

УДК 667.287.42

А.А. ЛУГОВСКИЙ, Е.С. ВОРОПАЙ, М.П. САМЦОВ, А.П. ЛУГОВСКИЙ, К.Н. КАПЛЕВСКИЙ

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОСАХАРИДАМИ ТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ – НОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ФДТ

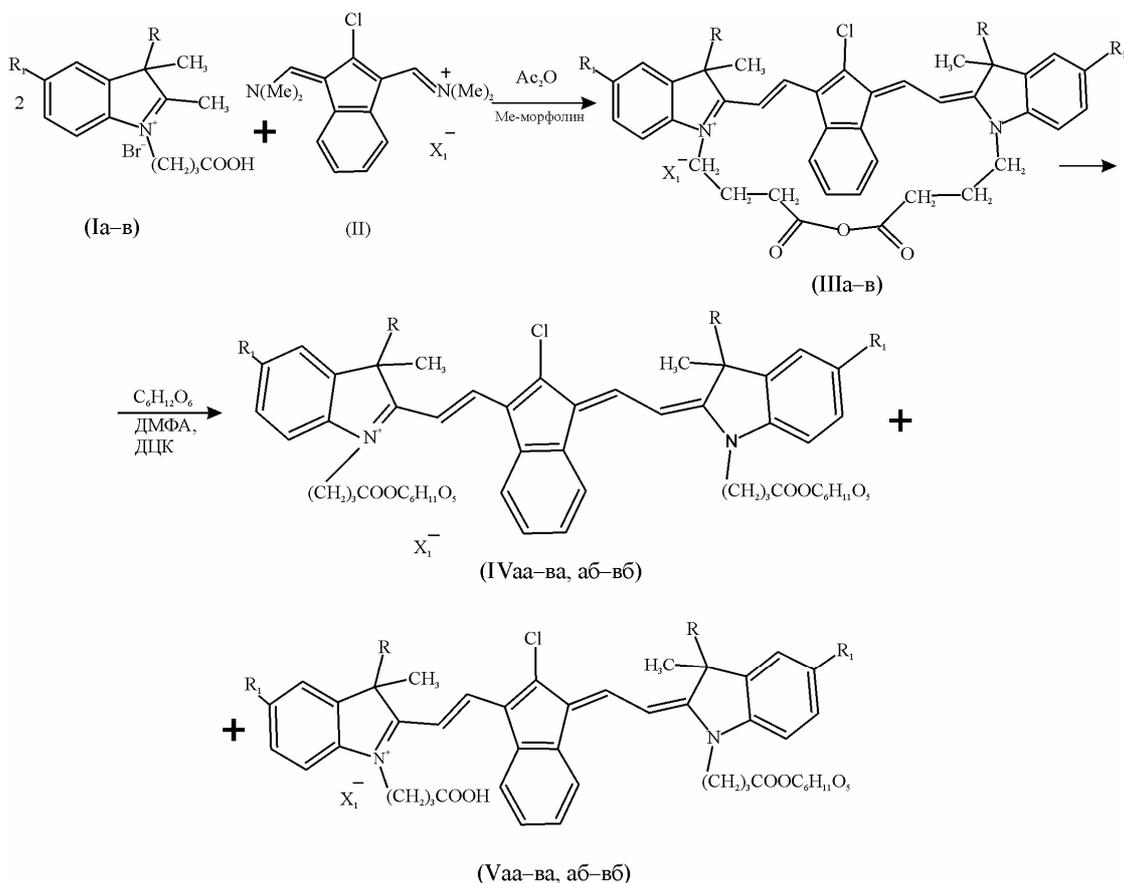
Tricarbocyanine dyes modified by monosaccharides are synthesized. Scheme of esterification of cyanine dyes by D-glucose and D-galactose is optimized. Synthesized substances have shown high photodynamic activity in vitro.

Основой метода фотодинамической терапии (ФДТ) является локальное токсическое воздействие на опухолевые ткани путем введения фотосенсибилизатора с последующей фотоактивацией его светом. В настоящее время в клинической практике применяются препараты на основе хлорина е6 [1], токсическое воздействие которых основано на генерации синглетного кислорода. Полиметиновые красители перспективны для использования в качестве фотосенсибилизаторов для фотохимиотерапии в связи с наличием в их спектрах поглощения, диапазон которого обеспечивает наибольшую прозрачность биологических тканей, что позволяет увеличивать глубину поражения раковой опухоли [2, 3].

В настоящей работе описан синтез новых полиметиновых красителей, представляющих практический интерес в качестве фотосенсибилизаторов ФДТ. Известно, что ковалентное связывание данных красителей с биологически активными соединениями приводит к повышению водорастворимости, селективности накопления в опухоли и скорости выведения фотосенсибилизатора из организма [4]. В качестве объектов для ковалентного связывания с трикарбоцианиновым красителем были выбраны D-глюкоза и D-галактоза, так как эти метаболиты активно усваиваются раковыми клетками [5].

Соединения (III) синтезировали из солей (I), полученных кватернизацией 2,3-диметил-3-алкил- и 2,3,5-триметил-3-алкилиндоленинов и этилового эфира γ -броммасляной кислоты с последующим гидролизом полученных соединений, и производного глутаконового альдегида (II) кипячением в уксусном ангидриде в присутствии N-метилморфолина.

На первой стадии конденсация одного эквивалента индоленина самокатализируется диметилламинной группой соли (II).



R = Me, R₁ = H (Ia, IIIa, IVa, Va); R = Et, R₁ = H (Ib, IIIб, IVб, Vб); R = Me, R₁ = Me (Iв, IIIв, IVв, Vв);
 X = Br, I, BF₄, C₆H₁₁O₅ – фрагмент D-галактозы (IVаа–Vва) или D-глюкозы (IVаб–Vб)

Взаимодействие со второй молекулой соли (I) требует дополнительного основного катализатора – 1 эквивалента N-метилморфолина.

Следует отметить, что соединение (III) стабильно в форме внутреннего ангидрида. Это было установлено на основании анализа спектров ИК-поглощения. В спектрах отсутствует полоса в области 3550 см^{-1} , которая соответствует валентным (–O–H) колебаниям.

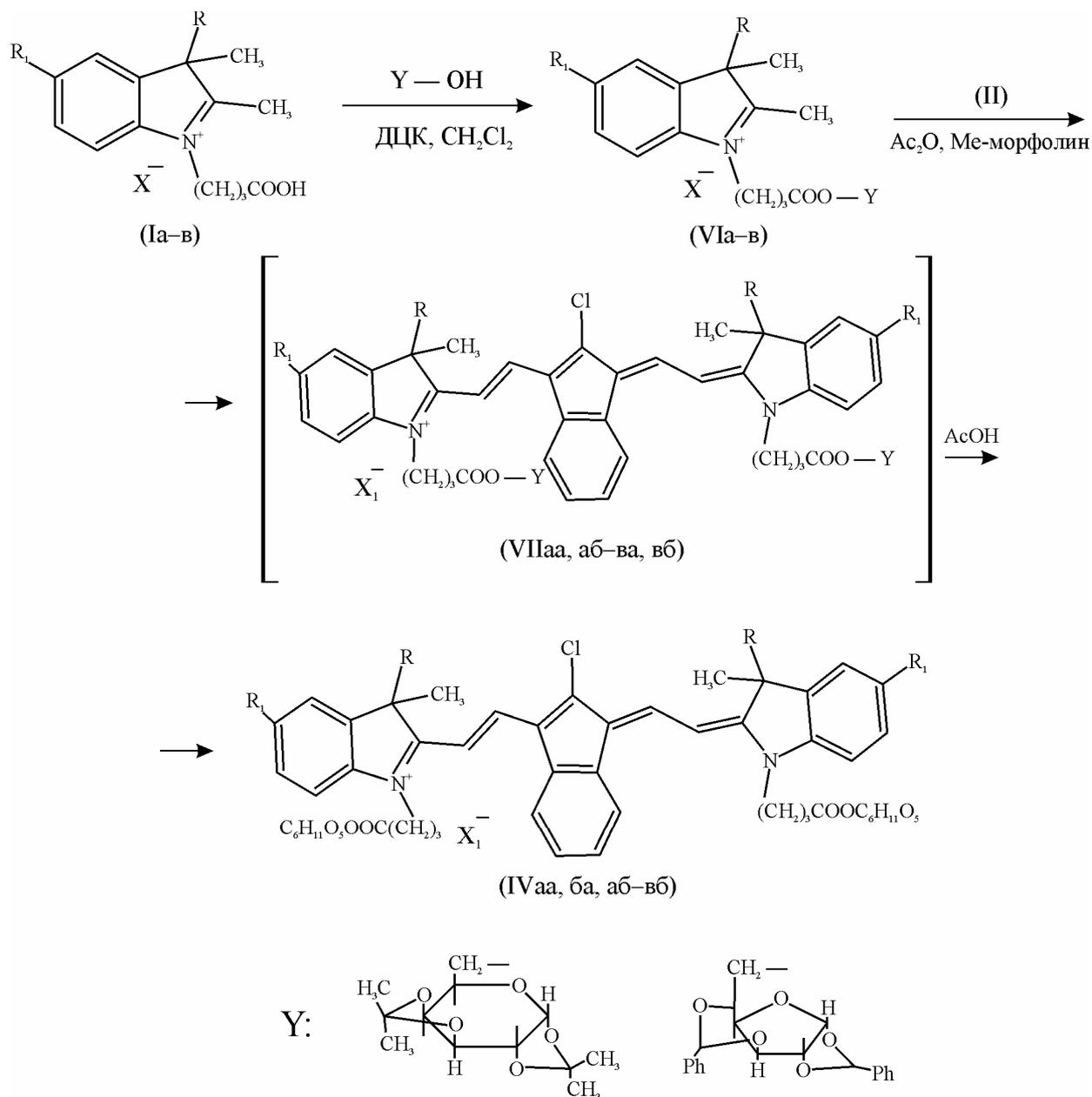
Дальнейшее взаимодействие соединений (IIIа–в) и D-галактозы или D-глюкозы проводилось в диметилформамиде в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). Взаимодействие моносахарида проходит преимущественно по первичной гидроксильной группе [6]. В результате последующего выделения была получена смесь продуктов реакции по одной и двум карбоксильным группам в соотношении 2,6:1. Выделение индивидуальных продуктов осуществлялось посредством колоночной препаративной хроматографии.

Необходимо отметить, что наличие продукта взаимодействия по одной группе (V) не оказывает существенного влияния на темновую и световую токсичности фотосенсибилизатора. Однако при использовании препарата в медицине важную роль играет индивидуальная чистота вещества. Поскольку хроматографическое отделение (IV) от (V) приводит к значительному снижению выхода, была разработана иная схема получения соединения (IV). Исходное производное индоленина (I) этерифицировали 1,2;3,5-добензилиден- α -D-глюкофуранозой [6] или 1,2;3,4-диизопропилиден- α -D-галактопиранозой [7]. При этом взаимодействие идет исключительно по незащищенному 6-положению моносахарида. Кроме того, необходимо защитить моносахариды от возможной побочной реакции их с уксусным ангидридом. Полученные сложные эфиры (VI) легко отделяются от исходного соединения (I) перекристаллизацией из этилового спирта.

Полученное соединение (VI) подвергают конденсации с производным глутаконового альдегида (II) в условиях, аналогичных описанному ранее синтезу красителя (III). Последующее снятие бензильной или изопропилиденовой защиты с соединения (VII) в уксусной кислоте приводит к целевому продукту (IV) с высоким выходом. Строение соединений (IV) подтверждено методами спектрально-флуоресцентного анализа, данными ТСХ и ЯМР¹H (табл. 1).

Длина волны максимума поглощения, квантовый выход фотодеструкции (Φ) и выход генерации синглетного кислорода (B) полиметиновых красителей в хлороформе- d^1 ($CDCl_3$)

Краситель	$t_{пл}, ^\circ C$	$\lambda_{макс}^{полг}, нм$	$\Phi, мол/фот$	$B \cdot 10^2$
IIIб ClO_4^-	174÷176	735	$(9,4 \pm 1,4) \cdot 10^{-5}$	$15,2 \pm 1,4$
IIIб Br^-	162÷164	730	$(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	$10,7 \pm 0,9$
IIIа Br^-	167÷169	730	—	—
IVаа Br^-	172÷174	735	—	—
IVба Br^-	176÷178	735	—	—
IVаб Br^-	145÷147	735	—	—
IVбб Br^-	140÷142	735	$(6,4 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}$	$4,8 \pm 0,5$
IVбб BF_4^-	151÷153	737	$(8,9 \pm 1,2) \cdot 10^{-6}$	$7,7 \pm 0,7$
IVбб I^-	147÷149	735	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$6,1 \pm 0,6$
IVвб Br^-	143÷145	735	—	—
Vаб Br^-	157÷159	735	—	—
Vбб Br^-	153÷155	736	—	—



R = Me, R₁ = H (Ia, IVa, VIa, VIIa); R = Et, R₁ = H (Iб, IVб, VIб, VIIб); R = Me, R₁ = Me (Iв, IVв, VIв, VIIв); X = Br, I, BF₄

Таким образом, разработано два конкурентоспособных метода получения диэфиров индотрикарбодиазаниновых красителей с моносахаридами с целью дальнейшей оптимизации промышленного получения субстанций лекарственных средств на основе этих соединений.

Исследование цитотоксичности ряда полученных соединений (табл. 2) показало, что после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 5 мкг/мл трикарбодиазаниновых красителей (ТК), выживаемость клеток существенно не отличается от контрольных значений. При увеличении концентрации ТК в инкубационной среде число жизнеспособных клеток уменьшается. Расчет эффективных концентраций препаратов, вызывающих уменьшение числа клеток на 50 % по сравнению с контролем ($ЭК_{50}$), показал, что по критерию $ЭК_{50}$ цитотоксичность зависит от противоиона и достигает меньших значений для соединений с противоионом Br^- .

Таблица 2

Выживаемость клеток HeLa после инкубации в течение 2 ч в питательной среде, содержащей соединения (IVаб, IVбб)

Концентрация красителя в среде, мкг/мл	IVаб (X=Br)		IVбб (X=Br)		IVбб (X=I)		IVбб (X=BF ₄)	
	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%
0	830±42	100	830±42	100	634±7	100	592±25	100
5	–	–	–	–	605±31	95	575±48	97
10	–	–	–	–	524±23	83	353±34	60
12,5	688±50	83	813±37	98	–	–	–	–
25	533±28	64	648±23	78	287±16	45	273±29	45
37,5	395±71	48	363±26	44	–	–	–	–
50	–	–	–	–	124±41	20	108±12	18
$ЭК_{50}$	35,6±0,3		35,7±1,6		23,3±0,5		18,7±2,0	

Для сравнения фотодинамической активности в качестве количественной характеристики использовано отношение числа жизнеспособных после фотооблучения клеток к количеству клеток в контрольных флаконах. Облучение проводили при температуре 0÷4 °С полупроводниковым лазером (740 нм, Lotis, Минск) в дозе 10 Дж/см². Плотность мощности фотооблучения, которую контролировали с помощью измерителя мощности LM-2 (Karl Zeiss, Jena), на поверхности дна флакона составляла 20 мВт/см². Соединение IVбб (X=Br) проявило сильновыраженную фоточитотоксичность.

Таблица 3

Выживаемость клеток HeLa после инкубации в течение 1 ч с препаратом IVаб (X=Br) и фотооблучения дозой 10 Дж/см²

IVаб (X=Br)									
Концентрация красителя, мкг/мл	0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	
Выживаемость клеток, % к контролю	110	90	48	25	6	0	1	0	
IIIа (X=Br)									
Концентрация красителя, мкг/мл	0,5	1	2,5	5	11				
Выживаемость клеток, % к контролю	93	72	56	26	9				

Из табл. 3 видно, что уже при концентрации красителя 1,6 мкг/мл препарат IVаб (X=Br) активно воздействует на злокачественные клетки, а при дальнейшем росте концентрации полностью их разрушает.

Таким образом, синтезированы новые трикарбодиазаниновые красители конденсацией алкилированных индоленинов и производного глутаконового альдегида и продукты их дальнейшей модификации моносахаридами. Оптимизированы условия получения этерификацией данных соединений D-галактозой и D-глюкозой.

Изучение фотодинамической активности полученных сложных эфиров на примере соединения IVаб (X=Br) и IIIа (X=Br) показало, что они, обладая низкой темновой токсичностью, проявили сильновыраженные фотодинамические свойства. В результате модификации к трикарбодиазаниновому красителю молекулы моносахарида повышается его фотодинамическая активность и снижается темновая токсичность препарата.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР 5 % растворов соединений были записаны на спектрометре Bruker AC 400 с рабочей частотой 400 МГц. Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра PV-1251 фирмы Solar; флуоресценция – с помощью флуориметра Fluorolog фирмы Spex. Спектры ИК-поглощения зарегистрированы Фурье-спектрометром Vertex 70 фирмы Bruker.

Синтез бромида 1-(3-карбоксыпропил)-3-этил-(2,3-диметил- или 2,3,5-триметил)-3Н-индолия (Iб). 0,1 моль 3-этил-2,3-диметил-индоленина и 0,1 моль этилового эфира гамма-броммасляной кислоты нагревали 3 ч при 130 °С. Полученную смесь перекристаллизовывали из этилацетата и отделяли фильтрованием осадок. Затем в 10 г соли добавляли 50 мл муравьиной кислоты и 1 мл 48 % HBr и нагревали при кипении 8 ч. Затем упаривали осадок и перекристаллизовывали из ацетона. ЯМР ^1H , δ м.д. (DMCO-d₆, TMS) (Iб): 0.38 (т, 3H, 3-Et), 1.57 (с, 3H в 3-Me), 2.06 (м, 2H, 1-C²H₂), 2.21 (к, 2H, 3-Et), 2.56 (т, 2H, 1-C³H₂), 2.92 (с, 3H, 2-Me), 4.56 (т, 2H, 1-C¹H₂), 7.6–8.1 (м, 4H, Ar-H), 10,76 с (COOH). Выход 25,4 %.

Соединения (Iа) и (Iв) получали по аналогичной методике.

Синтез (IIIа–в), (VIIа–в). Смесь 0,001 м бромида 1-(3-карбоксыпропил)-3-алкил-(2,3-диметил- или 2,3,5-триметил)-3Н-индолия (Iа–в) или его этерифицированного аналога (VIаа–га, VIаб–гб) выдерживали в 15 мл уксусного ангидрида и затем добавляли 0,0005 м соли [5-диметиламино-3-Z-2,4-(о-фенилено)-2,4-пентадиен-1-илиден]-диметиламмония (II), после нагревания при кипении в течение 10 мин в реакционную смесь добавляли 0,5 мл N-метилморфолина и нагревали еще 5 мин. После охлаждения в реакционную смесь добавляли 150 мл диэтилового эфира и через 1 ч выпавший продукт отделяли фильтрованием. Полученный осадок промывали на фильтре водой. Осадок растворяли в 10 мл хлористого метилена и высаждали 50 мл диэтилового эфира. Выход (IIIб Br⁻) 56 %. ЯМР ^1H (DMFA-D⁷), δ м.д. (IIIб): 0.49 (т, 6H, 3-Et), 1.87 (с, 6H, 3-Me), 1.96 (м, 4H, 1-C²H₂), 2.38 (т, 2H, 1-C³H₂), 2.47 (к, 4H, 3-Et), 4.27 (т, 2H, 1-C¹H₂), 8.47, 7.34 (д, 4H, -CH=); 7.49, 7.61, 7.82, 8.22, 8.27 (м, 12H, фенил-H). ИК-спектр (вазелиновое масло) ν , см⁻¹: 1829, 1760 (C=O), 1620, 1660 (C=C транс).

Синтез (IVаа–IVва, IVаб–IVвб) из (IIIа–в). 0,001 моль соединения (IIIа–г) и 0,003 моль D-глюкозы или D-галактозы растворяли в 15 мл DMFA и добавляли 0,0011 моль дициклогексилкарбодиимида. Через 12 ч продукт высаждали 200 мл диэтилового эфира. Осадок растворяли в 30 мл хлористого метилена и фильтровали. Из полученного фильтрата упаривали растворитель до объема 10 мл и высаждали 250 мл диэтилового эфира. Осадок отделяли фильтрованием. Смесь (IVаа – IVвб) и (Vаа – Vвб) разделяли методом колоночной хроматографии (силикагель, этилацетат – этанол – уксусная кислота 3:2:0,01). Выход (IVбб Br⁻) 51%. ЯМР ^1H (DMFA-D⁷), δ м.д. (IVбб): 0.49 (т, 6H, 3-Et), 1.87 (с, 6H, 3-Me), 1.96 (м, 4H, 1-C²H₂), 2.41 (т, 2H, 1-C³H₂), 2.47 (к, 4H, 3-Et), 3.08, 3.21, 3.62 (м, 8H, H²⁻, H³⁻, H⁴⁻, H⁵⁻-глюкоза), 4.27 (т, 2H, 1-C¹H₂), 4.62, 4.72 (м, 6H, H¹⁻, H⁶⁻-глюкоза), 8.47, 7.34 (д, 4H, -CH=); 7.49, 7.61, 7.82, 8.22, 8.27 (м, 12H, фенил-H). (Vбб): 0.49 (т, 6H, 3-Et), 1.87 (с, 6H, 3-Me), 1.96 (м, 4H, 1-C²H₂), 2.41 (т, 2H, 1-C³H₂), 2.47 (к, 4H, 3-Et), 3.08, 3.21, 3.62 (м, 4H, H²⁻, H³⁻, H⁴⁻, H⁵⁻-глюкоза), 4.27 (т, 2H, 1-C¹H₂), 4.62, 4.72 (м, 3H, H¹⁻, H⁶⁻-глюкоза), 8.47, 7.34 (д, 4H, -CH=); 7.49, 7.61, 7.82, 8.22, 8.27 (м, 12H, фенил-H).

Синтез (VIаа-ва, VIаб-вб). 0,01 моль бромида 1-(3-карбоксыпропил)-3-алкил-(2,3-диметил- или 2,3,5-триметил)-3Н-индолия (Iа–в) и 0,01 моль дициклогексилкарбодиимида в 50 мл хлористого метилена выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к этой смеси добавляли 0,01 моль соответствующего защищенного моносахарида (1,2;3,5-добензилиден- α -D-глюкофуранозы или 1,2;3,4-диизопропилиден- α -D-галактопиранозы) и выдерживали при комнатной температуре еще 48 ч. Полученную соль высаждали диэтиловым эфиром и перекристаллизовывали их этилового спирта. Выход (VIбб) 59 %.

Синтез (IVаа-ва, IVаб-вб) из (VIIа-в). 0,001 м (VIIа–в) помещали в 25 мл уксусной кислоты и выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч. Полученное соединение (IV) высаждали диэтиловым эфиром, осадок отделяли фильтрованием. Полученную соль растворяли в 10 мл хлористого метилена, затем добавляли 100 мл диэтилового эфира и очищенную выпавшую соль отделяли фильтрованием. Выход (IVбб) 88 %.

1. Kostenich G.A., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.A. // J. Photochem. Photobiol. B.: Biol. 1994. Vol. 22. P. 211.
2. Istomin Y.P., Alexandrova E.N., Zhavrid E.A. et al. // Experimental oncology. 2006. Vol. 28. № 1. P. 80.
3. Самцов М.П., Воропай Е.С., Каплевский К.Н. и др. // Журн. прикл. спектроскопии. 2009. Vol. 76. № 4. С. 576.
4. Ravindra K. Pandey, Nadine James, Yihui Chen, Mahabeer P. Dobhal // Top Heterocycl. Chem. 2008. Vol. 14. С. 41.
5. Балаж А. Биология опухолей. М., 1987. С. 298.
6. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. и др. Химия углеводов. М., 1967. С. 671.
7. Методы химии углеводов / Под ред. Н.К. Кочеткова. М., 1967. С. 137.

Поступила в редакцию 27.05.11.

Александр Анатольевич Луговский – ассистент кафедры лазерной физики и спектроскопии.

Евгений Семенович Воропай – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой лазерной физики и спектроскопии.

Михаил Петрович Самцов – доктор физико-математических наук, доцент, главный научный сотрудник НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ.

Анатолий Петрович Луговский – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ.

Кирилл Николаевич Каплевский – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры лазерной физики и спектроскопии.