

Изобретение относится к новому фармацевтически приемлемому светочувствительному соединению (фотосенсибилизатору)-5,10,15,20-тетракис-(1-алкил-пиридил)-21Н,23Н-7,8,17,18-тетрагидропорфирин-тетра-п-толуолсульфонату, а также к способу его получения.

Фотосенсибилизаторы - это светочувствительные химические соединения, которые иницируют фотохимическую реакцию после поглощения кванта света. Благодаря метаболическим процессам, протекающим различно в здоровых и патологических клетках, фотосенсибилизаторы аккумулируются более длительное время и в большей концентрации в раковых и некоторых предраковых клетках.

Фотосенсибилизатор активируется монохроматическим светом соответствующей длины волны и достаточной интенсивности. После поглощения кванта света фотосенсибилизатор переходит сначала в метастабильное синглетное, а потом в стабильное триплетное состояние. Это триплетное состояние является исходным для двух различных фотохимических реакций.

В результате реакции фотосенсибилизатора непосредственно с субстратом образуются радикалы, которые после реакции с молекулярным кислородом приводят к образованию перекиси, гидроксильного, пероксидного радикалов и других продуктов (тип I реакций).

К типу II фотодинамических реакций относятся реакции, в которых энергия возбуждения фотосенсибилизатора приводит к активации молекулярного кислорода, находящегося в основном триплетном состоянии и образованию метастабильного синглетного состояния $^1\text{O}_2$. Для большинства фотосенсибилизаторов фотодинамическое воздействие осуществляется при помощи реакций типа II. Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ обладает при этом повышенной химической активностью и вызывает окисление субстрата (Henderson, B.W. and Dougherty, T.J.. *How does photodynamic therapy work?*, Photochem. Photobiol., 1992, 55, 145-157).

Особые точки или типы повреждения клеток вследствие фотодинамической терапии еще однозначно не установлены. В зависимости от типа и заряда фотосенсибилизатора происходит его накопление на клеточных мембранах, в митохондриях или в лизосомах. В этом случае наблюдается повреждение мембран в результате фотоокисления ненасыщенных жирных кислот, липидпероксидов и сшитых протеинов (Gomer, C.J., Rucker, N., Ferrario, A., Wong, S.. *Properties and applications of photodynamic therapy*, Radiat. Res., 1989, 120, 1-18).

В литературе обсуждается также ингибирование определенных мембраноустойчивых ферментов (Modica-Napolitano, J.S., Joxal, J.L., Ara. G., Oseroff, A.R., Aprille, J.R. *Mitochondrial-toxicity of cationic photosensitizers for phototherapy*. Cancer Res., 1990, 50, 7876-7881), изменение интрамолекулярной концентрации ионов

Ca^{2+} (Hubmer, A., Hermann, A., Überriegler, K., Kramer B.. *Role of calcium in photodynamically induced cell damage of human fibroblasts*. Photochem. Photobiol., 1996, 64, 211-215) а также иницирование апоптоза клеток (Luo, Y., Chang, C.K., Kessel, D.. *Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy*. Photochem. Photobiol., 1996, 63, 528-534).

В медицине этот метод лечения называется фотодинамической терапией (ФДТ) и является одним из самых многообещающих методов лечения онкозаболеваний. ФДТ применяется как альтернативная терапия в тех случаях, когда пациенты слишком стары или слабы, чтобы быть в состоянии перенести химиотерапевтическое, хирургическое или радиологическое воздействие или в случаях, когда применение этих терапий не дает положительных результатов. ФДТ может проводиться совместно или в дополнение к другим методам лечения опухолей, при этом ее эффективность повышается за счет синергического эффекта. Световое облучение длится несколько минут, поэтому наиболее широко применяются непрерывные св-лазеры и волноводы для транспортировки света.

ФДТ как лечебная процедура была предложена Raab еще в 1900 году (Raab, O.. *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria*. Z. Biol., 1900, 39, 524-526), но значительных успехов удалось достигнуть только в 60-ые годы, когда было показано, что производные гематопорфирина (ППП) селективно накапливаются в опухолях (Lipson, R., Baldes, E., Olson, A.. *The use of derivative of hematoporphyrin in tumor detection*. J. Natn. Cancer Inst., 1961, 267, 1-8). С тех пор были проведены обширные, исследования ППП (Lipson, R., Baldes, E., Olson, A. *The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection*. J. Natn. Cancer Inst., 1961, 267, 1-8; Kessel, D. (ed.) *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease*, Vols. I and II. CRC Press, Boston 1990; Moan, J. . *Porphyrin photosensitization and phototherapy*. Photochem. Photobiol., 1986, 43, 681 - 690; Pass, H.I. *Photodynamic therapy in oncology: Mechanisms and clinical use*. J. Natl. Cancer Inst., 1993, 85, 443 - 456). Фототерапия на основе Photofrin® применяется в клиниках отдельных стран для лечения некоторых онкологических и других заболеваний.

Благодаря многообещающим клиническим результатам, полученным в случае Photofrin®, а также из-за недостатков данного соединения (слабое поглощение в спектральном диапазоне от 700 до 900 нм, т.е. в области минимального поглощения биологических тканей; химическая гетерогенность, а также сильная и длительная фототоксичность при дневном освещении и т.д.) синтезируется и исследуется все больше сенсибилизаторов так называемого второго и третьего поколений. В эту группу входят различные соединения, такие, как например, антрахиноны, антрапиразолы, периленхиноны, ксантены, циа-

нины, акридины, феноксазины и фенотиазины (Diwu, Z.J., Lown, J.W.. Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. *Pharmac. Ther.*, 1994, 63, 1-35). Отбор фотосенсибилизаторов второго и третьего поколений происходит по следующим критериям (Gomer, C.J., Rucker, N., Ferrario, A., Wong, S. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat. Res.*, 1989, 120, 1-18):

- химическая чистота,
- водорастворимость,
- минимальная темновая токсичность,
- значительное поглощение на длинах волн более 700 нм,
- высокий выход синглетного кислорода,
- преимущественное накопление в патологических тканях (например, в раковых),
- быстрый вывод из здоровой ткани.

В настоящее время очень интенсивно проводятся исследовательские работы по синтезу производных бактериохлорина. Согласно литературным данным они наиболее полно удовлетворяют вышеприведенным критериям отбора (Dougherty, T.J. et al. WO 90/12573; Skalkos D. et al. WO 94/00118; Pandey, R.K. et al. WO 95/32206; Dolphin, D. et al. WO 96/13504; Pandey, R.K. et al. WO 97/32885). Отдельные из вновь синтезированных бактериохлоринов обладают очень слабой темновой токсичностью и высокой селективностью в отношении раковых опухолей. При этом они имеют сильные полосы поглощения в так называемом "фототерапевтическом окне" в диапазоне от 700 до 810 нм и являются частично водорастворимыми. Таким образом, при их применении становится возможной обработка слоя ткани глубиной, большей чем 1 см (Pandey, R., Kozurev, A., Potter, W.R., Henderson B. W., Belliner, T. J., Dougherty, T. J. : Long wavelength photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1996, 63, Abstracts of the 24th Annual Meeting of the American Soc. for Photobiology, TPM-E6).

Известные производные бактериохлорина обладают следующими недостатками:

сложный и дорогой синтез, требующий дополнительной очистки исходных продуктов,

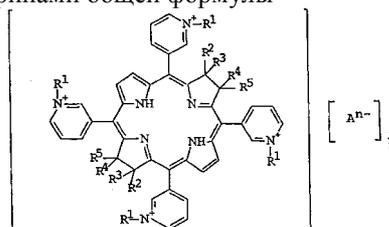
плохая водорастворимость, требующая при системном введении сенсibilизатора присутствия органических растворителей, что приводит к дополнительной химической нагрузке на организм пациента,

их отрицательный или же нейтральный общий заряд, приводящий к осложнению накопления в клетках вследствие их обычно отрицательного собственного заряда,

химическая нестабильность соединений.

Задачей настоящего изобретения является устранение вышеназванных недостатков благодаря синтезу фотосенсибилизаторов с химическими и физическими свойствами, позволяющими осуществлять их техническое и хозяйственное применение.

Поставленная задача достигается новыми порфиринами общей формулы

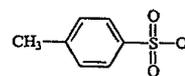


где

R^1 обозначает C_1-C_6 -алкил или арил,
 R^2 до R^5 , независимо друг от друга обозначают H, OH, C_1-C_6 -алкил, C_1-C_6 -алкилен или OR^6 , причем R^6 обозначает C_1-C_6 -алкил или арил,

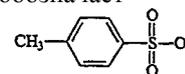
A^{n-} обозначает анион и
 n 1 или 2.

Одно- или двухвалентный анион выбран предпочтительно из группы, состоящей из Cl^- , Br^- , J^- , SO_4^{2-} ,

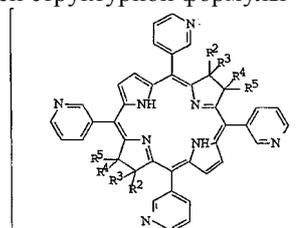


В особо предпочтительном соединении R^1 обозначает C_1-C_6 -алкильную группу, а именно: метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил; в особенности метил, остаток R^2 до R^5 обозначают H, а

анион A^{n-} обозначает

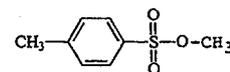


Новые порфирины легко синтезируются. Исходным продуктом служат при этом порфирины общей структурной формулы



где R^2 до R^5 имеют вышеуказанные значения. Соединения, у которых R^2 до R^5 означают H, можно купить в торговой сети или легко синтезировать из соединений, имеющих в продаже. Исходные соединения вступают во взаимодействие с соединением общей формулы R^1A , в котором R^1 и A имеют вышеуказанные значения.

В предпочтительном методе синтеза в качестве соединения R^1A используют метилтозилат



Новые соединения согласно изобретению относятся к классу производных тетрааксипиридил-порфирина и предпочтительно применяются как фотосенсибилизаторы в медицине, сельском хозяйстве и в промышленности в фотодинамических процессах.

Существенным является при этом использование пиридинового производного порфирина в качестве активного фотохимического соединения. Особенным преимуществом новых порфириновых соединений является их высокая водорастворимость и химическая стабильность.

Новые соединения могут быть также модифицированы посредством металлокомплексов. В этой связи открываются новые возможности транспортировки выбранных металлов (например, редкоземельных) в раковые клетки с целью их накопления. Благодаря этому станет возможным получение новых линий поглощения в близкой ИК-области, наличие которых интересно, как для диагностики, так и для терапии. Помимо этого при использовании лантанидов появляется возможность активации образованных сенсibilизированных комплексов рентгеновским излучением. Энергия активации комплекса за счет процесса передачи энергии путем излучения или без него передается на молекулярный кислород, что приводит в результате к образованию синглетного кислорода.

Новые соединения согласно изобретению пригодны для терапии черной меланомы. Некоторые примеры осуществления изобретения приведены ниже.

Пример синтеза

Синтез 5,10,15,20-тетраakis-(1-алкил-3-пиридил)-21H,23H-7,8,17,18-тетрагидропорфирин-тетра-п-толуолсульфоната

150 мг 5,10,15,20-тетраakis-(1-алкил-3-пиридил)-21H,23H-7,8,17,18-тетрагидропорфирина растворяют в 15 мл нитрометана. После этого добавляются 350 мг метилтозилата и смесь кипятят в течение 2 ч в атмосфере азота.

Спустя 2 ч добавляют 120 мг метилтозилата и продолжают кипячение еще в течение 3 ч. После окончания реакции раствор выпаривают и выдерживают в течение 12 ч при комнатной температуре. Кристаллический осадок фильтруют и промывают раствором бензол-нитрометан (1:1).

Выход составляет 238 мг (100%-го) 5,10,15,20-тетраakis-(1-алкил-3-пиридил)-21H,23H-7,8,17,18-тетрагидропорфирин-тетра-п-толуолсульфоната (THPTPS), что составляет 72% от массы исходных веществ.

Химическая формула: $C_{72}H_{70}N_8O_{12}S_4$.

Молекулярный вес: $MG = 1367,66$

Пример применения

Момент максимального накопления сенсibilизатора в клетках как функцию времени инкубации определяли при помощи флуоресцентного спектрометра FluoroMax-2 (Jobbin YVON-Spex Instruments S.A. Inc.). Клетки меланомы хориоидеи (Schastak, S.I., Enzmann, V., Jünger, A., Zhavrid, E.A., Voropai, E.S., Alexandrova, E.N., Sammtsov, M.P., Ugovssky, A.P., und P. Wiedemann, Erste Ergebnisse zur PDT des Aderhautmelanoms ex vivo mittels neuer im IR-Bereich

absorbierenden Photosensitizer, Lasermedizin 1997, 13, 50-54), а также клетки линии карциномы желчного пузыря (Wittier) (Purdum, P.P., Cultured human gallbladder epithelia, A carcinoma-derived model, Lab. Invest., 1993, 68:345-353) и клетки линии карциномы желчных протоков (Charlies) (Hylemon, P., Virginia Commonwealth Univ., Richmond, VA, 1996) в количестве $1,2 \times 10^6$ клеток/мл инкубировали с сенсibilизатором THPTPS в 10 концентрации 0,4 мг/мл или 0,2 мг/мл (LD_{10}) на протяжении 1, 6, 12 и 24 ч в темноте.

После этого промывали трижды в растворе PBS, трипсиновали, измельчали ультразвуком и центрифугировали в течение 20 мин со скоростью 5000 об/мин.

Концентрация фотосенсibilизатора в супернатанте соответствовала точно количеству, которое было накоплено в клетках. Измеряя интенсивность сигнала в максимуме полосы эмиссии THPTSP при 775 нм после различного времени инкубации получают зависимость интенсивности флуоресценции от времени инкубации, по которой определяют время, необходимое для максимального накопления сенсibilизатора в клетках.

Для исследования фотодинамического эффекта *in vitro* клетки вышеназванных клеточных линий в количестве 2×10^5 кл/мл культивировали в DMEM+10% FKS и инкубировали с фотосенсibilизатором THPTPS в следующих концентрациях:

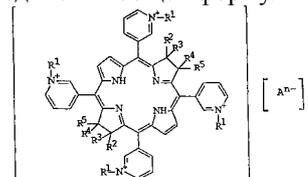
- 0,2; 0,4; 0,8 мг/мл (Wittier) и

0,4; 0,8; 1,6 мг/мл (Charlies) и клеток меланомы хориоидеи.

Инкубацию фотосенсibilизатором проводили в темноте на протяжении 12 ч. После этого клетки облучали светом непрерывного Ti:Sa-лазера с длиной волны 771 нм и дозой облучения, равной 15 мДж/см^2 . Оценка результатов фотодинамического воздействия, которая проводилась при помощи МТТ-теста (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий-бромид показала, что около 88% клеток Wittier и меланомы хориоидеи, а также около 84% клеток Charlies погибли в результате фотодинамического воздействия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединения общей формулы



где R^1 обозначает C_1 - C_6 -алкил или арил,

R^2 - R^5 независимо друг от друга обозначают H, OH, C_1 - C_6 -алкил, C_1 - C_6 -алкилен или OR^6 , причем R^6 обозначает C_1 - C_6 -алкил или арил,

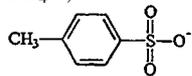
A^{n-} обозначает анион и

n равно 1 или 2.

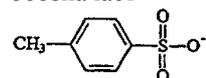
2. Соединения по п.1, отличающиеся тем, что R^1 обозначает метил, этил, пропил, бутил, пентил или гексил, в особенности метил.

3. Соединения по п.1 или 2, отличающиеся тем, что $R^2 - R^5$ обозначают H.

4. Соединения по пп.1-3, отличающиеся тем, что анион A^{n-} выбран из группы, включающей Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} ,



5. Соединения по пп.1-4, отличающиеся тем, что R^1 обозначает CH_3 , $R^2 - R^5$ каждый обозначает H и A^{n-} обозначает



6. Применение соединений по пп.1-5 в качестве фотосенсибилизаторов.

