



УДК 547.979.733

СИНТЕЗ МОДЕЛЬНЫХ ПОРФИРИН-ХЛОРИНОВЫХ ДИМЕРОВ С ПРОСТОЙ ЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

© 1995 г. Е. Г. Левинсон, А. Ф. Миронов

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, пр. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 10.06.94 г.

Осуществлен синтез порфиринов-хлориновых димеров с простой эфирной связью, обладающих интенсивной полосой поглощения в области 670 - 700 нм. В качестве гидрофобного компонента димеры содержат октаэтилпорфирин, а в качестве гидрофильного – производное хлорофилла – пурпурин 18. Раскрытие ангидридного цикла в последнем приводит к хлорину p_6 и его триметилловому эфиру. Щелочным гидролизом димеров получены производные с различной степенью амфифильности для изучения закономерностей проникновения и накопления фотосенсибилизаторов в злокачественных тканях.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, димерные порфирины, гетеродимер, октаэтилпорфирин, пурпурин 18, хлорин p_6 , амфифильность.

Димерные порфирины, соединенные между собой достаточно прочными ковалентными связями, весьма перспективны для изучения процессов преобразования энергии в природе, создания селективных катализаторов, а также в качестве фотосенсибилизаторов для диагностики и лечения злокачественных новообразований. Последний метод, получивший название “фотодинамическая терапия рака”, основан на способности этих соединений накапливаться в опухолях и при последующем облучении голубым светом ярко флуоресцировать, обнаруживая даже небольшие новообразования. Облучение светом красной области позволяет уничтожать опухоль, не затрагивая окружающую нормальную ткань. В этом методе обычно используются препараты на основе гематопорфирина (“Фотофрин 2”, США–Канада; “Фотосан”, ФРГ; отечественный “Фотогем”), представляющие собой сложные смеси моно-, ди-, тримерных и высших олигомерных порфиринов.

Многочисленными исследованиями [1 - 3] было показано, что активным началом в этих препаратах являются димерные, тримерные и высшие олигомерные порфирины с простой эфирной связью между макроциклами. По-видимому, меньшую роль играют олигомеры с иными типами связей. Известно несколько вариантов синтеза подобных димеров [1, 2]. Их отличают сравнительно низкие выходы целевых продуктов и недостаточная региоселективность.

В нашей лаборатории ранее был предложен метод направленного синтеза соединений этого ряда [4, 5]. Он основан на активации α -гидроксильной группы порфирина путем превращения

его в трифторацетат, который затем конденсируют с любым гидроксипорфирином в димерные или тримерные порфирины. При этом выходы получаемых соединений (65 - 75% для димеров) значительно превышают описанные в литературе. Изучение свойств димерных и тримерных порфиринов показало достаточную устойчивость простой эфирной связи в нейтральной, щелочной и умеренно кислой средах.

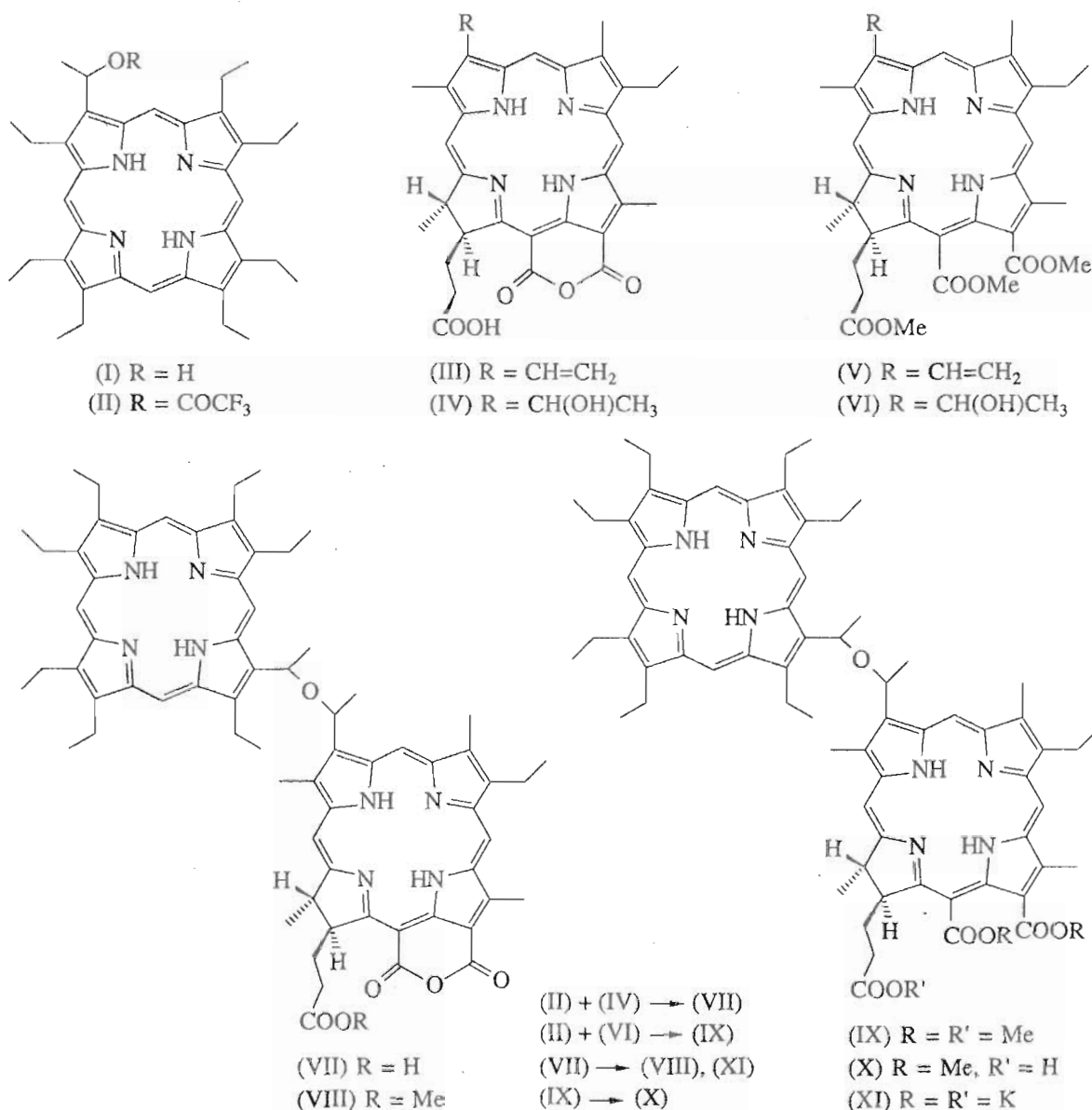
Данная работа посвящена синтезу несимметричных димеров, включающих наряду с порфириновым хлориновым макроциклом. Хлорины представляют особый интерес как возможные фотосенсибилизаторы второго поколения [6], обладающие высоким молярным коэффициентом поглощения основной полосы в длинноволновой части спектра, для которой ткани более “прозрачны”. Создание несимметричного порфиринов-хлоринового димера дает возможность объединить в одной молекуле спектральные преимущества хлоринов и селективность к опухоли, характерную для олигомерных порфиринов.

В качестве гидрофобного компонента для синтеза гетеродимеров выбран октаэтилпорфирин, а в качестве гидрофильного – производное природного хлорофилла – пурпурин 18. Последний привлекает не только из-за поглощения в области 700 нм, но также из-за наличия различных функциональных групп, позволяющих синтезировать необходимые производные и димеры с заданными свойствами. Присутствие в молекуле пурпурина 18 одного винильного заместителя создает возможность направленного синтеза димеров с простой эфирной связью, а раскрытие ангидридного

цикла приводит к образованию соединения, содержащего три карбоксильные группы. Таким образом, возможно получение гетеродимеров, содержащих наряду с порфириновой частью молекулы в качестве хлориновой пурпурина 18, хлорин p_6 и его эфиры, т.е. соединения с различной степенью амфифильности, что позволяет изучить проницаемость и накопление сенсibilизатора в клетке в зависимости от наличия в молекуле гидрофильных и гидрофобных заместителей [7 - 9].

Необходимый для синтеза гетеродимеров α -гидроксиэтилгептаэтилпорфирин (I) получен перегруппировкой дигидроксиоктаэтилхлорина в диоксане в присутствии соляной кислоты по методу, разработанному С. Чангом с сотрудниками [10], дигидроксиоктаэтилхлорин, в свою очередь, приготовлен окислением октаэтилпорфирина тетраоксидом осмия [11].

Пурпурин 18 (III) получен при щелочном окислении зеленых пигментов биомассы высших растений в соответствии с общей методикой [6]. В наших условиях при использовании отходов переработки наперстянки, принимая во внимание присутствие в исходном сырье не только производных хлорофилла и их алломеризованных форм, но также каротиноидов, липидов и других примесей, оптимальным оказалось окисление кислородом воздуха пигментной пасты в 10% спиртовом растворе щелочи при 80°C. Последующее подкисление реакционной массы, экстракция каротиноидов петролейным эфиром и хроматографическая очистка привели к пурпурину 18 (III) с общим выходом 22%. При раскрытии в щелочной среде ангидридного цикла пурпурина 18 и последующей этерификации диазометаном образовался триметилловый эфир хлорина p_6 .



Синтез α -гидроксипроизводных пурпурина 18 (IV) и хлорина p_6 (VI) осуществлен путем обработки соответствующего хлорина 40% HBr/AsOH с последующим гидролизом бромпроизводного.

Гетеродимеры получены конденсацией трифторацетата порфирина (II) с соответствующим гидроксихлорином в присутствии каталитических количеств 4-диметиламинопиридина. Образование димеров в реакционной массе подтверждено аналитической гель-хроматографией [3]. Препаративная гель-хроматография позволила выделить полученные димерные фракции, охарактеризовать их методами масс-спектрометрии и электронной спектроскопии. Выделенные соединения применяли в качестве хроматографических стандартов для препаративной тонкослойной хроматографии, проводимой в дальнейшем при обработке димеров.

Реакции димеризации протекают с высокой диастереоселективностью. В случае димера порфирина-хлорин p_6 , триметилэфир (IX) при аналитической хроматографии реакционной массы отчетливо различимы два основных изомера в соотношении 60 : 35, а два других в сумме составляют не более 5%, димер порфирина-пурпурин (VII) также представляет собой смесь двух основных изомеров в соотношении 60 : 40. Образование диастереомеров обусловлено наличием асимметрических центров у обоих исходных мономеров. Вводимые в реакцию конденсации α -гидроксиэтилхлорины (IV) и (VI) сами состоят из смеси диастереомеров, поскольку получены через гидробромирование по винильной группе производных природных порфиринов с определенной конфигурацией хиральных атомов в положениях 17 и 18. Это подтверждается расщеплением сигналов в спектре ПМР соединения (IV).

Димеры (VII) и (IX) преобразованы в производные с различной гидрофильностью. Раскрытие в присутствии щелочи ангидридного цикла в молекуле димера, содержащей пурпурин (VII), приводит к образованию трикальциевой соли (XI), при обработке этого же димера (VII) диазометаном образовался метиловый эфир (VIII). Щелочным гидролизом димера (IX) достигается селективное омыление только одной из трех группировок сложного эфира хлорина p_6 (по остатку пропионовой кислоты), в результате чего образуется диметиловый эфир (X). Таким образом, полученные соединения различаются количеством свободных и этерифицированных карбоксильных групп, что, по-видимому, существенно для изучения влияния амфифильности сенсбилизаторов на их накопление в опухолях.

Все синтезированные соединения переданы для проведения биологических испытаний в Онкологический институт им. П.А. Герцена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Электронные спектры для растворов веществ в CHCl_3 сняты на спектрофотометрах Shimadzu UV-240 (Япония) и Beckman DU 8 (США). Температура плавления определена с помощью прибора Koffler Bohetius (Германия). Масс-спектры получены на приборе МСБХ (SELMI, Украина) [12] методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии в сочетании с времяпролетным анализатором. Спектры ПМР записаны на приборе Bruker MSL 200 (200 МГц) в дейтерохлороформе, химические сдвиги определены относительно тетраметилсилана. Гель-хроматографию проводили на хроматографе фирмы Laboratorni Pstroje Praha (Чехо-Словакия) на геле Fractogel HW-40(S) фирмы Merck (Германия) в системе толуол-диметилсульфоксид-уксусная кислота (1 : 1 : 1) на колонках размером 8 × 800 мм (аналитическая) и 24 × 800 мм (препаративная). Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на жидкостном хроматографе фирмы Knauer (Германия). Колонка 3 × 250 мм, Nupersil ODS 6 мкм, элюент – метанол-вода (9 · 1) + 2% (по объему) трифторуксусной кислоты. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 40/100 и L 100/160 (Lachema). Аналитическую ТСХ проводили на пластинках НРТLC-Kieselgel 60 (Merck). Для препаративной ТСХ применяли силикагель 60 Н (Merck) на пластинках 20 × 20 см с толщиной слоя 1 мм. В качестве исходного сырья для получения пурпурина 18 использовали пигментную пасту из наперстянки пурпуровой (*Digitalis purpurea* L.), являющуюся промышленным отходом производства целанида. Содержание зеленых пигментов составляло 3 - 5%.

2,7,12,18-Тетраметил-3-винил-8-этил-13,15-(ангидро)-17-(2-карбоксиэтил)-17 α ,18 β -дигидропорфирин (пурпурин 18) (III). К раствору 15 г КОН в 5 мл воды и 150 мл изопропанола при перемешивании добавляли по каплям раствор 25 г смолы наперстянки в 50 мл изопропанола. Реакционную массу нагревали до 80°C и через смесь барботировали воздух в течение 1,5 ч, затем реакционную смесь разбавляли водой (1 л) и добавляли при перемешивании и охлаждении раствор 30 мл конц. HCl в 200 мл воды. Реакционную смесь промывали гексаном (6 × 500 мл) до отсутствия каротиноидов в органическом слое, нейтрализовали 20% раствором NaOH до pH 4 и экстрагировали пурпурин 18 хлороформом (3 × 150 мл). Органический слой промывали водой, высушивали сульфатом натрия и упаривали. После хроматографической очистки на фильтре (40 × 60 мм) с силикагелем L 100/160 в системе хлороформ-ацетон (4 : 1) и кристаллизации из хлороформа с бензолом (2 : 1) выход пурпурина 18 (III) чистотой не менее 95% (давные ВЭЖХ) составил 165 мг.

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (отношение интенсивностей): 361, 409, 478, 505, 544, 646, 698 (1.1 : 2.7 : 0.1 : 0.1 : 0.5 : 0.2 : 1.0). Лит. данные [6]: (ацетон) 361, 407, 479, 506, 544, 646, 696 (1.0 : 2.5 : 0.1 : 0.1 : 0.5 : 0.2 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 564 [M^+] (100), 550 (20), 536 (40), 522 (20), 491 (30).

3-Дезвинил-3-(α -гидроксиэтил-)пурпурин 18 (IV). Пурпурин 18 (III) (65 мг) растворяли в 1 мл 40% НВг/АсОН. Через 8 ч реакционную массу разбавляли водой (50 мл), добавляли 20 мл хлороформа, органический слой промывали водой, высушивали сульфатом натрия, упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем L 40/100 в системе хлороформ-ацетон (5 : 3). После перекристаллизации из метанола выход гидроксипурпурина (IV) составил 35 мг (54%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм ($\epsilon \times 10^{-3}$): 362 (27.4), 410 (66.9), 477 (2.1), 506 (3.6), 542 (10.1), 642 (4.7), 694 (19.8).

Масс-спектр, m/z (I , %): 582 [M^+] (100), 564 (30), 508 (50).

Спектр ПМР (δ , м. д.): 9.77 и 9.68 (по 0.5Н каждый*, с, 5-мезо-Н), 9.46 (1Н, с, 10-мезо-Н), 8.45 и 8.48 (по 0.5Н каждый, с, 20-мезо-Н), 6.28 (1Н, к, 3-СН(ОН)СН₃), 5.02 (1Н, м, 18-Н), 4.34 (1Н, м, 17-Н), 3.67 (3Н, с, 12-СН₃), 3.59 (2Н, к, 8-СН₂СН₃), 3.31 и 3.34 (3Н суммарно, с, 2-СН₃), 3.12 (3Н, с, 7-СН₃), 2.50 (2Н, м, 17-СН₂СН₂СООН), 2.02 (2Н, м, 17-СН₂СН₂СООН), 1.58 (3Н, д, 3-СН(ОН)СН₃), 1.20 (3Н, д, 18-СН₃), 0.78 (3Н, т, 8-СН₂СН₃).

3- α -[α -(3',7',8',12',13',17',18'-Гептаэтилпорфирин-2'-ил-)-этокси]-этил-2,7,12,18-тетраметил-8-этил-13,15-(ангидро)-17-(2-карбоксиил)-17 α ,18 β -дигидропорфирин (VII) (димер порфирин-пурпурин 18). Гидроксиэтилгептаэтилпорфирин (I) (14 мг) растворяли в 1 мл ангидрида трифторуксусной кислоты, через 20 мин избыток ангидрида отгоняли при пониженном давлении, полученный трифторацетат порфирина (II) высушивали от следов трифторуксусного ангидрида на масляном насосе. Раствор 20 мг гидроксиэтилпурпурина (IV) в 3 мл свежеперегнанного хлористого метилена добавляли к трифторацетату порфирина. Через 5 ч к реакционной смеси прибавляли 2 мг 4-диметиламинопиридина, выдерживали реакционную массу 24 ч и затем хроматографировали на пластине с силикагелем 60 Н в системе хлороформ-ацетон (3 : 1), продукт затирали в петролейном эфире. Выход 26 мг (90%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 399, 505, 544, 568, 624, 698 (2.5 : 0.3 : 0.5 : 0.1 : 0.1 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 1114 [M^+] (100), 564 (20), 550 (50), 534 (50).

* Расщепление сигналов обусловлено различием диастереомеров, образующихся из-за трех асимметрических центров в положениях 3, 17 и 18.

3- α -[α -(3',7',8',12',13',17',18'-Гептаэтилпорфирин-2'-ил-)-этокси]-этил-2,7,12,18-тетраметил-8-этил-13,15-(ангидро)-17-(2-метоксикарбонил)-этил-17 α ,18 β -дигидропорфирин (VIII) (димер порфирин-пурпурин 18, метиловый эфир). К раствору 6 мг димера (VII) в 2 мл хлороформа добавляли 3 мл раствора диазометана в диметиловом эфире. Через 30 мин растворитель упаривали, продукт затирали в петролейном эфире. Выход 5 мг (85%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 399, 505, 544, 568, 624, 698 (2.5 : 0.3 : 0.5 : 0.1 : 0.1 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 1129 [$M^+ + H$] (100), 578 (20), 550 (25), 534 (35), 505 (30).

3- α -[α -(3',7',8',12',13',17',18'-Гептаэтилпорфирин-2'-ил-)-этокси]-этил-2,7,12,18-тетраметил-8-этил-13,15-дикарбокси-17-(2-карбоксиил)-этил-17 α ,18 β -дигидропорфирин, трикалиевая соль (XI) (димер порфирин-хлорин p_6 , К₃). К раствору 8 мг (7.2 мкмоль) порфирин-пурпуринового димера (VII) в 1 мл метанола добавляли раствор 4 мг (28 мкмоль) карбоната калия в 0.2 мл воды и 2 мл метанола. Раствор перемешивали 20 мин, затем растворитель упаривали, остаток высушивали на масляном насосе. Получали 9.8 мг продукта с 95% содержанием соединения (XI).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 402, 500, 535, 566, 620, 659 (5.2 : 0.5 : 0.2 : 0.1 : 0.1 : 1.0).

2,7,12,18-Тетраметил-3-винил-8-этил-13,15-диметоксикарбонил-17-(2-метоксикарбонил)-этил-17 α ,18 β -дигидропорфирин (V) (хлорин p_6 , триметиловый эфир). К раствору 108 мг пурпурина 18 (III) в 100 мл тетрагидрофурана добавляли 40 мл 10% водного раствора КОН, реакционную массу перемешивали 40 мин, выливали в 250 мл воды, нейтрализовали 10% HCl до pH 5. Продукт экстрагировали хлороформом, этерифицировали диазометаном, переосаждали из хлороформа с петролейным эфиром. Выход 107 мг (91%). Т. пл. 232 - 234°C (236°C [6]).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 403, 499, 528, 564, 615, 668 (3.5 : 0.3 : 0.1 : 0.04 : 0.1 : 1.0). Лит. данные [6]: 403, 499, 529, 564, 615, 670 (3.5 : 0.3 : 0.1 : 0.04 : 0.1 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 625 [$M^+ + H$] (100), 610 (20), 596 (20), 582 (15).

3-Дезвинил-3-(α -гидроксиэтил-)хлорина p_6 триметиловый эфир (VI). 56 мг триметилового эфира хлорина p_6 (V) растворяли в 3 мл 40% НВг/АсОН. Через 4 ч реакционную массу разбавляли водой (50 мл), нейтрализовали раствором 20% КОН, осадок отфильтровали, высушили на воздухе, растворили в хлороформе и этерифицировали диазометаном. После хроматографической очистки на колонке с силикагелем L 100/160 в системе хлороформ-ацетон (98 : 2) и кристаллизации из петролейного эфира выход триметилового эфира гидроксихлорина p_6 (VI) составил 36 мг (63%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 399, 497, 527, 560, 608, 662 (3.5 : 0.3 : 0.1 : 0.02 : 0.1 : 1.0). Лит. данные [6]: 399, 497, 527, 560, 609, 662 (2.5 : 0.3 : 0.1 : 0.2 : 0.1 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 642 [M^+] (100), 628 (10), 614 (25), 600 (25).

3- α -[α -(3',7',8',12',13',17',18'-Гептаэтилпорфирин-2'-ил)-этокси]-этил-2,7,12,18-тетраметил-8-этил-13,15-диметоксикарбонил-17-(2-метоксикарбонил)-этил-17 α ,18 β -дигидропорфирин (IX) (димер порфирин-хлорин p_6 , триметиловый эфир). Гидроксиэтилгептаэтилпорфирин (I) (10 мг) растворяли в 1.5 мл ангидрида трифторуксусной кислоты, через 20 мин избыток ангидрида отгоняли, полученный трифторацетат (II) высушивали от следов трифторуксусного ангидрида на масляном насосе. Раствор 18 мг триметилового эфира гидроксиэтилхлорина p_6 (VI) в 3 мл свежеперегнанного хлористого метилена добавляли к трифторацетату порфирина. Через 4 ч к реакционной смеси прибавляли 2 мг 4-диметиламинопиридина и реакционную смесь выдерживали 24 ч. Целевой продукт выделяли хроматографированием на пластинах с силикагелем 60 Н в хлороформе и затирали в петролейном эфире. Выход 19 мг (89%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 399, 499, 535, 559, 600, 620, 663 (6.4 : 0.7 : 0.3 : 0.2 : 0.1 : 0.2 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 1175 [$M^+ + H$] (100), 625 (25), 550 (10), 534 (40).

3- α -[α -(3',7',8',12',13',17',18'-Гептаэтилпорфирин-2'-ил)-этокси]-этил-2,7,12,18-тетраметил-8-этил-13,15-диметоксикарбонил-17-(2-карбоксии)-этил-17 α ,18 β -дигидропорфирин (X) (димер порфирин-хлорин p_6 , диметиловый эфир). К раствору 30 мг димера (IX) в 3 мл метанола прибавляли 3 мл 40% раствора КОН в метаноле, смесь перемешивали 2 ч, затем разбавляли водой, нейтрали-

зовали 10% соляной кислотой и экстрагировали порфирин-хлорин p_6 (X) хлороформом. Выход 23 мг (82%).

Электронный спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм: 398, 499, 535, 565, 601, 620, 662 (6.4 : 0.7 : 0.3 : 0.2 : 0.1 : 0.2 : 1.0).

Масс-спектр, m/z (I , %): 1160 [M^+] (100), 611 (30), 534 (90).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pandey R.K., Shiau F.Y., Dougherty T.J., Smith K.M. // *Tetrahedron*. 1991. V. 47. № 46. P. 9571 - 9584.
2. Morris I.K., Ward A.D. // *Tetrahedron Lett.* 1988. V. 29. № 20. P. 2501 - 2504.
3. Mironov A.F., Seylanov A.S., Seylanov J.A., Pizhik V.M., Deruzhenko I.V., Nockel A.J. // *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*. 1992. № 16. P. 341-345.
4. Mironov A.F., Nizhnik A.N., Deruzhenko I.V., Bonnett R. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. № 44. P. 6409 - 6412.
5. Levinson E.G., Nizhnik A.N., Mironov A.F. // *Mendeleev Communication*. 1992. № 3. P. 95 - 96.
6. Brandis A.S., Kozyrev A.N., Mironov A.F. // *Tetrahedron*. 1992. V. 48. № 31. P. 6485 - 6494.
7. De Paolis A., Chandra S., Charalambides A.A., Bonnett R., Magnus I.A. // *Biochem. J.* 1985. № 226. P. 757 - 766.
8. Bonnett R., Ioanou S., White R.D., Winfield U.J., Berenbaum M.C. // *Photobiochem. and Photobiophys., Suppl.* 1987. P. 45 - 56.
9. Bonnett R., White R.D., Winfield U.J., Berenbaum M.C. // *Biochem. J.* 1989. № 261. P. 277 - 280.
10. Chang C.K., Sotiriou C. // *J. Org. Chem.* 1987. V. 52. № 5. P. 926 - 929.
11. Adams K.R., Berenbaum M.C., Bonnett R., Nizhnik A.N., Salgado A., Valles M.A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1992. P. 1465 - 1470.
12. Knysh A.N., Savin O.R., Loschinin M.V. // *Proceedings of First International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, Bulgaria*. 1989. V. 2. P. 370 - 372.

Synthesis of Model Ether-Linked Porphyrin-Chlorin Dimers

E. G. Levinson and A. F. Mironov*

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract – Synthesis of model porphyrin-chlorin dimers with ether bond between the porphyrin rings has been performed. New heterodimers have intense absorption maxima in the range of 670 - 700 nm. Octaethylporphyrin was chosen as hydrophobic moiety, and chlorophyll derivative purpurin 18 was used as hydrophilic component. Opening the anhydride ring of purpurin 18 under alkali treatment led to formation of chlorin p_6 and its trimethyl ester. Consecutive saponification of dimers afforded derivatives with different grade of chlorins esterification, that would allow to study regularity of sensitizer penetration and accumulation in tumors in dependence on its amphiphility.

Key words: photosensitizer, dimeric porphyrins, heterodimer, octaethylporphyrin, purpurin 18, chlorin p_6 , amphiphility.

* To whom correspondence should be addressed.