А.Ф. Миронов,
М.А. Грин

СЕНСИБИЛИЗАТОРЫ БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

УДК: 547.979.733

В настоящем обзоре собраны данные за последние 10-15 лет по синтезу и химической модификации бактериохлорофилла а. Обсуждается эффективность использования бактериохлориновых производных в фотодинамической терапии. Описаны направленные химические модификации, приводящие к повышению стабильности, улучшению фотофизических свойств и созданию водорастворимых форм новых фотосенсибилизаторов.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие внимание ученых, работающих в области создания новых фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) рака, обращено к соединениям с интенсивным поглощением в области 770 – 850 нм. Использование ФС с таким терапевтическим окном поглощения открывает новые возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований [1]. Особое значение это имеет для окрашенных опухолей, например, меланомы. Важно также, что в этом диапазоне могут использоваться недорогие полупроводниковые лазеры.

Перспективными соединениями для ФС, поглощающих в близкой ИК-области, являются природные и синтетические бактериохлорины, при использовании которых свет проникает в ткань на глубину до 8-10 мм.

Как известно, в порфириновых системах две периферические двойные связи в противоположных пиррольных кольцах (B и D) являются перекрестно-сопряженными и их наличие не является необходимым для сохранения ароматичности. При восстановлении одной или двух связей ароматичность образующихся хлоринов и бактериохлоринов сохраняется, а изменение симметрии приводит к значительному батохромному сдвигу Q-полосы. Среди трех соединений - порфирина, хлорина и бактериохлорина с одинаковыми заместителями в макроциклах наиболее интенсивным поглощением в ближней ИК-области обладают бактериохлорины (λ_{max} = = 760-780 нм, ε = 4-10·10^4 $M^{-1}см^{-1}$) [2]. Кроме того, они хорошо генерируют активные формы кислорода (АФК), что также является необходимым условием для успешной ФДТ [3].

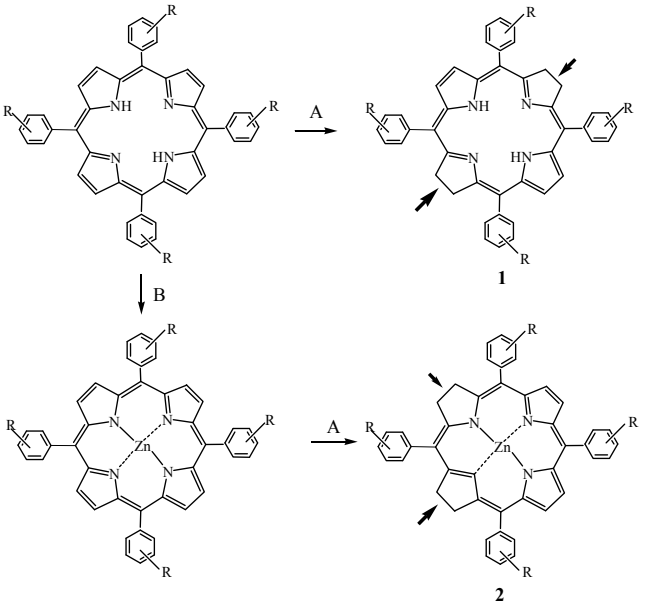
К сожалению, наиболее доступный природный тетрагидропорфирин – бактериохлорофилл *а* и ряд синтетических бактериохлоринов склонны к окислению до соответствующих хлоринов и порфиринов, и это существенно ограничивает их внедрение в клиническую практику. Высокая гидрофобность и связанная с ней низкая растворимость в полярных растворителях также осложняют практическое использование известных бактериохлоринов.

Основные работы, посвященные химическим превращениям бактериохлорофилла *а* (Бхл *а*), направлены на повышение химической стабильности и создание водорастворимых форм бактериохлориновых фотосенсибилизаторов.

Существует два подхода к получению производных бактериохлорина. Синтетический путь включает восстановление в различных порфиринах двойных связей в пиррольных кольцах B и D. Второй подход основан на направленной модификации природных бактериохлорофиллов и, в первую очередь, бактериохлорофилла *а*.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИОХЛОРИНЫ

Для восстановления порфиринов до хлоринов и бактериохлоринов можно использовать либо каталитическое гидрирование, либо обработку металлами в спиртовой среде (кипячение с натрием в амиловом спирте).

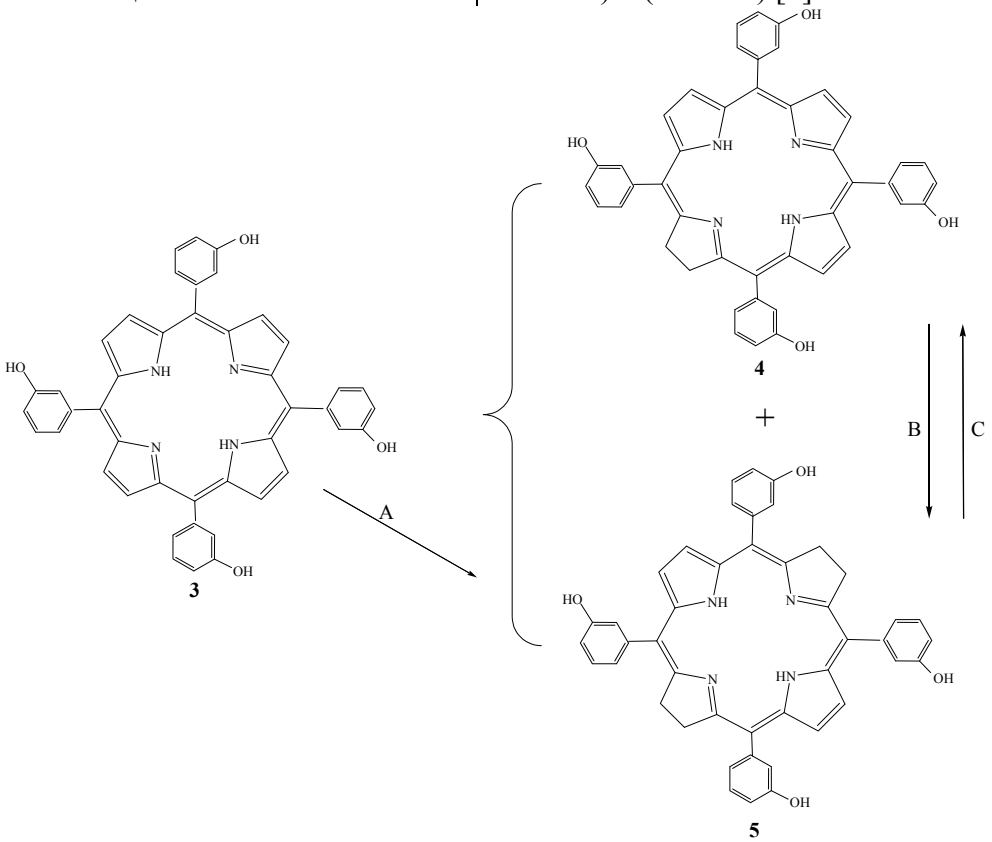


A: p-$MeC_6H_4SO_2NHNH_2$, K_2CO_3/Py.

Схема 1. Восстановление порфиринов и их металлокомплексов диимидом.

Иной подход связан с использованием в качестве восстановителя диимида NH=NH, который образуется из *п*-тозилгидразида. При восстановлении порфиринов в виде свободных оснований диимидом образуется смесь, состоящая из хлорина и бактериохлорина 1, тогда как продуктами восстановления цинкового комплекса являются хлорин и изобактериохлорин **2** (схема 1) [4].

Диимидный метод был использован Р. Боннетом с сотр. для восстановления 5,10,15,20-тетракис(*м*-гидроксифенил) порфирина (*м*-ТГФП) **3** в соответствующие хлорин (*м*-ТГФХ) **4** и бактериохлорин (*м*-ТГФБХ) **5** (схема 2) [5].



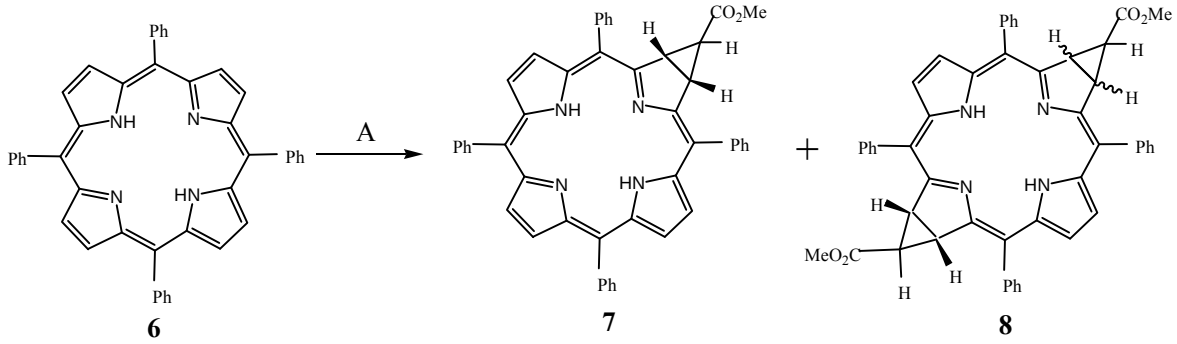
A: p-$MeC_6H_4SO_2NHNH_2$, K_2CO_3/Py, [N_2H_2]; B: [N_2H_2], C: о-хлоранил

Схема 2. Восстановление диимидом 5,10,15,20-тетракис-(*м*-гидроксифенил)порфирина.

Хотя положение длинноволновой полосы поглощения и ее коэффициенты молярной экстинкции существенно увеличиваются в ряду порфирин-хлорин-бактериохлорин, их фотофизические свойства, включая квантовые выходы триплета и синглетного кислорода, различаются незначительно [6]. Фотодинамическая эффективность соединений в указанном ряду увеличивается с каждой ступенью восстановления. Так, при глубине фотонекроза опухоли 5 мм дозы введенного ФС уменьшаются от 6.25 ммоль/кг для порфирина, до 0.75 ммоль/кг для хлорина и 0.39 ммоль/кг для бактериохлорина [5].

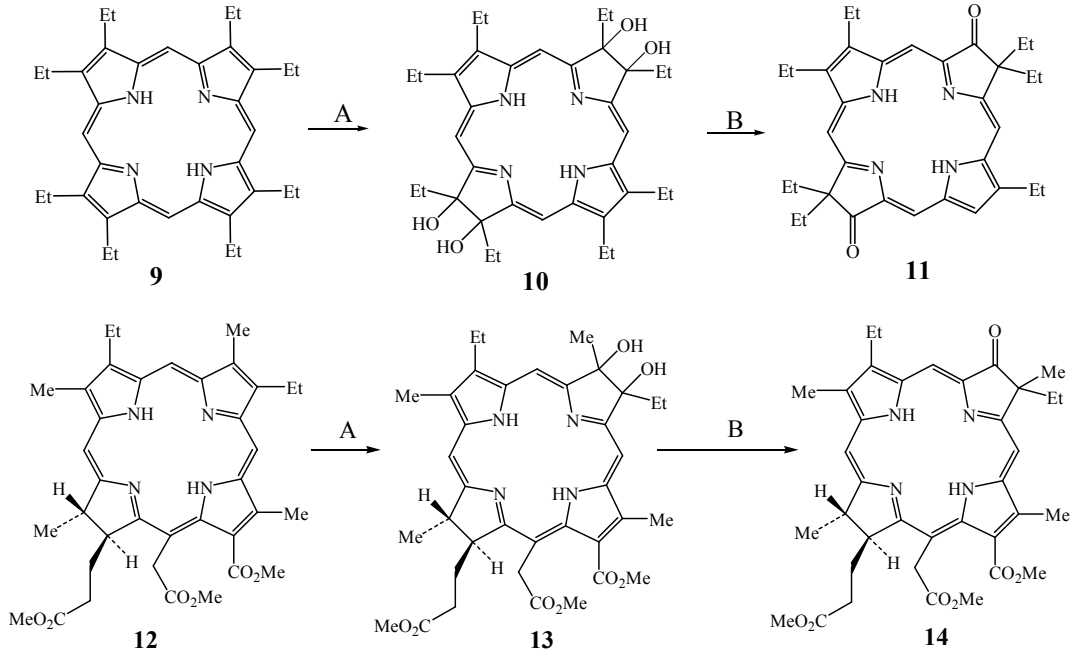
Вместе с тем, в экспериментах *in vivo* бактериохлорин **5** оказался менее стабильным, чем хлорин **4** (препарат Фоскан), и значительное его количество окислялось в клетках в течение первых суток.

Интересный подход к получению ди- и тетрагидропорфириновых производных был предложен Калло с сотр. [7]. Ими было показано, что при действии на тетрафенилпорфирин (ТФП) **6** эфира диазоуксусной кислоты карбен атакует двойные связи в пиррольных кольцах B и D с образованием продуктов циклоприсоединения – хлорина **7** (λ_{max}=650 нм) и бактериохлорина **8** (λ_{max}=720 нм) (схема 3).



A: N_2CHCO_2Me, CuI

Схема 3. Взаимодействие ТФП с метиловым эфиром диазоуксусной кислоты.



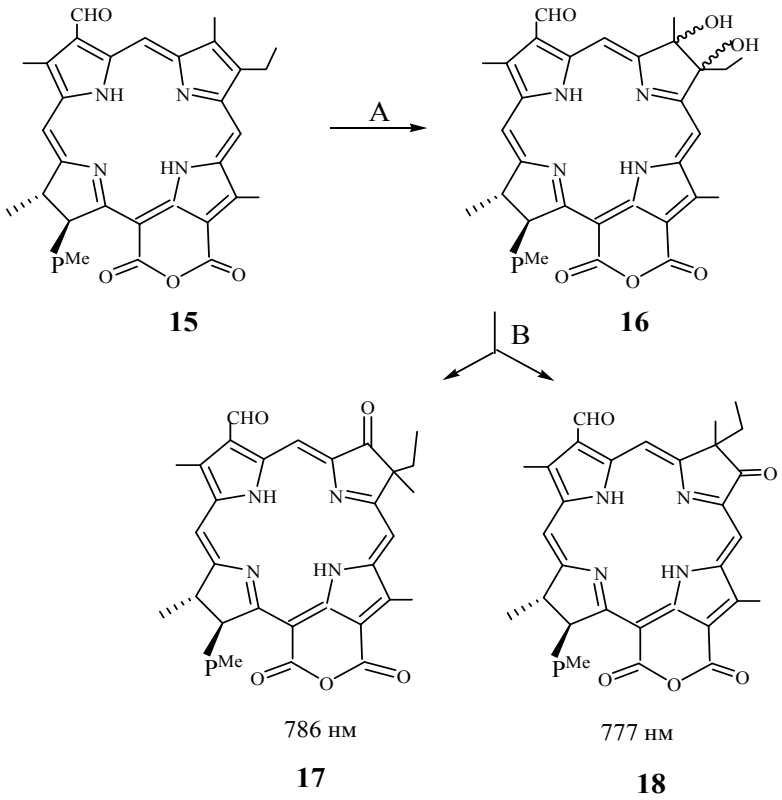
A: OsO_4/Py, H_2S; B: H_2SO_4

Схема 4. Окисление порфиринов и хлоринов тетраоксидом осмия.

Еще один способ получения бактериохлоринов основан на обработке порфиринов тетраоксидом осмия (схема 4).

Реакция октаэтилпорфирина **9** с OsO_4 дает тетрагидроксибактериохлорин **10**, а последующая пинаколиновая перегруппировка приводит к дикетобактериохлорину **11** [8]. Позже Р. Панди с сотр. использовали этот подход для получения дигидрокси- и кетобактериохлоринов из мезохлорина e_6 **12** [9-12]. Первоначально образующийся осматный комплекс с молекулой пиридина затем расщеплялся сероводородом в диол **13**. Последний в кислой среде давал кетобактериохлорин **14**.

Еще одним примером получения бактериохлоринов из производных хлорофилла *a* является осмилирование метилового эфира 3-формил-3-девинилпурпурина 18 **15** с образованием дигидроксибактериохлорина **16**, который после пинаколиновой перегруппировки дает смесь оксобактериохлоринов **17** и **18** (схема 5) [10].



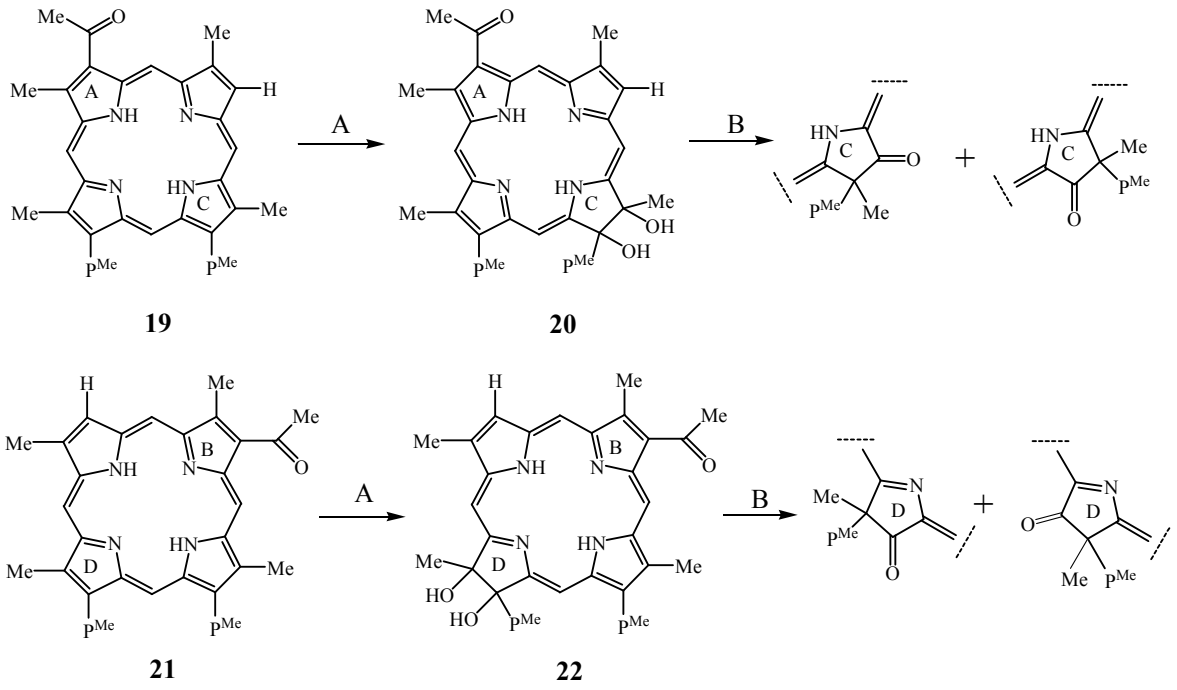
15 **16** **17** **18**

A: OsO_4/Py, H_2S; B: H_2SO_4

Схема 5. Окисление 3-формил-3-девинилпурпурина 18.

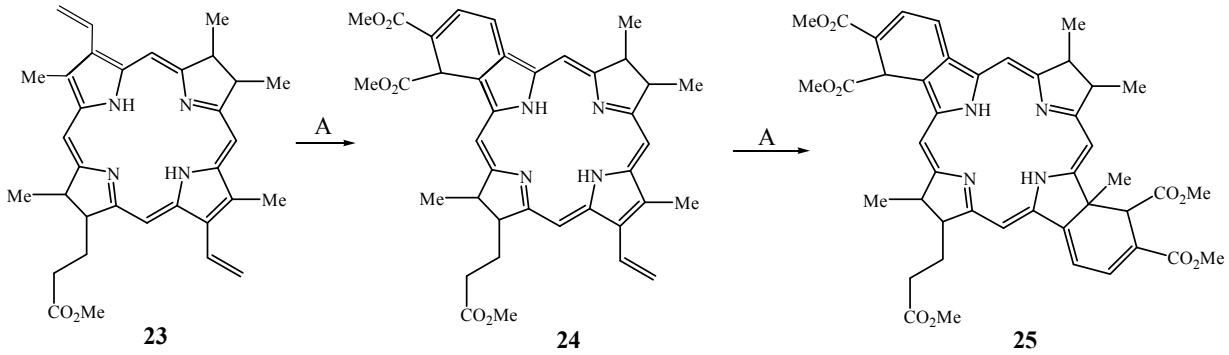
Было изучено влияние электроно-акцепторных заместителей в порфиринах и хлоринах на региоспецифичность реакции (схема 6) [11]. Показано, что наличие подобной группы в одном из пирролов ориентирует гидроксилирование в противоположное пиррольное кольцо. Так, при реакции с 3-ацетилдейтеропорфирином IX **19** преимущественно атакуется пиррол С с образованием диола **20**, а изомерный 8-ацетилдейтеропорфирин **21** превращается в хлорин **22**. В случае двух ацетильных групп в соседних кольцах А и В (3,8-диацетилпорфирин IX) подобная региоспецифичность не проявляется. При наличии в макроцикле одного гидрированного пиррольного кольца (пиррофеофорбид, хлорин e_6 и др.) реакция протекает направленно в противоположный пиррол (например, **12** → **13**).

Бактериохлорины могут быть также получены из дивинилпорфиринов **23** путем ступенчатой реакции Дильса-Альдера с участием двух винильных групп (схема 7) [13,14].



A: OsO_4/Py, H_2S; B: H_2SO_4

Схема 6. Влияние электроноакцепторных заместителей в порфиринах и хлоринах на региоселективность окисления OsO_4.



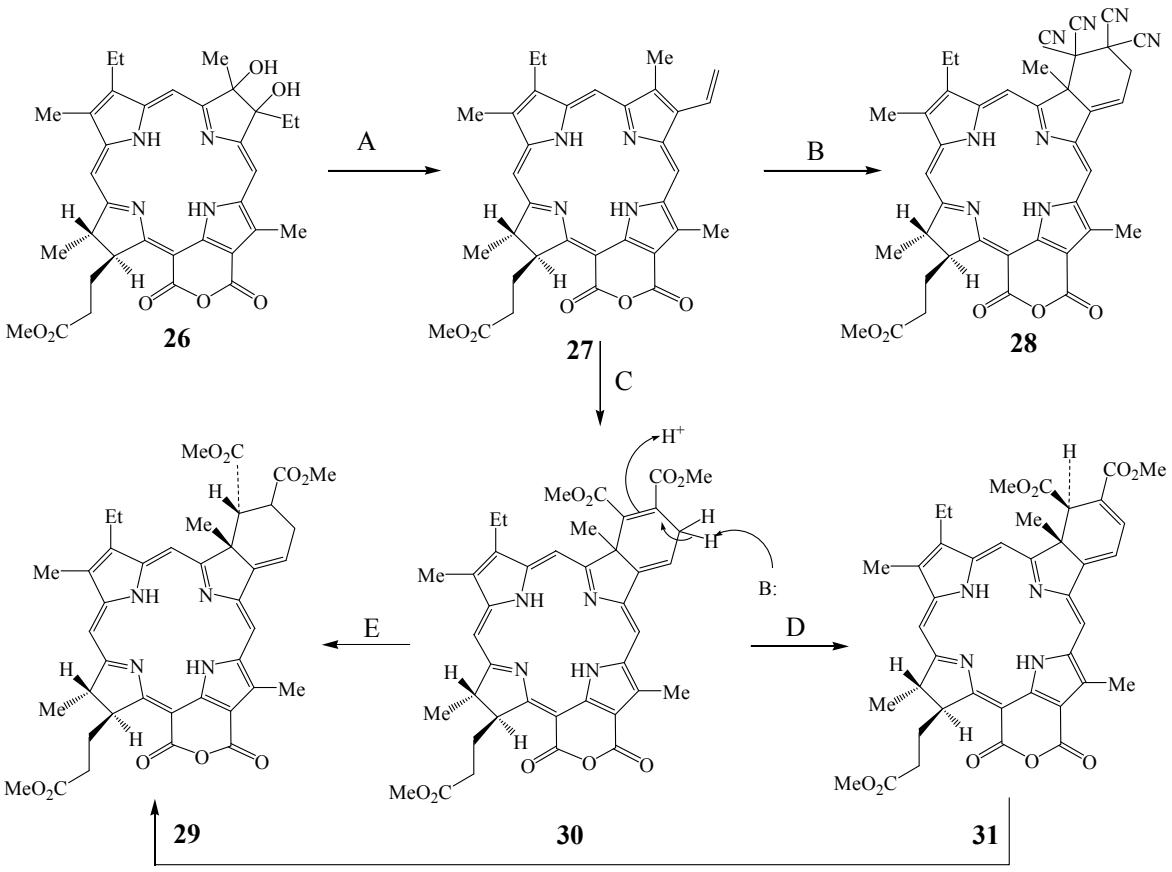
A: диметиловый эфир ацетилендикарбоновой кислоты (ДМАД), диазабициклоундецен (ДБУ).

Схема 7. Реакция Дильса-Альдера с дивинилпорфиринами.

Первоначально образующийся хлорин **24** затем присоединяет вторую молекулу диметилового эфира ацетилендикарбоновой кислоты (ДМАД), давая бактериохлорин **25**, в спектре которого Q-полоса смещается в район 800 нм.

Аналогичный подход был использован при получении бактериохлорина из метилового эфира 7,8-дигидрокси-мезо-пурпурина 18 **26** [15]. Кипячение последнего в *о*-дихлорбензоле приводило к метиловому эфиру 8-винил-8-деэтил-мезо-пурпурину 18 **27** с 60% выходом. Вышеописанная реакция с разными диенофилами (ТЦЭ и ДМАД) давала аддукты **28** и **29** и **31** (схема 8).

К этой реакции близка внутримолекулярная циклизация Ni-комплекса 5, 10- бис(винилформил) порфирина **32** с образованием бактериохлорина с двумя шестичленными экзоциклами, сопряженными с основным макроциклом **33** (схема 9) [16].



A: о-дихлорбензол, кипячение, B: тетрацианэтилен (ТЦЭ), C: ДМАД, D: Et_3N, E: ДБУ

Схема 8. Взаимодействие 8-винил-8-деэтил-мезопурпурина 18 с диенофилами.

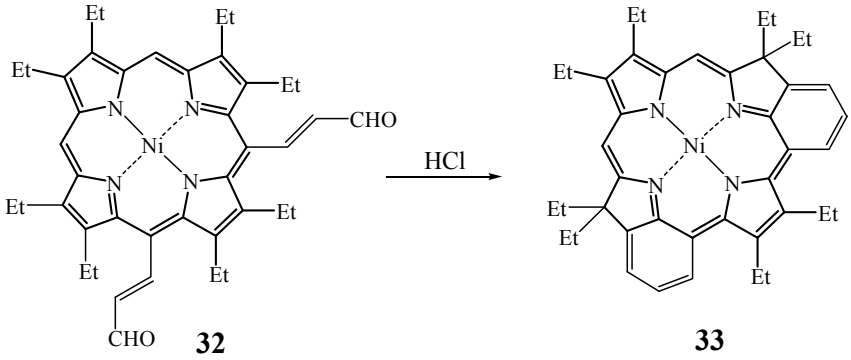


Схема 9. Внутримолекулярная циклизация бис - (винилформил) порфиринов.

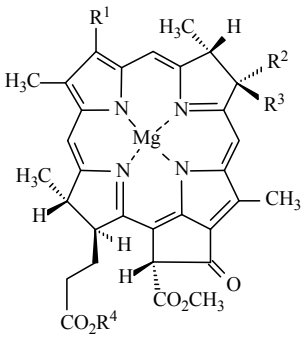
ПРИРОДНЫЕ БАКТЕРИОХЛОРИНЫ И ИХ ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ

Бактериохлорофиллы (Бхл) представляют самостоятельную группу природных хлорофиллов и широко распространены в природе, главным образом в многочисленных фотосинтезирующих бактериях [17-19]. Пигменты различаются по степени гидрирования макроцикла и по характеру заместителей. Известно несколько модификаций бактериохлорофиллов. Так, из пурпурных бактерий выделены бактериохлорофиллы *a* и *b*, из зеленых бактерий – бактериохлорофиллы *a, c, d* и *e,* из серных бактерий – бактериохлорофиллы *c, d* и *e,* из отдельных типов фотосинтезирующих бактерий – бактериохлорофилл *g*.

Перечисленные бактериохлорофиллы обычно подразделяют на две достаточно большие группы (схема 10). Для первой, куда входят бактериохлорофиллы *a, b* и *g,* характерно наличие тетрагидропорфиринового макроцикла **34** и в качестве алкоксильного радикала R^4 для первых двух остатки фитола (**a**), гераниола (**b**) и 2,10-

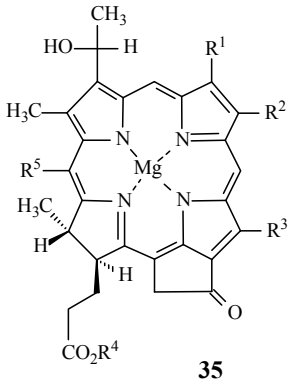
фитадиенола, а для третьего – фарнезола (**c**) и геранилгераниола. Вторая группа с дигидропорфириновым макроциклом **35**, для которой также используется название хлоробиум-хлорофиллы, включает бактериохлорофиллы *c, d* и *e.*

$(CH_3)_2C=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CHCH_2OH$ (**a**);
$(CH_3)_2CH(CH_2)_3C(CH_3)=CH(CH_2)_2CH(CH_3)(CH_2)_3\text{-}C(CH_3)=CHCH_2OH$ (**b**);
$(CH_3)_2C=CH(CH_2)_2\text{-}C(CH_3)=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CHCH_2OH$ (**c**)



34

Бактериохлорофилл *a*: $R^1 = COCH_3$, $R^2 = H$, $R^3 = C_2H_5$;
Бактериохлорофилл *b*: $R^1 = COCH_3$, $R^2 + R^3 = (=CHCH_3)$;
Бактериохлорофилл *g*: $R^1 = –CH=CH_2$, $R^2 + R^3 = (=CHCH_3)$.



35

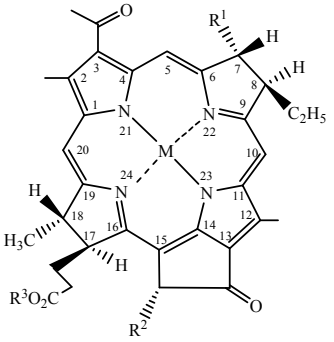
Бактериохлорофилл *c*: $R^1 = R^3 = R^5 = CH_3$, $R^2 = C_2H_5$;
Бактериохлорофилл *d*: $R^1 = CH_3$, $R^2 = C_2H_5–C_5H_{11}$, $R^3 = C_2H_5$, $R^5 = H$;
Бактериохлорофилл *e*: $R^1 = CHO$, $R^2 = C_2H_5–C_5H_{11}$, $R^3 = C_2H_5$, $R^5 = CH_3$.

Схема 10. Основные типы природных бактериохлорофиллов.

Для этих бактериохлорофиллов характерно наличие пентанонового кольца, α-гидроксиэтильной группы в положении 3, метильного заместителя при δ-мезо-углеродном атоме и этерифицирующего спирта R^4 – 2,6-фитадиенола $(CH_3)_2CH(CH_2)_3CH(CH_3)(CH_2)_3C(CH_3)=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CHCH_2OH$ и 2,16,20-фитатриенола $(CH_3)_2C=CH(CH_2)_2C(CH_3)=CH(CH_2)_2CH(CH_3)(CH_2)_3\text{-}C(CH_3)=CHCH_2OH$.

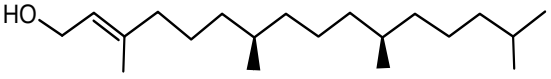
Пигменты первой группы имеют интенсивные полосы поглощения в ближней ИК-области спектра. Особое внимание обращают на себя бактериохлорофиллы *a* и *b,* максимумы которых не только наиболее смещены в красную область, но и имеют самые высокие коэффициенты экстинкции. В свою очередь, из двух последних обычно выбирают Бхл *a* в качестве исходного материала при разработке новых фотосенсибилизаторов для медицинских применений.

Все соединения бактериохлоринового ряда, упомянутые в тексте, можно подразделить на две группы. Первая включает производные Бхл *a*, содержащие экзоциклический фрагмент (форбиновые производные) **36**:

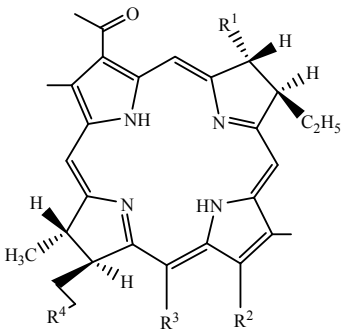


36

бактериохлорофилл *a*: M=Mg, R^1=Me, R^2=COOMe, R^3= фитил;
бактериофеофетин *a*: M=2H, R^1=Me, R^2=COOMe, R^3= фитил;
бактериофеофорбид *a*: M=2H, R^1=Me, R^2=COOMe, R^3=H;
бактериопирофеофорбид *a*: M=2H, R^1=Me, R^2=R^3=H;
фитил – остаток спирта фитола



Ко второй группе относятся производные, не содержащие экзоциклического фрагмента (нефорбиновые производные) **37**:



37

бактериохлорин e_6: R^1=Me, R^2=R^4=COOH, R^3= CH_2COOH;

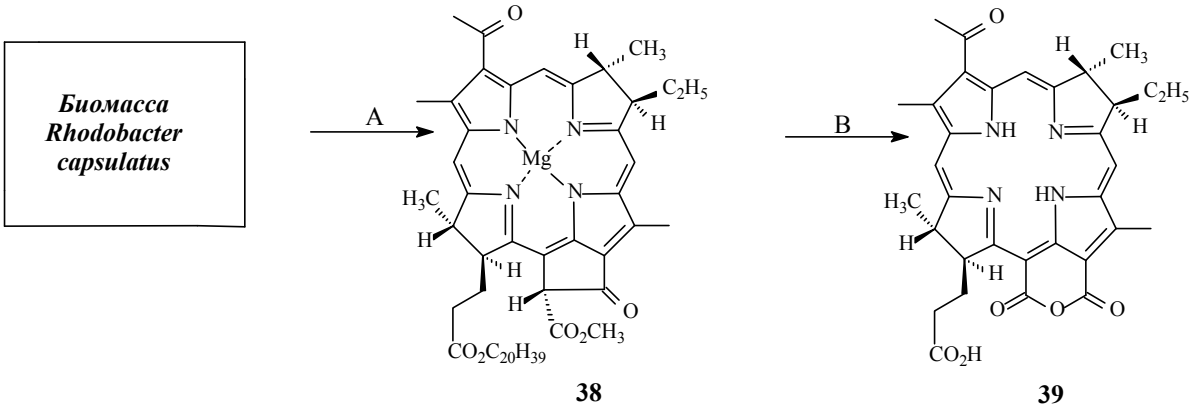
бактериохлорин *p*: R^1=Me, R^2=R^3=R^4=COOH;

триметиловый эфир бактериохлорина *p*: R^1=Me, R^2=R^3=R^4=COOMe;

Бхл *a* имеет ограниченную фотоцитотоксичность и в экспериментах *in vitro* быстро разрушается. При липосомальном введении животным обнаруживается быстрое выведение Бхл *a* из опухоли и разрушение ее сосудистого русла, приводящее к некрозу [20].

Источником для получения Бхл *a* является биомасса пурпурных бактерий, таких как, *Rh. sphaeroides, Rh. Roseapersiana* и *Rh. Capsulata*. В нашей лаборатории для выделения Бхл *a* используют биомассу *Rh. Capsulata* [21], которая не содержит других бактериохлорофиллов, что значительно облегчает выделение и очистку основного пигмента [22, 23]. На основе Бхл *a* в разных научных группах были предприняты исследования, целью которых явилась разработка методов получения стабильных производных со спектральными характеристиками, не уступающими исходному бактериохлорофиллу, а в ряде случаев и превосходящими их. Новые фотосенсибилизаторы должны были быть менее гидрофобными и обладать достаточной растворимостью в полярных растворителях. Кроме того желательно иметь в них функциональные группы для присоединения других биоактивных молекул для повышения тропности к раковым клеткам и направленного внутриклеточного транспорта.

Одним из путей для решения этих задач, явился синтез в нашей лаборатории бактериопурпурина **39**, наличие в котором ангидридного кольца значительно улучшало спектральные характеристики [24]. Для этого бактериохлорофилл *a* **38** экстрагировали из биомассы пурпурных бактерий *Rh. capsulata* и затем без выделения и дополнительной очистки окисляли в щелочной среде кислородом воздуха. Последующая обработка соляной кислотой приводила к образованию ангидридного кольца и получению бактериопурпурина **39** (БП) (схема 11).



38 **39**

A: изопропанол; B: 1. O_2/KOH, 2. HCl

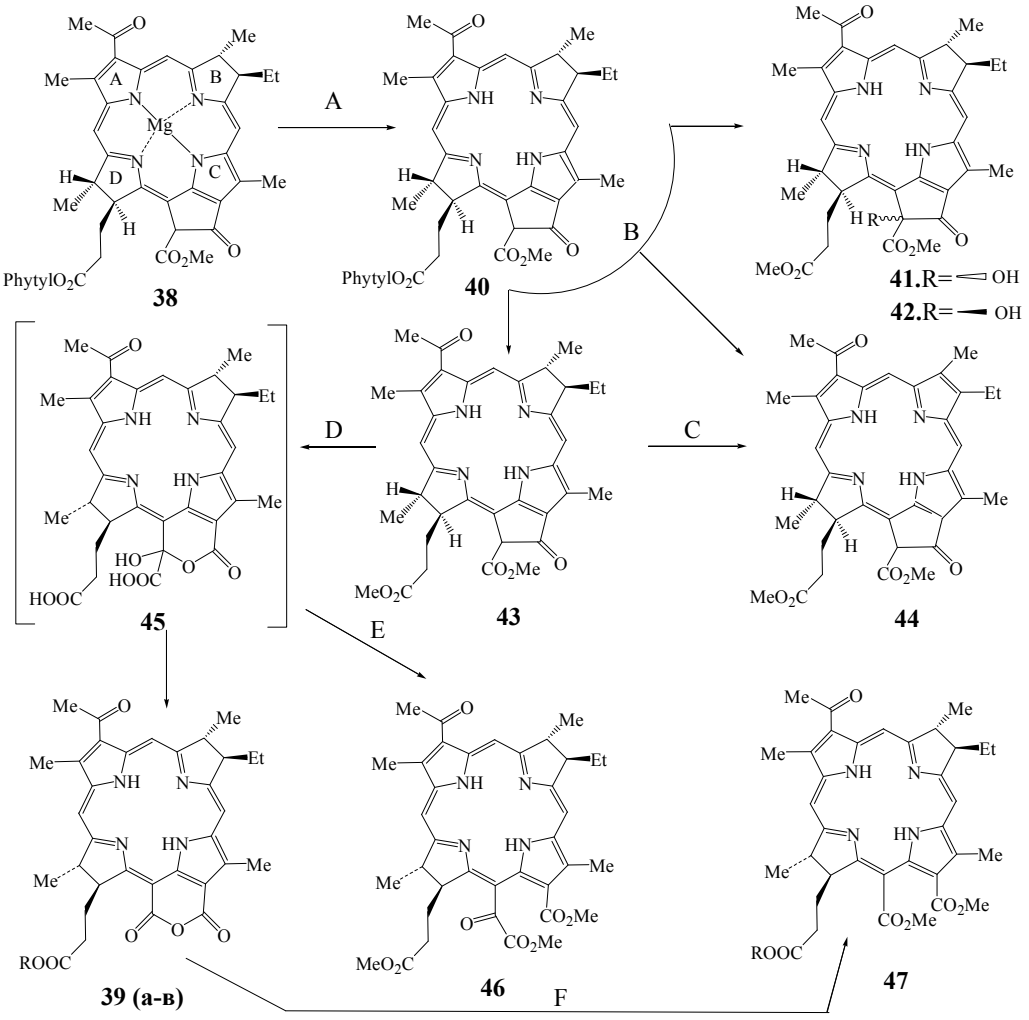
Схема 11. Получение бактериопурпурина.

Превращение пентанонового кольца в ангидридный цикл в хлорофилле *a*, наблюдалось еще в начале XX века основоположником химии хлорофилла, лауреатом Нобелевской премии Р. Вильштеттером [25]. Именно он ввел термин «алломеризация» для описания процесса автоокисления, который катализируется основаниями.

В настоящее время установлено, что механизм алломеризации включает образование енола в пентаноновом кольце, который далее окисляется, образуя лактон (нестабильный хлорин), который, в свою очередь, превращается в ангидридный цикл, сопряженный с хлориновым макроциклом (пурпурин 18). Наличие экзоцикла, приводящее к увеличению цепи сопряжения в молекуле, вызывает батохромный сдвиг полос поглощения Q_x (545 нм) и Q_y (818 нм) и появление пурпурно-красного окрашивания, с чем связано название соединения – «пурпурин» [26].

Алломеризацию бактериохлорофилла *a* первым наблюдал Фишер в 1938 году [27]. А недавно появилось сообщение об образовании 13^2-гидрокси- алломеров в метанольном растворе Бхл *a* [28].

Процесс окисления Бхл *a* в БП **39** был достаточно подробно изучен (схема 12) [29]. При действии на бактериофеофитин *a* **40** раствором 5% H_2SO_4 в метаноле наряду с целевым метиловым эфиром бактериофеофорбида **43** получали смесь продуктов окисления. Анализ последней показал, что она состоит из хлорина **44** и смеси диастереомеров 13^2-(R/S)-гидроксипроизводных **41** и **42** (эпимеры). Наличие гидроксильной группы в пентаноновом кольце и стереохимия были надежно доказаны с помощью ^{1}H ЯМР, при этом было найдено, что соотношение между R и S изомерами составляет 1:4. Эти исследования показали, что S-эпимер, в котором карбометоксильная группа в 13^2-положении и остаток пропионовой кислоты в положении 17 расположены с разных сторон плоскости макроцикла, термодинамически более стабилен в кислых условиях [30, 31].



R=H **(а)**, R=Me **(б),** R=Pr **(в)**

A: 0.1% HCl; B: 5% H_2SO_4/MeOH; C: O_2 воздуха; D: KOH/CH_3OH; E: CH_2N_2; F: KOH/CH_3OH, CH_2N_2

Схема 12. Химические превращения Бхл *a* в кислой и щелочной средах.

Однако, работа с производными Бхл *а* в кислой среде сильно осложнена из-за быстрого окисления пигмента. Поэтому в дальнейшем алломеризация была исследована в щелочных условиях. Так, бактериофеофорбид **43** в растворе КОН – пропанол при барботировании воздуха алломеризуется с образованием «нестабильного бактериохлорина» **45**. Механизм алломеризации в щелочных условиях неизвестен, но косвенным подтверждением образования интермедиата **45** может служить получение бактериохлорина с остатком глиоксалевой кислоты в положении 15 макроцикла **46** при действии на бактериофеофорбид **43** диазометана. Превращение «нестабильного бактериохлорина» **45** в БП происходит в процессе упаривания растворителя, причем возможно образование как свободной кислоты **39 а**, так и пропилового эфира **39в**. Поскольку БП **39 а** обладает низкой растворимостью в органических растворителях, целесообразно превращать последний в метиловый эфир **39 б**. В нашей лаборатории с целью повышения выхода БП разработан метод его получения без выделения бактериофеофорбида в качестве промежуточного соединения. В этом случае алломеризация Бхл *а* в растворе КОН-изопропанол при пропускании воздуха протекает более длительно (1.5-2.0 ч), что, по-видимому, связано с присутствием каротиноидов, которые являются ловушками радикалов [32].

Ангидридный цикл в БП обладает повышенной реакционной способностью, что может быть использовано для получения различных производных бактериохлорофилла *а* (рис.1).

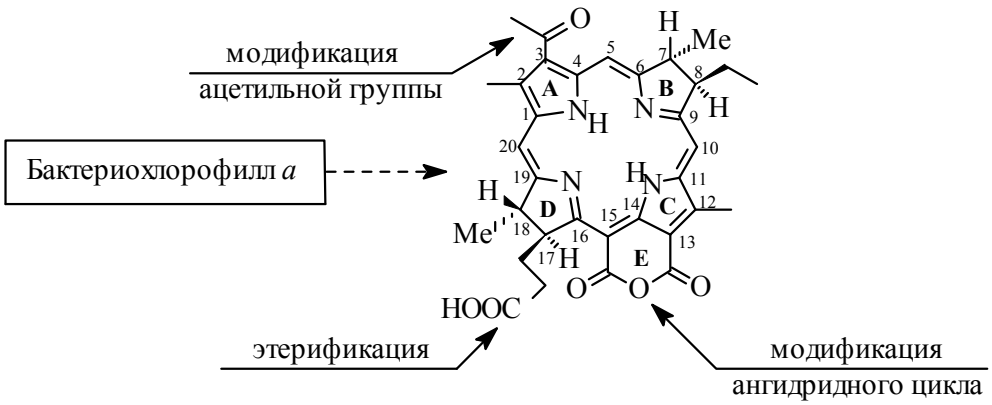


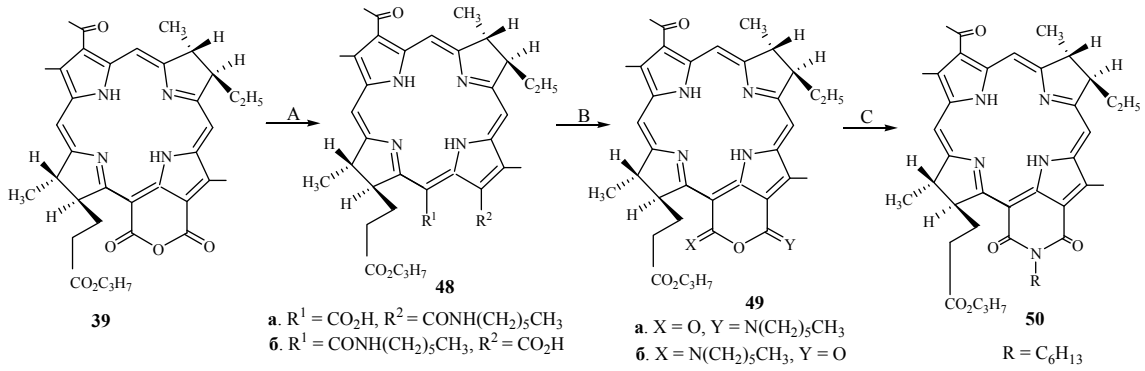
Рис. 1. Возможные химические модификации бактериопурпурина.

Однако, бактериопурпурин устойчив лишь в нейтральной и кислой средах, а в присутствии оснований происходит быстрое раскрытие ангидридного цикла с образованием бактериохлорина *р*, поглощающего при 770 нм.

С целью повышения стабильности и улучшения спектральных характеристик был предложен метод замены атома кислорода в экзоцикле на азот с превращением ангидридного цикла в имидный. Первоначально реакция была выполнена на пурпурине 18 [33], а затем на бактериопурпурине [34].

При обработке бактериопурпурина **39 в** алкиламином (в работе [34] использовался гексиламин) происходит раскрытие ангидридного цикла и образуется смесь двух изомеров **48 а, б** (схема 13). Их превращение в циклоимид **50** осуществляли двумя способами. В первом смесь амидов **48 а, б** обрабатывали ДЦК, и полученные циклические изоимиды **49 а, б** под действием основания диазабициклоундецена (ДБУ) перегруппировывались в циклоимид **50**.

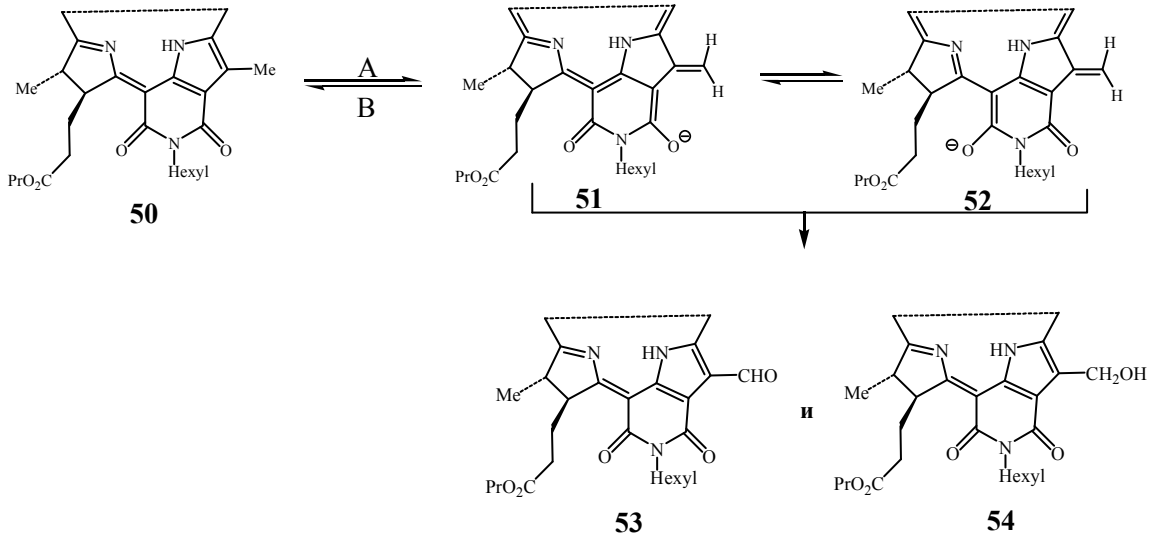
Во втором случае смесь **48 а, б** обрабатывали диазометаном, а затем метанольной щелочью. Второй способ проще в исполнении и дает более высокие выходы.



A: $C_6H_{13}NH_2$; 1 способ - B: ДЦК; C: ДБУ; 2 способ – из **48** в **50**, **C**: 1.CH_2N_2, 2. KOH/CH_3OH

Схема 13. Синтез циклических имидов в ряду бактериохлорофилла *a*.

В щелочной среде наряду с образованием целевого циклоимида **50** происходило окисление 12-CH_3 группы с образованием двух минорных продуктов: 12-формил (4-6%) **53** и 12-гидроксиметил (2-4%) **54** производных (схема 14).



A: KOH; B: HCl

Схема 14. Возможный механизм образования 12-формил- и 12-гидроксиметилциклоимида бактериохлорина *p* в присутствии щелочи.

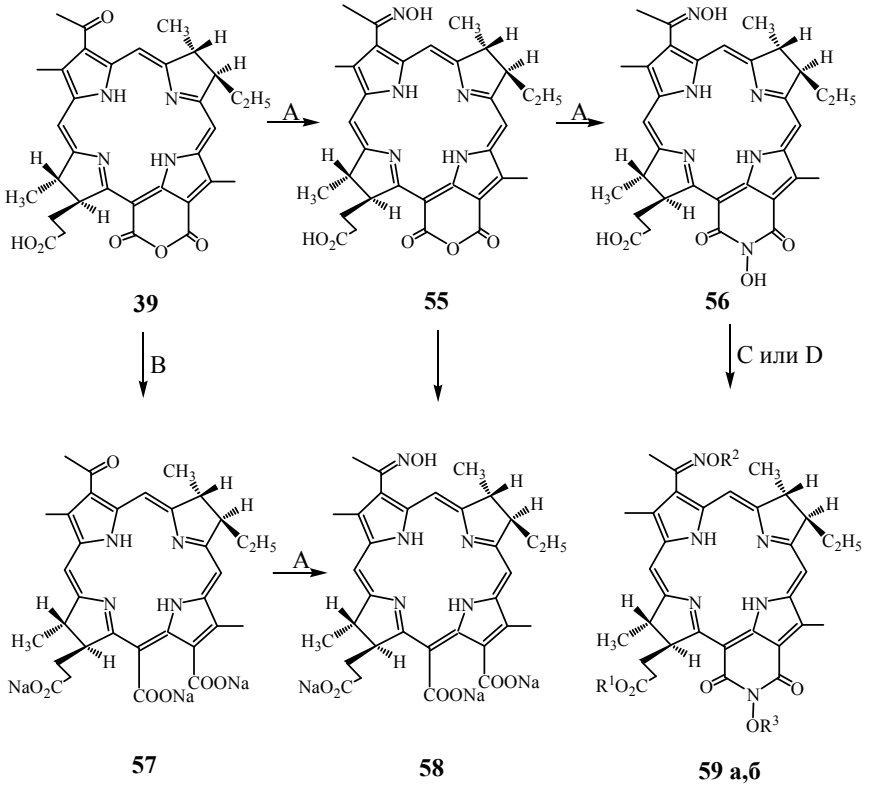
Авторы работы [35] полагают, что такое необычное окисление является следствием енолизации, приводящей к таутомерам **51** и **52**, которые склонны к окислению на воздухе. В свою очередь кето-енольная таутомерия в циклоимиде возможна благодаря сильному электроноакцепторному эффекту имидного экзоцикла, сопряженного с основной тетрапиррольной системой.

В отличие от природного бактериохлорофилла *a*, полученные циклоимидные аналоги являются более стабильными и их спектральные характеристики выгодно отличаются от соответствующих предшественников (полоса Q 710 нм).

Дальнейшее повышение фотодинамической активности производных бактериохлорина *p* может быть достигнуто за счет введения в пиррол А и имидный экзоцикл заместителей, содержащих трифторметильные группы [36, 37]. Фторсодержащие заместители повышают растворимость соединений в липидах, что увеличивает скорость транспорта подобных молекул через биологические мембраны. Авторы отмечают, что на активность ФС *in vivo* влияют не только природа заместителей, но и их расположение в макроцикле. Так, циклоимид с бис-(трифторметил)бензильной группировкой при атоме азота экзоцикла вызывает более эффективное торможение

роста опухоли (100%-ная регрессия опухоли через 90 дней), по сравнению с изомером, содержащим указанный заместитель в верхней части макроцикла (66%-ная регрессия опухоли через 90 дней).

Принципиально новые возможности для получения циклоимидов и их последующих химических превращений открылись при замене алкиламинов на более сильные нуклеофильные агенты гидроксиламин и гидразингидрат [38, 39]. В отличие от пурпурина 18 наличие в бактериопурпурине ацетильной группы создает дополнительный реакционный центр при реакции с этими нуклеофилами. Так, при обработке БП **39** гидроксиламином (пиридин, 20^0) первоначально образуется оксим **55** [40]. Для доказательства этого были выполнены химические превращения, включающие раскрытие ангидридного цикла в оксиме **55** и обработку бактериохлорина *p* **57** гидроксиламином в пиридине. Идентичность полученных продуктов указывает на то, что при обработке БП гидроксиламином в реакцию в первую очередь вступает ацетильная группа (схема 15).



A: $NH_2OH\cdot HCl$, Py; B: $NaOH/CH_3OH$; C: Ac_2O; D: CH_2N_2, $(C_2H_5)_2O$

Схема 15. Взаимодействие бактериопурпурина с гидроксиламином.

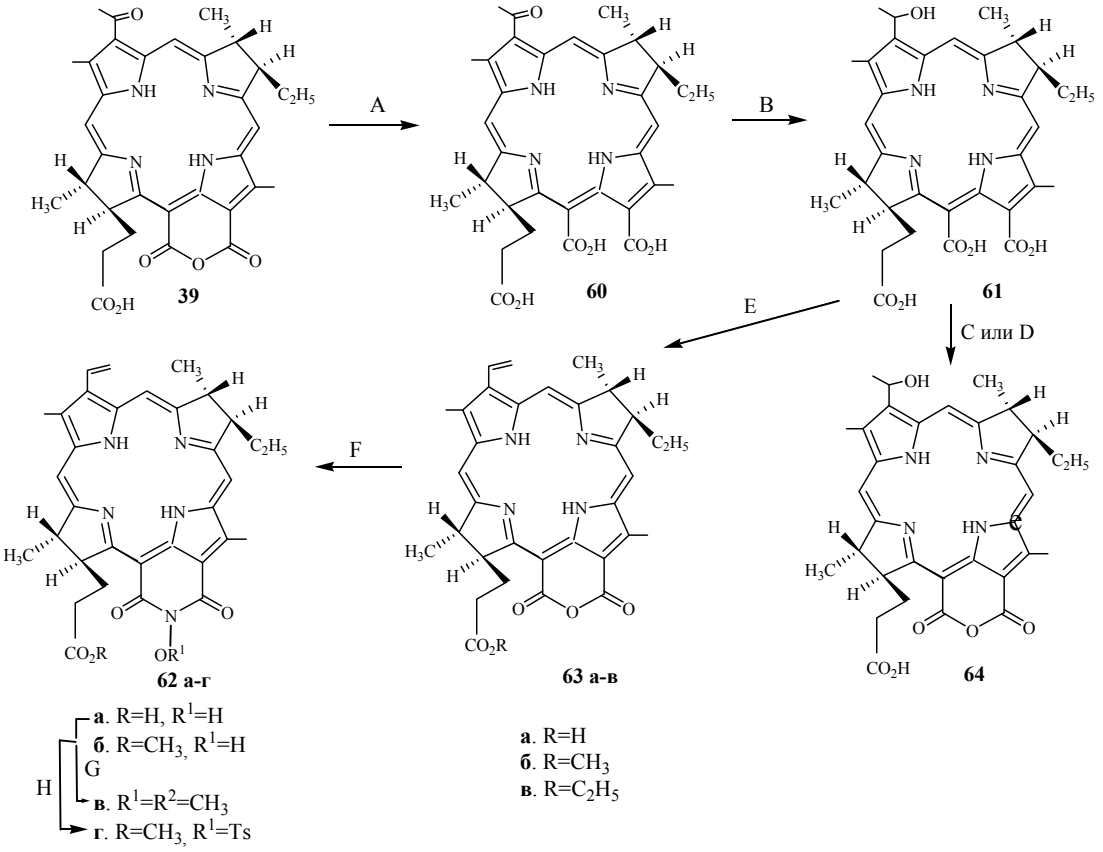
Последующее изучение взаимодействия бактериопурпурина с гидроксиламином показало, что при использовании избытка реагента и увеличении времени до 10 ч вторая молекула гидроксиламина вступает в реакцию с ангидридным циклом, давая оксим N-гидроксициклоимида бактериохлорина *p* **56**. Последнее соединение может быть получено как из бактериопурпурина **39**, так и из промежуточного оксима **55**. Ход реакции отслеживался хроматографически и спектрально по изменению положения длинноволновой полосы Q_y.

В течение первых трех часов максимум при 818 нм смещался до 792 нм, что соответствует образованию оксима **55**, после чего он постепенно возвращался в длинноволновую область (812 нм). Мы полагаем, что на этом этапе происходит взаимодействие оксима со второй молекулой гидроксиламина с образованием соединения **56**. Наличие в N- гидроксициклоимиде **56** подвижного атома водорода позволяет существенно расширить круг циклоимидов за счет реакций ацилирования и алкилирования [41]. Так, обработка

уксусным ангидридом приводит к образованию диацетата **59 а**, который оказался весьма лабильным и при хранении распадался на моноацетат и исходное соединение **56**. При обработке оксима **56** диазометаном с хорошим выходом образуется N-метоксициклоимид **59 б**. Это соединение оказалось значительно устойчивее ацетата и показало хорошую фотодинамическую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В отличие от гидроксильной группы в циклоимидном кольце кислотность атома водорода в оксимной функции (пиррол А) настолько понижена, что она не участвует в реакции с диазометаном. Кроме того, тщательный анализ N-метоксипроизводного **59 б** показал, что вещество является смесью двух изомеров с очень близкими значениями R_f. Выделенные изомеры были охарактеризованы спектрами ^{1}H ЯМР, включая спектроскопию 1D NOE, и на основании полученных данных сделан вывод, что оксим существует в виде двух стереоизомерных син- и анти- форм. Подобные изомеры могут образовываться при взаимодействии кетонов с гидроксиламином [42].

Поскольку ацетильная группа в БП сильно осложняет протекание реакции с гидроксиламином, было решено превратить ее в винильную. Последняя была получена из α - гидроксиэтильной группы в спирте **61** под действием *n*-толуолсульфокислоты (схема 16) [43].



A: NaOH, CH_3OH; B: $NaBH_4$; C: HCl, диоксан; D: TsCl, C_5H_5N; E: TsOH, $CHCl_3$; F: $NH_2OH\cdot$ HCl, Py; G: CH_2N_2, Et_2O; H: TsCl, Py

Схема 16. Синтез и модификации 3-винил-3-деацетилбактериопурпурина **63 а**.

Восстановление ацетильной группы проводилось не на бактериопурпурине **39**, а на бактериохлорине **60**, так как ранее было показано, что обработка бактериопурпурина боргидридом натрия способствует превращению ангидридного экзоцикла в δ-лактонный [44, 45]. Полученную из БП трикислоту **60** восстанавливали боргидридом натрия в спирт **61**. Обработка последнего соляной кислотой в диоксане, однако, приводила лишь к замыканию ангидридного цикла, но не к дегидратации α-гидроксиэтильной группы. Образование соединения **64** также наблюдалось при действии тозилхлорида на спирт **61**. Более эффективный способ получения винильной

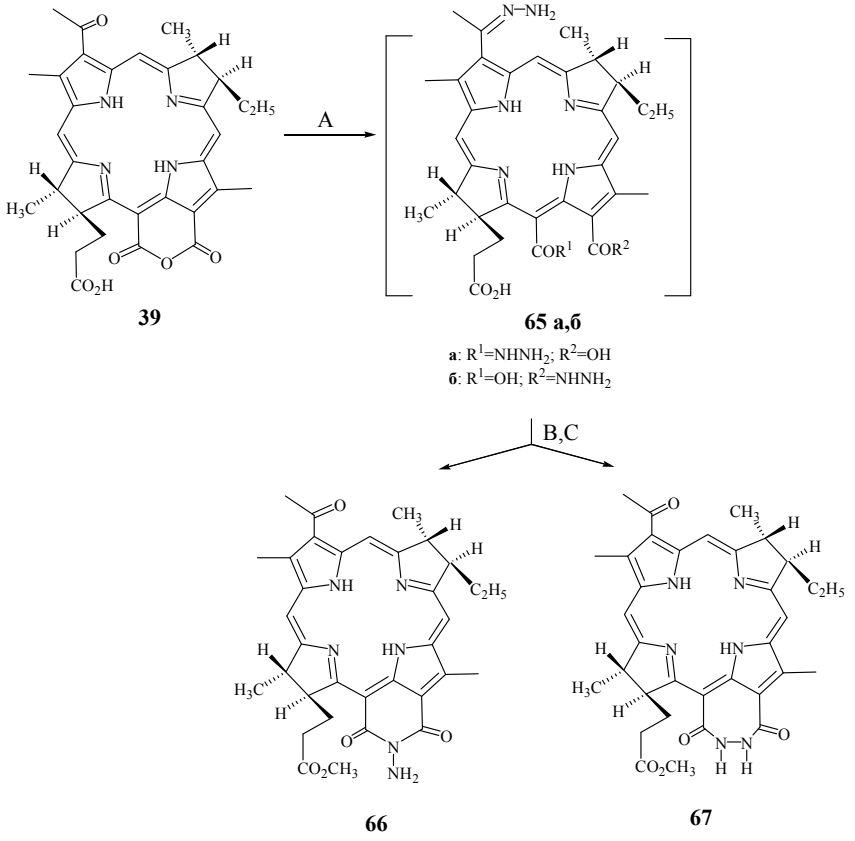
группы основан на обработке спирта **61** *n*-толуолсульфокислотой. При этом наряду с образованием винильной группы происходит замыкание ангидридного экзоцикла с возвращением основной спектральной полосы в область 783 нм. При проведении реакции в хлороформе образуется свободная кислота **63 а**, а при добавлении в реакционную среду метилового или этилового спиртов происходит образование метилового **63 б** или этилового **63 в** эфиров.

Изучение N-гидроксициклоимидов бактериохлорина показало, что гидроксильная группа может быть успешно использована для получения алкил-замещенных производных. Однако, введение ацильных радикалов этим путем менее перспективно из-за лабильности N-O-ацильных производных.

В связи с этим нами был разработан метод получения N-аминоциклоимидов бактериохлорина *p* [46]. Как известно, гидразин и его производные обладают высокой нуклеофильностью по отношению к sp^2-углеродным атомам. В связи с этим ангидриды кислот являются удобными реагентами для ацилирования гидразина [47].

В случае БП **39** нами было показано, что обработка его гидразингидратом в пиридине первоначально приводит к моногидразиду, очевидно, в виде двух изомеров **65 а, б** (схема 17). Ацетильная группа при этом превращается в гидразон. При последующей обработке реакционной массы HCl происходит внутримолекулярная циклизация с образованием дополнительного шести- или семи- членного цикла **66** или **67**. Гидразон на этой стадии превращался в исходный кетон.

Известно, что при ацилировании гидразина после присоединения первой ацильной группы последующее ацилирование, в силу частичной дезактивации первого атома азота, обычно протекает по второй аминогруппе [48]. Так, при взаимодействии гидразина с ангидридами ароматических дикарбоновых кислот образуются симметричные гидразиды с увеличением исходного пятичленного цикла до шестичленного (схема 18) [49].



39 **65 а,б**

а: R^1=$NHNH_2$; R^2=OH
б: R^1=OH; R^2=$NHNH_2$

66 **67**

A: $N_2H_4 \cdot H_2O$, пиридин; B: 1N HCl; C: CH_2N_2, Et_2O

Схема 17. Реакция бактериопурпурина с гидразингидратом.

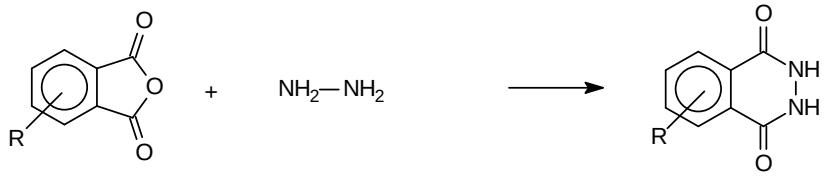


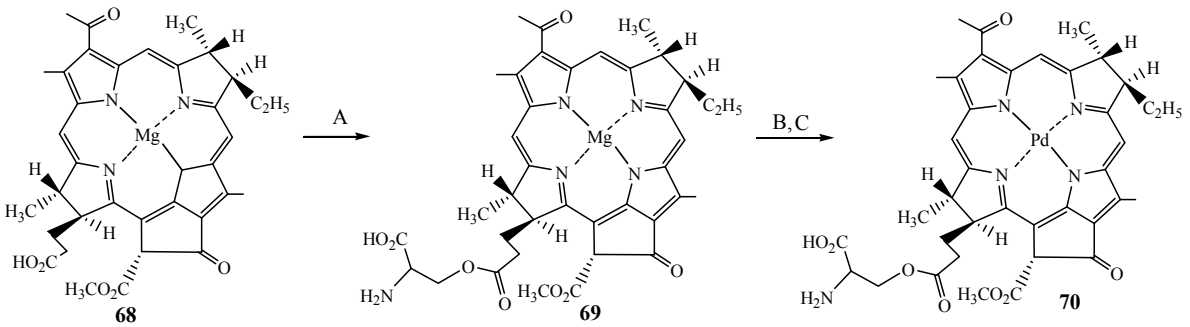
Схема 18. Образование циклических гидразидов при взаимодействии гидразина с ангидридами ароматических дикарбоновых кислот.

В случае бактериопурпурина это могло бы привести к образованию гидразида с шести- или семичленным циклами, соединения **66** и **67**, соответственно. Использование двумерного гетероядерного резонанса и изучение спектров ^{1}H ЯМР полученного соединения при различных температурах, а также химические модификации, включающие образование оснований Шиффа, алкилирование и ацилирование аминогруппы подтвердили шестичленную структуру экзоцикла. Разработанный способ получения N-аминоциклоимидных производных бактериохлорина *p* **66** отличается простотой проведения и высокими выходами [50].

Амфифильные и водорастворимые производные бактериохлоринов

Известно, что природные бактериохлорины отличаются повышенной гидрофобностью [2]. Для успешного их использования в ФДТ необходимо иметь более сбалансированное соотношение гидрофобных и гидрофильных заместителей в макроцикле. Обычно это достигается введением в молекулу одной, двух или трех карбоксильных групп, аминокислотных остатков или гидроксилсодержащих функций [51-54]. Так, введение серина по остатку пропионовой кислоты путем ферментативной переэтерификации Бхл *a* позволяет существенно повысить его растворимость в воде. Подобные коньюгаты бактериохлорофиллида *a* (Бхлфд *a*) с серином, сохраняя фотофизические свойства Бхл *a*, генерируют с высоким выходом АФК, но подвержены фотоокислению, деметаллированию в слабо кислой среде и биодеградации, что ограничивает возможность их использования в клинике.

Замена центрального атома Mg на Pd, этерификация остатка пропионовой кислоты и переэтерификация карбометоксильной группы в пентаноновом кольце приводят к стабильным производным [Pd]-Бхлфд *a* с высокой фотодинамической активностью [55]. Квантовый выход АФК для этих соединений достаточно высок и составляет от 1 в неполярных растворителях до 0.5 в водных растворах. Бактериохлорофиллид *a* **68** и его комплекс с серином **69** показали высокую противоопухолевую активность на линии клеток мышиной меланомы M2R (LD_{50} 0.2-0.5 мМ) (схема 19) [56].

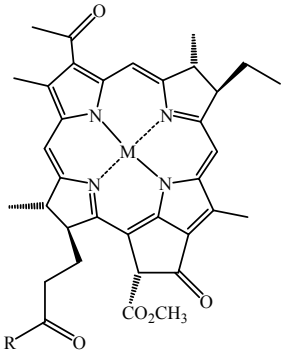


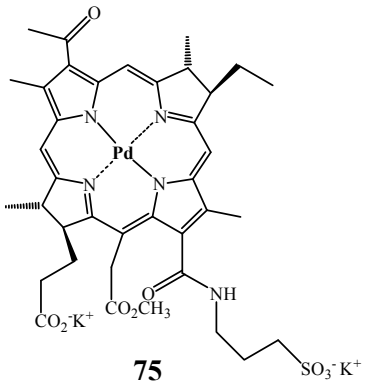
A: серин; B: HCl; C: $Pd(CH_3COO)_2$

Схема 19. Получение комплексов производных бактериохлорофилла *a* с серином.

Замена Mg на Pd **70** увеличила фотодинамическую активность, что привело к уменьшению значения LD_{50} до 0.01-0.03 мМ. Кроме того, благодаря высокой флуоресценции **69** в раковой ткани по сравнению со здоровой (селективность 8-10), последний, наряду с ФДТ, может использоваться также для флуоресцентной диагностики (ФД).

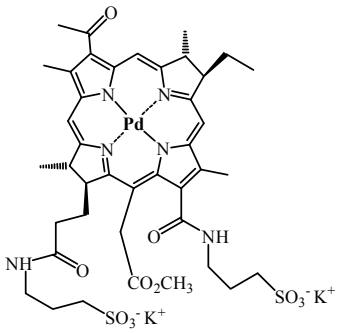
Серия новых отрицательно заряженных водорастворимых производных Бхл *a* была получена в институте им. Вейсмана, Израиль (схема 20).

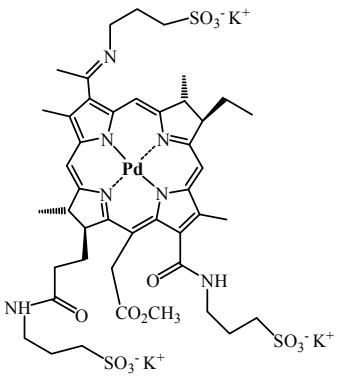


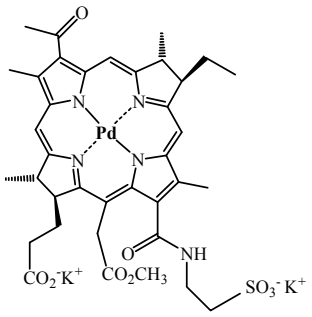


38:M=Mg, R=фитил
71:M=2H, R=OH
72:M=Pd, R=OH (WST09, Тукад)
73:M=Pd, R= O - сукцинимид - $SO_3^-Na^+$
74:M=Pd , R=NH-$(CH_2)_3$-$SO_3^-Na^+$

75







76

77

78: M = Pd
79: M = 2H
80: M = Cu^{II}
81: M = Zn
82: M = Mn^{III}

Схема 20. Отрицательно заряженные ФС на основе бактериофеофорбида и его металлокомплексов.

Эти соединения оказались перспективными для сосудистой ФДТ (ВФДТ, vascular-targeted photodynamic therapy, VPT). Установлено, что повреждение сосудов, обеспечивающих кровоснабжение опухоли, является важнейшим фактором ее некроза. ВФДТ эффективна в лечении твердых опухолей, а также неопухолевых процессов, связанных с повышенной васкуляризацией, например, возрастная дегенерация желтого тела. Регрессия и некроз опухоли наступают в результате как гибели самих раковых клеток, так и из-за окклюзии или перфорации сосудов опухоли. Однако, гемморагический некроз опухоли, вызываемый вышеназванными производными бактериохлорофилла *a*, может давать нежелательные последствия, особенно при локализации опухолей в таких жизненно важных органах, как

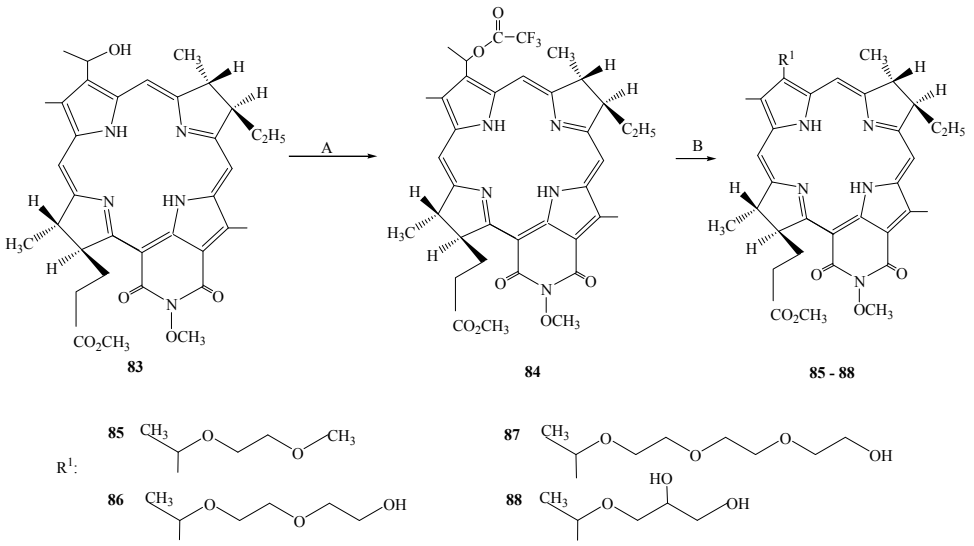
бронхи и легкие. Метод ВФДТ приводит к некрозу центральной части опухоли, который может распространяться на 95% ее объема. Однако раковые клетки на периферии опухоли могут не погибнуть и дать повторный рост. В связи с этим метод ВФДТ не универсален, и его можно рассматривать лишь в совокупности с химиотерапией, лучевой и фотодинамической терапией.

Водорастворимые отрицательно заряженные ФС были получены аминолизом пентанонового экзоцикла в бактериофеофорбиде и его металлокомплексах, изучены их гидрофильные свойства и способность к агрегации в водных растворах [57].

Амфифильность оценивали как коэффициент распределения октанол/вода (P). Показано влияние периферических заместителей на способность полученных соединений растворяться в воде и полярных органических растворителях. Найдено, что раскрытие экзоцикла в бактериофеофорбиде значительно повышает гидрофильность бактериохлоринов и, как следствие, увеличивает их способность растворяться в полярных растворителях. Кроме того, соединения с открытым циклом **75 - 82** хорошо растворяются в водных растворах (PBS) – до 40 мг/мл, что значительно выше растворимости соединений с пентаноновым кольцом, имеющих полярные заместители на периферии макроцикла (соединение **74** – 4 мг/мл). Коэффициент P сильно увеличивается (1:19) при замене центрального иона металла Pd (II) на Mn (III) **82**. В то же время уменьшение углеродной цепи в алкильном заместителе **75** по сравнению с **78** практически не сказывается на коэффициенте распределения. Все соединения с открытым экзоциклом в водных растворах образуют агрегаты (2-8 молекул), которые диссоциируют при разбавлении, включении в мицеллы, а также в растворах с физиологическими концентрациями сывороточного альбумина.

Среди новых ФС бактериохлоринового ряда, разработанных в Институте им. Вейсмана при сотрудничестве с фирмами Steba-Biotech и Negma – Lagards, следует отметить препарат Тукад (Tookad), который представляет собой Pd-комплекс бактериофеофорбида **72**. Тукад проявляет высокую активность к таким опухолям как, глиома крыс [58], рак простаты [59], перевитая карцинома толстой кишки человека HT29 в экспериментах на лабораторных животных. Основной механизм действия включает разрушение сосудов опухоли, что приводит к гипоксии и некрозу опухоли. В настоящее время препарат находится на второй стадии клинических испытаний, которые проводятся в медицинских центрах Канады, Европы и Израиля. Поскольку Тукад плохо растворим в водных растворах (октанол:вода = 24:1), его вводят в виде суспензии с Кремофором (Cremophor). При действии на Тукад **72** таурином (2-сульфоэтиламин) происходит раскрытие пентанонового цикла и образование дианиона (кодовое название WST11) **78** [60]. Новый препарат обладает хорошей растворимостью в фосфатном буфере (до 50 мг/мл), где находится в виде небольших агрегатов. В растворах, содержащих сыворотку крови, он подвергается дезагрегации и присутствует в виде мономеров в комплексе с сывороточным альбумином (БСА) и липидами высокой плотности.

Иной подход для увеличения гидрофильности циклоимидов бактериохлорина *p* был использован авторами настоящего обзора. С этой целью был предпринят синтез производных, которые содержат в пирроле А гидроксилсодержащие заместители, присоединенные к макроциклу за счет простой эфирной связи (схема 21). Для этого исходный бактериопурпурин **39** по схеме 16 превращали в бактериохлорин *p* **60** и затем в спирт **61**. Последующее замыкание ангидридного цикла и обработка гидроксиламином и диазометаном давали 3-(α-гидроксиэтил)-3-деацетил-N-гидроксиметилциклоимид бактериохлорина *p* **83**.



A: $(CF_3CO)_2O$; B: 1. $CH_2(OH)CH_2OMe$, 2. $HO(CH_2CH_2O)_2H$, 3. $HO(CH_2CH_2O)_3H$, 4. $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$

Схема 21. Синтез циклоимидов бактериохлорина *p* с полярными заместителями в пирроле А.

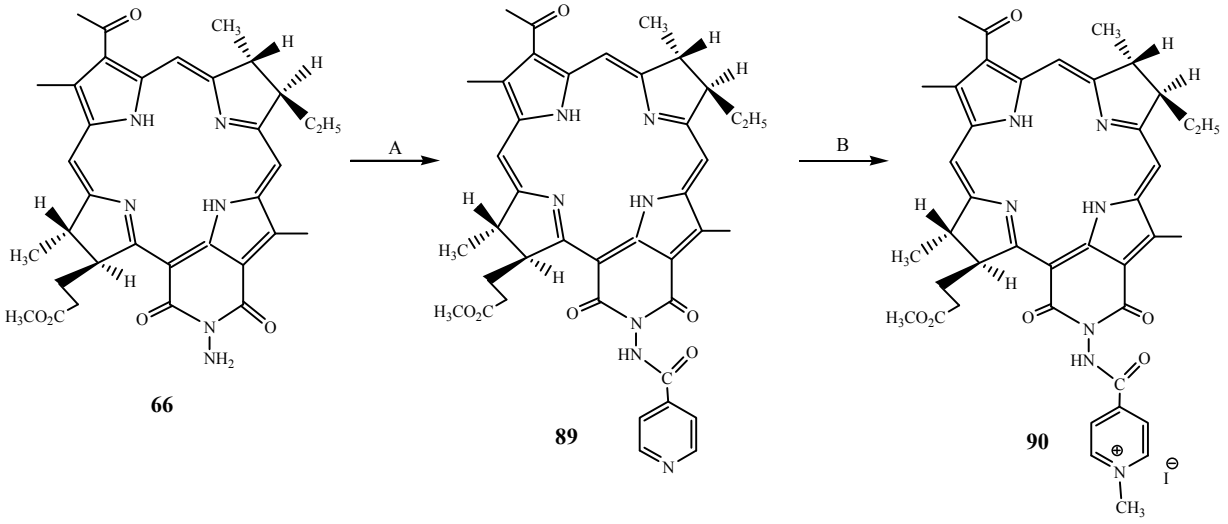
Гидроксильную группу в пирроле А активировали с помощью ангидрида трифторуксусной кислоты, и полученный трифторацетат **84** конденсировали с метиловым эфиром этиленгликоля, ди- и триэтиленгликолем и глицерином, получая соединения **85 - 88**.

В экспериментах *in vitro* на линиях клеток HeLa и A549 и *in vivo* на мышах с лимфомой было показано, что фотоцитотоксичность вышеназванных соединений в 20 выше, чем у исходного бактериопурпурина [61].

Причина столь высокой активности полученных препаратов связана с повышенной селективностью к раковым клеткам (тропность 8-13) и значительным квантовым выходом генерации синглетного кислорода (0.54-0.57). Анализ распределения ФС в тканях показал наибольшее накопление в сосудах опухоли, приводящее к гипоксии и некрозу последней, что полностью согласуется с данными израильских исследователей по механизму действия производных бактериохлорофилла *a*.

Значительно меньше известно о введении положительно заряженных заместителей в бактриохлорины. Однако, именно такие фотосенсибилизаторы могут оказаться наиболее эффективными в фотодинамической антимикробной терапии. Метод основан на инактивации вирусов, бактерий, дрожжевых грибов и простейших активными формами кислорода, которые генерируются фотосенсибилизаторами при освещении [62]. Имеющиеся литературные данные показывают, что данный метод значительно отстает по уровню фундаментальной разработки и практическому использованию от фотодинамической терапии рака. Имеются лишь отдельные данные о фотосенсибилизации непатогенных дрожжей в присутствии порфиринов и фталоцианинов [63-65]. Как известно, внешняя поверхность бактерий несет отрицательный заряд, в связи с чем, наиболее эффективного связывания с бактериальными клетками и фотодинамического действия следует ожидать от катионных фотосенсибилизаторов.

Для синтеза подобных фотосенсибилизаторов могут быть использованы N-аминоциклоимиды бактериохлорина. Первоначально планировалось использовать для этих целей N,N-диметиламинопроизводное. Однако, обработка последнего избытком иодистого метила или диметилсульфата не приводила к кватернизации атома азота [46]. Более успешным оказалось введение в N-аминопроизводное **66** остатка изоникотиновой кислоты **89** с последующей кватернизацией атома азота в пиридиновом кольце **90** (схема 22) [66]. Катионный фотосенсибилизатор **90** является значительно более гидрофильным соединением по сравнению с исходными бактериохлоринами **66** и **89**. В связи с этим для него характерна лучшая растворимость в водноспиртовых растворах, что делает его более перспективным для последующего медицинского применения.

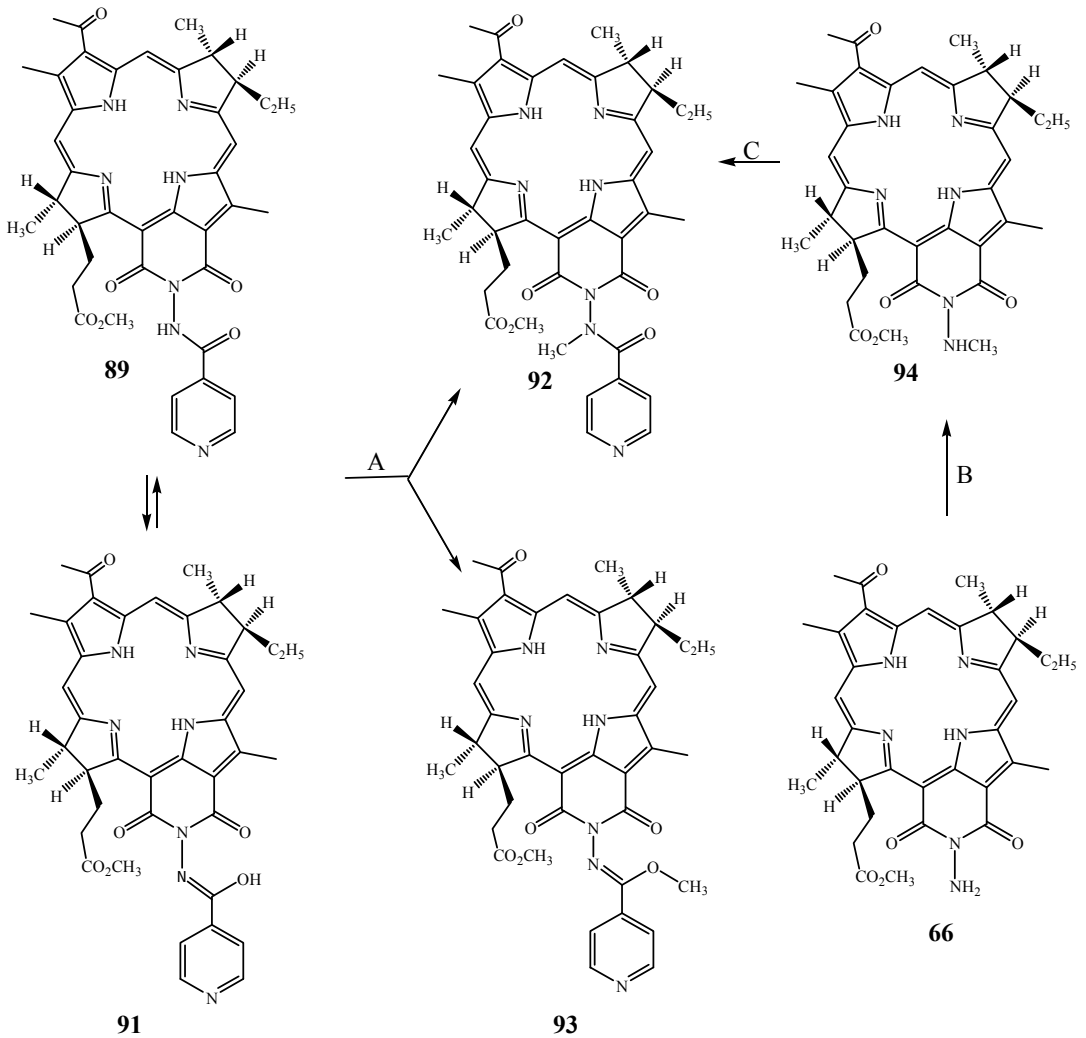


66 **89** **90**

A: хлорангидрид изоникотиновой кислоты, Py; B: CH_3I, кипячение

Схема 22. Синтез катионного циклоимида бактериохлорина *p*.

В ходе синтеза было обнаружено, что полученный гидразид **89** существует в двух изомерных формах, очевидно за счет кето-енольной таутомерии. Для установления структуры изомеров **89** и **91** была проведена их химическая модификация, включающая обработку диазометаном (схема 23).



89 **92** **94** **91** **93** **66**

A: CH_2N_2, Et_2O; B: CH_3I, $CHCl_3$; C: хлорангидрид изоникотиновой кислоты, Py

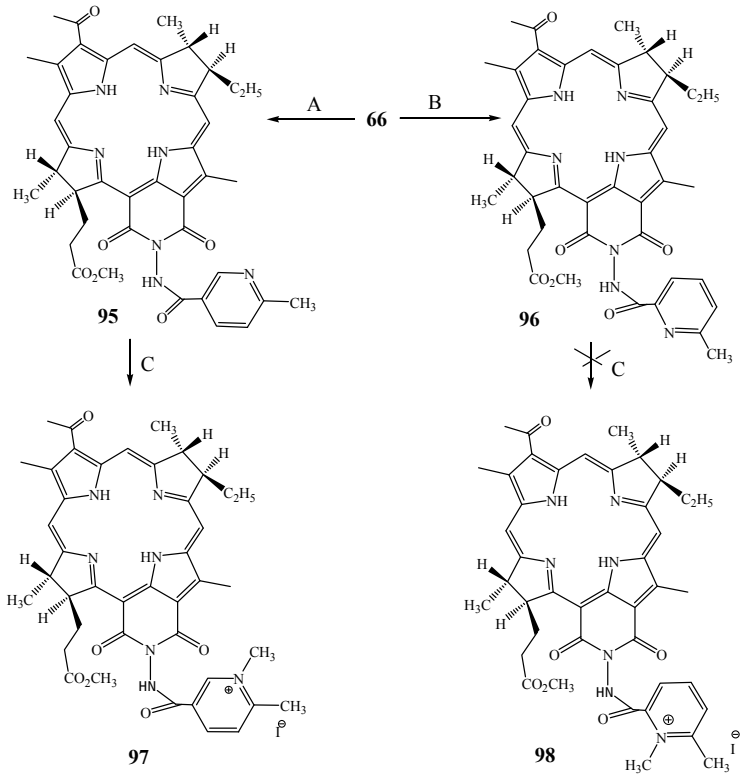
Схема 23. Химические превращения циклоимида **89**.

В результате были получены два вещества с одинаковой молекулярной массой, но различной хроматографической подвижностью, что позволило выделить их в индивидуальном виде. Более подвижному изомеру была приписана структура N-метилгидразида **92**, а второму изомеру – О-метилимидата **93**.

Структура N-метилгидразида была подтверждена встречным синтезом. Для этого N-аминоциклоимид **66** обрабатывали стехиометрическим количеством иодистого метила, и N-монометиламиноциклоимид **94** конденсировали с хлорангидридом изоникотиновой кислоты. Полученное соединение по молекулярной массе и хроматографической подвижности оказалось идентичным быстродвижущемуся изомеру **92**. Другой изомер **93** оказался весьма лабильным и быстро разрушался с образованием N-аминоциклоимида **66**.

В спектрах ^{1}H ЯМР быстродвижущегося изомера **92** сохранялось удвоение сигналов, подобное тому, что наблюдалось для исходного гидразида **89**. Данное явление, по-видимому, связано с существованием в амидах еще одного вида изомерии, которая возникает из-за отсутствия свободного вращения вокруг связи C(O)-N. Поскольку барьер вращения для таких изомеров сравнительно не высокий, то он может быть преодолен повышением температуры. Действительно, при съемке спектров ^{1}H ЯМР соединений **89** и **92** при 50^0 происходило слияние сигналов. В то же время, в изомере **93**, спектр ^{1}H ЯМР которого был снят в первые часы после выделения вещества, подобное удвоение сигналов отсутствует, что соответствует наличию лишь одного Z- или E-изомера.

Наряду с изоникотиновой кислотой для синтеза катионных фотосенсибилизаторв были использованы и другие пиридинкарбоновые кислоты, а также более сложные соединения хинолинового ряда [66]. Взаимодействие N-аминоциклоимида **66** с хлорангидридами 6-метилникотиновой и 6-метилпиколиновой кислот протекало аналогично реакции с изоникотиновой кислотой, и с высокими выходами были получены соединения **95** и **96** (схема 24).



A: хлорангидрид 6-метилникотиновой кислоты, пиридин; B: хлорангидрид 6-метилпиколиновой кислоты, пиридин; C: CH_3I, кипячение

Схема 24. Синтез и кватернизация циклоимидов с остатками пиридинкарбоновых кислот.

Однако попытка кватернизации полученных гидразидов показала существенные различия в их реакционной способности. В случае гидразида 6-метилникотиновой кислоты **95** кватернизация проходила успешно и с высоким выходом был получен катионный циклоимид **97**.

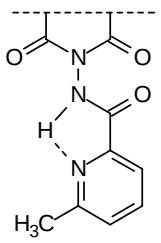
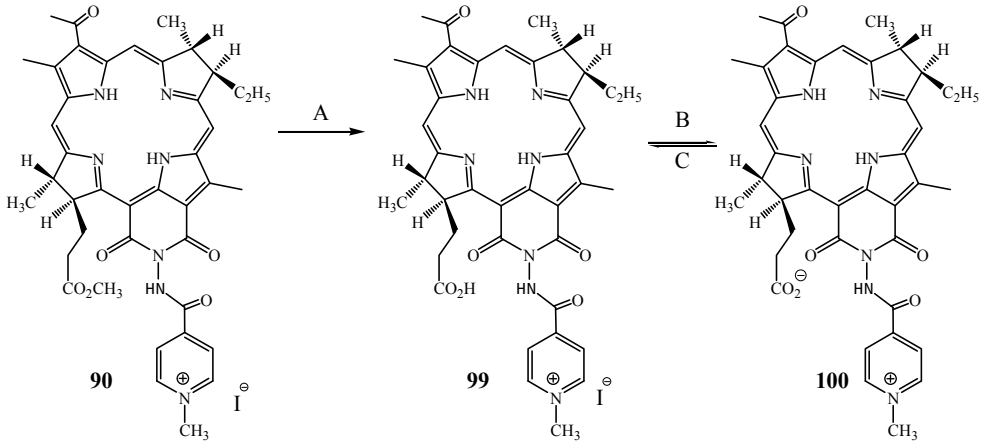


Рис.2. Образование пятичленного кольца в гидразиде **96**.

Напротив, соединение **98** не образуется даже при многочасовом кипячении гидразида 6-метилпиколиновой кислоты **96**. По-видимому, это связано с образованием пятичленного цикла (рис. 2) за счет внутримолекулярной водородной связи между атомами азота гетероцикла и амидным водородом.

В пользу жесткого закрепления пиридинового кольца в плоскости амидной связи свидетельствуют также данные спектров ^{1}H ЯМР, в которых отсутствует удвоение сигналов протонов. Подобные различия в химической активности мы также наблюдали для гидразидов с остатками изомерных хинолинкарбоновых кислот.

Логическим продолжением исследований в области гидрофильных фотосенсибилизаторов явился синтез цвиттер-ионных циклоимидов, имеющих N-метилпиридиниевую и карбоксильную группы в нижней части макроцикла **100**. Для введения отрицательного заряда, пространственно сближенного с катионной группировкой, проводили гидролиз метилового эфира остатка пропионовой кислоты в циклоимиде **90** (схема 25).



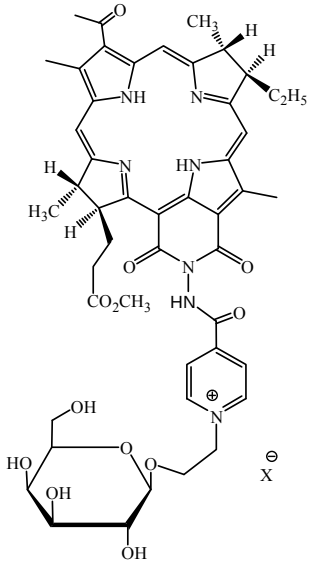
A: $(CH_3)_2CO$/HCl, Ar, t; B: KOH/H_2O; C: HCl

Схема 25. Синтез цвиттер-ионного циклоимида бактериохлоринового ряда.

Однако традиционный метод гидролиза сложных эфиров в щелочной среде был неприемлем из-за лабильности в подобных условиях имидного экзоцикла. Поэтому гидролиз метилового эфира циклоимида проводили в среде HCl/диоксан в атмосфере аргона. Полученное бетаиновое производное циклоимида бактериохлорина **100** обладало достаточно высокой растворимостью в воде, что позволило отказаться от Кремофора, обычно используемого для растворения гидрофобных соединений и обладающего собственной токсичностью [67, 68].

Введение в состав бактериохлориновых производных моносахаридов также позволяет регулировать амфифильность фотосенсибилизаторов. Кроме того, углеводсодержащие порфирины способны селективно накапливаться в неопластических тканях, специфически взаимодействуя с рецепторами на поверхности опухолевых клеток [69-71]. В нашей лаборатории осуществлен синтез нового углеводсодержащего фотосенсибилизатора

на основе циклоимида бактериохлорина *p*. В качестве исходного соединения был взят ранее описанный циклоимид, содержащий остаток изоникотиновой кислоты **89**. Углеводный компонент – 6-дегидрокси-6-иодо-D-галактопиранозид получали по схеме, включающей реакцию перацетата D-галактозы с бромэтанолом в условиях кислотного катализа, замену атома брома на иод кипячением с иодистым натрием в ацетоне и последующее удаление защитных группировок под действием 0.1 М раствора метилата натрия. Введение углеводного фрагмента в молекулу пигмента осуществляли путем кватернизации атома азота пиридинового кольца вышеописанным производным галактозы. С высоким выходом (70%) получен гликоконьюгат **101**, а также его ацетилированный аналог, при использовании 1-O-(2-иодэтил)-2,3,4,6-тетра-O-ацетил-β-D-галактопиранозида.



101

За счет положительного заряда и гидрофильного углеводного остатка полученное соединение хорошо растворяется в воде и, как показали предварительные биологические испытания, может рассматриваться в качестве перспективного фотосенсибилизатора для ФДТ рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный обзор имеет химическую направленность, так как написан химиками - органиками. В него не вошли многочисленные работы по биологическим испытаниям производных бактериохлорофилла *a*. Несомненно, что эти соединения чрезвычайно востребованы онкологами и специалистами других областей медицины (дерматология, офтальмология) в связи с перспективой их использования в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ.

Первые работы по синтезу бактериопроизводных, в которых участвовала и наша группа, появились 10-12 лет тому назад, а сейчас уже некоторые ФС находятся на разных стадиях клинических испытаний. Все это говорит о быстром развитии данной области химии тетрапиррольных соединений.

Совершенно очевидно, что для успешного использования ФДТ в клинической практике у медиков в наличии должен быть целый ряд ФС с различными терапевтическими окнами поглощения. Производные бактериохлорофилла *a*, поглощающие в ближней ИК-области спектра, имеют свою область использования, где другие ФС оказываются малоэффективными.

ЛИТЕРАТУРА:

1. D.Dolphin. //Can. J. Chem. – 1994. – Vol.72. – P. 1005-1011.
2. R. Bonnett. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. – UK: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. – P. 178-185.
3. C. Musewald, G. Hartwich, F. Pollinger-Dammer et al. //J. Phys. Chem. B. – 1998. – Vol.102. – P. 8336-8342.
4. H. W. Jr. Whitlock, R. Hanauer, M. Y. Oester et al. //J. Am.Chem. Soc. – 1969 – Vol.91 – P. 7485-7492.
5. R. Bonnett, R.D. White, U-J.Winfield et al. //J. Biochem. – 1989. – Vol.261 – P. 277-280.
6. R. Bonnett, P. Charlesworth, B.D. Djelal et al. //J. Chem. Soc., Perkin Trans. – 1999. – Vol.2. – P. 325-328.

7. H. L. Callot, A.W. Johnson, A. Sweeney. //Chem. Soc. Perkin Trans. – 1973. – Vol.1. – P.1424-1431.
8. C. K. Chang, S. Cotiriou, W.Wu. //J. Chem. Soc, Chem. Commun. – 1986. – P. 1213-1220.
9. R. K. Pandey, F-Y. Shiau, A. B. Sumlin et al. //Bioorg et al. Med. Chem. Lett. – 1994 – Vol.4. – P. 1263-1270.
10. A.N. Kozyrev, R.K. Pandey, C.J. Medforth et al. //Tetrahedron Letters. – 1996. – Vol.37. – P. 747-751.
11. R. K. Pandey, M. Isaac, I. MacDonald et al. //J. Org. Chem. – 1997. – Vol.62. – P. 1463-1473.
12. R. K. Pandey, F-Y. Shiau, M. Isaac et al. //Tetrahedron Lett. – 1992. – Vol.33. – P. 7815-7820.
13. R. K. Pandey, F-Y. Shiau, K. Ramachandran et al. //J. Chem. Soc, Perkin Trans. – 1992. – Vol.1. – P. 1377-1384.
14. P.Yon-Hin, T. P. Wijesekera, D. Dolphin. //Tetrahedron Lett. – 1991. – Vol.32. – P. 2875-2882.
15. G.Zheng, A.N. Kozyrev, T. J. Dougherty et al. //Chem. Lett. – 1996. – P. 1119-1123.
16. A.R. Morgan, D.Skalkos, G. M. Grabo et al. //J. Med. Chem. – 1991. – Vol.34. – P. 2126-2136.
17. Chlorophyll, ed. by H. Scheer, CRC Press. Jnc., 1991.
18. И. Дайзенхофер, Х. Михель. Фотосинтетический реакционный центр пурпурных бактерий. М.: 1990.
19. T.Mizoguchi, Y. Saga, H. Tamiaki. //Photochem.Photobiol.Sci. – 2002. – Vol.1. – P. 780-787.
20. B.W. Henderson, A.B. Sumlin, B.L. Owcharczak et al. //Photochem.Photobiol. B-Biol. – 1991. – V.10. – P. 303-313.
21. А.Ф. Миронов, А.В. Ефремов. Патент РФ «Способ получения бактериохлорофилла *а*», № 2, 144.085, 12.07.1996.
22. A.A. Tsygankov, T.V. Laurinavichene, I.N. Gogotov. //Biotechnol. Tech. – 1994 – Vol.8 – P. 575- 578.
23. A.A. Tsygankov, T.V. Laurinavichene, V.E. Bukatin et al. //Biochem. Microbiol. – 1997. – Vol.33. – P. 485-490.
24. A.F. Mironov, A.N. Kozyrev, A.S. Brandis. //Proc. SPIE. – 1992–Vol.1922. – P.204-208.
25. R. Willastatter, A. Stoll. Untersuchungen uber Chlorophyll, Springer. – Berlin. – 1913.
26. G.R. Seely. In Chlorophylls / G.R. Seely, L.P. Vernon. – New York, London: Academic Press, 1966. – P. 67-119.
27. H. Fischer, R. Lambrecht, H.Z. Mittenzwei. Physiol. //Chem. – 1939. – Vol.1. – P. 253-259.
28. G. Hartwich, L. Fiedor, I. Simonin et al. //J. Am. Chem. Soc. – 1998. – Vol.120. – P. 3675-3683.
29. A.N. Kozyrev, Y. Chen, L.N. Goswami et al. //J. Org. Chem. – 2006. – Vol.71. – P. 1949-1960.
30. M.R. Wasielewski, W.A. Svec. //J. Org. Chem. – 1980. – Vol.45. – P. 1969-1974.
31. A.Osuka, S.Marumo, Y.Wada et al. Bull. //Chem. Soc. Jpn. – 1995. – Vol.68. – P. 2909-2915.
32. P. Hynninen in Chlorophylls: H. Scheer., Ed.: CRC Press: Boca Raton. – 1991. – P. 145-209.
33. S-J. Lee, N. Jagerovic, K.M. Smith. //J. Chem. Soc. Perkin Trans.– 1993. – Vol.1. – P.2369-2374.
34. A.N. Kozyrev, G. Zheng, C.F. Zhu et al. //Tetrahedron Lett. – 1996. – Vol.37. – P. 6431-6434.
35. A.N. Kozyrev, T. J. Dougherty, R. K. Pandey. //Chem Commun. – 1998. – P. 481-482.
36. A.L. Gryshuk, A. Graham, S.K. Pandey et al. //Photochem.Photobiol – 2002. – Vol.76. – P. 555-559.
37. A.L. Gryshuk, Y. Chen, W.R. Potter et al. //J. Porphyrins Phthalocyanines – 2004. – Vol.8. – P. 671-679.
38. A.F. Mironov, V.S. Lebedeva. //Tetrahedron Lett. – 1998. – Vol.39. – P. 910-905.
39. A.F. Mironov, V.S. Lebedeva, R.I. Yakubovskaya et al. //Proc. SPIE – 1999. – Vol.3563– P. 59-67.

40. A.F. Mironov, M.A. Grin, A.G. Tsiprovskiy. //J. Porphyrins Phthalocyanines – 2002. – Vol.6– P. 358-361.
41. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский и др. //Биоорган. химия. – 2003. – Т.29. – С. 214-221.
42. Д. Бартон, У. Д. Оллис. Общая органическая химия, перевод с англ., под ред. Н.К. Кочеткова.– М.: Химия, 1982. – Т. 2. – С.521-523 (а); –Т. 3. – С.61-77 (б).
43. A.F. Mironov, M.A. Grin, D.V.Dzardanov et al. //Mendeleev Commun. – 2001 – P. 205-206.
44. A.F. Mironov, A.V. Efremov, O.A. Efremova, R. Bonnett. //Mendeleev Commun. – 1997. – P.244-245.
45. A.F. Mironov, A.V. Efremov, O.A. Efremova, R. Bonnett and G. Martinez. //J. Chem. Soc.,Perkin Trans.1 – 1998. – Vol.1. – P.3601-3607.
46. A.F. Mironov, M.A. Grin, A.G. Tsiprovskiy et al. //J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2003. – Vol.7. – P. 707-712.
47. D.E. Remy, R.E. Whitfield, N.L. Needles. //J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1967. – P. 681-695.
48. A.R. McCarthy, W.D. Ollis, A.N. Barnes et al. //J.Chem.Soc. (B) – 1969. – P.1185-1193.
49. K. Belnaik, E. Domagaliva, H. Hopkala. //Roczniki Chem. – 1967. – Vol.41. – P.831-843.
50. А.Ф. Миронов, М.А. Грин, А.Г. Ципровский и др. Патент РФ Гидразиды в ряду бактериохлорофилла *a*, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения, № 2,223.274, 10.02.2004.
51. M. Hoebeke, H.J. Schuitmaker, L.E. Jannink et al. //Photochem.Photobiol. – 1997. – Vol.66. – P. 502-508.
52. A. Scherz, J. Salomon, L. Fiedor. 1994. EP Appl. 584552.
53. L. Fiedor, V. Rosenbach-Belkin, M. Sai et al. //Plan.Physiol. Biochem. – 1996. – Vol.34. – P.393- 398.
54. H. Stiel, K. Teuchner, D. Leupold et al. //Photochem.Photobiol. – 2000. – Vol.72. – P.204-209.
55. Scherz A, Salomon Y, Brandis A et al. 2000, PCT Pat WO00/33833.
56. I.G. Meerovich, I.Yu. Kubasova, N.A. Oborotova et al. //Proc.SPIE. – 2005. – Vol.5973. – P.121-131.
57. A. Brandis, O. Mazor, E. Neumark et al. //Photochem.Photobiol. – 2005. – Vol.81. – P.983-993.
58. S. Schreiber, S. Gross, A. Brandis et al. //Int. J. Cancer – 2002. – V.99. – P. 279-285.
59. N.V. Koudinova, J.H. Pinthus, A. Brandis et al. //Int. J.Cancer. – 2003. – Vol.104. – P. 782-789.
60. O. Mazor, A. Brandis, V. Plaks et al. //Photochem.Photobiol. – 2005. – Vol.81. – P. 983-993.
61. G.V. Sharonov, T.A. Karmakova, R. Kassies, A.D. Pljutinskaya, M. Refregiers, R.I.Yakubovskaya, M.A. Grin, A.F. Mironov, J.-C. Maurizot, P. Vigny, C. Otto, A.V. Feofanov. Free Radical //Biology and Medicine. – 2006. – Vol.40. – P.407- 419.
62. M. Wainwright, //J. Antimicrob. Chemother. – 1998–Vol.42. – P. 13-28.
63. Z. Malik, I. Hanania, J. Nitzan. //Photochem. Photobiol. – 1990. – V.5. – P. 281-293.
64. T. Ito. //Photochem.Photobiol. – 1991. – Vol.34. – P. 521-524.
65. М.Г. Страховская, А.Ф. Миронов, А.М. Серегин. //ДАН. – 2002. – Т. 384. – С. 263-266.
66. A.F. Mironov, M.A. Grin, A.G. Tsiprovskiy, R. Titeev, E. Nizhnik, I. Lonin. //Mendeleev Commun. – 2004. – Vol.5. – P. 204-207.
67. A. Grichin, A. Feofanov, T. Karmakova, N. Kazachkina, E. Pecherskih, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Egret-Charlier ana P. Vigny. //Photochem. Photobiol. – 2001–Vol.73. – P.267-275.
68. A. Feofanov, A. Grichin, T. Karmakova, V. Lebedeva, A. Filyasova, R. Yakubovskaya, A. Mironov, M. Egret-Charlier and P. Vigny. //Photochem. Photobiol. – 2002–V.75 – P. 633-641.
69. K.R. Adams, M.C. Berenbaum, R. Bonnett et. al. //J. Chem. Soc. Perkin Trans. – 1992. – Vol.1. – P. 1465-1470.
70. А.А. Аксенова, Ю.Л.Себякин, А.Ф.Миронов. //Биоорган.химия. – 2000. – Т.26, № 2. – С. 126-129.
71. G. Zheng., A. Graham., M. Shibata et al. //Org. Chem. – 2001. – Vol.66. – P. 8709-8716.