



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00922**

(22) Data de depozit: **28/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/03/2019** BOPI nr. **3/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

(73) Titular:

• 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:

• BOSCENCU RICA, STR.VLĂDEASA NR.1,
BL.C 67, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;
• MANDA GINA, STR.DR.EUGEN O.IOSIF
NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SOCOTEANU RADU PETRE,
ALEEA PAȘCANI NR. 10, BL. M7, AP. 16,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• HINESCU MIHAIL EUGEN,
STR. IONIȚĂ CEGAN NR. 2, BL. P11, SC. 2,
AP. 41, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• RADULEA NATALIA, STR. SABARULUI
NR. 14, SAT CLINCENI, CLINCENI, IF, RO;
• NEAGOE IONELA VICTORIA,
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35,
SC. A, AP. 47, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• LUIS FILIPE VIEIRA FERREIRA,
AV.ROVISCO PAIS 1096, LISABONA, PT

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 123419 B1; RO 122039 B1;
BRUNO F. O. NASCIMENTO,
MARTA PINEIRO, ANTONIO M. D'A.
ROCHA GONSALVES, MANUELA RAMOS
SILVA, ANA MATOS BEJA ȘI JOSE A.
PAIXAO, "MICROWAVE-ASSISTED
SYNTHESIS OF PORPHYRINS AND
METALLO-PORPHYRINS: A RAPID AND
EFFICIENT SYNTETIC METHOD,
UNIVERSITATEA COIMBRA,
PORTUGALIA, 2007

(54) **COMPUS TETRAPIROLIC CU APLICAȚII ÎN TERANOSTICĂ,
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA**



RO 131946 B1

1 Invenția se referă la un compus cu structură tetrapirolică asimetric substituit, sintetizat
cu scopul utilizării lui în diagnoza și terapia tumorilor solide.

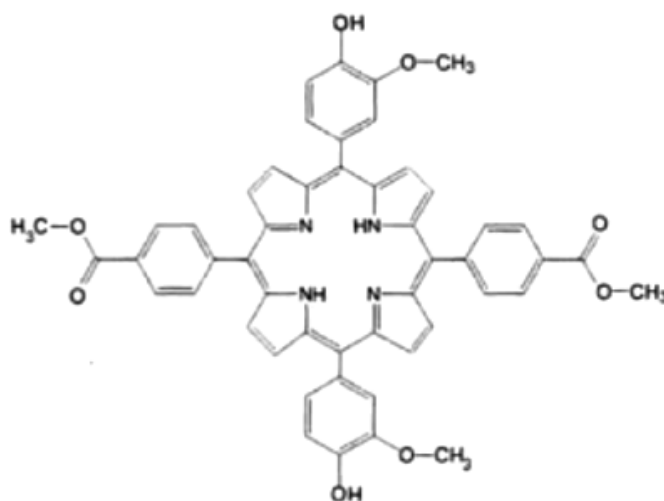
3 Invenția se referă la sinteza, purificarea, evaluarea structurală și testarea preliminară
in vitro a unui compus porfirinic cu aplicații teranostice în tumori solide. Dezvoltarea de noi
5 formule farmaceutice cu potențial de trasor imagistic și agent anti-tumoral se înscrie printre
cele mai recente preocupări ale colectivelor de specialiști din domeniul chimiei medicamentului.

7 Compușii tetrapirolici se înscriu în seriile de structuri investigate în scopul utilizării lor
în teranostică [P. C. Zhang, C. H. Hu, W. Ran, J. Meng, Q. Yin, Y. P. Li, *Theranostics*,
9 **2016**, **6**, 948-968, J. F. Lovell, P. C. Lo, *Theranostics*, **2012**, **2**, 9, 815-816, Kausch, M.
Sommerauer, F. Montorsi, A. Stenzl, D. Jacqmin, P. Jichlinski, D. Jocham, A. Ziegler,
11 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.
13 Thomas, et al., *J. Endourol.*, **2009**, **6**, 983-988].

Optimizarea structurală asociată cu stabilirea parametrilor ce descriu tehnica de
15 sinteză și purificare a compușilor porfirinici, precum și o analiză riguroasă a parametrilor ce
definesc profilul spectral și comportarea lor în mediu fiziologic (solubilitate, tendința de
17 agregare moleculară, afinitate pentru țesutul tumoral exprimată dependent de caracterul
lipofil/hidrofil, toxicitate), sunt extrem de utile în dezvoltarea de noi instrumente pentru
19 realizarea într-un singur pas a diagnosticului și terapiei tumorilor (abordare teranostică).
Profilul arhitectural al porfirinelor de sinteză dictează pe lângă afinitatea pentru diverse tipuri
21 de celule patologice și comportarea spectrală a acestora, respectiv absorbția radiațiilor din
domeniul vizibil, emisia fluorescentă în domeniul spectral 550...800 nm și capacitatea de a
23 genera oxigen singlet, toate aceste definind potențialul de agent teranostic al acestora [D.
K. Chatterjee, Z. Yong, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, **60**, 1627-1637, S.
25 Hilderbrand, R. Weissleder, *Current Opinion în Chemical Biology*, **2010**, **14**, 71-79, S.
Pascu, P. Waghorn, T. Conry, B. Lin, C. James, J. M. Zayed, *Advances în Inorganic
27 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].

29 Problema tehnică constă în obținerea prin metode de sinteză moderne și ecologice
a unor molecule noi, cu un profil structural și spectral care le recomandă pentru aplicații
31 teranostice în medicina personalizată.

Invenția are ca obiect un compus porfirinic caracterizat de repartizarea asimetrică a
33 substituenților periferici ai macrociclului tetrapirolic, compus destinat pentru teranostică în
tumori solide.



47 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina

RO 131946 B1

Obținerea compusului definit anterior se realizează printr-un procedeu care se desfășoară în 3 etape:	1
1. Interacția sub acțiunea microundelor a unui amestec format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru.	3
2. Dizolvarea în amestec diclormetan/eter etilic (50 v/1 v) a produsului obținut în reacția de condensare, filtrarea soluției obținute și concentrarea acesteia prin distilare simplă.	5
3. Purificarea compusului tetrapirolic asimetric prin cromatografie pe coloană urmată de cromatografie în strat subțire.	7
Avantajele aplicării invenției sunt:	9
- compusul tetrapirolic cu structură asimetrică poate fi obținut printr-o metodă ecologică, nepoluantă, în absența solventului ca mediu de reacție și într-un interval de timp mic;	11
- reacția de sinteză furnizează un produs brut cu un număr de izomeri mult mai mic decât metoda clasică, iar procedeu de purificare aplicat permite separarea eficientă a izomerilor porfirinici, respectiv a produsului util;	13
- stabilirea unui protocol <i>in vitro</i> de utilizare a compusului porfirinic nesimetric substituit pentru diagnoza prin fluorescență sau pentru terapie antitumorală prin fotosensibilizare (biomarker și agent terapeutic).	17
Procedeu de sinteză a compusului cu structură asimetrică are la bază interacția amestecului format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru sub acțiunea microundelor.	19
Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 1) amestecul echimolar format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă și metil 4-formil benzoat se aduce în vasul de sinteză peste suportul de reacție reprezentat de oxidul de aluminiu neutru. Se adaugă, în cantitate stoechiometrică cu aldehydele, pirolul proaspăt distilat. Reacția de condensare se desfășoară la iradierea cu microunde a amestecului de reactanți timp de 15 min, respectiv 3 iradieri succesive (650-450-350 W) a câte 5 min fiecare. Temperatura de reacție a fost fixată la 180°C, iar procedeu de sinteză a inclus răcirea la interval de 5 min a amestecului reactant.	21
Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției, în etapa 2) produsul de reacție se răcește la temperatura camerei și, pentru extracția produsului util, se dizolvă în amestec diclormetan/eter etilic (50 v/1 v), iar soluția se filtrează la presiune normală.	23
În etapa 3) soluția obținută prin filtrare în etapa anterioară a fost concentrată prin distilare simplă, evaporată, iar amestecul solid obținut a fost adus în coloana cromatografică pentru separarea izomerilor porfirinici.	25
Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat prin cromatografie pe coloană. Drept fază staționară, s-a utilizat oxid de aluminiu neutru (Al ₂ O ₃ 90, Merck, 63...200 μm, 70...230 mesh), iar ca eluent, un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v).	27
Pentru obținerea unui grad de puritate avansat al compusului de interes, faza finală a procedurii de obținere a inclus purificarea prin cromatografie în strat subțire, utilizând plăci PLC silica gel 60, 2 mm, 20 x 20 cm, și diclormetan/eter etilic ca eluent.	29
Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, de tip Bruker-Tensor 27, cu ATR Pike prevăzut cu cristal de diamant. Compusul a fost uscat 24 h la 150°C, iar domeniul spectral abordat a fost cuprins în intervalul 4000...500 cm ⁻¹ . Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) care au confirmat structura compusului 5,15-bis-	31

RO 131946 B1

1 (4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirina s-au înregistrat cu un spectro-
metru de tip Bruker Avance DRX 400, prevăzut cu un cap de probă multinuclear (de 5 mm)
3 cu detecție inversă. Spectrele ¹H-RMN au fost înregistrate la frecvența de 400 MHz, utilizând
drept referință semnalul tetrametilsilanului (TMS). Solventul utilizat a fost cloformul deuterat.

5 În evaluarea spectrală a structurilor de tip porfirinic destinate aplicațiilor biomedicale,
se impune studiul comportamentului acestora raportat la medii cu polarități diferite, deoarece
7 calitatea de marker și agent fotosensibilizator se manifestă după localizarea în mediul
celular, respectiv după traversarea stratului membranelor dublu lipidic. Interacțiile de natură
9 fizică ce pot apărea între substituenții periferici ai macrociclului porfirinic și moleculele cu
polarități diferite pot conduce la modificări ale profilului spectral al fotosensibilizatorului și
11 implicit la modificarea potențialului biomedical al acestuia. Din aceste considerente și pentru
identificarea unor eventuale fenomene de asociere ce pot apărea între moleculele porfirinice
13 cu formare de agregate moleculare, studiile ce au vizat stabilirea profilului spectral al noului
compus au inclus și analiza spectrală UV-Vis în solvenți cu polarități diferite (diclormetan,
15 dimetilsulfoxid, etanol, polietilenglicol 200). Spectrele de absorbție au fost înregistrate în
soluții ale compușilor porfirinici de concentrație $c = 2,5 \times 10^{-6}$ M cu ajutorul unui spectrometru
17 UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35, în domeniul 350...700 nm.

Studiile au inclus și testarea preliminară *in vitro* a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-
19 10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei (P1.3), urmărindu-se efectul exercitat asupra viabili-
tății și proliferării celulare, în relație cu concentrația și timpul de acțiune. Studiile au fost
21 realizate utilizând linia de celule umane de adenocarcinom de colon HT-29 (linie standard,
nr. catalog ATCC HTB-38) și fibroblaști de șoarece din linia L929 (linie standard, nr. catalog
23 ATCCCL-1).

Studiul biologic *in vitro* s-a realizat prin investigarea următorilor parametri celulari:

- 25 - viabilitatea și multiplicarea celulară, evaluate prin testul reducerii sării de 3-(4,5-di-
metiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (testul reducerii MTS);
- 27 - moartea celulară, evaluată ca integritate a membranei plasmatică prin testul
eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei (testul eliberării LDH).

29 Studiul preliminar realizat *in vitro* a avut ca scop evaluarea profilului citotoxic la
întuneric al noului compus tetrapirolic substituit nesimetric.

31 Alegerea PEG 200 pentru prepararea soluțiilor destinate testelor *in vitro* este
justificată de faptul că acesta se număra printre solvenții frecvent utilizați în formularea
33 farmaceutică a compușilor porfirinici [J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.*,
2003, 2, 214-221] și de solubilitatea foarte bună a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-
35 bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei în acest solvent.

Studiul *in vitro* a fost realizat pe celule tumorale din linia HT-29 (linie umană de
37 adenocarcinom de colon) și pe celule normale din linia fibroblaștilor de șoarece L929.
Celulele au fost menținute în cultură conform indicațiilor furnizorului (American Tissue and
39 Cell Collection, ATCC, SUA), în mediu de cultură DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin
(Biochrom) și soluție de antibiotic/antimicotic (Biochrom). Celulele au fost însămânțate în
41 plăci de cultură cu 96 godeuri, cu 24 h înainte de adăugarea noului compus tetrapirolic pentru a
permite aderarea celulelor la godeu. Celulele tumorale HT-29 au fost însămânțate la 10000
43 celule/godeu, iar fibroblaștii L929 la 5000 celule/godeu.

În culturi de 24 și 48 h, s-au urmărit efectele exercitate *in vitro* de noul compus asupra
45 viabilității/multiplicării celulare și a morții celulelor prin necroză.

Determinarea viabilității și multiplicării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS,
47 utilizând kitul CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega
Corporation). Testul reducerii MTS reprezintă o metodă colorimetrică pentru determinarea
49 numărului de celule metabolice active în cultură în cadrul testelor de proliferare sau

RO 131946 B1

citotoxicitate *in vitro*. Kitul conține un compus de tip sare de tetrazoliu [sare ide 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu] și un compus cuplat electronic (fenazin etosulfat; PES). PES prezintă stabilitate chimică, ceea ce permite combinarea sa cu MTS pentru a forma o soluție stabilă. Compusul MTS este bio-redus de către celule la formazan colorat, care este solubil în medii de cultură uzuale. Această conversie se presupune că are loc în prezența NADPH sau NADH, produse de către dehidrogenazele din celulele metabolic active. Testul se realizează prin adăugarea directă a reactivului kitului la cultura celulară, urmată de incubare 1...3 h (în funcție de tipul celular studiat) și înregistrarea densității optice (DO) la 492 nm, cu ajutorul unui cititor ELISA. DO este direct proporțională cu cantitatea de formazan formată, respectiv cu numărul de celule vii (metabolic active) din cultură. Pentru fiecare probă realizată în triplicat se calculează valoarea medie a DO ± SEM (densitate optică ± eroarea standard a mediei). Din valorile DO corespunzătoare probelor celulare se scade valoarea fondului (obținută în probe aceluare care conțin mediu de cultură, în absența sau prezența substanței de testat sau a solventului).

Determinarea morții celulare s-a realizat prin testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH) utilizând kitul colorimetric CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation). Această tehnică reprezintă o alternativă colorimetrică a metodei de dozare a cromului radioactiv (⁵¹Cr) eliberat din țintele celulare marcate în urma morții și implicit a perturbării masive a integrității membranare. Sistemul măsoară cantitativ enzima lactat dehidrogenază (LDH), cu localizare citosolică stabilă, care este eliberată în urma lizei celulare, în aceeași manieră în care ⁵¹Cr este eliberat în varianta testului radioactiv. LDH eliberat în supernatanul de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 min, care are ca rezultat conversia unei săruri de tetrazoliu la formazan roșu. Cantitatea de formazan format este proporțională cu numărul de celule lizate din cultură.

Pentru fiecare probă realizată în triplicat se calculează valoarea medie a DO ± SEM (densitate optică ± eroarea standard a mediei). Din valorile DO corespunzătoare probelor celulare se scade valoarea fondului (obținută în probe aceluare care conțin mediu de cultură, în absența sau prezența substanței de testat sau a solventului).

În urma evaluării realizate *in vitro*, utilizând atât celule tumorale din linia HT-29 (linie umană de adenocarcinom de colon), cât și celule normale din linia fibroblaștilor de șoarece L929, s-a constatat că noul compus porfirinic nesimetric substituit nu manifestă citotoxicitate semnificativă în condiții de întuneric, ceea ce îl face adecvat pentru dezvoltare ulterioară ca agent fluorescent în scop diagnostic, și ca fotosensibilizator pentru terapia tumorilor solide.

Descrierea desenelor:

- fig. 1 prezintă efectul exercitat *in vitro* de noul compus tetrapirolic (P1.3) și solventul PEG 200 asupra viabilității/multiplicării celulelor tumorale HT-29 din linia de adenocarcinom uman de colon, evaluată prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. *P < 0,05 comparativ cu solventul;
- fig. 2 prezintă efectul exercitat *in vitro* de noul compus tetrapirolic (P1.3) și solventul PEG 200 asupra morții celulelor tumorale HT-29 din linia de adenocarcinom uman de colon, evaluată prin testul eliberării LDH. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. *P < 0,05 comparativ cu celulele netratate;
- fig. 3 prezintă efectul exercitat *in vitro* de noul compus tetrapirolic (P1.3) și solventul PEG 200 asupra viabilității/multiplicării fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929, evaluată prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. *P < 0,05 comparativ cu solventul;
- fig. 4 prezintă efectul exercitat *in vitro* de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) și solventul PEG 200 asupra morții fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929, evaluată prin testul eliberării LDH. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. *P < 0,05 comparativ cu celulele netratate.

RO 131946 B1

1 Inventția este ilustrată prin 6 exemple nelimitative de realizare:

Exemplul 1

3 *Etapa 1*

5 *Sinteza compusului 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirină*

7 Procedeele de obținere a compusului porfirinic decurge printr-o reacție nepoluantă, în
9 absența solventului, într-un interval de timp scurt, cu randament bun și un număr mult mai
11 mic de produși secundari în amestecul final comparativ cu procedeul clasic. Procedeul se
13 bazează pe interacția în rapoarte stoechiometrice dintre 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă,
15 metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru sub acțiunea microundelor
17 generate într-un sintetizator de tip CLATRONIC MWG775 H cu control de putere și
19 temperatură.

13 Procedeele de obținere s-a realizat prin iradierea cu microunde a amestecului de
15 reactanți timp 15 min, respectiv 3 iradieri succesive (650-450-50 W) a câte 5 min fiecare, la
17 o temperatură de 180°C. În vasul de sinteză se aduc: 4,104 g metil 4-formil benzoat
19 (25 mmoli), 3,803 g 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida (25 mmoli), 5-6 g oxid de aluminiu
neutru (Al₂O₃ 90, Merck, 63...200 μm, 70...230 mesh) și 3,45 ml pirol proaspăt distilat
(50 mmoli). Se omogenizează amestecul și se încep seturile de iradiere cu răcirea probelor
la interval de 5 min.

21 Evoluția calitativă a reacțiilor de condensare a fost urmărită prin prelevarea, după
23 fiecare iradiere, a unor probe din amestecul de reactanți, dizolvarea acestora în diclormetan
25 și înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul vizibil. Prezența structurilor tetrapirolice
de tip porfirinic în produsul brut de reacție a fost indicată de prezența în spectrul electronic
a celor 5 benzi de absorbție (banda Soret și cele 4 benzi Q) specifice porfirinelor de tip bază
liberă.

27 Testele prin cromatografie în strat subțire au permis stabilirea unui raport volumetric
optim pentru amestecul diclormetan/eter etilic (50 v/1 v) utilizat la extracția compușilor
porfirinici din produsul brut de reacție și la separarea izomerilor porfirinici rezultați în sinteză.

29 Extracția produsului util din amestecul de reacție s-a realizat prin dizolvare în
31 amestec diclormetan/eter etilic 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.

33 *Etapa 2*

35 *Purificarea 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirinei*

37 Purificarea 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirinei
s-a realizat prin cromatografie pe coloană cu oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90, Merck,
39 63...200 μm, 70...230 mesh) fază staționară și diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v)
eluent. Analiza RMN a compușilor obținuți din fracțiile eluate pe coloană cromatografică a
41 confirmat prezența a 6 izomeri cu structură porfirinică (A₄, A₃B, A₂B₂(cis), A₂B₂(trans), AB₃,
B₄), în amestecul brut de reacție. În compoziția primei fracții eluate, a fost evidențiat
43 compusul porfirinic simetric substituit 5,10,15,20-meso-tetrakis-(4-carboximetilfenil)porfirina,
a doua fracție a evidențiat prezența 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,5,20-tris-(4-carboximetil-
fenil)porfirinei, iar structura 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)
porfirinei a fost identificată în a treia fracție eluată.

45 Randamentul reacției de obținere a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-
carboximetilfenil)porfirinei a fost de 32%.

47 Soluțiile porfirinice colectate au fost concentrate prin distilare simplă, iar produșii
obținuți au fost recristalizați din diclormetan.

RO 131946 B1

Compusul porfirinic obținut se prezintă sub formă de cristale violet, insolubile în apă, solubile în clorură de metilen, alcool etilic, alcool isopropilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

Exemplul 2

Caracterizarea prin spectroscopie vibrațională a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei a permis identificarea și atribuirea principalelor tipuri de vibrații ale legăturilor chimice prezente în grupele funcționale din molecula respectivă. În tabelul 1 sunt prezentate o serie de valori asociate vibrațiilor de valență și vibrațiilor de deformare din molecula 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei.

Tabelul 1

Tipul de vibrație	Numărul de undă al benzii IR (cm ⁻¹)
$\nu_{\text{O-H}}$	3310 (m)
$\nu_{\text{N-H}}$	3414 (s)
$\nu_{\text{C-H}}$	2922 (m)
$\nu_{\text{C-H}}$ din -O-CH ₃	2862 (m)
$\nu_{\text{C=O}}$	1717 (m)
$\nu_{\text{C=N}}$	1606 (i)
$\nu_{\text{C-N}}$	1511 (m)
$\nu_{\text{C-H}}$ pirol	1436 (m)
$\nu_{\text{C-O}}$ din Ph-OH	1261 (i)
$\nu_{\text{C-O}}$ din CH ₃ -COO-	1020 (m)
$\delta_{\text{C-H}}$	867 (s)
$\gamma_{\text{C-N}}$ pirol	798 (m)
$\gamma_{\text{C-H}}$	734 (m)

Exemplul 3

Rezultatele obținute prin analiza RMN a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei, sunt prezentate prin valorile deplasărilor chimice în cazul determinărilor de proton ¹H:

¹H-NMR, δ_{H} (400 MHz, CDCl₃), ppm: -2,79 (s, 2H), 4,01 (s, 6H); 4,11 (s, 6H), 5,34 (s, 2H); 7,26 (s, 2H); 7,30 ppm (d, 2H); 7,71 ppm (d, 2H); 7,98 (d, 4H); 8,20 ppm (d, 4H); 8,30 ppm (d, 4H); 8,44 ppm (d, 4H).

Exemplul 4

Parametrii spectrali (maxime de absorbție, λ_{max}) și valori ale coeficienților molari de extincție (lgε) asociați spectrelor electronice ale 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei, înregistrate în soluții de concentrații $c = 2,5 \times 10^{-6}$ M ale unor solvenți organici cu polarități diferite, sunt prezentate în tabelul 2.

Solvent	λ_{\max} (nm) [lg ϵ] (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)				
	Banda Soret	Qy(i,0)	Qy(o,o)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
CH ₂ Cl ₂	402,8[5,560]	498,4[4,264]	530,0[4,162]	572,2[3,763]	628,4[3,526]
DMSO	405,6[5,548]	499,2[4,527]	536,8[4,433]	573,0[4,218]	629,2[3,980]
EtOH	402,4[5,480]	499,6[4,490]	533,4[4,402]	575,6[4,268]	628,8[3,886]
PEG 200	404,0[5,538]	498,2[4,560]	534,6[4,442]	573,0[4,360]	629,8[3,980]

Exemplul 5

Efectul exercitat in vitro de compusul tetrapirolic substituit asimetric asupra celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon HT-29

Evaluarea viabilității/multiplicării și a morții celulelor din linia umană de adenocarcinom de colon HT-29 s-a realizat în domeniul de concentrații 5, 10 și 20 μ M ale compusului porfirinic, la 24 h și 48 h de tratament în cultură.

Viabilitatea/multiplicarea celulelor tumorale

Datele experimentale din fig. 1b arată că solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic, respectiv polietilen glicolul 200 (PEG 200), tinde să reducă numărul de celule HT-29 metabolic active la timpi lungi de expunere a celulelor (48 h). Este un efect anti-proliferativ benefic în condițiile utilizării compusului pentru terapie anti-tumorală.

Compusul tetrapirolic investigat (P1.3) nu modifică semnificativ reacția de reducere a MTS comparativ cu solventul PEG 200, ceea ce arată că P1.3 nu are efecte citotoxice sau anti-proliferative *in vitro*.

Remarcăm totuși faptul că 10 μ M P1.3 tinde să mărească, la 24 h, numărul de celulele tumorale metabolic active comparativ cu solventul (PEG 200). Totuși, reacția de reducere a MTS se menține în limitele răspunsului celulelor tumorale netratate cu compus sau solvent, ceea ce sugerează ca P1.3 nu induce *in vitro* intensificarea proliferării celulelor tumorale HT-29.

Moartea celulelor tumorale

Solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic (PEG 200) tinde să intensifice, în primele 24 h de tratament *in vitro*, eliberarea de LDH de către celulele tumorale HT-29, comparativ cu celulele nestimulate (fig. 2a).

Efectul nu este statistic semnificativ, dar sugerează existența unor perturbări la nivelul membranei plasmatică induse de PEG 200.

La timpi mai mari de incubare a celulelor tumorale (48 h), PEG 200 determină scăderea eliberării LDH (fig. 2b).

Coroborând rezultatele, cultivarea îndelungată a celulelor tumorale HT-29 cu PEG 200 rezultă în scăderea reacției de reducere a MTS însoțită de scăderea eliberării LDH, ceea ce sugerează că PEG 200 are efect citostatic și nu citotoxic, respectiv inhibă *in vitro* proliferarea celulelor tumorale HT-29, fără însă a le ucide.

Compusul tetrapirolic P1.3 afectează eliberarea LDH în același mod ca solventul PEG 200, ceea ce sugerează că P1.3 nu are acțiune citotoxică asupra celulelor tumorale HT-29.

Comparativ cu solventul, observăm că 10 μ M P1.3 tinde să intensifice, la 24 h, reacția de reducere a MTS (fig. 1a), micșorând în același timp eliberarea LDH (fig. 2a). Aceste rezultate sugerează că P1.3 la concentrația de 10 μ M susține proliferarea celulelor tumorale HT-29, fără însă ca acest efect să se asocieze cu proliferare tumorală mai intensă decât cea în absența oricărui tratament a celulelor tumorale.

Exemplul 6	1
<i>Efectul exercitat in vitro de compusul tetrapirolic substituit asimetric asupra fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929</i>	3
Evaluarea viabilității/multiplicării și a morții fibroblaștilor normali de șoarece din linia L929 s-a realizat în domeniul de concentrații 5, 10 și 20 μM ale compusului porfirinic, la 24 h și 48 h de tratament în cultură.	5
<i>Viabilitatea/multiplicarea celulelor tumorale</i>	7
Solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic (PEG 200) tinde să limiteze reacția de reducere a MTS de către fibroblaștii L929 în cultura de 24 h, rămânând însă în domeniul de reacție a celulelor L929 netratate. Efectul inhibitor nu se mai manifestă la timpi mai îndelungați de expunere (48 h).	9
La concentrațiile de 5 μM , compusul tetrapirolic investigat (P1.3) nu modifică semnificativ reacția de reducere a MTS, comparativ cu solventul (PEG 200), indiferent de timpul de expunere a celulelor (24 sau 48 h) (fig. 3a, b).	11
La concentrații mai mari, determină însă intensificarea reacției de reducere a MTS comparativ cu solventul. Astfel, 20 μM P1.3 intensifică reacția MTS la 24 h, iar 10 μM P1.3 are efect stimulator la 48 h, de cultivare a fibroblaștilor normali L929. Totuși, reacția de reducere a MTS se menține în limitele răspunsului fibroblaștilor L929 netratați cu compus sau solvent, ceea ce sugerează că P1.3 nu induce <i>in vitro</i> intensificare suplimentară a proliferării fibroblaștilor.	13
<i>Moartea celulelor tumorale</i>	15
Solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic (PEG 200) nu efectuează semnificativ eliberarea de LDH de către fibroblaștii L929, comparativ cu celulele nestimulate (fig. 4a, b).	17
Compusul tetrapirolic P1.3 nu afectează eliberarea LDH comparativ cu solventul PEG 200 în culturi de 24 h (fig. 4a).	19
La timpi mai îndelungați de cultivare (48 h), P1.3 tinde să reducă eliberarea LDH la toate concentrațiile testate (fig. 4b), ceea ce sugerează un efect de stabilizare a membranei plasmatică a fibroblaștilor L929 exercitat de compusul P1.3.	21
Fig. 1. Efectul exercitat <i>in vitro</i> de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) și solventul PEG200 asupra viabilității/multiplicării celulelor tumorale HT-29 din linia de adenocarcinom uman de colon, evaluată prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de proba.*P < 0,05 comparativ cu solventul.	23
	25
	27
	29
	31
	33

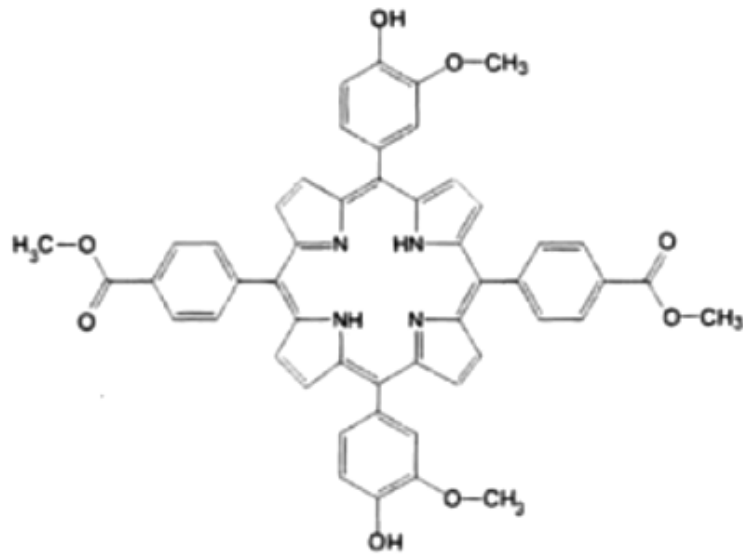
RO 131946 B1

Revendicări

1

1. Compus tetrapirolic cu următoarea structură chimică:

3

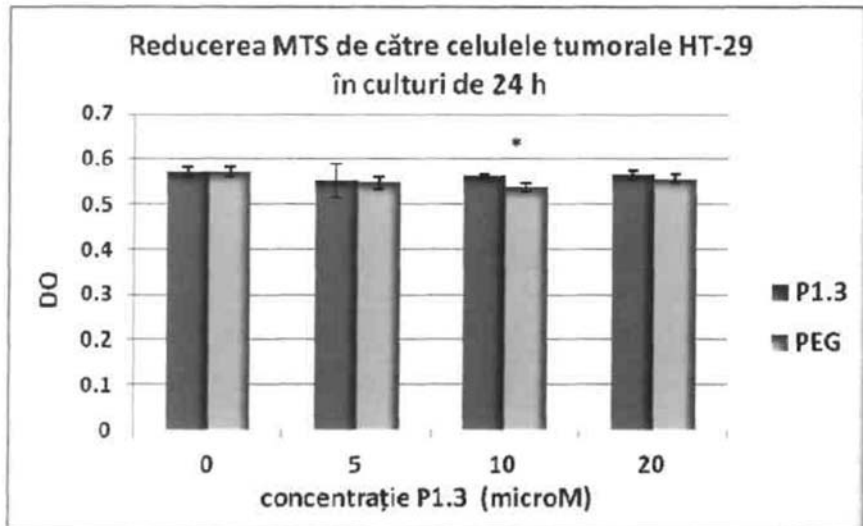


5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirină.

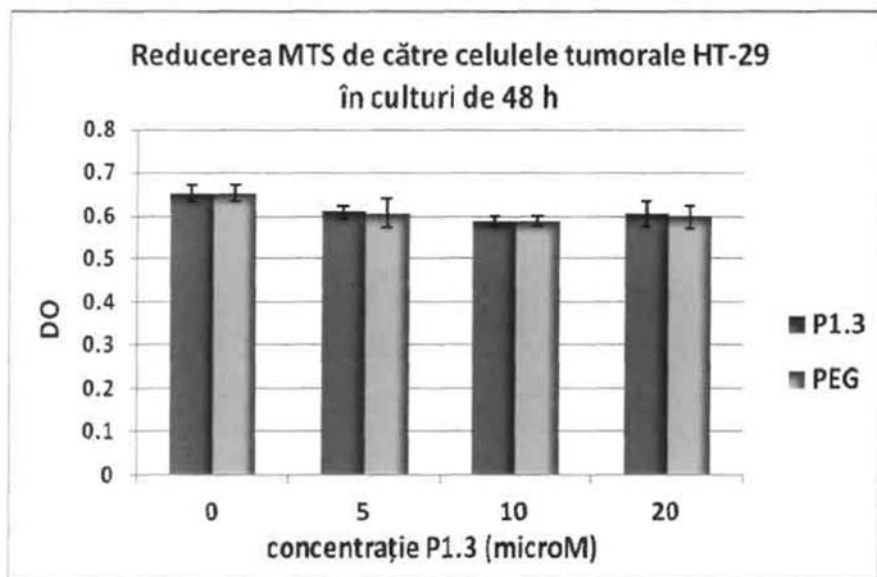
19

2. Compus tetrapirolic conform revendicării 1, pentru utilizare în diagnosticarea într-un singur pas și terapia tumorilor, în abordare teranostică.

21

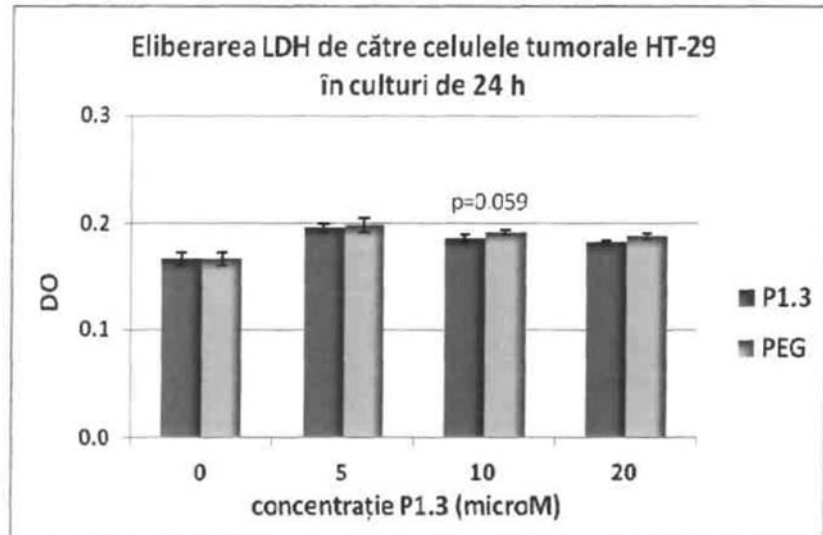


a) tratament de 24 h

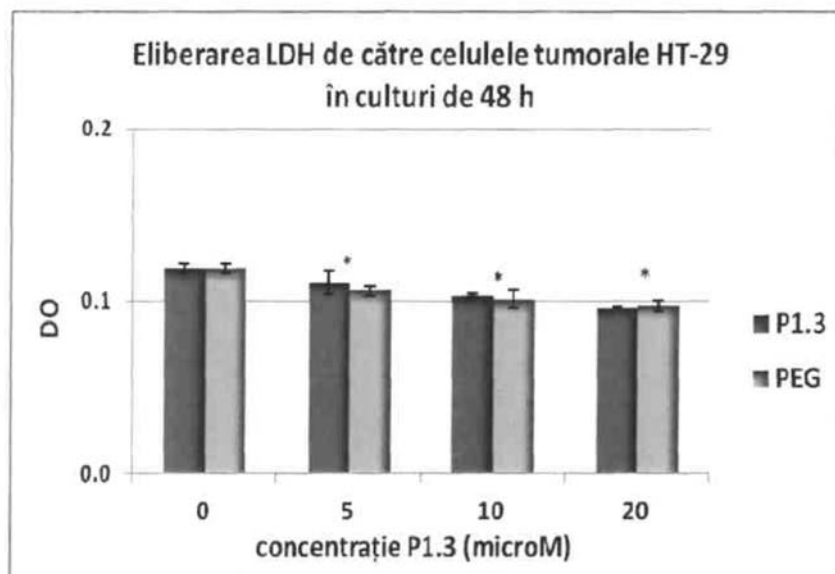


b) tratament de 48 h

Fig. 1

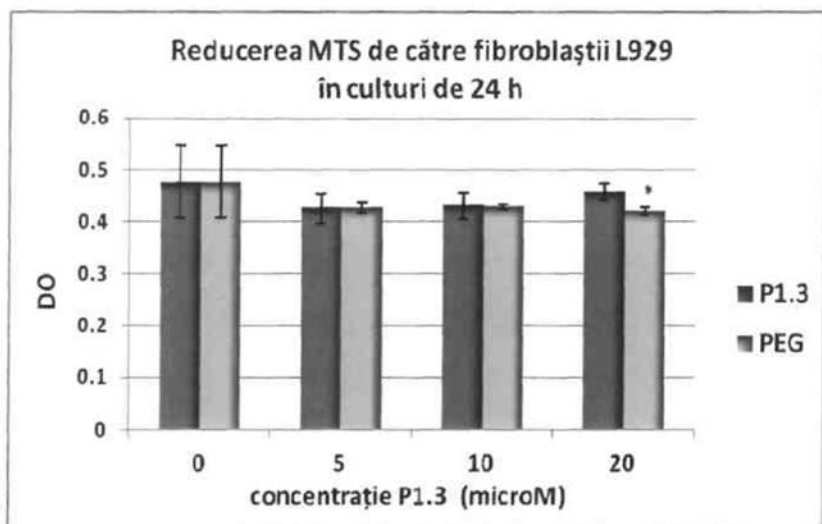


a) tratament de 24 h

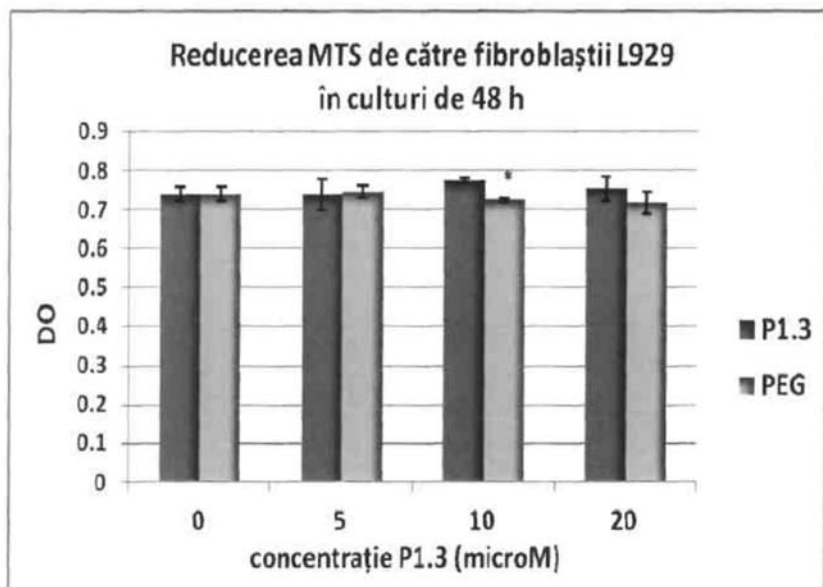


b) tratament de 48 h

Fig. 2

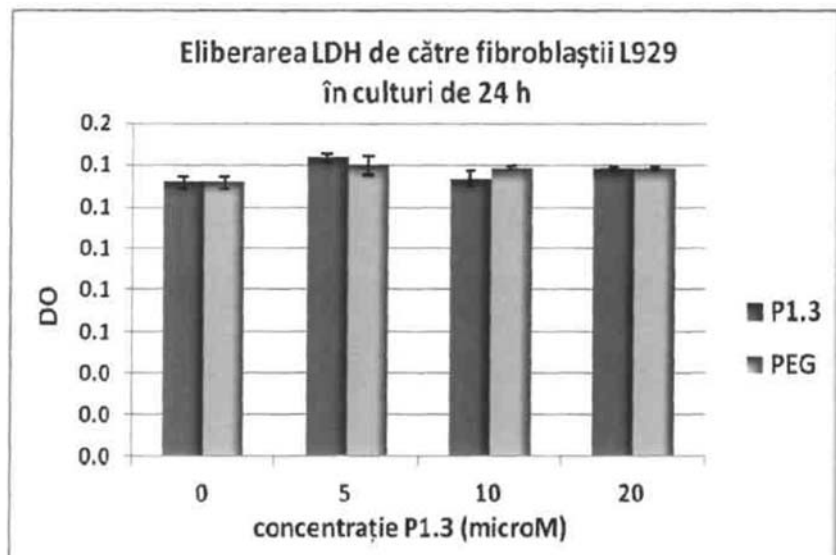


a) tratament de 24 h

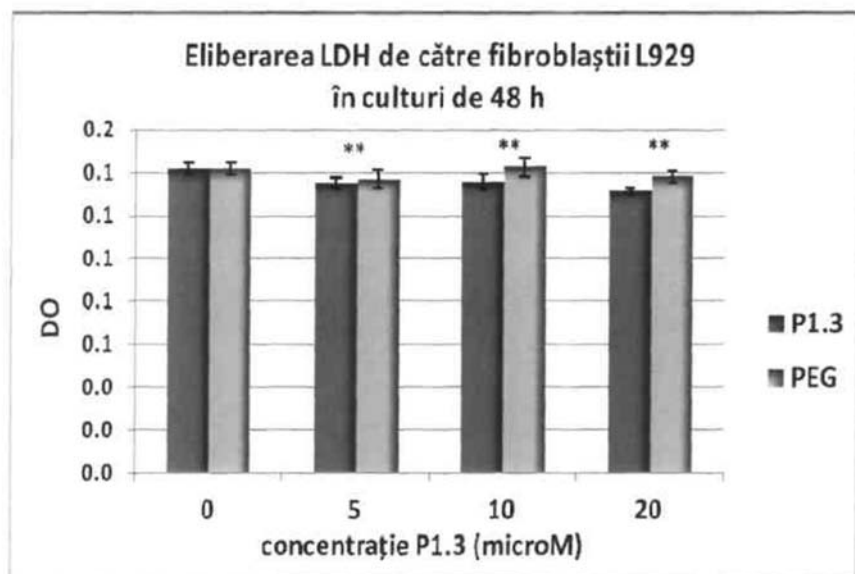


b) tratament de 48 h

Fig. 3



a) tratament de 24 h



b) tratament de 48 h

Fig. 4

