



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323478**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 487/22 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

C07F 19/00 (2006.01)

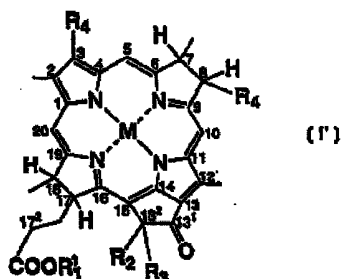
A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/49 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19982348	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.11.24 PCT/IL96/00161
(22)	Inng.dag	1998.05.22	(85)	Videreføringsdag	1998.05.22
(24)	Løpedag	1996.11.24	(30)	Prioritet	1995.11.24, IL, 116126
(41)	Alm.tilgj	1998.07.23			
(45)	Meddelt	2007.05.21			
(73)	Innehaver	Yeda Research and Development Company Ltd, P O Box 95, 76100 REHOVOT, IL Avigdor Scherz, 4 Tor Ha'aviv Street, 76329 REHOVOT, IL Yoram Salomon, 43 B Gordon Street, 76287 REHOVOT, IL Hugo Scheer, Ortsstrasse 17, 87662 BLONHOFEN, DE Gerhard Hartwich, München, DE Alexander Brandis, 9/3 Ehad Ha'am Street, 76261 REHOVOT, IL			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Syntetiske metall-substituerte bakterioklorofyllderivater samt anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	D1 = WO 90/12573 A1 (nevnt i søknadens beskrivelse på side 3) D2 = Geskes, C. et. al. "An electrochemical and spectroelectrochemical investigation of metal-substituted bacteriochlorophyll <i>a</i> ." J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 7776-7783.			
(57)	Sammendrag				

Metallerte bakterioklorofyller av formel [Ml-Bchl hvor M er et metallatom valgt fra divalent Pd, Co, Ni, Cu, Zn og Mn, trivalent Fe, Mn og Cr, og tetravalent Sn og Pt og Bchl representerer residuet av et demetallert naturlig eller syntetisk bakterioklorofyllderivat fremstilles ved transmetallering av de tilsvarende [Cd]-Bchl-derivater som bærer ved posisjon 173 en gruppe COOR, hvor R, er et C-, C,hydrokarbylresidu, og ytterligere eventuelt transesterifisering av 173-COOR,-gruppen av det dannede [Ml Bchl. Forbindelsene er egnet for bruk i fotodynamisk terapi og diagnose, samt for avlivning av celler og infeksjonsdyktige agenser, for eksempel bakterier og virus både i biologiske produkter og i levende vev. Foretrukne forbindelser er dem av formel (I') hvor RI, er et residu valgt fra (i) eventuelt substituert hydrokarbyl; (ii) hydroksyinneholdende aminosyrer eller peptid eller et derivat derav; og (iii) hydroksyinneholdende peptid eller en cellespesifik ligand, for eksempel peptid eller protein bundet til COO-gruppen via en avstandgivende gruppe som definert i (i).



Foreliggende oppfinnelse angår en ny fremgangsmåte ved fremstilling av syntetiske metallerte bakterioklorofyllderivater som angitt i krav 1 som er nyttige for *in vivo* dynamisk terapi (PDT) samt diagnose og *in vitro* fotodynamisk avlivelse av virus og mikroorganismer. Oppfinnelsen omfatter også slike nye metallsubstituerte bakterioklorofyllderivater som angitt i krav 6 samt anvendelse av disse for fremstilling av farmasøytiske sammensetninger som angitt i krav 13 - 16.

10 Definisjoner og forkortelser.

BChl = bakterioklorofyll a (det Mg-inneholdende 7,8,17,18-tetrahydroporfyrin av formel 1 nedenfor hvor M er Mg, R₁ er fytyl eller geranylgeranyl, R₂ er COOCH₃, R₃ er H, R₄ ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er atyl).

15 BChl-derivat = et derivat av BChl med modifikasjoner i makrokyle med sentrale metallatom og/eller i de omliggende innbefattende derivatene med formel I, II, III og I', II', III' nedenfor.

20 Bphe = bakteriofeofytin a (BChl hvor det sentrale Mg er erstattet med to H-atomer).

Chl = klorofyll (et Mg-inneholdende 17,18-dihydroporfyrin-derivat laget av et makromolekyl omfattende 4 pyrrol og en isocyclisk ring som er konjugert til hverandre og bundet til Mg-atomet). Klorofyll a har formelen I nedenfor hvor
25 R₁ er fytyl, R₂ er COOCH₃, R₃ er H. R₄ ved posisjon 3 er vinyl og er ved posisjon 8 etyl.

[M]-BChl = BChl-derivat hvor det sentrale Mg-atom har blitt erstattet med et metall M som definert nedenfor.

PDT = fotodynamisk terapi.

Phe = peofytin a (Chl hvor det sentrale Mg er erstattet med to H-atomer).

Bakgrunn for oppfinnelsen.

De Mg-inneholdende (bakterio)klorofyller ((B)Chl) samt deres frie baser (bakterio)feofytinene ((B)Phe) er essensielle for fotosyntesen. De virker som antenner eller redokspigmenter som tillater lysindusert ladingsseparasjon inne i reaksjonssenteret. Pigmentene er også potensielt anvendelige fotosensitivitatorer, for eksempel ved fotodynamisk svulst-terapi.

Porfyriner har blitt vist å akkumulere i svulstvev og, ved bestråling av svulstvevet, å absorbere lys *in situ*, noe som gir en mulighet til å påvise svulster ved beliggenheten av fluorescensen. Et grovderivat av hematoporfyrin kjent som hematoporfyrinderivat eller HPD har blitt foreslått både for påvisning og for fotodynamisk terapi av svulster. En form for HPD som er hevdet å være mer effektiv, omfatter en del av HPD med en aggregatvekt på over 10 Kda og er gjengstand for US patent nr. 4,649,151. HPD eller dets aktive komponenter har blitt beskrevet i US patent nr. 4,753,958 for topisk behandling av hudsykdommer og i Matthews et al., 1988 for sterilisering av biologiske prøver inneholdende infeksjonsdyktige organismer så som bakterier og virus.

For å optimalisere virkningen av porfyrinmedikamentene i terapeutika og diagnostika har flere porfyrinderivater blitt foreslått hvor, for eksempel, det finnes et sentralt metallatom kompleksbundet til de fire pyrrolringer, og/eller de omliggende substituenten av pyrrolringene er modifisert og/eller makromokyle er dihydrogenert til Chl-derivater (kloriner) eller tetrahydrogenert til BChl-derivater (bakteriokloriner).

Komplekser av cykliske tetrapyrroler med metaller andre enn Mg ble undersøkt i porfyrinen og 17,18-dihydroporfyrinse-

rien for å forstå deres spektroskopiske- og redoksegenskaper (Hynninen, 1991). Bakterioklorofyller er av potensiell fordel sammenlignet med klorofyllene fordi de viser intense bånd i det nære infrarøde spektrum, det vil si ved vesentlig lengre bølgelengde enn klorofyllderivater. Imidlertid er lite informasjon tilgjengelig angående bakterioklorofyller med sentralmetaller andre enn Mg.

Bakterieklorofyll α og derivater derav er også kjent fra Geshe, (et al., "An electrochemical and spectroelectrochemical investigation of metal-substituted bacteriochlorophyll α ." J.Am.Che.Sol. 1995, 117, 7776-7783.

Internasjonal PCT-søknad publikasjonnr. WO 90/112573 til Dougherty beskriver derivater av bakterioklorofyll-a eller -b eller av de tilsvarende bakteriokloriner uten det sentrale metallatom eller hvor det sentrale metallatom kan være et ikke-paramagnetisk metall valgt fra Mg^{2+} , Sn^{2+} og Zn^{2+} og C-17³-karboksylgruppen er esterifisert med et mettet eller umettet hydrokarbylresidu av 8-25C for fremstilling av en sammensetning for bruk ved en fremgangsmåte for å utføre ødeleggelsen eller hemmingen av uønskede biologiske målsubstrater, hvilken fremgangsmåte omfatter å fotosensitivisere nevnte substrat med en effektiv mengde av nevnte derivat fulgt av bestråling av målsubstratet med bestråling i et bølgelengdebånd absorbert av nevnte derivat over en tid som er effektiv for å hemme eller ødelegge substratet. I tillegg er forbindelsene hevdet å være anvendelige i fotodynamisk terapi og diagnose. Det bør bemerkes at selv om Sn^{2+} og Zn^{2+} -komplekser av bakterioklorofyll-a eller -b er krevd, har disse metallderivater ikke blitt eksemplifisert og heller ikke var noen metode for deres fremstilling beskrevet i beskrivelsen av nevnte patentsøknad WO 90/12573.

Losev et al., 1990 beskriver $[Pd]-BChl$ og $[Cu]-BChl$ komplekser hevdet å være fremstilt ved henholdsvis direkte metallering av BPhe med Pd benzonitril i benzen i en strøm av

nitrogen eller med en konsentrert oppløsning av CuCl_2 i metanol. Imidlertid mangler denne publikasjonen detaljer angående fremgangsmåten for fremstilling og karakterisering av metallkompleksene. Videre kunne fremstillingen av $[\text{Pd}]$ -BChl-komplekset i henhold til Losev ikke bli reproduisert av søker.

Under normale avleveringsbetingelser, det vil si i nærvær av oksygen ved romtemperatur og under normale lysbetingelser, er BChl-enhetene ustabile og har noe lavere mengdeut-
10 bytte for tripletttilstandsdannelse sammenlignet med for eksempel hematoporfyrinderivat (HPD). Imidlertid resulterer deres mulige initiering av biologiske redoksreaksjoner gunstige spektralkarakteristika og deres lette nedbrytning *in vivo* i potensiell overlegenhet av klorofyller i forhold
15 til andre forbindelser, for eksempel porfyriner og klorofyller for PDT-terapi og diagnostisering samt for avlivning av celler, virus og bakterier i prøver og i levende vev. Kjemisk modifikasjon av bakterioklorofyller er ventet ytterligere å forbedre deres egenskaper, men dette har vært
20 meget begrenset grunnet mangel på egnede metoder for fremstillingen av slike modifiserte bakterioklorofyller (Hynninen, 1991).

Europeisk patentsøknad publisert under nr. 0584552 av samme søker som foreliggende søknad beskriver nye konjugater av
25 Chl og BChl med aminosyrer, peptider og proteiner for bruk i PDT-terapi og diagnoser. Aminosyren, peptidet eller proteinresiduet blir bundet direkte via en avstandsgivende enhet til C-17^3 -karboksylgruppen av Chl eller BChl-molekylet. Disse konjugater blir fremstilt ved metoder som er milde
30 nok til å opprettholde det syrelabile sentrale Mg-atom. Zn- og Cu-komplekser av klorofyll α - 17^3 -serin metylester ble også beskrevet deri, men intet metallert bakterioklorofyll eller en fremgangsmåte for deres fremstilling ble beskrevet deri.

Tysk patentsøknad nr. DE 4121876 beskriver bakteriokloro-
 fyllderivater hvor modifiserte estere ved posisjoner C-13²
 og C-17³ blir dannet under milde betingelser ved rask al-
 kalisk transesterifisering noe som tillater ytterligere
 5 endringer ved den isocykliske ring under opprettholdelse av
 det sentrale Mg hvorved pigmentabsorpsjonen blir skiftet
 forbi 800 nm. Søknaden nevner også metallkomplekser av
 nevnte BChl-derivater med Zn eller Ni, men nevnte komplek-
 ser ble ikke eksemplifisert heller ikke ble en fremgangs-
 10 måte for deres fremstilling beskrevet deri.

Det ville være ønskelig å fremstille nye metallerte komp-
 lekser av BChl for bruk i PDT for å opprettholde eller til-
 og med forbedre de gunstige optiske og fysiologiske egen-
 skaper av BChl'er samtidig som deres fotosensitiviterende
 15 potensiale optimaliseres så vel som å forbedre deres kje-
 miske stabilitet og optimalisere deres fysiologiske leve-
 tid. Transmetallering resulterer i klare endringer i den
 kjemiske reaktivitet og stabilitet av BChl'er, noe som er
 viktig for nye modifikasjoner av makromolekyle og de omlig-
 20 gende substituenten og spesielt for å optimalisere deres
 transport, målretting og biologiske levetid og minimalisere
 toksiske bieffekter. Transmetallering resulterer også i
 klare endringer i egenskapene hos den eksiterte tilstand
 innbefattende tripletutbytte og levetid, tilgjengelighet av
 25 høyere eksiterte tilstander og produksjon av cytotoxiske
 oksygenforbindelser.

Flere metoder er kjent for variasjon av det sentrale
 metallatom i porfyriner (se Buchler, 1975). Porfyriner er
 lett tilgjengelige og kjemisk stabile, men spektralt og fy-
 30 siologisk ugunstige.

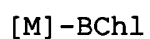
Få metoder er kjent for direkte eller indirekte metallering
 av klorofyller. Strell og Urumow, 1977 beskriver [Cr]-Chl
 og [Mn]-Chl komplekser fremstilt ved transmetallering av
 [Cd]-Chl-komplekset (dannet ved reaksjonen av det demetall-
 35 erte Chl-derivat med kadmiumacetat i metanol eller pyridin)

- med acetatet av Cr^{++} eller Mn^{++} i metanol under N_2 -atmosfære. Transmetalleringsmetoden er hevdet å være egnet også for Cu, Zn, Co og Pb-komplekser av klorofyllderivater, men ikke for Fe^{3+} , Ni og Mg. Imidlertid, siden Cu, Zn, Co og Pb-kompleksene kan bli fremstilt ved direkte metallering til Phe, ville metoden være egnet kun for Cr og Mn. Forfatterne beskriver også fremstilling av [Mg]-Chl-komplekset ved direkte metallering av Phe i aceton med Mg-acetat i dimetylsulfoksid.
- 10 Lite informasjon er for tiden tilgjengelig angående bakterioklorofyller med sentrale metaller andre enn Mg. Metallering av bakterioklorofyller er kjent å være vanskeligere enn den for klorofyller grunnet deres senkede reaktivitet for metallering og økede reaktivitet for sidereaksjoner.
- 15 En spesiell metode for innsetting av Mg i bakteriofeofytin har blitt beskrevet (Wasielewsky, 1977). Foreliggende oppfinnere har forsøkt de direkte metallering og transmetalleringsprosedyrer for klorofyllderivater beskrevet av Strell og Urumow for fremstillingen av metallkomplekser av bakterioklorofyllderivater, men ingen av forsøkene har lyktes.
- 20 Den direkte metallering av bakteriofeofytinderivater virket ikke med noe metall som ble forsøkt bortsatt fra Cu og Zn og resulterte ellers i en blanding av uomsatt bakteriofeofytin og metallerte oksyderingsprodukter av 3-acetylklorofyll a-typen.
- 25

Oppsummering av oppfinnelsen.

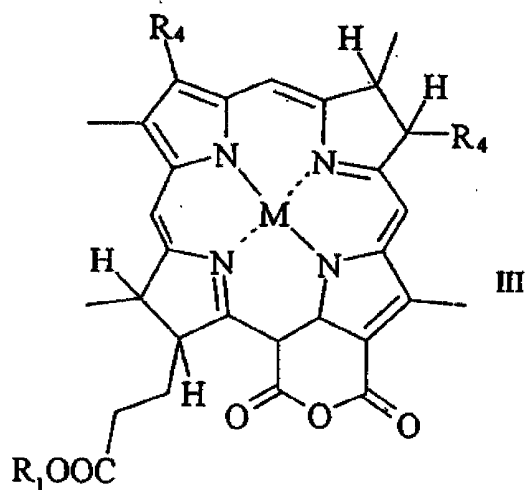
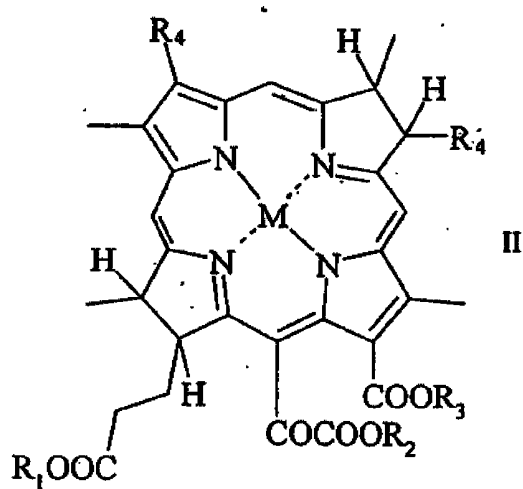
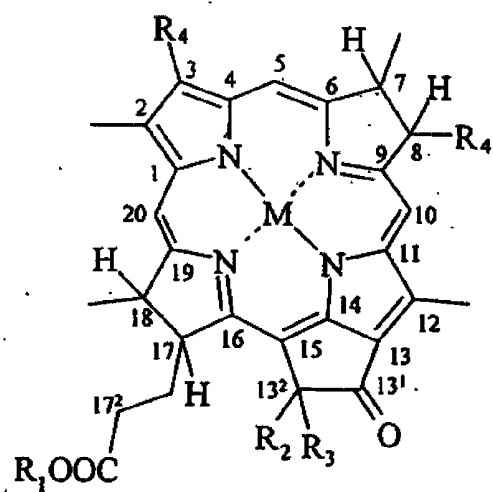
- Det har nå blitt funnet at i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan metallkompleksene av bakterioklorofyllderivater bli dannet ved en modifikasjon av transmetalleringssessen for metallering av klorofyllderivater publisert av Strell og Urumow, ved å bruke passende metallsalter og oppløsningsmidler.
- 30

Foreliggende oppfinnelse angår således en fremgangsmåte for fremstilling av syntetiske metallerte bakterioklorofyllderivater av formel



5 hvor

[M]-BChl-derivatet er valgt fra en forbindelse av formel I, II eller III:



hvor R_1 er et C_1 - C_{25} -hydrokarbylresidu;

R_2 er H, OH eller $COOR_5$ når forbindelsen er av formel I',
 eller R_2 er H eller R_5 når forbindelsen er av formel II',
 hvor R_5 er C_1 - C_{12} -alkyl eller C_3 - C_{12} -cykloalkyl;

5 R_3 er H, OH eller C_1 - C_{12} -alkyl eller alkoksy når forbindelsen er av formel I', eller R_3 er H eller C_1 - C_{12} -alkyl eller

alkoksy når forbindelsen er av formel II';

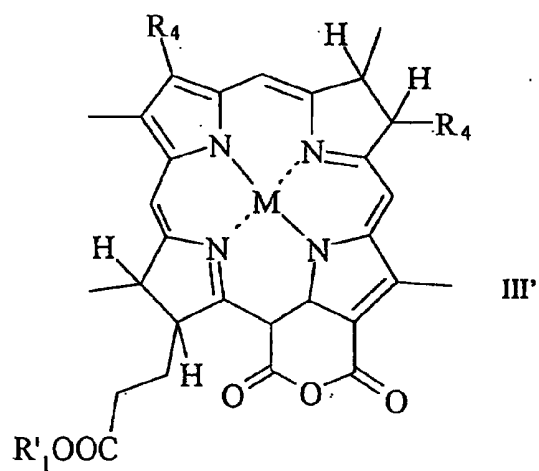
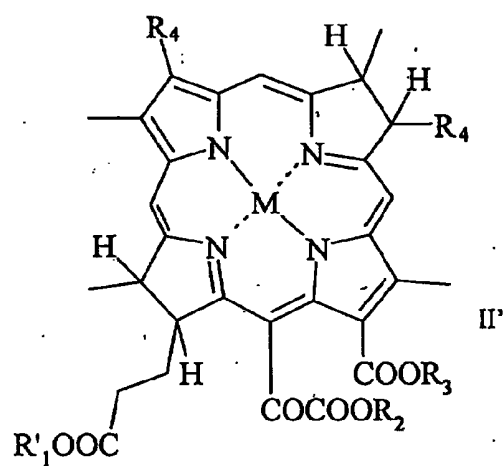
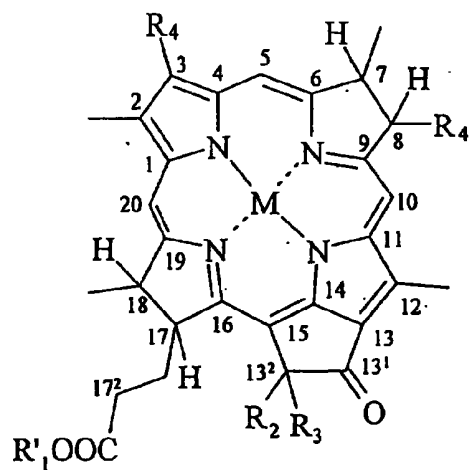
R_4 er hver uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av vinyl, etyl, acetyl, 1-hydroksyetyl og etere og estere av 1-hydroksyetyl; og

- 5 M representerer et metall med en ioneradius som er mindre enn den for Cd ($r \approx 95 \text{ pm}$), hvor nevnte metall M er valgt fra gruppen omfattende et divalent metall valgt fra gruppen bestående av Pd, Co, Ni og Mn, et trivalent metall valgt fra gruppen bestående av Fe, Mn og Cr, og et tetravalent metall
- 10 valgt fra gruppen bestående av Sn og Pt; unntatt forbindelsene av formel I hvor R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er etyl, R_1 er ftyl eller etyl og M er Pd;

hvilken fremgangsmåte omfatter:

- 15 (i) å omsette et bakteriofeofytinderivat tilsvarende nevnte BChl oppløst i dimetylformamid med dehydrert Cd-acetat i Ar-atmosfære og gjenvinning av [Cd]-BChl-komplekset fra reaksjonsblandingen ved kromatografi under reduserende betingelser.;
- 20 (ii) å omsette [Cd]-BChl-komplekset dannet i trinn (i) oppløst i tørr aceton med et passende dehydrert metall M-salt valgt fra metall M-klorid, acetat og acetylacetonat i Ar-atmosfære; og
- (iii) gjenvinne det ønskede metallerte [M]-BChl-derivat fra
- 25 reaksjonsblandingen.

- Fra de ovennevnte [M]-BChl-derivater med formel I, II og III kan ytterligere derivater bli dannet ved transesterifisering ved posisjon 17³ og således angår i et annet aspekt oppfinnelsen en fremgangsmåte hvor et [M]-BChl-derivat
- 30 av formel I, II eller III ytterligere omsettes med en forbindelse av formel $R'_1\text{-OH}$ under transesterifiseringsbetingelser ved posisjon 17³ for således å oppnå en forbindelse av følgende formel I'' II' eller III':



hvor R'_1 er valgt fra gruppen bestående av:

(i) et C_1 - C_{25} -hydrokarbylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH_2 eller et slikt

residu avbrutt av en eller flere heteroatomer valgt fra O, S og NH eller av en fenyling;

(ii) et residu av en aminosyre eller av et peptid inneholdende en hydroksygruppe eller et derivat derav valgt fra gruppen omfattende estere og N-beskyttede derivater hvor nevnte hydroksylerte aminosyre eller derivat derav er bundet til COO-residuet via hydroksygruppen;

(iii) et residu a et peptid som angitt i krav (ii) bundet til COO-residuet via en avstandsgivende gruppe som angitt i (i) hvor nevnte C₁-C₂₅-hydrokarbylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH₂ eller et slikt residu avbrutt av en eller flere heteroatomer valgt fra O, S og NH eller av en fenyling ytterligere er substituert med en endefunksjonell gruppe valgt fra OH, COOH eller NH₂; og

(iv) et residu av en celledespesifik ligand valgt fra et peptid og et protein direkte bundet til COO-residuet eller via en avstandsgivende gruppe som angitt i (i) hvor nevnte C₁-C₂₅-hydrokarbylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH₂ eller avbrutt av et eller flere heteroatomer valgt fra O, S og NH, eller av en fenyling videre er substituert med en endefunksjonell gruppe valgt fra OH, COOH eller NH₂;

R₂ er H, OH eller COOR₅, hvor R₅ er C₁-C₁₂-alkyl eller C₃-C₁₂-cykloalkyl;

R₃ er H, OH eller C₁-C₁₂-alkyl eller alkoksy;

R₄ er hver uavhengig av hverandre valgt fra gruppen omfattende vinyl, etyl, acetyl, 1-hydroksyetyl og etere og estere derav; og

M representerer et metall med en ioneradius som er mindre enn den for Cd ($r \approx 95 \text{ nm}$), hvor nevnte metall M er valgt fra gruppen omfattende et divalent metall valgt fra gruppen bestående av Pd, Co, Ni, Cu, Zn og Mn, et trivalent metall valgt fra gruppen bestående av Fe, Mn og Cr, unntatt forbindelsene av formel I' hvor R₂ er COOCH₃, R₃ er H, R₄

ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er etyl, R'_1 er fytyl eller etyl og M er Pd.

I en foretrukket utførelsesform er [M]-BChl-derivatet et [M]-BChl-derivat hvor R_1 er fytyl eller geranylgeranyl, R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl og metallet M er Pd, Cu, Ni, Co, Zn og Mn. I en annen foretrukket utførelsesform er metallsaltet M anvendt i trinn (ii) et metallklorid.

I en annen utførelsesform kan trinn (i) og (ii) bli kombinert til et enkelt trinn, det vil si bakteriofeofytinderivatet omsettes med et overskudd av det passende dehydrerte metall M-salt, eksempelvis metallklorid i nærvær av katalytiske mengder av det dehydrerte Cd-salt, for eksempel Cd-acetat i dimetylformamid eller aceton.

I et annet aspekt angår foreliggende oppfinnelse nye metallerte bakterioklorofyllderivater av formlene II', II' og III' som definert ovenfor, men som utelukker forbindelser av formel I hvor R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl, og R_1 er fytyl eller etyl og M er Pd eller R_1 er fytyl og M er Cu.

De nye metalobakterioklorofyllderivater ifølge oppfinnelsen av formel I', II' og III' som definert ovenfor er egnet for bruk som fotosensitivisatorer som terapeutiske og diagnostiske midler, og for avliving av celler, virus og bakterier i prøver og levende vev som er velkjent i faget for HPD og andre fotosensitivisatorer.

Kort beskrivelse av tegningene.

Fig. 1 viser fototoksisiteten av [Pd]-BChl-17³-serylmetyler ester [Pd]-BChl-Ser) og BChl-17³-serylmetyler ester (BChl-Ser) på bakteriesuspensjoner av *S.aureus*.

Fig. 2 viser fototoksisiteten av [Pd]-BChl-Ser på M2R-melanomceller i kultur ved [^3H]tymidininkorporering.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- I motsetning til porfyriner og klorofyller er den direkte metallering av bakterioklorofyller vanskelig. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse tillater fremstilling av metallerte bakterioklorofyllderivater med forbedrede egenskaper for bruk som fotosensitvisatorer ved transmetallering av de tilsvarende [Cd]-BChl-derivater.
- I henhold til foreliggende oppfinnelse kan [Cd]-BChl-komplekser som er lett tilgjengelige ved acetat/dimetylformamidmetoden bli transmetallert i utmerket utbytte til andre metallkomplekser under milde betingelser. Den lette transformasjonen ved å bruke [Cd]-BChl som prekursor er overraskende og trolig grunnet delvis den store ioneradius (r_M) av Cd^{2+} (95 pm) sammenlignet med Mg^{2+} ($r_M=72$ pm). En andre faktor er oppløsningsmidlet (aceton) i kombinasjon med metallenes motioner (klorider) benyttet for reaksjonen. I løpet av transmetallering blir CdCl_2 og [M]-BChl dannet i ekvilibrium med eduktene og den meget lave oppløselighet av CdCl_2 i aceton skifter likevekten til siden av produktene.

- I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er R_1 et hvert rett eller forgrenet mettet eller umettet, innbefattet aromatisk, hydrokarbylradikal, med 1 - 25 karbonatomer, så som alkyl, alkenyl, fenyl, fortrinnsvis et lavere alkyl på $C_1 - C_4$ -atomer, mest foretrukket etyl eller et radikal naturlig avledet fra naturlig BChlforbindelser, for eksempel geranylgeranyl (2,6-dimetyl-2,6oktadienyl) eller ftyl (2,6,10,14-tetrametylhexadek-14en-16-yl); og R'_1 er som definert for R_1 eller er en slik hydrokarbonkjede substituert med et halogenatom valgt fra F, Br, Cl og I, eller av OH, okso, CHO, COOH eller NH_2 , eller en slik eventuelt substituert hydrokarbylkjede avbrutt av O,S eller NH, fortrinnsvis O, eksempelvis er R'_1 et oligooksyetylenglykolre-

sidu på 4 - 10 karbonatomer, fortrinnsvis pentaoksyetylen-glykol. Når R'_1 virker som en avstandsgivende gruppe for et peptid eller protein som definert heri, vil den ha en endefunksjonell gruppe valgt fra OH, COOH og NH_2 gjennom
5 hvilken endefunksjonelle gruppe pepsidet eller proteinet er bundet via en ester- eller amidbinding.

I en annen utførelsesform er R'_1 residuet av en aminosyre eller av et peptid inneholdende en hydroksylgruppe så som serin, treonin og tyrosin, eller peptider inneholdende
10 disse, eller et derivat av nevnte aminosyre eller peptid valgt fra estere, for eksempel alkylestere, og N-beskyttede derivater hvor den N-beskyttende gruppe for eksempel er tert-butoksy, karbobenzoksy eller trityl, og nevnte hydroksylerte aminosyre eller peptid eller derivat derav er bun-
15 det til COO-gruppen via hydroksygruppen. Eksempler på slike aminosyrederivater er serinmetylester, N-tritylmetylester, tyrosinmetylester og N-tertbutoksytyrosinmetylester og et eksempel på et slikt peptid er N-karbobenzoksyseryl-serinmetylester hvor alle av dem er fremstilt som beskrevet
20 i EP 0584552. I en mest foretrukket utførelsesform er [M]-BChl-derivatet [Pd]-BChl esterifisert med L-serinmetylester.

I en annen utførelsesform er R'_1 residuet av en cellespesifikk ligand valgt fra peptider og proteiner som er eksemplifisert ved, men ikke begrenset til hormonpeptider, for eksempel melanocyt-stimulerende hormoner (melanotropiner),
25 og antistoff, for eksempel immunoglobuliner og svulstspesifike antistoff.

[M]-BChl-derivatene ifølge oppfinnelsen av formel I' hvor M
30 er Zn eller Cu kan også bli fremstilt ved direkte metallering av det demetallerte BChl-derivat som beskrevet nedenfor i eksempel 1 - 4.

Enkelte av metallkompleksene av bakterioklorofyller er meget stabile og kan således bli brukt for ytterligere modi-

fikasjoner i det omliggende av tetrapyrrolringsystemet som involverer sterke betingelser så som bruken av eddiksyre eller av en sterk mineralsyre som salt eller svovelsyre. Således kan estere, for eksempel eventuelt substituerte alkyl eller arylestere bli dannet ved omsetning av hydroksygrupper, for eksempel ved posisjon 3¹ eller 13² med de tilsvarende alifatiske eller aromatiske syrer, syreklorider eller aminosyrer, og etere ved samme posisjon blir dannet ved omsetning ved de tilsvarende alifatiske eller aromatiske alkoholer. Forbindelser med en hydroksygruppe ved posisjon 3¹, for eksempel 3-hydroksyetyl-BChl-derivater eller ved posisjon 13², for eksempel 13²-OH-BChl-derivater er tilgjengelige ved standardprosedyrer (se Struck et al., 1992, og Hinninen, 1991). I tillegg kan de naturlige forekommende fytyl og geranylgeranyl-estere ved posisjon 17³ bli transesterifisert ved sur katalyse til andre estere, for eksempel til etylester ved omsetning med den tilsvarende alkohol. Andre substituenten kan bli introdusert i den makrocykliske ring ved Wittig-reaksjonen av naturlige CO-grupper så som 3-acetyl i BChl a eller kjemisk innført i slike som ketoalkoholer esterifisert til C-17³ så vel som ved oksydativ kopling av OH-grupper for å danne eterbindinger ved C-13², eller ved syrekatalysert esterifisering av OH-grupper, for eksempel ved C-3¹, C-13¹, C-13² med karboksylsyrer.

I et alternativ blir modifikasjonene i det omliggende av tetrapyrrolringsystemet utført i det naturlige Mg-inneholdende BChl-derivat før demetallering.

BChl-derivatene av formel II og III heri kan bli dannet fra de tilsvarende naturlig forekommende BChl-derivater av formel I som tidligere beskrevet (Struck, 1990).

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen hvor R'₁ er et residu av en aminosyre, et peptid eller et protein, for eksempel et antistoff, blir fremstilt etter transmetalleringprosedyren ifølge foreliggende oppfinnelse ved enzymatisk transesteri-

5 fisering med enzymet klorofyllase eller ved katalytisk kondensasjon av det egnede bakterioklorofyllid (den fri syre BCh-17³-COOH) med den hydroksylerte aminosyre, peptid eller protein ved å bruke dicykloheksylkarbodiimid (DCC) og N-hydroksysuccinimid (NHS) eller 4-dimetylaminopyridin (DMAP) som beskrevet i EP 0584552, eller ved syrekatalyserte reaksjoner som ikke tolereres av Mg-komplekser lik nativt BChl.

10 De nye metalobakterioklorofyllderivater ifølge oppfinnelsen er for bruk som fotosensitivisatorer som terapeutiske og diagnostiske midler og for avlivning av celler, virus og bakterier i prøver og levende vev slik som er velkjent i faget for HPD og andre fotosensitivisatorer. Disse forbindelser er anvendelige for eksempel i å sensitivisere neoplastiske celler eller annet abnormalt vev til ødeleggelse 15 ved bestråling enten *in vivo* eller *ex vivo* ved å bruke lys av passende bølgelengde. Det er antatt at energien av fotoaktiveringen overføres til endogent oksygen for å omdanne dette til singletoksygen, hvilket singletoksygen er antatt å være ansvarlig for den cytotoksiske effekt. I tillegg 20 kan de fotoaktiverte former av bakterioklorofyllene fluoresisere, hvilken fluoresence kan hjelpe til med å lokalisere svulster eller andre områder til hvilke de metallerte bakterioklorofyller er tilført.

25 Eksempler på indikasjoner, kjent innen faget, som kan bli behandlet med de nye metalobakterioklorofyllderivater ifølge oppfinnelsen innbefatter destruksjon av kreftvev i faste svulster, oppløsning av plakker i blodkar (se for eksempel US patent nr. 4,512,762), behandling av topiske tilstander så som acne, fotsopp, vorter, papilloma og psoriasis, samt behandling av biologiske produkter (så som blod 30 for transfusjon) for infeksjonsdyktige organismer.

35 Metallobakterioklorofyllderivatene ifølge foreliggende oppfinnelse blir formulert til endelige farmasøytiske sammensetninger for tilførsel til pasienten eller tilført til et *in vitro*-mål ved å bruke teknikker som er velkjent i faget,

for eksempel som oppsummert i Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Penna, siste utgave. Sammensetningene kan bli tilført systemisk, spesielt ved injeksjon eller kan bli brukt topisk.

- 5 For diagnose kan metallobakterioklorofyllderivatene bli benyttet alene eller kan bli merket med et radioisotop eller annen påvisningsmarkør kjent innen faget.

Mengden av metallobakterioklorofyllderivat som skal tilføres vil være i henhold til erfaringen akkumulert med andre por-
10 fyrier brukt i for eksempel PDT, og vil variere avhengig av valget av derivatet som benyttes som aktiv bestanddel, tilstanden som skal behandles, innføringsmåten, alderen og tilstanden hos pasienten og vurderingen fra legen.

Bølgelengden av bestrålende lys blir fortrinnsvis valgt til
15 å tilsvare den maksimale absorpsjon av metallobakterioklorofyllfotosensitivisator. Den egnede bølgelengde for enhver av forbindelsene kan lett bli bestemt fra dets absorpsjonsspektrum.

I tillegg til *in vivo*-anvendelse kan metallobakterioklorofyllderivatene ifølge oppfinnelsen bli anvendt ved behandling av materialer *in vitro* for å drepe skadelig virus eller infeksjonsdyktige agenser så som skadelige bakterier. For eksempel kan blod og blodplasma som skal benyttes for fremtidig transfusjon bli behandlet med en forbindelse i-
25 følge oppfinnelsen og bestrålt for å fremskaffe sterilisering.

Oppfinnelsen angår således ytterligere farmasøytiske sammensetninger omfattende de metallerte metallobakterioklorofyllderivater av formel I', II' og III' heri for fotodynamisk terapi og diagnose av sykdommer og for fotodynamisk
30 avlivning av celler, bakterier og virus.

For disse formål vil sammensetningene bli fremstilt og tilført ved konvensjonelle metoder, for eksempel som beskrevet i US patent nr. 4,649,151, nr. 4. 753, 958, nr. 5. 256, 840 og nr. 5. 238, 940, europeisk patentsøknad nr. 0584552 og s PCT-søknad nr. WO 90/12573.

Oppfinnelsen vil nå bli illustrert av de følgende eksempler.

Eksempler

I eksemplene og tabell 1 vil utgangsforbindingene og de fremstilte metallkomplekser være identifisert av de følgende uthevede tall:

5	1a -BPhe	1b -BPhe-13 ² -OH
	2a -[Pd]-BChl	2b -[Pd]-BChl-13 ² -OH
	3a -[Co]-BChl	3b -[Co]-BChl-13 ² -OH
	4a -[Ni]-BChl	4b -[Ni]-BChl-13 ² -OH
	5a -[Cu]-BChl	5b -[Cu]- BChl-13 ² -OH
10	6a -[Zn]-BChl	6b -[Zn]- BChl-13 ² -OH
	7a -BChl	7b - BChl-13 ² -OH
	8a -[Cd]-BChl	8b -[Cd]- BChl-13 ² -OH
	9a -[Mn]-BChl	9b -[Mn]- BChl-13 ² -OH

Materialer og metoder

15 (i) *Isolering av BChl.* BChl (forbindelse **7a**) ble isolert fra fotosyntetiske bakterier lik *Rodobakter (Kb)sferoides* eller *Rodospirillum rubrum* i henhold til Scherz og Parson, 1984, Struck et al., 1992 eller Svec, 1991. Opprensning ble foretatt på DEAE-Sefarose i henhold til Omata og Mu-
20 rata, 1983.

(ii) *Fremstilling av 13²-hydroksybakterioklorofyll a [BChl-13²-OH].* BChl-13²-OH [forbindelse **7b**], en forbindelse av formel I hvor R₁ er ftyl, R₂ er COOCH₃, R₃ er OH, R₄ ved posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl, ble frem-
25 stilt ved hydroksylering av BChl [**7a**] ved posisjon C-13² ved lagring av **7a** i metanol i 5 - 7 dager i mørke ved 4°C (Struck og Scheer, 1990). Alternativt ble LiBr-prosedyren i henhold til Schaber et al., 1984 benyttet, noe som resul-
30 terte i mindre bi-produkter. Opprensning ble foretatt i hvert tilfelle på preparative (20x20 cm²) silikagelplater (Silikagel 60 H, Merck) eller kolonner med toluen/acetone (9:1,v:v) som elueringsmiddel. Det grønnblå bånd innehol-

dende tittelproduktet ($R_f \sim 0,4$) ble mekanisk fjernet og uom-
satt Bchl a ble ekstrahert fra SiO_2 med aceton.

(iii) *Demetallering av BChl og BChl-13²-OH*. Bphe [forbind-
else **1a**] og BChl-13²-OH [**7b**] og BChl-13²-OH [**7b**] ble hen-
5 holdsvis fremstilt ved demetallering av BChl [**7a**] og BChl-
13²-OH [**7b**] i henhold til Rocenbach-Belkin, 1988, med en li-
ten mengde eddiksyre (pigmentet er så vidt oppløst). Etter
demetallering, som inntreffer umiddelbart, ble eddiksyren
fjernet med en strøm av N_2 og Bphe-13²-OH ble gjenvunnet
10 som faste produkter.

(iv) *Klorofyllase (Chlase)*. Chlase acetonpulver ble frem-
stilt fra *Melia azedarach* L. Chinatreblader som beskrevet i
EP 0584552.

(v) *Cellekultur*. M2R-musemelanomceller ble dyrket som mo-
15 nolog i Dulbeccos modifisert Eagles medium/F12-inneholdende
25mM HEPES pH 7,4, 10% føtalt bovin serum, glutamin 2 mM,
penicillin 0,06 mg/ml og streptomycin 0,1 mg/ml ved 37°C i
en fuktig atmosfære på 8% CO_2 som tidligere beskrevet
(Gerst et al., 1986).

20 (vi) *Cellefotocytotoksitetsstudier*. M2R-musemelanomcellene
(1×10^5 celler/brønn) ble dyrket i 24 brønners mikroplater
og dyrket i 24 timer i omkring 2×10^5 celler/brønn, omtrent-
lig 70-80% konfluens. (M)-Bchl-derivatet oppløses i kul-
turmediet og dispergeres ved ultralydbehandling. Fotosan-3
25 (kommersielt tilgjengelig HPD) fortynnes til sin endelige
konsentrasjon i dyrkningsmediet. Mediet erstattes med se-
rumfritt medium og celler inkuberes i mørke med den ønskede
konsentrasjon av fotosensitivisatorer. Etter to timer in-
kubering blir cellene bestrålt ved romtemperatur i 5 minut-
30 ter fra bunnen av platen. Mediet erstattes med seruminne-
holdende medium og dyrkningsplatene plasseres tilbake i in-
kubatoren i 24 timer. Cytotoksisk effektivitet i cellekul-
turen blir bestemt ved (i) mikroskopisk undersøkelse av
cellemorfologi, (ii) fluorescencemikroskopi av celler etter

behandling med vitalfarging (propidium iodid [PID][2,7-diamin-9-fenyl-10-(diethylaminopropyl)-fenatridiniumiodidmetiodid]), som selektivt akkumulerer i kjerner av skadede celler og (iii) [^3H]tymidininkorporering som ytterligere

- 5 beskrevet nedenfor. Kontrollforsøk innbefatter (1) ubehandlede celler holdt i mørke, (2) ubehandlede celler bestrålt og (3) celler behandlet med medikamentet men beholdt i mørke.

- (vii) *Lyskilde.* Lyskilden for bestråling er en hjemmebygd
10 250 W halogenlampe fokusert gjennom et 10 cm vannfilter på en glasstøtte og utstyrt med et væskefilter (klorofyll a O.D. = 10,00 ved 660 nm). Lysdosen justeres til 45 m W/cm² i alle tilfeller.

- (viii) [^3H]tymidininkorporering. 24 timer etter PDT blir
15 cellekulturene pulsert med 1 µCi/ml [^3H]tymidin i 2 timer ved 37°C. Kulturene blir så vasket to ganger med fosfatbufferet fysiologisk saltvann og behandlet med 7,5% kald trikloreddiksyre i 30 minutter ved 4°C og vasket to ganger med etanol. Natriumhydroksyd (1 N, 300 µl/brønn) tilsettes
20 og platene holdes i 10 minutter ved 37°C. Prøver på 100 µl overføres til sintilasjonsbegeret, nøytraliseres med 100 µl 1 N HCl og radioaktiviteten telles med væskescintillasjonstelling i 4 mL(20:8[vol/vol])xylenscintillator lumaxblending i henhold til Chen et al., 1988.

- 25 **Eksempel 1: Fremstilling av [Zn]-BChl og [Zn]-BChl-13²-OH ved direkte metallering.**

- [Zn]-BChl [forbindelse **6a**] og [Zn]-BChl-13²-OH [forbindelse **6b**] fremstilles ved direkte metallering av Bphe [**1a**] og Bphe-13²-OH [**1b**] med acetat/eddiksyre eller acetat/dimetylformamidmetoden.
30

1a Acetat/dimetylformamid (DMF)metoden

[Zn]-BChl og [Zn]-BChl-13²-OH [**6a**, **6b**] ble fremstilt ved å koke under tilbakeløp henholdsvis Bphe og Bphe-13²-OH (**1a**, **1b**) (~70 µM) i DMF med et 1000 ganger overskudd av vannfri

Zn(Oac)₂ i 60 (75) minutter ved 110 °C (tilbakeløp ved 163°C minker reaksjonstiden til 5 minutter). Reaksjonen ble fulgt spektroskopisk og forløp til fullstendighet. Isolering og opprensning av produkter ble foretatt som for Cd-kompleksene **8a**, **8b** nedenfor (utbytte: ~80%).

1b: Acetat/eddiksyremetoden.

[Zn]-BChl og [Zn]-BChl-13²-OH (**6a**, **6b**) ble fremstilt ved å koke under tilbakeløp **1a**, **1b** eller **7a**, **7b**, (~70µM) i iseddiksyre med et 250 ganger overskudd av vannfri Zn(Oac)₂ og natriumaskorbat 50 mM i 120 (30) minutter ved 100°C. Eddiksyren ble så inndampet i en strøm av N₂ og Zn-komplekset ekstrahert med dietyleter og renset på en preparativ ModCol HPLC-kolonne (250 x 25,4 mm) pakket med Bakerbond Silica NP (partikkelstørrelse 10µm; porediameter 150). Forbindelse **6a** ble eluert isokratisk (10 ml/min) med 2-propanol(5%), metanol(5%) og n-heksan(90% v/v) med en retensjonstid på omkring 17 minutter, med ~75% utbytte av den rensede forbindelse. Forbindelse **6b** ble renset med kolonnekromatografi på silikagel ved å bruke samme oppløsningsmiddelblending som for HPLC, noe som ga et utbytte på 90 - 95%.

Eksempel 2: Fremstilling av [Zn]-BChl-3-vinyl og [Zn]-BChl-3-vinyl-13²-OH ved direkte metallering.

Metallering ved acetat/DMF-metoden som i eksempel 1a ovenfor kan bli utvidet til andre derivater av BPhe når reaksjonsbetingelsene er lett endret. For eksempel forløper metallering av 3-vinyl-Bphe eller 3-vinyl-13²-hydroksy-Bphe med Zn(Oac)₂ under identiske betingelser innen ~40 minutter ved 120°C.

Eksempel 3: Fremstilling av [Zn]-BChl-13²-dekarbometoksy ved direkte metallering.

Zn-kompleksene av 13²-dekarbometoksy-Bphe (eller 13²-dekarbometoksy-BChl) dannes under samme betingelser som beskrevet ovenfor i eksempel 1b. Reaksjonstiden er 30 minutter ved 100°C; isolering og opprensning er identisk til **6b**.

Eksempel 4: Fremstilling av [Cu]-BChl-13²-OH og [Cu]-BChl-13²-dekarbometoksy ved direkte metallering.

[Cu]-BChl (**5a**) ble fremstilt ved å koke under tilbaketilbake løp **1a** eller **7a** (~70 µM) i iseddiksyre med et 250 ganger overskudd av vannfri Cu₂O og natriumascorbat (50 mM) i 15 minutter ved 100°C. [Cu]-BChl-13²-OH (**5b**) ble dannet ved romtemperatur ved å blande **1b** eller **7b**, (~70 µM) i iseddiksyre med et 250 ganger overskudd av vannfri Cu₂O og natriumascorbat 50 mM. Cu-derivatene av 13²-dekarbometoksy-Bphe (eller 13²-dekarbometoksy-BChl) ble fremstilt ved identiske betingelser som beskrevet for **5b**. Til tross for anvendelse av Cu₂O, ble Cu-kompleksene dannet i alle tilfeller grunnet tilstedeværelsen av gjenværende oksygen eller disproporsjonering. Isolering og opprensning ble foretatt som i eksempel 1b ovenfor for Zn-kompleksene fremstilt ved iseddiksyremetoden, noe som ga henholdsvis ~75% (**5a**), ~90% (**5b**) og ~90% (Cu-derivat av 13²-dekarbometoksy-BChl).

Eksempel 5: Fremstilling av [Cd]-BChl ved direkte metallering av Bphe.

[Cd]-BChl ble fremstilt ved å koke under tilbaketilbake løp omkring 70 µM Bphe i dimetylformamid med et 300 ganger overskudd av vannfri Cd(OAc)₂ i 40 minutter ved 130°C. Reaksjonen ble fulgt spektroskopisk og forløp til fullstendighet. Grovproduktene isolert ved oppdeling mellom dietyleter (DE) og NaHCO₃-mettet vann kan bli rensert på silikagel under reduserende betingelser (1,5% natriumascorbat tilsatt) med toluen/acetone/trietylamin (88/10/2 v/v/v) som elueringsmiddel. Reaksjonen og opparbeidelsen blir utført under nøye Ar-beskyttelse. Det blå bånd av ren [Cd]-BChl (R_f~0,7) blir mekanisk fjernet og ekstrahert med dietyleter/vann som beskrevet ovenfor for grovproduktet. Råproduktet ble brukt i alle transmetalleringprosedyrer beskrevet nedenfor. Dets spektralegenskaper (forbindelse **8a**) er angitt i tabell 1.

Eksempel 6: Fremstilling av [M]-BChl og [M]-BChl-13²-OH-komplekser av Pd, Co, Ni, Cu, Zn, Cd og Mn ved transmetal-

lering av [Cd]-BChl og [Cd]-BChl-13²-OH.

For fremstillingen av [Pd]-BChl-derivatet (**2a**) ble [Cd]-BChl (**8a**) fra eksempel 5 oppløst i tørr aceton ($A_{770} = 5 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 50 \text{ }\mu\text{M}$) under streng Ar beskyttelse for å forhindre ukontrollert oksidasjon ved posisjonene C-7 og C-8. Etter omkring 15 minutter ble PdCl_2 (Merck, p.a.) tilsatt ($\sim 30 \text{ mg/100 ml}$ oppløsning) og reaksjonsblandingen ble kokt under tilbakeløp i 40 minutter. Reaksjonen kan bli fulgt spektroskopisk (Qx-båndskift fra $\sim 590 \text{ nm}$ til $\sim 530 \text{ nm}$ ved produktdannelse). Det i hovedsak rene produkt ble isolert ved ekstrahering med dietyleter/vann som beskrevet i eksempel 5 for [Cd]-BChl. Om nødvendig blir ytterligere opprensning utført på silikagelplater som beskrevet for [Cd]-BChl. Spektralegenskapene av Pd-BChl (**2a**) er oppsummert i tabell 1.

På en lignende måte ble [Pd]-BChl-13²-OH (**2b**) fremstilt ved transmetallering av [Cd]-BChl-13²-OH og metallkompleksene av Co, Ni, Cu, Zn, og Mn av Bchl (forbindelser **3a**, **4a**, **5a**, **6a**, **9a**) og BChl-13²-OH (forbindelser **3b**, **4b**, **5b**, **6b**, **9b**) ble fremstilt ved omsetning av henholdsvis [Cd]-BChl og BChl-13²-OH med de tilsvarende metallklorider. De vannfrie metallklorider ble tilsatt ved et 10 ganger molart overskudd (Cu: **5a**, **5b**; Zn: **6a**, **6b**), 100 ganger molart overskudd (Co: **3a**, **3b**) eller til metning som Pd (Ni: **3a**, **3b**; Mn: **9a**, **9b**). Reaksjonene inntraff praktisk talt umiddelbart ved 25°C, bortsett fra for Pd og Ni (omkring 30 - 40 minutter koking ved tilbakeløp) og ble fulgt spektroskopisk. Små mengder av C7 - C8 oksyderte produkter ($\lambda_{\text{max}} \sim 680 \text{ nm}$) ble dannet grunnet nærvær av gjenværende oksygen og kan bli undertrykt ved tilsetning av natriumascorbat (mettet). Isolering og opprensning av produkter ble gjort som for [Cd]-BChl i eksempel 5 ovenfor. Produktene ble karakterisert ved absorpsjon, fluoressens, ¹H-NMR og FAB-MS som vist i tabell 1. UV/VIS absorpsjonsspektra ble nedtegnet på et Perkin Elmer Lamda 2 spektrofotometer, fluoressensemisjonsintensiteter på en Spex Fluorolog 221 utstyrt med en 450 W Xwnon-lampe og normalisert til sensitiviteten av fotomulti-

plikatorrøret og eksitasjonsenergien. Maksimale optiske tettheter for fluoressensmålinger var $<0,1 \text{ cm}^{-1}$ og eksitasjonen var i Q_x -absorpsjonsbåndet for **1a**, **1b** til **9a**, **9b**. Sirkulære dikroismespektra (CD) ble nedtegnet på en Dichro-
s graf CD6 (Jobin Yvon). FAB-MS ble nedtegnet på et CH7a/SS massespektrometer (Varian MAT) eller et Finigan MAT 9000 med en Cs-pistol væskeoverflateionisering foretatt i en matrise på m-hydroksybenzylalkohol. ^1H -NMR-spektra ble
10 nedtegnet på en 360 MHz-Bruker modell AM360. Standard oppløsningsmiddel var pyridin- d_5 , kjemiske skift er i ppm mot tetrametylsilan som intern standard. Ektinsjonskoeffisienter ble bestemt ved ICP/ICPMS atomabsorpsjonsspektra (AAS) av sentralmetallene; før forbrenning, oppløsningsmidlet i prøver av **1a**, **1b** til **9a**, **9b** med mengdebestemte optiske
15 tettheter ble først inndampet i kvartsglassrør og prøvene så behandlet med konsentrert salpetersyre for å tillate fullstendig frigjøring av metallet.

Tabell 1: Spektralegenskaper av **1a**, **1b-9a**, **9b**^a

Forbindelse Ion	Absorpsjon ^b $\lambda_{\max}[\text{nm}](\epsilon[10^{-3}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}])$				Emisjon ^c $\lambda_{\max}[\text{nm}]$	χ_M/r_i ^d	Molekylær FAB-MS
	B _Y	B _X	Q _X	Q _Y			
1a (+) ^e	356 (113)	383 (62.7)	525 (28.3)	750 (67.5)	759		
	362 (92.3)	389 (49.3)	532 (26.2)	754 (56.4)			
2a (+)	331 (18.1)	383 (15.4)	529 (6.0)	753 (38.1)	764 (755)	[3.44]	992 (¹⁰⁶ Pd)
	334 (14.0)	388 (11.5)	535 (5.6)	763 (25.5)			
3a (-)	336 (34.8)	388 (27.1)	531 (8.9)	766 (63.7)	- ^f	[3.21] ^g	945 (⁵⁹ Co)
	355 (40.6)	386 (27.5)	562 (10.2)	767 (56.3)			
4a (-) ^h	335 (45.7)	390 (30.4)	531 (11.4)	779 (63.0)	- ^f	[3.18]	944 (⁵⁸ Ni)
	366 (49.2)	391 (30.3)	598 (16.1)	771 (71.8)			
5a (-)	342 (53.3)	390 (42.9)	538 (14.5)	771 (64.1)	- ^f	[3.06]	949 (⁶³ Cu)
	358 (44.7)	395 (31.9)	573 (12.2)	780 (56.1)			
6a (+)	353 (58.9)	389 (39.7)	558 (18.0)	762 (67.7)	782 (772)	[2.48]	950 (⁶⁴ Zn)
	364 (52.4)	390 (31.7)	579 (16.5)	773 (57.1)			
7a (+)	357 (73.3)	390 (48.0)	573 (20.8)	771 (91.0)	788 (778)	1.82	910 (²⁴ Mg)
	374 (57.7)	ikke oppløst	612 (16.9)	781 (76.0)			
8a (+)	359 (80.3)	389 (53.5)	575 (22.3)	761 (88.3)	778 (774)	1.78	1000 (¹¹⁴ Cd)
	386 (65.6)	391 (44.1)	593 (19.4)	773 (69.6)			
9a (-)	362 (71.8)	392 (43.0)	587 (18.0)	770 (76.7)	- ^f	1.89	941 (⁵⁵ Mn)
	373 (64.4)	ikke oppløst	601 (16.4)	780 (66.0)			

^a Absorpsjon- og fluoressensspektraene av 13²-OH-pigmentene (**1b** - **9b**) tilsvarte den for de respektive 13²-H-utgangsforbindelser bortsett fra for et systematisk blåskift av Q_x-absorpsjonen (530 - 600 nm området) med ~ 5 nm. Massespektraene var alltid skiftet med 16 masseenheter til

høyere verdier. Alle bølgelengder er i [nm]. ^b Absorb-
sjons og ekstinksjonskoeffisienter (ved AAS) ved 298 K i DE
(øvre linje) og pyridinen (nedre linje, *italics*) ^c Fluor-
essens i DE/petroleum eter/isopropanol (5:5.2; v/v/v) ved
5 298 K (77K). ^d Elektronegativitet (χ_M) og effektive ione-
radier (r_M i $10^{-14}m$) for seks ganger koordinasjonen (data i
hakeparenteser anvender radier for fire ganger koordinasjo-
nen) fra Buchler, 1975. ^e ¹H-NMR i pyridin-d₅; (+): skarpe
signaler, (-): utstrakt linjeutvidelse grunnet paramagnetisk
10 sentralt metall. ^f Ikke fluoressens (Spex fluorolog 221).
^h Skarpe ¹H-NMR signaler i C²H₃CN.

**Eksempel 7: Transesterifisering av [Pd]-BChl og perifert-
modifiserte BChl til 17³-etylesteren.**

For fremstillingen av Pd-bakteriofeoforbid a etylester
15 [Pd]-BChl oppløst i kloroform (1 mg/ml) og et identisk vo-
lum av etanol inneholdende 5% H₂SO₄ v/v ble tilsatt. Blan-
dingen ble kokt under tilbakeløp i en Ar-atmosfære i 90 mi-
nutter. Derpå ble [Pd]-Bphe (100 mg) transesterifisert i
50 ml svovelsyre i etanol/kloroform (1:1/v:v) ved koking
20 under tilbakeløp under Ar i 2,5 timer. Derpå ble reaksjo-
nosblandingen fortynnet med eter, vasket flere ganger med
10% vandig natriumbikarbonatoppløsning. Senere ble den or-
ganiske fase tørket og inndampet. Ved preparativ TLC under
nitrogen på silikagel under eluering med 8% aceton i toluen
25 er det senere bevegelige av de to bånd som ble dannet til
forbindelsen ($R_f=0,75$). VIS i eter: $\chi_{max}[nm]$ (relativ in-
tensitet) 329 (0,45); 385 (0,39); 527 (0,13); 755 (0,1); ¹H-
NMR [ppm]: 9,25, 8,80, 8,70 (hver s, 1, 5-, 10-, 20-H);
4,55(q, 1H, 18-H); 4,45(d, 1H, 17-H); 4,10(q, 2H, 81-
30 CH₂CH₃); 3,85 (s, 3H, 13²-CO₂CH₃); 3,7 (d, 1H, 7-H); 3,6 (q,
3H, 17³-CH₂CH₃); 3,50, 3,32 (hver s, 3H, 2-, 12-CH₃); 3,30
(m, 1H, 8-H); 3,06 (s, 3H, 3-COCH₃); 3,04 (d, 3H, 7-CH₃);
2,65 (2H, 17¹-H₂); 2,45 (2H, 17²-H₂); 1,75 (d, 3H, 18-CH₃);
1,65 (t, 3H, 8 CH₂CH₃); 1,38 (t, 3H, 17³-CH₂CH₃); 0,10 og -
35 1,90 (s, 2H, 2NH). FAB-MS kalkulert for PD-C₃₇H₄₀N₄O₆:
742,38 (M+1). Funnet 742,2 (M+1).

Etyl og andre estere av andre syrestabile metallkomplekser lik Ni, Cu, Zn av BChl-derivater kan bli fremstilt på en lignende måte.

Eksempel 8: Fremstilling av [Pd]-BChl-17³-serylmetylester

5 **[Pd]-BChl-17³-L-Ser-Ome ([Pd]-BChl-Ser)**

Enzymatisk transesterifisering av [Pd]-BChl fremstilt i eksempel 6 ovenfor med L-serinmetylester-hydroklorid (Sigma) ble utført med klorofyllase acetonpulver som beskrevet i EP 0584552, noe som danner tittelforbindelsen, heri betegnet
10 [Pd]-BChl-Ser, en forbindelse av formel I' heri hvor R'₁ er serylmetylesterresiduet bundet til COO-gruppen via serin-hydroksygruppen.

Med samme enzymatiske transesterifiseringsprosedyre kan tilsvarende 17³-serylmetylestere av andre metallkomplekser
15 [M]-Bchl i henhold til oppfinnelsen bli fremstilt så vel som [M]-Bchl-17²-estere med andre serinderivater, eksempelvis N-trityl-L-serinmetylester og N-karbobenzoksyserylserinmetylester, eller med tyrosinderivater, for eksempel N-tert-butoksykarbonyltyrosin-metylester som beskrevet i EP
20 0584552.

Eksempel 9: Fototoksisitet *in vitro* av [Pd]-BChl-Ser.

9a. Bakterier og virus.

Fototoksisitetsassayet består av tre adskilte trinn: innkubering av en bakteriell oppløsning med sensitivisatoren,
25 bestråling og vurdering av fototoksisitet.

Suspensjoner (~1x10⁷ bakterier/200 µl) av fersk *S. aureus* i fosfatbufferet fysiologisk saltvann (PBS) ble inkubert med gitte konsentrasjoner av sensitivisatorene [Pd]-BChl-Ser eller BChl-Ser i en time i mørke og derpå vasket fri for
30 pigmentet ved sentrifugering og resuspensjon i PBS. De vaskede bakteriesuspensjoner ble bestrålt i 5 minutter ved

å bruke en lyskilde av en selvbygget Xenon-lampe med vertikal emisjon på 1000 lux/m² ved målnivået ved å bruke et væskefilter (klorofyll a O.D.=10,00 ved 660nm). Den fotodynamiske skade ble vurdert ved bestemmelse av bakteriell overlevelse: prøver på den bakterielle suspensjon (30µl) ble dyrket i 3 ml hjernehjerteinfusjon (BHI) flytende bakterielt dyrkningsmedium i 2 timer ved 37°C under risting. Bakterietetthet ble målt som turbiditet ved $\lambda=660\text{nm}$.

Hvert forsøk besto av (a) en eksperimentell (bakterier utsatt for den fullstendige behandling) og tre kontrollgrupper: (b) bakterier bestrålt uten sensitivisator, (c) ubestrålte bakterier behandlet med sensitivisator, og (d) ubehandlede bakterier (100% overlevelse).

Som vist i fig. 1 er de fototoksiske effekter av [Pd]-BChl-Ser doseavhengige med hensyn til sensitivisatorkonsentrasjoner ($\text{LD}_{50} \sim 0,6 \mu\text{M}$) og ingen toksisitet ble overført i mørke. Lignende resultater ble funnet med BChl-Ser undersøkt som sammenligning under de samme betingelser med en noe, men insignifikant lavere LD_{50} .

Assayet ble gjentatt med *B. subtilis* og *Propionibacterium acnes* og med *Herpes simplex virus 1* (HSV-1) både i suspensjon og i infiserte celler og lignende resultater av fototoksitet ble funnet (ikke vist).

9b. Melanomceller

Assayet ble utført som beskrevet i Materialer og Metoder ovenfor, del (iv) til (viii). Monolag av M2R-celler ble inkubert med de angitte konsentrasjoner av [Pd]-BChl-Ser i en time og utsatt for fotodynamisk behandling som beskrevet ovenfor. Fotocytotoksitet ble bekreftet ved [³H]-tymidininkorporering og prosent overlevelse av de behandlede celler og passende kontroller er beskrevet i fig. 2. Overlevelse av ubehandlede celler ble tatt som 100%.

Det kan bli observert i fig. 2 at den fototoksiske effekt var doseavhengig med hensyn til [Pd]-BChl-Ser-konsentrasjonen med en omtrentlig LD₅₀ på 0,05 µM. Den fototoksiske effekt ble ikke observert i mørkekontrollene.

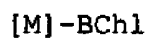
REFERANSELISTE

1. Buchler, J.W., 1975 "Static coordination chemistry of metalloporphyrins", i *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Smith, K.M., ed., s. 157-232, Elsevier, New York.
- 5 2. Chen, L-Y-, Mory, A. Zilberstein og M.Revel, 1988, Proc.Natl.Aca.Sci. USA, vol. 85, s. 8037- 41.
3. DeJordy, J.O., P. Bendel, A. Horowitz, Y. Salomon og H. Degani, 1992, J. Magn. reson. Imag., vol. 2, s. 695-700.
4. Gerst, J.E., J. Sole, J.P. Mather og Y. Salomon, 1986, 10 Mol.Cell.Endocrinol, vol. 46, s. 137-47.
5. Hynninen P.H. i Scheer, 1991, s. 145-209.
6. Losev et al., 1990, Opt.Spektrosk., vol. 69, s. 97-101.
7. Matthews, J.L. et al, 1988, Transfusion, s. 81-83.
- 15 8. Omata, T. og N. Murata, 1983, "Preparation of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-Sephadex C1-6B and Sephadex C1-6B", Plant Cell Physiol., vol. 24, s. 1093-1100.
9. Rosenbach-Belkin, V., 1988, "The primary reactants in 20 bacterial photosynthesis medelling by *in vitro* preparation", Ph.D. Thesis, Weizmann Institute of Science, Israel.
10. Schaber, P.M., J.E. Hunt, R. Fries og J.J. Katz, 1984, J. Chromatogr. 316, 25-41.
- 25 11. Scheer, H, ed., 1991, *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
12. Scherz, A. og W.W. Parson, 1984, Biochim. Biophys. Acta, vol. 766, s. 653-55.
13. Strell, M. og Urumow, T., 1977, Liebigs Ann, Chem, s. 30 970-974.
14. Struck, A., 1990, "Chemisch modifizierte Bakteriochlorophylle und -phaeophytine in den bindungsstellen B_{A,B} und H_{A,B} von photosynthetischen Reaktionszentren aus Rhodobacter sphaeroides R26: Pigmentsynthese, Pigmentaustausch 35 und spektroskopie", Ph. D. thesis, University of Munich, Germany.
- Struck, A, et al., 1992, Bacteriochlorophylls modified at

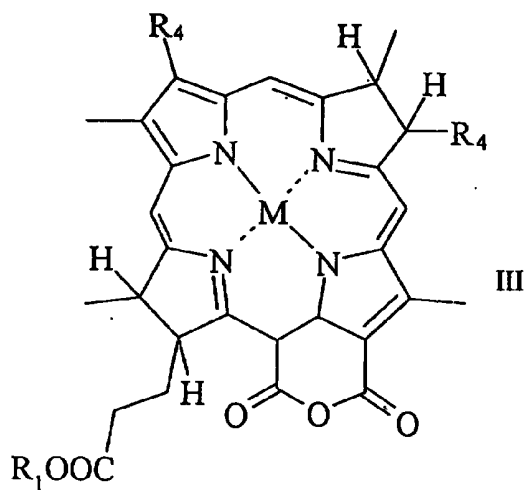
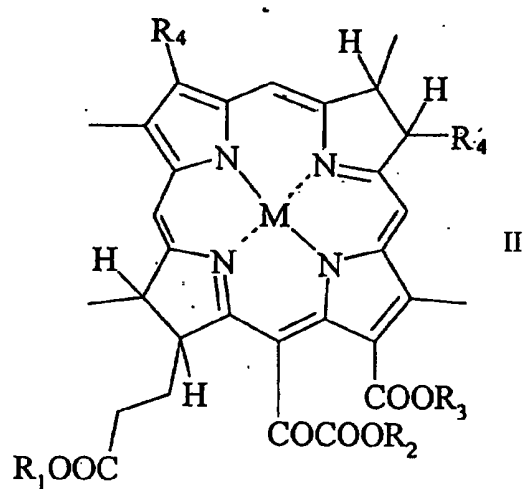
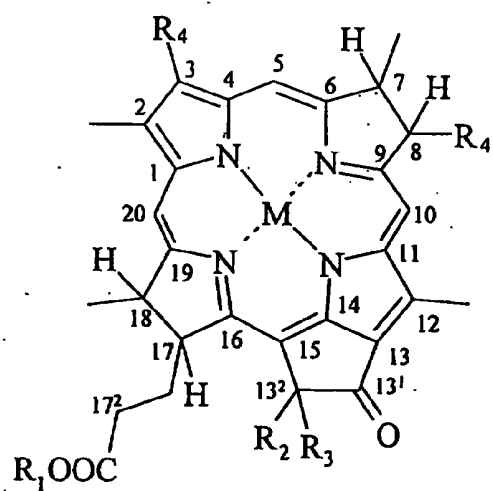
- position C-3: Long-range intramolecular interaction with position C-13,2, *Biochim. Biophys. Acta*, 1101:321-328.
16. Struck, A. og Scheer, H., 1990, "Modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26, 1. Exchange of
5 monomeric bacteriochlorophyll with ^{13}C -hydroxy-bacteriochlorophyll", *FEBS Lett.* 261, s. 385-388.
17. Svec., W.A., 1991, "The distribution and extraction of the Chlorophylls", in: Scheer, 1991, s. 89-102.
18. Wasielewsky, M.R., 1977, "A mild method for the intro-
10 duction of Magnesium into bacteriopheophytin-a2, *Tetrahedron Letters*, s. 1373-76.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av syntetiske metallerte [M]-bakterioklorofyllderivativer med formel



s hvor [M]-BChl-derivatet er valgt fra en forbindelse av formel I, II eller III:



hvor R_1 er et C_1 - C_{25} -hydrokarbylresidu;

R_2 er H, OH eller $COOR_5$ når forbindelsen er av formel I', eller R_2 er H eller R_5 når forbindelsen er av formel

5 II', hvor R_5 er C_1 - C_{12} -alkyl eller C_3 - C_{12} -cykloalkyl;

R_3 er H, OH eller C_1 - C_{12} -alkyl eller alkoksy når

forbindelsen er av formel I', eller R_3 er H eller C_1-C_{12} -alkyl eller alkoksy når forbindelsen er av formel II';

R_4 er hver uavhengig av hverandre valgt fra gruppen bestående av vinyl, etyl, acetyl, 1-hydroksyetyl og etere
5 og estere av 1-hydroksyetyl; og

M representerer et metall med en ioneradius som er mindre enn den for Cd ($r \approx 95 \text{ pm}$), hvor nevnte metall M er valgt fra gruppen omfattende et divalent metall valgt fra gruppen bestående av Pd, Co, Ni og Mn, et trivalent metall
10 valgt fra gruppen bestående av Fe, Mn og Cr, og et tetravalent metall valgt fra gruppen bestående av Sn og Pt;

unntatt forbindelsene av formel I hvor R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er etyl, R_1 er ftyl eller etyl og M er Pd;

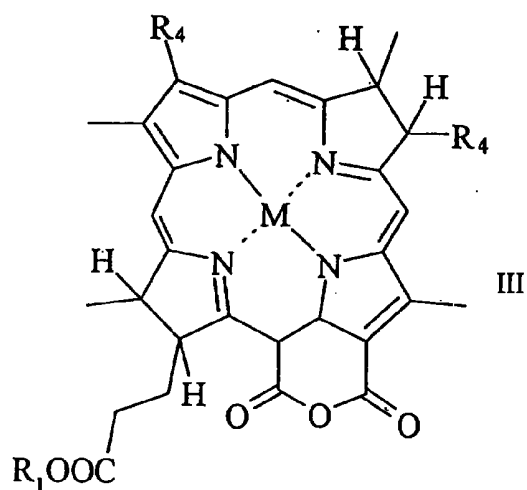
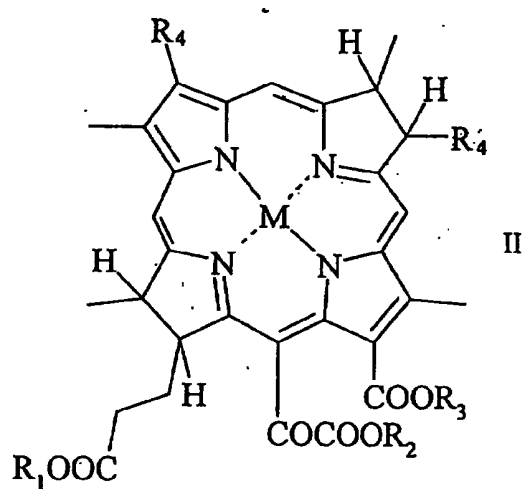
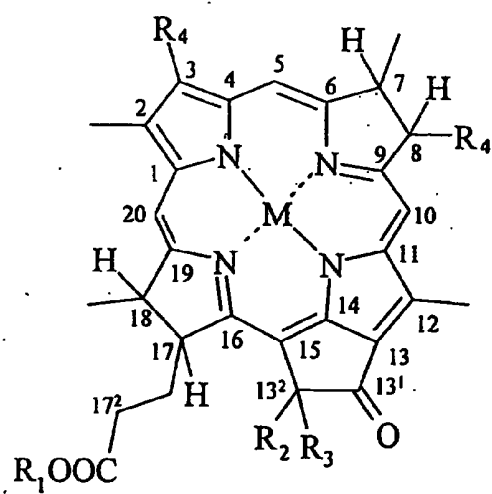
15 hvilken fremgangsmåte omfatter:

(i) å omsette et bakteriofeofytinderivat tilsvarende nevnte BChl oppløst i dimetylformamid med dehydrert Cd-acetat i Ar-atmosfære og gjenvinning av [Cd]-BChl-komplekset fra reaksjonsblandingen ved kromatografi under reduserende
20 betingelser.;

(ii) å omsette [Cd]-BChl-komplekset dannet i trinn (i) oppløst i tørr aceton med et passende dehydrert metall M-salt valgt fra metall M-klorid, acetat og acetylacetonat i Ar-atmosfære; og

25 (iii) gjenvinne det ønskede metallerte [M]-BChl-derivat fra reaksjonsblandingen.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 hvor nevnte [M]-BChl-derivat av formel I, II eller III ytterligere omsettes med en forbindelse av formel $R'_1\text{-OH}$ under transesterifiseringsbetingelser ved posisjon 17³ for således å oppnå en forbindelse av følgende formel I', II' eller III':
30



hvor R'_1 er valgt fra gruppen bestående av:

- (i) et C_1 - C_{25} -hydrokarylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH_2 eller et slikt residu avbrutt av en eller flere heteroatomer valgt fra O, s og NH eller av en fenylring;

(ii) et residu av en aminosyre eller av et peptid inneholdende en hydroksygruppe eller et derivat derav valgt fra gruppen bestående av alkylestere og N-beskyttede derivater, hvor nevnte N-beskyttende gruppe er tert-butoksy, karbobenzoksy eller trityl og hvor nevnte hydroksylerte aminosyre eller derivat derav er bundet til COO-residuet via hydroksygruppen;

(iii) et residu a et peptid som angitt i (ii) bundet til COO-residuet via et C₁-C₂₅-hydrokarbylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH₂ eller med en fenylring som er ytterligere substituert med en funksjonell endegruppe valgt fra OH, COOH eller NH₂, og

(iv) et residu av en celledoesesifikk ligand valgt fra et peptid og et protein direkte bundet til COO-residuet eller via et C₁-C₂₅ hydrokarbylresidu eventuelt substituert med halogen, OH, okso, CHO, COOH eller NH₂, eller avbrutt av et eller flere heteroatomer valgt fra O, S og NH, eller av en fenylring videre er substituert med en endefunksjonell gruppe valgt fra OH, COOH eller NH₂;

R₂ er H, OH eller COOR₅, hvor R₅ er C₁-C₁₂-alkyl eller C₃-C₁₂-cykloalkyl;

R₃ er H, OH eller C₁-C₁₂-alkyl eller alkoksy;

R₄ er hver uavhengig av hverandre valgt fra gruppen omfattende vinyl, etyl, acetyl, 1-hydroksyetyl og etere og estere av 1-hydroksyetyl; og

M representerer et metall med en ioneradius som er mindre enn den for Cd (r₉₅nm), hvor nevnte metall M er valgt fra gruppen omfattende et divalent metall valgt fra gruppen bestående av Pd, Co, Ni og Mn, et trivalent metall valgt fra gruppen bestående av Fe, Mn og Cr, og et tetravalent metall valgt fra gruppen bestående av Sn og Pt, unntatt forbindelsene av formel I' hvor R₂ er COOCH₃, R₃ er H, R₄ ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er etyl, R'₁ er ftyl eller etyl og M er Pd.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2 hvor nevnte metall M er Pd, Ni, Co eller Mn, og BChl er et residu av bakterio-
klorofyll-a-derivat av formel I i krav 2 hvor R_1 er fytyl
eller geranylgeranyl, R_2 er COOCH_3 , R_3 er H eller OH, R_4 ved
5 posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl, bortsett
fra forbindelsen hvor M er Pd, R'_1 er fytyl, R_2 er COOCH_3 ,
 R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og ved posisjon 8 er
etyl.
4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 3 hvor
10 metall-M-saltet anvendt i trinn (ii) er et metallklorid.
5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 4 hvor
trinn (i) og (ii) er slått sammen til et enkelt trinn og
bakteriofeofytinderivatet omsettes med et overskudd av det
passende dehydrerte metall-M-salt i nærvær av katalytiske
15 mengder av det dehydrerte Cd-acetat i dimetylformamid eller
acetone.
6. Metallert bakterioklorofyllderivat av formel I', II'
eller III' som definert i krav 2, men bortsett fra forbin-
delsene av formel I' hvor R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved po-
20 sisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl, R'_1 er fytyl
eller etyl og M er Pd.
7. Metallert bakterioklorofyllderivat ifølge krav 6 av
formel I' hvor R'_1 er fytyl eller geranylgeranyl, R_2 er
 COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og er ved posi-
25 sjon 8 etyl og M er Co, Ni eller Mn.
8. Metallert bakterioklorofyllderivat ifølge krav 6 av
formel I' hvor R'_1 er fytyl eller geranylgeranyl, R_2 er
 COOCH_3 , R_3 er OH, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og er ved
posisjon 8 etyl og M er Pd, Co, Ni eller Mn.
- 30 9. Metallert bakterioklorofyllderivat ifølge krav 6 av
formel I' hvor R'_1 er etyl, R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved
posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl, og M er Ni.

10. Metallert bakterioklorofyllderivat ifølge krav 6 av formel I' hvor R'_1 er serylmetyler, R_2 er COOCH_3 , R_3 er H, R_4 ved posisjon 3 er acetyl og er ved posisjon 8 etyl og M er Pd.
- 5 11. Farmasøytisk sammensetning omfattende et metallert bakterioklorofyll av formel I', II' eller III' som angitt i krav 6 samt et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.
12. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11 hvor det metallerte bakterioklorofyll er forbindelsen krevd i krav 10.
- 10 13. Anvendelse av et metallert bakterioklorofyll av formel I', II' eller III' som definert i krav 6 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for bruk i fotodynamisk terapi.
14. Anvendelse av et metallert bakterioklorofyll av formel
15 I', II' eller III' som definert i krav 6 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for diagnose av svulster.
15. Anvendelse av et metallert bakterioklorofyll av formel I', II' eller III' som definert i krav 6 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for avlivning av celler
20 eller infeksjonsdyktige agenter omfattende bakterier og virus.
16. Anvendelse ifølge krav 15 hvor den farmasøytiske sammensetning er for avlivning av infeksjonsdyktige agenser i biologiske produkter.

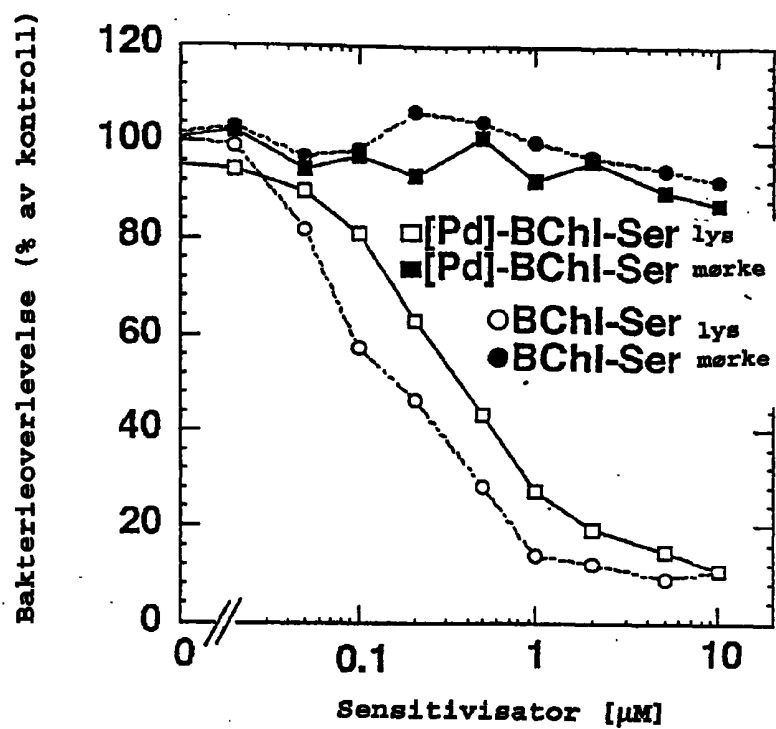


Fig. 1

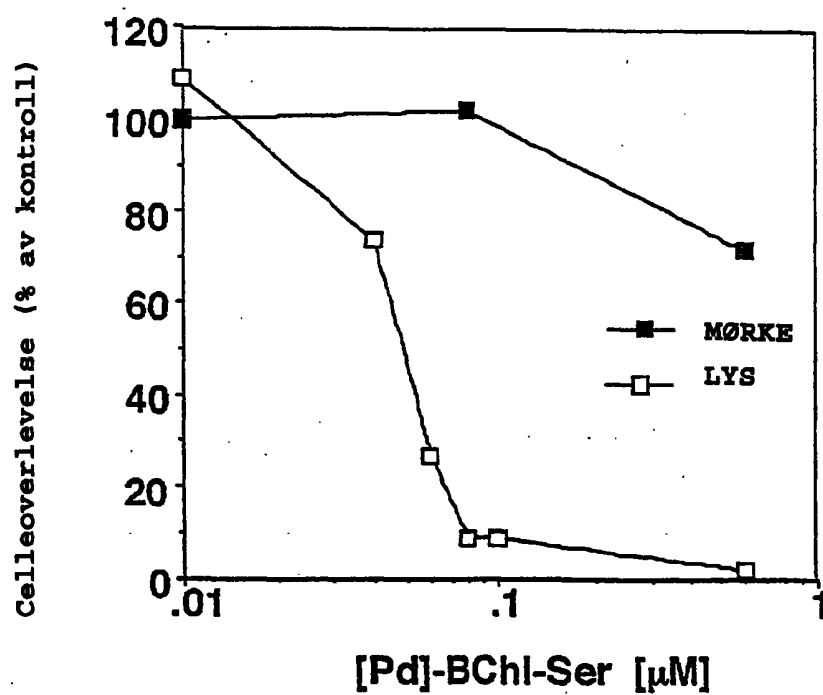


Fig. 2