

KONJUGÁTY PORFYRINŮ

PAVLA TOMANOVÁ a MICHAL JURÁŠEK

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6
paja.tomanova@seznam.cz, michal.jurasek@gmail.com*

Došlo 23.10.13, přijato 22.11.13.

Klíčová slova: porfyrin, malý konjugát, fotodynamická terapie, fluorescenční značení

Obsah

1. Úvod
2. Porfyriny
 - 2.1. Magnetická rezonance (MRI)
 - 2.2. Fotodynamická terapie (PDT)
 - 2.3. Vliv buněčné lokalizace konjugátu na iniciaci apoptózy
 - 2.4. Konjugáty porfyrinů
 - 2.4.1. Konjugáty porfyrinů se sacharidy
 - 2.4.2. Konjugáty porfyrinů s peptidy
 - 2.4.3. Konjugáty porfyrinů se steroidem
 - 2.4.4. Konjugát porfyrinu s dendrimerem a dimerní konjugáty porfyrinu
 - 2.4.5. Konjugáty porfyrinů s retinoidy
 - 2.4.6. Konjugát porfyrinu s dalším chromoforem
3. Závěr

1. Úvod

Porfyriny jsou přirozeně se vyskytující látky, které mají ve své základní struktuře tetrapyrrolový makrocycklus. Jsou to barevné sloučeniny s absorpčním maximem nejčastěji kolem 405 nm (tzv. Soretův pás) a dalšími intenzivními absorpčními pásy v oblasti 400 až 800 nm (cit.¹). Po konjugaci s biologicky aktivní látkou tak umožňují využití fotochemických vlastností, které jsou vlastní porfyrinovému skeletu, např. k vizualizaci transportu konjugátu a jeho lokalizace uvnitř buňky.

2. Porfyriny

Porfyriny nacházejí velké uplatnění v klinické praxi a to díky skutečnosti, že mají vlastnosti tzv. fotosenzitizérů (PS). Důležitou roli hrají nejen porfyriny samotné, ale i ve

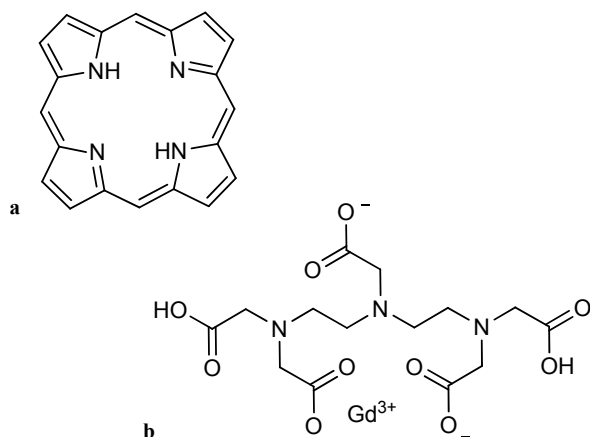
formě konjugátů s polymerními látkami, sacharidy, peptidy a dalšími sloučeninami. Jejich unikátní vlastnosti umožňují široké využití především v oblasti diagnózy a léčby rakoviny. Jsou netoxické a stabilní a mají absorpční maximum pro světlo o vysoké energii (a krátké vlnové délce), které je na rozhraní infračerveného a viditelného spektra. Mají schopnost se selektivně akumulovat v nádorových tkáních^{2,3}, což umožňuje jejich využití při terapii ozařováním i pro cílené směřování léčiva do místa terapeutického působení³.

Existují PS první a druhé generace. První skupina zahrnuje deriváty hematoporfyrinu. Tyto látky nejsou přesně definované a jejich aplikace vyvolává citlivost kůže na sluneční záření. V současné době jsou komerčně dostupné pod různými firemními názvy, např. Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo). Výhodou druhé generace PS je, že nezpůsobují kožní fotosenzitivitu. Jsou to plně definované chemické sloučeniny, mezi které patří především barviva porfyrinového typu, např. ftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny, benzochloriny a purpuriny⁴.

Užívá se několik metod ozařování, v této práci se budeme zabývat dvěma nejvíce diskutovanými – fotodynamickou terapií (PDT – angl. PhotoDynamic Therapy) a magnetickou rezonancí (MRI – angl. Magnetic Resonance Imaging). PDT je metoda sloužící k léčbě zhoubných nádorů citlivých na záření. MRI je metodou diagnostickou, která umožňuje pomocí aktivace fotosenzitizérů zobrazit umístění nádoru v tkáni. V tomto případě mají PS funkci kontrastních látek a jako takové se využívají porfyrinové komplexy manganu (Mn) a gadolinia (Gd) díky své schopnosti efektivně relaxovat vodíky ve vodě⁵.

2.1. Magnetická rezonance (MRI)

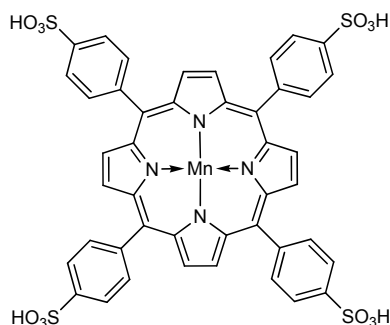
Magnetická rezonance je jednou z nejpobulárnějších diagnostických technik používaných v medicíně, která umožňuje zobrazování vybraných částí těla bez jakéhokoli narušení⁶. Její hlavní nevýhodou jsou vysoké provozní a pořizovací náklady a určité nebezpečí hrozí u pacientů s kardiostimulátory a kovovými materiály v těle. Velmi výhodné je vysoké rozlišení a nepřítomnost ionizujícího záření (na rozdíl od vyšetření CT). Využívá rozdílných intenzit signálů mezi různými měkkými tkáněmi a tím poskytuje morfologické a fyziologické informace o sledovaném objektu⁶. MRI funguje na stejném principu jako nukleární magnetická rezonance (NMR)⁷. Ve chvíli, kdy impuls radiového záření přestane působit a atomy vodíku se začnou vracet do původního stavu, přičemž postupně vyzařují energii, kterou při ozáření absorbovaly, nastává relaxační fáze a právě při ní probíhá měření. Kontrastní látky interagují s vodíky v roztoku a tím zkracují relaxační dobu⁷. Ideální kontrastní látka by měla splňovat několik



Obr. 1. Struktury kontrastních látek (a) porfyrinu; (b) Gd-DTPA

požadavků – urychlovat relaxaci vodíků v tkáni, mít nízkou toxicitu a vysokou specifitu vůči poškozeným tkáním, nebýt z organismu ihned vyloučena (problém u malých molekul), zajistit kontrast i při malých dávkách⁸. Dříve byl nejvíce používanou a komerčně dostupnou kontrastní látkou gadolinium-diethylenetriamin-pentaacetát (Gd-DTPA), který ovšem není selektivní vůči rakovinným tkáním, na rozdíl od porfyrinových chelátorů⁹.

Navíc byl u této látky problém s rychlým vyloučením z organismu vzhledem k její malé molekulové hmotnosti. Nevýhodou Gd-DTPA a podobné kontrastní látky tetraazacyklododekantetraoctové kyseliny (DOTA) je i jejich polarita a v důsledku malá prostupnost přes buněčnou membránu. Proto se často tyto látky inkorporují do lysosomů nebo uhlíkových nanotrubic¹⁰. Porphyrinové komplexy nemají vzhledem k jejich hydrofobicitě s přechodem přes buněčnou membránu problém. Dnes jsou nejvíce využívány komplexy Gd a Mn. Významnou nevýhodou Gd je jeho toxicita a fakt, že Gd^{3+} může vést k nefrogenní systémové fibróze⁶, dalším problémem je velikost iontu. Gadolinium se nevejde do porfyrinového makrocyklu a po vstupu do organismu se rozpadá a tím ztrácí svou účinnost¹¹. Přesto se kontrastní látky s tímto kovem stále vyvíjejí. Příkladem

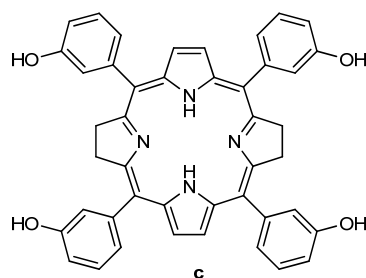
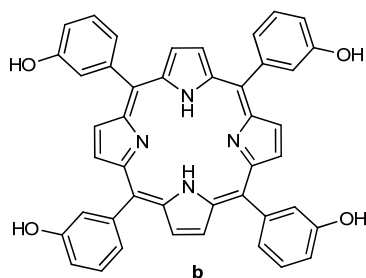
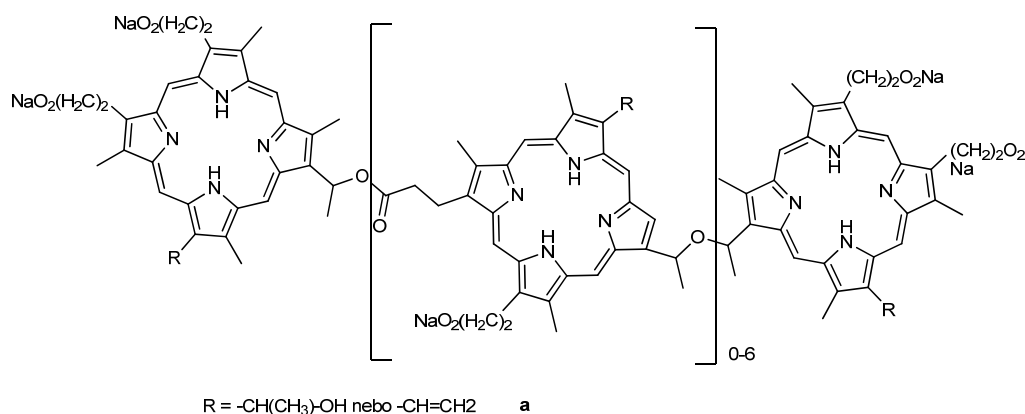
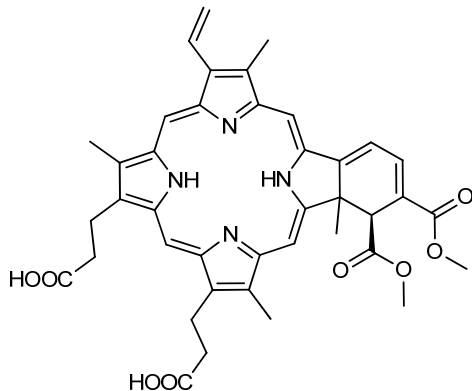


Obr. 2. Mn(III)-meso-tetrakis(p-sulfophenyl)porfyrin

toho je konjugát Gd-DTPA s polyaspartamidem, který se používá jako polymerní nosič léčiv, a porfyrinem, který je přednostně přijímán nádorovými buňkami. Příčina lokalizace porfyrinů v nádorech není známa. Uvažuje se, že možným důvodem je jejich příjem endocytózou za účasti LDL-receptorů, které se vyskytují na povrchu rakovinných buněk více než jinde⁸. Výhodou Mn je jeho přirozený výskyt v těle. Navíc vytváří s porfyriny stabilní komplexy¹¹. Příkladem takového porfyrinového komplexu je Mn(III)-meso-tetrakis(p-sulfophenyl)porfyrin (obr. 2)¹⁰.

2.2. Fotodynamická terapie (PDT)

Výhody fotodynamické terapie jsou především její selektivita vůči rakovinným buňkám (závisí na použitém PS)¹², nulová toxicita fotosenzitizujících látek a fakt, že se řadí mezi neinvazivní metody. Nevýhodou je omezená použitelnost, protože světlo aktivující PS proniká jen pod povrch tkáně a je tedy možné tuto terapii aplikovat pouze na některé typy rakoviny¹³. Tento problém ale v současné době nachází řešení v použití endoskopické laserové technologie¹⁴. Princip fotodynamické terapie je založen na dopravení fotosenzitivní látky přednostně do rychle se množících rakovinných buněk. V minulosti bylo vyzkoušeno více sloučenin, které by mohly zastávat úlohu PS (kyaninová barviva, tetracykliny, fluorescein, eosin), ale nesplňovaly podmínku selektivní lokalizace¹². Vhodnými fotosenzitivními látkami se ukázaly být porfyriny, které jsou za běžných podmínek neškodné, ale po excitaci paprskem určité vlnové délky produkují velmi toxické molekuly. V případě PDT se jedná o vlnovou délku 650 až 900 nm, při které jsou postižené tkáně nejvíce transparentní. V prvním kroku PS absorbuje záření o vhodné vlnové délce a jeden z elektronů ze základního stavu PS je excitován do energeticky bohatšího orbitálu a vzniká tak první excitovaný stav. Ten není příliš stabilní a trvá velmi krátkou chvíli ($\sim 10^{-9}$ s). Ke ztrátě nově nabitě energie může dojít emisí světla (fluorescencí) nebo přeměnou energie na teplo. Třetím způsobem je tzv. mezisystémový přechod, při kterém dochází ke změně spinu excitovaného elektronu. Pokud je spin excitovaného elektronu opačný k jeho párovému elektronu v základním stavu, jedná se o singletový excitovaný stav. V případě shodnosti spinu obou elektronů z páru jde o tripletový excitovaný stav, který má delší dobu trvání ($\sim 10^{-6}$ s). Když je PS v tripletovém excitovaném stavu, mohou nastat dvě situace. V jednom případě může PS získat nebo darovat elektron jakékoli molekule ve své blízkosti. V druhém přenesení energii na molekulu, která je v základním stavu tripletem a obě molekuly přejdou do singletového stavu. Jednou z mála tripletových molekul v základním stavu je molekula kyslíku hojně se vyskytujícího v každé buňce. Kyslík je přeměněn na reaktivní formu excitovaného singletového kyslíku, která je toxická i pro rakovinnou tkáň¹⁵. Toxické tedy nejsou přímo porfyrinové konjugáty, ale vznikající reaktivní formy kyslíku (singletový kyslík, superoxidový a hydroxylový radikál, peroxid vodíku)¹⁶. V poslední době jsou nejvíce používány PS Photofrin® (směs porfyrinových derivátů)

Obr. 3. Struktury Photofrinu® (a), Foscanu® (b), 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyfenyl) bakteriochlorinu¹⁷ (c)

Obr. 4. Struktura Verteporfinu

a Foscan® (syntetický chlorin), avšak tato oblast je stále předmětem aktivního bádání.

Momentálně jsou například prováděny klinické testy bakteriochlorinů¹⁷, které vykazují zvýšenou absorpci při vlnové délce 650–900 nm. Navíc jsou schopny produkce nejen reaktivního singletového kyslíku, ale i superoxidového radikálu, který se také podílí na spuštění apoptózy rakovinných buněk².

Dalším PS schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je verteporfin (Visudyne®).

Tato látka ve spojení s proteinem zajišťujícím selektivitu konjugátu vykazuje silný účinek proti rakovině prsu *in vivo* i *in vitro*. Očekává se její potenciální účinek i proti dalším tumorům přístupným použitému záření, které mají na svém povrchu receptory interagující s příslušným proteinem¹⁸. Samotný verteporfin je ve fázi klinických testů – zkoumají se jeho účinky proti glaukomu^{19,20}. Ukázalo se, že verteporfin příznivě působí proti cévní neovaskularizaci (CNV) a věkem podmíněné makulární degeneraci (AMD), která se léčí PDT s využitím tohoto PS.

2.3. Vliv buněčné lokalizace konjugátu na iniciaci apoptózy

Existují dva druhy buněčné smrti – apoptóza a nekróza. Pro léčbu rakoviny je preferována apoptóza, což je plánovaná a samotnou buňkou řízená buněčná smrt. Druhým typem je nekróza, smrt způsobená vnitřními autolytickými procesy v důsledku narušení některé ze základních buněčných funkcí. Poměr apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci PS a dávce ozáření. Nižší dávky PS a záření způsobují apoptózu, vyšší nekrózu, ovšem při každé aplikaci dochází k oběma typům smrti buněk. Dále má na typ buněčné smrti vliv preferovaná lokalizace PS uvnitř buňky, např. akumulace PS v mitochondrii nebo endoplazmatickém retikulu (ER) vede primárně k apoptóze²¹.

V případě PDT je nejvhodnější lokalizace v organelách, které hrají zásadní roli při spouštění a regu-

laci buněčné smrti. Takovými organelami jsou jádro, mitochondrie nebo ER. Výhodou kumulace přímo v jádře je přímá destrukce DNA a RNA, která vede jednoznačně k usmrcení celé buňky²². Mitochondrie je jednou z nejžádanějších buněčných organel pro zacílení farmak proti rakovině a to především proto, že má zásadní roli ve vyvolání apoptózy. Změny této organely vedoucí k apoptóze jsou způsobeny ztrátou elektrochemického gradientu na mitochondriální membráně z důvodu otevření transportních pórů a uvolnění určitých proteinů do cytosolu (např. cytochrom c, apoptózu indukující faktor, kaspázy)²³. Pouze několik málo studií věnovalo pozornost vlivu zničení ER na inaktivaci rakovinných buněk. Tato organela je v buňce umístěna v blízkém okolí jádra, hraje významnou roli v biosyntéze a transportu bílkovin a lipidů a podílí se na vylučování vápníku²⁴. Pokud je tato schopnost ER narušena, je vyvolána apoptóza buňky.

Lokalizace PS v buňce je jedním z nejdůležitějších faktorů určující biologickou účinnost. Je to místo, kde dochází k prvotnímu poškození buňky a udává mechanismus buněčné smrti²².

2.4. Konjugáty porfyrinů

Obecně se porfyriny konjugují s jinými organickými sloučeninami za účelem zlepšení jejich přechodu přes buněčnou membránu, který je často komplikovaný až nemožný vzhledem k jejich fyzikálně chemickým vlastnostem. Dalším důvodem bývá přeměna hydrofobní molekuly na více polární nebo amfifilní²⁴. Účinek takového konjugátu může být zesílen biologickou aktivitou připojené neporfyrinové části²⁵. V neposlední řadě má připojená část porfyrinového konjugátu vliv na selektivitu lokalizace v buňce po dodání do organismu.

2.4.1. Konjugáty porfyrinů se sacharidy

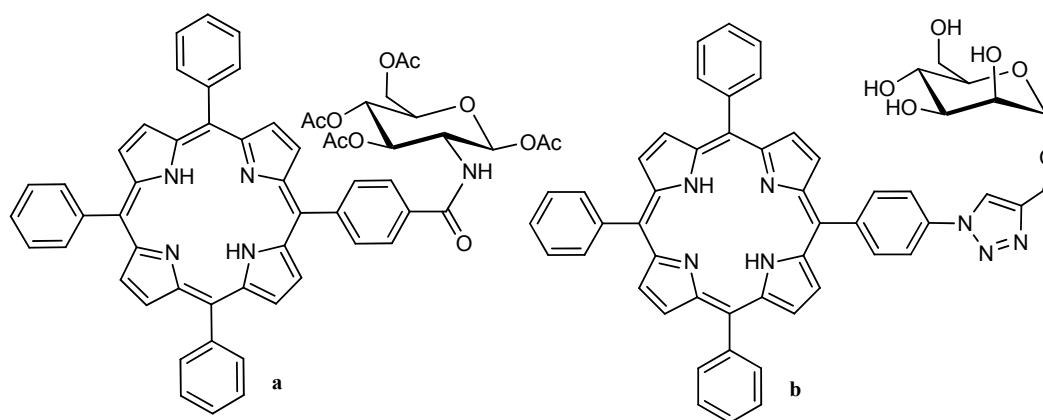
Glykosylace porfyrinů je jednou z mnoha metod, snažících se o zacílení PS do rakovinných buněk. Je způsobem, jak změnit molekulu hydrofobního porfyrinu na amfifilní sloučeninu, která je schopná projít buněčnou mem-

bránou²⁴. Je známo, že na povrchu rakovinných buněk se nachází velké množství lektinů, proteinů, které umí s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat cukry²⁶. S ohledem na interakce mezi sacharidy a lektiny a významnou roli sacharidů v buněčném rozpoznávání se předpokládá, že konjugáty porfyrinů s těmito biomolekulami budou vynikat v cíleném směřování látky do rakovinných tkání v porovnání s jinými PS (cit.²⁷).

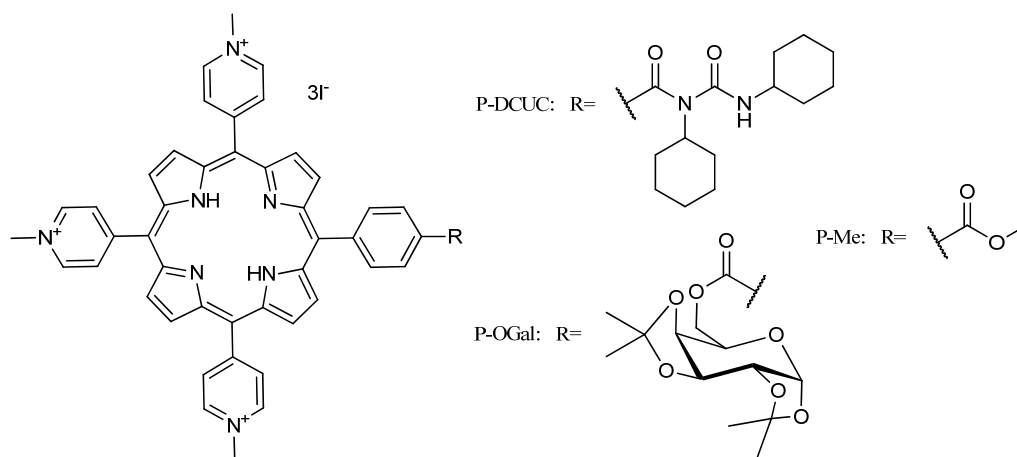
Studie uvádějí, že na lokalizaci glykosylovaného porfyrinu má vliv symetrie celé molekuly a dále počet a povaha navázaných cukerných jednotek. Konjugáty mající cukerné jednotky vázané přímo na porfyrinový kruh (obr. 5) se často kumulují v membráně liposomů, která může být složena z nasycených²⁸ i nenasycených²⁹ mastných kyselin. Různé konjugáty se kumulují v rozdílné hloubce membrány, což závisí v případě nenasycených kyselin na pozici navázaného porfyrinu (vzdálenosti od dvojné vazby v nenasycené kyselině) a symetrii²⁹. Symetrický konjugát se lokalizuje blíže k povrchu membrány, kdežto asymetrický substituovaný se nachází hlouběji.

U liposomálních membrán z nasycených kyselin má vliv celkový náboj. Obecně lze říci, že záporně nabitě liposomy usnadňují interakci se symetrickými konjugáty, oproti tomu nesymetrické konjugáty jsou schopné vazby i na nenabité liposomy, což je důsledkem jejich vyšší lipofility²⁸. V jiné studii se přímo vázané konjugáty kumulují v lysosomech nebo endoplazmatickém retikulu²⁴.

Vědecká skupina Silva a spol. připravila sérii konjugátů porfyrinu, které byly mezi sebou porovnávány z hlediska buněčného příjmu a fotocytotoxicity. Byl zvolen kladně nabitý porfyrin, u kterého se předpokládal snadný přechod do buňky a následně do organel preferovaných pro PDT. Mezi nejúčinnější konjugáty (obr. 6) patřil porfyrin s di-*O*-isopropyliden-(*D*-galaktopyranosou) (P-OGal) a srovnatelné účinky měl methylester (P-Me) a *N,N'*-di-cyklohexylureidooxykarbonylový derivát (P-DCUC) příslušného porfyrinu. Tyto konjugáty byly buňkami NCTC 2544 (rakovinné buňky kůže) snadno přijímány a docházelo u nich k lokalizaci uvnitř endo- a pinocytotických váčků, což vypovídá i o mechanismu jejich příjmu³⁰.



Obr. 5. Konjugát porfyrinu s acetylovanou 2-amido-2-deoxy-β-D-glukopyranosou (a) a α-D-mannopyranosou (b)

Obr. 6. Série konjugátů porfyrinu³⁰

Glykosylované porfyrinové konjugáty jsou v porovnání s jednoduše substituovanými porfyrinovými jádry při PDT často účinnější a v důsledku velkého množství glukosových transportérů, které se v rakoviných buňkách vyskytují více než ve zdravých, se vyznačují i zvýšeným buněčným příjmem³¹.

Konjugát porfyrinu s dextranem byl připraven za účelem použití v MRI. Výsledky ukázaly, že syntetizovaná sloučenina disponovala dlouhou relaxační dobou a zvýšenou afinitou vůči rakovinným buňkám. Konjugace s dextranem umožnila lokalizaci v buněčné membráně, kde tato cukerná část interagovala s glykolipidy¹¹.

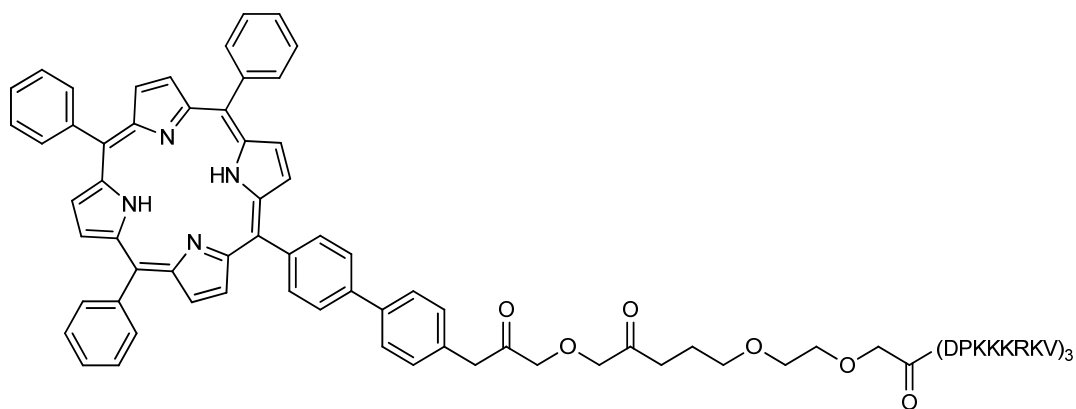
Glykosylované konjugáty porfyrinů, a to především nesymetrické, jsou nejen vhodnými fotosenzitizéry pro PDT, ale našly využití i jako kontrastní látky v MRI a byla potvrzena jejich zvýšená afinita ve prospěch rakovinných buněk.

2.4.2. Konjugáty porfyrinů s peptidy

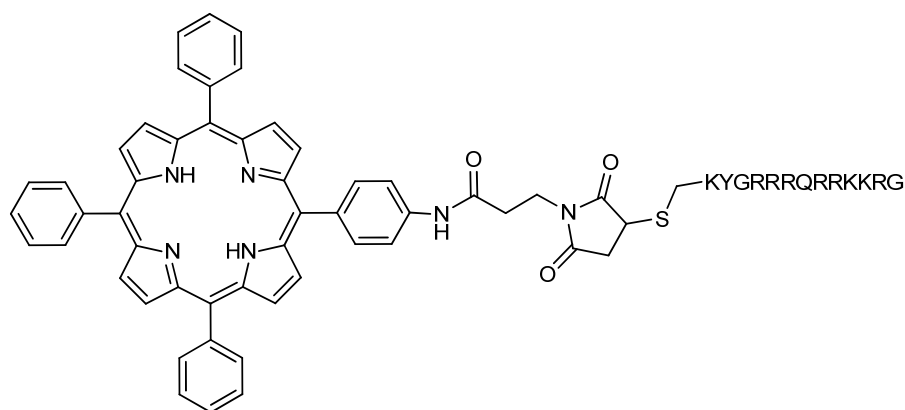
Pro zvýšení vstřebání léčiv do buňky se stalo atraktivním použití peptidových signálních sekvencí, a to pře-

devším pro jednoduchost syntézy peptidu a modifikace jeho struktury. Biologicky účinnější konjugáty porfyrinů pro PDT jsou takové, které se po podání lokalizují v organelách pro buňku nejdůležitějších, např. jádře, mitochondriích nebo ER. Ozáření konjugátů PS v preferovaných organelách vede k nevratnému poškození rakovinné tkáně²³. Kumulace ve prospěch těchto buněčných organel může být ovlivněna zvolenou sekvencí peptidu. Existují tzv. jaderné lokalizační sekvence (NLS, angl. Nuclear Localization Sequence)³² nebo mitochondriální lokalizační sekvence (MLS, angl. Mitochondria Localization Sequence)²³. Podle publikovaných studií však ani toto opatření pro kumulaci v požadované organelě často nestačí a konjugát PS je dopraven místo do cílené organely do lysosomů³². Příkladem konjugátu obsahujícího jadernou lokalizační sekvenci je sloučenina na obr. 7, u které byla navzdory mimojaderné lokalizaci pozorována silná fototoxicita.

Peptidový řetězec v molekule konjugátu může být navázán na porfyrin přímo, nebo přes spojovací molekulu polyethylenglykolu (PEG). Tato konjugace nejen zvyšuje



Obr. 7. Konjugát porfyrinu s peptidovou sekvencí spojený přes PEG



Obr. 8. Konjugát porfyriu s CPP

rozpuštěnost celého konjugátu ve vodě, ale také snižuje možnost agregace a dalších nežádoucích interakcí mezi makrocylem porfyriu a připojenou peptidovou sekvencí²³. Agregaci a nevazebným interakcím mezi porfyriem a delšími peptidovými řetězci můžeme zabránit i využitím lipidového nosiče, který má schopnost dopravit peptidové konjugáty do mitochondrií²².

U velkého množství farmak se setkáváme s nedostatečnou biologickou dostupností v důsledku jejich neschopnosti procházet buněčnými membránami nebo nízké rozpustnosti ve vodě. Tento problém lze řešit pomocí konjugace léčiv s peptidy zajišťujícími přestup přes buněčnou membránu (CPP, angl. Cell Penetrating Peptides). Tyto konjugáty (obr. 8) jsou cíleny do vnitrobuněčných váček³³.

Biologická aktivita a dostupnost porfyrin-peptidových konjugátů závisí na sekvenci aminokyselin v peptidovém řetězci, substituentech navázaných v periferních oblastech porfyrinového cyklu, celkovém náboji a amfifilitě konjugovaného systému³⁴.

Konjugáty obsahující v peptidu jednu až čtyři kladně nabitě aminokyseliny mají tendenci se akumulovat

v lysosomech a disponují nízkou fototoxicitou²², kdežto peptidy bohaté na arginin nacházíme převážně v endoplazmatickém retikulu. Velmi účinným konjugátem při PDT je také např. porfyrin-guanidin, vzhledem k jeho preferované lokalizaci v mitochondriích a ER²³.

PS se symetricky rozmístěnými NLS vykazují sníženou fototoxicitu a jsou do buněk přijímány v menší míře a to pravděpodobně v důsledku snížené amfifility a hydrofóbnosti³².

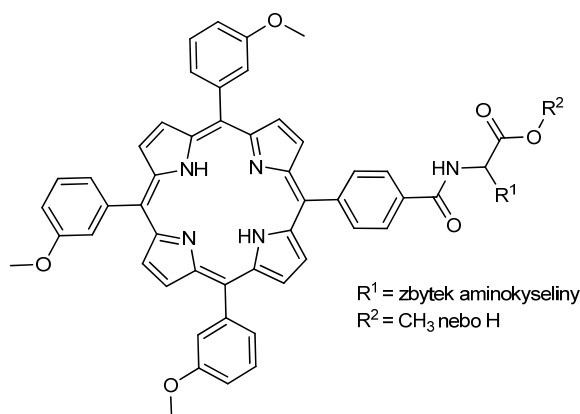
Stejně tak při porovnání samotného porfyriu s konjugovaným lze pozorovat vyšší příjem a fototoxicitu konjugátu a to v důsledku výše zmíněných důvodů. Přestože je zvolený porfyrin nabitý pro snadnější přestup přes buněčnou membránu a lepší rozpustnost ve fyziologickém prostředí, lokalizoval se jen v cytoplazmě. Oproti tomu poly-S-lysinový konjugát byl zacílen do lysosomů³⁵.

Jiná studie³⁶ byla zaměřena na přípravu konjugátů porfyriu pouze s aminokyselinami (obr. 9). Tyto nové konjugáty se lokalizují v lysosomech a plazmatické membráně. Jsou schopny produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, angl. Reactive Oxygen Species), což je základním požadavkem všech PS.

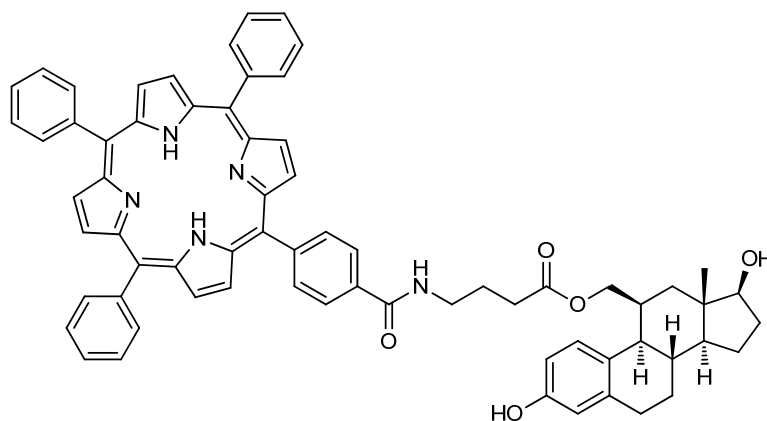
Lze předpovědět, že vhodnou volbou peptidového řetězce a nosiče se podaří syntetizovat konjugát schopný přechodu buněčné membrány a lokalizace ve specifické organelle³⁴. Velkou výhodou těchto konjugátů je především jejich snadná příprava a selektivní lokalizace v nádorových buňkách³⁶.

2.4.3. Konjugát porfyriu se steroidem

V současné době se vědci často zabývají specifickými postupy léčení nádorů a roste snaha o přípravu speciálních cytotoxinů, které by po podání zacílily a usmrtily přímo rakovinnou buňku. Problémem je nedostatek receptorů v poškozených buňkách, které by byly výhradně rozpoznány zmíněnými toxiny. Vědcům z USA se podařilo navrhnout a syntetizovat konjugát porfyriu s cytotoxinem a hormonem estradiolem³ (obr. 10). Vzhledem ke skutečnosti, že tento hormon je výlučně produkován v prsou



Obr. 9. Konjugát porfyriu s aminokyselinou



Obr. 10. Konjugát porfyriu s 17-β-estradiolem

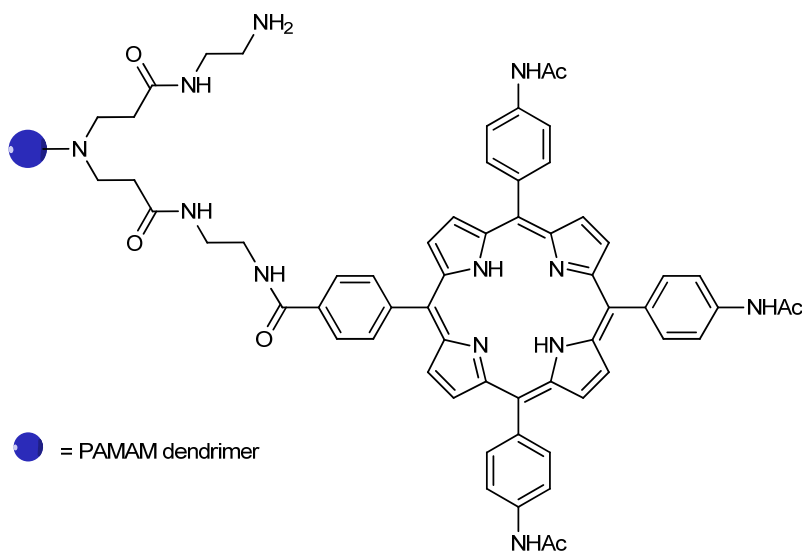
a vaječnicích, obsahují tyto orgány zvýšené množství estrogenních receptorů a předpokládá se, že jsou schopny vychytat z krevního řečiště léčivou látku, pokud je konjugována s tímto hormonem. Na základě této hypotézy byla navržena potenciálně atraktivní metoda pro léčbu rakoviny prsu, vaječníků a dělohy. Testování hypotézy bylo provedeno na prsní tkáni. Tento konjugát se akumuloval v buněčném jádře a byl úspěšně selektivně dopraven do tkáně produkující hormon estradiol.

V rámci jiné studie byl připraven konjugát $C_{17\alpha}$ -alkynylestradiolu s porfyriem pyrofeoforbidem. Tento konjugát se také úspěšně lokalizoval především v rakovinné tkáni a snímky z fluorescenčního mikroskopu potvrdily jeho lokalizaci uvnitř buňky. V porovnání se samotným porfyriem vykazoval konjugát vyšší fototoxicitu³⁷.

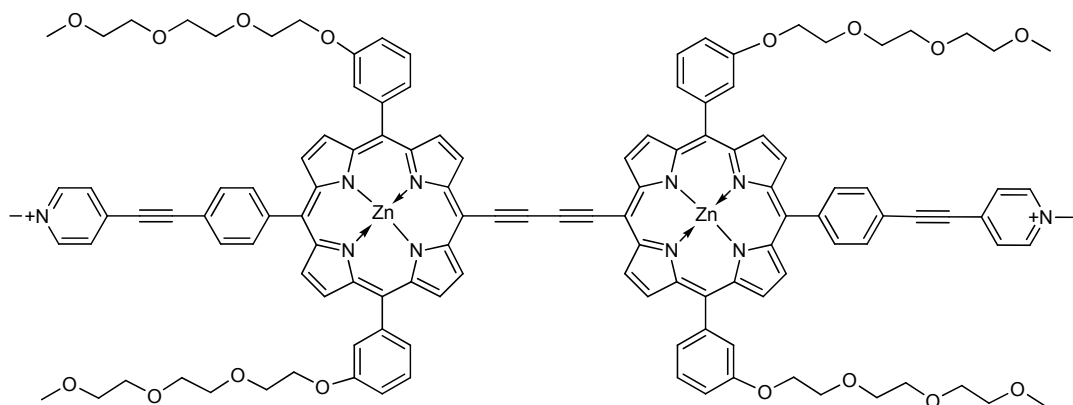
2.4.4. Konjugát porfyriu s dendrimerem a dimerní konjugáty porfyriu

Genová terapie je slibnou strategií pro léčbu a prevenci genetických poruch a nemocí. Vhodnými vektory, tedy přenašeči genetické informace do buňky, jsou např. viry a plazmidy. S ohledem na určité bezpečnostní pochybnosti u oslabených jedinců v souvislosti s možností sekundárních projevů infekčnosti viru se vědci snaží vyvinout nevirální nosiče (např. na bázi polymerů). Mezi takové vektory patří polyamidoamin dendrimer (PAMAM), který byl v tomto případě konjugován s hydrofobním porfyriem. Vzniklý konjugát (obr. 11) se lokalizoval v buněčných lysosomech a endosomech a po ozáření byl schopen transfekce genu a vykazoval vlastnosti potenciálního biomateriálu pro genovou terapii^{38,39}.

V rámci přípravy nových dimerních konjugátů porfyriu byla zkoumána jejich fotocytotoxicita, selektivní lokalizace v nádorových tkáních, intracelulární lokalizace



Obr. 11. Konjugát porfyriu s PAMAM dendrimerem



Obr. 12. Příklad dimerního konjugátu porfyriu

a potřebná dávka záření. Přestože se tyto konjugáty neložují v organelech preferovaných pro PDT, jsou celkem účinnými PS. Produkce ROS je srovnatelná s produkcí PS již klinicky schválených (např. Visudyne®)⁴⁰. Porfyrinové dimery byly schopny přechodu přes buněčnou membránu a byly zacíleny do cytoplazmy⁴⁰, nebo buněčných liposomů⁴¹.

2.4.5. Konjugáty porfyriu s retinoidy

Dále byla zkoumána fototoxicita a buněčná lokalizace u konjugátů porfyriu s retinoly (obr. 13) obsahující *all-trans* nebo *13-cis*-retinoid. Deriváty vitaminu A jsou vázány na tetrafenylporfyrin přímo do *para* polohy fenylů, nebo přes spojovací jednotku PEG. S ohledem na přítomnost receptorů pro kyselinu retinovou v jádře by se dala předpokládat akumulace retinoidních konjugátů právě v této organelle. Všechny konjugáty se ale přednostně lokalizují v buněčných vezikulech a lysosomech, malé množství konjugátů obsahujících PEG se nachází i v ER. Tyto PS se pravděpodobně nekumulují v jádře kvůli makrocycly porfyriu, který s ohledem na svou velikost není schopen projít jadernou membránou.

K nejvyššímu příjmu buňkou dochází v případě konjugátu porfyriu s *13-cis*-retinovou kyselinou připojenou k PS pomocí PEG, ale fototoxicita je vyšší u konjugátů,

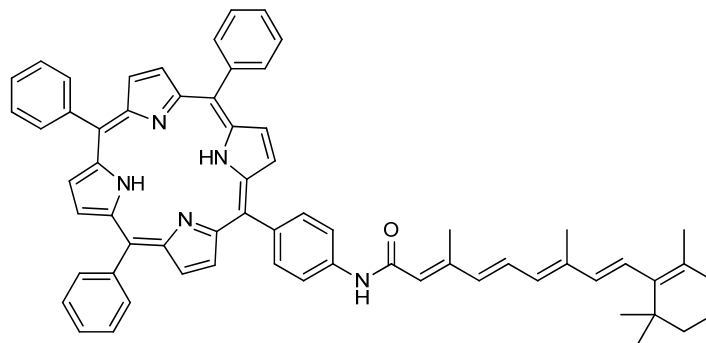
kteří jsou na porfyrinový cyklus navázány přímo. To, že jsou tyto konjugáty toxičtější navzdory nižšímu příjmu buňkou a kumulaci v méně preferovaných částech buňky naznačuje, že se jedná o nový a jiný mechanismus indukce buněčné smrti. Tento mechanismus však není doposud znám⁴².

2.4.6. Konjugát porfyriu s dalším chromoforem

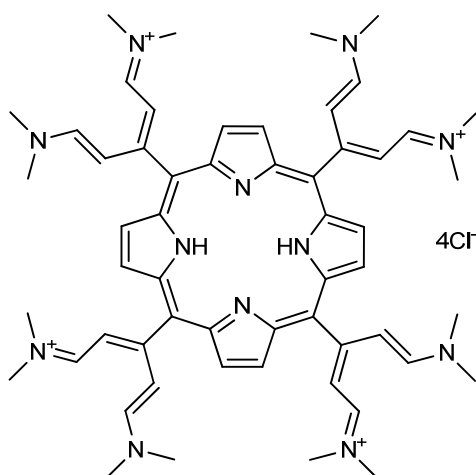
Dalším přístupem v syntéze nových konjugátů porfyriu jako PS je spojení dvou chromoforů – porfyriu s pentamethinem. Vznik více konjugovaného systému umožňuje nižší dávkování PS do organismu a připojená nabitá část usnadňuje přestup přes buněčnou membránu. Předběžné testy *in vivo* na buňkách HL-60 ukázaly selektivní lokalizaci v nádorové tkáni a po ozáření došlo k regresi tumoru. Konkrétní lokalizace uvnitř buňky nebyla v publikaci zmíněna⁴³.

3. Závěr

Syntéza nových konjugátů porfyriu je efektivní metodou pro přípravu účinných PS pro diagnostické (MRI) i terapeutické (PDT) ozařovací metody. Konjugací již dříve používaných porfyriu se zlepšují jejich vlastnosti a tím se



Obr. 13. Konjugát porfyriu s retinoidem



Obr. 14. Konjugát porfyrinu s pentamethinem

zvyšuje jejich účinnost. U PDT je důležitá intracelulární lokalizace a to přednostně v organelách, jejichž poškození způsobené ozářením vede k indukci apoptózy. U MRI je důležité, aby byl PS schopen přestupu přes buněčnou membránu. V současné době je výzkum zaměřen na cílení těchto konjugátů výhradně do rakovinné tkáně a dále na vývoj látek působících proti druhu rakoviny, kterou nelze léčit běžnými cytostatiky.

LITERATURA

- Khan T. K., Bröring M., Mathur S., Ravikanth M.: *Coord. Chem. Rev.* **257**, 2348 (2013).
- Silva E. F. F., Serpa C., Dabrowski J. M., Monteiro C. J. P., Formosinho S. J., Stochel G., Urbanska K., Simoes S., Pereira M. M., Arnaut L. G.: *Chem. – Eur. J.* **16**, 9273 (2010).
- Swamy N., James D. A., Mohr S. C., Hanson R. N., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3237 (2002).
- Pavelková A.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010.
- Matthews S. E., Pouton C. W., Threadgill M. D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1809.
- Winter M. B., Klemm P. J., Phillips-Piro C. M., Raymond K. N., Marletta M. A.: *Inorg. Chem.* **52**, 2277 (2013).
- Matsumoto Y., Jasanoff A.: *FEBS Lett.* **587**, 1021 (2013).
- Yan G.-P., Li Z., Xu W., Zhou C.-K., Yang L., Zhang Q., Li L., Liu F., Han L., Ge Y.-X., Guo J.-F.: *Int. J. Pharm.* **407**, 119 (2011).
- Shahbazi-Gahrouei D.: *J. Res. Med. Sci.* **11**, 217 (2006).
- Lee T., Zhang X.-A., Dhar S., Faas H., Lippard S. J., Jasanoff A.: *Chem. Biol.* **17**, 665 (2010).
- Zhang Z., He R., Yan K., Guo Q.-N., Lu Y.-G., Wang X.-X., Lei H., Li Z.-Y.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6675 (2009).
- Tita S. P. S., Perussi J. R.: *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1331 (2001).
- Tuncel S., Trivella A., Atilla D., Bennis K., Savoie H., Albrieux F., Delort L., Billard H., Dubois V., Ahsen V., Caldefie-Chezet F., Richard C., Boyle R. W., Ducki S., Dumoulin F.: *Mol. Pharmaceutics* **10**, 3706 (2013).
- Mukai H., Wada Y., Watanabe Y.: *Ann. Nucl. Med.* **27**, 625 (2013).
- Mroz P., Bhaumik J., Dogutan D. K., Aly Z., Kamal Z., Khalid L., Kee H. L., Bocian D. F., Holten D., Lindsey J. S., Hamblin M. R.: *Cancer Lett.* **282**, 63 (2009).
- Drabkova M., Marsalek B., Admiraal W.: *Environ. Toxicol.* **22**, 112 (2007).
- van Duijnhoven F., Rovers J., Engelmann K., Krajina Z., Purkiss S., Zoetmulder F. N., Vogl T., Terpstra O.: *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 808 (2005).
- Hu Z., Rao B., Chen S., Duanmu J.: *BMC Cancer* **10**, 235 (2010).
- Scott L. J., Goa K. L.: *Drugs Aging* **16**, 139 (2000).
- Fenton C., Perry C. M.: *Drugs Aging* **23**, 421 (2006).
- Kralova J., Dvorak M., Koc M., Kral V.: *Oncogene* **27**, 3010 (2008).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Fronczek F. R., Hammer R. P., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* **16**, 852 (2005).
- Sibrian-Vazquez M., Nesterova I. V., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* **19**, 705 (2008).
- Di Stasio B., Frochot C., Dumas D.: *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1111 (2005).
- Kumar D., Mishra B. A., Chandra S. K. P., Kumar A., Akamatsu K., Kusaka E., Ito T.: *Chem. Commun.* **49**, 683 (2013).
- Daly R., Vaz G., Davies A. M., Senge M. O., Scanlan E. M.: *Chem. – Eur. J.* **18**, 14671 (2012).
- Vedachalam S., Choi B.-H., Pasunooti K. K., Ching K. M., Lee K., Yoon H. S., Liu X.-W.: *MedChemComm* **2**, 390 (2011).
- Voszka I., Galántai R., Maillard P., Csík G.: *J. Photochem. Photobiol., B* **52**, 92 (1999).
- Voszka I., Budai M., Szabó Z., Maillard P., Csík G., Gróf P.: *Chem. Phys. Lipids* **145**, 63 (2007).
- Silva J. N., Galmiche A., Tomé J. P. C., Boullier A., Neves M. G. P. M. S., Silva E. M. P., Capiod J.-C., Cavaleiro J. A. S., Santos R., Mazière J.-C., Filipe P., Morlière P.: *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1373 (2010).
- Csík G., Balog E., Voszka I., Tölgyesi F., Oulmi D., Maillard P., Momenteau M.: *J. Photochem. Photobiol., B* **44**, 216 (1998).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1160 (2010).
- Wang J. T. W., Giuntini F., Eggleston I. M., Bown S. G., MacRobert A. J.: *J. Controlled Release* **157**, 305 (2012).
- Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *J.*

- Med. Chem. 51, 2915 (2008).
35. Nuno S. J., Haigle J., Tome J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tome A. C., Maziere J.-C., Maziere C., Santus R., Cavaleiro J. A. S., Filipe P., Morliere P.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 126 (2006).
 36. Serra V. V., Zamarrón A., Faustino M. A. F., Cruz M. C. I.-D. L., Blázquez A., Rodrigues J. M. M., Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., Juarraz A., Sanz-Rodríguez F.: *Bioorg. Med. Chem.* 18, 6170 (2010).
 37. Sadler S., Persons K. S., Jones G. B., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4638 (2011).
 38. Shieh M.-J., Peng C.-L., Lou P.-J., Chiu C.-H., Tsai T.-Y., Hsu C.-Y., Yeh C.-Y., Lai P.-S.: *J. Controlled Release* 129, 200 (2008).
 39. Peng C. L., Lai P. S., Chiu C. H., Chang C. C., Lai T. Y., Shieh M. J.: *Sborník abstraktů přednášek, díl 2, Nano Science and Technology Institute*, 384, Nano Science and Technology Institute Cambridge, Boston 2006.
 40. Dahlstedt E., Collins H. A., Balaz M., Kuimova M. K., Khurana M., Wilson B. C., Phillips D., Anderson H. L.: *Org. Biomol. Chem.* 7, 897 (2009).
 41. Khurana M., Ulrich S., Kim A., Moriyama Y., Netchev G., Akens M. K., Anderson H. L., Wilson B. C.: *Photochem. Photobiol.* 88, 1531 (2012).
 42. Sibrian-Vazquez M., Jensen T. J., Vicente M. G. H.: *Bioconjugate Chem.* 18, 1185 (2007).
 43. Bříza T., Králová J., Cígler P., Kejík Z., Poučková P., Vašek P., Moserová I., Martásek P., Král V.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 82 (2012).

P. Tomanová and M. Jurášek (*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Porphyrin Conjugates**

Due to their photophysical and pharmacokinetic properties, porphyrin conjugates are used as photosensitisers in clinical practice, especially in photodynamic therapy (PDT) and magnetic resonance imaging (MRI). The use of porphyrins alone is limited because of their hydrophobicity, low cellular uptake and low selectivity. To suppress the disadvantages their conjugates with various natural products (saccharides, proteins, polymers or steroids) were tested. Porphyrin conjugates can be visualised after cellular uptake by fluorescence microscopy. Determination of their precise localization in the cell is crucial for further biological scenario control. This review summarizes the obtained results.