



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/495 (2022.02); A61K 41/0057 (2022.02); A61P 35/00 (2022.02); C07D 257/08 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021116143, 04.06.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
04.06.2021

Дата регистрации:  
28.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.06.2021

(45) Опубликовано: 28.04.2022 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 30, ФГАОУ ВО  
Национальный исследовательский Томский  
политехнический университет

(72) Автор(ы):

Петунин Павел Васильевич (RU),  
Плотников Евгений Владимирович (RU),  
Воткина Дарья Евгеньевна (RU),  
Постников Павел Сергеевич (RU),  
Трусова Марина Евгеньевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

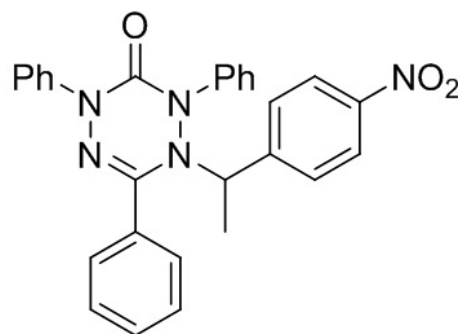
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Национальный  
исследовательский Томский  
политехнический университет» (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2411943 C2, 20.02.2011. RU  
2071320 C1, 10.01.1997. RU 2646477 C1,  
05.03.2018. EP 1472259 B1, 02.09.2009. WO  
2001066550 A2, 13.09.2001.

## (54) СЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО РАЗРУШЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической химии и онкологии, а именно к соединению для фотодинамического разрушения злокачественных опухолевых клеток. Предложен сенсibilизатор для фотодинамического разрушения опухолевых клеток, который представляет собой 1-(1-(4-нитрофенил)этил)-2,4,6-трифенил-1,4-дигидро-1,2,4,5-тетразин-3(2H)-он со структурной формулой:



Технический результат заключается в расширении арсенала средств для фотодинамического разрушения злокачественных опухолевых клеток. 1 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 257/08 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/495 (2022.02); A61K 41/0057 (2022.02); A61P 35/00 (2022.02); C07D 257/08 (2022.02)

(21)(22) Application: 2021116143, 04.06.2021

(24) Effective date for property rights:  
04.06.2021Registration date:  
28.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: 04.06.2021

(45) Date of publication: 28.04.2022 Bull. № 13

Mail address:

634050, g. Tomsk, pr. Lenina, 30, FGAOU VO  
Natsionalnyj issledovatel'skij Tomskij  
politekhnikeskij universitet

(72) Inventor(s):

Petunin Pavel Vasilevich (RU),  
Plotnikov Evgenii Vladimirovich (RU),  
Votkina Daria Evgenievna (RU),  
Postnikov Pavel Sergeevich (RU),  
Trusova Marina Evgenievna (RU)

(73) Proprietor(s):

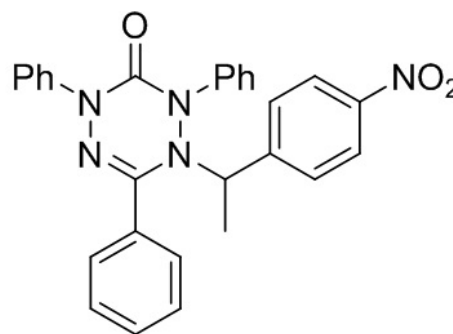
federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniia «Natsionalnyi issledovatel'skii  
Tomskii politekhnikeskii universitet» (RU)

## (54) SENSITIZER FOR PHOTODYNAMIC DESTRUCTION OF TUMOR CELLS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical chemistry and oncology, namely to a compound for photodynamic destruction of malignant tumor cells. A sensitizer for photodynamic destruction of tumor cells is proposed, which is 1-(1-(4-nitrophenyl)ethyl)-2,4,6-triphenyl-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazine-3(2H)-ol with the structural formula:



EFFECT: expanding the arsenal of means for photodynamic destruction of malignant tumor cells.

1 cl, 1 dwg

Изобретение относится к фармацевтической химии и онкологии, а именно к соединениям для фотодинамического разрушения злокачественных клеток.

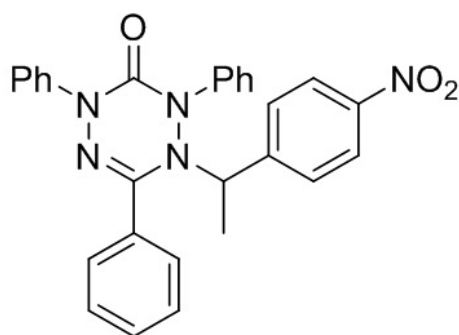
Известен сенсibilизатор для фотодинамического разрушения клеток злокачественных новообразований [RU 2071320 C1, МПК (1995.01) *A61K31/40, C09B47/00* (1995.01), опубл. 10.01.1997], который представляет собой сульфированный тетрафенилтетрабензопорфин общей формулы  $C_{60}H_{38}N_4O_{12}S_4$ , оказывающий терапевтический эффект при облучении криптоновым лазером с длиной волны 675 нм в течение 15 минут.

Известен фотосенсibilизатор [RU 2411943 C2, МПК (2006.01) *A61K31/409, A61K9/10, A61N5/067, A61P35/00, C07D487/22, B82B1/00*, опубл. 20.10.2010], представляющий собой наноструктурированную водную дисперсию на основе производного бактериохлорина р, который представляет собой метиловый эфир О-этилоксиа N-этоксиклоимида бактериохлорина р  $C_{38}H_{46}N_6O_6$ . Наноструктурированная водная дисперсия представляет собой липосомальную дисперсию на основе лецитина и холестерина, а метиловый эфир О-этилоксиа N-этоксиклоимида бактериохлорина р включен в липидный бислой липосом. Терапевтический эффект реализуется при облучении патологического участка оптическим излучением в спектральном диапазоне 790-810 нм.

Известен фотосенсibilизатор для лечения онкологических заболеваний, который содержит соль хлорин е6, N-метил-D-глюкамин (меглумин) и L-лизин в мольных соотношениях 1:2:1 [RU 2646477 C1, МПК (2006.01) *A61K31/40, A61K41/00, A61P35/00, A61P31/04*, опубл. 05.03.2018], проявляющий активность под воздействием лазера с длиной волны 662 нм.

Техническим результатом изобретения является расширение арсенала средств для фотодинамического разрушения опухолевых клеток.

В качестве сенсibilизатора для фотодинамического разрушения опухолевых клеток предлагается 1-(1-(4-нитрофенил)этил)-2,4,6-трифенил-1,4-дигидро-1,2,4,5-тетразин-3(2H)-он со структурной формулой:



На фиг. 1 показана жизнеспособность опухолевых клеток после фотодинамического воздействия в присутствии фотосенсibilизатора.

Для получения предложенного сенсibilизатора в двугорлую круглодонную колбу объемом 100 мл внесли 76 мг обескислороженной суспензии порошка меди и 86 мг бромида меди (I) в 30 мл бензола, а затем добавили 125 мкл N,N,N',N'',N''-пентаметилдиэтилентриамина. К полученной смеси добавили обескислороженный раствор, полученный растворением 327 мг 1,3,5-трифенилвердазильного радикала и 276 мг 1-(1-бромозтил)-4-нитробензола в 20 мл бензола.

Полученную реакционную массу кипятили 8 часов с обратным холодильником Димрота в атмосфере аргона, который подавали из линии Шленка. После охлаждения на воздухе до комнатной температуры полученную реакционную массу пропустили

через 3 см слоя силикагеля, а затем силикагель дополнительно промыли 15 мл бензола для полного переноса продукта в маточник. Полученный маточный раствор упарили в вакууме в круглодонной колбе с помощью ротационного испарителя до 3-4 мл итогового раствора. После этого в колбу с концентрированным раствором добавили 50 мл гексана для осаждения продукта. Выпавший продукт отфильтровали на фильтре Шотта, присоединенного к колбе Бунзена под абсолютным давлением 800 мбар, промыли гексаном 100 мл и сушили на воздухе в темноте.

В результате получили продукт массой 382 мг (что составило 80% от теоретического выхода), который представляет собой кристаллическое вещество бледно-желтого цвета с формулой  $C_{28}H_{23}N_5O_3$ .

Оценку фотосенсибилизирующих свойств заявляемого соединения проводили по уровню жизнеспособности опухолевой клеточной культуры при световом воздействии с длиной волны 395-410 нм.

В качестве тестовой клеточной линии использовали опухолевую культуру клеток MCF-7 (адгезивная линия рака молочной железы человека). Клетки засевали в 96-луночный планшет в концентрации 5000 клеток в лунке в полной питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и смеси антибиотиков (пенициллин 50 ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл). Далее клетки инкубировали в течение 24 часов при 37°C в среде 5% углекислого газа. После адгезии клеток и микроскопического подтверждения жизнеспособности культуры, клетки использовали для оценки фотосенсибилизирующих свойств. Для этого готовили серию из 6 полных питательных сред DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, смеси антибиотиков (пенициллин 50 ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл) и предложенного сенсибилизатора. Концентрация сенсибилизатора в среде была 50, 25, 12, 6, 3 и 1,5 мкг/мл.

Питательную среду в лунках заменили на приготовленные среды, содержащие сенсибилизатор в соответствующих концентрациях. В качестве контрольной группы использовали лунки с опухолевыми клетками, в которых среду меняли на среду, не содержащую сенсибилизатор. После этого планшет подвергали световому воздействию в течение 20 минут. Источник излучения: светодиодная матрица, состоящая из 5 столбцов по 7 светодиодов в столбце с расстояниями между диодами 18 мм в рядах и столбцах, сила света каждого диода 1 Кд, диапазон излучения 395-410 нм. Расстояние от светодиода до лунки с опухолевыми клетками – 2 см. После облучения планшеты помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор при 37°C в среде 5% углекислого газа на 48 часов. Далее проводили оценку жизнеспособности опухолевых клеток с помощью МТТ-теста.

Для МТТ-теста из каждой лунки удаляли питательную среду и вносили 100 мкл раствора МТТ-реактанта (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в питательной среде, затем планшеты помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор при 37°C на 4 часа.

После этого из планшетов снова удаляли среду, и в каждую лунку для растворения образовавшихся кристаллов формазана было добавлено по 100 мкл диметилсульфоксида. После этого проводили оценку оптической плотности образцов с помощью микропланшетного ридера (MULTISCAN FC) при длине волны 570 нм.

Жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{жизнеспособность, \%} = ((\text{ОП}_{\text{обр}} - \text{ОП}_{\text{пуст}}) / (\text{ОП}_{\text{контр}} - \text{ОП}_{\text{пуст}})) \cdot 100,$$

где ОП<sub>обр</sub> – средняя оптическая плотность образцов с внесенным сенсибилизатором;

ОП<sub>пуст</sub> – средняя оптическая плотность среды без опухолевых клеток;

ОП<sub>контр</sub> – средняя оптическая плотность опухолевых клеток, не подвергавшихся

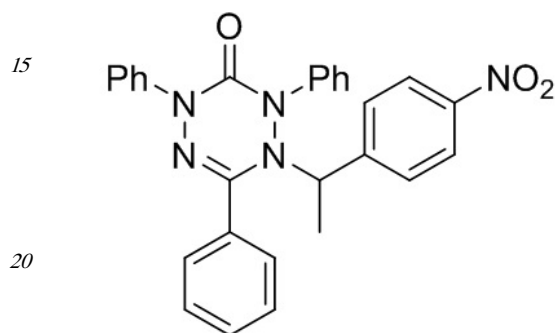
воздействию сенсibilизатора.

Результаты определения уровня жизнеспособности культуры клеток MCF-7 после фотодинамического воздействия с использованием предложенного сенсibilизатора и контрольной группы представлены на фиг. 1.

- 5 Наблюдается дозозависимое снижение жизнеспособности опухолевых клеток при воздействии облучения в присутствии сенсibilизатора. Процент жизнеспособных клеток после фотодинамического воздействия с сенсibilизатором в концентрациях 50-1,5 мкг/мл статистически значимо ниже уровня контроля ( $p < 0,001$ ).

10 (57) Формула изобретения

Сенсibilизатор для фотодинамического разрушения опухолевых клеток, отличающийся тем, что он представляет собой 1-(1-(4-нитрофенил)этил)-2,4,6-трифенил-1,4-дигидро-1,2,4,5-тетразин-3(2H)-он со структурной формулой:



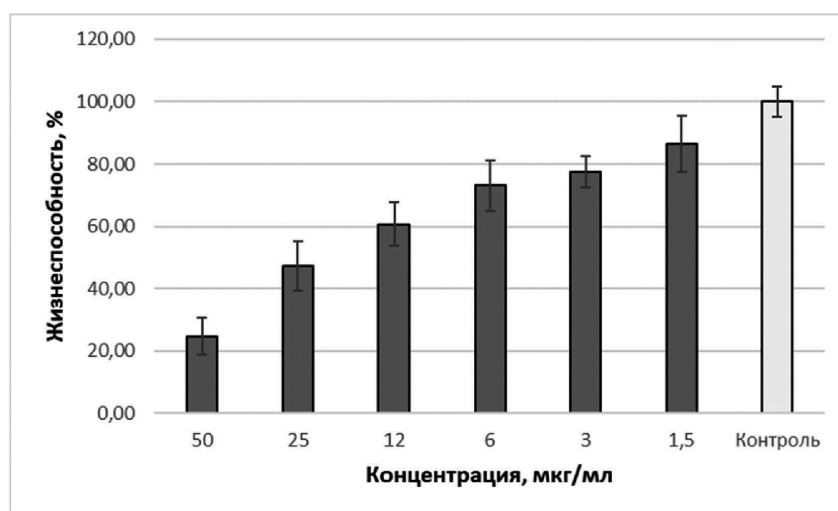
25

30

35

40

45



Фиг. 1