



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01030**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2023** BOPI nr. **11/2023**

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

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA", STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 2, 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;**
- **BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:

- **BOSCENCU 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- BOSCENCU R. ȘI COLAB., "STUDIES ON THE SYNTHESIS, PHOTOPHYSICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SOME UNSYMMETRICAL MESO-TETRASUBSTITUTED PHENYL PORPHYRINS", MOLECULES, 2017;**
BOSCENCU R. ȘI COLAB., "SYNTHESIS UNDER SOLVENT FREE CONDITIONS OF SOME UNSYMMETRICALLY SUBSTITUED PORPHYRINIC COMPOUNDS", REVISTA DE CHIMIE, NR. 8, VOL. 65, 2014

(54) **DERIVAT PORFIRINIC PENTRU UTILIZARE ÎN TERANOSTICĂ**



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

 Invenția se referă la obținerea, caracterizarea spectrală și evaluarea *in vitro* la nivel
5 celular a unui derivat porfirinic cu potențial de marker și fotosensibilizator. În prezent,
statisticile privind mortalitatea asociată cancerului din întreaga lume precum și implicațiile
7 financiare în domeniul terapiei antitumorale sunt alarmante și de aceea cercetările inter-
disciplinare privind obținerea unor forme farmaceutice care să asigure identificarea și terapia
9 formațiunilor de natura tumorală într-un singur pas se constituie ca tematici prioritare ale
obiectivelor ce vizează îmbunătățirea stării de sănătate a populației [M. Chowdhurya Roy,
11 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.
13 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,
15 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
17 mare de localizare la nivel celular, fără efecte secundare toxice semnificative, care prezintă
fluorescență în domeniul spectral 550-800 nm și capacitate de a genera oxigen singlet [R.
19 Kojima, D. Aubel, 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,
21 P.C. Lo, *Theranostics*, 2012, 2, 9, 815-816].

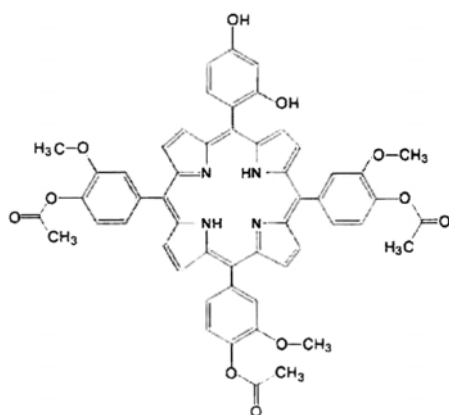
 Compușii din clasa meso-porfirinelor tetrafenil substituite se încadrează în structurile
23 macrociclice cu potențial de substanță activă pentru o abordare teranostică [P.C. Zhang,
C.H. Hu, W. Ran, J. Meng, Q. Yin, Y.P. Li, *Theranostics*, 2016, 6, 948-968, J.F. Lovell,
25 P.C. Lo, *Theranostics*, 2012, 2, 9, 815-816].

 Se cunosc din literatura de specialitate [Boscencu, R. și colab., "*Studies on the
27 synthesis, photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-
tetrasubstituted phenyl porphyrins*", *Molecules*, octombrie 2017] derivați meso-porfirinici asi-
29 metrici fenil tetrasubstituiți, cum ar fi 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-
metoxifenil)porfirină, destinați utilizării ca agenți teranostatici în terapia fotodinamică a tumori-
31 lor solide. Un procedeu de obținere ale acestora descris, de asemenea, în literatura de
specialitate [Boscencu, R. și colab., "*Synthesis under solvent free conditions of some
33 unsymmetrically substituted porphyrinic compounds*", *Revista de Chimie*, 65, nr. 8, 2014]
prezintă sinteza prin iradiere cu microunde în absența unui solvent și evaluarea spectrală a
35 unor compuși din clasa derivaților tetrapirolici, și anume 5-(2-hidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-
acetoxi-3-metoxifenil)-21,23-H-porfină și 5-(3-hidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxi-
37 fenil)-21,23-H-porfină. Dezavatajele derivaților cunoscuți rezidă în polaritatea și capacitatea
de internalizare celulară reduse.

 Problema tehnică constă în obținerea cu randamente bune și puritate ridicată a unor
39 structuri porfirinice noi, cu proprietăți structurale și spectrale care le recomandă pentru
41 aplicații în diagnoza și tratamentul antitumoral.

RO 132752 B1

Invenția are ca obiect un derivat din clasa meso-porfirinelor tetrafenil asimetric substituie, compus destinat pentru teranostică în tumori solide, reprezentat prin formula structurală



și având denumirea chimică 5-(2,4-dihydroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirină.

Procedee de obținere a compusului definit anterior include următoarele etape:

- iradierea cu microunde a unui amestec de 2,4-dihydroxibenzaldehidă, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehidă și pirol în raport molar de 1:3:4, pe suport de oxid de aluminiu neutru;
- dizolvarea produsului brut într-un amestec clorura de metilen/eter etilic în raport volumetric de 30:1, filtrare și concentrare prin distilare simplă a soluției obținute;
- separarea și purificarea compusului 5-(2,4-dihydroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirină (P4.2), prin cromatografie pe coloană și cromatografie în strat subțire.

Derivatul porfirinic conform invenției, 5-(2,4-dihydroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina, este destinat utilizării ca fotosensibilizator prin activare cu lumină laser de 635 nm și ca agent teranostic.

Avantajele aplicării invenției sunt:

- derivatul porfirinic cu structură amfifilă se obține cu randament bun printr-un procedeu care asigură și o separare eficientă și puritate ridicată a derivatului porfirinic cu structura amfifilă;
- tehnica abordată în sinteza este una ecologică, cu impact redus asupra mediului;
- stabilirea unui protocol *in vitro* de utilizare a derivatului porfirinic în teranostică.

Evaluarea *in vitro* a 5-(2,4-dihydroxifenil)-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 utilizând fibroblaste dermice umane normale (linia celulară HS27 - ATCC® CRL-1634™), Keratinocite umane normale (linia celulară HaCaT-Thermo Fisher Scientific), Monocite/macrofage umane din sânge periferic (linia celulară SC-ATCC® CRL-9855™) și celule tumorale umane de adenocarcinom de colon (linia celulară HT-29 - ATCC® HTB-38™).

Studiul biologic *in vitro* a arătat că diverse tipuri de celule umane normale și tumorale încorporează derivatul porfirinic într-o manieră dependentă de concentrația acestuia. Compusul porfirinic este biocompatibil, cu limite legate de concentrație (10 sau 20 μM) în ce privește interacția cu celulele monocitare și keratinocitele dermice.

Prin activare cu lumina laser de 635 nm, derivatul porfirinic manifestă proprietăți de fotosensibilizator.

RO 132752 B1

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

În prima etapă, 2,4-dihidroxibenzaldehida, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehida și pirolul
5 se aduc peste oxidul de aluminiu neutru în vasul de reacție. Amestecul de reactanți este
supus timp de 9 min la iradieri succesive (680 W - 500 W - 350 W).

7 Etapa a doua include dizolvarea produsului brut în amestec de diclormetan/eter etilic
în raport volumetric de 30/1, filtrare și concentrare prin distilare simplă a soluției obținute, iar
9 în ultima etapă se realizează purificarea compusului porfirinic prin metode cromatografice.

Purificarea compusului util din amestecul de reacție s-a realizat într-o primă etapa
11 prin cromatografie pe coloană, utilizând ca fază staționară oxid de aluminiu neutru (Al₂O₃ 90,
Merck, 63-200 μm 70-230 mesh) iar ca eluent un amestec diclormetan/eter etilic în raport
13 30/1 (v/v). Purificarea finală a compusului de interes s-a realizat prin cromatografie în strat
subțire, utilizând plăci PLC silica gel 60, 2 mm, 20 x 20 cm și diclormetan/eter etilic ca eluent.

15 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
17 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).
19 Solventul utilizat a fost cloformul deuterat.

Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrometru UV-Vizibil Specord 200,
21 pentru soluții ale compusului porfirinic (c = 2,5 x 10⁻⁶ M) în solvenții: polietilenglicol 200,
diclormetan, dimetilsulfoxid, alcool etilic.

23 Prepararea soluțiilor destinate studiul biologic *in vitro* s-a realizat prin dizolvarea
derivatului porfirinic într-un solvent frecvent utilizat în formularea farmaceutică, respectiv
25 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 10 mM.

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

29 Celulele, atât cele aderente cât și cele neaderente, au fost cultivate și tratate cu
derivat porfirinic în intervalul de concentrații 2,5-10 μM, timp de 24 h în cazul celulelor mono-
31 citare 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 celule
33 din țesuturi. La finalul acestei perioade, celulele au fost spălate de două ori cu tampon fosfat
salin (TFS, Gibco) pentru îndepărtarea compusului neîncorporat, după care celulele au fost
35 procesate pentru evaluare biologică.

După încărcare, celulele aderente au fost tripsinizate cu 0,25%/0,02% Trypsin/EDTA
37 (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).
39 Citirea probelor s-a realizat imediat la citometrul în flux (BD FACSCalibur sau BD FACS
Canto de la Becton Dickinson), utilizând pentru excitare un laser de 488 nm, iar emisia a fost
41 înregistrată în canalul de fluorescență FL3 (roșu). Datele au fost achiziționate și prelucrate
la citometrul în flux cu ajutorul programului CellQuest sau DIVA (BD Biosciences). Datele au
43 fost exprimate ca intensitate medie de fluorescență exprimată în unități de fluorescență
arbitrare.

45 Testul reducerii MTS a fost utilizat pentru evaluarea numărului de celule metabolic
active în cultură. Pentru aceasta s-a utilizat kitul CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell
47 Proliferation Assay de la Promega Corporation și s-a aplicat metodologia recomandată de
producător ([https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-
49 aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-svstem-protocol/](https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-svstem-protocol/)).

RO 132752 B1

Celulele au fost cultivate în plăci de cultură cu 96 godeuri, în 100 μL mediu de cultură, în absența sau prezența derivatului porfirinic sau a solventului PEG 200. Celulele aderente au fost pre-cultivate 24 h pentru a permite celulelor să adere la godeu. Celulele neaderente investigate au fost direct cultivate în prezența compusului porfirinic sau a solventului PEG 200. După încheierea timpului de incubare/tratament cu porfirină a celulelor, respectiv 24 h în cazul monocitelor SC și 48 h în cazul fibroblastelor HS27 și a keratinocitelor HaCaT, în fiecare probă s-au adăugat 20 μL din reactivul kitului. Celulele au fost incubate încă 2-3 h (depinzând de tipul celule și de metabolismul redox al acestora) la 37°C, în atmosferă de 5% CO_2 , pentru a permite dezvoltarea reacției de reducere a MTS de către celulele metabolic active. La sfârșitul perioadei de incubare, la un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevăzut cu program de analiză a datelor, s-a măsurat densitatea optică (DO) a probelor și controalelor la lungimea de undă 490 nm față de referința de 620 nm. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea DO a probelor acelulare (soluție derivat porfirinic în mediu de cultură sau mediu de cultură). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH) a fost utilizat pentru evaluarea integrității membranare și implicit a potentialului citotoxic al derivatului porfirinic; s-a utilizat kitul colorimetric CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation) și metodologia producătorului (<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 sfârșitul experimentului, plăcile de cultură au fost centrifugate la 120 rpm, 5 min pentru clarificarea supernatantului de cultură în vederea recoltării a 50 μL din acesta. Peste cei 50 μL de supernatant s-au adăugat 50 μL din reactivul de detecție a kitului. Probele au fost incubate 30 min la temperatura camerei și la întuneric pentru a permite dezvoltarea reacției LDH. Reacția LDH a fost stopată la final cu reactivul de blocare a reacției din kitul mai sus menționat. La un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevăzut cu program de analiză a datelor, s-a măsurat densitatea optică (DO) a probelor și controalelor la lungimea de undă 490 nm față de referința de 620 nm. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea DO a probelor acelulare (soluție derivat porfirinic în mediu de cultură sau mediu de cultură). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Terapie fotodinamică *in vitro* a fost realizată utilizând celule monocitare SC (0,5-0,7 celule/mL) încărcate timp de 24 h cu noul derivat porfirinic. S-au realizat, în aceleași condiții, probe control: celule netratate cu porfirină și celule tratate cu solvent (PEG 200). Probe acelulare, conținând doar mediu de cultură au fost utilizate pentru stabilirea fondului. Prin centrifugarea și spălarea celulelor cu TFS s-au îndepărtat compusul porfirinic și solventul, după care celulele au fost reluate în Live cell imaging (Thermo Fisher Scientific).

Celulele au fost iradiate utilizând echipamentul Modulight ML6600 prevăzut cu laser cu lungimea de undă de 635 nm, cu sistem computerizat de control al dozei și iradiantei, ca și a temperaturii laserului. Pentru experimentare s-au ales următorii parametri de iradiere: doza de 15 J/cm^2 , iradianta: 25 W/cm^2 , 50 W/cm^2 și 100 W/cm^2 [M.O. Senge, J.C. Brandt, **Photochemistry and Photobiology**, 2011, 87, 1240-1296]. Pentru a evita creșterea temperaturii în culturile celulare datorită iluminării cu lumina laser, probele au fost răcite anterior iradierii la 2-7°C. După iradiere, probele au fost centrifugate și reluate în mediu de cultură specific pentru linia monocitară SC. Probele iradiate și controalele neiradiate au fost repartizate în plăci de cultură de 96 godeuri și au fost incubate timp de 24 h la 37°C, în atmosfera de 5% CO_2 , după care s-a evaluat numărul de celule metabolic active din cultură utilizând testul reducerii MTS.

RO 132752 B1

1 Descrierea desenelor:

2 - fig. 1, prezintă incorporarea compusului P4.2 în celulele monocitare umane SC (linia
3 celulară ATCC® CRL-9855™), evaluată prin citometrie în flux ca intensitate medie de
4 fluorescență celulară utilizând programul CellQuest (Becton Dickinson) (a. Intensitatea medie
5 de fluorescență a celulelor monocitare SC încărcate 24 h cu derivatul porfirinic
6 P4.2, $c = 2,5-10 \mu\text{M}$. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă;
7 b.Diagrama generată de programul de interpretare a datelor de citometrie în flux CellQuest
8 care evidențiază dependența intensității medii a fluorescenței celulelor monocitare SC de
9 concentrația compusului P4.2. ($C = \text{control-PEG200}$); $c_1 = 2,5 \mu\text{M}$ P4.2; $c_2 = 5 \mu\text{M}$ P4.2;
10 $c_3 = 10 \mu\text{M}$ P4.2);

11 - fig. 2, prezintă încorporarea în keratinocite umane normale (linia celulară HaCaT)
12 a compusului P4.2 ($c = 2,5-10 \mu\text{M}$), evaluată prin citometrie în flux ca intensitate medie de
13 fluorescență celulară utilizând programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt
14 prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă;

15 - fig. 3, prezintă încorporarea compusului P4.2 în linia celulară de fibroblaste dermice
16 umane normale HS27, evaluată prin citometrie în flux ca intensitate medie de fluorescență
17 celulară utilizând programul Diva 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie
18 \pm SEM pentru triplicat de probă (a. intensitatea medie de fluorescență a fibroblastelor
19 dermice umane normale încărcate 24 h cu derivatul porfirinic P4.2, $c = 2,5-10 \mu\text{M}$. Rezul-
20 tatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă, b. diagrame generate de
21 programul de interpretare a datelor de citometrie în flux Diva 6 care evidențiază dependența
22 intensității medii a fluorescenței fibroblastelor dermice umane normale de concentrația
23 compusului P4.2. Comparția s-a făcut cu fibroblaste încărcate cu solventul PEG 200);

24 - fig. 4, prezintă încorporarea compusului P4.2 în celulele tumorale umane de adeno-
25 carcinom de colon din linia HT-29 (linia celulara ATCC® CRL-9855™), evaluată prin cito-
26 metrie în flux ca intensitate medie de fluorescență celulară utilizând programul CellQuest
27 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă;

28 - fig. 5, prezintă efectul exercitat în vitro de compusul P4.2 asupra keratinocitelor
29 umane din linia HaCaT. Celulele au fost încărcate timp de 48 h cu compusul
30 P4.2 ($2,5-20 \mu\text{M}$). Numărul de celule metabolic active în cultură a fost determinat prin testul
31 reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmatică a fost evaluată prin testul eliberării
32 LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba (a. reducerea
33 MTS, b. eliberarea LDH);

34 - fig. 6, prezintă efectul exercitat în vitro de compusul P4.2 asupra fibroblastelor
35 dermice umane normale din linia HS27. Celulele au fost încărcate timp de 48 h cu compusul
36 P4.2 ($2,5-20 \mu\text{M}$). Numărul de celule metabolic active în cultura a fost determinat prin testul
37 reducerii MTS, iar integritatea membranei plasmatică a fost evaluată prin testul eliberării
38 LDH. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă. * $P < 0,05$. (a.
39 reducerea MTS, b. eliberarea LDH);

40 - fig. 7, prezintă efectul exercitat *in vitro* de compusul P4.2 asupra celulelor monoci-
41 tare umane din linia SC. Celulele au fost încărcate timp de 24 h cu compusul P4.2
42 ($2,5-20 \mu\text{M}$). Numărul de celule metabolic active în cultură a fost determinat prin testul redu-
43 cerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de proba. * $P < 0,05$;

44 - fig. 8 prezintă efectul exercitat de iluminarea laser ($A=635 \text{ nm}$, doza= 15 J/cm și
45 iradianța = 25 mW/cm^2 , 50 mW/cm^2 și 100 mW/cm^2 . Celulele au fost incarcate timp de 24 h
46 cu compusul P4.2 ($10 \mu\text{M}$) după care au fost expuse la lumina laser utilizând echipamentul
47 de iradiere Modulight. 24 h post-iradiere s-a determinat numărul de celule metabolic active
48 în cultura prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru
49 triplicat de proba. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

RO 132752 B1

Invenția este ilustrată prin 5 exemple nelimitative de realizare, în legătură cu figurile.	1
Exemplul 1	
<i>Etapa 1</i>	3
<i>Sinteza compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina (P4.2)</i>	5
Procedeul de sinteză al compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina a fost inițiat prin interacția sub acțiunea microundelor a 0,0863 g 2,4-dihidroxibenzaldehidă (0,625 mmoli), 0,364 g 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehidă (1,875 mmoli) și 0,17 ml pirol (2,5 mmoli) în mediu anhidru, utilizând ca suport de reacție oxid de aluminiu neutru (Al ₂ O ₃ 90, Merck, 63-200 μm 70-230 mesh).	7
Reacția de sinteză s-a desfășurat într-un sintetizator de tip Biotage Initiator + timp de 9 min prin 3 iradieri succesive (680 W-500 W-350 W). Monitorizarea reacției de sinteză s-a realizat prin prelevare de probe din amestecul de reacție, probe ce au fost răcite și dizolvate în amestec diclormetan/eter etilic (30:1 v/v), apoi evaluate prin înregistrarea spectrelor electronice în domeniul vizibil și prin cromatografie în strat subțire. Profilul spectral al probelor prelevate și analizate a confirmat prezența compusului porfirinic prin existența în spectru a benzilor Q și a benzii Soret, iar testele de cromatografie au permis fixarea parametrilor asociați procedurii de purificare.	9
<i>Etapa 2</i>	11
<i>Purificarea 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei</i>	13
Pentru separarea și purificarea compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirina, produsul brut de reacție a fost dizolvat într-un amestec volumetric clorura de metilen/eter etilic (30/1), filtrat la presiune normal și concentrat prin distilare simplă. După evaporarea solventului s-a obținut o masă solidă de culoare brun roșcat care a fost apoi purificată prin cromatografie pe coloană și cromatografie în strat subțire. Pentru cromatografierea pe coloană a soluției ce conține produsul brut s-a utilizat ca fază staționară oxid de aluminiu neutru (Al ₂ O ₃ 90, Merck, 63-200 μm 70-230 mesh) și diclormetan/eter etilic în raport 30/1 (v/v) ca eluent.	15
Reacția de sinteză a furnizat un amestec ce conține un număr de 6 izomeri porfirinici (A ₄ , A ₃ B, A ₂ B ₂ (cis), A ₂ B ₂ (trans), AB ₃ , B ₄), iar metoda cromatografică a permis separarea acestora și obținerea compusului asimetric cu structura A ₃ B cu un randament de 34%. Compusul 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirină a fost obținut sub formă de cristale aciculare de culoare violet, solubile în clorura de metilen, alcool etilic, dimetil sulfoxid, polietilenglicol 200.	17
Exemplul 2	19
<i>Analiza spectrală RMN, FT-IR, UV-Vis a compusului 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirină a confirmat structura acestuia</i>	21
¹ H-RMN, 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). IR(cm ⁻¹): 3410, 3170, 2946, 2860, 1663, 1587, 1509, 1462, 1298, 1151, 1025, 859, 731;	23
Parametrii asociați spectrelor electronice ale 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirinei înregistrate pentru soluții de concentrație 2,5 x 10 ⁻⁶ M, în diferiți solvenți organici (polietilenglicol 200, diclormetan, dimetilsulfoxid, alcool etilic) sunt prezentați în tabelul 1.	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45

Solvent	λ_{\max} (nm) [$I_{g\epsilon}$] ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)				
	Banda Soret	$Q_y(1,0)$	$Q_y(0,0)$	$Q_x(1,0)$	$Q_x(0,0)$
CH ₂ C 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 proprietăților fluorescente ale compusului P4.2, încorporarea acestuia în celule s-a putut determina prin citometrie în flux ca fluorescență medie intracelulară. Celulele au fost încărcate timp de 24 h cu compusul P4.2 (2,5-10 μM), după care probele celulare au fost imediat analizate prin citometrie în flux.

Studiul realizat cu celule monocitare SC, cu relevanță privind răspunsul imun, a evidențiat creșterea după o curbă liniară a fluorescenței medii celulare (fig. 1) în funcție de concentrația compusului P4.2. Aceste rezultate indică faptul că celulele monocitare SC încorporează în 24 h compusul P4.2, dependent de concentrația acestuia. Rezultate similare s-au obținut și pentru alte celule umane normale, cum ar fi keratinocitele Hacat (fig. 2), relevante pentru interacția celulelor din piele cu compusul P4.2, sau fibroblastele HS27, relevante pentru interacția pielii și a țesutului conjunctiv cu P4.2 (fig. 3). Se remarcă totuși faptul că aceste celule încorporează în mai mică măsură compusul P4.2 comparativ cu monocitele SC, după cum se observă din valorile mult mai scăzute ale intensității medii de fluorescență și din valoarea mai mică a pantei curbei. Astfel, este posibil că pielea și țesutul conjunctiv normal să fie mai puțin afectate de PDT cu compusul P4.2 decât celulele imune, cel puțin din punctul de vedere al gradului de acumulare al fotosensibilizatorului în celule.

Experimentele au demonstrat ca linia HT-29 de celule umane de adenocarcinom de colon (fig. 4) încorporează semnificativ compusul P4.2, într-o manieră similară cu linia de celule monocitare SC. Aceste date justifică faptul că celulele tumorale sunt selectiv sensibile la fotosensibilizare cu compusul P4.2. Încorporarea compusului P4.2 în monocitele SC ar putea determina afectarea răspunsului imun de către PDT. În același timp, recrutarea monocitelor la nivelul tumorii ar putea mări semnificativ încărcarea cu fotosensibilizator (compusul P4.2) a tumorii, crescând astfel eficacitatea PDT. Deși unele celulele normale (monocitele) și celulele tumorale par să încorporeze similar compusul P4.2, acesta poate realiza uciderea selectivă a celulelor tumorale atunci când este activat cu lumina de lungime de undă specifică (PDT), fără a afecta dramatic celule normale adiacente sau pe cele din circulație, având în vedere că activarea cu lumină a fotosensibilizatorului se realizează prin iluminarea înalt țintită cu lumina laser doar a tumorii.

Exemplul 4*Biocompatibilitatea derivatului porfirinic*

Biocompatibilitatea derivatului porfirinic P4.2 a fost testată pe diverse linii celulare umane normale (linia celulară de fibroblaste dermice HS27, linia celulară de keratinocite HaCaT, linia de celule monocitare SC). Celulele au fost încărcate cu porfirină P4.2 (2,5-20 μ M) timp de 48 h. Biocompatibilitatea derivatului porfirinic P4.2 a fost investigată relativ la numărul de celule metabolic active (testul reducerii MTS), și relativ la integritatea membranară (testul eliberării LDH).

Datele experimentale arată ca viabilitatea/proliferarea keratinocitelor HaCaT nu este scăzută în urma încărcării lor cu compusul P4.2 (fig. 5a) timp de 48 h, având în vedere faptul că reducerea MTS de către celulele tratate cu diverse concentrații de compus nu este scăzută semnificativ comparativ cu reducerea MTS de către solventul PEG 200. La concentrații mari (20 μ M), porfirina P4.2 susține metabolismul celulelor HaCaT ($P < 0,05$, comparativ cu solventul). Compusul P4.2 nu modifică statistic semnificativ eliberarea LDH (fig. 5b), ceea ce arată că integritatea membranei plasmatică nu este afectată de încărcarea celulelor HaCaT cu compusul P4.2. În cazul liniei de fibroblaste dermice umane normale HS27, la concentrații mai mici de 20 μ M a derivatului porfirinic P4.2 nu este afectată reducerea MTS și implicit numărul de celule metabolic active (fig. 6a). Pentru concentrații mari (20 μ M), porfirina P4.2 reduce numărul de fibroblaste metabolic active ($P < 0,05$ comparativ cu solventul PEG 200). Având în vedere faptul că P4.2 nu modifică eliberarea LDH (fig. 6b), se poate afirma că reducerea numărului de celule metabolic active nu este asociată cu moartea celulară, ci cu o scădere a proliferării fibroblastelor sau a unor procese metabolice care susțin reducerea MTS. La concentrații mai mici (10 μ M) compusul P4.2 afectează numărul de celule monocitare umane din linia SC (fig. 7), având în vedere scăderea statistic semnificativă a reacției de reducere a MTS ($P < 0,001$) la 73% comparativ cu controlul de solvent.

În cazul celulelor monocitare nu s-au putut interpreta datele de eliberare a LDH, datorită nivelului extrem de scăzut de enzimă LDH eliberată de aceste celule. Datele experimentale evidențiază biocompatibilitatea compusului P4.2 dizolvat în PEG200 relativ la keratinocitele umane HaCaT, fibroblastele dermice umane HS27 și celulele monocitare umane SC. Există totuși unele limitări de concentrație, respectiv 20 μ M în cazul fibroblastelor dermice și 10 μ M în cazul celulelor monocitare. Remarcăm în mod deosebit faptul că P4.2 poate altera răspunsul imun la concentrații relativ mari (20 μ M) prin perturbarea metabolică a monocitelor. Această constatare este cu atât mai relevantă cu cât, din punctul de vedere al PDT, compusul P4.2 va fi injectat intravenos. Astfel, va intra în circulație o doză mare de compus care poate afecta, cel puțin conform studiului *in vitro*, funcționalitatea monocitelor și implicit a sistemului imun [A. Parihar, T.D. Eubank, A. Doseff, *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2, 204-215].

Exemplul 5*Terapie fotodinamică in vitro*

A fost realizat un studiu preliminar pentru a testa proprietățile de fotosensibilizator ale derivatului P4.2. În acest scop, celulele monocitare umane din linia SC au fost încărcate 24 h cu derivat porfirinic în concentrație 10 μ M. Rezultatele obținute prin citometrie în flux au indicat o încărcare semnificativă a celulelor cu această concentrație de compus. Pentru activarea compusului P4.2 încorporat, celulele SC au fost iradiate cu lumina laser de 635 nm utilizând echipamentul de iradiere Modulight.

RO 132752 B1

1 A fost aplicată o doză de 15 J/cm^2 și iradiantă cu valorile de 25, 50 și 100 mW/cm^2 .
2 Parametrii de iradiere au fost aleși pe baza datelor din literatura de specialitate
3 referitoare la un compus relativ similar de pe piața farmaceutică, Foscan® [M.O. Senge, J.C.
4 **Brandt, Photochemistry and Photobiology, 2011, 87, 1240-1296; [http://www.ema.](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000318/WC500024392.pdf)**
5 **eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000318/WC500024392.pdf**].

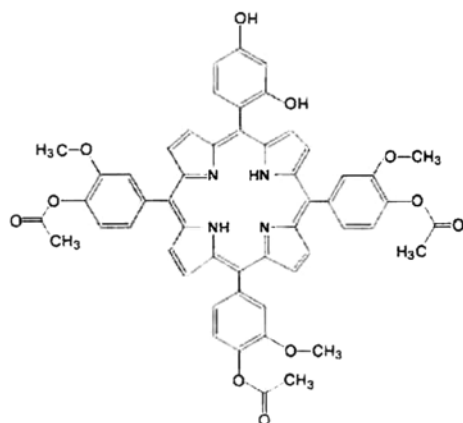
6 După iradiere, celulele au fost cultivate 24 h, după care s-a determinat numărul de
7 celule metabolic active în cultură cu ajutorul testului de reducere a MTS. Conform datelor
8 prezentate în fig. 8, expunerea celulelor SC la radiație laser de 635 nm reduce numărul de
9 celule metabolic active la iradiante cu valori de 50 și 100 W/cm^2 . PEG 200 (solventul în care
10 a fost dizolvat compusul P4.2) tinde să protejeze celule de acțiunea dăunătoare a expunerii
11 la lumina laser. 24 h post-iradiere, reacția de reducere a MTS a scăzut la aproximativ 55%
12 comparativ cu solventul PEG (fig. 8), ceea ce indică o scădere drastică a numărului de celule
13 SC metabolic active ($P < 0,05$). Remarcăm de asemenea faptul că iradianta de 50 mW/cm^2
14 pare să fie cea mai eficientă în inhibarea metabolică a celulelor SC.

15 Aceste date experimentale evidențiază faptul că derivatul porfirinic P4.2 are
16 proprietăți de fotosensibilizator și poate să fie dezvoltat pentru utilizare în teranostica
17 cancerului.

RO 132752 B1

Revendicări

1. Derivat porfirinic reprezentat prin formula structurală



având denumirea chimică 5-(2,4-dihidroxfenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil)porfirină.

2. Procedeu de obținere a derivatului porfirinic definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din etapele:

- iradiere cu microunde a unui amestec de 2,4-dihidroxibenzaldehidă, 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldehidă și pirol în raport molar de 1:3:4, pe suport de oxid de aluminiu neutru;

- dizolvarea produsului brut într-un amestec clorură de metilen/eter etilic în raport volumetric de 30:1, filtrare și concentrare prin distilare simplă a soluției obținute;

- separare și purificare a compusului 5-(2,4-dihidroxfenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirină, prin comatografie pe coloană și cromatografie în strat subțire.

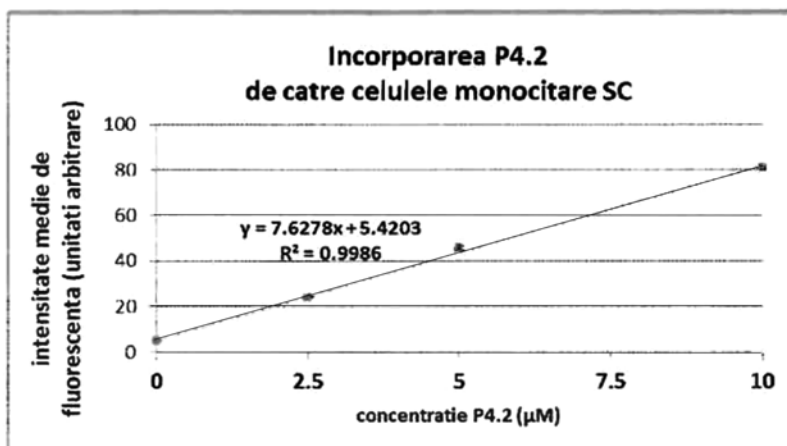
3. Derivat porfirinic definit în revendicarea 1, pentru utilizare ca fotosensibilizator prin activare cu lumina laser de 635 nm și ca agent teranostic.

(51) Int.Cl.

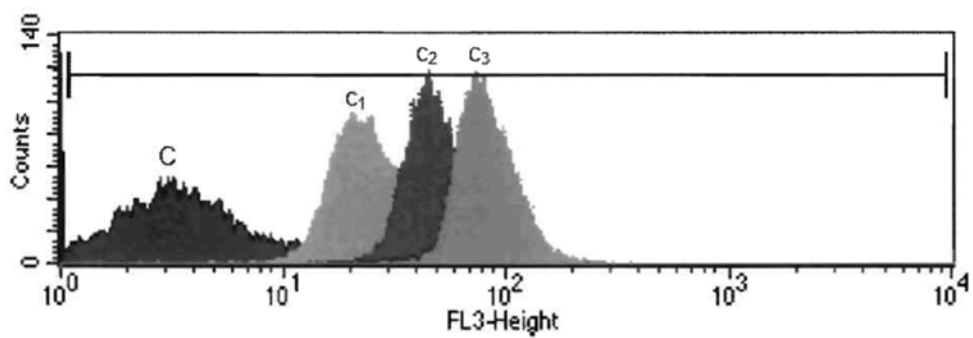
C07D 487/22 (2006.01);

A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)



a)



b)

Fig. 1

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);

A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)

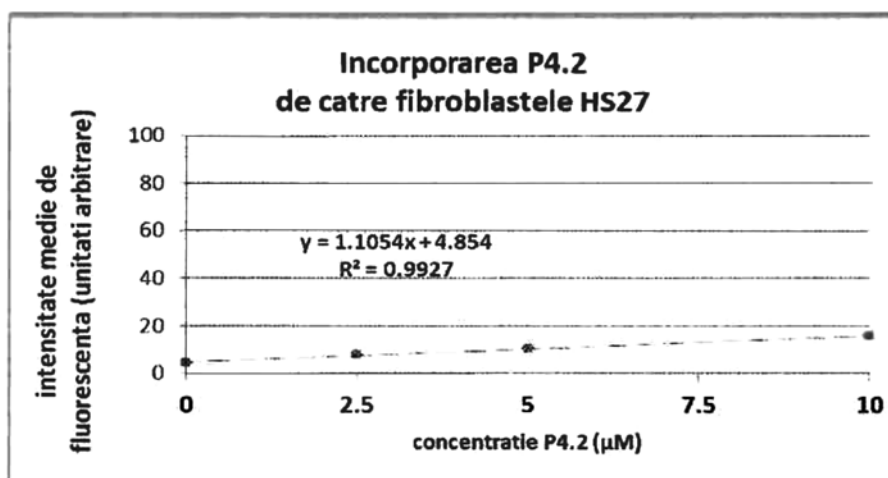
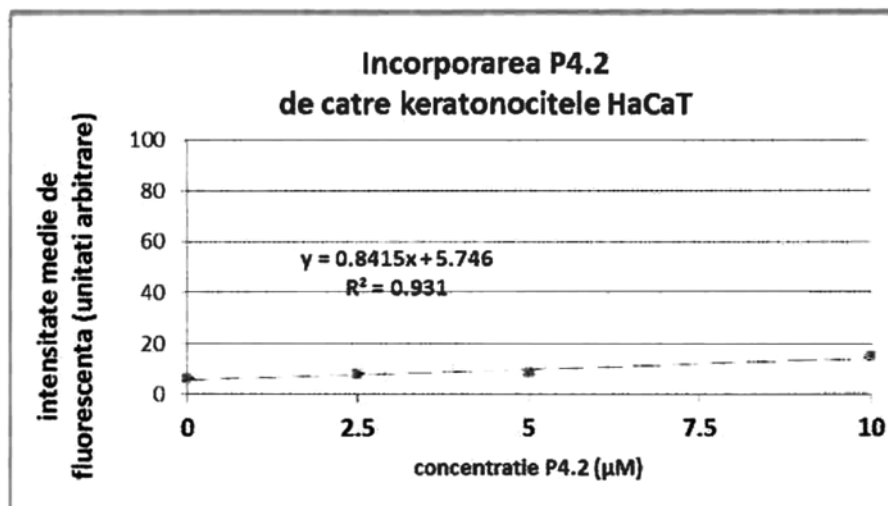


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);
A61K 49/10 (2006.01);
A61P 35/00 (2006.01)

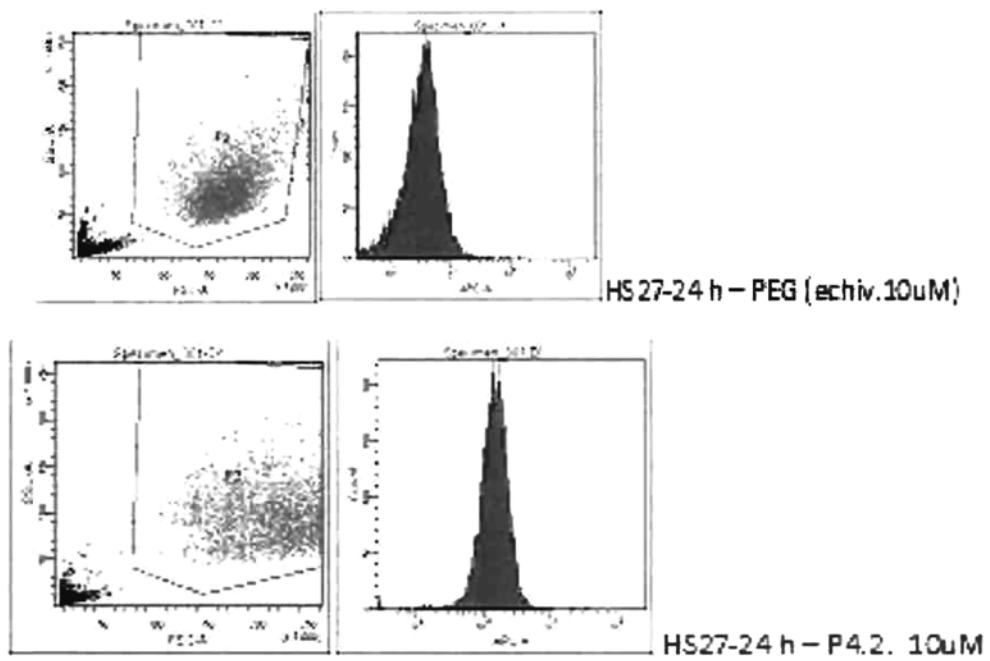


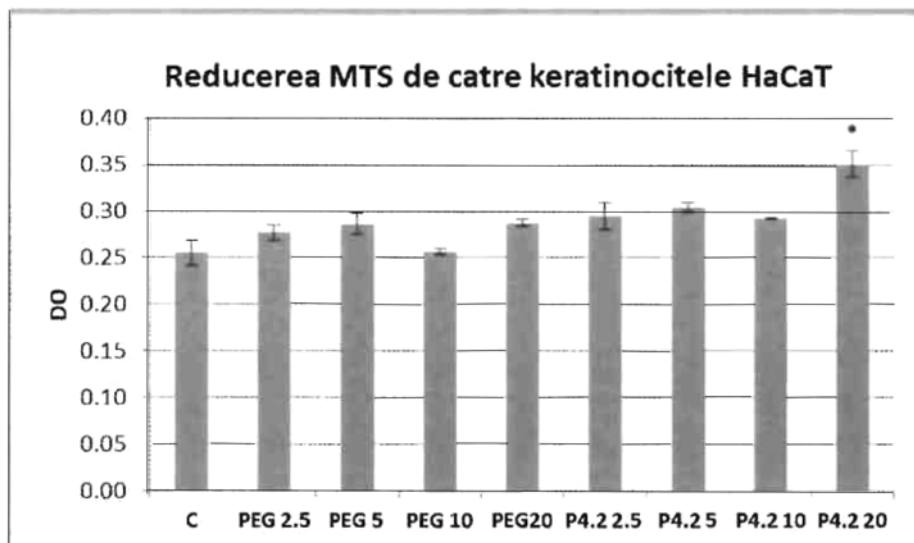
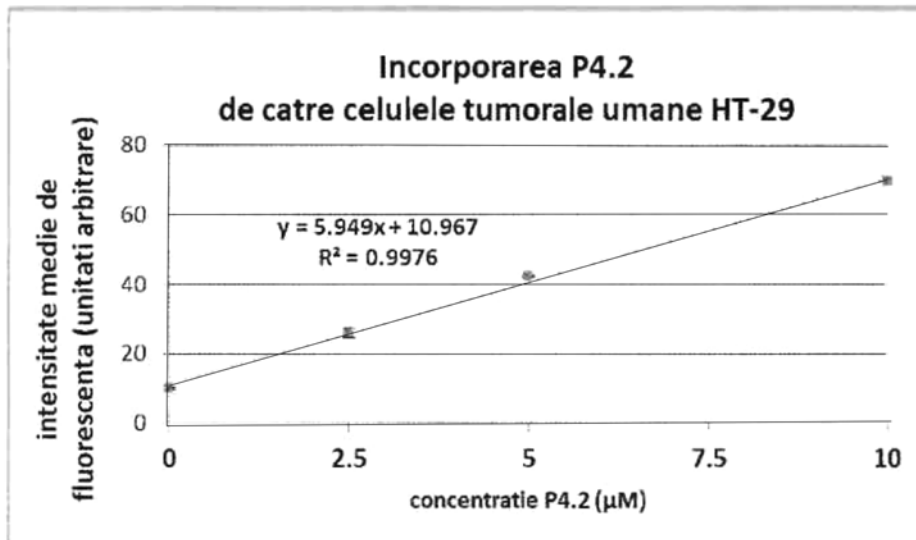
Fig. 3

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);

A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)



Reducerea MTS

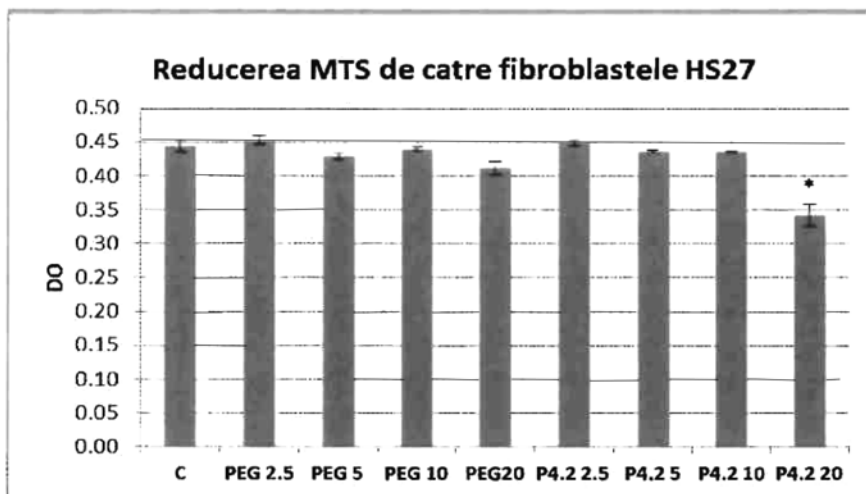
Fig. 4

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);

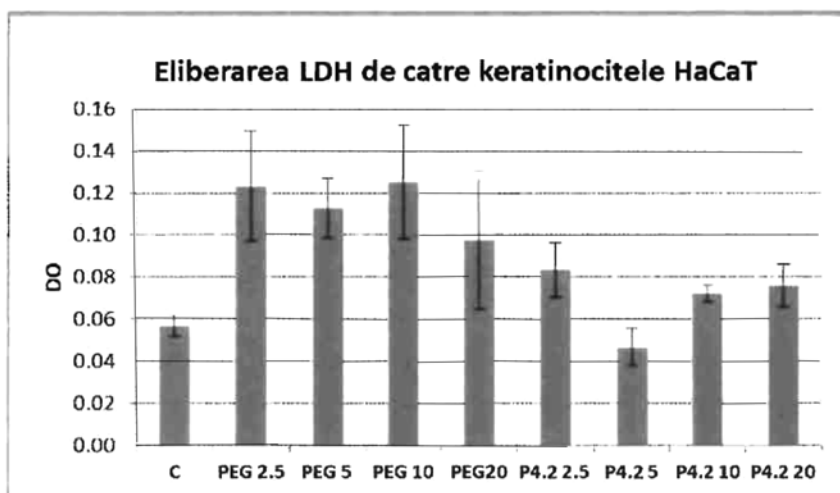
A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)



Reducerea MTS

a)



Eliberarea LDH

b)

Fig. 5

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);

A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)

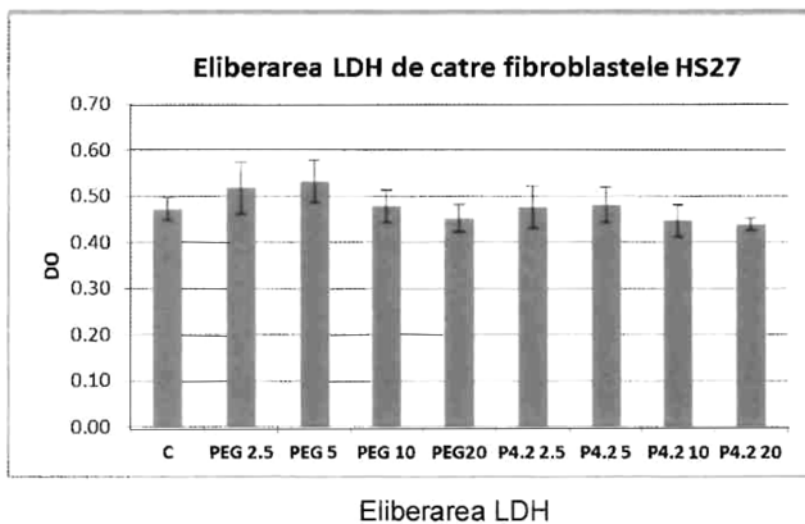


Fig. 6

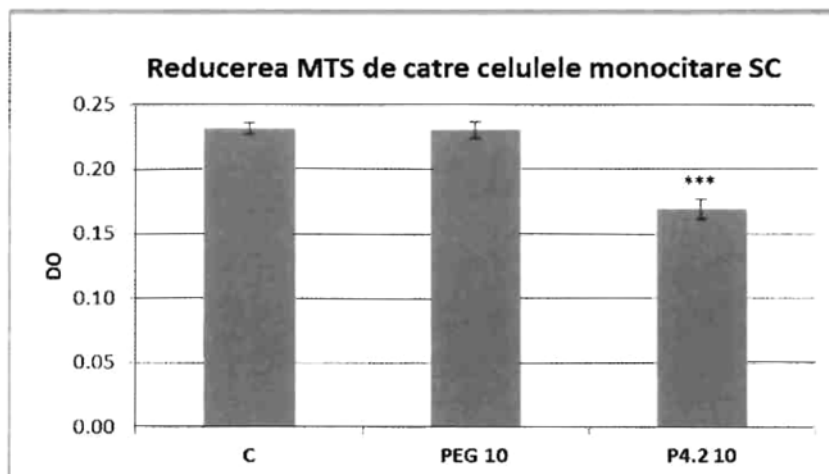


Fig. 7

(51) Int.Cl.

C07D 487/22 (2006.01);

A61K 49/10 (2006.01);

A61P 35/00 (2006.01)

1

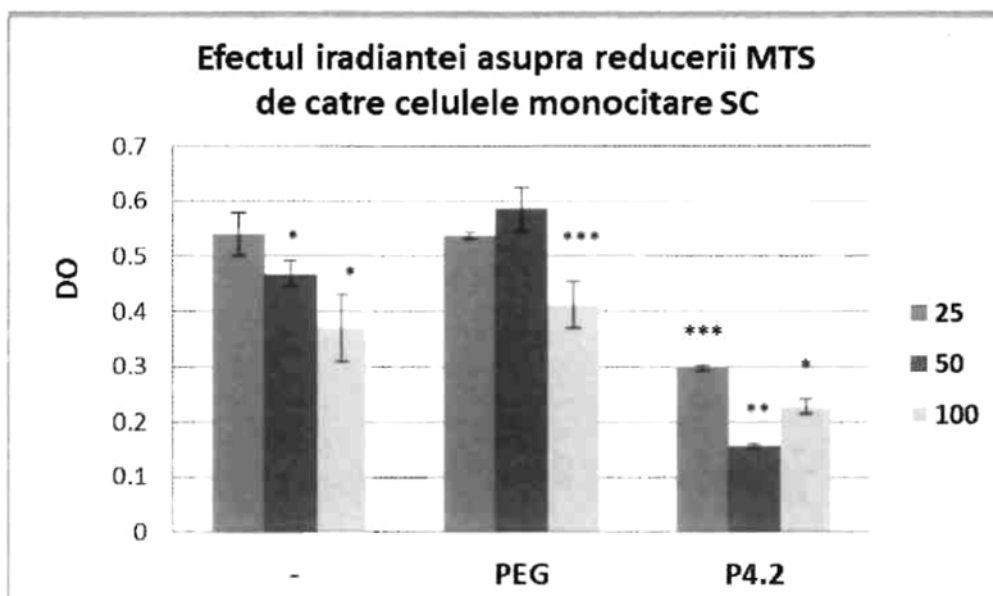


Fig. 8



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 446/2023