



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2346874 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 487/22 (2006.01)
A61K 31/409 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.28
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.12.04
(86)	Europeisk søknadsnr	09768255.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.22
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.27
(30)	Prioritet	2008.10.24, GB, 0819594
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Universidade De Coimbra, Reitoria - Paço das Escolas, 3004-531 Coimbra, PT-Portugal Bluepharma - Industria Farmacêutica, S.A., Cimo de Fala São Martinho do Bispo, 3045-016 Coimbra, PT-Portugal
(72)	Oppfinner	DA SILVA ARNAUT MOREIRA, Luís Guilherme, Departamento de QuímicaUniversidade de Coimbra, P-3004-535 Coimbra, PT-Portugal MIGUÉNS PEREIRA, Maria, Departamento de QuímicaUniversidade de Coimbra, P-3004-535 Coimbra, PT-Portugal FORMOSINHO SANCHES SIMÕES, Sebastião José, Departamento de QuímicaUniversidade de Coimbra, P-3004-535 Coimbra, PT-Portugal MAGALHÃES SIMÕES, Sérgio Paulo, Departamento de QuímicaUniversidade de Coimbra, P-3004-535 Coimbra, PT-Portugal URBANSKA, Krystyna, Nowa Góska 12, PL-31-235 Kraków, PL-Polen STOCHEL, Grazynia, Krasieniec Zakupny 78, PL-32-095 Iwanowice, PL-Polen
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av kloriner og deres farmasøytiske anvendelse
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-03/064427 WO-A-2006/053707 WO-A1-2008/102669 WO-A2-03/020309 DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 4 January 1993 (1993-01-04), SUTTER, TIMOTHY P. G. ET AL: "Steric and inductive effects on the basicity of porphyrins and on the site of protonation of porphyrin dianions: radiolytic reduction of porphyrins and metalloporphyrins to chlorins or phlorins" XP002565503 retrieved from STN Database accession no. 1993:437307 & JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, FARADAY TRANSACTIONS, vol. 89, no. 3, 4 January 1993 (1993-01-04), pages 495-502, ISSN: 0956-5000 DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; 5 January 2009 (2009-01-05), PEREIRA, MARIETTE M. ET AL: "Synthesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins:: new opportunities for photodynamic

therapy of cancer" XP002574198 retrieved from STN Database accession no. 2009:875474 &
JOURNAL OF PORPHYRINS AND PHTHALOCYANINES , 13(4-5), 567-573 CODEN: JPPHFZ;
ISSN: 1088-4246, 2009,
SINGH J ET AL: "TRANSDERMAL LONTOPHORESIS: EFFECT OF PENETRATION
ENHANCER AND LONTOPHORESIS ON DRUG TRANSPORT AND SURFACE
CHARACTERISTICS OF HUMAN EPIDERMIS" CURRENT PROBLEMS IN DERMATOLOGY,
KARGER, BASEL, CH, vol. 22, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 179-189, XP008019183
ISSN: 1421-5721

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelsen beskriver fremgangsmåter for fremstilling, egenskaper, farmasøytiske sammensetninger og anvendelse i terapi av sulfonerte kloriner og bakteriokloriner beregnet for fotodynamisk terapi (PDT) av hyperproliferativt vev slik som tumorer, hyperproliferative blodkar og andre forstyrrelser eller uregelmessigheter som er mottakelig for PDT. Spesielt vedrører foreliggende oppfinnelse en ny fremgangsmåte som er i stand til kjemisk å syntetisere stabile kloriner og bakteriokloriner i stor skala, som karakteriseres ved fravær av oppløsningsmiddel, og fraværet av base.

I. OPPFINNELSENS BAKGRUNN

I.A. Teknikkens stilling

Forskjellige tetrapyrrolisk makrosykluser, slik som purpuriner, kloriner, bakteriokloriner, fthalocyanin og benzokloriner, har vist evne både til fortrinnsvis å samle seg i hyperproliferativt vev når det injiseres i en organisme, og for å absorbere lys for å danne en aktivert tilstand som respons på lyset. Disse makrosyklusene viser deretter en cytotoksisk effekt på cellene eller på annet vev der de er lokalisert når de bestråles ved den riktige bølgelengden. Videre forårsaker disse forbindelser også utslipp av energi fra vev, som kan brukes til å finne plasseringen deres.

I PDT injiseres pasienten med en fotosensibilisator (vanligvis mellom ca. 0,1 og ca. 10 mg/kg kroppsvekt) som viser noen selektivitet for lysskade på tumorvevet og etter en viss tid, er svulstområdet bestrålt med synlige eller nær-infrarødt lys (fra ca. 50-200 J/cm²). Fotosensibilisatoren absorberer lys og fluorescens, eller reagerer med substratmolekyler i vevet av elektronet eller hydrogenoverføringsreaksjoner (Type I prosesser), eller overfører sin energi til grunntilstand - molekylært oksygen genererer singlet oksygen O₂(¹Δ_g) som angriper vevet (Type II prosess). En stor bidragsyter til Type I prosess er superoksid (O₂⁻), dannet av elektronoverføring fra elektronisk stimulert sensibilisator. Det er bevis som favoriserer Type II fotooksideringsprosessen framfor type I-prosesser i celler [1,2], men det finnes også påstander om en forsterket PDT respons når superoksidet også genereres [3]. Når det gjelder påvisningen, bestemmes fluorescens ved eksponering til lys i ønsket bølgelengdeområdet og det er nødvendig med lavere energi enn for behandling. Effektiv behandling krever vanligvis dannelse av høye utbytter av singlet oksygen i vevet, som kan ha en synergistisk effekt med den ledsagende dannelsen av superoksid eller andre reaktive oksygenarter.

Egenskapene til optimale sensibilisatorer for PDT behandling omfatter: (i) enkel, effektiv og økonomisk syntese, (ii) stabilitet, renhet og lang holdbarhet, (iii) oppløselighet i bioforenelige

løsningsmidler eller bærere, (iv) med høy absorpsjonskoeffisient i det "fototerapeutiske vinduet" (600-900 nm), (v) singlet molekylært oksygensensibilisering og/eller superoksydgenerering med et høyt kvanteutbytte, (vi) redusert eller ingen mørk toksisitet, (vii) selektiv akkumulering og forlenget retensjon i tumorvev, (viii) lav hudfotosensibilisering under systemisk administrasjon, (ix) kontrollert fotobleking, (x) lette metabolisme eller ekskresjon etter behandling. Sensibilisatoren er bare forløperen til de cytotoksiske artene, i særdeleshet singlet oksygen og andre reaktive oksygenforbindelser slik som superoksidion. Den umiddelbare forløperen for singlet oksygen, og ofte for superoksid, er triplet tilstand av sensibilisatoren. Således krever høyt singlet oksygen kvanteutbytte minst tre sensibilisatorer triplet tilstandsegenskaper: (i) et nært enhetskvanteutbytte, (ii) en elektronisk energi på minst 20 kJ/mol over det for singlet oksygen (94 kJ/mol), (iii) og en lang levetid (flere hundre mikrosekunder). Akkumuleringen og retensjon i tumorvev kan forbedres med tilsetning av spesifikke vektorer, men en relevant iboende egenskap ved sensibilisator for disse formålene er den hydrofile/lipofilisitet til sensibilisatoren og evnen til å tilpasse slike egenskaper for å oppnå de ønskede mål er en meget velkommen egenskap.

Den nedre delen av det fototerapeutiske vinduet bestemmes ved nærværet av hemeproteiner, som står for det meste av absorpsjonen av lyset i det synlige området i vevet. Gjennomtrengning av lys i vev faller raskt under 550 nm. Imidlertid er det en betydelig økning i penetrasjon fra 550 til 630 nm, og penetrasjonen doubles igjen til 700 nm. Dette etterfølges av en 10 % økning i vevspenetrasjon når bølgelengden beveger seg mot 800 nm. Den øvre enden av det fototerapeutiske vinduet bestemmes av absorpsjonen av infrarød stråling i vann, og ved energikravene for effektiv energioverføring til oksygen. Faktisk krever diffusjonskontrollert triplet energioverføring fra sensibilisatoren til molekylært oksygen at triplet energien til sensibilisatoren er minst 115 kJ/mol. I tillegg er singlet-triplet energi splittingen i tetrapyrrolisk makrosykluser ca. 40 kJ/mol [4], noe som krever at sensibilisatoren må ha en singlet energi som er større enn 150 kJ/mol. Tatt i betraktning at Stokes skifte av slike sensibilisatorer vanligvis er små, bør de absorbere lys rett under 800 nm. Konklusjonen er at en ideell sensibilisator sterkt må absorbere lys med bølgelengder på ca. 750 nm. Den sterke absorpsjon av bakteriokloriner ved denne bølgelengden gjør dem til ideelle kandidater for PDT sensibilisatorer. For applikasjoner der lyspenetrasjon ikke er så kritisk, er kloriner også aktuelle kandidater for PDT.

Photofrin®, et hematoporfyrinderivat [5], er den mest brukte fotosensibilisatoren og er godkjent for behandling av en rekke faste svulster [6]. Hematoporfyrinderivat (HpD) fremstilt ved å blande hematoporfyrin med eddiksyre og svovelsyre, etterfulgt av hydrolyse og utfall under sure

betingelser. Denne metoden ble delvis beskrevet av Lipson et al [7]. HpD produsert slik består derfor av en kompleks blanding av porfyriner. Når HpD er delt i sine to viktigste fraksjoner ved gelfiltrering med Sefadex LH-20, er den høyere molekylvekt delen, kalt Photofrin®, en mer effektiv PDT agent [8]. Den anbefalte menneskelige dosen av Photofrin® er 1-2 mg/kg av kroppsvekten.

5 Hovedkomponentene i Photofrin® er dimere og høyere oligomere knyttet til eter, ester og muligens karbon-karbon-koblinger [9].

Photofrin® har noen attraktive egenskaper, inkludert god effekt, vannløselighet, rimelig utbytte for singlet oksygen og enkel produksjon. Photofrin® har imidlertid også noen ufordelaktige egenskaper: (i) det er en kompleks blanding av porfyrindimere og høyere oligomere forbundet med

10 eter, ester eller karbon-karbon-bindinger, (ii) den viser hudfototoksisitet hos pasienter i fire til seks uker etter administrasjon, (iii) på grunn av den relativt svake absorptansen i det røde området (630 nm), begrenser mangel på penetrering av lys gjennom vev vanlig klinisk bruk av Photofrin® i PDT til ødeleggelsen av kreftvev lokalisert mindre enn 4 mm fra lyskilden som brukes i terapi. Dermed er det behov for mer effektiv, kjemisk ren, mindre fototoksisk, bedre lokalisering av sensibiliserende

15 stoffer som absorberer lys mer intenst og i det infrarøde.

Det er kjent i faget at den kjemiske reduksjonen av en av tetrapyrrolringene, som svarer til transformasjonen av porfyrin til klorin, fører til en forskyvning av lengste bølgelengdeabsorpsjonbånd til rødt, samtidig med en økning av absorpsjonskoeffisienten. Slike egenskaper ble undersøkt i andre generasjon av PDT fotosensibilisatorer, og 5,10,15,20-tetrakis(3-

20 hydroksyfenyl)klorin (m-THPC), kommersialisert under navnet Foscan®, dukket opp som en av de mest potente av denne nye generasjonen fotosensibilisatorer [10]. Videre reduksjon av den motsatte pyrrolringen, tilsvarer transformasjonen av et klorin over i et bakterioklorin, fører til forskyvning av absorpsjonsbåndet over i det infrarøde og en ytterligere økning av dens absorpsjonskoeffisient. Men inntil nylig var det en utbredt tro at bakteriokloriner var svært ustabile forbindelser [10] og

25 forskningsinnsats på PDT sensibiliserende stoffer fokusert på kloriner [11]. Senere har det vist seg at stabile bakteriokloriner faktisk kan bli syntetisert [12]. Dette ble ikke fullt verdsatt i den vitenskapelige litteraturen, hvor det ble hevdet at syntese av stabile bakteriokloriner med denne tilnærmingen var begrenset til å fremstille bakteriokloriner med inert funksjonalitet [13]. Imidlertid er bakteriokloriner med ytterligere funksjonalitet fremstilt (se PCT/EP2005/012212, WO/2006/053707).

30 Den åpenbare interessen for bakteriokloriner som PDT sensibilisatorer og rapporter om at noen naturlig forekommende bakteriokloriner var effektive fotosensibilisatorer både in vitro og in vivo [14,15], motiverte til mange forsøk på å syntetisere bakteriokloriner. Syntetiske bakteriokloriner er

fremstilt ved derivatisering av de tilsvarende porfyrinerene *via* tilstøtende dihydroksylering med osmiumtetroksyd [16], intramolekylær syklisering [17], Diels-Alder reaksjoner ved bruk av porfyriner som dienofil [18] eller Diels-Alder reaksjoner med vinylporfyriner der porfyrin er dienet [19], *via* 1,3-dipolare sykloaddisjoner [20] og også ved selvkondensasjon av dehydrodipyrin-acetalderivater [21]. I tillegg er det den klassiske metoden, utviklet for flere tiår siden av Whitlock for å forberede bakteriokloriner, ved reduksjon av 7,8-17,18-pyrrolisk porfyrinposisjoner med diimid [22]. Dette var metoden Bonnet brukte for å syntetisere Foscan og 5,10,15,20-tetrakis(3-hydrofenyl)bakterioklorin [23]. Samtidig leder den meget intensive forskningen på syntesen av bakterioklorinderivater til en rekke patenter basert på de metodene som er beskrevet over (se for eksempel, US2007/7,166,719; US2003/6,624,187; US2003/6,569,846; US2002/6,376,483; US1999/5,864,035; US1998/5,831,088; WO90/12573; WO94/00118; WO95/32206; WO96/13504; WO97/32885; US2006/194,960).

Noen av de nylig syntetiserte bakterioklorinene har ubetydelig mørk toksisitet og en høy tumorselektivitet, er delvis vannløselige og har markerte absorpsjonsbånd i området fra 700 nm til 800 nm. Imidlertid er det fortsatt noen ulemper, nemlig: (i) en komplisert og kostbar syntese som involverer arbeidskrevende rensinger, (ii) begrenset løselighet i vann, som i tilfellet av en systemisk anvendelse, resulterer i en oppløsning i organiske oppløsningsmidler, med en ekstra kjemisk belastning på organismen, eller binding til en bærer, noe som øker kostnadene ved behandlingen, (iii) kjemisk ustabilitet, spesielt i nærvær av lys, (iv) lavt eller ukjent singlet oksygen kvanteutbytte. En interessant representant for denne tredje generasjonen av fotosensibilisatorer er en palladium-bakteriofeoforbid, nå kjent som Tookad®, som er godkjent for fase III kliniske studier. Tookad® er avledet fra bakterioklorofyll, og som de fleste av de naturlig forekommende bakteriokloriner, er det svært følsomt for oksygen, noe som resulterer i hurtig oksydasjon til klorintilstand, som har et absorpsjonsmaksimum ved eller under 660 nm. Videre, hvis en laser brukes for å eksitere bakterioklorin *in vivo*, kan oksidasjon resultere i dannelsen av en ny kromofor som absorberer utenfor laservinduet, noe som reduserer den fotosensibiliserende effekten. Den fotokjemiske nedbrytningen av denne familien av forbindelser ble målt ved 778 nm (13 mW) belysning i TX-100/PBS, og viste at 90 % av forbindelsen ble irreversibelt tapt på 5 minutter (4 J), med samtidig vekst av et klorinbånd på 660 nm [3].

PDT er også grundig testet for behandling av hudlidelser, nemlig aktiniske keratoser, plateepitelkarsinom, Bowens sykdom (intra-epitelial skivepitelcellekarsinom), basalcellekraft, men lite informasjon er tilgjengelig på malignt melanom [24]. Den høye pigmenteringen av melanomt vev

begrenser effektiviteten av PDT når synlig lys anvendes, fordi melanin demper lysgjennomtrengning i vev for bølgelengder under 700 nm. Det er også rapporter om aktuell PDT bruk i ikke-tumoral tilstand, for eksempel psoriasis. Tidligere studier brukte hematoporfyrinderivat [25] og meso-tetrafenylporfinesulfonat tetranatriumsalt [26] i flytende formuleringer som inneholder perkutan
 5 penetrasjonsforsterkere. Men vanligvis, når HpD, eller andre porfyriner anvendes topisk i en (væske, gel, krem, emulsjon osv.) formulering inneholdende en bærer beregnet på å forbedre gjennomtrengningsevnen i vev, har porfyriner en tendens til å bli beholdt som fortynningen av gjennomtrengelighetsforsterker av normale vevsvæsker. I slike tilfeller kan ikke lenger porfyriner
 10 ofte forbundet med tap av spesifisitet for ondartet vev, og normalt vev nær området for påføring kan utvikle vedvarende fotosensibilisering som følge av lokalisert konsentrasjonen av porfyrin.

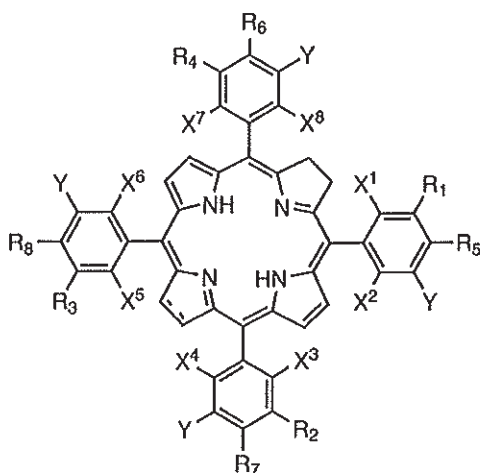
For å overvinne disse problemene, ble det foreslått at heller enn å bruke en porfyrin lokalt ville det være en fordel å bruke et middel som ikke i seg selv er fotosensibiliserende, men som induserer syntesen av endogene porfyriner in vivo, nemlig protoporfyrin-IX (PpIX) [27]. Det er kjent at 5-
 15 amino-4-oxopentansyre, ellers kjent som 5-aminolevulinsyre (eller ALA), er en biologisk forløper til protoporfyrin IX. Et overskudd av ALA fører til en biologisk akkumulering av PpIX, som er det faktiske fotosensibiliserende middelet. Således kan det oppnås en gunstig fototerapeutisk effekt (se, for eksempel WO91/01727) ved å påføre ALA topisk på hudsvulster, og deretter, etter flere timer, utsette svulstene for lys. Siden huden som dekker basilomaer og skiveepitelkreftsvulster lettere
 20 gjennomtrenges av ALA enn frisk hud, og siden biosyntesen av PpIX er mer effektiv i hudsvulster, er det funnet at topisk anvendelse av ALA fører til en selektivt forbedret produksjon av PpIX i svulster. Dette har vært grunnlaget for mange dermatologiske formuleringer av ALA, eller noen av dets derivater, som er godkjent og er i klinisk bruk, særlig Levulan® og Metvix®.

Men mens bruk av ALA representerer en betydelig fordel i faget, er fotodynamisk terapi med
 25 ALA ikke helt tilfredsstillende. Pasienter har gjentatte ganger rapportert å ha opplevd smerter i ALA-PDT [28]. ALA er en prodrug og effektiviteten av medikamentproduksjonen varierer med biosyntesen i individet. Bare en svært begrenset mengde PpIX kan biosyntetiseres av cellene. Den er tilbøyelig til å være ustabil i farmasøytiske formuleringer. Den er ikke i stand til å trenge inn i alle svulster og annet vev med tilstrekkelig effektivitet til å muliggjøre behandling av en rekke svulster
 30 eller andre tilstander. Dennes foretrukne bølgelengde av det fotoaktiverende lyset er ca. 635 nm, mens det har vært vist at bare mellom 1 og 10 prosent av innfallende rødt lys (600-700 nm) kan

passere gjennom en skive av menneskelig vev som er 1 cm tykk. Det finnes derfor behov for forbedrede fotodynamiske terapeutiske midler for topisk påføring.

I.B. Oppsummering av oppfinnelsen

- 5 I henhold til et første aspektet tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (I)

hvor:

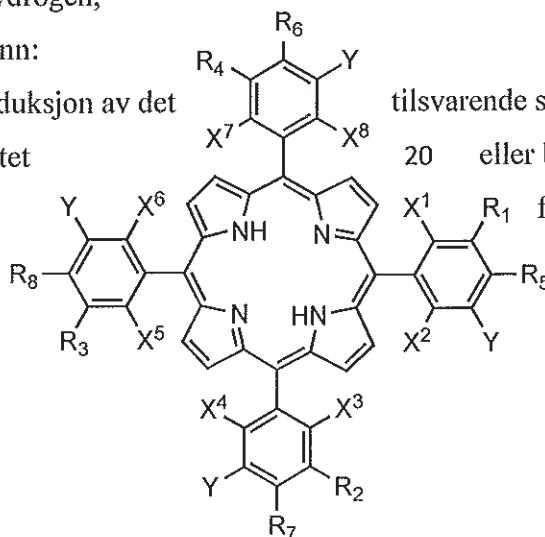
- 10 ----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding, $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8$ er hver uavhengig valgt fra halogen (F, Cl, Br) og hydrogenatomer, forutsatt at enten alle av X^2, X^4, X^6 og X^8 eller alle av X^1, X^3, X^5 og X^7 er halogener, eller alle X er halogener,

- $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$, er uavhengig av hverandre valgt blant H, -OH og $-SO_2R$, hvor R er hver uavhengig valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, $-OR^n$, $-NHR^n$ og $-NR_2^n$ hvor R^n er alkyl med 1 til 12 karbonatomer,

Y er enten fluor eller hydrogen,

omfattende følgende trinn:

- 20 (i) faststoffs-reduksjon av det klorinderivatet tilsvarende substituerte porfyrin til eller bakterioklorinderivat ved hjelp av fravær av oppløsningsmidler og i fravær av baser, der substituerte porfyrin har formelen:



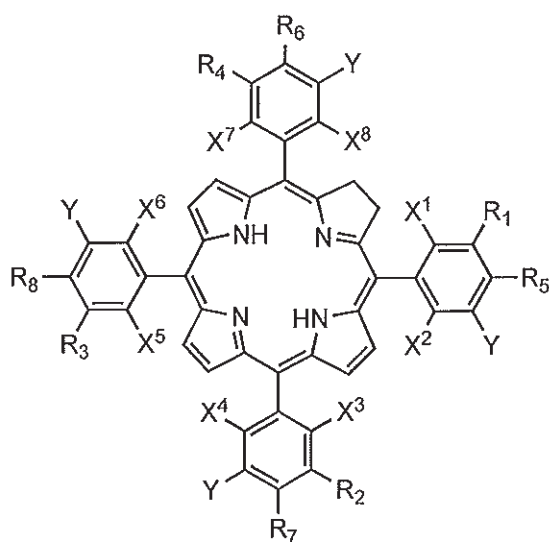
5

10

Formel (II).

Herav følger at forbindelsen med formel (I) kan være et klorinderivat med formelen:

15

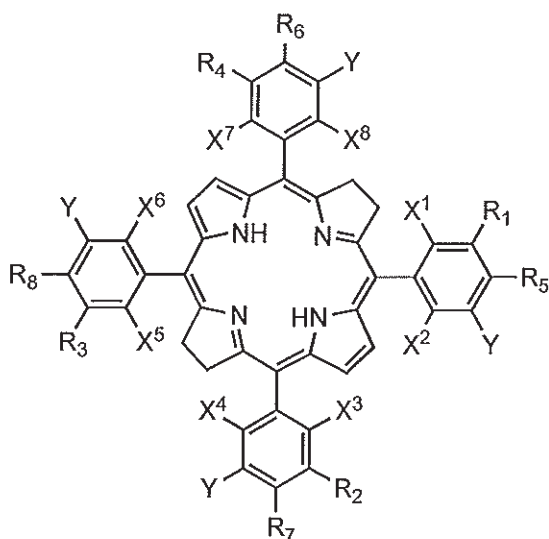


20

Formel (V).

25

Alternativt kan forbindelsen med formel (I) være et bakterioklorinderivat med formelen



Formel (VI).

5 Hensiktsmessig X^2 , X^4 , X^6 , X^8 er hver uavhengig valgt fra halogen (F, Cl, Br).

Hensiktsmessig R_5 , R_6 , R_7 , R_8 er H.

Hensiktsmessig Y er H.

10

Hensiktsmessig R_1 , R_2 , R_3 , R_4 er $-\text{SO}_2\text{R}$, hvor hver R uavhengig er valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, $-\text{OR}^n$, $-\text{NHR}^n$ og $-\text{NR}_2^n$ hvor R^n er alkyl av 1 til 12 karbonatomer.

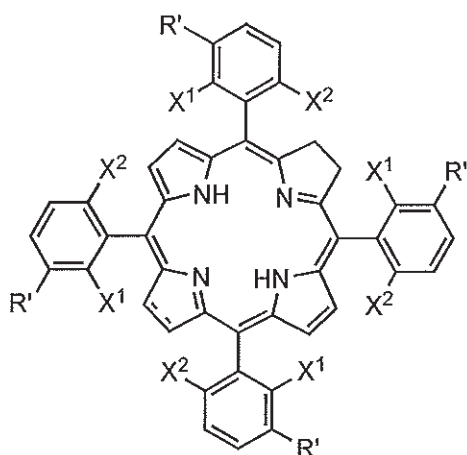
I et videre aspekt er X^2 , X^4 , X^6 , X^8 hver uavhengig valgt fra halogen (F, Cl, Br),

15 R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , er H,

Y er H, og

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 er $-\text{SO}_2\text{R}$, hvor hver R uavhengig er valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, $-\text{OR}^n$, $-\text{NHR}^n$ og $-\text{NR}_2^n$ hvor R^n er alkyl av 1 til 12 karbonatomer.

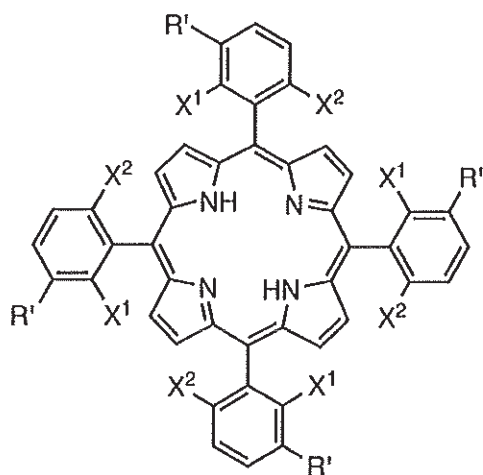
20 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (III)

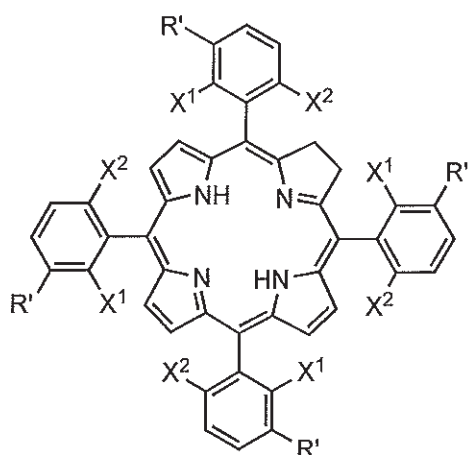
hvor:

- 5 ----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,
 X^2 er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X^1 er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og
 R' er $-\text{SO}_2\text{R}$, hvor R alle er uavhengig valgt fra $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, $-\text{aminosyre}$, $-\text{OR}^n$, $-\text{NHR}^n$ og $-\text{NR}_2^n$ hvor R^n
er alkyl av 1 til 12 karbonatomer,
- 10 som omfatter følgende trinn:
(i) faststoffs-reduksjon av det tilsvarende substituerte porfyrin til klorinderivatet eller
bakterioklorinderivat ved hjelp av hydrazider i fravær av oppløsningsmidler og eventuelt, i fravær av
baser, der tilsvarende substituerte porfyrin har formelen:



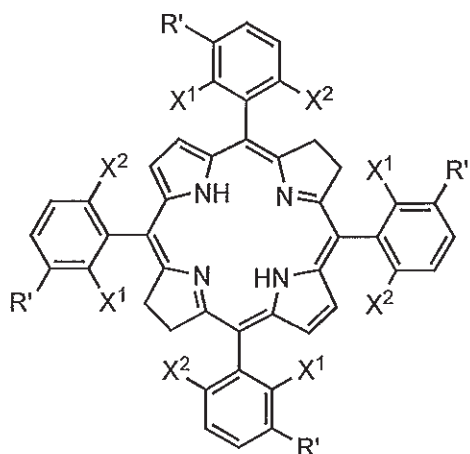
15 Formel (IV).

Herav følger at forbindelsen med formel (III) kan være et klorinderivat med formelen:



Formel (VII).

- 5 Alternativt kan forbindelsen med formel (I) være et bakterioklorinderivat med formelen



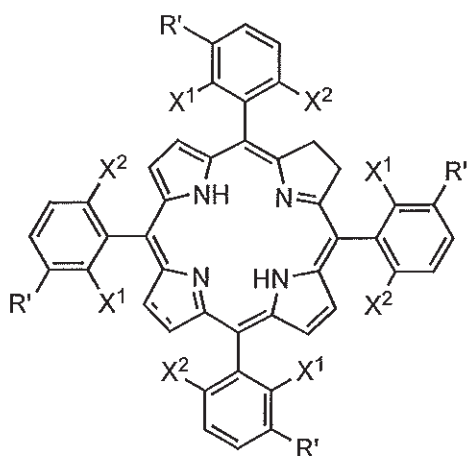
Formel (VIII).

- I et ytterligere aspekt er R', -SO₂R, hvor R er -Cl for det tilsvarende substituerte porfyrinet fra Formel (IV), og fremgangsmåten omfatter det videre trinnet av:
- 10 (ii) binding av klorin eller et bakterioklorinderivat med et amin H-NHRⁿ eller H-NR₂ⁿ, en aminosyre, eller en alkohol H-ORⁿ, hvor Rⁿ er alkyl med 1 til 12 karbonatomer, til å gi et klorin- eller bakterioklorinderivat hvori R' er -SO₂R, hvor R er -aminosyre, -ORⁿ, -NHRⁿ eller -NR₂ⁿ hvor Rⁿ er alkyl med 1 til 12 karbonatomer.

15

I et ytterligere aspekt, beskriver foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning omfattende:

(a) et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (III)

5 eller et farmasøytisk akseptabelt sammensetningsderivat derav,

hvor:

----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,

X^2 er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X^1 er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og R' er $-SO_2R$;

10 R er hver uavhengig valgt fra $-Cl$, $-OH$, $-aminosyre$, $-OR^n$, $-NHR^n$ og $-NR_2^n$ hvor R^n er alkyl med 1 til 12 karbonatomer,

hvor klorin eller bakterioklorinderivatet virker i en fotodynamisk terapibehandling for å lindre symptomene på en hyperproliferativ forstyrrelse, og

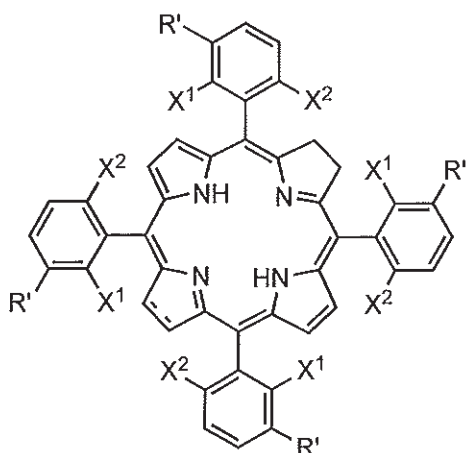
15

(b) en overflategjennomtrengings-forsterker.

I et ytterligere aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen, beskrives anvendelsen av et klorin eller et bakterioklorinderivat, eller et farmasøytisk akseptabelt sammensetningsderivat derav, i påvisningen av hyperproliferativt vev,

20

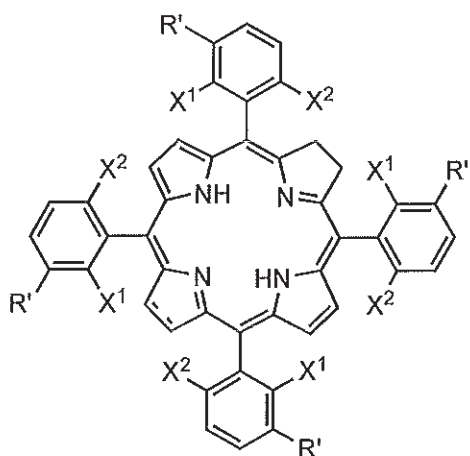
hvor klorin- eller bakterioklorinderivatet med formelen:



Formel (III)

hvor:

- 5 ----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,
 X^2 er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X^1 er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og R' er $-SO_2R$;
 R er hver uavhengig valgt fra $-Cl$, $-OH$, $-aminosyre$, $-OR^n$, $-NHR^n$ og $-NR_2^n$ hvor R^n er alkyl med 1 til 12 karbonatomer,
- 10 I et ytterligere aspekt av den foreliggende oppfinnelsen er det beskrevet en fremgangsmåte for å påvise nærværet av et hyperproliferativt vev hos et individ, omfattende:
 (i) å administrere til individet en tilstrekkelig diagnostisk mengde klorin- eller bakterioklorinderivat med formelen



15 Formel (III)

hvor:

----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,
 X^2 er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X^1 er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og R' er $-SO_2R$;
 R er hver uavhengig valgt fra $-Cl$, $-OH$, $-aminosyre$, $-OR^n$, $-NHR^n$ og $-NR_2^n$ hvor R^n er alkyl med 1 til
 12 karbonatomer,

5

eller et farmasøytisk akseptabelt sammensetningsderivat derav som fortrinnsvis assosierer seg med
 målet,

10

(ii) å tillate tilstrekkelig tid for klorin- eller bakterioklorinderivatet til å assosiere til målet og for et
 hvilket som helst klorin- eller bakterioklorinderivat som ikke fortrinnsvis er assosiert med målvevet å
 klareres fra ikke-målvev, og
 (iii) å visualisere forbindelsen inne i pasienten.

15

Trinnet for visualisering kan oppnås ved å generere et MR-bilde av i alle fall en del av pasientens
 kropp.

Alternativt kan trinnet med å visualisere oppnås ved å utsette forbindelsen for lys med tilstrekkelig
 energi til å forårsake at forbindelsen fluorescerer.

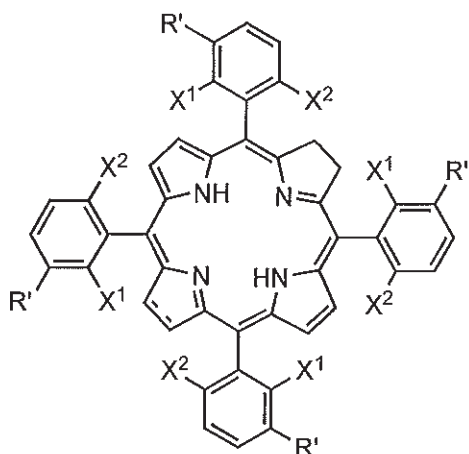
20

I et ytterligere aspekt av den foreliggende oppfinnelsen er det beskrevet en farmasøytisk akseptabel
 sammensetning for anvendelse ved behandling av en hudkreft eller av en hudsykdom valgt fra
 aktiniske keratoser, skivepitelkarsinom, Bowens sykdom, basalcellekarsinom, psoriasis, acne
 vulgaris og rosacea,

der sammensetningen omfatter:

25

(i) et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (III)

hvor:

5

----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,

X² er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X¹ er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og R' er -SO₂R;
R er hver uavhengig valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, -ORⁿ, -NHRⁿ og -NR₂ⁿ hvor Rⁿ er alkyl med 1 til
12 karbonatomer,

10 og

(ii) en farmasøytisk akseptabel bærer for intradermal eller transdermal levering av en slik forbindelse,
hvor bæreren omfatter en overflategjennomtrengings-forsterker som forbigående gjør huden
permeabel og letter gjennomtrengningen av forbindelsen gjennom de ulike hudlagene,

15 hvor

(a) sammensetningen blir administrert til et individ,

(b) tilstrekkelig tid tillates for klorin eller bakterioklorinderivatet til fortrinnsvis å lokaliseres nær
målet for dermatologisk behandling, og

(c) målet bestråles for å oppnå den ønskede responsen for hudkreft eller for hudsykdommen.

20

Prosess for fremstillingen av derivatene

Hensiktsmessig er hydrazinet *p*-toluensulfonyl-hydrazid, 4-klorbensensulfonhydrazid, 4,4'-oksybis (bensensulfonyl)-hydrazid, bensensulfonyl-hydrazid, 4-metoksybensensulfonylhydrazid-eller benzosyrehydrazid.

- 5 Faststoff-reaksjoner krever anvendelse av en temperatur som er over smeltepunktet for en av reaktantene, slik at den andre reaktanten eller reaktantene delvis oppløses, eller dispergeres, i den smeltede. For faststoff-reaksjonene mellom hydrazider og porfyrinderivater utføres faststoff-reaksjonen hensiktsmessig over smeltepunktet for hydrazidet.
- 10 Hensiktsmessig utføres reduksjonstrinnet ved en temperatur på minst 70 °C. Hensiktsmessig utføres reduksjonstrinnet ved en temperatur på minst 100 °C. I et ytterligere aspekt, blir reduksjonstrinnet utført ved en temperatur på 70-200 °C. Hensiktsmessig utføres reduksjonstrinnet i minst 5 minutter.

Hensiktsmessig utføres reduksjonstrinnet under vakuum eller en inert atmosfære.

15

Farmasøytiske sammensetninger

- Hensiktsmessig omfatter den farmasøytiske sammensetningen minst 0,01 vekt% av klorin- eller bakterioklorinderivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, basert på den samlede vekten
- 20 av sammensetningen. Hensiktsmessig omfatter den farmasøytiske sammensetningen fra 0,01 vekt% til 30 vekt% av klorin- eller bakterioklorinderivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, basert på den samlede vekten av sammensetningen. Hensiktsmessig omfatter den farmasøytiske sammensetningen fra 0,01 vekt% til 10 vekt% av klorin- eller bakterioklorinderivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, basert sammensetningens samlede vekt. Hensiktsmessig
- 25 omfatter den farmasøytiske sammensetningen fra 0,1 vekt% til 1 vekt% av klorin- eller bakterioklorinderivat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, basert på den samlede vekten til sammensetningen.

- Når en overflategjennomtrengings-forsterker er til stede i en farmasøytisk sammensetning,
- 30 omfatter hensiktsmessig blandingen 0,05 til 10 vekt% av overflategjennomtrengnings-forsterkeren basert på den samlede vekten av sammensetningen. Hensiktsmessig omfatter preparatet 0,1 til 10 vekt% av overflategjennomtrengnings-forsterkeren. Hensiktsmessig kan en slik gjennomtrengnings-

forsterker velges fra dimetylsulfoksyd og andre dialkylsulfoksider, N-metylformamid, dimetylformamid, dimetylacetamid, glykoler, ulike pyrrolidonderivater og ulike 1-substituerte azacykloalkan-2-oner.

- 5 Egnede glykoler kan velges fra polyetylenglykol, polypropylenglykol 425, trimetylenglykol og propylenglykol-monolaurat.

- Egnede pyrrolidonderivater kan velges fra N-dodecylpyrrolidin-3,5-dion, N-dodecylpyrrolidin-2-tion, N-dodecyl-2-pyrrolidon, N-(2, hydroksyetyl)-2-pyrrolidon, N-cykloheksyl -2-pyrrolidon, 1-
10 butyl-3-dodecyl-2-pyrrolidon, 1,5-dimetyl-2-pyrrolidon, 1-etyl-2-pyrrolidon, 1-heksyl-4-metyloksykarbonyl-2-pyrrolidon, 1-heksyl-2-pyrrolidon, 1-(2-hydroksyetyl)pyrrolidinon, 3-hydroksy-N-metyl-2-pyrrolidinon, 1-lauryl-4-metyloksykarbonyl-2-pyrrolidon og N-metyl-2-pyrrolidon.

- 15 Egnede 1-substituert azacykloalkan-2-oner, inkluderer 1-dodecylazacycloheptan-2-on heretter referert til som Azone®, er beskrevet i U.S. patenter 4 562 075, 4 405 616, 4 326 893 og 3 989 816.

Påvisning av hyperproliferativt vev

- 20 Når klorin- og bakterioklorinderivater eller farmasøytisk akseptable salter derav, benyttes i påvisning av hyperproliferativt vev, kan det passende hyperproliferativt vevet velges fra et vaskulært endotelvev, neovaskulaturvev, neovaskulaturvev tilstede i øyet, en unormal vaskulær vegg av en tumor, en fast tumor, en tumor i et hode, en tumor i en hals, en tumor i et øye, en tumor i en mage-
25 tarmkanal, en tumor i en lever, en tumor i et bryst, en tumor i en prostata, en tumor i en lunge, en ikke-fast tumor, maligne celler fra en av et hematopoietisk vev og et lymfoid vev, lesjoner i vaskulærsystemet, en syk benmarg, og syke celler hvori sykdommen er en av en auto-immun- og en inflammatorisk sykdom.

Behandling av hyperproliferative forstyrrelser

I et ytterligere aspekt, beskriver foreliggende oppfinnelsen anvendelse av et klorin- eller bakterioklorinderivat som beskrevet heri, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, i fremstillingen av et medikament for anvendelse ved behandling av hyperproliferative lidelser.

5 Når klorin- eller bakterioklorinderivat eller et farmasøytisk akseptable salter derav anvendes ved behandling av hyperproliferative forstyrrelser, er hensiktsmessig den hyperproliferative lidelsen valgt fra kreft eller karsinomer, myelomer, psoriasis, maculadegenerasjon. Passende eksempler er magekreft, tarmkreft, lungekreft, brystkreft, livmorkreft, spiserørskreft, eggstokkreft, kreft i bukspyttkjertelen, kreft i svelget, sarkomer, leverkreft, kreft i urinblæren, kreft i overkjeven, kreft i
10 gallegangen, hode og nakke kreft, kreft i tungen, cerebral tumor, hudkreft, malignt struma, prostatakreft, tykktarmskreft, kreft i spyttkjertelen, Hodgkins sykdom, multippelt myelom, nyrekreft, leukemi, og ondartet lymfocytoma.

Slike behandlinger omfatter hensiktsmessig bestråling av klorin- eller bakterioklorinderivatet
15 eller farmasøytisk akseptabelt sammensetningsderivat derav, med lys av en bølgelengde som passer til absorpsjonsbåndene for klorin eller bakterioklorinderivatet. Hensiktsmessig har lyset en bølgelengde på 600-800 nm. Når kloriner brukes har hensiktsmessig lyset en bølgelengde på 630-690 nm. Når bakteriokloriner brukes har hensiktsmessig lyset en bølgelengde på 720-780 nm.

20 Lysdosen er hensiktsmessig fra 1 til 250 J/cm². I noen aspekter er lysdosen hensiktsmessig mindre enn 50 J/cm², mindre enn 20 J/cm², mindre enn 10 J/cm².

Hensiktsmessig er dosen av klorin eller bakterioklorinderivater eller farmasøytisk akseptable salter derav, fra 0,01 mg til 200 mg pr kilo kroppsvekt pr dag. Hensiktsmessig er en dose på fra 0,01
25 mg til 100 mg pr kilo kroppsvekt pr dag.

Foreliggende oppfinnelse ble gjort i lys av den kjente teknikken som er beskrevet over. Syntesen som er beskrevet i WO 2006/053707 (PCT/EP2005/012212) omfattet bare tre nesten kvantitative trinn: (i) funksjonalisering av halogenerte tetrakisfenylporfyriner *via* klorsulfonering av
30 fenyling, (ii) syntese av amfyfiliske forbindelser *via* reaksjon av klorsulfongruppen med nukleofiler, vann, nemlig aminer eller alkoholer, iii) reduksjon av tetrapyrrolmakrosykelen med hydrazidderivater i nærvær av uorganiske eller organiske ikke-nukleofile baser. Imidlertid, som illustrert i figur 2 i

patentet WO 2006/053707, er syntesen av halogenerte sulfonerte bakteriokloriner med denne metoden forbundet med forurensning av det analoge klorinet og rensingen krever en omstendelig separasjon. Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en økonomisk og miljøvennlig, storskalasyntese av rent, stabilt og funksjonalisert tetrakisfenylkloriner og tetrakisfenyl-
 5 bakteriokloriner som bærer elektrontiltrekkende grupper i *orto*-stillingene av fenyrlingene.

Halogenerte sulfonerte bakteriokloriner har forskjellige egenskaper som gjør dem til foretrukne lyssensibilisatorer for PDT:

1) Nærværet av halogenatomer i *orto*-posisjonene til fenyldgruppene oppfyller tre funksjoner. For det første gir de en kontrollert "tungtatom-effekt", som øker utbyttet av sensibilisatorens triplet
 10 tilstand uten å forstyrre triplettens levetid og dens evne til å overføre den elektronisk energi effektivt til molekylært oksygen [29]. For det andre, stabiliserer de den reduserte tilstanden i tetrapyrrolmakrosykler, både ved elektroniske og steriske effekter. For det tredje akselererer de hastighetskonstanten for energioverføring til molekylært oksygen gjennom ladeoverføringsinteraksjoner, som fører til stort utbytte av singlet oksygen, superoksid og andre
 15 reaktive oksygenarter.

2) Nærværet av sulfonsyregruppen i *meta*-posisjonene til fenyldgruppene, oppfyller to funksjoner. For det første gir det en metode for å skreddersy hydrofilitet/lipofilitet til sensibilisatorene, fordi svært hydrofobe sensibilisatorer synes å være mindre fototoksiske, trolig på grunn av lav oppløselighet og lav evne til å relokalisere fra plasmamembranen inn i andre
 20 intracellulære rom, mens svært hydrofile fargestoffer overveiende kan lokalisere i tumor stroma og få redusert PDT effekt [30]. For det andre, gir sulfonsyre-gruppen, spesielt med store eller lange substituentter som er knyttet til den, en ekstra sterisk beskyttelse mot oksidasjon i bakterioklorinkjernen til fargestoffene.

3) Den samtidige tilstedeværelsen av halogenatomer i *orto* posisjonene og sulfonsyregruppen i
 25 *meta* posisjonene til fenyldgruppene oppfyller også en annen funksjon. Molekylær modellering og eksperimentelle data viser at når det er en begrenset rotasjon av enkeltbinding ved meso-posisjonen på 5,10,15,20-tetrafenylporfyriner med usymmetriske fenyrlinger, resulterer geometriske isomerer (kjent som atropisomerene) fra den annen posisjon til *orto* og/eller *meta* substituentter relativt til porfyrinplanet [31]. Atropisomerene har signifikant forskjellige polariteter og absorpsjons-
 30 koeffisienter for det lengste bølgelengde absorpsjonsbåndet som kan avvike med nesten en størrelsesorden. Spesielt har α_4 isomerer, med de fire sulfamoyl-substituentene på samme side av porfyrinplanet, den høyeste absorpsjonskoeffisienten og er den mest amfifile av atropisomerene.

Den utbredte bruken av sulfonerte kloriner og bakteriokloriner i PDT krever en økonomisk og miljøvennlig syntese som kan utføres i en industriell skala. Det er et sentralt formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en ny fremgangsmåte for fremstilling av slike forbindelser basert bare på forløperen porfyrin og et hydrazid, hvor den sistnevnte blir tilsatt i fast tilstand, varmes opp til over smeltetemperatur i en forseglet reaktor i fravær av oksygen og base, og det ønskede produkt oppnås etter en tid.

Den foreliggende oppfinnelse beskriver fremgangsmåter for PDT ved bruk av topisk administrering av nevnte sulfonerte klorin eller bakterioklorin med en egnet bærer. Bærer for topisk administrasjon av fotosensibilisatorer kan ha forskjellige former, inkludert flytende løsninger, geler, kremer, emulsjoner, salver, osv. Typisk formulering av slike bærere omfatter minst en overflategjennomtrengningsforsterker. Mot den konvensjonelle kunnskapen på dette området om at legemidler med molekylvekter som overstiger 500 Dalton ikke trenger godt inn i huden [32], tilveiebringer vi formuleringer for effektiv intradermal levering av nevnte sulfonerte kloriner eller bakteriokloriner til hudlidelser, hvor de nevnte molekyler oppnår molekylvekter litt i overkant av 1 kD.

Denne oppfinnelsen beskriver forbindelser for behandling og påvisning av hyperproliferativt vev slik som tumorer, ved bruk av fotodynamiske metoder. Forbindelsene er også anvendelige for behandling av dermatologiske lidelser som psoriasis, acne vulgaris og rosacea, gynekologiske forstyrrelser slik som dysfunksjonell livmorblødning, urologiske forstyrrelser slik som kondylom virus, kardio-vaskulære lidelser så som restenose og aterosklerotisk plakk, fotodynamisk destruksjon av bakterier eller virus, hårfjerning og kosmetikk, hemming av immunresponser etter transplantasjon av organer eller vev.

Endelig er det et ytterligere formål med oppfinnelsen å beskrive fremgangsmåter for diagnostisering av hyperproliferativt vev ved hjelp av halogenerte sulfonerte kloriner eller bakteriokloriner. Under forutsetning av at disse forbindelsene fortrinnsvis samler seg i slikt vev, er den ytterligere egenskapen som kreves i diagnostiske formål entydig påvisning av meget små mengder av slike forbindelser. Disse forbindelser har svært distinkte absorpsjonsbånd i rødt og infrarødt, hvor vevene er mest transparente. Den selektive eksitering av disse forbindelsene fører til tydelig fluorescens ved bølgelengder der biologiske molekyler ikke emitterer. Påvisning av fluorescens kan gjøres med meget følsomt utstyr og der sub-nanomolar mengder av halogenerte sulfonerte kloriner eller bakteriokloriner kan måles i biologisk media. Kilden til bestråling for fotodiagnose og fototerapi er ikke begrenset, men en laserstråle er å foretrekke fordi intensive

lysstråler i et ønsket bølgelengdeområde kan påføres selektivt. Det er nødvendig at lysstrålene har tilstrekkelig intensitet til å forårsake at forbindelsene emitterer fluorescens for diagnose og å utøve en celledrependeeffekt for terapi. I tillegg kan fluor-MRI (Magnetic Resonance Imaging) detektere akkumulering av disse forbindelsene i små områder av kroppen og følge metabolittene som dannes i små områder av kroppen når fluorsulfonerte kloriner eller bakteriokloriner anvendes.

II. DETALJERT BESKRIVELSE

II. A. Definisjoner

Som anvendt heri, betyr "hyperproliferative forstyrrelsene" de tilstandsforstyrrelser som deler som underliggende patologi av overdrevne celleproliferasjon forårsaket av uregulert eller unormal cellevekst, og inkluderer ukontrollert angiogenese. Eksempler på hyperproliferative lidelser inkluderer, men er ikke begrenset til, kreft eller karsinomer, myelomer, psoriasis, maculadegenerasjon.

"Hyperproliferativt vev" som brukes her, betyr vev som vokser ut av kontroll og inkluderer svulster og uhemmet vekst av vener som blodkarvekst funnet i aldersrelatert maculadegenerasjon.

Som benyttet heri, angir "tumor" et neoplasma, og omfatter både godartede og ondartede svulster. Dette begrepet omfatter spesielt ondartede svulster som kan være enten faste eller ikke-faste (som for eksempel leukemi). Eksempler på svulster er magekreft, tarmkreft, lungekreft, brystkreft, livmorkreft, spiserørskreft, eggstokkreft, kreft i bukspyttkjertelen, kreft i svelget, sarkomer, leverkreft, kreft i urinblæren, kreft i overkjeven, kreft i gallegangen, hode og nakke kreft, kreft i tungen, cerebral tumor, hudkreft, malignt struma, prostatakreft, tykktarmskreft, kreft i spyttkjertelen, Hodgkins sykdom, multippelt myelom, nyrekreft, leukemi, og ondartet lymfocytom.

Som brukt her, "infiseringsmiddel" betegner invaderende mikrober eller parasitter. Som anvendt heri, "mikrobe" betegner virus, bakterier, rickettsie, mykoplasma, protozoer, sopp og lignende mikroorganismer, og "parasitt" betegner infeksiose, vanligvis av mikroskopiske eller svært små flercellede invertebrater eller egg eller unge former derav, som er følsomme for antistoffindusert klaring eller lytisk eller fagocytisk ødeleggelse.

Slik det anvendes her, viser et "farmasøytisk middel" eller "medikament" til en kjemisk forbindelse eller blanding som kan indusere en ønsket terapeutisk eller profylaktisk effekt når den skal gis til et individ. Det omfatter, men er ikke begrenset til fotosensibilisatorer som absorberer lys og bruker det enten til å fungere som et medikament eller for å aktivere andre kjemiske forbindelser som deretter fungerer som medikamenter.

Som anvendt heri refererer et "farmasøytisk akseptabelt sammensetningsderivat" refererer til sammensetninger hvor fotosensibilisatorer er bundet til biologiske aktive grupper, det vil si en hvilken som helst gruppe som selektivt fremmer bindingen, akkumuleringen eller elimineringen i et bestemt biologisk miljø. Eksempler som er kjent innen teknikken omfatter substituenten avledet fra

5 sukkere, aminosyrebaserte derivater, oligonukleotider eller ligander som er spesifikke for reseptorer (steroidhormoner, vekstfaktorer, neurotransmittere eller antistoffer). Den omfatter også salter av fotosensibilisatorer.

Som anvendt heri inkluderer en "farmasøytisk akseptabel bærer" enhver og alle løsningsmidler, dispersjonsmedier, hjelpestoffer for å formulere tabletter, piller, kapsler, kremer, oppløsninger,

10 suspensjoner eller emulsjoner. Det er velkjent innen teknikken hvordan man skal utforme disse farmasøytiske sammensetningene.

Som anvendt heri, refererer en "overflategjennomtrengings-forsterker" til en kjemisk forbindelse eller sammensetning som kan øke eller akselerere transport av medikamentet forbi en barriere, slik som hud og annet vev, og med dimetylsulfoksyd og andre dialkylsulfoksider,

15 dimetylformamid, dimetylacetamid, glykoler, diverse pyrrolidonderivater, Azone®, eller andre av de hudgjennomtrengnings-hjelpestoffer som er beskrevet i litteraturen, eller blandinger derav.

Som anvendt heri menes det med "bestråling" å utsette en gjenstand for alle frekvenser av det elektromagnetiske spektrum. Fortrinnsvis er bestrålingen bølgelengde valgt for å passe til bølgelengden(e) hvor stoffet absorberer lys.

20 Som anvendt heri refererer "Luzitin" til et hvilket som helst sulfonert tetrakisfenylklorin eller tetrakisfenylbakterioklorin med elektrontiltrekkende grupper i *orto*-posisjonene til fenylgruppene, og de følgende forkortelser refererer til spesifikke kjemiske forbindelser som er ikke-begrensende eksempler på denne beholdningen av molekyler:

- Luzitin-Cl-c er 5,10,15,20-tetrakis (2-klor-5-sulfonylfenyl) klorin,
- 25 – Luzitin-fMet-c er 5,10,15,20-tetrakis (2-fluor-5-N-metylsulfamoylfenyl) klorin,
- Luzitin-F er 5,10,15,20-tetrakis (2-fluor-5-sulfonylfenyl) bakterioklorin,
- Luzitin-Cl er 5,10,15,20-tetrakis (2-klor-5-sulfonylfenyl) bakterioklorin,
- Luzitin-Cl₂ er 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-diklor-3-sulfonylfenyl) bakterioklorin,
- Luzitin-FMet er 5,10,15,20-tetrakis (2-fluor-5-N-metylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,
- 30 – Luzitin-F₂ er 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-fluor-3-N-metylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,
- Luzitin-Cl₂Et er 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-diklor-3-N-etylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,
- Luzitin-Cl₂Hep er 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-diklor-3-N-heptylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,

– Luzitin-FMet₂ er 5,10,15,20-tetrakis (2-fluor-5-N, N-dimetylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,

Akronymene under brukes også i dette dokumentet

– Cl₂PhB som er 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-diklorfenyl) bakterioklorin,

- BMPO som er 5-tert-butoksykarbonyl-5-metyl-1-pyrrolin-N-oksyd

5 - BMPO som er 5-dimetyl -1-pyrrolin-N-oksyd

- DMSO som er dimetylsulfoksyd

II. B. Forstadiumsforbindelser

5,10,15,20-tetrakis-(halogen-fenyl) porfyriner og 5,10,15,20-tetrakis (2-cyanofenyl) porfyriner,
 10 5,10,15,20-tetrakis (2-trifluormetylfenyl) porfyriner, 5, 10,15,20-tetrakis (2-nitrofenyl) porfyriner og
 5,10,15,20-tetrakis (2-carboxymetylfenyl) porfyriner ble syntetisert ved hjelp av
 nitrobenzenmetoden [33], blanding av pyrrol med de ønskede halogenerte fenyl-aldehyder i en
 blanding av eddiksyre/nitrobenzen ved 120 °C. Etter avkjøling krystalliseres den rene porfyrinen
 direkte fra reaksjonsmediet. Alle karakteriseringsdata (NMR, FAB, og mikro-analyse) er i god
 15 overensstemmelse med tidligere beskrevne porfyriner.

Klorsulfonering av de nevnte porfyriner ble gjennomført i henhold til en metode som er utviklet
 tidligere [34,35]. Det krevde porfyrinet (200 mg), og klorsulfonsyre (10 ml, 150 mmol) ble omrørt
 ved en temperatur på mellom 50 og 250 °C i 1 til 3 timer. Etter denne perioden ble diklormetan (200
 ml) tilsatt oppløsningen. En kontinuerlig vannekstraksjon ble utført under omrøring, inntil
 20 nøytralisering. Diklormetanoppløsningen ble deretter vasket med natrium-hydrogenkarbonat og
 tørket over vannfritt Na₂SO₄. Rensing ved kolonnekromatografi på silikagel ved anvendelse av
 diklormetan som eluent, og etterfølgende fordampning av løsningsmiddelet, ga de ønskede
 klorsulfonatporfyriner som lilla krystaller.

Hydrolyse av klorsulfonaterte porfyriner over ble utført ved å suspendere 100 mg av den ønskede
 25 forbindelse i destillert vann (120 ml) og refuks i 12 timer. De resulterende oppløsningene ble
 konsentrert ved rotasjonsfordampning, og det faste stoffet som ble oppnådd ble tørket ved 120 °C.
 Sulfonsyreporfyrin-derivater ble samlet med kvantitative resultater. Deres karakterisering ved NMR,
 FAB og mikroanalyse, er i god overensstemmelse med litteraturdata [34,35].

30 II. C. Instrumenter

Absorpsjonsspektra ble registrert på et Shimadzu UV-2100 spektrofotometer eller med en
 Carry 50 biospektrofotometer (Varian, Mulgrave, USA). Fluorescensspektra ble målt med en Spex

Fluorolog 3 spektrofotometer, med korreksjon for bølgelengde-avhengighetssystemet (RCA C31034 fotomultiplikator), eller med en PerkinElmer LS 50 spektrofluorimeter. Transient absorpsjonsspektra ble målt med en anvendt fotofysikk LKS 60 nanosekund laserflash fotolysekinetikk-spektrometer, ved bruk av tredje harmoniske Spectra-Physics Quanta Ray GCR 130-01 Nd/YAG laser for eksitasjon, en Hamamatsu 1P28 fotomultiplikator og et Hewlett-Packard infinium oscilloskop (1 GS/s). Flash fotolysemålinger ble gjort med tilstedeværelse av luft, og i argonmettede løsninger. Fotoakustiskkalorimetri benyttet samme Nd/YAG laser, en hjemmelaget frontface fotoakustiske celle med 2,25 MHz Panametrics transduser (modell 5676) og en Tektronix DSA 601 transientregistrator [36]. Romtemperatur singlet-oksygen fosforescens ble målt ved 1270 nm med en Hamamatsu R5509-42 fotomultiplikator, avkjølt til 193 K i et flytendenitrogenkammer (produkter for forskning modell PC176TSCE005), følgende lasereksitasjon av karboniserte oppløsninger ved 355 nm, ved hjelp av et tilpasset Applied Photophysics spektrometer [37]. Singlet oksygenemisjon på 1270 nm ble også overvåket med flytendenitrogen-kjølt germaniumsdetektor (North Coast) koblet til en Tectronix Digitizing skop(TDS 520B), følgende prøve eksitasjon med 5 ns laserpulser av den tredje harmoniske (355 nm) generert av en Q-omstilt Nd: YAG-laser (Continuum Surelite II).

Elementanalyser ble utført på en *Fisons Instruments EA1108 CHNS-O* elementanalysator. Smeltepunkter ble målt på et *Elektrotermal* kapillær-smeltepunktsapparat. ^1H -NMR og ^{19}F -NMR og ^{13}C -NMR spektra ble målt på en *300 MHz Bruker-Amx*. ^1H tilordninger ble gjort ved hjelp av 2D COSY og NOESY eksperimenter, mens ^{13}C tilordninger ble gjort ved hjelp av 2D HSQC og HMBC eksperimenter. MALDI-TOFMS data ble innhentet ved hjelp av et *Applied Biosystems Voyager DE-STR* instrument (Framingham, MA, USA), som er utstyrt med en nitrogenlaser (= 337 nm).

Elektronparamagnetisk resonans (EPR) spekter av arter med minst et uparet elektron ble utført ved å bruke et Bruker ESP 300 spektrometer (IBM Instruments Inc.). Typisk instrumentinnstilling var: mikrobølgeeffekt 10 mW, amplitudemodulasjon 0,8 G, avøkingsbredde, 60,0 G. EPR-spektra ble registrert i henhold til in situ bestråling med en Hamamatsu diodelaser. Følgende innstillinger ble benyttet for å registrere spektra: høy effekt (4 mW), lav amplitudemodulasjon (0,2 G) og smalt søkeområde (60 G), og 20 søk ble registrert for hvert spektrum.

Bestråling i *in vitro*-forsøkene ble utført ved bruk av enten en halogenlampe eller en laserkilde. I det første tilfelle ble en 500 W halogenlampe plassert 50 cm fra den bestrålte platen for å sikre homogen bestråling. Et avkjølt vannfilter ($d = 35$ mm) og et 600 nm cut off filter ble plassert mellom lampen og prøvene. Flukstettheten som når prøvene var 3 mW/cm^2 . Emisjonsspekteret av halogenlampen ble registrert med et spektrometri IL2000 (Spectrocube), Figur 1. I det andre

tilfellet ble det brukt tre Lynx ekstern-hulrom diodelasere TEC 500 drevet av PilotPC 500 Laser
 Controllers (Sacher Lasertechnik, Marburg, Tyskland). Laserenergiene var stabile på 40 mW for 748
 nm laseren, 10 mW for 649 laseren og 10 mW for 633 laseren. Laserenergiene ble regelmessig målt
 med en Coherent LaserCheck. I noen in vitro-eksperimenter, ble laserlys konsentrert på et optisk
 5 fiber gjennom en kollimator i microbenk, og levert til cellene. Dette systemet reduserte 748 nm
 laserlys til 30 mW.

Bestråling av bakteriokloriner i fotoblekingseksperimenter brukte 748 nm Lynx diodelaseren.
 For dyrestudier brukte vi en spesiallaget Hamamatsu diodelaser, type LA0873, S/N M070301, som
 leverte 140 mW ved 748 nm. Denne diodelaseren ble kontrollert av en Thorlabs 500 mA ACC/APC
 10 laserdiodekontroller og in-house elektronikk. Laserenergien av denne og de andre høyenergilasene
 brukt i dette arbeidet ble regelmessig sjekket med en Ophir modell AN/2E laserenergimåler.

Det tidsavhengige cellulære opptaket av fotosensibilisatorer og cellenes levedyktighet ble
 bekreftet ved fluorescensmikroskopi ved bruk av et *Nikon* ECLIPSE TS-100F instrument.

Fluorescenshudprøvene ble analysert med en Olympus Fluorescence Microscopy, modell
 15 BX51M, ved hjelp av en U-MSWG2 fluorescens speilenehet (eksitasjonsfilter 480-550, emisjonsfilter
 590, dikromatisk filter 570 nm). Konfokalmikroskopi ble utført med en Leica TCS SP5 (Leica
 Mycosystems CMS GmbH, Mannheim, Tyskland) invertert mikroskop (DMI6000) med et 63x vann
 (1,2 numerisk apertur) apokromatisk objektiv. Før man gikk til konfokal modus, ble GUV
 suspensjonen direkte observert ved bruk av en natriumlampe som lyskilde, og et filter for å velge
 20 Rhod-DOPE fluorescens for å evaluere utbytte av GUV dannelsen. Eksitasjonskilden i konfokal
 fluorescens mikroskopi var enten 514 nm linjen fra en Ar⁺ laser, eller 745 nm linjen i en Ti: Sa laser.
 Emisjonen ble samlet 550-800 nm, og dro nytte av den akustisk-optiske innstillbare fiber- og
 stråledeleren til Leica TCS SPC5 systemet. Strølys er minimert i overensstemmelse med en
 "smartforskyvning" som alltid forble under 0,5 % (vanligvis mellom -0,1 % og 0,1 %), og
 25 ubetydelige fotonantall utenfor lipidstrukturer. Konfokale partier med tykkelse under 0,5 nm ble
 oppnådd ved bruk av det galvanometriske motorstadiumet. 3D-proeksjonene ble innhentet ved hjelp
 av Leica Application Suite - avansert fluorescens-programvare.

II. D. Metoder

30 II.D.1. Fordelingskoeffisienter

n-oktanolet: vannfordelingskoeffisienter (CP) ble målt ved bruk av en mindre modifikasjon av riste-kolbe-metoden beskrevet av noen av oss i litteraturen [35]. Modifikasjonen gjelder eksitasjon av absorpsjonsbåndet ca. 500 nm, og innsamling av fluorescensen i rød/IR-området.

5 II.D.2. Fotokjemi og fotofysikk

Fotoblekingseksperimenter ble gjennomført i PBS, PBS: metanol (50:50), og metanol-løsninger. Oppløsningene ble bestrålt i en kyvette med en optisk veglengde på 1 cm og Lynx diodelaser. Den initiale absorpsjon av løsningene var ca. 0,8. Mekanismen for fotobleking ble vurdert med bestrålingen av sensibilisatoren ved bruk av Hamamatsu diodelaser ved 80 mW. Sensibilisator ble bestrålt i PBS og i nærvær av askorbinsyre eller azid.

Fluorescenskvanteutbytte (Φ_F) der det er bestemt i etanol bruker fluorescenskvanteutbytte av Cl₂PHB i toluen [4] som referanse. Absorpsjoner for både referansen og prøveløsningene ble tilpasset ved ca. 0,2 ved eksitasjonsbølgelengden på 515,5 nm, og løsningene ble fortynnet med en faktor 10 før oppfangning av fluorescens. Fluorescenskvanteutbytte ble oppnådd fra forholdet for fluorescensbåndene for prøven vs referansen, multiplisert med fluorescenskvanteutbytte av referansen, 0,012 ifølge [12], etter korreksjon for forskjellen i brytningsindekser for etanol og toluen.

Triplet-triplet absorpsjonsspektre og triplet levetiden for fotosensibilisatorene (τ_T) ble målt med transient absorpsjonsspekterutstyr som er beskrevet ovenfor, med eksitasjon ved 355 nm, hvor oppløsningene hadde absorpsjoner mellom 0,25 og 0,30.

Tidsoppløst fotoakustisk kalorimetri (PAC) ble gjort med oppsettet som beskrevet ovenfor, ved bruk av en fremgangsmåte beskrevet av noen av oss [4]. Alle målingene ble gjort i etanol ved bruk av mangan-5,10,15,20-tetrafenylporfyrin som fotoakustisk referanse.

Singlet oksygen kvanteutbytte i etanol ble oppnådd under anvendelse av en fremgangsmåte beskrevet av noen av oss [37], ved hjelp av fenalenon som referanse. Litteraturverdien for singlet oksygen kvanteutbytte oppnådd med fenalenon i etanol er $\Phi_{\Delta=0,95}$ [38].

II.D.3. Elektronspinnresonans/ elektron-paramagnetisk resonans (EPR)

Reaktive oksygenarter som produseres ved bestråling av fotosensibilisatorer i PBS, nemlig superoksydion og hydroksylradikalet, danner addukter med forskjellige spin-feller. Slike addukter kan identifiseres av EPR. PBS-bufferen som anvendes i disse målingene ble tidligere behandlet med chelaterende harpiks, Chelex 100, for å fjerne eventuelle forurensende metallioner som kan katalysere nedbrytning av peroksider. To spin-feller ble brukt: BMPO og DMPO. DMPO ble først

renset med aktivt kull/benzen, og deretter ble en 1,0 M råkonsentrasjon bestemt spektrofotometrisk ved bruk av $\epsilon_{226} = 7200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. EPR-målinger ble utført ved romtemperatur ved hjelp av Bruker spektrometeret som er beskrevet ovenfor, med in situ bestråling med Hamamatsu diodelaser.

5 II.D.4. Hudgjennomtrengings-tester

Den beste dyremodell for å teste hudgjennomtrengningen er minigrisen, i lys av likhetene mellom minigris- og humane-hudegenskaper [39]. Forskjellige formuleringer av kremer, salver, geler og flytende løsninger ble anvendt for å øke gjennomtrengning av fotosensibilisatoren gjennom hudprøver fra minigris. Formuleringene inneholdt fotosensibilisatorene i mengder varierende fra 0,1
10 til 10 %, med gjennomtrengningsforsterkere som Azone® og DMSO, og forskjellige hjelpestoffer. Ex vivo-tester anvendte hud som var fjernet fra ryggen til minigriser. In vivo-tester ble gjort på ryggen til minigris. I hver test ble formuleringen anvendt i et område på ca. 1 cm^2 av huden i den ønskede tidsperioden under okklusiv bandasje. Så snart denne tiden hadde forløpt, ble formuleringen fjernet med en spatel og vasket med medisinsk bomull innsatt med etanol, inntil ingen spor av
15 sensibilisatoren kan ses i den medisinske bomullen. I in vivo-testene ble hudprøvene fjernet kirurgisk, og dyrene ble deretter avlivet.

Det første trinnet i fremgangsmåten for fiksering av vevet i hudprøvene var nedsenking i paraformaldehyd (4 % i vannoppløsning) i minst 24 timer. Deretter ble prøvene overført til en 25 % sukroseoppløsning i minst 48 timer. Etter denne behandling blir hudprøvene tettere enn sukrose-
20 løsning. En alikvot ble ekstrahert med en biopsi punch, frosset på tørris og deretter montert i holderen med Tissue-Tek O.C.T. Satt sammen (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Nederland) og delt i skiver med kontrollerte tykkelser valgt mellom 25 og 100 μm i en Cryostat. Hudstykkene ble samlet på objektglass og oppbevart i kjøleskap til de ble analysert ved hjelp av fluorescens-
mikroskopi og konfokalmikroskopi. Alternativt, istedenfor å bruke paraformaldehyd som
25 fikseringsmiddel, ble hudprøver frosset direkte i tørris.

II.D.5. In vitro eksperimenter

Medikamentene som er beskrevet her, er evaluert i *in vitro* studier. Ett sett *in vitro*-studier anvender bestråling med en halogenlampe utstyrt med flere filtre. Det andre settet anvendte
30 diodelaserbestråling for å levere lys til hver cellekultur.

II.D.5.ii) In vitro-forsøk med halogenlampe-bestråling

Cellelinjene anvendt i halogenlampe-bestrålingen var MCF7 (human brystkreft), SKMEL 188 (humant melanom) og S91/I3 (melanom hos mus) celler. De ble brukt både for cytotoxisitets- og fotocytotoxisitetseksperimentene. MCF7-celler ble dyrket supplert med 10 % kalvefosterserum (FBS), 25 enheter/ml penicillin, og 25 µg/ml streptomycin. Humane melanomceller SKMEL-188 ble dyrket i F10 medium, supplert med 10 % kalvefosterserum (FCS), 100 enheter/ml penicillin, og 100 µg/ml streptomycin. I3 underlinje av Cloudman S91 melanomceller ble dyrket i RPMI 1640 medium supplert med 100 enheter/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin og 5 % kalvefosterserum (FCS) (Gibco BRL). Alle cellelinjer ble dyrket som monolag i petriskåler med 60 mm diameter og inkubert ved 37 °C i en fuktig atmosfære inneholdende 5 % CO₂.

Cytotoksitet. Cellemetabolsk effektivitet og levedyktighet ble bestemt ved opptak og reduksjon av 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium-bromid (MTT) til et uoppløselig formazanfargestoff av cellulære mikrosomale enzymer. Cellelinjene ble dyrket i RPMI-medium med 10 % kalvefosterserum, penicillin og streptomycin. Celler ble bevart i 5 % CO₂, 95 % luft og 100 % fuktighet. For bestemmelse av cytotoxisetet ble disse cellene utsådd på 96-brønns-plater, med en tetthet på 1×10^4 celler brønn i fullstendig media. Etter 24 timer ble cellene inkubert med fotosensibilisatorer ved forskjellige konsentrasjoner (0,25 opptil 50 µM) i 18 timer ved 37 °C. Cellene ble deretter vasket to ganger med PBS og inkubert i vekstmedium ved 37 °C i 24 timer. Deretter ble mediet erstattet med 100 µl friskt medium og 20µl MTT, og cellene ble inkubert med MTT i 3 timer, med en endelig konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Deretter ble dyrkingsmediet erstattet med DMSO-metanol-oppløsning (1:1) for å oppløse de blå formazankrystallene. De 96-brønns kulturplatene ble rystet i 0,5 min i romtemperatur og umiddelbart avlest for optisk densitet ved 560 nm ved hjelp av en ELISA-leser (GENios Plus; Tecan Trading AG, Sveits). Celleoverlevelsen ble uttrykt ved absorbansendringer i formazansaltet, og overlevelse ble gitt som prosentandel av levedyktige behandlede celler sammenlignet med antallet levedyktige ubehandlede celler. Antall celler ble bestemt fra lineær regresjon fra en kalibreringskurve.

Tidsavhengig cellulært opptak. SKMEL 188, S91 og MCF7-celler ble sådd på 96-brønneplater med 1×10^4 celler pr brønn, og eksponert for 20 µM konsentrasjoner av kloriner og bakteriokloriner fotosensibilisatorer i PBS for ulike tidsintervaller, fra 10 min opp til 180 min for å undersøke tidsavhengig medikament akkumulering. Ved slutten av inkubasjonsintervallet, ble cellene vasket tre ganger med PBS og re-suspendert i 100 µL av 0,25 % Triton X-100 i PBS. Retensjonen av celleassosierte fotosensibilisatorer ble påvist ved fluorescens-måling av akkumulert fotosensibilisatorer ved hjelp av en ELISA-leser. I tillegg ble opptaket av fotosensibilisator og

levedyktigheten til cellene bekreftet ved fluorescensmikroskopi. I disse eksperimentene ble SKMEL 188, S91 og MCF7-celler inkubert i 2 timer med 20 μM av fotosensibilisator, etterfulgt av vasking av cellene tre ganger med PBS, re-suspensjon i PBS, og undersøkelse ved hjelp av fluorescensmikroskopi.

- 5 *Cellefotosensibiliseringen.* SKMEL 188, S91 og MCF7-celler ble fremstilt som beskrevet ovenfor. På grunnlag av cytotoxissitetsanalyser, ble en 5 μM konsentrasjon av fotosensibilisatoren valgt for fotosensibiliseringsanalyser. Cellene ble inkubert i 12 t ved 37 °C og deretter bestrålt med en 0,53 cm mW^2 flukstetthet og i doser fra 0,1 til 0,64 J cm^2 . Vi minner om at fotosensibilisatoren bare bruker ca.1/5 av den tilgjengelige flukstetthet av den filtrerte halogenlampen. MTT-test ble
- 10 utført 24 timer etter bestråling. Verdiene ble oppnådd fra tre uavhengige eksperimenter og uttrykt som prosent av celleoverlevelse med henvisning til kontroll-celler, som ble manipulert på samme måte, men uten inkubering med fotosensibilisator og uten belysning.

II.D.5.ii) In vitro-forsøk med laser bestråling

- 15 Cellelinjene som ble benyttet i laserbestrålingen var HT-29 (humant tykktarmkarcinom), PC-3 (humant prostatakarcinom), SW2 (humant småcellet lungekreft), A-549 (human ikke-småcellet lungekreft), S91/I3 (melanom i mus) og CT26 (tykktarmkarcinom hos mus). De ble brukt både for cytotoxissitet og fotocytotoxissitet eksperimenter. PC-3, SW2 og S91/I3 celler ble dyrket i RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) og HT-29, A-549 og CT26 celler ble dyrket i
- 20 Dulbeccos modifiserte Eagle Medium (DMEM) (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgia). Begge cellekulturmedier ble supplert med 10 % varmeinaktivert Fetal Bovine Serum (FBS) (Cambrex bioscience, Verviers, Belgia) og 100 IE/ml penicillin-100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Cambrex bioscience, Verviers, Belgia). DMEM mediet som brukes for CT26 cellene ble også supplert med 10 mM HEPES. Cellelinjene ble opprettholdt i 75 cm^2 kolber (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgia) ved
- 25 37 °C i fuktet atmosfære med 5 % CO_2 . For in vitro-studier, ble celler ved 85-90 % konfluens løsnet med trypsin-Versene-EDTA-løsning (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgia), tellet og sådd i flatbunnede 96-brønners plater ved ønsket tetthet.

- Cellelevedyktighetsanalyse.* Til slutt ble cellenes levedyktighet evaluert med resazurin reduksjonsanalysen [40]. Resazurin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) stamløsning (0,1 mg/ml i
- 30 fosfatbuffer saltvannsoppløsning (PBS) pH 7,4) ble fortynnet 10 % i kulturmedium uten FBS og antibiotika og 200 μl ble tilsatt cellene i hver brønn. Platene ble inkubert i 3-4t ved 37 °C.

Absorbansverdiene for hver brønn ble målt ved 540 nm og 630 nm ved hjelp av en mikroplateleser Multiskan Ex (Thermo - Elektron Corporation, Vartaa, Finland).

Cytotoksisitet. Celler ble sådd i flatbunnet 96-brønn-plater (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgia) i 100 µl kulturmedium og fikk feste seg over natten. Fotosensibilisatoren ble tilsatt cellene (fortynnet i 100 µl kulturmedium) med endelige konsentrasjoner mellom 0,01 og 1 mM. Hver konsentrasjon ble testet i fire eksemplarer. Inkubasjonsperiodene i mørke ved 37 °C var to ganger doblingstiden for den testede cellelinjen. Etter inkuberingen ble cellelevedyktigheten evaluert. I parallelle kontrolleksperimenter ble celler inkubert uten medikamentet. Cytotoksisitet ble kvantifisert ved å uttrykke celledød relativt til ubehandlede celler (% av kontrollceller). Resultatene ble plottet som doseresponskurver (% celledød som en funksjon av konsentrasjonen av MEDIKAMENTET), som tillater bestemmelse av den konsentrasjon som hemmer 50 % av celleveksten (IC₅₀).

Cellefotosensibilisering. Celler ble sådd i DB Falcon svart 96-brønn-plater med klar flat bunn (DB Biosciences – Labware, NJ, USA) i 100 µl kulturmedium og fikk feste seg over natten. Medikamentet ble tilsatt cellene (fortynnet i 100 µl kulturmedium) for å oppnå den ønskede konsentrasjon. Celler ble inkubert med medikamentet i mørket ved 37 °C i en gitt tidsperiode. Denne perioden av inkuberingen blir vanligvis omtalt som medikament-til-lys-intervallet. Etter inkubering ble cellene vasket en gang med 200 µl med PBS for å fjerne ikke-internalisert medikament og 100 µl med friskt kulturmedium ble tilsatt. Cellene ble bestrålt (hver brønn individuelt) med 748 nm lys fra Lynx diodelaseren som er beskrevet ovenfor, med en effekt på 100,7 mW/cm². Bestrålingstiden ble valgt for å oppnå den ønskede lysdosen. To parallelle kontrollforhold ble testet: celler ble inkubert i mørket med den høyeste dosen av medikamentet og ble ikke bestrålt, og celler ble bestrålt med den høyeste lysdose uten medikament. Etter bestråling ble 100 µl friskt kulturmedium tilsatt. Cellenes levedyktighet ble evaluert omtrent 24 timer etter bestråling.

25 *II.D.6. In vivo eksperimenter*

Musene benyttet i denne undersøkelsen ble delt i to kilder. Mørk toksisitet, biofordelingsstudier og farmakokinetikkstudier brukte DBA/2 mus, som veide 20-30 g, fra avlsanlegget ved Avdeling for biokjemi, biofysikk og bioteknologi, Jagiellonian University, Krakow. Musene ble holdt på en standard laboratoriediett med fri tilgang til drikkevann. Bruken av slike dyr for eksperimentelle formål ble godkjent av Jagiellonian University komité for etikk i dyreforsøk (beslutning nr. 384/99). Slike mus ble også brukt i PDT.

De andre musene var Balb/C, som veide 20-25 g, fra avlanlegget ved Charles River

Laboratories (Barcelona). Musene ble holdt på en standard laboratoriediett med fri tilgang til drikkevann. Bruken av slike dyr for eksperimentelle formål ble godkjent av styret i Centro de Neurociências e biologia Celular (Coimbra).

De fire minigrisene som ble brukt i denne studien ble hentet fra IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) - Aranjuez (Madrid). De var alle 5 hunddyr, i alderen 6-8 måneder, hvite med brune flekker, snittvekt 56,8 kg (66,2, 57,1, 43,5, 60,6 kg). De ankom Estação ZOOTECNICA Nacional, Vale de Santarém, der de ble innkvartert i individuelle bokser med 1,5 m², matet med en standarddiett for griser og vann ad libidum, i en akklimatiseringsperiode på tre uker. Studien ble utført i henhold til de portugisiske etiske 10 retningslinjer etter en lisens gitt av Direcção de Servicos de Saúde e Protecção Animal, jfr. 0420/000/000/2007. Tilgang til mat ble suspendert 24 timer før behandling. Dyrenes rygger ble barbert 24 timer før påføring av preparatene. Den lokale administrasjonen av fotosensibilisatorer ble gjort under narkose. Formedisinering som ble utført 30 min på forhånd var: Azaperone (Stresnil® - Veterinaria ESTEVE - Spania), 2 mg/kg intramuskulær injeksjon + atropinsulfat, 50 mg SC. 15 Induksjonen ble gjort med ketamin (Clorketam® - Vetoquinol, Frankrike), 20 mg/kg, intramuskulær injeksjon. Anestesi ble opprettholdt med endotrakeal intubasjon, ved bruk av spontan ventilasjon med 2-3 l/min oksygen + 3 % isofluran (Isoflo® - Veterinaria Esteve, Spania). Prøvene ble tatt fra tre minigris under anestesi som er beskrevet ovenfor. Hudalikvotene med størrelser 20X20X10 (lengde, bredde, dybde) ble innhentet ved hjelp av kirurgi. Etter innhenting av hudprøvene ble dyrene avlivet 20 med en overdose av natriumtiopental (25 mg/kg) + 20 ml 7,5 % kaliumklorid. Den fjerde minigrisen ble fulgt opp i tre uker mens den ble foret med standard diett for griser og vann ad libidum. Etter tre uker ble lokal administrasjon av fotosensibilisatorer utført under narkose igjen. Dyret ble gjort bevisstløst ved elektrisk støt og drept ved årelating fra halsvenen.

25 II. E. Forbindelsenes egenskaper

II.E.1. Fysiske egenskaper

Som nevnt i Bakgrunnen, er de viktigste fysiske og kjemiske egenskapene til stoffene som er relevante for PDT, en sterk absorpsjon i 600-800 nm spekteret, høy effektivitet av singlet oksygen generering, kjemisk stabilitet, kontrollert fotobleking og oktanol: vannfordelingskoeffisient mellom 30 -2 og 5. Disse egenskapene møter den ønskede lysabsorbansen i det fototerapeutiske vinduet, effektiv fotogenerering av cytotoksiske arter, reduserer bivirkninger som for eksempel langvarig hudfotosensitivitet, og legger til rette for systemiske eller transdermale administrasjonsveier.

Absorpsjonsevne til forbindelsene ble målt ved flere konsentrasjoner, fra 1 til 20 μM , og i alle tilfeller ble det observert at det følger Beer-Lambert-loven. I tillegg varierte ikke bølgelengden for maksimal absorpsjon (λ_{max}) i det infrarøde i det studerte konsentrasjonsområdet. Dette er en indikasjon på liten aggregering mellom molekylerne, som eksisterer hovedsakelig som monomere ved disse konsentrasjonene i de løsemidlene som er studert. Tabell 1 viser typiske røde og infrarøde molar absorpsjonskoeffisienter (ϵ_{max}) og bølgelengdemaksimum. Den samme tabellen presenterer også representative fluorescens kvanteutbytte (Φ_{F}) for Luzitiner. Fluorescens kvanteutbytte synker for disse molekylerne som reduseres i nærvær av klorsubstituent, et fingeravtrykk av tungatom-effekten som forventet for slike molekyler.

Triplet-triplet-absorpsjonsspektra av Luzitinene målt i dette arbeidet var i god overensstemmelse med data i litteraturen for kloriner og bakteriokloriner. Alle oppløsninger av triplet var tydelig monoeksponentielle. I avluftede løsninger, fremstilt ved å spyle N_2 i minst 30 min, har tripletten levetider (τ_{T}) i millisekundområdet, noe som viser ineffektiv fotokjemi i fravær av oksygen. Representative verdier er gitt i Tabell 1. I luftmettet etanol falt triplet levetiden til 200-300 nanosekunder, vesentlig kortere enn levetiden til de tilsvarende porfyrinene. Slike verdier er i overensstemmelse med diffusjonsbegrenset energioverføring fra triplet tilstanden av sensibilisatoren til molekylært oksygen gjennom en ladningsoverførings interaksjon.

All singlet oksygenemisjonen målt i ventilerte etanolløsninger er svært godt beskrevet ved monoeksponensiell oppløsning, med typisk singlet oksygenlevetid (τ_{Δ}). Φ_{Δ} verdiene i Tabell 1 ble oppnådd ved fremgangsmåtene beskrevet ovenfor, og er representative for disse fotosensibilisatorene.

Tabell 1. Fluorescens kvanteutbytte, triplet levetid, singlet oksygen kvanteutbytte og singlet oksygenlevetid på representative fotosensibilisatorer i luftmettede etanolløsninger.

	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Φ_{F}	$\tau_{\text{T}}(\text{air})$ (nsec)	Φ_{Δ}	τ_{Δ} (μsec)
Photofrin®	630	3 200		400 ^{a)}	^{b)}	10,6 ^{a)}
Luzitin-Cl-c ^o)	650	7 000	0,039	-	0,69	-
Luzitin-Cl	746,5	23 000 ^{d)}	0,0403	240	0,43	13,6
Luzitin-Cl ₂	745,0	27 000 ^{d)}	0,0062	226	0,85	15,4
Luzitin-FMet	742,5	62 000 ^{d)}	0,0589	-	0,71	14,1
Luzitin-F ₂ Met	742,5	78 000 ^{d)}	-	-	-	-

Luzitin-Cl ₂ Et	745,5	96 000	0,0081	265	0,66	13,7
Luzitin-Cl ₂ Hep	746	75 000	0,0082	295	0,63	14,3
Luzitin-FMet ₂	742,5	78 000 ^{d)}	0,0585	-	-	-
Foscan®	650	29 600 ^{e)}	0,089 ^{f)}		0,43 ^{f)}	

^{a)} [41]. ^{b)} HpD monomer enheter har $\Phi_{\Delta}=0,64$ i metanol, men i vann er det for det meste til stede i form av dimere med $\Phi_{\Delta}=0,11$ [42]. ^{c)} I vandig oppløsning. ^{d)} Korrigert for klorin-innhold ^{d)} [43]. ^{e)} I metanol, men synker til halvparten av denne verdien i 65 % vann i metanol [44]. ^{f)} I metanol [45].

5 Typisk er summen av fluorescens- og singlet oksygen kvanteutbytter av Luzitins 0,6 til 0,8, og 20 til 40 % av det lyset som absorberes inn anvendes i andre prosesser. Disse prosessene ble undersøkt med tidsoppløst fotoakustisk kalorimetri (PAC) og elektronspinnresonans (EPR). PAC måler hvor mye energi som frigjøres i strålingsfrie prosesser (intern konvertering, intersystemkrysning, kjemiske reaksjoner) i nedbrytingen av elektronisk eksiterte tilstander. EPR

10 måler mengden av arter med uparede elektroner (frie radikaler) som er tilstede i prøven, og ble anvendt her under direkte laserbestråling for å måle fotoindusert generering av superoksidion, hydroksylradikaler og andre reaktive oksygenarter (ROS). Energifrigjøring målt ved PAC samsvarer med dannelsen av bakterioklorin i triplet form med nesten enhet kvanteutbytte og triplet energi på 105-125 kJ/mol, i samsvar med litteraturdata på halogenerte bakteriokloriner [12]. EPR-spektra som

15 ble innsamlet under bestråling av Luzitiner i PBS og i nærvær av DMPO og BMPO, avslørte tilstedeværelse av superoksydion og hydroksylradikalet. Sammen viser EPR og PAC-data entydig at bestråling av disse fotosensibilisatorene ved 748 nm, fører til dannelsen av superoksydion, og deretter med hydroksylradikal, som bidrar til fototoksisitet av Luzitiner. Dermed er fototoksisiteten til sensibilisatorene høyere enn det som forventes av deres singlet oksygen kvanteutbytter, som allerede

20 er 5 ganger høyere enn for Photofrin®.

Den kjemiske stabiliteten til forbindelsene ble studert ved å utsette dem for lys, luft, og pH- endringer. Den viktigste forringelsen oppstår for luftede løsninger bestrålt med lys av passende bølgelengde. I slike tilfeller følger fotobleking av forbindelsene en første ordens hastighet og er proporsjonal med energien av det innfallende laserlyset. Generelt ble det også observert at

25 fotoblekingshastigheten øker med mengden av vann tilstede i oppløsningen. Bonnett rapporterte fotokonvertering av Foscan® (m-THPC) og av det analoge bakterioklorin (m-THPB) i PBS: metanol (50:50) [46]. Scherz rapporterte fotokonvertering av Tookad® i aceton og Triton-X: PBS [3]. I den hensikt å sammenligne fotostabiliteten for Luzitiner med den for Foscan® og Tookad®, presenterer

vi i tabell 2 halveringstidene ($t_{1/2}$) for representative stoffer som er beskrevet her, sammen med de for Foscan og Tookad® normalisert for en lasereffekt på 100 mW.

Tabell 2. Halveringstider på bakteriokloriner under 100 mW laserbestråling ved 748 nm, og deres n-oktanol: vannfordelingskoeffisienter (K_{OW}).

Medikament	løsemiddel	$t_{1/2}$ (sek)	log K_{OW}
Tookad® ^{a)}	Tensid : PBS	1,56	
Luzitin-F	PBS	58	-
Luzitin-Cl	PBS	174	-1,70
Luzitin-Cl ₂	PBS	358	-1,75
Luzitin-FMet	PBS : metanol	647	2,3
	metanol	3553	
Luzitin-F ₂ Met	PBS : metanol	6480	2,7
Luzitin-Cl ₂ Et	PBS : metanol	4013	1,8
Luzitin-FMet ₂	metanol	4352	>4
Foscan® ^{b)}	PBS : metanol	8582	
Luzitin-Cl ₂ Hep	metanol	164 105	>4

^{a)} [3]. ^{b)} [46].

Vi skiller fotobleking av våre bakteriokloriner fra fotokonvertering av *m*-THPB eller Tookad®. Denne forskjellen er basert på det faktum at etter lengre tids laserbestråling blir de fleste av våre bakteriokloriner omdannet til produkter som ikke har en påviselig synlig absorpsjon, og kan hensiktsmessig beskrives som fotobleking. På den annen side, laserbestråling av *m*-THPB eller Tookad® produserer store mengder av de tilsvarende kloriner, som ikke absorberer det samme laserlyset, og dette beskrives mer hensiktsmessig som en fotokonvertering til en annen farge. Fotoblekingen av våre bakteriokloriner er fordelaktig fordi det gir mindre hud-fotosensitivitet, i motsetning til fotokonverteringen til en annen farge.

II.E.1. Biologiske egenskaper

Photofrin® gir viktige referanser for mørk toksisitet og PDT-effekt in vitro. Toksisiteten til Photofrin® i mørket mot ikke-småcellet lungekreft cellelinje H1299 ble evaluert for flere Photofrin® konsentrasjoner og cellelevedyktigheten ble redusert til 50 % for $IC_{dark50}=8,0 \mu\text{g/ml}$ [47].

En tilsvarende undersøkelse på den mørke toksisiteten til Photofrin® mot Colo-26, en murin tykktarmkarcinom-cellelinje ga $IC_{dark50} \approx 20 \mu g/ml$ ($30 \mu M$, forutsatt en monomer) [48]. Human adenokarsinomcellelinje (HT29) har vært en av de mest studerte cellelinjer i PDT. Konsentrasjonsavhengighets-studiene av Photofrin® i HT29 celler ga den dødelige dosen av 50 % drepning under $5 J/cm^2$ filtrert halogenlys av $IC_{50} = 7,5 \mu g/ml$. For å drepe 90 % økes konsentrasjonen til $IC_{90} = 40 \mu g/ml$ [49]. For den samme cellelinjen, er Foscan® mye mer fototoksisk med $IC_{50} = 0,8 \mu g/ml$ når det brukes en fargelaser ved 650 nm for å levere $10 J/cm^2$, likevel, for denne lysdosen, $IC_{90} > 10 \mu g/ml$ og faller innenfor grensene av sin mørke toksisitet, $IC_{dark50} = 13 \mu g/ml$ [50]. I motsetning til Photofrin®, er den molekylære sammensetningen av Foscan® kjent, og det er mer praktisk å uttrykke dens ICer i molare enheter. I disse enhetene er den mørke cytotoxiskiteten til Foscan® $IC_{dark50} = 19 \mu M$, og toksisiteten for en lysdose på $10 J/cm^2$ er $IC_{50} = 1,2 \mu M$. Til slutt er det interessant å vise til at Tookad® forårsaker en 50 % dødsrate på HT29-celler i en dose på $48 \mu M$ under en bestråling på $25 J/cm^2$ (Patent US2003/6569846). Selv om verdiene av IC_{50} og IC_{90} avhenger av administrasjonsmåter, inkubasjonstid, lysfluens og andre detaljer av forsøkene, er verdiene gitt ovenfor beskrivende for beste praksis på dette feltet.

Tabell 3 sammenligner mørke toksisitet for Photofrin® og Foscan® med den for luzitiner. Ved hjelp av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor, og i mer detalj i eksemplene nedenfor, er lysdoser som kreves for å drepe 50 % og 90 % av flere cellelinjer i henhold filtrert halogenlys i nærvær av et halogenert og sulfonert klorin presentert i tabell 4, og de tilsvarende verdiene for et halogenert og sulfonert bakterioklorin er presentert i Tabell 5. Tabell 6 viser fototoksiskiteten når det gjelder konsentrasjonen av forskjellige Luzitiner som kreves for å drepe 90 % av cellene under en laserlysdose på $6 J/cm^2$.

Tabell 3. Mørk toksisitet av fotosensibilisatorer i humane og murine kreftcellelinjer.

Cellelinje	Inkubasjonstid (t)	Photofrin® IC_{50} ($\mu g/ml$)	Foscan® IC_{50} (μM)	Luzitin-Cl ^{a)} IC_{50} (μM)
H1299		8,0	-	
HT-29	48	-	19	500
SW2	48	-	-	400
PC-3	72	-	-	600
S9II3	40	-	-	500

^{a)} Celler ble inkubert i to ganger populasjonen DT i fullstendig kulturmedium, i mørket, i nærvær av varierende konsentrasjoner av fotosensibilisatoren.

Tabell 4. Lysdoser, i J/cm^2 , som kreves for å drepe 50 % og 90 % av cellene i de cellelinjer som er angitt, for [Luzitin-Cl-c]=20 μM ($\approx 20 \mu g/ml$) under filtrert halogenlampebestråling.

Cellelinje	S91	SKMEL 188	MCF7
LD ₅₀	0,13	0,26	0,3
LD ₉₀	0,26	0,46	0,7

5 Tabell 5. Lysdoser, i J/cm^2 , som kreves for å drepe 50 % og 90 % av cellene i de cellelinjer som er angitt, for [Luzitin-Cl]=20 μM ($\approx 20 \mu g/ml$) under filtrert halogenlampebestråling.

Cellelinje	S91	SKMEL 188	MCF7
LD ₅₀	0,15	0,1	0,08
LD ₉₀	0,3	0,32	0,25

10 Tabell 6. Konsentrasjonen av sensibilisator, i μM , som kreves for å drepe 90 % av cellene ved human prostatakarsinom (PC-3), human adenokarsinom (HT-29), humant ikke-småcellet lungekarsinom (A-549), et melanom (S9113) hos mus, og murin tykktarmkarsinom (CT26) cellelinjer under 6 J/cm^2 diodelaserbestråling på 28,5 mW.

Fotosensibilisator	PC-3	HT-29	A-549	S9113	CT26
Luzitin-Cl ₂	20	50	--	40	-
Luzitin-Cl ₂ Et	5	10	10	--	5
Luzitin-FMet	0,5	0,5	0,5	--	1,0
Luzitin-F ₂ Met	0,5	-	0,5	--	1,0

15 Tabellene 4-6 viser den lave mørke toksisiteten til Luzitiner og deres meget høye fototoksisitet. Tabell 6 viser at Luzitin-konsentrasjonen som kreves for å drepe 90 % av cellene i forskjellige cellelinjer er opp til 100 ganger mindre enn dem som kreves ved Photofrin®, og opp til 20 ganger mindre enn de som kreves av Foscan®. Med laserlysdoser på 6 J/cm^2 (60 sekunder bestråling under våre eksperimentelle betingelser) var det mulig å drepe 100 % av cellene i noen av cellelinjene som ble undersøkt med Luzitin konsentrasjon av ubetydelig cytotoxiskitet i mørket.

II. F. Fremgangsmåter for anvendelse av blandinger og sammensetningene

Luzitiner kan administreres ved topisk, oral, intravenøs, subkutan, intraperitoneal, rektal, sublingual, nasal, okulær, øre eller inhaleringsformulering, avhengig av den kliniske situasjonen. Den farmasøytiske formuleringen er tilpasset den valgte administrasjonsmåte. Formuleringene omfatter foruten Luzitiner (enkeltvis eller i kombinasjon med hverandre), en farmasøytisk akseptabel bærer.

5 Luzitinene kan derivatiseres som de tilsvarende salter, estere, enoletere eller estere, acetaler, ketalder, ortoestere, hemiacetaler, hemiketalder, syrer, baser, solvater, hydrater eller prekursorer før formulering.

Etter topisk eller systemisk tilførsel, eller begge deler, eksponeres det behandlede området for lys med riktig bølgelengde, fortrinnsvis mellom 630 og 690 nm for kloriner, eller mellom 720 og 780
10 nm for bakteriokloriner, og helst ved hjelp av en laser. Fremgangsmåter for å bestråle ulike deler av kroppen er godt kjent innen teknikken. Medikament-til-lys-intervallet kan variere fra noen få minutter til flere dager, avhengig av administrasjonsmåten. Lysdosen er avhengig av administrasjonsrute, lyskilde og terapeutisk mål. For kontinuerlig laserbestråling, bør lysdosen være mellom 10 og 250 Joule/cm², med en lasereffekt mellom 20 og 200 mW/cm². Det er også mulig å
15 anvende pulsert laserstråling med energier pr puls mellom 0,001 og 10 mJ/cm². Lysdosen kan anvendes i en eller flere økter. For diagnostiske formål, kan den lette dosen reduseres. Da det anvendes bredbåndslyskilder i bestrålingen, økes de lette dosene for å opprettholde energien til lyskilden i de spektrale områdene hvor Luzitin absorberer til nivået foreskrevet for laserbestråling.

Luzitinene kan administreres på en gang, eller de kan deles inn i flere mindre doser som skal
20 administreres med tidsintervaller. Luzitiner kan administreres i forbindelse med andre medikamenter for å oppnå synergistiske effekter. Lysdoser administrert etter medikament-til-lys-intervallet faller i områdene som er angitt ovenfor for en enkeltdose. Behandlingen kan gjentas flere ganger ved forskjellige tidsintervaller. Det forstås at den nøyaktige doseringen og varigheten av behandlingen er en funksjon av sykdommen som behandles og kan bestemmes empirisk ved hjelp av protokoller som
25 er kjent innen teknikken.

II.F.1. Systemisk administrasjon (oral, injiserbare, aerosoler, rektal)

En vanlig begrensning forbundet med oral administrering er den antatte fordøyelsen av medikamentet under sure betingelser som finnes i magen. Som vist i eksempler nedenfor, er luzitiner
30 relativt stabile ved pH 1 i 3 timer. De spektrale endringene som ble observert ved lav pH, er på grunn av protonering av pyrrolringen, men reverseres når surheten er nøytralisert. En annen vanskelighet som ofte forekommer ved oral administrasjon er den for biologisk tilgjengelighet. Det er mulig å

skape luzitiner som er nær ved å møte Lipinsky regel for fem [51] for intestinal absorpsjon. Luzitiner kan ha logg $K_{OW} < 5$, 4 hydrogenbindingsdonorer, 12 hydrogenbindingsakseptorer og molekylvekt på 1 kD. Bare dette siste parameteret overstiger vesentlig grensene for den nevnte regel.

5 Ved å ta hensyn til de fysikalsk-kjemiske egenskapene til luzitin, kan både faststoff, halvfast og flytende doseringsformer vurderes. I denne forbindelse bør de kjente løsningene i form av farmasøytiske hjelpestoffer for de ulike farmasøytiske doseringsformer og administrasjonsmåter vurderes.

10 Det foretrukne medikament-til-lys-intervallet i systemisk administrasjon kan variere fra noen få minutter til 3 dager, avhengig av administrasjonsmåten. De farmasøytiske sammensetningene skal gi en dose fra 0,01 mg til 100 mg med luzitin (eller kombinasjon av luzitiner) pr kilo kroppsvekt pr dag. Den foretrukne daglige dosen av luzitiner er mellom 0,1 og 10 mg pr kilo kroppsvekt.

II.F.2. Lokal administrasjon

15 Topisk administrasjon kan oppnås med passende formuleringer inneholdende en eller flere overflategjennomtrengings-forsterkere og andre hjelpestoffer i form av væske, gel, hydrogel, krem, salver, spray eller hvilken som helst annen akseptabel dermatologisk formulering. Som nevnt i Bakgrunnen, er hudgjennomtrengingen som oppnås for Photofrin® eller andre fotosensibilisatorer med store molekylærmasser utilstrekkelig for effektiv PDT av hudlidelser. Luzitiner møter heller ikke de fleste av kriteriene for god transdermal levering [32]. Vår evne til å modulere den 20 amfipatiske- og hydrogenbindingsevnen til disse forbindelsene og, til en viss utstrekning molekylvekten deres, forenkler imidlertid oppgaven med å finne formuleringer som fremmer deres passive diffusjon til dermis. En gelformulering presentert i Eksempel 21, viser seg å gi rask og effektiv topisk avlevering til dermis.

25 Det foretrukne medikament-til-lys-intervallet i topisk administrering er mellom 15 minutter og 3 timer. Preparatet bør inneholde 0,01 til 10 % i luzitin. I en foretrukket utførelse, er prosentandelen av sensibilisator i preparatet mellom 0,1 og 1 %.

Topisk administrasjon omfatter også påføring på øyet. Applikasjoner som er beregnet for bruk på øyet, kan formuleres som 0,01 % - 10 % isotoniske oppløsninger, pH 5-7, med passende salter.

Eksempelene som faller inn under omfanget av kravene, representerer utførelsesformer av oppfinnelsen, alle de andre er referanseeksempler.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet i mer detalj i de følgende ikke-begrensede eksemplene, med henvisning til tegningene der:

Figur 1. Spektraltetthet for 500 W halogenlampen med en 600 nm cut-off-filter og infrarødt absorpsjonsspektrum av et klorin (prikket linje) og av et bakterioklorin (stiplet linje).

Figur 2. Absorpsjonsspektrum av Luzitin-FMet-c oppnådd fra reduksjon av den tilsvarende porfyrin i en syntetisk rute karakterisert ved totalt fravær av organisk løsningsmiddel og baser.

Figur 3. Absorpsjonsspektrum av Luzitin-Cl₂Et oppnådd fra reduksjon av den tilsvarende porfyrin i en syntetisk rute karakterisert ved totalt fravær av organisk løsningsmiddel og baser.

Figur 4. Absorpsjonsspekteret av den mer polare fraksjon ($\beta\alpha_3+\alpha_4$) av atropoisomere av Luzitin-Cl₂Et illustrerer den økte absorptiviteten i det infrarøde, anslått til å nå $\epsilon_{\text{max}}=150\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ved 748 nm.

Figur 5. Absorpsjonsspektrum av Luzitin-Cl₂ i nøytral vandig løsning (hel linje), etter 2 timer ved en pH-verdi på 1 (prikket linje), og etter nøytralisering (stiplet linje). Spektrene ble korrigert for fortynningseffekten som produseres av den dråpevis tilsetningen av HCl og NaOH i vandig løsning.

Figur 6. Absorpsjonsspektra til Luzitin-FMet i PBS: metanol (3:2) før (venstre) og etter (høyre) 65 min bestråling med 748 nm Lynx diodelaseren på 28,8 mW (110 J), som illustrerer kontrollert fotobleking.

Figur 7. Singlet oksygen fosforescensintensitet innsamlet ved 1270 nm, etter eksitasjon ved 355 nm av Luzitin-Cl₂Hep eller fenalenon i luftmettet etanol. Fallet i fosforescens vs laserintensitetsavhengighet ble anvendt for å bestemme kvanteutbytte av sensibilisator for singlet oksygen.

Figur 8. EPR-spektra oppnådd i nærvær av 80 μM av Luzitin-Cl under bestråling. Venstre: med 40 mM BMPO i PBS svarer spekteret til den for spinn adduktet av BMPO med hydroksylradikalet. Høyre: med 40 mM DMPO i DMSO svarer spekteret til den for spinn adduktet av DMPO med superoksidionet.

Figur 9. Overlevelsesandel av S91-celler (i prosent) for ulike lette doser i nærvær av [Luzitin-Cl-c]=20 μM . Den ikke-internaliserte fotosensibilisatoren ble ikke fjernet før bestråling. Innsatt: Cytotoksisitet i mørket av Luzitin-Cl-c mot S91-celler cellelinjer med ulike konsentrasjoner av sensibilisatorer.

Figur 10. Overlevelsesandel for MCF7-celler (i prosent) for ulike lette doser i nærvær av [Luzitin-Cl]₂ = 5 µM, etter 12 timers inkubasjonstid. Den ikke-internaliserte fotosensibilisatoren ble fjernet før bestråling. Innsatt: cytotoksisitet i mørket av Luzitin-Cl mot MCF-celler cellelinjer med ulike konsentrasjoner av sensibilisatorer. Den effektive lyseffekten er 0,53 mW/cm².

- 5 Figur 11. Fototoksisk effekt av Luzitin-Cl₂ i prostatakreft-cellelinjen PC-3 etter et medikament-til-lys-intervall på 24 timer. Celler i kulturmedium ble bestrålt med laserlys på 748 nm i 30 eller 60 sekunder, som henholdsvis korresponderer med lysdoser på 3 og 6 J/cm².

- Figur 12. Prosentandel av celleoverlevelse sammenlignet med kontrollgruppen for ulike Luzitin-Cl₂Et-konsentrasjoner i tykktarmkarsinom cellelinjer hos mus etter et medikament-til-lys-intervall på 18 timer. Den ikke-internaliserte fotosensibilisatoren ble fjernet før bestråling. Celler i kulturmedium ble bestrålt med laserlys på 748 nm i 60 sekunder, som henholdsvis korresponderer med lysdoser på 6 J/cm².
- 10

- Figur 13. Prosentandel av celleoverlevelse sammenlignet med kontrollgruppen for ulike Luzitin-FMet-konsentrasjoner i humane adenokarsinom cellelinjer etter en inkubasjonstid på 18 timer. Den ikke-internaliserte fotosensibilisatoren ble fjernet før bestråling. Celler i kulturmedium ble bestrålt med laserlys på 748 nm i 60 sekunder, som henholdsvis korresponderer med lysdoser på 6 J/cm².
- 15

- Figur 14. Prosentandel av celleoverlevelse sammenlignet med kontrollgruppen for ulike Luzitin-F₂Met-konsentrasjoner i human ikke-småcellet lungekreft-linjer etter en inkubasjonstid på 18 timer. Den ikke-internaliserte fotosensibilisatoren ble fjernet før bestråling. Celler i kulturmedium ble bestrålt med laserlys på 748 nm i 60 sekunder, som henholdsvis korresponderer med lysdoser på 6 J/cm².
- 20

- Figur 15. Fluorescens av Luzitin-Cl₂Et i den humane serumkonsentrasjon av 3,26 nM (hel linje) og 0,26 nM (stiplet linje) anvendes for å bestemme dens deteksjonsgrense. Basislinjen (strek-prikket linje) vises også, og Gauss-kurven (stiplet linje) som brukes for å simulere den laveste konsentrasjon for en mer nøyaktig bestemmelse av lav intensitets fluorescens.
- 25

Figur 16. Fluorescens av Luzitin-Cl-c dividert med massen av lever, blod og hjerne, henholdsvis størrelsesorden til intensitet, som følge ip administrering av 10 mg/kg i DBA/2 mus.

- Figur 17. Farmakokinetisk og biodistribusjon av Luzitin-Cl etterfølgende ip administrasjon av 10 mg/kg i DBA/2 mus Fluorescens-intensiteten i de forskjellige vev (blod, tumor, hjerte, lunger, milt, lever, nyre, tarm, muskler, hud) ble normalisert av deres respektive masser.
- 30

Figur 18. Fluorescens av Luzitin-Cl₂Et dividert med massen av tumor og blod, henholdsvis i størrelsesorden av intensitet, etter ip administrering av 10 mg/kg i DBA/2 mus.

Figur 19. Volumet av svulstene i Balb/C mus med implantert CT26 svulster og behandlet med Luzitin-FMet. Den tykke linjen representerer gjennomsnittlig tumorstørrelse i fire kontroll dyr, som fikk Luzitin-FMet administrert, men som ikke ble bestrålt. Feilstolpene er standardavvik. De tynne linjene representerer individuelle dyr behandlet med Luzitin-FMet og 132 J/cm^2 av laserlys ved 748 nm.

Figur 20. Størrelse på implanterte S91svulster i DBA/2 mus behandlet med Luzitin-Cl₂Et. To laserlysdoser på 748 nm ble benyttet.

Figur 21. Konfokalfluorescens av luzitin-FMet 3 timer etter topisk applikasjon på ryggen av en minigris. Multifotoneksitasjon ved 744 nm, full støyeliminering, fluorescens planbilder konstruert av seks bilder, 800 V @ detektor, knappenålshull = $379 \mu\text{m}$. Fotosensibilisatoren spredt gjennom 50 mikroner av stratum corneum og epidermis.

Figur 22. Absorpsjonsspektra av luzitin-FMet 3 timer etter topisk applikasjon på ryggen av en minigris, oppnådd med konfokalspektroskopi. De ulike linjene tilsvarer målinger i forskjellige deler av prøven.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1. FASTSTOFFSYNTEISK PROSEDYRE FOR BAKTERIOKLORINER MED ELEKTRONTILTREKKENDE SUBSTITUENTER

Dette eksempel illustrerer det brede spekteret av bakteriokloriner som kan syntetiseres ved en fremgangsmåte kjennetegnet ved fravær av løsemiddel og base, hvor derfor kun et porfyrin og et hydrazid (begge i fast form) anvendes som utgangsmaterialer.

I et preparat blandet vi 60 mg ($6.8 \times 10^{-5} \text{ mol}$) av 5,10,15,20-tetrakis (2-trifluormetylphenyl)-porfyrin med 500 mg ($2.7 \times 10^{-3} \text{ mol}$) av *p*-toluensulfonylhydrazid, begge i meget fine pulver. De ble ført inn i en reaktor, som ble utpumpet, forsegles under N₂ og oppvarmes til en temperatur høyere enn 100 °C i flere minutter. Etter avkjøling (romtemperatur) ble faststoffet fjernet, og flere deler *p*-toluensulfonylhydrazid 250 mg ($1.4 \times 10^{-3} \text{ mol}$) ble tilsatt, inntil porfyrin Soret-båndet var fullstendig forsvunnet. Bakterioklorinet ble ekstrahert med en liten mengde organisk løsemiddel. Overskuddet av hydrazidet ble fjernet ved en kort filtrering på silikagel (kolonnehøyde 8 cm, indre kolonnediameter 2,5 cm) ved bruk av diklormetan/*n*-heksan som elutant. Etter løsemiddelfordamping og rekrystallisering fra dietyleter/pentan 90 % av CF₃PhB ble oppnådd med mindre enn 5 % klorinforurensning.

NMR av det isolerte produkt er:

RMN ¹H: (400,13 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 7,47-7,45 (m, 4H); 7,26- 7,20 (m, 8H); 7,15-7,12 (m, 4H); 2,42 (s, 4H); 2,37 (s, 4H); -1,27 (s, 2H).

5 EKSEMPEL 2. FASTFASE SYNTETISK PROSEDYRE FOR HALOGENERTE KLORINER

I en fremstilling av 5,10,15,20-tetrakis(2-fluorfenyl-5-N-metylsulfamoylfenyl)klorin, Luzitin-FMet-c, blandet vi 50 mg ($4,72 \times 10^{-5}$ mol) av 5,10,15,20-tetrakis(2-fluorfenyl-5-N-metylsulfamoylfenyl)porfyrin med 18 mg ($9,44 \times 10^{-5}$ mol) av p-toluensulfonylhydrazid. Reaktoren

10 Etter avkjøling (romtemperatur), ble det faststoffet fjernet med en liten mengde organisk løsemiddel, og det overskytende hydrazidet ble fjernet ved en kort filtrering på silikagel ved bruk av etylacetat/heksan som eluant. Det ble oppnådd en blanding av klorin kontaminert med ca. 10 % av bakterioklorin. Blandingen av klorin og bakterioklorin ble oppløst i diklormetan og oksydert til tilsvarende klorin ved oppvarming ved 50 °C i nærvær av luft.

15 Etter re-krystallisering fra dietyleter/pentan ble 90 % av Luzitin-fMet-c oppnådd med mindre enn 1 % av bakterioklorinforurensning. Figur 2 viser absorpsjonsspektrum i det endelige produktet.

EKSEMPEL 3. FASTFASE SYNTETISK PROSEDYRE FOR HALOGEN BAKTERIOKLORINER

20 Dette eksemplet beskriver en ren, enkel, økonomisk og miljømessig riktig syntetisk metode, som involverer en løsemiddelfri one-pot syntese av halogenerte amfipatiske bakteriokloriner.

Det passende porfyrinet (faststoff), og p-toluensulfonylhydrazid (faststoffet) males til meget fint pulver og blandes grundig. Deretter blir de ført inn i en reaktor og pumpet til høyt vakuum. Reaktoren blir deretter forseglet og holdt under vakuum, eller vasket gjentatte ganger med en inert

25 gass. Til slutt blir reaktoren oppvarmet (70-200 °C) i løpet av 1 til 340 min, mens forseglet. Straks reaksjonen er fullført, og reaktoren brakt til romtemperatur, blir den tilsvarende bakterioklorinet oppnådd med 90 % utbytte. Etter en kort filtrering med silikagelkolonne, fås et bakterioklorin med en forurensning på mindre enn 5 % av det tilsvarende klorinet.

I en fremstilling av 5,10,15,20-tetrakis-(2,6-diklor-3-N-etylsulfamoylfenyl) bakterioklorin,

30 Luzitin-Cl₂Et, med denne metoden blandet vi 50 mg ($3,8 \times 10^{-5}$ mol) av 5,10,15,20-tetrakis (2,6-diklor-3-sulfoetylphenyl) porfyrin med 188 mg (10^{-3} mol) av p-toluensulfonylhydrazid, evakuerte reaktoren med en Edwards pumpe, forseglet og varmet deretter opp reaktoren til mer enn 70 °C i

flere minutter. Etter avkjøling (romtemperatur), fjernes det faststoffet med en liten mengde dietyleter, og det overskytende hydrazidet fjernes ved en kort filtrering på silikagel (kolonnehøyde 4 cm, kolonnens indre diameter 2,5 cm) ved bruk av etylacetat/dietyleter, som elutant. Etter løsningsmiddelfordampning re-krystalliseres det resulterende faststoffet fra dietyleter/pentan for å gi

5 Luzitin-Cl₂Et med 90 % utbytte. Absorpsjonsspektrumet i Figur 3 viser nærvær av mindre enn 5 % av det tilsvarende klorinet. Den molare absorpsjonskoeffisienten av dette og andre bakteriokloriner presenteres i Tabell 1, korrigert for mengden av klorin som kan være til stede i prøvene.

Sammenligningen mellom spektrene i Figur 3 nedenfor, og de i Figur 2 i patentet

PCT/EP2005/012212, også ved University of Coimbra, avslører at klorinurenheterne reduseres med

10 minst en faktor på 10 ved denne nye syntetiske prosedyren, som også er mer økonomisk og mindre arbeidskrevende og miljøfiendtlig. NMR og MS av det isolerte produkt er som følger:

RMN ¹ H: (300 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,42 (d, J = 8,55 Hz, 4H, *p*-H); 7,88 (d, J = 8,55 Hz, 4H, *m*-H); 7,84- 7,82 (m, 4H, -H); 5,01 (m, 4H, N-H); 3,91 (s, 8H, -H); 3,22 (m, 8H, CH₂); 1,24 (t, 12H, J = 6,73 Hz, CH₃); -1,29 (s, 2H, NH).

15 MS: (MALDI-TOF), m/z: 1322,0 [M]⁺.

EKSEMPEL 4. ATROPISOMERE I HALOGENERTE BAKTERIOKLORINER

Dette eksemplet viser at stabile atropisomere eksisterer i halogenerte og sulfonerte bakteriokloriner og at de lett kan skilles. Det viser også at de mer polare atropisomerene har høyere

20 ekstinksjonskoeffisient i det infrarøde.

Ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 3, men ved anvendelse av en større kolonne (kolonnehøyde 8 cm, indre kolonnediameter 2,5 cm) med etylacetat/*n*-heksan (1:1) som første elutant og etylacetat/*n*-heksan (3:1) som siste elutant, observerte vi en separasjon av 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diklor-3-N-etylsulfamoylfenyl)bakterioklorin, Luzitin-Cl₂Et, i to fraksjoner.

25 Hver fraksjon viste to flekker på TLC, som ble identifisert som en blanding av de mindre polare atropisomerene αβ₁β₂+α₂β₂ eller av de mer polare β₃α₃+α₄. Figur 4 viser absorpsjonsspekteret til blandingen av atropisomerene med høyere polaritet. Denne fraksjonen viser en 50 % forbedring på ε ved 750 nm båndet, som når 150 000 M⁻¹ cm⁻¹.

30 EKSEMPEL 5. pH-STABILITET HOS HALOGENERTE OG SULFONERTE BAKTERIOKLORINER

Dette eksempelet viser stabiliteten til halogenerte og sulfonerte bakteriokloriner ved pH 1 og 37 °C, det vil si i den surhetsgraden som finnes i magen.

Luzitin-Cl₂ ble oppløst i nøytral vandig løsning og balansert til 37 °C for å danne absorpsjonsspektrumet som er representert i figur 5. HCl i vandig oppløsning ble tilsatt dråpevis, for å senke pH-verdien til 1, og 2 timer senere ble absorpsjonsspekteret av Luzitin-Cl₂ ved pH 1 registrert. Deretter ble en vandig oppløsning av NaOH tilsatt for å nøytralisere oppløsningen, og ett nytt absorpsjonsspektrum ble registrert 3 timer senere. Figur 5 viser absorpsjonsspektra, korrigert for fortynningen som produseres ved tilsetning av HCl og NaOH i vandig løsning. De spektrale endringene som ble observert ved lav pH, er på grunn av protonering av pyrrolringen, men reverseres når surheten er nøytralisert. Under disse forholdene, gjenvinnes nesten halvparten av Luzitin-Cl₂, og den andre halvparten transformeres til det tilsvarende klorinet.

EKSEMPEL 6. LYSSTABILITET HOS HALOGENERTE OG SULFONERTE BAKTERIOKLORINER

Dette eksempelet viser den økte stabiliteten til halogenerte og sulfonerte bakteriokloriner overfor bestråling med infrarødt lys, noe som løser problemene med ustabilitet som finnes i andre bakteriokloriner, enten de er av syntetisk opprinnelse slik som 5,10,15,20-tetrakis(3-hydroksyfenyl)-bakterioklorin, eller avledet fra naturlige produkter slik som Tookad®.

Luzitin-FMet ble oppløst i PBS:metanol (2:3), overført til en 1 cm kvartscelle, og dens absorpsjonsspektrum ble registrert, Figur 6. Kvartscellen ble deretter plassert i strålen til 748 nm Lynx diodelaseren, tidligere ufokusert for å ha en strålediameter sammenfallende med åpningen i kvartscellen. Lasereffekten målt under disse betingelser var 28,8 mW. Hvert 5. minutt ble bestrålingen avbrutt og et nytt absorpsjonsspektrum ble registrert. Denne fremgangsmåten ble fulgt i 65 minutter. Fotoblekingen følger kinetikken til en førsteordens reaksjon i forsøkets tidsvindu. Figur 6 viser også absorpsjonsspektrum etter bestråling. Mens bakterioklorintoppen på 743 nm reduseres fra en absorbans på 1,128 til 0,337, øker bare absorpsjon av klorin fra 0,114 til 0,151. Tatt i betraktning de molare absorpsjonskoeffisientene av forbindelsene ved disse bølgelengdene, er det klart at mens 70 % av bakterioklorinet blir ødelagt under bestrålingen, dannes bare noen få prosent av klorin. De gjenværende produktene, har ikke godt-oppløste spektra i det synlige/IR, og den dominerende fotodegradasjonsprosessen kan beskrives som fotobleking.

Halveringstiden av fotoblekingen ble målt for forskjellig laserintensiteter, og den viste seg å være proporsjonal med lasereffekten. Halveringstiden for andre bakteriokloriner normaliserte 100

mW laserbestråling på 748 nm er presentert i Tabell 1, sammen med litteratordata for fotodegradasjon av Foscan® og Tookad® normalisert for samme lysintensitet. Det ble også observert at halveringstiden for Luzitin-Cl økes med en faktor på 30 når PBS-oppløsningen av fotosensibilisatoren er mettet med argon, noe som reduserer oksygenkonsentrasjonen i oppløsningen.

5 Dette viser ROS deltagelse i fotoblekingen.

EKSEMPEL 7. EFFEKTIV FOTOGENERERING AV SINGLET OKSYGEN

Dette eksempelet beskriver effektiviteten i dannelsen av singlet oksygen i nærvær av Luzitiner, lys i passende bølgelengde og molekylært oksygen oppløst i løsningen.

10 En luftmettet løsning av Luzitin-Cl₂Hep i etanol med en absorbans ca. 0,2 ved 355 nm ble anslått i en 1 cm kvartskyvett av en pulsert Nd: YAG laser, og singlet oksygenemisjon ble fulgt ved 1270 nm, ved bruk av utstyret og fremgangsmåtene som tidligere er beskrevet. Intensiteten av singlet oksygen fosforescensen ble studert som en funksjon av laserintensiteten. En lignende undersøkelse ble gjort med fenalenon i etanol, ved en konsentrasjon som passer til absorbansen av Luzitin-Cl₂Hep

15 på 355 nm. Figur 7 viser laserenergiens avhengighet av singlet oksygen fosforescensintensiteten målt ved 1270 nm etter Luzitin-Cl₂Hep eller fenalenon eksitasjon ved 355 nm i luftmettet etanol. Ulike laserenergier ble brukt og fra fallet i energiavhengigheten av singlet oksygenemisjon og verdien av Φ_{Δ} = 0,95 for fenalenon i denne etanolen, innhentet vi Φ_{Δ} = 0,78 for Luzitin-Cl₂Hep. Verdier for andre bakteriokloriner er presentert i Tabell 1.

20 Fotostabiliteten for disse bakterioklorinene forbundet med sine ca. 70 % kvanteeffekt av singlet oksygenproduksjon, innebærer at ett gitt molekyl bakterioklorin under kontinuerlig bestråling lokalt vil produsere en svært stor mengde elektronisk eksiterte oksygenmolekyler før det fotoblekes. 30 % av den energien som absorberes av sensibilisatoren tapes til andre prosesser, noen av dem identifisert i de følgende eksemplene.

25

EKSEMPEL 8. FOTOGENERERING AV REAKTIVE OKSYGENARTER (ROS)

Dette eksempelet beskriver produksjonen av reaktive oksygenarter, nemlig superoksid-ion og hydroksylradikalet ved bruk av Luzitin-Cl som sensibilisator.

30 For å kunne vurdere fotogenerering av superoksid-ion og hydroksylradikalet av Luzitin-Cl, ble EPR spektra i nærvær av 30-80 μ M av Luzitin-Cl og 40 μ M BMPO målt i følgende forhold:

a) Luftmettet vandig løsning i mørket.

b) Nitrogenmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 8 minutter.

- c) Luftmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 4 minutter.
- d) Luftmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 8 minutter.
- e) Luftmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 16 minutter.
- f) Luftmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 16 minutter, i nærvær av
5 superoksid dismutase (50 µg/ml).
- f) Luftmettet vandig oppløsning bestråles med Hamamatsu diodelaser i 16 minutter, i nærvær av
superoksid katalase (30 µg/ml).

Under eksperimentelle betingelser (a) og (b) ble ingen ROS-BMPO addukt detektert. Imidlertid fører eksperimentelle betingelser (c), (d) og (e) til oppdagelse av en BMPO addukt som er den som
10 dannes mellom BMPO og hydroksylradikalet, Figur 8. Tilstedeværelsen av lys er nødvendig for å danne et slikt addukt. Eksperimentell betingelse (f) gir ikke noe signal, med virkemidler som superoksid dismutase, en kjent utvasker med superoksid-ion, hemmer dannelsen av BMPO-hydroksylradikalet addukt. I tillegg gir heller ikke eksperimentell betingelse (g) noe signal, og beviser at katalase, som bryter ned hydrogenperoksyd til vann og molekylært oksygen, også hemmer
15 dannelsen av BMPO-hydroksylradikaladduktet. Disse resultatene indikerer at hydroksylradikaler ikke dannes direkte fra fotosensibilisatoren og det molekylære oksygenet, men heller som et sekundært produkt. Hemmingen observert ved superoksid dismutase er et tvingende bevis for dannelse av superoksid-ion. Hemmingen observert ved katalase tyder på at hydrogenperoksid også er en forløper for hydroksylradikalet.

20 Lignende eksperimenter ble utført med DMPO i DMSO. Vi har oppdaget DMPO-superoksid addukt i nærvær av luft og lys, Figur 8. Imidlertid ble ikke dette adduktet observert i fravær av luft eller lys, eller i nærvær av superoksid dismutase.

Satt sammen indikerer disse dataene dannelsen av superoksid-ion, fulgt av dannelse av hydrogenperoksid, og senere, av hydroksylradikalet, som alle er meget godt dokumenterte reaktive
25 oksygenarter som er i stand til å danne skader på celler. Disse ROS utfyller ca. 70 % singlet oksygendannelses-effektiviteten av disse bakterioklorinene, og viser at resterende 30 % av den energi som absorberes av sensibilisatoren ikke går tapt, men heller anvendes i dannelsen av andre cytotoksiske arter, i tillegg til singlet oksygen.

30 EKSEMPEL 9. IN VITRO FOTOTOKSISITET I Luzitin-Cl-c MOT MELANOMCELLELINJER HOS MUS UNDER STANDARD LAMPEBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitiner er svært giftig for melanomceller hos mus under filtrert halogenlysbestråling ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

Cytotoksisitet i mørke og den fotosensibiliserende aktiviteten til Luzitin-Cl-ci S91 (melanom hos mus) cellelinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere, bortsett fra at etter inkubasjon ble ikke cellene vasket for å fjerne ikke-internalisert fotosensibilisator før bestråling. Innfelt i Figur 9 viser cytotoksisiteten i mørket med forskjellige konsentrasjoner av Luzitin-Cl-c i en inkubasjonstid på 120 timer. Figur 9 viser overlevelsesfraksjonen for S91-celler for ulike lysdoser, når cellene bestråles i nærvær av [Luzitin-Cl-c]=20 μ M. Lysdoser som kreves for å drepe 90 % (LD₉₀) eller 50 % (LD₅₀) av cellene i kulturen er presentert i Tabell 3.

EKSEMPEL 10. IN VITRO FOTOTOKSISITET I Luzitin-Cl MOT MELANOMCELLELINJER HOS MUS UNDER STANDARD LAMPEBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitiner er svært giftig for humant brystkarsinom under filtrert halogenlysbestråling, ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

Cytotoksisiteten i mørke og den fotosensibiliserende aktiviteten i Luzitin-Cl i MCF7 (humant brystkarsinom) cellelinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere. Innsatt i Figur 10 viser cytotoksisiteten i mørket med forskjellige konsentrasjoner av Luzitin-Cl og en inkubasjonstid på 12 timer. Fig. 10 viser overlevelsesfraksjonen for MCF7-celler for [Luzitin-Cl]=5 μ M og ulike lette doser. Åpenbart produserte en 5 μ M konsentrasjon av Luzitin-Cl 100 % celledød ved eksponering for filtrert halogenlys i en dose på 0,6 J/cm². Lysdoser som kreves for å drepe 90 % (LD₉₀) eller 50 % (LD₅₀) av cellene i kulturen er presentert i Tabell 4.

EKSEMPEL 11. IN VITRO FOTOTOKSISITET FOR Luzitin-Cl₂ MOT HUMANT PROSTATAKARSINOM UNDER LASERBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitins er svært giftig for humant prostatakarsinom under laserbestråling, ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

Cytotoksisiteten i Luzitin-Cl₂ in PC-3 (humant prostatakarsinom) cellelinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere. I henhold til disse eksperimentene, er 0,05 mM den høyeste konsentrasjonen av Luzitin-Cl₂ som forårsaker forholdsvis ingen effekt på levedyktigheten til cellelinjene i blindtesten. Dette vil være referansekonsentrasjonen i de følgende fototoksisitetsstudiene.

Den fotosensibiliserende aktiviteten til Luzitin-Cl₂ in PC-3 cellelinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere. Overlevelsesandel for lette doser på 3 og 6 J/cm² og en inkubasjonstid på 24 timer er vist på figur 11 for forskjellige konsentrasjoner av denne fotosensibilisatoren. I henhold til Figur 11, produserer [Luzitin-Cl₂]=20 µM 100 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm².

EKSEMPEL 12. IN VITRO FOTOTOKSISITET I Luzitin-Cl₂Et MOT TYKKTARMKARSINOM CELLELINJER HOS MUS UNDER LASERBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitins er svært giftig for tykktarmkarsinom hos mus under laserbestråling ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

Cytotoksisiteten i mørket av Luzitin-Cl₂Et i CT26 (tykktarmkarsinom hos mus) cellelinjer kan ikke måles i form av IC₅₀ fordi forbindelsen utfelles i kulturmediet før den oppnår dette nivå av cytotoksisitet. En konsentrasjon på 50 µM er den høyeste konsentrasjonen av Luzitin-Cl₂Et som forårsaker forholdsvis ingen effekt på levedyktigheten til disse cellelinjene i mørket.

Den fotosensibiliserende aktiviteten til Luzitin-Cl₂Et i CT26 cellelinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere. Overlevelsesandel for lette doser av 6 J/cm² og en inkubasjonstid på 18 timer er vist på figur 12 for forskjellige konsentrasjoner av denne fotosensibilisatoren. Denne figuren viser at Luzitin-Cl₂Et ved en konsentrasjon på 5 µM produserte 90 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm², LD₉₀=0.5 µM. I henhold til Figur 12, produserer [Luzitin-Cl₂]=10 µM 100 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm². Tabell 6 presenterer Luzitin-Cl₂Et konsentrasjoner som kreves for å oppnå LD₉₀ i flere andre cellelinjer under 6 J/cm² diodelaserbestråling på 28,5 mW.

EKSEMPEL 13. IN VITRO FOTOTOKSISITET I Luzitin-FMet MOT HUMAN TYKKTARMKARSINOMCELLER UNDER LASERBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitins er svært giftig for humant tykktarmkarsinom under laserbestråling, ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

Den cytotoksisitet i mørket av Luzitin-FMet in HT-29 (humant tykktarmadenokarsinom) cellelinjer kan ikke måles i form av IC₅₀ fordi forbindelsen utfelles i kulturmediet før den oppnår dette nivå av cytotoksisitet. En konsentrasjon på 50 µM er den høyeste konsentrasjonen av Luzitin-FMet som forårsaker forholdsvis ingen effekt på levedyktigheten til cellelinjene i blindtesten.

Den fotosensibiliserende aktiviteten til Luzitin-FMet i HT-29 celledinjer ble målt med de materialer og metoder som er beskrevet tidligere. Overlevelsesandel for lette doser av 6 J/cm^2 og en inkubasjonstid på 18 timer er vist på figur 13 for forskjellige konsentrasjoner av denne fotosensibilisatoren. Denne figuren viser at Luzitin-FMet ved en konsentrasjon på $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ produserte 90 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm^2 , $\text{LD}_{90}=0,5 \text{ }\mu\text{M}$. I henhold til Figur 13, produserer $[\text{Luzitin-FMet}]=1 \text{ }\mu\text{M}$ 100 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm^2 . Tabell 6 presenterer Luzitin-FMet konsentrasjoner som kreves for å oppnå LD_{90} i flere andre celledinjer under 6 J/cm^2 diodelaserbestråling på 28,5 mW.

10 EKSEMPEL 14. IN VITRO FOTOTOKSISITET FOR Luzitin-F₂Met MOT HUMAN IKKE-SMÅCELLET LUNGEKARSINOM UNDER LASERBESTRÅLING

Dette eksempelet viser at Luzitins er svært giftig for humane ikke-småcellet-lungekarsinomceller under laserbestråling, ved konsentrasjoner hvor deres mørke-toksisitet er ubetydelig.

15 Cytotoksisitet i mørket av Luzitin-F₂Met i A-549 (human ikke-småcellet lungekreft) celledinjer kan ikke måles i form av IC_{50} fordi forbindelsen utfelles i kulturmediet før de oppnår dette nivået av cytotoksisitet. En konsentrasjon på 50 mM er den høyeste konsentrasjonen av Luzitin-F₂Met som forårsaker forholdsvis ingen effekt på levedyktigheten til celledinjene i blindtesten.

20 Overlevelsesandel for lette doser av 6 J/cm^2 og en inkubasjonstid på 18 timer er vist på figur 14 for forskjellige konsentrasjoner av denne fotosensibilisatoren. Denne figuren viser at Luzitin-F₂Met ved en konsentrasjon på $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ produserte 90 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm^2 , $\text{LD}_{90}=0,5 \text{ }\mu\text{M}$. I henhold til Figur 14, produserer $[\text{Luzitin-F}_2\text{Met}]=0,5 \text{ }\mu\text{M}$ 100 % celledød ved eksponering for en laserlysdose på 6 J/cm^2 . Tabell 6 presenterer Luzitin-F₂Met konsentrasjoner som kreves for å oppnå LD_{90} i flere andre celledinjer under 6 J/cm^2 diodelaserbestråling på 28,5 mW.

25

EKSEMPEL 15. FLUORESCENSE PÅVISNINGSGRENSE

Dette eksempel viser den ekstreme følsomheten og selektiviteten for påvisning av Luzitiner i biologiske prøver.

30 Oppløsninger av forskjellige konsentrasjoner hvor fremstilt ved fortykning til i humant serum av en 1 % stamløsning av Luzitin-Cl₂Et i etanol. Konsentrasjonene varierte fra 0,2 nM til 10 nM. Prøvene ble eksitert ved 514 nm i spektrofluorimeteret beskrevet ovenfor, ved hjelp av splitt 4:5:3: for eksitasjon og emisjon. Emisjonen ble innsamlet i det infrarøde som illustrert i figur 15.

Deteksjonsgrensen ble bestemt ved hjelp av ligningen

$$L.D. = \frac{3.3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

der $S_{y/x}$ er standardavviket for kalibreringskurven og b er hellingen. Deteksjonsgrensen på 0,17 nM (eller 0,2 ng/g) ble oppnådd.

5

EKSEMPEL 16. IN VIVO TOKSISITET I MØRKE

Dette eksempelet viser at Luzitiner ikke er toksisk for mus ved konsentrasjoner langt høyere enn de er godkjent for PDT med kommersielt tilgjengelige fotosensibilisatorer.

Musene ble delt i følgende eksperimentgrupper:

- 10 a) 10 dyr mottok 2 mg/kg av Luzitin-Cl
- b) 10 dyr mottok 5 mg/kg av Luzitin-Cl
- c) 10 dyr mottok 10 mg/kg av Luzitin-Cl
- d) 10 dyr mottok 15 mg/kg av Luzitin-Cl
- e) 10 dyr mottok 20 mg/kg av Luzitin-Cl
- 15 f) 10 dyr mottok ingen behandling, og er i kontrollgruppen.

Oppløsningene av Luzitin-Cl (0,5 ml) ble injisert subkutan og dyrene ble nøye observert i 30 dager. De første 6 dager etter injeksjon viste dyrene fra gruppe (e) følsomhet overfor lys, og noen i gruppe (d) viste også en viss følsomhet. De manifesterte slik følsomhet ved å flytte seg vekk fra lyskilder som var direkte innstilt på dem. Dyrene ble veiet regelmessig, men ingen vesentlige masseendringer ble observert for noen av dem. Etter 30 dager ble dyrene bedøvet ved hjelp Morbital (Biowet, Polen), organer og vevsprøver ble fjernet, og det ble utført blodmorfologi samt at det ble utført histologi av utvalgte organers tester. Det ble ikke observert noen endringer i blodet eller i organer.

De anvendte dosene i disse mørk-toksisitetsanalysene var 10 ganger høyere enn det som er anbefalt for bruk av Photofrin® og 100 ganger høyere enn dosene som anvendes med Foscan®. Og likevel, ble ikke terskelen for målbar mørk-toksisitet hos mus oppnådd. Dette beviser at høyere doser av Luzitiner kan anvendes i PDT enn av Photofrin® eller Foscan®.

EKSEMPEL 17. KLORIN BIODISTRIBUSJON ETTERFØLGENDE IP ADMINISTRASJON

30 Dette eksemplet viser at Luzitiner kan krysse blod-hjerne-barrieren to timer etter ip administrasjon.

Luzitin-Cl-c ble administrert i en dose på 10 mg/kg i DBA/2 mus via intraperitoneal injeksjon. Klorinfordeling i vevet ble analysert 2 timer etter administrering. Dyrene ble bedøvet ved bruk av Morbital (Biowet, Polen), og noen av deres organer, inkludert hjernen, ble fjernet, veiet og deretter lagret ved -30 °C inntil videre analyse. Innholdet av pigmenter i vevsprøvene ble analysert
 5 spektrofluorometrisk. For å hente ut pigmentene ble vevsprøver homogenisert 1 min i 7 ml iskald 90 % vannholdig aceton, ved hjelp av en vevshomogenisator MPW-120 (Medical Instruments, Polen) med en hastighet på 10 000 rpm. Homogenatet ble sentrifugert ved 2000 g i 10 min ved 4 °C, supernatanten ble samlet opp og pelleten ble re-ekstrahert med 90 % vannholdig aceton for å sikre en fullstendig gjenvinning av pigmentet. Ekstraktene ble samlet og analysert med hensyn til
 10 pigmentinnhold. Prøvene ble eksitert ved 413 nm og fluorescens-spektrene ble tatt opp i området mellom 600 og 800 nm. Figur 16 illustrerer fluorescensintensiteten fra hjernen og flere organer, normalisert ved de respektive masser.

Blod-hjerne-fordelingen av sensibilisator var 4:1 to timer etter administrering i DBA/2 mus. Dette er et prinsippbevis som beviser at egnede Luzitiner kan krysse hjerne-blodbarrieren i betydelige
 15 mengder for å bli en aktiv fotosensibilisator i hjernen. Det er vist i det etterfølgende eksempelet som denne klassen av sensibilisatorforbindelser har en tendens til å akkumuleres i tumorer, noe som ytterligere øker mengden av fotosensibilisatorer som vil være tilgjengelig for behandlingen av hjernetumorer.

20 EKSEMPEL 18. BAKTERIOKLORIN FARMAKOKINETIKK ETTERFØLGENDE IP ADMINISTRASJON

Dette eksempelet viser at etter ip administrasjon akkumuleres Luzitins først i svulster, og så klares i lavere hastighet.

Tumormodellen var S91 Cloudman melanomceller, dyrket som monolag i RPMI medium,
 25 inneholdende 5 % føtalt kalveserum og supplementert med antibiotika. Cellene ble dyrket ved 37 °C i fuktet atmosfære inneholdende 5 % CO₂. Melanomcellene (~1x10⁶) ble tatt opp i 0,1 ml fosfatbufret saltløsning (PBS), og implantert subkutan i høyre flanke av dyret. Tumorene vokste synlig i løpet av ti dager etter implantasjon. Dyrene ble behandlet i tre uker etter injeksjonen.

Luzitin-Cl ble administrert i en dose på 10 mg/kg i DBA/2 mus via intraperitoneal injeksjon.
 30 Bakterioklorin vevsdistribusjoner ble analysert med følgende intervaller: 2 t, 6 t, 12 t, 24 t og 48 t etter intraperitoneal administrasjon. Dyrene ble bedøvet med ketamin og xylazin, deres organer og vevsprøver ble fjernet, veiet og deretter lagret ved -30 °C inntil videre analyse. Innholdet av

pigmenter i vevsprøvene ble analysert spektrofluorometrisk. For å hente ut pigmentene ble vevsprøver homogenisert 1 min i 7 ml iskald etanol/DMSO løsning (75:25), ved hjelp av en vevshomogenisator MPW-120 (Medical Instruments, Polen) med en hastighet på 10 000 rpm. Homogenatet ble sentrifugert ved 2000 g i 10 min ved 4 °C, supernatanten ble samlet opp og pelleten ble re-ekstrahert med etanol: DMSO-løsning for å sikre en fullstendig gjennvinning av pigmentet. Ekstraktene ble samlet og analysert med hensyn til pigmentinnhold. Prøvene ble eksitert ved 517 nm og fluorescens-spektrene ble tatt opp i området mellom 600 og 850 nm. Figur 17 illustrerer fluorescensintensiteten fra tumoren og flere organer, normalisert ved de respektive masser.

Det er en betydelig ansamling av denne fotosensibilisatoren i tumoren en dag etter intraperitoneal administrasjon, når den når en konsentrasjon 3 ganger høyere enn i muskel. I tillegg er akkumulering i huden ubetydelig, noe som forklarer mangelen på fotosensitivitet for musene i de mørke toksisitetsstudiene. Til slutt ble fotosensibilisatoren fjernet fra de fleste organene innen 24 timer. Denne farmakokinetikken er meget gunstige for utvelgelse av et tidsvindu for PDT-behandling der bivirkningene blir redusert og effektiviteten av behandlingen blir maksimert.

Tilsvarende undersøkelser ble utført med andre Luzitiner, og Luzitin-Cl₂Et viste en meget sterk svulst vs muskelselektivitet, Figur 18.

EKSEMPEL 19. PDT FOR TYKKTARMKARSINOM I MUS I Balb/C MUS VED BRUK AC Luzitin-fMet

Dette eksemplet viser at Luzitiner når de utsettes for lys med en passende bølgelengde, produserer tumorregresjon/nekrose.

Tumormodellen var CT26 tykktarmkarsinom i mus, dyrket som monolag i RPMI medium, inneholdende 5 % føtalt kalveserum og supplementert med antibiotika. Cellene ble dyrket ved 37 °C i fuktet atmosfære inneholdende 5 % CO₂. Karsinomcellene (~1x10⁶) ble tatt opp i 0,1 ml fosfatbufret saltløsning (PBS), og implantert subkutan i høyre flanke av Balb/C musen. Tumorene vokste til 5 mm omtrent en uke etter implantasjon. Det ble ikke observert noen spontan nekrose. Behandlingen ble startet når tumoren nådde 5 mm i diameter i hvert dyr. Dagen tumorene nådde behandlingsstørrelsen ble musene injisert via ip med en dose på 10 mg/kg med Luzitin-FMet i PEG400. 24 timer etter injeksjon, ble fire mus bedøvet med ketamin og xylazin, og behandlet med Hamamatsu 748 nm diodelaser som er beskrevet tidligere, ved en flukstetthet på 100 mW/cm² i 22 minutter (total fluens på 132 J/cm²). Fire andre mus ble ikke behandlet, og tjente som kontroll.

Musene ble kontrollert daglig, svulstene ble målt ved hjelp av to ortogonale målinger L og W (vinkelrett på L) og volumene ble beregnet ved hjelp av formelen $V=L \times B^2/2$ og registrert.

Figur 19 viser det relative tumorvolumet målt på forskjellige dager etter laserbestråling. Tumorstørrelsen i dyrene som behandles er mindre enn den gjennomsnittlige størrelsen på kontrolldyrene, og i ett tilfelle forsvant svulsten fullstendig.

EKSEMPEL 20. PDT FOR MELANOMCELLER I DBA/2 MUS VED BRUK AV Luzitin-Cl₂Et

Dette eksemplet viser at Luzitiner når de utsettes for lys med en passende bølgelengde, produserer tumorregresjon/nekrose.

Tumormodellen var S91 Cloudman melanomceller, dyrket som monolag i RPMI medium, inneholdende 5 % føtalt kalveserum og supplementert med antibiotika. Cellene ble dyrket ved 37 °C i fuktet atmosfære inneholdende 5 % CO₂. Melanomcellene ($\sim 1 \times 10^6$) ble tatt opp i 0,1 ml fosfatbufret saltløsning (PBS), og implantert subkutan i høyre flanke av DBA/2 musen. Svulstene vokste til 5 mm omtrent en uke etter implantasjon. Det ble ikke observert noen spontan nekrose. Behandlingen ble startet når tumoren nådde 5 mm i diameter i hvert dyr. Dagen tumorene nådde behandlingsstørrelsen ble musene injisert via ip med en dose på 10 mg/kg med Luzitin-Cl₂Et i PEG400. Ved 24 timer etter injeksjonen ble musene bedøvet med ketamin og xylazin, og holdes i plastholdere, og ble deretter behandlet med forskjellige doser lys med Hamamatsu 748 nm diodelaser som er beskrevet tidligere. Innen minutter etter bestråling, viste tumorområdet tydelige signaler på nekroser, som strakk seg til alle de bestrålte område i løpet av få timer. Musene ble kontrollert daglig, og størrelsen på svulstene ble målt og registrert. Figur 20 viser tumorstørrelsen målt på forskjellige dager etter laserbestråling. Det var åpenbart at en enkelt behandlingsøkt produserte en langvarig tumorregresjon.

EKSEMPEL 21. FORMULERINGER FOR TOPISK ADMINISTRERING

Dette eksemplet viser at Luzitins kan diffundere raskt gjennom huden når den påføres med en egnet transdermalformulering. Fire minigris ble anvendt til å teste diffusjon inn i huden av fotosensibilisatoren Luzitin-fMet, og for å evaluere eventuelle bivirkninger av formuleringer for topisk administrering.

Fotosensibilisatoren ble først løst opp i absolutt etanol (5 mg i 0,556 ml), deretter ble det tilsatt 1,737 ml propylenglykol, etterfulgt av 0,22 ml av Azone og 0,3 ml vann. Blandingen ble

grundig blandet i virvel og ultralydbehandlet for å lette oppløseligheten, og deretter tilsatt til gelbasen, bestående av vann (76,65 %), 96 % etanol (15 %) glyserol (6 %), trietanolamin (1,35 %), Carbopol 940 (1 %). Blandingen ble grundig blandet for å oppnå en god homogenisering. I dette preparat er den endelige konsentrasjonen av fotosensibilisator 0,1 % og for Azone® er den 4 %.

5 Behandlingen av dyrene ble beskrevet ovenfor. Når rolig under anestesi, ble formuleringene påført for hånd, ved bruk av kirurgiske hansker, på forhåndsbestemte områder. Hver påføring dekket et tilnærmet sirkulært område 3 cm i diameter, med en tykkelse på noen få millimeter med gel. Applikasjonsområdet ble dekket med et okklusivt plaster. For noen dyr ble samme prosedyre gjentatt 3 timer senere, på et annet område av ryggen. I det ene av dyrene ble formuleringene fjernet 6 timer
10 etter påføring, ryggen til dyret ble renset og det ble holdt i live i 10 dager for etterfølgende evaluering. Hudprøvene ble samlet inn som beskrevet tidligere. Hver prøve var tilnærmet rektangulære, med 2 cm sider og en tykkelse på 1 cm. Ingen av dyrene, og spesielt dyr som forble i live, viste tegn til bivirkninger forårsaket av preparatet med eller uten noen sensibilisatorer.

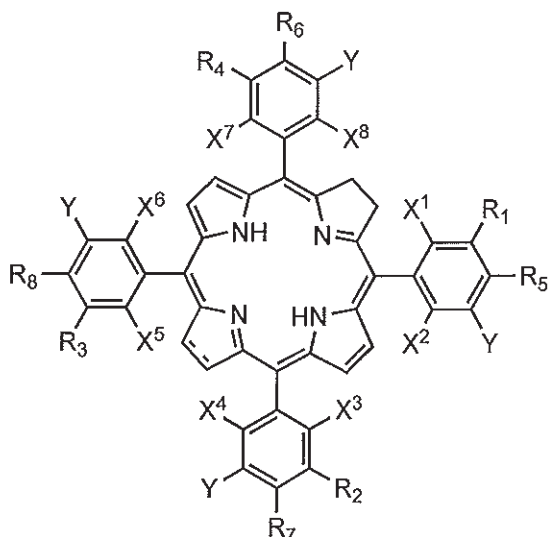
Etter fiksativ behandling, ble hver prøve skåret i skiver for evaluering ved
15 fluorescensmikroskopi og ved konfokalmikroskopi. Et representativt eksempel av bildene innhentet fra prøvene er presentert i figur 21. Bildene viser at, i løpet av 3 timer ved anvendelse av gel, diffunderte Luzitin-fMet gjennom alle epidermis. Fluorescensen av Luzitin-fMet ble ytterligere bekreftet ved sitt absorpsjonsspektrum i figur 22. Således er det mulig å formulere en sammensetning for lokal påføring av Luzitins som diffunderer gjennom stratum corneum og epidermis løpet av noen
20 få timer, noe som er meget fordelaktig for PDT av hudlidelser.

- (1) K. Berg, in H. Hönigsmann, G. Jori, A.R. Young (Eds.), *The Fundamental Bases of Phototherapy*. OEMF spa, Milano, 1996, p. 181-207.
- (2) R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1993.
- (3) Y. Vakrat-Haglili, L. Weiner, V. Brumfeld, A. Brandis, Y. Salomon, B. McIlroy, B.C. Wilson, A. Pawlak, M. Rozanowska, T. Sarna, A. Scherz, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6487.
- (4) M. Pineiro, A.L. Carvalho, M.M. Pereira, A.M.d.A.R. Gonsalves, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, *Chem. Eur. J.* 4 (1998) 2299.
- (5) T.J. Dougherty, D.G. Boyle, K.R. Weishaupt: *Photodynamic Therapy--Clinical and Drug Advances*, Porphyrin Photosensitization, Plenum Press, New York, 1983.
- (6) T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889.
- (7) R.L. Lipson, E.J. Baldes, A.M. Olsen, *J. Natl. Cancer Inst.* 26 (1961) 1.
- (8) T.J. Dougherty, D.G. Boyle, K.R. Weishaupt, B. Henderson, W. Potter, D.A. Bellnier, K.E. Wityk, *Adv. Exp. Biol. Med.* 160 (1983) 3.
- (9) R.K. Pandey, M.M. Siegel, R. Tsao, J.M. McReynolds, T.J. Dougherty, *Biomed. And Environ. Mass Spectrometry* 19 (1990) 405.
- (10) R. Bonnett, G. Martínez, *Tetrahedron* 57 (2001) 9513.
- (11) E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brucker, *Tetrahedron* 54 (1998) 4151.
- (12) M. Pineiro, A.M.d.A. Rocha Gonsalves, M.M. Pereira, S.J. Formosinho, L.G. Arnaut, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 3787.
- (13) Y. Chen, G. Li, R.K. Pandey, *Current Org. Chem.* 8 (2004) 1105.
- (14) E.M. Beems, T.M.A.R. Dubbelman, J. Lugtenburg, J.A.B. Best, M.F.M.A. Smeets, J.P.J. Boehgeim, *Photochem. Photobiol.* 46 (1987) 639.
- (15) S. Schastak, B. Jean, R. Handzel, G. Kostenich, R. Hermann, U. Sack, A. Orenstein, Y. Wang, P. Wiedermann, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 78 (2005) 203.
- (16) C.K. Chang, C. Sotiriou, W. Wu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1986) 1213.
- (17) A.R. Morgan, D. Skalkos, G.M. Garbo, R.W. Keck, S.H. Selamn, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 2126.
- (18) P. Yong-Hin, T.P. Wijesekera, D. Dolphin, *Tetrahedron Lett.* 32 (1991) 2875.
- (19) G. Zheng, A. Kozyrev, T.J. Dougherty, K.M. Smith, R.K. Pandey, *Chemistry Lett.* (1996) 119.
- (20) A.C. Tome, P.S.S. Lacerda, M.G.P.M.S. Neves, J.A. S. Cavaleiro, *Chem Commun* (1997) 1199.
- (21) H.-J. Kim, J.S. Lindsey, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 5475.
- (22) H.W. Whitlock Jr., R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 7485.
- (23) R. Bonnett, R.D. White, U.-J. Winfield, M.C. Berenbaum, *Biochem. J.* 261 (1989) 277.
- (24) F.S. De Rosa, M.V.L.B. Bentley, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1447.
- (25) J.L. McCullough, G.D. Weinstein, L.L. Lemus, W. Rampone, J.J. Jenkins, *J. Invest. Dermatol.* 81 (1983) 528.
- (26) O. Santoro, G. Bandieramonte, E. Melloni, R. Marchesini, F. Zunino, P. Lepera, G. De Palo, *Cancer Res.* 50 (1990) 4501.
- (27) J.C. Kennedy, R.H. Pottier, D.C. Pross, *J. Photochem. Photobiol. B* 6 (1990) 143.
- (28) S.R. Wiegell, I.-M. Stender, R. Na, H.C. Wulf, *Arch. Dermatol.* 139 (2003).
- (29) E.G. Azenha, A.C. Serra, M. Pineiro, M.M. Pereira, J. Seixas de Melo, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, A.M.d.A.R. Gonsalves, *Chem. Phys* 280 (2002) 177.

- (30) R.W. Boyle, D. Dolphin, *Photochem. Photobiol.* 64 (1996) 469.
- (31) A.S.M. Ressurreição, M. Pineiro, L.G. Arnaut, A.M.d.A.R. Gonsalves, J. Porphyrins Phthalocyanines 11 (2007) 50.
- (32) B.M. Magnusson, W.J. Pugh, M.S. Roberts, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1047.
- (33) A.M.d.A.R. Gonsalves, J.M.T.B. Varejão, M.M. Pereira, J. *Heterocycl. Chem.* 28 (1991) 635.
- (34) A.M.D.R. Gonsalves, R.A.W. Johnstone, M.M. Pereira, A.M.P. deSantAna, A.C. Serra, A.J.F.N. Sobral, P.A. Stocks, *HETEROCYCLES* 43 (1996) 829.
- (35) C.J.P. Monteiro, M.M. Pereira, S.M.A. Pinto, A.V.C. Simões, G.F.F. Sá, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, S. Simões, M.F. Wyatt, *Tetrahedron* 64 (2008) 5132.
- (36) C. Serpa, P.J.S. Gomes, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, J. Pina, J. Seixas de Melo, *Chem. Eur. J.* 12 (2006).
- (37) J.M. Dabrowski, M.M. Pereira, L.G. Arnaut, C.J.P. Monteiro, A.F. Peixoto, A. Karocki, K. Urbanska, G. Stochel, *Photochem. Photobiol.* 83 (2007) 897.
- (38) R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 79 (1994) 11.
- (39) M.H. Qvist, U. Hoeck, B. Kreilgaard, F. Madsen, S. Frokjaer, *Eur. J. Pharm. Sc.* 11 (2000) 59.
- (40) J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5421.
- (41) M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 382-91.
- (42) C. Tanielian, C. Schweitzer, R. Mechin, C. Wolff, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 208-12.
- (43) C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van der Bergh, G. Wagnières, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 45 (1998) 170-78.
- (44) R. Bonnett, B.D. Djelal, A. Nguyen, J. Porphyrins Phthalocyanines 5 (2001) 652.
- (45) R. Bonnett, P. Charlesworth, B.D. Djelal, D.J. McGarvey, T.G. Truscott, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1999) 325.
- (46) R. Bonnett, B.D. Djelal, P.A. Hamilton, G. Martinez, F. Wierrani, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 53 (1999) 136-43.
- (47) E. Crescenzi, A. Chiaviello, G. Canti, E. Reddi, B.M. Veneziani, G. Palumbo, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 776-85.
- (48) D.G. Hilmey, M. Abe, M.I. Nelen, C.E. Stilts, G.A. Baker, S.N. Baker, F.V. Bright, S.R. Davies, S.O. Gollnick, A.R. Oseroff, S.L. Gibson, R. Hilf, M.R. Detty, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 449-61.
- (49) A. Hajri, S. Wack, C. Meyer, M.K. Smith, C. Leberquier, M. Kedingier, M. Aprahamian, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 140.
- (50) H. Rezzoug, L. Bezdetnaya, O. A'amar, J.L. Merlin, F. Guillemin, *Lasers Med. Sci.* 13 (1998) 119.
- (51) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.* 46 (2001) 3.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (I)

hvor:

----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,

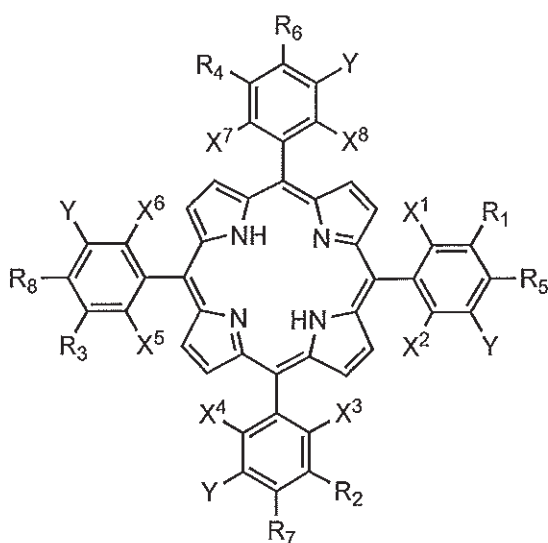
$X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8$ er hver uavhengig valgt fra halogen (F, Cl, Br) og hydrogenatomer, forutsatt at enten alle av X^2, X^4, X^6 og X^8 eller alle av X^1, X^3, X^5 og X^7 er halogener, eller alle X er halogener,

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$, er uavhengig av hverandre valgt blant H, -OH og $-SO_2R$, hvor R er hver uavhengig valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, $-OR^n$, $-NHR^n$ og $-NR_2^n$ hvor R^n er alkyl med 1 til 12 karbonatomer,

Y er enten fluor eller hydrogen,

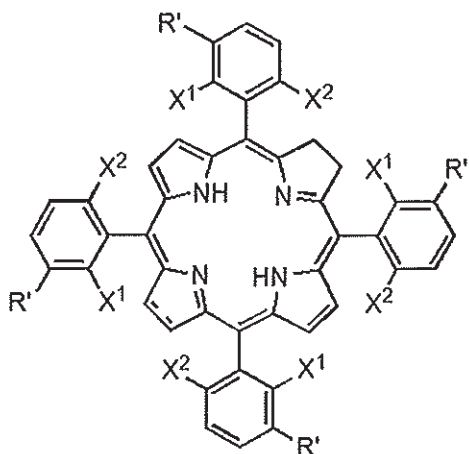
som omfatter følgende trinn:

(i) Fastfase-reduksjon av det tilsvarende substituerte porfyrin til klorinderivatet eller bakterioklorinderivat ved hjelp av hydrazider i fravær av oppløsningsmidler, og eventuelt, i fravær av baser, der tilsvarende substituerte porfyrin har formelen:



Formel (II).

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av et klorin eller bakterioklorinderivat med formelen:



Formel (III)

hvor:

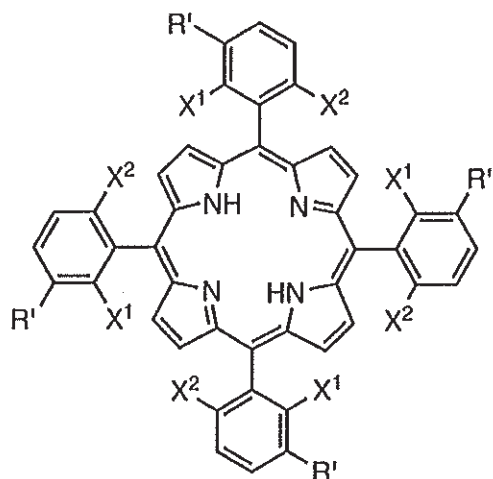
----- representerer en karbon-karbon-enkeltbinding eller en karbon-karbon-dobbelbinding,

X² er valgt fra halogen (F, Cl, Br), X¹ er valgt fra hydrogen eller halogen (F, Cl, Br), og R' er -SO₂R;

R er hver uavhengig valgt fra -Cl, -OH, -aminosyre, -ORⁿ, -NHRⁿ og -NR₂ⁿ hvor Rⁿ er alkyl med 1 til 12 karbonatomer,

som omfatter følgende trinn:

(i) Fastfase-reduksjon av det tilsvarende substituerte porfyrin til klorinderivatet eller bakterioklorinderivat ved hjelp av hydrazider i fravær av oppløsningsmidler, og, eventuelt, i fravær av baser, der tilsvarende substituerte porfyrin har formelen:

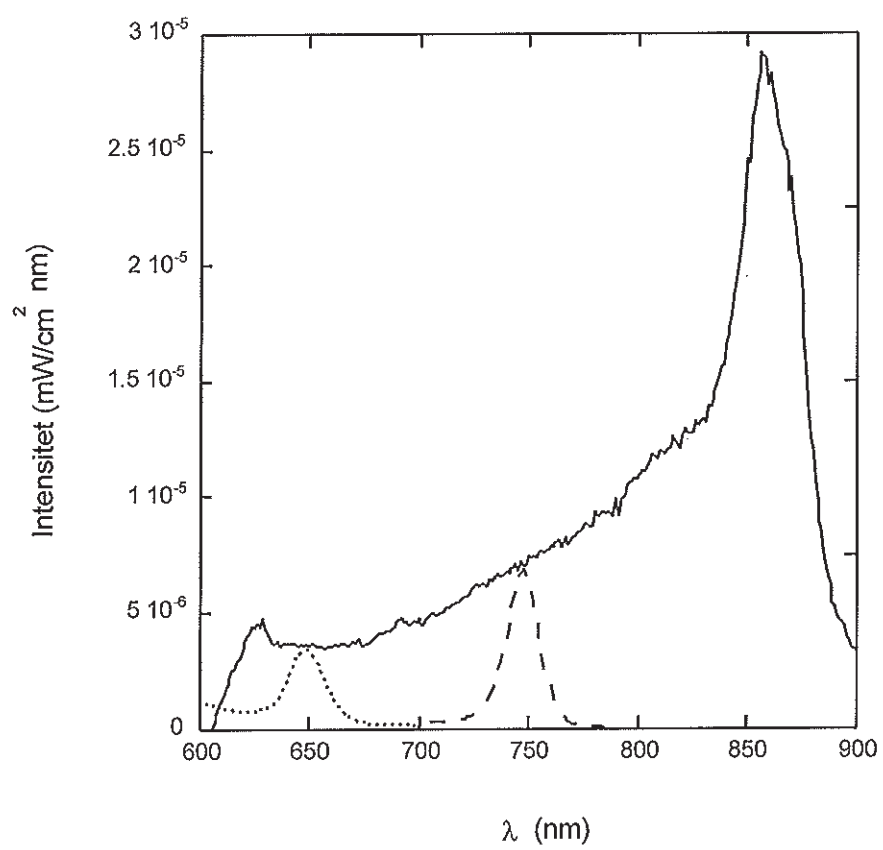


Formel (IV).

SAMMENDRAG

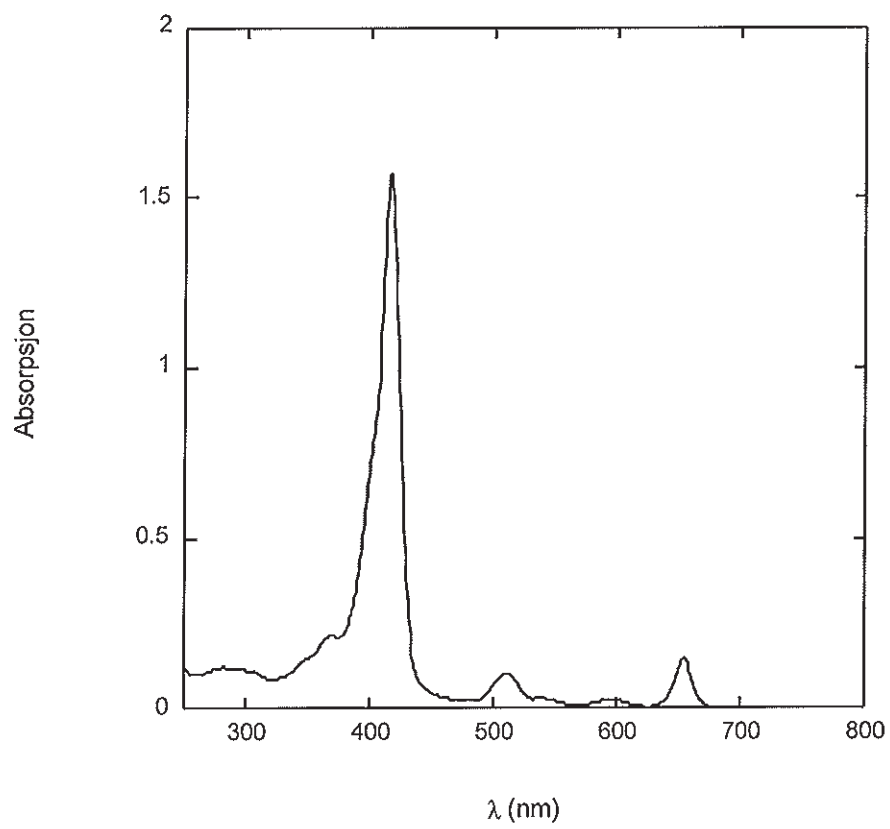
Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for bearbeiding, egenskaper, farmasøytiske preparater og metoder for behandling av sulfonerte kloriner og bakteriokloriner beregnet for fotodynamisk terapi (PDT) av hyperproliferativt vev slik som tumorer, hyperproliferative blodkar og andre lidelser eller abnormaliteter som er mottakelig for PDT. Spesielt er det beskrevet økonomisk i storskala-syntese av stabile kloriner og bakteriokloriner. Egenskapene deres ble skreddersydd for å møte de for ideelle fotosensibilisatorer for PDT. I en annen utførelsesform, er farmasøytiske preparater og metoder for terapi for systemisk administrering inkludert. I ytterligere en utførelsesform, er farmasøytiske preparater og metoder for terapi for topisk administrering også gitt. Videre tilveiebragt er en fremgangsmåte for merking av et målvev og som gir et bilde av vevet ved fluorescens ved magnetisk resonansavbildning.

1/14



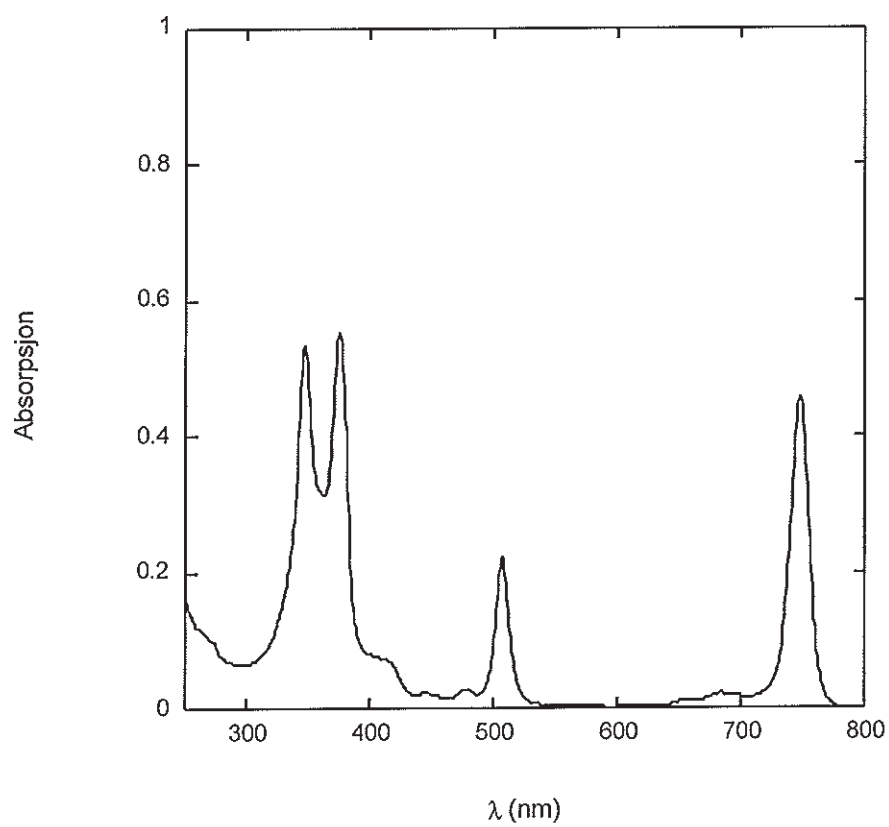
Figur 1

2/14



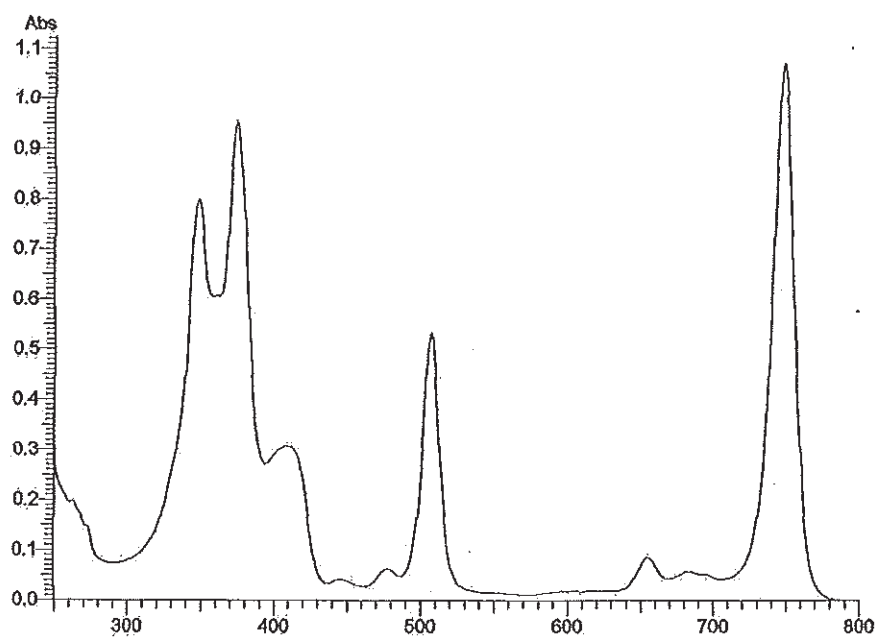
Figur 2

3/14

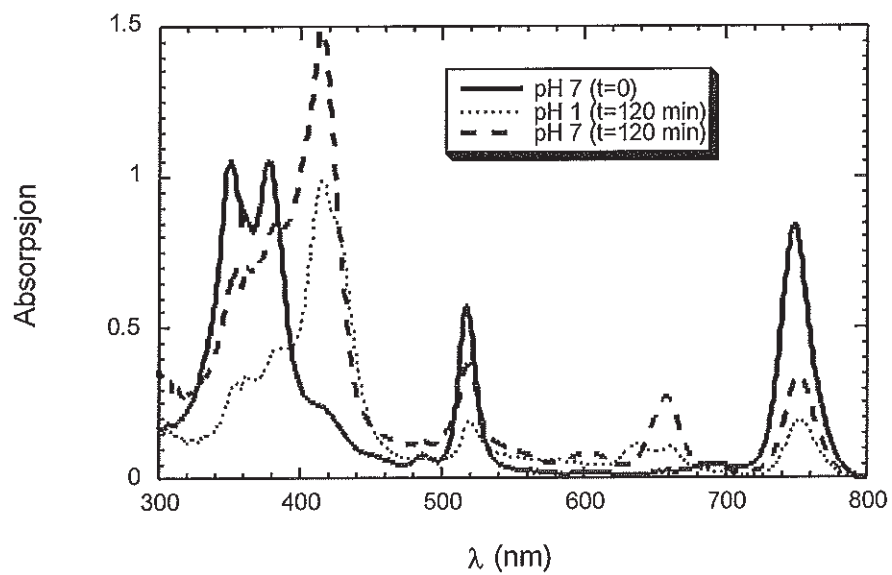


Figur 3

4/14

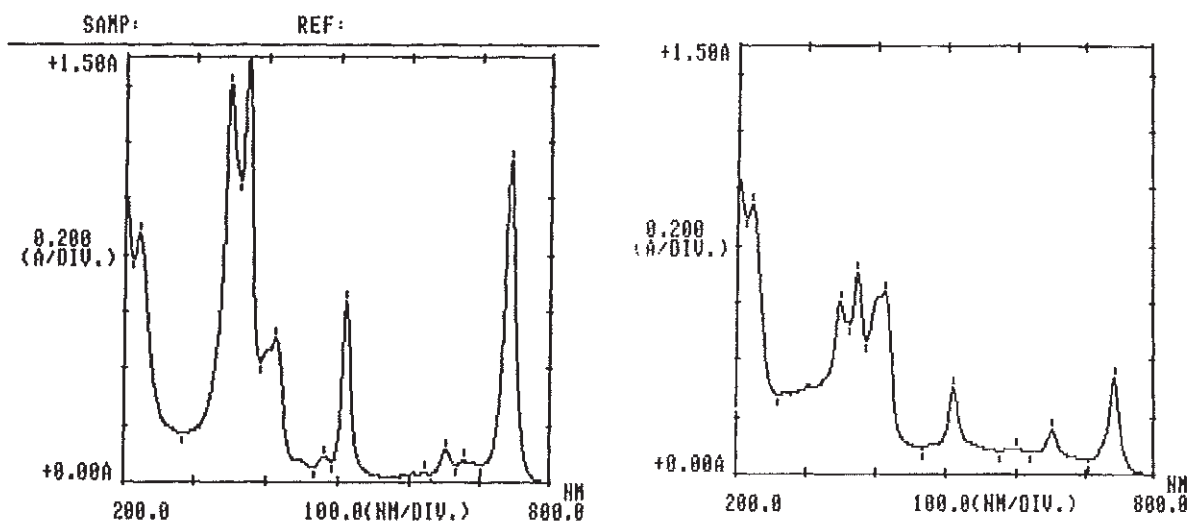


Figur 4

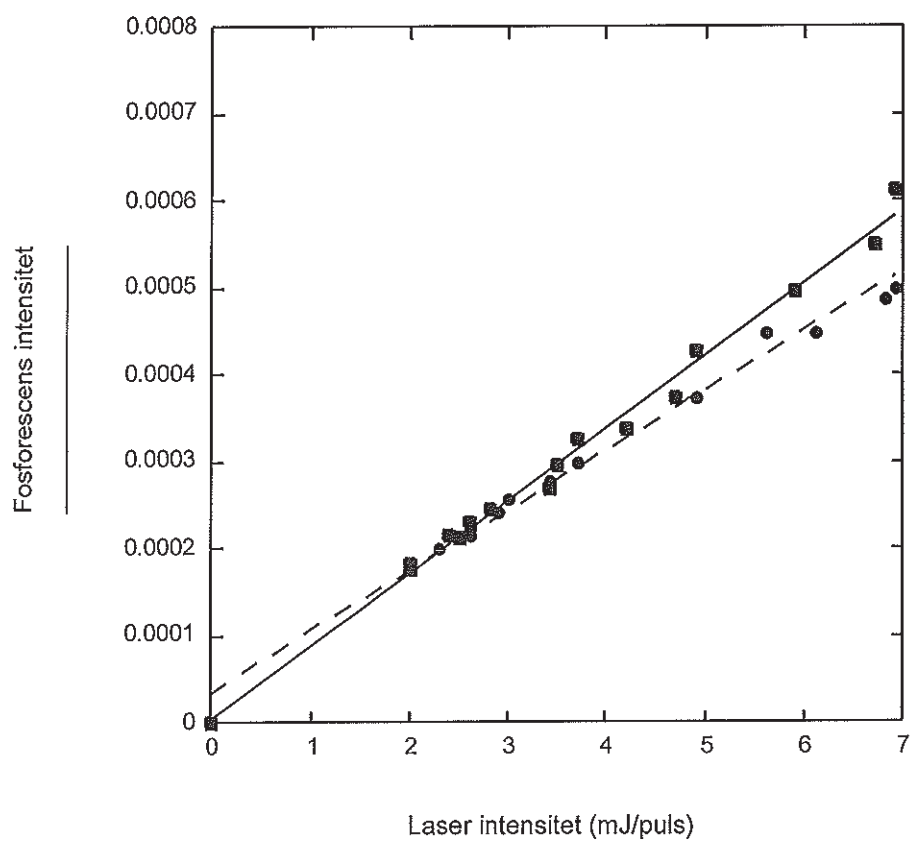


Figur 5

5/14

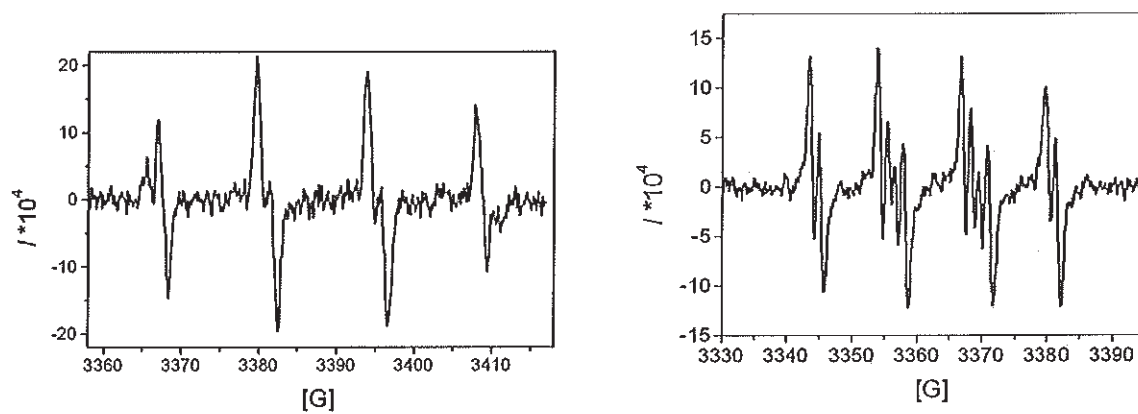


Figur 6

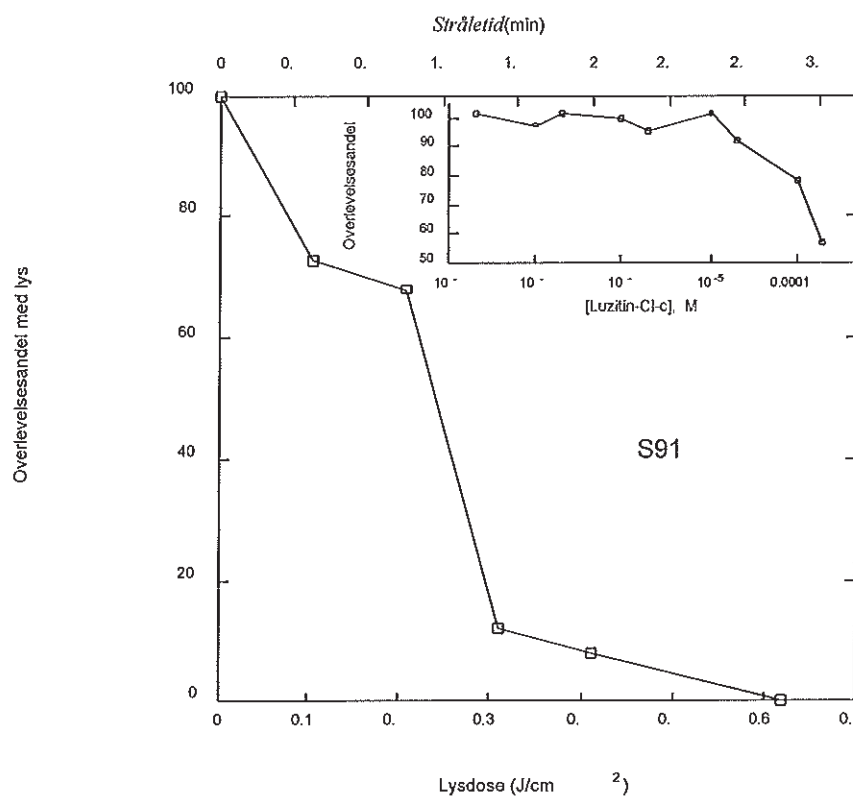


Figur 7

6/14

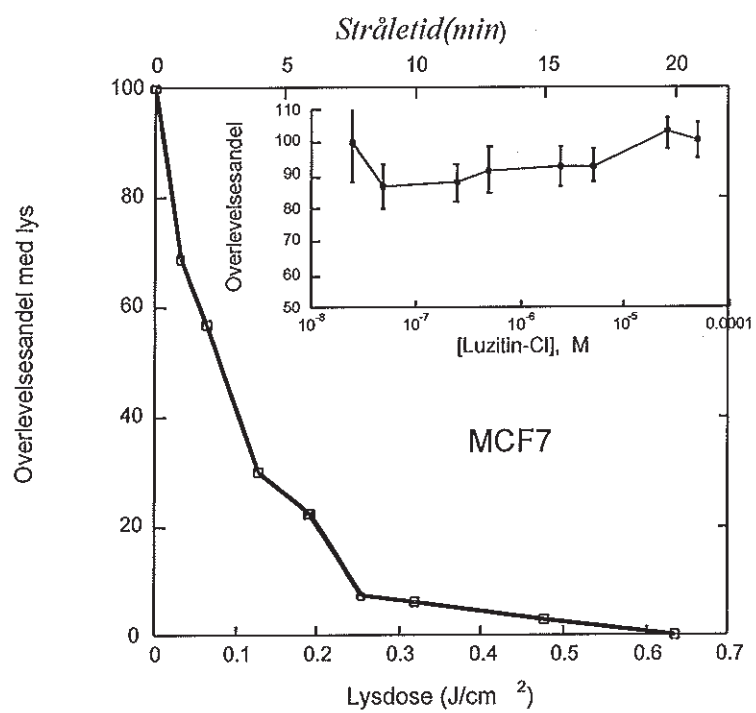


Figur 8



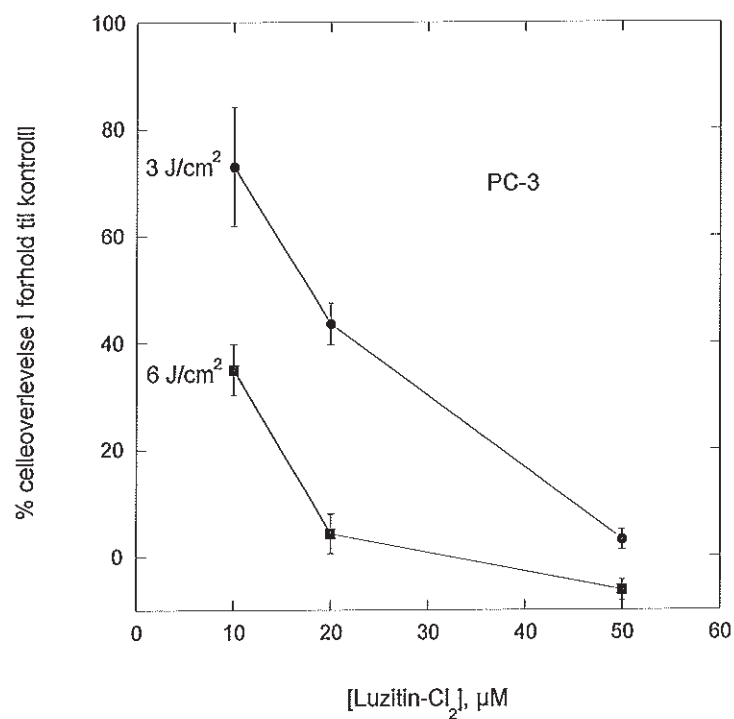
Figur 9

7/14

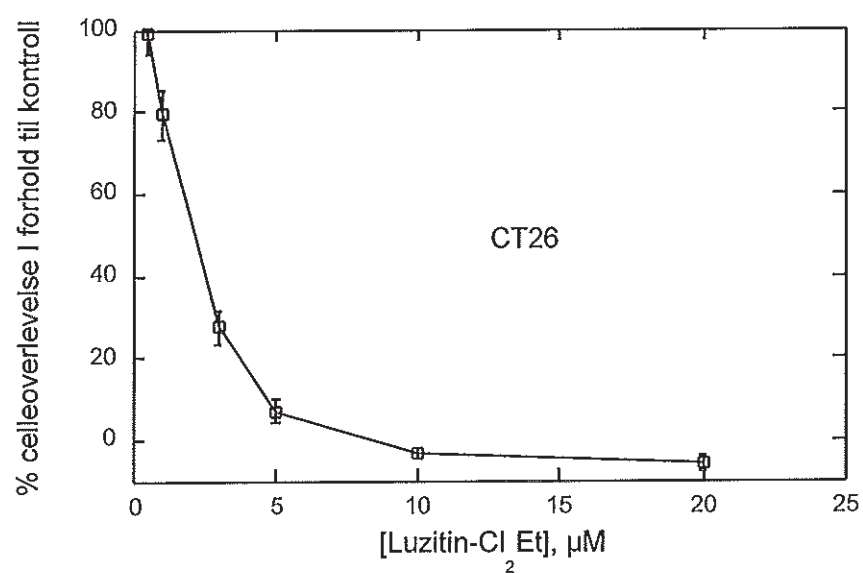


Figur 10

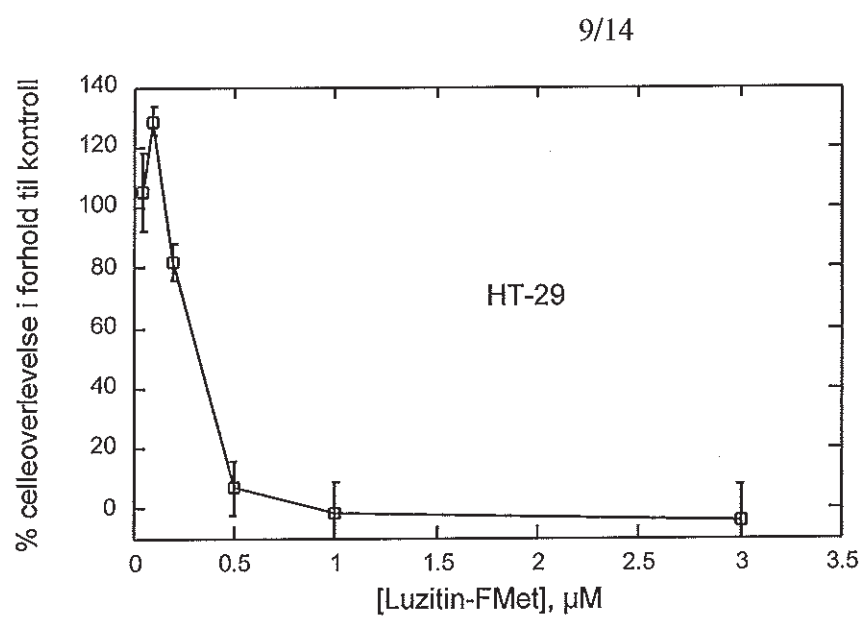
8/14



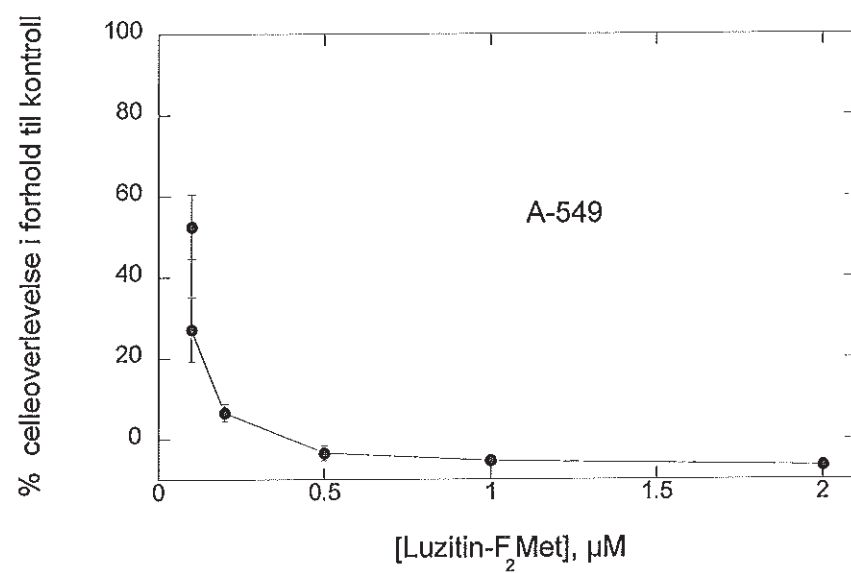
Figur 11



Figur 12

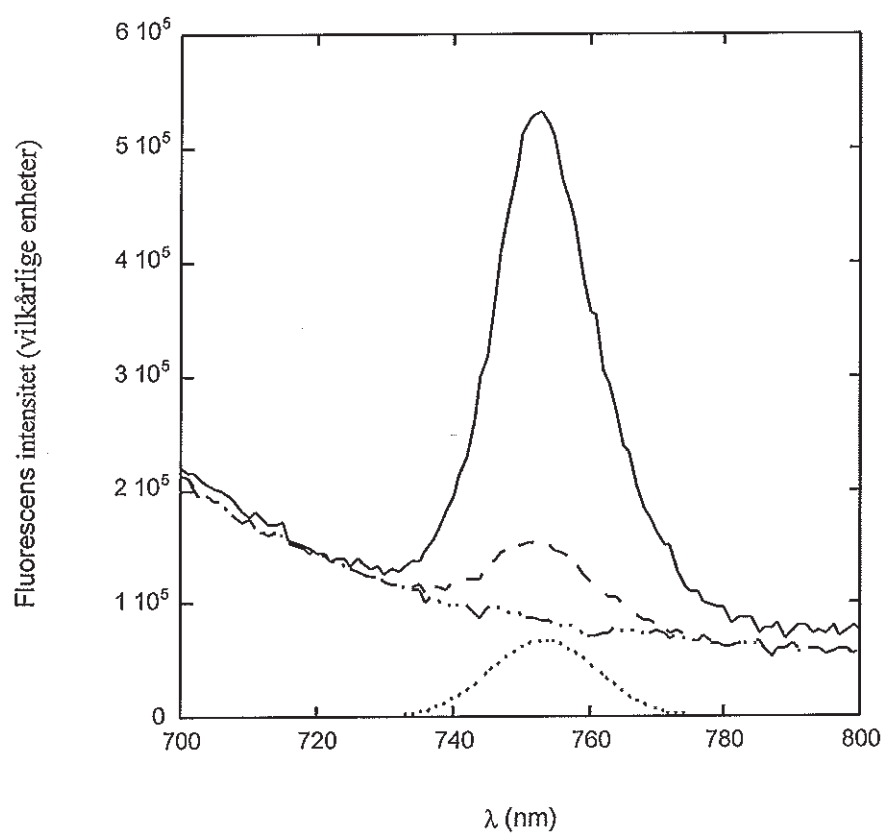


Figur 13

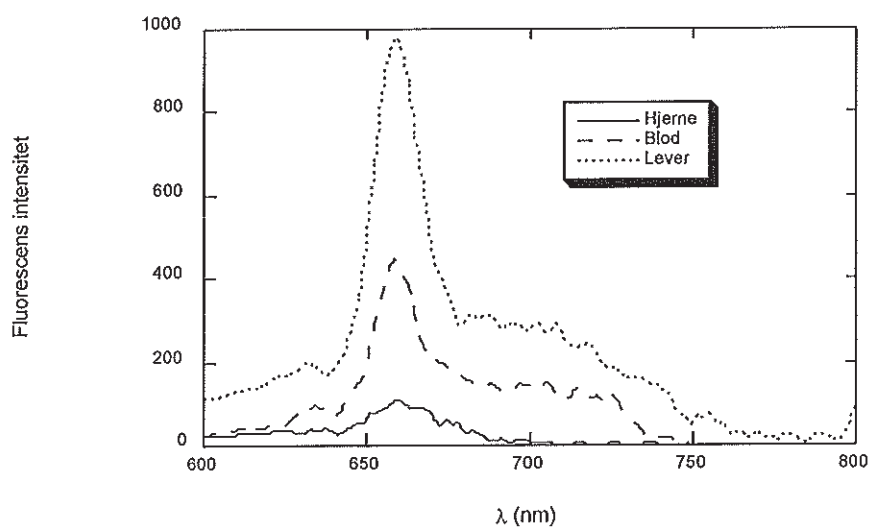


Figur 14

10/14

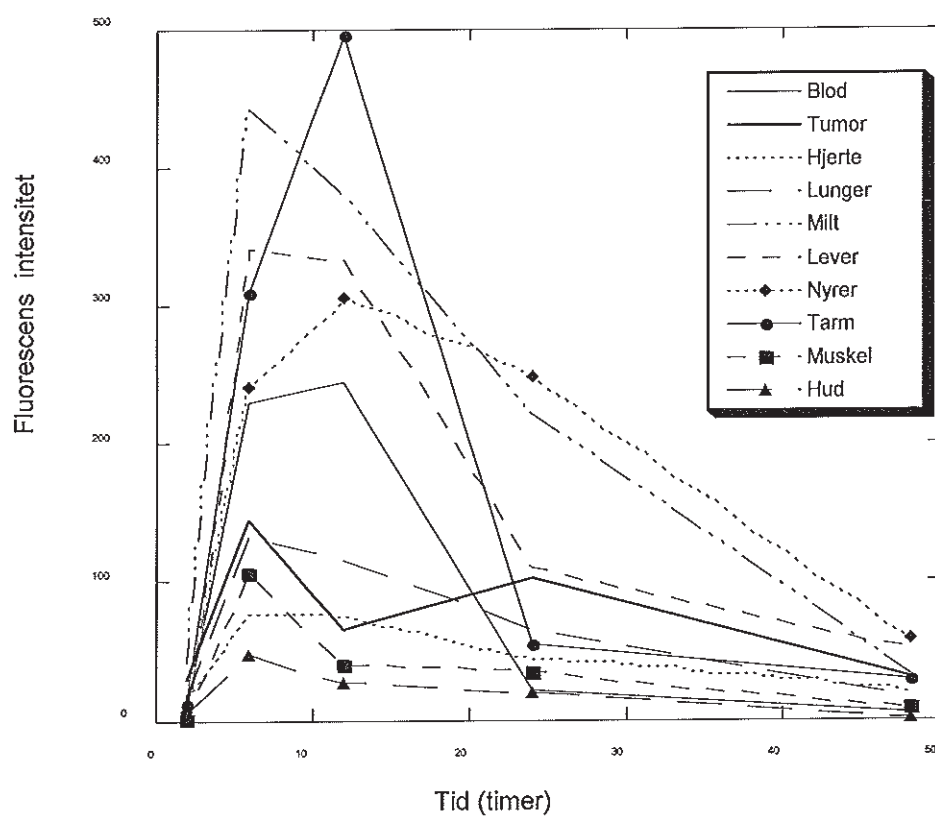


Figur 15

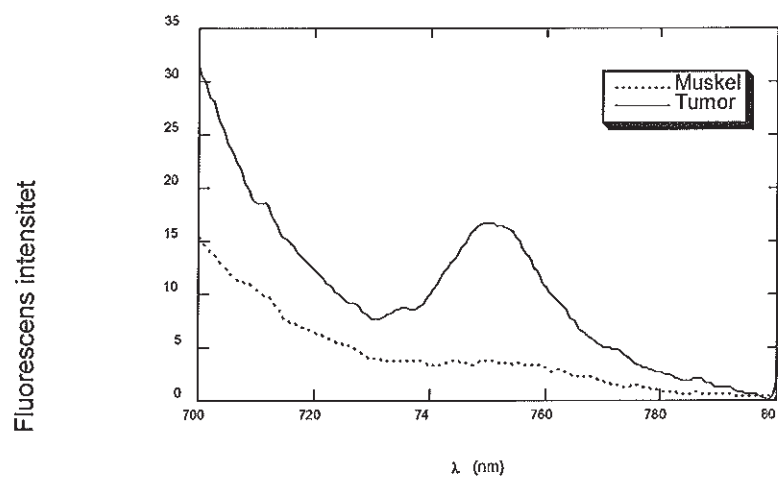


Figur 16

11/14

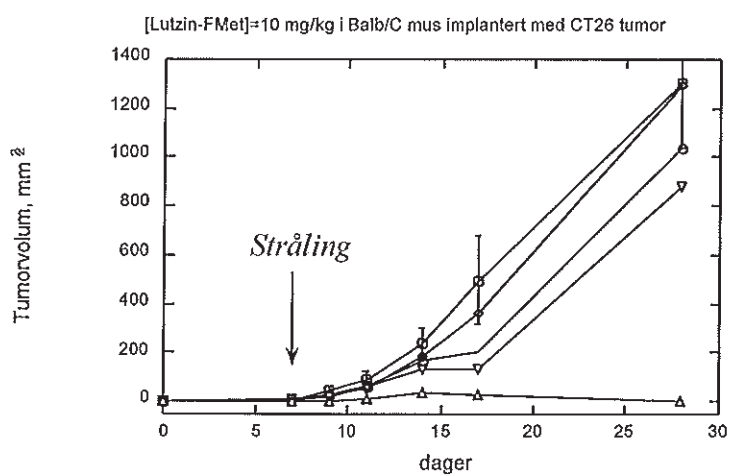


Figur 17

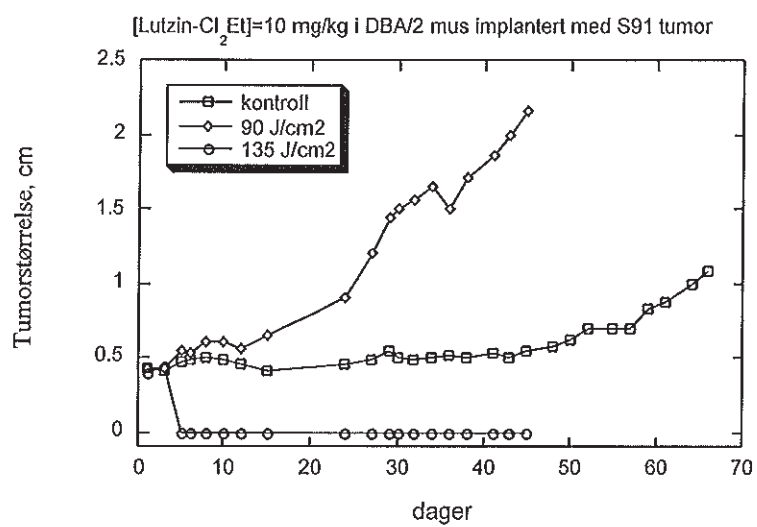


Figur 18

12/14

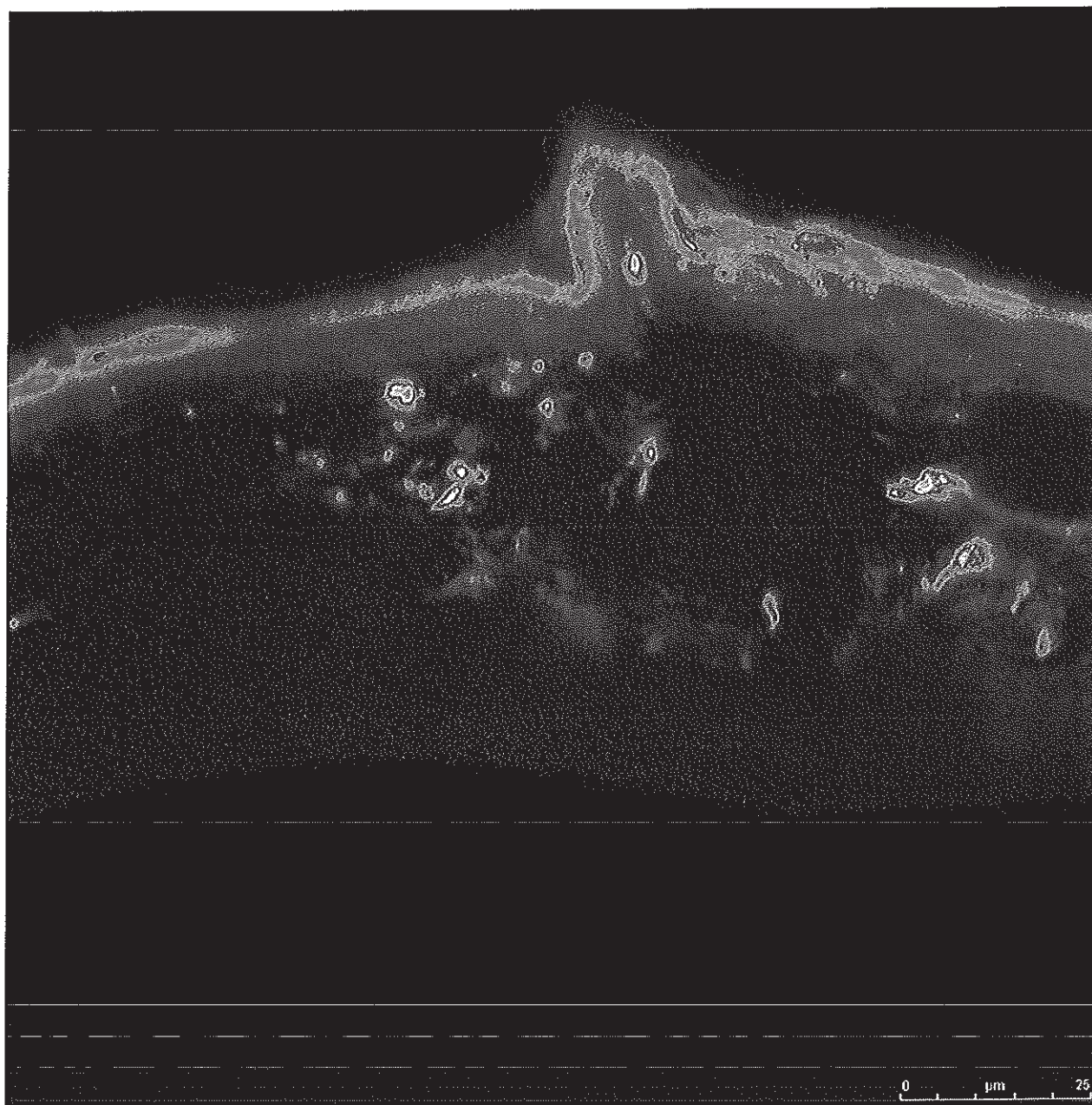


Figur 19



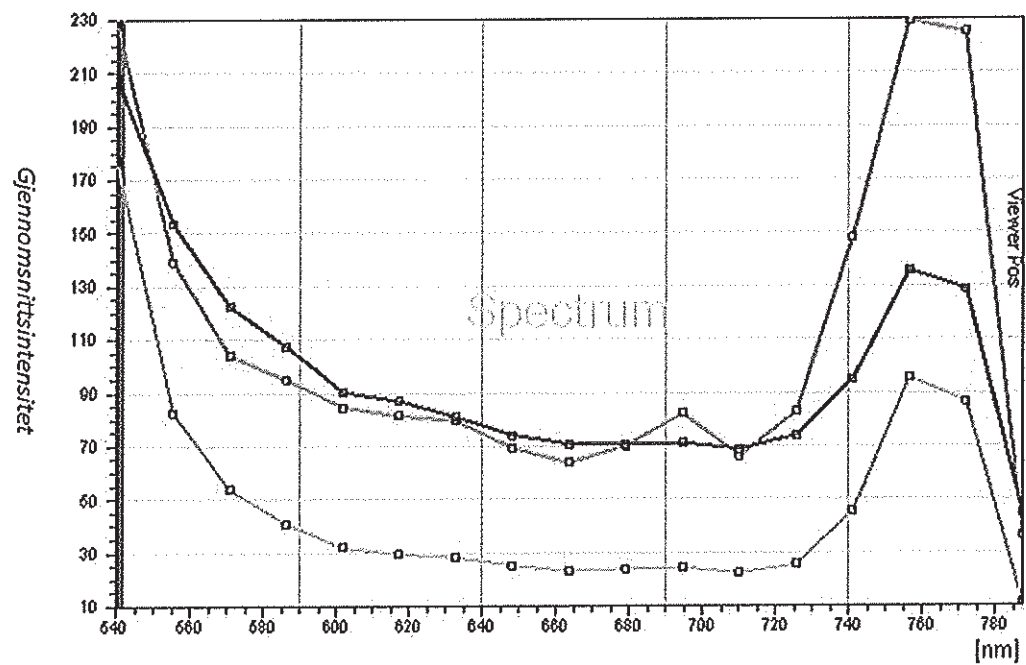
Figur 20

13/14



Figur 21

14/14



Figur 22