

Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда, растворимые в перфторуглеродах: синтез и свойства

^aБеляева Е.В.*, ^aМаркова А.А., ^aЗахарко М.А., ^bРадченко А.Ш., ^aСиган А.Л., ^aИконников Н.С., ^cШтиль А.А., ^aЧкаников Н.Д.

^a *Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова Российской академии наук, 119991, ГСП-1, Москва, В-334, ул. Вавилова, д. 28
e-mail: faftor.belyaeva@mail.ru*

^b *Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

^c *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Каширское шоссе, 23*

Аннотация: *Разработан метод получения не известных ранее синтетических полифторированных хлоринов для использования в фотодинамической терапии рака в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов в составе перфторуглеродных эмульсий. Для полученных соединений определены оптические характеристики, растворимость в перфтордекалине и эффективность генерации активных форм кислорода.*

Ключевые слова: *порфирины, хлорины, фотосенсибилизаторы, циклоприсоединение азометин-илидов, фторуглероды, перфтордекалин, растворимость во фторуглеродах, активные формы кислорода.*

Введение

Фотосенсибилизирующие вещества (или фотосенсибилизаторы - ФС) используются в фотодинамической терапии (ФДТ) рака для генерации активных форм кислорода. Одним из перспективных направлений развития метода ФДТ является комбинированное использование ФС с фторуглеродными эмульсиями [1]. Ранее такие композиции были сконструированы нами на основе полифторированных порфиринов (в качестве ФС) и препарата "Перфторан" и изучены в искусственно созданных условиях гипоксии (0,5% O₂) *in vitro*. Полученные данные демонстрировали усиление фотодинамической активности ФС при введении в составе фторуглеродных эмульсий по сравнению со свободной формой ФС [2].

В настоящее время более востребованными в качестве ФС для ФДТ являются гидрированные производные порфиринов - хлорины. Эти соединения обладают более интенсивным по сравнению с порфиринами поглощением света в области 630-800 нм (окно наибольшей проницаемости живых тканей). Однако, в основном примеры синтеза высокофторированных хлоринов, способных растворяться во фторуглеродах, сводятся к модификации хлоринов природного происхождения [3,4], а число полученных соединений остается ограниченным.

Целью данной работы являлась разработка удобного метода получения синтетических полифторированных хлоринов и исследование наиболее важных характеристик полученных соединений для их использования в качестве ФС - оптических свойств, растворимости в перфтордекалине (основном фторуглеродном компоненте эмульсии "Перфторан") и эффективности генерации активных форм кислорода.

Результаты и обсуждение

Синтез: Возможность получения хлоринов путем [3+2]-циклоприсоединения азометин-илида по "квазиизолированной" двойной связи пиррольного фрагмента порфиринового кольца впервые была продемонстрирована в работе Silva и соотр. [5] на примере *мезо*-тетра(пентафторфенил)порфирина. Механизм этой реакции включает поэтапное образование азометин-илида из альдегида и α -аминокислоты и присоединение этого высокорекреационного интермедиата к пиррольному фрагменту порфиринового кольца. Среди продуктов реакции авторами были обнаружены исходный порфирин, продукты моно- (хлорин), бис- (изобактерио- и бактериохлорин) и трис-присоединения.

В данной работе в качестве исходных реагентов нами были выбраны *мезо*-арил- (**1a-c** и **1e**) и *мезо*-алкил- (**1d**) замещенные порфирины, предварительно полученные по известным методикам [2,6]. Для генерирования азометин-илида использовались параформальдегид и N-метилглицин, условия синтеза и структуры полученных продуктов приведены на Схеме 1.

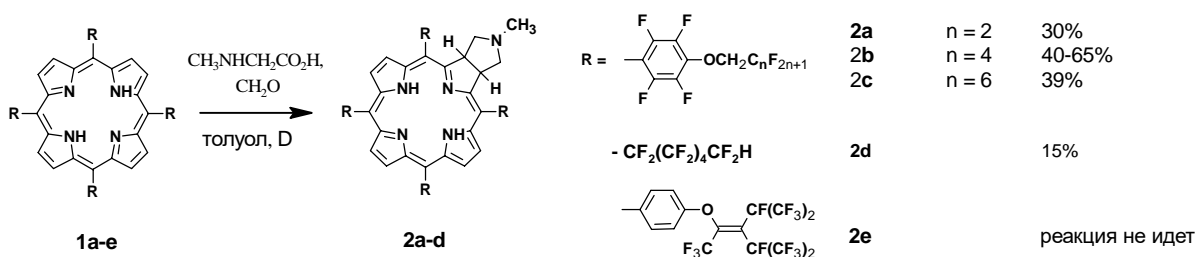


Схема 1. Взаимодействие порфиринов **1a-e** с азометин-илидом.

Мезо-арил-замещенные порфирины **1a-c** с линейными перфторалифатическими фрагментами присоединяли азометин-илид с образованием соответствующих хлоринов **2a-c** с выходами 30-65%. Независимо от продолжительности реакции и количества реагентов в реакционной смеси всегда оставался исходный порфирин, увеличение времени реакции приводило лишь к росту доли продуктов повторного присоединения азометин-илида к хлорину. *Мезо*-арил-замещенный порфирин **1e** с объемным перфторалифатическим заместителем вопреки ожиданиям не вступал в реакцию циклоприсоединения по пиррольному фрагменту порфиринового макроцикла. В этом случае на UV-Vis спектрах реакционной смеси наблюдались только сигналы исходного порфирина. *Мезо*-алкил-замещенный порфирин **1d** присоединял азометин-илид, однако выход соответствующего хлорина **2d** не превышал 15%. Следует отметить, что получение *мезо*-алкил-замещенных хлоринов ранее осуществлялось только на примере нефторированных аналогов путем присоединения алкил-лития (такое алкилирование является неселективным, реакция идет не только по β - но и по *мезо*-положениям с нарушением ароматичности) [7] и восстановлением с помощью *n*-тозилгидразина [8] или окислением тетраоксидом осмия [9].

Сравнение реакционной способности порфиринов **1a-e** дает основание предположить, что при наличии объемных или расположенных близко к порфириновому ядру перфторалифатических групп происходит экранирование реакционного центра ("квазиизолированной" двойной связи пиррольного фрагмента) и азометин-илид, представляющий собой заряженный диполь, с трудом вступает в реакцию [3+2]-циклоприсоединения.

Оптические характеристики: Положение максимума поглощения и молярный коэффициент экстинкции в области 630-800 нм является одной из ключевых характеристик ФС, в том числе порфиринов и хлоринов, поглощающих свет в этом

диапазоне с разной эффективностью. В качестве примера на Рисунке 1 приведены спектры поглощения порфирина **1b** и соответствующего хлорина **2b**.

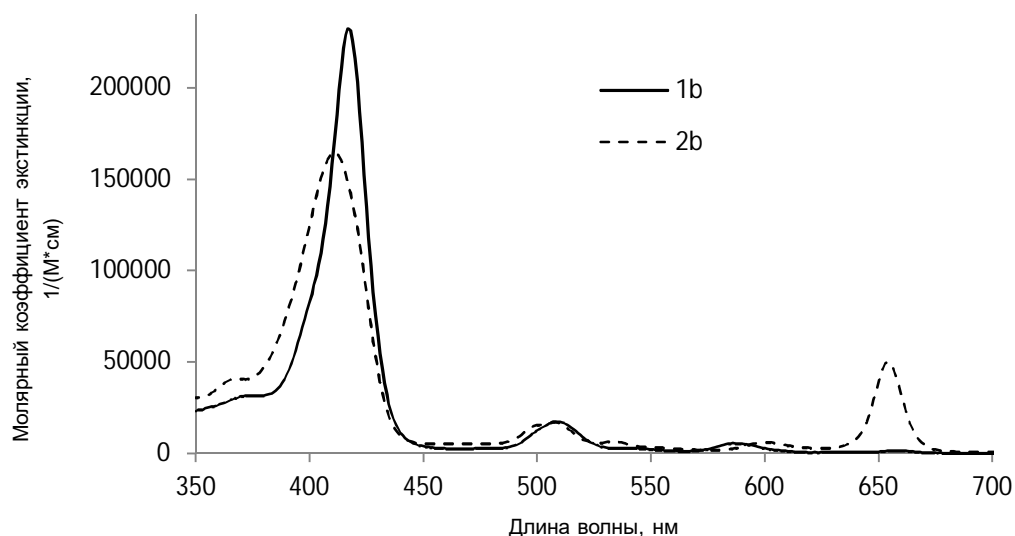


Рисунок 1. Спектры поглощения порфирина **1b** (сплошная линия) и хлорина **2b** (пунктирная линия) в бензоле.

Исследование оптических характеристик соединений **1a-c** и **2a-c** также проводилось в растворах перфтордекалина (ПФД). Показано, что длина перфторалифатического фрагмента не оказывает заметного влияния на положение всех максимумов поглощения как в ряду хлоринов, так и в ряду порфиринов. Величина смещения полосы Q4 в коротковолновую область у хлоринов по сравнению с порфиринами составляла 4-5 нм, а молярный коэффициент экстинкции полосы Q4 на порядок выше, чем у соответствующих порфиринов (см. Таблицу 1).

Таблица 1. Оптические характеристики, эффективность генерации активных форм кислорода (АФК) и растворимость в ПФД исходных порфиринов **1a-d** и хлоринов **2a-c**.

№	Максимумы поглощения λ , нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, $(M \times cm)^{-1}$)					Эффективность генерации АФК	Растворимость в ПФД c_{max} , мМ
	Sore	Q1	Q2	Q3	Q4		
1a	407	503 (22.5)	533 (2.2)	582 (6.4)	653 (1.0)	-	1
1b	407	502 (17.9)	532 (1.9)	582 (5.0)	653 (1.7)	-	1
1c	406 (137.2)	501 (13.9)	*	583 (4.7)	654 (2.3)	0.83**	1
1d	398 (89.4)	505 (9.1)	537 (6.5)	595 (3.7)	647 (9.3)	0.72**	1
1e	410	507	539	587	643	0.91**	1
2a	400 (173.9)	494 (14.6)	502 (17.0)	598 (4.9)	650 (61.9)	0.54	2
2b	399 (147.6)	494 (12.6)	502 (14.6)	596 (4.6)	650 (50.4)	0.50	114
2c	400 (189.9)	493 (17.2)	502 (19.3)	*	650 (65.3)	0.48	>100

* - невозможно определить положение максимума поглощения из-за наложение полос, ** - измерение проводили по фосфоресценции синглетного кислорода в бензоле

Растворимость: Для определения растворимости в ПФД полифторированных порфиринов и соответствующих хлоринов в данной работе использовался метод спектрофотометрии, полученные данные представлены в Таблице 1.

Нами было показано, что, в отличие от практически не растворимого в ПФД (<1 мкМ) мезо-тетра(пентафторфенил)порфирина, растворимость порфиринов **1a-e** достигала величины 1мМ и не зависела от строения перфторалифатических заместителей. Кардинальные изменения наблюдались при переходе к хлориновым структурам - разница

в растворимости внутри ряда хлоринов **2a-c** в зависимости от строения заместителей составляла уже 2 порядка (см Таблицу 1). Такая тенденция может быть связана с выведением N-метилпирролидинового фрагмента хлорина из плоскости макроцикла, что должно оказывать влияние на плотность упаковки и энергию связывания молекул в кристаллической структуре.

Генерация активных форм кислорода: При использовании метода ФДТ активные формы кислорода (АФК) являются основным поражающим фактором и, соответственно, эффективность генерации АФК является одним из основных критериев отбора потенциальных ФС. Одним из наиболее простых и доступных методов оценки этой величины является метод химических ловушек - соединений, реагирующих с АФК необратимо и нацело. Для проведения измерений в неполярных средах наиболее распространенной ловушкой является 1,3-дифенил-изобензофуран (DPIBF), падение концентрации которого фиксируется по спектрам поглощения.

В качестве стандарта при определении эффективности генерации АФК мы использовали наиболее близкий структурный аналог исследуемых ФС - мезо-тетра(пентафторфенил)порфирин, для которого величина эффективности генерации АФК составляет 0.7 в бензоле [10]. Использование метода химических ловушек позволило определить относительную эффективность генерации АФК в том же растворителе для хлоринов **2a-c**. Полученные величины для хлоринов **2a-c** приведены в Таблице 1, где также для сравнения даны величины для порфиринов **1c-e**, ранее определенные нами по флуоресценции синглетного кислорода относительно того же стандарта [2].

Заключение

Таким образом в данной работе предложен метод получения полифторированных хлоринов путем [3+2]-циклоприсоединения азометин-илида по "квазиизолированной" двойной связи пиррольного фрагмента порфиринового кольца. Показано, что по сравнению с соответствующими порфиринами полученные хлорины хорошо растворимы в фторуглеродах. По своим оптическим характеристикам и способности к генерации АФК полученные соединения могут считаться перспективными для использования в составе эмульсионных систем в качестве ФС для ФДТ.

Экспериментальная часть

Оборудование: Спектры ЯМР ^1H и ^{19}F регистрировали на спектрометрах Bruker AMX-400 и AMX-300 с частотой 400.13 и 376.50 МГц при 20 °С, отнесение сигналов проведено относительно сигнала остаточных протонов растворителя (CDCl_3 , DMCO-d_6) и трифторуксусной кислоты (TFA) в качестве внешнего стандарта. Масс-спектры ESI (1) и APCI (2) регистрировали на тандемном динамическом масс-спектрометре Finnigan LCQ Advantage, масс-анализатор с октапольной ионной ловушкой, насос MS Surveyor, автосамплер Surveyor, генератор азота Schmidlin-Lab. Распыляющий и вспомогательный газ азот с потоками 10/0 (1) и 70/10 (2). Температура испарителя 400 °С. (2). Температура трансферного капилляра 150 °С, напряжение поля между иглой и противоэлектродом 4.50 (1) и 6.0 kV (2). Образцы в растворе ацетонитрила 10^{-4} моль/литр вводили в ионный источник со шприцевого ввода со скоростью потока ацетонитрила 50 (1) и 350 (2) мкл/мин через инжектор Reodyne с петлей на 5 мкл. Масс-спектры (EI-DIP) регистрировали на масс-спектрометре Finnigan Polaris Q, энергия ионизирующего излучения 70 эВ, способ ввода образца - прямой ввод. Ход реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Merck Kieselgel 60 F254. Для колоночной хроматографии использовали силикагель (MN Kieselgel 60). Электронные спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Cary-300 UV-Vis (Agilent, США) и

однолучевом спектрофотометре Beckman DU 68 (Beckman Instruments, Япония) при комнатной температуре в перфтордекалине и бензоле (диапазон сканирования – 350-850 нм, в кварцевых кюветах 1×1 см).

Реактивы и растворители: Толуол, бензол, хлороформ, этилацетат перегоняли перед использованием. Перфтордекалин (P&M Invest), 1,3-дифенил-изобензофуран (Sigma-Aldrich) и остальные реактивы (Acros Organics) использовались без дополнительной очистки.

Общая методика синтеза хлоринов: К раствору порфирина **1a-e** (0,10 г, 1 экв.) в толуоле (25 мл) в атмосфере аргона последовательно добавили N-метилглицин (2 экв.) и параформальдегид (4,7 экв.) и полученную смесь кипятили 5 часов. Затем прибавили дополнительные порции N-метилглицина и параформальдегида (2 и 4,7 экв. соответственно) и продолжили кипячение еще 5 часов. Дополнительные порции N-метилглицина и параформальдегида добавляли до начала образования продуктов повторного присоединения азометин-ирида (по данным ТСХ). Затем реакционную смесь упарили досуха, полученный остаток разделяли методом колоночной хроматографии (силикагель, градиентное элюирование хлороформ-этилацетат).

2a (2,3,3a,21a-тетрагидро-2-метил-5,10,15,20-тетраakis[2,3,5,6-тетрафторо-4-(1H,1H-перфторпропил-1-окси)фенил]-1H,23H,25H-пирроло[3,4-β]порфин).

Фиолетовый порошок с зеленым отливом, выход 30%. ЯМР ^1H (CDCl_3 (7.28), δ , ppm): - 1.86 (с, 2H, NH), 2.74 (с, 3H, CH_3N), 3.06 (с, 2H, CH_2N), 4.19 (с, 2H, CH_2N), 4.95-5.09 (м, 8H, CH_2CF_2), 5.78 (с, 2H, CH), 8.38 (м, 2H, Pyr-H), 8.55 (с, 2H, Pyr-H), 8.78 (м, 2H, Pyr-H). ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , от TFA, δ , ppm): -80.45 - -80.18 (м, 4F), -79.06 (м, 2F), -77.30 (м, 2F), -62.05 (м, 2F), -61.70 (м, 4F), -60.99 (м, 2F), -48.55 (м, 8F), -7.53 (м, 12F). UV-Vis $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^3$, (см x M) $^{-1}$) в бензоле: 411 (176.1), 507, 534, 600, 654 (53.8); в ПФД: 400 (173.9), 494 (14.6), 502 (17.0), 598 (4.9), 650 (61.9). ESI-MS, m/z: 1551.9 [M+H] $^+$.

2b (2,3,3a,21a-тетрагидро-2-метил-5,10,15,20-тетраakis[2,3,5,6-тетрафторо-4-(1H,1H-перфторпентил-1-окси)фенил]-1H,23H,25H-пирроло[3,4-β]порфин):

Фиолетовый порошок с зеленым отливом, выход 65%. ЯМР ^1H (CDCl_3 (7.28), δ , ppm): - 1.93 (с, 2H, NH), 2.73 (с, 3H, CH_3N), 3.08 (с, 2H, CH_2N), 4.19 (с, 2H, CH_2N), 5.00-5.13 (м, 8H, CH_2CF_2), 5.78 (с, 2H, CH), 8.38 (м, 2H, Pyr-H), 8.55 (с, 2H, Pyr-H), 8.79 (м, 2H, Pyr-H). ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , от TFA, δ , ppm): -80.45, -80.17, -79.06, -77.28, -62.13, -61.74, -60.98, -50.49, -48.25, -45.00, -5.08. UV-Vis $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^3$, (см x M) $^{-1}$) в бензоле: 411 (162.5), 507 (17.2), 534 (6.6), 600 (6.0), 654 (49.6); в ПФД: 399 (157.8), 494 (12.6), 502 (14.6), 596 (4.6), 650 (50.4). APCI-MS, m/z: 1952.4 [M+H] $^+$.

2c (2,3,3a,21a-тетрагидро-2-метил-5,10,15,20-тетраakis[2,3,5,6-тетрафторо-4-(1H,1H-перфторгептил-1-окси)фенил]-1H,23H,25H-пирроло[3,4-β]порфин):

Фиолетовый порошок с зеленым отливом, выход 39%. ЯМР ^1H (CDCl_3 (7.28), δ , ppm): - 1.93 (с, 2H, NH), 2.70 (с, 3H, CH_3N), 3.05 (с, 2H, CH_2N), 4.18 (м, 2H, CH_2N), 4.98-5.12 (м, 8H, CH_2CF_2), 5.75 (с, 2H, CH), 8.37 (м, 2H, Pyr-H), 8.55 (с, 2H, Pyr-H), 8.78 (м, 2H, Pyr-H). ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , от TFA, δ , ppm): -80.36, -79.10, -77.35, -62.11, -61.77, -61.07, -50.41, -47.26, -47.05, -46.34, -44.76, -42.72, -5.03. UV-Vis $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^3$, (см x M) $^{-1}$) в бензоле: 411 (215.3), 507 (21.9), 534 (8.1), 600 (7.4), 654 (61.8); в ПФД: 400 (189.9), 493 (17.2), 502 (19.3), 596, 650 (65.3).

2d (2,3,3a,21a-тетрагидро-2-метил-5,10,15,20-тетраakis[6-Н-перфторгексил-1]-1Н,23Н,25Н-пирроло[3,4-β]порфин): Фиолетовый порошок, выход 15%. ЯМР ¹H (dmsо-d6 (2.51) + CDCl₃ (7.28), δ, ppm): 2.05 (с, 3Н, CH₃N), 3.09 (с, 2Н, CH₂N), 3.46 (с, 2Н, CH₂N), 5.57 (с, 2Н, CH), 6.19-6.61 (м, 4Н, CF₂H), 8.31-8.94 (м, 6Н, Pyr-H). ЯМР ¹⁹F (dmsо-d6 (2.51) + CDCl₃ (7.28), δ, ppm): -136.94, -129.35, -123.22, -121.37, -115.34, -86.96. UV-Vis λ_{макс}, нм в бензоле: 407, 506, 687. АРСІ-MS, m/z: 1568.8 [M+H]⁺.

Определение растворимости: Для определения растворимости были приготовлены насыщенные при комнатной температуре растворы хлоринов **2a-c** в ПФД. Для ускорения процесса растворение хлоринов проводили при нагревании, затем растворы выдерживали при комнатной температуре несколько суток для достижения равновесия. Насыщенные растворы разбавляли в необходимое количество раз для точного измерения оптической плотности (для расчетов использовали диапазон от 0.1 до 1.0 единиц). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Beckman DU 68. По известным коэффициентам экстинкции в соответствие с законом Бугера-Ламберта-Бера рассчитывали концентрацию растворенного вещества.

Генерация активных форм кислорода: Для экспериментов использовали свежеприготовленные растворы стандартного ФС (мезо-тетра(пентафторфенил)порфирин), ловушки (1,3-дифенил-изобензофуран - DPIBF) и исследуемых хлоринов **2a-c** в бензоле. Концентрации всех ФС - ~10⁻⁴ М, DPIBF - 10⁻³ М. Облучение растворов проводили на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Япония), источник излучения - Ксеноновая лампа 450 W. Длина волны возбуждения для всех образцов (503 нм), аналитическая длина волны для контроля концентрации DPIBF - 440 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary-300.

Методика: В кварцевую кювету (1x1 см), оборудованную перемешивающим устройством, помещали 2,5 мл бензола, 100 мкл раствора исследуемого ФС, 50 мкл раствора DPIBF и облучали светом 503 нм 3-4 раза по 15 с, на каждом этапе регистрировали спектр поглощения. Затем с использованием полученных данных строили зависимость оптической плотности раствора (λ = 440 нм) от времени облучения, определяли границы области линейности и рассчитывали тангенс угла наклона линейного участка (α). Затем по Формуле 1 рассчитывали эффективность генерации АФК.

$$\varphi_{\text{exp}} = \varphi_{\text{st}} \times \frac{\alpha_{\text{exp}}}{\alpha_{\text{st}}} \times \frac{1 - 10^{-A_{\text{st}}}}{1 - 10^{-A_{\text{exp}}}} \quad (1)$$

φ_{exp} и φ_{st} - эффективность генерации АФК исследуемого ФС и стандартного ФС по литературным данным, α_{exp} и α_{st} - тангенс угла наклона линейного участка на графике А-t при λ = 440 нм, A_{exp} и A_{st} - оптическая плотность раствора исследуемого ФС на длине волны возбуждения (503 нм).

Благодарности

Строение полученных соединений изучено с использованием оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-315-00432)

Список литературы

1. Scheer A., Kirsch M., Ferenz K.B. Perfluorocarbons in photodynamic and photothermal therapy // *J Nanosci Nanomed.* 2017. Т. 1. № 1. С. 21–27.
2. Belyaeva E. V. и др. Novel Fluorinated Porphyrins Sensitize Tumor Cells to Photodamage in Normoxia and Hypoxia: Synthesis and Biocompatible Formulations // *Anticancer. Agents Med. Chem.* 2018. Т. 18. № 4. С. 617–627.
3. Shibata R. и др. Self-aggregation of synthetic zinc chlorophyll derivatives possessing multi-perfluoroalkyl chains in perfluorinated solvents. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007. Т. 6. № 7. С. 749–757.
4. Tamiaki H., Nishiyama T., Shibata R. Self-aggregation of zinc chlorophylls possessing perfluoroalkyl chains in fluorinated solvents: Selective extraction of the self-aggregates with fluorinated phase and accelerated formation of the ordered supramolecules in this phase. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. Т. 17. № 7. С. 1920–1923.
5. Silva A.M.G. и др. meso-Tetraarylporphyrins as dipolarophiles in 1,3-dipolar cycloaddition reactions // *Chem. Commun.* 1999. № 17. С. 1767–1768.
6. Belyaeva E. V. и др. A method of introducing fluorinated substituents in porphyrin structure by nucleophilic substitution of fluorine in meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin and pentafluorobenzaldehyde with polyfluoroaliphatic alcohols // *Fluorine notes: сетевой журн.* 2015, N 5(102), URL: http://notes.fluorine1.ru/public/2015/5_2015/letters/rusletter2.html
7. Sergeeva N.N. и др. Synthesis of hydroporphyrins based on comparative studies of palladium-catalyzed and non-catalyzed approaches. // *Tetrahedron.* 2007. Т. 63. № 50. С. 12454–12464.
8. Ikezaki A. и др. Electronic structure of low-spin six-coordinate iron(III) meso - tetrapropylchlorin complexes // *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 2014. Т. 18. № 08n09. С. 778–791.
9. Aicher D. Preparation of β -functionalized dihydroxy-chlorins for photodynamic therapy. / D. Aicher, A. Wiehe, C. B. W. Stark, V. Albrecht, S. Grafe // *PCT Int. Appl.* –2012. –№ WO2012012809A2 –53pp.c.
10. Grancho J.C.P. и др. Synthesis, Spectra and Photophysics of some Free Base Tetrafluoroalkyl and Tetrafluoroaryl Porphyrins with Potential Applications in Imaging. // *Photochem. Photobiol.* 2002. Т. 75. № 3. С. 249.