



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
C07D 487/22 (2006.01)  
C07F 3/06 (2006.01)  
A61K 31/40 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004135497/04, 06.12.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.12.2004

(45) Опубликовано: 20.06.2006 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2188200, C2, 27.08.2002. RU  
2223963, C1, 20.02.2004. US 5190966, A,  
02.03.1993. US 5451599 A, 19.09.1995.

Адрес для переписки:  
123995, Москва, ГСП-5, ул. Б. Садовая, 1,  
корп.4, ФГУП "ГНЦ "НИОПИК"

(72) Автор(ы):

Барканова Светлана Васильевна (RU),  
Быстрицкий Георгий Иосифович (RU),  
Ворожцов Георгий Николаевич (RU),  
Кармакова Татьяна Анатольевна (RU),  
Лужков Юрий Михайлович (RU),  
Лукиянец Евгений Антонович (RU),  
Макарова Елена Александровна (RU),  
Морозова Наталья Борисовна (RU),  
Умнова Любовь Васильевна (RU),  
Якубовская Раиса Ивановна (RU)

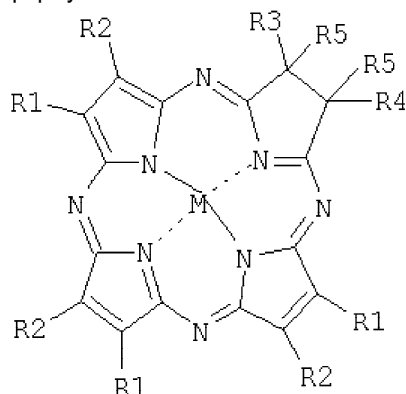
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Государственное унитарное  
предприятие "Государственный научный центр  
"Научно-исследовательский институт  
органических полупродуктов и красителей"  
(RU)

## (54) ТЕТРААЗАХЛОРИНЫ КАК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а более конкретно - к фотосенсибилизаторам для фотодинамической терапии (ФДТ) новообразований и ряда других заболеваний. Изобретение описывает тетраазахлорины общей формулы



где  $R_1R_2=C_6H_4$ ,  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=Hh$   
( $H_2TB^tAC$ );

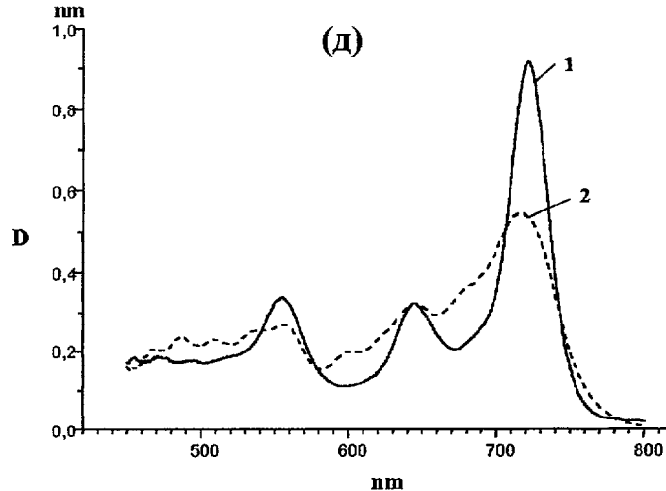
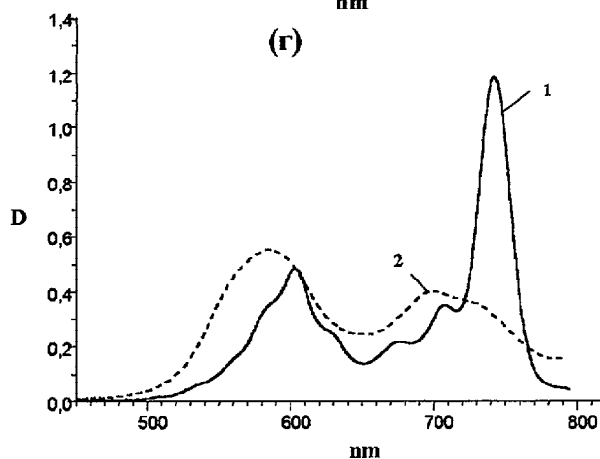
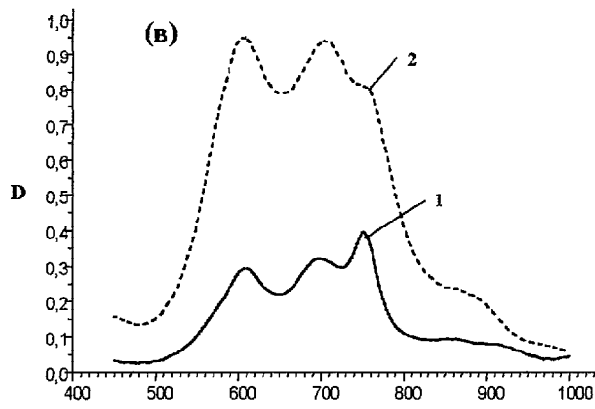
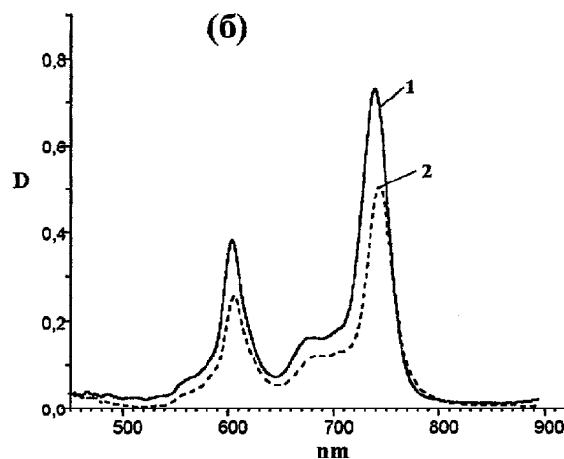
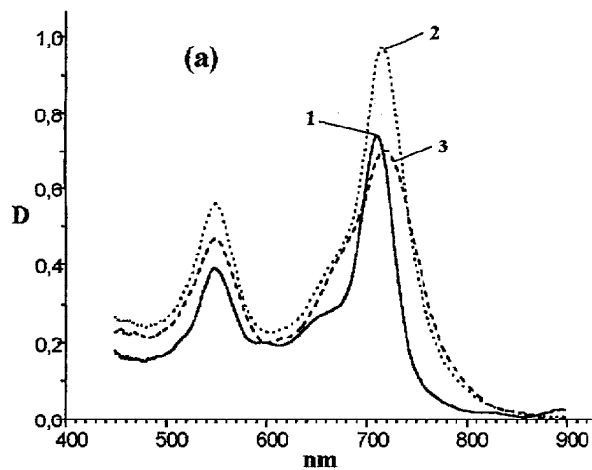
$R_1R_2=1,2-C_{10}H_6$ ;  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=Zn(Zn-1,2-$   
 $TNTAC)$ ;

$R_1=R_2=C_6H_5$ ;  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=Hh$   
( $H_2TACPh_6$ );

$R_1=R_3=H$ ,  $R_2=R_4=C_6H_5$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  
 $M=Hh$  ( $H_2PyrTACPh_4$ );

$R_1R_2=4-$   
 $C(CH_3)_3C_6H_3$ ,  $R_3=R_4=H$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  $M=Hh$   
( $H_2TB^tACPy^N-Me$ ).

в качестве фотосенсибилизаторов ближней ИК области спектра для фотодинамической терапии. Описываемые фотосенсибилизаторы обладают интенсивным поглощением в спектральной области 710-750 нм и могут быть использованы для лечения методом ФДТ глубоких опухолевых тканей. 1 ил., 5 табл.



### Электронные спектры поглощения тетраазахлоринов

для всех красителей  $2.5 \times 10^{-5}$  М в ДМФ + 5%  $\text{CHCl}_3$  (1) (а, б -  $l=1$  см; в, г -  $l=0.5$  см;

а -  $\text{H}_2\text{PyrTACPh}_4$ ,  $0.5 \times 10^{-3}$  М (0.35 мг/мл) в 4% Кремофоре EL (2) и 4% Проксаноле 268 (3),  $l=0.1$  см;

б -  $1,2\text{-NFTACZn}$ ,  $0.45 \times 10^{-3}$  М в 4% Кремофоре EL (2),  $l=0.02$  см;

в -  $\text{H}_2\text{TB}^t\text{TACPyr}^{\text{N-Me}}$ ,  $5.18 \times 10^{-4}$  М (0.357 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см;

г -  $\text{H}_2\text{TBTAC}$ ,  $1.36 \times 10^{-4}$  М (0.07 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см;

д -  $\text{H}_2\text{TBTAC}$ ,  $1.63 \times 10^{-4}$  М (0.135 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C07D 487/22* (2006.01)*C07F 3/06* (2006.01)*A61K 31/40* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004135497/04, 06.12.2004**(24) Effective date for property rights: **06.12.2004**(45) Date of publication: **20.06.2006 Bull. 17**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Barkanova Svetlana Vasil'evna (RU),  
Bystritskij Georgij Iosifovich (RU),  
Vorozhtsov Georgij Nikolaevich (RU),  
Karmakova Tat'jana Anatol'evna (RU),  
Luzhkov Jurij Mikhajlovich (RU),  
Luk'janets Evgenij Antonovich (RU),  
Makarova Elena Aleksandrovna (RU),  
Morozova Natal'ja Borisovna (RU),  
Umnova Ljubov' Vasil'evna (RU),  
Jakubovskaja Raisa Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

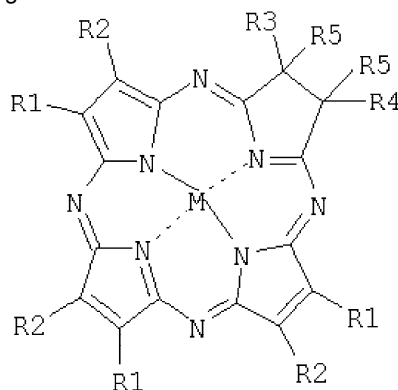
**Federal'noe Gosudarstvennoe unitarnoe  
predpriятие "Gosudarstvennyj nauchnyj  
tsentr "Nauchno-issledovatel'skij institut  
organicheskikh poluproduktov i krasitelej" (RU)**

**(54) TETRAAZACHLORINES AS PHOTOSENSIBILIZATORS FOR PHOTODYNAMIC THERAPY**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, medicine, oncology.

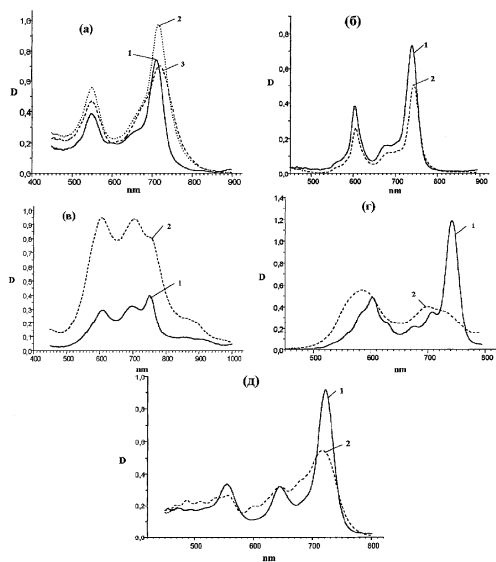
SUBSTANCE: invention relates to photosensitizing agents used in photodynamic therapy of neoplasm and some other diseases. Invention describes tetraazachlorines of the general formula:



wherein  $R_1R_2$  mean  $-C_6H_4$ ;  $R_3 = R_4 = R_5$  mean  $-CH_3$ ; M means HH ( $H_2TBTAC$ );  $R_1R_2$  means  $1,2-C_{10}H_6$ ;  $R_3 = R_4 = R_5$  mean  $-CH_3$ ; M means Zn( $Zn-1,2-TNTAC$ );  $R_1 = R_2$  mean  $-C_6H_5$ ;  $R_3 = R_4 = R_5$  mean  $-CH_3$ ; M means HH ( $H_2TACPh_6$ );  $R_1 = R_3$  mean hydrogen atom (H);  $R_2 = R_4$  mean  $-C_6H_5$ ;  $R_5R_5$  mean  $-CH_2N(CH_3)CH_2$ ; M means HH ( $H_2PyrTACPh_4$ );  $R_1R_2$  mean  $4-C(CH_3)_3C_6H_3$ ;  $R_3 = R_4$  mean hydrogen atom (H);  $R_5R_5$  mean  $-CH_2N(CH_3)CH_2$ ; M means HH ( $H_2TB^tTACPy^{N-Me}$ ) used as photosensitizing agents in the near IR-region of spectrum for carrying out the photodynamic therapy. These photosensitizing agents possess the intensive absorption in spectral region 710-750 nm and can be used in treatment of deep tumor tissues by the photodynamic therapy method.

EFFECT: valuable medicinal properties of compounds.

1 cl, 4 ex



**Электронные спектры поглощения тетраазалантролинов**

для всех красителей  $2.5 \times 10^{-5}$  М в ДМФ + 5%  $\text{CHCl}_3$  (1) (а, б -  $l=1$  см, в, г -  $l=0.5$  см,  
 а -  $\text{H}_2\text{PyrTASPh}$ ,  $0.5 \times 10^{-4}$  М (0.35 мг/мл) в 4% Кремофоре ЕЛ (2) и 4% Проксаноле 268 (3),  
 $l=0.1$  см,  
 б -  $1,2\text{-NTPACZn}$ ,  $0.45 \times 10^{-3}$  М в 4% Кремофоре ЕЛ (2),  $l=0.02$  см,  
 в -  $\text{H}_2\text{PyrTASPh}^{\text{Me}}$ ,  $5.18 \times 10^{-4}$  М (0.557 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см,  
 г -  $\text{H}_2\text{PVTAS}$ ,  $1.36 \times 10^{-2}$  М (0.07 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см,  
 д -  $\text{H}_2\text{PVTAS}$ ,  $1.63 \times 10^{-4}$  М (0.135 мг/мл) в 4% Проксаноле 268 (2),  $l=0.2$  см

RU 2 2 7 8 1 1 9 C 1

RU 2 2 7 8 1 1 9 C 1

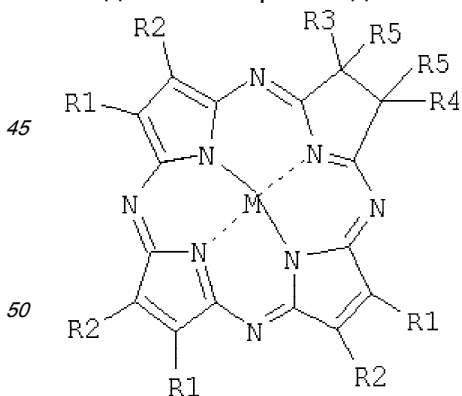
Настоящее изобретение относится к медицине, а более конкретно - к фотосенсибилизаторам для фотодинамической терапии (ФДТ) новообразований и ряда других заболеваний.

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

Недостатком применяющихся в клинической практике фотосенсибилизаторов на основе производных гематопорфиринов, например НРД (hematoporphyrin derivative), фотофрин-2, является невысокая интенсивность поглощения в полосе фотовозбуждения (625-640 нм). Значительное собственное поглощение биологической ткани в этой спектральной области обуславливает малую глубину проникновения излучения и затрудняет лечение опухолей больших размеров (R. Bonnett. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. Chem. Soc. Rev., 24(1), 19-33, 1995). В этом отношении преимущество имеют фотосенсибилизаторы на основе хлоринов (дигидропорфиринов), более интенсивная длинноволновая полоса поглощения которых смещена в красную область по сравнению с порфиринами. Среди них следует отметить водорастворимые моно-L-аспартилхлорин  $e_{6u}$  (препараты НРеб, МАСЕ) и другие различные формы хлорина  $e_6$ , в частности отечественные препараты "Фотодитазин", "Радахлорин", а также синтетические хлорины - 5,10,15,20-тетраakis(м-гидроксифенил)хлорин (темопорфин, m-THPC, фоскан) и производные бензопорфирина (бензопорфирин моноокислота, кольцо А) с максимумом поглощения при 690 нм. Однако эти соединения весьма труднодоступны, к тому же их коэффициент экстинкции, как правило, невысок.

Весьма перспективными фотосенсибилизаторами являются производные фталоцианина, тетрабензотетраза - аналога порфиринов. Так, фотосенсибилизатор "Фотосенс" на основе сульфированного фталоцианина гидроксиалюминия, поглощающий при 675 нм с коэффициентом экстинкции, превышающим  $10^5 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  (Е.А. Лукьянец. Новые сенсбилизаторы для фотодинамической терапии. Росс. хим. журнал, 42(5), 9-16, 1998), разрешен к клиническому применению в России для лечения ряда онкозаболеваний различных локализаций. Однако и в области поглощения "Фотосенса" собственное поглощение несенсибилизированных тканей остается значительным. Известно, что оно является минимальным только при длинах волн, превышающих 700 нм, в области так называемого "терапевтического окна". Кроме того, недостатком "Фотосенса" является длительное удерживание в коже, что требует тщательного соблюдения пациентами светового режима. "Фотосенс" является наиболее близким аналогом предлагаемых в настоящей заявке фотосенсибилизаторов.

В предлагаемом изобретении ставится задача создания фотосенсибилизаторов для ФДТ с интенсивным поглощением в спектральной области 710-750 нм. Указанная задача решается тем, что в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ предлагаются новые соединения - производные тетраазахлорина - общей формулы



где  $R_1 R_2 = C_6H_4$ ,  $R_3 = R_4 = R_5 = CH_3$ ,  $M = NH(H_2TBAC)$ ;

$R_1R_2=1,2-C_{10}H_6$ ;  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=Zn(Zn-1,2-TNTAC)$ ;

$R_1=R_2=C_6H_5$ ;  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=HH(H_2TACPh_6)$ ;

$R_1=R_3=H$ ,  $R_2=R_4=C_6H_5$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  $M=HH(H_2PyrTACPh_4)$ ;

$R_1R_2=4-C(CH_3)_3C_6H_3$ ,  $R_3=R_4=H$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  $M=HH(H_2TB^tTACPyr^{N-Me})$ .

5 например, тетраметилтрибензотетраазахлорин ( $H_2TB^tTAC$ ), тетраметилтри-1,2-нафто-тетраазахлорин цинка ( $Zn-1,2-TNTAC$ ), тетраметилгексафенилтетраазахлорин ( $H_2TACPh_6$ ), N-метилпирролидино-[3,4-b]тетрафенилтетраазахлорин ( $H_2PyrTACPh_4$ ), N-метилпирролидино-[3,4-b]три-(4'-трет.-бутил)бензотетраазахлорин ( $H_2TB^tTACPyr^{N-Me}$ ).

Предлагаемые производные тетраазахлорина синтезированы по разработанным нами  
10 методам. Тетраметилтрибензотетраазахлорин ( $H_2TB^tTAC$ ) и гексафенилтетраазахлорин ( $H_2TACPh_6$ ) получены конденсацией смеси тетраметилсукцинонитрила с соответствующими 1,2-динитрилами в диметиламиноэтаноле в присутствии диметиламиноэтилата лития, а три-1,2-нафтотетраазахлорин цинка ( $Zn-1,2-TNTAC$ ) - аналогичной конденсацией в высококипящих органических растворителях в присутствии  
15 хлорида цинка [Патент РФ №2188200, кл. С 07 D 487/22 (2002). БИ №24 (2002)]. N-Метилпирролидино[3,4-b]тетрафенилтетраазахлорин ( $H_2PyrTACPh_4$ ) и -три-(4'-трет.-бутил)бензотетраазахлорин ( $H_2TB^tACPyr^{N-Me}$ ) получены по аналогии с тетраарилпорфиринами (Silva A.M.G, Tome AC., Neves G.P.M.S., Silva A.M.S, Cavaleiro J.A.S., II J.Chem. Soc. Chem. Commun., 1999, p.1767) реакцией 1,3-циклоприсоединения  
20 соответствующих тетраазапорфинов с азометинилидом, генерируемым *in situ* из N-метилглицина и параформа. Все синтезированные тетраазахлорины нерастворимы в воде и использовались в виде их эмульсий в водных 4% растворах Кремофора EL и Проксанола 268 (таблица 1, чертеж).

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами.

25 ПРИМЕР 1. Синтез N-метилпирролидино[3,4-b]тетрафенилтетраазахлорина ( $H_2PyrTACPh_4$ ). Нагревают при перемешивании раствор 50 мг (0.08 ммоль) тетрафенилтетраазапорфина в 5 мл о-дихлорбензола до 100°C в атмосфере аргона и добавляют 14 мг (0.16 ммоль) саркозина и 12 мг (0.4 ммоль) параформа. Далее  
30 реакцию смесь нагревают до 150°C и выдерживают при этой температуре в течение 1.5 ч. Затем охлажденную реакцию массу хроматографируют на силикагеле хлороформом. Вторую фракцию (смесь хлорина и изобактериохлорина) повторно хроматографируют на окиси алюминия толуолом. Собирают малиновую фракцию и после удаления растворителя получают 15 мг (27.5%)  $H_2PyrTACPh_4$ . Масс-спектр,  $m/z$ : 675 ( $M^+$ ). ЭСП,  $\lambda_{\max}$  (соотношение интенсивностей), хлороформ: 711 (1.0), 656 пл. (0.39), 547  
35 (0.49), 358 (1.02), 333 (0.99).

Аналогично из три-(4'-трет.-бутил)бензотетраазапорфина получен N-метилпирролидино-[3,4-b]три-(4'-трет.-бутил)бензотетраазахлорин ( $H_2TB^tTACPyr^{N-Me}$ ).

40 ПРИМЕР 2. Синтез тетраметилгексафенилтетраазахлорина ( $H_2TACPh_6$ ). Растворяют 0.01 г (14 ммоль) лития при нагревании в 20 мл диметиламиноэтанола, охлаждают до комнатной температуры. Добавляют смесь 0.82 г (3.6 ммоль) дифенилмалеонитрила и 0.49 г (3.6 ммоль) тетраметилсукцинонитрила, медленно нагревают при перемешивании до кипения и продолжают кипячение в течение 4 часов. Затем реакцию смесь охлаждают, разбавляют 100 мл воды, выпавший осадок отфильтровывают, промывают  
45 последовательно горячей водой, 50% водным этанолом, сушат на воздухе. Остаток растирают, экстрагируют этанолом для удаления примесей, затем хлорбензолом. Хлорбензольный экстракт упаривают в вакууме и хроматографируют на силикагеле хлороформом, собирают малиновую фракцию. Получают 0.025 г (3.8%)  $H_2TACPh_6$ . Найдено, %: С 78.45; Н 5.66; N 12.76.  $C_{56}H_{44}N_8H_2O$ . Вычислено, %: С 79.41; Н 5.47; N  
50 13.23. Масс-спектр,  $m/z$ : 829.2 ( $M^+$ ). Электронный спектр поглощения.  $\lambda_{\max}$ , нм (lg  $\epsilon$ ), хлороформ: 727 (4.63), 691пл. (3.85), 662пл. (3.69), 557 (4.10), 488 (3.57), 371 (4.32), 336 (4.33).

ПРИМЕР 3. Определение фототоксичности N-метилпирролидино[3,4-b]

тетрафенилтетраазахлорина безметального ( $H_2PyrTACPh_4$ ) in vitro.

Тестирование проводили на культуре клеток эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEP2. Клетки рассеивали в концентрации  $40 \times 10^3$  кл/мл в лунки 96-луночного планшета ("Costar", США) в среде ИГЛА-МЕМ, содержащей 7% эмбриональную телячью сыворотку. Через 24 часа (начало логарифмической фазы роста культуры) вносили вещество в последовательных разведениях, инкубировали клетки в течение 2-5 часов и проводили облучение галогеновой лампой мощностью 500 Вт с использованием фильтра КС-13 ( $\lambda \geq 640$  нм). Плотность мощности составляла 13.6-15.0 мВт/см<sup>2</sup>. Расчетная световая доза во всех экспериментах составляла 10 Дж/см<sup>2</sup>. Контролем служили: 1) клетки, не подвергавшиеся обработке красителем, растворителем и облучению, 2) клетки, подвергавшиеся облучению без предварительной инкубации с красителем, 3) клетки, инкубированные с красителем без последующего облучения, 4) клетки, обработанные 4% Кремофором с последующим облучением.

Результаты определения фототоксичности приведены в таблице 2.

ПРИМЕР 4. Определение фотодинамической активности водных эмульсий тетраазахлоринов in vivo.

Солидную форму асцитной карциномы Эрлиха (ОЭ) прививали подкожно на наружную поверхность нижней конечности мышей-самок линии СВА. Для имплантации использовали разведенную асцитическую жидкость ( $\sim 2.2 \times 10^6$  опухолевых клеток), взятую от мышидонора на 7 день роста опухоли.

Образцы тетраазахлоринов в 4% Кремофоре EL или Проксаноле 268 фильтровали через мембранный фильтр 0.22 мкм и вводили животным внутривенно (в хвостовую вену) однократно на 6 день роста опухоли за 48, 24 или 0.5 часа до проведения ФДТ.

Сенсибилизированную опухоль облучали с помощью аппарата терапевтического онкологического для фотодинамической терапии АТО-1 и фильтрами КС-18 с максимумом пропускания на длине волн 700 нм и СЗС для фильтрации ультрафиолетовой части спектра. Плотность мощности излучения - 250 мВт/см<sup>2</sup>, плотность дозы - 300 Дж/см<sup>2</sup>. Перед облучением шерсть над опухолью удаляли. Продолжительность наблюдения за животными составляла 25 дней после лечения.

Эффективность воздействия оценивали по изменению объема опухоли ( $V_{оп}$ ) и значениям торможения роста опухоли (ТРО), рассчитанным по формулам (2) и (3):

$$V_{оп} = \pi / 6 \cdot (D_1 \cdot D_2 \cdot D_3) \quad (2)$$

$$ТРО = \left\{ \left( \frac{V_{оп(контроль)} - V_{оп(опыт)}}{V_{оп(контроль)}} \right) \right\} \times 100\%, \quad (3)$$

где  $D_1$ ,  $D_2$  и  $D_3$  - три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли.

При исследовании фотодинамической активности in vivo водных эмульсий  $H_2PyrTACPh_4$  в 4% Кремофоре на мышах с опухолью Р-388 облучение проводили через 30 минут после введения с использованием аппарата АТО-1 с фильтрами КС-10 и СЗС. Плотность мощности излучения - 300 мВт/см<sup>2</sup>, световая доза - 270 Дж/см<sup>2</sup>.

Результаты определения фотодинамической активности приведены в таблицах 3-5.

**Таблица 1.** Значения  $\epsilon_{\text{ДМФ}}$ , мольных коэффициентов экстинкции водных эмульсий тетраазахлоринов ( $\epsilon_{\text{сол}}$ ) и предельно достижимой концентрации вещества в солюбилизате ( $C_{\text{сол}}$ )

Тетраазахлорин	Эмульгатор (4 вес %)	Мольная экстинкция <sup>а</sup> , $\text{дм}^3 \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1} (\lambda, \text{нм})$		$C_{\text{сол}}$ , М (мг/мл)
		$\epsilon_{\text{ДМФ}}$	$\epsilon_{\text{сол}}$	
$\text{H}_2\text{PyrTACPh}_4$	Кремофор EL	$2.8 \times 10^4$ (709)	$2.4 \times 10^4$ (715) <sup>б</sup>	$0.6 \times 10^{-3}$ (0.42)
	Проксанол 268		$1.34 \times 10^4$ (717) <sup>в</sup>	$1.0 \times 10^{-3}$ (0.7)
$1,2\text{NfTACZn}$	Кремофор EL	$5.8 \times 10^4$ (741)	$5.1 \times 10^4$ (746) <sup>г</sup>	$0.95 \times 10^{-3}$
$\text{H}_2\text{TB}^1\text{TACPyg}^{\text{N-Me}}$	Проксанол 268	$1.6 \times 10^4$ (751)	$0.67 \times 10^4$ (756) <sup>б</sup>	$5.18 \times 10^{-4}$ (0.35)
$\text{H}_2\text{TBTAC}$	Проксанол 268	$9.5 \times 10^4$ (742)	$1.5 \times 10^4$ (700)	$1.36 \times 10^{-4}$ (0.071)
$\text{H}_2\text{TACPh}_6$	Проксанол 268	$3.7 \times 10^4$ (722)	$1.7 \times 10^4$ (717)	$1.63 \times 10^{-4}$ (0.135)

а) Точность  $\pm 3$  отн. %

б) Для концентраций  $\leq 1.5 \times 10^{-4}$  М.

в) Не изменяется при разбавлении водой или 4% Проксанолом в пределах концентраций  $0.7-10 \times 10^{-4}$  М.

г) Для концентраций  $\leq 0.5 \times 10^{-4}$  М не меняется при разбавлении водой в 100 раз.

**Таблица 2.** Фотоиндуцированная и темновая токсичность водных эмульсий

$\text{H}_2\text{PyrTACPh}_4$  в 4% Кремофоре EL.

Облучение	Культура HEp2		Культура A549	
	Время инкубации, час	ИК <sub>50</sub> , мкМ	Время инкубации, час	ИК <sub>50</sub> , мкМ
В присутствии соединения в среде инкубации	0.5	$2.9 \pm 0.5$	2	$1.63 \pm 0.4$
	1	$1.43 \pm 0.4$		
	2	$1.33 \pm 0.4$		
	4	$1.0 \pm 0.2$		
В его отсутствие (смена среды)	0.5	$4.6 \pm 0.6$	2	$1.69 \pm 0.3$
	1	$2.65 \pm 0.3$		
	2	$1.25 \pm 0.3$		
	4	$1.15 \pm 0.2$		
Инкубация с соединением без облучения (темновая токсичность)	2	$\gg 20$	2	$\gg 20$
	4	$\sim 25$	4	$21 \pm 4$
	24	$12.5 \pm 0.5$	24	$14.3 \pm 3.7$



Таблица 3. Фотодинамическая активность *in vivo* водных эмульсий  $H_2PugTACPh_4$  в 4% Кремофоре EL и в 4% Проксаноле 268

Режим воздействия	Доза, мг/кг	Время до облуч., час	Кол-во животных	ТРО, %			
				10 дней	15 дней	20 дней	25 дней
$H_2PugTACPh_4$ в 4% Кремофоре EL	6.0	-	7	11.2	4.6	-4.4	-29.7
	3.0		7	-6.3	-6.3	-16.1	-18.4
	1.0		6	-11.4	-17.1	-57.7	-40.6
	0.5		2	23.8	23.8	-5.3	-16.4
	0.1		2	23.8	-	10.5	1.8
Облучение P -250 мВт/см <sup>2</sup> . d - 300 Дж/см <sup>2</sup>	-	-	3	23.1	25.0	6.5	11.1
$H_2PugTACPh_4$ + ФДТ в 4% Кремофоре EL	6.0	48	8	69.9	56.8	68.3	52.2
	3.0		6	79.9	80.0	69.8	61.7
$H_2PugTACPh_4$ + ФДТ в 4% Кремофоре EL	6.0	24	11	92.3	78.8	89.9	89.6
	3.0		9	93.1	93.1	79.3	70.6
	1.0		15	82.5	70.3	61.3	57.5
	0.5		4	4.8	4.8	-18.4	-16.4
	0.1		4	33.3	33.3	18.4	21.8
$H_2PugTACPh_4$ + ФДТ в 4% Кремофоре EL	1.0	0.5	18	-	63.7	65.1	61.9
	0.5		13	-	61.8	45.1	43.4
Проксанол 268 (4% раствор)	0.4 мл	-	4	7.7	12.5	-49.4	3.9
Проксанол 268 + ФДТ	0.4 мл	0.5	3	-	37.5	26.3	25.0
$H_2PugTACPh_4$ в 4% Проксаноле 268	7.0	-	4	16.7	11.1	10.8	9.8
	3.5		3	8.3	-16.7	5.4	-16.4
	1.0		8	-2.1	-23.6	-27.3	-26.0
$H_2PugTACPh_4$ + ФДТ в 4% Проксаноле 268	7.0	24	4	100.0	100.0	97.3	93.4
	3.5		4	100.0	100.0	91.9	91.8
	1.0		4	58.3	61.1	54.0	27.9
$H_2PugTACPh_4$ + ФДТ в 4% Проксаноле 268	1.0	0.5	4	50.0	55.0	63.7	52.6
	0.5		4	25.0	70.0	63.7	58.0

**Таблица 4.** Фотодинамическая активность *in vivo* эмульсий H<sub>2</sub>TACPh<sub>6</sub>, H<sub>2</sub>TBTAC и H<sub>2</sub>TB<sup>t</sup>TACPyg<sup>N-Me</sup> в 4% Проксаноле 268.

Тетраазахлорин	Доза, мг/кг	Время до облуч., час	К-во животных	ТРО, %	
				10 дней	20 дней
H <sub>2</sub> TACPh <sub>6</sub>	1.35	2	4	100%	94.6
	0.67	2	4	77.1	79.7
H <sub>2</sub> TBTAC	0.71	2	4	80.0	78.0
	0.35	2	4	20.0	70.0
H <sub>2</sub> TB <sup>t</sup> TACPyg <sup>N-Me</sup>	3.3	2	9	44.4	69.7

**Таблица 5.** Противоопухолевая эффективность ФДТ с эмульсией H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub> в 4% Кремофоре EL в отношении опухоли P-388 *in vivo*.

Воздействие	Доза, мг/кг	Показатель роста опухоли	Дни после ФДТ				СПЖ, сутки (УПЖ, %)
			8	11	13	15	
H <sub>2</sub> PygTACPh <sub>4</sub> -CrEL + облучение	1.0	см <sup>3</sup> ТРО, %	0.01±0.01 96.3	0.03±0.02 93.6	0.06±0.03 91.0	0.17±0.08 83.5	35.0±6.4 (42.9)
	0.5	см <sup>3</sup> ТРО, %	0.08±0.05 70.4	0.14±0.08 70.2	0.15±0.09 77.6	0.24±0.15 76.7	30.6±6.4 (24.9)
4% Кремофор (контроль)	0.0	см <sup>3</sup>	0.27±0.06	0.47±0.12	0.67±0.14	1.03±0.20	24.5±1.2
H <sub>2</sub> PygTACPh <sub>4</sub> -CrEL	1.0	см <sup>3</sup> ТРО, %	0.23±0.05 4.2	0.38±0.09 20.8	0.71±0.14 -7.6	0.92±0.15 -8.2	25.2±0.6 (11.5)
4% Кремофор (контроль)	0.0	см <sup>3</sup>	0.24±0.03	0.48±0.11	0.66±0.11	0.85±0.13	22.6±1.3

Эмульсия H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub> в 4% Кремофоре (H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub>-CrEL) обладает фотоиндуцированной активностью на культуре опухолевых клеток человека (таблица 2). В стандартных условиях скрининга ИК<sub>50</sub> при облучении составляет в среднем 1-33 мкМ (культура HEP2) и 1.63 мкМ (культура A549), "темновая" токсичность в этом диапазоне концентраций отсутствует. Варьирование времени инкубации и условий облучения позволяет заключить, что близкая к максимуму эффективная концентрация H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub> в клетках достигается к 2 часам и фототоксичность на этот срок обусловлена преимущественно внутриклеточным фотосенсибилизатором. Аналогичная эмульсия Zn-1,2-TNTAC обладает сравнительно низкой фотоиндуцированной активностью: величина ИК<sub>50</sub> для него оказалась равной 31.0 мкМ (культура HEP2).

Фотодинамическая активность *in vivo* водных эмульсий H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub> изучена на мышах с солидной формой асцитной карциномы Эрлиха (ОЭ). H<sub>2</sub>PygTACPh<sub>4</sub> в водном растворе 4% Кремофора EL (в дозах 0.1-6.0 мг/кг) и 4% Проксанола 268 (в дозах 1.0-7.0 мг/кг) не подавлял роста опухоли в отсутствие светового воздействия, т.е. не обладал "темновой"

цитотоксичностью (таблица 3). При проведении ФДТ через 48 и 24 часа после внутривенного введения  $H_2PyrTACPh_4$  в дозах 1.0, 3.0 и 6.0 мг/кг отмечен выраженный противоопухолевый эффект на всем протяжении наблюдения (ТРО=52.2-92.3%). При проведении сеанса облучения через 0.5 часа после введения фотосенсибилизатора в дозе 1.0 мг/кг терапевтический эффект регистрировался на протяжении 25 дней наблюдения (ТРО=61.9-65.1), а в дозе 0.5 мг/кг - только на 15-ый день после ФДТ (61.8%).

Раствор  $H_2PyrTACPh_4$  в 4% Проксаноле 268 проявлял высокую фотодинамическую активность в отношении экспериментальной ОЭ при введении в дозах 3.5 и 7.0 мг/кг за 24 часа до сеанса ФДТ - торможение роста опухоли достигало 91.8-100% (таблица 3). При более низких дозах (1.0 и 0.5 мг/кг) биологически значимое подавление роста опухоли отмечалось при облучении через 0.5 часа после введения и составляло 52.6-70.0% на 15-25 день наблюдения. Сравнение фотодинамической активности  $H_2PyrTACPh_4$  в Кремофоре ЕЛ и Проксаноле 268 не выявило существенных различий (таблица 3).

Водные эмульсии  $H_2TACPh_6$ ,  $H_2TBTAC$  и  $H_2TB^tTACPyr^{N-Me}$  в 4% Проксаноле 268 в аналогичных условиях также не обладали "темновой" токсичностью и проявляли выраженную активность при проведении сеанса ФДТ через 2 часа после введения (таблица 4). Следует отметить высокую активность  $H_2TBTAC$ , обеспечивающего высокие значения ТРО при низких дозах (до 0.35 мг/кг).

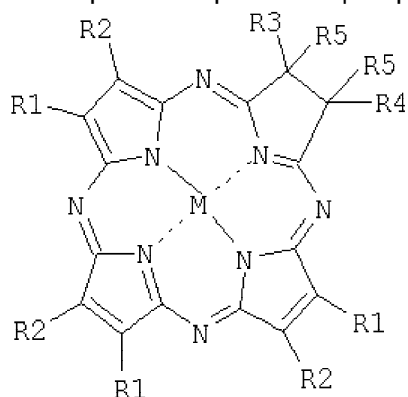
Изучена также фотодинамическая активность *in vivo* водных эмульсий  $H_2PyrTACPh_4$  в 4% Кремофоре на мышах с опухолью Р-388. ФДТ с  $H_2PyrTACPh_4-CrEL$  приводило к развитию характерных тканевых реакций - отека с последующим формированием некротического струпа у всех животных через 8-9 дней после облучения. ФДТ с  $H_2PyrTACPh_4-CrEL$  приводила к выраженному подавлению роста опухоли Р-388 на все сроки наблюдения и увеличению продолжительности жизни животных (таблица 4).

Лечебный эффект ФДТ выше при дозе фотосенсибилизатора 1.0 мг/кг, чем при дозе 0,5 мг/кг: ТРО превышало 80% при дозе 1.0 мг/кг и 70% при дозе 0.5 мг/кг; УПЖ при дозе 1.0 мг/кг составило 42.9%, при дозе 0.5 мг/кг - 24.9%.

Таким образом, предлагаемые в настоящем изобретении производные тетраазахлорина с интенсивным поглощением в спектральной области 710-750 нм представляют собой новый класс эффективных фотосенсибилизаторов ближней ИК области спектра, которые могут быть использованы для лечения методом ФДТ глубоких опухолевых тканей.

#### Формула изобретения

##### Тетраазахлорины общей формулы



где  $R_1R_2=C_6H_4$ ,  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=H$  ( $H_2TBTAC$ );  
 $R_1R_2=1,2-C_{10}H_6$ ,  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=Zn$  ( $Zn-1,2-TNTAC$ );  
 $R_1=R_2=C_6H_5$ ,  $R_3=R_4=R_5=CH_3$ ,  $M=H$  ( $H_2TACPh_6$ );  
 $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=R_4=C_6H_5$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  $M=H$  ( $H_2PyrTACPh_4$ );  
 $R_1R_2=4-C(CH_3)_3C_6H_3$ ,  $R_3=R_4=H$ ,  $R_5R_5=CH_2N(CH_3)CH_2$ ,  $M=H$  ( $H_2TB^tTACPyr^{N-Me}$ ).  
 как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии.