



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01012**

(22) Data de depozit: **26.10.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2014** BOPI nr. **12/2014**

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

(73) Titular:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37, SECTOR 1, 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.C 67, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- SOCOTEANU RADU-PETRE, ALEEA PAȘCANI NR.10, BL.M 7, 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.M 82, SC.2, ET.3, AP.76, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- NACEA VERONICA, CALEA FLOREASCA NR.124, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- GIRD ELENA CERASELA, STR.PODARULUI NR.6, BL.F 3, AP.13, SECTOR 4, 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:  
**JPS62205081 (A)**

(54) **COMPUS PORFIRINIC NESIMETRIC SUBSTITUIT, CA AGENT DE FOTOSENSIBILIZARE, UTILIZAT ÎN DIAGNOSTICUL CANCERULUI, ȘI PROCEDEU DE PREPARARE A ACESTUIA**



1 Inventția se referă la un compus tetrapirolic sintetizat în scopul utilizării lui ca marker  
fluorescent în biomedicină.

3 Inventția 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 intra-  
5 celulară a efectului unui compus porfirinic cu aplicații în diagnoză prin fotosensibilizare.

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

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

Compușii destinați diagnozei prin fotosensibilizare trebuie să prezinte eficiențe  
15 cuantice mari, deplasări Stokes mari, fotolabilitate redusă și, în același timp, caracteristici  
17 optime pentru a fi utilizate la studiul celulelor și țesuturilor (caracter amfifil bine echilibrat, fără  
toxicitate intrinsecă, lungime de undă de excitare mare, care să evite interferențele spectrale  
19 datorate autofluorescenței probelor biologice) [S. Bonneau, C.V. Bizet, H. Mojziso, D.  
Brault, *Int. J. Pharm.*, 2007, 344, 78-87, D. K. Chatterjee, Z. Yong, *Advanced Drug Delivery*  
21 *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.  
23 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  
25 fluorescenți. Acest nou domeniu de utilizare a porfirinelor a fost amplificat parțial de  
posibilitatea aplicării lor ca dispozitive medicale non-convenționale în terapia fotodinamică  
27 (PDT), deoarece au absorbții adecvate în domeniul fototerapeutic (~670 la 1100 nm) [S.  
Hilderbrand, R. Weissleder, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14, 71-79, S. Pascu,  
29 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.*  
31 *J. Oncol.*, 2005, 26, 1501-1506].

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

35 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  
37 dependentă de caracterul amfifil al porfirinei [F. Ricchelli, G. Jori, S. Gobbo, M. Tronchin,  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1065,42-48].

39 Diagnoza diferitelor tipuri de cancer prin fotosensibilizare utilizând ca markeri  
substanțe active cu structuri macrociclice este aplicată tot mai mult deoarece este o metodă  
41 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.  
43 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.  
45 Thomas, et al., *J. Endourol.*, 2009, 6, 983-988].

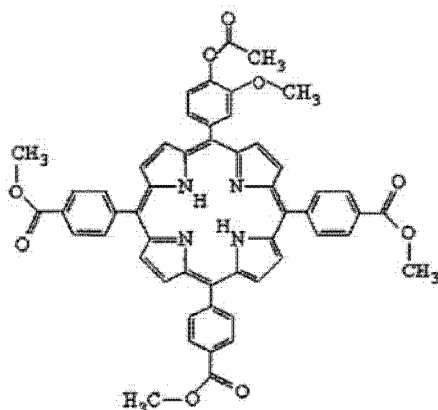
**JPS62205081 (A)** se referă la un compus porfirinic cu denumirea chimică:  
47 7,12-bis{1-[2-(2-hidroxi-etiloxi)etiloxi]etil}-3,8,13,17-tetrametil, 2,18-bis{2-[2-(2-hidroxi-etil-  
oxi)etiloxi]carbonilet}-21H,23H-porfirină, ca agent de fotosensibilizare util în diagnosticarea

cancerului, și la procedeul de preparare a acestuia, care cuprinde etapele de: reacție a acidului 7,12-dietenil-3,8,13,17-tetrametil-21H,23H-porfin-2,18-dipropionic, în prezența unei soluții de acid bromhidric în acid acetic cu  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$  (cu  $n=2-6$ ) și hidroliza produsului intermediar pentru a obține derivatul porfirinic dorit.

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

Problema tehnică întâlnită 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 tetrapirolic nesimetric substituit cu următoarea structură chimică:



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

- reacție a 3-metoxi-4-acetoxibenzaldehidei cu 4-acetoxibenzaldehidă și pirol, în raport molar 1:3:4, pe suport de silicagel neutru;
- extracție a produsului util din amestecul de reacție prin dizolvare într-un amestec diclorometan/eter, în raport 50:1 (v/v), și filtrare la presiune normală;
- purificare a compusului porfirinic asimetric, prin cromatografie pe coloană.

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 sânge periferic uman, izolat de la donatori voluntari (PBMC).

Procedeul s-a realizat prin investigarea următorilor parametri:

- determinarea viabilității celulare/integrității 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-sulfonil)-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 care se desfășoară în condiții ecologice, iar numărul de izomeri din amestecul final este mult mai mic comparativ cu cel obținut prin 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;

# RO 126761 B1

1 - stabilirea unui protocol optim de utilizare a compusului porfirinic nesimetric substituit, pentru diagnoza prin marcarea fluorescentă sau fotosensibilizare (biomarker).

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

5 Inventția 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.

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

9 Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 11 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 min 13 fiecare. Puterea de iradiere a fost de 475 W pentru primele două iradieri, apoi a fost scăzută la 350 W. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C, iar procedul de sinteză a inclus 15 răcirea la interval de 2 min a amestecului în timpul reacției.

17 Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 2, 19 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 21 extracției produsului util.

23 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 25 superioară, între straturile de fază staționară, la o distanță de aproximativ 15 cm de partea superioară.

27 Descrierea pe scurt a desenelor:

29 - fig. 1 prezintă evaluarea viabilității/integrității membranare pentru celule din linia U937;

- fig. 2 prezintă evaluarea capacității proliferative pentru celule din linia U937;

31 - fig. 3 prezintă evaluarea viabilității celulare pentru PBMC umane normale;

- fig. 4 prezintă evaluarea proliferării celulare pentru PBMC umane normale;

33 - fig. 5 prezintă evaluarea viabilității celulare pentru PBMC umane tumorale;

- fig. 6 prezintă evaluarea proliferării celulare pentru PBMC umane tumorale;

35 - fig. 7 prezintă evaluarea comparativă viabilitate celulară la 24 h de cultură, PBMC normale versus PBMC tumorale;

37 - fig. 8 prezintă evaluarea comparativă viabilitate celulară la 48 h de cultură, PBMC normale versus PBMC tumorale;

39 - fig. 9 prezintă evaluarea comparativă proliferare celulară la 24 h de cultură, PBMC normale versus PBMC tumorale;

41 - fig. 10 prezintă evaluarea comparativă proliferare celulară la 48 h de cultură, PBMC normale versus PBMC tumorale.

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

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

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

# RO 126761 B1

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 h la 150°C, iar domeniul spectral abordat a fost cuprins în intervalul 4000-500 cm<sup>-1</sup>. 1  
3

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 porfină 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. Spectrele <sup>1</sup>H-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 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 (metanol, etanol, clorură de metilen, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid) pentru concentrații în compus porfirinic de 2,5 x 10<sup>-6</sup> M. 5  
7  
9  
11  
13  
15  
17  
19

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 cultură cu 96 de godeuri. Această tehnică reprezintă o alternativă colorimetrică a metodei de dozare a cromului radioactiv (<sup>51</sup>Cr) eliberat din țintele celulare marcate. Sistemul măsoară cantitativ enzima lactat dehidrogenază (LDH), cu localizare citosolică stabilă, și care este eliberată în urma lizei celulare, în aceeași manieră în care <sup>51</sup>Cr este eliberat în varianta radioactivă. LDH eliberat în supernatanții de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 min, ce 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. 21  
23  
25  
27  
29  
31

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-sulfofenil)-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. Testul se realizează prin adăugarea directă a reactivului kitului (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent*) la suspensia celulară din godeurile de cultură, urmată de incubare de 1- 4 h (în funcție de tipul celular studiat) și înregistrarea DO la 492 nm, cu un cititor de plăci. Densitatea optică măsurată la 492 nm este direct proporțională cu cantitatea de formazan obținută, respectiv, cu numărul de celule vii, proliferante, din cultură. 33  
35  
37  
39  
41  
43  
45

1 **Exemplul 1**

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

5 Procedeu 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.

7 Procedeu are la bază reacția stoechiometrică dintre 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehidă, 9 metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de silicagel neutru, prin iradiere cu microunde, utilizând o instalație de tip HINARI - MX606, 2450 MHz.

11 Amestecul de reactanți este supus la 5 iradieri succesive a câte 2 min fiecare. Puterea de iradiere a fost de 475 W pentru primele două iradieri, apoi a fost scăzută la 13 350 W. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C, iar procedeul de sinteză a inclus răcirea la interval de 2 min a amestecului în timpul reacției. 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehida 15 (2,427 g, 12,5 mmoli) și metil 4-formil benzoat (6,156 g, 37,5 mmoli) se aduc în vasul de sinteză peste 4-5 g silicagel neutru (Kieselgel 60, Merck, 200-500 μm; 35-70 mesh), folosit 17 ca suport în reacția de sinteză. Se omogenizează amestecul, se adaugă pirolul proaspăt distilat (3,45 mL, 50 mmoli) și se încep seturile de iradiere. Pentru monitorizarea reacției de 19 sinteză, după fiecare iradiere s-au prelevat probe din amestecul de reacție, care au fost dizolvate în diclormetan și evaluate prin înregistrarea spectrelor electronice în domeniul 21 vizibil. Extracția produsului util din amestecul de reacție s-a realizat prin dizolvare într-un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v), și filtrare la presiune normală. Filtratul a 23 fost concentrat prin distilare simplă, apoi evaporat. S-a obținut o masă solidă, cristalină, care a fost ulterior purificată.

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

27 Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie utilizând o coloană cromatografică de L = 100 cm și φ = 10 cm. Ca fază staționară s-a utilizat 29 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 31 a evita antrenarea compușilor de separat în volumul de eluent de la partea superioară a coloanei, peste amestecul de separat s-au adăugat 5-6 cm de fază staționară. Analiza RMN 33 a compușilor prezenți în fracțiile eluate pe colana cromatografică a confirmat prezența compusului 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfină în 35 cea de-a doua fracție colectată. În compoziția primei fracții eluate a fost evidențiat compusul porfirinic simetric substituit 5,10,15,20-A77eso-tetrakis-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfina. 37 Randamentul reacției de obținere a noului compus porfirinic a fost de 35%.

39 **Exemplul 2.** Valorile parametrilor spectrali IR ale TCMPOM și ale compusului de referință TCMP sunt prezentate în tabelul 1.

41

Tabelul 1

43

45

| Vibrația caracteristică          | Numărul de undă al benzii IR (cm <sup>-1</sup> ) |         |
|----------------------------------|--|---------|
|                                  | TCMPOM   | TCMP    |
| $V_{N-H}$                        | 3177(m)  | 3310(s) |
| $V_{C-H}$                        | 2922(m)  | 2950(m) |
| $V_{C-H}$ din -O-CH <sub>3</sub> | 2851(m)  | 2851(i) |

Tabelul 1 (continuare)

| Vibrația caracteristică        | Numărul de undă al benzii IR (cm <sup>-1</sup> ) |         |
|--------------------------------|--|---------|
|                                | TCMPOM   | TCMP    |
| $V_{C=O}$                      | 1719(m)  | 1717(i) |
| $V_{C-N}$                      | 1605(m)  | 1603(m) |
| $V_{C-N}$                      | 1508(m)  | 1469(s) |
| $V_{C-H \text{ pyrrole}}$      | 1463(m)  | 1400(m) |
| $V_{C-O}$                      | 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)  |
| $\gamma_{C-N \text{ pyrrole}}$ | 811(m)   | 798(m)  |
| $\gamma_{C-H}$                 | 761 (m)  | 761 (m) |

**Exemplul 3.** Rezultatele obținute prin analiza RMN sunt:

<sup>1</sup>H-NMR,  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ppm: -2,80 (2H, br. s., -NH), 3,61 (3H, s, CH<sub>3</sub>COO), 3,82 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 4,13 (9H, s, -COOCH<sub>3</sub>), 7,06 (1H, d, H<sub>orto-Ph-CH<sub>3</sub>COO</sub>), 7,28 (1H, s, H<sub>orto-Ph-CH<sub>3</sub>COO</sub>), 7,43 (1H, d, H<sub>meta-Ph-CH<sub>3</sub>COO</sub>), 8,32 (6H, d, H<sub>meta-Ph-COOCH<sub>3</sub></sub>), 8,48 (6H, d, H<sub>orto-Ph-COOCH<sub>3</sub></sub>), 8,83 (6H, d, H <sub>$\beta$ pyrr</sub>), 8,97 (2H, d, H <sub>$\beta$ pyrr</sub>).

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

Tabelul 2

| Solvent                         | Soret<br>$\lambda$ (nm) | $Q_y(1,0)$<br>$\lambda$ (nm) | $Q_y(0,0)$<br>$\lambda$ (nm) | $Q_x(1,0)$<br>$\lambda$ (nm) | $Q_x(0,0)$<br>$\lambda$ (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, celulelor primare umane PBMC s-a realizat pe domeniul de concentrații 1,25-40  $\mu$ M ale compusului porfirinic, la 3 timpi de cultura diferiți (2, 24 și 48 h). În condițiile experimentale date, viabilitatea celulelor U937 nu variază semnificativ în funcție de timpul de incubare și de concentrația de compus testată. Pe toată durata intervalului de concentrații eliberarea de LDH este sub nivelul înregistrat în cazul martorului 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 h, curbele au alură similară, cu valori comparabile cu ale martorului celular (2 h), sau

1 stimulare ușoară a proliferării la doze mai mari de 5  $\mu$ M (24 h). La 48 h, se constată stimula-  
rea capacității proliferative în special la doze mici (1,25, 2,5  $\mu$ M). Menținerea funcționalității  
3 celulare a U937 chiar și la timpi îndelungați de cultură (48 h) susțin profilul netoxic al com-  
pusului investigat.

5 **Exemplul 6.** Evaluarea viabilității și capacității proliferative a celulelor primare mono-  
nucleare umane (PBMC) izolate din sânge periferic, în prezența 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-  
7 10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfinei s-au realizat pe domeniul 0,625-20  $\mu$ M. În  
cazul PBMC, testările s-au realizat la 24 și 48 h de cultură, având în vedere faptul că la 2 h  
9 nu se disting modificări majore de funcționalitate celulară constatate în cazul U937. De  
asemenea, domeniul de concentrații a fost deplasat cu o concentrație, respectiv, cea mai  
11 mică valoare testată a devenit 0,625  $\mu$ M. Acest fapt s-a impus datorită naturii culturilor pri-  
mare de celule umane, mai sensibile la acțiunea agenților medicamentoși comparativ cu  
13 celule imortalizate (standard). Populația de celule mononucleare primare umane (PBMC)  
cuprinde atât limfocite, cât și monocite, și au fost alese pentru testări pentru comparație cu  
15 linia standard U937 cu morfologie de monocit.

Au fost testate 2 tipuri de populații PBMC: normale, izolate de la donator voluntar  
17 sănătos (PBMC\_n), și tumorale, izolate de la pacient cu cancer gastric (PBMC\_t).

În cazul PBMC normale, efectul 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-  
19 carboximetilfenil)-21,23H porfinei se observă în cazul testării de proliferare, viabilitatea  
celulară nefiind influențată indiferent de timpul de cultivare în prezența acestuia.

21 La 24 h de incubare, reacția de reducere a MTS, respectiv, stimularea proliferării este  
mai intensă la dozele mari (10 și 20  $\mu$ M), urmată de dozele mici din capătul intervalului  
23 (0,625 și 1,25  $\mu$ M). Concentrațiile din zona mediană a intervalului (2,5 și 5  $\mu$ M) imprimă o  
rată de proliferare similară cu a matorului celular (celule netratate cu compus). La 48 h de  
25 incubare, numai dozele mici (în special 1,25  $\mu$ M) de compus stimulează slab proliferarea  
PBMC normale.

27 În cazul PBMC tumorale, se remarcă dependența viabilității celulare de timpul de  
incubare, compusul tetrapirolic neafectând semnificativ viabilitatea celulară. La 48 h de  
29 cultură, eliberarea LDH crește comparativ cu 24 h, dar acest lucru se datorează timpului de  
viață în cultură a celulelor primare, și nu este un efect al 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-  
31 *tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23H porfinei.

Proliferarea PBMC tumorale depinde însă atât de doza de compus încărcată, cât și  
33 de timpul de cultură. Notabil este efectul 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboxi-  
metilfenil)-21,23H porfinei la 48 h de incubare, unde, cu excepția dozelor de 2,5  $\mu$ M și 20  $\mu$ M,  
35 rata de proliferare este redusă comparativ cu valorile matorului. Această observație susține  
potențialul caracter antitumoral al 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetil-  
37 fenil)-21,23H porfinei dependent de doză și timp de cultivare. Evaluarea comparativă a  
viabilității celor 2 tipuri de PBMC în prezența 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-  
39 carboximetilfenil)-21,23H porfinei denotă posibilul caracter antitumoral al compusului în cazul  
PBMC tumorale, și potențialul rol de marker în cazul PBMC normale.

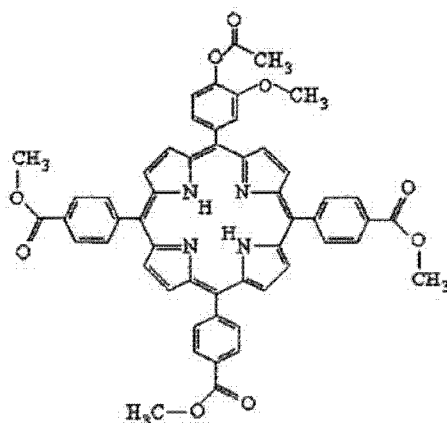
41 De asemenea, evaluarea comparativă a profilului curbelor de proliferare a celor tipuri  
de PBMC în prezența 5-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)-21,23H  
43 porfinei relevă comportamentul diferit al compusului posibil antitumoral (reducerea prolif-  
erării), în cazul celulelor tumorale, și candidat de marker celular (nu interferează în proliferarea  
45 celulară la doze scăzute), în cazul celulelor normale.



# RO 126761 B1

## Revendicări

1. Compus tetrapirolic nesimetric substituit, cu următoarea structură chimică:



2. Procedeu de obținere pentru compusul porfirinic nesimetric substituit, definit ca în revendicarea 1, care cuprinde următoarele etape:

- reacția dintre 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehidă, metil 4-formil benzoat și pirol în raport molar de 1:3:4 pe suport de silicagel neutru;

- extracția 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;

- separarea compusului porfirinic asimetric, prin cromatografie pe coloană.

3. Compus porfirinic nesimetric substituit, conform revendicării 1, pentru utilizare în depistarea cancerului prin fotosensibilizare (biomarker).

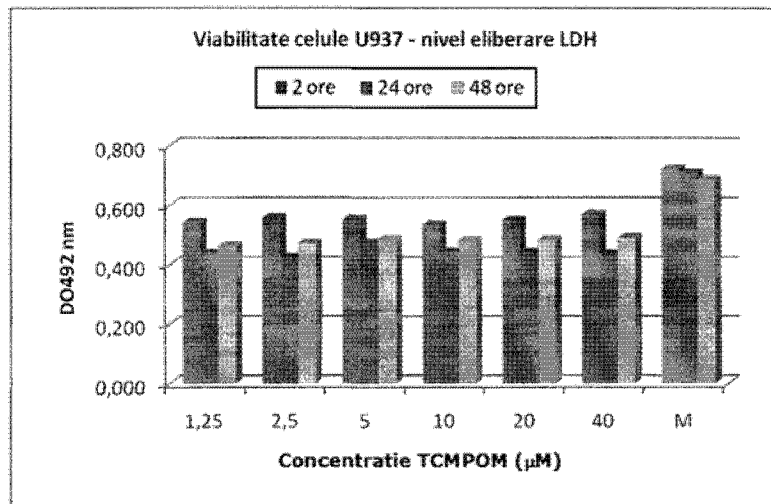


Fig. 1

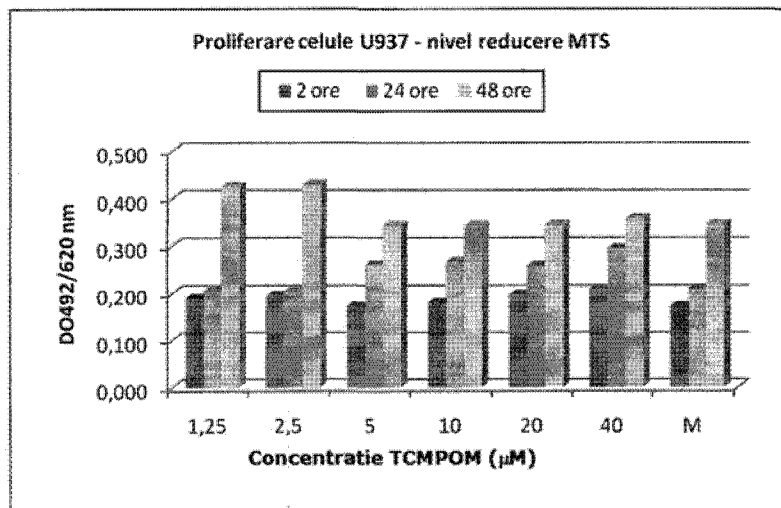


Fig. 2

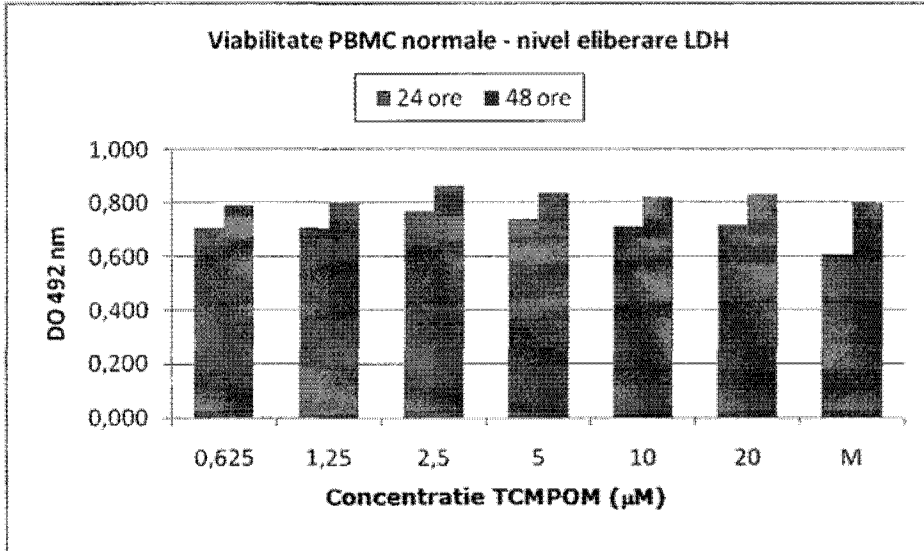


Fig. 3

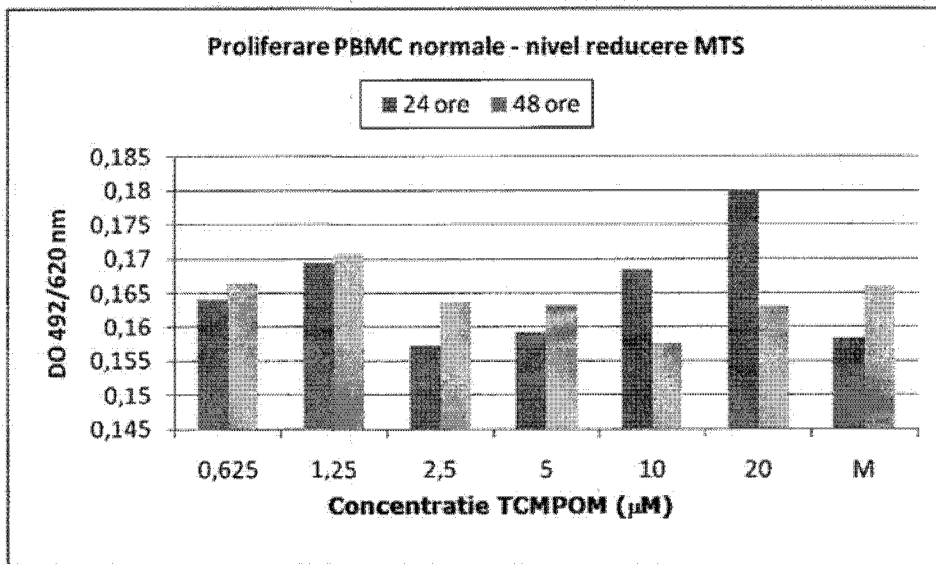


Fig. 4

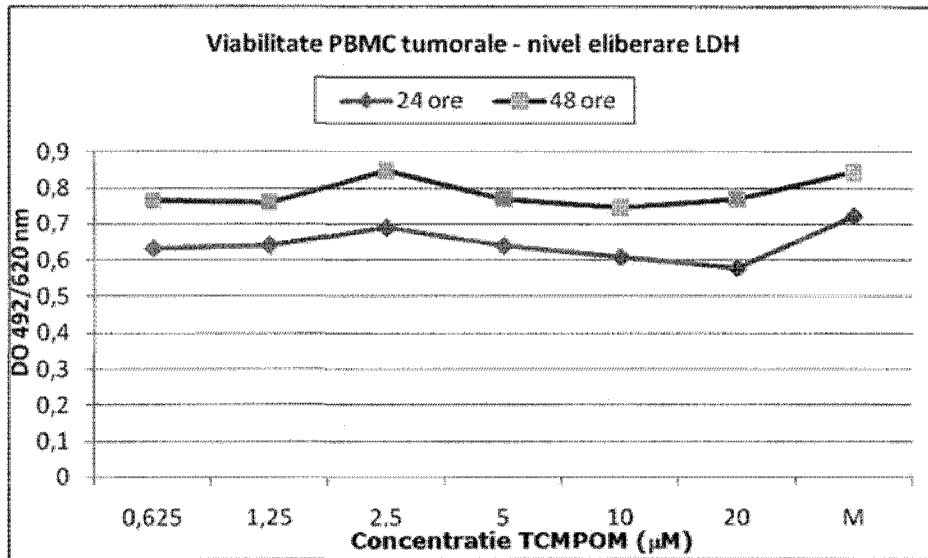


Fig. 5

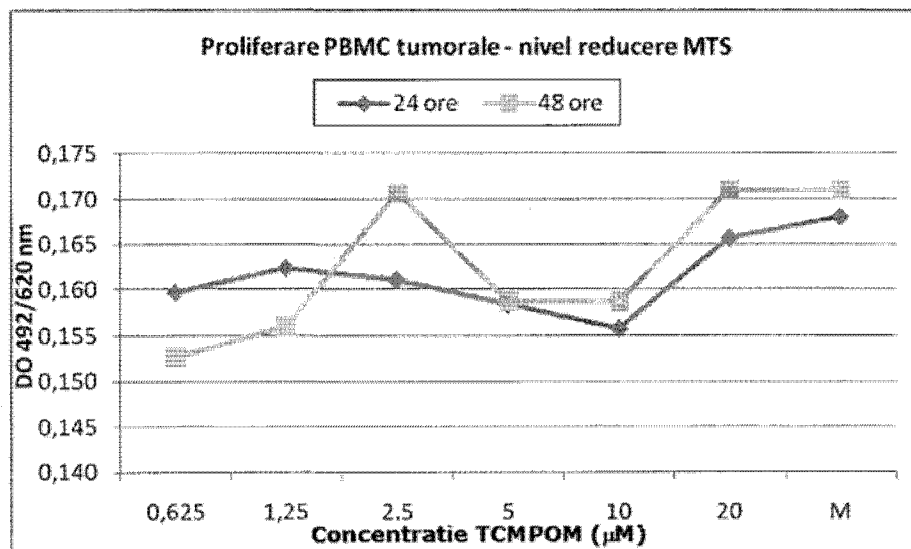


Fig. 6

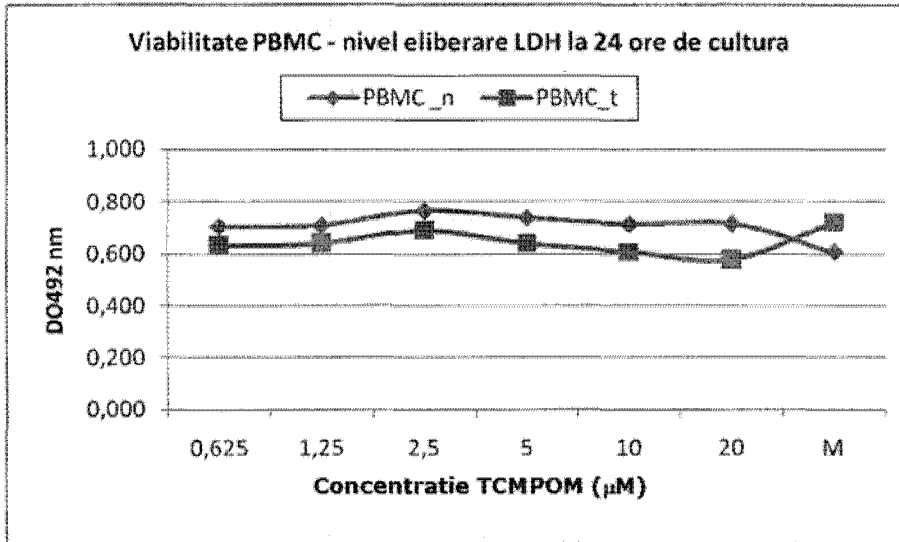


Fig. 7

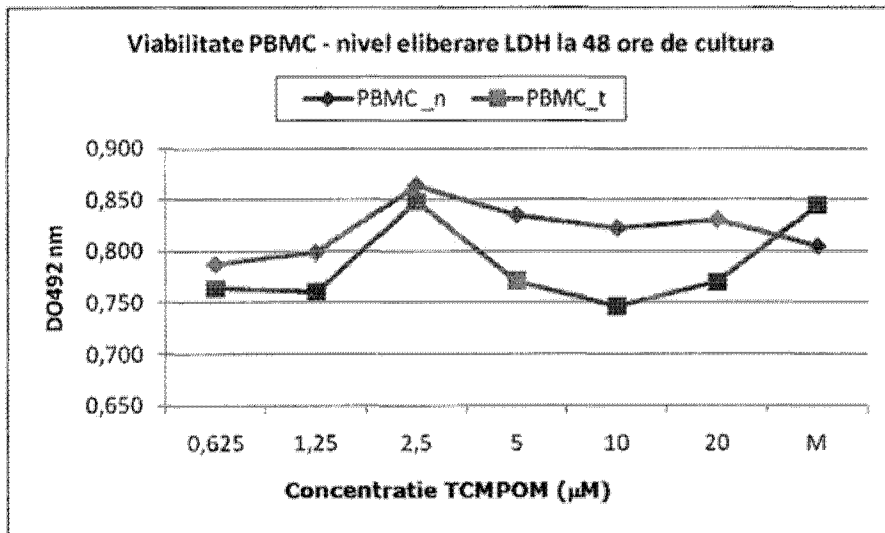


Fig. 8

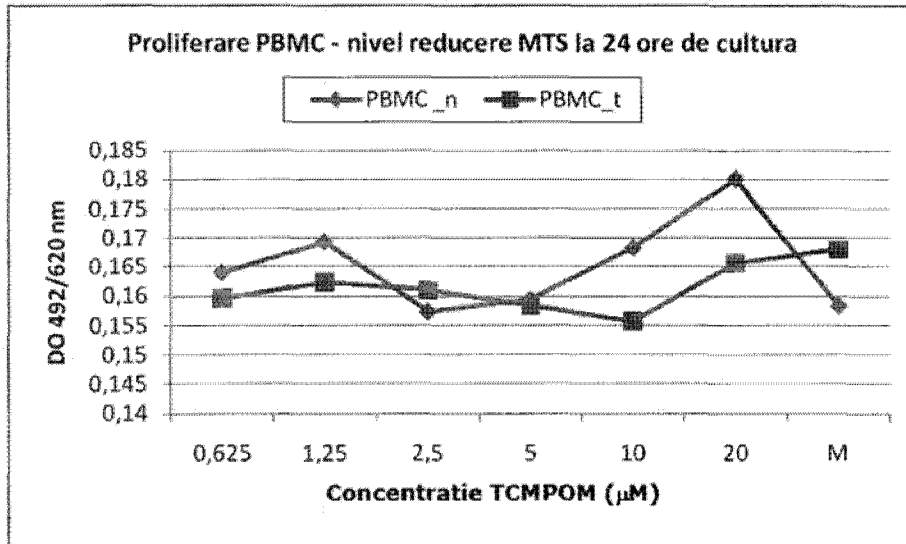


Fig. 9

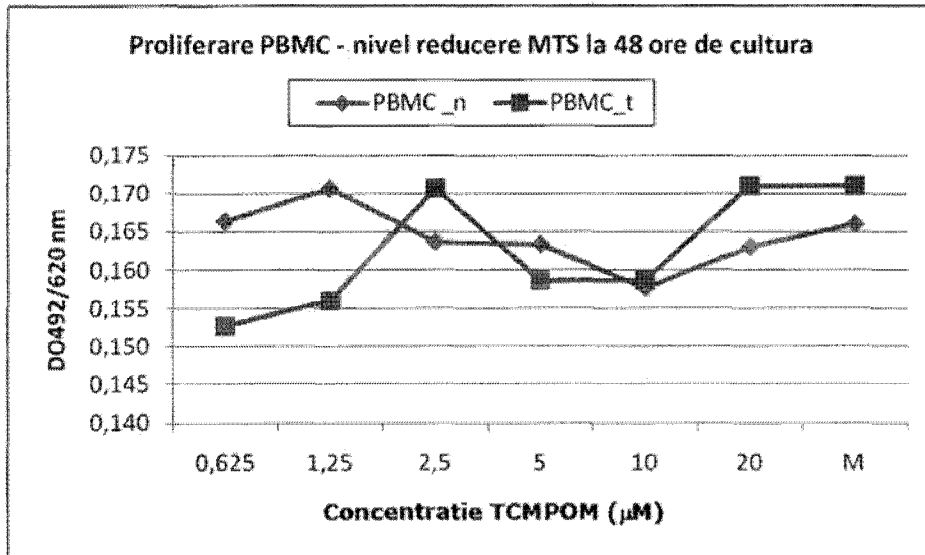


Fig. 10

