



СИНТЕЗ ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕОФОРБИДА

© 2000 г. А. А. Аксенова[#], Ю. Л. Себякин, А. Ф. Миронов

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

Поступила в редакцию 14.05.99 г. Принята к печати 28.09.99 г.

Осуществлен синтез новых производных феофорбида и пиррофеофорбида, содержащих углеводные фрагменты. В качестве последних использовались производные галактопиранозы. Галактопиранозилфеофорбид и галактопиранозилпиррофеофорбид со свободными гидроксильными группами обладают растворимостью в воде, что позволит использовать их в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия; гликозилированные порфирины.

Конструирование водорастворимых гликозилированных порфиринов с заданными свойствами является новым направлением в химии биологически активных соединений. Системы, включающие подобные порфирины, могут найти применение при моделировании разнообразных биохимических процессов, включая транспорт электронов, преобразование энергии, метаболизм лекарственных соединений и др.

Особенно заметный прогресс в этой области за последние 10 лет связан с получением фотосенсибилизаторов нового поколения для фотодинамической терапии рака (ФДТ). Гликопорфирины способны накапливаться в опухолевых тканях и обладают фототоксичностью. Хорошая растворимость в воде благоприятствует быстрому удалению сенсибилизатора из организма после терапии, а гликозидные остатки могут участвовать в процессах межклеточного узнавания [1, 2].

В качестве исходных соединений для синтеза гликопорфиринов в настоящее время широко используются синтетические порфирины, в частности производные тетрафенилпорфирина [3, 4]. Но при всей значимости синтетических фотосенсибилизаторов основные перспективы создания новых препаратов связывают с природными пигментами – производными хлорофиллов и бактериохлорофиллов. Выбор зеленых пигментов в качестве основы для синтеза новых фотосенсибилизаторов обусловлен рядом причин, включая такие, как широкое распространение в природе, возможность химической модификации боковых

заместителей, структурная близость к эндогенным порфиринам, что позволяет предполагать низкий уровень токсичности подобных соединений и быстрое выведение из организма [5–7].

В связи с этим разработка простого и удобного метода введения различных углеводных фрагментов в структуру природных хлоринов представляет большой научный и практический интерес. В настоящей работе нами описан синтез новых гликозилированных порфиринов на основе феофорбида *a*. Как известно, многочисленные производные хлорофилла *a* в основном удовлетворяют требованиям, предъявляемым к фотосенсибилизаторам второго поколения. Они имеют низкую темновую токсичность, хорошо накапливаются в опухолях и быстро выводятся из организма. Кроме того, они обладают интенсивным поглощением в области 650–700 нм, что позволяет работать со светом, глубоко проникающим в ткани, и хорошо генерируют синглетный кислород [7, 17].

Многочисленные модификации природных хлоринов связаны с возможностью различных превращений винильной группы в пиррольном кольце А. Для активации винильной группы нами использован метод Фишера (присоединение бромистого водорода с образованием соответствующих α -бромэтильных производных с последующим замещением атома брома на спиртовой остаток) [8–10].

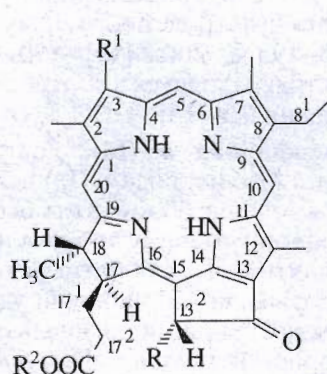
Гидробромирование феофорбида *a* (**Ia**) и пиррофеофорбида *a* (**Ib**) проводили по описанной методике [10] свежеприготовленным 50% раствором НВг в ледяной уксусной кислоте в течение 1 сут. После удаления кислоты в вакууме получали ярко-зеленые бромиды (**IIa**, **б**), которые в силу их

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 434-85-44; e-mail: mironov@httos.mifht.msk.ru).

неустойчивости и высокой реакционной способности не выделяли и сразу использовали на последующих стадиях.

Синтезированные ранее в рамках работ по созданию новых сенсibilizаторов для ФДТ порфи-

рины, несущие галактопиранозильные остатки, способны продуцировать синглетный кислород и обладают фототоксичностью [11, 12]. Поэтому в качестве углеводного заместителя нами выбраны производные галактозы.

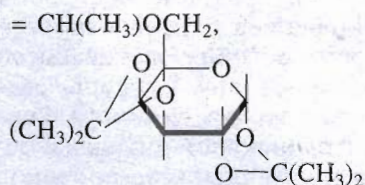


а: R = COOCH₃
б: R = H

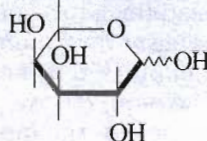
(Iа, б): R¹ = CH=CH₂, R² = H

(IIа, б): R¹ = CH(CH₃)Br, R² = H

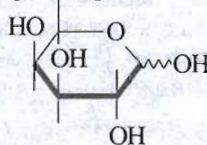
(IIIа, б): R¹ = CH(CH₃)OCH₂, R² = H



(IVа, б): R¹ = CH(CH₃)OCH₂, R² = H



(Vа, б): R¹ = CH(CH₃)OCH₂, R² = CH₃



С целью увеличения селективности реакции алкилирования использовали 1,2;3,4-ди-*O*-изопропилиденгалактозу, которую получали конденсацией галактозы с ацетоном в присутствии конц. H₂SO₄ и безводного сульфата меди(II) в качестве катализатора [13]. При взаимодействии бромпроизводных (IIа, б) с безводной 1,2;3,4-ди-*O*-изопропилиденгалактопиранозой происходит замещение атома брома на спиртовой остаток при шестом атоме углерода галактопиранозы с образованием гликофеофорбидов (IIIа, б).

Нами изучены различные условия проведения этой реакции. Установлено, что реакция протекает с достаточным выходом только в присутствии основных реагентов, связывающих выделяющийся HBr (безводного поташа или 4-диметиламинопиридина). Однако в этих условиях возможно протекание конкурирующей реакции элиминирования HBr с образованием винильной группы. Наибольший выход целевого продукта (30–32%) наблюдался при медленном прикапывании раствора 4-диметиламинопиридина к смеси бромида и углевода в безводном хлороформе при небольшом нагревании (45–50°C) в течение 2 ч.

Защитные изопропилиденные группировки удаляли, обрабатывая реакционную массу смесью

трифторуксусная кислота–вода (7 : 1) при комнатной температуре в течение 20–30 мин. При этом получали гликофеофорбид (IVа) и гликопирофеофорбид (IVб) со свободными гидроксильными группами с количественным выходом. Продукты выделяли хроматографически и характеризовали в виде метиловых эфиров (Va, б), полученных обработкой 5% H₂SO₄ в метаноле в течение 5 ч. По данным ТСХ, ПМР- и масс-спектров в этих условиях образования заметных количеств замещенных метилгалактопиранозидов не происходит и соединения (Va, б) являются единственными продуктами реакции. В масс-спектрах полевой десорбции (ПД) полученных феофорбидов (Va, б) присутствуют только пики молекулярных ионов 786.7 (*M*⁺) и 728.0 (*M*⁺) соответственно. Однако при более длительной обработке (20 ч) выход соответствующих замещенных метилгалактозидов существенно возрастает, что подтверждено данными масс-спектров ПД, в которых наблюдаются пики молекулярных ионов метиловых эфиров метилгалактопиранозилзамещенных производных феофорбида с *m/z* 800.6 (*M*⁺) и пирофеофорбида с *m/z* 742.0 (*M*⁺). В ПМР-спектрах появляется сигнал OCH₃-группы в виде одного синглета (в этих условиях образуется преимущественно α-аномер [14]) с δ 3.05 м. д.

В электронных спектрах соединений (**Va**, **б**) наблюдается небольшой гипсохромный сдвиг основной полосы поглощения (с 667 до 658 нм). По данным ЯМР-спектроскопии гликофеофорбиды (**Va**, **б**) образуются в виде практически эквимолярной смеси двух диастереомеров и α - и β -аномеров каждого из них в соотношении 3 : 2. В спектрах ^1H -ЯМР* этих соединений сигналы мезо-протона H5, расположенного наиболее близко к хиральному заместителю, представляют собой 4 синглета с соотношением интенсивностей 2 : 3 : 2 : 3, что говорит об образовании смеси 4 изомеров [10], сигналы метильной группы, связанной с асимметричным атомом углерода феофорбида – 2 дублета с одинаковой интенсивностью (2.17 и 2.14 м. д.), сигналы мезо-протонов H10 – 2 синглета. Сигнал наиболее удаленного от углеводного заместителя мезо-протона H20 не расщепляется. Авторами [10] наблюдалось аналогичное расщепление сигналов мезо-протонов. Углеводные фрагменты соединений (**Va**, **б**) находятся преимущественно в пиранозной форме, о чем свидетельствуют характерные для пираноз сигналы аномерных протонов в области 5.3 м. д. (α -аномер) и 4.4 м. д. (β -аномер), а также то обстоятельство, что удаление защитных изопропилиденовых групп проводилось в условиях, в которых, как продемонстрировано ранее авторами [11], продукт образуется исключительно в пиранозной форме.

Галактопиранозилфеофорбид (**IVa**) и галактопиранозилпирофеофорбид (**IVб**) со свободными гидроксильными группами практически нерастворимы в неполярных растворителях (хлороформе и хлористом метиле), хорошо растворимы в спиртах и обладают ограниченной растворимостью в воде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -ЯМР снимали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-200 (Германия) с рабочей частотой 200 МГц, внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия – в герцах. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Jasco-7800 (Япония). Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (Украина) с ионизацией осколками деления ^{252}Cf . Ускоряющее напряжение ± 15 кВ. Температуры плавления определяли на приборе Воейтис и не корректировали. ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия).

50% НВг в уксусной кислоте получали по методу [10].

* Отнесение сигналов сделано на основании литературных данных [10, 11].

1,2;3,4-Ди-*O*-изопропилиденгалактопиранозу получали по стандартной методике [13].

Феофорбид а (Ia). Хлорофилл *a* экстрагировали из водоросли *Spirulina platensis* в соответствии с методом [15]. Феофорбид *a* получали из хлорофилла *a* с использованием стандартных методик [16], очищали перекристаллизацией из хлористого метилена и петролейного эфира. Выход 70%. Т. пл. 188–195°C (лит. [15], 190–195°C). УФ- и ПМР-спектры находятся в соответствии с литературными данными [15].

Пирофеофорбид а (Iб). Растворяли 95 мг (0.16 ммоль) феофорбида *a* (**Ia**) в 50 мл пиридина при 100°C в течение 30 мин в атмосфере азота. Затем в реакционную массу добавляли 0.4 г фторида лития и кипятили 4 ч с обратным холодильником. Отфильтровывали LiF, пиридин удаляли в вакууме. Продукт перекристаллизовывали из смеси метанол–хлористый метилен. Получали 67 мг (78%) пирофеофорбида *a* в виде темно-фиолетовых кристаллов. Масс-спектр: m/z 534.7 (M^+). УФ- и ПМР-спектры соответствуют литературным данным [16, 17].

Галактопиранозилфеофорбид (IVa) и его метиловый эфир (Va). К 50 мг (0.084 ммоль) феофорбида *a* (**Ia**) при охлаждении до 0°C добавляли 2 мл свежеприготовленного 50% раствора НВг в ледяной уксусной кислоте и выдерживали в темноте при комнатной температуре 24 ч. Уксусную кислоту удаляли на ротонном испарителе, остаток высушивали в течение 1 ч в вакууме. К полученному бромиду (**IIa**) добавляли раствор 100 мг (0.38 ммоль) безводной 1,2;3,4-ди-*O*-изопропилиден- α -*D*-галактопиранозы в 5 мл сухого хлороформа и прикапывали раствор 11 мг (0.09 ммоль) 4-диметиламинопиридина в 3 мл безводного хлороформа при перемешивании и нагревании до 50°C в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Твердый остаток растворяли в 4 мл смеси трифторуксусная кислота–вода (7 : 1) и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Кислоту удаляли в вакууме азеотропной перегонкой с толуолом (3 × 5 мл). Продукт выделяли с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе хлороформ–метанол (9 : 1), собирая фракцию с R_f 0.3. Получали 21 мг (32%) соединения (**IVa**). Масс-спектр: m/z 772.8 (M^+), 714.5 ($M^+ - \text{COOMe}$).

Полученный продукт перемешивали в темноте в растворе 5% H_2SO_4 в метаноле (5 мл) в течение 5 ч при комнатной температуре. Реакционную массу разбавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (3 × 10 мл). После удаления растворителя и переосаждения из хлороформа в петролейный эфир получали 14 мг (85%) соответствующего метилового эфира (**Va**). Масс-спектр: m/z 786.7 (M^+), 728.9 ($M^+ - \text{COOMe}$). Электронный спектр (ацетон, λ_{max} , нм ($\epsilon \times 10^{-3}$)): 658 (38.2), 602.2 (6.3), 531.7 (7.7), 501.7 (8.4), 405.4 (79.0). ^1H -ЯМР

(CDCl₃-CD₃OD, 15 : 1, δ, м. д.): 9.65, 9.62, 9.58 и 9.56 (1H, 4 с, H5), 9.38 и 9.4 (1H, 2 с, H10), 8.49 (1H, с, H20), 6.17 (1H, с, H13²), 5.9 (1H, м, OCHCH₃), 5.3–4.9 (3.6H, 3 м, H1' α-аномера, H2', H3', H4'), 4.37 (0.4H, м*, H1' β-аномера), 4.24 (1H, м, H18), 4.10 (1H, м, H17), 3.85–3.65 (2H, м, H5', H6'), 3.87 (3H, с, 13²-COOCH₃), 3.62 (3H, с, 17²-COOCH₃), 3.52 (3H, с, 12-CH₃), 3.55 (2H, к, H8'), 3.33 и 3.28 (3H, 2 с, 2-CH₃), 3.15 (3H, с, 7-CH₃), 2.25–2.67 (4H, м, H17¹, H17²), 2.1 (3H, м, OCHCH₃), 1.72 (3H, д, 18-CH₃), 1.6 (3H, т, 8¹-CH₃).

Галактопиранозилпирофеофорбид (IVб). Получали аналогично (IVа), выход 30%. Масс-спектр: *m/z* 714.7 (M⁺). Метанолиз дает соответствующий метиловый эфир (Vб) с выходом 85%. Масс-спектр: *m/z* 728.9 (M⁺). Электронный спектр (хлороформ, λ_{max}, нм (ε × 10⁻³)): 658.2 (41.3), 603 (6.5), 534 (8.1), 502.5 (8.5), 409 (81.3). ¹H-ЯМР (CDCl₃-CD₃OD, 15 : 1, δ, м. д.): 9.67 и 9.63 (1H, 2 уш. с, H5), 9.51 (1H, уш. с, H10), 8.52 (1H, с, H20), 6.0 (1H, м, OCHCH₃), 5.15 (2H, к, H13²), 5.27 (0.5H, м*, H1' α-аномера), 4.72 (1H, 2 уш. с, H3'), 4.42 (0.4H, м*, H1' β-аномера), 4.35–4.0 (4H, м, H18, H17; H2', H4'), 3.92–3.70 (2H, м, H5', H6'), 3.68 (3H, с, 17²-COOCH₃), 3.57 (3H, с, 12-CH₃), 3.5 (2H, м, H8'), 3.37 и 3.22 (3H, 2 с, 2-CH₃), 3.17 (3H, с, 7-CH₃), 2.70–2.30 (4H, м, H17¹, H17²), 2.17 и 2.13 (3H, 2 д, OCHCH₃), 1.77 (3H, д, 18-CH₃), 1.67 (3H, т, 8¹-CH₃).

* Наложение дублетов двух диастереомеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Driaf K., Krausz P., Verneuil B., Spiro M., Blais J.-S., Bolbach G. // *Tetrahedron Lett.* 1993. V. 34. P. 1027–1030.
2. Bourhim A., Czernecki S., Krausz P., Viari A., Vigny P. // *J. Carb. Chem.* 1990. V. 9. P. 761–765.
3. Kohata K., Yamaguchi Y., Higashio H., Odashima T., Ishi H. // *Chem. Lett.* 1992. V. 2. P. 489–492.
4. Oulmi D., Maillard P., Guerquin-Kern J.-L., Huel C., Momenteau M. // *J. Org. Chem.* 1995. V. 60. P. 1554–1564.
5. Bonnet R. // *Proc. SPIE.* 1994. V. 2078. P. 74–90.
6. The Chlorophylls / Eds L.P. Vernon, G.R. Seely. N.Y.: Acad. Press, 1996. P. 3–118.
7. Mironov A.F., Kozyrev A.N., Brandis A.S. // *Proc. SPIE.* 1992. V. 1922. P. 204–208.
8. Fischer H., Orth H. *Die Chemie des Pyrrols.* Leipzig: Akademische Verlag, 1937. V. II, part. I. P. 423.
9. Rimington C., Roennestad A., Western A., Moan J. // *Int. J. Biochem.* 1988. V. 20. P. 1139–1149.
10. Adams K.R., Berenbaum C.R., Bonnett R., Nizhnik A.N., Salgado A., Valles M.A. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1992. № 12. P. 1465–1470.
11. Hombrecher H.K., Ohm S., Koll D. // *Tetrahedron.* 1996. V. 52. P. 5441–5448.
12. Fulling G., Schroder D., Frank B. // *Angew. Chem.* 1989. V. 101. P. 1550–1552.
13. Link K.P., Sell H.M. // *Biochem. Preparations.* 1953. V. 3. P. 75.
14. Wing R.E., BeMiller J.N. // *Carbohydr. Res.* 1969. V. 10. P. 441.
15. Brandis A.S., Kozyrev A.N., Mironov A.F. // *Tetrahedron.* 1992. V. 48. P. 6485–6494.
16. Порфирины: структура, свойства, синтез / Ред. Н.С. Ениколопян. М.: Наука, 1985.
17. Fabiano A.-S., Allouche D., Sanejouand Y.-H., Pailous N. // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 66. P. 336–345.

The Synthesis of Galactopyranosyl-substituted Derivatives of Pheophorbide

A. A. Aksenova[#], Yu. L. Sebyakin, and A. F. Mironov

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

New pheophorbide and pyropheophorbide derivatives containing carbohydrate fragments, derivatives of galactopyranose, were synthesized. Galactopyranosylpheophorbide and galactopyranosylpyropheophorbide with free hydroxyl groups were found to be water-soluble and useful as sensitizers in photodynamic therapy of cancer.

Key words: glycosylated porphyrins, photodynamic cancer therapy

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 434-8544; e-mail: mironov@httos.mitht.msk.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.