

На правах рукописи



СУВОРОВ НИКИТА ВЛАДИМИРОВИЧ

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРИРОДНЫЕ ХЛОРИНЫ НАПРАВЛЕННОГО
ДЕЙСТВИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ РАЗЛИЧНОГО
ГЕНЕЗА**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА)

Научный руководитель: **Грин Михаил Александрович**
доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Преображенского Н.А. ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»

Официальные оппоненты: **Мамардашвили Нугзар Жораевич**
доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ИХР РАН, заведующий лабораторией «Координационная химия макроциклических соединений».

Пятигорская Наталья Валерьевна
доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой промышленной фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита состоится «01» июля 2019 г. в 15:00 часов, на заседании диссертационного совета Д 212.131.06 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119571, г. Москва, проспект Вернадского, д. 86, ауд. М-119.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на интернет-сайте ВАК РФ <http://vak.ed.gov.ru> и на интернет-сайте Российского технологического университета www.mirea.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119454, Москва, проспект Вернадского, 78 и на интернет-сайте www.mirea.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доц.



Лебедева В.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ¹

Актуальность работы. Молекулярно-таргетная терапия является одним из новых направлений медикаментозного лечения (фармакотерапии) рака. Как вид молекулярной медицины, таргетная терапия блокирует рост раковых клеток с помощью вмешательства в механизм действия конкретных ключевых молекул, необходимых для канцерогенеза и роста опухоли, а не просто препятствует размножению всех быстро делящихся клеток. Целевое воздействие только на опухоль не наносит вреда здоровым тканям вокруг нее и здоровью больного в целом, что исключает негативные последствия, которые возникают при химиотерапии или лучевом воздействии.

В настоящее время существует два подхода к увеличению туморотропности химиопрепаратов и, в частности, фотосенсибилизаторов (ФС). Создание конъюгатов последних с векторными молекулами позволяет реализовать активный таргетинг в опухолевые клетки. В качестве таких молекул могут выступать таргетные пептиды, стероиды, углеводы, а также производные фолиевой кислоты. Сверхэкспрессия рецепторов определенного типа на поверхности опухолей различного генеза позволяет увеличить накопление препаратов за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза. Другим подходом к увеличению селективности накопления является иммобилизация активных фармацевтических субстанций на наночастицы различной природы, что обеспечивает пассивный таргетинг, включающий экстравазацию нагруженных наночастиц из дефектных сосудов опухоли и удержание их в интерстиции за счет нарушенной лимфодренажной системы опухоли (EPR-эффект).

Большинство фотосенсибилизаторов, используемых на сегодняшний день для фотодинамической терапии рака, являются природными или синтетическими макрогетероциклическими соединениями, включая порфирины, хлорины, фталоцианины и их металлокомплексы. Хотя природа данных молекул способствует их удержанию в опухолевом узле, а прицельное облучение светом определенной длины волны минимизирует риски повреждения окружающих тканей, тем не менее проблема повышения селективности накопления фотосенсибилизаторов в зоне интереса остается

¹ Список используемых сокращений:

ФС – фотосенсибилизатор; ФДТ – фотодинамическая терапия; ПСМА – простат-специфический мембранный антиген; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; NHS – *N*-гидроксисукцинимид; DCM – дихлорметан; DMSO – диметилсульфоксид; Py – пиридин; *i-PrOH* – изопропанол; DMF – диметилформамид; DIPEA – диизопропилэтиламин; TFA – трифторуксусная кислота; DMAP – 4-диметиламинопиридин; L-Lys(Z)-OtBu·HCl – *трет*-бутил-*N*⁶-[(бензилокси)карбонил]-L-лизинат гидрохлорид; IEDDA – Inverse Electron Demand Diels-Alder reaction; ИК₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; дипрокси-БПИ – *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимид.

весьма актуальной. Учитывая это, создание конъюгатов фотосенсибилизаторов с малыми таргетными молекулами, а также с наночастицами представляет перспективный подход к увеличению эффективности метода фотодинамической терапии и расширению области его клинического использования.

Цель работы заключается в направленной функционализации природных хлоринов и бактериохлоринов с помощью присоединения на периферию макроцикла биологически активных молекул и иммобилизации пигмента на железооксидные наночастицы для создания фотодинамических агентов таргетного действия.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих **задач**:

- Получение аминок амидов хлорина e_6 с остатком фолиевой кислоты, разработка их водорастворимой формы и изучение специфической активности *in vitro* на клетках *HeLa*, имеющих высокую экспрессию фолатных рецепторов.
- Разработка региоселективного синтеза 13^1 -, 15^2 - амидов хлорина e_6 , а также 17^3 - амида бактериопурпуринимида, с лигандами к простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА) и оценка их биологической эффективности на клетках рака простаты, обладающих сверхэкспрессией рецепторов ПСМА и без них.
- Изучение реакции тетразин-алкенового присоединения между арилтетразинами и природным хлорином для региоселективного введения лиганда к ПСМА в положение 3 макроцикла ФС и оценка фоточитотоксичности полученного конъюгата на клетках рака предстательной железы.
- Получение наночастиц магнетита, нагруженных *O*-пропил оксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимидом, и изучение биологической активности наноконплексов.

Научная новизна.

- 1) Осуществлено региоселективное введение лиганда к ПСМА в 3-, 13-, 15-, 17- положения макроцикла природных хлоринов и бактериопурпуринимида для эффективной интернализации ФС в опухолевые клетки рака предстательной железы.
- 2) Впервые изучена реакция тетразин-алкенового присоединения между производным хлорофилла *a* и арилзамещенными тетразинами, которая позволила ввести лиганд к ПСМА в положение 3 хлоринового макроцикла.

- 3) Получены аминокамиды хлорина e_6 , содержащие спейсеры различной длины, с фолиевой кислотой для активного таргетинга к опухолевым клеткам со сверхэкспрессией фолатных рецепторов.
- 4) Получены нековалентные комплексы на основе производных бактериопурпуринимидов с наночастицами магнетита для сочетанных методов терапии и диагностики в онкологии.

Практическая значимость работы. Разработаны фотоактивные субстанции на основе природных хлоринов, которые могут использоваться для направленного транспорта фотосенсибилизаторов в опухоли различной этиологии. Поглощение полученных пигментов в области 660-800 нм позволяет осуществлять фотодинамическую терапию глубокозалегающих и пигментированных опухолей. На основании проведенных исследований разработан и запатентован способ получения таргетного фотосенсибилизатора для лечения рака предстательной железы (Патент РФ № 2670087, 2018 г.). Получены конъюгаты на основе бактериопурпуринимидов и наночастиц магнетита, которые в дальнейшем могут найти применение для ФДТ и магнитно-резонансной томографии.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Получение аминокамидов хлорина e_6 с остатком фолиевой кислоты и разработка их водорастворимой формы.
- 2) Синтез 13¹-, 15²- амидов хлорина e_6 , а также 17³-амида бактериопурпуринимидов, с лигандами к ПСМА.
- 3) Изучение реакции тетралин-алкенового присоединения для региоселективного введения лиганда к ПСМА в положение 3 макроцикла ФС.
- 4) Иммобилизация *O*-пропилксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимидов на поверхность наночастиц магнетита.
- 5) Оценка биологической активности предлагаемых в работе конъюгатов и наноконплексов на опухолевых клетках различного генеза.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, входящих в Перечень ВАК и в международные базы цитирования Scopus и WoS, 7 тезисов докладов (из них 4 представлены на международных конференциях), получен 1 патент РФ.

Апробация работы. Результаты работы были представлены и обсуждены на: XII Международной конференции «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (Иваново, 2016); XVI Международной научной конференции «High-Tech in Chemical Engineering –2016» with elements of school of young scientists (Москва, 2016); Научной конференции грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-века», (Москва, 2016); III Российской конференции по медицинской химии (Казань, 2017); 16th World congress IPA (Coimbra, Portugal, 2017); VI Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика (Ростов-на-Дону, 2017); II Международной научно-практической школе-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение» (Звенигород, 2017).

Личный вклад автора. Диссертантом выполнен весь объем синтетической части работы, проведены физико-химические и спектральные исследования, проанализирован массив данных, полученных в ходе биологических испытаний, сформулированы цель работы, задачи и выводы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 117 наименований источников. Работа изложена на 111 страницах печатного текста и содержит 14 рисунков, 28 схем и 8 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В настоящее время созданы десятки лекарственных средств, относящихся к препаратам таргетного действия, которые успешно используются в терапии рака легких, молочной железы, почек, меланомы и опухолей других локализаций. К наиболее популярным и востребованным препаратам относятся Авастин, Герцептин, Сорафениб, Тарцева и др. В структуре большинства препаратов в качестве вектора присутствуют высокомолекулярные биологически активные соединения, например, моноклональные антитела. Создание конъюгатов противоопухолевых агентов с малыми таргетными молекулами является альтернативным подходом для направленной доставки лекарств в опухоли. Данный подход обладает рядом преимуществ, такими как, управляемый синтез и неиммуногенный характер конечных соединений.

В данной работе в состав молекул фотосенсибилизаторов были введены низкомолекулярные таргетные молекулы – фолиевая кислота и пептидомиметик, являющийся лигандом к простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА), и исследована роль данных векторных молекул для эффективной интернализации пигментов в опухолевые клетки. В настоящем исследовании вышеназванные лиганды были региоселективно введены в различные положения хлороинового макроцикла и установлена связь структуры ФС и их биологической активности (Схема 1).

Химические модификации природных хлоринов

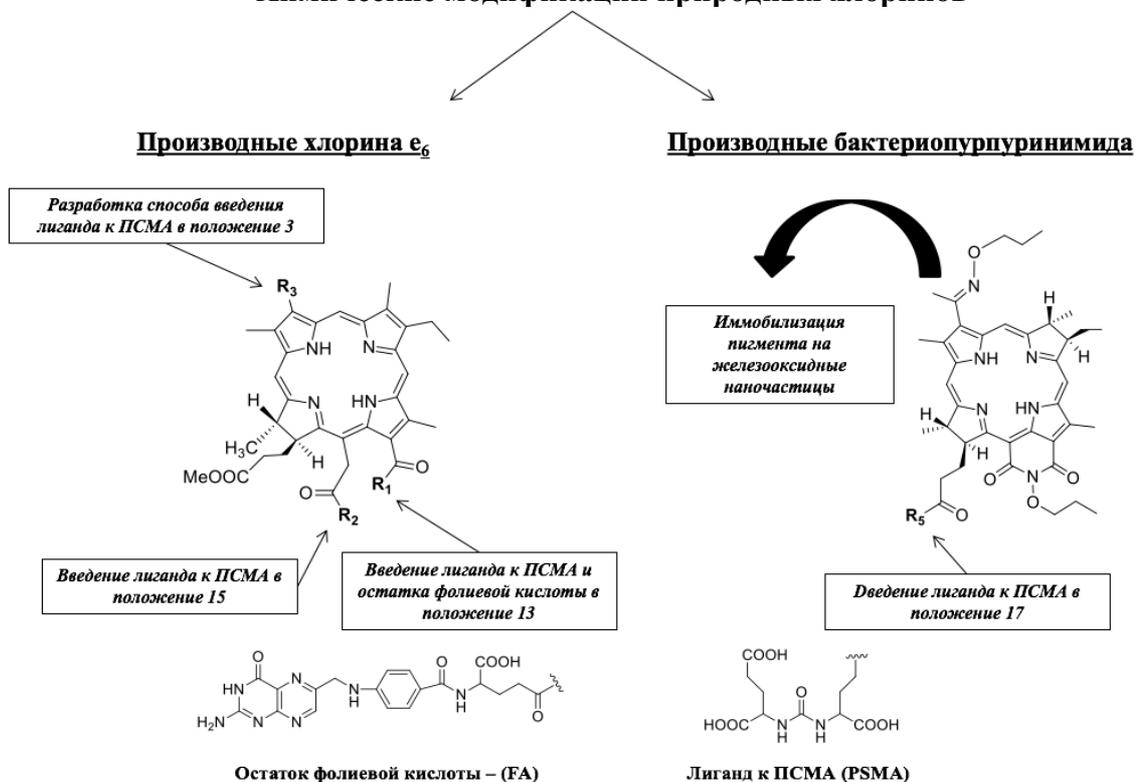


Схема 1. Направления модификации природных хлоринов.

В последние годы активное развитие получила доставка лекарственных соединений в опухоли с использованием наноматериалов. В настоящей работе предложены наноконструкции на основе производных бактериопурпуринимида и наночастиц магнетита, которые могут рассматриваться в качестве тераностиков, перспективных как для ФДТ глубокозалегающих и пигментированных опухолей, так и для МРТ.

1. Конъюгаты производных хлорина e_6 с фолиевой кислотой.

Сверхэкспрессия фолатных рецепторов на поверхности клеток некоторых злокачественных новообразований (рак шейки матки, рак яичников, рак молочной железы и др.) наряду с их чрезвычайно высокой аффинностью к фолиевой кислоте делает их перспективными мишенями для таргетной противоопухолевой терапии. В настоящей работе был получен ряд хлоринов, модифицированных фолиевой кислотой.

В качестве исходных соединений были выбраны аминокамиды хлорина e_6 с различной длиной спейсера в положении 13 макроцикла соединений **2a-d**, которые были получены из феофорбида **1**. Фолиевая кислота была присоединена за счет карбоксильной группы к терминальной аминогруппе ФС с использованием дициклогексилкарбодиимида в смеси ДМСО/пиридин с получением амидов **3a-d** (Схема 2).

Строение полученных соединений **3a-d** подтверждено с помощью спектроскопии ЯМР: обнаружены сигналы протонов остатка фолиевой кислоты, хлоринового макроцикла, а также амидной связи между фрагментами. В основном амидирование протекало по γ -COOH группе фолиевой кислоты и лишь 5-7% приходилось на минорные продукты присоединения по α -COOH группе. В масс-спектрах соединений **3a-d** присутствуют сигналы, соответствующие молекулярным ионам.

Несмотря на высокую полярность молекул, полученные конъюгаты **3a-d** обладали крайне низкой растворимостью в физиологических средах. Нами была подобрана система для солюбилизации, представляющая собой 4%-ный водный раствор Tween 20. Водный раствор конъюгатов получали из тонких пленок. Данный метод заключался в совместном растворении солюбилизатора и конъюгата в ДМФА с последующим удалением органической фазы и растворением полученной пленки в воде.

Изучена фотодинамическая активность полученных соединений **3a-d**.² Для этого 0.3-5 мкМ последних и триметиловый эфир хлорина e_6 инкубировали с клетками *HeLa* (рак шейки матки) в течение 3 ч, затем облучали красным светом, после чего

² Эксперименты выполнены в ИБХ РАН под руководством д.б.н., проф. А.В. Феофанова

инкубировали еще 3 ч с последующим анализом количества живых и мертвых клеток методом флуоресцентной микроскопии.

Наблюдали 100%-ную гибель клеток для конъюгатов **3a**, **3c** и для триметилового эфира хлорина e_6 при концентрациях 2.5 и 5 мкМ для каждого соединения. При уменьшении концентрации ФС до 1.25 мкМ все клетки оставались живыми.

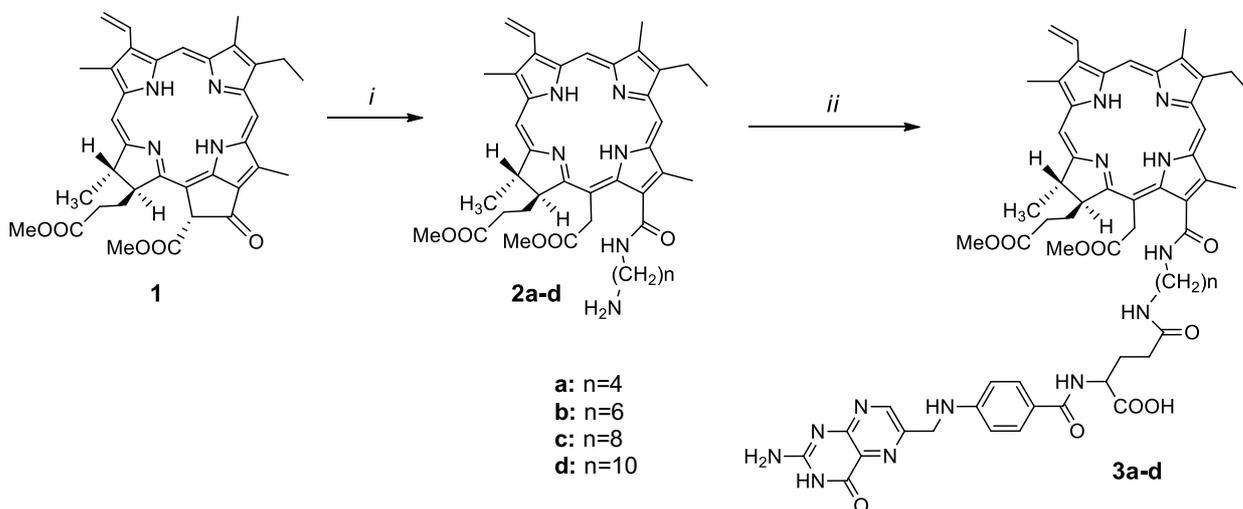


Схема 2. Получение конъюгатов аминоклиринов хлорина с фолиевой кислотой.

Реагенты и условия: (i) $NH_2-(CH_2)_n-NH_2$, ДХМ, 35 °С, 2 ч.; (ii) Фолиевая кислота, DCC, NHS, DMSO/Py, 120 ч.

В случае конъюгатов **3b** и **3d** фотоиндуцированной цитотоксичности в исследованном диапазоне концентраций не было обнаружено. Методом флуоресцентной микроскопии изучали накопление вышеназванных хлоринов в клетках HeLa, которое коррелировало с данными по их цитотоксичности (Рис. 1).

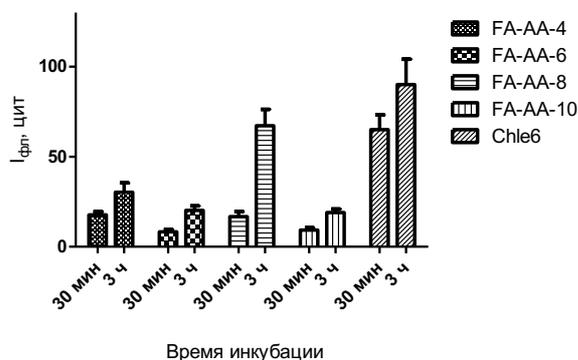


Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции в цитоплазме клеток HeLa через 30 мин и 3 ч инкубации с 2.5 мкМ соединений **3a-d** (FA-AA-4 – FA-AA-10). Значения нормированы на интенсивность спектров флуоресценции в растворе.

Таким образом, нами было показано, что длина спейсера между фармакофором и векторной молекулой имеет существенное значение для эффективности связывания с фолатными рецепторами. Обнаружено, что наибольшей активностью обладает соединение, содержащее спейсер из восьми метиленовых звеньев между ФС и фолиевой кислотой. Это согласуется с данными, полученными нами ранее по эффективности интернализации аминоксидов в опухолевые клетки [Патент РФ №254867, 2015].

2. Конъюгаты производных хлорина e_6 с ПСМА-лигандом

Известен ПСМА-лиганд, который является векторным пептидомиметиком на ПСМА-рецепторы, которые экспрессированы на опухолях предстательной железы. На его основе получены таргетные радиофармпрепараты для радиотерапии и диагностики в онкологии [Патент WO 2015171792 A1, 2015]. Также описан синтез конъюгата ПСМА-лиганда с фталоцианиновым фотосенсибилизатором [Y. Chen et al., Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology 2017, 167, 111.].

В настоящей работе был получен конъюгат природного хлорина с ПСМА-лигандом для направленной доставки препарата в опухоли предстательной железы.

2.1 Региоселективное введение ПСМА-лиганда по 13¹- и 15²- положениям хлоринового макроцикла

В работе осуществлен синтез таргетных ФС на основе хлорина e_6 , содержащих лиганд ПСМА в 13-ом и 15-ом положениях макроцикла и изучены их биологические свойства. Стратегия синтеза включала Cu-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения (Схема 3). В качестве алкиновой компоненты были получены цинковые комплексы диметилового эфира 13¹-(пропаргиламино)хлорина e_6 **10** и диметилового эфира 15²-(пропаргиламино)хлорина e_6 **16**.

Обработка феофорбида **1** избытком пропаргиламина позволила получить 13¹-амид **9**. Соединение **15** было синтезировано с использованием ангидрида, образующегося за счет реакции карбоксильных групп в 13¹- и 15²- положениях хлорина e_6 **14** под действием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида [H. Chen et al., JPP, 2017, 21, 354.] с последующим раскрытием ангидридного цикла пропаргиламином и метилированием диазومتаном.

Азидный компонент **8** был получен путем ацилирования терминальной аминогруппы лиганда к ПСМА 11-азидоундекановой кислотой³. Дипептид получали из

³ Синтез модифицированного ПСМА лиганда был осуществлен совместно с лабораторией БАОС кафедры органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

ди-*tert*-бутилового эфира глутаминовой кислоты **4** с образованием изоцианата *in situ* в присутствии трифосгена и DIPEA, который затем вступал в реакцию с Cbz-защищенным *tert*-бутиловым эфиром лизина. После удаления *tert*-бутильных групп была реализована click-реакция, приводящая к получению соединений **11** и **17**.

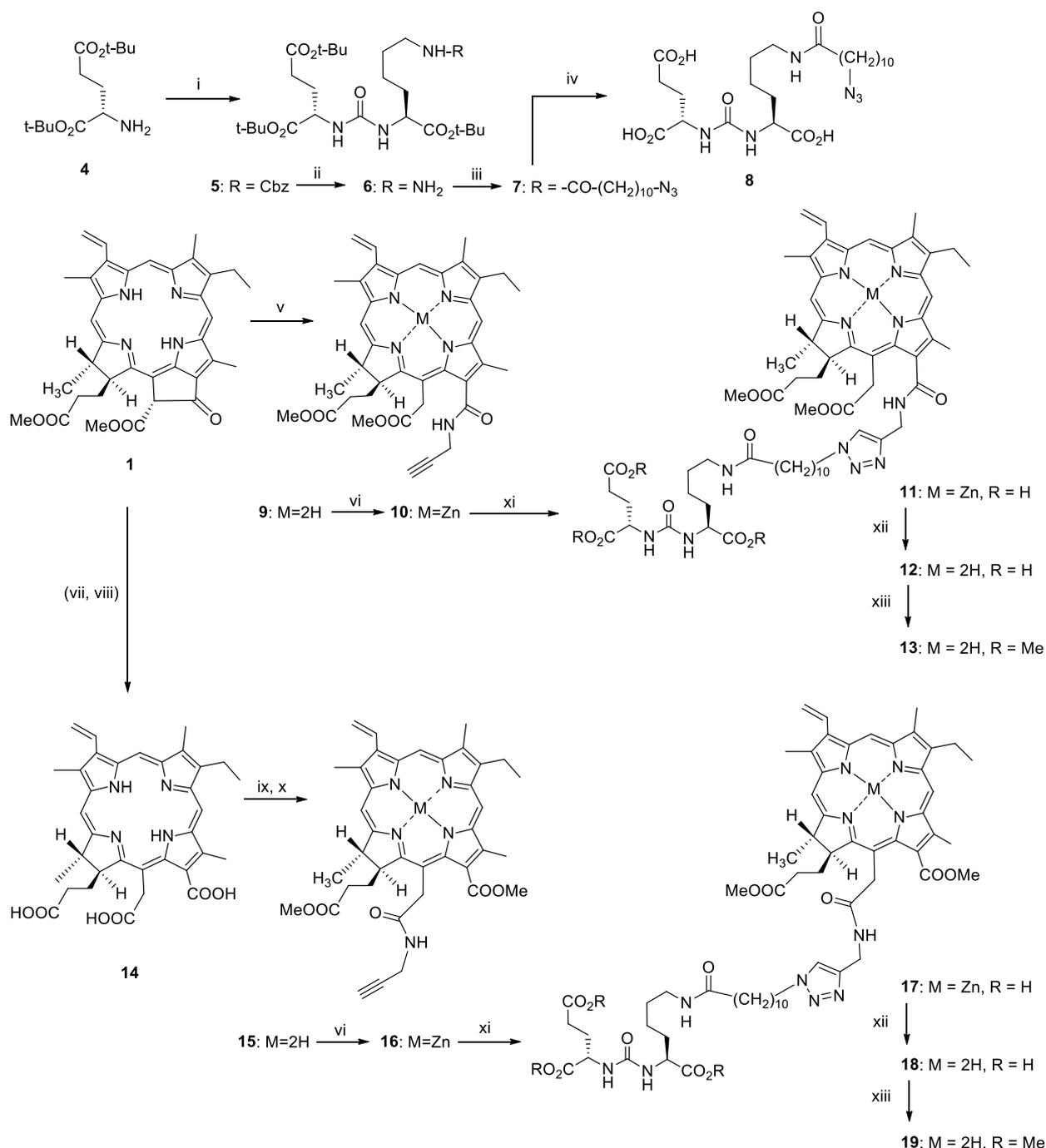


Схема 3. Синтез ПСМА-таргентных хлоринов.

Реагенты и условия: (i) *L*-Lys(Z)-OtBu-HCl, трифосген, -83 °C; (ii) H₂, Pd/C, CH₃OH; (iii) 11-азидоундекановая кислота, EDC, NHS, DMF, 20 °C, 18 ч; (iv) 11% TFA/DCM; (v) пропаргиламин, DCM, 20 °C, 48 ч; (vi) Zn(OAc)₂; (vii) NaOH, ацетон, 50 °C; (viii) HCl; (ix) EDC, DMAP, пропаргиламин, DCM; (x) CH₂N₂, DCM; (xi) **8**, CuI, DIPEA, DMF, 20 °C, 16 ч; (xii) 10% TFA/DMSO, 20 °C, 2 ч; (xiii) SOCl₂, CH₃OH/DCM.

Деметаллирование последних проводили, используя 10%-ный раствор ТФК в ДМСО с последующим осаждением конечных продуктов **12** и **18** дезоксигенированной дистиллированной водой.

Значения молекулярной массы, соответствующие соединениям **12** и **18**, присутствовали в масс-спектрах высокого разрешения. Из-за низкой растворимости полученных конъюгатов **12** и **18** в ДМСО- d_6 карбоксильные группы в вышеназванных соединениях были прометилованы с использованием тионилхлорида в смеси CH_3OH/DCM .

Соединения **13** и **19** растворялись в $CDCl_3$, а их спектры ЯМР соответствовали предложенным структурам, включая сигналы хлоринового макроцикла, триазола, ундецильного спейсера и лиганда ПСМА.

Для оценки амфифильности полученных соединений были рассчитаны коэффициенты распределения в системе *n*-октанол/вода. Значения $\log P$ для соединений **12** и **18** составили -0.88 и -0.79, соответственно, что указывает на высокую гидрофильность конъюгатов, несмотря на наличие больших гидрофобных фрагментов в их молекулах. Это позволяет предположить, что склонность данных веществ к пассивному трансмембранному переносу мала, а интернализация в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза наиболее вероятна.

Фототоксичность конъюгатов **12** и **18** оценивалась на клеточных линиях рака простаты 22Rv1 и РС-3 при 0.5, 1, 2, 4 и 6 ч инкубации после облучения галогеновой лампой с широкополосным фильтром ($\lambda > 620$ нм, плотность мощности 18.2 ± 0.7 мВт /см², световая доза 10 Дж/см²). Клетки линии 22Rv1 экспрессируют рецепторы ПСМА на клеточной мембране в большом количестве, тогда как у клеток линии РС-3 данные рецепторы отсутствуют. В качестве референсного ФС был использован Радахлорин (RadaPharma, Россия), который одобрен для клинического применения в России. Максимальная фотоактивность конъюгата **12** определялась после 6-часовой инкубации ФС с клетками (Таблица 1). ИК₅₀ хлорина e_6 с лигандом ПСМА для клеток 22Rv1 составила 1.2 ± 0.1 мкМ и превысила фотоактивность, полученную на клетках РС-3, в 7 раз, что, по-видимому, связано с высокой экспрессией рецепторов ПСМА в данной клеточной культуре. Напротив, для клеток РС-3, не имеющих таких рецепторов, интернализация ФС посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза невозможна. Следует отметить, что Радахлорин оказался менее эффективным для клеток 22Rv1 (ИК₅₀ = 3.0 ± 0.2 мкМ) по сравнению с конъюгатом **12**. ФС **18** вообще не показал увеличения эффективности по сравнению с Радахлорином. Значения ИК₅₀ для ФС **18** были примерно одинаковыми для обеих клеточных линий.

Таблица 1. Фототоксичность конъюгатов хлорина e_6 с ПСМА-лигандом и Радахлорина⁴.

ФС/Время инкубации	ИК ₅₀ , мкМ				
	0,5 ч	1 ч	2 ч	4 ч	6 ч
22Rv1 (ПСМА+)					
12	5.8±0.2	4.0±0,3	2.7±0,2	2.7±0,1	1.2±0.1
18	6.4±0.3	5.7±0.2	5.5±0.2	5,4±0.2	5.2±0.2
Радахлорин	8.5±0,3	5.1±0.3	4.4±0.2	2.9±0.1	3.0±0.2
РС-3 (ПСМА-)					
12	12.0±0.4	11.4±0.2	10.9±0.4	10.2±0.5	8.5±0.3
18	13.6±0.5	8.3±0.3	6.2±0.3	5.5±0.2	5.4±0.2
Радахлорин	17.2±0.4	13.3±0.3	6.9±0.3	5.1±0.4	4.3±0.2

Таким образом, нами было показано, что введение ПСМА-лиганда в различные положения макроцикла существенно влияет на эффективность фотосенсибилизаторов.

По итогам данной работы был получен патент РФ № 2670087 «Фотосенсибилизатор для лечения рака предстательной железы и способ его получения».

2.2 Введение ПСМА-лиганда в хлориновый макроцикл с использованием реакции тетразин-алкенового присоединения.

Продолжая исследование взаимосвязи «структура-активность» для хлоринов с ПСМА-лигандом, нами было реализовано региоселективное введение пептидомиметика в пиррол А хлоринового макроцикла. Наличие винильной группы у производных хлорофилла *a* делает возможным использование реакции тетразин-алкенового присоединения (Inverse electron demand Diels–Alder reaction, IEDDA) для получения конъюгатов с биологически активными молекулами.

С целью изучения протекания IEDDA-реакции и оптимизации условий ее проведения, было осуществлено тетразин-алкеновое присоединение между триметилловым эфиром хлорина e_6 и арилтетразинами (Схема 4), и установлены структуры полученных продуктов. В качестве исходного соединения был выбран 3-фенил-1,2,4,5-тетразин, который вводили в реакцию с хлорином **20** как в неполярных (толуол, хлористый метилен), так и в полярных (смесь DCM/CH₃OH, CH₃OH, DMF) растворителях. Наилучших результатов удалось достичь при использовании полярных растворителей, таких как, диметилформамид (8 ч, выход 94%).

⁴ Эксперименты выполнены в МНИОИ им. П.А. Герцена научным сотрудником отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии, к.б.н. Е.А. Плотниковой.

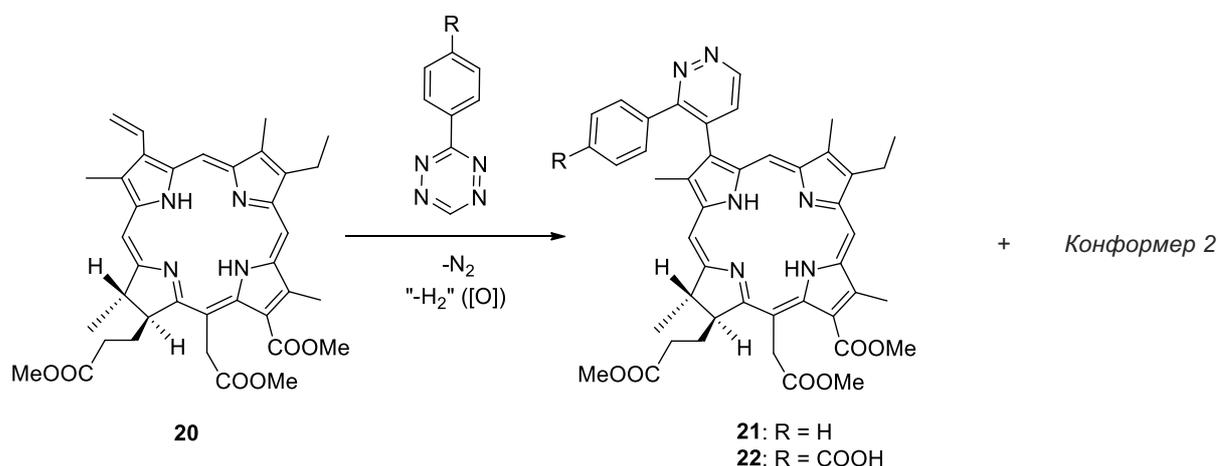


Схема 4. Получение пиридазин-замещенных производных триметилового эфира хлорина e_6 .

Строение продукта было изучено методом спектроскопии ЯМР. В протонном спектре ЯМР присутствовали удвоенные сигналы *мезо*-протона в 20-ом положении хлоринового макроцикла и протонов пиридазинового фрагмента. При анализе спектров ^1H и ^{13}C было обнаружено наличие двух конформеров соединения **21** в соотношении 1:1,

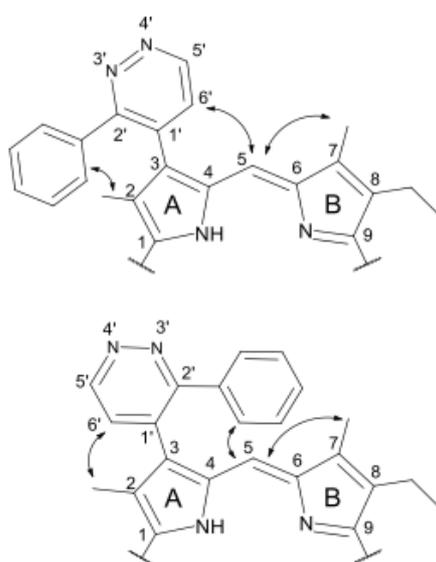


Рисунок 2. Фрагменты структур конформеров соединения **21**. Стрелками показаны NOE-эффекты, наблюдаемые в спектре NOESY.

отличающихся друг от друга пространственным расположением пиридазинового цикла (Рис. 2). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР последних было реализовано с помощью экспериментов COSY, NOESY и HSQC.

Для введения дополнительной карбоксильной группы в хлориновый макроцикл была проведена реакция триметилового эфира хлорина e_6 с 4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензойной кислотой с получением продукта **22**. В спектрах ЯМР последнего наблюдалось наличие сигналов двух конформеров, аналогично описанному выше.

Подобная функционализация хлорина позволила осуществить введение векторной молекулы пептидомиметика в положение 3 макроцикла (Схема 5). К *трет*-бутильному производному лиганда ПСМА с терминальной аминогруппой **6** была присоединена 4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензойная кислота за счет образования амидной связи с последующим удалением защитных групп в конъюгате **23**

ацидолизом. Соединение **24** вступало в реакцию с триметилловым эфиром хлорина **e₆** с образованием водорастворимого конъюгата **25**, для подтверждения структуры которого методом ЯМР свободные карбоксильные группы были прометилованы. Полученное соединение **26** растворялись в CDCl₃, а сигналы в спектре ЯМР соответствовали предложенной структуре.

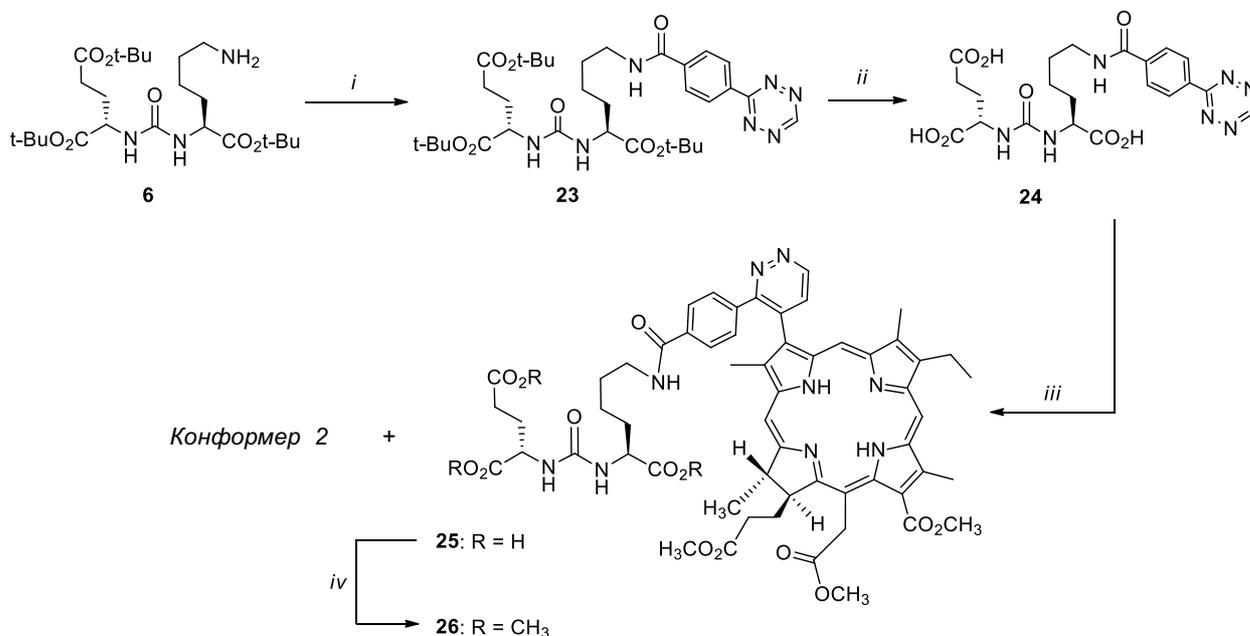


Схема 5. Направленное введение лиганда ПСМА в 3-положение триметиллового эфира хлорина **e₆** с помощью реакции тетразин-алкенового присоединения.

Реагенты и условия: (i) EDC, NHS, DMF, 20 °C, 48 ч; (ii) 10 % TFA/DCM, 16 ч; (iii) DMF, 20 °C, 24 ч; (iv) SOCl₂, CH₃OH/DCM, 20 °C, 1,5 ч.

Фототоксичность конъюгата **25** (Таблица 2) оценивали на клеточных линиях рака простаты 22Rv1 и PC-3 в условиях, аналогичных ранее описанным для 13- и 15-дипептидзамещенных хлоринов (гл. 1.2.1). В качестве ФС сравнения использовали Радахлорин (RadaPharma, Россия). На обеих линиях наблюдалась более высокая фотодинамическая активность пигмента **25** по сравнению с Радахлорином. При этом с увеличением времени инкубации уменьшалась концентрация полумаксимального ингибирования (ИК₅₀).

Таблица 2. Фототоксичность конъюгатов **25** и Радахлорина⁵.

Время инкубации, часы	ИК ₅₀ , мкМ				
	0,5	1	2	4	6
22Rv1 (ПСМА+)					
25	10.2±0.3	6.7±0.2	2.3±0.2	0.9±0,1	0.7±0,1
Радахлорин	15±0.4	11.3±0.4	6.0±0.2	3.9±0.2	2.1±0.2
РС-3 (ПСМА-)					
25	3.4±0.2	2.9±0.2	2.1±0,1	0.6±0,1	0.6±0,1
Радахлорин	15.3±0.4	9.1±0.3	6.5±0.2	4.4±0.2	2.7±0.2

Следует отметить, что 3-замещенный хлорин **25** был эффективен на обеих клеточных линиях в отличие от 13-замещенного конъюгата **12**, который эффективен только на линии 22Rv1 (ПСМА+) и 15-замещенного конъюгата **18**, уступающего по активности Радахлорину (разд. 2.1, таблица 1).

Таким образом, нами было показано, что click-реакция тетразин-алкенового присоединения, протекающая в мягких условиях без катализатора, является эффективным способом региоселективного введения достаточно сложных молекул в производные хлорофилла *a*. Введение лиганда к ПСМА в положение 3 макроцикла с помощью данной реакции привело к значительному увеличению фототоксичности полученного ФС по сравнению с официальным препаратом.

2.3 Введение ПСМА-лиганда в состав дипропокси-БПИ

Ранее в нашей лаборатории был получен бактериопурпуринимид, представляющий собой *O*-пропилоксим-*N*-пропоксисибактериопурпуринимид (дипропокси-БПИ), который оказался стабильным ФС с высокими фотоиндуцированной цитотоксичностью на линиях опухолевых клеток и фотодинамической эффективностью *in vivo* на опухолях различного генеза [Патент РФ № 2521327, 2012 г.].

Для реализации направленной доставки вышеназванного лидерного ФС в опухолевую ткань предстательной железы ПСМА-лиганд был присоединен к нему по пропионовому остатку бактериопурпуринимид.

В схеме синтеза использовали пептидомиметик **27** с незащищенными карбоксильными группами (Схема 6), поскольку условия удаления *tert*-бутильных защитных групп (10-15% TFA в CH₂Cl₂) после конъюгации с бактериопурпуринимидом

⁵ Эксперименты выполнены в МНИОИ им. П.А. Герцена научным сотрудником отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии, к.б.н. А.Д. Плютинской

являются достаточно жесткими для природного пигмента. Амидирование дипропокси-БПИ проводилось методом активированных эфиров путем образования промежуточного *N*-сукцинимидного эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида **29**, который после выделения из реакционной среды был введен в реакцию с соединением **27** (Схема 7). Полученный конъюгат **30** растворялся в фосфатном буфере (pH=7.2) с сохранением спектральных свойств исходного дипропокси-БПИ **28**. Для подтверждения структуры методом ЯМР свободные карбоксильные группы в соединении **30** были прометилованы с помощью диазометана. Полученный пигмент **31** растворялся в CDCl₃, а сигналы в спектре ЯМР соответствовали предложенной структуре.

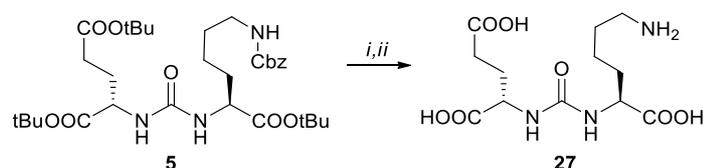


Схема 6. Получение пептидомиметика – лиганда к ПСМА.

Реагенты и условия: (i) H₂, Pd/C, CH₃OH, 20 °C; (ii) 10% TFA/DCM, 20 °C.

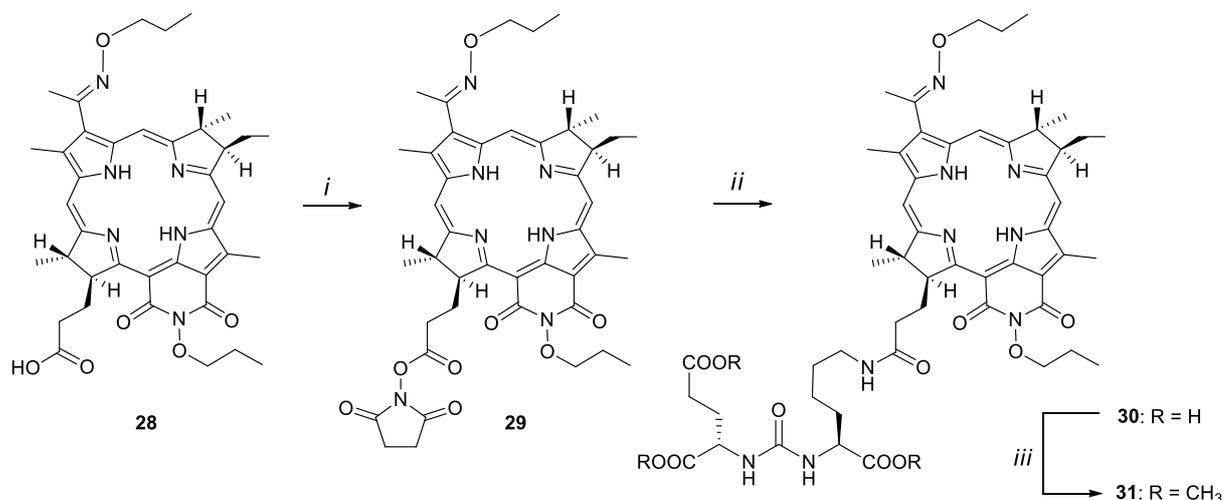


Схема 7. Направленное введение лиганда ПСМА в состав молекулы дипропокси-БПИ.

Реагенты и условия: (i) EDC, NHS, ДХМ, 24 ч.; (ii) **27**, DCM/*i*-PrOH; (iii) CH₂N₂, DCM.

Значения фотоиндуцированной цитотоксичности конъюгата **30** в воде и дипропокси-БПИ в солюбилизаторе Kolliphog по отношению к клеткам рака простаты со сверхэкспрессией ПСМА-рецепторов (22Rv1) представлены в таблице 3. Было установлено, что фотоиндуцированная цитотоксичность предложенного таргетного ФС **30** в 5 раз меньше, чем у свободного дипропокси-БПИ. Полученный результат может быть связан с высокой гидрофильностью конъюгата **30**, имеющего в своей структуре три

карбоксильные группы, что снижает эффективность трансмембранного переноса по сравнению с пассивным транспортом мицеллярной формы дипропокси-БПИ.

Таблица 3. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности конъюгата *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида с ПСМА-лигандом на клетках рака простаты 22Rv1⁴.

ФС/Время инкубирования	ИК ₅₀ , мкМ		
	0,5 ч	2 ч	4 ч
Соединение 30	1.55±0.12	1.29±0.15	1.10±0.10
Эмульсия дипропокси-БПИ в Kolliphor ELP (4%)	0.27±0.03	0.21±0.02	0.20±0.03

Таким образом, прямое цитотоксическое действие исследуемых ФС является многофакторным процессом, зависящим от природы макроцикла (хлорин или бактериохлорин), наличия или отсутствия векторной молекулы в структуре пигмента, ее местоположения на периферии макроцикла и от общей амфифильности ФС, определяющей биодоступность как на клеточном, так и на организменном уровне.

3. Наноконплексы на основе частиц магнетита и производного бактериохлорофилла *a*.

Иммобилизация различных противоопухолевых агентов на биосовместимых наноматериалах позволяет увеличить селективность накопления препаратов в опухоли за счет EPR-эффекта. Среди различных наноносителей наибольшее внимание исследователей привлекают наночастицы магнетита, в связи с их низкой токсичностью, возможностью функционализации биомолекулами, относительной агрегативной устойчивостью, а также собственными суперпарамагнитными свойствами. В данной работе был предложен способ иммобилизации ФС на поверхность таких наночастиц.

В качестве ФС, который был иммобилизован на наночастицы магнетита, был выбран дипропокси-БПИ, использованный нами ранее (гл. 2.3). Наночастицы магнетита сферической формы, средний размер которых по данным ПЭМ составил 12 нм, получали на основе олеата железа. Метод иммобилизации ФС включал их инкубацию с пигментом в хлористом метиле с последующим упариванием и растворением в гексане. Полученные наноконплексы, нагруженные ФС, обрабатывали водным раствором плуроника F127 (Схема 8). Использование данного подхода позволило преодолеть агрегацию фотосенсибилизатора и сохранить его спектральные свойства. После загрузки ФС и покрытия наночастиц плуроником F127 средний гидродинамический диаметр

частиц, установленный методом динамического светорассеяния, составил 125 нм. Загрузка ФС на поверхность наночастиц составила 9.2 % масс.

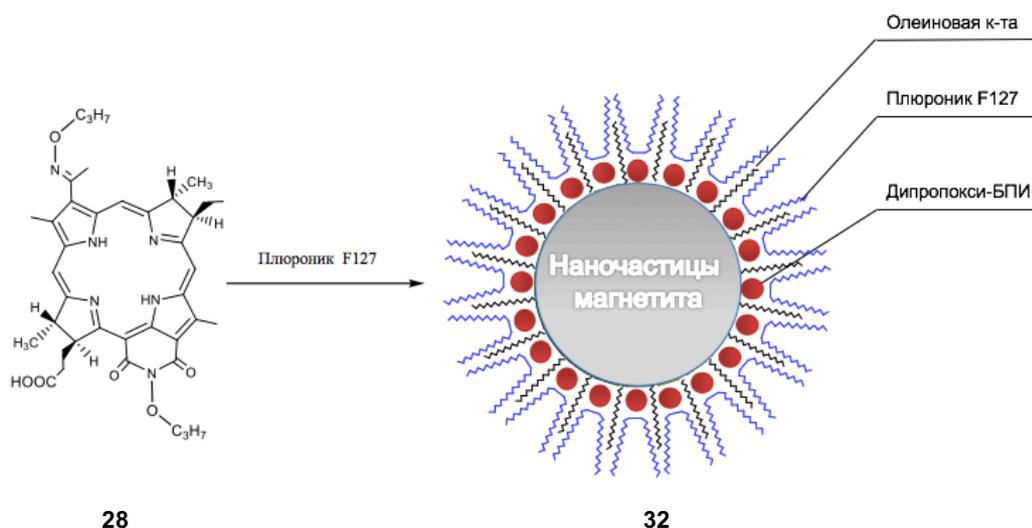


Схема 8. Иммуобилизация дипропокси-БПИ на наночастицы магнетита.

Изучение внутриклеточного накопления наноструктурированного дипропокси-БПИ **32** проводилось на двух клеточных линиях рака простаты – LNCaP и PC-3⁶. Аналогично ранее использованной клеточной линии 22Rv1, клетки LNCaP являются ПСМА-позитивными. В качестве контроля использована мицеллярная форма того же ФС в плюронике F127. Динамика накопления двух форм ФС – мицеллярной и наноструктурированной – оценивалась по интенсивности флуоресценции клеток. Обнаружено, что разница в скорости накопления обеих форм ФС в клетках линии LNCaP несущественна (Рис 3А). Однако, для клеток линии PC-3 было выявлено значительное различие (Рис 3В) – накопление наноструктурированного ФС оказалось в два раза выше. Данное обстоятельство, по-видимому, связано с различной морфологией клеток LNCaP и PC-3 и разными размерами частиц.

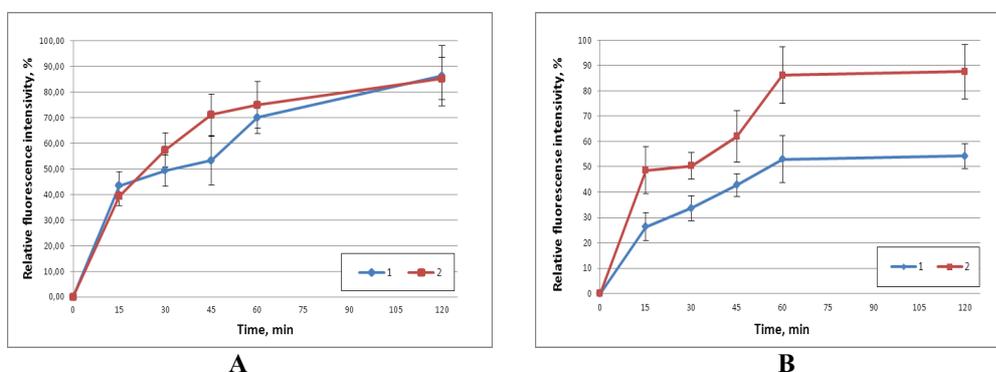


Рисунок 3. Кинетика накопления мицеллярного (1) и наноструктурированного (2) фотосенсибилизатора в клетках линии LNCaP (А) и PC-3 (В).

⁶ Эксперименты выполнены в МИСиС научным сотрудником лаборатории биомедицинских наноматериалов, к.б.н. А.С. Гараниной под руководством д.х.н., проф. А.Г. Мажуги

Поскольку в данном случае у ФС отсутствует векторный фрагмент, зависимость его накопления от экспрессии рецепторов (ПСМА+ или ПСМА-) не наблюдается.

Таким образом, в настоящей работе был предложен метод получения железоксидных наночастиц с иммобилизованным бактериопурпуринимидом, который позволяет сохранять фотодинамическую активность пигмента, сочетая ее с возможностями диагностики онкологических заболеваний методом магнитно-резонансной томографии за счет наличия в конструкции магнитоактивных наночастиц.

Выводы:

1. Получены конъюгаты аминоксидов хлорина e_6 с фолиевой кислотой и разработана их водорастворимая лекарственная форма. Изучение фотоиндуцированной цитотоксичности на клетках HeLa со сверхэкспрессией фолатных рецепторов показало, что длина спейсера между фармакофором и векторной молекулой имеет существенное значение для эффективности интернализации в опухолевые клетки. Обнаружено, что наибольшей активностью обладает соединение, содержащее спейсер из восьми метиленовых звеньев между ФС и фолиевой кислотой.
2. Синтезированы производные хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* с лигандом к ПСМА в различных положениях макроцикла. Исследование специфической активности *in vitro* на линиях клеток со сверхэкспрессией ПСМА и при отсутствии антигена показало, что введение ПСМА-лиганда в различные положения на периферии макроцикла существенно влияет на эффективность фотосенсибилизаторов. Наиболее активным оказался 13-замещенный хлорин.
3. Предложен новый способ введения лиганда ПСМА в положение 3 хлоринового макроцикла. Показано, что *click*-реакция тетразин-алкенового присоединения, протекающая в мягких условиях без катализатора, является эффективным способом региоселективного введения достаточно сложных молекул в производные хлорофилла *a*. Введение лиганда к ПСМА в положение 3 макроцикла с помощью данной реакции привело к значительному увеличению фототоксичности полученного ФС по сравнению с официальным препаратом.
4. Разработан метод получения железоксидных наночастиц с иммобилизованным бактериопурпуринимидом, который позволяет сохранять фотодинамическую активность пигмента, сочетая ее с возможностями диагностики онкологических заболеваний методом магнитно-резонансной томографии за счет наличия в конструкции магнитоактивных наночастиц.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Suvorov N.V., Grin M.A., Popkov A.M., Garanina A.S., Mironov A.F., Majouga A.G. Novel Photosensitizer based on bacteriopurpurinimide and magnetite nanoparticles // *Macroheterocycles*. – 2016. – V.9. – P. 175-179.
2. Суворов Н.В., Миронов А.Ф., Грин М.А. Фолиевая кислота и ее производные для таргетной фотодинамической терапии // *Известия Академии Наук. Серия Химическая*. – 2017. – №11. – С. 1982-2008.
3. Suvorov N.V., Machulkin A.E., Ivanova A.V., Popkov A.M., Bondareva E.A., Plotnikova E.A., Yakubovskaya R.I., Majouga A.G., Mironov A.F., Grin M.A. Synthesis of PSMA-targeted 13¹- and 15²-substituted chlorin e₆ derivatives and their biological properties // *Journal of Porphyrins and Phtalocyanins*. – 2018. – V. 22 – P. 1030-1038.
4. Suvorov N.V., Cheshkov D.A., Mironov A.F., Grin M.A. Inverse electron demand Diels–Alder reaction as the novel method of functionalization of natural chlorins // *Mendeleev Communications*. – 2019. – V. 29. – P. 206-208.

Патенты РФ:

5. Патент РФ N 2670087. Фотосенсибилизатор для лечения рака предстательной железы и способ его получения. // Грин М.А., Суворов Н.В. Мачулкин А.Е., Плотникова Е.А., Якубовская Р.И., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Филоненко Е.В. Опубликовано 18.10.2018, бюлл. № 29

Публикации в сборниках тезисов научных конференций:

6. Суворов Н.В., Островерхов П.В., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Грин М.А. Разработка таргетных наноструктурированных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака предстательной железы // *Материалы XII Международной конференции «Синтез и применение порфиринов и их аналогов»*, Иваново, Россия. – 2016. – С. 71.
7. Popkov A.M., Suvorov N.V., Majouga A.G., Mironov A.F., Grin M.A. The Synthesis of Nanostructured Photosensitizers Based on Gold and Ferromagnetic nanoparticles // *XVI International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering –2016» with elements of school of young scientists*. –Moscow, Russia. – 2016. – P. 140.
8. Суворов Н.В., Попков А.М., Гаранина А.С., Каплан М.А, Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Грин М.А. Новый фотосенсибилизатор на основе бактериопурпуриимида и наночастиц магнетита // *Материалы научной*

- конференции грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-века». – Москва, Россия – 2016. – С. 539.
9. Popkov A.M., Pogrebnyak I.V., Suvorov N.V., Ivanova A.V., Machulkin A.E., Majouga A.G., Mironov A.F., Grin M.A. Target conjugates based on natural chlorins for photodynamic therapy against cancer // Materials of 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. – Kazan, Russia – 2017. – P. 196.
 10. Mironov A.F., Grin M.A., Suvorov N.V., Ostroverkhov P.V., Kaplan M.A., Majouga A.G. Development of Targeted Nanostructured Bacteriochlorophyll *a* Based Photosensitizers for Photodynamic Cancer Therapy //16th World congress IPA 2017. Book of Abstracts. – Coimbra, Portugal. – 2017. – P. 261.
 11. Суворов Н.В., Попков А.М., Мачулкин А.Э., Иванова А.В., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Грин М.А. Получение таргетного фотосенсибилизатора на основе хлорина e_6 для фотодинамической терапии рака предстательной железы // Biomedical Photonics, Специальный выпуск – Материалы VI Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика. – Ростов-на-Дону, Россия. – 2017. – С. 21.
 12. Суворов Н.В., Грин М.А. Попков А.М. Гаранина А.С. Миронов А.Ф., Новый фотосенсибилизатор на основе бактериопурпуринимида и наночастиц магнетита // Материалы II Международной научно-практической школы-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение». – Звенигород, Россия. – 2017. – С. 143.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю заведующему кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии Н.А. Преображенского д.х.н., проф. Грину М.А., д.х.н., проф. Миронову А.Ф., д.х.н., проф. Мажуге А.Г., д.б.н., проф. Феофанову А.В. и д.б.н., проф. Якубовской Р.И. Автор искренне благодарен всем соавторам за проведение совместных исследований, а также сотрудникам кафедры ХТБАСМиОХ за помощь и постоянную поддержку.

Суворов Никита Владимирович

Модифицированные природные хлорины направленного действия по отношению к
опухолевым клеткам различного генеза

Подписано в печать __.__.____. Усл.п.л. –

Заказ №

Тираж:

Копицентр «ЧЕРТЕЖ.ру»

ИНН 7701723201

107023, Москва, ул.Б.Семеновская 11, стр.12 (495) 542-7389

www.chertez.ru