



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00775**

(22) Data de depozit: **28/11/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. **5/2023**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ", SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• BURLOIU ANDREEA- MIHAELA, STR. SIDERURGIȚILOR, NR. 4, BL. D2, AP. 73, GALAȚI, GL, RO;

• MANDA GINA, STR. EUGEN IOSIF NR. 9, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• BOSCENCU RICA, STR. VLĂDEASA NR. 1, BL. C 67, AP. 20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGOE IONELA VICTORIA, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35, SC. A, AP. 47, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• LUPULIASA DUMITRU, STR. GEN. IOAN CULCER NR. 28A, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• SURCEL MIHAELA, ALEEA BARAJUL ROVINARI, NR. 12, BL. Y12, SC. A, AP. 3, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22, ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• MIHAI DRAGOȘ PAUL, STR. GEORGE GEORGESCU, NR. 48, ET. 1, AP. 1A, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **COMPUS PORFIRINIC CU POTENȚIAL DE MARCATOR FLUORESCENT ÎN DERMATO-ONCOLOGIE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus porfirinic cu potențial de marcator fluorescent pentru celule normale și tumorale în imagistica de fluorescență pentru diagnoza afecțiunilor cutanate pre-maligne și la un procedeu de obținere a acestuia. Compusul, conform invenției, este derivatul porfirinic 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)porfiringa. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: reacția de condensare dintre 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehida, metil 4-formil benzoat și pirol, pe suport de silicagel neutru, dizolvarea produ-

sului de condensare într-un amestec clorură de metilen/ eter etilic, filtrare și concentrarea filtratului prin distilare, separare și purificare prin cromatografie în strat subțire, rezultând compusul porfirinic având proprietăți fluorescente și activitate anti-proliferativă moderată la nivelul keratinocitelor.

Revendicări: 3
Figuri: 10

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).



60

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 00775
Data depozit	28-11-2022

Titlul invenției

**COMPUS PORFIRINIC CU POTENTIAL DE MARCATOR FLUORESCENT
IN DERMATO -ONCOLOGIE**

Descrierea invenției

Invenția se referă la obținerea, caracterizarea structurală și evaluarea *in vitro* la nivel celular a unui fotosensibilizator pentru diagnoza afecțiunilor cutanate premaligne. Statisticile recente evidentiază cancerul ca fiind principala cauză de deces la nivel mondial. La un număr de 19,3 milioane cazuri noi de cancer identificate în anul 2020 au fost înregistrate aproximativ 10 milioane de decese prin cancer. Povara globală a cancerului este de așteptat să fie de 28,4 milioane de cazuri în 2040, o creștere cu 47% față de 2020 [P. Sarbadhikary, B. P. George, H. Abrahamse, *Theranostics* 2021, 11(18), 9054-9088, H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *CA Cancer J Clin.* 2021, 1-41]. Din aceste considerente, dezvoltarea de strategii inovative pentru diseminarea măsurilor de prevenire prin diagnosticare a cancerului și furnizarea de substanțe active cu potential teranostic, sunt esențiale pentru combaterea cancerului la nivel mondial.

Melanomul și alte afecțiuni premaligne (keratoza actinică) sau maligne (carcinomul spinocelular și bazocelular, limfomul cutanat, sarcomul Kaposi și angiosarcomul) sunt încadrate de statisticile mondiale printre cele mai frecvente forme de cancer la nivelul pielii. Dezvoltarea unui cancer non-melanom este determinată de factori genetici, istoric de infecție cu virusul papiloma (HPV) și de afecțiuni cutanate inflamatorii cronice, expunere la substanțe toxice, expunere prelungită la soare, imunosupresie, fototipurile cutanate I și II, PUVA ca terapie anterioară [<https://www.euromelanoma.org>, A. Zink, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2019, 46, 19-23].

Keratozele actinice sunt descrise în literatură sub forma de „*carcinom in situ*” (din cauza keratinocitelor displazice asemănătoare cu carcinomul cu celule scuamoase) sau ca leziune premalignă [L. Del Regno, S. Catapano, A. Di Stefani, et al., *Am. J. Clin. Dermatol.* 2022, 23, 339–352]. Abordarea terapeutică în cazul keratozei actinice

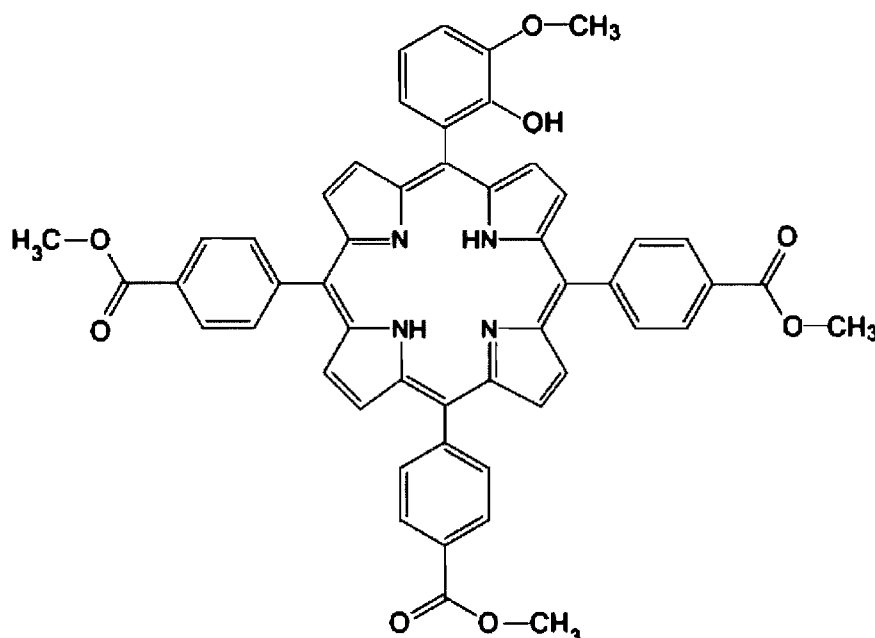
trebuie să tintească scăderea riscului de malignizare și să faciliteze un diagnostic corect al formațiunilor maligne care pot apărea într-un câmp de keratoză actinică.

Porfirinele, prin profilul lor structural și spectral, au potențial medical de marcator fluorescent al țesuturilor și de fotosensibilizator pentru aplicații în diagnoza și terapia patologiilor cutanate de tip malign [S.R. De Annunzio, N.C.S. Costa, R.D. Mezzina, et al., *Int J Mol Sci.* 2019, 20(16), 3861-3882].

În plus, avantajul major al structurilor porfirinice (asemănătoare structural cu hemul), este selectivitatea lor pentru celulele tumorale prezente într-un câmp de keratoză actinică și, implicit, diferențierea perturbărilor patologice în etapele incipiente de malignizare. Un alt avantaj al structurilor porfirinice este dat de versatilitatea lor și de posibilitatea modelării structurale prin atașare de substituenți cu diferite grade de polaritate, pentru obținerea unui raport hidrofil/lipofil optim, care poate îmbunătăți semnificativ internalizarea compușilor de către celule.

Problema tehnică constă în obținerea unor noi marcatori fluorescenți pentru celule, utilizând metode de sinteză ecologice, cu randamente bune și costuri reduse.

Invenția are ca obiect elaborarea procedurii de obținere a unui marcator de tip porfirină asimetric substituită, cu aplicabilitate în dermato-oncologie.



5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina

5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina s-a obținut printr-un procedeu tehnic descris de următoarele etape:

1) reacția de condensare dintre 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehida, metil 4-formil benzoat și pirol, pe suport de silicagel neutru. Interacția aldehydelor cu pirolul a fost inițată prin iradiere cu microunde.

2) dizolvarea produsului de condensare într-un amestec clorură de metilen/eter etilic (30v/1v), filtrare și concentrarea filtratului prin distilare.

3) separarea și purificarea compusului util.

Într-o etapă ulterioară de realizare a invenției, s-a realizat un studiu biologic *in vitro* pentru evaluarea biocompatibilității noului compus porfirinic și a potențialului său de marcator celular fluorescent. Pentru experimentele *in vitro* s-au utilizat următoarele tipuri de celule aderente specifice pentru piele: a) celule umane normale de piele, cum ar fi fibroblaste dermice umane din linia celulară HS27 (ATCC® CRL-1634™) și keratinocite umane normale din linia celulară HaCaT (Thermo Fisher Scientific); b) celule tumorale de melanom de șoarece din linia B16F10 (ATCC® CRL-6475™). Pentru menținerea liniilor celulare investigate și pentru multiplicarea lor, celulele au fost cultivate în mediu de cultură DMEM-F12 (Gibco) suplimentat cu ser fetal bovin (SFB, Euroclone) și soluție de antibiotic-antimicotic (Sigma), care va fi denumit în continuare mediu de cultură complet. Au fost analizați următorii parametri celulari: biocompatibilitatea derivatului porfirinic, incorporarea sa în celule și efectele celulare ale terapiei fotodinamice (PDT) realizată cu derivatul porfirinic.

Avantajele aplicării invenției sunt:

- porfirina asimetrică se obține printr-un procedeu eficient, netoxic, cu costuri mici și randament optim.
- tehnica de purificare este simplă și permite o separare eficientă a compusului porfirinic asimetric.
- a fost stabilit un protocol de testare *in vitro* pentru evaluarea biocompatibilității și a potențialului de marcator fluorescent al noului compus.
- compusul porfirinic fluorescent este incorporat de celule normale sau tumorale specifice pielii, este biocompatibil cu fibroblastele dermice umane și are tendința de a inhiba multiplicarea keratinocitelor umane.

- compusul porfirinic induce fotosensibilizarea moderată a keratinocitelor, dar nu și a celulelor tumorale de melanom.

5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina s-a obținut prin reacția de condensare în mediu neutru, a unui amestec de aldehide și pirol, reacție inițiată prin iradiere cu microunde într-un sintetizator de tip Biotage Initiator+.

În etapa 1), conform unei variante preferate de realizare a invenției, 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehida, metil 4-formil benzoatul și pirolul se aduc în vasul de reacție pe suport de silicagel neutru și se supun timp de 9 minute acțiunii microundelor, prin 3 iradieri succesive între 600W și 300W.

Într-o altă variantă de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 2) se răcește produsul brut, apoi se dizolvă într-un amestec clorură de metilen/eter etilic (30v/1v). Soluția obținută se filtrează, iar fracția lichidă se concentrează prin distilare simplă. Etapa 3) este descrisă de separarea și purificarea compusului util prin metode cromatografice, respectiv cromatografia pe coloana (faza staționară silicagel 60H Merck), urmată de cromatografie în strat subțire (placi PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm). Un amestec de clorură de metilen/eter etilic în raport volumetric 30v/1v, a fost utilizat ca eluent.

Confirmarea structurii porfirinei asimetrice s-a realizat prin evaluare spectrală FT-IR, RMN, UV-Vis și spectrometrie de fluorescență. Spectrele FT-IR au fost înregistrate cu spectrometru Bruker-Tensor 27, iar spectrele de rezonanță magnetică nucleară cu un spectrometru Bruker Avance DRX 400, la frecvența de 400 MHz cu referință semnalul tetrametilsilanului. Solventul utilizat a fost cloformul deuterat. Spectrele de absorbție și cele de fluorescență au fost înregistrate pentru soluții 2.5×10^{-6} M în polietilenglicol 200 ca solvent, cu spectrometrul UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35 și spectrofluorimetrul JASCO FP 6500. Polietilenglicolul 200 este un solvent acceptat în formularea de substanțe active [J.M. Harris, R.B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 214–221], și de aceea s-a utilizat pentru prepararea soluției porfirinice.

Bazat pe proprietățile fluorescente ale compusului porfirinic, incorporarea acestuia în celule specifice pielii a fost evaluată prin citometrie în flux. Celulele ($5 - 10 \times 10^4$) au fost plasate în placă de cultură cu 24 godeuri și au fost cultivate în mediu de cultură complet timp de 24 h la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, pentru a permite aderarea celulelor la

placa de cultură. Supernatantul de cultură a fost apoi îndepărtat și înlocuit cu diverse diluții ale compusului porfirinic (2.5–20 μM) realizate în mediu de cultură DMEM-F12 (Gibco) suplimentat cu 2% SFB (Euroclone) și soluție de antibiotic-antimicotic (Sigma). S-a realizat de asemenea o probă control care nu conține compus porfirinic. Celulele au fost cultivate în aceste condiții timp de 24 h la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, pentru a permite incorporarea compusului porfirinic în celule. La finalul cultivării, supernatantul de cultură a fost îndepărtat, iar celulele aderente au fost tripsinizate cu 0.25%/0.02% Trypsin/EDTA (Biochrom) pentru a le trece de la starea aderentă la o suspensie celulară. Pentru îndepărtarea mediului de cultură și a compusului porfirinic, celulele detașate au fost spălate de două ori prin centrifugare în tampon fosfat salin cu Ca²⁺ și Mg²⁺ (TFS, Gibco), ținut la rece în recipient plasat în gheață. Celulele au fost apoi resuspendate în soluție Live Cell Imaging (Thermo Fisher Scientific) pentru evaluarea încorporării compusului porfirinic fluorescent prin citometrie în flux. Citirea probelor s-a realizat în interval de 1h la citometrul în flux BD FACS Canto (Becton Dickinson), utilizând pentru excitare un laser de 488 nm, emisia fiind înregistrată în canalul de fluorescență FL3 (roșu). Datele au fost achiziționate și prelucrate cu programul BD FACSDiva (Becton Dickinson) și au fost exprimate ca intensitate medie de fluorescență exprimată în unități arbitrare de fluorescență.

Pentru evaluarea biocompatibilității compusului porfirinic a fost utilizat testul reducerii sării de tetrazoliu ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) cu kitul CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation), conform protocolului furnizat de producător (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>). Testul oferă informații privind numărul de celule metabolice active în cultură, fiind astfel o măsură a viabilității celulare. Celulele (5-10x10³ celule) au fost pre-cultivate timp de 24 h la 37°C, în atmosfera de 5% CO₂ în plăci de cultura cu 96 godeuri, în 100 μL de mediu de cultura complet, pentru a permite aderarea celulelor la godeurile plăcii de cultură. Supernatantul de cultură a fost apoi îndepărtat și înlocuit cu diverse diluții ale compusului porfirinic în mediu de cultură complet. S-au realizat de asemenea următoarele probe control: a) o probă control celulară care conține celule și mediu de cultură complet; b) o probă

control acellular, care conține doar mediu de cultură complet, fără celule. Toate probele au fost realizate în triplicat. Probele au fost cultivate 24 h la 37°C, în atmosfera de 5% CO₂, pentru a permite interacția celulelor cu porfirina analizată. După încheierea timpului de tratament al celulelor, în fiecare probă s-au adăugat 20 μL din reactivul kitului. Celulele au fost incubate 2h la 37°C, în atmosfera de 5% CO₂, pentru a permite dezvoltarea reacției de reducere a MTS de către celulele metabolic active. Intensitatea reacției a fost măsurată cu un cititor ELISA Sunrise (Tecan) dotat cu programul de control și analiză Magellan (Tecan), prin determinarea densității optice (DO) a probelor și controalelor la lungimea de unda 490 nm față de lungimea de undă de referință (620 nm). DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea valorii medii a DO din probele acelulare. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Evaluarea potențialului citotoxic al compusului porfirinic analizat s-a realizat cu testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH) utilizând kitul colorimetric *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation)* și protocolul furnizat de producător (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol>). Au fost realizate probe identice cu cele descrise la testul reducerii MTS, prezentat mai sus. La finalul cultivării celulelor cu compus porfirinic, s-au recoltat 50 μL supernatant de cultură care au fost plasați într-o placă de cultura cu 96 godeuri, peste care s-au adăugat 50 μL din reactivul de detecție din kit. Probele au fost incubate 30 min la temperatura camerei și la întuneric pentru a permite dezvoltarea reacției enzimatică. Reacția LDH a fost stopată la final cu reactivul de blocare din kit. Intensitatea reacției a fost măsurată cu un cititor ELISA Sunrise (Tecan) dotat cu programul de control și analiză Magellan (Tecan), prin determinarea densității optice (DO) a probelor și controalelor la lungimea de unda 490 nm. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea valorii medii a DO din probele acelulare. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Terapia fotodinamică (PDT) *in vitro* a fost realizată în plăci Petri cu diametrul de 35 mm în care au fost plasate suspensiile celulare (0.5-0.75 celule/mL) care au fost incubate timp de 24h la 37°C, în atmosfera de 5% CO₂ pentru a permite aderarea celulelor la

placă. S-a îndepărtat apoi supernatantul de cultură care s-a înlocuit cu o soluție 10 μM a porfirinei testate, soluție realizată în mediu de cultură DMEM-F12 (Gibco) suplimentat cu 2% SFB (Euroclone) și cu soluție de antibiotic-antimicotic (Sigma). Probele au fost incubate timp de 24h la 37°C, în atmosfera de 5% CO_2 , pentru a permite încărcarea celulelor cu compusul porfirinic. Pentru realizarea PDT, supernatantul de cultură a fost îndepărtat din toate probele și a fost înlocuit cu tampon Hank's necolorat (Sigma) suplimentat cu 2% SFB (Euroclone) și cu soluție de antibiotic antimicotic (Sigma). S-au realizat probe pereche, una dintre probe fiind expusă la PDT, în timp ce o altă probă neexpusă la PDT a reprezentat controlul. PDT *in vitro* s-a realizat cu echipamentul Modulight ML6600 (Modulight Inc) prevăzut cu laser având lungimea de undă de 635 nm, sistem computerizat de control al dozei și iradianței, ca și al temperaturii laserului. Pentru PDT s-au utilizat următorii parametri: doza de 10 J/cm^2 și iradianța de 50 mW/cm^2 [M. Dobre, R. Boscencu, I.V.Neagoe, M. Surcel, E. Milanesi, G. Manda, *Pharmaceutics* 2021,13(7):1032]. După PDT, din fiecare probă s-a eliminat supernatantul și s-a înlocuit cu mediu de cultură complet, probele fiind apoi cultivate timp de 24 h la 37°C, în atmosfera de 5% CO_2 , pentru a investiga impactul PDT asupra morfologiei și viabilității celulare. La 24 h după PDT, din plăcile Petri a fost recoltat supernatant pentru a realiza testul eliberării LDH. În unele experimente, la 24 h după PDT celulele au fost detașate din plăcile Petri prin tripsinizare cu 25%/0.02% Trypsin/EDTA (Biochrom), au fost centrifugate (1200 rpm, 5 min 4°C) și reluate în mediu de cultură complet. Numărarea celulelor în suspensie s-a realizat într-un hemocitometru Burker-Turk prin testul excluziunii albastrului de tripan [W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol.* 2015, 111: A3.B.1–A3.B.3]. Suspensiile celulare au fost apoi transferate pentru realizarea testului de reducere a MTS cu celulele în suspensie, sau pentru evaluarea apoptozei și necrozei celulare.

Evaluarea apoptozei și a necrozei celulare s-a realizat prin citometrie în flux cu anexină V și iodură de propidium, utilizând kitul FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend). Celulele din fiecare probă ($0.25 - 0.3 \times 10^6$) au fost spălate de două ori prin centrifugare în TFS rece, după care au fost reluate în 100 μL din tamponul kitului, special formulat pentru legarea anexinei V la celulele apoptotice. Celulele au fost marcate apoi cu 5 μL anexină V-FITC și cu 10 μL iodură de propidium. Marcarea celulelor

s-a realizat la temperatura camerei, la întuneric, timp de 15 min. În final, în fiecare probă s-au adăugat 400 μ L din tamponul kitului pentru stoparea interacției celulelor cu marcatorii fluorescenți. În decurs de 1h, probele au fost citite la citometrul în flux BD FACS Canto (Becton Dickinson), utilizând pentru excitare un laser de 488 nm, emisia fiind înregistrată în canalul de fluorescență FL1 (verde) pentru anexina V-FITC și în canalul FL2 (oranj) pentru iodura de propidiu. Datele au fost achiziționate și prelucrate cu programul BD FACSDiva (Becton Dickinson) și au fost exprimate ca intensitate medie de fluorescență (unități arbitrare de fluorescență). Rezultatele au fost exprimate ca procent de celule în apoptoză timpurie (anexină V+ / iodura de propidiu-), apoptoză târzie (anexină V+ / iodură de propidiu+) sau necrotice (anexină V- / iodură de propidiu+).

Descrierea desenelor:

- fig.1 prezintă eliberarea de LDH de către celulele normale (HaCaT, HS27) sau tumorale (B16F10) de piele, tratate timp de 24h cu derivatul porfirinic la concentrația de 10 μ M. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm deviație standard a mediei SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.
- fig. 2 prezintă efectul tratării cu derivatul porfirinic ($c=10 \mu$ M), timp de 24h, a celulelor umane normale de piele (HaCaT, HS27). Efectul exercitat de derivatul porfirinic a fost calculat ca raport dintre valorile eliberării LDH în prezența și în absența porfirinei. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale eliberării LDH, obținute în două experimente independente. Diferențele dintre celule au fost considerate statistic semnificative pentru valori $p<0.05$.
- fig. 3 prezintă reducerea MTS de către celulele normale dermice din liniile HaCaT și HS27 tratate timp de 24h cu derivatul porfirinic în intervalul de concentrații 2.5 - 20 μ M. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.
- fig. 4 prezintă incorporarea derivatului porfirinic de către celulele umane normale din liniile HaCaT și HS27 și de către celulele de melanom de șoarece din linia B16F10. Celulele au fost tratate 24h cu derivatul porfirinic la concentrația de 10 μ M. Intensitatea medie de fluorescență intracelulară s-a determinat prin citometrie în flux cu programul FACSDiva (Becton Dickinson). Rezultate sunt exprimate ca procent al intensității medii

de fluorescență în celule tratate cu derivat porfirinic din fluorescența medie a celulelor netratate.

- fig. 5 prezintă reducerea MTS și eliberarea LDH de către keratinocitele umane din linia HaCaT încărcate cu derivatul porfirinic (10 μ M), expuse la PDT (10J/cm², 50 mW/cm²) și analizate la 24h după aceea. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

- fig. 6 prezintă apoptoza și necroza keratinocitelor umane normale din linia HaCaT încărcate cu derivatul porfirinic (10 μ M), expuse la PDT (10J/cm², 50 mW/cm²) și analizate la 24h după aceea. Datele au fost achiziționate și procesate cu programul FACSDiva (Becton Dickinson).

- fig. 7 prezintă imagini în microscopie optică ale keratinocitelor HaCaT tratate prin PDT cu derivatul porfirinic și analizate la 24h după aceea comparativ cu controlul neexpus la PDT.

- fig. 8 prezintă reducerea MTS și eliberarea LDH de către celulele de melanom de șoarece din linia B16F10 încărcate cu derivatul porfirinic (10 μ M), expuse la PDT (10J/cm², 50 mW/cm²) și analizate la 24h după aceea. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

- fig. 9 prezintă imagini în microscopie optică ale celulelor de melanom de șoarece din linia B16F10 tratate prin PDT cu derivatul porfirinic și analizate la 24h după aceea comparativ cu controlul neexpus la PDT.

- fig. 10 prezintă apoptoza și necroza celulelor de melanom de șoarece din linia B16F10 încărcate cu derivatul porfirinic (10 μ M), expuse la PDT (10J/cm², 50 mW/cm²) și analizate la 24h după aceea. Datele au fost achiziționate și procesate cu programul FACSDiva (Becton Dickinson).

Invenția este descrisă prin următoarele exemple nelimitative de realizare.

EXEMPLUL 1

Obținerea compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina

Compusul porfirinic cu structură asimetrică a fost obținut printr-un procedeu tehnic descris de interacția 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehida cu metil 4-formil benzoat și pirol în raport molar 1:3:4, pe suport de silicagel neutru, sub iradiere cu microunde (3 iradieri succesive 600W, 400W, 350W), timp de 9 minute.

Monitorizarea reacției de sinteză s-a realizat prin testarea UV-Vis a unor probe prelevate din amestecul de reacție și dizolvate în diclormetan. Spectrul de absorbție în domeniul vizibil al porfirinelor este tipic și permite identificarea cu ușurință a acestui tip de compuși. Pentru probele testate, prezența izomerilor de tip porfirinic a fost confirmată de existența benzii Soret și a celor 4 benzi Q în spectrul de absorbție.

Intr-o altă etapă de obținere a compusului porfirinic asimetric, produsul brut de reacție a fost dizolvat într-un amestec diclormetan/dietileter (30v/1v), filtrat la presiune normală și concentrat prin distilare simplă. Testarea soluțiilor de produs brut prin cromatografie în strat subțire a permis stabilirea numărului de izomeri porfirinici rezultați în sinteză. Reacțiile de sinteză au furnizat un amestec de 6 izomeri porfirinici (A_4 , A_3B , $A_2B_2(cis)$, $A_2B_2(trans)$, AB_3 , B_4). Izomerul A_3B a fost separat prin cromatografie pe coloană (faza staționară Kieselgel 60 Merck și eluent diclormetan/eter etilic 30v/1v).

Pentru obținerea unui grad de puritate avansată a compusului de interes, în etapa finală, s-a realizat purificarea prin cromatografie în strat subțire, pe plăci PLC silica gel 60, 2 mm, 20x20 cm și cu eluent amestecul celor doi solvenți diclormetan și eter etilic.

5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina a fost obținută cu un randament de 38%.

EXEMPLUL 2

Evaluarea spectrala FT-IR, RMN, UV-Vis și de fluorescență pentru noul compus porfirinic 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina a furnizat următoarele caracteristici spectrale:

IR(cm^{-1}): 3424, 3316, 2924, 2853, 1722, 1606, 1558, 1468, 1434, 1402, 1276, 1179, 1100, 1020, 963, 867, 801, 760, 735.

1H -NMR, $\delta_H(400\text{ MHz, }CDCl_3)$, ppm: -2.80 (s, 2H), 4.07 (s, 3H), 4.16 (s, 9H), 5.83 (s, 1H), 7.24 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.63 (t, 1H), 8.31 (d, 6H), 8.46 (d, 6H), 8.82 (d, 6H); 8.91 (d, 2H).

UV-Vis (soluție în PEG 200, $c=2.5 \times 10^{-6}M$) λ_{max} (nm): 402, 495, 528, 570, 630

Max. emisie (soluție în PEG 200, $c=2.5 \times 10^{-6}M$) λ_{max} (nm): 657 nm

EXEMPLUL 3

Biocompatibilitatea compusului porfirinic

Biocompatibilitatea derivatului porfirinic a fost testată pe linii celulare umane normale (linia celulară de fibroblaste dermice HS27 și linia celulară de keratinocite HaCaT) și pe linia celulară tumorală de melanom de șoarece B16F10, Aceste linii celulare sunt relevante pentru piele. Celulele testate au fost încărcate cu derivatul porfirinic (2.5–20μM) timp de 24 h. Biocompatibilitatea derivatului porfirinic a fost evaluată relativ la numărul de celule metabolic active (testul reducerii MTS), și relativ la integritatea membranară (testul eliberării LDH).

Datele experimentale evidențiază faptul că tratarea celulelor cu derivatul porfirinic la concentrația de 10μM nu modifică statistic semnificativ eliberarea de LDH de către niciuna dintre liniile celulare investigate, normale sau tumorale (Figura 1). Aceste rezultate arată că derivatul porfirinic nu este citotoxic, el neinducând perturbarea integrității membranare pe parcursul celor 24 h de cultură, astfel încât LDH, care este o enzimă cu localizare intracelulară, să fie eliberată prin pori membranari ca urmare a tratării celulelor cu derivatul porfirinic. Remarcăm totuși că există o tendință mai accentuată de eliberare a LDH de către fibroblastele dermice umane normale din linia HS27 comparativ cu keratinocitele umane normale din linia HaCaT, conform datelor statistice de eliberare a LDH, obținute în două experimente independente (Figura 2).

Intr-o alta etapa de realizare a inventiei, a fost investigat efectul exercitat *in vitro* de derivatul porfirinic asupra numărului de celule metabolic active, ca măsură a potențialelor efecte anti-proliferative a acestuia. Datele de reducere a MTS relevă o tendință de scădere a reducerii MTS de către keratinocitele umane normale din linia HaCaT, în timp ce fibroblaștii umani dermici HS27 nu sunt afectați la nivelul acestui parametru (Figura 3). Conform acestor rezultate, derivatul porfirinic poate inhiba proliferarea keratinocitelor, dovedind astfel, pe lângă proprietățile fluorescente, și activitate anti-proliferativă moderată, posibil tranzitorie, la nivelul keratinocitelor.

Aceste proprietăți ale derivatului porfirinic au relevanță în cazul keratozei actinice caracterizată prin proliferarea aberantă a keratinocitelor de la nivelul epidermei [A. Dodds, A. Chia, S. Shumack, *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2014, 4(1):11-31].

EXEMPLUL 4

Capacitatea celulelor de a incorpora compusul porfirinic

Datorita proprietăților fluorescente ale porfirinei nou sintetizate, incorporarea acesteia în celule s-a determinat prin citometrie în flux ca fluorescență medie intracelulară. Celulele au fost incarcate timp de 24 h cu compus porfirinic la concentrația de 10 μM , după care probele celulare au fost analizate prin citometrie in flux pentru a determina intensitatea medie de fluorescență intracelulară. Datele experimentale descrise în Figura 4 arată că toate celulele de piele analizate (keratinocite normale HaCaT, fibroblaști normali HS27 și celulele de melanom de șoarece B16F10) incorporează noul compus porfirinic, prezentând o intensitate medie de fluorescență intracelulară crescută în medie de $(4,35 \pm 0,64)$ ori față de celulele control netratate cu porfirină.

Rezultatele confirma utilitatea derivatului porfirinic de marcator fluorescent al celulelor normale sau tumorale din piele.

EXEMPLUL 5

Capacitatea compusului porfirinic de a realiza terapie fotodinamica in vitro

S-a analizat potentialul terapeutic al noului compus porfirinic prin capacitatea acestuia de a realiza terapie fotodinamica *in vitro* în keratinocite normale HaCaT și în celulele de melanom de șoarece B16F10. Celulele au fost încărcate timp de 24 h cu porfirina (10 μM), după care au fost expuse la terapie fotodinamica (PDT) utilizând lumină laser cu lungimea de undă de 635 nm și parametrii de iluminare de 10 $\text{J}/\text{cm}^2/50\text{mW}/\text{cm}^2$. Celulele au fost analizate la 24 h post-PDT relativ la viabilitatea/proliferarea celulară măsurată prin testul reducerii MTS, și relativ la moartea celulară detectată ca alterare a membranei plasmatică prin testul eliberării LDH.

Datele experimentale privitoare la linia celulară HaCaT (Figura 5) arată că PDT realizat *in vitro* cu derivatul porfirinic reduce la aproximativ 72% intensitatea reacției de reducere a MTS de către aceste celule, crescând în același timp eliberarea de LDH de aproximativ 4,5 ori. Aceste date sunt susținute și de rezultatele privind apoptoza și necroza keratinocitelor HaCaT (Figura 6) care arată o dublare a procentului de celule apoptotice, fără ca procentul de celule necrotice să fie semnificativ afectat la 24 h după PDT. Analiza microscopică a keratinocitelor HaCaT la 24 h post-PDT (Figura 7) arată

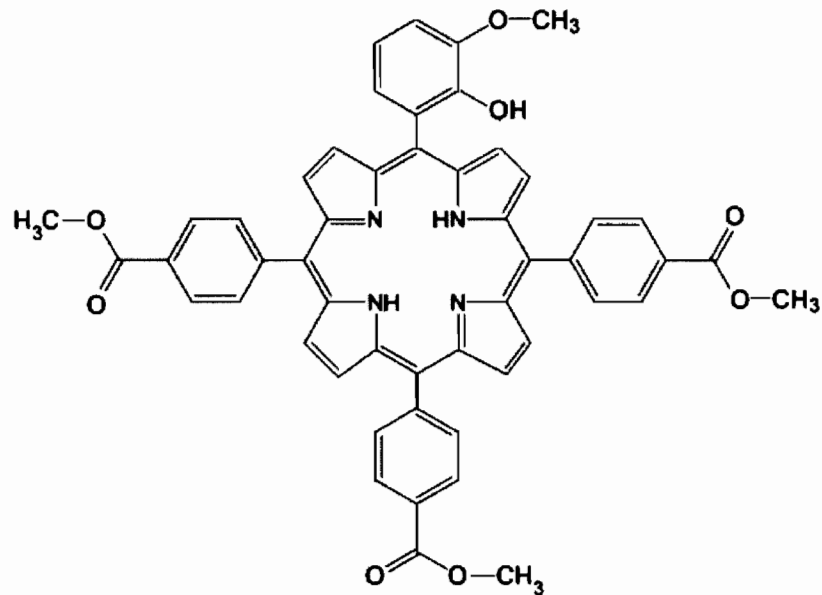
că stratul de celule are doar zone mici de afectare, evidențiate prin celule rotunde, neaderate la placa Petri, care sunt foarte posibil celule moarte.

Rezultatele indică capacitatea compusului porfirinic de a induce fotosensibilizarea moderată a keratinocitelor umane normale, ceea ce sugerează necesitatea de a proteja de lumină zona tratată cu compus porfirinic pentru a evita efectele nedorite ale fotosensibilizării la nivelul pielii normale.

În celulele de melanom de șoarece B16F10, PDT nu afectează la 24 h intensitatea reacției de reducere a MTS, crescând ușor eliberarea de LDH de către aceste celule (Figura 8), dar perturbarea integrității membranare nu pare să afecteze multiplicarea celulelor tumorale de melanom (Figura 9). Rezultatele arată că derivatul porfirinic investigat nu are potential fotosensibilizant în terapia fotodinamică a melanomului. Datele de apoptoză și necroză a celulelor de melanom B16F10 (Figura 10) arată că PDT cu porfirina testată nu modifică semnificativ procentul de celule apoptotice sau necrotice la 24 h după expunerea celulelor la PDT.

REVENDICĂRI

1. Compus porfirinic cu următoarea structură chimică



5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina

2. Procedul de obținere pentru compusul porfirinic definit ca în revendicarea 1

3. Compusul porfirinic definit ca în revendicarea 1, evaluat *in vitro* pe celule specifice pielii, a dovedit proprietăți de marcator fluorescent pentru celule normale și tumorale. Aceste proprietăți califică compusul porfirinic drept candidat pentru imagistică de fluorescență în dermatologie, inclusiv în dermatologia oncologică.

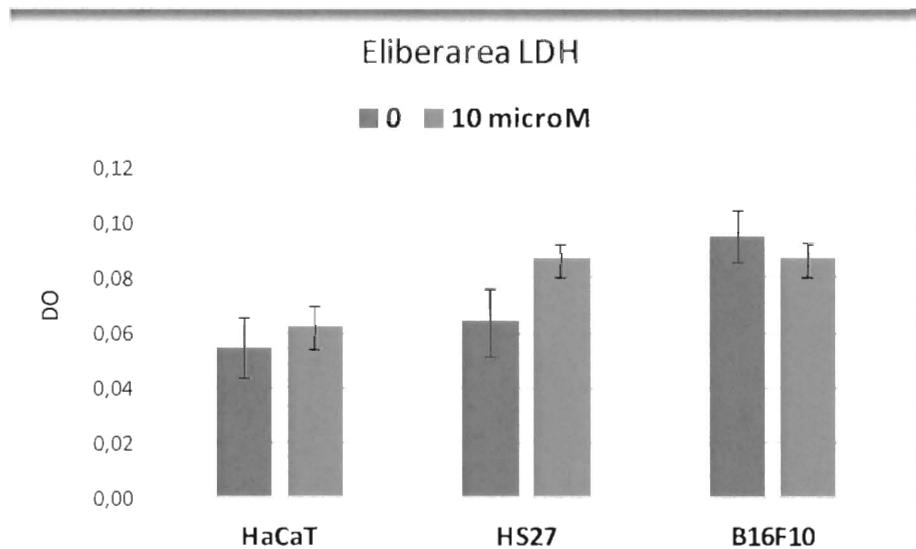


Figura 1. Eliberarea de LDH de către celulele normale (HaCaT, HS27) sau tumorale (B16F10) de piele, tratate timp de 24 h cu derivatul porfirinic la concentrația de 10 μ M. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

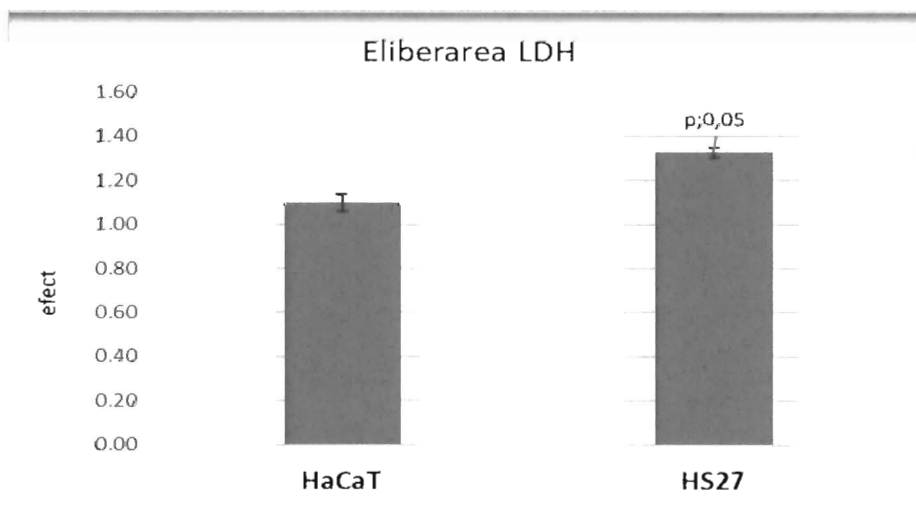


Figura 2. Efectul tratării cu derivatul porfirinic ($c=10 \mu$ M), timp de 24h, a celulelor umane normale de piele (HaCaT, HS27). Efectul exercitat de derivatul porfirinic a fost calculat ca raport dintre valorile eliberării LDH în prezența și absența porfirinei. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm SEM ale eliberării LDH, obținute în două experimente independente. Diferențele dintre celule au fost considerate statistic semnificative pentru valori $p<0.05$.

45

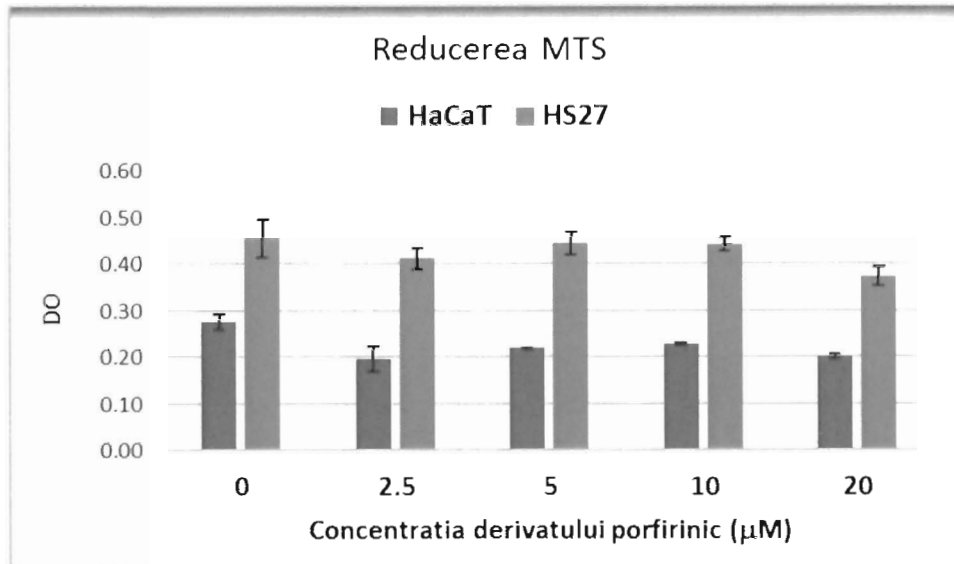


Figura 3. Reducerea MTS de către celulele normale dermice din liniile HaCaT și HS27 tratate timp de 24h cu derivatul porfirinic în intervalul de concentrații 2.5-20 μM . Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

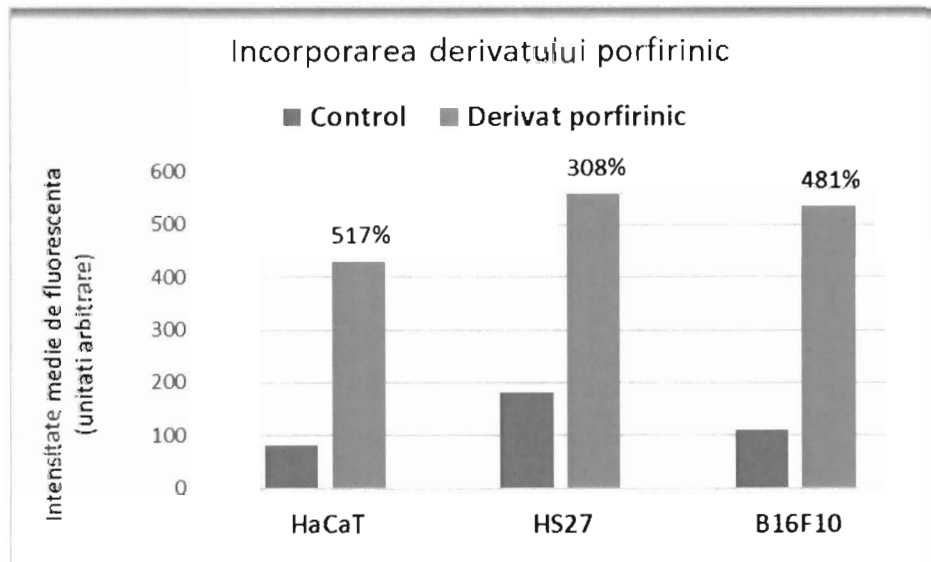


Figura 4. Incorporarea derivatului porfirinic de către celulele umane normale din liniile HaCaT și HS27 și de către celulele de melanom de șoarece din linia B16F10. Celulele au fost tratate 24 h cu derivatul porfirinic la concentrația de 10 μM . Intensitatea medie de fluorescență intracelulară s-a determinat prin citometrie în flux cu programul FACSDiva (Becton Dickinson). Rezultate exprimate în procent al intensității medii de fluorescență în celule tratate cu derivat porfirinic din fluorescența medie a celulelor netratate.

64

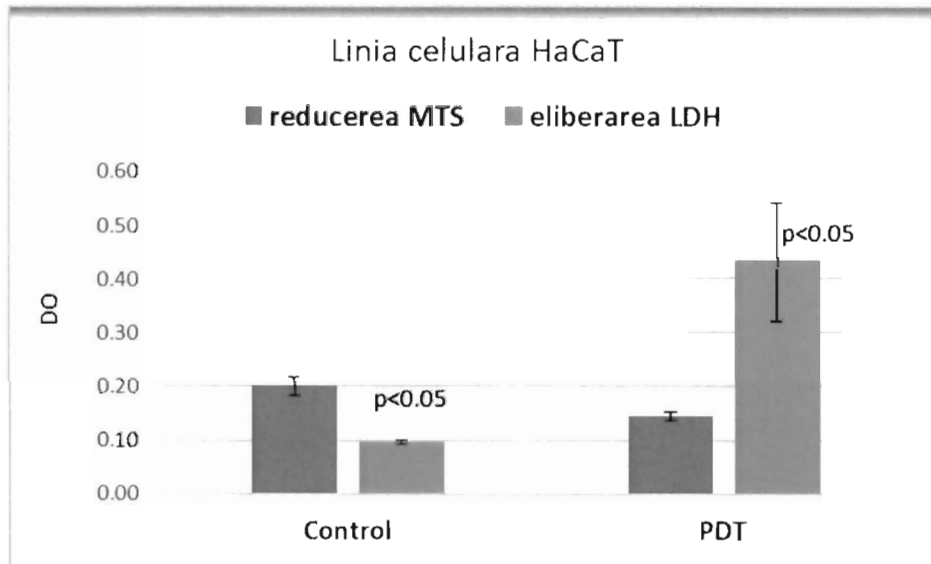


Figura 5. Reducerea MTS și eliberarea LDH de către keratinocitele umane din linia HaCaT încărcate cu derivatul porfirinic ($10 \mu\text{M}$), expuse la PDT ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $50 \text{mW}/\text{cm}^2$) și analizate la 24h post-PDT. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

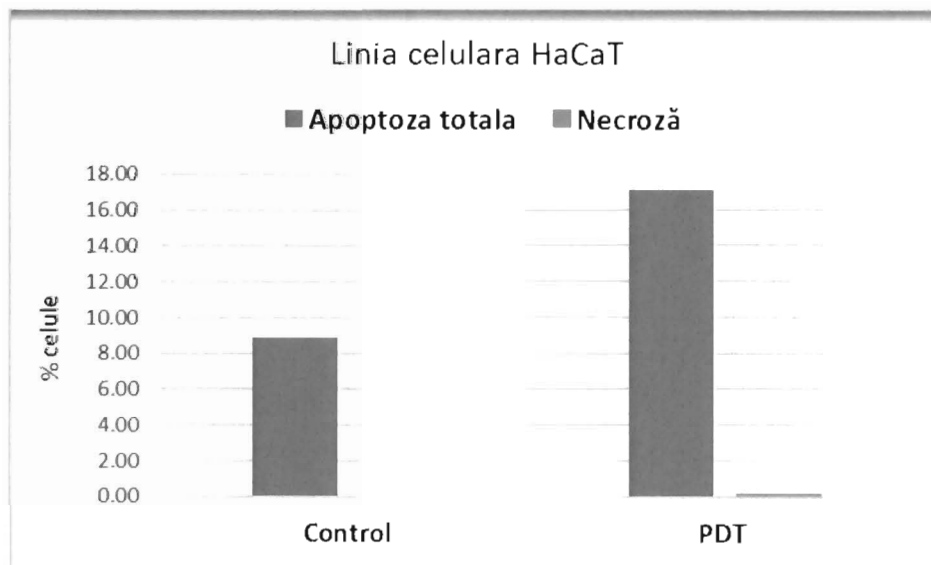


Figura 6. Apoptoza și necroza keratinocitelor umane normale din linia HaCaT încărcate cu derivatul porfirinic ($10 \mu\text{M}$), expuse la PDT ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $50 \text{mW}/\text{cm}^2$) și analizate la 24 h post-PDT. Datele au fost achiziționate și procesate cu programul FACSDiva (Becton Dickinson).

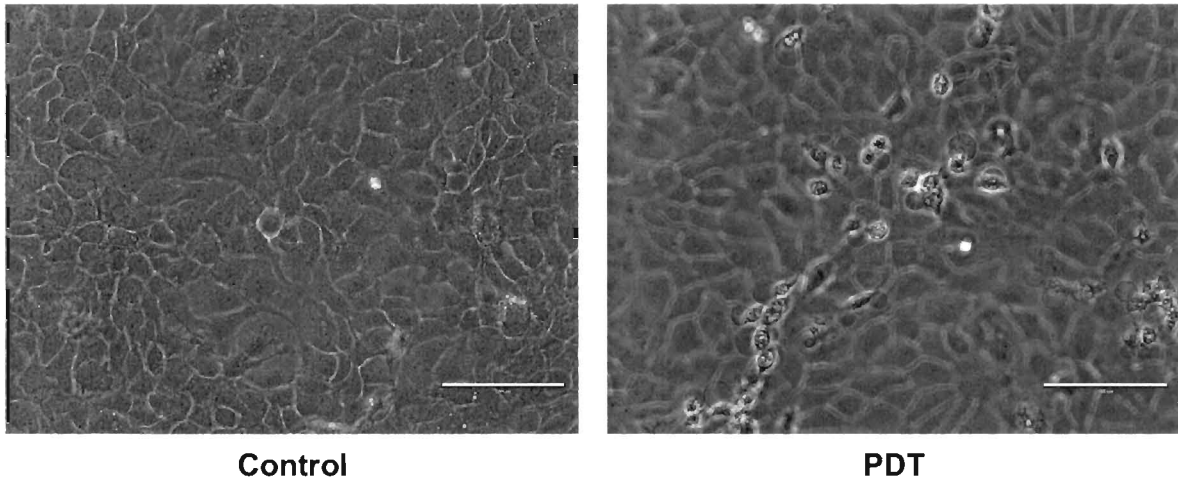


Figura 7. Imagini în microscopie optică ale keratinocitelor HaCaT tratate prin PDT cu derivatul porfirinic și analizate la 24 h după PDT comparativ cu controlul neexpus la PDT.

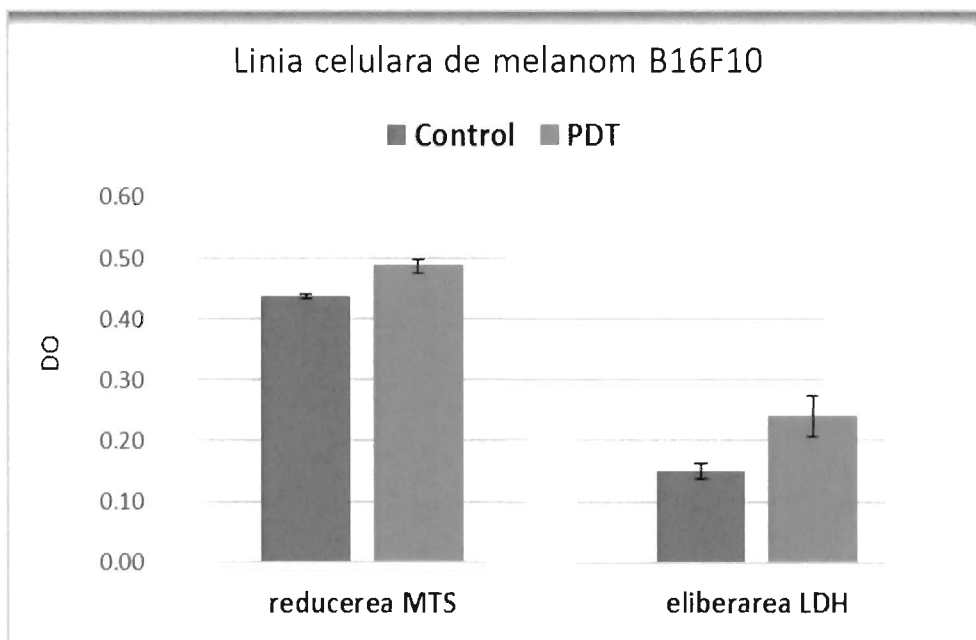


Figura 8. Reducerea MTS și eliberarea LDH de către celulele de melanom de șoarece din linia B16F10 încărcate cu derivatul porfirinic ($10 \mu\text{M}$), expuse la PDT ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $50 \text{mW}/\text{cm}^2$) și analizate la 24 h post-PDT. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

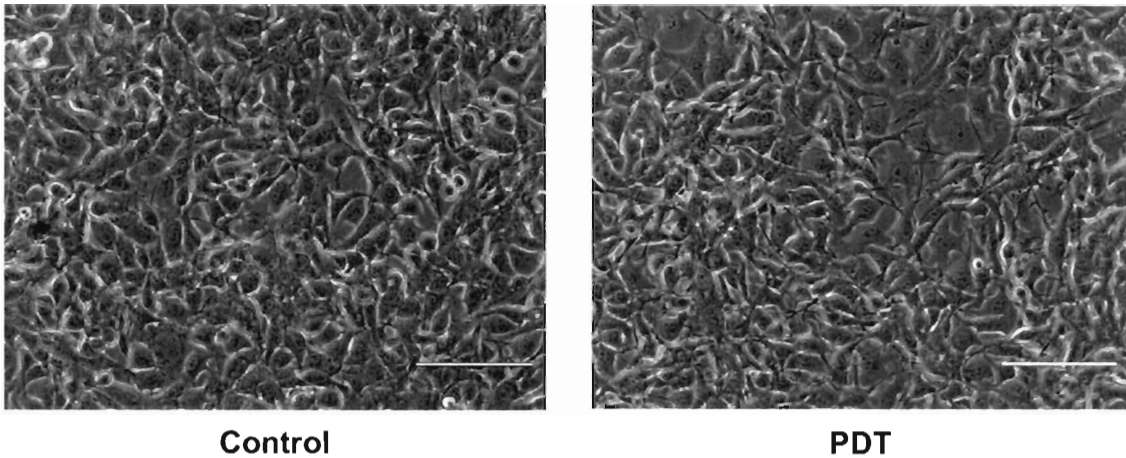


Figura 9. Imagini în microscopie optică ale celulelor de melanom de șoarece din linia B16F10 tratate prin PDT cu derivatul porfirinic și analizate la 24 h după PDT comparativ cu controlul neexpus la PDT.

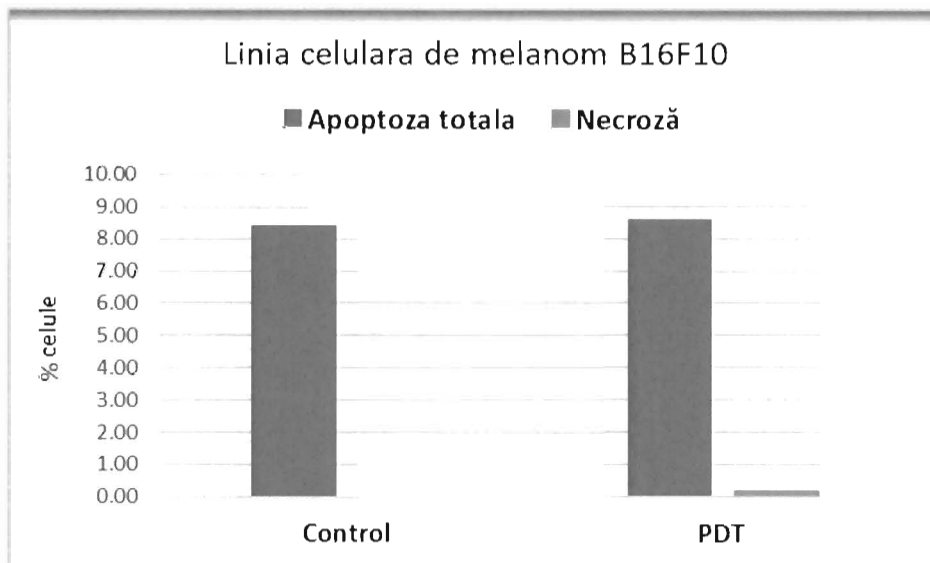


Figura 10. Apoptoza și necroza celulelor de melanom de șoarece din linia B16F10 încărcate cu derivatul porfirinic ($10 \mu\text{M}$), expuse la PDT ($10\text{J}/\text{cm}^2$, $50 \text{mW}/\text{cm}^2$) și analizate la 24 h post-PDT. Datele au fost achiziționate și procesate cu programul FACSDiva (Becton Dickinson).