



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00799**

(22) Data de depozit: **27/11/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2020 BOPI nr. **9/2020**

(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.EUGEN IOSIF NR.9,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

• OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22, ET.
2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGOE IONELA VICTORIA,
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35,
SC. A, AP. 47, 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;
• VIEIRA FERREIRA LUIS FILIPE,
AV.ROVISCO PAIS 1096, LISABONA, PT;
• CUADRADO ANTONIO, AVE.CONDESA
DE CHINCHON 19, P12, BOADILLA DEL
MONTE, 28660, MADRID, ES;
• BASAGA SELMA HUYEYDA,
ORHANLI-TUZLA, 34956, ISTANBUL, TR

(54) **DERIVAT TETRAPIROLIC DESTINAT TERAPIEI
FOTODINAMICE ANTITUMORALE ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTUIA**

(57) Rezumat:

invenția se referă la un compus derivat tetrapirolic destinat terapiei fotodinamice antitumorale și la un procedeu de obținere a acestuia. Compusul, conform invenției, este 5-(hidroxi-5-metoxifenil) 10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina. Procedeu, conform invenției, constă în interacția în mediu anhidru a unui amestec format din pirol, 2-hidroxi-5-metoxi- benzaldehidă și metil 4-formil benzoat, în raport molar 4:1:3, pe suport solid de silicagel neutru, sub acțiunea microundelor, timp de 6 min, la 500 W, dizolvarea

produsului brut de reacție într-un amestec de clorură de metilen/eter etilic, urmată de filtrare, concentrare prin distilare a soluției de amestec de izomeri porfirinici și în final separarea izomerilor și purificarea cromatografică, rezultând derivatul porfirinic sub formă de cristale aciculare de culoare violet, cu un randament de 30%.

Revendicări: 3
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



48

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARC
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2019 00799
Data depozit 27 -11- 2019

Titlul invenției

DERIVAT TETRAPIROLIC DESTINAT TERAPIEI FOTODINAMICE ANTITUMORALE SI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA

Descrierea invenției

Invenția se referă la un derivat tetrapirolic de tip porfirinic destinat terapiei fotodinamice a tumorilor solide.

Invenția se referă la obținerea și evaluarea spectrală a unui derivat tetrapirolic cu potențial de agent fotosensibilizator pentru terapia fotodinamică a cancerului și la evaluarea biocompatibilității compusului la nivel celular.

Obiectivele actuale ale specialiștilor din domeniul farmaceutic și oncologic au ca prioritate identificarea și tratarea formațiunilor tumorale, prin dezvoltarea și implementarea de noi molecule cu proprietăți farmacologice excepționale și efecte adverse minime [J. Sandland, N. Malatesti, R. Boyle, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018, 23, 281–294].

Terapia fotodinamică care utilizează fotosensibilizatori macrociclici de tip tetrapirolic s-a dovedit o alternativă eficientă la terapiile antitumorale clasice (chirurgie oncologică, chimioterapie și radioterapie), reprezentând o variantă eficientă de terapie antitumorală țintită care poate fi personalizată [J. Sandland, N. Malatesti, R. Boyle, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018, 23, 281–294, R. Baskaran, J. Lee, S. G. Yang, *Biomaterials Research*, 2018, 22, 1-8, J. Zhang, C. Jiang, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018; 8, 37–146, J. Akimoto, S. Fukami, M. Ichikawa, A. Mohamed, M. Kohno, *Front. Surg.*, 2019, 6-12, S. Monro, L. K. Colón, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R. Thummel, L. Lilge, G. C. Cameron, A. S. McFarland, *Chem. Rev.*, 2019, 119, 797–828].

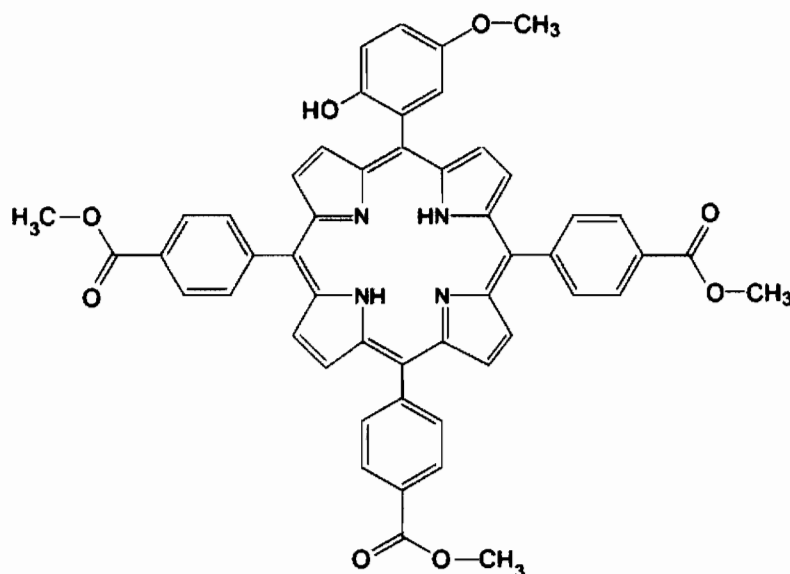
Datorită structurii lor versatile și profilului spectral adecvat unui fotosensibilizator, compușii macrociclici tetrapirolici de tip porfirinic sunt printre cei mai studiați în ceea ce privește potențialul lor antitumoral [J. Zhang, C. Jiang, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018; 8, 37–146].

Utilizarea moleculelor tetrapirolice ca substanțe active în terapia fotodinamică impune respectarea unor criterii legate de profilul structural (distribuție optimă a grupărilor

lipofile/hidrofile la periferia macrociclului tetrapirolic), care să permită internalizarea buna la nivelul masei tumorale, dar și de profilul spectral definit de absorbții optime a radiației luminoase la fotoactivare, asociat cu un randament cuantic bun în generarea oxigenului singlet ($\Phi_{\Delta} \geq 0,5$) și timpi de viață ai stării triplet de ordinul microsecundelor. Stabilitatea moleculei în condiții fiziologice, solubilitatea în solvenți acceptați pentru formularea farmaceutică, non toxicitate în absența luminii și pentru metabolizii fotosensibilizatorului, un clearance bun cu eliminare rapidă din organism, sunt cerințe impuse structurilor tetrapirolice destinate terapiei fotodinamice antitumorale [J. Sandland, N. Malatesti, R. Boyle, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018, 23, 281–294, P. C. Zhang, C. H. Hu, W. Ran, J. Meng, Q. Yin, Y.P. Li, *Theranostics*, 2016, 6, 948–968].

Problema tehnică constă în obținerea prin metode moderne, ecologice de sinteză organică de noi molecule tetrapirolice, caracterizate de un grad maxim de puritate și proprietăți adecvate unui fotosensibilizator.

Invenția are ca obiect furnizarea procedurii de obținere a unui derivat tetrapirolic destinat terapiei fotodinamice antitumorale și a rezultatelor obținute prin caracterizarea spectrală a compusului și evaluarea biocompatibilității acestuia la nivel celular.



5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina

Obținerea derivatului tetrapirolic s-a realizat în două etape utilizând iradierea cu microunde a amestecului format din pirol și benzaldehidele substituie (2-hidroxi-5-

metoxi-benzaldehida, metil 4-formil benzoat) in mediu anhidru, pe suport de silicagel neutru, sub actiunea microundelor, urmat de dizolvarea produsului brut in amestec clorura de metilen/eter etilic (50v/1v), filtrare si purificare prin cromatografie a compusului util.

Evaluarea biocompatibilității compusului tetrapirolic s-a realizat *in vitro*, utilizând celule tumorale de adenocarcinom uman de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™) și a urmărit incorporarea compusului în celule și potențialul citotoxic al acestuia.-

Avantajele aplicării invenției sunt:

- derivatul tetrapirolic de tip porfirinic obținut are o distribuție optimă a grupărilor functionale la periferia macrociclului tetrapirolic, design structural ce favorizeaza acumularea intracelulara a compusului
- procedeul de sinteza aplicat implică costuri reduse si se incadreaza in metodele ecologice de sinteza organica, caracterizate de randamente de reactie optime si impact redus asupra mediului
- tehnica aplicata si reactivii utilizati in etapa purificarii derivatului porfirinic permit o separare eficienta a acestuia, cu mentinerea profilului său structural si spectral.

Studiul de biocompatibilitate realizat *in vitro* pe celule tumorale umane din linia HT-29 (adenocarcinom uman de colon) a aratat ca celulele tumorale incorporează compusul porfirinic într-o manieră dependentă de concentrația acestuia in intervalul de concentrații 5μM -20μM. Compusul este biocompatibil în acest interval de concentrații si nu afecteaza semnificativ viabilitatea celulelor tumorale pe parcursul a 48 h de incubare în condiții de întuneric.

Sinteza derivatului tetrapirolic de tip porfirina asimetrica s-a realizat, prin reactia in mediu anhidru pe suport de silicagel neutru (Kieselgel 60, Merck, 200-500μm; 35-70 mesh), a amestecului format din pirol, 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehida si metil 4-formil benzoat. Conform unei variante preferate de realizare a procedeului conform invenției, in etapa 1) pirolul, 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehida si metil 4-formil benzoatul impreuna cu suportul de reactie (silicagelul neutru) se aduc in vasul de reactie si dupa omogenizare, amestecul se supune iradierii timp de 6 minute. In etapa 2), conform invenției, se realizeaza mai intai racirea produsului brut de reactie si dizolvarea acestuia in amestec de diclormetan/eter etilic (50v/1v) urmat de filtrare si concentrare prin

distilare a soluției ce conține amestecul de izomeri porfirinici. În etapa 2 s-a realizat separarea cromatografică a amestecului de izomeri tetrapirolici cu izolarea și purificarea compusului tetrapirolic cu structură asimetrică de tip A₃B, 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil)porfirina. Metodele de separare și purificare a compusului util au inclus cromatografia pe coloană (fază staționară silicagel 60H Merck) urmată de cromatografie în strat subțire (placi PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm), în ambele cazuri amestecul diclormetan/eter etilic 50v/1v a fost utilizat ca eluent.

Evaluarea spectrală a produsului util s-a realizat prin spectrometrie FT-IR, RMN, UV-Vis cu spectrometru cu transformată Fourier, de tip Bruker-Tensor 27, spectrometru de tip Bruker Avance DRX 400 (solventul utilizat a fost cloformul deuterat și ca referință semnalul tetrametilsilanului) și spectrometru UV-Vizibil Specord 200 (soluții ale derivatului porfirinic $c=2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ în polietilenglicol 200).

Soluțiile destinate evaluării *in vitro* la nivel celular, s-au preparat în concentrații inițiale de 10Mm, prin dizolvarea derivatului porfirinic în solventul PEG 200 (Sigma-Aldrich), solvent acceptat pentru formularea farmaceutică [J.M. Harris, R.B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2, 214–221].

Compusul porfirinic, dizolvat în PEG 200, a fost diluat în mediu de cultură imediat înainte de experiment la concentrațiile testate 5μM – 20μM. Pe tot parcursul experimentului, soluțiile de compus porfirinic au fost păstrate la întuneric pentru a evita activarea nedorită a fotosensibilizatorului ca urmare a expunerii acestuia la lumină. De asemenea, experimentele au fost realizate evitând expunerea directă a sistemelor experimentale la lumină. Celulele tumorale umane din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™) au fost menținute în cultură conform indicațiilor furnizorului (American Tissue and Cell Collection-ATCC) în mediu de cultură DMEM (Gibco) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (Biochrom) și soluție de antibiotic-antimicotic (Sigma-Aldrich, 100 unități de penicilină, 0,1 mg streptomycină și 0,25 μg amfotericină B). Celulele au fost menținute în cultura prin pasaj la 3-5 zile și au fost utilizate în experiment între pasajele 5 și 8. Celulele au fost însămânțate în plăci de cultură cu 24 sau 96 godeuri, în funcție de testul biologic, la o densitate de 23000 celule/cm². Celulele au fost lăsate să adere în plăci timp de 24 h, după care s-au realizat sistemele experimentale pentru evaluarea incorporării compusului în celule și a biocompatibilității acestuia.

Pentru evaluarea incorporării compusului în celulele tumorale umane HT-29, celulele aderate în plăci de cultură cu 24 godeuri au fost incubate timp de 24 h cu compusul porfirinic în intervalul de concentrații 5 μ M-20 μ M, într-un volum de 500 μ L. Proba control s-a realizat prin tratarea celulelor cu PEG 200 (solvent) la o concentrație similară cu cea din probele cu compus porfirinic. La finalul acestei perioade, celulele au fost spălate de două ori cu tampon fosfat salin (TFS, Gibco) pentru îndepărtarea compusului neincorporat în celule, după care celulele au fost desprinse din placa de cultură prin tripsinizare cu o soluție de 0.25%/0.02% Tripsină/EDTA (Biochrom). Tripsina a fost în final inactivată prin adăugarea a 5 mL de mediu de cultură suplimentat cu 10% SFB. Celulele detașate au fost spălate de două ori prin centrifugare cu tampon fosfat salin (TFS, Gibco) rece și au fost apoi resuspendate în Live Cell Imaging Solution (Thermo Fisher Scientific). Evaluarea incorporării compusului porfirinic în celule s-a realizat prin citometrie în flux pe baza proprietăților de fluorescență ale compusului. Citirea probelor s-a realizat la un citometru în flux (BD FACSCanto, Becton Dickinson), utilizând pentru excitare un laser de 488 nm, iar emisia a fost înregistrată în canalul de fluorescență FL3 (roșu). Au fost achiziționate date pentru minim 10000 de evenimente în fiecare probă. Datele au fost prelucrate cu ajutorul programului DIVA 6 (Becton Dickinson). Rezultatele au fost exprimate ca intensitate medie de fluorescență (medie geometrică a datelor de la toate evenimentele achiziționate într-o probă) și au fost exprimate ca unități de fluorescență arbitrară.

Pentru evaluarea biocompatibilității compusului porfirinic, celulele tumorale HT-29 au fost cultivate în plăci de cultura cu 96 godeuri, în 100 μ L mediu de cultură complet, în absența sau în prezența compusului porfirinic sau a solventului (PEG 200). Tratarea celulelor cu compus porfirinic sau cu solvent s-a realizat pentru un timp de 48 h care este considerat suficient pentru evidențierea potențialelor efecte citotoxice ale compusului sau ale solventului.

Evaluarea biocompatibilității s-a realizat prin determinarea viabilității și a mortalității celulare prin metodele prezentate mai jos. Testul reducerii MTS a fost utilizat ca test de viabilitate pentru evaluarea numărului de celule metabolic active în cultură. Determinările s-au realizat cu kitul CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation), aplicând protocolul recomandat de

producator (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>). După încheierea timpului de incubare cu compus a celulelor tumorale (48 h), în fiecare proba s-au adăugat 20 μ L din reactivul kitului. Celulele au fost incubate încă 2h la 37°C, în atmosfera de 5% CO₂, pentru a permite dezvoltarea reacției de reducere a MTS de către celulele metabolic active din cultură. În final, s-a măsurat densitatea optica (DO) a probelor și controalelor la lungimea de unda 490 nm fata de lungimea de undă de referință de 620 nm. Citirea absorbantei s-a realizat la un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevăzut cu program de analiza a datelor. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea DO corespunzătoare probelor acelulare utilizate pentru determinarea fondului (compus porfirinic sau solvent în mediu de cultură, sau mediu de cultură ca atare). 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 mortalității celulare, evidențiind potențialul efect citotoxic al compusului porfirinic. A fost utilizat kitul colorimetric *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation)*, aplicând protocolul recomandat de producător (<https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/>). Sistemele experimentale au fost realizate similar cu cele de la testul reducerii MTS descris mai sus. La sfârșitul experimentului, din fiecare probă s-au recoltat 50 μ L din supernatantul de cultură, peste care s-au adăugat 50 μ L din reactivul kitului. Probele au fost incubate 30 min la temperatura camerei, la întuneric, pentru a permite dezvoltarea reacției LDH. Stoparea reacției s-a realizat cu reactivul special din kit. Intensitatea reacției LDH s-a măsurat la un cititor ELISA (Tecan Sunrise), prevăzut cu program de analiza a datelor, determinându-se densitatea optica (DO) a probelor și controalelor la lungimea de unda 490 nm. DO a fost corectată în probele celulare prin scăderea DO a probelor acelulare (compus porfirinic sau solvent în mediu de cultură, sau mediu de cultură ca atare). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard a mediei (SEM) pentru triplicate de probă.

Descrierea desenelor:

- figura 1 prezintă internalizarea compusului porfirinic fluorescent ($5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$) în celule tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin citometrie în flux ca intensitate medie de fluorescența celulară utilizând programul DIVA 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă;

- figura 2 prezintă eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) în supernatantul de cultură pe parcursul celor 24 h de incubare a celulelor tumorale de adenocarcinom uman de colon (ATCC® HTB-38™) cu compusul porfirinic ($5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$). Rezultatele sunt prezentate ca absorbantă (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

- figura 3 prezintă efectul exercitat *in vitro* de compusul porfirinic asupra viabilității celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin testul reducerii MTS. Celulele tumorale au fost incubate cu compus porfirinic ($5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$) timp de 48 h. Rezultatele sunt prezentate ca absorbantă (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

- figura 4 prezintă efectul exercitat *in vitro* de compusul porfirinic asupra mortalității (integritatea membranei plasmatică) celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin testul eliberării LDH. Celulele tumorale au fost incubate cu compus porfirinic ($5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$) timp de 48 h. Rezultatele sunt prezentate ca absorbantă (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

Invenția este ilustrată prin 4 exemple nelimitative de realizare.

EXEMPLUL 1

Etapa 1

Sinteza 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirinei

Procedeeul de obtinere al derivatului tetrapirolic 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina a fost inițiat de interacția în mediu anhidru, a amestecului format din pirol, 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehida și metil 4-formil benzoat în raport molar 4:1:3, interacție realizată pe suport solid de silicagel neutru (Kieselgel 60, Merck, 200-500 μm ; 35-70 mesh) sub acțiunea microundelor timp de 6 minute la 500W, utilizând un sintetizator de tip Biotage Initiator+. Gradul de interacție al benzaldehidelor substituie cu

moleculele de pirol a fost monitorizat prin spectrometrie UV-Vis, profilul spectrelor de absorbție moleculară indicând prezența în sistemul de reacție a componentelor de tip porfirinic. În plus, stabilirea parametrilor asociați procedurii de purificare s-a realizat prin teste de cromatografie în strat subțire a probelor prelevate din amestecul de reacție.

Etapa 2

Purificarea 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirinei

Separarea și purificarea derivatului tetrapirolic cu structura porfirinică asimetrică, 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina, s-a realizat prin dizolvarea produsului brut de reacție în amestecul format de clorura de metilen/eter etilic (50v/1v), urmată de filtrare și concentrare prin distilare a soluției ce conține amestecul de izomeri porfirinici și în final de separarea izomerilor prin cromatografie pe coloană (fază staționară silicagel 60H Merck) și cromatografie în strat subțire (placi PLC silica gel 60, 2mm, 20x20cm) în amestecul diclormetan/eter etilic 50v/1v a fost utilizat ca eluent. Procedura de sinteză aplicată a furnizat un amestec brut ce conține 6 izomeri de cu structuri tetrapirolice și distribuție diferită a substituenților periferici macrociclului porfirinic (izomeri de tip A_4 , A_3B , A_2B_2 (*cis*), A_2B_2 (*trans*), AB_3 , B_4); separarea și purificarea cromatografică a permis obținerea derivatului porfirinic 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina sub formă de cristale aciculare de culoare violet, cu un randament de 30%.

EXEMPLUL 2

Evaluarea spectrală a compusului 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil)porfirina

Rezultatele obținute prin analiza spectrală RMN, FT-IR și UV-Vis a derivatului tetrapirolic sunt prezentate prin valori ale deplasărilor chimice δ_H (ppm), ale vibrațiilor de valență și vibrațiilor de deformare asociate legăturilor chimice din structura porfirinică, completate de valori ale maximelor de absorbție (λ_{max}) înregistrate pentru soluții de concentrație $2,5 \times 10^{-6} M$ (solvent PEG 200) ale acestui compus.

1H -NMR, δ_H (400 MHz, $CDCl_3$), ppm: -2.80 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 4.11 (s, 9H), 6.76 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.90 (d, 1H), 8.30 (d, 6H), 8.46 (d, 6H), 8.82 (d, 6H); 8.95 (d, 2H).

IR(cm^{-1}): 3410, 3308, 2924, 2850, 1715, 1610, 1505, 1434, 1273, 986, 868, 798, 758.

UV-Vis (soluții în PEG 200) λ_{max} (nm): 403.2, 494.4, 528.5, 569.0, 626.2.

EXEMPLUL 3

Internalizarea compusului porfirinic în celulele tumorale umane din linia HT-29

Incorporarea compusului porfirinic în celulele tumorale umane din linia HT-29 (adenocarcinom de colon) pe parcursul a 24 h a fost determinată prin citometrie în flux ca intensitate medie de fluorescență, pe baza proprietăților fluorescente ale compusului. Datele experimentale descrise în Figura 1, arată că celulele tumorale încorporează compusul porfirinic într-o manieră dependentă de concentrația acestuia (dependență liniară) în intervalul de concentrații $5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$. În acest interval de concentrații, cu relevanță farmaceutică, nu se înregistrează saturarea abilității celulelor de a internaliza compusul porfirinic (Figura 1). Incorporarea compusului porfirinic în celulele tumorale nu afectează integritatea membranei plasmatică a acestora, având în vedere rezultatele descrise în Figura 2 care arată că expunerea celulelor la compus nu afectează semnificativ eliberarea LDH pe parcursul celor 24 h de tratare a celulelor tumorale cu compus.

EXEMPLUL 4

Biocompatibilitatea compusului porfirinic față de celulele tumorale din linia HT-29

Biocompatibilitatea compusului porfirinic a fost testată pe linia celulară de adenocarcinom uman de colon HT-29.

Celulele au fost tratate cu compusul porfirinic ($5\mu\text{M}$ – $20\mu\text{M}$) timp de 48h. Biocompatibilitatea compusului a fost investigată privind viabilitatea celulară (numărul de celule metabolic active în cultură) prin testul reducerii MTS, ca și privind mortalitatea celulară, evaluată prin testul eliberării LDH.

Datele experimentale arată că viabilitatea celulelor tumorale HT-29, evaluată prin testul reducerii MTS, nu este semnificativ afectată de incubarea la întuneric timp de 48 h a celulelor tumorale cu compusul porfirinic în domeniul de concentrații $5\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$ (Figura 3). Se înregistrează doar o scădere ușoară a intensității reducerii MTS, cu 9% în cazul tratării celulelor cu compus porfirinic la concentrația de $10\mu\text{M}$ ($p > 0.05$ față de celulele netratate și $p = 0.024$ față de proba echivalentă de solvent) și cu 5% în cazul

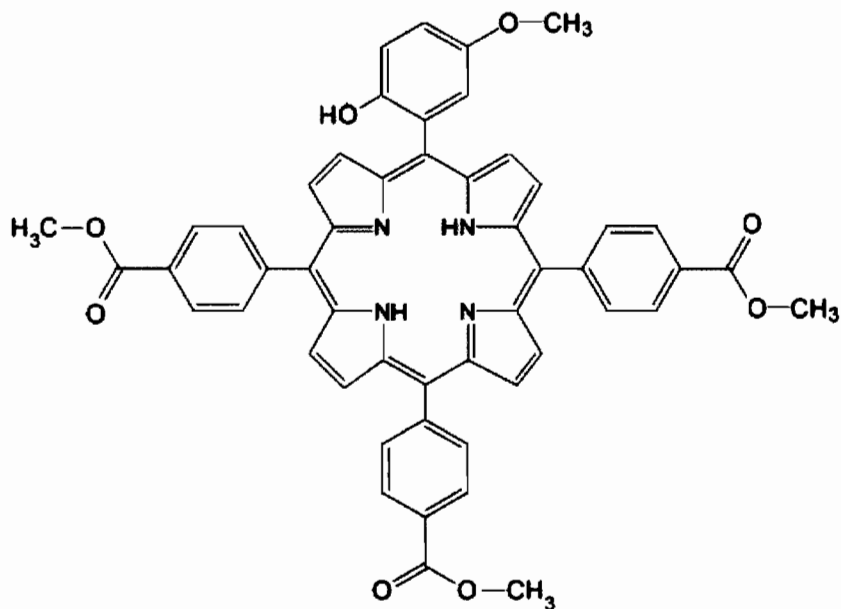
tratării celulelor cu compus porfirinic la concentrația de 20 μM ($p > 0.05$ față de celulele netratate și $p = 0.11$ față de proba echivalentă de solvent). Solventul (PEG 200) la concentrațiile corespunzătoare celor din preparatul de compus porfirinic, nu afectează intensitatea reducerii MTS și implicit nici viabilitatea celulară.

Rezultatele obținute prin testul eliberării LDH din celule (Figura 4), care reflectă integritatea membranei plasmatică a celulelor, au arătat faptul că solventul utilizat (PEG 200) stabilizează membrana celulelor tumorale HT-29 (diminuează eliberarea LDH), în special la concentrațiile joase. Acest efect de stabilizare se transferă și la probele celulare tratate cu compus porfirinic. La concentrațiile de 10 μM și 20 μM , compusul porfirinic nu induce eliberare de LDH semnificativ mai mare comparativ cu solventul (Figura 4). Remarcăm totuși faptul că, la concentrații mai joase (5 μM) la care solventul exercită un efect de stabilizare a membranei plasmatică, compusul porfirinic intensifică eliberarea de LDH comparativ cu solventul ($p = 0.02$) dar valorile eliberării de LDH rămân în limitele corespunzătoare celulelor netratate.

Coroborând rezultatele privind efectul compusului porfirinic asupra viabilității (Figura 3) și a mortalității (Figura 4) celulelor tumorale umane din linia HT-29, apreciem că incorporarea compusului în celule nu afectează semnificativ viabilitatea acestora în condiții de întuneric, ceea ce demonstrează o bună biocompatibilitate a compusului.

REVENDICĂRI

1. Derivat tetrapirolic cu următoarea structură chimică



5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil) porfirina

2. Procedul de obținere pentru derivatul tetrapirolic definit ca în revendicarea 1
3. Derivatul tetrapirolic definit ca în revendicarea 1, demonstrează calități de fotosensibilizator destinat terapiei fotodinamice antitumorale.

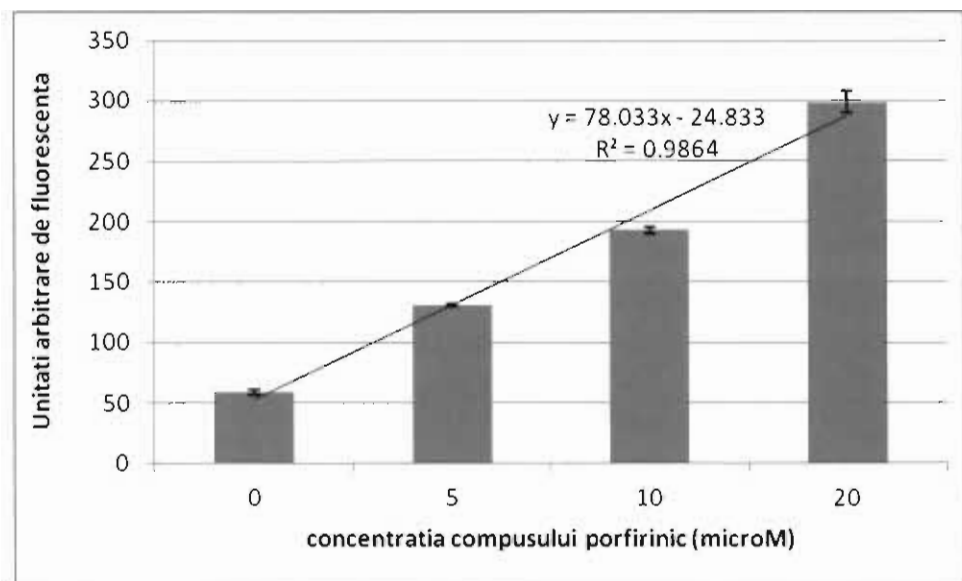


Figura 1. Internalizarea compusului porfirinic fluorescent (5 μM - 20 μM) pe parcursul a 24h, în celule tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin citometrie în flux ca intensitate medie de fluorescență celulară (unități arbitrare de fluorescență), utilizând programul DIVA 6 (Becton Dickinson). Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

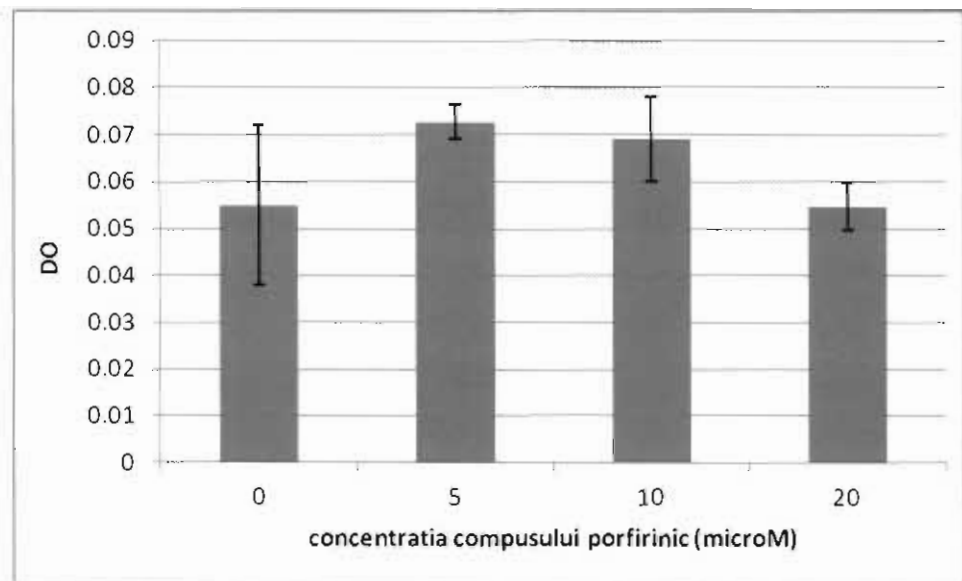


Figura 2. Eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) în supernatantul de cultură pe parcursul a 24 h de incubare a celulelor tumorale de adenocarcinom uman de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™) cu compusul porfirinic (5 μ M - 20 μ M). Rezultatele sunt prezentate ca absorbantă (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

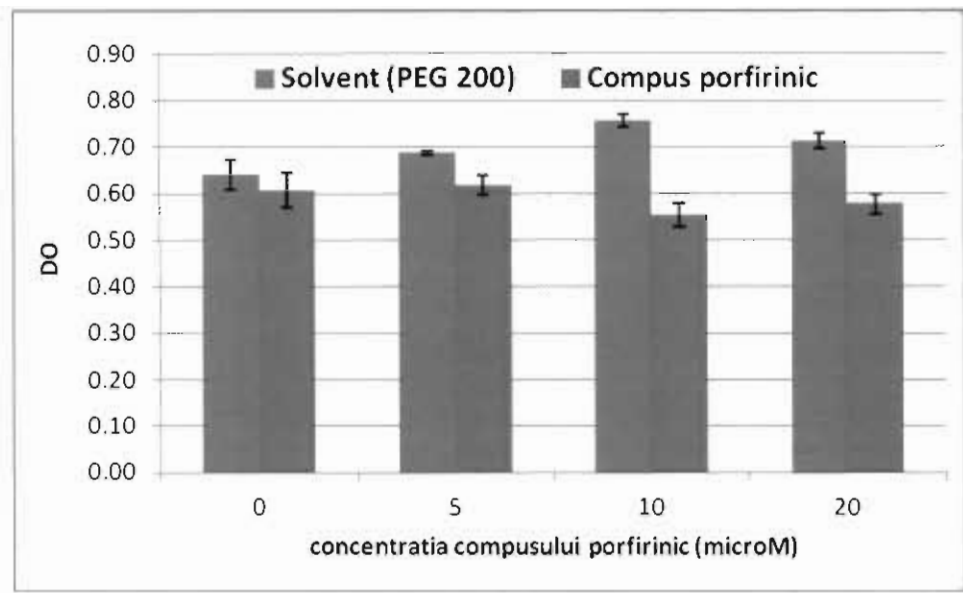


Figura 3. Efectul exercitat *in vitro* de compusul porfirinic asupra viabilității celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin testul reducerii MTS, comparativ cu solventul utilizat (PEG 200). Celulele tumorale au fost incubate cu compus porfirinic (în domeniul de concentrații 5 μ M - 20 μ M) timp de 48 h. Rezultatele sunt prezentate ca absorbanță (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

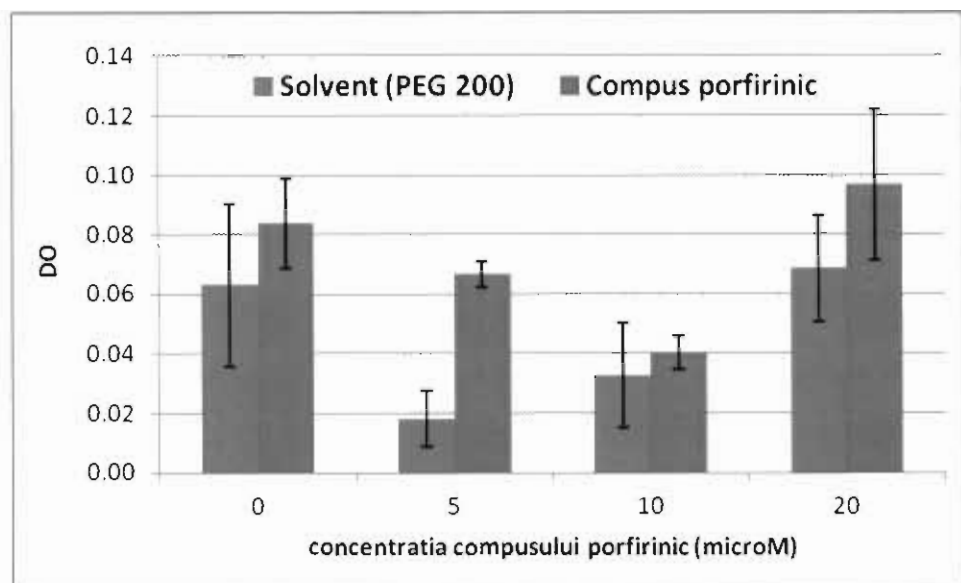


Figura 4. Efectul exercitat *in vitro* de compusul porfirinic asupra mortalității celulelor tumorale umane de adenocarcinom de colon din linia HT-29 (ATCC® HTB-38™), evaluată prin testul eliberării, comparativ cu solventul utilizat (PEG 200). Celulele tumorale au fost incubate cu compus porfirinic (în domeniul de concentrații 5 μ M - 20 μ M) timp de 48 h. Rezultatele sunt prezentate ca absorbanță (DO), valoare medie \pm SEM pentru triplicat de probă.