



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314806**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 D 487/22, A 61 K 39/395

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19995440	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1998.04.29, PCT/CA98/00425
(22) Inng. dag	1999.11.05	(85) Videreføringsdag	1999.11.05
(24) Løpedag	1998.04.29	(30) Prioritet	1997.05.07, US, 852326
(41) Alm. tilg.	1999.11.05		1997.08.26, US, 918840
(45) Meddelt dato	2003.05.26		

(71) Patenthaver	The University of British Columbia, 2194 Health Sciences Mall, Room 331, IRC Building, Industry Liaison Office, Vancouver, BC V6T 1Z3, CA
(72) Oppfinner	David Dolphin, Vancouver, BC, CA Julia G. Levy, Vancouver, BC, CA Anna M. Richter, Vancouver, BC, CA Ethan D. Sternberg, Vancouver, BC, CA Andrew Tovey, Vancouver, BC, CA
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Fotoaktive benzoporfyriinderivatforbindelser, fremgangsmåter ved fremstilling og anvendelse derav, samt farmasøytisk blanding inneholdende disse**

(56) Anførte publikasjoner CAN.J.CHEM., VOL. 75, 1997, PP. 262-275
EP A 276121

(57) Sammendrag

Nye forbindelser som utvider repertoaret av forbindelser som er anvendelige i fotodynamisk terapi er beskrevet. Monohydrobenzoporfyriiner kan oppnås i trisyreform eller som estere med heteroatom-substituerte alkoholer, eller som amider.

En ny klasse fotoaktive benzoporfyriinderivatforbindelser

Teknisk område

Oppfinnelsen vedrører forbindelser som er anvendelige ved fotodynamisk
5 terapi og beslektede applikasjoner av fotoaktiv forbindelsesteknologi. Videre ved-
rører oppfinnelsen fremgangsmåter for å fremstille en klasse benzoporfyriinderva-
ter med kontrollert derivatisering på tre eller fire karboksylsubstituenten.

Bakgrunn

10 Fotodynamisk terapi (PDT) medfører generelt administrering av forbindelser
som er istand til å absorbere lys, typisk i det synlige området, men også i det nære
ultrafiolett, etterfulgt av bestråling av steder hos et individ for hvilke en toksisk,
modifiserende eller inhiberende virkning er ønsket. PDT ble først utviklet ved bruk
av hematoporfyrin og beslektede forbindelser ved behandling av tumorer, da det
15 viste seg at disse forbindelser ville "huse" på steder som inneholdt rasktdelende
celler. Tumoren kunne så bestråles med lys absorbert av hematoporfyrinet, og
ødeleggelse av det omgivende vev var resultatet. PDT har siden blitt vist å være
anvendelig for behandling av aterosklerotiske plakker, restenose, infeksjoner i
blodstrømmen, reumatoid artritt, psoriasis og for behandling av okulære tilstander
20 som ikke nødvendigvis er begrenset til tumorer.

U.S. patent nr. 5.171.749 og patenter som ble utstedt på beslektede
applikasjoner, U.S. patenter nr. 5,83.255; 5.399.583; 4.883.790; og 5.095.030;
som her alle er inntatt som henvising, beskriver og krever en klasse fotoaktive for-
bindelser som er anvendelige i PDT kalt monohydrobenzoporfyriinene, eller
25 "BPD'er". Denne klasse oppnås ved Diels-Alder reaksjon av et mono- eller di-
substituert alkyn med protoporfyrin-IX, og de resulterende forbindelser kan videre
isomeriseres, reduseres og/eller derivatiseres og gi en stor klasse "BPD'er". Som
beskrevet i disse patenter, kommer en spesielt anvendelig underklasse av denne
gruppen fra hydrolyse eller delvis hydrolyse av estergruppen til 2-karboksyetyl-
30 sidekjedene på ringer C og D. Forestring som beskyttelse av disse grupper under
Diels-Alder reaksjonen fører først til produkter som inneholder 2-
karbalkoksyetylgrupper. Det ble funnet at lett hydrolyse av disse estere greit kun-
ne utføres, hvilket ga tilbake alle karbalkoksygrupper i forbindelse med Diels-Alder
produktet oppnådd fra et dikarbalkoksyalkyn praktisk talt fullstendig ikke-

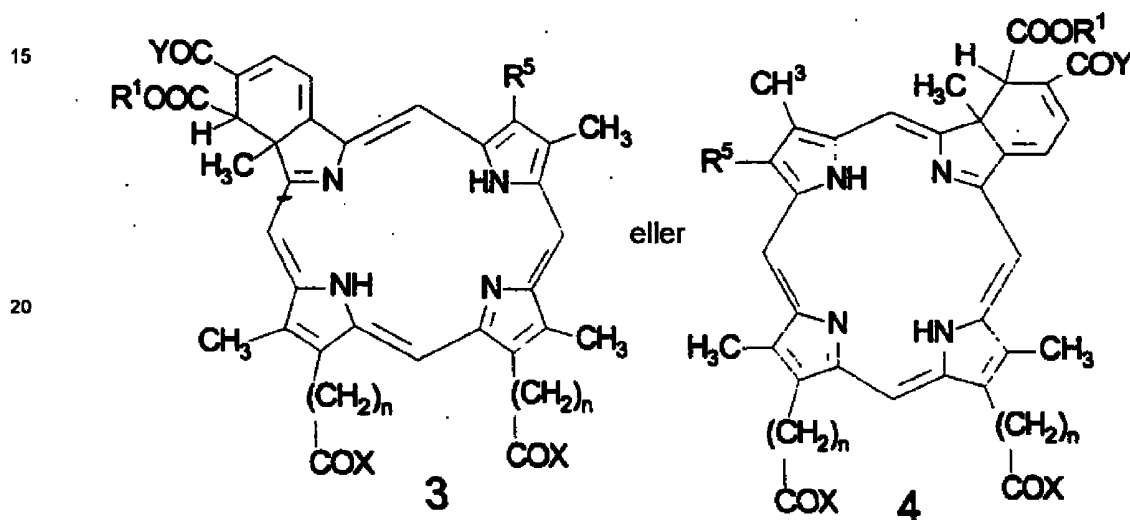
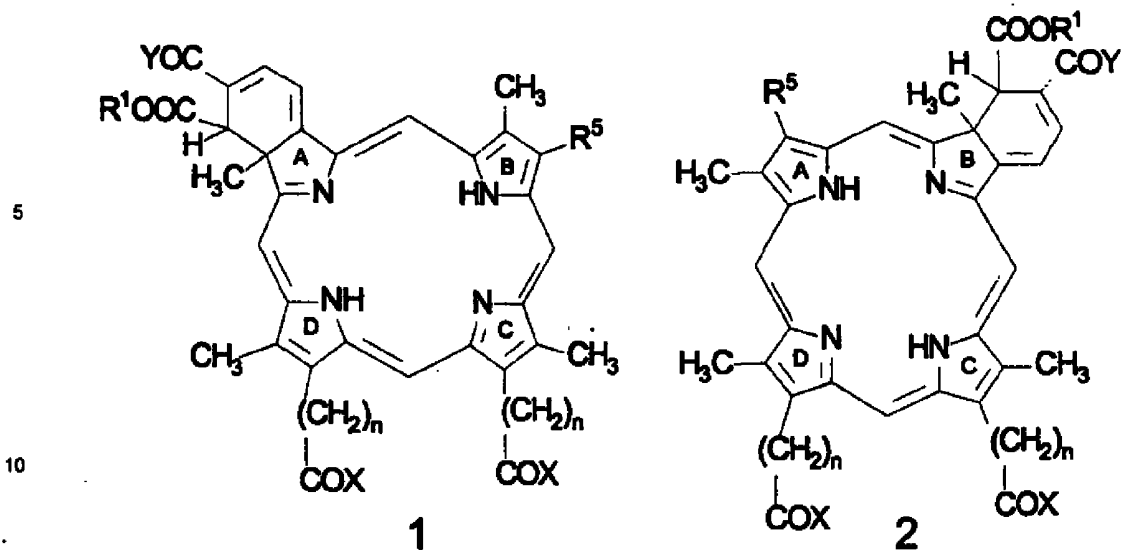
hydrolysert. Dette førte til fire grupper av forbindelser, BPD-MA, BPD-MB, BPD-DA og BPD-DB, som vist i Figur 1; denne figur er tatt fra US patent nr. 5.171.749. I denne oversikten er R¹ og R² karbalkoksygrupper, typisk karbometoksy eller karboetoksy, og R er alkyl(1-6C).

5 BPD-MA ble funnet å ha spesielt anvendelige egenskaper for PDT og er for tiden under klinisk utvikling. Imidlertid forblir det et behov for ytterligere spesifikke former av fotoaktive midler som utvider repertoaret av fotoaktive forbindelser for de forskjellige indikasjoner som PDT anvendes på som angitt ovenfor. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av hittil ikke
10 beskrevne eller utilgjengelige medlemmer av denne klassen i forbindelse med beskrevne forbindelser i de ovenfor nevnte patenter, hvori spesifikk kontrollert derivatisering på tre av karboksylsubstituentene gir en ny gruppe fotoaktive forbindelser med ønskelige egenskaper. Innbefattet er "trisyre"-formen, samt en spesielt anvendelig homotriester, hvori trisyren er forestret på alle tre karboksylgrupper
15 med etylenglykol.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Fremgangsmåtene og forbindelsene ifølge oppfinnelsen gir spesielt anvendelige, nye tilføyelser til repertoaret av forbindelser som er anvendelige ved foto-
20 dynamisk terapi samt midler til å utvide dette repertoar på en metodisk måte. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utnytter muligheten for å justere hydrolysebetingelser, slik at den tidligere ikke-beskrevne trisyreform av monohydroksybenzoporfyriinklassen av fotoaktive forbindelser oppnås, og muligheten for å derivatisere de resulterende tre karboksylgrupper på en kontrollert måte.

25 Således er ett aspekt av oppfinnelsen rettet på en forbindelse med formelen



25

og salter og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav,
hvor

R^1 er alkyl (1-6C);

Y er $-OH$;

30 n er et heltall 0-6,

hver X er uavhengig $-OH$ eller OR^4 , hvor R^4 er en usubstituert hydrokarbonrest
med 1-10C; og

R^5 er vinyl eller et derivat derav, som kan oppnås ved addisjon eller oksydasjon av
vinylgruppen.

Det vil bemerkes at forbindelsene 1 og 2 bare skiller seg ved lokaliseringen av Diels-Alder substituenten i A- i forhold til B-ringen. To slike produkter oppstår fordi protoporfyrin IX, utgangsmaterialet for fremstilling av forbindelser 1 og 2, ikke er symmetriske ved substitusjon i disse ringer. På den annen side stammer forbindelsen med formel 3 fra lignende Diels-Alder addisjon til protoporfyrin III; forbindelsen med formel 4 fra Diels-Alder addisjon til protoporfyrin XIII. Da disse protoporfyriner er usymmetrisk substituerte, oppstår bare ett produkt i hvert tilfelle

Oppfinnelsen er også rettet på fremgangsmåter for å fremstille forbindelser med formel 9-12 og salter og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav,

hvor R^1 er alkyl (1-6C);

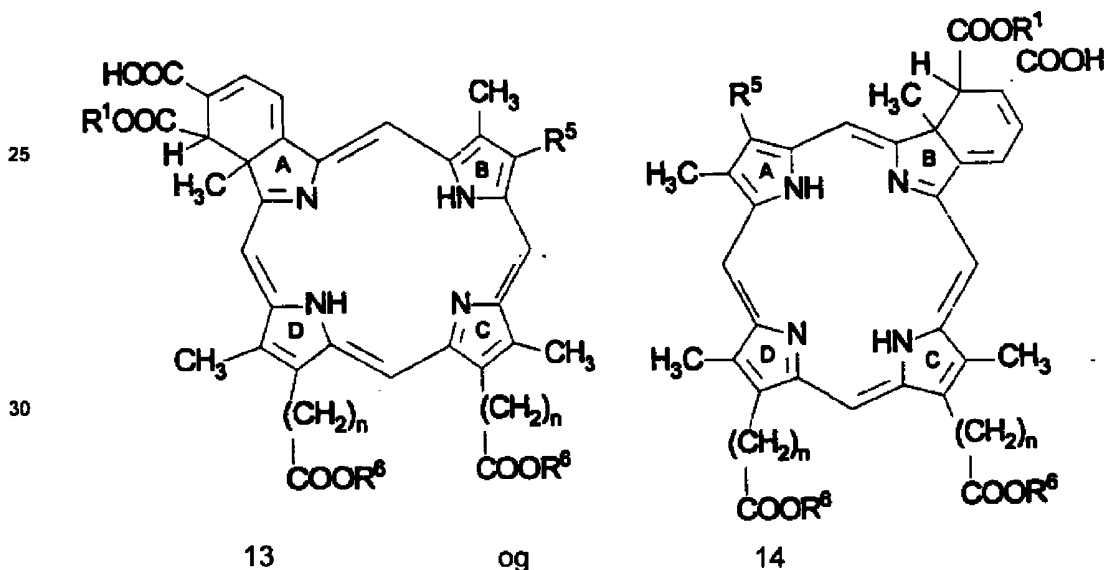
n er et heltall 1-6; og

hvor R^5 er vinyl eller et derivat derav, som kan oppnås ved addisjon eller oksidasjon av vinylgruppen;

hvilken fremgangsmåte omfatter behandling av en høyere forestret form av nevnte produktforbindelse eller salt, metallisert form, merket form eller konjugert form derav,

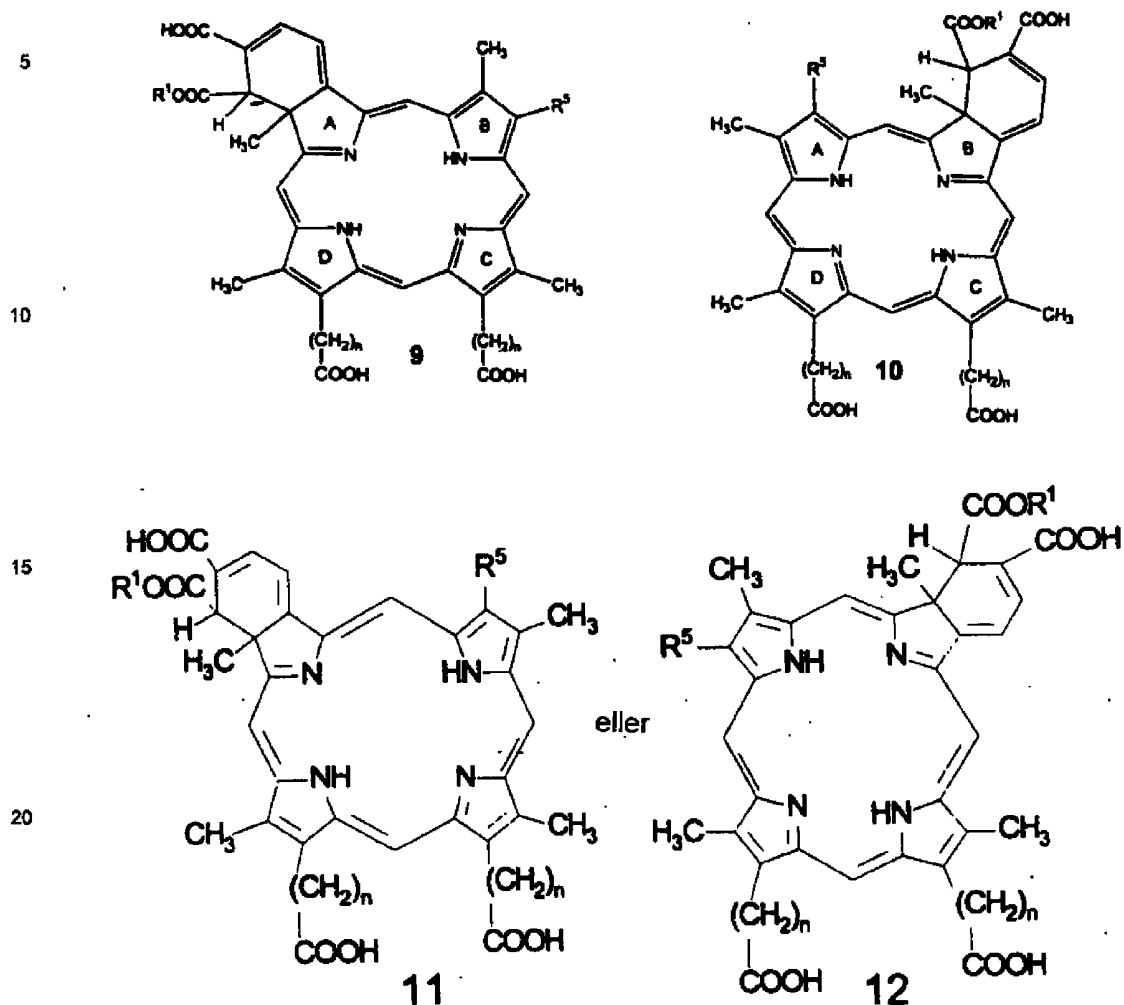
med en base og løsningsmidler i tilstrekkelig tid til å gi avestring slik at produktforbindelsen oppnås.

Innbefattet i oppfinnelsen er også som foretrukne utførelsesformer av forbindelsene ifølge krav 2-6 og forbindelsene med formlene



hvor n er 2 og R^5 er vinyl.

Videre vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av en produktforbindelse med formelen

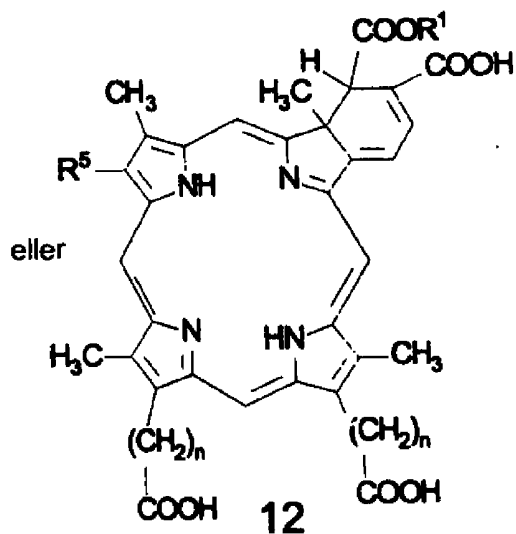
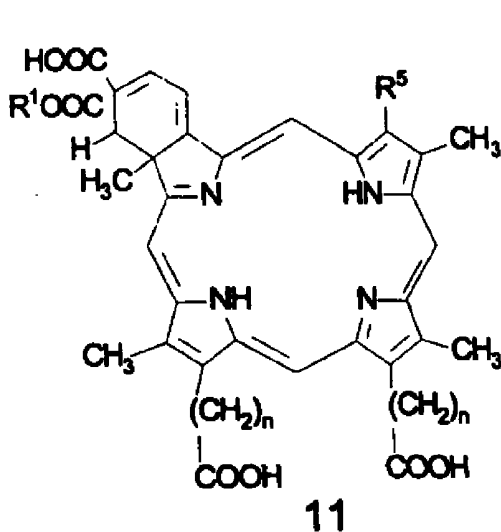
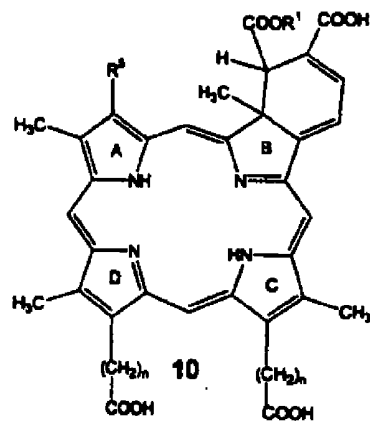
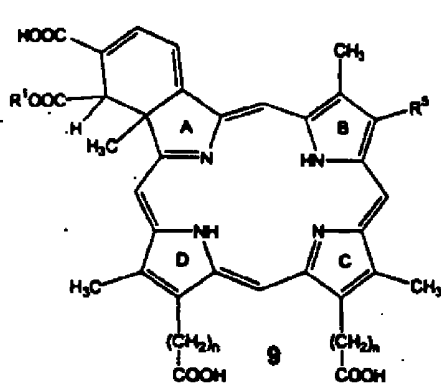


- og salter og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav;
 hvori R^1 er alkyl (1-6C);
 n er et heltall 1-6; og
 hvori R^5 er vinyl eller et derivat derav som kan oppnås ved addisjon eller oksidasjon av vinylgruppen;
- hvilken fremgangsmåte omfatter behandling av en høyere forestret form av nevnte produktforbindelse eller salt, metallisert form, merket form eller konjugert form derav,
 med en base og løsningsmidler i tilstrekkelig tid til å gi avestring slik at produktforbindelsen oppnås.

Foretrukne utførelsesformer derav fremgår av de uselvstendige krav 9-10.

Dertil vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel 1-4 eller salter eller metalliserte eller merkede eller konjugerte former derav, hvori R^1 er alkyl(1-6C); Y er $-OH$, som kan oppnås ved addisjon eller oksidasjon av vinylgruppen, X er uavhengig $-OH$ eller OR^4 , hvor R^4 er en usubstituert hydrokarbonrest med 1-10C; $-OR^3$,

n er et heltall 0-6; og R^5 er vinyl eller et derivat derav; som kan oppnås ved addisjon eller oksidasjon av vinylgruppen – omfattende behandling av en karboksylaktivert form av en utgangsforbindelse med formelen:



og saltene og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav; hvori R^1 er alkyl (1-6C);

n er et heltall 1-6; og
 hvori R^5 er vinyl eller et derivat derav;
 med R^3OH eller HNR^2_2 under betingelser som er tilstrekkelige til å danne en forbindelse med formlene 1-4 eller de metalliserte eller merkede eller konjugerte former derav, hvori Y og begge X enten er $-OR^3$ eller NR^2_2 .

Foretrukne trekk ved den fremgangsmåten fremgår av de uselvstendige krav 12-14.

Til slutt vedrører oppfinnelsen en farmasøytisk blanding omfattende forbindelsen ifølge hvert av kravene 1-10 i blanding med en farmasøytisk akseptabel eksipient, og anvendelse av forbindelsene i følge kravene 1-10 til fremstilling av et fotoaktivt middel.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser forbindelsene i henhold til den kjente teknikk, BPD-MA; BPD-MB; BDP-DA og BPD-DB.

Figurene 2A og 2B viser fotosensitivisering av L 1210 celler *in vitro* ved B3 som en funksjon av konsentrasjonen.

Figur 3 viser tidsforløpet for opptak av B3 i L 1210 celler.

Figur 4 viser frigjøringskinetikken til B3 fra L 1210 celler etter 1 time inkubering.

Figur 5 viser biofordelingen av B3 i musevev.

Utførelsesformer av oppfinnelsen

Forbindelsene med formlene 1-4 ifølge oppfinnelsen er analoge med slike som er beskrevet i US patent nr. 5.171.749 og dens forgjengere, U.S. patentene nr. 5.283.255; 5.399.583; 4.883.790; 4.920.143 og 5.095.030. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen skiller seg fra dem som er beskrevet i disse patenter gjennom derivatisering i de tre karboksylgrupper vist som "COY" og "COX" i disse formler. Dannelsen av disse forbindelser har vært utelukket ved vanskeligheten med å hydrolysere karbalkoksygruppen i stillingen opptatt av "COY". Den foreliggende oppfinnelse gir adgang til denne karbalkoksy og muliggjør syntesen av en rekke fotoaktive forbindelser som hittil var utilgjengelige.

For å forenkle denne omtale, vil substituenten "COY" refereres til som "vinylkarboksyl" uavhengig av utførelsesformen av Y i forbindelsen som omtales.

Gruppene kalt "COX" vil refereres til som "propionkarboksyl", igjen uavhengig av utførelsesformen av X eller n i en spesiell forbindelse.

De foreliggende oppfinnere har funnet at gjennom egnet justering av hydrolysebetingelsene kan vinylkarboksylgruppen oppnås. Selv om propionkarboksyl-
5 grupper er lett å manipulere ved avestring, gjenforestring, eller annen derivatisering, er vinylkarboksylen i form av en alkylester mer bestandig mot hydrolyse, og faktisk må hydrolyse som lykkes med hensyn til denne gruppen utføres under betingelser som forhindrer oksidasjon eller destruksjon av molekylet.

Muligheten for tilgang til vinylkarboksylgruppen har viktige konsekvenser.
10 Først er trisyreforbindelsen som således dannes selv et viktig, nytt fotoaktivt middel. For det andre, fordi propionkarboksylgruppene er de mest reaktive, kan de lett gjenforestres for beskyttelse og vinylkarboksylen så aktiveres for ytterligere substitusjon. Således kan en rekke forbindelser oppnås hvori propionkarboksylgruppene enten foreligger i form av fri syrer og salter eller enkle estere eller amider eller acylhydrasider, og hvori vinylkarboksylen er en fri syre eller salt eller er
15 derivatisert som en kompleks ester eller et amid eller acylhydrasid.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen foreligger i form av optisk isomere. Uavhengig av om separasjon i de enkelte optiske isomere utføres, er forbindelsene som oppnås ved å danne derivater av vinylkarboksylen selv anvendelige som fotoaktive midler. Tilgjengeligheten av ytterligere forbindelser i repertoaret av fotoaktive midler muliggjør justering av forskrifter, slik at de passer spesielle indikasjoner og individer.
20

Tilgjengeligheten av vinylkarboksyl muliggjør også dannelsen av fotoaktive midler hvori alle tre karboksylgrupper (vinylkarboksylen og propionkarboksylene)
25 er identisk derivatisert, og således gir enda flere medlemmer i repertoaret av fotoaktive forbindelser. Til slutt vil det være klart at en rekke kombinasjoner av substituenten av de tre relevante karboksylgrupper gir et område av forbindelser, hvilket område økes av variasjonene som kan oppnås ved R⁵ gjennom derivatisering av vinylsubstituenten.

30 Således, selv uten å justere betingelsene slik at bare én av propionkarboksylene omsettes, og foruten potensiale for variasjon på R⁵, innbefatter tilgjengelige kombinasjoner slike som er vist i Tabell 1.

Tabell 1

	Vinylkarboksyl Y =	propionsyrekarboksyl X =
5	X-1	-OH
	X-2	-OR ⁴

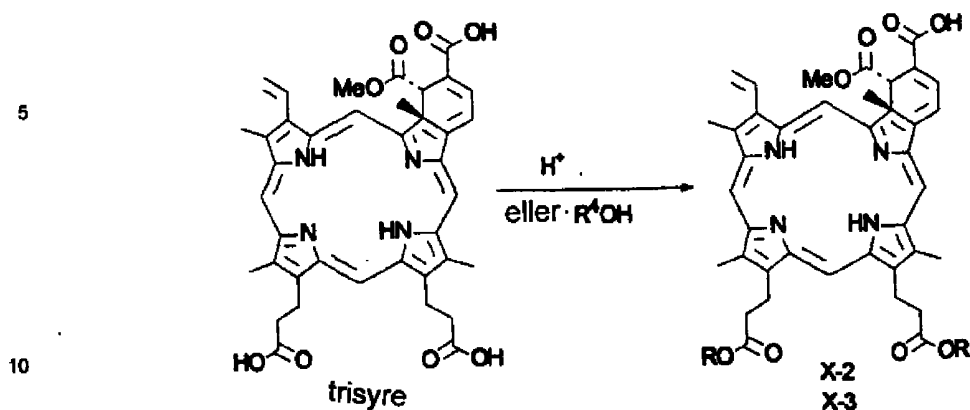
hvor OH representerer den fri syre eller salt, avhengig av pH.

10 For å oppnå forbindelsene i Gruppe X-1, hydrolyseres Diels-Alder produktet eller enda sterkere forestrede former av forbindelsene i denne gruppen med hensyn til vinyl- og propion-karboksylene under betingelsene som er beskrevet heri for å oppnå trisyreformeren. For å oppnå forbindelsen i Gruppen X-2, gjenforestres propionkarboksylene eller amideres ved bruk av standard metoder, ettersom de er mer reaktive enn vinylkarboksylen.

15 Ved anvendelse av denne metode ble en spesielt foretrukket forbindelse kalt "B3" heri fremstilt som angitt i Eksempel 3 nedenunder.

Reaksjonsskjema 1 viser omdannelsen av trisyremellomproduktet oppnådd ved metoden ifølge oppfinnelsen, til forbindelsen i Gruppe X-2 gjennom enkel 20 forestring under standardbetingelser av propionkarboksyler. Disse standardbetingelser innbefatter behandling av trisyre-mellomproduktet med den tilsvarende alkohol i nærvær av en syre, så som svovelsyre, saltsyre, triflinsyre eller annen egnet syre.

Reaksjonsskjema 1



hvor R er R⁴-

Den illustrerte omdannelse viser Diel-Alder-substituenten i B-ringene avledet fra protoporphyrin IX, det vil si forbindelsen med formel 2, og en vinylsubstituent på R⁵; imidlertid er reaksjonsskjema 1 generelt for forbindelser ifølge oppfinnelsen og bare vist som illustrasjon. Andre utførelsesformer av R⁵ og forbindelser med formelene 1, 3 eller 4 kunne likeledes ha vært brukt for illustrasjon.

15

Spesielt foretrukne produkter i dette reaksjonsskjema er forbindelsene med formelene 13-16 angitt ovenfor. Disse forbindelsene kan formuleres til terapeutiske blandinger for anvendelse i PDT.

20

Som angitt ovenfor, gir fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, og spesielt tilgjengeligheten av trisyreformene av BPD-type forbindelsene, spesielt i forbindelse med tilgjengeligheten av vinylgruppen på R^5 for derivatisering, midler til å syntetisere store antall av beslektede fotoaktive midler. En slik syntese kunne planlegges å utføres på statistisk eller systematisk måte for å oppnå store antall forbindelser som i denne henseende anses som kombinatoriske biblioteker.

Substituentene på BPD'ene ifølge oppfinnelsen er beskrevet som karakterisering av R^1 - R^5 . Terminologien kan videre defineres som følger:

Slik det er anvendt heri, betyr uttrykket "alkyl" et mettet, rettkjedet eller forgrenet hydrokarbon som, hvis det inneholder et tilstrekkelig antall karbonatomer, kan være cyklisk eller inneholde en cyklisk del. Typiske eksempler er metyl, etyl, t-butyl, cykloheksyl og lignende.

Egnede usubstituerte hydrokarbonrester med 1-10C som vist i R^4 og innbattet i R^2 , er for eksempel metyl, etyl, propyl, butyl, heksyl, cyklopentadienyl, fenyl, kromenyl, antanyl, naftyl eller benzyl. Disse utførelsesformer kan også inngå i definisjonen av R^3 , forutsatt at de er substituerte med en heteroatomholdig substituent som angitt ovenfor.

I forbindelsene ifølge oppfinnelsen er R^5 fortrinnsvis vinyl, men kan også være et derivat derav. Vinylgruppen i ring A eller B derivatiseres lett til andre utførelsesformer av R^5 ved addisjon eller oksydasjon. Addisjons- eller oksydasjonsproduktene kan videre være substituert hvis de adderte substituent er funksjonelle som utgående grupper, for eksempel kan $-Br$ erstattes med $-OH$, $-OR''$, $-NH_2$, $-NHR''$ eller $-NR_2''$, etc., hvor R'' er en hydrokarbonrest. For eksempel kan én av de adderte substituent være hydrogen og den andre halogen, hydrokso, lavere alkokso, amino eller et amid, sulfhydryl eller et organosulfid eller et ytterligere hydrogen. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen inneholder forskjellige grupper som R^5 , innbattet substituent som gir ytterligere porfyrin- eller porfyrinbeslektede ringsystemer.

Således kan R^5 være vinyl, $-CHOR'$, $-CHO$, $-COOR'$, $-CH(OR')CH_3$, $-CH(OR'')CH_2OR'$, $-CH(SR')CH_3$, $-CH(NR')_2CH_3$, $-CH(CN)CH_3$, $-CH(COOR')CH_3$, $-CH(OOCR')CH_3$, $-CH(NR'COR')CH_3$, $-CH(CONR'_2)CH_3$, $-CH(halo)CH_3$, eller $-CH(halo)CH_2(halo)$, hvori R' er H, eller en hydrokarbonrest (1-6C), eventuelt substituert med en heteroatoms substituent, eller hvori R^5 er en uorganisk gruppe med

mindre enn 12C som følger av direkte eller indirekte derivatisering av vinylgruppen, eller hvori R⁵ er en gruppe som inneholder 1-3 tetrapyrrol-typekjerner.

Det vil bemerkes at forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan inneholde ett eller flere chirale sentre og således foreligge i enantiomere eller diastereomere former.

5 Formlene 1-4, som er representative for forbindelsene ifølge oppfinnelsen, representerer således optisk rene enantiomere eller diastereomere eller kan være racemiske blandinger eller blandinger av diastereomere alt ettersom.

Om ønsket, kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles i metalliserte former ved behandling av tetrapyrroltype-kjernen med et tilsvarende ion, så som 10 magnesiumion, zinkion, tinnion og lignende, hvilket gir et metallkompleks. Metallionet kan også være en radioaktiv markør. Generelt innsettes metallionet ved bruk av de tilsvarende salter under standardbetingelser på området. For eksempel kan zinkionet innføres ved behandling av forbindelser med zinkacetat i 1:1 metylen-klorid:metanol.

15 Forbindelsene kan også inneholde markør innbefattende radioisotoper, kromoforer og fluorescensmarkører. Radioisotopmerking er generelt anvendelig når forbindelsene skal følges *in vivo* eller brukes til å merke spesifikke rester. Anvendelige kationiske rester som er radioisotoper innbefatter teknetium, gallium og indium. I tillegg kan radioisotoper av heteroatomer, så som ¹³¹I eller ³²P i selve 20 molekylet, eller inklusjon av ¹⁴C anvendes til å merke molekylet.

Som videre beskrevet i de BPD-relaterte patenter angitt ovenfor, kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen om ønsket kobles til et målsøkende middel som vil føre molekylet til et spesifikt vev eller organ. Slike målsøkende midler innbefatter 25 antistoffer, reseptorer, reseptor-ligander og lignende. Binding av det målsøkende middel til forbindelsen utføres ved bruk av standard-teknikker. Slik det anvendes heri, viser uttrykket "konjugerte former" til forbindelser med formlene 1-4 som eventuelt er koblet gjennom en linker til disse målspesifikke midler.

De forskjellige former av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan brukes i de 30 fotodynamiske terapiteknikker som generelt er kjent på området. Som angitt i bakgrunnsavsnittet ovenfor, kan fotodynamisk terapi utføres ved bruk av flere protokoller og for en rekke indikasjoner. I tillegg viser forbindelser av denne type farmakologisk aktivitet uten lys i noen tilfeller. Farmasøytiske standardblandinger, innbefattet liposom-blandinger, anvendes om ønsket i slike applikasjoner.

Spesielt anvendelige i disse sammenhenger er forbindelsene med formlene 14, hvori R^5 er vinyl, og spesielt når R^1 er metyl, i formel 14, eller den tilsvarende A-ring substituerte form (13), igjen spesielt hvor R^1 er metyl, og spesielt forbindelsen B3 i Eksempel 3 nedenfor.

5

Fremstilling av trisyre.

Sentralt i syntesen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er fremstillingen av trisyrene av forbindelsene med formlene 1-4, det vil si hvor X og Y er OH. I denne fremstillingen anvendes en form av forbindelsene med formler 1-4 som er i høyere grad forestret med hensyn til vinylkarboksylen og propionkarboksylen enn selve trisyren som utgangsmateriale. Typisk vil vinylkarboksylen foreligge i form av en ester, typisk en alkylester, og propionkarboksylene kan også være forestret. Alternativt kan substituerte hydrokarbonrest-estere anvendes som utgangsmaterialer i likhet med de tilsvarende amider.

Da reaksjoner på propionkarboksylene er mye lettere enn på vinylkarboksylen, innbefatter typiske utgangsmaterialer forbindelser med formlene 1-4, hvori vinylkarboksylen er en ester eller et amid, mens propionkarboksylen allerede kan være helt eller delvis hydrolysert. Således vil de typiske utgangsmaterialer innbefatte forbindelser med den generelle formel 1-4, hvori vinylkarboksylen og propionkarboksylen alle foreligger i forestret eller amidert form, eller slike hvori vinylkarboksylen og propionkarboksylen alle foreligger i amidform, eller de tilsvarende forbindelser hvori propionkarboksylene er helt eller delvis hydrolysert. Blandede amider og estere kan også anvendes som utgangsmaterialer.

Disse utgangsmaterialer løses i et tilsvarende løsningsmiddel, så som dimetylformamid (DMF), dimetylsulfoksyd (DMSO) eller tetrahydrofuran (THF) eller blandinger, og behandles med en egnet base så som natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, litiumhydroksyd, kalsiumhydroksyd, bariumhydroksyd, kromhydroksyd eller tetraalkylammoniumhydroksyd eller enhver annen egnet, sterk base. Faste, harpiksbaserte alkalireagenser kan også anvendes. Vann kan også være tilstede i reaksjonsblandingen i likhet med lavmolekylare alkoholer. Typiske konsentrasjoner av baser er i området 0,1-1 M. Det foretrekkes at reaksjonen finner sted under enn oksydativt inert atmosfære, slik den ville foreligge med hydrogen, helium eller argon. Temperaturen i reaksjonsblandingen ligger i området 0-60°C, men reaksjonen utføres typisk ved romtemperatur. Reaksjonstiden er slik at den er tilstrek-

kelig til å gi hydrolyse av vinylkarboksylene, typisk 2-48 timer. Dette avhenger av temperaturèn som reaksjonen kjøres ved, men hvis reaksjonen kjøres ved romtemperatur, vil reaksjonen typisk være ferdig på ca. 18 timer. Hydrolyseforløpet kan følges kromatografisk, for eksempel ved TLC eller HPLC, slik at det tilsvarende tidsrom kan velges.

Trisyrereaksjonsproduktet faller ofte ut under reaksjonsbetingelsene, men kan oppløses igjen ved tilsetning av vann. Fortrinnsvis gjenutfelles da produktet ved senkning av pH til ca. 3-4 ved bruk av enhver tilgjengelig syre, normalt svovelsyre, saltpetersyre, saltsyre eller $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$. Den utfelte trisyre kan omkrystalliseres i egnede løsningsmidler. Et særlig foretrukket løsningsmiddel er våt metanol.

Så snart det rensede, krystalliserte produkt oppnås, kan trisyren behandles under standard reaksjonsbetingelser som angitt i reaksjonsskjemaene 1-4 ovenfor for å fremstille en lang rekke fotoaktive midler med formel 1-4. Omdannelser av gruppen representert ved R^5 kan utføres med hensyn til ethvert av mellomproduktene eller med hensyn til utgangsmaterialer og produkter.

De følgende eksempler er ment å illustrere, men ikke begrense oppfinnelsen.

Eksempel 1

Fremstilling av trisyre med formel 6

1,0 g (1,37 mmol) av tetraesteren oppnådd fra B-ring Diels-Alder adduktet til protoporfyrin IX -- det vil si i forbindelse 2, hvori R^1 er Me, Y og X er -Ome, n er 2 og R^5 er vinyl, ble satt til en suspensjon av LiOH (1,0 g, 41 mmol) i 50 ml tetrahydrofuran, 10 ml metanol og 5,0 ml vann som var blitt avgasset ved røring under nitrogen i 1 time. Reaksjonsblandingen ble rørt i 18 timer under en langsom nitrogenstrøm. Den ble kontrollert ved kiselgel TLC ved bruk av diklormetan/metanol som utviklingsløsningsmiddel. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet ved først å tilsette 100 ml vann og deretter bringe pH ned til 3-4 med 5% HCl. Det faste stoff ble filtrert og vasket med vann som hadde blitt bufret med eddiksyre til pH 3,5. Den faste trisyre med formel 6 ble omkrystallisert fra våt metanol og ga 770 mg (82%) utbytte. Trisyren spalter etter smelting. Strukturen ble bekreftet ved C/H og N analyse sammen med NMR. NMR'et viste tap av metylesterresonansen fra pro-

propionsyresidekjedene samt nedfelts resonansen tilskrevet esteren på vinyl-gruppen. For å verifisere strukturen, ble trisyren med formel 6 behandlet med diazometan for å regere flere utgangsmaterialet.

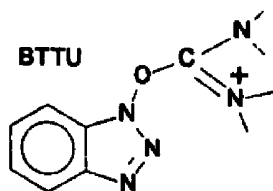
5

Eksempel 2

Fremstilling av etylenglykoltriester

50 mg (72 μ mol) av trisyren oppnådd i Eksempel 1 ble løst i tørr dimetylformamid (DMF) (2 ml) og aktivert med benzotriazol-1-yl N, N, N', N' tetrametyluronium-tetrafluorborat (BTTU) (Aldrich) (200 mg, 310 μ mol) i nærvær av trietylamin (50 μ l). BTTU er det karboksylaktiverende reagens med formelen

15



Reaksjonsblandingen ble rørt i 6 timer og deretter ble 250 μ l etylenglykol og så 20 μ l DBU tilsatt. Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen satt til en omrørt løsning av 10 ml diklormetan og 10 ml vann. Det organiske sjiktet ble isolert og vasket 3 ganger til med 5 ml vann i hver vask. Løsningsmidlet ble fjernet, hvilket ga tilbake en mørk grønn olje. Produktet, 27 mg av etylenglykoltriesteren (38%) ble isolert fra en preparativ tynn-sjikt-kromatografiplate under eluering med 5% metanol i diklormetan.

25

Eksempel 3

Fremstilling av B3

Til 200 mg (0,289 mmol) av trisyren fremstilt i Eksempel 1 i 10,0 ml metanol sattes tilnærmet 100 mikroliter (1 mmol) svovelsyre. Reaksjonen ble avbrutt etter 2 timer ved tilsetning av 10 ml 5% ammoniumacetat og 20 ml diklormetan. Det organiske sjiktet ble vasket 2 ganger med vann. Til produktløsningen sattes 10 ml acetonitril. Løsningsmidlet ble fjernet ved rotasjonsfordampning og ga et mørk grønt pulver. Produktet, B3, ble krystallisert fra metanol/kloroform og ga 140 mg (67%) av et mørk grønt, fast stoff etter tørking ved 60°C under vakuum i 4 timer.

30

Produktet spaltes under smelting. Strukturen ble bekreftet ved C/H og N analyse, massespektrumanalyse sammen med proton NMR, som formel 14, hvori R⁵ er vinyl og R¹ og R⁶ er metyl.

5

Eksempel 4

Fotosensitivisering av celler *in vitro*

Muse-leukemi-celler (L 1210) ble inkubert i egnet buffer med og uten serum i forskjellige mengder av drogen B3 i 1 time. Etter fjerning av drogen ble celle-
neutsatt for bredspektret lys ved 9 J/cm². Cellelevedyktighet ble bestemt 20 timer
senere ved MTT-kolorimetrisk måling. Resultatene er oppstilt i figur 2A og 2B som
% celledrap for celler utsatt for bare lys. LD₅₀-dosen (dose som forårsaker 50%
celledrap) var 7 ng/ml i fravær av og, 35 ng/ml i nærvær av, 10% serum. Således
er B3 en meget sterk fotosensitiviserer for celler og bibeholder denne egenskapen
i nærvær av serum.

15

Eksempel 5

Cellulær farmakokinetika

Opptak av B3 ved celler *in vitro*: L 1210 celler (5x10⁶/glass) ble inkubert i
nærvær av 10% serum med B3 på 3 µg/ml for tider opp til 100 minutter. Ved for-
skjellige tider under inkubasjon ble duplikatglass trukket ut, og cellene ble etter
vasking lyset, og mengden av B3 i ekstraktet bestemt ved fluorescens i nærvær av
1% Triton X-100.

20

Frigjøring/retensjon av B3 ved celler *in vitro*: L 1210 celler ble inkubert i 1
time med B3 på 3 µg/ml i nærvær av 10% serum, deretter vasket og plassert i
drogefritt medium inneholdende 10% serum. På forskjellige tidspunkter ble dupli-
kat-alikvoter evaluert med hensyn til celleinnhold av B3 som beskrevet ovenfor.

25

Resultatene som er presentert i figur 3 og 4 viser at B3 har meget raske
farmakokinetika *in vitro*. Forbindelsen går raskt inn i celler, idet de når maksi-
mumskonsentrasjoner i løpet av 20 minutter. Etter fjerning av B3 fra kulturmediet,
er frigjøring rask og nesten fullstendig etter 30 minutter. Basert på erfaring med
andre legemidler, forventes B3 å ha meget raske farmakokinetika *in vivo*, og såle-
des unngås langvarig hudfotosensitivitet.

30

Eksempel 6

Vevsfordeling og klaring *in vivo*

Mus (normale, friske og M1-tumor-bærende) ble injisert intravenøst på 4
5 mg/kg med B3 formulert i vandig løsning inneholdende DMSO. På forskjellige ti-
der etter B3 administrering, ble dyrene avlivet og B3-innholdet i forskjellige vev ble
bestemt i vevsekstrakter ved fluorescens som beskrevet ovenfor.

Resultatene er vist i figur 5. Legemidlet var ute fra testede vev etter ca. 5
minutter. Således har B3 meget raske farmakokinetiska *in vivo*, som bekrefter at
10 forventning om langvarig hud-hypersensitivitet ikke vil være resultatet når drogen
anvendes terapeutisk.

Eksempel 7

Selektivitet *in vivo*

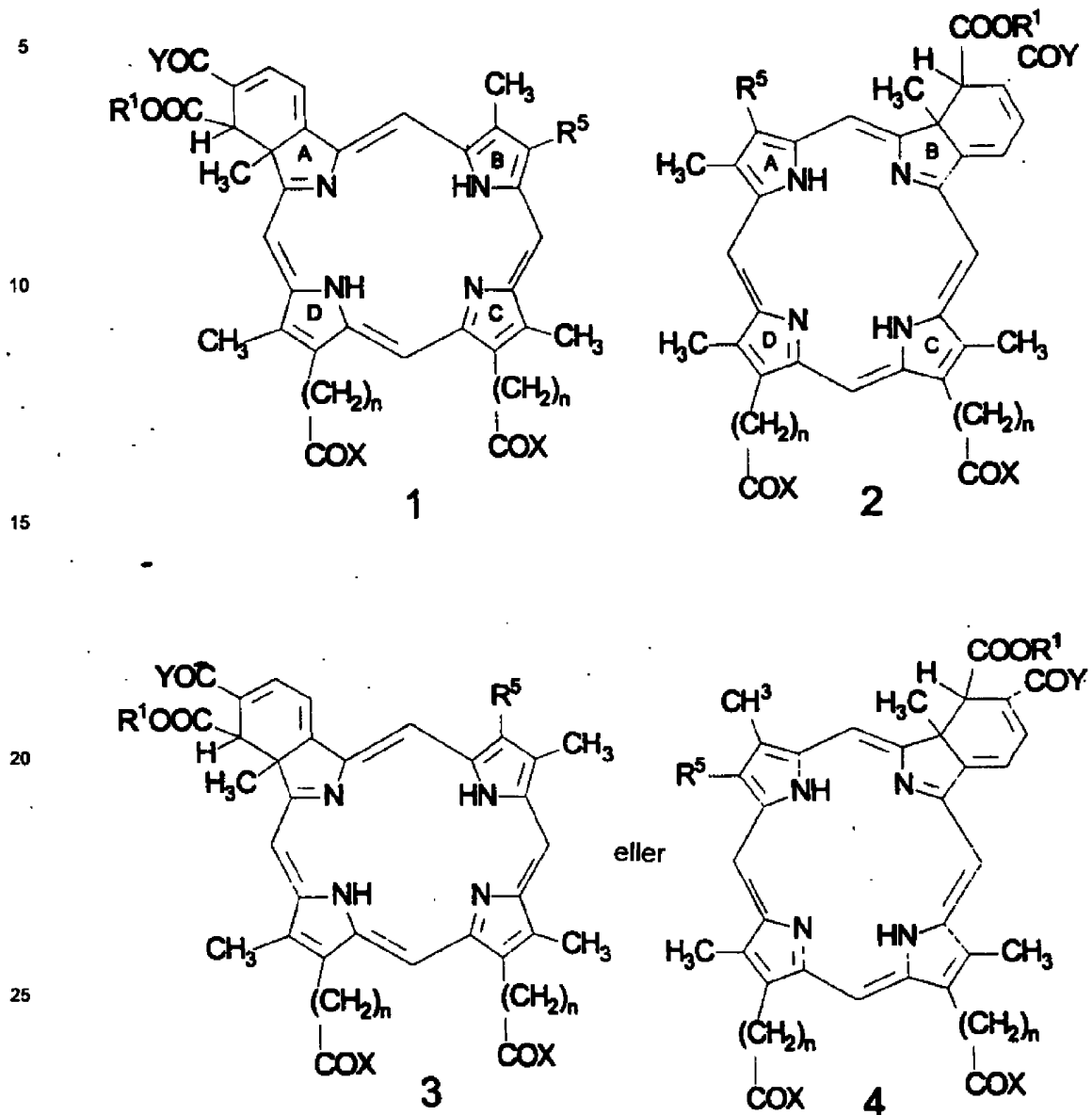
15

Biofordelingsdata for B3 (tumor:vevsforhold) oppnådd i M1 (radbdomyosar-
koma) tumor-bærende mus ble også evaluert på forskjellige tidspunkter. I løpet
av den første timen etter intravenøs administrering av 4 mg/kg B3, var tumor:vevs-
forhold for muskel og hud henholdsvis 1,5-2,0 og 3,1:3,9. Lymfeknuter ga forhold
20 på 0,7. Resultatene viser foretrukket akkumulering av B3 i tumor og andre prolifere-
rative vev (lymfeknuter) i motsetning til normalt ikke-prolifererende vev. Da denne
foretrukne akkumulering ble observert kort etter B3-administrering, kan denne fo-
tosensitivator aktiveres med lys kort etter injeksjonen derav, hvilket er gunstig i
klinisk anvendelse.

25

Patentkrav

1. Forbindelse, karakterisert ved formelen



og salter og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav,

hvor

R^1 er alkyl (1-6C);

Y er -OH;

n er et heltall 0-6,

hver X er uavhengig $-\text{OH}$ eller OR^4 ; hvori R^4 er en usubstituert hydrokarbonrest med 1-10C; og

R^5 er vinyl eller et derivat derav, som kan oppnås ved addisjon eller oksydasjon av vinylgruppen.

5

2. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at n er 2; og/eller

hvori R^5 er vinyl, $-\text{CHOR}'$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOR}'$, $-\text{CH}(\text{OR}')\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{OR}')\text{CH}_2\text{OR}'$, $-\text{CH}(\text{SR}')\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{NR}')_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CN})\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{COOR}')\text{CH}_3$,

10 $-\text{CH}(\text{OOCR}')\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{NR}'\text{COR}')\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CONR}'_2)\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{halo})\text{CH}_3$, eller
 $-\text{CH}(\text{halo})\text{CH}_2(\text{halo})$, hvori R' er H, eller en hydrokarbonrest (1-6C), eventuelt substituert med en heteroatom-holdig substituent, eller hvori R^5 er en organisk gruppe med mindre enn 12C som stammer fra direkte eller indirekte derivatisering fra vinylgruppen, eller hvori R^5 omfatter en gruppe inneholdende 1-3 tetrapyrrol-type

15 kjerner; og/eller

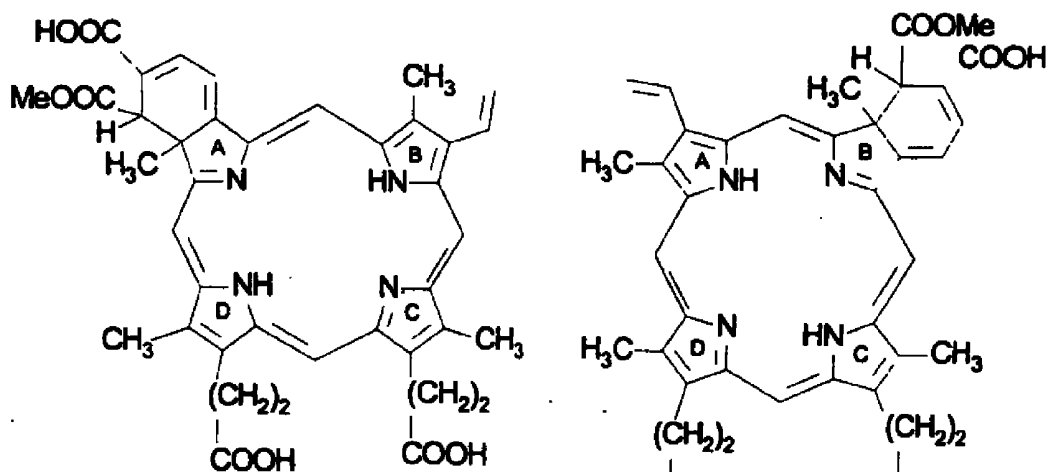
hvori Y og begge X er $-\text{OH}$.

3. Forbindelse ifølge krav 2, karakterisert ved at R^5 er vinyl, og hvori Y og begge X er $-\text{OH}$; og

20 hvori n er 2.

4. Forbindelse ifølge krav 3, karakterisert ved at "trisyren" har formelen

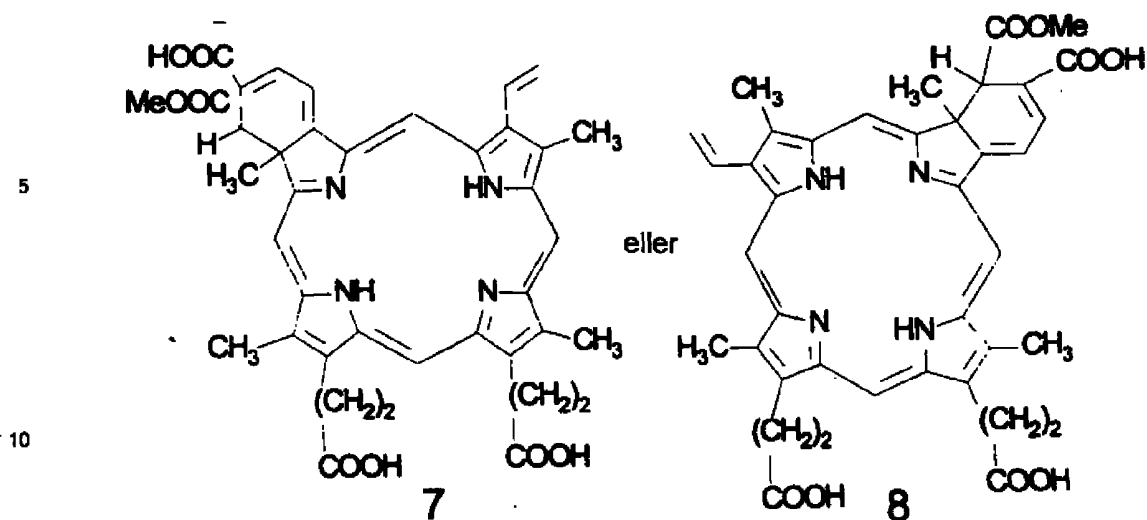
25



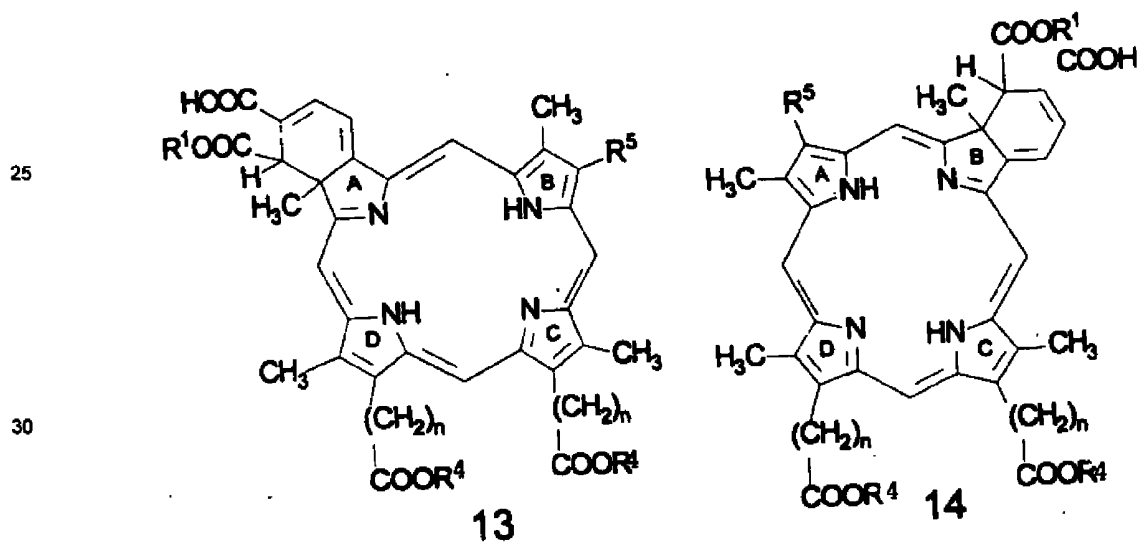
30

5

6

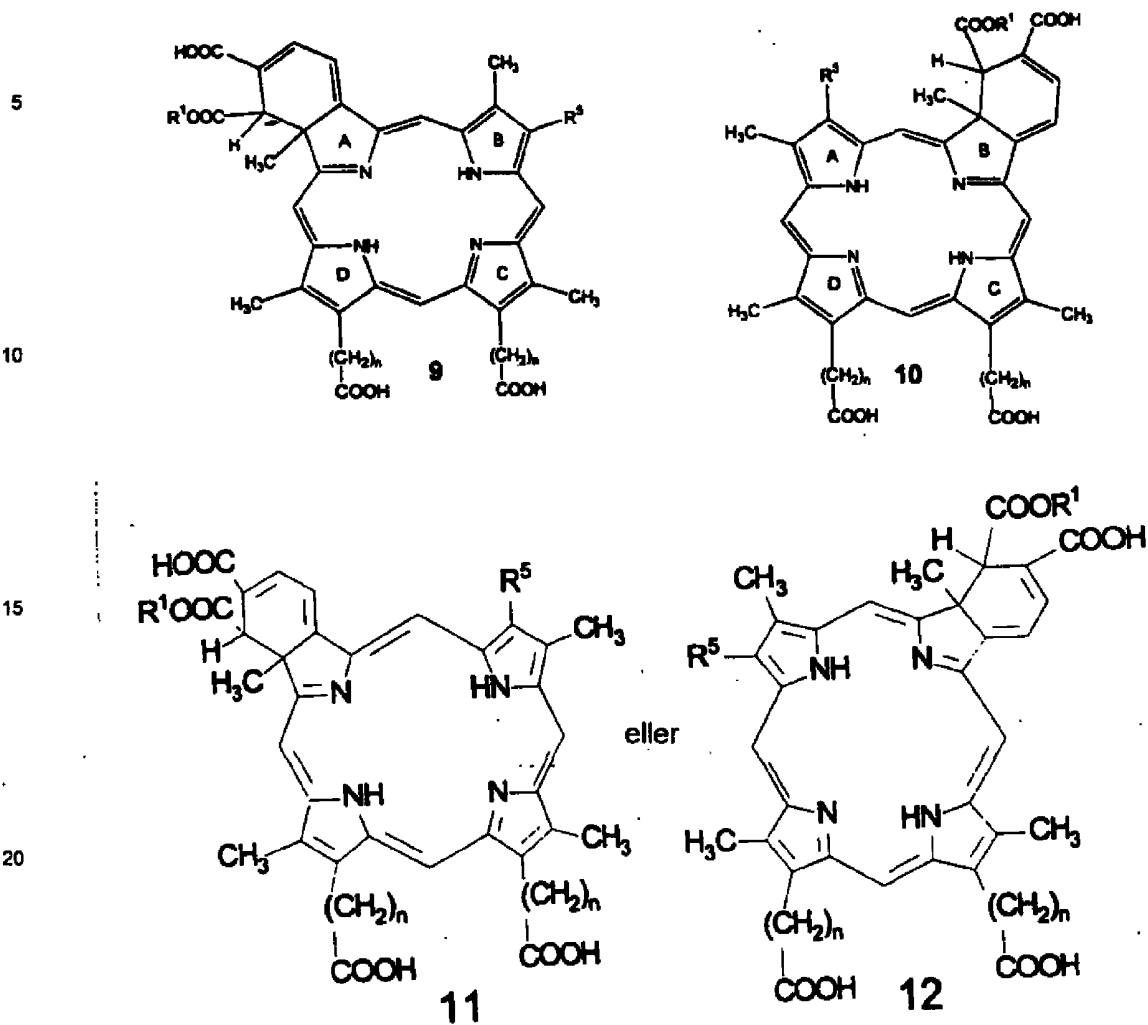


5. Forbindelse ifølge hvert af kravene 1-2, karakteriseret ved at både X og Y er $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.
6. Forbindelse ifølge krav 1 eller 2, karakteriseret ved at Y er OH og begge X er $-\text{OR}^4$, hvori R^4 er lavere alkyl(1-4C).
7. Forbindelse ifølge krav 6, karakteriseret ved at den har formelen



hvori n er 2 og R^5 er vinyl.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av en produktforbindelse med formelen

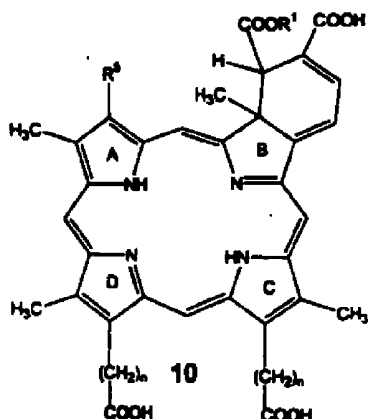
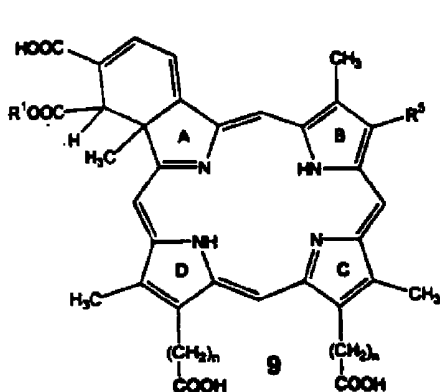


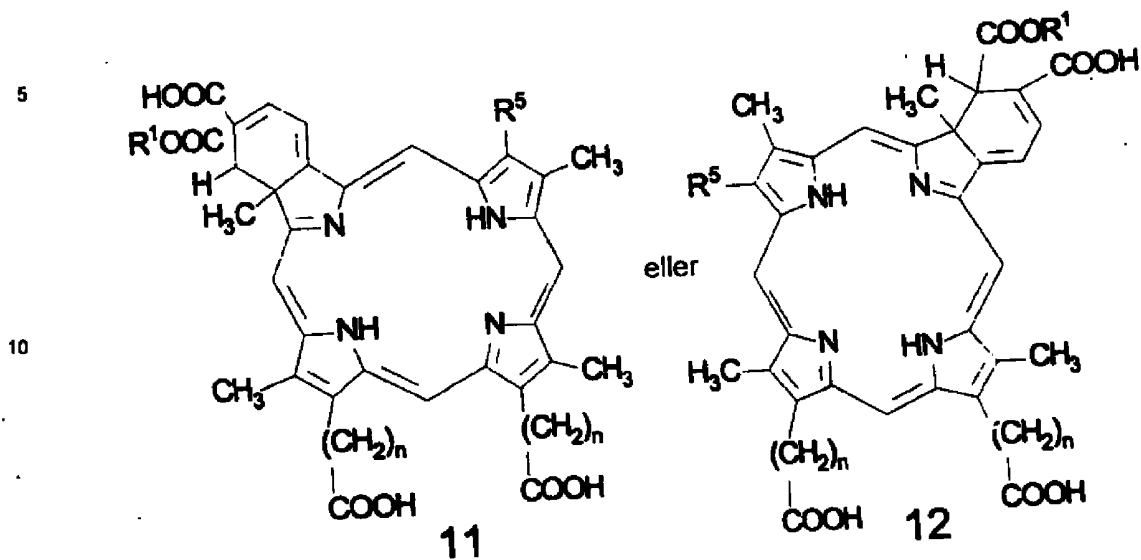
- 25 og salter og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav;
 hvori R^1 er alkyl (1-6C);
 n er et heltall 1-6; og
 hvori R^5 er vinyl eller et derivat derav, som kan oppnås ved addisjon eller
 oksidasjon av vinylgruppen,;
- 30 hvilken fremgangsmåte omfatter behandling av en høyere forestret form av nevnte
 produktforbindelse eller salt, metallisert form, merket form eller konjugeret form
 derav,
 med en base og løsningsmidler i tilstrekkelig tid til å gi avestring slik at produkt-
 forbindelsen oppnås.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte be-
 handling utføres i en inert atmosfære som forhindrer oksydasjon; og/eller
 at nevnte base er natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, litiumhydroksyd, kalsium-
 5 hydroksyd, bariumhydroksyd, kromhydroksyd eller tetraalkylammoniumhydroksyd;
 og/eller
 at løsningsmidlet er DMSO, en lavmolekylær alkohol, DMF, THF eller vann eller
 blandinger derav; og/eller
 at nevnte inerte atmosfære tilveiebringes med nitrogen, helium eller argongass;
 10 og/eller
 at nevnte behandling utføres ved en temperatur på ca. 0-60°C; og/eller
 at nevnte behandling utføres ved romtemperatur i ca. 2-48 timer.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9;
 15 k a r a k t e r i s e r t v e d at enhver produktforbinelse eller dens salt, metalliserte
 form, merkede form eller konjugerte form oppløses i vann og tilsettes tilstrekkelig
 syre til å utfelle produktforbindelsen.

11. Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse med formel 1-4 eller salter
 20 eller metalliserte eller merkede eller konjugerte former derav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at R¹ er alkyl (1-6C); Y er -OH, som kan oppnås ved
 addisjon eller oksydasjon av vinylgruppen, X er uavhengig -OH eller OR⁴, hvor
 R⁴ er en usubstituert hydrokarbonrest med 1-10C; -OR³;
 n er et heltall 0-6; og R⁵ er vinyl eller et derivat derav; som kan oppnås ved addi-
 25 sjon eller oksydasjon av vinylgruppen- omfattende behandling av en karboksylak-
 tivert form av en utgangsforbindelse med formelen:





og saltene og/eller metalliserte og/eller merkede og/eller konjugerte former derav;

20 hvori R^1 er alkyl (1-6C);

n er et heltall 1-6; og

hvis R^5 er vinyl eller et derivat derav;

25 med R^3OH eller HNR^2_2 under betingelser som er tilstrekkelige til å danne en forbindelse med formlene 1-4 eller de metalliserte eller merkede eller konjugerte former derav, hvori Y og begge X enten er $-OR^3$ eller NR^2_2 .

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, karakterisert ved at den aktiverte karboksyl oppnås ved behandling av fri karboksylgrupper i nevnte utgangsforbindelse med et aktiverende middel.

30

13. Fremgangsmåte ifølge krav 11, karakterisert ved at Y og begge X er $-OR^3$; og hvori $-OR^3$ er $-OCH_2CH_2OH$ og $-R^3OH$ er etylenglykol.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 12, karakterisert ved at aktiveringsmidlet er TSTU eller BTTU.

15. Farmasøytisk blanding, karakterisert ved at den omfatter forbindelsen ifølge hvert av kravene 1-10 i blanding med en farmasøytisk akseptabel eksipient.

16. Anvendelse av forbindelsene ifølge hvert av kravene 1-10 til fremstilling av et fotoaktivt middel.

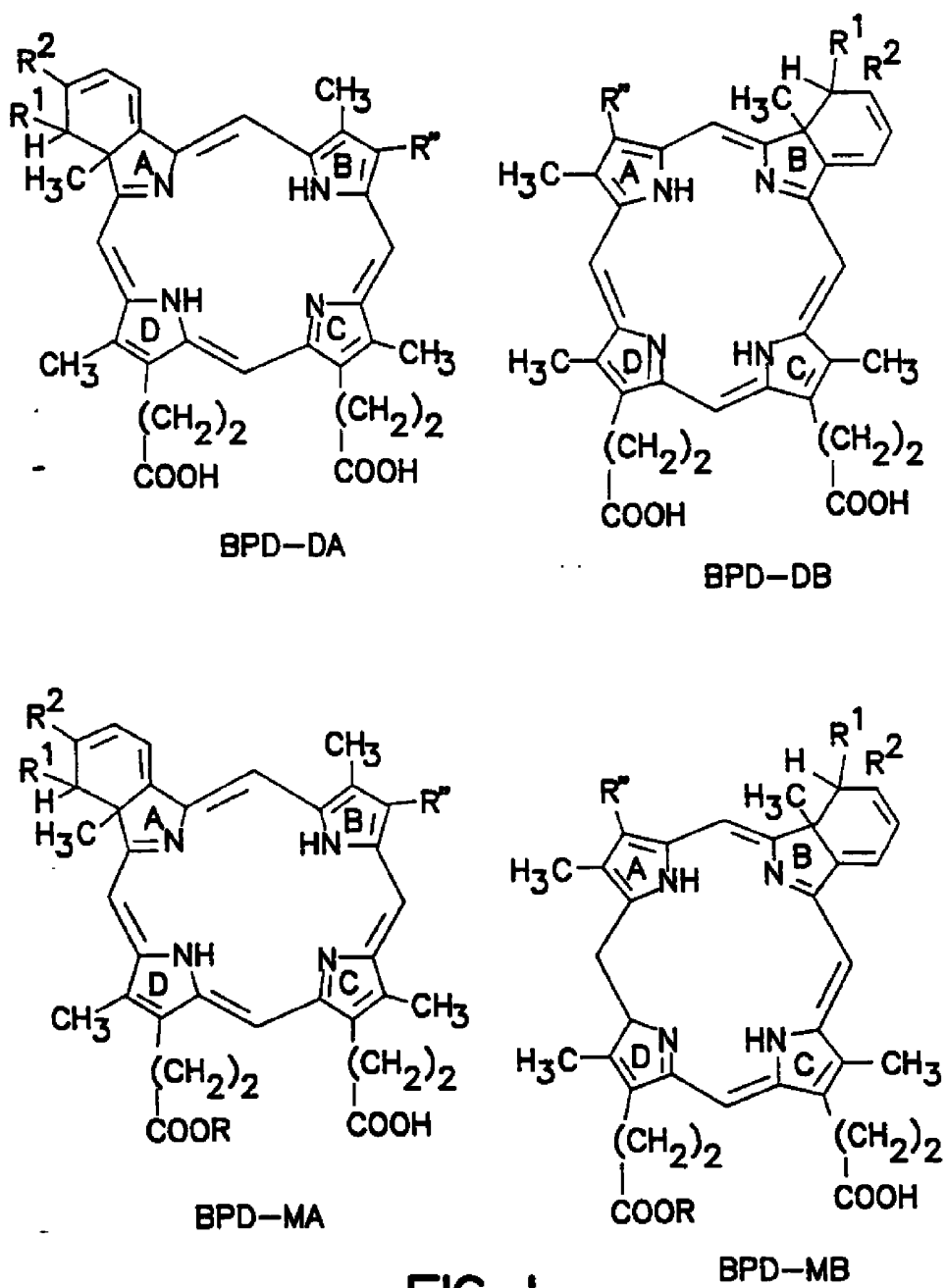


FIG. 1

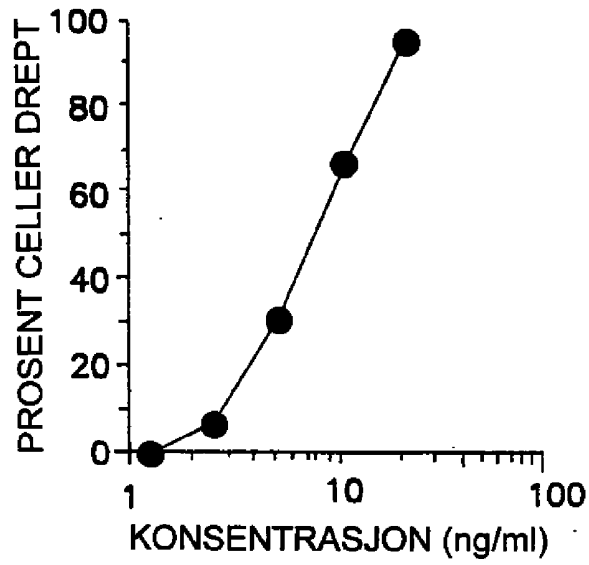


FIG. 2A

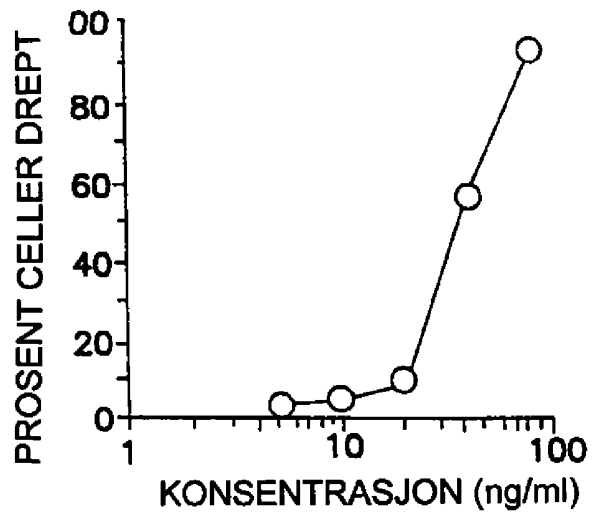


FIG. 2B

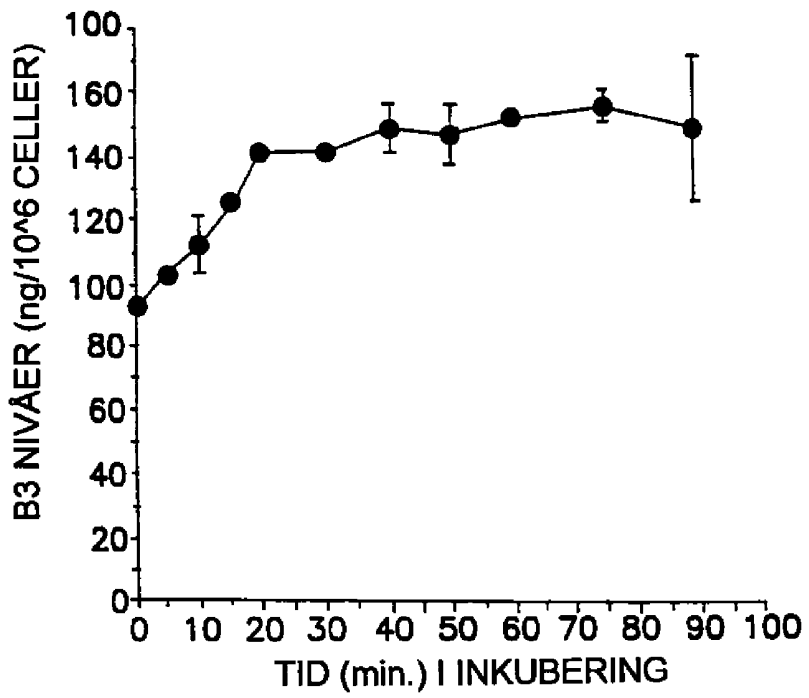
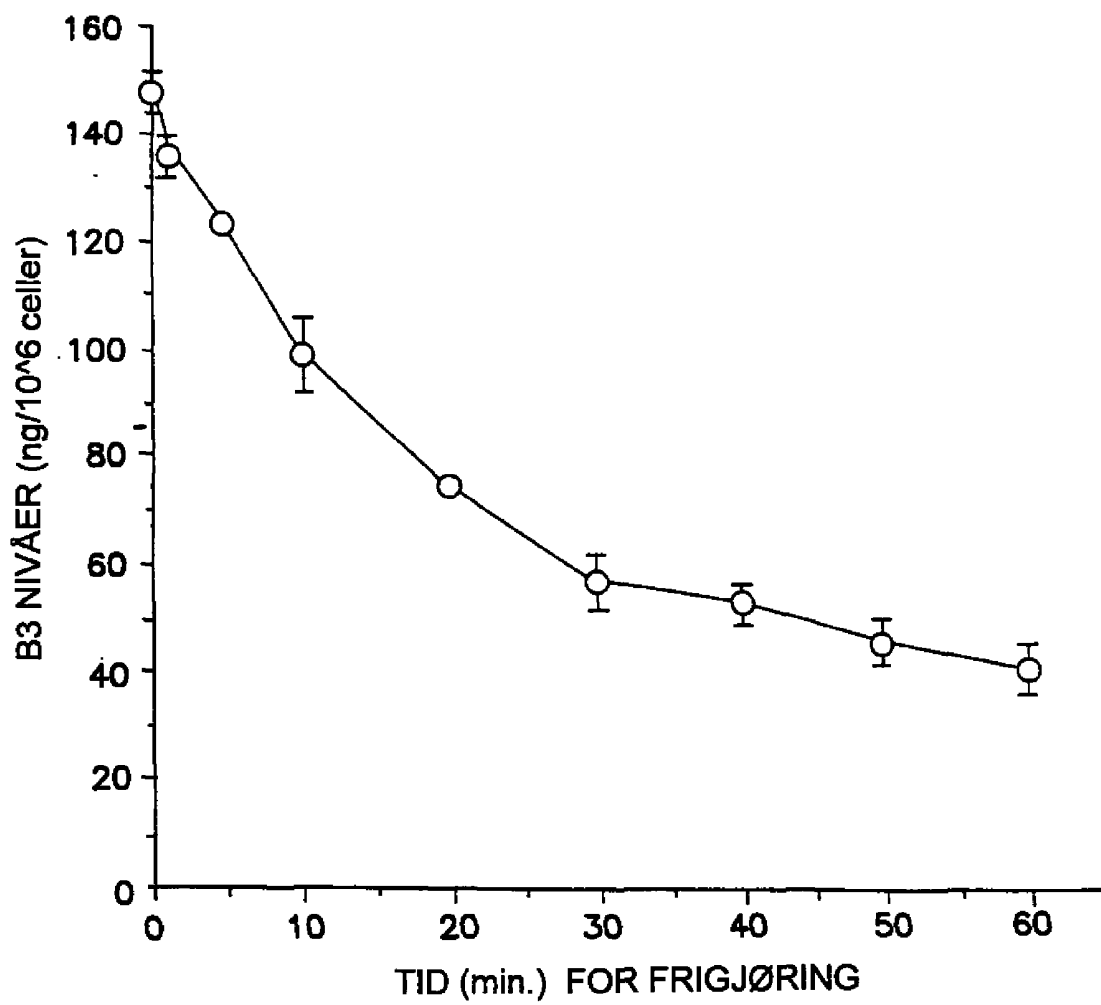


FIG. 3

**FIG. 4**

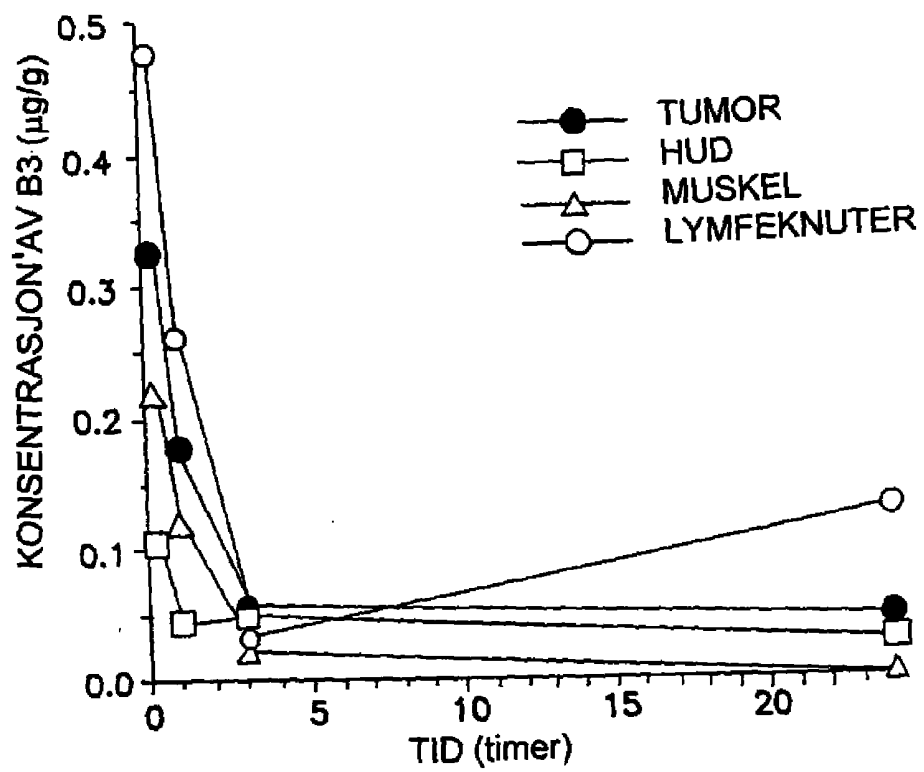


FIG. 5