



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Optimal photosensitizers for photodynamic therapy : the preparation and characterization of novel photosensitizers derived from mesoporphyrin

Haas, H.H.S. van der

Citation

Haas, H. H. S. van der. (2006, June 14). *Optimal photosensitizers for photodynamic therapy : the preparation and characterization of novel photosensitizers derived from mesoporphyrin*. Department Bio-Organic Photochemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11405>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/11405>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

IJzer- en magnesiumporfyrynes zijn essentieel in levende organismen (**hoofdstuk 1**). Het rood gekleurde zuurstof bevattende onderdeel van het bloedeiwit hemoglobine is heem. Heem is het ijzer(II) complex van protoporfyrine IX. In planten is het magnesium bevattende chlorophyll verantwoordelijk voor de eerste stap in fotosynthese: absorptie van licht gevolgd door de omzetting van de lichtenergie in redox equivalenten. De absorptie van licht door een porfyrimolecuul leidt tot het aanslaan van de porfyryne naar de aangeslagen singlet toestand waarna omzetting naar de triplet toestand plaats vindt. Zodra een zuurstof molecuul in contact komt met dit aangeslagen molecuul wordt de energie overgedragen naar dit zuurstof molecuul onder vorming van singlet zuurstof, welke een zeer reactieve en giftige vorm van zuurstof is. In heem voorkomt het aanwezige ijzer de vorming van singlet zuurstof door de triplet toestand uit te doven terwijl in planten carotenen verantwoordelijk zijn voor het uitdoven van deze triplet toestand. Mensen en dieren met een bepaalde genetische afwijking die leidt tot de ophoping van vrije porfyryne basen in de huid worden zeer lichtgevoelig door de vorming van singlet zuurstof wat leidt tot het ontstaan van oedema en wonden. In water heeft singlet zuurstof een zeer korte levensduur (3.1 μ s) dat betekent dat er alleen schade wordt veroorzaakt waar de singlet zuurstof gevormd wordt.

Wanneer een porfyryne zich specifiek ophoopt in een tumor zal bestraling met licht leiden tot de vernietiging van de tumor. Op dit principe is fotodynamische therapie (PDT) gebaseerd. Doel van dit project is het ontwikkelen van een nieuwe fotosensibilisatoren voor toepassing in (PDT). Hemine, een makkelijk verkrijgbare verbinding en goedkoop, is de grondstof van waaruit deze nieuwe fotosensibilisatoren gemaakt worden. Photofrin[®] is momenteel de populairste fotosensibilisator voor PDT en ook gebaseerd op heem maar heeft een aantal nadelen: het is een mengsel van instabiele verbindingen en heeft slechts een zwakke absorptie bij 635 nm in het rode gedeelte van het zichtbaar licht spectrum waar het doordringingsvermogen van licht in weefsel nog verre van optimaal is. In dit project wordt gestreefd naar de ontwikkeling van een nieuwe fotosensibilisator die niet giftig is in het donker, stabiel is onder zowel donkere als lichte omstandigheden en met een sterke absorptie bij een golflengte langer dan 650 nm waar licht een veel beter doordringingsvermogen heeft.

In **hoofdstuk 2** wordt de synthese van nieuwe fotosensibilisatoren gebaseerd het van heem afgeleide mesoporfyrine beschreven. Het nikkel(II) complex van mesoporfyrine dimethylester

Samenvatting

is geformyleerd via de Vilsmeier-Haack methode. De vier isomere producten die hierbij zijn gevormd zijn geïsoleerd en gekarakteriseerd. Wadsworth-Emmons koppeling met het anion van diethylfosfonoacetonitril geeft omzetting van de vier aldehydes naar de corresponderende *meso*-acrylnitril derivaten. Reactie van deze acrylnitril systemen bij 180°C met trichloorazijnzuur resulteert in de vorming van de Ni(II)-complexen van geheel nieuwe achirale *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines. Na verwijdering van nikkel zijn de vier corresponderende vrije basen quino[4,4a,5,6-*efg*]-geanneleerd 7-demethyl-8-deethyl-mesoporfyrine dimethyl ester **6a**, 2-(methoxycarbonyl)quino-[4,4a,5,6-*jkl*]-geanneleerd 12-demethyl-13-de[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]mesoporfyrine dimethyl ester **6b**, 2-(methoxycarbonyl) quino[4,4a,5,6-*qrs*]-geanneleerd 18-demethyl-17-de(2-methoxy-carbonylethyl)-mesoporfyrine dimethyl ester **6c** en quino[4,5,6,7-*abt*]-geanneleerd 2-demethyl-3-deethyl-mesoporfyrine dimethyl ester **6d** verkregen. De structuren van deze systemen zijn ondubbelzinnig vastgesteld met behulp van massa spectroscopie en met een uitgebreide reeks van NMR-technieken. Op dezelfde wijze zijn etioporfyrine en octaethylporfyrine omgezet in de corresponderende *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines, waaruit blijkt dat de vorming van *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines een algemene reactie is in de porfyrine chemie en dat deze reactie een breed toepassingsgebied in de porfyrine chemie zal hebben. Daarnaast is er een zeer aannemelijk mechanisme opgesteld voor deze reactie.

Als een eerste test voor de gebruiksmogelijkheden van deze systemen als fotosensibilisatoren in een therapie met ver-rood licht is de quantum opbrengst van singlet zuurstof door verbinding **6a** in toluen bestudeerd. Deze quantum opbrengst is 0.77 wat zelfs hoger is dan de singlet zuurstof opbrengst van gesensibiliseerd *meso*-tetraphenylporfyrine. Een tweede test is gedaan op ovarium-cellen van de Chinese hamster (CHO-cellen). Wanneer deze ovarium-cellen in het donker worden geïncubeerd in een medium dat tot 15 µg/mL van verbinding **6a** bevat blijft vrijwel 100% van CHO-cellen in leven. Dit geeft aan dat in het donker **6a** niet giftig is voor deze ei-cellen. Echter wanneer de CHO-cellen die zijn behandeld in een medium dat 1 µg/mL of meer van verbinding **6a** bevat gedurende 15 minuten worden belicht met wit licht van een intensiteit van 30 mW/cm² blijken na belichting alle ovarium-cellen gedood te zijn. Op basis van deze gegevens verwachten we dat elk van de vier achirale systemen veelbelovende eigenschappen hebben om de basis te vormen van een fotodynamische therapie met langgolvig rood licht. Het feit dat deze verbindingen niet chiraal zijn is een extra voordeel in medische toepassingen, omdat hierdoor wordt voorkomen dat medische eigenschappen van afzonderlijke enantiomeren onderzocht moet worden.

In **hoofdstuk 3** wordt het sterisch gehinderde nickel(II) complex van 5-(2-cyanovinyl)meso-porfyrine dimethylester behandeld met *N*-methylformanilide onder Vilsmeier-Haack condities. Dit leverde naast de te verwachten *meso*-formylporfyrine derivaten ook 22% van een nieuwe groene verbinding op. Na verwijdering van Ni(II) door behandeling met geconcentreerd zwavelzuur is de structuur van deze nieuwe verbinding opgehelderd met behulp van massa spectroscopie en met ¹H- en ¹³C-NMR spectroscopie wat tot de ondubbelzinnige vaststelling heeft geleid dat dit het nog nooit eerder beschreven 2'-cyano-8'-formyl-*N*'-methyl-1,1a,5a,6-tetrahydroacrido[4,5,5a,6-*bcd*]-geanneleerd 2,3-dihydromeso-porfyrine dimethylester **5** is, welke verkregen is als racemisch mengsel. Dit racemische mengsel kon op eenvoudige wijze gescheiden worden in de twee zuivere enantiomere vormen via HPLC over een chirale kolom. Beide enantiomeer zuivere vormen vertonen een identiek elektronisch spectrum vergeleken met het racemische mengsel. De twee optisch zuivere vormen geven exact het tegengestelde CD-spectrum. De structuur van deze nieuwe verbinding is ontegenzeggelijk ontstaan doordat de eerste aanval van het carbenium ion dat wordt gevormd uit *N*-methylformamide en fosfor oxychloride plaatsvindt op de α -koolstof van de *meso*-acrylnitril zijketen. Deze reactie is een tot nu toe nog nooit beschreven cyclisatie onder Vilsmeier-Haack condities. Het is duidelijk dat in dit geval het aromatische systeem van het Vilsmeier-Haack reagens essentieel is voor de reactie.

Bij het verder onderzoeken van de reactiviteit van het uitgangsmateriaal werd deze behandeld met het Vilsmeier-Haack reagens uit dimethylformamide en fosfor oxychloride. In dit geval werd naast de te verwachten *meso*-formyleringsproducten een mengsel van wederom twee *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines verkregen. Vergelijking van de structuren van de producten en uitgangsmateriaal kan vastgesteld worden dat in dit geval de eerste aanval van het Vilsmeier-Haack reagens plaatsvindt op de stikstof van de *meso*-acrylonitril zijketen.

De eerste tests op de fotodynamische activiteit van **5** laat zien dat ook dit een efficiënte singlet zuurstof generator die stabiel is onder de experimentele omstandigheden. Deze verbinding is in het donker niet giftig voor longkanker cellen terwijl in aanwezigheid van zuurstof en licht de kankercellen al gedood worden bij concentraties die een orde van grootte lager ligt dan bij de eerder beschreven *peri*-gecondenseerde quinoporfyrine systemen. Dit zijn allemaal veelbelovende eigenschappen voor verdere studies en het ontwikkelen van een fotodynamische therapie gebaseerd op deze fotosensibilisatoren.

In **hoofdstuk 4** wordt een ¹H-NMR-studie gepresenteerd over de eigenschappen van porfyrines met aanhangende amide zijketens. Uit het ¹H-NMR-spectrum van het Zn(II) complex van *N,N*-bis(2,2-diethoxyethyl) mesoporfyrine bisamide in *d*₆-dimethylsulfoxide

Samenvatting

wordt waargenomen dat de $^1\text{H-NMR}$ signalen van de amide zijketens een grote verschuiving naar hoger veld vertonen ten opzichte van de corresponderende signalen van 2,2-diethoxyethylamine. Verder hebben de twee amide zijketens verschillende chemical shift-waarden in hun $^1\text{H-NMR}$ spectrum. Het feit dat de $^1\text{H-NMR}$ -signalen van deze aanhangende zijketens in d_6 -dimethylsulfoxide niet veranderen met de concentratie geeft aan dat deze verschuiving naar hoger veld alleen veroorzaakt kan worden door intramoleculaire interacties. Dit betekent dat de aanhangende amide zijketens teruggevouwen zijn over het porfyriene ringsysteem in een dynamisch evenwicht. Rondom de pyrrool ringen C en D is het porfyriene systeem erg symmetrisch. Het gegeven dat de twee amide zijketens verschillen vertonen in chemical shift waarden kan dan ook alleen worden verklaard door de asymmetrie die voortkomt uit de ordening van methyl- en ethylgroepen op de pyrrool ringen A en B aan de andere kant van het porfyriene ringsysteem. Ook dit geeft aan dat de zijketens teruggevouwen zijn over het porfyriene ringsysteem. Hetzelfde fenomeen werd teruggevonden voor de analoge protoporfyrine en deuteroporfyrine derivaten. In zowel protoporfyrine als in deuteroporfyrine is het verschil tussen de chemical shift waarden van de twee amide zijketens kleiner, omdat dat de substituenten op de posities 3 en 8 van pyrrool ringen A en B minder sterische interactie met de ethoxygroepen van de amide zijketens geven. Soortgelijke resultaten werden gevonden in de $^1\text{H-NMR}$ spectra van de corresponderende vrije basen. In dit geval is de verschuiving naar hoger veld zelfs nog groter wat verklaard wordt doordat bij afwezigheid van een centraal metaalion er ook geen oplosmiddel moleculen aan kunnen coördineren. Door afwezigheid van deze oplosmiddel moleculen kunnen de zijketens dicht bij het porfyriene ringsysteem komen. Modificatie van de amide zijketens heeft geresulteerd in een uitgebreide reeks van porfyriene derivaten met aanhangende amide zijgroepen die terugvouden over het aromatische porfyriene ringsysteem.

Een algemene bespreking van het werk dat is beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 en een bespreking van de toekomst perspectieven omtrent het werk dat is beschreven in dit proefschrift worden gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. Ook worden hier de eerste resultaten uit preklinisch onderzoek naar de biologische eigenschappen van twee van de nieuwe fotosensibilisatoren beschreven. In dit hoofdstuk wordt duidelijk gemaakt dat de chemie zoals die is beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 toegang geeft tot een hele reeks van *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines en tot *peri*-gecondenseerde tetrahydroacrido dihydro-porfyrines. Modificatie van het uitgangsmateriaal zal al toegang geven tot nieuwe verbindingen. Verder kunnen de producten zelf ook nog gemodificeerd worden. Er worden ook enkele suggesties gedaan voor het verder ontwikkelen van de fotosensibilisatoren die zijn

beschreven in dit proefschrift. Bijvoorbeeld in het geval van de *peri*-gecondenseerde quinoporfyrines leidt alkylering van de stikstof van de quinoline stikstof tot een quolinium porfyryne met absorptie bij 755 nm.

Ook de functionele groepen in 2'-cyano-8'-formyl-*N'*-methyl-1,1a,5a,6-tetrahydroacrido[4,5,5a,6-*bcd*]-geanneleerd 2,3-dihydromesoporfyrine zijn erg bruikbaar voor verdere aanpassingen. Preklinisch onderzoek naar de biologische activiteit van zowel quino[4,4a,5,6-*efg*]-geanneleerd 8-deethyl-7-demethylmesoporfyrine (PB07) en van 2'-cyano-8'-formyl-*N'*-methyl-1,1a,5a,6-tetrahydroacrido[4,5,5a,6-*bcd*]-geanneleerd 2,3-dihydromesoporfyrine (PB109) in embryo's in kippeneieren aan de ene kant en in tumoren in muizen aan de andere kant maken duidelijk dat beide fotosensibilisatoren erg veelbelovend zijn voor toepassing in fotodynamische therapie.

