



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2008 00818

(22) Data de depozit: 15.10.2008

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.03.2012 BOPI nr. 3/2012

(41) Data publicării cererii:
27.02.2009 BOPI nr. 2/2009

(73) Titular:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "I.G.MURGULESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202, SECTOR 6, 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

(72) Inventatori:

- BOSCENCU RICA, STR.VLĂDEASA NR.1, BL.C67, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- SOCOTEANU RADU PETRE, ALEEA PAȘCANI NR.10, BL.M7, SC.A, AP.16, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

- NACEA VERONICA, CALEA FLOREASCA NR. 124, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- CONSTANTIN CAROLINA, STR.TEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1, AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- MANDA GINA, STR.EUGEN IOSIF NR.9, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- NEAGU MONICA, STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- ILIE MIHAELA, STR.DUMBRAVA NOUĂ NR.10, BL.M82, AP.76, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- BACONI DANIELA LUIZA, STR.ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN NR.10, BL.465, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- ANABELA SOUSA OLIVEIRA, AV.ROVISCO PAIS 1096, LISABONA, PT;
- LUIS FELIPE VIEIRA FERREIRA, AV.ROVISCO PAIS 1096, LISABONA, PT

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 122037 B1; WO 2006/012140 A1

(54) COMPUS TETRAPIROLIC NESIMETRIC SUBSTITUIT, PROCEDEU DE OBTINERE ȘI EVALUARE BIOLOGICĂ EVALUARE BIOLOGICĂ LA NIVEL CELULAR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus tetrapirolic nesimetric substituit, la un procedeu de obținere a acestuia și la utilizarea lui ca substanță activă, în forme farmaceutice utilizate în terapia antitumorală. Compusul conform invenției este 5-[(3,4- metilendioxi) fenil]-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfină.

Revendicări: 3

Figuri: 4

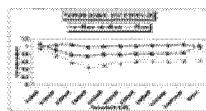


Fig. 1

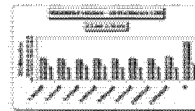


Fig. 3

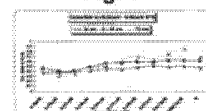


Fig. 2

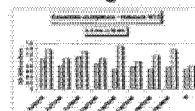


Fig. 4

Examinator: dr. chimist CONSTANTINESCU ADELA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123419 B1

1 Prezența invenției se referă la un compus tetrapirolic nesimetric substituit, utilizat ca
substanță activă în forme farmaceutice în terapia antitumorală.

3 Invenția se referă la obținerea, caracterizarea spectrală și evaluarea *in vitro*, la nivel
celular, a unui compus cu structură tetrapirolică nesimetric substituit, cu potențiale aplicații
5 în terapia fotodinamică a cancerului.

În ultimii ani, atenția comunității științifice este îndreptată către tehnologiile promi-
7 țătoare din era post-genomică, utilizate pentru identificarea de compuși noi cu proprietăți
antitumorale, precum și de noi ținte celulare ale acestor agenți inovatori. Privit din punctul
9 de vedere al biologiei celulare, cancerul reprezintă pe deplin maladia care afectează celula
integral, implicând proliferare celulară necontrolată, ca rezultat al acumulării mutațiilor
11 somatice [H. Mujagic, *Drug News Perspect.*, 2006, 19(9), 575-583].

Multe aspecte ale terapiei antitumorale pot fi decelate și monitorizate în sistemele
13 celulare, fapt care le conferă caracterul de vehicule ideale pentru exploatarea de noi agenți
cu potențial antitumoral [J. S.Caldwell, *Adv. Cancer Res.*, 2007;96, 145-173].

15 Cele mai studiate sisteme heterociclice din punct de vedere al utilizării lor ca agenți
fotosensibilizatori în terapia fotodinamică a cancerului sunt cele de tip tetrapirolic. [M.R.
17 Detty, S.L. Gibson, S.J. Wagner, *J. Medicinal Chem.*, 2004, 47, 3897].

Terapia fotodinamică bazată pe derivați tetrapirolici reprezintă o modalitate
19 promițătoare în tratamentul tumorilor pulmonare, de esofag și piele, precum și în
degenerescenta maculară generată de vârstă. Eficiența tratamentului este în mare măsură
21 determinată de transportul fotosensibilizatorilor de către lipoproteinele serice de densitate
joasă, și de livrarea specifică a compușilor porfirinici în celulele și vascularizația tumorală.
23 Eficiența poate fi optimizată prin creșterea selectivității preluării fotosensibilizatorului de către
tumoră și prin utilizarea unor surse de lumină în domeniul 630-680 nm, interval în care
25 țesuturile prezintă cea mai crescută transitanță.

O bună localizare la nivel celular este asigurată de repartizarea neuniformă a
27 densității de sarcină pe macrociclul tetrapirolic, respectiv de caracterul amfifil al moleculei
fotosensibilizatorului [F. Ricchelli, G. Jori, S. Gobbo, M. Tronchin, *Biochim. Biophys. Acta*,
29 1991, 1065, 42-48].

În prezent, terapia antitumorală bazată pe substanțe active medicamentoase cu
31 structuri macrociclice de tip tetrapirolic se aplică în numeroase clinici, însă procedul nu este
suficient dezvoltat [J. C. Kennedy, S. L. Marcus, R. H. Pottier, *J. Clin. Laser. Med.*
33 *Surg.*, 1996, 14, 289; G. Gupta, C. A. Morton, C. Witehurst, J. V. Moore, R. M. MacKie, *Br. J.*
Dermatol, 1999, 141, 385; R. A. Miller, K. Woodburn, Q. Fan, M. F. Renschler, J. L. Sessler,
35 J. A. Koutcher, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1999, 45, 981].

Pe de altă parte, compușii din această clasă, utilizați în prezent ca fotosensibilizatori,
37 nu întrunesc toate criteriile pentru obținerea unei eficiențe antitumorale maxime.

RO 122037 B1 descrie 5-di[(3-hidroxi-4-metoxi)fenil]-10,15,20-tris-(3,4-metilendioxfenil)-
39 21,23H porfina utilizată în tratamentul cancerului.

WO 2006/012140 A1 descrie derivați porfirinici tetrafenil substituiți cu formula
41 generală I, în care grupările pot fi substituite în poziția orto, meta sau para, cu alchil,
cicloalchil, aril, alchilaril, heteroaril sau alchil, sau grupare alchil, cicloalchil, aril, hidroxi,
43 arilalchil sau heteroaril, substituită cu 1 până la 4 grupări hidrofobe, selectate dintre hidroxi,
alcoxi, -C(O)OR⁵, -SOR⁶, -SO₂R⁶, nitro etc., utilizați în tratamentul cancerului.

45 Comparativ cu compusul 5-di[(3-hidroxi-4-metoxi)fenil]-10,15,20-tris-(3,4-metilendioxfenil)-
21,23H porfirina, descris în **RO 122037 B1**, compusul prezentei invenții prezintă următoarele
47 avantaje: solubilitate superioară în solvenți compatibili cu fluidele biologice, datorită caracterului

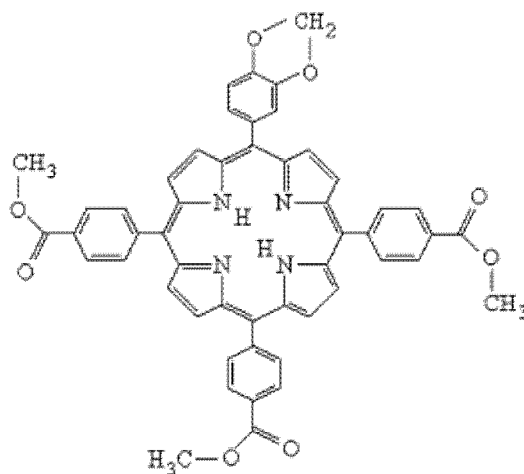
RO 123419 B1

său amfifil conferit de natura substituenților periferici (grupările metoxi, gruparea metilendioxi); stabilitate superioară și particularități de comportament chimic evidențiate prin analiza spectrală a compusului tetrapirolic care face obiectul prezentei invenții. 1
3

Unul din scopurile invenției constă în îmbunătățirea calităților compusului din punct de vedere spectral. O compatibilitate mărită, dublată de solubilitate crescută în solvenți cu polarități diferite conduce la spectre de absorbție cu un grad mai mare al raportului semnal zgomot, respectiv, la o interpretare riguroasă a caracteristicilor spectrale relevante pentru aplicațiile medicale ale compusului prezentei invenții. 5
7

Problema tehnică constă în obținerea unor compuși macrociclici stabili, netoxici, cu structuri și proprietăți fizico-chimice care să asigure o bună localizare la nivel celular, dar și randament bun în generarea oxigenului singlet. 9
11

Invenția are ca obiect furnizarea unui compus tetrapirolic nesimetric substituit cu proprietăți antitumorale. 13



5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina 15 17 19 21 23 25 27

Un alt obiect al invenției constă într-un procedeu de obținere a compusului tetrapirolic definit anterior, care decurge prin următoarele etape: 29

1) reacția dintre 4-formil-benzoat de metil, metilendioxi-benzaldehida și pirol pe suport de silicagel neutru; 31

2) răcirea amestecului de reacție, dizolvare în clorură de metilen și filtrare la presiune normală; 33

3) separarea produsului util pe coloană cromatografică. 35

De asemenea, s-a urmărit și evaluarea viabilității și capacității proliferative a unor linii celulare: linia Jurkat (linie umană de leucemie cu celule T) și celule HT29 (linie umană de cancer de colon), în prezența compusului tetrapirolic nesimetric. 37

Procedeul s-a realizat prin investigarea următorilor parametri: 39

- determinarea viabilității celulare/integrității membranare prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei; 41

- determinarea proliferării celulare prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolium. 43

Avantajele aplicării invenției sunt:

- compusul tetrapirolic nesimetric substituit poate fi obținut cu randament bun printr-o reacție necatalizată ce se desfășoară în condiții ecologice, într-un interval de timp scurt, iar numărul de izomeri din amestecul final de reacție este mult mai mic comparativ cu metoda clasică; 45
47

RO 123419 B1

1 - procedeul de purificare aplicat permite o separare eficientă a produsului util, prin
particularitățile structurale și proprietățile fizico-chimice, compusul prezintă avantajul unei
3 bune localizări la nivel celular și subcelular;

- stabilirea unui protocol optim de inducere a terapiei fotodinamice, utilizând ca
5 substanță fotosensibilizatoare compusul tetrapirolic nesimetric substituit.

S-a constatat acum că noul fotosensibilizator prin caracterul sau amfifil se poate
7 localiza ușor la nivel celular și nu manifestă toxicitate asupra liniilor celulare tumorale
studiate.

9 Inventția se referă la un compus tetrapirolic nesimetric substituit, care se localizează
ușor la nivel celular și care nu manifestă toxicitate asupra liniilor celulare tumorale Jurkat și
11 HT29.

Reacția de obținere a compusului tetrapirolic nesimetric substituit decurge prin reacția
13 aldehidelor cu pirolul pe suport de silicagel neutru prin iradiere cu microunde.

Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform invenției, în etapa
15 1, pirolul proaspăt distilat se adaugă în vasul de reacție imediat după ce componentele
carbonilice au fost amestecate în raport stoichiometric. Se omogenizează amestecul celor
17 trei reactanți și se adaugă silicagel neutru ca suport în reacția de sinteză. Se fac 4-6 iradiieri
cu răcirii succesive, la 375 W, timpul fiecărei iradiieri fiind de 3 min.

19 Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 3,
produsul de reacție sub formă de soluție foarte concentrată în CH_2Cl_2 s-a introdus în coloana
21 cromatografică între straturile de fază staționară, la o distanță de aproximativ 20 cm de la
partea superioară.

23 Descrierea pe scurt a desenelor:

- fig. 1 prezintă evaluarea viabilității/integrității membranare pentru celule Jurkat
25 (celule în suspensie);

- fig. 2 prezintă evaluarea capacității proliferative pentru celule Jurkat (celule în
27 suspensie);

- fig. 3 prezintă evaluarea viabilității/integrității membranare pentru celule HT29
29 (celule aderente);

- fig. 4 prezintă evaluarea capacității proliferative pentru celule HT29 (celule
31 aderente).

În continuare, invenția este ilustrată prin 6 exemple nelimitative de realizare.

33 Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie,
utilizând o coloană cromatografică de $L=100$ cm și $F=10$ cm. Drept fază staționară, s-a
35 utilizat silicagel 60 H Merck, iar ca eluent, un amestec clorură de metilen:eter etilic în raport
40:1.

37 Spectrele IR au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru cu transformată
Fourier, de tip Bruker - Tensor 27, cu ATR (reflexie totală atenuată) Pike, prevăzut cu cristal
39 de diamant. Compusul studiat a fost uscat timp de 24 h, 150°C , iar domeniul spectral abordat
a fost cuprins în intervalul $4000\dots 500\text{ cm}^{-1}$.

41 Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN), care au confirmat structura
compusului 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina,
43 s-au înregistrat cu ajutorul unui spectrometru de tip Bruker Avance DRX 400, prevăzut cu
un cap de probă multinuclear (de 5 mm) cu detecție inversă. Intensitatea câmpului magnetic
45 extern aplicat probei de studiat a fost de 9 Tesla, iar proba a fost expusă câmpului în tuburi
speciale de tip Norell 507 PP.

47 Au fost înregistrate atât spectrele RMN unidimensionale (^1H -RMN, ^{13}C -RMN și
DEPT), cât și cele bidimensionale (COSY, HMQC și HMBC).

RO 123419 B1

| | |
|--|----------------------------|
| Spectrele ¹ H-RMN au fost înregistrate la frecvența de 400 MHz, utilizând drept referință semnalul tetrametilsilanului (TMS). Solventul utilizat a fost clorofomul deuterat. | 1 |
| Fereastra tipică de înregistrare a spectrelor a fost de 15 ppm. Au fost utilizate un număr de 16 scanări pentru fiecare spectru. Lungimea pulsurilor a corespuns unei înclinări a vectorului magnetizării de 45°. | 3 5 |
| Spectrele ¹³ C-RMN au fost înregistrate la o frecvență de 100 MHz, utilizând ca referință semnalul clorofomului deuterat. Fereastra tipică de înregistrare a spectrelor a fost de 300 ppm. Fiecare spectru obținut reprezintă medierea unui număr de 512 sau 1024 scanări. Lungimea pulsurilor a corespuns unei înclinări a vectorului magnetizării de 30°. | 7 9 |
| Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35, cu domeniul spectral de lucru 200-800 nm. Pentru a evalua modul în care tipul solventului influențează alura spectrelor și intensitățile benzilor de absorbție, comportarea spectrală a compusului macrociclic tetrapirolic cu structura asimetrică a fost analizată în diverși solvenți (diclormetan, ciclohexan, DMF și DMSO), pentru concentrații cuprinse în intervalul 10 ⁻⁴ ÷ 10 ⁻⁶ M. | 11 13 15 |
| Pentru determinarea viabilității celulare prin testul eliberării lactat dehidrogenazei s-a utilizat sistemul <i>The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation)</i> . Această tehnică reprezintă o alternativă colorimetrică a metodei de dozare a cromului radioactiv (⁵¹ Cr) eliberat din țintele celulare marcate. Sistemul măsoară cantitativ enzima lactat dehidrogenaza (LDH), cu localizare citosolică stabilă, și care este eliberată în urma lizei celulare, în aceeași manieră în care ⁵¹ Cr este eliberat în varianta radioactivă. LDH eliberat în supernatanții de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 min, care are drept rezultat conversia unei săruri de tetrazoliu la formazan roșu. Cantitatea de produs roșu format este proporțională cu numărul de celule lizate din cultură. Densitățile optice (DO) măsurate în domeniul vizibil la 492 nm sunt înregistrate la un cititor de plăci cu 96 de godeuri. Pentru fiecare probă în triplicat, se calculează valoarea medie a DO ± SD. | 17 19 21 23 25 |
| Determinarea proliferării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS. Sistemul <i>The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation)</i> reprezintă o metodă colorimetrică pentru determinarea numărului de celule viabile în cadrul testelor de proliferare sau citotoxicitate. Conține un compus tip tetrazolium [sare internă de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium] și un compus cuplat electronic (fenazin etosulfat; PES). PES prezintă stabilitate chimică ceea ce permite combinarea cu MTS pentru a forma o soluție stabilă. Compusul MTS este bioredux de către celule la formazan colorat, care este solubil în mediul de cultură utilizat. Această conversie se presupune că are loc în prezența NADPH sau NADH produse de dehidrogenazele din celulele active metabolic. | 27 29 31 33 |
| Testul se realizează prin adăugarea unei mici cantități din reactivul kitului (<i>CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent</i>) direct în godeurile de cultură, urmată de incubare de 3 h și înregistrarea DO la 492 nm, cu un cititor de plăci. Cantitatea de formazan măsurată la 492 nm este direct proporțională cu numărul de celule vii, proliferante, din cultură. | 35 37 39 |
| Exemplul 1 | 41 |
| <i>Etape 1. Sinteza compusului tetrapirolic nesimetric substituit 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina brută</i> | 43 |
| Metoda de obținere a noului compus macrociclic cu structură tetrapirolică este diferită de metoda clasică [A.D. Adler, F. Longo, J. Emarelli, J. Goldmacher, J. Assour, I. Korsakoff, <i>J. Org. Chem.</i> , 1967, 32, 476, R.A. Little, J.A. Anton, P.A. Loach, J.A. Ibers: <i>J. Het. Chem.</i> , 1974, 12, 343-349], și prin totalitatea parametrilor care o descriu (natura amestecului de reacție, puterea și durata iradierii, răcirea succesivă a probelor pe parcursul iradierii) poate fi încadrată printre metodele ecologice de sinteză organică. | 45 47 49 |

RO 123419 B1

1 Obținerea compusului tetrapirolic presupune conducerea unei reacții stoichiometrice
dintre 4-formil-benzoat de metil, metilendioxi-benzaldehida și pirol pe suport de silicagel
3 neutru prin iradiere cu microunde, utilizând o instalație de tip HINARI - MX606, 2450 MHz.
S-au efectuat 4-6 iradieri cu răciri succesive, la 375 W, timpul fiecărei iradieri fiind de 3 min.

5 În vasul de reacție se amestecă amestecul format din 3 moli 4-formil-benzoat de
metil și 1 mol metilendioxi-benzaldehida și se adaugă cei 4 moli de pirol proaspăt distilat.
7 Amestecului i se adaugă 4-5 g silicagel (*Kieselgel 60*, Merck, 200-500 mm; 35-70 mesh) se
omogenizează și se încep seturile de iradieri.

9 Monitorizarea analitică a reacției de sinteză s-a realizat prin spectrometrie UV-VIS,
acest lucru fiind motivat de faptul că spectrul electronic în domeniul vizibil reprezintă o
11 „amprentă” a compușilor porfirinici. Astfel, prezența benzii Soret și a celor 4 benzi Q este
întotdeauna un indiciu al existenței acestor structuri în mediul de reacție studiat. În acest
13 sens, după fiecare iradiere s-au prelevat probe din amestecul de reacție, care au fost
dizolvate în clorură de metilen și evaluate prin înregistrarea spectrelor electronice în
15 domeniul vizibil.

Produsul de reacție solubilizat în diclormetan a fost filtrat la presiune normală, filtratul
17 a fost concentrat prin distilare și apoi a fost supus purificării.

19 *Etapa 2. Purificarea 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil) -
21,23-H porfinei*

21 Pe baza proprietăților cromofore manifestate de compușii porfirinici, evaluarea
numărului de componenți din amestecul final de reacție s-a realizat prin teste de
cromatografie în strat subțire.

23 S-a constatat faptul că numărul de izomeri prezenți în amestecul final este mult mai
mic comparativ cu metoda clasică.

25 Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie,
utilizând o coloană cromatografică de L= 100 cm și F=10 cm. Drept fază staționară, s-a
27 utilizat silicagel 60 H Merck, iar ca eluent, un amestec clorură de metilen:eter etilic în raport
40:1.

29 Pentru o separare eficientă, produsul rezultat în reacția de sinteză se aduce sub
formă de soluție concentrată în CH₂Cl₂ în coloană și pentru a evita antrenarea compușilor
31 de separat în volumul de eluent de la partea superioară a coloanei, s-a adăugat peste acesta
5-6 cm de fază staționară.

33 Analiza RMN a compușilor rezultați din cele trei fracții eluate pe colana cromatografică
a confirmat următoarele aspecte:

35 - prima bandă care străbate coloana reprezintă compusul tetrapirolic simetric
substituit 5,10,15,20-meso-tetrakis(3,4- metilendioxi -benzo)-21,23H porfina;

37 - cea de-a doua bandă care se deplasează la mică distanță de prima a pus în
evidență prezența compusului util 5-[(3,4-metilendioxi)-fenil]-10, 15, 20-tris-(4-
39 carboximetilfenil)-21,23-H porfina;

41 - banda a treia aparține compusului 5,10,15,20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil) -
21, 23-H porfina.

Randamentul reacției de obținere a noului compus tetrapirolic a fost de 45%.

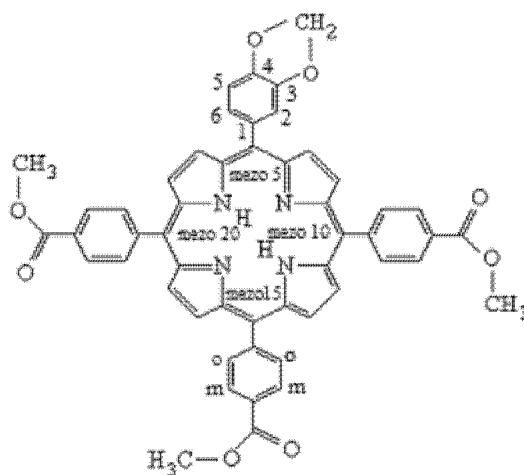
43 Exemplul 2

45 În tabelul 1 sunt prezentate atribuirile principalelor benzi din spectrele IR înregistrate
pentru compusul tetrapirolic nesimetric substituit 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-
carboximetilfenil)-21,23H porfina (TRMOPP) și pentru compușii de referință 5,10,15,20-
47 meso-tetrakis-(3,4-metilendioxi-benzo)-21,23H porfina (TMDOPP) și 5, 10, 15, 20-meso-
tetrakis-(4-carboximetilfenil) - 21, 23H porfina (TCMP).

| Vibrația caracteristică | Numărul de undă al benzii IR (cm ⁻¹) | | |
|-------------------------------------|--|------------|------------|
| | TRMOPP | TMDOPP | TCMP |
| ν_{N-H} | 3312(s) | 3305 (s) | 3310(s) |
| ν_{C-H} | 2925(m) | 2920(m) | 2950(m) |
| $\nu_{C-H \text{ din } -O-CH_2-O-}$ | 2918(m) | 2888 (m) | - |
| $\nu_{C-H \text{ din } -O-CH_3}$ | 2849(m) | - | 2851(i) |
| $\nu_{C=O}$ | 1716(i) | - | 1717(f.i.) |
| ν_{C-N} | 1604(s) | 1603(s) | 1603(m) |
| $\nu_{C=N}$ | 1553(s) | 1556(s) | 1560(s) |
| $\nu_{C=N}$ | 1473(m) | 1471(f.i.) | 1469(s) |
| ν_{C-H} | 1432(m) | 1436(i) | 1400(m) |
| ν_{C-O} | 1272(i) | 1240(f.i.) | 1156(i) |
| d_{C-H} | 1035(m) | 1037(f.i.) | 1018(m) |
| d_{C-H} | 964(m) | 975(m) | 963 (m) |
| g_{C-C} | 866(s) | 832(f.s.) | 868(s) |
| g_{C-N} | 803(m) | 800(i) | 798(m) |
| g_{C-H} | 760(m) | 729(m) | 761(m) |

Exemplul 3

Rezultatele obținute prin analiza RMN sunt prezentate prin valorile deplasărilor chimice în cazul determinărilor de proton ¹H, respectiv ¹³C:



Structura explicativă pentru 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-carboximetil-fenil)-21,23H porfina

TRMOPP: ¹H-RMN, d_H (400 MHz, CDCl₃), ppm: -2,82(2H, brs, NH); 4,13 (9H, s, O-CH₃), 6,27 (2H, s, H_{>CH₂} heterociclu); 8,80 (2H, d, H_{pyrr-1}); 8,95 (6H, d, H_{pyrr-2}); 7,18 (1H, d, H₅); 7,63 (1H, d, H₆); 7,65 (1H, s, H₂); 7,792 (6H, d, H_m); 8,17 (6H, d, H_o).

¹³C-RMN, d_C (400 MHz, CDCl₃), ppm: 52,4 (C_{O-CH₃}), 101,5 (C_{>CH₂} heterociclu); 106,7 (C₅); 115,1 (C₂); 119,1 (mezo-C_{5,10,15,20}); 127,1 (C_m); 127,9 (C_p), 128,6 (C₆), 129,8 (Cb_{pyrr}), 134,5 (C_o), 146,3 (C₁), 146,3 (C₃), 147,7 (C₄).

RO 123419 B1

1 Exemplul 4

3 Maximele benzilor de absorbție din spectrele UV-VIS înregistrate pentru 5-[(3,4-
metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina în diverși solvenți
5 sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

| Solvent | Soret l(nm) | $Q_y(1,0)$ l(nm) | $Q_y(0,0)$ l(nm) | $Q_x(1,0)$ l(nm) | $Q_x(0,0)$ l(nm) |
|---------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| DMF | 421 | 515,46 | 551,52 | 591,91 | 642,12 |
| CH ₂ Cl ₂ | 421 | 515,98 | 550,69 | 590,91 | 646,92 |
| DMSO | 422,7 | 516,22 | 553,50 | 591,67 | 646,7 |
| Ciclohexan | 419,3 | 513,87 | 548,55 | 591,96 | 649,06 |

13

Exemplul 5

15 Evaluarea viabilității și capacității proliferative a celulelor din linia Jurkat (linie umană
de leucemie cu celule T) s-a realizat pe domeniul de concentrații 390... 0.75 μ M ale
17 compusului porfirinic. În condițiile date, viabilitatea celulelor Jurkat variază în funcție de
19 timpul de incubare, neînregistrându-se o eliberare semnificativă de LDH.

21 Trebuie ținut cont de natura celulelor Jurkat, non-fagocitară, și deci de faptul că la
23 timpi mai mari de incubare, compusul este mai bine internalizat intracelular. Pe același
25 domeniu de concentrații, rata de proliferare nu prezintă variații în funcție de doza la timpi
scurți (24 h), având valori comparabile cu martorul celular. Se constată creșterea ratei de
multiplicare la 72 h, pentru anumite doze (6 μ M și, respectiv, 0.75 μ M). Deși s-a remarcat
efectul non-citotoxic al compusului, testările ulterioare extinse la alte linii celulare s-au
efectuat pe un domeniu mai scăzut de concentrații.

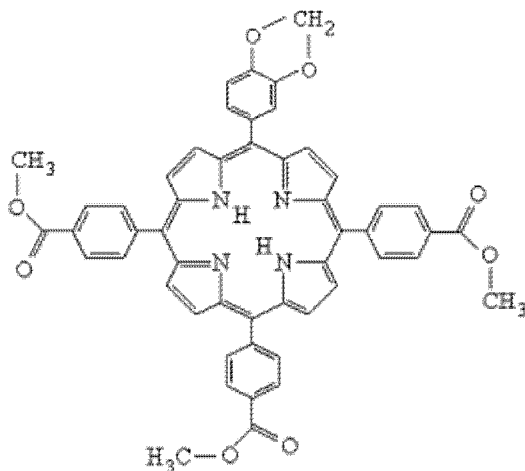
Exemplul 6

27 Evaluarea viabilității și capacității proliferative a celulelor din linia HT29 - linie umană
de cancer de colon (celule aderente), în prezența 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-tris-(4-
29 carboximetilfenil)-21,23-H porfinei, s-au realizat pe domeniul 62.5...0.48 μ M. Datele obținute
31 pentru linia Jurkat au sugerat posibilitatea studierii efectelor compusului tetrapirolic
nesimetric la timpi și mai scurți de incubare (toxicitate de scurtă durată), respectiv, 2 și 18
h. Astfel, la 2 h de incubare, compusul nu induce moartea celulară pe domeniul studiat,
33 observându-se un nivel mai scăzut al eliberării LDH comparativ cu celulele neincubate cu
compus. La 18 h, comportamentul celulelor în prezența 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10, 15, 20-
35 tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfinei este de asemenea omogen, niciuna din doze
nefiind letală. Rata de multiplicare a celulelor, deși are aceeași alură la ambii timpi de
37 incubare, este ușor ridicată la 18 h; acest rezultat se corelează cu viabilitatea, dar poate fi
datorat nu atât efectului compusului, ci modificării raportului număr celule/doză compus
39 (numărul de celule de la care s-a pornit inițial testarea a crescut, dar doza a rămas aceeași).

RO 123419 B1

Revendicări

Compus tetrapirolic nesimetric substituit, cu următoarea structură chimică:



2. Procedeu de obținere a compusului tetrapirolic nesimetric substituit, definit în revendicarea 1, care cuprinde următoarele etape:

- reacția dintre metilendioxi-benzaldehida, 4-formil-benzoat de metil și pirol în raport molar 1:3:4;

- răcirea amestecului de reacție, dizolvare în clorura de metilen și filtrare la presiune normală;

- separarea produsului util pe coloană cromatografică pe silicagel 60 H Merck, cu amestec clorură de metilen și eter etilic în raport 40:1(v/v).

3. Compus tetrapirolic nesimetric substituit, conform revendicării 1, pentru utilizare în terapia fotodinamică a cancerului.

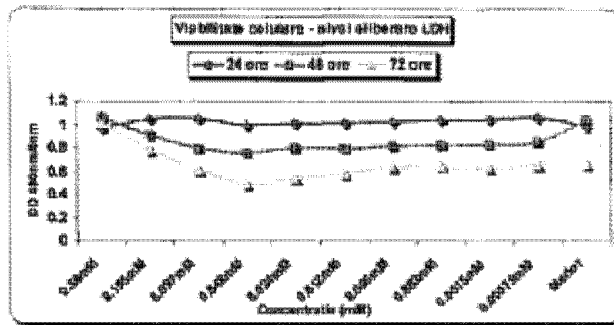


Fig. 1

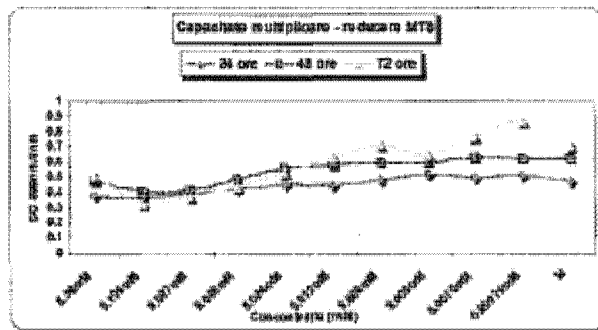


Fig. 2

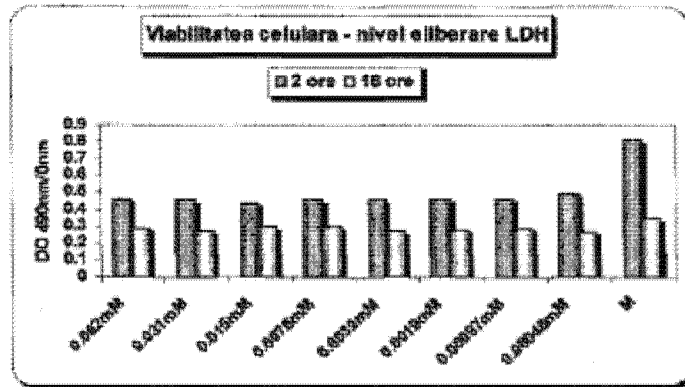


Fig. 3

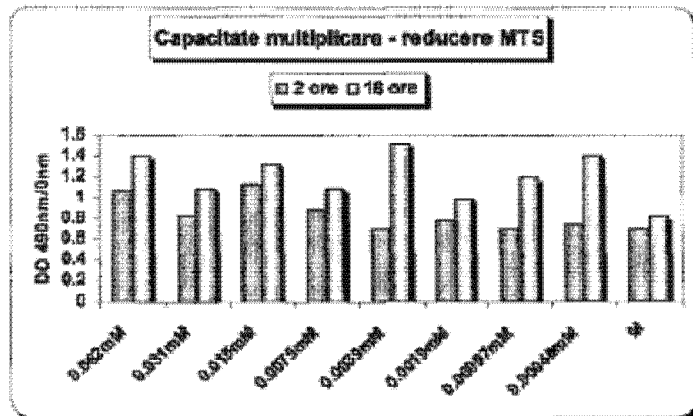


Fig. 4

