



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004108103/15, 22.03.2004

(24) Дата начала действия патента: 22.03.2004

(45) Опубликовано: 10.08.2005 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2001118842, А, 10.12.2003. RU 2183635 С2, 20.06.2002. US 5166197 А, 24.11.1992. ЛУКЬЯНЕЦ Е.А. Новые сенсibilизаторы для фотодинамической терапии. Росс. хим. журнал. 1998, 42(5), с.9-16.

Адрес для переписки:

123995, Москва, ГСП-5, ул. Б. Садовая, 1,
корп.4, ФГУП "ГНЦ "НИОПИК", ген. директору

(72) Автор(ы):

Барышников А.Ю. (RU),
Борисова Л.М. (RU),
Ворожцов Г.Н. (RU),
Герасимова Г.К. (RU),
Давыдов М.И. (RU),
Деркачева В.М. (RU),
Кокарева В.И. (RU),
Кубасова И.Ю. (RU),
Лощенов В.Б. (RU),
Лужков Ю.М. (RU),
Лукьянец Е.А. (RU),
Меерович Г.А. (RU),
Меерович И.Г. (RU),
Оборотова Н.А. (RU),
Полозкова А.П. (RU),
Смирнова З.С. (RU),
Стратонников А.А. (RU)

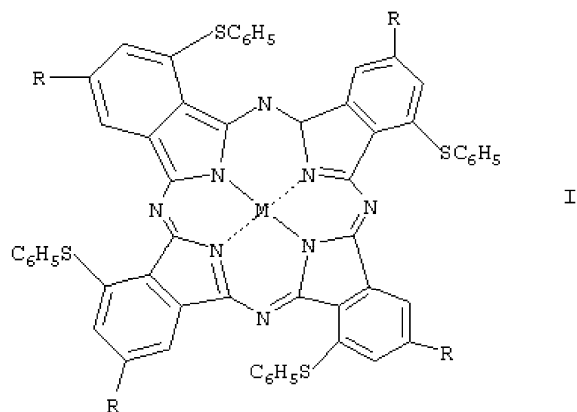
(73) Патентообладатель(ли):

Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научный центр "Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей" (ФГУП "ГНЦ "НИОПИК") (RU),
Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук (ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) (RU)

(54) ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР, ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА И СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

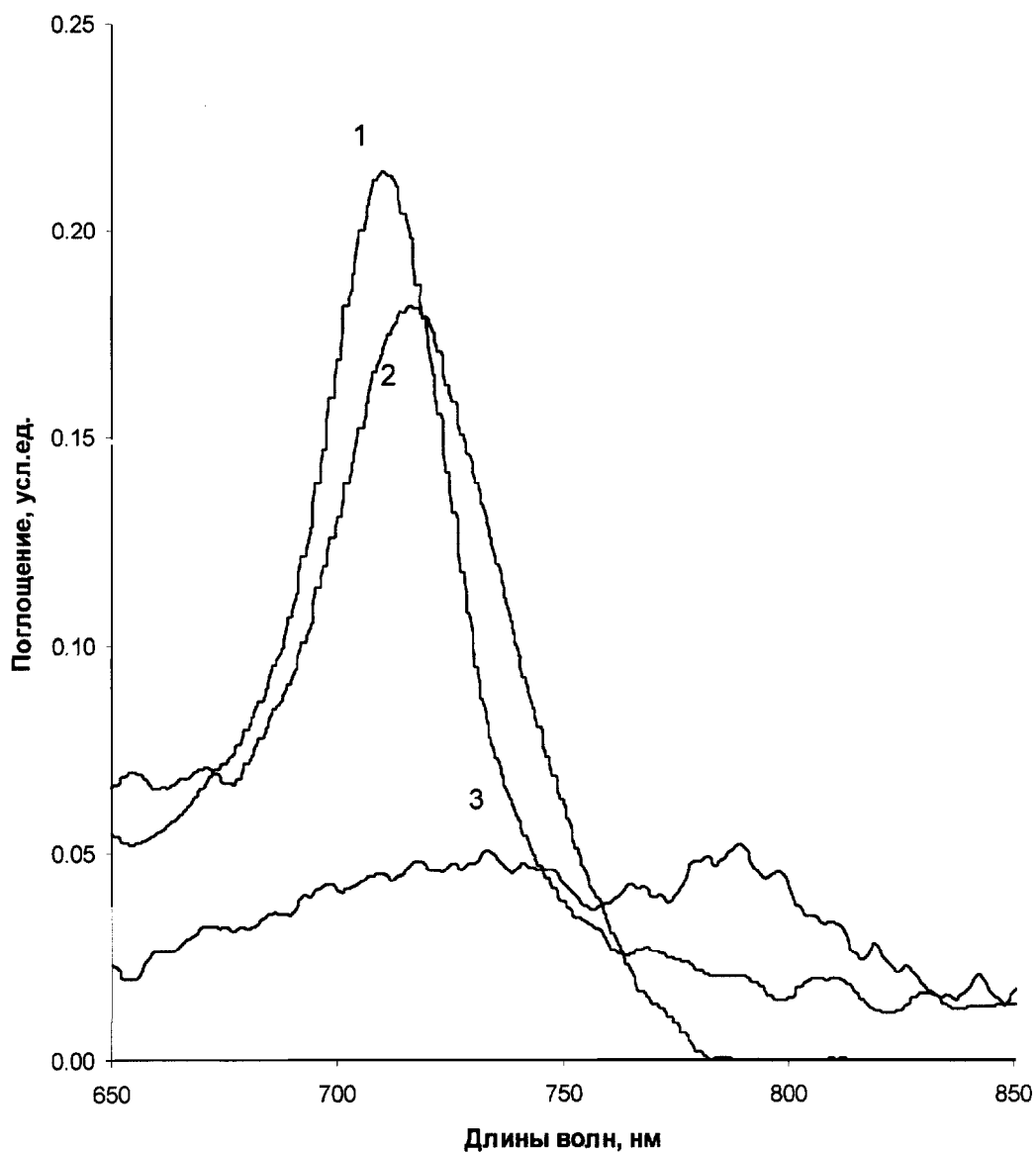
Изобретение относится к области медицины и касается фотосенсибилизатора, представляющего собой фенилтиозамещенное производное фталоцианина общей формулы (I)



где R=H, t-C₄H₉; M=Hh, AlOH, Zn, ero

липосомальной формы, представляющей собой композицию смеси липидов (лецитина, холестерина, кардиолипина) и фотосенсибилизатора, а также способа проведения фотодинамической терапии с ее использованием. Фотосенсибилизаторы имеют высокую скорость

выведения из нормальных тканей, обеспечивают глубокое терапевтическое воздействие на опухолевые ткани, нетоксичны и перспективны для применения в онкологии и других областях медицины. 2 з.п. ф-лы, 3 ил.



Фиг.1

RU 2257898 C1

RU 2257898 C1

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 257 898** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 31/409, 9/127, A 61**
P 35/00

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2004108103/15, 22.03.2004

(24) Effective date for property rights: 22.03.2004

(45) Date of publication: 10.08.2005 Bull. 22

Mail address:

123995, Moskva, GSP-5, ul. B. Sadovaja, 1,
korp.4, FGUP "GNTs "NIOPIK", gen. direktoru

(72) Inventor(s):

Baryshnikov A.Ju. (RU),
Borisova L.M. (RU),
Vorozhtsov G.N. (RU),
Gerasimova G.K. (RU),
Davydov M.I. (RU),
Derkacheva V.M. (RU),
Kokareva V.I. (RU),
Kubasova I.Ju. (RU),
Loshchenov V.B. (RU),
Luzhkov Ju.M. (RU),
Luk'janets E.A. (RU),
Meerovich G.A. (RU),
Meerovich I.G. (RU),
Oborotova N.A. (RU),
Polozkova A.P. (RU),
Smirnova Z.S. (RU),
Stratonnikov A.A. (RU)

(73) Proprietor(s):

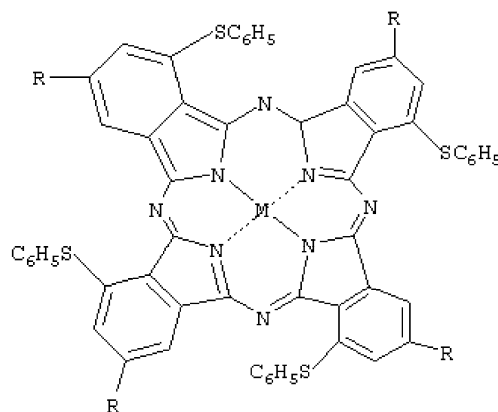
Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatje "Gosudarstvennyj nauchnyj
tsentr "Nauchno-issledovatel'skij institut
organicheskikh poluproduktov i krasitelej"
(FGUP "GNTs "NIOPIK") (RU),
Gosudarstvennoe uchrezhdenie Rossijskij
onkologicheskij nauchnyj tsentr im. N.N.
Blokchina Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk (GU RONTs im. N.N. Blokhina RAMN) (RU)

(54) **PHOTOSENSIBILIZING AGENT, LIPOSOMAL FORMULATION OF PHOTOSENSIBILIZING AGENT AND METHOD FOR CARRYING OUT PHOTODYNAMIC THERAPY**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a
photosensibilizing compound representing
phenylthio-substituted derivative of
phthalocyanine of the general formula (I):



wherein R means hydrogen atom (H), t-C₄H₉; M

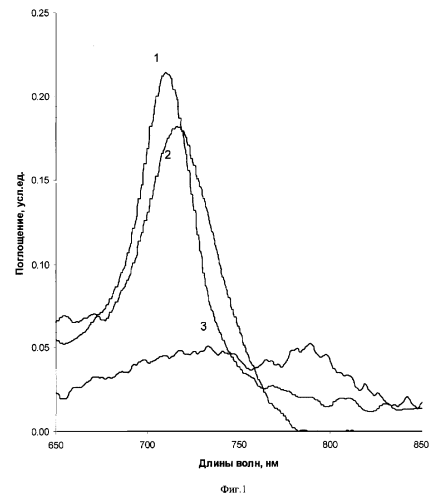
RU 2 257 898 C1

RU 2 257 898 C1

means HH, AIOH, Zn. Also, invention relates to its liposomal formulation representing the composition of mixture of lipids (lecithin, cholesterol, cardiolipin) and a photosensibilizing agent, and to a method for carrying out the photodynamic therapy using this formulation. Photosensibilizing agents show high elimination rate from normal tissues, provide the deep therapeutic effect on tumor tissues, non-toxic properties and perspective for their using in oncology and other branches of medicine.

EFFECT: valuable medicinal properties of compound.

4 cl, 3 dwg, 9 ex



RU 2257898 C1

RU 2257898 C1

Настоящее изобретение относится к медицине, а более конкретно к фотосенсибилизаторам для фотодинамической терапии (ФДТ) новообразований и других заболеваний, лекарственным формам на основе фотосенсибилизаторов и способам проведения фотодинамической терапии.

5 Метод ФДТ основан на использовании препаратов - фотосенсибилизаторов, которые при введении в организм накапливаются преимущественно в опухоли. При последующем световом, например лазерном, облучении патологического участка его молекулы катализируют образование цитотоксических агентов, в частности синглетного кислорода, разрушающих опухолевые клетки.

10 Недостатком применяющихся в клинической практике фотосенсибилизаторов на основе производных гематопорфиринов (R. Bonnett. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. Chem. Soc. Rev., 24(1), 19-33, 1995) является невысокая интенсивность поглощения в длинноволновой полосе (625-640 нм), в которой происходит фотовозбуждение сенсибилизатора. В то же время собственное
15 поглощение биологической ткани в этой спектральной области значительно. Это обуславливает малую глубину проникновения излучения в ткани, приводит к существенным его потерям вне опухоли и затрудняет лечение опухолей больших размеров. Кроме того, это приводит к необходимости использовать большие дозы фотосенсибилизатора и терапевтического излучения, что в свою очередь вызывает значительные побочные
20 эффекты.

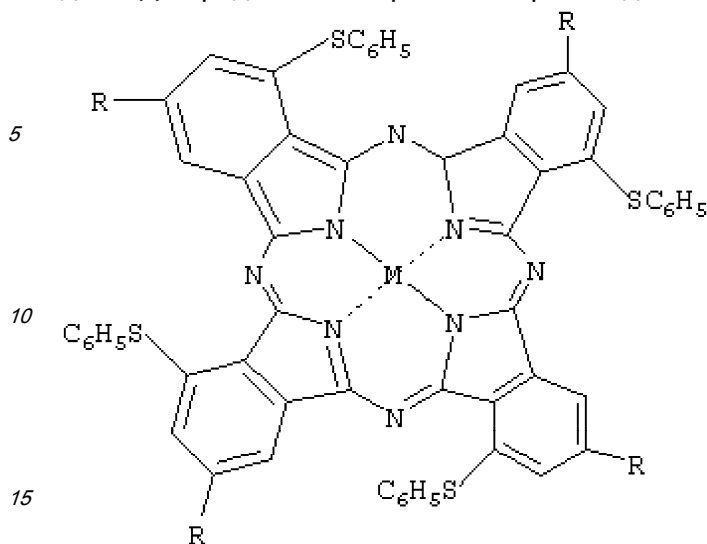
Фотосенсибилизаторы на основе хлоринов (дигидропорфиринов) имеют более интенсивную длинноволновую полосу поглощения, смещенную в красную область по сравнению с порфиринами. Среди них следует отметить водорастворимые моно-L-аспартилхлорин $e_{6и}$ (препараты NРe6, MACE) и другие различные формы хлорина e_6 ,
25 металлические комплексы пурпуринов, поглощающие в области 660 нм, а также синтетические хлорины - 5,10,15,20-тетракис(м-гидроксифенил)хлорин (препараты темопорфин, m-THPC, фоскан) и производные бензопорфирина (бензопорфирин монокислота, кольцо A) с максимумом поглощения при 690 нм. Лютециевый комплекс тексафирина растворим в воде и имеет максимум поглощения свыше 730 нм (R. Bonnett, см. выше). Однако эти соединения, как правило, имеют слишком сложную и дорогую
30 технология либо поглощают в области собственного поглощения биологической ткани, либо их коэффициент экстинкции невысок.

Некоторые из этих недостатков отсутствуют у фотосенсибилизатора на основе сульфированного фталоцианина гидроксиалюминия ("Фотосенс"), поглощающего при 675
35 нм с коэффициентом экстинкции, превышающим 10^5 л·моль⁻¹·см⁻¹ (Е.А.Лукьянец. Новые сенсибилизаторы для фотодинамической терапии. Росс. хим. журнал, 42(5), 9-16, 1998). Поглощение несенсибилизированных тканей в этой области в 3-4 раза ниже, чем в области 625-640 нм, что позволяет повысить глубину фотодинамического воздействия. В способе ФДТ с использованием этого фотосенсибилизатора его вводят в организм в водном
40 растворе. "Фотосенс" и способ ФДТ с его использованием являются наиболее близкими аналогами предлагаемых в настоящей заявке фотосенсибилизаторов и способа ФДТ. Однако и в области поглощения "Фотосенса" собственное поглощение несенсибилизированных тканей остается значительным, что приводит к значительным потерям энергии терапевтического излучения и не позволяет проводить ФДТ глубоких
45 слоев опухолей.

Известно, что собственное поглощение ткани уменьшается до минимальных значений только при длинах волн, превышающих 700 нм. Следовательно, для обеспечения эффективной ФДТ фотосенсибилизаторы должны иметь максимум поглощения в области
50 далее 700 нм.

В предлагаемом изобретении решается задача повышения эффективности ФДТ глубоких опухолевых тканей путем создания и использования для ФДТ фотосенсибилизаторов с интенсивным поглощением в спектральной области с длинами волн более 700 нм. Указанная задача решается тем, что в качестве фотосенсибилизатора

для ФДТ предлагаются фенилтиопроизводные фталоцианина общей формулы



где R=H, t-C₄H₉; M=Hh, AlOH, Zn.

Указанная задача решается также тем, что предлагается липосомальная форма фотосенсибилизатора, представляющая собой композицию смеси липидов (лецитина, холестерина, кардиолипина) и фотосенсибилизатора по п.1.

Указанная задача решается также и тем, что в способе проведения фотодинамической терапии используют липосомальную форму фотосенсибилизатора по п.2.

Наличие в положениях 3 бензольных колец макроцикла фенилтио групп существенно смещает длинноволновую полосу поглощения соответствующих фталоцианинов в красную область по сравнению с их незамещенными и трет-бутил-замещенными аналогами. Это позволяет использовать эти соединения в качестве фотосенсибилизаторов, чувствительных в ближней ИК области спектра.

Сущность изобретения поясняется фиг.1-3.

На фиг.1 приведены спектры поглощения фенилтиопроизводных фталоцианина в биологической ткани:

- 1-тетра-3-фенилтиофталоцианин цинка,
- 2-тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия,
- 3-безметалльный тетра-3-фенилтио-тетра-3-трет-бутил-фталоцианин.

На фиг.2 приведена зависимость усредненного по группам объема опухолей Эрлиха мышей F1 после ФДТ с липосомальным тетра-3-фенилтиофталоцианином гидроксиалюминия:

- 1 - контрольная группа, 2 - группа после ФДТ.

На фиг.3 приведена зависимость усредненного по группам объема опухолей Эрлиха мышей F1 после ФДТ с липосомальным безметалльным тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианином:

- 1 - контрольная группа, 2 - группа после ФДТ.

Синтез фенилтиозамещенных фталоцианинов осуществляют, исходя из 3-фенилтиофталодинитрила (Деркачева В.М., Лукьянец Е.А. ЖОХ, 50(10), 2313-2318, 1980) или 3-фенилтио-5-трет-бутилфталодинитрила (Долотова О.В., Бундина Н.И., Деркачева В.М., Негримовский В.М., Минин В.В., Ларин Г.М., Каляя О.Л., Лукьянец Е.А. ЖОХ, 62(9), 2064-2075, 1992). Взаимодействием указанных фталодинитрилов с солями соответствующих металлов были получены металлические комплексы, а для синтеза безметалльных фталоцианинов было использовано деметаллирование в кислой среде литиевых комплексов, полученных в свою очередь нагреванием фталодинитрилов с алколюлятом лития в растворе диметиламиноэтанола.

Липосомальную форму фенилтиопроизводных фталоцианинов получают методом Бенгема (Bangham) (Liposomes: a practical approach, in D. Rickwood and B.D. Hames (eds.) Practical Approach Series, Oil Press at Oxford University Press, Oxford, 1990;

Preparation of liposomes, in G.Gregoriadis (ed.), Liposome technology, Vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984), редиспергированием водным раствором сахарозы тонкой однородной пленки лецитиновых многослойных липосом (МСЛ), образованной упариванием в вакууме на роторном испарителе раствора смеси липидов и

5 фенилтиозамещенного фталоцианина в хлороформе. Смесь липидов включала лецитин, холестерин и кардиолипин в молярном соотношении 12:6:(0,1-1), отношение "смесь липидов: фенилтиозамещенный фталоцианин" составляло (14-16):1. Уменьшение размеров липосом осуществлялось методами ультразвуковой соникации и экструзии.

Ниже приведены примеры, иллюстрирующие настоящее изобретение.

10 Пример 1. Безметалльный тетра-3-фенилтиофталоцианин. К раствору диметиламиноэтилата лития, полученного из 0.012 г (1.71 ммоль) лития в 2.5 мл диметиламиноэтанола, добавляют 1.01 г (4.3 ммоль) 3-фенилтиофталодинитрила. Смесь кипятят 8 ч, после чего охлаждают и разбавляют 100 мл метанола. После обычной очистки и сушки осадка получают 0.69 г (68%) безметалльного тетра-3-фенилтиофталоцианина.

15 Найдено, %: С 71.09; Н 3.71; N 12.02; S 13.51. $C_{56}H_{34}N_8S_4$. Вычислено, %: С 71.01; Н 3.62; N 11.83; S 13.54. $\lambda_{\text{макс.}}$, нм (lg ϵ) в трихлорбензоле: 740 (5.09), 712 (5.04), 674 (4.50), 641 (4.45), ~435 (4.28), ~400 (4.41), 336 (4.85).

20 Пример 2. Безметалльный тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианин. К раствору диметиламиноэтилата лития, полученного из 0.017 г (2.43 ммоль) лития в 4.5 мл диметиламиноэтанола, добавляют 1.81 г (6.2 ммоль) 3-фенилтио-5-трет-бутилфталодинитрила. Смесь кипятят 7 ч, после чего охлаждают и добавляют 25 мл 4% соляной кислоты, после обычной очистки продукт реакции хроматографируют на SiO_2 (элюент - смесь бензол: гексан 1:1). После упаривания растворителя и сушки получают 0.86 г (47%) безметалльного тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина.

25 Найдено, %: С 73.66; Н 5.60; N 9.30; S 10.82. $C_{72}H_{66}N_8S_4$. Вычислено, %: С 73.81; Н 5.68; N 9.56; S 10.95. $\lambda_{\text{макс.}}$, нм (lg ϵ) в хлороформе: 746 (5.18), 717 (5.16), 681 (4.68), 648 (4.59), ~450, ~375, 337 (4.94).

30 Пример 3. Тетра-3-фенилтиофталоцианин цинка. Смесь 0.24 г (1 ммоль) 3-фенилтиофталодинитрила, 0.18 г (3 ммоль) мочевины, 0.06 г (0.27 ммоль) ацетата цинка дигидрата, 0.28 г сульфата натрия и каталитического количества молибдата аммония нагревают 1 ч при 180-185°C. После обычной очистки и сушки продукта реакции получают 0.14 г (55%) тетра-3-фенилтиофталоцианина цинка. Найдено, %: С 66.58; Н 3.19; N 11.30; S 12.78. $C_{56}H_{32}N_8S_4Zn$. Вычислено, %: С 66.56; Н 3.19; N 11.09; S 12.69. $\lambda_{\text{макс.}}$, нм (lg ϵ) в

35 1% растворе пиридина в трихлорбензоле: 715 (5.17), 688 пл. (4.44), 640 (4.41), 435 (4.16), 390 (4.32), 337 (4.63).

40 Пример 4. Тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианин цинка. Тщательно растертую смесь 0.29 г (1 ммоль) 3-фенилтио-5-трет-бутилфталодинитрила, 0.06 г (0.33 ммоль) безводного ацетата цинка, 0.06 г (1 ммоль) сухой мочевины и каталитического количества молибдата аммония нагревают 45 мин при 200-210°C и 45 мин при 220-230°C. После хроматографирования на Al_2O_3 смесью бензола с хлороформом (1:1), а затем 1% пиридином в бензоле получают 0.14 г (45%) тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина цинка. Найдено, %: С 70.31; Н 5.21; N 9.09; S 10.27. $C_{72}H_{64}N_8S_4Zn$. Вычислено, %: С 70.02; Н 5.22; N 9.07; S 10.38. $\lambda_{\text{макс.}}$, нм (lg ϵ) в хлороформе: 721 (5.35), 647 (4.64), ~440 пл., 341 (4.89).

45 Пример 5. Тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия. Тщательно растертую смесь 1.88 г (8 ммоль) 3-фенилтиофталодинитрила, 0.34 г (2.6 ммоль) хлористого алюминия, 0.5 г (8 ммоль) сухой мочевины и каталитического количества молибдата аммония нагревают в течение 50 мин от 160 до 225°C, после чего выдерживают 40 мин при 225-230°C. После хроматографирования на Al_2O_3 сначала бензолом, затем смесью его с хлороформом получают 1.32 г (66%) тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина гидроксиалюминия. Найдено, %: С 67.77; Н 3.14; N 11.29; S 12.86. $C_{56}H_{33}AlN_8OS_4$. Вычислено, %: С 68.00; Н 3.36; N 11.33; S 12.97. $\lambda_{\text{макс.}}$, нм (lg ϵ) в хлороформе: 736 (5.32),

50

657 (4.36), ~460, 340 (4.68).

Пример 6. Липосомальная форма тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия.

Навески лецитина (0.65 г) и холестерина (0.15 г) объединяют и растворяют в 5 мл хлороформа. К раствору добавляют 2.7 мл 0.5% этанольного раствора кардиолипина. Затем раствор переносят в круглодонную колбу и к нему прибавляют раствор 0.007 г тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия в 5 мл хлороформа. Содержимое колбы перемешивают и упаривают на роторном испарителе при 20-25°C до образования однородной липидной пленки. Затем в колбу добавляют 10 мл воды для инъекций и взбалтывают в ультразвуковой ванне до полного смывания пленки со стенок колбы и образования липосомальной эмульсии. Размер полученных липосом, измеренный на приборе Submicron Particle Sizer NICOMP-380, составлял 450 ± 50 нм.

Пример 7. Липосомальная форма безметалльного тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина.

Навески лецитина (0.63 г) и холестерина (0.12 г) объединяют и растворяют в 5 мл хлороформа. К раствору добавляют 2.7 мл 0.5% этанольного раствора кардиолипина. Затем раствор переносят в круглодонную колбу и к нему добавляют раствор 0.005 г безметалльного тетра-3-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина в 5 мл хлороформа. Содержимое колбы перемешивают и упаривают на роторном испарителе при 20-25°C до образования однородной липидной пленки. Затем в колбу добавляют 10 мл воды для инъекций и взбалтывают в ультразвуковой ванне до полного смывания пленки со стенок колбы и образования липосомальной эмульсии. Размер полученных липосом, измеренный на приборе Submicron Particle Sizer NICOMP, составлял 230 ± 150 нм.

Ниже приведены примеры осуществления предлагаемого способа фотодинамической терапии.

Пример 8. Группе мышей F1 с опухолью Эрлиха (ELD) вводят в хвостовую вену липосомальную форму тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия (пример 6) в дозе 4 мг/кг массы животного. Вторая группа мышей - контрольная.

После введения фотосенсибилизатора опухоли облучают излучением лампового источника света с длиной волны 725 нм, плотностью мощности 300 мВт/см^2 и плотностью дозы 350 Дж/см^2 . Через сутки после облучения в опухоли формируется некроз. У этой группы выявлен терапевтический эффект по сравнению с контрольной - торможение роста опухолей составляет более 80% (фиг.2).

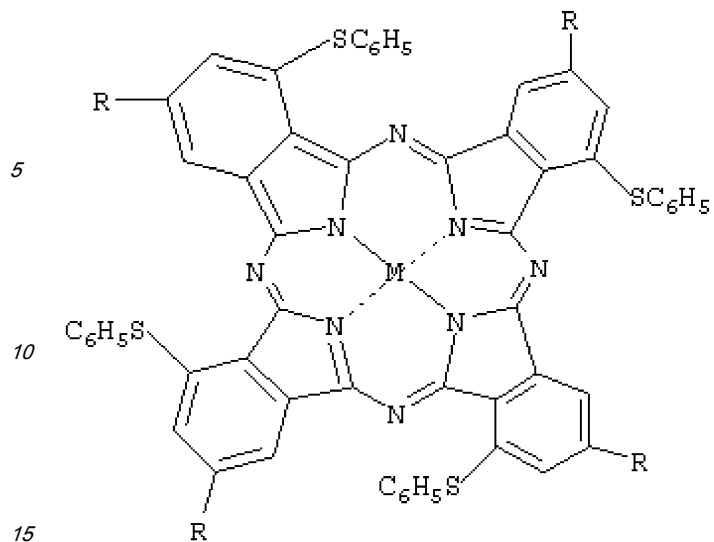
Пример 9. Группе мышей BDF1 с солидной формой лимфолейкоза P388 вводят в хвостовую вену липосомальную форму безметалльного тетра-фенилтио-тетра-5-трет-бутилфталоцианина (пример 7) в дозе 4 мг/кг массы животного, вторая группа мышей контрольная.

После введения фотосенсибилизатора опухоли мышей первой группы облучают излучением лампового источника света с длиной волны 730 нм, плотностью мощности 300 мВт/см^2 и плотностью дозы 350 Дж/см^2 . Через сутки после облучения в опухолях формировался некроз. При сравнении леченой группы с контрольной выявлено торможение роста опухолей более чем на 90% (фиг.3), в ряде случаев наблюдалось полное разрушение опухоли.

Предлагаемые фотосенсибилизаторы обеспечивают глубокое терапевтическое воздействие на опухоль, имеют высокую скорость выведения из нормальных тканей, нетоксичны и перспективны для применения в онкологии и других областях медицины.

Формула изобретения

1. Фотосенсибилизатор, представляющий собой фенилтиозамещенное производное фталоцианина общей формулы:



где R=H, t-C₄H₉; M=Hh, AlOH, Zn.

2. Липосомальная форма фотосенсибилизатора, представляющая собой композицию смеси липидов (лецитина, холестерина, кардиолипина) и фотосенсибилизатора по п.1.

3. Способ проведения фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора на основе производных фталоцианина, отличающийся тем, что используют липосомальную форму фотосенсибилизатора по п.2.

20

25

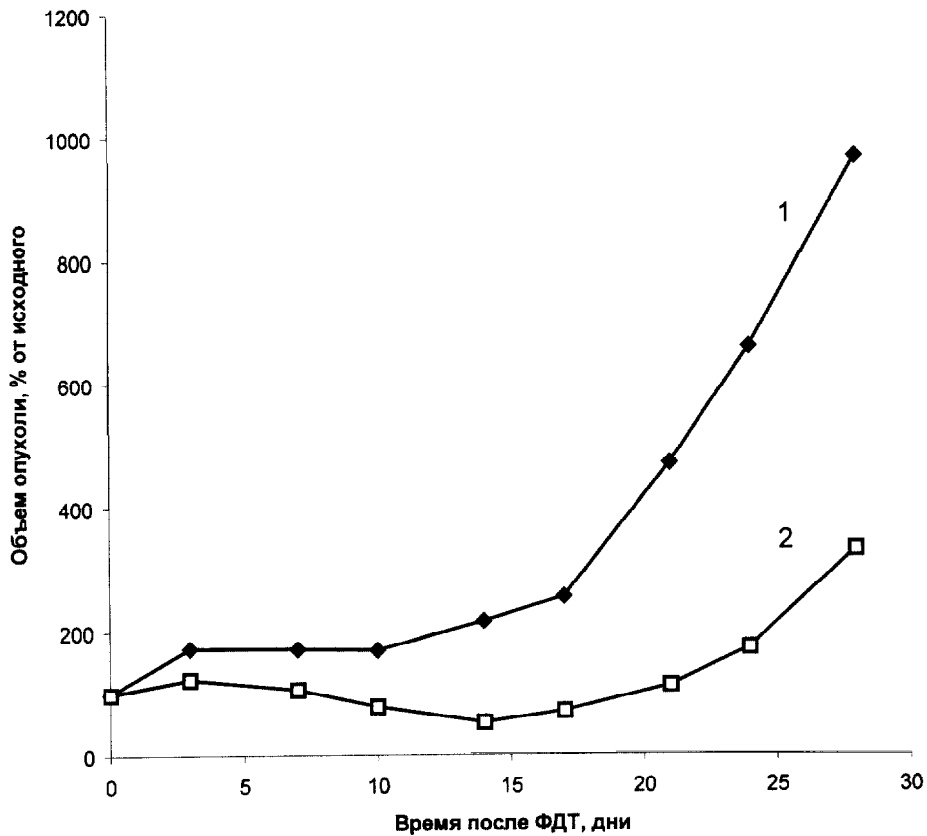
30

35

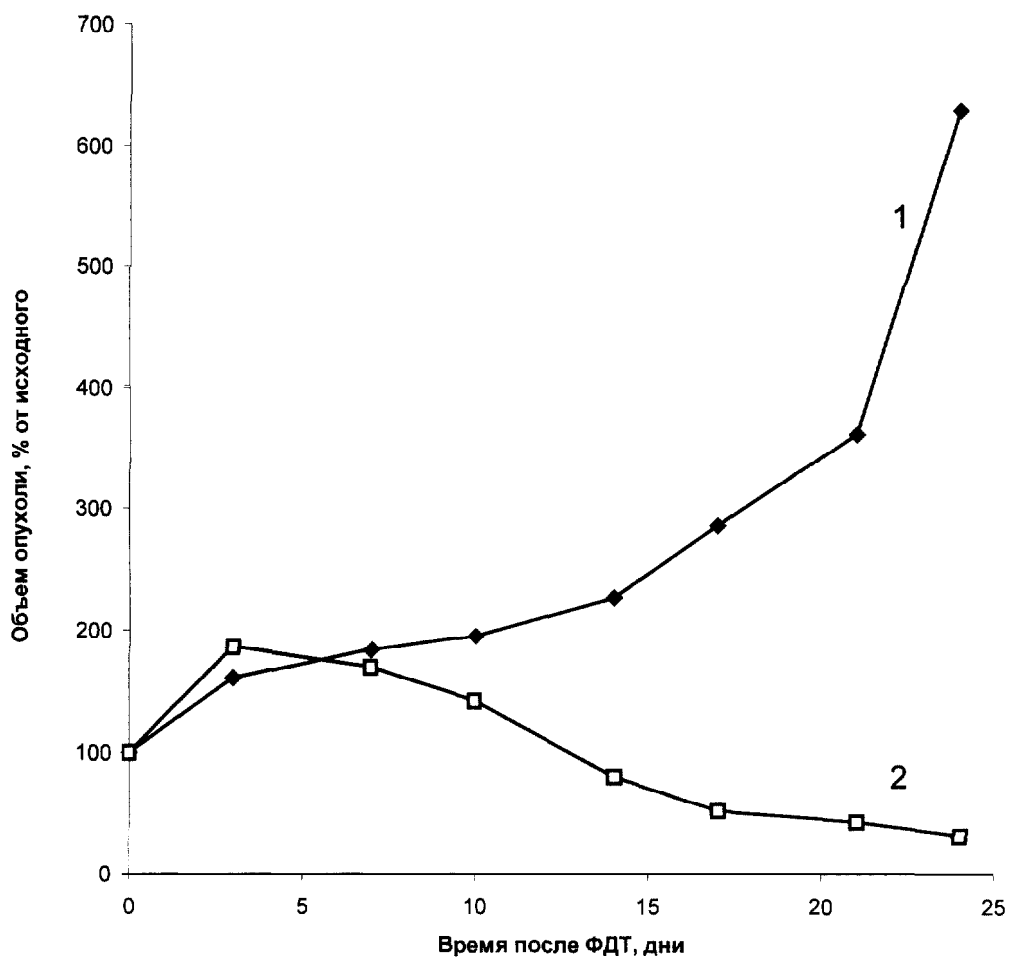
40

45

50



Фиг.2



Фиг.3