

СИНТЕЗ ГЕПТИЛАМИДА ХЛОРИНА e_6 И ЕГО ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ФЕРРОКОМПЗИТАХ

Л. Х. Комиссарова, Н. А. Марнаутов, Н. Л. Горбунова, А. Б. Елфимов

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
Поступила в редакцию 02.06.2020 г.

Аннотация. Целью исследования является синтез потенциального фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии опухолей гептиламида хлорина e_6 , его иммобилизация на феррокомпозитах и оценка их сорбционной эффективности. Синтезирован потенциальный фотосенсибилизатор 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e_6 путем химической модификации феофорбида *a*. Реакцию раскрытия циклопентанового кольца проводили в инертной атмосфере в присутствии или отсутствии диметилформамида. При проведении реакции брали различные количественные соотношения амина и феофорбида *a* (амин/феофорбид $a = 10/1, 30/1$). Синтез гептиламида контролировали методами тонкослойной хроматографии и электронной спектроскопии. Полученный амид хлорина e_6 очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле. Впервые проведена иммобилизация гептиламида хлорина e_6 на нано- и микрочастицах феррокомпозитов различного химического состава. В работе использовали наночастицы железа состава: 90-92% Fe металлического и 8-10% Fe_3O_4 , и композит железо-двуокись кремния ($FeSiO_2$) с различным содержанием Fe и SiO_2 с размером частиц 0.1-0.2 мкм и микрочастицы железо-углерода (FeC) с размером частиц 1-2 мкм. Иммобилизацию гептиламида хлорина e_6 на феррокомпозитах проводили путем инкубации суспензии микрочастиц в 0.85% NaCl в растворе гептиламида хлорина e_6 в хлороформе. Поверхность частиц железа была модифицирована желатином и декстраном. Для покрытия частиц использовали 0.1% растворы желатина или декстрана (Mm 15-25 тыс. Da) в 0.85% NaCl. Наиболее высокая сорбционная емкость гептиламида хлорина e_6 обнаружена для наночастиц железа, модифицированных желатином (73.4 мг/г) и нанокompозита железо-двуокись кремния (60.5 мг/г). Обсуждается механизм иммобилизации гептиламида хлорина e_6 на феррокомпозитах и возможность разработки на их основе магнитоуправляемых препаратов гидрофобных амидов хлорина e_6 для направленной доставки в опухоль при фотодинамической терапии.

Ключевые слова: химическая модификация феофорбида *a*, гептиламид хлорина e_6 , фотосенсибилизатор, нано- и микрочастицы феррокомпозитов, модификация поверхности частиц, иммобилизация, сорбционная емкость, фотодинамическая терапия.

Проблема применения магнитоуправляемых нано- и микрочастиц в медицине является одним из самых актуальных направлений высоких технологий. На основе высокодисперсных частиц феррокомпозитов (ФК) разработаны новые методы диагностики и терапии злокачественных новообразований: МРТ-диагностика, иммуноанализ, гипертермия опухолей, магнитоуправляемый транспорт и локализация в опухоли лекарственных препаратов [1-9]. Для нерастворимых в воде лекарственных средств, включая гидрофобные фотосенсибилизаторы (ФС), были синтезированы их липосомальные формы. Применение ли-

посомальных форм гидрофобных ФК [10-12], в том числе, магнитоуправляемых липосомальных форм [13, 14], позволяет использовать инъекционные формы препаратов, а также уменьшить общую токсичность и повысить селективность. Однако, синтез липосомальных форм лекарственных средств является достаточно трудоемким. Кроме того, липосомальные формы препаратов требуют специальных условий для хранения. Другим подходом является использование в качестве носителей для направленной доставки препаратов, в том числе, гидрофобных ФС нано- и микроразмерных композитов на основе железа [15, 16]. В работе Zhiwei Li и коллег [17] в опытах на животных обнаружено торможение роста опухоли в результате фотодинамической терапии при использовании

пегелированных нанокластеров оксида железа, нагруженные хлорином e_6 .

Целью исследования является: синтез потенциального фотосенсибилизатора 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e (гептиламид хлорина e_6), его иммобилизация на нано- и микрочастицах ФК (0,1-2 мкм) различного химического состава и оценка их сорбционной эффективности.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтез 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e_6

В качестве исходного соединения для синтеза гептиламида хлорина e_6 использовался феофорбид a , который легко реагирует по механизму нуклеофильного замещения с размыканием циклопентанового фрагмента при действии аминов с образованием амидов хлорина e_6 (рис. 1) [18].

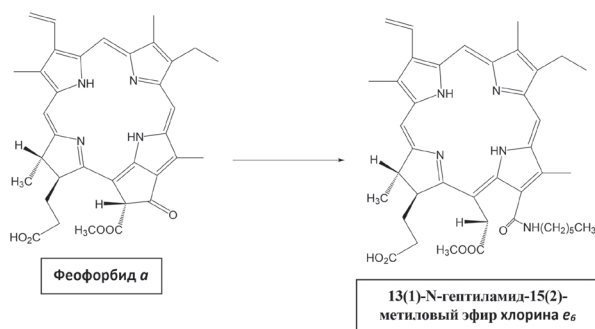


Рис. 1. Схема получения 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e_6 .

При проведении реакции брали различные количественные соотношения амина и феофорбида a (амин/феофорбид $a = 10/1, 30/1$). Реакции раскрытия циклопентанового кольца проводились в инертной атмосфере в присутствии или отсутствии диметилформамида (ДМФА). ДМФА использовался для сольватации переходного состояния, за счет чего удалось уменьшить время протекания реакции, не уменьшая при этом нуклеофильность аминогруппы первичного амина. Контролировали синтез амида по данным ТСХ (рис. 2) и электронной спектроскопии (рис. 3). При наложении электронных спектров феофорбида a и амида хлорина e_6 наблюдали гипохромный сдвиг в области полосы Soret.

После завершения реакции удаляли непрореагировавший амин с помощью образования водорастворимой соли, для этого промывали реакционную смесь 0,1 N раствором соляной кислоты. Далее экстрагировали хлороформом

и промывали водой до нейтрального значения среды. Полученный амид хлорина e_6 очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле. Элюировали в системе хлороформ – изопропанол. Чистоту фракций вещества контролировали методами ТСХ и электронной спектроскопии. Целевые фракции объединяли, отфильтровав от силикагеля, упаривали и остаток переосаждали из смеси ацетон/гексан. После образования осадка проводили фильтрацию в вакууме. Затем осадок сушили в эксикаторе под вакуумом над P_2O_5 .

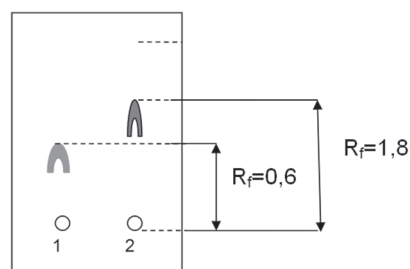


Рис. 2. Контроль процесса образования 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e_6 хроматографическим методом (ТСХ) на пластинках с закреплённым слоем силикагеля (Sorbfil, Россия), (1) – стандарт – феофорбид a , (2) – реакционная смесь.

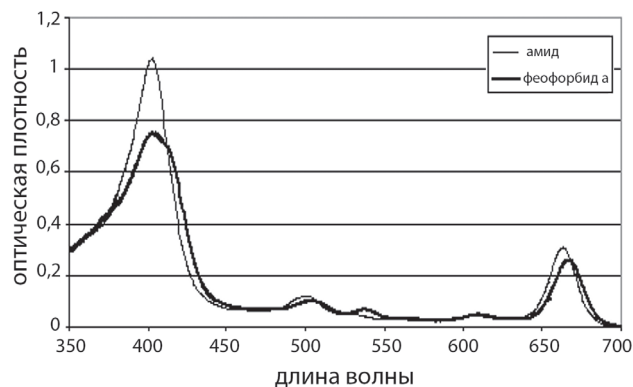


Рис. 3. Электронный спектр феофорбида a и гептиламида хлорина e_6 в хлороформе.

Химический состав феррокомпозитов

В работе использовались ФК различного химического состава: наночастицы железа состава: 90-92% Fe металлического и 8-10% Fe_3O_4 , и железо-двуокиси кремния ($FeSiO_2$) с различным содержанием Fe и SiO_2 с размером частиц 0,1-0,2-мкм, синтезированные плазмо-химическим методом [19], микрочастицы железо-углерода (FeC) с размером частиц 1-2-мкм, синтезированные методом низкотемпературного пиролиза [20]. Поверхность наночастиц железа была модифицирована желатином или декстраном [21].

Модификация поверхности феррокомпози- тов

Частицы ФК в растворе образуют конгломераты. Для разбивки конгломератов и получения однородной по размерам и магнитным свойствам суспензии проводили ультразвуковое диспергирование суспензии частиц в воде с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН-Т при температуре 3-5°C. Модификацию поверхности частиц проводили желатином или декстраном (Sigma). Для покрытия частиц желатином использовали 0.1% желатин в 0.85% NaCl, для покрытия декстраном - 0.1% декстран Mm 15-25 тыс. Da в 0,85% NaCl.

Иммобилизация гептиламида хлорина e_6 на феррокомпозитах

Иммобилизацию гептиламида хлорина e_6 на ФК проводили путем инкубации 1% суспензии частиц в 0.85% NaCl в растворе гептиламида хлорина e_6 концентрацией 0.1 мг/мл в хлороформе при весовых отношениях ФК/гептиламид 10/1 в течение 1 часа при температуре 20-22°C при перемешивании. Затем частицы с адсорбированным гептиламидам хлорина e_6 осаждали на самарий-кобальтовом магните индукцией 0.15 Тл и снимали электронный спектр поглощения супернатанта на спектрофотометре СФ-2000 в видимой области. Сорбцию гептиламида хлорина e_6 рассчитывали по формуле:

$$\text{Сорбция}(\%) = \frac{D_{\text{контр}} - D_{\text{обр}}}{D_{\text{контр}}} \times 100$$

$D_{\text{контр}}$ и $D_{\text{обр}}$ - значения оптической плотности супернатанта для полосы Сорс (410 nm).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 4 представлены спектры поглощения гептиламида хлорина e_6 после адсорбции на ФК при разных соотношениях ФК/гептиламид.

На рис. 5 показана кривая адсорбции гептиламида хлорина e_6 на композите FeSiO₂.

Сорбционные характеристики микрочастиц ФК для гептиламида хлорина e_6 представлены в таблице 1.

Из представленных данных видно, что наибольший процент сорбции и сорбционной емкости гептиламида хлорина e_6 обнаружены для наночастиц железа, модифицированных желатином

(73.4.%) и наночастиц FeSiO₂ (60.5%). Очевидно, что адсорбция гептиламида e_6 происходит на границе раздела фаз вода/хлороформ. Можно предположить, что иммобилизация гептиламида хлорина e_6 осуществляется за счет формирования водородных связей между поляризованными молекулами воды в гидратном слое поверхности сорбентов, который наиболее характерен для покрытого желатином железа, и отрицательно заряженными карбоксильными группами амида и в некоторой степени ион-дипольными взаимодействиями. Уменьшение адсорбции гептиламида хлорина e_6 для композитов FeSiO₂ с увеличением содержания SiO₂ в композите (рис.5) может быть обусловлено уменьшением поляризации молекул воды на поверхности сорбента.

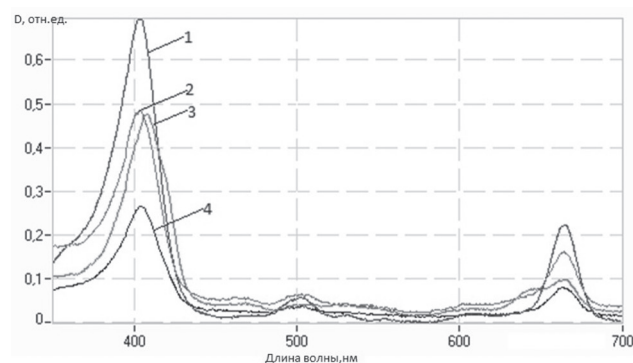


Рис. 4. Спектры поглощения гептиламида хлорина e_6 в хлороформе до адсорбции и после адсорбции на композитах FeGel при разных весовых отношениях ФК/гептиламид: (1) - контроль, (2) – ФК/гептиламид = 2, (3) – ФК/гептиламид = 5, (4) – ФК/гептиламид = 10.

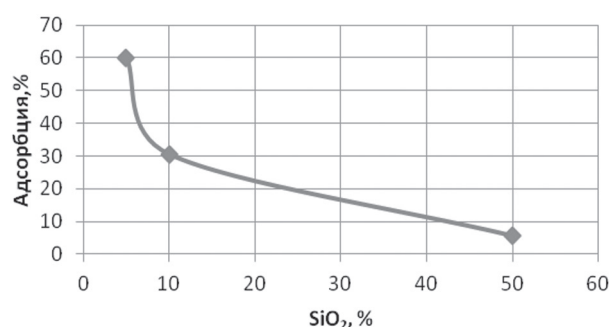


Рис. 5. Адсорбция гептиламида хлорина e_6 в хлороформе на композите FeSiO₂ в зависимости от содержания SiO₂.

Таблица 1

Сорбционные характеристики ФК для гептиламида хлорина e_6 (ГА) в хлороформе при весовых отношениях ФК/ГА = 10/1

Показатели	Тип сорбента				
	Fe	FeC	FeDex	FeGel	FeSiO ₂ (SiO ₂ , 5%)
Сорбция, %, $M \pm m$	54 ± 7	56 ± 6	53 ± 7	73 ± 8	61 ± 6
Сорб. емк., мг/г, $M \pm m$	54 ± 7	56 ± 6	53 ± 7	73 ± 8	61 ± 6

ФК с иммобилизованным гептиламидом хлорина e_6 являются магнитоуправляемыми в магнитных полях индукцией 0,15Тл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован потенциальный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии опухоли 13(1)-N-гептиламида-15(2)-метилового эфира хлорина e_6 путем химической модификации феофорбида а. Впервые проведена иммобилизация гептиламида хлорина e_6 на нано- и микрочастицах феррокомпозитов различного химического состава. Высокие сорбционные характеристики нано-феррокомпозитов к гептиламиду хлорина e_6 : железо, модифицированное желатином и композит $FeSiO_2$, а также их способность быть магнитоуправляемыми под действием внешнего магнитного поля свидетельствуют о перспективности исследований по разработке на их основе магнитоуправляемых препаратов гидрофобных фотосенсибилизаторов - амидов хлорина e_6 для направленной доставки в опухоль при фотодинамической терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брусенцов Н.А, Байбуртский Ф.С, Комиссарова Л.Х, Филиппов В.И., Тарасов В.В. // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36. № 4 .С. 32-40.
2. Gao J., Gu H and Xu B. // Accounts of chemical research 2009. Vol. 42. No. 8. pp. 1097-1107.
3. Mohammed L., Goma H. G., Ragab D., Zhu J. // Particuology. 2017. Vol. 30. pp. 1-14.
4. Pastucha M., Farka Z., Lacina K., Mikusova Z., Skladal P. // Microchimica Acta. 2019. Vol. 186. No. 5. pp. 312.
5. Anselmo A.C., Mitragotri S. // The AAPS journal. 2015. Vol. 17. No. 5. pp. 1041-1054.
6. Amiri M., Salavati-Niasari M., Akbari A. // Advances in Colloid and Interface Science. 2019. Vol. 265. pp. 29-44.
7. Xin Y., Huang Q., Tang J.Q., Hou X.Y., Zhang P., Zhang L.Z., Jiang G. // Cancer letters. 2016. Vol. 379. No. 1. pp. 24-31.
8. Liu J., Li M., Luo Z., Dai L., Guo X., Cai K. // Nano Today. 2017. Vol. 15. pp. 56-90.
9. Ulbrich K., Hola K., Subr V., Bakandritsos A., Tucek J., Zboril R. // Chemical reviews. 2016. Vol. 116. No. 9. pp. 5338-5431.
10. Минаева О.В., Зырняева Н.Н., Куликов О.А., Жарков М.Н., Юрлов И.А., Бродовская Е.П. // Современные проблемы науки и образования. 2015. №6. С. 33-38.
11. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Smirnova Z. // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2014. Vol. 24. No. 4. pp. 315-319.
12. Gushchina O.I., Gramma V.A., Larkina E.A., Mironov A.F. // Mendeleev Commun. 2017. Vol. 27. pp. 50-52.
13. Марнаутов Н.А., Комиссарова Л.Х., Татиколов А.С., Голощапов А.Н., Ларкина Е.А. Патент РФ, № RU 2 697 802 C1, 2018.
14. Rodrigues A.R.O., Ramos J.M., Gomes I.T., Almeida B.G., Araujo J.P., Queiroz M.J.R., Castanheira E.M. // RSC advances. 2016. Vol. 6. No. 21. pp. 17302-17313.
15. Cheng C., Xu F., Gu H. // New Journal of Chemistry. 2011. Vol. 35. No. 5. pp. 1072-1079.
16. Panda J., Satapathy B. S., Majumder S., Sarkar R., Mukherjee B., Tudu B. // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2019. Vol. 485. pp. 165-173.
17. Zhiwei Li, Chao Wang , Liang Cheng, Hua Gong, Shengnan Yin, Qiufang Gong, Yonggang Li, Zhuang Liu. // Biomaterials. 2013. No. 34. pp. 9160-9170.
18. Ларкина Е.А., Буй Т.Л., Ткачевская Е.П., Миронов А.Ф. // Вестник МИТХТ. 2008. Т. 3. № 2. С. 104-106.
19. Кутушов М.В., Комиссарова Л.Х., Глухоедов Н.П. Патент РФ, № 2109522, 1998.
20. Самойлов И.Б., Комиссарова Л.Х., Кузнецов А.А. Патент РФ, № 2547740, 2015.
21. Komissarova L.K., Feofanov, V.S. Chemical Technology: Key Developments in Applied Chemistry, Biochemistry and Materials Science. Canada, 2016, pp. 75-87.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

*Комиссарова Л. Х., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
E-mail: komissarova-lkh@mail.ru

Марнаутов Н. А., младший научный сотрудник
E-mail: n.marnautov@gmail.com

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences

*Komissarova L. Kh., PhD., Senior Researcher
E-mail: komissarova-lkh@mail.ru.

Marnautov N. A., junior researcher
E-mail: norron@mail.ru.

Горбунова Н. Л., студент
E-mail: registration.1@list.ru

Gorbunova N. L., student
E-mail: registration.1@list.ru

Елфимов А. Б., младший научный сотрудник
E-mail: elfimov_anton@mail.ru

Elfimov A. B., junior researcher
E-mail: elfimov_anton@mail.ru

CHLORINE E₆ HEPTYLAMID SYNTHESIS AND ITS IMMOBILIZATION ON FERROCOMPOSITES

L. Kh. Komissarova, N. A. Marnautov, N. L. Gorbunova, A. B. Elfimov

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences

Abstract. The aim of the investigation is the synthesis of heptylamid chlorine e₆ – a potential photosensitizer for photodynamic therapy of tumors, its immobilization on ferrocomposites and evaluation of their sorption efficiency. The potential photosensitizer 13(1)-N-heptylamid-15(2)-methyl ether of chlorine e₆ has been synthesized by chemical modification of feoforbid a. The reaction of opening the ciclopentan ring was performed in an inert environment in the presence or in the absence of dimethylformamide. At conducting the reaction different amount ratios of amin to feoforbid a = 10/1, 30/1 were taken. The synthesis of heptylamid was controlled by the methods of thin-layer chromatography and electronic spectroscopy. The obtained amid chlorine e₆ was cleaned by colon chromatography method on silicagel. The immobilization of heptylamid chlorine e₆ on nano- and microparticles of the ferrocomposites of different chemical composition was performed for the first time. There were used the iron nanoparticles of the composition: 90-92 % of metallic Fe and 8-10 % of Fe₃O₄ and composite FeSiO₂ with the different content of Fe and SiO₂ with the size of the particles 0.1-0.2 mkm and iron-carbon (FeC) microparticles with the size of the particles 1-2 mkm. The immobilization of heptylamid chlorine e₆ on the ferrocomposites was performed by incubating the particles' suspension in 0.85% NaCl in heptylamid solution in chloroform. The surface of the iron particles was modified by gelatin or dextran. 0.1% solutions of gelatin or dextran (Mm 15-25 000 Da) in a physiological solution were used for covering the particles. The highest sorption capacity of heptylamid chlorine e₆ has been detected for the iron nanoparticles modified by gelatin (73.4 mg/g) and FeSiO₂ nanocomposite (60.5 mg/g). The mechanism of heptylamid chlorine e₆ immobilization on ferrocomposites and the possibility of working out on their basis magnetic-operated preparations of hydrophobic chlorine e₆ derivatives for targeted delivery into the tumor at photodynamic therapy are discussed.

Keywords: chemical modification of feoforbid a, heptylamid chlorine e₆, photosensitizer, nano- and microparticles of ferrocomposites, modification of the particles' surface, immobilization, sorption capacity, photodynamic therapy.

REFERENCES

1. Brusentsov N.A, Baiburtskii F.S, Komissarova L.Kh, Filippov V.I., Tarasov V.V., Pharmaceutical Chemistry Journal, 2002, Vol. 36, No. 4, pp. 32-40.
2. Gao J., Gu H and Xu B., Accounts of chemical research, 2009, Vol. 42, No. 8, pp. 1097-1107.
3. Mohammed L., Gomaa H. G., Ragab D., Zhu J., Particuology, 2017, Vol. 30, pp. 1-14.
4. Pastucha M., Farka Z., Lacina K., Mikusova Z., Skladal P., Microchimica Acta, 2019, Vol. 186, No. 5, pp. 312.
5. Anselmo A.C., Mitragotri S., The AAPS journal, 2015, Vol. 17, No. 5, pp. 1041-1054.
6. Amiri M., Salavati-Niasari M., Akbari A., Advances in Colloid and Interface Science, 2019, Vol. 265, pp. 29-44.
7. Xin Y., Huang Q., Tang J.Q., Hou X.Y., Zhang P., Zhang L.Z., Jiang G., Cancer letters, 2016, Vol. 379, No. 1, pp. 24-31.
8. Liu J., Li M., Luo Z., Dai L., Guo X., Cai K., Nano Today, 2017, Vol. 15, pp. 56-90.
9. Ulbrich K., Hola K., Subr V., Bakandritsos A., Tucek J., Zboril R., Chemical reviews, 2016, Vol. 116, No. 9, pp. 5338-5431.
10. Minaeva O.V., Zyrnyaeva N.N., Kulikov O.A., Zharkov M.N., Yurlov I.A., Brodovskaya E.P., Modern Problems of Science and Education, 2015, No. 6, pp. 33-38.
11. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Smirnova Z., Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2014, Vol. 24, No. 4, pp. 315-319.

12. Gushchina O.I., Gramma V.A., Larkina E.A., Mironov A.F., Mendeleev Commun, 2017, Vol. 27, pp. 50-52.
13. Marnautov N.A., Komissarova L.Kh., Tati-kolov A.S., Goloshchapov A.N., Larkina E.A. Patent RF, no. RU 2 697 802 C1, 2018.
14. Rodrigues A.R.O., Ramos J.M., Gomes I.T., Almeida B.G., Araujo J.P., Queiroz M.J.R., Castan-heira E.M., RSC advances, 2016, Vol. 6, No. 21, pp. 17302-17313.
15. Cheng C., Xu F., Gu H., New Journal of Chemistry, 2011, Vol. 35, No. 5, pp. 1072-1079.
16. Panda J., Satapathy B. S., Majumder S., Sar-kar R., Mukherjee B., Tudu B., Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2019, Vol. 485, pp. 165-173.
17. Zhiwei Li, Chao Wang , Liang Cheng, Hua Gong, Shengnan Yin, Qiufang Gong, Yonggang Li, Zhuang Liu., Biomaterials, 2013, No. 34, pp. 9160-9170.
18. Larkina E.A., Bui T.L., Tkachevskaya E.P., Mironov A.F., Fine Chemical Technologies (Vestnik. MITHT), 2008, Vol. 3, No. 2, pp. 104-106.
19. Kutushov M.V., Komissarova L.Kh., Gluk-hoedov N.P. Patent RF, no. 2109522, 1998.
20. Samoilov I.B., Komissarova L.Kh., Kuznetsov A.A. Patent RF, no. 2547740, 2015.
21. Komissarova L.Kh., Feofanov, V.S. Chemical Technology: Key Developments in Applied Chem-istry, Biochemistry and Materials Science. Canada, 2016, pp. 75-87.