



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00452**

(22) Data de depozit: **17.06.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2015** BOPI nr. **4/2015**

(41) Data publicării cererii:
30.11.2009 BOPI nr. **11/2009**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "I.G.MURGULESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **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**

(72) Inventatori:

- **SOCOTEANU RADU-PETRE, ALEEA PAȘCANI NR.10, BL.M 7, SC.A, AP.16, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BOSCENCU RICA, STR.VLĂDEASA NR.1, BL.C 67, AP.20, 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.M 82, SC.2, ET.3, AP.76, SECTOR 5, 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 122035 B1; RO 122036 B1;**
- RO 122037 B1; RO 122038 B1;**
- RO 122039 B1**

(54) **COMPUS PORFIRINIC DESTINAT TERAPIEI FOTODINAMICE A CANCERULUI**



RO 125018 B1

1 Prezenta invenție se referă la un derivat de porfirină cu denumirea chimică 5-(4-
2 hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină care este un compus substituit
3 asimetric, din clasa heterociclicilor tetrapirolici, util pentru terapia cancerului. 5-(4-Hidroxifenil)-
4 10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina a fost sintetizată și optimizată pentru
5 studiile de încărcare celulară (teste preliminare biomimetice în tratamentul cancerului).

6 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina, un sistem
7 heterociclic polifuncțional de tip porfirinic, face parte dintr-o clasă de compuși chimici extrem
8 de studiați, în special datorită rolului jucat în reacțiile de fotodegradare oxidativă care au loc
9 la nivel celular și subcelular.

10 În ceea ce privește stadiul actual al utilizărilor biomedicale ale acestor compuși,
11 domeniul cu cea mai mare aplicabilitate îl reprezintă *Terapia Fotodinamică a Cancerului*. Ca
12 metodă selectivă de tratament antitumoral, aceasta presupune administrarea formei
13 farmaceutice care conține fotosensibilizatorul, localizarea selectivă a acestuia la nivelul
14 celulelor tumorale, iradierea țesutului afectat cu lumină laser și generarea de specii chimice
15 foarte reactive (oxigen singlet, 1O_2) care distrug celulele tumorale.

16 Cel mai important avantaj al terapiei fotodinamice îl constituie utilizarea spectrului
17 radiativ vizibil sau ultraviolet, care presupune energii mult mai mici decât cele implicate în
18 tratamentul radiochimic clasic (radiații γ).

19 În stadiul tehnicii sunt cunoscuți numeroși derivați de porfirină utili pentru tratamentul
20 cancerului.

21 Astfel, din brevetul **RO 122035 B1**, cu titlul "Compus porfirinic, dublu grefat,
22 heterociclic", se cunoaște derivatul de porfirină 5,15-di[3,4-metilendioxi]benzo]-10,20difenil-
23 21,23H porfina, utilizat ca generator de oxigen singlet și, implicit, drept componentă activă
24 în compoziții farmaceutice pentru tratamentul cancerului.

25 Din brevetul **RO 122036 B1**, cu titlul "Derivat porfirinic substituit asimetric", se
26 cunoaște derivatul de porfirină 5-[(3,4-metilendioxi)fenil]-10,15,20 trifenil-21,23Hporfina
27 (TMDPP) și utilizarea acestuia ca generator de oxigen singlet și, implicit, drept componentă
28 activă, în compoziții farmaceutice, pentru tratamentul cancerului.

29 Din brevetul **RO 122037 B1**, cu titlul "Porfirină nesimetrică, bază liberă", se cunoaște
30 derivatul de porfirină 5-di-[(3-hidroxi-4-metoxi)fenil]-10,15,20-*tris*-(3,4-metilendioxi)fenil)-
31 21,23H porfină, utilizat ca generator de oxigen singlet și drept componentă activă, în
32 compoziții pentru tratamentul cancerului.

33 Din brevetul **RO 122038 B1**, cu titlul "Compus porfirinic, generator de oxigen singlet",
34 se cunoaște derivatul de porfirină 5-di[(3-hidroxi-4-metoxi)fenil]-10,15,20-trifenil-21H, 23H
35 porfină (TMHAPP), utilizat ca generator de oxigen singlet și drept componentă activă, în
36 compoziții farmaceutice, pentru tratamentul anticanceros.

37 Din brevetul **RO 122039**, cu titlul "Compus tetrapirolic, asimetric", se cunoaște
38 derivatul de porfirină 5-fenil-10,15,20-*tris*(3,4-metilendioxi)fenil-21,23H porfină, utilizat ca
39 generator de oxigen singlet și drept componentă activă, în compoziții farmaceutice, pentru
40 tratamentul cancerului.

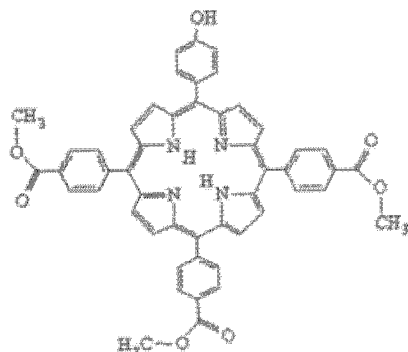
41 S-a observat acum, în mod surprinzător, că derivatul de porfirină cu denumirea
42 științifică **IUPAC 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină**, ce
43 va fi numit în continuare cu forma uzuală prescurtată **TCMPOHp**, prezintă un echilibru
44 modificat între zonele de atac electrofil și nucleofil. Ca urmare, penetrarea membranei (cu
45 potențial electric) a fost modificată la rândul ei, rezultând un proces superior de încărcare
celulară, așa cum va fi evidențiat în continuare prin rezultatele studiilor biologice.

RO 125018 B1

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în obținerea unui derivat porfirinic cu eficiență mărită, util pentru terapia fotodinamică a cancerului. 1

Soluția la această problemă constă într-un derivat de porfirină cu denumirea chimică 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfină. 3

Ca atare, într-un prim aspect, prezenta invenție se referă la un derivat de porfirină cu structura: 5



având denumirea științifică IUPAC: 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină. 7
9
11
13
15
17

Într-un aspect preferat, derivatul de porfirină definit mai sus se utilizează ca generator de oxigen singlet. 19
21

Într-un alt aspect preferat, derivatul de porfirină definit mai sus se utilizează ca tester pe: linia **Jurkat** de leucemie umană cu morfologie de limfocit T; linia **U937** mieloidă umană cu morfologie de monocit-macrofag; linia aderentă umană **HT29**, de adenocarcinom de colon. 23
25

Derivatul de porfirină definit mai sus se utilizează într-o formulare farmaceutică pentru tratamentul cancerului. 27

Derivatul de porfirină, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- un grad înalt de puritate și reproductibilitate sintetică în condiții de laborator; 29
- fotoactivitate la lungimi de undă $\lambda > 600$ nm, pentru a se asigura pătrunderea radiației în țesuturi mai în profunzime, și sensibilizarea cu o sursă de lumină externă; 31
- nivel de toxicitate în absența luminii apropiat de zero; 33
- selectivitate pentru țesuturile tumorale; 33
- eliminare rapidă din organism, după ce efectul a fost realizat; 35
- solubilitate acceptabilă în fluidele organismului, pentru a se localiza ușor la nivel celular și subcelular. 35

În figurile care fac parte din prezenta descriere sunt redate următoarele: 37

- fig. 1, structura TCMPOH_p 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină; 39
- fig. 2, notarea pozițiilor principale RMN pentru TCMPOH_p; 39
- fig. 3, cromatograma compusului TCMPOH_p ($T_R = 1,965$ min); 41
- fig. 4, spectrul UV al compusului eluat la $T_R = 1,965$ min ($\lambda = 415$ nm); 41
- fig. 5, cromatogramele compusului TCMPOH_p ($T_R = 1,965$ min, domeniul 1...5 λ g); 43
- fig. 6, cromatograma compusului TCMPOH_p ($T_R = 2,039$ min, faza mobilă metanol:acetonitril 30:70); 45

RO 125018 B1

- 1 - fig. 7 , viabilitate și proliferare la 24 h de incubare;
- fig. 8 , viabilitate și proliferare la 48 h de incubare;
3 - fig. 9 , viabilitate și proliferare la 72 h de incubare;
- fig. 10, 11, viabilitate și proliferare la 2, respectiv, 18 h de incubare, linia HT29;
5 - fig. 12 , apoptoza în linia U937 - pe grade de apoptoză TCMPOHp.

7 *Legendă:* An-Pi- = celule vii; An+Pi- = apoptoză timpurie; An+Pi+= apoptoză târzie; An-Pi+ = necroză.

9 Prezenta invenție cuprinde sinteza, purificarea, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea interacției cu biomolecule și culturi celulare ale unor structuri macrociclice de tip tetrapirolic, cu potențiale aplicații în terapia antitumorală, prin fotosensibilizare.

11 Compusul care face obiectul invenției a fost sintetizat prin metode neconvenționale (tehnica iradierii cu microunde), și prezintă formula structurală redată în fig. 1.

13 Compusul de referință pentru structura asimetrică ce face obiectul invenției este 5,10,15,20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina, denumită prescurtat **TCMP**.

15 Sinteza compușilor macrociclici, de tip porfirină simetric substituită **TCMP** sau porfirină asimetrică **TCMPOHp**, s-a realizat cu randament foarte bun printr-o reacție necatalizată, într-un interval de timp scurt și cu un număr de izomeri în amestecul final de reacție mult mai mic în comparație cu metoda clasică.

19 Metoda de obținere a acestor structuri este diferită de metoda clasică [1,2] 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.

23 Obținerea caracteristicilor structurale și a parametrilor ce caracterizează comportarea sistemelor porfirinice în raport cu valori diferite de pH sau solvenți diferiți s-a realizat printr-o analiză spectrală complexă a noilor compuși sintetizați în cadrul acestei etape. În acest sens s-au utilizat cele mai noi tehnici spectrale de analiză: RMN, FTIR, UV-VIS, HPLC, GS-MS.

27 Modificările induse în sistem acelular, la nivelul topoizomerazelor I și II, precum și la nivelul ADN-ului genomic, au fost evaluate prin studii de interacție a structurilor macrociclice de tip tetrapirolic cu biomolecule. Testele sunt efectuate în sisteme celulare reprezentate de linii celulare standard, sub formă de suspensie sau aderențe, respectiv: linia **Jurkat** de leucemie umană cu morfologie de limfocit T, linia **U937** mieloidă umană cu morfologie de monocit-macrofag, și linia aderentă umană **HT29**, de adenocarcinom de colon. De asemenea, se revendică o serie de corelații între toxicitatea biologică *in vitro* și structura compușilor macrociclici, prin studii de interacție a acestora cu suspensii celulare.

35 S-au realizat sisteme experimentale în prezența celulelor **Jurkat** pentru 24, 48 și 72 h de cultură. Linia umană standard **HT29** (*ECACC 91072201*), de adenocarcinom de colon, a fost investigată în sisteme de toxicitate de scurtă durată (2 h) și la perioade mai lungi de incubare (18 h), în prezența compușilor porfirinici nou-sintetizați. Acumularea porfirinelor în celulele HT29 a fost evaluată indirect, prin teste de eliberare de LDH și reducere a MTS.

41 Evaluarea stadiilor de apoptoză s-a făcut în urma studiilor cu porfirinele de sinteză în prezența liniei celulare **U937**. Tot în cadrul acestor studii au fost evaluate și interacțiile porfirină-topoizomerază II, în sisteme acelulare.

RO 125018 B1

| | |
|---|----|
| Exemplul 1 | 1 |
| Sinteza compușilor tetrapirolici baze libere | |
| Acest exemplu descrie procedeul de sinteză a compusului asimetric printr-o metodă modernă și ecologică. | 3 |
| Etapele procesului de obținere a compusului de interes au fost următoarele: | 5 |
| ● reacția incipientă dintre benzaldehida substituită, benzaldehida adiacentă și pirol pe suport de silicagel neutru; | 7 |
| ● iradierea cu microunde a acestui amestec; | |
| ● răcirea amestecului de reacție, dizolvarea în clorură de metilen și filtrarea la presiune normală; | 9 |
| ● separarea produsului util pe coloană cromatografică, urmată de recristalizare. | 11 |
| Obținerea compusului util cu structură tetrapirolică s-a realizat prin conducerea unei reacții stoechiometrice dintre benzaldehidele substituite și pirol pe suport de silicagel neutru (<i>Kieselgel 60</i> , Merck, 200-500 μm; 35-70 mesh), prin iradierea 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. Produsul de reacție solubilizat în diclormetan a fost filtrat la presiune normală, filtratul a fost concentrat prin distilare și apoi a fost supus purificării. | 13 |
| | 15 |
| | 17 |
| 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. S-a constatat faptul că numărul de izomeri prezenți în amestecul final este mult mai mic comparativ cu metoda clasică, subliniind caracterul ecologic al acestui procedeu. | 19 |
| | 21 |
| | 23 |
| Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie utilizând o coloană cromatografică de L= 100cm și Φ = 6 cm. | 25 |
| Drept fază staționară s-a utilizat silicagel 60H Merck, iar ca eluent, un amestec de clorură de metilen:eter etilic în raport 40:1. | 27 |
| 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 este reprezentativ pentru compușii 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 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 domeniul vizibil. Modul de lucru în acest caz a inclus și TLC- cromatografia în strat subțire - ale cărei rezultate au influențat atât modul de iradiere, cât și alegerea eluenților pentru purificarea pe coloană cromatografică. | 29 |
| | 31 |
| | 33 |
| | 35 |
| Randamentul reacției calculat la produsul de interes fost de 53%. | 37 |
| Exemplul 2 | |
| Spectrometria UV-VIS | 39 |
| Caracterizarea spectrală a compușilor de interes a inclus și analiza prin spectrometrie UV-VIS a acestora. Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35, cu domeniul spectral de lucru 200...800 nm. | 41 |
| Prin analiza spectrelor electronice ale celor patru compuși macrocilici sintetizați de noi, s-a urmărit completarea ansamblului de date care confirmă în final structurile propuse. | 43 |

RO 125018 B1

În cazul compușilor cu structură tetrapirolică, spectrele de absorbție electronică sunt utilizate pentru identificare, deoarece compușii din această clasă au drept caracteristică esențială un spectru de absorbție în domeniul vizibil tipic, care cuprinde următoarele elemente caracteristice [4]:

- zona benzii B (banda Soret) situată în domeniul lungimilor de undă 400...440 nm;
- zona benzilor Q situată în domeniul lungimilor de undă 450...700 nm; în cazul porfirinelor baze-libere, acestei zone din spectru îi corespund patru benzi, în timp ce în spectrul metaloporfirinelor sunt prezente doar două.

Maximele benzilor de absorbție din spectrele UV-VIS înregistrate în soluții de diclormetan pentru compușii TCMP și TCMPOHp sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

| Compus porfirinic | Soret λ (nm) | Q _y (1,0) λ (nm) | Q _y (0,0) λ (nm) | Q _x (i,0) λ (nm) | Q _x (0,0) λ (nm) |
|-------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| TCMP | 4196 | 5152 | 550 | 5901 | 6455 |
| TCMPOHp | 421 | 5161 | 5503 | 5903 | 6486 |

Exemplul 3

Caracterizarea spectrală IR

În exemplul ce urmează este prezentată structura revendicată prin prisma analizei în spectrul infraroșu. 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 de diamant. Compușii destinați studiului au fost uscați timp de 24 h la 150°C, iar domeniul spectral abordat a fost cuprins în intervalul 4000-500 cm⁻¹.

În tabelul 2 sunt prezentate atribuirile principalelor benzi din spectrele IR înregistrate pentru compusul revendicat - datele sunt prezentate în raport cu un compus analog - TCMP:

Tabelul 2

| Tipul vibrațional | TCMPOHp | TCMPOH |
|--|----------|-------------|
| ν_{O-H} | 3480 (m) | - |
| ν_{N-H} | 3161 (m) | 3310 (s) |
| ν_{C-H} | 2921 (m) | 2950 (m) |
| ν_{C-H} din -O-CH ₂ -O- | - | - |
| ν_{C-H} din -O-CH ₃ | 2851 (m) | 2851 (l) |
| $\nu_{C=O}$ | 1720 (l) | 1717 (f.i.) |
| $\nu_{C=N}$ | 1595 (l) | 1603 (m) |
| $\nu_{C=N}$ | 1515 (m) | 1560 (s) |
| $\nu_{C=N}$ | 1451 (m) | 1469 (s) |
| ν_{C-H} | 1385 (m) | 1400 (m) |

Tabelul 2 (continuare)

| Tipul vibrațional | TCMPOHp | TCMPOH |
|-------------------|----------|----------|
| ν_{C-O} | 1158 (m) | 1156 (i) |
| δ_{C-H} | 1019 (s) | 1018 (m) |
| δ_{C-H} | 964 (m) | 963 (m) |
| ν_{C-C} | 858 (s) | 868 (s) |
| ν_{C-N} | 788 (s) | 798 (m) |
| ν_{C-H} | 761 (s) | 761 (m) |

Rezultatele analizei spectrale IR au confirmat prezența în moleculele noilor compuși tetrapirolici a benzilor caracteristice frecvențelor de vibrație ν_{N-H} și ν_{N-H} în regiunea spectrală 3310...3480 cm^{-1} .

Prezența grupării funcționale -O-CH₃ în molecula porfirinelor a fost confirmată de existența în spectrul IR a unei benzi poziționate în zona spectrală 2849...2851 cm^{-1} .

În spectrul IR al compusului revendicat se observă prezența unei benzi de intensitate medie în zona spectrală 1716...1720 cm^{-1} , bandă care poate fi atribuită vibrațiilor corespunzătoare legăturii C=O.

Frecvențele vibrațiilor de valență corespunzătoare legăturilor C=N sunt cuprinse între 1451 și 1560 cm^{-1} . Benzile spectrale rezultat al vibrațiilor de legătura C-H sunt poziționate în domeniul 2952 cm^{-1} ...2921 cm^{-1} .

Exemplul 4

Spectrometria RMN

Exemplul 4 constă în prezentarea obținerii caracteristicilor structurale ale compusului sintetizat, prin interpretarea rezultatelor deduse din analiza spectrală complexă a acestei structuri polifuncționale. S-au abordat în acest sens metode moderne de analiză spectrală, ce includ mai multe tipuri de experimente de rezonanță magnetică nucleară (¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMBC, HMQC, DEPT, COSY), Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) care au confirmat structura compusului porfirinic au fost înregistrate 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 extern aplicat probei de studiat a fost de 9 Tesla, iar proba a fost expusă câmpului în tuburi speciale de tip Norell 507 PP.

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

Spectrele ¹H-RMN au fost înregistrate la frecvența de 400 MHz, utilizând drept referință semnalul tetrametilsilanului (TMS). Solventul utilizat a fost cloroformul deuterat. 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°.

Spectrele ¹³C-RMN au fost înregistrate pentru o frecvență de 100 MHz, utilizând ca referință semnalul cloroformului 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°.

RO 125018 B1

1 Etapele de monitorizare prin tehnica RMN au furnizat rezultate care indică prezența
unui număr mai mic de componenți în amestecul final de reacție, comparativ cu metoda
3 clasică (unde rezultă și un compus clar identificabil prin RMN, și anume, clorina). S-au făcut
și aprecieri pentru etapele următoare de sinteză în ceea ce privește comportarea semnalului
5 caracteristic de la -2,8 ppm, cât și a influenței substituenților exteriori asupra ecranării inelului
porfirinic, constatându-se echivalența poziției semnalului în serie. Ca urmare, au fost
7 precizate principalele valori în cazul deplasărilor chimice pentru TCMPOHp, cât și pentru
compusul de referință TCMPOH.

9 Datorită diverselor grade de asimetrie ale compușilor, aceștia au fost notați, pe lângă
tipologia IUPAC, și cu litere care să diferențieze pozițiile protonilor și atomilor de carbon din
11 diversele molecule, așa cum este redat în fig. 2.

Prezentul exemplu prezintă în concluzie datele RMN pentru proton și carbon tabelate
13 în raport cu același compus de referință TCMPOH:

Tabelul 3

| TCMP | |
|--|--|
| ¹ H-NMR, δ _H (400 MHz, CDCl ₃), ppm | |
| | -2,81 (2H, br. s., -NH), 4,11 (12H, s, O-CH ₃), 8,30 (8H, d, H ₀), 8,81 (8H, d, H _{βpyrr}), 8,45 (8H, d, H _m) |
| ¹³ C-NMR, δ _C (400 MHz, CDCl ₃), ppm | |
| | 52,4 (C _{O-CH₃}), 119,4 (C _{5,10,15,20}), 128,0 (C _{c,e}), 129,7 (C _{b,f}), 134,5 (C _{βpyrr}), 146,6 (C _{opyrr}), 67,2 (C _{COO}) |
| TCMPOHp | |
| ¹ H-NMR, δ _H (400 MHz, CDCl ₃), ppm | |
| | 2,78 (2H, br. s., -NH), 4,10 (9H, s, O-CH ₃), 5,23 (1H, s, OH), 7,00 (1H, s, H _b), 7,61 (1H, t, H _e), 7,68 (1H, d, H _f), 7,75 (1H, m, H _d), 8,78 (6H, d, H _{βpyrr2}), 8,89 (2H, d, H _{βpyrr1}) |
| ¹³ C-NMR δ _C (400 MHz, CDCl ₃), ppm | |
| | 53,8 (C _{O-CH₃}), 114,1 (C _d), 120,9 (C _b), 121,0 (C ₅), 121,3 (C _{10,15,20}), 127,6 (C _f), 127,9 (C _{c,e}), 129,6 (C _e), 134,5 (C _{βpyrr}), 135,9 (C _{b,f}), 145,0 (C _a), 146,8 (C _a), 151,1 (C _{c'-OH}), 167,1 (C _{COO}) |

Exemplul 5

Spectroscopia de fluorescență

33 Spectrele de fluorescență au fost înregistrate pentru soluții de concentrații $2,5 \times 10^{-6}$
M în solvenți cu polarități diferite. Măsurătorile au fost efectuate cu un spectrofluorimetru
35 JASCO FP 6500.

37 Spectrele de fluorescență sunt prezentate în continuare, iar parametrii specifici
fluorescenței, lungimea de undă a maximului benzii de emisie, λ_{\max} , cât și intensitatea
fluorescenței determinate la lungimea de undă a maximului benzii sunt prezentate în tabelul
39 4.

41 Analiza datelor de fluorescență obținute pentru soluții în DMSO (solvent polar aprotic)
indică o deplasare batocromă a benzilor de fluorescență în cazul porfirinelor asimetrice care
43 conțin ca element de asimetrie gruparea -OH, deplasare ce poate fi atribuită efectului de
hiperconjugare manifestat prin prezența grupării hidroxifenilice (efectul este mai pronunțat
când elementul de asimetrie se găsește în poziția para).

Parametrii spectrali (λ_{max} și intensitățile fluorescenței [If]) corespunzători compușilor TCMP, TCMPOHp în solvenți diferiți ($C = 2,5 \times 10^{-6} M$) 3

| Comp. Porf. | Solvent | $\lambda_{max}^{(nm)}$ [If] u.a. | | | |
|-------------|---|----------------------------------|------------|------------|--|
| TCMP | 5,10,15,20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina | | | | |
| | MeOH | 600 [3,90] | 647 [39,3] | 706 [2,00] | |
| | EtOH | 603 [8,20] | 648 [113] | 706 [5,40] | |
| | Iso-PrOH | 602 [9,10] | 648 [201] | 704 [9,0] | |
| | DMSO | 606 [17,3] | 648 [724] | 707 [27,2] | |
| | DMF | 607 [24,2] | 648 [685] | 704 [25,7] | |
| | CH ₂ Cl ₂ | 596 [310] | 648 [204] | - | |
| CMPOHp | 5-(4-hidroxifenil)-10,15,10-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfina | | | | |
| | MeOH | 605 [474] | 650 [294] | 706 [9,12] | |
| | EtOH | 606 [437] | 651 [396] | 709 [12,6] | |
| | Iso-PrOH | 607 [383] | 651 [386] | 708 [12,6] | |
| | DMSO | 611 [191] | 652 [534] | 712 [16,1] | |
| | DMF | 610 [287] | 652 [485] | 705 [14,9] | |
| | CH ₂ Cl ₂ | 604 [589] | 648 [196] | - | |

MeOH = alcool metilic, EtOH = alcool etilic, Iso-PrOH = alcool izopropilic, DMSO = dimetil sulfoxid, DMF = dimetilformamidă, CH₂Cl₂ = clorură de metilen 21

Exemplul 6 23

Prezentarea structurii revendicate în analizele de tip HPLC 25

Pentru a susține gradul de puritate ridicat și structura revendicată, s-a utilizat și metoda HPLC în fază reversă, cu detecție UV ($\lambda=415\text{nm}$), utilizând coloana cromatografică Hypersil Gold (100 x 4,6 mm, fază staționară C18, cu particule de 5 μm) și o fază mobilă polară, compusă din amestec metanol (LiChrosolv pentru HPLC Merck)-acetonitril (Scharlau Chemie) în raport 50:50; debitul fazei mobile: 1 mL/min. 27

Determinările au fost realizate cu ajutorul unui lichid cromatograf model Surveyor Plus (Thermo Electron Corp.), echipat cu: detector tip DAD (diode array detector), cu program specializat pentru determinarea purității spectrale a compușilor eluați, pompă cuaternară, cu degazor cu vacuum, autosampler termostatat (Peltier), compartimentul coloanei fiind prevăzut cu termostat (Peltier), baie cu ultrasunete (model Elmasonic S60/H, Elma), balanță analitică (Ohaus). 31

Pentru prepararea fazei mobile, metanolul și acetonitrilul au fost supuse ultrasonării, înainte de utilizare, timp de 5 min. 37

Soluțiile de analizat se obțin din soluțiile stoc (2 mg compus porfirinic dizolvat în diclormetan, și păstrate la -18°C), prin diluare cu faza mobilă. 39

De asemenea, având în vedere timpii mari de retenție (în jur de 20 min) pentru diverși compuși porfirinici, în cadrul analizelor HPLC utilizând faze staționare de tip C18, a fost selectată o coloană Hypersil Gold (4,6 mm x 100 mm, 5 μm diametrul particulelor), care a furnizat rezultate convenabile din punct de vedere al timpului de analiză, timpii de retenție ai compușilor analizați, în condițiile de lucru stabilite (utilizând faza mobilă metanol:acetonitril 50:50), fiind de aproximativ 2 min. 41

În cazul compusului TCMPOHp, rezultatele experimentale indică o separare ($T_R = 1,965$) de două mici impurități prezente ($T_R = 1,638$ - preponderență cantitativ și $T_R = 2,473$ - fig. 3), lungimea de undă de detecție selectată (415 nm) este adecvată, compusul de interes (eluat la $T_R = 1,965$) având în spectrul de absorbție un maxim la 415,3 nm (fig. 4). 47

RO 125018 B1

1 Rezultatele preliminare obținute în urma analizei unor soluții de concentrații diferite
sugerează că metoda propusă poate fi aplicată nu numai pentru evaluarea purității, ci și
3 pentru evaluarea cantitativă a compusului porfirinic de interes, după întocmirea unei curbe
de calibrare, după cum se observă din fig. 5.

5 Modificarea compoziției fazei mobile, în sensul scăderii polarității (faza mobilă
metanol:acetonitril 30:70), nu influențează semnificativ timpul de retenție al compusului
7 porfirinic analizat - $T_R = 2,039$ (fig. 6).

9 Concluzia datelor prezentate în acest exemplu este că porfirina revendicată a fost
obținută în conformația declarată și cu un grad de puritate înalt.

Exemplul 7

11 **Investigații de funcționalitate celulară în prezența compusului 5-(4-hidroxifenil)-
10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină (TCMPOHp)**

13 Prepararea suspensiei de lucru de compus

15 Compusul sub formă de pulbere a fost resuspendat inițial într-un volum minim de
DMSO, obținându-se un stoc din care s-au realizat ulterior diluții în mediul de cultură adecvat
liniilor celulare testate.

17 Compusul a fost testat în sisteme experimentale *in vitro* reprezentate de linii celulare
standard, sub formă de suspensie sau aderențe, respectiv:

- 19 ● linia **Jurkat** de leucemie umană, cu morfologie de limfocit T;
- linia **U937** mieloidă umană, cu morfologie de monocit-macrofag;
- 21 ● linia aderentă umană **HT29**, de adenocarcinom de colon.

23 Metodologia de lucru

25 Determinarea viabilității celulare/integrității membranare - efectul compusului asupra
integrității membranei plasmatică a liniilor celulare s-a investigat prin testul eliberării
extracelulare a lactat dehidrogenazei (LDH; CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay
- Promega). În funcție de tipul celular studiat, au fost realizate sisteme de incubare cu
27 TCMPOHp la diferiți timpi, pentru fiecare timp de incubare testându-se viabilitatea, respectiv,
identificarea în supernatantul de cultură a enzimei LDH, eliberată din citosol doar de către
29 celulele cu membrană plasmatică lezată. LDH eliberat în supernatantii de cultură este
măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 min, ce are drept rezultat conversia unei săruri de
31 tetrazoliu la formazan roșu. Densitățile optice (DO) măsurate în domeniul vizibil la 492 nm
cuantifică cantitatea de produs roșu format, care este proporțională cu numărul de celule
33 lizate din cultură.

35 Determinarea capacității proliferative, simultan cu identificarea colorimetrică a LDH
în supernatantii culturilor celulare testate, s-a realizat prin evaluarea capacității de
multiplicare a celulelor în prezența TCMPOHp. Proliferarea celulelor incubate diferite
37 perioade de timp cu compuși s-a evaluat indirect, prin detecția colorimetrică a reducerii unei
săruri de tetrazoliu care este rezultatul unei reacții ce poate fi desfășurată doar de celulele
39 metabolic active (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit - Promega).
Cantitatea de formazan formată, măsurată la 492 nm, este direct proporțională cu numărul
41 de celule vii, proliferante, din cultură. Evaluarea încărcării celulare (citometrie în flux) - pentru
sistemele experimentale cu celule în suspensie, s-a putut evalua, prin citometrie în flux,
43 gradul de încărcare a celulelor cu diferite concentrații de TCMPOHp, respectiv, s-a
monitorizat fluorescența emisă de populațiile celulare încărcate cu compus (citometru
45 FACScan, Becton Dickinson, program Cell Quest).

RO 125018 B1

Evaluarea inducerii apoptozei (marcare cu Anexina V) - identificarea gradului de apoptoză la celulele incubate cu TCMPOHp s-a realizat prin marcarea cu Anexina V - FITC. Acest marcator se leagă cu înaltă specificitate de fosfatidil serină, încărcată negativ, care este expusă pe fața externă a membranei doar de către celulele apoptotice. Populațiile celulare au fost analizate cu citometrul FACScan, Becton Dickinson, program Cell Quest, iar rezultatele sunt exprimate în procent de celule aflate în anumite stadii apoptotice: apoptoza timpurie, apoptoza târzie sau necroza (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I, Becton Dickinson).

a. Studii cu TCMPOHp în prezența liniei celulare *Jurkat*

Prezentul exemplu se înscrie în sfera studiului comportamentului compușilor macrociclici funcționalizați cu grupări metoxi, hidroxil sau lanțuri hidrocarbonice, integrați în lipozomi și livrați în sistemele membranare. Celulele din linia Jurkat au servit drept țintă a unor asemenea vehicule, în scopul selectării unor potențiali fotosensibilizatori pentru tratamentul cancerului. S-au realizat sisteme experimentale cu 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23-H porfină (TCMPOHp), în prezența celulelor Jurkat pentru 24, 48 și 72 h de cultură. Având în vedere caracterul de limfoblast, non-fagocitar, s-au efectuat testări ale funcționalității celulare pe o curbă extinsă de concentrații, cuprinse între 7 μ M...390 μ M (diluții în serie) și la diferite perioade de incubare, prelungite, respectiv, 24, 48 și 72 h.

Celulele au fost incubate cu compusul de testat ca atare, reluat în mediul de cultură al celulelor, fără intermediul unui vehicul de transport.

La 24 h de la inițierea incubării, rezultatele de viabilitate au indicat un răspuns celular omogen pe curbă de concentrații studiate. La doze mai mari din curbă (95 μ M), TCMPOHp imprimă o tendință slabă de creștere a eliberării LDH, dar multiplicarea celulară nu este afectată semnificativ (fig. 7).

La 48 h de cultură, viabilitatea celulară nu este influențată, această caracteristică menținându-se pe întreg intervalul de concentrații. Creșterea duratei de incubare nu se reflectă în amplificarea eliberării LDH, iar capacitatea de reducere a MTS nu suferă modificări majore comparativ cu martorul celular (fig. 8).

Odată cu creșterea timpului de cultură la 72 h, curba de viabilitate celulară își păstrează aspectul omogen, spre deosebire de reacția de reducere a MTS, care separă răspunsul celular în prezența TCMPOHp, în mai multe zone pe curba de concentrații (fig. 9).

Se poate conchide că statusul metabolic activ al celulelor, proliferarea, este mai omogen la 24 h de incubare, iar la 72 h răspunsul este dependent de doză, zona din curbă cu caracter omogen fiind înregistrată la doze mai mari (fig. 9). Aceste date preliminare, privind citotoxicitatea de întuneric a compusului TCMPOHp, indică faptul că acesta *nu devine toxic* în prezența liniei Jurkat; datele pot constitui punctul de pornire pentru studii ulterioare de testare ca și agent fotosensibilizator în terapia fotodinamică a cancerului.

b. Studii cu TCMPOHp în prezența liniei celulare *HT29*

Linia celulară **HT29** de carcinom de colon (ECACC 91072201) constituie în prezent ținta unor studii care vizează lansarea celei de-a doua generații de fotosensibilizatori pe bază de compuși cu ftalocianine și siliciu, studii realizate în model animal murin. Este cunoscută rezistența acestui tip celular la terapia pe bază de metotrexat, astfel încât celulele HT29 devin ideale în investigații care țintesc noi tipuri de compuși cu potențial antitumoral sau care pot funcționa ca agenți fotosensibilizatori în terapia fotodinamică a cancerului.

Celulele liniei HT29 au fost testate în sisteme de toxicitate de scurtă durată (2 h - fig. 10) și la perioade mai lungi de incubare (18 h - fig. 11), în prezența compusului TCMPOHp. Efectul acumulării porfirinei nou sintetizate în celulele HT29 a fost evaluat indirect, ca și în cazul liniei Jurkat, prin teste de eliberare de LDH (testare viabilitate) și reducere a MTS (testare proliferare).

1 Rezultatele ambelor sisteme de incubare indică un caracter non-toxic al TCMPOHp,
2 relevat în special de datele de reducere a MTS, la care tendința este de susținere chiar a
3 funcției de proliferare la anumite doze. În termeni de viabilitate celulară, datele de 2 și,
4 respectiv, 18 h se înscriu în aceeași manieră de răspuns, ceea ce sugerează că, la acest tip
5 celular, structura TCMPOHp poate fi studiată în experimente de PDT, unde este de preferat
6 un timp scurt de incubare pre-activării fotochimice.

7 **c. Apoptoza în linia U937 - discuție pe grade de apoptoză TCMPOHp**

8 Celulele liniei U937 au fost utilizate recent în studii privind dezvoltarea unor noi
9 compuși fotosensibilizatori de tip porfirinic, care au vizat, de asemenea, gradul de
10 penetrabilitate intracelulară, toxicitatea de "întuneric" și fenomenele apoptotice.

11 Aproximativ 90% din populațiile celulare de U937, analizate prin citometrie în flux,
12 prezintă un fenotip An⁻PI⁻ (celule vii). S-au constatat tendințe de antrenare a celulelor spre
13 apoptoză în prezența TCMPOHp, care se manifestă însă doar la doza 62,5 μM - fig. 12.

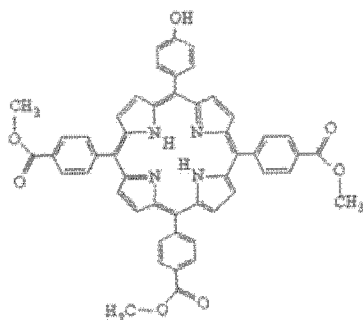
15 **Bibliografie generală**

- 16 1. Adler A.D., Longo F., Emarelli J., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff I., *J. Org.*
17 *Chem.*, 32, 476, 1967.
- 18 2. Little R.A., Anton J.A., Loach P.A., Ibers J.A., *J. Het. Chem.*, 12, 343-349, 1974.
- 19 3. Dolphin D., *Canadian J. Chem.*, 72, 1005-1013, 1994.
- 20 4. Dorough J.D., Miller J.R., Heumnekens F.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 5076, 1978.
- 21 5. Sandberg S., Romslo I., *Clin. Chim. Acta*, 109, 193-201, 1981.
- 22 6. Ricchelli F., *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol., 29, 109-118, 1995.
- 23 7. Richelli F., Jori G., Moreno G., Vinzens F., Salet C, *J. Photochem. Photobiol.*, B:
24 *Biol.*, 6, 69-77, 1990.
- 25 8. Brault D., Vever-Bizet C, Kuzelova K., *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol., 20, 191-
26 195, 1993.
- 27 9. Brault D., Vever-Bizet C, Doan T.L, *Biochim. Biophys. Acta*, 857, 238-250, 1986.
- 28 10. Brault D., Vever-Bizet C, Dellinger M, *Biochimie*, 68, 913-921, 1986.
- 29 11. Makarska-Bialokoz M., Pratiel G. and Radzki St., *Journal of Molecular Structure*,
30 875, Iss 1-3, 468-477, 2008.
- 31 12. Barrett A.J., Kennedy J.C., Johns R.A., P. Nadeau, Pottier R.H., *J. Photochem.*
32 *Photobiol.*, B: Biol., 6, 309-321, 1990.
- 33 13. Vergetdt F.J., Koehorst R.B.M., A. van Hoek, Schoasma T.J., *J. Phys. Chem.*, 99,
34 4397-4405, 1995.
- 35 14. Jian Bo Xiaoa, Xin Yu Jianga, Xiao Qing Chena, Ping Chena, Ming Xub,
36 *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 51,3, 164-173, 2006.
- 37 15. Valenzeno D., *Photochem. Photobiol.*, 46, 146-160, 1987.
- 38 16. Al-Omari S, *Biomed Mater.*; 2(2): 107-115, 2007.
- 39 17. Josefsen LB and Boyle RW, *British Journal of Pharmacology* (2008) 154, 1-3, &
40 2008 Nature Publishing Group.
- 41 18. Selga E, Morales C, Noé V, Peinado MA, Ciudad CJ, *BMC Med Genomics*,
42 11,1.35. 2008.
- 43 19. Cheng WC, Leach KM, Hardwick JM, *Biochim Biophys Acta.*; 1783(7), 1272-1279,
44 2008.
- 45 20. Minnes R, Weitman H, You Y, Detty MR, Ehrenberg B., *J Phys Chem B*.
46 13;112(10): 3268-76, 2008.
- 47 21. Balaña-Fouce R, Garcia-Estrada C, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM, *BMC*
48 *Microbiol.* 8; 8:113, 2008.

RO 125018 B1

Revendicări

1. Derivat de porfirină, caracterizat prin aceea că prezintă următoarea structură:



având denumirea științifică IUPAC:

5-(4-hidroxifenil)-10,15, 20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfirină.

2. Derivat de porfirină definit ca în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că se utilizează ca generator de oxigen singlet.

3. Derivat de porfirină definit ca în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că se utilizează ca tester pe: linia *Jurkat* de leucemie umană, cu morfologie de limfocit T; linia *U937* mieloidă umană, cu morfologie de monocit-macrofag; linia aderentă umană *HT29*, de adenocarcinom de colon.

4. Derivat de porfirină definit ca în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că se utilizează în compoziții farmaceutice pentru tratamentul cancerului.

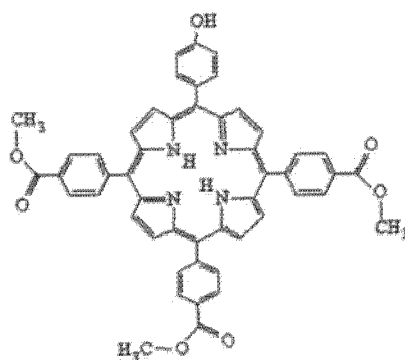


Fig. 1

Structura TCMPOH_p, 5-(4-hydroxifenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina

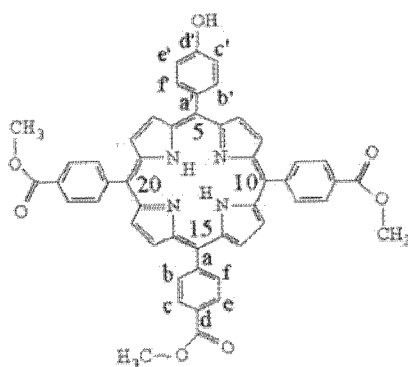


Fig. 2

Notarea pozitiilor principale RMN pentru TCMPOH_p

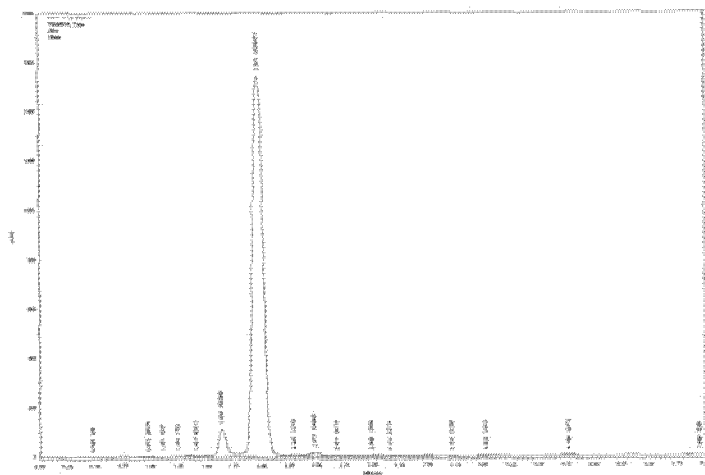


Fig. 3

Cromatograma compusului TCMPOH_p ($T_R = 1,965$ min.)

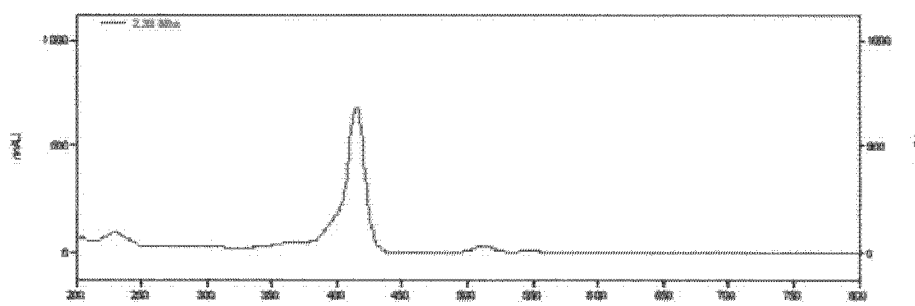


Fig. 4

Spectrul UV al compusului eluat la $T_R = 1,965$ min ($\lambda = 415$ nm)

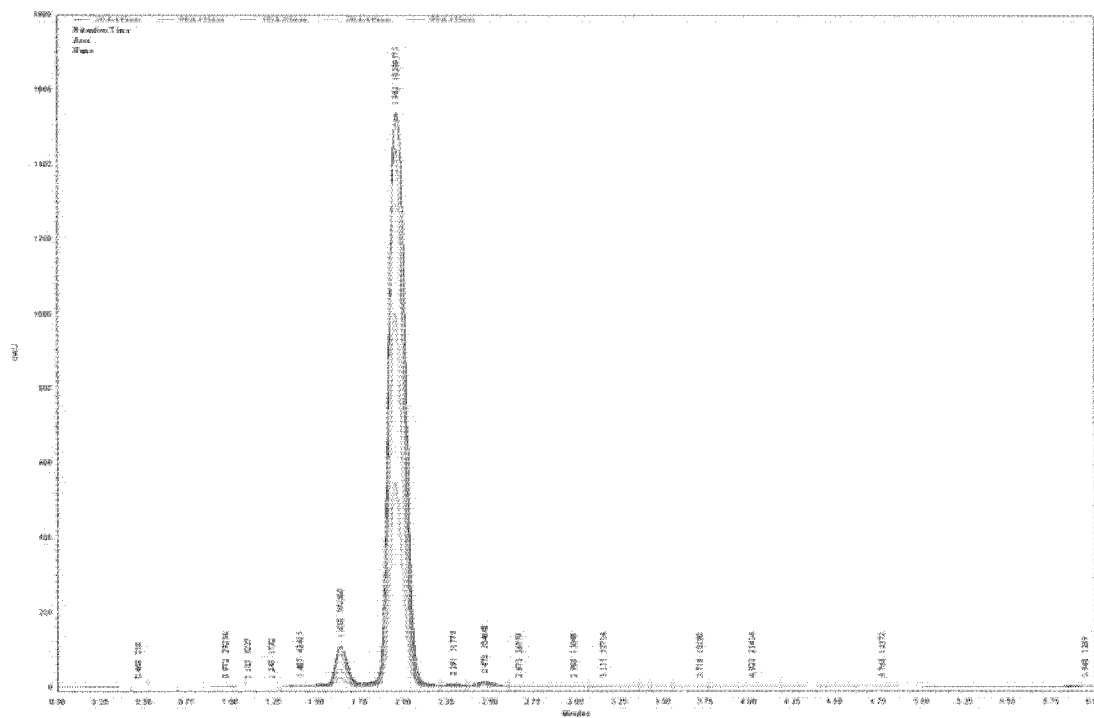


Fig. 5

Cromatogramele compusului TCMPOHp ($T_R = 1,965$ min., domeniul 1 – 5 μ g)

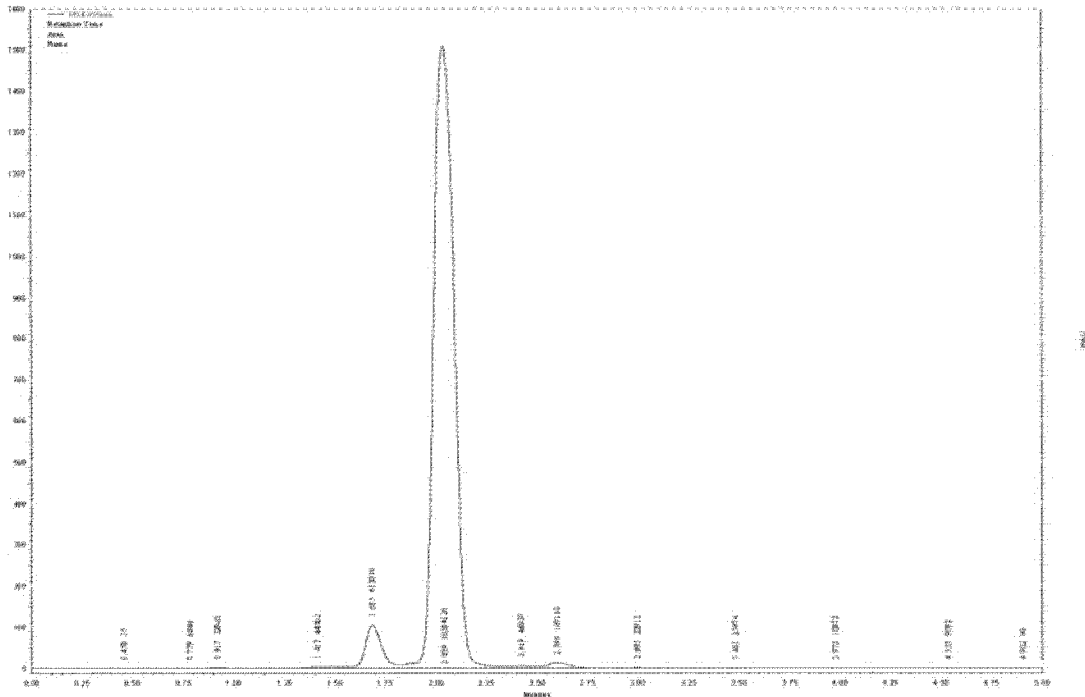


Fig. 6

Cromatograma compusului TCMPOHp ($T_R = 2,039$ min., faza mobila metanol: acetonitril 30:70)

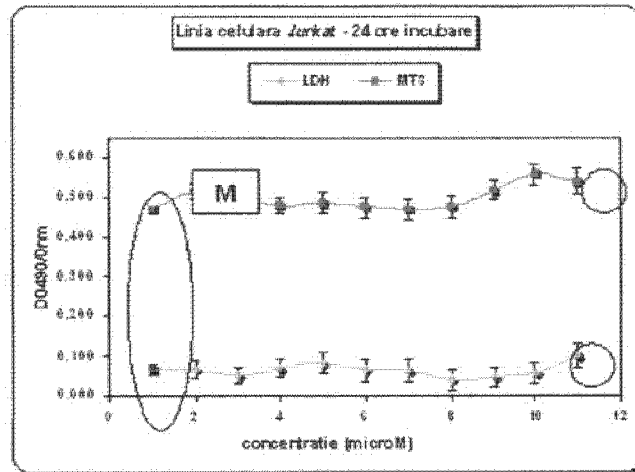


Fig. 7

Viabilitate și proliferare la 24 ore de incubare

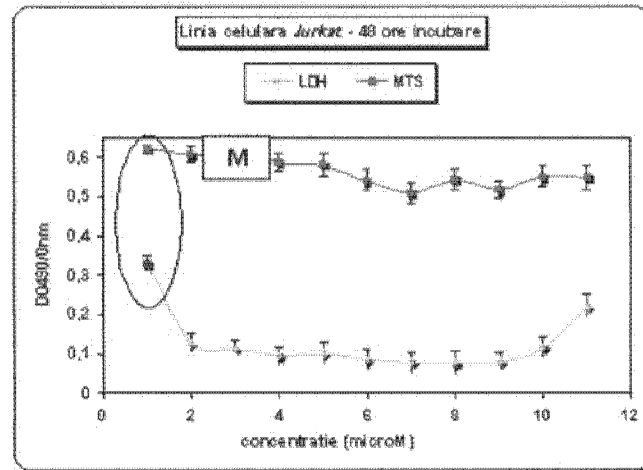


Fig. 8

Viabilitate și proliferare la 48 ore de incubare

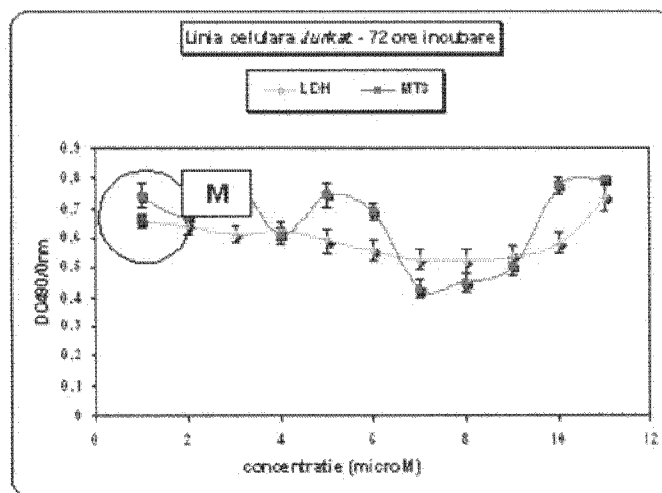


Fig. 9

Viabilitate și proliferare la 72 ore de incubare

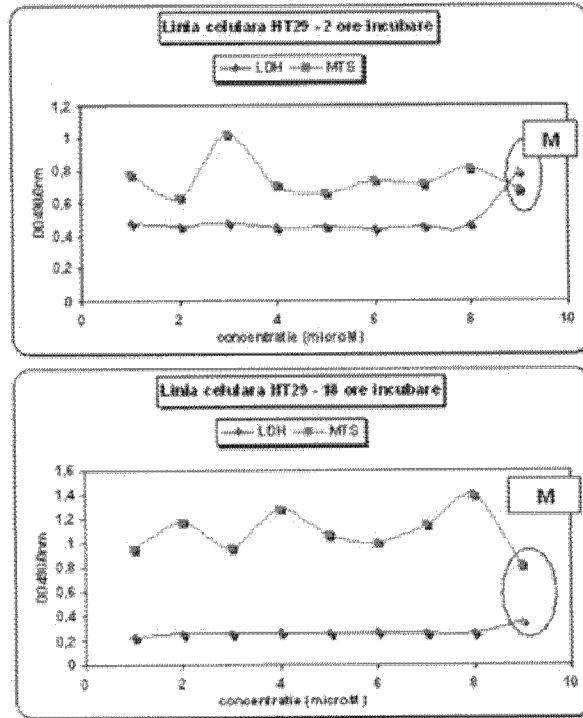


Fig. 10, 11
Viabilitate si proliferare la 2 ore -respectiv 18 ore -de incubare, linia HT29

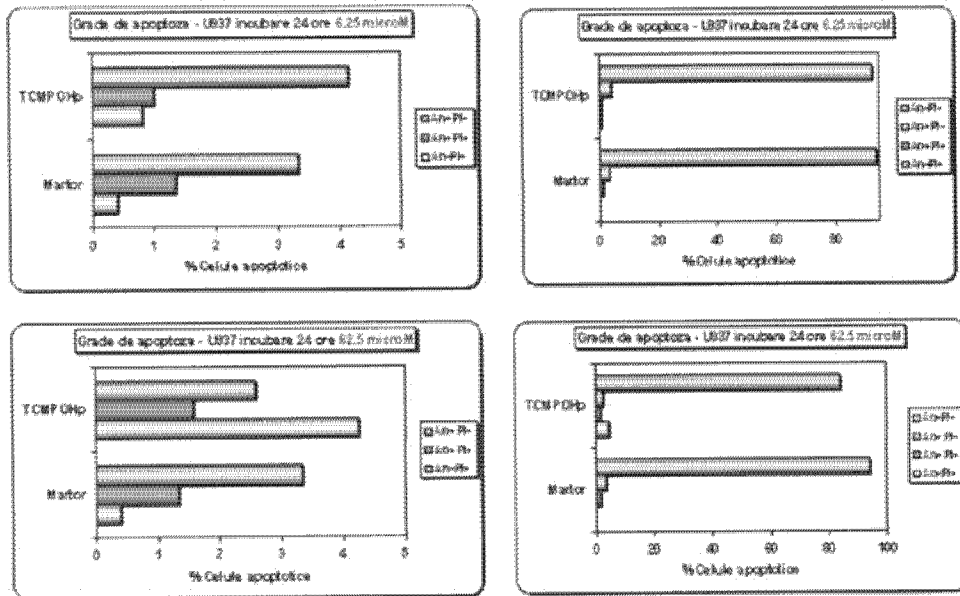


Fig. 12
Apoptoza in linia U937 – pe grade de apoptoza TCMPOHp
Legenda: An-Pi- = celule vii; An+Pi- = apoptoza timpurie; An+Pi+ = apoptoza tarzie; An-Pi+ = necroza

