



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 01030

(22) Data de depozit: 05/12/2017

(41) Data publicării cererii:
30/08/2018 BOPI nr. 8/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA", STR. DIONISIE LUPU NR. 36, 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;
• INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU", SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• BIOTEHNS S.A., STR. GORUNULUI NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO

(72) Inventatori:
• BOSCEANU RICA, STR. VLĂDEASA NR. 1, BL. C 67, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MANDA GINA, STR.EUGEN IOSIF NR.9, 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;
• NEAGOE IONELA VICTORIA, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35, SC. A, AP. 47, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22, ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• DUMITRIU BRANDUȘA, STR. DORNEI, NR.5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) DERIVAT PORFIRINIC PENTRU UTILIZARE ÎN TERANOSTICĂ

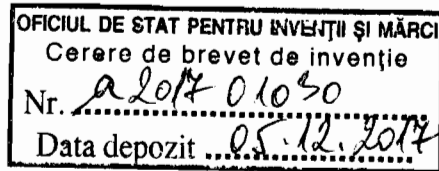
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus din clasa meso-tetrafenil porfirinelor, utilizat ca marker și fotosensibilizator în diagnoza și tratamentul antitumoral, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Compusul conform invenției este 5-(2, 4-dihidroxifenil)-10, 15, 20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina. Procedeu conform invenției constă în reacția dintre 2,4-dihidroxibenzaldehidă, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehidă și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru și sub

acțiunea microundelor, dizolvarea produsului brut într-un amestec de clorură de metilen/eter etilic într-un raport de 30:1 v/v, filtrare și concentrare prin distilarea simplă a soluției rezultate, urmată de purificare prin metode cromatografice.

Revendicări: 3
Figuri: 8





66

Titlul invenției

DERIVAT PORFIRINIC PENTRU UTILIZARE IN TERANOSTICA

Descrierea invenției

Invenția se referă la un compus din clasa *meso*-tetrafenil porfirinelor cu distribuție asimetrică a substituenților periferici macrociclului porfirinic, compus destinat unei abordări teranostice în cancer.

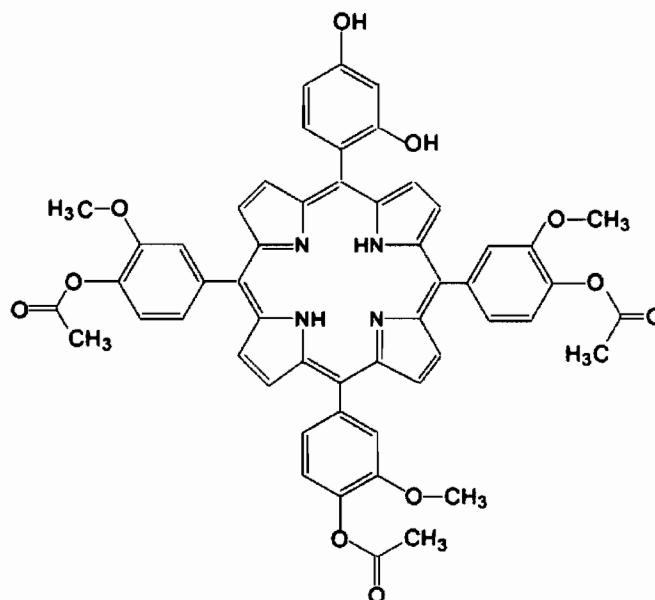
Invenția se referă la obținerea, caracterizarea spectrală și evaluarea *in vitro* la nivel celular a unui derivat porfirinic cu potențial de marker și fotosensibilizator.

În prezent, statisticile privind mortalitatea asociată cancerului din întreaga lume precum și implicațiile financiare în domeniul terapiei antitumorale sunt alarmante și de aceea cercetările interdisciplinare privind obținerea unor forme farmaceutice care să asigure identificarea și terapia formațiunilor de natură tumorală într-un singur pas se constituie ca tematici prioritare ale obiectivelor ce vizează îmbunătățirea stării de sănătate a populației [M. Chowdhury Roy, C. Schumannb, D. Bhakta-Guhac, G. Guhac, *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 2016, 84, 291–304, R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *CA Cancer J. Clin.*, 2016, 66, 7–30, D. Bhakta-Guha, M. E. M. Saeed, H.J. Greten, T. Efferth, *Curr. Med. Chem.*, 2015, 22, 685–694, M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio, T. Rosso, P. Boffetta, F. Levi, C.L. Vecchia, E. Negri, *Ann. Oncol.*, 2016, 27, 725–731]. Profilul structural și spectral al unui agent teranostic trebuie să definească o moleculă simplă, stabilă în condiții fiziologice, cu potențial mare de localizare la nivel celular, fără efecte secundare toxice semnificative, care prezintă fluorescență în domeniul spectral 550-800nm și capacitate de a genera oxigen singlet [R. Kojima, D. Aibel, M. Fussenegger, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2015, 28, 29–38, 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].

Compușii din clasa *meso*-porfirinelor tetrafenil substituie se încadrează în structurile macrociclice cu potențial de substanță activă pentru o abordare 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].

Problema tehnică constă în obținerea cu randamente bune și costuri reduse a unor structuri porfirinice noi, cu proprietăți structurale și spectrale care le recomandă pentru aplicații în diagnostic și tratamentul antitumoral.

Invenția are ca obiect furnizarea procedurii de sinteză a unui derivat din clasa meso-porfirinelor tetrafenil asimetric substituie, compus destinat pentru teranostică în tumori solide.



5-(2,4-dihydroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina

Metoda de obținere a compusului definit anterior include următoarele etape:

- 1) reacția dintre 2,4-dihidroxibenzaldehida, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehida și pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru și sub acțiunea microundelor
- 2) dizolvarea produsului brut într-un amestec clorura de metilen/eter etilic (30v/1v), filtrare și concentrare prin distilare simplă a soluției obținute
- 3) purificarea compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina (P4.2), prin metode cromatografice

Evaluarea *in vitro* a 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei (P4.2), a urmărit capacitatea de localizare la nivel celular, biocompatibilitatea și potențialul compusului de a ucide celulele atunci când este activat cu lumina de lungime de undă specifică (terapie fotodinamică *in vitro*).

Studiile s-au realizat utilizand fibroblaste dermice umane normale (linia celulara HS27 - ATCC® CRL-1634™), Keratinocite umane normale (linia celulara HaCaT–Thermo Fisher Scientific), Monocite/macrofage umane din sange periferic (linia celulara SC-ATCC® CRL-9855™) si celule tumorale umane de adenocarcinom de colon (linia celulara HT-29 - ATCC® HTB-38™)

Avantajele aplicării invenției sunt:

- derivatul porfirinic cu structura amfifila se obține cu randament bun printr-un procedeu ce implica costuri mici,
- tehnica abordata in sinteza este una ecologica, cu impact redus asupra mediului,
- procedeu ales pentru purificarea compusului de interes permite o separare eficienta a derivatului porfirinic cu structura amfifila,
- stabilirea unui protocol *in vitro* de utilizare a derivatului porfirinic in teranostica

Studiul biologic *in vitro* a aratat ca diverse tipuri de celule umane normale si tumorale incorporeaza derivatul porfirinic intr-o maniera dependenta de concentratia acestuia. Compusul porfirinic este biocompatibil, cu limite legate de concentratie (10 sau 20μM) in ce priveste interactia cu celulele monocitare si keratinocitele dermice.

Prin activare cu lumina laser de 635 nm, derivatul porfirinic manifesta proprietati de fotosensibilizator.

Sinteza compusului porfirinic se realizeaza prin iradierea cu microunde a unui amestec format din 2,4-dihidroxibenzaldehida, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehida si pirol pe suport de oxid de aluminiu neutru.

Conform unei variante preferate de realizare a procedurii conform invenției, in etapa 1) 2,4-dihidroxibenzaldehida, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehida si pirolul se aduc peste oxidul de aluminiu neutru in vasul de reactie. Amestecul de reactanti este supus timp de 9 minute la iradieri succesive (680W – 500W- 350W).

Într-o altă variantă preferată de realizare a procedurii conform invenției, etapa 2) include dizolvarea produsului brut in amestec de diclormetan/eter etilic (30v/1v), filtrare si concentrare prin distilare simpla a solutiei obtinute si in etapa 3) se realizeaza purificarea compusului porfirinic prin metode cromatografice.

Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat intr-o prima etapa prin cromatografie pe coloana, utilizand ca fază staționară oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃)

90, Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh) iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport 30/1 (v/v). Purificarea finala a compusului de interes s-a realizat prin cromatografie în strat subtire, utilizând placi PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm și diclormetan/eter etilic ca eluent.

Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, de tip Bruker-Tensor 27, cu ATR Pike prevăzut cu cristal de diamant. Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) s-au înregistrat cu un spectrometru de tip Bruker Avance DRX 400, la frecvența de 400 MHz, utilizând drept referință semnalul tetrametilsilanului (TMS). Solventul utilizat a fost cloformul deuterat.

Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrometru UV-Vizibil Specord 200, pentru soluții ale compusului porfirinic ($c=2.5 \times 10^{-6}$ M) în solventii: polietilenglicol 200, diclormetan, dimetilsulfoxid, alcool etilic.

Prepararea soluțiilor destinate studiului biologic *in vitro* s-a realizat prin dizolvarea derivatului porfirinic într-un solvent frecvent utilizat în formularea farmaceutică, respectiv în PEG 200 [J.M. Harris, R.B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, 214–221], pentru o concentrație inițială în derivat porfirinic de 10mM.

Bazat pe proprietățile fluorescente ale derivatului porfirinic, evaluarea capacității de localizare la nivel celular a acestuia, a fost realizată prin citometrie în flux.

Celulele, atât cele aderente cât și cele neaderente, au fost cultivate și tratate cu derivat porfirinic în intervalul de concentrații 2.5–10 μ M, timp de 24 h în cazul celulelor monocitare SC relevante pentru celulele din sânge, sau timp de 48 h în cazul fibroblastelor dermice HS27 și a keratinocitelor HaCaT care sunt relevante pentru interacția compusului cu celulele din țesuturi. La finalul acestei perioade, celulele au fost spălate de două ori cu tampon fosfat salin (TFS, Gibco) pentru îndepărtarea compusului neincorporat, după care celulele au fost procesate pentru evaluare biologică.

După încărcare, celulele aderente au fost tripsinizate cu 0.25%/0.02% Trypsin/EDTA (Biochrom). Celulele detașate și celulele neaderente au fost spălate de două ori cu TFS (Gibco) rece și au fost resuspendate în Live cell imaging solution (Thermo Fisher Scientific). Citirea probelor s-a realizat imediat la citometrul în flux (BD FACSCalibur sau BD FACS Canto de la Becton Dickinson), utilizând pentru excitație un laser de 488 nm, iar emisia a fost înregistrată în canalul de fluorescență FL3 (roșu). Datele au fost

achizitionate si prelucrate la citometrul in flux cu ajutorul programului CellQuest sau DIVA (BD Biosciences). Datele au fost exprimate ca intensitate medie de fluorescenta exprimata in unitati de fluorescenta arbitrare.

Testul reducerii MTS a fost utilizat pentru evaluarea numarului de celule metabolic active in cultura. Pentru aceasta s-a utilizat kitul CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay de la Promega Corporation si s-a aplicat metodologia recomandata de producator (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>).

Celulele au fost cultivate in placi de cultura cu 96 godeuri, in 100 µL mediu de cultura, in absenta sau prezenta derivatului porfirinic sau a solventului PEG 200. Celulele aderente au fost pre-cultivate 24h pentru a permite celulelor sa adere la godeu. Celulele neaderente investigate au fost direct cultivate in prezenta compusului porfirinic sau a solventului PEG200. Dupa incheierea timpului de incubare/tratament cu porfirina a celulelor, respectiv 24h in cazul monocitelor SC si 48h in cazul fibroblastelor HS27 si a keratinocitelor HaCaT, in fiecare proba s-au adaugat 20µL din reactivul kitului. Celulele au fost incubate inca 2-3h (depinzand de tipul celule si de metabolismul redox al acestora) la 37°C, in atmosfera de 5% CO₂, pentru a permite dezvoltarea reactiei de reducere a MTS de catre celulele metabolic active. La sfarsitul perioadei de incubare, la un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevazut cu program de analiza a datelor, s-a masurat densitatea optica (DO) a probelor si controalelor la lungimea de unda 490nm fata de referinta de 620nm. DO a fost corectata in probele celulare prin scaderea DO a probelor acelulare (solutie derivat porfirinic in mediu de cultura, sau mediu de cultura).

Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de proba.

Testul eliberarii lactat dehidrogenazei (LDH) a fost utilizat pentru evaluarea integritatii membranare si implicit a potentialului citotoxic al derivatului porfirinic; s-a utilizat kitul colorimetric *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega Corporation) si metodologia producatorului (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/>).

Probele au fost realizate similar cu cele de la testul reducerii MTS. La sfarsitul experimentului, placile de cultura au fost centrifugate la 120rpm, 5min pentru

clarificarea supernatantului de cultura in vederea recoltarii a 50 μ L din acesta. Peste cei 50 μ L de supernatant s-au adaugat 50 μ L din reactivul de detectie a kitului. Probele au fost incubate 30 min la temperatura camerei si la intuneric pentru a permite dezvoltarea reactiei LDH. Reactia LDH a fost stopata la final cu reactivul de blocare a reactiei din kitul mai sus mentionat. La un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevazut cu program de analiza a datelor, s-a masurat densitatea optica (DO) a probelor si controalelor la lungimea de unda 490nm fata de referinta de 620nm. DO a fost corectata in probele celulare prin scaderea DO a probelor aceluare (solutie derivate porfirinic in mediu de cultura, sau mediu de cultura). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de proba

Terapie fotodinamica *in vitro* a fost realizata utilizand celule monocitare SC (0.5-0.7 celule/mL) incarcate timp de 24h cu noul derivat porfirinic. S-au realizat, in aceleasi conditii, probe control: celule netratate cu porfirina si celule tratate cu solvent (PEG 200). Probe aceluare, continand doar mediu de cultura au fost utilizate pentru stabilirea fondului. Prin centrifugarea si spalarea celulelor cu TFS s-au indepartat compusul porfirinic si solventul, dupa care celulele au fost reluate in Live cell imaging (Thermo Fisher Scientific).

Celulele au fost iradiate utilizand echipamentul Modulight ML6600 prevazut cu laser cu lungimea de unda de 635 nm, cu sistem computerizat de control al dozei si iradiantei, ca si a temperaturii laserului. Pentru experimentare s-au ales urmatoorii parametri de iradiere: doza de 15J/cm², iradianta: 25W/cm², 50W/cm² si 100W/cm² [M.O. Senge, J.C. Brandt, *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87, 1240–1296].

Pentru a evita cresterea temperaturii in culturile celulare datorita iluminarii cu lumina laser, probele au fost racite anterior iradierii la 2-7°C. Dupa iradiere, probele au fost centrifugate si reluate in mediu de cultura specific pentru linia monocitara SC. Probele iradiate si controalele neiradiate au fost repartizate in placi de cultura de 96 godeuri si au fost incubate timp de 24h la 37°C, in atmosfera de 5%CO₂, dupa care s-a evaluat numarul de celule metabolic active din cultura utilizand testul reducerii MTS.

Descrierea desenelor:

- fig.1 prezinta incorporarea compusului P4.2 in celulele monocitare umane SC (linia celulara ATCC® CRL-9855™), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescenta celulara utilizand programul CellQuest (Becton Dickinson) (a. *Intensitatea medie de fluorescenta a celulelor monocitare SC incarcate 24h cu derivatul porfirinic P4.2, c=2.5–10μM. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba; b.Diagrama generata de programul de interpretare a datelor de citometrie in flux CellQuest care evidentiaza dependenta intensitatii medii a fluorescentei celulelor monocitare SC de concentratia compusului P4.2 .(C=control-PEG200); c₁=2.5μM P4.2; c₂=5μM P4.2; c₃=10μM P4.2).*

- fig.2 prezinta incorporarea in keratinocite umane normale (linia celulara HaCaT) a compusului P4.2 (c=2.5–10μM), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescenta celulara utilizand programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba.

- fig.3 prezinta incorporarea compusului P4.2 in linia celulara de fibroblaste dermice umane normale HS27, evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescenta celulara utilizand programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba (a. *intensitatea medie de fluorescenta a fibroblastelor dermice umane normale incarcate 24h cu derivatul porfirinic P4.2, c=2.5–10μM. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba, b. diagrame generate de programul de interpretare a datelor de citometrie in flux Diva 6 care evidentiaza dependenta intensitatii medii a fluorescentei fibroblastelor dermice umane normale de concentratia compusului P4.2. Comparatia s-a facut cu fibroblaste incarcate cu solventul PEG 200).*

- fig.4 prezinta incorporarea compusului P4.2 in celulele tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (linia celulara ATCC® CRL-9855™), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescenta celulara utilizand programul CellQuest (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba.

- fig.5 prezinta efectul exercitat *in vitro* de compusul P4.2 asupra keratinocitelor umane din linia HaCaT. Celulele au fost incarcate timp de 48h cu compusul P4.2 (2.5-20μM).

Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmaticice a fost evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba (*a. reducerea MTS, b. eliberarea LDH*)

- fig.6 prezinta efectul exercitat *in vitro* de compusul P4.2 asupra fibroblastelor dermice umane normale din linia HS27. Celulele au fost incarcate timp de 48h cu compusul P4.2 (2.5-20 μ M). Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmaticice a fost evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0.05$. (*a. reducerea MTS, b. eliberarea LDH*)

- fig.7 prezinta efectul exercitat *in vitro* de compusul P4.2 asupra celulelor monocitare umane din linia SC. Celulele au fost incarcate timp de 24 h cu compusul P4.2 (2.5-20 μ M). Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0.05$.

-fig.8 prezinta efectul exercitat de iluminarea laser ($\lambda = 635$ nm, doza = 15 J/cm si iradianta = 25 mW/cm², 50 mW/cm² si 100 mW/cm²). Celulele au fost incarcate timp de 24h cu compusul P4.2 (10 μ M) dupa care au fost expuse la lumina laser utilizand echipamentul de iradiere Modulight. 24h post-iradiere s-a determinat numarul de celule metabolic active in cultura prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Invenția este ilustrată prin 5 exemple nelimitative de realizare

EXEMPLUL 1

Etapa 1

Sinteza compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P4.2)

Procedeul de sinteza al compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina a fost initiat prin interactia sub actiunea microundelor a 0,0863 g 2,4-dihidroxibenzaldehida (0,625mmoli), 0,364 g 4-acetoxi-3-metoxibenzaldehida(1,875mmoli) si 0,17 mL pirol (2,5mmoli) in mediu anhidru, utilizand ca suport de reactie oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90, Merck, 63-200 μ m 70-230 mesh).

Reactia de sinteza s-a desfasurat intr-un sintetizator de tip Biotage Initiator+ timp de 9 minute prin 3 iradierii succesive (680W–500W–350W). Monitorizarea reactiei de sinteza s-a realizat prin prelevare de probe din amestecul de reactie, probe ce au fost racite si dizolvate in amestec diclorometan/eter etilic (30:1v/v), apoi evaluate prin inregistrarea spectrelor electronice in domeniul vizibil si prin cromatografie in strat subtire. Profilul spectral al probelor prelevate si analizate a confirmat prezenta compusului porfirinic prin existenta in spectru a benzilor Q si a benzii Soret, iar testele de cromatografie au permis fixarea parametrilor asociati procedurii de purificare.

Etapa 2

Purificarea 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei

Pentru separarea si purificarea compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina, produsul brut de reactie a fost dizolvat intr-un amestec clorura de metilen/eter etilic (30v/1v), filtrat la presiune normala si concentrat prin distilare simpla. Dupa evaporarea solventului s-a obtinut o masa solida de culoare brun rosu care a fost apoi purificata prin cromatografie pe coloana si cromatografie in strat subtire. Pentru cromatografierea pe coloana a solutiei ce contine produsul brut s-a utilizat ca fază staționară oxid de aluminiu neutru (Al_2O_3 90, Merck, 63-200 μm 70-230 mesh) si diclorometan/eter etilic în raport 30/1 (v/v) ca eluent.

Reactia de sinteza a furnizat un amestec ce contine un numar de 6 izomeri porfirinici (A_4 , A_3B , $A_2B_2(cis)$, $A_2B_2(trans)$, AB_3 , B_4), iar metoda cromatografica a permis separarea acestora si obtinerea compusului asimetric cu structura A_3B cu un randament de 34%.

Compusul 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina a fost obtinut sub forma de cristale aciculare de culoare violet, solubile in clorura de metilen, alcool etilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.

EXEMPLUL 2

Analiza spectrala RMN, FT-IR, UV-Vis a compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina a confirmat structura acestuia.

$^1\text{H-NMR}$, δ_{H} (400 MHz, CDCl_3), ppm: -2.84 (s, 2H), 3.88 (s, 9H), 3.97 (s, 9H), 6.20 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 7.05 (d, 3H), 7.26 (s, 3H), 7.44 (d, 3H), 7.64 (d, 1H), 7.73 (d, 1H), 7.83 (s, 1H); 8.92 (d, 6H); 8.93 (d, 2H). $\text{IR}(\text{cm}^{-1})$: 3410, 3170, 2946, 2860, 1663, 1587, 1509, 1462, 1298, 1151, 1025, 859, 731;

Parametri asociati spectrelor electronice ale 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei inregistrate pentru solutii de concentratie $2,5 \times 10^{-6} \text{M}$, in diferiti solvent organici (polietilenglicol 200, diclormetan, dimetilsulfoxid, alcool etilic) sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Solvent	λ_{max} (nm)				
	Banda Soret	$Q_y(1,0)$	$Q_y(0,0)$	$Q_x(1,0)$	$Q_x(0,0)$
CH_2Cl_2	400.4[5.890]	494.4[4.593]	528.4[4.271]	568.4[3.998]	624.0[3.660]
DMSO	401.6[5.907]	495.2[4.675]	530.4[4.350]	570.0[4.096]	624.8[3.895]
EtOH	396.8[5.886]	492.0[4.635]	526.4[4.264]	568.0[3.968]	624.0[3.622]
PEG 200	401.2[5.896]	494.8[4.808]	530.4[4.519]	570.0[4.263]	625.2[4.049]

EXEMPLUL 3

Capacitatea de localizare la nivel celular a derivatului porfirinic

Datorita proprietatilor fluorescente ale compusului P4.2, incorporarea acestuia in celule s-a putut determina prin citometrie in flux ca fluorescenta medie intracelulara. Celulele au fost incarcate timp de 24h cu compusul P4.2 (2.5– 10 μM), dupa care probele celulare au fost imediat analizate prin citometrie in flux.

Studiul realizat cu celule monocitare SC, cu relevanta privind raspunsul imun, a evidentiat cresterea dupa o curba liniara a fluorescentei medii celulare (Figura 1) in functie de concentratia compusului P4.2. Aceste rezultate indica faptul ca celulele monocitare SC incorporeaza in 24h compusul P4.2, dependent de concentratia acestuia. Rezultate similare s-au obtinut si pentru alte celule umane normale, cum ar fi keratinocitele Hacat (Figura 2), relevante pentru interactia celulelor din piele cu compusul P4.2, sau fibroblastele HS27, relevante pentru interactia pielii si a tesutului conjunctiv cu P4.2 (Figura 3). Se remarca totusi faptul ca aceste celule incorporeaza in mai mica masura compusul P4.2 comparativ cu monocitele SC, dupa cum se observa din valorile mult mai scazute ale intensitatii medii de fluorescenta si din valoarea mai mica a pantei curbei. Astfel, este posibil ca pielea si tesutul conjunctiv normal sa fie mai putin afectate de PDT cu compusul P4.2 decat celulele imune, cel putin din punctul de vedere al gradului de acumulare al fotosensibilizatorului in celule.

Experimentele au demonstrat ca linia HT-29 de celule umane de adenocarcinom de colon (Figura 4) incorporeaza semnificativ compusul P4.2, intr-o maniera similara cu linia de celule monocitare SC. Aceste date justifica faptul ca celulele tumorale sunt selectiv sensibile la fotosensibilizare cu compusul P4.2. Incorporarea compusului P4.2 in monocitele SC ar putea determina afectarea raspunsului imun de catre PDT. In acelasi timp, recrutarea monocitelor la nivelul tumorii ar putea mari semnificativ incarcarea cu fotosensibilizator (compusul P4.2) a tumorii, crescand astfel eficacitatea PDT. Desi unele celulele normale (monocitele) si celulele tumorale par sa incorporeze similar compusul P4.2, acesta poate realiza uciderea selectiva a celulelor tumorale atunci cand este activat cu lumina de lungime de unda specifica (PDT), fara a afecta dramatic celule normale adiacente sau pe cele din circulatie, avand in vedere ca activarea cu lumina a fotosensibilizatorului se realizeaza prin iluminarea inalt tintita cu lumina laser doar a tumorii.

EXEMPLUL 4

Biocompatibilitatea derivatului porfirinic

Biocompatibilitatea derivatului porfirinic P4.2 a fost testata pe diverse linii celulare umane normale (linia celulara de fibroblaste dermice HS27, linia celulara de keratinocite HaCaT, linia de celule monocitare SC). Celulele au fost incarcate cu porfirina P4.2 (2.5–20 μ M) timp de 48h. Biocompatibilitatea derivatului porfirinic P4.2 a fost investigata relativ la numarul de celule metabolic active (testul reducerii MTS), si relativ la integritatea membrana (testul eliberarii LDH).

Datele experimentale arata ca viabilitatea/proliferarea keratinocitelor HaCaT nu este scazuta in urma incarcarii lor cu compusul P4.2 (Figura 5a) timp de 48h, avand in vedere faptul ca reducerea MTS de catre celulele tratate cu diverse concentratii de compus nu este scazuta semnificativ comparativ cu reducerea MTS de catre solventul PEG 200. La concentratii mari (20 μ M), porfirina P4.2 sustine metabolismul celulelor HaCaT ($P < 0.05$, comparativ cu solventul). Compusul P4.2 nu modifica statistic semnificativ eliberarea LDH (Figura 5b), ceea ce arata ca integritatea membranei plasmatiche nu este afectata de incarcarea celulelor HaCaT cu compusul P4.2. In cazul liniei de fibroblaste dermice umane normale HS27, la concentratii mai mici de 20 μ M a derivatului porfirinic P4.2 nu este afectata reducerea MTS si implicit numarul de celule

metabolic active (Figura 6a). Pentru concentratii mari (20 μ M), porfirina P4.2 reduce numarul de fibroblaste metabolic active ($P < 0.05$ comparativ cu solventul PEG 200). Avand in vedere faptul ca P4.2 nu modifica eliberarea LDH (Figura 6b), se poate afirma ca reducerea numarului de celule metabolic active nu este asociata cu moartea celulara, ci cu o scadere a proliferarii fibroblastelor sau a unor procese metabolice care sustin reducerea MTS. La concentratii mai mici (10 μ M) compusul P4.2 afecteaza numarul de celule monocitare umane din linia SC (Figura 7), avand in vedere scaderea statistic semnificativa a reactiei de reducere a MTS ($P < 0.001$) la 73% comparativ cu controlul de solvent.

In cazul celulelor monocitare nu s-au putut interpreta datele de eliberare a LDH, datorita nivelului extrem de scazut de enzima LDH eliberata de aceste celule. Datele experimentale evidentiaza biocompatibilitatea compusului P4.2 dizolvat in PEG200 relativ la keratinocitele umane HaCaT, fibroblastele dermice umane HS27 si celulele monocitare umane SC. Exista totusi unele limitari de concentratie, respectiv 20 μ M in cazul fibroblastelor dermice si 10 μ M in cazul celulelor monocitare. Remarcam in mod deosebit faptul ca P4.2 poate altera raspunsul imun la concentratii relativ mari (20 μ M) prin perturbarea metabolica a monocitelor. Aceasta constatare este cu atat mai relevanta cu cat, din punctul de vedere al PDT, compusul P4.2 va fi injectat intravenos. Astfel, va intra in circulatie o doza mare de compus care poate afecta, cel putin conform studiului *in vitro*, functionalitatea monocitelor si implicit a sistemului imun [A. Parihar, T.D. Eubank, A. Doseff, *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2, 204-215.]

EXEMPLUL 5

Terapie fotodinamica in vitro

A fost realizat un studiu preliminar pentru a testa proprietatile de fotosensibilizator ale derivatului P4.2. In acest scop, celulele monocitare umane din linia SC au fost incarcate 24h cu derivat porfirinic in concentratie 10 μ M. Rezultatele obtinute prin citometrie in flux au indicat o incarcarea semnificativa a celulelor cu aceasta concentratie de compus. Pentru activarea compusului P4.2 incorporat, celulele SC au fost iradiate cu lumina laser de 635nm utilizand echipamentul de iradiere Modulight.

A fost aplicata o doza de 15 J/cm² si iradiana cu valorile de 25, 50 si 100mW/cm². Parametrii de iradiere au fost alesi pe baza datelor din literatura de specialitate

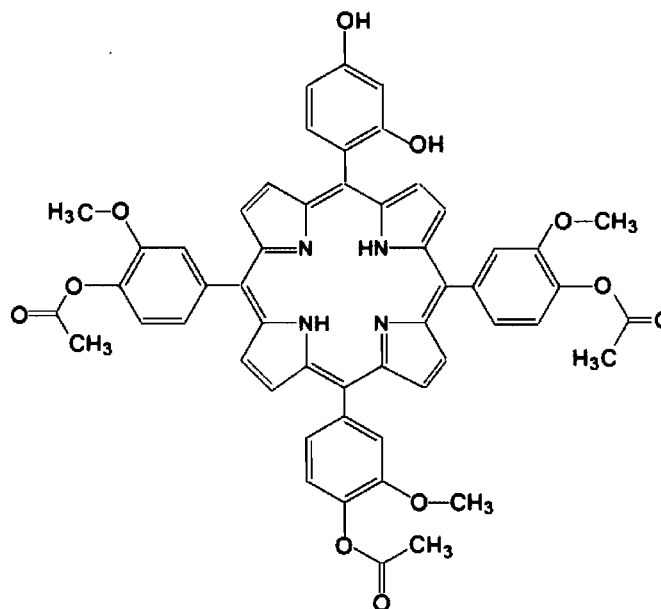
referitoare la un compus relativ similar de pe piata farmaceutica, Foscan® [M.O. Senge, J.C. Brandt, *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87, 1240–1296; http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000318/WC500024392.pdf].

Dupa iradiere, celulele au fost cultivate 24h, dupa care s-a determinat numarul de celule metabolic active in cultura cu ajutorul testului de reducere a MTS. Conform datelor prezentate in Figura 8, expunerea celulelor SC la radiatie laser de 635nm reduce numarul de celule metabolic active la iradiante cu valori de 50 si 100W/cm². PEG 200 (solventul in care a fost dizolvat compusul P4.2) tinde sa protejeze celule de actiunea daunatoare a expunerii la lumina laser. 24h post-iradiere, reactia de reducere a MTS a scazut la aproximativ 55% comparativ cu solventul PEG (Figura 8), ceea ce indica o scadere drastica a numarului de celule SC metabolic active (P<0.05). Remarcam de asemenea faptul ca iradiana de 50mW/cm² pare sa fie cea mai eficienta in inhibarea metabolica a celulelor SC.

Aceste date experimentale evidentiaza faptul ca derivatul porfirinic P4.2 are proprietati de fotosensibilizator si poate sa fie dezvoltat pentru utilizare in teranostica cancerului.

REVENDICĂRI

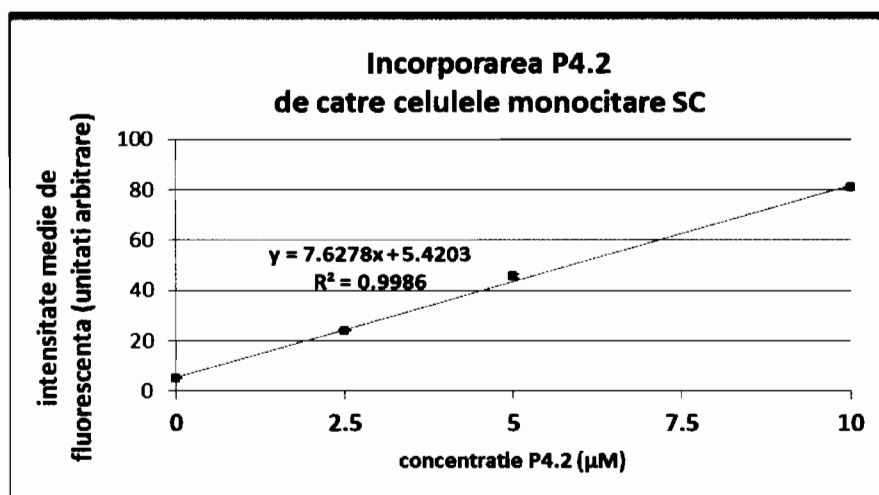
1. Derivat porfirinic cu următoarea structură chimică



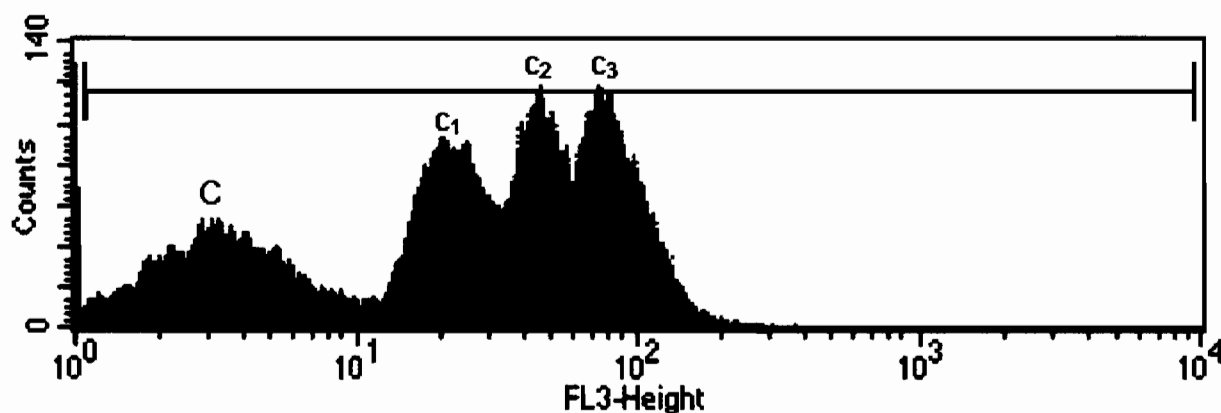
5-(2,4-dihydroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina

2. Procedeu de obținere pentru derivatul porfirinic definit ca în revendicarea 1

3. Derivatul porfirinic definit ca în revendicarea 1, încorporat în celule manifestă proprietăți de fotosensibilizator prin activare cu lumina laser de 635 nm și poate fi utilizat ca agent teranostic.



a. Intensitatea medie de fluorescenta a celulelor monocitare SC incarcate 24h cu derivatul porfirinic P4.2, $c=2.5-10\mu\text{M}$. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba.



b. Diagrama generata de programul de interpretare a datelor de citometrie in flux CellQuest care evidentiaza dependenta intensitatii medii a fluorescentei celulelor monocitare SC de concentratia compusului P4.2. (C=control-PEG200); $c_1=2.5\mu\text{M}$ P4.2; $c_2=5\mu\text{M}$ P4.2; $c_3=10\mu\text{M}$ P4.2).

Figura 1. Incorporarea compusului P4.2 in celulele monocitare umane SC (linia celulara ATCC® CRL-9855™), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescenta celulara utilizand programul CellQuest (Becton Dickinson).

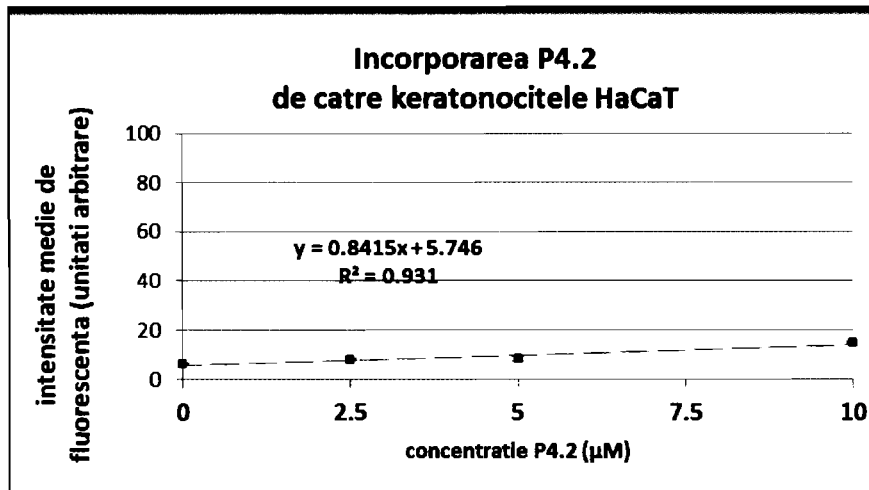
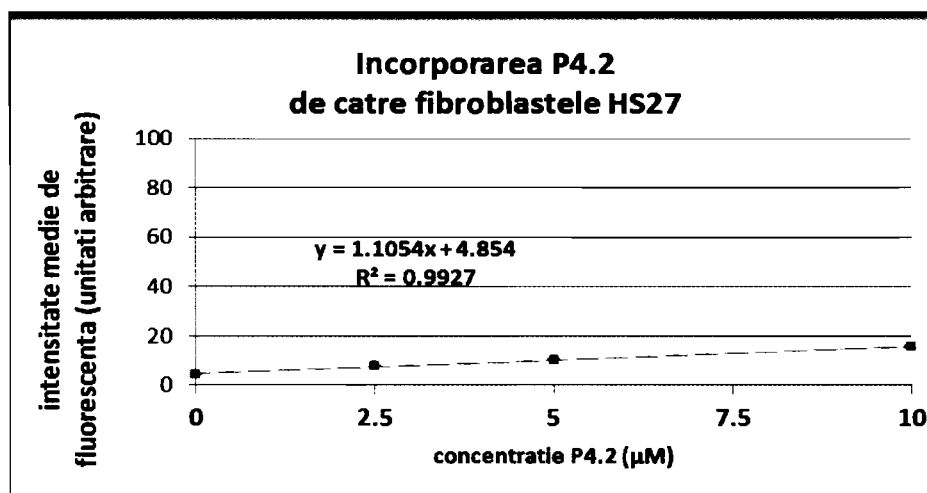
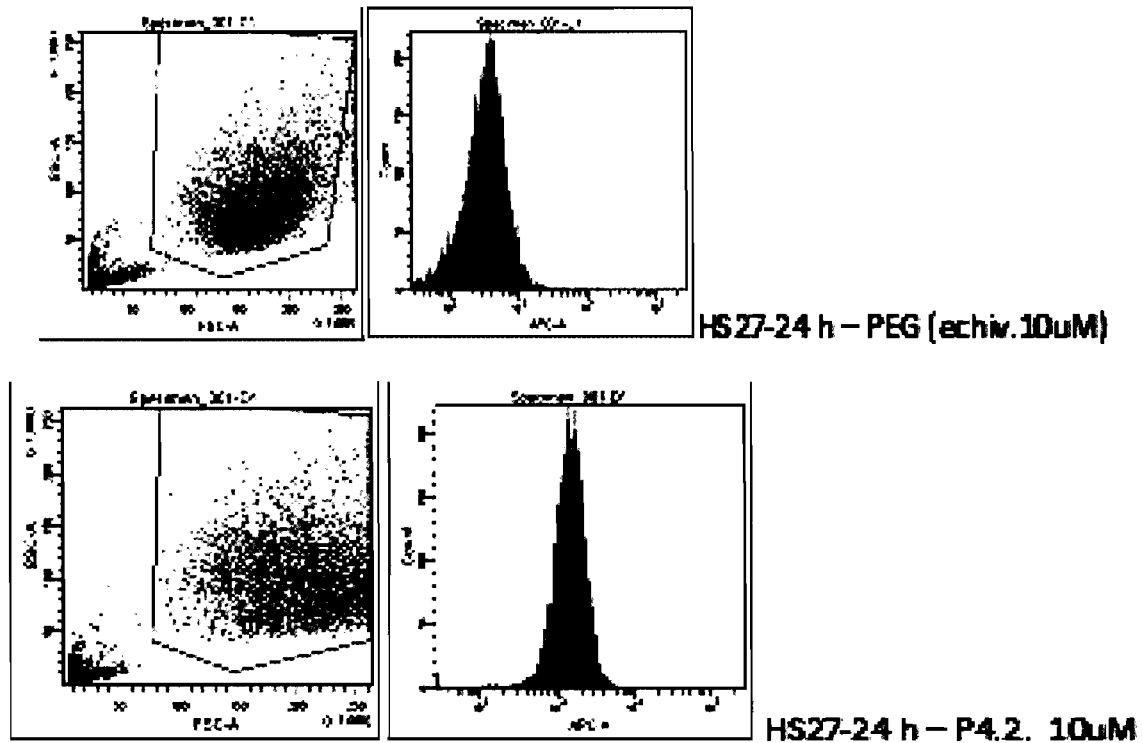


Figura 2. Incorporarea in keratinocite umane normale (linia celulara HaCaT) a compusului P4.2 ($c=2.5-10\mu\text{M}$), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescanta celulara utilizand programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba.



a) Intensitatea medie de fluorescanta a fibroblastelor dermice umane normale incarcate 24h cu derivatul porfirinic P4.2, $c=2.5-10\mu\text{M}$. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba.



b) *Diagrame generate de programul de interpretare a datelor de citometrie in flux Diva 6 care evidentiaza dependenta intensitatii medii a fluorescentei fibroblastelor dermice umane normale de concentratia compusului P4.2. Comparatia s-a facut cu fibroblaste incarcate cu solventul PEG 200.*

Figura 3. Incorporarea compusului P4.2 in linia celulara de fibroblaste dermice umane normale HS27, evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescena celulara utilizand programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba.

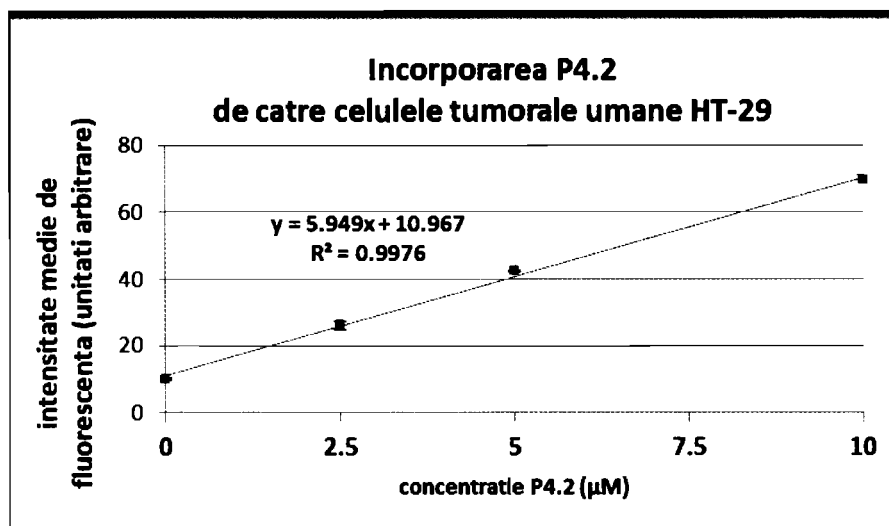
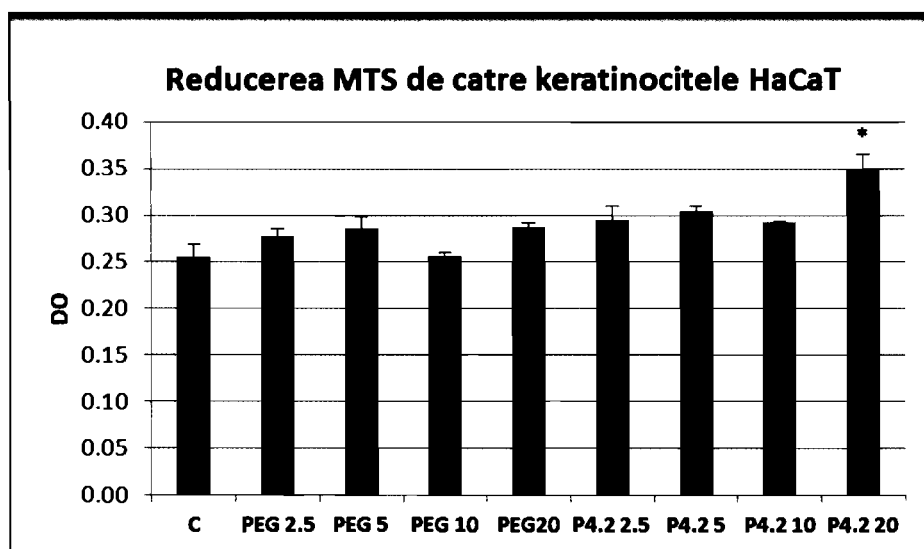
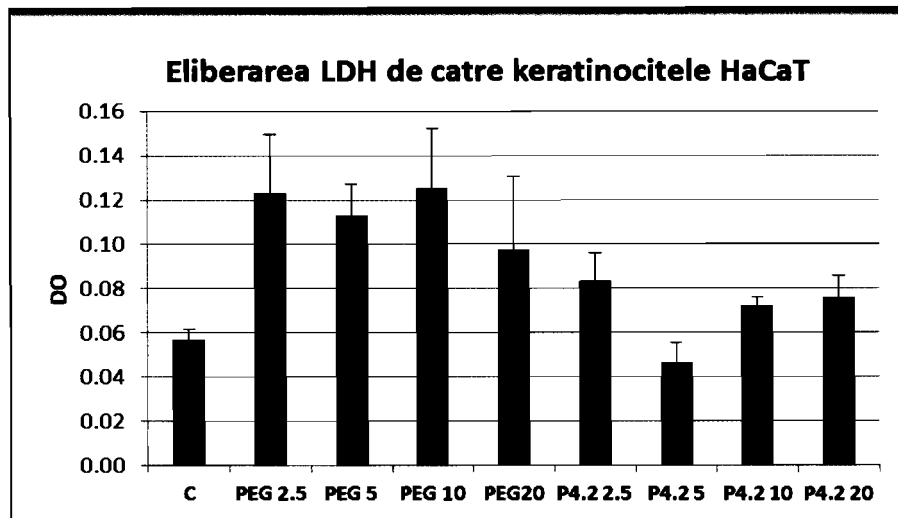


Figura 4. Incorporarea compusului P4.2 in celulele tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (linia celulara ATCC® CRL-9855™), evaluata prin citometrie in flux ca intensitate medie de fluorescanta celulara utilizand programul CellQuest (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM pentru triplicat de proba.

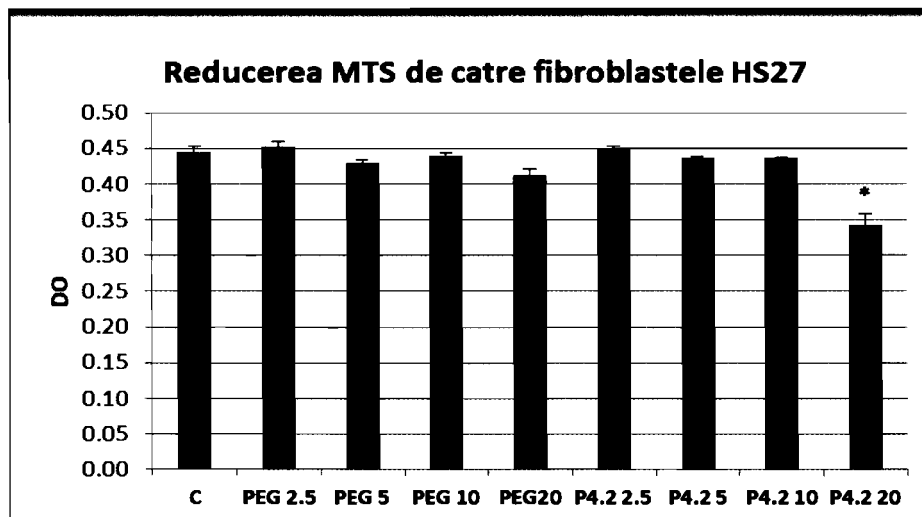


a) Reducerea MTS

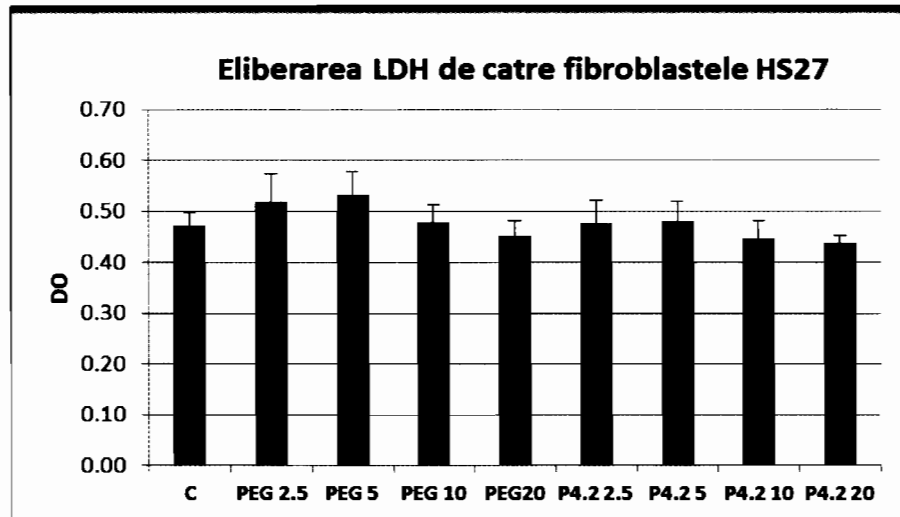


b) Eliberarea LDH

Figura 5. Efectul exercitat *in vitro* de compusul P4.2 asupra keratinocitelor umane din linia HaCaT. Celulele au fost incarcate timp de 48 h cu compusul P4.2 (2.5-20 μ M). Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmaticе a fost evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba.



a) Reducerea MTS



b) Eliberarea LDH

Figura 6. Efectul exercitat in vitro de compusul P4.2 asupra fibroblastelor dermice umane normale din linia HS27. Celulele au fost incarcate timp de 48 h cu compusul P4.2 (2.5-20 μ M). Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmaticice a fost evaluata prin testul eliberarii LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0.05$.

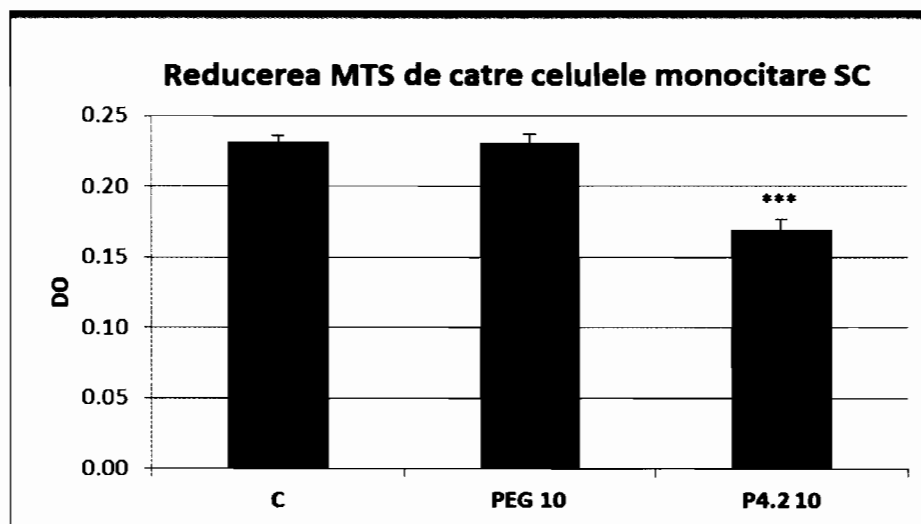


Figura 7. Efectul exercitat in vitro de compusul P4.2 asupra celulelor monocitare umane din linia SC. Celulele au fost incarcate timp de 24 h cu compusul P4.2 (2.5-20 μ M). Numarul de celule metabolic active in cultura a fost determinat prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0.05$.

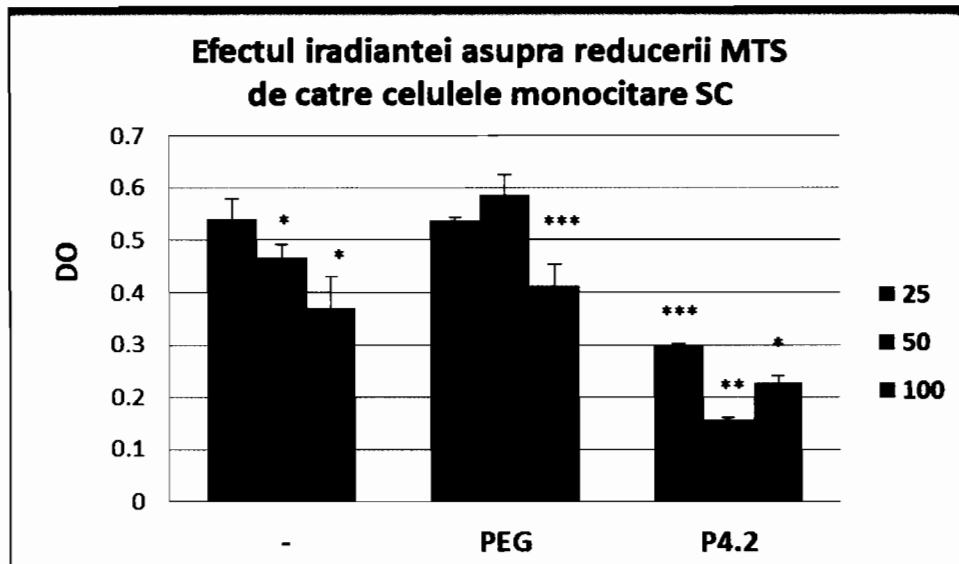


Figura 8. Efectul exercitat de iluminarea laser ($\lambda=635\text{nm}$, doza= $15\text{J}/\text{cm}$ si iradianta= $25\text{ mW}/\text{cm}^2$, $50\text{ mW}/\text{cm}^2$ si $100\text{ mW}/\text{cm}^2$. Celulele au fost incarcate timp de 24h cu compusul P4.2 ($10\mu\text{M}$) dupa care au fost expuse la lumina laser utilizand echipamentul de iradiere Modulight. 24h post-iradiere s-a determinat numarul de celule metabolic active in cultura prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.