

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ИК-ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

И.В. Пантюшенко¹, аспирант, М.А. Грин^{1,*}, профессор,

Р.И. Якубовская², профессор, Е.А. Плотникова², младший научный

сотрудник, Н.Б. Морозова², научный сотрудник, А.А. Цыганков³,

заведующий лабораторией, А.Ф. Миронов¹, заведующий кафедрой

¹кафедра Химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена
Минздрава РФ, Москва, 125284 Россия

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, 142290 Россия

*Автор для переписки, e-mail: michael_grin@mail.ru

Осуществлен синтез и изучены физико-химические и биологические свойства производного бактериохлорофилла *a* – метилового эфира *O*-пропилноксима *N*-пропоксибактериопурпуринимида, использованного в качестве фотосенсибилизатора в виде наноструктурированной водной дисперсии. В работе реализован метод фотодинамической терапии рака, который включает системное введение данного фотосенсибилизатора в дозах от 1.0 до 10.0 мг/кг и облучение патологического участка оптическим излучением через 0.25–8 ч после введения препарата в спектральном диапазоне 789–831 нм при плотности энергии от 45 до 360 Дж/см². Показано, что фотодинамическая терапия с использованием данного препарата обеспечивает высокую фотоиндуцированную противоопухолевую активность в системе *in vitro* и *in vivo*, 100%-ное торможение роста опухоли и 90%-ную излеченность животных за счет селективного накопления в опухоли и быстрого выведения из организма.

Ключевые слова: бактериохлорофилл *a*, бактериопурпурин, бактериопурпуринимиды, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, злокачественные новообразования.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) рака основывается на накоплении в опухоли фотосенсибилизатора (ФС), который под действием света определенной длины волны вызывает образование цитотоксического агента (синглетного кислорода), что приводит к гибели опухоли [1–10]. Фотодинамическая терапия является относительно мягким неинвазивным методом терапии онкологических заболеваний [11, 12]. Главными преимуществами ФДТ являются: локальность действия, что оставляет здоровые ткани незатронутыми, возможность амбулаторного лечения, отсутствие послеоперационных осложнений при сохранении функции пораженного органа, снижение системного неблагоприятного воздействия на организм (тошнота, рвота, стоматит, выпадение волос, угнетение кроветворения и т. д.).

В настоящее время применяются в клинике или находятся на разных стадиях клинических испытаний фотосенсибилизаторы различных классов: порфирины и их металлокомплексы, хлорины, бензопорфирины, фталоцианины и др. Однако особый интерес представляют природные хлорофиллы и их производные с интенсивным поглощением в дальней красной и ближней ИК-областях спектра, поскольку их терапевтическое окно поглощения (750–850 нм) открывает новые возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований [13, 14]. Поскольку свет с длиной волны такого диапазона проникает в ткани на глубину до

20 мм, становится возможным лечение крупных, глубокозалегающих в неполых органах (молочная железа, простата) и плотно окрашенных (меланома) опухолей.

Выбор природного пигмента для создания новых ФС обусловлен рядом причин, включая относительно недорогой биотехнологический способ наработки исходного соединения, интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра, возможность химической модификации боковых заместителей, структурную близость к эндогенным порфиринам, что предполагает низкий уровень токсичности подобных соединений и быстрое выведение из организма.

Однако сами хлорины и бактериохлорины имеют ограниченное применение в качестве ФС из-за высокой гидрофобности, низкой химической и фотостабильности, умеренной селективности накопления в раковых клетках. Это диктует необходимость создания устойчивых производных хлоринов и бактериохлоринов с улучшенными спектральными характеристиками, повышенной гидрофильностью для растворимости в полярных растворителях и воде, обладающих значительной тропностью к опухолям.

Использование бактериопурпуринимида в качестве ключевого соединения в синтезе новых высокоэффективных ФС обусловлено двумя причинами. Во-первых, включение в тетрагидропорфириновый макроцикл имидного экзоцикла приводит к повышению устойчивости

пигмента. Во-вторых, спектральные характеристики циклических имидов выгодно отличают их от производных с цикlopентаноновым фрагментом, который присутствует в природном бактериохлорофилле *a*, что проявляется в батохромном сдвиге основной полосы поглощения с 765 до 800 нм.

Ранее было показано, что использование гидроксилamina и его производных при получении циклических имидов в ряду хлорофилла *a* [15, 16] и бактериохлорофилла *a* [17] дает возможность, с одной стороны, упростить синтез за счет одностадийности процесса, включающего самопроизвольно протекающую внутримолекулярную циклизацию, с другой стороны, использование производных гидроксилamina с алкильными заместителями, имеющими различную длину углеводородной цепи, позволило получить модификационные ряды пурпурин- и бактериопурпуринимидов, что значительно упростило поиск новых эффективных ФС.

В отличие от пурпурина в случае бактериопурпурина (БП) в реакциях с производными гидроксилamina принимает участие не только ангидридный цикл, но и ацетильная группа в пирроле А, приводя к соответствующим оксимам (рис. 1).

Исследование взаимодействия БП **1** с пропоксимином показало, что оптимальными для данной реакции являются условия, при которых используется 5-ти-кратный избыток гидрохлорида пропоксимиана в пиридине, а процесс протекает в течение 20 ч. При уменьшении количества производного гидроксилamina время реакции увеличивалось, а ее выход снижался. Ход реакции отслеживали по гипсохромному смещению Q-полосы в электронном спектре с 818 до 800 нм, что является интегральным эффектом батохромного сдвига, вызванного образованием циклического имида, и гипсохромным сдвигом за счет образования оксима. После хроматографической очистки целевой пигмент **3** был выделен с выходом 80%.

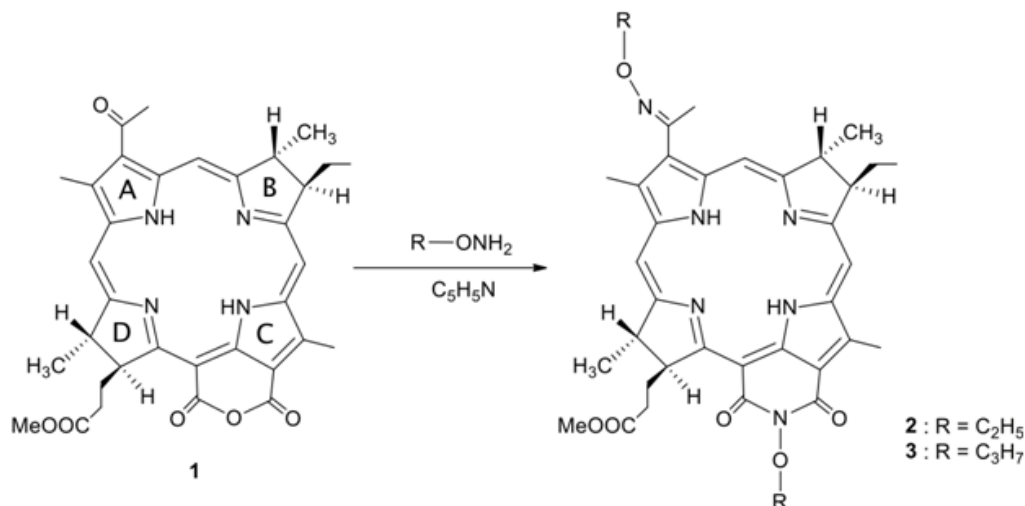


Рис. 1. Взаимодействие бактериопурпурина с производными гидроксилamina.

Несмотря на то, что гидрофильные вещества более удобны с точки зрения приготовления растворов для внутривенного введения, их способность проникать сквозь клеточные мембраны к жизненно важным мишеням клетки довольно ограничена. Известно, что гидрофобные ФС обычно проникают внутрь опухолей и опухолевых клеток, а гидрофильные накапливаются в кровеносных сосудах и строме на периферии опухоли [18–20]. Показано, что на амфифильность пигментов можно влиять, изменяя длину алкильных боковых цепей, что, в свою очередь, сказывается на фотоиндуцированной активности фотосенсибилизаторов [21]. Известно, что максимальной активностью *in vitro* и *in vivo* обладают ФС с боковыми цепями, содержащими три или шесть метиленовых звеньев [22].

Ранее нами был получен аналог описанного в данной работе ФС, содержащий на одно

метиленовое звено меньше в алкильных заместителях при атомах азота, представляющий собой метиловый эфир *O*-этилокси-*N*-этокси-бактериопурпуринимида (**2**) [23]. Наличие в его структуре двух этильных групп придает молекуле определенную гидрофобность, которой, однако, недостаточно для реализации эффективного трансмембранного переноса в опухолевых клетках, что приводит к невысокой фотоиндуцированной противоопухолевой активности [24]. Кроме того, пигмент **2** имеет низкую селективность накопления в опухоли (индекс селективности не превышает 2) и не обеспечивает полной излеченности животных.

Наличие вышеназванных недостатков обуславливает поиск новых высокоэффективных ФС, у которых повышение гидрофобности достигается путем увеличения длины углеводородной цепи боковых заместителей.

В данном исследовании создан ИК-ФС на основе производного бактериопурпуринимида, имеющий высокую фотоиндуцированную противоопухолевую активность в системе *in vitro* и *in vivo*, обеспечивающий высокую излеченность животных-опухоленосителей, селективное накопление в опухоли и быстрое выведение из организма млекопитающих, что позволило повысить эффективность ФДТ глубоководных опухолей.

Было предложено применять фотосенсибилизатор в виде наноструктурированной водной дисперсии на основе метилового эфира *O*-пропилоксима *N*-пропоксибактериопурпуринимида (**3**) (нано-ФС **3**). Для ее приготовления в качестве солюбилизатора использовали Кремофор ELP, который дезагрегирует ФС и не обладает собственной токсичностью [25]. Размер мицелл нано-ФС **3** был измерен методом динамического рассеяния света и составил 10–15 нм. Исследование стабильности нано-ФС **3** показало, что пигмент химически и фотостабилен во времени. Так, нано-ФС **3** стабилен в течение суток инкубации в 0.9% растворе NaCl и в среде Игла МЕМ, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), при варьировании концентраций от 15 до 35 мкМ в темновых условиях (рис. 2, 3). При облучении нано-ФС **3** не происходило сдвига максимума флуоресценции ($\lambda_{\text{max}} = 799 \pm 2$ нм), а интенсивность флуоресценции снижалась незначительно без изменений в профиле спектра (рис. 4).

В экспериментах *in vitro* выявлено, что нано-ФС **3** проявляет максимальную фотоиндуцированную активность относительно клеток карциномы толстой кишки (HT29) при 6-ти-часовой инкубации (IC_{50} составляла 0.35 ± 0.03 мкМ); с увеличением времени инкубации до 24 ч величина IC_{50} не изменялась (рис. 5). Инкубация клеток с нано-ФС **3** в концентрациях до 15 мкМ в отсутствие светового воздействия в течение 24 ч не влияла на рост клеточной культуры. Удаление фотосенсибилизатора из культуральной среды перед воздействием светом незначительно снижало эффективность фотодинамического воздействия, что свидетельствует о том, что фотоиндуцированная активность реализуется преимущественно за счет активации ФС, который проник внутрь клеток.

Таким образом, результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, показали, что метиловый эфир *O*-пропилоксима *N*-пропоксибактериопурпуринимида **3** в виде наноструктурированной водной дисперсии (нано-ФС **3**) эффективно накапливается в клетках и обладает высокой фотоиндуцированной активностью.

При изучении кинетики накопления нано-

ФС **3** у мышей с эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC) было показано, что в опухолевой ткани нормированная флуоресценция (ФН) фотосенсибилизатора достигала максимального значения через 15 мин и сохранялась на высоком уровне до 8 ч после введения, а затем к 72 ч снижалась на 90–98% от максимального значения. Наиболее высокие уровни ФН в нормальной коже и мышце наблюдались через 0.25–4 ч после введения ФС. Максимальная флуоресцентная контрастность относительно окружающих нормальных тканей кожи и мышцы регистрировалась в интервале от 0.25 до 8 ч после введения и составляла 2.2–2.8 и 1.6–2.2 усл. ед., соответственно.

Фотоиндуцированная противоопухолевая эффективность ФС изучалась методом ФДТ, включающим системное введение бактериопурпуринимида в виде нано-ФС **3** в дозах от 1.0 до 10.0 мг/кг и облучение патологического участка оптическим излучением через 0.25–8 ч после введения препарата в спектральном диапазоне 789–831 нм при плотности энергии от 45 до 360 Дж/см².

При использовании нано-ФС **3** в дозе 2.5 мг/кг среднее значение объема опухоли увеличивалось медленно по отношению к объему опухоли контрольной группы. Торможение роста опухоли (ТРО) составило 92.1–100%, увеличение продолжительности жизни (УПЖ) животных-опухоленосителей – 62.2%, критерий излеченности (КИ) – 33.3%. Для дозы 5.0 мг/кг выявлена еще более высокая эффективность: ТРО – 100% в течение всего срока наблюдения, УПЖ – 111.1% и КИ – 90% (рис. 6).

Изучение фармакокинетики нано-ФС **3** показало, что во внутренних органах через 24 ч уровень нормированной флуоресценции снижался в печени на 33%, почках – на 63%, селезенке – на 93% от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС в дозе 5.0 мг/кг определялась в почках и селезенке до 48 ч, а в печени остаточное количество определялось до 7 сут.

В коже максимальное значение флуоресценции регистрировалось через 15 мин после введения фотосенсибилизатора, затем его нормированная флуоресценция быстро снижалась и через 24 ч не определялась. Это свидетельствовало о быстром элиминировании ФС из кожи. В мышце через 24 ч уровень ФН также снижался на 83%, в жировой ткани – на 58%. Флуоресцирующая форма ФС определялась в мышце до 48 ч, а в жировой ткани – до 4 сут.

Таким образом, нано-ФС **3** обладает хорошей фармакокинетикой и быстро выводится из организма млекопитающих, особенно из кожи (в течение 24 ч).

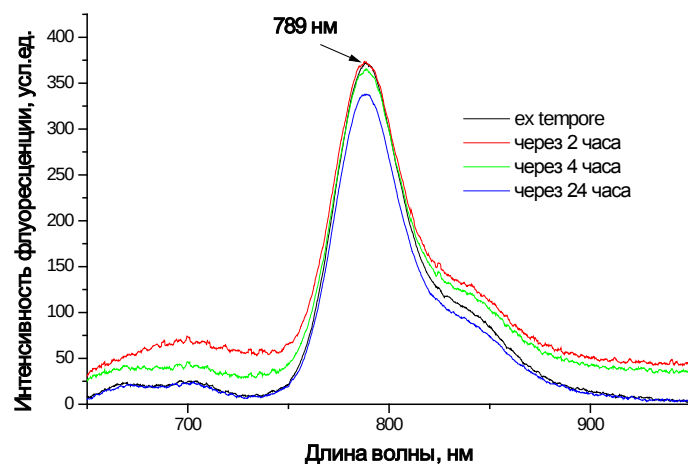


Рис. 2. Спектры флуоресценции нано-ФС 3 в 0.9% растворе хлористого натрия в динамике ($\lambda_{\text{max}} = 799$ нм).

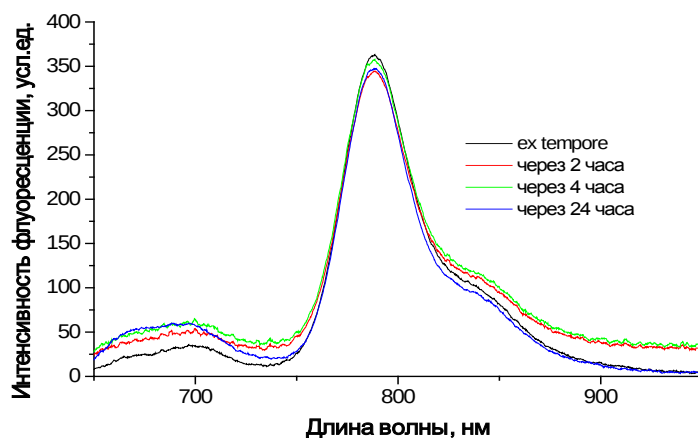


Рис. 3. Спектры флуоресценции нано-ФС 3 в среде Игла МЕМ, содержащей 10% ЭТС, в динамике ($\lambda_{\text{max}} = 799$ нм).

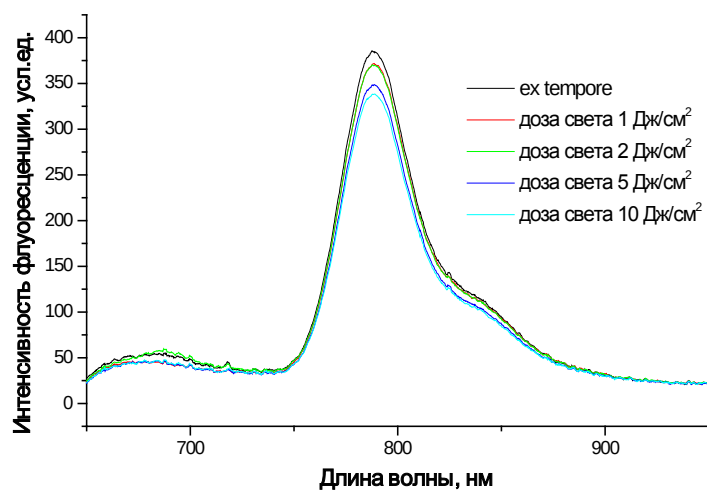


Рис. 4. Спектры флуоресценции нано-ФС 3 в среде Игла МЕМ, содержащей 10% ЭТС, до и после облучения ($\lambda_{\text{max}} = 799$ нм).

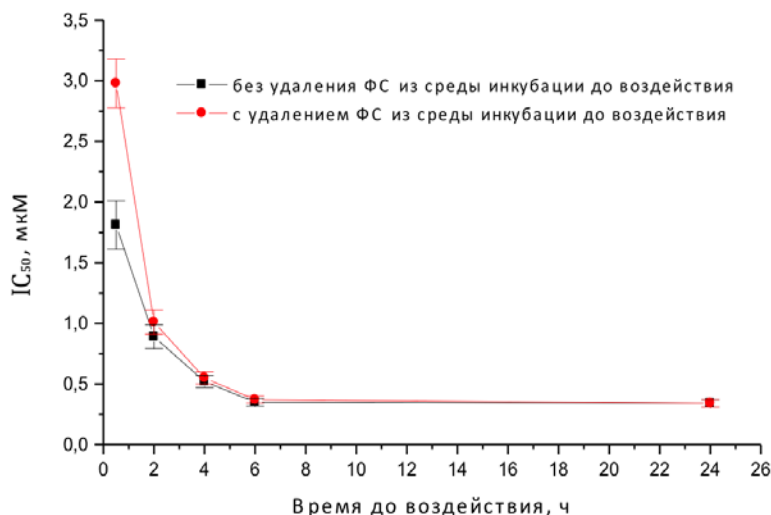


Рис. 5. Фотоиндуцированная активность нано-ФС 3 в зависимости от времени инкубации.

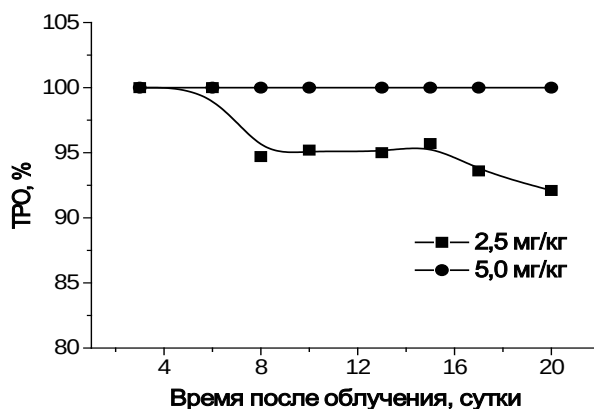


Рис. 6. Фотоиндуцированная противоопухолевая активность нано-ФС 3 у мышей с опухолью LLC в зависимости от дозы ФС.

Таким образом, предложенный в данной работе ФС, представляющий собой наноструктурированную водную дисперсию на основе метилового эфира *O*-пропиллоксима *N*-пропоксибактериопурпуринамида, и фотодинамическая терапия с его использованием обеспечивают высокую фотоиндуцированную противоопухолевую активность, 100%-ное торможение роста опухоли и 90%-ную излеченность животных, за счет селективного накопления в опухоли и быстрого выведения из организма.

Экспериментальная часть

В работе использовали *O*-пропилгидроксил-амин гидрохлорид (Sigma Aldrich, США), Кремофор (Cremophor) ELP (BASF, Германия), а также реагенты и растворители отечественного производства. Растворители были очищены и подготовлены по стандартным методикам. Бактериопурпурин синтезирован из бактериохлорофилла *a*, выделяемого из биомассы пурпурных бактерий, с использованием метода, разработанного на кафедре ХТБАС МИТХТ [26].

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в хлористом метиле. Спектры ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц для ¹H. Масс-спектры получены на время-пролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex TOF/TOF методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (DHB). Электронные спектры поглощения были получены на спектрофотометре Ultrospec 2100 Pro (США), в кварцевых кюветах толщиной 10 мм. Все спектральные исследования выполняли при 25⁰С.

Метилловый эфир *O*-пропиллоксима *N*-пропоксибактериопурпуринамида (3). К раствору 30 мг (0,05 ммоль) бактериопурпурина (1) в 2 мл пиридина прибавляли 0,5 ммоль гидрохлорида *O*-пропилгидроксиламина. Полученный раствор перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали спектрофотометрически и при помощи

ТСХ. Затем реакционную смесь разбавляли 150 мл воды и 5 мл 1 н. HCl и экстрагировали хлороформом до полного обесцвечивания органического слоя (5×30 мл). Органические экстракты объединяли, сушили безводным сульфатом натрия, удаляли растворитель на ротаторном испарителе. Полученный продукт очищали с помощью препаративной ТСХ на силикагеле в системе $\text{CHCl}_3\text{--CH}_3\text{OH}$ (50:1 об./об.). Выход 80%. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.65 (H, с, 5-H), 8.58 (H, с, 10-H), 8.40 (H, с, 20-H), 5.21 (H, м, 17-H), 4.59 (4H, м, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 4.18 (2H, м, 7-H, 18-H), 4.00 (H, м, 8-H), 3.64 (3H, с, 12- CH_3), 3.58 (3H, с, 17³- COOCH_3), 3.30 (3H, с, 2- CH_3), 2.78 (3H, с, 3²- CH_3), 2.75 (H, м, 17²- CH_2), 2.40 (3H, м, 8¹- CH_2 , 17¹- CH_2 , 17²- CH_2), 2.08 (2H, м, 8¹- CH_2 , 17¹- CH_2), 1.80 (3H, д, J 7.24 Гц, 7- CH_3), 1.70 (9H, м, 18- CH_3 , $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 1.10 (3H, т, J 7.38 Гц, 8²- CH_3), 0.00 (с, NH), -0.26 (с, NH). UV-VIS, λ_{max} , нм ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 368 (100), 418 (53), 541 (40), 800 (49).

Получение наноструктурированной водной эмульсии метилового эфира *O*-пропил-оксима *N*-пропоксибактериопурпуринимида (нано-ФС 3) с использованием Кремофора ELP. К раствору 5 мг соединения 3 в 0.25 мл Кремофора ELP добавляли 0.9% раствор хлористого натрия до концентрации 1 мг/мл при перемешивании при комнатной температуре, затем фильтровали через мембранный фильтр Millipore с размером пор 0.22 мкм.

Оценка стабильности нано-ФС 3 в темновых условиях. Растворы для проведения исследований готовили *ex tempore*, достигая выбранной концентрации путем последовательных разведений исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл. В качестве растворителей использовали среду Игла, содержащую 10% ЭТС, и 0.9% раствор хлористого натрия. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Genesys 2 (США) в диапазоне длин волн 600–900 нм. Регистрацию флуоресценции растворов проводили в динамике контактным способом на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА-6» (ТОО «БиоСпек», Россия). Флуоресценцию возбуждали He-Ne-лазером при длине волны генерации 632.8 нм, спектральный диапазон 600–950 нм.

Оценка фотостабильности нано-ФС 3 в бесклеточной среде. Оценка фотовыцветания проводили в среде Игла MEM, содержащей 10% ЭТС, при облучении полихроматическим светом. В качестве источника света использовали галогеновую лампу мощностью 500 Вт с широкополосным фильтром КС-19 ($\lambda_{\text{max}} \geq 720$ нм) и водным фильтром толщиной 5 см. Световая доза составляла 1, 2, 5 и 10 Дж/см² при плот-

ности мощности 13.0–25.0 мВт/см². Измерения флуоресценции проводили контактным способом на лазерном спектральном анализаторе «ЛЭСА-06» в спектральном диапазоне 650–950 нм. Спектры флуоресценции регистрировали сразу после приготовления раствора и через различные промежутки времени после начала облучения.

Фотоиндуцированная активность нано-ФС 3 в отношении клеток карциномы толстой кишки (HT29). Оценка фотоиндуцированной активности проводили при варьировании концентрации ФС от 0.1 до 15.0 мкМ, времени инкубации до светового воздействия от 0.5 до 24 ч, с удалением и без удаления фотосенсибилизатора перед облучением. В качестве источника света использовали галогеновую лампу мощностью 500 Вт с широкополосным фильтром КС-19 ($\lambda_{\text{max}} \geq 720$ нм) и водным фильтром толщиной 5 см. Оценка выживаемости проводили как визуально, оценивая с помощью световой микроскопии морфологические изменения клеток, так и колориметрическим методом с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенилтетразолийбромида (МТТ-тест) [27].

Уровень ингибирования роста клеток в культуре вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = [(\text{P}_\text{к} - \text{P}_0) / \text{P}_\text{к}] \times 100,$$

где: ИР – ингибирование роста клеток культуры, %; P_0 и $\text{P}_\text{к}$ – число жизнеспособных клеток, выраженное в единицах оптической плотности, в опытных (с ФС) и контрольных (без ФС) пробах, соответственно.

Биологически значимым эффектом считали ингибирование роста культуры на 50% (IC_{50}).

Распределение нано-ФС 3 в опухоли LLC и флуоресцентная контрастность относительно окружающей ткани. Оценка распределения красителя в опухолевой и окружающей тканях проводили у мышей с карциномой LLC в интервале от 5 мин до 72 ч методом локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС). Нано-ФС 3 вводили внутривенно в дозе 5.0 мг/кг. Флуоресценцию регистрировали контактным способом на лазерном спектральном анализаторе «ЛЭСА-06». При возбуждении флуоресценции в красной области спектра интегральную интенсивность флуоресценции в спектральном диапазоне измерений 640–850 нм нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния в ткани возбуждающего лазерного излучения, определяя нормированную флуоресценцию (ФН) тканей [28]. Накопление нано-ФС 3 в тканях оценивали по максимальным значениям ФН при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции метилового эфира *O*-пропил-оксима *N*-пропоксибактериопурпуринимида (3). В ходе исследования рассчитывали флуоресцентную контрастность (ФК) как отношение

ФН в опухоли к ФН в коже и мышце:

$$ФК = ФН_{опухоль} / ФН_{кожа}$$

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность нано-ФС 3 у животных с опухолью LLC. Исследование фотодинамической терапии нано-ФС 3 проводили у животных с карциномой легкого Льюис, привитой подкожно с внешней стороны правого бедра мышам BDF₁, в зависимости от дозы ФС на 7 сутки после инокуляции опухоли.

В первой и второй опытных группах животным вводили нано-ФС 3 однократно внутривенно в хвостовую вену в дозах 2.5 и 5.0 мг/кг, соответственно. Облучение проводили через 30 мин после введения фотосенсибилизатора. Для облучения использовали светодиодный источник (ФГУП «ГНЦ РФ НИОПИК») с длиной волны 810±21 нм и плотностью мощности 100 мВт/см² (плотность энергии 150 Дж/см²). Третья группа животных – контрольная без воздействия.

Эффективность ФДТ оценивали, используя общепринятые в экспериментальной онкологии критерии:

- торможение роста опухоли ТРО = $[(V_k - V_{оп}) / V_k] \cdot 100\%$, где $V_{оп}$ и V_k – объем опухоли в опытной и контрольной группах, соответственно;

- увеличение продолжительности жизни УПЖ = $[(СПЖ_{оп} - СПЖ_k) / СПЖ_k] \cdot 100\%$, где

СПЖ_{оп} и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни в опытной и контрольной группах, соответственно;

- критерий излеченности КИ = $[N_i / N_o] \cdot 100\%$, где N_i и N_o – количество излеченных животных и общее количество животных в опытной группе, соответственно.

Измерение объема опухоли проводили в течение 20 сут после проведенного облучения с помощью электронного цифрового кронциркуля STORMtm 3C301 «Central». За животными наблюдали 120 сут.

Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = d_1 \cdot d_2 \cdot d_3$, где d_1 , d_2 и d_3 – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли.

Фармакокинетика нано-ФС 3 у intact-ных мышей. Фармакокинетика нано-ФС 3 изучали методом ЛФС в органах и тканях intact-ных мышей в дозе 5.0 мг/кг. Максимум спектра флуоресценции ФС в тканях животных регистрировали при 796±2 нм. Флуоресцирующая форма фотосенсибилизатора быстро (в течение 15–30 мин) регистрировалась во внутренних органах и тканях организма, преимущественно в печени, затем снижалась с различной скоростью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-03-00577 и 14-03-00503).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dougherty T.J., Gomer C., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbely M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer I. 1998. V. 90. № 12. P. 889–905.
2. Gross S., Gilead A., Scherz A., Neeman M., Salomon Y. Monitoring photodynamic therapy of solid tumors online by BOLD-contrast MR // Nature Medicine. 2003. V. 9. P. 1327–1331.
3. Oseroff A., Shieh S., Frawley N., Blumenson L., Parsons J., Potter E., Graham A., Henderson B.W., Dougherty T.J. PDT for skin cancer: What do we know about how to go // Abstracts of 29th Annu. Meeting Am. Soc. Photobiol. USA, California, San Francisco, 2001. P. 146.
4. Keefe K.A., Tadir Y., Tromberg B., Berns M., Osann K., Hashad R., Monk B.J. Photodynamic therapy of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with 5-aminolevulinic acid // Lasers Surg. Med. 2002. V. 31. P. 289–293.
5. Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? // Photochem. Photobiol. 1992. V. 55. P. 145–157.
6. Kessel D. Delivery of photosensitizing agents // Adv. Drug Deliv. Rev. 2004. V. 56. P. 7–8.
7. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how? // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 1. P. 1–21.
8. Dolmans D., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // Natl. Cancer Rev. 2003. V. 3. P. 380–387.
9. Sternberg E.D., Dolphin D., Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy // Tetrahedron. 1998. V. 54 (17). P. 4151–4202.
10. Pandey R.K., Smith K.M., Dougherty T.J. Porphyrin dimers as photosensitizers in photodynamic therapy // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2032–2038.
11. MacDonald I., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2001. V. 5. P. 105–129.
12. Henderson B.W., Gollnick S.O. Mechanistic principles of photodynamic therapy // In: Biomedical Photonics Handbook / Ed. T. Vo-Dinh. Boca Raton: CRC Press, 2002.
13. Pandey R.K., Zheng G. Porphyrins as Photosensitizers in Photodynamic Therapy // In: The Porphyrin Handbook / Ed. by K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard. Academic Press, 2000. P. 157–230.
14. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll *a* and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy // Anti-Cancer Agents in Med. Chem. 2008. V. 8. № 6. P. 683–697.
15. Mironov A.F., Lebedeva V.S. Cyclic N-hydroxyimides in a series of chlorins and porphyrins // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. P. 905–908.

16. Миронов А.Ф. Разработка сенсibilизаторов второго поколения на основе природных хлорофиллов // Рос. хим. журнал. 1998. Т. 1, № 4, С. 23–26.
17. Mironov A.F., Grin M.A., Tsirovskiy A.G. Synthesis of the first N-hydroxycycloimide in bacterio-chlorophyll *a* series // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2002. V. 6. № 5. P. 358–361.
18. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruziyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J.-C., Vigny P. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin *p*₆ // Photochem. Photobiol. 2004. V. 79. P. 172–188.
19. Karmakova T., Feofanov A., Pankratov A., Kazachkina N., Nazarova A., Yakubovskaya R., Lebedeva V., Ruziyev R., Mironov A., Maurizot J.-C., Vigny P. Tissue distribution and *in vivo* photosensitizing activity of 13,15-N-(3-hydroxypropyl)cycloimide chlorin *p*₆ and 13,15-N-methoxycycloimide chlorin *p*₆ methyl ester // Photochem. Photobiol. B: Biology. 2006. V. 82. P. 28–36.
20. Brandis A., Mazor O., Neumark E., Rozenbach-Belkin V., Salomon Y., Scherz A. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: Synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins // Photochem. Photobiol. 2005. V. 81. P. 983–992.
21. Pandey R.K., Sumlin A.B., Constantine S., Aoudia M., Potter W.R., Bellnier D.A., Henderson B.W., Rodgers M.A., Smith K.M., Dougherty T.J. Synthesis, photophysical properties and photodynamic efficacy // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64 (1). P. 194–204.
22. Boyle R., Dolphin D. Structure and biodistribution relationship of photodynamic sensitizer // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. P. 469–485.
23. Миронов А.Ф., Ципровский А.Г., Грин М.А., Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Лощенов В.Б., Барышников А.Ю. Фотодинамически активная субстанция на основе производных бактериохлорина *p*, способ ее получения, фотосенсибилизатор на ее основе и способ фотодинамической терапии с его использованием : пат. 2411943 Рос. Федерация. № 2009113808/15; заявл. 14.04.2009; опубл. 20.02.2011, Бюл. № 5, 13 с.
24. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Миронов А.Ф., Грин М.А., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Цыганков А.А. Препарат для фотодинамической терапии и способ фотодинамической терапии рака с его использованием : заявка № 2012153433/15 (085004), 2012 г. Положительное решение о выдаче патента на изобретение от 25.03.2014.
25. Sharonov G.V., Karmakova T.A., Kassies R., Pljutinskaya A.D., Refregiers M., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F., Grin M.A., Maurizot J.-C., Vigny P., Otto C., Feofanov A.V. Cycloimide bacteriochlorin *p* derivatives: Photodynamic properties, cellular- and tissue distribution // Free Radicals Biol. Med. 2006. V. 40. P. 407–419.
26. Mironov A.F., Kozyrev A.N., Brandis A.S. Sensitizers of second generation for photodynamic therapy of cancer based on chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives // Proc. SPIE. 1992. V. 1922. P. 204–208.
27. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 936–942.
28. Zharkova N.N., Kozlov D.N., Polivanov Yu.N. [et al.] Laser-excited fluorescence spectro-photometric system for tissue diagnostics // SPIE. 1994. V. 2328. P. 196–201.

THE NOVEL HIGHLY EFFECTIVE IR-PHOTOSENSITIZER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER

I.V. Pantyushenko¹, M.A. Grin^{1,@}, R.I. Yakubovskaya², E.A. Plotnikova², N.B. Morozova², A.A. Tsygankov³, A.F. Mironov¹

¹M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

²P.A. Herten Moscow Institute of Oncology, Moscow, 125284 Russia

³Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

@Corresponding author e-mail: michael_grin@mail.ru

The present article is devoted to the synthesis and investigation of biological and physico-chemical properties of the bacteriopurpurinimide derivative that was used as a photosensitizer. These substances have an ability to accumulate selectively in the malignant tumours. Also this class of photosensitizers is of particular interest because of their strong light absorption spectrum in red and NIR-region in the "window of tissue transparency". This property affords to treat deep-seated tumours at the depth of 2 cm. In this study it was implemented the method of photodynamic therapy of cancer. The photosensitizer for this study was prepared as the nanostructured water-soluble micellar dispersion of O-propyloxime-N-propoxybacteriopurpurinimide methyl ester. The photodynamic therapy using this substance provided the highly effective photoinduced antitumour *in vitro* and *in vivo* activity, 100% regression of the tumour and 90% cure of animals.

Keywords: bacteriochlorophyll *a*, bacteriopurpurin, bacteriopurpurinimide, photosensitizer, photodynamic therapy, malignant tumours.