

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ  
им А.Н. НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

БЕЛЯЕВА  
Елизавета Викторовна

**ПРОИЗВОДНЫЕ ПОРФИРИНОВ, РАСТВОРИМЫЕ ВО  
ФТОРУГЛЕРОДАХ, КАК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ  
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории Физиологически активных фторорганических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук

**Научный руководитель:** **Чкаников Николай Дмитриевич**  
доктор химических наук, заведующий лабораторией  
Физиологически активных фторорганических  
соединений ИНЭОС РАН

**Официальные оппоненты:** **Соловьева Анна Борисовна**  
доктор химических наук, профессор, заведующая  
лабораторией Модифицированных полимерных  
систем ФГБУН Института химической физики им.  
Н.Н. Семенова Российской академии наук

**Мелик-Нубаров Николай Сергеевич**  
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник  
кафедры Высокмолекулярных соединений  
химического факультета ФГБОУ ВО Московского  
государственного университета им. М.В. Ломоносова

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки Институт органического синтеза им. И.Я.  
Постовского Уральского отделения Российской  
академии наук (ИОС УрО РАН)

Защита диссертации состоится 8 февраля 2018 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.250.01 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, В-334, ул. Вавилова, 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЭОС РАН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 002.250.01  
кандидат химических наук

Ольшевская В.А

## Общая характеристика работы

### Актуальность темы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является неинвазивным методом лечения различных злокачественных новообразований и применяется в клинической практике в Российской Федерации с 1996 года. Принцип действия ФДТ основан на использовании токсичных активных форм кислорода, образующихся при облучении в присутствии препаратов-фотосенсибилизаторов (ФС). Эффективность этого метода лечения зависит не только от способности ФС к генерации активных форм кислорода, но и от содержания самого кислорода в опухолевой ткани. Для многих солидных опухолей характерно состояние гипоксии – недостатка кислорода, что резко понижает их ответ на лечение с помощью ФДТ. Значительно расширить сферу применения ФДТ, а также увеличить ее эффективность можно посредством разработки методов оксигенации опухолей, а также создания комплексных препаратов, обладающих помимо противоопухолевой активности функцией переносчика кислорода. Перспективным подходом к решению этой проблемы является использование мультифункциональных композиций на основе фторуглеродных эмульсий (ФУЭ), которые могут играть роль и переносчика кислорода, и средства доставки противоопухолевого агента – фотосенсибилизатора (ФС) - в зону опухоли, и контрастного агента для  $^{19}\text{F}$ -МРТ-визуализации. Для создания фторуглеродной противоопухолевой композиции для ФДТ желательно, чтобы ФС находился во фторуглеродной фазе – это обеспечит его адресную доставку в зону опухоли, а также усилит фотодинамическую эффективность за счет большого содержания кислорода во фторуглероде. Подавляющее большинство используемых на настоящий момент ФС относится к соединениям порфиринового ряда, часть из них растворима в воде, а часть является гидрофобными соединениями, для доставки которых используют специальные солюбилизующие агенты, однако все эти ФС нерастворимы во фторуглеродах.

**Целью** данной работы является синтез фторсодержащих ФС порфиринового ряда, создание на их основе фторуглеродной эмульсионной композиции с ФС во фторуглеродной фазе, проверка эффективности этой композиции *in vitro*, а также оценка её применимости в качестве контрастного агента для  $^{19}\text{F}$ -МРТ визуализации.

### Научная новизна

В рамках данного диссертационного исследования разработаны подходы к синтезу фторсодержащих исходных соединений для сборки порфиринового макроцикла, а именно отработана методика гидроксикалирования пирролов в  $\alpha$ -положение для получения перфторалкил-содержащих пирролил-2-карбинолов, одностадийный метод получения полифторалкоксо-содержащих бензальдегидов из пентафторбензальдегида путем нуклеофильного замещения атомов фтора в ароматическом кольце. Получен ряд новых перфторалкил-содержащих порфиринов различной структуры с алифатическими и ароматическими заместителями в *мезо*-положении. Исследованы возможные пути прямого получения электронодефицитных хлоринов и бактериохлоринов из *мезо*-перфторалкилпорфиринов. Показано, что окислительный метод синтеза с использованием тетраоксида осмия приводит к наибольшему выходу фторсодержащего хлорина.

Создана фторуглеродная эмульсионная композиция с помещенным внутрь фторуглеродной фазы ФС (фторсодержащим порфирином). Показано, что в составе эмульсии фотодинамическая активность ФС повышается.

### **Практическая ценность**

Испытания созданной фторуглеродной эмульсионной композиции *in vitro* показали, что она обладает хорошей фотодинамической активностью и может быть основой для создания новых противоопухолевых препаратов. На основании этих результатов получен патент (Беляева Е.В., Маркова А.А., Сиган А.Л., Гервиц Л.Л., Букалов С.С., Штиль А.А., Чкаников Н.Д. Патент РФ RU 2626600 С1 от 20.06.2016, опубликовано 28.07.2017, «Композиция для применения в фотодинамической терапии рака»).

С помощью метода  $^{19}\text{F}$ -МРТ-визуализации продемонстрирована возможность использования такой композиции в качестве контрастного агента.

**Личный вклад автора** состоял в синтезе и доказательстве структуры всех полученных соединений, проведении спектральных исследований полученных фторсодержащих порфиринов, приготовлении фторуглеродных эмульсий, подготовке образцов для *in vitro* и *in vivo* испытаний, участии в обсуждении результатов на всех этапах работы, подготовке результатов работы к публикации.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены и обсуждены на международных и российских конференциях (см. список литературы на стр. 25), а также на учебно-научных конференциях ИНЭОС РАН «Веснянка» (2014, 2015, 2016, 2017 гг.).

**Публикации.** Результаты исследования представлены в 6 публикациях в отечественных и зарубежных журналах и сборниках научных конференций.

**Структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 119 страницах; содержит 66 схем, 14 таблиц, 19 рисунков, 1 формулу; библиография насчитывает 130 наименований.

**Работа выполнена** в лаборатории Физиологически активных фторорганических соединений ИНЭОС РАН при финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ № 14.604.21.0060 (RFMEFI60414X0060).

### **Основное содержание работы**

Во **введении** изложены современные тенденции в разработке препаратов-фотосенсибилизаторов для ФДТ рака, показана актуальность настоящего диссертационного исследования и обозначена цель работы.

В **литературном обзоре** кратко показан принцип действия ФДТ и факторы, от которых зависит ее эффективность, проведен анализ методов синтеза

фторсодержащих порфириноидов и рассмотрены примеры использования таких соединений в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ.

Глава **Обсуждение результатов** состоит из двух разделов.

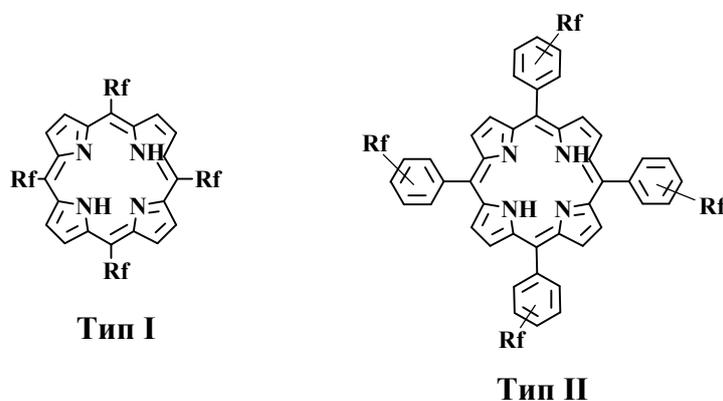
Для создания фторуглеродной эмульсионной композиции нам в первую очередь необходимо было подобрать подходящий ФС. Большинство ФС, используемых в ФДТ, относятся к классу порфириноидов. До последнего времени в связи с недостаточной эффективностью средств доставки гидрофобных препаратов в опухолевые ткани, дизайн подходящих ФС был ориентирован на получение водорастворимых соединений, т.е. практически все ФС, применяемые в ФДТ, содержат гидрофильные фрагменты, неизбежно препятствующие растворению во фторуглеродах. Немногочисленные примеры структур фторсодержащих порфириноидов, разрабатываемых для ФДТ, содержат в себе лишь небольшое количество фторных заместителей, не достаточное для растворения во фторуглеродах. Таким образом, первостепенной задачей данного исследования являлась разработка методов синтеза фторсодержащих соединений порфиринового ряда, растворимых во фторуглеродах, и отвечающих всем требованиям, предъявляемым к ФС для ФДТ.

## 1. Синтез фторсодержащих порфириноидов

### 1.1. Дизайн фторсодержащих ФС

Перед нами стояла задача сконструировать молекулу потенциального ФС так, чтобы обеспечить достаточную растворимость в ПФУ и сохранить ключевые характеристики порфиринового макроцикла, за счет которых он является эффективным ФС, добиться минимального содержания функциональных групп, усложняющих его синтез и спектральный анализ, а также потенциально приводящих к нежелательным дополнительным эффектам при *in vitro* экспериментах.

Учитывая эти условия и проанализировав доступные подходы к синтезу перфторалкил-замещенных порфиринов, мы остановились на двух типах симметричных порфириновых структур (Схема 1).



**Схема 1.** Структуры потенциальных ФС порфиринового ряда.

Структура типа I содержит основные группы, необходимые для обеспечения требуемых свойств ФС: порфириновое ядро, ответственное за способность к генерации АФК, и перфторуглеродные заместители, придающие молекуле растворимость в ПФУ. В структуре типа II кроме того имеется арильный «спейсер», минимизирующий возможное влияние перфторуглеродных фрагментов на спектральные свойства порфирина и позволяющий вводить в молекулу большее количество перфторуглеродных заместителей.

## 1.2. Синтез мезо-полифторалкил-замещенных порфиринов

Из двух возможных методов синтеза мезо-полифторалкил-замещенных порфиринов (Схема 2) - (1) алкилирование перфторалкилиодидами порфина (или его β-замещенных производных) и (2) сборка порфиринового макроцикла из фторсодержащих пирролил-2-карбинолов — мы выбрали второй.

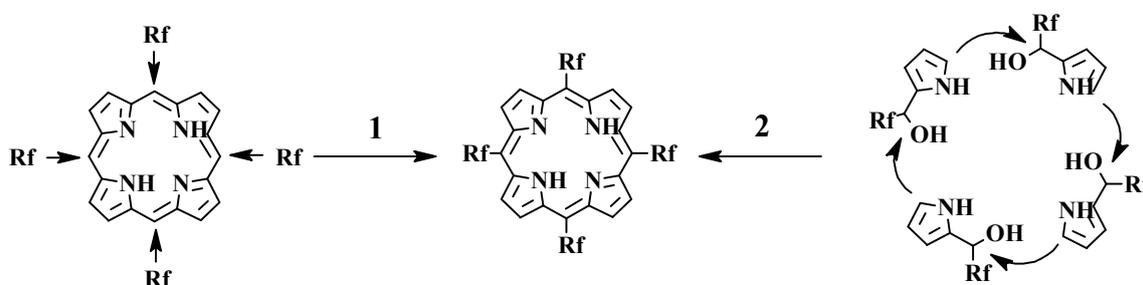


Схема 2. Пути синтеза симметричных мезо-алкил-замещенных порфиринов.

Первый метод отличается хорошими выходами конечных продуктов, но не является селективным. Второй метод приводит к меньшим выходам, но при его использовании получается только тетра-замещенный порфирин, который сравнительно легко очищается от побочных продуктов, имеющих совершенно иную природу (линейные олигомеры).

### Синтез пирролил-2-карбинолов

Синтез фторсодержащих пирролил-2-карбинолов первоначально проводили путем взаимодействия незамещенного пиррола и перфторалифатического альдегида (Схема 3) без растворителя в инертной атмосфере в присутствии избытка щелочи. Соединения **1a** и **1c** с перфторуглеродными радикалами  $C_2F_5$ - и  $HC_2F_2(CF_2)_4CF_2$ - были получены с выходами 40 % и 37 %, соответственно.

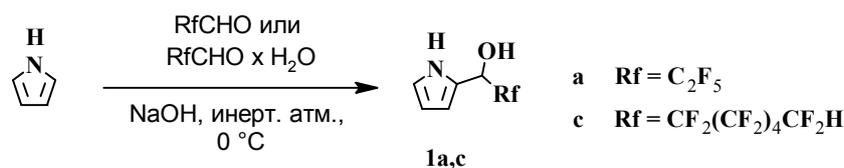
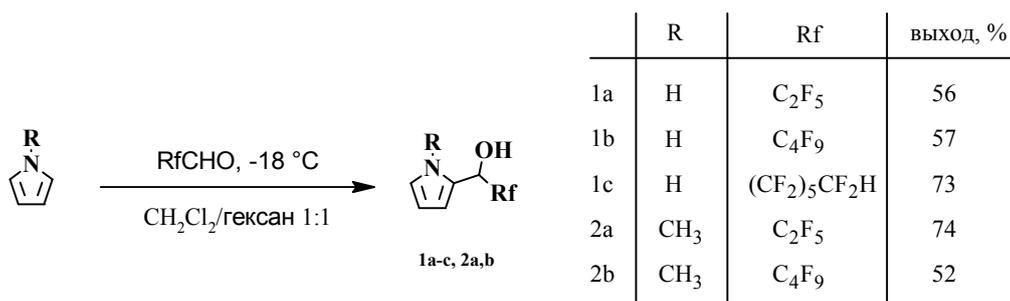


Схема 3. Синтез фторсодержащих пирролил-2-карбинолов.

Такой метод синтеза имеет ряд недостатков (саморазогрев реакционной смеси и ее высокая вязкость, препятствующая перемешиванию), которые приводят к образованию побочных высокомолекулярных продуктов и снижают выход пирролил-2-карбинолов.

Обнаружено, что взаимодействие пирролов и перфторалифатических альдегидов с образованием пирролил-2-карбинолов можно провести и без добавления щелочи (Схема 4). Кроме того, за счет проведения реакции при  $-18^{\circ}\text{C}$  и подбора смешанного растворителя (смеси ДХМ - гексан) удалось избежать образования побочных продуктов полимеризации, а пирролил-2-карбинолы выделить простой кристаллизацией из реакционной смеси.

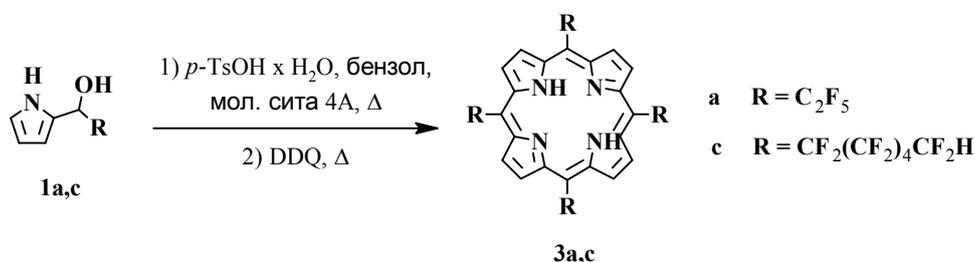


**Схема 4.** Взаимодействие пирролов и перфторалифатических альдегидов с образованием пирролил-2-карбинолов.

Разработанный метод был также использован нами для гидроксильного алкилирования N-метилпиррола (Схема 4) и нескольких индолов – соответствующие пирролил-2- и индолил-3-карбинолы были получены с хорошими выходами.

### Синтез порфиринов

Сборку порфиринов из пирролил-2-карбинолов осуществляли путем их тетрамеризации в бензоле в присутствии каталитического количества *para*-толуолсульфокислоты с азеотропной отгонкой воды и последующим окислением порфириногена 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном (DDQ). После хроматографической очистки порфирины **3a** и **3c** были получены с выходами 5 и 21%, соответственно (Схема 5).



**Схема 5.** Реакция синтеза порфиринов.

Хороший выход порфиринов обеспечивается за счет эффективного удаления воды из реакционной смеси с использованием свежепрокаленных молекулярных сит.

### 1.3. Синтез мезо-арил-замещенных порфиринов

Получение мезо-арил-замещенных фторсодержащих порфиринов также можно осуществить двумя способами (Схема 6): модификацией готового порфиринового цикла фторсодержащими заместителями (1) и сборкой макроцикла из фторсодержащих фрагментов (2).

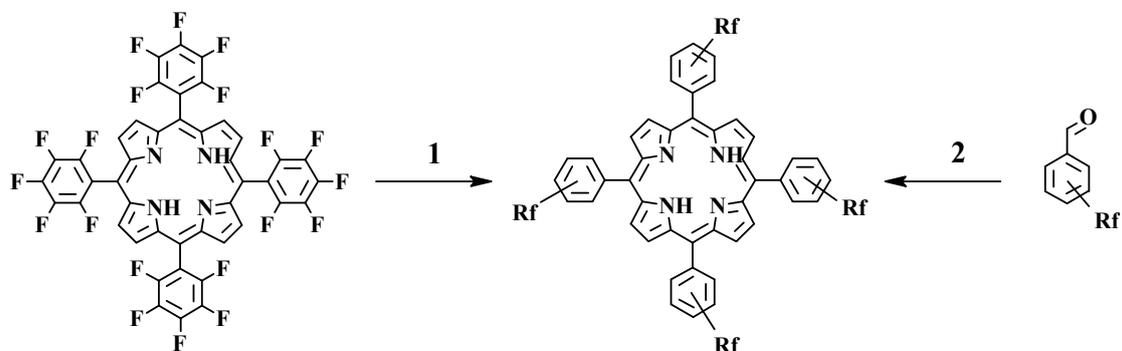


Схема 6. Подходы к синтезу симметричных мезо-арил-замещенных порфиринов.

Для реализации первого способа в качестве базовой структуры был выбран мезо-тетракис(пентафторфенил)порфирин ( $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$ ) – удобное соединение для введения различных функциональных групп путем нуклеофильного замещения атомов фтора в *para*-положении  $\text{C}_6\text{F}_5$ -фрагментов. Во втором способе изначально получали замещенные бензальдегиды, которые затем конденсировали с пирролом в порфириновый макроцикл.

#### Замещение атома фтора в мезо-тетракис(пентафторфенил)порфирине ( $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$ )

В качестве фторсодержащих заместителей для модификации  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  были выбраны полифторалифатические спирты. Реакцию изначально проводили путем кипячения смеси  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  (1 экв.) и 2,2,3,3-тетрафторпропанола (12 экв.) в ТГФ с добавлением основания (KOH) в инертной атмосфере (Схема 7).

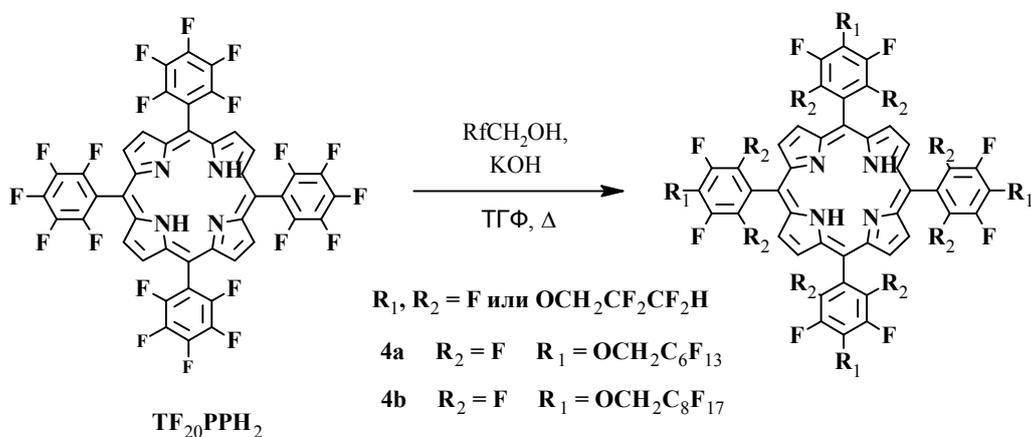


Схема 7. Нуклеофильное замещение атомов фтора в  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$ .

После 4-х часов кипячения продукты реакции экстрагировали диэтиловым эфиром, по данным масс-спектрометрии (Таблица 1 п. 2) смесь состояла из четырех порфиринов, содержащих от 4-х до 7-ми полифторалкоксильных заместителей. Спектры ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{19}\text{F}$  оказались малоинформативны - из-за наложения сигналов определение состава смеси по ним не представляется возможным. Исходя из данных масс-спектрометрии и ТСХ, мы предполагаем, что нуклеофильная атака идет не только по *para*-положению фрагмента  $\text{C}_6\text{F}_5$ -, но и по *орто*- или *мета*-положениям.

Для проверки влияния соотношения реагентов на тип продуктов были проведены реакции при соотношениях  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  – спирт 1:4.5 и 1:80 (Таблица 1 пп. 1,3). Смеси продуктов реакции были проанализированы так же, как и ранее. В первом случае наблюдалось отсутствие замещения атомов фтора в другие положения  $\text{C}_6\text{F}_5$ -фрагмента, кроме *para*-, была получена смесь порфиринов, содержащих от 1-го до 4-х заместителей. При использовании значительного избытка спирта (80 экв.) была получена смесь порфиринов с количеством заместителей уже от 4-х до 8-ми.

**Таблица 1.** Продукты реакции  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  с  $\text{HCF}_2\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OH}$  общей формулы  $\text{TF}_{20-n}\text{PPH}_2(\text{OCH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{H})_n$ , полученные при разных соотношениях реагентов.

пп.	соотношение $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$ – спирт	общий выход продуктов, %	тип продуктов по данным ESI-MS	
			n	m/z
1	1:4,5	32	1	1086,8
			2	1197,7
			3	1310,8
			4	1422,7
2	1:12	75	4	1423,3
			5	1532,2
			6	1646,9
			7	1758,8
3	1:80	84	4	1423,2
			5	1535,4
			6	1647,1
			7	1758,9
			8	1870,7

В отличие от 2,2,3,3-тетрафторпропанола, взаимодействие 1 экв.  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  и 12 экв. длинноцепочечного спирта ( $\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}_2\text{OH}$  или  $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{CH}_2\text{OH}$ ) приводит к образованию только тетразамещенных порфиринов **4a** и **4b** (Схема 7) с выходами 47% и 35%, соответственно. Мы полагаем, что это связано с большим объемом молекулы спирта, способной подойти для атаки  $\text{C}_6\text{F}_5$ -фрагмента только в *para*-положение. Поэтому нуклеофильное замещение атомов фтора в *para*-положениях  $\text{C}_6\text{F}_5$ -фрагментов  $\text{TF}_{20}\text{PPH}_2$  можно рекомендовать для введения исключительно длинноцепочечных полифторсодержащих фрагментов.

### **Сборка макроцикла из полифторалкил-замещенных бензальдегидов**

Второй подход к синтезу полифторалкил-замещенных *мезо*-тетраарилпорфиринов заключался в первоначальном получении полифторалкокси-замещенных бензальдегидов, а затем их конденсации с пирролом с образованием порфирина.

## Синтез фторзамещенных бензальдегидов

В качестве фторсодержащих фрагментов были использованы те же полифторалифатические спирты, которые вводили в молекулу бензальдегида путем нуклеофильного замещения атома фтора в *para*- или *para*- и *ortho*-положениях.

### Замещение атома фтора в 4-фторбензальдегиде

Для синтеза полифторалкил-замещенных бензальдегидов получали алкоголят полифторалифатического спирта (1,1-Н,Н-перфторгептанола-1) взаимодействием с гидридом натрия, который затем прибавляли к раствору 4-фторбензальдегида в ДМСО и перемешивали при комнатной температуре 10 часов (Схема 8), после соответствующей обработки альдегид **5** был получен с выходом 16%.

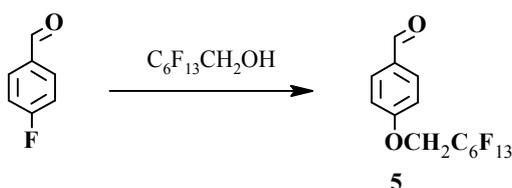


Схема 8. Замещение атома фтора в 4-фторбензальдегиде.

При проведении реакции в ТГФ процесс шел медленно, и за 15 часов не удалось добиться полной конверсии исходного альдегида. В ДМФА реакцию проводили при кипячении в течение 6-ти часов, алкоголят 1,1-Н,Н-перфторгептанола-1 получали взаимодействием с метилатом натрия – таким образом выход продукта **5** удалось повысить до 33% (при полной конверсии исходного альдегида).

### Замещение атома фтора в пентафторбензальдегиде

В отличие от 4-фторбензальдегида пентафторбензальдегид является более активным в реакциях нуклеофильного замещения за счет влияния пяти атомов фтора. Реакцию замещения на остатки полифторалифатических спиртов проводили в ДМФА с использованием в качестве оснований KF и CsF (Схема 9). Нами было показано, что при комнатной температуре происходит лишь *para*-замещение вне зависимости от времени реакции, при нагревании до 60 °С образуются бензальдегиды с тремя полифторалкоксильными заместителями, а нагрев до 80 °С приводит к частичному осмолению реакционной смеси и снижению выхода целевого продукта.

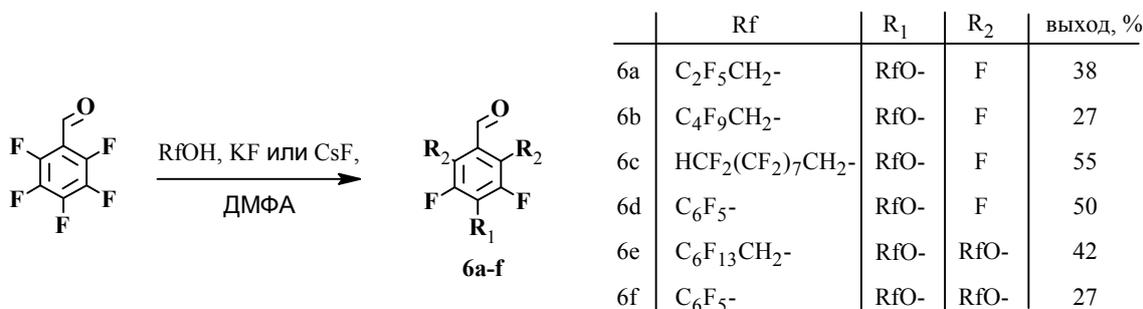


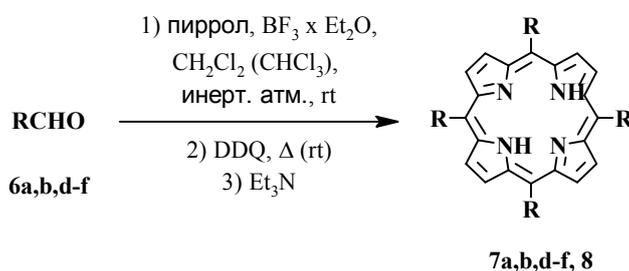
Схема 9. Замещение атомов фтора в пентафторбензальдегиде на остатки полифторалифатических спиртов.

Полученные замещенные бензальдегиды представляют собой желтые вязкие маслянистые жидкости или светло-желтые твердые вещества в зависимости от количества и длины полифторуглеродных фрагментов. Все они были выделены из реакционной смеси путем экстракции диэтиловым эфиром, в некоторых случаях дополнительно использовалась флеш-хроматография.

### Синтез порфиринов

Сборку симметричных *мезо*-тетраарилпорфиринов, как правило, осуществляют путем конденсации бензальдегидов с пирролами по методу Адлера-Лонго (кипячение смеси пиррола и альдегида в уксусной или пропионовой кислоте с последующим окислением кислородом воздуха) или Линдси (альдегид-пиррольная конденсация проводится при комнатной температуре или при небольшом нагревании до 40-60 °С под действием кислоты Льюиса (чаще  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), в качестве окислителя используется DDQ).

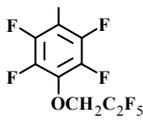
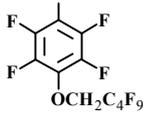
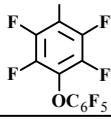
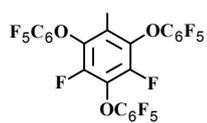
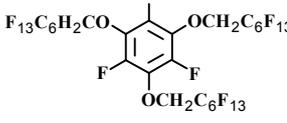
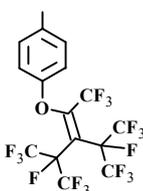
Для сборки замещенных порфиринов нами был выбран метод Линдси (Схема 10). Он отличается хорошими выходами конечных продуктов и более мягкими условиями по сравнению с методом Адлера-Лонго. Альдегид-пиррольную конденсацию проводили в ДХМ при комнатной температуре в присутствии  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , образовавшийся порфириноген окисляли с помощью DDQ при 40 °С. Порфирины **7a,b,d** и **8** (Таблица 2) были получены с хорошими для этого класса соединений выходами (10-20%) и охарактеризованы методами ЯМР- и масс-спектроскопии.



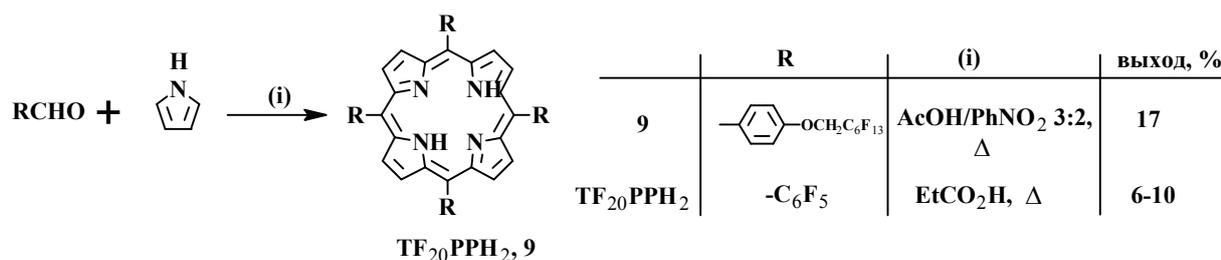
**Схема 10.** Альдегид-пиррольная конденсация по методу Линдси.

Наличие у бензальдегидов в 2-м и/или 6-м положении заместителей даже небольшого объема значительно затрудняет образование порфиринов упомянутым методом. Для синтеза таких порфиринов Линдси и сотр. предложили использовать небольшую добавку этанола. Использование этой методики для конденсации альдегида **6e** с пирролом привело к получению соответствующего порфирина **7e**, но выход продукта не превышал 2%. Попытка провести реакцию с альдегидом **6f** оказалась неудачной, что может быть связано с большим объемом заместителей (1,1-*N,N*-перфторгептилокси- по сравнению с пентафторфенокси- группой) или с низкой растворимостью промежуточных соединений в хлороформе, наблюдаемой нами в обоих случаях.

**Таблица 2.** Порфирины с полифторалкоксильными заместителями, полученные путем сборки макроцикла из пиррола и фторсодержащих бензальдегидов.

№	R	условия реакции	выход продукта, %
7a		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, ДХМ, аргон, комнатная температура 2) DDQ, 40 °С 3) Et <sub>3</sub> N	23
7b		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, ДХМ, аргон, комнатная температура 2) DDQ, 40 °С 3) Et <sub>3</sub> N	21
7d		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, ДХМ, аргон, комнатная температура 2) DDQ, 40 °С	18
7e		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, CHCl <sub>3</sub> (+EtOH об. 0,8%), аргон, комнатная температура 2) DDQ, комнатная температура 3) Et <sub>3</sub> N	1
7f		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, CHCl <sub>3</sub> (+EtOH об. 0,8%), аргон, комнатная температура 2) DDQ, комнатная температура 3) Et <sub>3</sub> N	-
8		1) пиррол, BF <sub>3</sub> xH <sub>2</sub> O, ДХМ, аргон, комнатная температура 2) DDQ, 40 °С 3) Et <sub>3</sub> N	2

Метод Адлера-Лонго был использован для конденсации пиррола с альдегидом **5** и пентафторбензальдегидом (Схема 11). Полифторалкокси-группы оказались в условиях реакции незатронутыми. Соответствующие порфирины *мезо*-тетракис(4-(1,1-Н,Н-перфторгептилокси)фенил)порфирин (**9**) и TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub> были получены с выходами 17 и 6-10%.



**Схема 11.** Конденсации пиррола с альдегидом по методу Адлера-Лонго.

Итак, нами было протестировано несколько подходов к синтезу симметричных фторсодержащих порфиринов, и получен ряд фторсодержащих порфиринов с алифатическими и ароматическими заместителями. Порфирины с алифатическими заместителями в *мезо*-положении (**3a** и **3c**) были получены по схеме, разработанной DiMagno и сотр., которую мы модифицировали путем упрощения синтеза необходимых пирролил-2-карбинолов. Порфирины с ароматическими заместителями в *мезо*-положении (**4a,b**; **7a,b,d,e**; **8** и **9**) были синтезированы с использованием двух подходов. Наиболее эффективной оказалась сборка порфиринового макроцикла из полифторалкил-замещенных бензальдегидов путем конденсации их с пирролом по методу Линдси. Для ее реализации был разработан удобный метод синтеза таких бензальдегидов в одну стадию путем замещения атомов фтора в пентафторбензальдегиде на полифторалифатические спирты под действием фторида калия.

#### 1.4. Поиск подходов к синтезу хлоринов и бактериохлоринов из порфирина **3c**

Одним из способов увеличения эффективности порфиринов, используемых в качестве ФС для ФДТ, является их превращение в хлорины и бактериохлорины, которые отличаются более интенсивным поглощением в «красном» (хлорины) и ближнем ИК (бактериохлорины) диапазонах. Их потенциальным преимуществом является то, что свет в этих диапазонах лучше проникает в ткани, следовательно, при терапии потребуется меньшая доза облучения. Также в этих диапазонах уже не поглощают эндогенные порфирины, что снижает риск фотосенсибилизации здоровых тканей. Мы решили исследовать возможность синтеза перфторалкил-замещенных хлоринов и бактериохлоринов для их дальнейшего изучения в качестве ФС для ФДТ. Объектом для модификации был выбран порфирин **3c** как наиболее активный по действию на опухолевые клетки.

##### Восстановление тозилгидразином

Восстановление порфиринов тозилгидразином является наиболее часто используемым методом синтеза хлоринов и бактериохлоринов. Роль восстановителя здесь играет диимид (HN=NH), образующийся *in situ* из тозилгидразина под действием высокой температуры или микроволнового излучения. Реакцию проводили в пиридине в присутствии поташа при нагревании до 95°C (Схема 12).

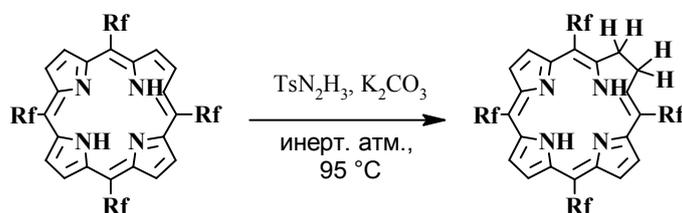


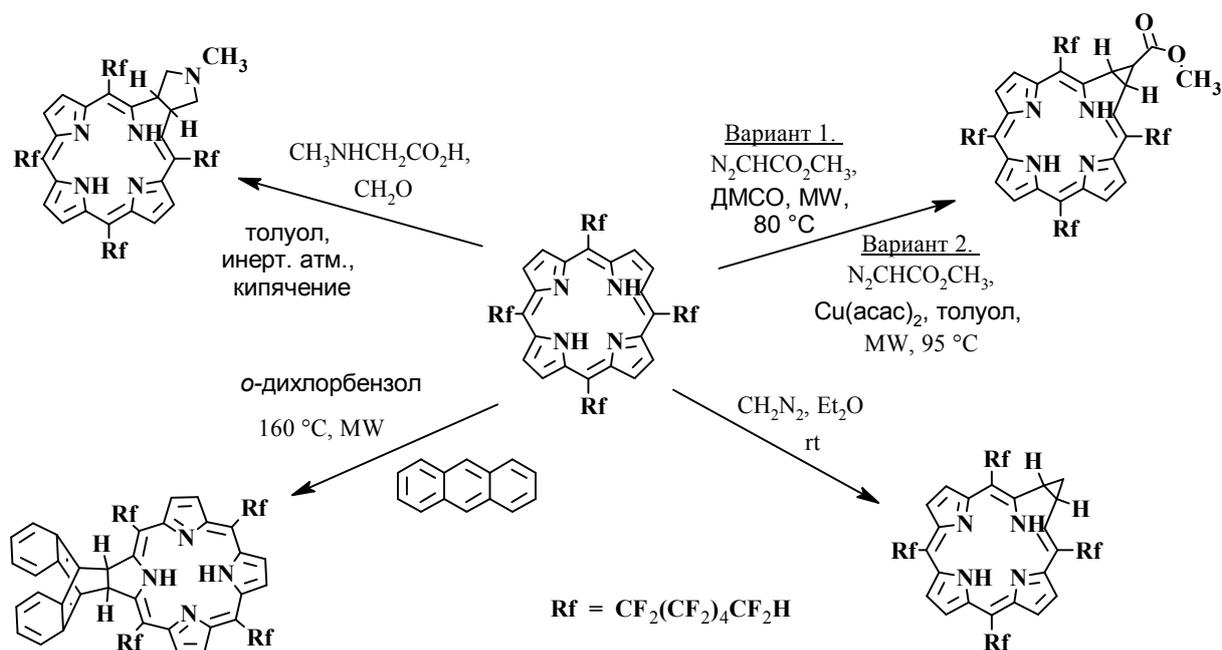
Схема 12. Реакция восстановления порфиринов тозилгидразином.

Через два-три часа нагревания наблюдалось исчезновение исходного порфирина с образованием сложной смеси неидентифицированных продуктов, на УФ-спектре не наблюдалось пиков ни исходного порфирина, ни хлорина или бактериохлорина.

Уменьшение времени и температуры реакции также не приводило к положительным результатам, что может быть связано с сильным электроноакцепторным эффектом перфторуглеродных заместителей, облегчающим восстановление «квазидвойных» связей порфирина настолько, что реакцию не удается остановить на стадии образования хлорина или бактериохлорина.

### Циклоприсоединение

Нами было опробовано несколько базовых типов циклоприсоединения по «квазидвойной» связи порфиринового макроцикла (Схема 13) – [4+2] (присоединение по Дильсу-Альдеру, где порфирин является диенофилом), [3+2] (1,3-диполярное циклоприсоединение азометин-ирида) и [1+2] (циклопропанирование диазосоединениями).



**Схема 13.** Различные способы циклоприсоединения по «квазидвойной» связи порфиринового макроцикла.

Присоединение по Дильсу-Альдеру. Присоединение антрацена проводили при 160 °С в течение часа, на УФ-спектре охлажденной реакционной смеси были обнаружены сигналы только от исходного порфирина, продуктов присоединения обнаружено не было.

Присоединение азометин-ирида. Для [3+2] циклоприсоединения к «квазидвойной» связи порфирина выбрали азометин-ирид, получаемый *in situ* из N-метилглицина и параформальдегида. Реакцию проводили путем кипячения порфирина **3c** со смесью N-метилглицина и параформальдегида в толуоле, контроль осуществляли методами ТСХ и УФ-спектроскопии реакционной смеси. По результатам спектрального анализа после 10-ти часов в реакционной смеси был обнаружен только исходный порфирин, продуктов присоединения азометин-ирида обнаружено не было.

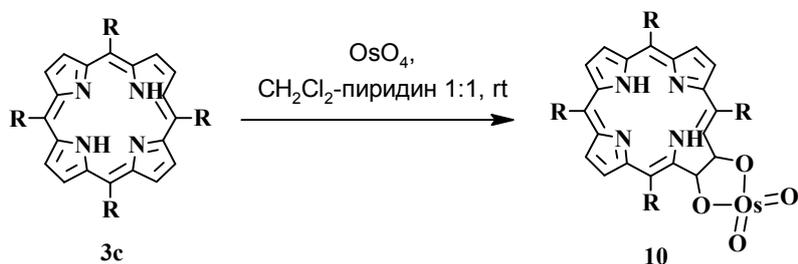
Для циклопропанирования были использованы диазометан и метилдiazоацетат.

Диазометан получали из N-метил-N-нитрозомочевины под действием гидроксида калия в диэтиловом эфире и использовали сразу после приготовления. Реакцию циклопропанирования порфирина **3c** проводили при комнатной температуре в эфире, периодически добавляя свежеприготовленный раствор диазометана, контроль осуществляли по УФ-спектрам реакционной смеси. Через 13 дней на спектре помимо сигналов от исходного порфирина обнаружилась только слабая полоса поглощения  $\lambda = 677$  нм, отнесенная нами к хлорину. Выбранный метод, по-видимому, можно считать синтетически неперспективным.

Метилдиазоацетат получали диазотированием гидрохлорида метилового эфира глицина и использовали в виде 7%-ного раствора в ДХМ. Присоединение метилдиазоацетата к порфируну **3c** проводили под действием микроволнового излучения в двух вариантах. Некаталитическое присоединение проводили в ДМСО при 80 °С. Каталитическое - в присутствии  $\text{Cu}(\text{acac})_2$  в толуоле при 95 °С. И в том и в другом случае на УФ-спектрах реакционных смесей наблюдались сигналы только от исходного порфирина.

### Окисление тетраоксидом осмия

Реакцию присоединения  $\text{OsO}_4$  (Схема 14) проводили в смеси ДХМ-пиридин (соотношение 1:1) в запаянной ампуле при комнатной температуре и перемешивании в течение 14-ти дней, контроль процесса осуществляли методом УФ-спектроскопии. На 14-й день наблюдались полосы поглощения, характерные для хлорина (410, 631, 687 нм) и бактериохлорина (356, 520, 786 нм), сигналы от исходного порфирина отсутствовали.



**Схема 14.** Реакция окисления порфирина тетраоксидом осмия.

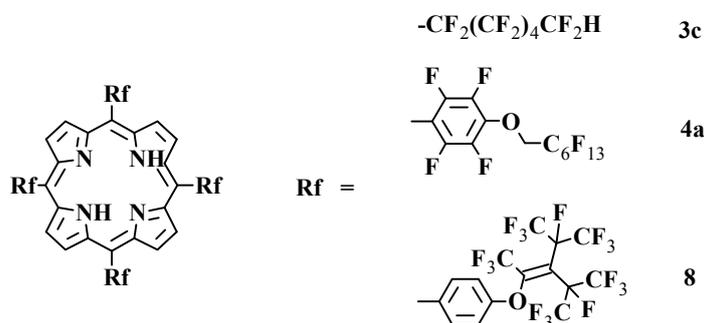
Полученную смесь разделяли последовательно методами колоночной и препаративной тонкослойной хроматографии. В чистом виде был выделен осмиевый эфир хлорина (**10**) с выходом 68%, который при стоянии в закрытом сосуде постепенно превращался в исходный порфирин (по ТСХ).

Таким образом, было показано, что среди изученных единственным методом, приводящим к получению хлорина из порфирина **3c**, оказалось окисление «квазидвойной» связи порфирина тетраоксидом осмия.

## **2. Изучение фторсодержащих порфиринов в составе фторуглеродных эмульсий как ФС для ФДТ**

Отбор наиболее перспективных структур для дальнейших испытаний *in vitro* и *in vivo* проводили на основании данных по растворимости в перфторуглеродах (ПФУ),

спектральным характеристикам (поглощение в видимой области и флуоресценция) и способности к фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода. Сравнение проводили в ряду порфиринов **3c**, **4a**, **8** (Рисунок 1) с максимально отличающимися структурами.



**Рисунок 1.** Порфирины, отобранные для исследований.

## 2.1. Растворимость в ПФУ и спектральные характеристики порфиринов

### Растворимость

Показано, что максимальные концентрации порфиринов **3c**, **4a**, **8** в ПФД (перфтордекалин), независимо от типа и месторасположения перфторуглеродных фрагментов, находятся на уровне 1 мМ., измерения проводили при комнатной температуре спектрофотометрическим методом.

### Электронные спектры поглощения

Максимумы поглощения измеряли в бензоле (для оценки эффективности генерации  $^1\text{O}_2$ ) и ПФД (основной фторуглеродный компонент эмульсии). Для всех порфиринов наблюдались характерные спектры поглощения - полоса Soret и 4 Q-полосы. Общей тенденцией являлся заметный «красный» сдвиг максимумов поглощения в бензоле по отношению к ПФД - полосы Soret смещены на 10-14 нм, Q-полосы - немного меньше (Таблица 3).

**Таблица 3.** Максимумы поглощения и коэффициенты экстинкции порфиринов **3c**, **4a** и **8** в бензоле ( $\lambda_1$ ) и в ПФД ( $\lambda_2$ ),  $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ .

№	$\lambda$ , нм ( $\epsilon$ , $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )														
	Soret			Qy(1,0)			Qy(0,0)			Qx(1,0)			Qx(0,0)		
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\Delta\lambda$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\Delta\lambda$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\Delta\lambda$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\Delta\lambda$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\Delta\lambda$
<b>TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub></b>	416			508 (28,4)			537 (4,1)			586 (8,9)			658 (6,4)		
<b>3c</b>	410	398 (89,4)	12	514	505 (9,1)	9	547	537 (6,5)	10	598	595 (3,7)	3	650	647 (9,3)	3
<b>4a</b>	417	406 (137,2)	11	510	501 (13,9)	9	*	*	*	587	583 (4,7)	4	659	654 (2,3)	5
<b>8</b>	420 (175,5)	410	10	515 (9,0)	507 (12,7)	8	550 (4,5)	539	11	591	587 (4,9)	4	650	643	7

\* - невозможно определить максимум поглощения из-за наложения полос.

Порфирин **3с** с алифатическим заместителем в *мезо*-положении сильнее поглощает в "красной области", а у порфиринов с ароматическими заместителями (**TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub>**, **4а** и **8**) значительная доля поглощенной энергии приходилась на полосу *Soret*, что хорошо согласуется с литературными данными.

### Флуоресценция

Исследование флуоресценции порфиринов **3с**, **4а**, **8** проводили в растворах ПФД и бензола. Относительный квантовый выход флуоресценции ( $\phi$ ) рассчитывали с использованием **TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub>** в качестве стандарта и имеющихся для него литературных данных, регистрировали спектры не менее 3-х растворов разной концентрации для каждого соединения, возбуждение проводили при длине волны  $\lambda = 406$  нм. Для расчета  $\phi$  (Таблица 4) выбрали величины интенсивности при длине волны 660 нм (точка наибольшего перекрытия полос испускания всех порфиринов). Расчет  $\phi$  проводили по формуле (1).

$$\phi = \phi_{st} \times \frac{a_{exp}}{a_{st}}, \quad (1)$$

где  $\phi$  – квантовый выход,  $a$  – тангенс угла наклона прямой на графике I-D ( $I$  – интенсивность испускания,  $D$  – оптическая плотность).

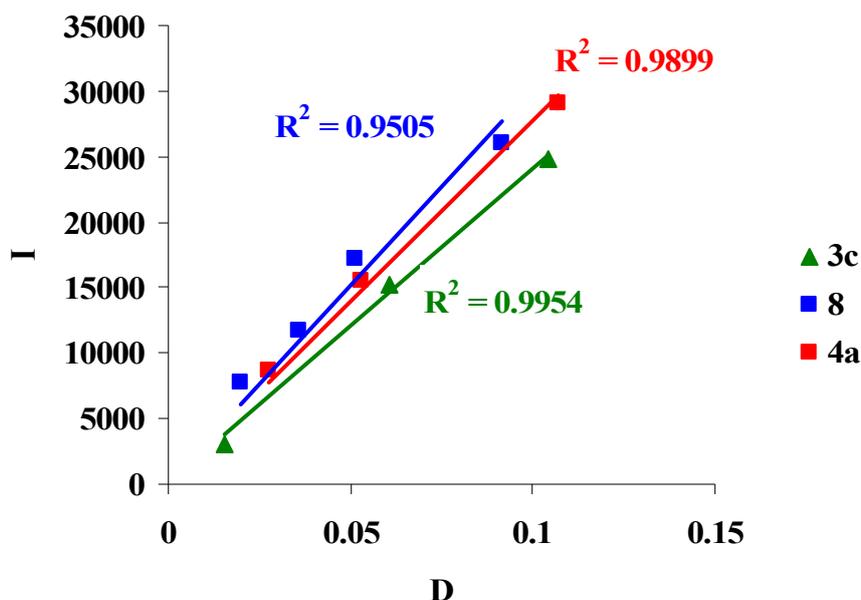
**Таблица 4.** Максимумы флуоресценции и относительные квантовые выходы ( $\phi$ ) порфиринов **3с**, **4а**, и **8** в бензоле.

В-ВО	$\lambda$ , нм		$\phi$
	Q (0,0)	Q (0,1)	
<b>TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub></b>	660	710	0.032
<b>8</b>	650	720	0.032
<b>4а</b>	660	715	0.016
<b>3с</b>	655	720	0.011

Показано, что порфирин **3с** с алифатическим заместителем флуоресцирует слабее, чем образцы с арильными заместителями (**4а** и **8**), что также наблюдается и в растворах ПФД.

### Фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода

Для количественной оценки содержания синглетного кислорода ( $^1O_2$ ) регистрировали спектры его фосфоресценции и проводили расчет величин относительной квантовой эффективности фосфоресценции ( $\phi(^1O_2)$ ). Метод расчета и стандарт использовали те же, что и для расчета относительного квантового выхода флуоресценции. Возбуждение проводили в растворах бензола при длине волны  $\lambda = 532$  нм, максимум фосфоресценции  $^1O_2$  наблюдался при  $\lambda = 1275$  нм. Полученные зависимости I-D порфиринов **3с**, **4а**, **8** (Рисунок 2) хорошо ложились на прямую ( $R^2 \geq 0.95$ ). Тангенс угла наклона полученных прямых использовали для расчета  $\phi(^1O_2)$  по формуле (1). Рассчитанные значения  $\phi(^1O_2)$  для порфиринов **3с**, **4а**, **8** составили 0,72, 0,83 и 0,91, соответственно (для стандарта **TF<sub>20</sub>PPH<sub>2</sub>** величина  $\phi(^1O_2) = 0,7$ ).



**Рисунок 2.** Зависимость интенсивности (I) фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  от оптической плотности (D) растворов порфиринов **3c**, **4a**, и **8** в бензоле.

При облучении светом с длиной волны  $\lambda = 505$  нм в растворах порфиринов **3c**, **4a** и **8** в ПФД также наблюдалась интенсивная фосфоресценция  $^1\text{O}_2$ . Полученные зависимости I-D оказались близки к линейным ( $R^2 \geq 0,93$ ) только в случае порфиринов с арильными заместителями (**4a** и **8**). Зависимость I-D для раствора **3c** не ложится на прямую, что исключает расчет величины  $\phi(^1\text{O}_2)$ . При облучении светом с длиной волны  $\lambda = 650$  нм фосфоресценция  $^1\text{O}_2$  также наблюдалась в растворах всех порфиринов.

Таким образом, можно заключить, что полученные нами полифторалкилзамещенные порфирины отвечают требованиям, предъявляемым к потенциальным ФС в плане генерации  $^1\text{O}_2$ , одного из основных типов АФК, и по величинам квантовой эффективности генерации  $^1\text{O}_2$  не уступают их нефторированным аналогам.

## 2.2. Приготовление фторуглеродных эмульсий

Фторуглеродные эмульсии (ФУЭ) представляют собой коллоидные системы масло-в-воде, стабилизированные поверхностно-активными веществами (ПАВ). Эмульсии, предназначенные для использования *in vivo* как правило стабилизируют проксанолами (блоксополимеры окиси этилена и окиси пропилена) или фосфолипидами, полученными из яичного желтка или сои. ФУЭ изначально разрабатывались для использования в качестве кровезаменителей благодаря уникальным свойствам ПФУ (химическая инертность, биохимическая стабильность, способность к растворению  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$  в больших концентрациях и т.д.). Один из препаратов на основе ФУЭ Перфторан®, разрешенный для применения не только на животных, но и на людях, представляет собой эмульсию фторуглеродов (смесь *цис*- и *транс*- изомеров ПФД и перфтор-N-(4-метилциклогексил)пиперидина (ПМЦП)) в физиологическом растворе, стабилизированную проксанолом-268. Перфторан® был выбран нами как объект для модификации. Внедрить фторсодержащие порфирины в

готовую ФУЭ не представляется возможным, поэтому эмульсии с порфиринами мы готовили самостоятельно. Небольшие изменения были внесены в состав водной фазы эмульсии (Таблица 5) – вместо раствора неорганических компонентов и глюкозы был использован физиологический раствор, содержащий 0.9% NaCl, это не повлияло на стабильность эмульсии и не оказало влияния на цитологические эксперименты.

**Таблица 5.** Состав эмульсий Перфторан® и эмульсий с порфиринами **3с** и **4а**.

<b>Перфторан®</b>	<b>Эмульсия с порфиринами</b>
ПФД - 13,0 г, ПМЦП - 6,5 г, проксанол-268 - 4 г, NaCl - 0,6 г, KCl - 0,039 г, MgCl <sub>2</sub> - 0,019 г, NaHCO <sub>3</sub> - 0,065 г, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,02 г, глюкоза - 0,2 г, Вода – до 100 мл	Р-р порфирина в ПФД – 1,3 г, ПМЦП – 0,65 г, Р-р проксанола-268 (10%-ный в физ. р-ре) – 4 г, физ. р-р (0,9% NaCl) – 10 мл

Среди полученных фторсодержащих порфиринов мы выбрали **3с** и **4а** по ряду критериев (эффективность генерации синглетного кислорода, фототоксичность в свободном виде, доступность получения). Для приготовления эмульсий первоначально готовили растворы порфиринов в ПФД и проксанола-268 в физиологическом растворе (растворение полимера происходит при нагревании в течение длительного времени). Затем компоненты смешивали и готовили эмульсию методом ультразвукового диспергирования. Визуально холостая эмульсия не отличается от препарата Перфторан® - это прозрачная опалесцирующая жидкость с голубоватым оттенком. Эмульсии с порфиринами имели желтоватый или красноватый оттенок. Образцы эмульсий хранили в морозильной камере при температуре -18 °С.

Размер частиц эмульсии определяли методом динамического светорассеяния. Для холостой эмульсии и эмульсий с порфиринами **3с** и **4а** средний размер частиц составлял 170 нм. Минимальный средний размер частиц ФУЭ зависит не только от способа приготовления, но и от состава фторуглеродной фазы и типа ПАВ. Природа компонентов, используемых в препарате Перфторан®, позволяет готовить эмульсии со средним размером частиц до 50 нм путем последовательного диспергирования (на первом этапе готовится «грубая» эмульсия с размером частиц ~170 нм, затем «тонкая» - частицы измельчают до 50 нм путем гомогенизации под давлением). Однако для *in vitro* экспериментов не было необходимости делать «тонкую» эмульсию, поэтому мы ограничились только первым этапом.

### **2.3. Исследование цитотоксичности порфиринов и эмульсий с ними**

Потенциальные ФС должны обладать низкой темновой токсичностью и как можно большей фототоксичностью – эти критерии в первую очередь определяют эффективность ФС-кандидатов в лекарственные препараты. Под понятием «темновая токсичность» подразумевается величина цитотоксичности ФС в отсутствие облучения. Фотоиндуцированной называют цитотоксичность при облучении. Исследования цитотоксичности порфиринов **3с** и **4а** *in vitro* на культивируемых опухолевых клетках человека НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки) проведено в

лаборатории Механизмов гибели опухолевых клеток (НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Блохина) под руководством д.м.н. А.А. Штиля сотрудником нашей лаборатории к.б.н. А.А. Марковой. Выживаемость клеток определяли методом МТТ-теста, а также оценивали с помощью фазовой и флуоресцентной микроскопии.

Эмульсия Перфторан® и все её компоненты являются разрешенными для клинического применения на человеке, однако перед началом экспериментов мы должны были убедиться, что перфтордекалин и приготовленная нами «холостая» эмульсия не обладают цитотоксическими эффектами, чтобы потом их можно было использовать в качестве контрольных образцов. Результаты экспериментов показали, что они не обладают фототоксичностью, а при отсутствии облучения «холостая» эмульсия способствует небольшому (в пределах 10% за 24ч) увеличению количества клеток, аналогичным действием на клетки обладал препарат Перфторан®.

Цитотоксичность порфиринов **3с** и **4а**, а также образцов эмульсий с ними определяли в темноте и после освещения, в гипоксии и нормоксии. Так как фторсодержащие порфирины гидрофобны, то для внесения в водную клеточную среду использовали их растворы в ДМФА. Тесты без облучения показали отсутствие темновой токсичности всех порфиринов (Таблица 6) при концентрациях до 50 мкМ (принятой максимальной в таких экспериментах), т.е. величины IC<sub>50</sub> были больше 50 мкМ. Таким образом, было доказано, что порфирины **3с** и **4а** не оказывают токсического действия на опухолевые клетки в отсутствие облучения.

**Таблица 6.** Темновая токсичность порфиринов **3с** и **4а** и содержащих их эмульсий.

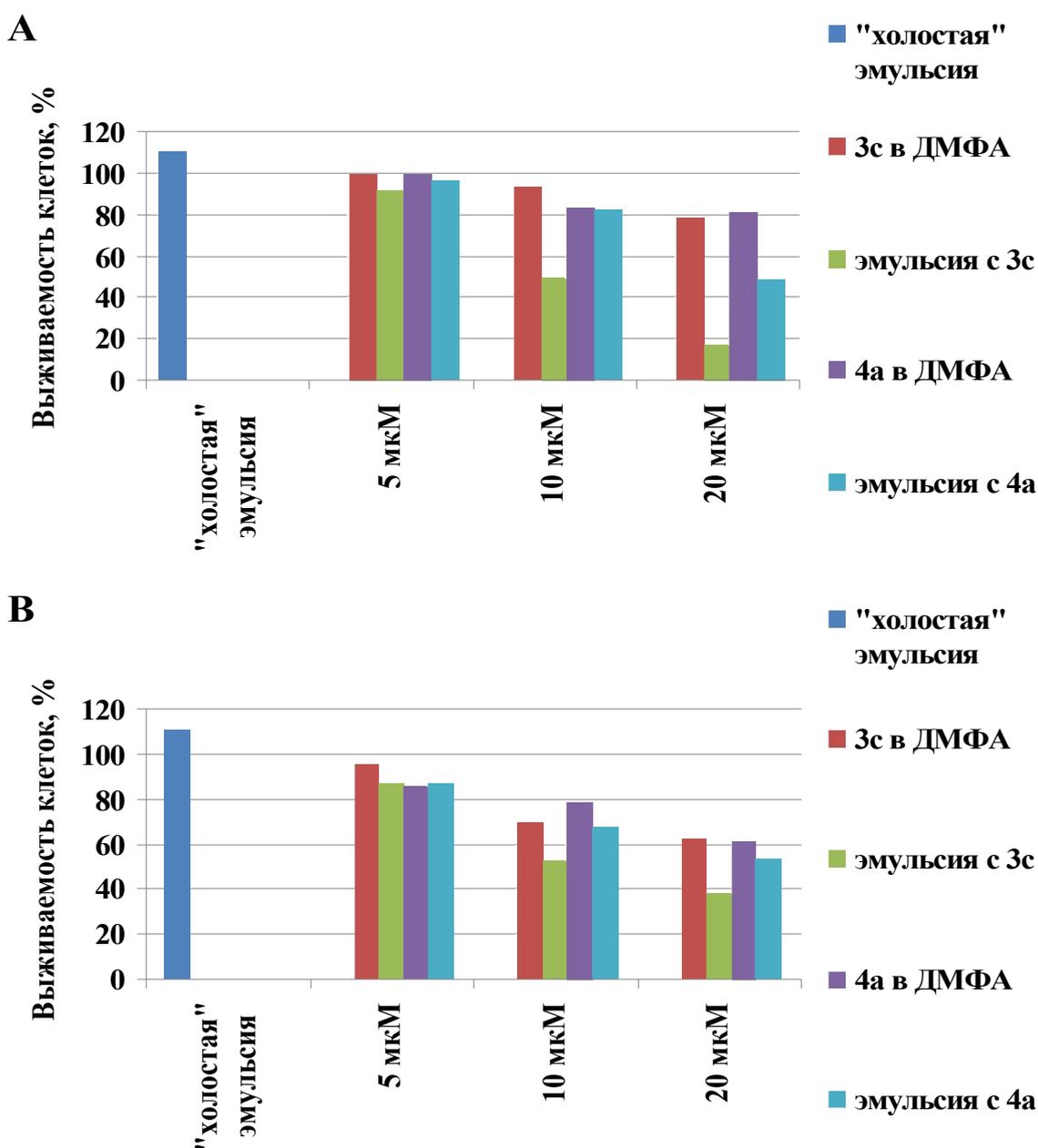
Образец	Выживаемость опухолевых клеток в темноте, %			
	Контроль	5 мкМ	10 мкМ	20 мкМ
<b>Эмульсия с 4а</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>98</b>	<b>96</b>
4а в ДМФА	100	100	94	87
<b>Эмульсия с 3с</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>97</b>	<b>95</b>
3с в ДМФА	100	100	96	90

Фототоксичность порфиринов и образцов эмульсий была протестирована на той же клеточной линии НСТ116 при облучении лазером ( $\lambda = 633$  нм). Показано, что исследуемые порфирины проявляют фототоксичность в субмикромольных концентрациях. Помимо того, что **3с** обладает большим фототоксическим эффектом, чем **4а**, он также в большей степени вызывает гибель опухолевых клеток при введении в составе эмульсии, чем **4а** (Таблица 7, Рисунок 3А). Это подтверждает вывод, что фототоксичность усилилась благодаря фторуглеродной эмульсии.

**Таблица 7.** Фототоксичность порфиринов **3с** и **4а** и содержащих их эмульсий.

Образец	Выживаемость опухолевых клеток после освещения, %			
	Контроль	5 мкМ	10 мкМ	20 мкМ
<b>Эмульсия с 4а</b>	<b>100</b>	<b>94</b>	<b>93</b>	<b>49</b>
4а в ДМФА	100	95	92	77
<b>Эмульсия с 3с</b>	<b>100</b>	<b>89</b>	<b>48</b>	<b>16</b>
3с в ДМФА	100	90	74	58

Идея применения фторуглеродных эмульсий в ФДТ основана на их способности к оксигенации опухолевых тканей, находящихся в состоянии гипоксии. Для проверки эффективности наших эмульсионных систем были проведены *in vitro* эксперименты в условиях гипоксии (содержание  $O_2$  – 0,5%). Фототоксичность растворов порфиринов **3c** и **4a** в ДМФА (Рисунок 3В) не достигла 50%, что считается малой токсичностью. В тоже время под действием этих же порфиринов в составе эмульсии выживаемость клеток оказывается ниже 50%, то есть показатели  $IC_{50}$  достигнуты, при этом эмульсия с порфирином **3c** также оказывает больший фототоксический эффект, чем с **4a**.



**Рисунок 3.** Фототоксичность порфиринов **3c** и **4a** в растворах ДМФА и в составе эмульсий. **А:** нормоксия - 20.9%  $O_2$ , **В:** гипоксия - 0.5%  $O_2$ .

В результате данных исследований показана перспективность фторсодержащих порфиринов для дальнейшего более обширного изучения в качестве ФС в ФДТ и преимущества фторуглеродных эмульсий, которые являются не только пассивным

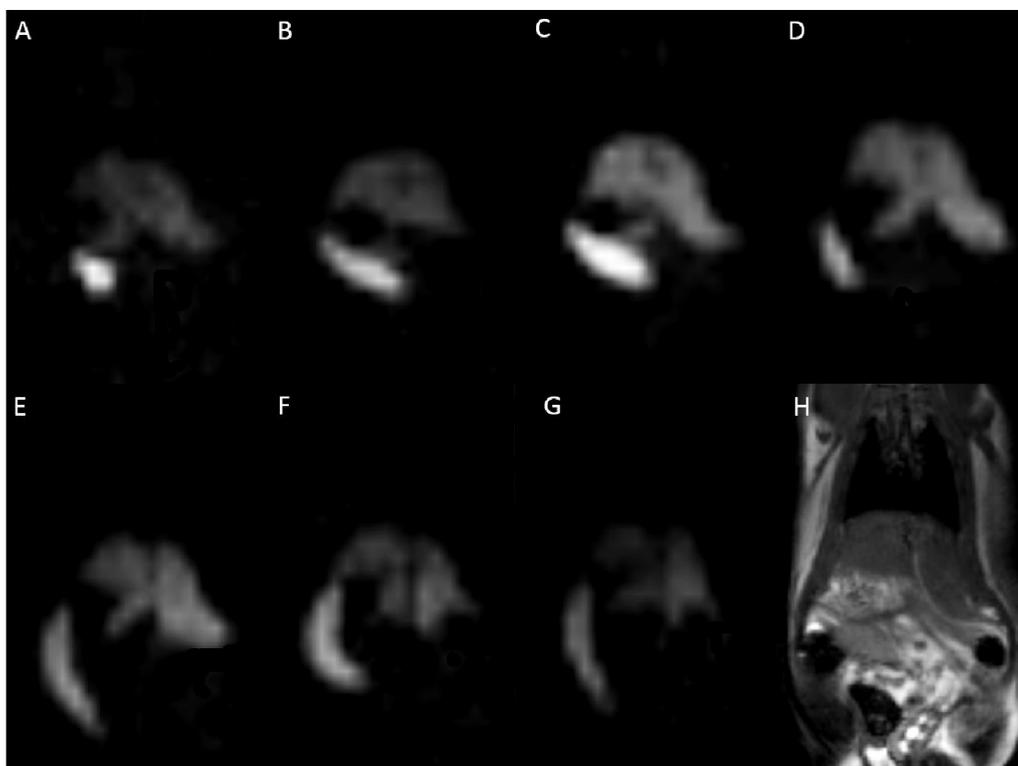
средством доставки, но и средством оксигенации, усиливающим эффект ФС, продемонстрирована принципиальная возможность проведения ФДТ в условиях гипоксии.

#### 2.4. МРТ-исследования эмульсий

Метод  $^{19}\text{F}$ -МРТ-визуализации позволяет получить информацию о локализации и скорости накопления фторсодержащих субстанций в организме, которая важна при разработке потенциальных лекарственных и диагностических средств. В лаборатории магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова совместно с ИНЭОС РАН в рамках проекта «Фторуглеродные соединения в биомедицинских исследованиях *in vivo* с применением мультядерной МРТ визуализации» (грант Минобрнауки РФ № 14.604.21.0060) был разработан метод определения локализации и скорости накопления модифицированных ФУЭ *in vivo* путем  $^{19}\text{F}$ -МРТ визуализации. Опыты проводились на малых лабораторных животных (мыши и крысы) – здоровых и имеющих спонтанные опухоли, в качестве ФУЭ использовали Перфторан® (как известный стандарт) и эмульсию с порфирином **4a**.

##### Накопление эмульсии ПФУ в организме здоровых крыс

Эксперименты по определению локализации модифицированных ФУЭ в результате их внутрибрюшинного и внутривенного введения в организм крыс проводили с эмульсией с порфирином **4a** (Рисунок 4).



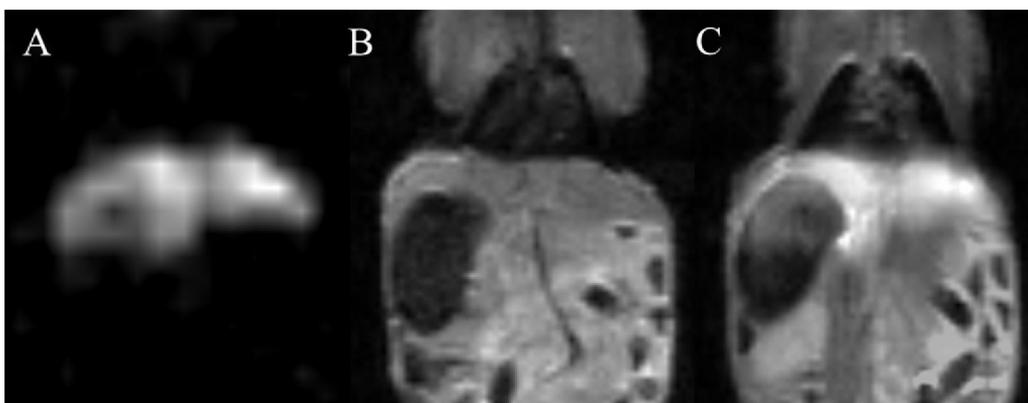
**Рисунок 4.**  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения всего тела крысы спустя 3,5 часа (А), 1 день (В), 2 дня (С), 3 дня (D), 6 дней (Е), 14 дней (F) и 21 день (G) после внутривенного введения 2 мл эмульсии с порфирином **4a**; (H):  $^1\text{H}$ -МРТ-изображение.

Из анализа полученных  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображений можно сделать вывод, что при внутривенном введении ПФУ начинают накапливаться сначала в селезенке, затем в печени. После 6-ти дней начинается процесс выведения ПФУ из этих органов и организма в целом в той же последовательности. ПФУ не искажают локального магнитного поля и не изменяют вид изображения, получаемого с помощью  $^1\text{H}$  МРТ визуализации, что позволяет использовать методы  $^1\text{H}$  и  $^{19}\text{F}$  МРТ вместе. Изображение имеет яркость, пропорциональную количеству ПФУ.

#### **Области накопления эмульсий ПФУ в организме мышей со спонтанными опухолями.**

Спонтанными называют опухоли, возникшие без какого-либо воздействия экспериментатора. У мышей чаще всего встречаются опухоли молочных желез. У самок мышей пять пар молочных желез, и в каждой железе может возникнуть опухоль. Как модель такие спонтанные опухоли привлекают исследователей легкостью наблюдений, возможностью измерения, а также получения штаммов перевиваемых опухолей.

МРТ исследования по накоплению препарата Перфторан® и модифицированных ФУЭ проводили на мышах со спонтанными опухолями молочной железы. На Рисунке 5 представлены  $^{19}\text{F}$ -,  $^1\text{H}$ - и совмещенное  $^1\text{H}+^{19}\text{F}$ -МРТ-изображение одной из мышей, полученные с помощью оптимизированных протоколов на следующий день после внутривенного введения препарата Перфторан® в количестве 0,24 мл. В качестве  $^1\text{H}$ -МРТ-изображений представлено  $T_1$ -взвешенное изображение на основе GE (градиентное эхо). Как видно из Рисунка 5,  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигнал хорошо визуализирует печень. Этот эксперимент показывает, что чувствительность метода  $^{19}\text{F}$ -МРТ на МР-томографе BioSpec 70/30 USR с помощью оптимизированной модели SE (спиновое эхо) позволяет получать  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-изображения эмульсий, введенных мелким лабораторным животным – мышам.

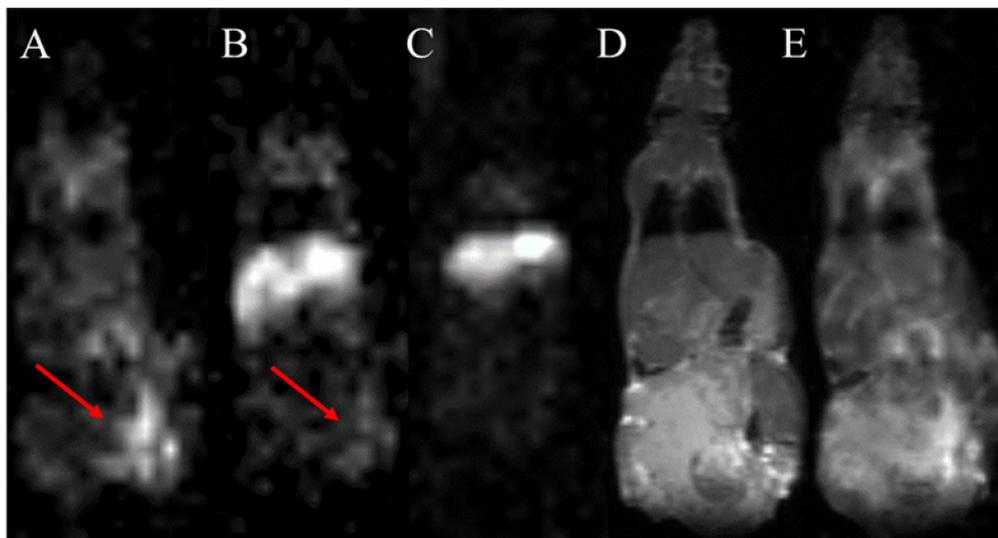


**Рисунок 5.**  $^{19}\text{F}$ -,  $^1\text{H}$ - и совмещенное  $^1\text{H}+^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения мыши, полученные с помощью оптимизированных протоколов МРТ-исследований.

К сожалению, наглядное изображение распространения эмульсии на основе ПФД по всему телу мыши, а главное в зоне спонтанной опухоли, получить не удалось. Причиной является небольшой размер мыши и, как следствие, небольшой максимально допустимый объем вводимой эмульсии (0,24 мл). Поэтому для получения  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения зоны опухоли было решено использовать эмульсии на основе перфтортрибутиламина (ПФТБА), который дает более интенсивный  $^{19}\text{F}$ -

ЯМР-сигнал. Состав фторуглеродной фазы эмульсии не влияет на ее распределение в организме животного, а только на время выведения компонентов эмульсии из организма. Это позволяет проводить прямое сравнение  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображений, полученных с разными эмульсиями.

На Рисунке 6 представлены  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения всего тела мыши сразу после внутривенного введения 0,24 мл эмульсии **ПФТБА-4а**, спустя 1 и 2 дня после инъекции, а также  $^1\text{H}$ -МРТ-изображения всего тела мыши и ее  $^1\text{H}+^{19}\text{F}$ -МРТ-изображение.



**Рисунок 6.**  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения всего тела мыши сразу после внутривенного введения 0,24 мл эмульсии **ПФТБА-4а** (А), спустя 1 день (В) и 2 дня (С) после введения. (D) и (E):  $^1\text{H}$ - и  $^1\text{H}+^{19}\text{F}$ -МРТ-изображение всего тела мыши, соответственно. Красной стрелкой отмечены  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигналы эмульсии, скопившейся вблизи сосудистой сети ангиогенеза.

$^{19}\text{F}$ -МРТ-изображения дают наглядную картину распространения введенной эмульсии **ПФТБА-4а** по всему организму мыши. Из рисунка 6 видно, что сразу после введения эмульсия равномерно перемешивается в кровеносном русле – причем на  $^{19}\text{F}$ -МРТ-изображении (А) можно видеть контур всей мыши – видна шея, печень, задние лапы, однако наибольший  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигнал наблюдается в самом низу тела мыши – данная область помечена красной стрелкой. Эту область можно характеризовать, как область ангиогенеза, в ней находится множество мелких капилляров и сосудов, питающих опухоль. Очевидно, «нагруженные» эмульсионными частицами ПФУ с порфирином макрофаги присутствуют в этой области в значительной концентрации. Поэтому в зоне, отмеченной красной стрелкой, виден сильный  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигнал. Спустя один день  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигнал в этой области начинает постепенно уменьшаться, так как «нагруженные» макрофаги постепенно мигрируют из зоны патологии и уносят эмульсионные частицы в печень. Еще через один день  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-сигнал обнаруживается только в печени.

Таким образом,  $^{19}\text{F}$ -МРТ исследования модифицированных ФУЭ, содержащих порфирин **4а** показали, что подобные эмульсии могут служить не только основой для создания препаратов для ФДТ, но также средствами их адресной доставки в зоны опухолей и диагностическим инструментом для более эффективного проведения терапии.

## Выводы

1. Разработаны доступные методы синтеза полифторалкил-содержащих пирролил-2-карбинолов и бензальдегидов – базовых соединений для сборки порфиринового макроцикла.
2. Предложены и реализованы оптимальные схемы синтеза ряда полифторированных *мезо*-алкил- и *мезо*-арил-замещенных порфиринов путем тетрамеризации фторсодержащих пирролил-2-карбинолов, сборки макроциклов из полифторалкил-замещенных бензальдегидов и пиррола, замещения атомов фтора в *мезо*-тетракис(пентафторфенил)порфирине.
3. На основании исследований спектральных характеристик полифторированных порфиринов доказана их эффективность в фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода. Показана перспективность использования полученных соединений в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака
4. На базе препарата Перфторан® создана и изучена наноразмерная эмульсионная система с порфиринами, растворенными во фторуглеродной фазе. Продемонстрирована фотодинамическая эффективность такой системы *in vitro*, в том числе в условиях недостатка кислорода. Методом  $^{19}\text{F}$ -МРТ визуализации *in vivo* показана способность таких эмульсий накапливаться в зоне опухоли.
5. Показана перспективность использования полученной эмульсии для создания мультифункциональных препаратов, выполняющих одновременно функции ФС в ФДТ и контрастного агента в методе  $^{19}\text{F}$ -МРТ визуализации.

### Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Belyaeva E.V.**, Sigan A.L., Gervits L.L., Chkanikov N.D. Approaches to the synthesis of porphyrins with polyfluoroalkyl substituents. X. German-Russian-Ukrainian Symposium on Fluorine Chemistry, Berlin, Germany, November 26-28, 2014, P.19.
2. **Belyaeva E. V.** A method of introducing fluorinated substituents in porphyrin structure by nucleophilic substitution of fluorine in *meso*-tetakis(pentafluorophenyl)porphyrin and pentafluorobenzaldehyde with polyfluoroaliphatic alcohols / E. V. Belyaeva, A. L. Sigan, I. E. Druzhinina, N. S. Ikonnikov, N. D. Chkanikov // Fluor. notes – 2015. – Т. 102 – № 5.
3. **E. V. Belyaeva**, A. A. Markova, A. L. Sigan, L. L. Gervits, A. A. Shtil, N. D. Chkanikov. The fluorocarbon emulsion for photodynamic therapy. 11th All-Russia Conference “FLUORINE CHEMISTRY» marking the 110th anniversary of Professor Ivan L. Knunyants, Moscow, Russia, June 26-30, 2016, O-36, p. 80.
4. A. A. Markova, **E. V. Belyaeva**, S. S. Bukalov, N. D. Chkanikov, A. A. Shtil. Photodamage of tumor cells caused by novel fluorinated porphyrins dissolved in perfluorocarbon. 11th All-Russia Conference “FLUORINE CHEMISTRY» marking the 110th anniversary of Professor Ivan L. Knunyants, Moscow, Russia, June 26-30, 2016, O-37, p. 81.
5. **Belyaeva E. V.** Novel Fluorinated Porphyrins Sensitize Tumor Cells to Photodamage in Normoxia and Hypoxia: Synthesis and Biocompatible Formulations / E. V. Belyaeva, A. A. Markova, D. N. Kaluzhnyb, A. L. Sigan, L. L. Gervitz, A. N.

- Ataeva, N. D. Chkanikov, A. A. Shtil // *Anticancer. Agents Med. Chem.* – 2017. – Т. 17.
6. Gusev D. V. Synthesis of 3-Indolyl Perfluoroalkyl Carbinols by the Reaction of Indoles with Perfluorinated Aldehydes / D. V. Gusev, **E. V. Belyaeva**, A. L. Sigan, N. D. Chkanikov // *Fluor. Notes* – 2017. – Т. 4 – № 113.
7. Патент РФ № 2626600 С1, 28.07.2017. **Беляева Е.В.**, Маркова А.А., Сиган А.Л., Гервиц Л.Л., Букалов С.С., Штиль А.А., Чкаников Н.Д. Композиция для применения в фотодинамической терапии рака // Патент России № 2626600 С1; заявл. 20.06.2016; опубл. 28.07.2017, Бюл. № 22.