



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01012

(22) Data de depozit: 26.10.2010

(41) Data publicării cererii:  
28.10.2011 BOPI nr. 10/2011

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN  
BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37,  
SECTOR 1, 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;  
• CONSTANTIN CAROLINA,  
STR.TEIUL DOAMNEI NR.13, BL.36, SC.1,  
AP.27, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• NEAGU MONICA,  
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MANDA GINA, STR.EUGEN IOSIF NR.9,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ILIE MIHAELA, STR.DUMBRAVA NOUĂ  
NR.10, BL.M82, AP.76, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NACEA VERONICA, CALEA FLOREASCA  
NR. 124, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CERASELA ELENA GIRD,  
STR. PODARULUI NR.6, BL.F3, AP.13,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ANABELA SOUSA OLIVEIRA,  
AV.ROVISCO PAIS, LISABONA, PT;  
• LUIS FELIPE VIEIRA FERREIRA,  
AV.ROVISCO PAIS, LISABONA, PT

(54) COMPUS PORFIRINIC DESTINAT DIAGNOZEI PRIN  
FOTOSENSIBILIZARE, PROCEDU DE OBȚINERE ȘI  
EVALUARE BIOLOGICĂ IN VITRO LA NIVEL CELULAR

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un compus porfirinic, destinat diagnozei prin fotosensibilizare, și la un procedeu de sintetizare a acestuia. Compusul conform invenției are structura chimică 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfină. Procedeu de obținere a compusului porfirinic include etapa de reacție dintre 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehidă, 4-acetoxibenzaldehidă și pirol pe suport de silicagel

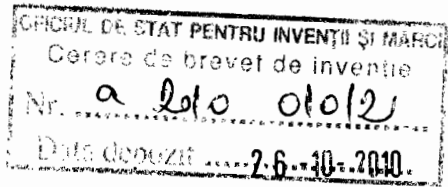
neutră, urmată de extracția produsului util din amestecul de reacție, prin dizolvare într-un amestec diclorometan/eter etilic în raport de 50 : 1 (v/v), filtrare la presiune normală și purificarea compusului porfirinic asimetric, prin cromatografie pe coloană.

Revendicări: 4

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).



17



Titlul invenției:

**COMPUS PORFIRINIC DESTINAT DIAGNOZEI PRIN FOTOSENSIBILIZARE.  
PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI EVALUARE BIOLOGICA *IN VITRO* LA NIVEL  
CELULAR**

Descrierea invenției

Compusul porfirinic a fost sintetizat în scopul utilizării lui ca marker fluorescent în biomedicină.

Invenția se referă la obținerea, caracterizarea spectrală și cuantificarea *in vitro* pe baza viabilității și proliferării celulare, în relație cu doza, timpul de acțiune și localizarea intracelulară a efectului unui compus porfirinic cu aplicații în diagnoza prin fotosensibilizare.

Porfirinele reprezintă o clasă importantă de compuși heterociclici cu rol determinant în procesele fotosintetice naturale și artificiale, în funcționalizarea dispozitivelor energetice moleculare, în terapia fotodinamică a cancerului precum și în terapia antiinfecțioasă prin fotosensibilizare.

Cercetările experimentale efectuate în ultimii ani privind utilizarea sistemelor tetrapirolice nanostructurate în domeniul biomedical, au evidențiat și posibilitatea aplicării acestora ca dispozitive de diagnostic non-invaziv prin care să fie analizate metabolismul și/sau funcțiile celulare/tisulare pentru a permite diferențierea perturbărilor patologice în faze incipiente ale bolii.

Compușii destinați diagnozei prin fotosensibilizare trebuie să prezinte eficiențe cuantice mari, deplasări Stokes mari, fotolabilitate redusă și în același timp caracteristici optime pentru a fi utilizați la studiul celulelor și țesuturilor (caracter amfifil bine echilibrat, fără toxicitate intrinsecă, lungime de undă de excitație mare, care să evite interferențele spectrale datorate autofluorescenței probelor biologice) [S. Bonneau, C.V. Bizet, H. Mojzisova, D. Brault, *Int. J. Pharm.*, 2007, 344, 78–87, D. K. Chatterjee, Z. Yong, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1627–1637, K. Berg, P. K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, *J. Microsc.*, 2005, 218, 133–147, W.W.L. Chin, W. K. O.Lau, R. Bhuvanewari, P.W. S. Heng, M. Olivo, *Cancer Letters*, 2007, 245, 127–133].



Porfirinele se află printre compușii investigați în scopul utilizării lor ca markeri fluorescenți. Acest nou domeniu de utilizare al porfirinelor a fost amplificat parțial de posibilitatea aplicării lor ca dispozitive medicale non-convenționale în terapia fotodinamică (PDT), deoarece au absorbții adecvate în domeniul fototerapeutic (~670 to 1100nm) [S. Hilderbrand, R. Weissleder, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14, 71-79, S. Pascu, P. Waghorn, T. Conry, B. Lin, C. James, J. M. Zayed, *Advances in Inorganic Chemistry*, 2009, 61, 131-178, B. Ramaswamy, V. Manivasager, W.W. Chin, K.C. Soo and M. Olivo, *Int. J. Oncol.*, 2005, 26, 1501–1506].

Structurile porfirinice, aflate în soluție sau incluse în geometrii de tip nanocavități, prezintă timpi de înjumătățire mari, ceea ce le conferă un avantaj în plus pentru imagistica fluorescentă.

Eficiența biomedicală a acestui tip de markeri este dependentă de localizarea lor la nivelul celular și subcelular, afinitatea celulară a structurilor de tip tetrapirolic fiind dependentă de caracterul amfifil al porfirinei [F. Ricchelli, G. Jori, S. Gobbo, M. Tronchin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1065, 42-48].

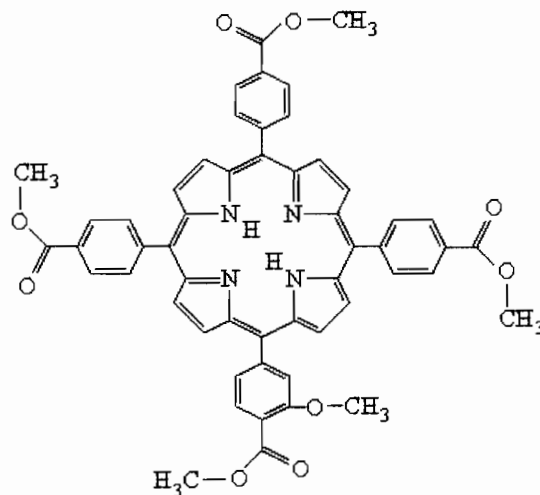
Diagnoza diferitelor tipuri de cancer prin fotosensibilizare utilizând ca markeri substanțe active cu structuri macrociclice este aplicată tot mai mult deoarece este o metodă neinvazivă și permite diferențierea perturbărilor patologice în faze incipiente ale bolii. [I. Kausch, M. Sommerauer, F. Montorsi, A. Stenzl, D. Jacqmin, P. Jichlinski, D. Jocham, A. Ziegler, R. Vonthein, *European Urology*, 2010, 57, 4, 595-606, K. Moghissi, M. R. Stringer, K. Dixon, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2008, 5, 235–237, E. R. Ray, K. Chatterton, K. Thomas, et al., *J. Endourol.*, 2009, 6, 983–988].

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

Problema tehnică constă în obținerea unor structuri stabile, netoxice, cu proprietăți fizico-chimice care să asigure o bună localizare la nivel celular, și cu absorbții adecvate în domeniul fototerapeutic.

Invenția are ca obiect furnizarea unui compus porfirinic nesimetric substituit destinat diagnozei prin fotosensibilizare.





5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina

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

1) reacția dintre 3-metoxi-4-acetoxibenzaldehida, 4-acetoxibenzaldehida și pirol pe suport de silicagel neutru.

2) extractia produsului util din amestecul de reacție prin dizolvare într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v) și filtrare la presiune normală.

3) purificarea compusului tetrapirolic asimetric prin cromatografie pe coloana.

De asemenea, s-a urmărit cuantificarea *in vitro* a efectului compusului tetrapirolic nesimetric pe baza viabilității și proliferării celulare, în relație cu doza, timpul de acțiune și localizarea intracelulară. Studiile au fost realizate utilizând linia celulară U937 (linie standard de limfom histiocitar uman cu morfologie de monocit, nr. Catalog ECACC 85011440) și celule mononucleare din sange periferic uman izolat de la donatori voluntari (PBMC).

Procedeu s-a realizat prin investigarea următorilor parametri:

- determinarea viabilității celulare/integritatii membranare, prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei;
- determinarea proliferării celulare prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium;



Avantajele aplicării invenției sunt:

- compusul porfirinic nesimetric substituit poate fi obținut cu randament bun, într-un interval de timp scurt, printr-o reacție necatalizată ce se desfășoară în condiții ecologice iar numărul de izomeri din amestecul final este mult mai mic comparativ cu metoda clasică.
- procedeul de purificare aplicat permite o separare eficientă a produsului util.
- prin particularitățile structurale compusul prezintă avantajul unei bune localizări la nivelul componentelor celulare.
- stabilirea unui protocol optim de utilizare a compusului porfirinic nesimetric substituit pentru diagnoza prin marcarea fluorescenței sau fotosensibilizare (biomarker).

Prin evaluare *in vitro* în sistem experimental cu celule U937 și PBMC, s-a constatat că proprietățile structurale ale compusului corelate cu parametri doza de încărcare și timpul de incubare, permit o bună localizare la nivel celular pentru compusul nou.

Invenția se referă la un compus porfirinic nesimetric substituit care se localizează ușor la nivel celular și care nu manifestă toxicitate asupra celulelor din linia standard U937 și culturilor primare de PBMC.

Procedeul de obținere a compusului porfirinic nesimetric substituit decurge prin reacția aldehidelor cu pirolul pe suport de silicagel neutru prin iradiere cu microunde.

Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 1) cantități stoechiometrice de aldehide se aduc în vasul de sinteză peste silicagel neutru folosit ca suport în reacția de sinteză. Se omogenizează amestecul și apoi se adaugă pirolul proaspăt distilat. Amestecul de reactanți este supus la 5 iradieri succesive a câte 2 minute fiecare. Puterea de iradiere a fost de 475W pentru primele două iradieri, apoi a fost scăzută la 350W. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C iar procedeul de sinteză a inclus răcirea la interval de 2 minute a amestecului în timpul reacției.

Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției în etapa 2) vasul de sinteză se răcește la temperatura camerei iar amestecul rezultat este dizolvat într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v) și filtrat la presiune normală cu scopul extracției produsului util.



Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției în etapa 3) soluția obținută prin filtrare în etapa 2 a fost concentrată prin distilare simplă apoi evaporată. S-a obținut o masă solidă, cristalină care a fost adusă în coloana cromatografică la partea superioară, între straturile de fază staționară, la o distanță de aproximativ 15 cm de partea superioară.

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

Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie utilizând o coloană cromatografică de  $L = 100\text{cm}$  și  $\Phi = 10\text{ cm}$ .

Drept fază staționară s-a utilizat silicagel 60H Merck iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v).

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. Compusul studiat a fost uscat timp de 24 de ore la  $150^\circ\text{C}$ , iar domeniul spectral abordat a fost cuprins în intervalul  $4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$ .

Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) care au confirmat structura compusului 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina 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 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 ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN și DEPT), cât și cele bidimensionale (COSY, HMQC și HMBC).

Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN au fost înregistrate la frecvența de 400 MHz, utilizând drept referință semnalul tetrametilsilanului (TMS). Solventul utilizat a fost cloformul 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  $45^\circ$ .

Spectrele  $^{13}\text{C}$ -RMN au fost înregistrate la o frecvență de 100MHz, 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°.

Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35, cu domeniul spectral de lucru 200-800nm. 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 (metanol, etanol, clorura de metilen, dimetilformamida, dimetilsulfoxid) pentru concentrații în compus porfirinic de  $2,5 \times 10^{-6}$  M.

Pentru determinarea viabilității celulare prin testul eliberării lactat dehidrogenazei s-a utilizat un sistem de dozare colorimetrică (*The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay - Promega Corporation*) măsurabil la un cititor de plăci de cultura cu 96 de godeuri. Această tehnică reprezintă o alternativă colorimetrică a metodei de dozare a cromului radioactiv ( $^{51}\text{Cr}$ ) 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  $^{51}\text{Cr}$  este eliberat în varianta radioactivă. LDH eliberat în supernatanții de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 minute, 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  $DO \pm SD$ .

Determinarea proliferării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS. Sistemul *The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation)* 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 bio-redus 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. Testul se realizează prin aditia directă a reactivului kitului (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent*) la suspensia celulară din godeurile de cultură, urmată de incubare de 1- 4 ore (în funcție de tipul celular studiat) și înregistrarea DO la 492 nm, cu un cititor de plăci. Densitatea optică măsurată la 492nm este direct proporțională cu cantitatea de formazan obținută respectiv cu numărul de celule vii, proliferante, din cultură.

### EXEMPLUL 1

*Etapa 1. Sinteza compusului porfirinic nesimetric substituit 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina*

Procedeul de obținere a noului compus porfirinic nesimetric substituit decurge cu randament bun, într-un interval de timp scurt, printr-o reacție necatalizată ce se desfășoară în condiții ecologice iar numărul de izomeri din amestecul final este mult mai mic comparativ cu metoda clasică.

Procedeul are la bază reacția stoichiometrică dintre 3-metoxi-4-acetoxibenzaldehidă, 4-acetoxibenzaldehidă și pirol pe suport de silicagel neutru prin iradiere cu microunde utilizând o instalație de tip HINARI - MX606, 2450 MHz.

Amestecul de reactanți este supus la 5 iradieri succesive a câte 2 minute fiecare. Puterea de iradiere a fost de 475W pentru primele două iradieri, apoi a fost scăzută la 350W. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C iar procedeul de sinteză a inclus răcirea la interval de 2 minute a amestecului în timpul reacției. 3-metoxi-4-acetoxibenzaldehidă (2,427g, 12,5 mmoli), 4-acetoxibenzaldehidă (6,156g, 37,5 mmoli) se aduc în vasul de sinteză peste 4-5g silicagel neutru (Kieselgel 60, Merck, 200-500μm; 35-70 mesh) folosit ca suport în reacția de sinteză. Se omogenizează amestecul, se adaugă pirolul proaspăt distilat (3,45 mL, 50mmoli) și se încep seturile de iradieri. Pentru monitorizarea reacției de sinteză după fiecare iradiere s-au prelevat probe din amestecul de reacție care au fost dizolvate în diclorometan și evaluate prin înregistrarea spectrelor electronice în domeniul vizibil. Extractia produsului util din amestecul de reacție s-a realizat prin dizolvare într-un amestec diclorometan/eter etilic în raport 50/1 (v/v) și filtrare la presiune normală. Filtratul a fost concentrat prin distilare simplă apoi evaporat. S-a obținut o masă solidă, cristalină care a fost ulterior purificată.





Etapa 2. Purificarea 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei

Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie utilizând o coloana cromatografică de  $L=100\text{cm}$  și  $\Phi=10\text{ cm}$ . Ca fază staționară s-a utilizat silicagel 60 H Merck iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v). Masa solidă, cristalină a fost adusă în coloana cromatografică la partea superioară. Pentru a evita antrenarea compușilor de separat în volumul de eluent de la partea superioară a coloanei, peste amestecul de separat s-a adăugat 5-6 cm de fază staționară. Analiza RMN a compușilor prezenți în fracțiile eluate pe coloana cromatografică a confirmat prezența compusului 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina în cea de-a doua fracție colectată. În compoziția primei fracții eluate a fost evidențiat compusul porfirinic simetric substituit 5,10,15,20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil)- 21, 23-H porfina. Randamentul reacției de obținere a noului compus porfirinic a fost de 35%.

## EXEMPLUL 2

Valorile parametrilor spectrali IR ale 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina (TCMPOM) și ale compusului de referință 5, 10, 15, 20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil) - 21, 23-H porfina (TCMP) sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Vibrația Caracteristică	Numărul de undă al benzii IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	TCMPOM	TCMP
$\nu_{N-H}$	3177(m)	3310(s)
$\nu_{C-H}$	2922(m)	2950(m)
$\nu_{C-H}$ din $-O-CH_3$	2851(m)	2851(i)
$\nu_{C=O}$	1719(m)	1717(i)
$\nu_{C-N}$	1605(m)	1603(m)
$\nu_{C=N}$	1508(m)	1469(s)
$\nu_{C-H}$ pyrrole	1463(m)	1400(m)
$\nu_{C-O}$	1265(i)	1156(i)
$\delta_{C-H}$	1027(m)	1018(m)
$\delta_{C-H}$	982(m)	963 (m)
$\gamma_{C-C}$	859(s)	868(s)
$\gamma_{C-N}$ pyrrole	811(m)	798(m)
$\gamma_{C-H}$	761(m)	761(m)



**EXEMPLUL 3.** Rezultatele obținute prin analiza RMN a 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei sunt prezentate prin valorile deplasărilor chimice în cazul determinărilor de proton  $^1\text{H}$ , respectiv  $^{13}\text{C}$ :

$^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta_{\text{H}}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ppm: -2.80 (2H, br. s., -NH), 3.82 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 4.13 (12H, s, -COOCH<sub>3</sub>), 7.06 (1H, d, H<sub>F</sub>), 7.28 (1H, s, H<sub>B</sub>), 7.43 (1H, d, H<sub>E</sub>), 8.32(6H, d, H<sub>meta</sub>), 8.48(6H, d, H<sub>orto</sub>), 8.83 (6H, d, H <sub>$\beta$ pyrr2</sub>), 8.97 (2H, d, H <sub>$\beta$ pyrr1</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$   $\delta_{\text{C}}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ppm: 52.3 (C<sub>O-CH3</sub>), 67.2 (C<sub>COO</sub>), 119.8 (C<sub>10,15,20</sub>), 120.1 (C<sub>5</sub>), 128.0 (C<sub>c,e</sub>), 129.3 (C<sub>b,f</sub>), 134.5(C <sub>$\beta$ pyrr</sub>), 135.8 (C<sub>a</sub>).

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

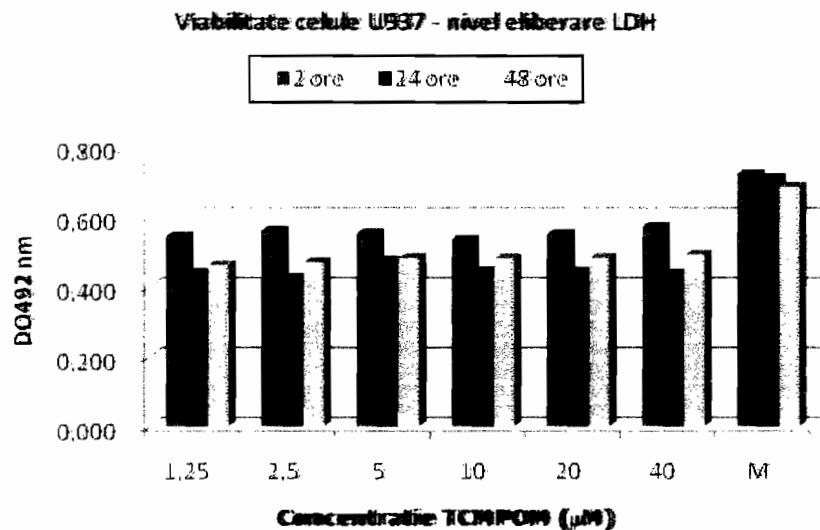
Tabelul 2

Solvent	Soret $\lambda$ (nm)	Q <sub>y</sub> (1,0) $\lambda$ (nm)	Q <sub>y</sub> (0,0) $\lambda$ (nm)	Q <sub>x</sub> (1,0) $\lambda$ (nm)	Q <sub>x</sub> (0,0) $\lambda$ (nm)
MeOH	415	513	547	588	644
EtOH	416	513	548	589	646
DMF	419	515	549	590	645
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	420	515	550	590	645
DMSO	421	515	550	590	645

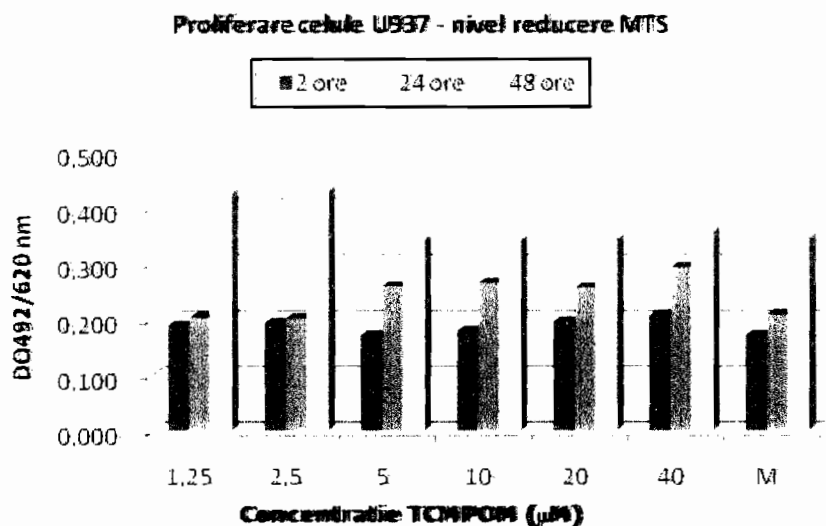
**EXEMPLUL 5**

Evaluarea viabilității și capacității proliferative a celulelor din linia U937 și respectiv celule primare umane PBMC, s-a realizat pe domeniul de concentrații 1.25 – 40  $\mu\text{M}$  ale compusului porfirinic, la 3 timpi de cultura diferiți (2, 24 și 48 de ore). În condițiile experimentale date viabilitatea celulelor U937 nu variază semnificativ în funcție de timpul de incubare și de concentrația de compus testat. Pe toată durata intervalului de concentrații eliberarea de LDH este sub nivelul înregistrat în cazul matorului fapt care susține caracterul netoxic al compusului asupra liniei U937. Pe același domeniu de concentrații, curbele de proliferare sunt diferențiate pentru fiecare timp de incubare. Astfel, în cazul culturilor de 2 și 24 de ore, curbele au alura similară, cu valori comparabile cu ale matorului celular (2 ore) sau stimulare ușoară a proliferării la doze mai mari de 5  $\mu\text{M}$  (24 ore). La 48 de ore, se constată stimularea capacității proliferative în special la doze mici (1.25, 2.5  $\mu\text{M}$ ). Menținerea funcționalității celulare a U937 chiar și la timpi îndelungați de cultura (48 ore) susțin profilul netoxic al compusului investigat.





Evaluarea viabilitatii /integritatii membranare pentru celule din linia U937



Evaluarea capacitatii proliferative pentru celule din linia U937

### EXEMPLUL 6

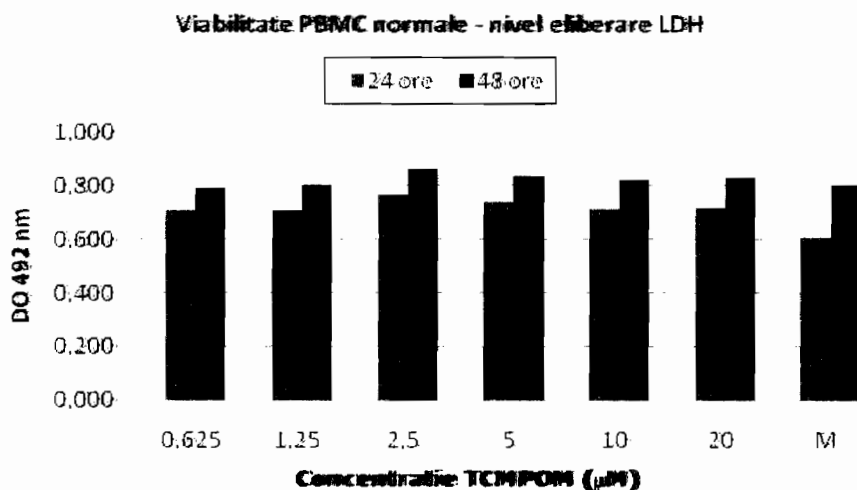
Evaluarea viabilității și capacității proliferative a celulelor primare mononucleare umane (PBMC) izolate din sange periferic, în prezența 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei s-au realizat pe domeniul 0.625 – 20  $\mu\text{M}$ . In cazul PBMC testările s-au realizat la 24 si 48 ore de cultura, avand in vedere



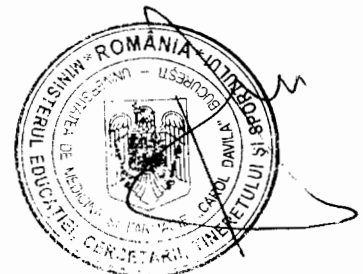
faptul ca la 2 ore nu se disting modificari majore de functionalitate celulara constatate in cazul U937. De asemenea domeniul de concentratii a fost deplasat cu o concentratie, respectiv cea mai mica valoare testata a devenit 0.625  $\mu\text{M}$ . Acest fapt s-a impus datorita naturii culturilor primare de celule umane, mai sensibile la actiunea agentilor medicamentoși comparativ cu celule imortalizate (standard). Populatia de celule mononucleare primare umane (PBMC) cuprinde atat limfocite cat si monocite, si au fost alese pentru testari pentru comparatie cu linia standard U937 cu morfologie de monocit.

Au fost testate 2 tipuri de populatii PBMC: normale, izolate de la donator voluntar sanatos (PBMC\_n) si tumorale, izolate de la pacient cu cancer gastric (PBMC\_t).

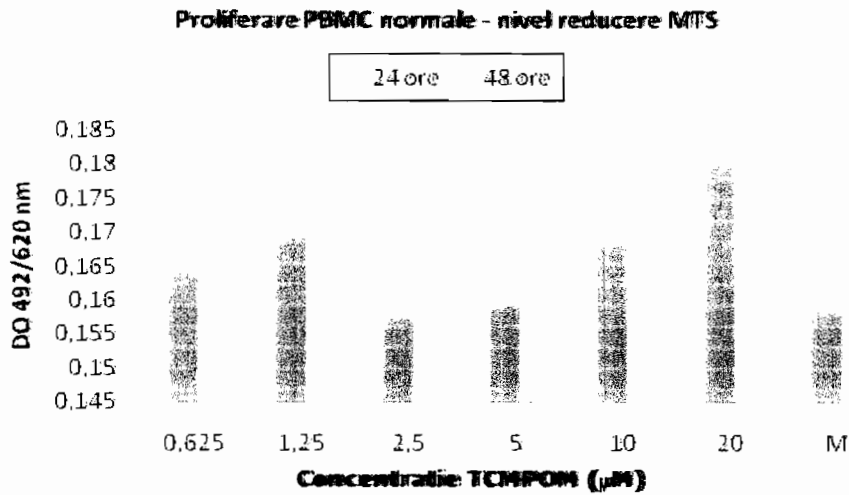
In cazul *PBMC normale*, efectul 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei se observa in cazul testarii de proliferare, viabilitatea celulara nefiind influentata indiferent de timpul de cultivare in prezenta acestuia. La 24 ore de incubare, reactia de reducere a MTS, respectiv stimularea proliferarii, este mai intensa la dozele mari (10 si 20  $\mu\text{M}$ ), urmata de dozele mici din capatul intervalului (0.625 si 1.25  $\mu\text{M}$ ). Concentratiile din zona mediana a intervalului (2.5 si 5  $\mu\text{M}$ ) imprima o rata de proliferare similara cu a martorului celular (celule netratate cu compus). La 48 ore de incubare, numai dozele mici (in special 1.25  $\mu\text{M}$ ) de compus stimuleaza slab proliferarea PBMC normale.



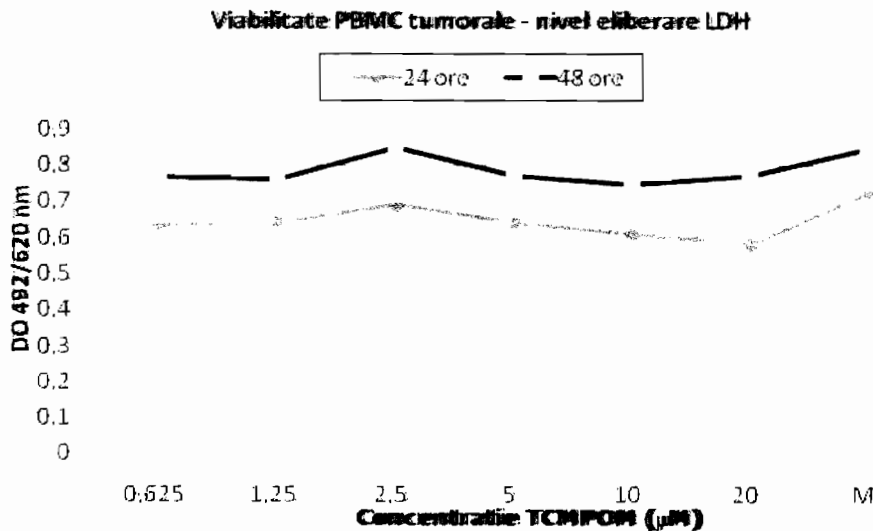
Evaluare viabilitate celulara pentru PBMC umane normale



In cazul *PBMC tumorale*, se remarca dependenta viabilitatii celulare de timpul de incubare, compusul tetrapirolic neafectand semnificativ viabilitatea celulara. La 48 ore de cultura, eliberarea LDH creste comparativ cu 24 ore dar acest lucru se datoreaza timpului de viata in cultura a celulelor primare si nu este un efect al 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei.



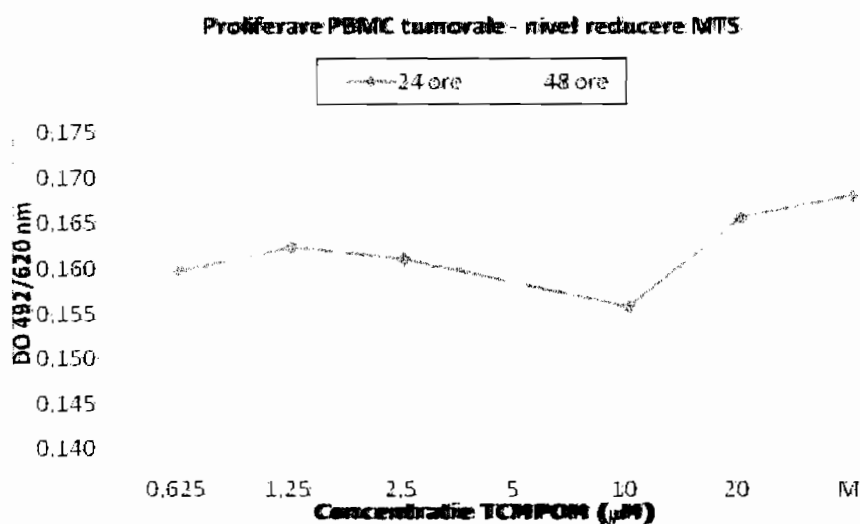
**Evaluare proliferare celulara pentru PBMC umane normale**



**Evaluare viabilitate celulara pentru PBMC umane tumorale**



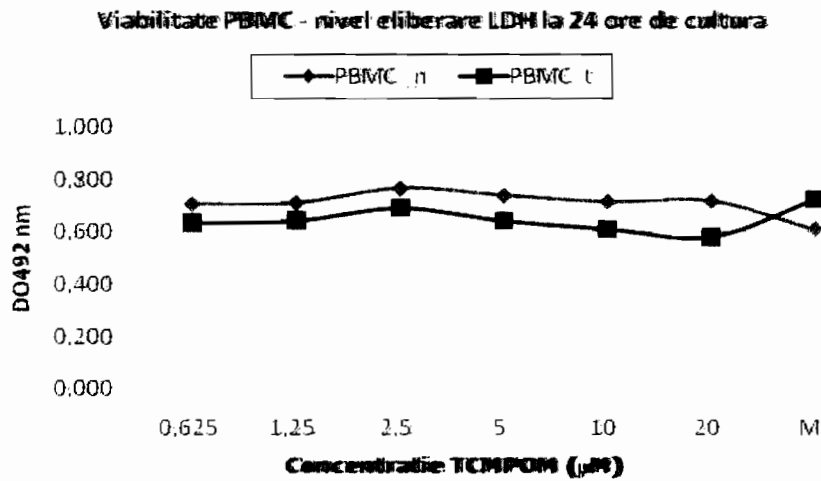
Proliferarea *PBMC tumorale* depinde insa atat de doza de compus incarcata cat si de timpul de cultura. Notabil este efectul 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei la 48 ore de incubare, unde cu exceptia dozelor de 2.5  $\mu\text{M}$  si 20  $\mu\text{M}$ , rata de proliferare este redusa comparativ cu valorile martorului. Aceasta observatie sustine potentialul caracter antitumoral al 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei dependent de doza si timp de cultivare.



*Evaluare proliferare celulara pentru PBMC umane tumorale*

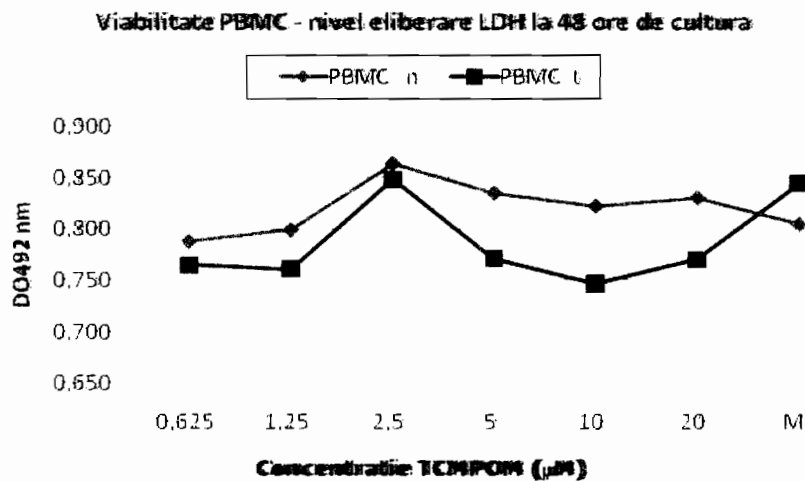
Evaluarea comparativa a viabilitatii celor 2 tipuri de PBMC in prezenta 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei denota posibilul caracter anti-tumoral al compusului in cazul PBMC tumorale si potentialul rol de marker in cazul PBMC normale.





Evaluare comparativa viabilitate celulara la 24 ore de cultura, PBMC normale versus PBMC tumorale

De asemenea evaluarea comparativa a profilului curbelor de proliferare a celor tipuri de PBMC in prezenta 5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfinei releva comportamentul diferit al compusului posibil *anti-tumoral* (reducerea proliferarii) in cazul celulelor tumorale si candidat de *marker celular* (nu interfera in proliferarea celulara la doze scazute) in cazul celulelor normale.

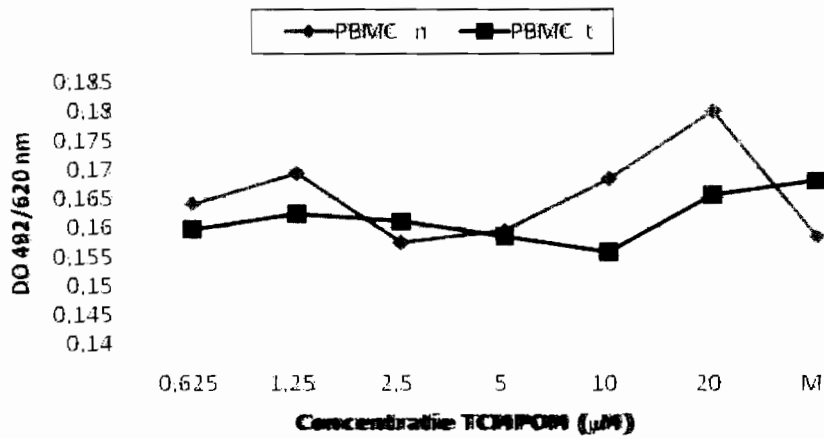


Evaluare comparativa viabilitate celulara la 48 ore de cultura, PBMC normale versus PBMC tumorale



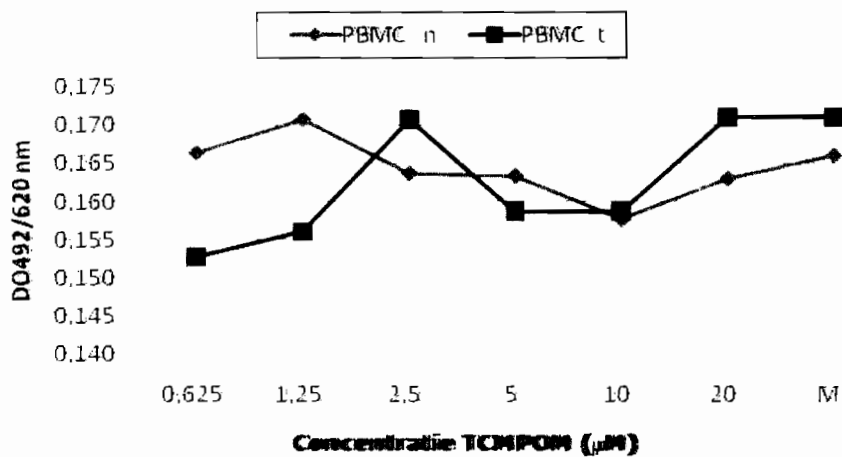


Proliferare PBMC - nivel reducere MTS la 24 ore de cultura

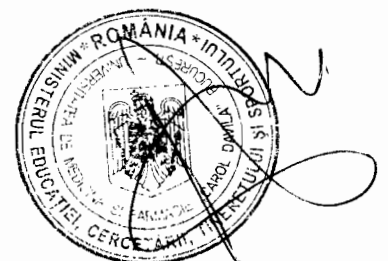


Evaluare comparativa proliferare celulara la 24 ore de cultura, PBMC normale versus PBMC tumorale

Proliferare PBMC - nivel reducere MTS la 48 ore de cultura

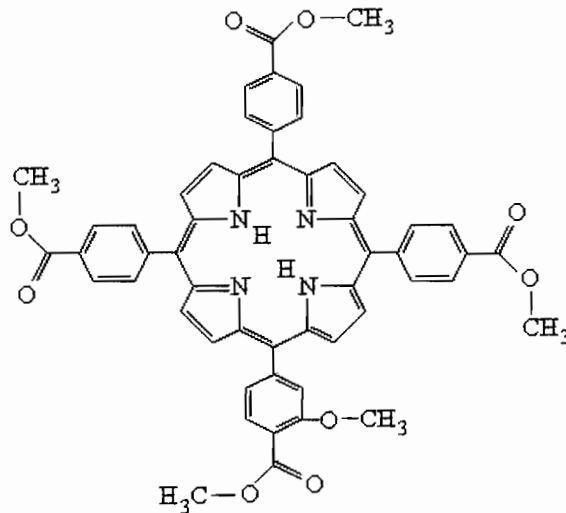


Evaluare comparativa proliferare celulara la 48 ore de cultura, PBMC normale versus PBMC tumorale



## REVENDICĂRI

1. Compusul porfirinic nesimetric substituit cu următoarea structură chimică:



5-(3-metoxi-4-carboximetilfenil)-10, 15, 20-tris-(4-carboximetilfenil)-21, 23-H porfina

2. Procedul de obținere pentru compusul porfirinic nesimetric substituit definit ca în revendicarea 1, caracterizat prin următoarele etape:

- *reacția dintre 3-metoxi-4-acetoxibenzaldehida, 4-acetoxibenzaldehida și pirol pe suport de silicagel neutru.*
- *extractia produsului util din amestecul de reacție prin dizolvare într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v) și filtrare la presiune normală.*
- *purificarea compusului porfirinic asimetric prin cromatografie pe coloana.*

3. Compusul porfirinic nesimetric substituit prezintă o bună localizare și nu manifestă toxicitate asupra celulelor din linia standard U937 și culturilor primare de PBMC

4. Compusul porfirinic nesimetric substituit definit ca în Revendicarea 1, prin proprietățile sale poate fi utilizat în depistarea cancerului prin fotosensibilizare (biomarker).

