



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU⁽¹¹⁾ 2 193 563⁽¹³⁾ C2
(51) МПК⁷ C 07 D 487/22, A 61 K 31/409,
49/00

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2000103198/14, 11.02.2000

(24) Дата начала действия патента: 11.02.2000

(46) Опубликовано: 27.11.2002

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2106146 C1, 10.03.1998. US 5166197 A, 24.11.1992. US 5556849 A, 17.09.1996. US 3301814 A, 31.01.1967.

Адрес для переписки:
103787, Москва, ГСП-3, ул. Б.Садовая, 1,
корп.4, ГНЦ РФ "НИОПИК"

(71) Заявитель(и):
Государственный научный центр Российской Федерации "НИОПИК"

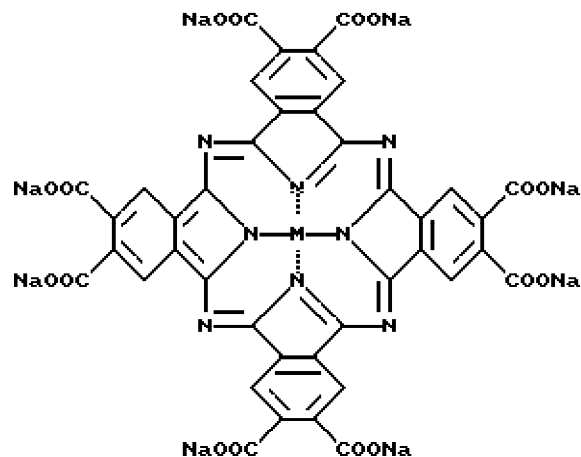
(72) Автор(ы):
Ворожцов Г.Н.,
Казачкина Н.И.,
Лужков Ю.М.,
Кузнецова Н.А.,
Лукьянец Е.А.,
Михаленко С.А.,
Печерских Е.В.,
Соловьева Л.И.,
Чиссов В.И.,
Якубовская Р.И.

(73) Патентообладатель(ли):
Государственный научный центр Российской Федерации "НИОПИК"

(54) ОКТА-4,5-КАРБОКСИФТАЛОЦИАНИНЫ КАК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается применения окта-4,5-карбокситфаллоцианинов алюминия или цинка формулы



где M = AlOH, Zn, в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Предлагаемые фотосенсибилизаторы обладают увеличенной селективностью накопления в опухолевой ткани. 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 193 563** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 D 487/22, A 61 K 31/409,**
49/00

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2000103198/14, 11.02.2000**

(24) Effective date for property rights: **11.02.2000**

(46) Date of publication: **27.11.2002**

Mail address:

**103787, Moskva, GSP-3, ul. B.Sadovaja, 1,
korp.4, GNTs RF "NIOPIK"**

(71) Applicant(s):

**Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr Rossijskoj
Federatsii "NIOPIK"**

(72) Inventor(s):

**Vorozhtsov G.N.,
Kazachkina N.I.,
Luzhkov Ju.M.,
Kuznetsova N.A.,
Luk'janets E.A.,
Mikhajlenko S.A.,
Pecherskikh E.V.,
Solov'eva L.I.,
Chissov V.I.,
Jakubovskaja R.I.**

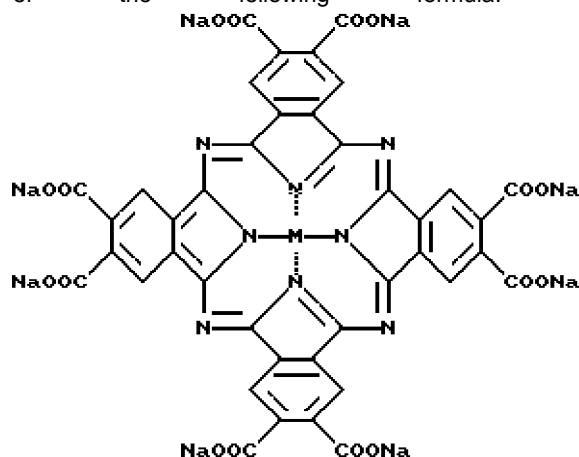
(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr Rossijskoj
Federatsii "NIOPIK"**

(54) **OCTA-4,5-CARBOXYPHthalOCYANINES AS PHOTOSENSITIZING AGENTS FOR
PHOTODYNAMIC THERAPY**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, medicine, oncology.
SUBSTANCE: invention relates to the use of
aluminum or zinc octa- 4,5-carboxyphthalocyanine
of the following formula:



where M means AlOH, Zn that are used as
photosensitizing agents in photodynamic therapy.
Proposed photosensitizing agents show the
enhanced selectivity of accumulation in tumor
tissue. EFFECT: valuable medicinal property of
agents. 3 tbl, 2 ex

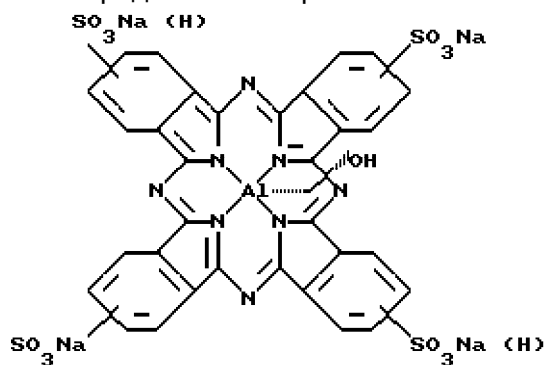
RU 2 1 9 3 5 6 3 C 2

RU 2 1 9 3 5 6 3 C 2

Изобретение относится к фармацевтической химии, а более конкретно к препаратам для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей и других патологических новообразований.

Метод ФДТ основан на использовании фотосенсибилизаторов, которые при введении в организм локализуются преимущественно в опухоли, а при световом, в частности лазерном возбуждении, продуцируют цитотоксические вещества, прежде всего синглетный кислород. В настоящее время в клинической практике применяются фотосенсибилизаторы на основе сложных смесей производных гематопорфирина, например Fotofrin-II (E. Sternberg, D. Dolphin, C. Bruckner. Tetrahedron, 54, 4151 (1998)). Недостаток этих фотосенсибилизаторов заключается в том, что их коэффициент экстинкции в наиболее длинноволновой полосе (620-640 нм) относительно невысок, в то время как поглощение несенсибилизированных тканей в этой области весьма значительно. Это уменьшает глубину проникновения излучения в ткани, что затрудняет лечение опухолей больших размеров и требует увеличения доз вводимого в организм препарата и терапевтического излучения.

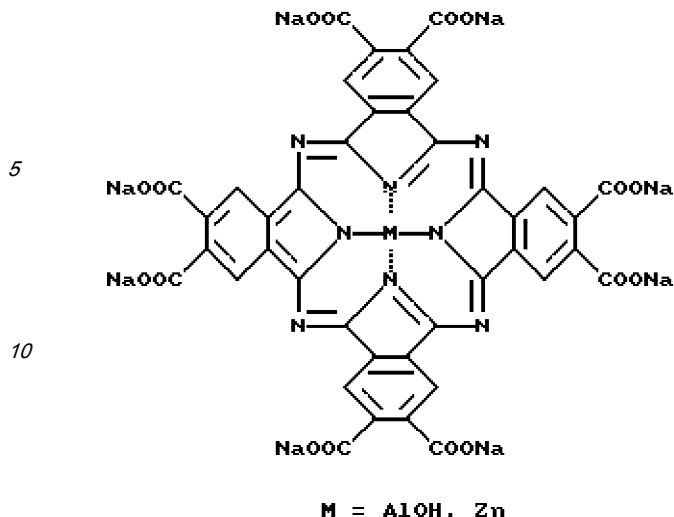
Эти недостатки частично устраняются при использовании для ФДТ фотосенсибилизатора - сульфированного фталоцианина алюминия ("Фотосенса"), поглощающего в спектральном диапазоне 660-680 нм с коэффициентом экстинкции в максимуме, превышающем $10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Поглощение несенсибилизированных тканей в диапазоне 660-680 нм падает, при этом растет глубина фотодинамического воздействия на ткани, что позволяет в целом повысить эффективность ФДТ. Этот препарат наиболее близок к предлагаемым фотосенсибилизаторам и поэтому выбран в качестве аналога:



"Фотосенс"

Однако "Фотосенс" обладает все же недостаточно высоким контрастом накопления в опухолевой ткани, следовательно, весьма высокой величиной используемой дозы (0,5-0,8 мг на кг веса тела), следствием чего является, учитывая малую скорость его выведения из организма, наличие у него нежелательной кожной токсичности.

Задачей предлагаемого изобретения является изыскание новых фотосенсибилизаторов, которые обладали бы увеличенной селективностью накопления в опухолевой ткани, не уступая в эффективности "Фотосенсу" по другим показателям. Для решения этой задачи в настоящем изобретении в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ предлагаются окта-4,5-карбокситефталоцианины алюминия и цинка (в виде их натриевых солей):



15 Известно применение эти соединений в качестве сшивающих агентов для получения термостойких эпоксидных смол (Пат.США 3301814,260-37,1967).

20 Окта-4,5-карбокситефталоцианины (PcC8) алюминия и цинка получены взаимодействием диангида пиромеллитовой кислоты с солями соответствующих металлов, например хлористым алюминием и ацетатом цинка, в присутствии мочевины с последующим гидролизом промежуточно образующихся тетраимидов PcC8. AlPcC8 получен гидролизом тетраимида кипячением в 20%-ной серной кислоте, а ZnPcC8 - в 15%-ном триэтиленгликолевом растворе едкого кали. Для выделения чистых мономеров PcC8 и их отделения от примесей димеров и олигомеров использована хроматографическая очистка их водных растворов на окиси алюминия. PcC8 переведены в их натриевые соли растворением в рассчитанном количестве водного едкого натра и последующим упариванием растворов досуха.

25 Пример 1. Получение окта-4,5-карбокситефталоцианина алюминия (AlPcC8)

Тетраимид окта-4,5-карбокситефталоцианина алюминия

30 Смесь 47,0 г (0,212 моль) диангида пиромеллитовой кислоты, 7,26 г безводного хлористого алюминия (0,0545 моль), 127,2 г (2,12 моль) сухой мочевины и 1 г молибдата аммония сплавляют в течение 3 ч при 215-220°C. Плав охлаждают до 80-90°C, прибавляют горячую воду и смесь кипятят 1 ч, суспензию фильтруют, осадок промывают на фильтре горячей водой, отжимают и кипятят с 10%-ной водной соляной кислотой. Соляно-кислую суспензию фильтруют горячей, осадок на фильтре промывают горячей водной соляной кислотой и горячей водой до нейтральной реакции. Соляно-кислую обработку повторяют дважды. Получают 30,1 г (68%) AlPcC8. ИК-спектр, таблетка KBr, см⁻¹: 1680, 1710, 1755 (C=O имидной группы).

35 Окта-4,5-карбокситефталоцианин алюминия

40 30,1 г измельченного тетраимида окта-4,5-карбокситефталоцианина алюминия прибавляют к 300 мл 20%-ной серной кислоты и кипятят при перемешивании в течение 72 ч. Суспензию фильтруют горячей, осадок на фильтре промывают горячей 5%-ной серной кислотой, затем горячей дистиллированной водой до нейтральной реакции, высушивают и получают 8.6 г технического AlPcC8, который измельчают и суспендируют в 100 мл дистиллированной воды и переводят в натриевую соль добавлением 1%-ного раствора едкого натра. Полученный раствор фильтруют и хроматографированием на окиси алюминия выделяют 2.65 г (8.1%) мономерного AlPcC8; 1.95 г смеси мономера и димера и 2.7 г олигомера. Мономер суспендируют в дистиллированной воде и добавлением 1%-ного раствора едкого натра до pH 8.9 переводят в натриевую соль. Раствор фильтруют, фильтрат упаривают досуха, сухой остаток измельчают, перемешивают с этанолом и высушивают при 106-110°C. Получают с количественным выходом октанатриевую соль AlPcC8.

45 Найдено, %: C 42.24; H 1,67; N 10,04.

50 C₄₀H₈N₈AlNa₈O₁₇•2H₂O.

Вычислено, %: С 42,04; Н 1,06; N 9,81.

$\lambda_{\text{макс}}$, нм, в фосфатном буфере (рН 8): 361, 614, 690.

Пример 2. Получение окта-4,5-карбокситфалоцианина цинка (ZnPcC8)

Тетраимид окта-4,5-карбокситфалоцианина цинка

5 Смесь 23.5 г (0.106 моль) диангидрида пиромеллитовой кислоты, 9.72 г безводного ацетата цинка (0.053 моль), 63.6 г (1.06 моль) сухой мочевины и 0.5 г молибдата аммония и 25 мл 1-бромнафталина перемешивают в течение 4 ч при 230-235°C в токе азота. Охлажденную реакционную массу фильтруют, осадок на фильтре промывают бензолом, остаток кипятят с водой, суспензию фильтруют, осадок на фильтре отжимают и кипятят 1 ч с 5%-ной водной соляной кислотой, фильтруют, обработку соляной кислотой повторяют дважды. Осадок на фильтре промывают горячей водой до нейтральной реакции, отжимают и кипятят 1 ч с 740 мл 4%-ного водного раствора аммиака, раствор охлаждают, подкисляют 5%-ной соляной кислотой, суспензию фильтруют, осадок промывают

10 последовательно 5%-ной соляной кислотой, кипятят горячей 5%-ной водной соляной кислотой, горячей дистиллированной водой, отжимают и высушивают. Выход очищенного имида 4.55 г (18.5%). ИК-спектр, таблетка KBr, см⁻¹: 1695, 1710, 1750 (C=O имидной группы).

Окта-4,5-карбокситфалоцианин цинка

15 30.1 г тетраимида ZnPcC8 прибавляют к раствору 21,6 г едкого кали в 127 мл триэтиленгликоля и нагревают при перемешивании в токе азота до 135°C и перемешивают 2 ч при этой температуре. Реакционную массу охлаждают, выливают в 10%-ный водный раствор соляной кислоты. Суспензию фильтруют, осадок на фильтре промывают горячей водной соляной кислотой, затем горячей дистиллированной водой до нейтральной реакции, отжимают и высушивают. Получают 3.05 г (61%) технического ZnPcC8, который очищают хроматографированием на окиси алюминия. Выход чистого мономера 1.75 г (37%).

25 Найдено, %: С 40,87; Н 1.50, N 10,65.

$C_{40}H_{16}N_8O_{20}Zn$.

Вычислено, %: С 40,78; Н 1,37, N 9.51.

$\lambda_{\text{макс}}$, нм, в фосфатном буфере (рН 8): 354, 618, 686.

30 Октанатриевая соль ZnPcC8 получена с количественным выходом аналогично.

Физико-химические свойства

Натриевые соли AlPcC8 и ZnPcC8 представляют собой прекрасно растворимые в воде соединения, малорастворимые в спиртах и неполярных органических растворителях. В электронном спектре их растворов в воде и в фосфатном буфере с физиологическим значением рН 7,4 наблюдается интенсивная длинноволновая полоса Q в области 690 нм с четко выраженными колебательными спутниками, что свидетельствует об образовании имидных, неагрегированных растворов (максимумы при 690 нм для AlPcC8 и 686 нм для ZnPcC8). Введение детергента Triton X-100 не приводит к изменению спектра, что подтверждает отсутствие агрегатов в растворе сенсibilизатора.

40 Для оценки эффективности AlPcC8 и ZnPcC8 как сенсibilизаторов были определены квантовые выходы синглетного кислорода (ϕ_{Δ}), высокая реакционная способность которого по отношению к биомолекулам в значительной мере определяет фототоксичность сенсibilизаторов в методе ФДТ.

45 Величины ϕ_{Δ} определяли относительно бенгальского розового в водном буферном растворе с рН 7.4. Акцептором синглетного кислорода служила растворимая в воде натриевая соль антрацен-9,10-диметил-бис(малоновой) кислоты, полученная по известному методу (Ю. Постовский, Н. Беднягина. ЖОрХ, 7, 2919 (1937)). Концентрация сенсibilизатора составляла $\sim 10^{-5}$ моль/л. Раствор красителя, содержащий $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л акцептора, помещали в стандартную кювету с толщиной оптического слоя 1 см и облучали светом лампы ДКСШ-150 в длинноволновую полосу поглощения сенсibilизатора через стеклянный светофильтр ЖС-18 и интерференционный фильтр с максимумом пропускания 550 нм для бенгальского розового (стандарт) и 700 нм для фталоцианинов. Интенсивность световых потоков определяли, используя измеритель мощности Spectra Physics 404, долю

поглощаемого образцом света рассчитывали интегрированием перекрывания спектров пропускания светофильтров и спектра поглощения красителей. Фотосенсибилизированное окисление акцептора синглетного кислорода контролировали спектрофотометрически по снижению поглощения в максимуме на длине волны 400 нм при толщине оптического слоя 0.05 см. Для расчета ϕ_{Δ} использовали соотношение:

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta}^{BP} \frac{w_{XI}^{BP}}{w_{BP}^{XI}},$$

где ϕ_{Δ}^{BP} - квантовый выход генерации синглетного кислорода бенгальским розовым в воде, равный 0.75 (D.C. Neckers. J. Photochem. Photobiol. A., 47, N 1 (1989)), w и w^{BP} - скорости расходования акцептора, сенсибилизированного MPcC8 либо бенгальским розовым соответственно, I - количество поглощенных сенсибилизатором в единицу времени квантов света.

Квантовые выходы ϕ_{Δ} составили 0.17 ± 0.03 для A1PcC8 и 0.57 ± 0.07 для ZnPcC8.

15 Накопление в тканях животных

Селективность накопления PсC8 оксиалюминия и цинка изучали на мышах с опухолью Эрлиха. Их содержание в тканях оценивали флюоресцентным методом на лазерной диагностической установке на основе He-Ne лазера (длина волны генерации - 633 нм) контактным способом *ex vivo* (N.N. Zharkova, D.N. Kozlov, Yu.N. Polivanov, et al. "Laser-excited fluorescence spectrometric system for tissue diagnostics", Proc. SPIE, vol. 2328, pp. 196-201, 1994). В качестве критерия использована константа селективности (K_c), представляющая собой отношение интенсивностей флюоресценции в опухоли и в окружающей ткани (коже).

Фотосенсибилизаторы вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг, флюоресценцию регистрировали через 24 и 48 ч. В качестве контроля сравнения вводили "Фотосенс" в дозе 2 мг/кг (доза препарата, при которой K_c "Фотосенса" в опухоли Эрлиха - максимальна). (Kazachkina N.I., Zharkova N.N., Fomina G.I. et al Pharmacokinetical study of Al- and Zn-sulphonated phthalocyanines. Proc. SPIE, vol. 2924, pp. 233-249, 1996). Эксперименты показали, что оба фотосенсибилизатора имеют максимум флюоресценции в тканях мышей при 698 нм, избирательно накапливаются в опухоли Эрлиха с константой селективности в 3-4 раза выше, чем у "Фотосенса" (таблица 1).

Фотодинамическая терапия

A1PcC8 и ZnPcC8 вводили внутривенно в дозах 5 и 25 мг/кг мышам BDF₁ с опухолью P-388, привитой подкожно в область икроножной мышцы правой лапы, и с опухолью Эрлиха, привитой подкожно в подлопаточную область справа. Через 4 ч после этого опухоли облучали красным светом (фильтры Kс-10 и СЗС-26, $\lambda \geq 630$ нм), используя излучатель АТО-1 (НПО "Полюс") на основе галогеновой лампы (150 Вт, "Olympus", Япония) с оптоволоконным жгутом. Диаметр светового пятна составлял 1.5 см, плотность мощности - от 120 до 360 мВт/см², световая доза - от 108 до 324 Дж/см².

В качестве контроля сравнения вводили "Фотосенс" в дозе 5 мг/кг (максимально переносимая доза препарата у животных с привитой на лапу опухолью при плотности энергии - 400 Дж/см²). Облучение проводили через 24 ч после введения препарата.

Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) и увеличению продолжительности жизни мышей (УПЖ) относительно соответствующих величин у животных, не подвергавшихся каким-либо воздействиям. Биологически значимыми считали ТРО \geq 50% и УПЖ \geq 25% (Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США 1980, М., Медицина - С. 71-106).

В результате проведенных экспериментов показано, что ФДТ с PсC8 оксиалюминия и цинка подавляет рост опухоли Эрлиха (таблица 2).

50 Провести сравнение терапевтической эффективности PсC8 и "Фотосенса" в отношении опухоли Эрлиха не представляется возможным, так как при данной локализации опухоли при использовании в ФДТ "Фотосенса" в дозе 5 мг/кг наблюдается 100% гибель мышей.

Доза фотосенсибилизатора 25 мг/кг, световая доза - 324 Дж/см².

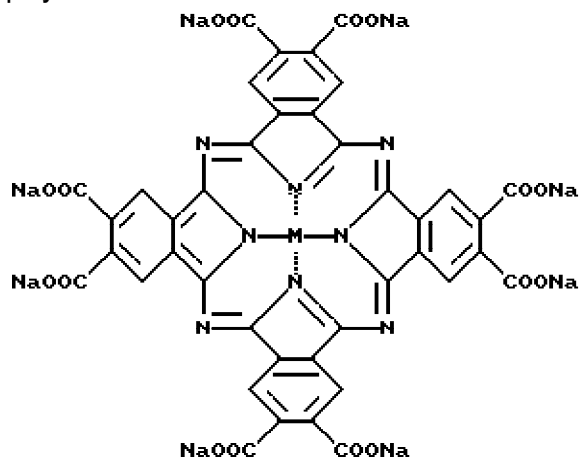
У мышей с Р-388 (таблица 3) величины ТРО в группах, получавших РсС8 с последующим облучением, тем больше, чем выше доза фотосенсибилизатора и световая доза.

5 Применение РсС8 цинка в качестве фотосенсибилизатора приводит к увеличению продолжительности жизни леченых мышей с Р-388. Биологически значимые величины УПЖ наблюдаются в группах, получавших РсС8 цинка с последующим облучением в дозе 324 Дж/см². Здесь УПЖ составляла 29-35% в зависимости от дозы фотосенсибилизатора. ФДТ с "Фотосенсом" в максимально переносимой дозе при данной локализации опухоли также приводит к торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни 10 подопытных мышей. Однако она несколько ниже, чем при применении октакарбоксихталоцианина цинка.

Таким образом, предлагаемые в настоящем изобретении новые фотосенсибилизаторы обладают увеличенной селективностью накопления в опухолевой ткани, не уступая 15 используемому аналогу в эффективности ФДТ.

Формула изобретения

Применение окта-4,5-карбоксихталоцианинов в виде их натриевых солей общей формулы



где M= AlOH, Zn,

в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии.

35

40

45

50

Таблица 1
Нормированная флюоресценция (Фн) РсС8 в тканях мышей с опухолью Эрлиха

Фотосенсибилизатор	Время после введения фотосенсибилизатора, ч	Фн, у.е.		Кс, у.е.
		опухоль	окруж. кожа	
“Фотосенс”	24	8±1	3±1	3±0.3
	48	9±1	2±0.3	4±1
AlPcC8	24	33±12	3±1	12±3
	48	36±19	3±1	12±6
ZnPcC8	24	53±9	6±2	9±2
	48	54±4	5±2	13±4

Таблица 2

Эффективность ФДТ в отношении опухоли Эрлиха

Воздействие	ТРО, %					
	Дни после ФДТ					
	5	8	12	15	18	21
AlPcC8 + освещение	91	75	59	67	71	72
ZnPcC8 + освещение	100	98	91	86	86	82

Таблица 3

Эффективность ФДТ в отношении Р-388

Фотосенсибилизатор	Доза, мг/кг	Свет. доза Дж/см ²	ТРО, %				УПДЖ, %
			Дни после ФДТ				
			6	8	10	13	
AlPcC8	25	100	-22	3	38	15	12
	5	324	21	43	62	48	12
	25	324	58	60	58	52	11
ZnPcC8	25	100	7	3	23	28	9
	5	324	39	54	78	72	29
	25	324	87	84	88	85	35
“Фотосенс”	5	400	99	97	95	92	25
Контроль (физ. р-р)	0	324	2	-16	17	5	0