



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00922

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

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

(71) Solicitant:
• 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

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

(57) Rezumat:

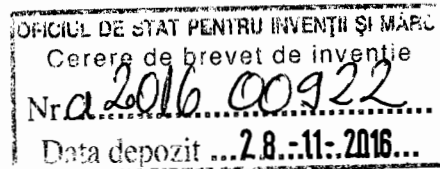
Invenția se referă la un compus tetrapirolic cu aplicații în diagnoza și terapia tumorilor solide, și la un procedeu de obținere a acestuia. Compusul conform invenției este 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil) porfirina, se prezintă sub formă de cristale violet, insolubile în apă, solubile în clorură de metilen, alcool etilic, alcool izopropilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200, și prin proprietățile sale poate realiza simultan diagnoza și terapia tumorilor solide. Procedeu de obținere conform invenției constă în

interacția sub acțiunea microundelor a unui amestec format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă, metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru, dizolvarea produsului rezultat în diclormetan/eter etilic, filtrarea și concentrarea soluției prin distilare, urmată de purificarea compusului tetrapirolic asimetric prin cromatografie.

Revendicări: 4
Figuri: 4



57



Titlul invenției

COMPUS TETRAPIROLIC CU APLICAȚII IN TERANOSTICA SI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA

Descrierea invenției

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

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 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.

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*, 2016, 6, 948–968, J.F. Lovell, P.C. Lo, *Theranostics*, 2012, 2, 9, 815-816, Kausch, M. Sommerauer, F. Montorsi, A. Stenzl, D. Jacquemin, 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].

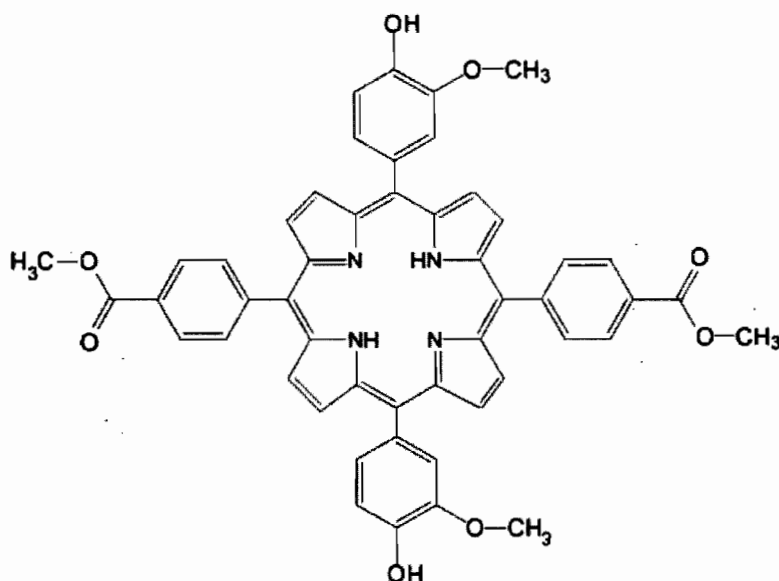
Optimizarea structurală asociată cu stabilirea parametrilor ce descriu tehnica de sinteză și purificare a compuşilor porfirinici, precum și o analiză riguroasă a parametrilor ce definesc profilul spectral și comportarea lor în mediu fiziologic (solubilitate, tendința de agregare moleculară, afinitate pentru țesutul tumoral exprimată dependent de caracterul lipofil/hidrofil, toxicitate), sunt extrem de utile în dezvoltarea de noi instrumente pentru 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 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 genera oxigen singlet, toate acestea definind potențialul de agent teranostic al acestora [D. K. Chatterjee, Z. Yong, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60,

1627–1637, 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].

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 teranostice în medicina personalizată.

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



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

Obținerea compusului definit anterior se realizează printr-un procedeu care se desfășoară în 3 etape:

- 1) interacția sub acțiunea microundelor a unui amestec format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehidă, metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru.
- 2) dizolvarea în amestec diclorometan/eter etilic (50v/1v) a produsului obținut în reacția de condensare, filtrarea soluției obținute și concentrarea acesteia prin distilare simplă.

3) purificarea compusului tetrapirolic asimetric prin cromatografie pe coloana urmata de cromatografie in strat subtire.

Studiile au inclus si testarea preliminara *in vitro* a 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) - 10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei (P1.3), umarindu-se efectul exercitat asupra viabilității si proliferării celulare, în relație cu concentratia si timpul de acțiune. Studiile au fost realizate utilizand linia de celule umane de adenocarcinom de colon HT-29 (linie standard, nr. catalog ATCC HTB-38) si fibroblasti de soarece din linia L929 (linie standard, nr. catalog ATCC CCL-1).

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

- viabilitatea si multiplicarea celulara, evaluate prin testul reducerii sării de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (testul reducerii MTS)
- moartea celulara, evaluata ca integritate a membranei plasmaticice prin testul eliberării extracelulare a lactat dehidrogenazei (testul eliberării LDH);

Avantajele aplicării invenției sunt:

- compusul tetrapirolic cu structura asimetrica poate fi obținut printr-o metoda ecologica, nepoluanta, in absenta solventului ca mediu de reactie si intr-un interval de timp mic.
- reactia de sinteza furnizeaza un produs brut cu un numar de izomeri mult mai mic decat metoda clasica, iar procedeul de purificare aplicat permite separarea eficienta a izomerilor porfirinici respectiv a produsului util.
- stabilirea unui protocol *in vitro* de utilizare a compusul porfirinic nesimetric substituit pentru diagnoza prin fluorescenta sau pentru terapie antitumorală prin fotosensibilizare (biomarker si agent terapeutic).

In urma evaluării realizate *in vitro* utilizand atat celule tumorale din linia HT-29 (linie umana de adenocarcinom de colon), cat si celule normale din linia fibroblastilor de soarece L929, s-a constatat ca noul compus porfirinic nesimetric substituit nu manifesta citotoxicitate semnificativa in conditii de intuneric, ceea ce il face adecvat pentru dezvoltare ulterioara ca agent fluorescent in scop diagnostic, si ca fotosensibilizator pentru terapia tumorilor solide.

Procedeul de sinteza a compusului cu structura asimetrica are la baza interactia amestecului format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, metil 4-formil benzoat si pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru sub actiunea microundelor.

Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform inventiei, in etapa 1) amestecul echimolar format din 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida si metil 4-formil benzoat, se aduce in vasul de sinteza peste suportul de reactie reprezentat de oxidul de aluminiu neutru. Se adauga in cantitate stoechiometrica cu alchidele, pirolul proaspăt distilat. Reactia de condensare se desfasoara la iradierea cu microunde a amestecului de reactanti timp 15 minute, respectiv 3 iradieri succesive (650W – 450W- 350W) a cate 5 minute fiecare. Temperatura de reactie a fost fixata la 180°C iar procedeul de sinteza a inclus racirea la interval de 5 minute a amestecului reactant.

Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform inventiei în etapa 2) produsul de reactie se raceste la temperatura camerei si pentru extractia produsului util se dizolva in amestec diclormetan/eter etilic (50v/1v) iar solutia se filtreaza la presiune normală.

In etapa 3) solutia obtinuta prin filtrare in etapa anterioara a fost concentrata prin distilare simpla, evaporata iar amestecul solid obtinut a fost adus în coloana cromatografică pentru separarea izomerilor porfirinici.

Purificarea compusului util din amestecul de reactie s-a realizat prin cromatografie pe coloana. Drept fază staționară s-a utilizat oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90, Merck, 63-200µm 70-230 mesh) iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v). Pentru obtinerea unui grad de puritate avansat al compusului de interes, faza finala a procedurii de obtinere a inclus purificarea prin cromatografie in strat subtire, utilizand placi PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm si diclormetan/eter etilic ca eluent.

Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, de tip Bruker-Tensor 27, cu ATR Pike prevazut cu cristal de diamant. Compusul a fost uscat 24 de ore la 150°C, iar domeniul spectral abordat a fost cuprins în intervalul 4000-500cm⁻¹. Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) care au confirmat structura compusului 5, 15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10, 20- bis-(4-carboximetilfenil) porfirina s-au înregistrat cu un spectrometru de tip Bruker Avance DRX 400, prevăzut cu un cap de probă multinuclear (de 5 mm) 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.

În evaluarea spectrală a structurilor de tip porfirinic destinate aplicațiilor biomedicale se impune studiul comportamentului acestora raportat la medii cu polarități diferite deoarece calitatea de marker și agent fotosensibilizator se manifestă după localizarea în mediul celular, respectiv după traversarea stratului membranar dublu lipidic. Interacțiile de natură 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 implicit la modificarea potențialului biomedical al acestuia. Din aceste considerente și pentru identificarea unor eventuale fenomene de asociere ce pot apărea între moleculele porfirinice 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, dimetilsulfoxid, etanol, polietilenglicol 200).

Spectrele de absorbție au fost înregistrate în soluții ale compusilor porfirinici de concentrație $c=2.5 \times 10^{-6}$ M cu ajutorul unui spectrometru UV-Vizibil Perkin-Elmer Lambda 35, în domeniul 350-700 nm.

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

Alegerea PEG 200 pentru prepararea soluțiilor destinate testelor *in vitro*, este justificată de faptul că acesta se numără printre solvenții frecvent utilizați în formularea farmaceutică a compusilor 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-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirinei în acest solvent.

Studiul *in vitro* a fost realizat pe celule tumorale din linia HT-29 (linie umană de adenocarcinom de colon) și pe celule normale din linia fibroblastilor de soarece L929. Celulele au fost menținute în cultură conform indicațiilor furnizorului (American Tissue and 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 plăci de cultură cu 96 godeuri, cu 24 h înainte de aditarea noului compus tetrapirolic pentru a permite aderența celulelor la godeu. Celulele tumorale HT-29 au fost însămânțate la 10.000 celule / godeu, iar fibroblastii L929 la 5.000 celule / godeu.

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

Determinarea viabilității și multiplicării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS utilizând kitul *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega Corporation). Testul reducerii MTS reprezintă o metodă colorimetrică pentru determinarea numărului de celule metabolic active în cultura în cadrul testelor de proliferare sau citotoxicitate in vitro. Kitul conține un compus de tip sare de tetrazoliu [sare de 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 de 1-3 ore (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 $DO \pm SEM$ (densitate optică \pm 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 (^{51}Cr) eliberat din țintele celulare marcate în urma morții și implicit a perturbarii 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 ^{51}Cr este eliberat în varianta testului radioactiv. LDH eliberat în supernatanul de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică de 30 minute, 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 \pm SEM (densitate optică \pm 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).

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 \pm 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 \pm 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 fibroblastilor normali de soarece din linia L929, evaluată prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm 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 fibroblastilor normali de soarece din linia L929, evaluată prin testul eliberării LDH. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de probă. ** $P < 0.05$ comparativ cu celulele netratate.

Invenția este ilustrată prin 6 exemple nelimitative de realizare

EXEMPLUL 1

Etapa 1

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

Procedeul de obținere a compusului porfirinic decurge printr-o reacție nepoluantă, în absența solventului, într-un interval de timp scurt, cu randament bun și un număr mult mai mic de produși secundari în amestecul final comparativ cu procedeul clasic. Procedeul se bazează pe interacția în rapoarte stoechiometrice dintre 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida, metil 4-formil benzoat și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru

sub actiunea microundelor generate intr-un sintetizator de tip CLATRONIC MWG775 H cu control de putere si temperatura.

Procedeeul de obtinere s-a realizat prin iradiere cu microunde a amestecului de reactanti timp 15 minute, respectiv 3 iradieri succesive (650W-450W- 50W) a cate 5 minute fiecare, la o temperatura de 180°C. In vasul de sinteza se aduc: 4,104g metil 4-formil benzoat (25mmoli), 3,803g 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida (25mmoli), 5-6 g oxid de aluminiu neutru (Al_2O_3 90, Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh) si 3,45 mL pirol proaspăt distilat (50mmoli). Se omogenizează amestecul si se incep seturile de iradiere cu racirea probelor la interval de 5 minute.

Evolutia calitativa a reactiilor de condensare a fost urmarita prin prelevarea, dupa fiecare iradiere, a unor probe din amestecul de reactanti, dizolvarea acestora in diclormetan si înregistrarea spectrelor de absorbtie în domeniul vizibil. Prezenta structurilor tetrapirolice de tip porfirinic in produsul brut de reactie a fost indicata de prezenta in spectrul electronic a celor 5 benzi de absorbtie (banda Soret si cele 4 benzi Q) specifice porfirinelor de tip baza libera.

Testele prin cromatografie in strat subtire au permis stabilirea unui raport volumetric optim pentru amestecul diclormetan/eter etilic (50v/1v) utilizat la extractia compusilor porfirinici din produsul brut de reactie si la separarea izomerilor porfirinici rezultati in sinteza.

Extractia produsului util din amestecul de reactie s-a realizat prin dizolvare in amestec diclormetan/eter etilic și filtrare la presiune normală. Filtratul a fost concentrat prin distilare simpla apoi evaporat. S-a obtinut o masa solida, cristalina care a fost ulterior purificata.

Etapa 2

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

Purificarea 5,15-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-bis-(4-carboximetilfenil)porfirinei, s-a realizat prin cromatografie pe coloana cu oxid de aluminiu neutru (Al_2O_3 90, Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh) fază staționară si diclormetan/eter etilic în raport 50/1 (v/v) eluent. Analiza RMN a compuşilor obtinuti din fracţiile eluate pe colana cromatografică a confirmat prezenta a 6 izomeri cu structura porfirinica (A_4 , A_3B , $A_2B_2(cis)$, $A_2B_2(trans)$, AB_3 , B_4), in amestecul brut de reactie. In compozitia primei fractii eluate a fost evidentiat

compusul porfirinic simetric substituit 5,10,15,20-*meso*-tetrakis-(4-carboximetilfenil) porfirina, a doua fractie a evidentiat prezenta 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirinei iar structura 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirinei a fost identificata in a treia fractie eluata.

Randamentul reactiei de obtinere a 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirinei a fost de 32%.

Solutiile porfirinice colectate au fost concentrate prin distilare simpla iar produsii obtinuti au fost recristalizati din diclormetan.

Compusul porfirinic obtinut se prezinta sub forma de cristale violet, insolubile in apa, solubile in clorura de metilen, alcool etilic, alcool isopropilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

EXEMPLUL 2

Caracterizarea prin spectroscopie vibrationala a 5, 15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil)porfirinei a permis identificarea si atribuirea principalelor tipuri de vibratii ale legaturilor chimice prezente in grupele functionale din molecula respectiva. In tabelul 1 sunt prezentate o serie de valori asociate vibratiilor de valenta si vibratiilor de deformare din molecula 5,15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,20-*bis*-(4-carboximetilfenil) porfirinei.

Tabelul 1

Tipul de vibratie	Numărul de undă al benzii IR (cm ⁻¹)
ν_{O-H}	3310 (m)
ν_{N-H}	3414 (s)
ν_{C-H}	2922 (m)
ν_{C-H} din <i>O-CH3</i>	2862 (m)
$\nu_{C=O}$	1717 (m)
$\nu_{C=N}$	1606 (i)
ν_{C-N}	1511 (m)
ν_{C-H} <i>pyrrole</i>	1436 (m)
ν_{C-O} din <i>Ph-OH</i>	1261 (i)
ν_{C-O} din <i>CH3-COO-</i>	1020 (m)
δ_{C-H}	867 (s)
γ_{C-N} <i>pyrrole</i>	798 (m)
γ_{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 :

$^1\text{H-NMR}$, δ_{H} (400 MHz, CDCl_3), 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 ($\text{lg}\epsilon$) asociați spectrelor electronice ale 5, 15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10, 20-*bis*-(4-carboximetilfenil) porfirinei, înregistrate în soluții de concentrații $c=2,5 \times 10^{-6}\text{M}$ ale unor solvenți organici cu polarități diferite, sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Solvent	λ_{max} (nm)		[lg ϵ] (L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$)		
	Banda Soret	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
CH_2Cl_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 μM ale compusului porfirinic, la 24 h și 48 h de tratament în cultură.

- *viabilitatea/multiplicarea celulelor tumorale*

Datele experimentale din Figura 1b arată că solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic, respectiv polietilen glicolul 200 (PEG 200), tinde să reducă

numarul de celule HT-29 metabolic active la timpi lungi de expunere a celulelor (48 h). Este un efect anti-proliferativ benefic in conditiile utilizarii compusului pentru terapie anti-tumorală.

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

Remarcam totusi faptul ca 10 μ M P1.3 tinde sa mareasca la 24 h numarul de celulele tumorale metabolic active comparativ cu solventul (PEG 200). Totusi, reactia de reducere a MTS se mentine in limitele raspunsului celulelor tumorale netratate cu compus sau solvent, ceea ce sugereaza ca P1.3 nu induce *in vitro* intensificarea proliferarii celulelor tumorale HT-29.

- *moartea celulelor tumorale*

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

Efectul nu este statistic semnificativ; dar sugereaza existenta unor perturbari la nivelul membranei plasmatică induse de PEG 200.

La timpi mai mari de incubare a celulelor tumorale (48h), PEG 200 determina scaderea eliberării LDH (Figura 2b).

Coroborand rezultatele, cultivarea indelungata a celulelor tumorale HT-29 cu PEG 200 rezulta in scaderea reactiei de reducere a MTS insotita de scaderea eliberării LDH, ceea ce sugereaza ca PEG 200 are efect citostatic si nu citotoxic, respectiv inhiba *in vitro* proliferarea celulelor tumorale HT-29 fara inasa a le ucide.

Compusul tetrapirolic P1.3 afecteaza eliberarea LDH in acelasi mod ca si solventul PEG 200, ceea ce sugereaza ca P1.3 nu are actiune citotoxica asupra celulelor tumorale HT-29.

Comparativ cu solventul, observam ca 10 μ M P1.3 tinde sa intensifice la 24 h reactia de reducere a MTS (Figura 1a), microrand in acelasi timp eliberarea LDH (Figura 2a). Aceste rezultate sugereaza ca P1.3 la concentratia de 10 μ M sustine proliferarea celulelor tumorale HT-29, fara inasa ca acest efect sa se asocieze cu proliferare tumorală mai intensa decat cea in absenta oricarui tratament a celulelor tumorale.

EXEMPLUL 6

Efectul exercitat in vitro de compusul tetrapirolic substituit asimetric asupra normali de soarece din linia L929

Evaluarea viabilității/multiplicării și a morții fibroblastilor normali de soarece 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 cultura.

- *viabilitatea/multiplicarea celulelor tumorale*

Solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic (PEG 200) tinde să limiteze reacția de reducere a MTS de către fibroblastii L929 în cultura de 24 h. Rămânând însă în domeniul de reacție a celulelor L929 netratate. Efectul inhibitor nu se mai manifestă la timpuri mai îndelungate de expunere (48 h).

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) (Figura 3a,b).

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 fibroblastilor normali L929. Totuși, reacția de reducere a MTS se menține în limitele răspunsului fibroblastilor L929 netratați cu compus sau solvent, ceea ce sugerează că P1.3 nu induce in vitro intensificare suplimentară a proliferării fibroblastilor.

- *moartea celulelor tumorale*

Solventul utilizat pentru dizolvarea compusului tetrapirolic (PEG 200) nu efectuează semnificativ eliberarea de LDH de către fibroblastii L929, comparativ cu celulele nestimulate (Figura 4a,b).

Compusul tetrapirolic P1.3 nu afectează eliberarea LDH comparativ cu solventul PEG 200 în culturi de 24 h (Figura 4a).

La timpuri mai îndelungate de cultivare (48 h) P1.3 tinde să reducă eliberarea LDH la toate concentrațiile testate (Figura 4b), ceea ce sugerează un efect de stabilizare a membranei plasmatică a fibroblastilor L929 exercitat de compusul P1.3.

Figura 1. Efectul exercitat in vitro de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) si solventul PEG200 asupra viabilitatii/multiplicarii celulelor tumorale HT-29 din linia de adenocarcinom uman de colon, evaluata prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. * $P < 0.05$ comparativ cu solventul.

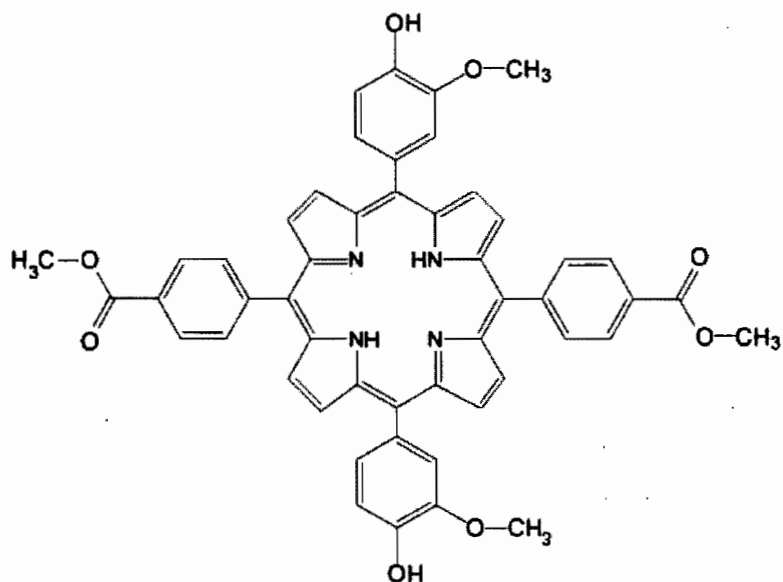
Figura 2. Efectul exercitat in vitro de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) si solventul PEG200 asupra mortii celulelor tumorale HT-29 din linia de adenocarcinom uman de colon, evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. * $P < 0.05$ comparativ cu celulele netratate.

Figura 3. Efectul exercitat in vitro de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) si solventul PEG200 asupra viabilitatii/multiplicarii fibroblastilor normali de soarece din linia L929, evaluata prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. * $P < 0.05$ comparativ cu solventul

Figura 4. Efectul exercitat in vitro de noul compus tetrapirolic substituit nesimetric (P1.3) si solventul PEG200 asupra mortii fibroblastilor normali de soarece din linia L929, evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard a mediei pentru triplicate de proba. ** $P < 0.05$ comparativ cu celulele netratate.

REVEDICĂRI

1. Compusul tetrapirolic cu următoarea structură chimică

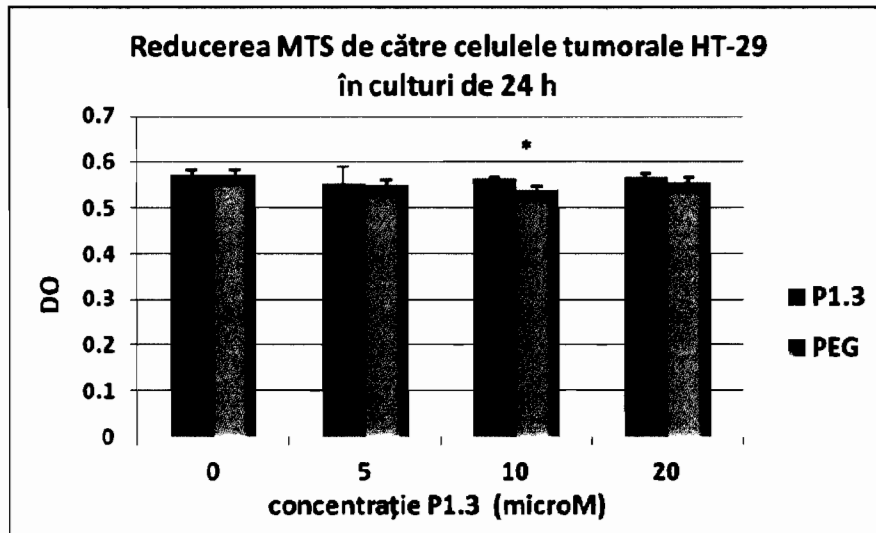


5, 15-*bis*-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10, 20-*bis*-(4-carboximetilfenil) porfirina

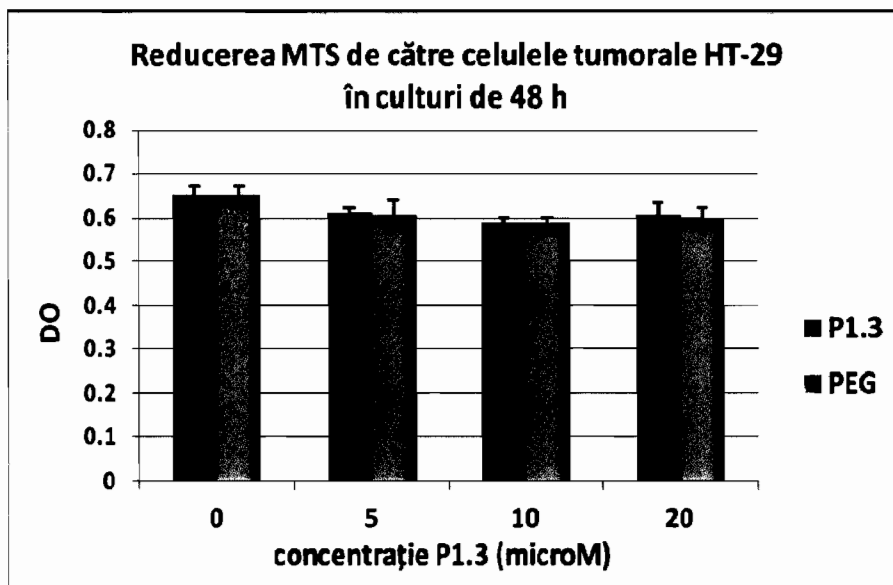
2. Procedul de obținere pentru compusul tetrapirolic definit ca în revendicarea 1

3. Compusul tetrapirolic nesimetric substituit nu manifesta citotoxicitate asupra celulelor tumorale de adenocarcinom uman de colon HT-29 și asupra fibroblastilor normali din linia L929.

4. Compusul tetrapirolic definit ca în revendicarea 1, prin proprietatile sale poate fi utilizat pentru realizarea într-un singur pas a diagnosticului și terapiei tumorilor (abordare teranostică).

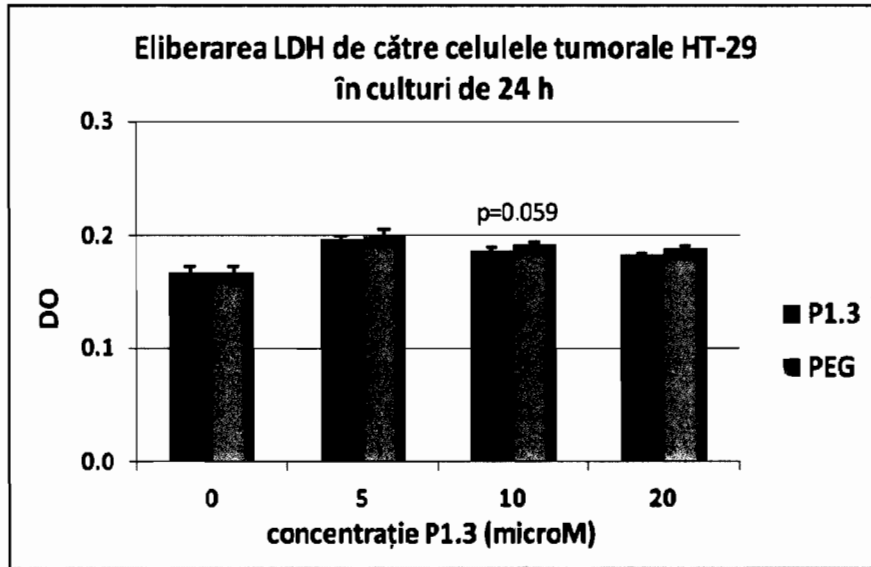


a) tratament de 24 h

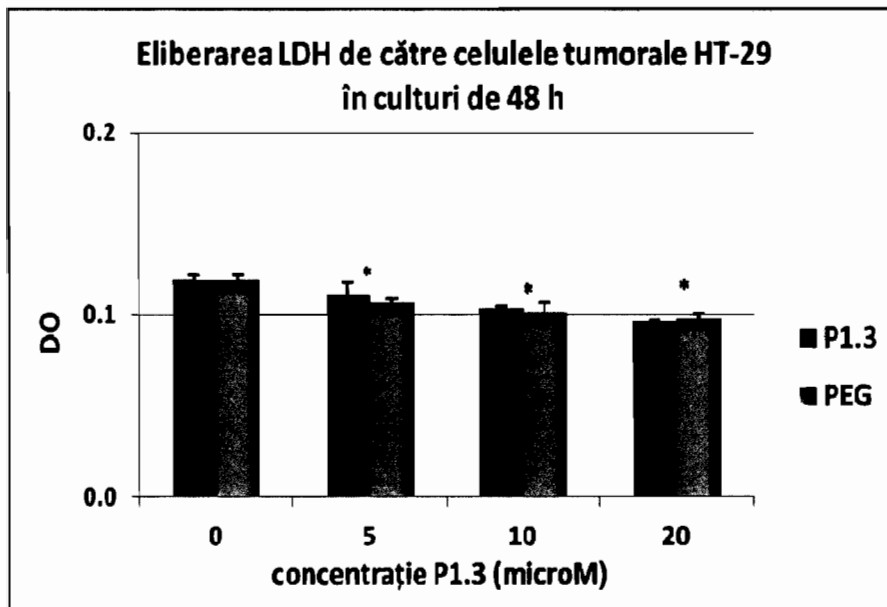


b) tratament de 48 h

Figura 1

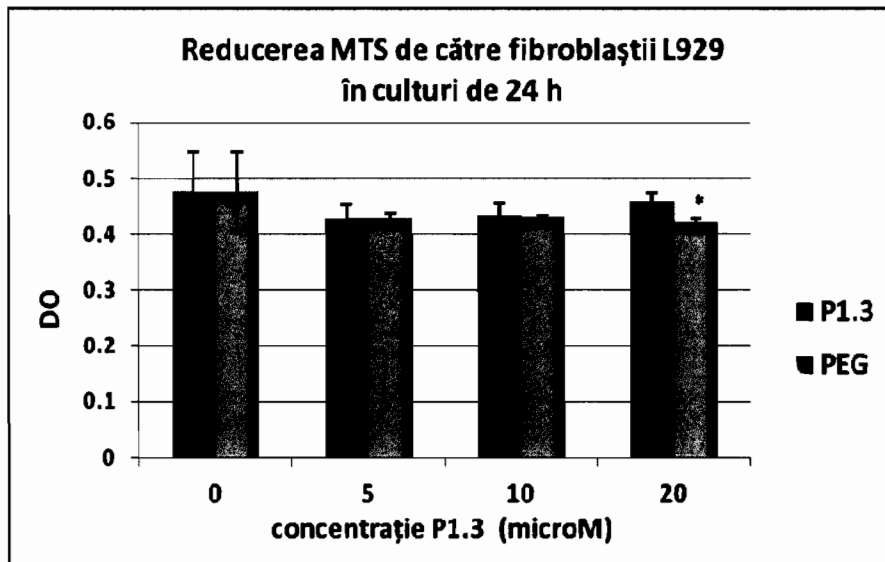


a) tratament de 24 h

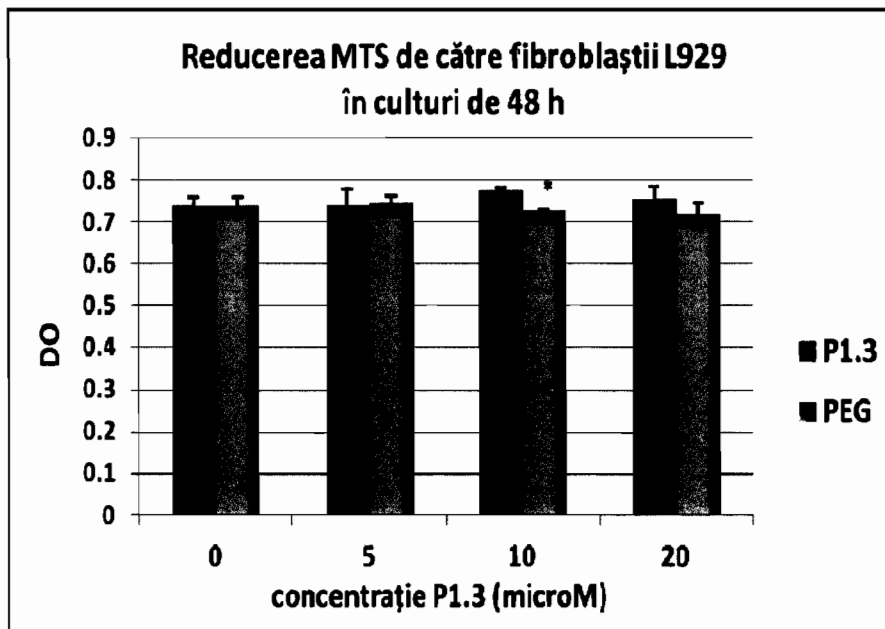


b) tratament de 48 h

Figura 2

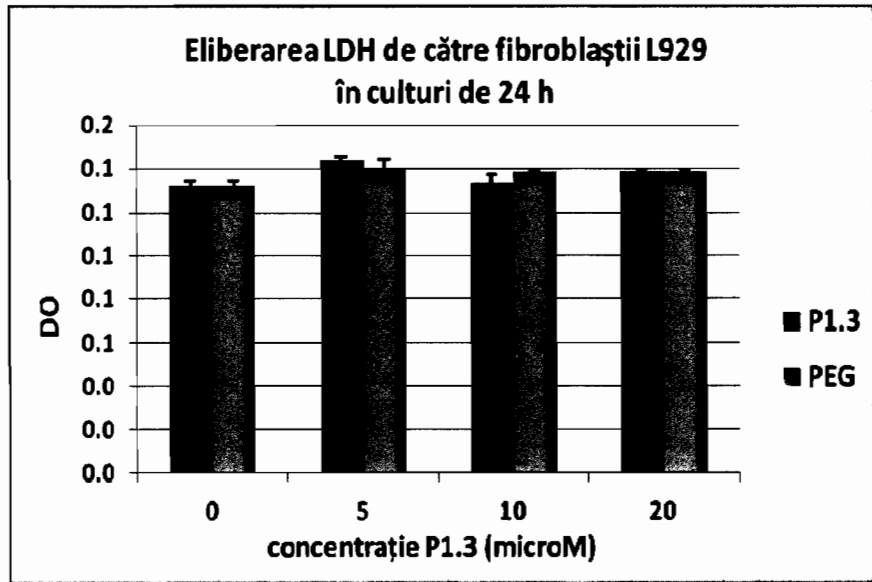


a) tratament de 24 h

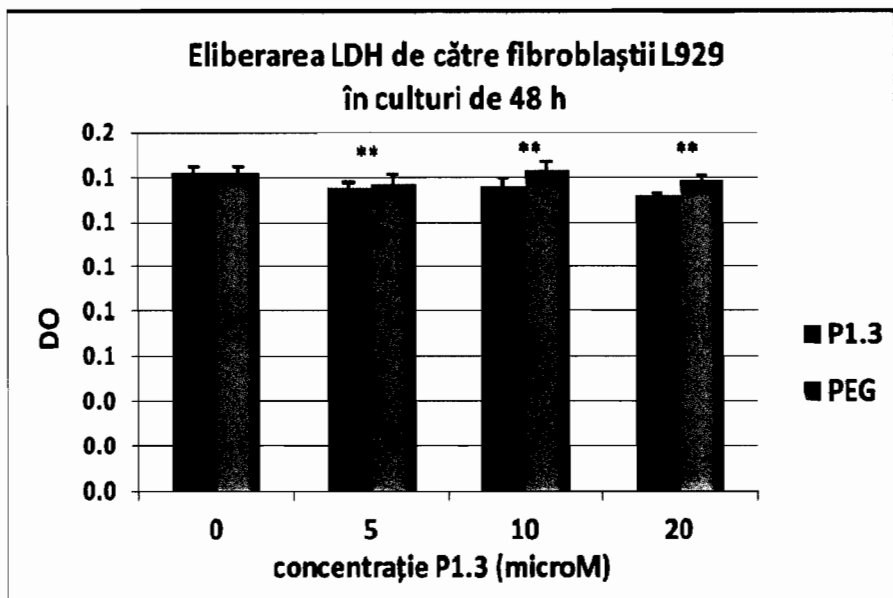


b) tratament de 48 h

Figura 3



a) tratament de 24 h



b) tratament de 48 h

Figura 4