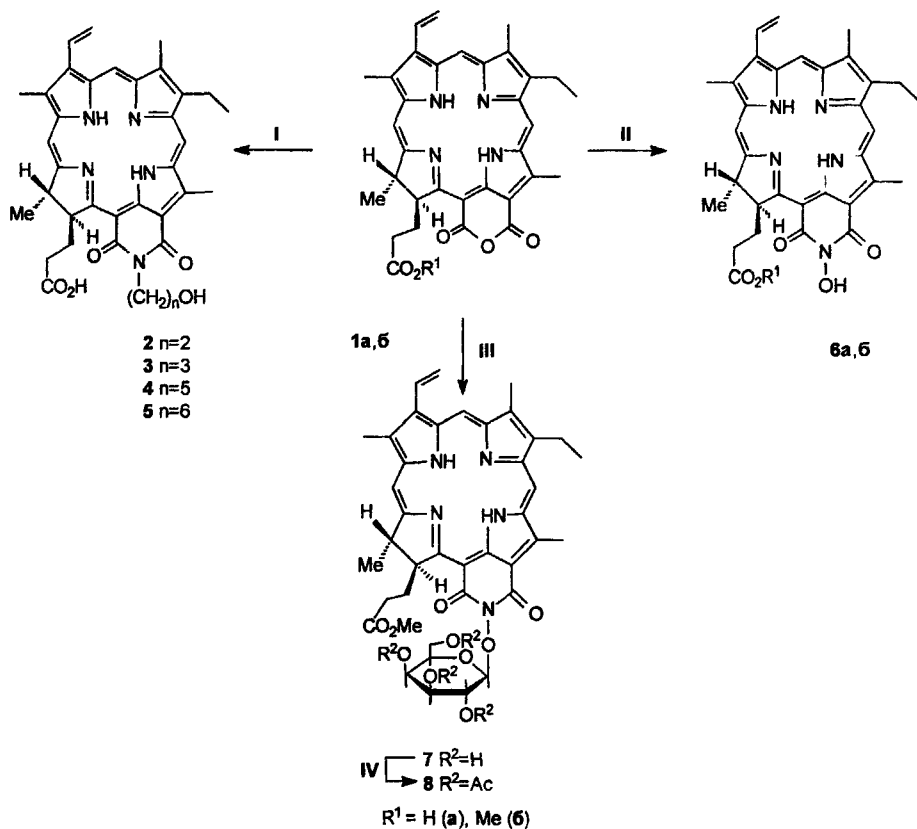


Схема 1. Синтез N -(ω -гидроксикал)-, N -гидрокси- и N -галактозилоксициклоимидов хлорина p_6 .

Реагенты и условия проведения реакции: I – $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, CHCl_3 , 25°C (1), $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ или Ac_2O (2), NaHCO_3 или NaOH (3); II – $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 25°C ; III – O - β -D-галактопиранозилгидроксиламин, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$; IV – Ac_2O , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$.

циклоимиды (2), (3), так и ранее неописанные N -(5-гидроксипентил)- (4) и N -(6-гидрогексил)- (5) циклоимиды хлорина p_6 . В ходе работы было установлено, что циклоимиды (4) и (5) описанным способом получаются с низким выходом. С целью повышения выхода циклоимидов было увеличено втрое время выдерживания пурпурина 18 (1a) с 5-аминопентанолом и 6-аминогексанолом, а также произведена

замена уксусного ангидрида на трифторуксусный ангидрид при циклизации промежуточно образующихся моноамидов хлорина p_6 . Однако наиболее предпочтительной модификацией метода, на наш взгляд, явилась замена бикарбоната натрия при нейтрализации избытка ангидрида на 5%-ный раствор гидроксида натрия. Это позволило получить ранее неизвестные *N*-(5-гидроксипентил)- (4) и *N*-(6-гидрогексил)- (5) циклоимиды с выходом 32-35%, а выход *N*-(2-гидроксиэтил)- (2) и *N*-(3-гидроксипропил)- (3) циклоимидов увеличить до 45-47%. По своим характеристикам (хроматографической подвижности и электронным спектрам) синтезированные соединения (2) и (3) соответствуют ранее полученным циклоимидам. Структура циклоимидов (4) и (5) подтверждена данными ^1H ЯМР, масс- и абсорбционной спектроскопии. *N*-(5-Гидроксипентил)- (4) и *N*-(6-гидрогексил)- (5) циклоимиды хлорина p_6 имеют максимум поглощения в области 708 нм. Масс-спектры этих хлоринов содержат пики молекулярных ионов с m/z 650.5 и 664.3.

Другой тип циклоимидов хлорина p_6 , полученный модификацией ангидридного кольца пурпурина 18 и использованный нами в дальнейших превращениях, содержал гидроксильную группу непосредственно у атома азота. *N*-Гидроксициклоимид (6а) получали в одну стадию взаимодействием пурпурина 18 (1а) с гидрохлоридом гидроксиламина в пиридине с выходом 70%. Метилловый эфир пурпурина 18 (1б) в этих условиях реагирует с образованием циклоимид (6б) с выходом 93%. По сравнению с *N*-(ω -гидроксиалкил)циклоимидами *N*-гидроксициклоимиды (6а) и (6б) имеют больший сдвиг максимума поглощения в ИК область и поглощают при 718 нм. В спектре ^1H ЯМР метилового эфира *N*-гидроксициклоимид хлорина p_6 (6б) в слабом поле при δ 9.16 м.д. имеется уширенный синглет интенсивностью в один протон, который был отнесен к гидроксилу при атоме азота имидного кольца. В ИК-спектре соединения (6б) наблюдаются полосы валентных колебаний C=O связей сложноэфирной группы и имидного кольца при 1732, 1693 и 1600 cm^{-1} , а также полоса валентных колебаний O-H связи гидроксильной группы при атоме азота при 3583 cm^{-1} .

Нами для модификации ангидридного кольца пурпурина 18 в имидный цикл предложено *O*-гликозилированное производное гидроксиламина – *O*- β -D-галактопиранозилгидроксиламин¹. Показано, что метилловый эфир пурпурина 18 (1б) реагирует с *O*- β -D-галактопиранозилгидроксиламином в пиридине при комнатной температуре с образованием *N*-галактозилоксициклоимид (7) При этом, что особенно важно, превращение в циклоимид осуществляется без

¹ *O*- β -D-Галактопиранозилгидроксиламин синтезирован на кафедре ХТБАС МИТХТ им. М.В. Ломоносова в лаборатории проф. Ю.Л. Себякина.

предварительной защиты гидроксильных групп углевода. Циклоимид (7) имеет максимум поглощения при 714 нм. Его масс-спектр содержит пик молекулярного иона с m/z 756.2. Полученный циклоимид содержит четыре гидроксильные группы, увеличивающие его гидрофильность. Обработка соединения (7) уксусным ангидридом в пиридине приводит к *N*-галактозилоксициклоимиду (8). В спектре ^1H ЯМР соединения (8) сигналы, отнесенные к протонам остатка галактозы, наблюдаются в областях 5.50 - 5.30 и 4.44 - 4.03 м.д., протоны ацетоксигрупп – в области 2.42 – 1.90 м.д. Сигнал аномерного протона находится при 4.44 м.д., что указывает на сохранение β -конфигурации аномерного центра. Масс-спектр соединения (8) содержит пик с m/z 924.5 ($M^+ + \text{H}$).

Таким образом, за счет модификации ангидридного кольца пурпурина 18 получены три типа хлоринов с шестичленным имидным циклом, отличающиеся заместителями у атома азота. Первый тип – *N*-замещенные циклоимиды, содержащие остатки алифатических спиртов. Второй тип представляют циклоимиды с гидроксильной группой у атома азота. Третий тип – *N*-гликозилоксициклоимид. У синтезированных соединений по сравнению с пурпурином 18 наблюдается bathochromный сдвиг максимума поглощения и повышенная устойчивость в щелочных средах. Введение в структуру гидрофобного макроцикла гидрофильного углеводного заместителя позволяет улучшить растворимость сенсibilизатора в полярных растворителях и повысить его накопление в опухолях. Благодаря потенциальной специфичности β -галактозидов к галектинам, интенсивно экспрессируемым на поверхности раковых клеток, можно ожидать, что наличие галактозного фрагмента в составе циклоимида хлорина p_6 позволит осуществить его направленный транспорт к опухоли.

2. Модификация *N*-гидроксициклоимидов хлорина p_6

Нами выполнен ряд модификаций по гидроксильной группе в *N*-гидроксициклоимидах хлорина p_6 . Так, при обработке *N*-гидроксициклоимида (6a) diazometаном получен *N*-метоксициклоимид (9) с выходом 89% (схема 2). Наличие подвижного атома водорода в *N*-гидроксициклоимидах хлорина p_6 также позволяет легко осуществлять ацилирование.

Показано, что хлорангидрид монохлоруксусной кислоты взаимодействует с *N*-гидроксициклоимидом (6b) в хлористом метиле в присутствии пиридина при комнатной температуре, давая *N*-хлорацетоксициклоимид (11) с выходом 73%. Его

масс-спектр содержит пики с m/z 670.2 (M^+) (75.5%) и 672.2 (M^+) (24.5%), что соответствует природному распределению ионов ^{35}Cl и ^{37}Cl .

N-Ацетоксициклоимиды (10а) и (10б), ранее синтезированные ацилированием *N*-гидроксициклоимидов (6а) и (6б) уксусным ангидридом в диоксане, в данной работе получены с более высокими выходами (80-84%) взаимодействием пурпурина 18 (1а) и (1б) и гидроксиламина с последующей обработкой реакционной смеси уксусным ангидридом без выделения промежуточного продукта. Замена по гидроксильной группе сопровождается небольшим гипсохромным сдвигом основного максимума поглощения в электронных спектрах циклоимидов с 718 до 710-711 нм.

Наличие в спектрах ^1H ЯМР циклоимидов (9), (10а,б) и (11) синглетов трех *мезо*-протонов, протонов винильной, метильных и метиленовых групп, а также сигналов 17-Н и 18-Н свидетельствует о сохранении хлоринового макроцикла. Наблюдаемые в спектрах соединений (9) и (11) дополнительные синглеты интенсивностью

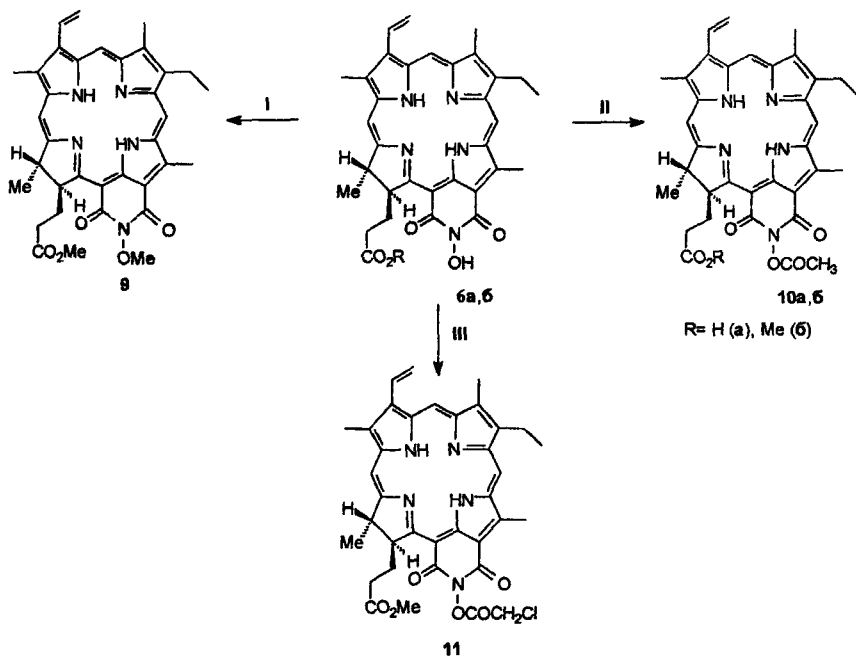


Схема 2. Химические превращения *N*-гидроксициклоимидов хлорина р₆.

Реагенты: I – CH_2N_2 , CHCl_3 ; II – Ac_2O , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$;

III – ClCH_2COCl , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, CHCl_3 .

в три и два протона при δ 4.70 и 4.37 м.д. были отнесены к метокси- и хлорацетоксигруппам при атоме азота. Спектры хлоринов (**10а,б**) также подтверждают строение веществ, однако содержат дополнительные сигналы, для отнесения которых нами был использован метод NOESY. В соединении (**10а**) протоны винильной группы взаимодействуют с одним из *мезо*-протонов при 9.24 м.д. и синглетом в 3Н при 3.29 м.д. В связи с этим первый сигнал отнесен к 5-*мезо*-протону, а второй – к метильной группе в положении 2. Кросс-пики 5-*мезо*-протона позволили определить положение сигнала 7-CH₃ (3.11 м.д.). Далее были найдены значения химических сдвигов для 8-C₂H₅ (3.58 м.д., кв, 1.64 м.д., т), 10-*мезо*-протона (9.49 м.д.) и 12-CH₃ (3.74 м.д.). Метильная группа в положении 2 имеет выраженный кросс-сигнал с 20-*мезо*-протоном (8.49 м.д.). Исходя из взаимодействия последнего установлены химические сдвиги для 18-Н (4.33 м.д., кв) и 18-CH₃ (1.70 м.д., д). Аналогичным образом установлено положение 17-Н. В спектре ему соответствует два уширенных дублета при 5.22 и 5.16 м.д. примерно равной интенсивности. Три протона 13⁵-CH₃ также представлены двумя синглетами при 2.62 и 2.61 м.д. Очевидно, для *N*-ацетоксциклоимида хлорина *p*₆ существуют два состояния (возможно, обусловленные расположением ацильной группы над и под плоскостью макроцикла), химический обмен между которыми происходит медленно во временной шкале ЯМР. Подтверждением такого предположения является уширение сигналов 17-Н и 13⁵-CH₃ в спектре ¹Н ЯМР при повышении температуры. Структура циклоимида (**10а**) была также подтверждена спектрами ¹³С ЯМР и двумерного гетероядерного резонанса на ядрах ¹³С и ¹Н.

Таким образом, гидроксильная группа при атоме азота имидного кольца *N*-гидроксидициклоимидного производного хлорина *p*₆ легко вступает в реакции алкилирования и ацилирования, что позволяет получать циклоимиды с *N*-OR группой с высоким выходом. Введение заместителя с атомом хлора может быть использовано в дальнейших модификациях, в том числе с целью присоединения к молекулам-носителям для осуществления направленного транспорта к раковым клеткам.

3. Введение гидроксильной группы в пиррольное кольцо D

В ходе исследований, проводящихся на кафедре ХТБАС по изучению реакции внутримолекулярной циклизации остатка пропионовой кислоты в природных хлоринах в соседнее положение 18 и дальнейших превращений образующегося δ -лактонного цикла при пиррольном кольце D, нами показано, что гидролиз δ -лактонов может быть

использован для создания дополнительного гидрофильного участка в молекулах *N*-ацетокси- и *N*-(3-гидроксипропил)циклоимидов хлорина *p*₆ (схема 3). Исходные

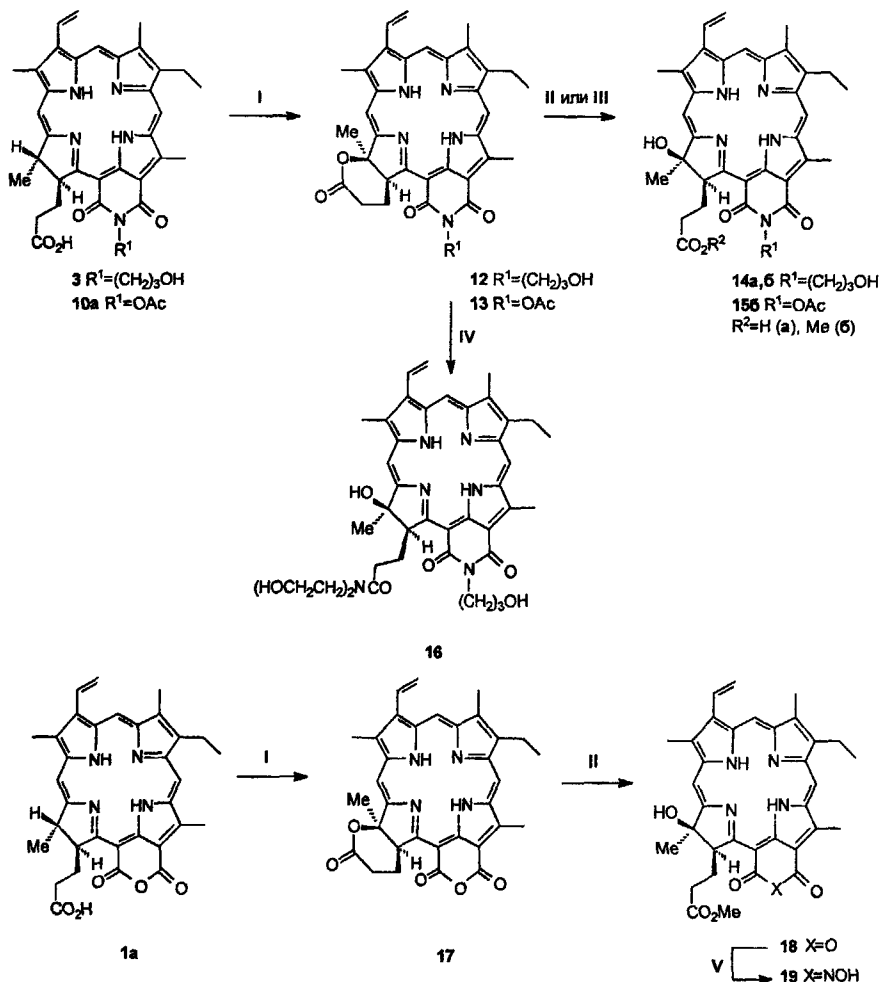


Схема 3. Синтез 18-гидроксизамещенных циклоимидов хлорина *p*₆.

Реагенты: I – ДДХ, $CHCl_3$; II – CF_3CO_2H , $MeOH$ (1:10); III – $NaOH$, ТГФ;
IV – $NH(CH_2CH_2OH)_2$, ТГФ; V – $NH_2OH \cdot HCl$, C_5H_5N .

δ -лактоны (12) и (13) получены окислением *N*-(3-гидроксипропил)- и *N*-ацетоксциклоимидов (3) и (10a). Так, обработка *N*-(3-гидроксипропил)циклоимида хлорина *p*₆ (3) в атмосфере аргона 1.5 кратным избытком 2,3-дихлор-5,6-дициан-1,4-

бензохинона (ДДХ) в течение 35 мин при 25°C приводит к лактону (12) с выходом 54%. Аналогичным образом соединение (10а) окисляется с образованием δ -лактона *N*-ацетоксициклоимида хлорина p_6 (13) с выходом 58%. Образование лактонного цикла не влияет на положение максимума основной полосы поглощения в электронных спектрах циклоимидов.

Обработка лактона (13) раствором трифторуксусной кислоты в метаноле приводит к 18-гидрокси-*N*-ацетоксициклоимиду (156) с выходом 62%. В то же время, δ -лактон *N*-(3-гидроксипропил)циклоимида (12) в кислых условиях склонен к дегидратации с образованием порфирина. Раскрытие его δ -лактонного кольца успешнее проходит в присутствии щелочи. При обработке лактона (12) гидроксидом натрия в тетрагидрофуране при комнатной температуре 18-гидроксициклоимид (14а) получен с выходом 70%. Его метилирование диазометаном приводит к эфиру (146). В масс-спектрах соединений (14а), (146) и (156) имеются пики молекулярных ионов с m/z 637.4, 652.1, и 667.2, соответственно.

Как известно, раскрытие δ -лактонного кольца хлоринов также происходит под действием аминов. Нами эта реакция была исследована на δ -лактоне циклоимида (12). С целью введения дополнительных полярных групп в нижнюю часть макроцикла δ -лактон циклоимида (12) обрабатывали диэтаноломином в тетрагидрофуране при комнатной температуре. В результате был получен диэтаноламид 18-гидроксициклоимида (16) с выходом 63%. Его масс-спектр содержит пик молекулярного иона с m/z 725.2.

Для получения 18-гидрокси-*N*-гидроксициклоимида (19) использован иной подход. В качестве исходного соединения был взят пурпурин 18, который под действием ДДХ превратили в δ -лактон (17). Последний действием трифторуксусной кислоты в метаноле раскрывался, давая соединение (18). Это соединение обрабатывали гидрохлоридом гидросиламина и в результате 18-гидроксициклоимид (19) был получен с выходом 75%. Структура соединения (19) подтверждена данными масс-спектрометрии (пик молекулярного иона с m/z 610.5) и ^1H ЯМР спектроскопии. В спектрах ^1H ЯМР полученных 18-гидроксициклоимидов (14а,б), (156), и (19) отсутствуют квартеты 18-Н протонов, а сигналы 18-CH₃ сдвинуты в сильное поле с 2.15-2.18 м.д. до 1.82-1.83 м.д. В спектре соединения (19) наблюдается также уширенный синглет при 4.71 м.д. интенсивностью в один протон, который был отнесен к 18-ОН группе.

Двумерная спектроскопия NOESY выявила наличие сильных взаимодействий между 17-Н и 18-CH₃ для соединений (14а) и (156), как и в случае δ -лактонов (12) и

(13), что свидетельствует о том, что данные заместители находятся с одной стороны от плоскости макроцикла и, следовательно, образовавшаяся 18-ОН группа располагается над плоскостью макроцикла. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с ранее полученными данными для 18-гидроксипурпурина 18 (18) и диметилового эфира 18-гидроксихлорина p_6 . Аналогичное расположение 18-гидроксильной группы можно предположить для 18-гидроксипроизводного (19).

Таким образом, варьирование условий раскрытия δ -лактонного кольца циклоимидов хлорина p_6 позволяет вводить дополнительную гидроксильную группу в положение 18 макроцикла с сохранением природной конфигурации остатка пропионовой кислоты.

4. Химические превращения винильной группы пиррольного кольца А

Изменение гидрофобности природных хлоринов, а также значительное улучшение их спектральных характеристик может быть достигнуто модификацией по винильной группе пиррольного кольца А. Нами проведен ряд химических превращений винильной группы циклоимидов хлорина p_6 , ранее показавших хорошую фотодинамическую активность. Циклоимиды (3), (9) и (10а) (схема 4) были окислены периодатом натрия в присутствии каталитических количеств тетраоксида осмия. В процессе работы удалось увеличить выход ранее описанных 3-формилциклоимидов (20а) и (21а) до 72-74%, а также получить новый 3-формил-*N*-метоксициклоимид (22б) с выходом 80%. Масс-спектр последнего содержит интенсивный пик молекулярного иона с m/z 610.0. Максимумы поглощения соединений (20а), (21а) и (22б) находятся в области 746-747 нм.

Существенное смещение максимума поглощения в длинноволновую область (на 20 нм) наблюдается также в случае замещения атома водорода винильной группы на формильную. Для получения циклоимидов с 2-формилвинильной группой нами была использована реакция Вильсмейера. В химии хлоринов эта реакция обычно применяется в синтезе 20-формилхлоринов. Однако, имеются данные, что при наличии в хлориновом макроцикле винильной группы, она первой взаимодействует с комплексом Вильсмейера. Нами была изучена реакция с пурпурином 18. Для этого медный комплекс пурпурина 18 (23) обрабатывали комплексом ДМФА- POCl_3 в ДМФА в течение 48 часов. В результате был выделен единственный продукт – медный комплекс 3-(2-формилвинил)пурпурина 18 (26) с выходом 75%. Масс-спектр этого соединения содержит пики с m/z 669.0 (M^+) (69%) и 671.0 (M^+) (31%), что соответствует

природному распределению ионов ^{63}Cu и ^{65}Cu . В электронном спектре максимум основной полосы поглощения находится при 702 нм.

Деметаллирование соединения (26) смесью серной и трифторуксусной кислот (15:85) дает 3-(2-формилвинил)пурпурин 18 (29) с выходом 53%, а обработка серной кислотой непосредственно иминиевой соли, образующейся при взаимодействии соединения (23) с комплексом Вильсмейера - 58%. Масс-спектр хлорина (29) содержит пик молекулярного иона с m/z 606.2. В электронном спектре наблюдается bathochromный сдвиг максимума поглощения до 728 нм.

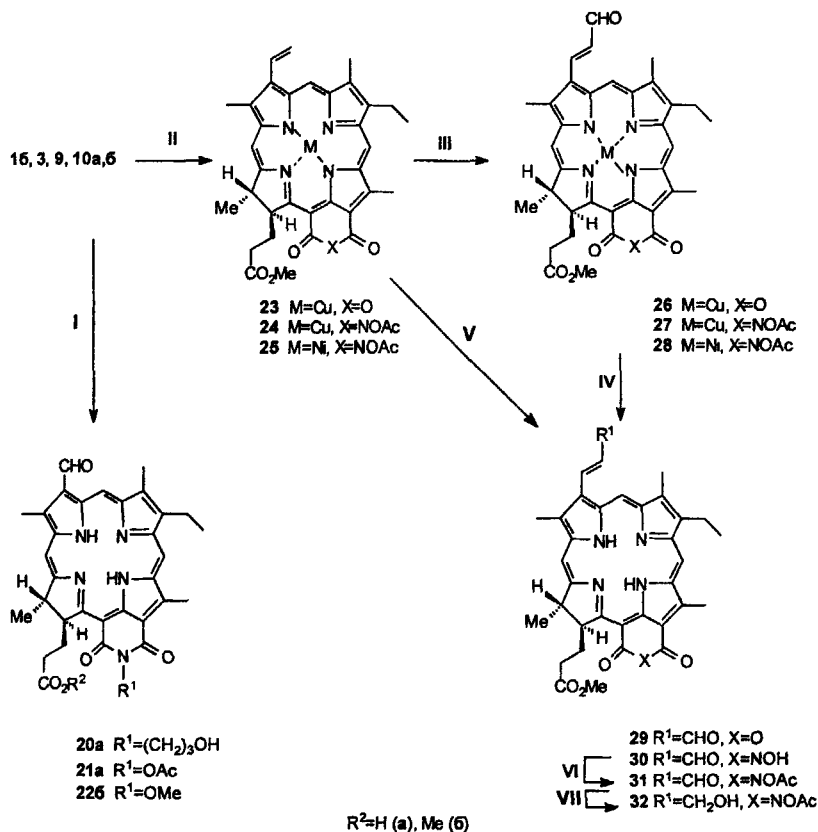


Схема 4. Химические превращения винильной группы пиррольного кольца А.

Реагенты: I – NaIO₄/OsO₄, диоксан, II – Cu(OAc)₂·MeOH, CHCl₃ или NiCl₂, ДМФА; III – ДМФА-POCl₃, CHCl₃ (1), NaHCO₃, H₂O (2); IV – H₂SO₄, ТФК, V – ДМФА-POCl₃, CHCl₃ (1), H₂SO₄ (2), NaHCO₃, H₂O (3); VI – Ac₂O; VII – NaBH₄.

Cu(II)- и Ni(II)-комплексы *N*-ацетоксициклоимида (24) и (25) реагируют с комплексом ДМФА-POCl₃ аналогичным образом. Соединение (24) реагирует с ДМФА-POCl₃ в течение 48 часов при комнатной температуре с образованием соответствующего металлокомплекса 3-(2-формилвинил)циклоимида (27). Использование в этой реакции в качестве растворителя хлороформа уменьшало время реакции до 18 часов, а выход 3-(2-формилвинил)хлорина (27) повышался до 90%. Масс-спектр металлокомплекса циклоимида (27) содержит пики молекулярных ионов с m/z 724.1 и 726.0. При кипячении Ni(II)-*N*-ацетоксициклоимида хлорина *p*₆ (25) с комплексом ДМФА-POCl₃ в ДМФА в течение 1 часа также не обнаружено образования мезо-замещенных продуктов, в результате был выделен только 3-(2-формилвинил)циклоимид (28). Удаление металла из соединения (27) смесью серной и трифторуксусной кислот (15:85), сопровождалось гидролизом ацетоксигруппы при атоме азота имидного кольца и 3-(2-формилвинил)-*N*-гидроксициклоимид (30) был получен с выходом 55%. В масс-спектре этого соединения имеется пик молекулярного иона с m/z 622.4. *N*-Гидроксициклоимид (30), содержащий 2-формилвинильную группу в положении 3 пиррольного кольца А, поглощает в области 744 нм.

При обработке 3-(2-формилвинил)-*N*-гидроксициклоимида (30) уксусным ангидридом с выходом 88% получен *N*-ацетоксициклоимид (31). Этот хлорин поглощает при 739 нм. Его масс-спектр содержит пик молекулярного иона с m/z 663.3. В спектре ¹H ЯМР хлорина (31) наряду с сигналами трех мезо-протонов при 9.57, 9.37 и 8.67 м.д. имеются дублеты интенсивностью в один протон каждый при 10.10 и 8.74 м.д., отнесенные к 3²-СНО и 3¹-СН, а также дублет дублетов 3²-СН ($J=17.0$ Гц) при 7.35 м.д. Величина константы спин-спинового взаимодействия указывает на транс-конфигурацию двойной связи 3-формилвинильной группы.

Для снижения гидрофобности верхней части хлоринового макроцикла формилвинилциклоимид (31) восстанавливали до соответствующего спирта (32). В масс-спектре соединения (32) присутствует пик молекулярного иона с m/z 666.4. В электронном спектре хлорина (32) по сравнению с исходным формилвинилпроизводным (31) наблюдается гипсохромный сдвиг основной полосы поглощения на 18 нм.

Таким образом, на основании данных по формилированию Cu(II)-пурпурина 18 (23), Cu(II)- и Ni(II)-*N*-ацетоксициклоимидов (24) и (25) в условиях реакции Вильсмейера можно предположить, что образующаяся формилвинильная группа в этих системах снижает реакционную способность 20-мезо-положения В пользу этого

свидетельствует также тот факт, что при повторной обработке 3-(2-формилвинил)циклоимидов (26) и (27) комплексом Вильсмейера образования 20-мезо-замещенных продуктов не наблюдалось.

5. Окисление двойной связи в пиррольном кольце В

Дальнейшее смещение основной полосы поглощения циклоимидных производных хлорина *p*₆ в длинноволновую область может быть достигнуто за счет окисления пиррольного кольца В (схема 5). Обработка 3-формилциклоимида (226) тетраоксидом осмия в присутствии пиридина и последующее разрушение осматного комплекса сероводородом приводят к 7,8-дигидроксикабактериопроизводному (336). В масс-спектре соединения (336) присутствует пик молекулярного иона с *m/z* 643.3. В электронном спектре полученного циклоимида наблюдается интенсивный максимум поглощения при 825 нм. В спектре ¹H ЯМР в слабом поле при 11.32 м.д. присутствует синглет в один протон, отнесенный к формильной группе и удвоенные сигналы трех мезо-протонов при 9.54 и 9.53 м.д., 9.02 и 9.01 м.д., 8.55 и 8.54 м.д. Аналогичное удвоение наблюдается для смещенных в более сильное поле сигналов протонов 7-CH₃ и 8-CH₂CH₃. Протоны 7-CH₃, 8¹-CH₂ и 8²-CH₃ проявляются в виде двух синглетов

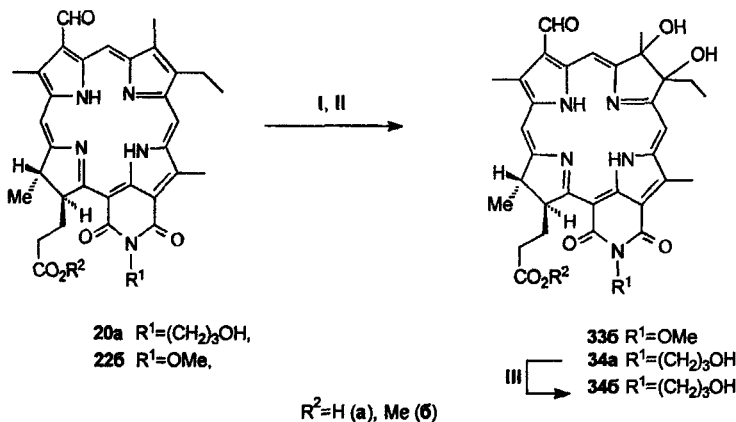


Схема 5. Окисление двойной связи пиррольного кольца В циклоимидов хлорина *p*₆
Реагенты: I - OsO₄, C₅H₅N, CH₂Cl₂; II - H₂S; III - CH₂N₂.

при 2.46 и 2.40 м.д., мультиплета при 1.01 м.д. и двух триплетов при 0.86 и 0.82 м.д., соответственно. Сигналы N-H групп представлены в виде четырех синглетов при 0.01, -0.05 и -0.10, -0.15 м.д. Все выше перечисленное указывает на то, что

дигидроксициклоимид (33б) существует в виде двух изомеров, что обусловлено расположением введенных гидроксильных групп над и под плоскостью макроцикла. Аналогичным образом из циклоимида (20а) был синтезирован 7,8-дигидроксибактериоциклоимид (34а) с 3-гидроксипропильным заместителем при атоме азота имидного кольца, поглощающий в области 821 нм. В масс-спектре соединения (34а) присутствует пик с m/z 679.0, соответствующий (M^+ +Na). Структура полученного 7,8-дигидроксибактериоциклоимида подтверждена также данными спектра ^1H ЯМР для его метилового эфира (34б), синтезированного обработкой соединения (34а) диазотетаном. Масс-спектр циклоимида (34б) содержит пик молекулярного иона с m/z 670.4.

2.6. Анализ данных по биологической активности *N*-(ω -гидроксипропил)- и *N*-гидроксициклоимидов хлорина p_6 и их производных

Фотобиологические свойства *N*-(ω -гидроксипропил)- и *N*-гидроксициклоимидов хлорина p_6 , а также их производных, в отличие от *N*-алкилциклоимидов, к началу настоящей работы были изучены недостаточно. Разработанными методами циклоимиды (2), (3), (6а,б), (9) и (10а) были синтезированы в необходимых количествах, обеспечивающих более глубокое исследование их селективного накопления в раковых клетках, генерирования синглетного кислорода при облучении светом и фотодинамической активности в условиях *in vitro* и *in vivo*²

13,15-*N*-(2-Гидроксиэтил)циклоимид хлорина p_6 (2), 13,15-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимид хлорина p_6 (3), метиловый эфир 13,15-*N*-гидроксициклоимида хлорина p_6 (6б), метиловые эфиры 13,15-*N*-метоксициклоимида хлорина p_6 (9) и 13,15-*N*-ацетоксициклоимида хлорина p_6 (10а) обладают низкой темновой токсичностью. Эти соединения характеризуются достаточно высоким квантовым выходом синглетного кислорода (0.35-0.73), при этом максимальное значение 0.73 наблюдалось для *N*-метоксициклоимида хлорина p_6 (9), а минимальное 0.35 зарегистрировано для *N*-гидроксициклоимида (6б). Фотостабильность циклоимидов снижается в ряду (6б)>(3)>(2),(9),(10а). Интересно отметить, что наибольшую фототоксичность на клетках аденокарциномы легкого человека А549 проявил метиловый эфир *N*-гидроксициклоимида хлорина p_6 (6б). Для изученных циклоимидов она убывала в ряду (6б)>(9)>(3)>(2)>(10а). Активность хлорина (6б) в

² Биологические исследования проводились в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена в отделении модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии в группе профессора Р.И. Якубовской и в Институте биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН в группе старшего научного сотрудника А.В. Феофанова

8 раз выше, чем у соединения (10a), а фотодинамическая активность циклоимида (10a) в 100 и 280 раз выше, чем для хлорина p_6 и препарата Фотогем, соответственно. При этом не наблюдалось прямой взаимосвязи между фотодинамической активностью этих циклоимидных производных и их концентрацией в раковой клетке, которая достигала наибольших значений у соединений (9) и (10a).

Ранее полученные данные по фотодинамической активности *N*-алкилциклоимидов хлорина p_6 также свидетельствовали о том, что высокая концентрация сенсibilизатора в опухоли не является главным критерием его эффективности. Было высказано предположение, что для того, чтобы фотосенсibilизатор был эффективен, он должен локализоваться в наиболее чувствительных к фотодинамическому воздействию участках раковой клетки. Изучение внутриклеточного распределения циклоимидов (2), (3), (66), (9) и (10a) на клетках A549 показало, что соединения с полярными группами (циклоимиды (2), (3) и (66), содержащие гидроксильную или ω -гидроксипропильные группы при атоме азота имидазного кольца, а также *N*-ацетоксипропилоимида (10a) со свободным остатком пропионовой кислоты) накапливаются в митохондриях и аппарате Гольджи, тогда как гидрофобный метиловый эфир *N*-метоксипропилоимида (9) локализуется в лизосомах. Согласно литературным данным, воздействие сенсibilизатора на вышеперечисленные участки может инициировать процесс апоптоза клетки. Возможно, характер внутриклеточной локализации *N*-гидроксипропилоимида (66) является одной из причин того, что, имея самые низкие квантовый выход синглетного кислорода и концентрацию накопления в раковой клетке, это соединение проявляет высокую фотодинамическую активность.

Предварительные данные по фотодинамической активности *N*-(3-гидроксипропил)циклоимида хлорина p_6 (3) *in vivo* получены на мышцах с лимфолейкозом P388. Циклоимид (3) вызывает практически 100% торможение роста опухоли с 7 по 14 день наблюдения при дозе 2.5 мг/кг. При этом наблюдался высокий процент животных без опухоли с полным восстановлением кожного покрова.

Таким образом, полученные данные по накоплению в раковых клетках и фотодинамической активности *N*-гидроксипропил- (2), (3) и *N*-гидроксипропил- (66) циклоимидов хлорина p_6 , а также их производных (9) и (10a), подтверждают ранее высказанное предположение о существовании корреляции между характером внутриклеточной локализации фотосенсibilизатора и его фотодинамической активностью.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод регио- и стереонаправленного введения гидроксильной группы в пиррольное кольцо D в ряду *N*-гидрокси- и *N*-(ω -гидроксиалкил)циклоимидов хлорина *p*₆. Синтезированы ранее неописанные 18-гидрокси- 13,15-*N*-гидрокси-, 13,15-*N*-ацетокси- и 13,15-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимиды хлорина *p*₆, а также диэтаноламид 18-гидрокси-13,15-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимида хлорина *p*₆.
2. Впервые предложен способ синтеза *N*-гликозилоксициклоимидов хлорина *p*₆. Взаимодействием метилового эфира пурпурина 18 с *O*- β -D-галактопиранозилгидроксиламином получен ранее неизвестный *N*-(*O*- β -D-галактозил)оксициклоимид хлорина *p*₆.
3. Показано, что в ряду природных хлоринов с дополнительным сопряженным шестичленным экзоциклом происходит селективное замещение атома водорода винильной группы в положении 3² на формильную под действием реагента Вильсмейера. Синтезированы ранее неизвестные 3-(2-формилвинил)-3-девинил-13,15-*N*-гидрокси- и 13,15-*N*-ацетоксициклоимиды хлорина *p*₆.
4. Окислением двойной связи в пиррольном кольце В циклоимидов хлорина *p*₆ получены 7,8-дигидроксибактериохлорины с максимумом поглощения в области 820 нм.
5. Предварительные данные биологических исследований 13,15-*N*-(2-гидроксиэтил)-, *N*-(3-гидроксипропил)-, *N*-гидрокси-, *N*-метокси- и *N*-ацетоксициклоимидов хлорина *p*₆ подтверждают существование связи между характером внутриклеточной локализации этих соединений и фотодинамической активностью. Наличие гидроксильных групп в структуре циклоимидных производных хлорина *p*₆ способствует накоплению циклоимидов в аппарате Гольджи и митохондриях, фотодинамическое воздействие на которые, по-видимому, инициирует процесс апоптоза, существенно повышая эффективность сенситизаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.Ф. Миронов, Р.Д. Рузиев, В.С. Лебедева. Синтез и химические превращения *N*-гидрокси- и *N*-гидроксикарбоксимидов хлорина *p*₆.// Биоорган. химия, 2004, т. 30, № 5, с.520-530.
2. A. Feofanov, G. Sharonov, A. Grichine, T. Karmakova, A. Pljutinskaya, V. Lebedeva, R. Ruziyev, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Refregier, J-C. Maurizot and P. Vigny. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-*N*-cycloimide derivatives of chlorin *p*₆.// Photochemistry and Photobiology, 2004, v.79, № 2, p.172-188.
3. А.В. Феофанов, А.И. Назарова, Т.А. Кармакова, А.Д. Плютинская, А.И. Гришин, Р.И. Якубовская, В.С. Лебедева, Р.Д. Рузиев, А.Ф. Миронов, Ж.-К. Моризо, П. Вини. Фотобиологические свойства 13,15-*N*-(карбоксиметил)- и (2-карбоксиэтил)- циклоимидных производных хлорина *p*₆.// Биоорган. химия, 2004, т. 30, № 4, с. 417-428.
4. A. Feofanov, A. Grichine, T. Karmakova, A. Pljutinskaya, V. Lebedeva, R. Ruziyev, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Refregier, J-C. Maurizot and P. Vigny. Photobiological effects of cycloimide derivatives of chlorin *p*₆, new promising near IR photosensitizers.// XX International conference on photochemistry. – Moscow, 2001, p.262-263.
5. Р.Д. Рузиев, В.С. Лебедева, А.Ф. Миронов. Новые 3-(2-формилвинил)замещенные *N*-гидрокси- и *N*-(3-гидроксипропил)циклоимиды хлорина *p*₆.// Тезисы докладов III Съезда биохимического общества. – Санкт-Петербург, 2002, с.209.
6. Р.Д. Рузиев, В.С. Лебедева, А.Ф. Миронов. Формилирование природных хлоринов с винильной группой в условиях реакции Вильсмейера.// Тезисы докладов V Школы-конференции молодых ученых стран СНГ по химии порфиринов и родственных соединений. – Звенигород, 2002, с.74.
7. Т.А. Кармакова, Г.В. Шаронов, А.И. Гришин, А.Д. Плютинская, А.И. Филясова, А.В. Феофанов, Н.И. Казачкина, Р.И. Якубовская, В.С. Лебедева, Р.Д. Рузиев, А.Ф. Миронов, П. Вини. Структурно-функциональные взаимосвязи фотосенсибилизаторов на примере циклоимидных производных хлорина *p*₆.// Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Отечественные противоопухолевые препараты”. – Москва, 2003, с.25.

8. A. Feofanov, G. Sharonov, A. Grichine, T. Karmakova, A. Pljutinskaya, V. Lebedeva, R. Ruziyev, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Refregier, J-C. Maurizot and P. Vigny. Cycloimide derivatives of chlorin p_6 – novel near-IR photosensitizers.// The 10th Congress of the European society for photobiology. – Vienna, 2003, p.92.
9. Р.Д. Рузиев, В.С. Лебедева, А.Ф. Миронов. 18-Гидроксициклоимиды хлорина p_6 .// Тезисы докладов IX Международной конференции по химии порфиринов и их аналогов. – Суздаль, 2003, с.67.
10. А.В. Феофанов, Г.В. Шаронов, А.И. Назарова, Т.А. Кармакова, А.И. Гришин, А.Д. Плютинская, Р.И. Якубовская, В.С. Лебедева, Р.Д. Рузиев, А.Ф. Миронов, Ж.-К. Моризо, П. Вини. Оптимизация структуры циклоимидных производных хлорина p_6 для фотодинамической терапии рака.// Суздаль, 2003, с.339-341.
11. Р.Д. Рузиев, В.С. Лебедева, А.Ф. Миронов. Метод стереонаправленного гидроксилирования в ряду циклоимидных производных хлорина p_6 .// Тезисы докладов X Международной научно-технической конференции “Наукоемкие химические технологии -2004”.- Волгоград, 2004, с.320-321.

Принято к исполнению 12/08/2005
Исполнено 16/08/2005

Заказ № 980
Тираж: 75 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

№ 1 4 7 5 3

РНБ Русский фонд

2006-4

11853