



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 978**

51 Int. Cl.:

C07C 227/00 (2006.01)

C07C 229/22 (2006.01)

C07C 309/30 (2006.01)

C07F 9/11 (2006.01)

A01N 37/44 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05727585 .1**

96 Fecha de presentación : **28.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1731500**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54

Título: **Sal de fosfato de ácido 5-aminolevulínico, proceso para producir la misma y uso de la misma.**

30

Prioridad: **30.03.2004 JP 2004-99670**
30.03.2004 JP 2004-99671
30.03.2004 JP 2004-99672
30.11.2004 JP 2004-345661
25.02.2005 JP 2005-51216
25.02.2005 JP 2005-51217
25.02.2005 JP 2005-51218

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73

Titular/es: **COSMO OIL Co., Ltd.**
1-1, Shibaura 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8528, JP

72

Inventor/es: **Tachiya, Naohisa;**
Nishikawa, Seiji;
Higo, Mai;
Tanaka, Tohru;
Ishizuka, Masahiro y
Okada, Hideki

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 355 978 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sal de fosfato de ácido 5-aminolevulínico, proceso para producir la misma y uso de la misma.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico que es útil en los campos, por ejemplo, de los microorganismos, fermentación, animales, medicamentos y plantas; a un proceso para producir la misma; a una composición médica que comprende la misma; y a una composición de activador de plantas que comprende la misma.

Técnica antecedente

Se conoce que el ácido 5-aminolevulínico es útil, por ejemplo, para la producción de V B₁₂, la producción de la enzima hemo, el cultivo microbiano y la producción de porfirina en el campo de la fermentación microbiana, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Referencia No de patente 1), esterilización, diagnóstico de *Haemophilus*, materiales derivados, depilación, terapia del reumatismo (Referencia No de patente 2), terapia del cáncer (Referencia No de patente 3), terapia del trombo (Referencia No de Patente 4), diagnóstico durante operación de cáncer (Referencia No de patente 5), cultivo de células animales, corte con UV, investigación del metabolismo del hemo, cuidado del pelo, diagnóstico de intoxicación con metales pesados y porfiria y prevención de anemia en el campo de la terapia animal y, por ejemplo, para productos químicos agrícolas en el campo de plantas.

Por otro lado, el método de producción del ácido 5-aminolevulínico se conoce solamente como su clorhidrato y se han descrito métodos que usan ácido hipúrico (Referencia de Patente 1), cloruro de monoéster del ácido succínico (Referencia de Patente 2), furfurilamina (Referencia de Patente 3), hidroximetilfufural (Referencia de Patente 4), éster metílico del ácido oxovalérico (Referencia de Patente 5) o anhídrido succínico (Referencia de Patente 6) como el material.

Sin embargo, ya que el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico contiene ácido clorhídrico, es necesario tener en cuenta la corrosión del aparato y la generación de una estimulación causada por el cloruro de hidrógeno vaporizado durante el proceso de producción y el proceso de formación de compuestos y dispersión, de tal forma que es preferible adoptar una contramedida para evitar las mismas.

Además, en el caso de la administración oral de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico o su aplicación a la piel en un ser humano, se añade una estimulación de abrasamiento a la lengua o la piel. Por consiguiente, el interés se ha dirigido a una sal de ácido 5-aminolevulínico que tenga una menor estimulación que la del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico, como el ácido 5-aminolevulínico a usar en el campo de la medicina.

Además, ya que el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico tiene una propensión a degradarse parcialmente de 130 a 156°C y degradarse completamente a 156°C, tiene el problema de ser capaz de resistir con dificultad a un tratamiento de esterilización por calor a alta temperatura.

Un método de esterilización mediante exposición a radiación se conoce como un método para resolver este problema (Referencia de Patente 7), pero este método requiere un aparato de exposición a radiación.

Por consiguiente, para realizar la esterilización mediante un método de esterilización por calor general y cómodo, es necesario mejorar la resistencia térmica del ácido 5-aminolevulínico.

Además, aunque el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico se usa en el campo de plantas (Referencia de Patente 8), cuando se usa mezclando con nitrato de plata o un componente bactericida similar usado generalmente para plantas, la precipitación del cloruro de plata se genera en algunos casos a través de la reacción del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico con nitrato de plata, lo que requiere una gran atención desde el punto de vista funcional debido a la posibilidad de inutilizar la pulverización del agente debido al atascamiento de la boquilla del pulverizador. Además, cuando una solución acuosa de clorhidrato de ácido 5-aminolevulínico se aplica directamente a una fruta, la coloración de la fruta en ocasiones es insuficiente cuando está presente el ión de cloruro.

Además, aunque una solución acuosa que contiene ión de ácido 5-aminolevulínico e ión de nitrato se ha sugerido, el nitrato del ácido 5-aminolevulínico todavía no se ha aislado (Referencia No de patente 6).

60	Referencia de Patente 1:	JP-A-48-92328
	Referencia de Patente 2:	JP-A-62-111954
	Referencia de Patente 3:	JP-A-2-76841
65	Referencia de Patente 4:	JP-A-6-172281

ES 2 355 978 T3

Referencia de Patente 5: JP-A-7-188133

Referencia de Patente 6: JP-A-9-316041

5 Referencia de Patente 7: JP-T-2001-514243

Referencia de Patente 8: JP-A-4-338305

10 Referencia No de Patente 1: **Peter W. et al.**, *J. Am. Acad Dermatol.*, 31, 678-680 (1994)

Referencia No de Patente 2: **Kenneth T.**, Patente de Estados Unidos 5.368.841 (1994)

Referencia No de Patente 3: **Hillemanns P. et al.**, *Int. J. Cancer*, 85, 649-653 (2000)

15 Referencia No de Patente 4: **Ichiro Yamada et al.**, *Abstracts of Papers, The Japanese Orthopedic Association* (1988)

20 Referencia No de Patente 5: **Kamasaki N. et al.**, *Journal of Japan Society for Laser Medicine*, 22, 255-262 (2001)

Referencia No de Patente 6: **Baxter C. S. et al.**, *Toxicology And Applied Pharmacology*, 47, 477-482 (1979)

25 El documento US 6.559.183 B1 describe una composición que comprende una nanoemulsión que contiene una sustancia activa seleccionada entre ácido 5-aminolevulínico, un compuesto de sal del mismo, un compuesto de complejo del mismo y un compuesto de adición del mismo, precursores del mismo y metabolitos del mismo y un vehículo, formado por al menos un lípido y al menos un emulsionante, en una fase acuosa. La composición se describe como útil en una terapia fotodinámica de enfermedades asociadas con proliferación celular.

30

Descripción de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

35 La presente invención es para proporcionar una sal novedosa del ácido 5-aminolevulínico que tiene una baja estimulación o que puede resistir un tratamiento de esterilización por calor a alta temperatura, un método de producción de la misma, una composición para uso de tratamiento médico que comprende la misma y una composición de activador de planta que comprende la misma.

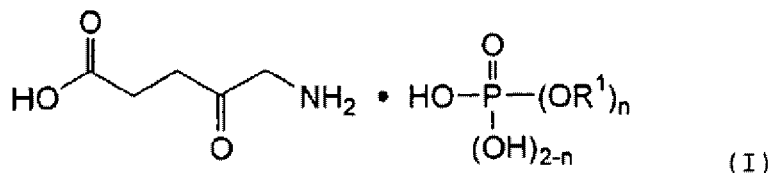
40

Medios para resolver los problemas

45 Teniendo en cuenta tales circunstancias reales, los presentes inventores han realizado intensos estudios y han hallado como resultado que un fosfato del ácido 5-aminolevulínico puede satisfacer los requisitos que se han descrito anteriormente y se puede obtener eluyendo ácido 5-aminolevulínico absorbido sobre una resina de intercambio catiónico y mezclando el eluato con ácido fosfórico.

Por tanto, la presente invención se refiere a una sal de fosfato de ácido 5-aminolevulínico de fórmula (I):

50



55

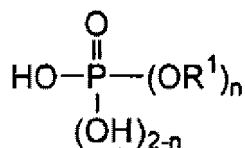
60 en la que R¹ individualmente es cada uno H, alquilo C₁₋₁₈, alquenilo C₂₋₁₈, aralquilo C₇₋₂₆ o fenilo; y n es un número entero de 0-2.

Además, la invención se refiere a un proceso para producir esta sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico, que comprende

65

(i) eluir un ácido 5-aminolevulínico adsorbido sobre una resina de intercambio catiónico y

(ii) mezclar el eluato con un ácido fosfórico de la fórmula



en la que R¹ individualmente es cada uno H, alquilo C₁₋₁₈, alqueno C₂₋₁₈, aralquilo C₇₋₂₆ o fenilo; y n es un número entero de 0-2.

Aún adicionalmente, la invención se refiere a una composición que comprende la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico, así como al uso de la sal del ácido 5-aminolevulínico (a) para la fabricación de un agente médico para el tratamiento fofodinámico o diagnóstico fotodinámico; y (b) como un activador de plantas.

Las realizaciones preferidas son como se definen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Efecto de la invención

La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención es una sustancia que es sencilla de manejar, debido a que no desprende un olor desagradable o un olor estimulante. Además, esto muestra una baja naturaleza estimulante sobre la piel y la lengua y su permeabilidad a través de la piel también es excelente, de tal forma que una composición que comprenda esto es útil como un agente para tratamiento o diagnóstico fotodinámico. Aun adicionalmente, esto tiene un elevado punto de descomposición y una alta resistencia térmica en comparación con su clorhidrato. De acuerdo con el método de producción de la presente invención se puede producir una sal de fosfato de ácido 5-aminolevulínico de forma cómoda y eficaz. Además, ya que su concentración de ión de cloruro es baja cuando se prepara en una solución acuosa, difícilmente tiene lugar el daño por cloruro al administrar la misma a plantas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra una relación entre la concentración y el pH de soluciones acuosas de sal de ácido 5-aminolevulínico.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de una celda de diálisis.

La Figura 3 es un gráfico que muestra un resultado de ensayo de permeabilidad cutánea de cerdo de fosfato y clorhidrato de ácido 5-aminolevulínico.

La Figura 4 es un gráfico que muestra un resultado del ensayo de permeabilidad de epidermis de cebolla de fosfato y clorhidrato de ácido 5-aminolevulínico.

Mejor modo para realizar la invención

En la fórmula que se ha descrito anteriormente (I), el alquilo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono representado por R¹ puede ser lineal, ramificado o cíclico. El alquilo lineal o ramificado incluye, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *tert*-pentilo, 2-metilbutilo, *n*-hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, etilbutilo, *n*-heptilo, 2-metilhexilo, *n*-octilo, isooctilo, *tert*-octilo, 2-etilhexilo, 3-metilheptilo, *n*-nonilo, isononilo, 1-metiloctilo, etilheptilo, *n*-decilo, 1-metilnonilo, *n*-undecilo, 1,1-dimetilnonilo, *n*-dodecilo, *n*-tridecilo, *n*-tetradecilo, *n*-pentadecilo, *n*-hexadecilo, *n*-heptadecilo y *n*-octadecilo. El alquilo cíclico o el alquilo que contiene un grupo cíclico incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, 2-ciclopropiletilo, 2-ciclobutiletilo, 2-ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, 2-ciclohexiletilo, cicloheptilmetilo, 2-ciclooctiletilo, 3-metilciclohexilo, 4-metilciclohexilo, 4-etilciclohexilo, 2-metilciclooctilo, 3-(3-metilciclohexil)propilo, 2-(4-metilciclohexil)etilo, 2-(4-etilciclohexil)etilo y 2-(2-metilciclooctil)etilo. Como el alquilo que se ha descrito anteriormente que tiene de 1 a 18 átomos de carbono, se prefiere un alquilo que tenga de 1 a 16 átomos de carbono y se prefiere particularmente metilo, etilo, *n*-butilo, *n*-hexadecilo o 2-etilhexilo.

El alqueno que tiene de 2 a 18 átomos de carbono incluye, por ejemplo, vinilo, alilo, isopropenilo, 2-butenilo, 2-metilalilo, 1,1-dimetilalilo, 3-metil-2-butenilo, 3-metil-3-butenilo, 4-pentenilo, hexenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, 4-metilciclohexenilo, 4-etilciclohexenilo, 2-ciclopenteniletilo, ciclohexenilmetilo, cicloheptenilmetilo, 2-ciclobuteniletilo, 2-cicloocteniletilo, 3-(4-metilciclohexenil)propilo, 5-(4-etilciclohexenil)pentilo, oleilo, vacenilo, linoleilo y linolenilo, y se prefiere oleilo.

ES 2 355 978 T3

El aralquilo que tiene de 7 a 26 átomos de carbono es preferiblemente uno que está constituido por alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono. El alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono incluye, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclohexilo, y el arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono incluye, por ejemplo, pentilo y naftilo. Entre los aralquilos que tienen de 7 a 26 átomos de carbono se prefieren bencilo o fenetilo y se prefiere particularmente el bencilo. El arilo en el aralquilo puede estar sustituido con 1 a 3 sustituyentes, tales como el alquilo que se ha descrito anteriormente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *n*-butoxi, isobutoxi y *tert*-butoxi; hidroxilo; amino, nitro, ciano; halógeno, tal como fluoro, cloro, bromo y yodo; y carboxilo.

La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención puede ser un sólido o una solución. El sólido indica un cristal, pero puede ser un hidrato. La solución indica un estado en el que la sal está disuelta o dispersada en un disolvente que incluye agua y su pH se puede ajustar con un agente de ajuste del pH o similares. Además, el disolvente que incluye agua se puede usar mezclando dos de los mismos. El agente de ajuste del pH incluye, por ejemplo, tampones que usan ácido fosfórico, ácido bórico, ácido ftálico, ácido cítrico, ácido succínico, tris, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido ftálico, ácido maleico y sales de los mismos o tampones de Good.

Una solución acuosa es preferible como la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en la forma de solución. La concentración de la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en la solución acuosa es preferiblemente del 0,01 ppm en peso al 10% en peso, más preferiblemente de 0,1 ppm en peso al 5% en peso y aún más preferiblemente de 1 ppm en peso al 1% en peso. Además, el pH de esta solución acuosa es preferiblemente de 3 a 7, más preferiblemente de 3,5 a 7 y aún más preferiblemente de 4 a 7. Además, en esta solución acuosa puede estar contenida una sal diferente de la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención y en ese caso, la concentración del ión de cloruro es preferiblemente del 50% en moles o menos, más preferiblemente del 10% en moles o menos y aún más preferiblemente del 3% en moles o menos. En este contexto, la expresión "no contiene ión de cloruro" significa que la concentración de ión de cloruro es sustancialmente del 0% en moles, concretamente es preferible que la misma sea igual o inferior al límite de detección cuando se mide, por ejemplo, mediante cromatografía iónica (0,1 ppm).

La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención se puede producir eluyendo ácido 5-aminolevulínico adsorbido sobre una resina de intercambio catiónico con una solución acuosa que contiene iones y mezclando el eluato con ácido fosfórico. Además, la sal del fosfato del ácido 5-aminolevulínico se puede obtener como un sólido, cristalizando el mismo mediante la adición de un mal disolvente al líquido mixto. El ácido 5-aminolevulínico a adsorber sobre una resina de intercambio catiónico no está limitado particularmente y su pureza y similares tampoco están limitados. Es decir, los que se producen de acuerdo con los métodos descritos en los documentos JP-A-48-92328, JP-A-62-111954, JP-A-2-76841, JP-A-6-172281, JP-A-7-188133 y similares, y el documento JP-A-11-42083, las soluciones de reacción química y los líquidos de fermentación antes de la purificación de los mismos, artículos comercializados también se pueden usar. En este contexto se usa preferiblemente el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

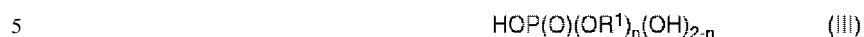
La resina de intercambio catiónico puede ser una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida o una resina de intercambio catiónico débilmente ácida. Además también se puede usar de forma adecuada una resina de quelato. Entre las mismas es preferible una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida. Como el tipo de la resina de intercambio catiónico fuertemente ácida se prefieren aquellas en las que los grupos sulfonato están unidos a resinas del sistema de poliestireno.

La adsorción del ácido 5-aminolevulínico por la resina de intercambio catiónico se puede realizar pasando una solución de ácido 5-aminolevulínico preparada disolviendo en un disolvente apropiado a través de la resina de intercambio catiónico. Tal disolvente no está limitado particularmente, siempre que se pueda disolver en el mismo ácido 5-aminolevulínico y los ejemplos incluyen agua; dimetilsulfóxido; alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol; amidas tales como N,N-dimetilformamida y N,N-dimetilacetamida; y piridinas; y agua, dimetilsulfóxido, metanol o etanol es preferible y agua, metanol o etanol es particularmente preferible. Además se pueden usar dos o más disolventes mezclando los mismos. Además, cuando se usa una solución de reacción química o un líquido de fermentación antes de la purificación se puede realizar la retirada del disolvente de reacción o dilución con un disolvente apropiado. En este contexto, el pH del disolvente que se ha descrito anteriormente y la solución de reacción química o líquido de fermentación antes de la purificación se puede ajustar usando el agente de ajuste del pH que se ha descrito anteriormente.

Aunque la solución acuosa que contiene iones a usar en la elución no está particularmente limitada, se prefieren aquellas en las que están disueltos en agua ácidos fosfóricos, ácido nítrico, ácidos sulfónicos, hidróxidos o carbonatos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, amonio, una amina, un compuesto que contiene un grupo amino, aquellas en las que está disuelto en agua hidróxido de litio, hidróxido sódico, hidróxido de magnesio, hidróxido de potasio, hidróxido cálcico, hidróxido de cesio, hidróxido de bario, carbonato de amonio, hidrogenocarbonato de amonio, carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, carbonato sódico-potásico, bicarbonato potásico, amonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina o trietilamina son más preferibles y aquellas en las que está disuelto amonio en agua son particularmente preferibles. Estas soluciones acuosas se pueden usar en combinación de dos o más. La concentración del amonio acuoso es preferiblemente de 0,01 a 10 N, más preferiblemente de 0,1 a 3 N.

ES 2 355 978 T3

Como los ácidos fosfóricos a mezclar con el eluato de ácido 5-aminolevulínico se puede usar un compuesto representado por la fórmula (III)



en la que R¹ y n son como se han definido anteriormente. Los ácidos fosfóricos incluyen, por ejemplo, ácido fosfórico; monoésteres de ácido fosfórico, tales como metil fosfato, etil fosfato, *n*-butil fosfato, 2-etilhexil fosfato, hexadecil fosfato, bencil fosfato, oleil fosfato y fenil fosfato; y diésteres de ácido fosfórico tales como dimetil fosfato, dietil fosfato, di-*n*-butil fosfato, di(2-etilhexil) fosfato, dihexadecil fosfato, dibencil fosfato, dioleil fosfato y difenil fosfato y metil fosfato, etil fosfato, oleil fosfato, fenil fosfato, dimetil fosfato, dietil fosfato, di-*n*-butil fosfato, di(2-etilhexil) fosfato, dihexadecil fosfato, dibencil fosfato, dioleil fosfato o difenil fosfato es particularmente preferible. Además también se puede usar de forma adecuada ácido hipofosfórico o ácido fosfórico.

Los ácidos fosfóricos pueden ser hidratos o sales y se pueden usar de forma adecuada los que están disueltos o dispersos en un disolvente apropiado. La cantidad de mezcla de los ácidos fosfóricos es preferiblemente de 1 a 500 veces la cantidad molar, más preferiblemente de 1 a 500 veces la cantidad molar y aún más preferiblemente de 1 a 50 veces la cantidad molar, basándose en la cantidad de elución de ácido 5-aminolevulínico deducida de la cantidad del ácido 5-aminolevulínico adsorbido. En este contexto, la cantidad de elución de ácido 5-aminolevulínico deducida de la cantidad del ácido 5-aminolevulínico adsorbido varía dependiendo de los tipos de la resina de intercambio catiónico y eluyente y la cantidad de paso del eluyente, pero generalmente es del 90 al 100% basándose en la cantidad de ácido 5-aminolevulínico adsorbido.

Los ejemplos del disolvente incluyen agua; dimetilsulfóxido; alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol e isobutanol; amidas tales como N,N-dimetilformamida y N,N-dimetilacetamida; y piridinas; y agua, dimetilsulfóxido, metanol o etanol es preferible y agua, metanol o etanol es particularmente preferible. Además se pueden usar dos o más disolventes mezclando los mismos.

El mal disolvente no está particularmente limitado, siempre que un sólido precipite en el mismo y los ejemplos de tal disolvente incluyen alcoholes, tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, *n*-butanol e isobutanol; éteres tales como dietil éter, diisopropil éter, dioxano, tetrahidrofurano y dimetoxietano; ésteres tales como metil acetato, etil acetato, propil acetato, isopropil acetato y γ -butirolactona; cetonas tales como acetona y metil etil cetona; y nitrilos tales como acetonitrilo y benzonitrilo; y se prefiere metil acetato, etil acetato, γ -butirolactona, acetona o acetonitrilo y se prefiere particularmente metil acetato, γ -butirolactona, acetona o acetonitrilo. Además se pueden usar dos o más disolventes mezclando los mismos.

La temperatura para la elución mediante una solución acuosa que contiene iones y la mezcla del eluato con ácido fosfórico, ácido nítrico o ácido sulfónico es preferiblemente de -20 a 60°C, más preferiblemente de -10 a 30°C, en condiciones tales que el eluato y el ácido fosfórico, ácido nítrico o ácido sulfónico no solidifiquen.

La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención se puede producir a partir de un ácido 5-aminolevulínico en el que el grupo amino está protegido con un grupo protector hidrolizable, tal como aquel en el que el grupo amino está protegido con un grupo acilo o en el que un grupo protector capaz de formar un esqueleto molecular de tipo 1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-ilo está unido al grupo amino. Además, la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención también se puede preparar mediante un método de producción diferente del de la presente invención, es decir, un método en el que se hidroliza 2-fenil-4-(β -alcoxicarbonilpropionil)oxazolin-5-ona usando ácidos fosfóricos deseados o un método en el que se permite que una sal diferente de las de ácidos fosfóricos, tal como clorhidrato de ácido 5-aminolevulínico, se ponga en contacto con ácidos fosfóricos deseados en un disolvente. Se pueden usar compuestos de la fórmula que se ha descrito anteriormente (III) como los ácidos fosfóricos y se pueden usar los que se han descrito anteriormente como los disolventes de reacción.

Como se muestra más adelante en los Ejemplos, la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico no genera olores desagradables en comparación con el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico y particularmente en el caso del fosfato de ácido 5-aminolevulínico tiene una débil estimulación para la piel y la lengua y no se encuentra mutagenicidad en el mismo. Además, es excelente en su permeabilidad a través de la piel animal y la epidermis vegetal. Por consiguiente, de forma similar al caso del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico, el fosfato del ácido 5-aminolevulínico es útil como un agente para tratamiento fotodinámico o diagnóstico fotodinámico en animales incluyendo al ser humano. Como el agente para el tratamiento o diagnóstico fotodinámico se pueden ilustrar agentes para el tratamiento o diagnóstico fotodinámico de cáncer, enfermedad infecciosa, reumatismo, trombo, espinillas y similares.

Al usar la sal del ácido 5-aminolevulínico como un agente para el tratamiento o diagnóstico fotodinámico, se puede usar en condiciones conocidas convencionalmente y más específicamente, se puede usar basándose en las prescripciones y métodos descritos en los documentos JP-T-2001-501970 (WO98/30242), JP-T-4-500770 (WO91/01727), JP-T-2005-501050 (WO2003/011265), JP-T-2004-506005 (WO2002/013788), JP-T-2001-518498 (WO99/17764) y JP-T-8-507755 (WO94/17797).

Específicamente, una enfermedad se puede tratar fotodinámicamente administrando una cantidad eficaz de la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico a un animal (incluyendo el ser humano) y realizando la irradiación con luz. Además, una enfermedad se puede diagnosticar fotodinámicamente detectando fluorescencia de la parte afectada.

5 La composición para el tratamiento fotodinámico o el diagnóstico fotodinámico, que contiene la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico, se puede preparar en formas de dosificación tales como preparaciones externas para la piel, inyecciones, preparaciones orales y supositorios. Al preparar las mismas en estas formas de dosificación se pueden usar vehículos farmacéuticamente aceptables. Como los vehículos se usan, por ejemplo, agua, aglutinantes, disgregantes, agentes solubilizantes, lubricantes, agentes voluminizantes y cargas.

10 La dosis varía dependiendo, por ejemplo, de la edad, peso corporal, síntoma, efecto terapéutico, método de administración y periodo de tiempo de tratamiento, pero en general, se administra dentro del intervalo de 10 mg a 10 g, más preferiblemente de 100 mg a 1 g, una vez por kg de peso corporal por adulto, una vez o varias veces al día.

15 Además, cuando se usa la sal del fosfato del ácido 5-aminolevulínico, por ejemplo, en aplicaciones de plantas, puede contener, por ejemplo, un componente de fertilizador usado generalmente. Como el componente de fertilizador se pueden ilustrar las sustancias descritas en el documento JP-A-4-338305 (Patente de Estados Unidos 5.298.482, documento EP-A-0514776).

20 La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico también es útil como un activador de plantas. Al usar ésta como un activador de plantas, se puede usar en condiciones conocidas convencionalmente y, específicamente, se puede usar para una planta mediante el método descrito en el documento JP-A-4-338305 (Patente de Estados Unidos 5.298.482, documento EP-A-0514776).

25 Más específicamente, un agente de tratamiento de follaje y un agente de tratamiento de suelo se puede ilustrar como el activador de plantas. Además, este agente se puede absorber antes de plantar una planta o un esqueje o añadir al agua en el momento del cultivo hidropónico.

30 Cuando se usa la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico como un agente de tratamiento de follaje, es preferible que contenga la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en el mismo a una concentración de 1 a 1.000 ppm, particularmente de 10 a 500 ppm y usar el mismo en una cantidad de 10 a 100 litros, particularmente de 50 a 300 litros por 10 áreas.

35 Cuando la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico se usa como un agente de tratamiento de suelo, es preferible usar la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en una cantidad de 1 a 1.000 g, particularmente de 10 a 50 g por 10 áreas.

40 Cuando se usa la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico como un agente de tratamiento de follaje aplicando la misma antes de la plantación, es preferible que contenga la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico a una concentración de 1 a 1.000 ppm, particularmente de 10 a 500 ppm y usar esto en una cantidad de 10 a 100 litros, particularmente de 50 a 300 litros por 10 áreas. En este contexto, también es preferible usar prácticamente la misma cantidad en el momento de cultivo hidropónico.

45 Como la planta a tratar se pueden ilustrar cereales, verduras, árboles frutales, flores y plantas ornamentales, árboles, semillas, patatas, cebolletas, pastos.

Ejemplos

50 La presente invención se describe a continuación con más detalle basándose en los Ejemplos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

55 *Producción de fosfato del ácido 5-aminolevulínico*

Una columna se cargó con 180 ml de una resina de intercambio iónico fuertemente ácida (AMBERLITE IR120B Na, fabricada por Japan Organo). La resina de intercambio iónico se usó después de convertir la misma desde el tipo de ión de sodio al tipo de ión de hidrógeno mediante el tratamiento con ácido clorhídrico. A continuación se disolvieron 20,00 g (119 mmol) de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en 1000 ml de agua de intercambio iónico y se pasaron a través de dicha columna y después se pasaron 1000 ml de agua de intercambio iónico a través de la misma. A continuación se pasó lentamente amonio acuoso 1 N a través de la misma para recoger 346 ml de eluato amarillo. El eluato recogido de este modo se añadió a 16 ml de ácido fosfórico al 85% (H_3PO_4 238 mmol) y se concentró usando un evaporador. Al líquido concentrado se añadieron 400 ml de acetona, seguido de agitación vigorosamente con una agitadora y después se dejó reposar a 4°C durante 16 horas. El sólido precipitado de este modo se recuperó mediante filtración por succión y se lavó con 500 ml de acetona. El sólido obtenido de este modo se secó con presión reducida durante 12 horas para obtener 23,04 g (101 mmol) de la sustancia de interés. Sus datos de propiedad física se muestran a continuación.

ES 2 355 978 T3

Punto de fusión: 108-109°C

RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) δ ppm: 2,67 (t, 2H, CH_2), 2,86 (t, 2H, CH_2), 4,08 (s, 2H, CH_2)

5 RMN de ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ ppm: 30 (CH_2), 37 (CH_2), 50 (CH_2), 180 (CO), 207 (COO)

Datos de análisis elemental: para $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$

10	Calc:	C 26,21%,	H 5,28%;	N 6,11%
	Hallado	C25,6%;	H 5,2%;	N 6,1%

15 Contenido de PO_4^{3-} mediante cromatografía iónica:

Calc.: 41,45%

Hallado: 43%

20

Condiciones de análisis de cromatografía iónica; columna de separación: IonPac AS 12A fabricada por Nippon Dionex, eluyente: solución acuosa que contiene Na_2CO_3 y NaHCO_3 (Na_2CO_3 : 3,0 mmol/l, NaHCO_3 : 0,5 mmol/l), caudal: 1,5 ml/min, cantidad de muestra introducida: 25 μl , temperatura de columna: 35°C, detector: detector de conductividad eléctrica.

25

Ejemplo 2

30 *Producción de sal del ácido 5-aminolevulínico (di-n-butil fosfato)*

Una columna se cargó con 180 ml de una resina de intercambio iónico fuertemente ácida (AMBERLITE IR120B Na, fabricado por Japan Organo). La resina de intercambio iónico se usó después de convertir la misma desde el tipo de ión de sodio al tipo de ión de hidrógeno mediante el tratamiento con ácido clorhídrico. A continuación se disolvieron 20,00 g (119 mmol) de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en 1000 ml de agua de intercambio iónico y se pasaron a través de dicha columna y después se pasaron 1000 ml de agua de intercambio iónico a través de la misma. A continuación se pasó lentamente amonio acuoso 1 N a través de la misma para recoger 321 ml de eluato amarillo. El eluato recogido de este modo se añadió a 50,00 g (238 mmol) de di-n-butil fosfato y se concentró usando un evaporador. Al líquido concentrado se añadieron 400 ml de acetona, seguido de agitación vigorosamente con una agitadora y después la mezcla se dejó reposar a -25°C durante 16 horas. El sólido precipitado de este modo se recuperó mediante filtración por succión. El sólido obtenido de este modo se secó con presión reducida durante 12 horas para obtener 14,67 g (43 mmol) de la sustancia de interés. Sus datos de propiedad física se muestran a continuación.

45 RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) δ ppm: 0,75 (6H, CH_3), 1,23 (4H, CH_2), 1,41 (4H, CH_2), 2,46 (2H, CH_2), 2,59 (2H, CH_2), 3,66 (4H, CH_2), 3,80 (2H, CH_2)

RMN de ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ ppm: 14 (CH_3), 20 (CH_2), 29 (CH_2), 34,2 (CH_2), 34,3 (CH_2), 36 (CH_2), 67 (CH_2O), 176 (COO), 204 (CO)

50 Ejemplo 3

Medición de olor de fosfato del ácido 5-aminolevulínico

55 Cinco sujetos olieron directamente una solución acuosa del fosfato del ácido 5-aminolevulínico producido en el Ejemplo 1 (un líquido mixto del eluato de la columna y ácido fosfórico) y su sólido y evaluaron sus olores de acuerdo con los siguientes criterios. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Criterios de evaluación:

60 0: no oido.

1: oido pero no desagradable.

65 2: olor desagradable.

ES 2 355 978 T3

Ejemplo Comparativo 1

Los olores se evaluaron del mismo modo que en el Ejemplo 3, excepto por que se usó una solución acuosa de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico y su sólido. En este contexto, la solución acuosa de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico se preparó usando un sólido de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico, ácido clorhídrico y agua de intercambio iónico de tal modo que sus concentraciones de ácido 5-aminolevulínico y de ión de cloruro respectivamente adquirieron las mismas concentraciones molares que las concentraciones del ácido 5-aminolevulínico e ión de fosfato de la solución acuosa del fosfato del ácido 5-aminolevulínico del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Ejemplo 3	Solución acuosa	0	0	0	0	0
	Sólido	0	0	0	0	0
Ejemplo Comparativo 1	Solución acuosa	2	2	2	2	2
	Sólido	1	1	1	1	1

Ejemplo 4

Los olores se evaluaron del mismo modo que en el Ejemplo 3, excepto porque se usó una solución acuosa preparada disolviendo 0,5 g de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en 1 ml de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo Comparativo 2

Los olores se evaluaron del mismo modo que en el Ejemplo 3, excepto por que se usó una solución acuosa preparada disolviendo 0,5 g de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en 1 ml de agua. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Sujeto	A	B	C	D	E
Ejemplo 4	0	0	0	0	0
Ejemplo Comparativo 2	1	0	1	1	0

Basándose en las Tablas 1 y 2, los olores no se encontraron en la solución acuosa de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en comparación con la solución acuosa del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico. Ya que la medida antiolor y la medida de gas anticorrosivo necesarias para producir una solución acuosa de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico estaban simplificadas, el manejo era más cómodo. Además, el sólido de fosfato del ácido 5-aminolevulínico tampoco generó olores en comparación con el sólido de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico, de tal forma que los manejos tales como pesada y dispensación eran más cómodos.

Ejemplo 5

Medición de acidez de solución acuosa del fosfato del ácido 5-aminolevulínico

Se prepararon respectivamente soluciones acuosas de fosfato del ácido 5-aminolevulínico y soluciones acuosas de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico que tenían una concentración de 1 a 1000 mM y se midió su acidez a 25°C usando un pH metro. Los resultados se muestran en la Figura 1. Como es evidente a partir de la Figura 1, en el caso de la misma concentración, la acidez de la solución acuosa de fosfato del ácido 5-aminolevulínico era menor que la de la solución acuosa del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

ES 2 355 978 T3

Ejemplo 6

Ensayo de estimulación de fosfato del ácido 5-aminolevulínico

5 Cada uno de los cinco sujetos evaluó el sentido del gusto del fosfato del ácido 5-aminolevulínico obtenido en el Ejemplo 1, de acuerdo con los siguientes criterios poniendo directamente 5 mg de su sólido sobre la lengua. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Criterios de evaluación:

0: no se siente ninguna estimulación.

1: existe una estimulación pero débil.

2: existe una fuerte estimulación.

Ejemplo Comparativo 3

El sentido del gusto se evaluó del mismo modo que en el Ejemplo 6, excepto porque se usaron 5 mg de sólido de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Ejemplo 6	1	1	1	1	1
Ejemplo Comparativo 3	2	2	2	2	2

Como se muestran en la Tabla 3, no se halló estimulación fuerte en el fosfato del ácido 5-aminolevulínico en comparación con el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

Ejemplo 7

Ensayo de mutagenicidad (retromutación) usando microorganismos (bacterias)

Se realizó un ensayo de acuerdo con “Standard of Mutagenicity Tests Using Microorganisms” (Ministerio de Trabajo, Notificación N° 77 1988) (revisión parcial por Ministerio de Trabajo, Notificación N° 67, 1997) y “Regarding the Tests Concerning Novel Chemical Substances and the like” (con fecha de 21 de noviembre del 2003: Yaku-Shoku-Hatsu N° 1121002, 2003.11.13 Sei-Kyoku, N° 2, Kan-Ho-Ki-Hatsu N° 031121002). A 0,1 ml de una solución preparada disolviendo 5% (p/v) de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en agua destilada (Wako Pure Chemical Industries) se añadieron 0,5 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,4) (0,5 ml de mezcla S9 en el caso del ensayo de activación de metabolismo) y adicionalmente a estos se añadieron 0,1 ml de cada suspensión de cepa de ensayo (se usaron 5 cepas de *Salmonella typhimurium* sin histidina TA 100, TA 98, TA 1535 y TA 1537 y *Escherichia coli* sin triptófano WP2uvrA (Japan Bioassay Research Center)), seguido de pre-incubación a 37°C durante 20 minutos con agitación. Después de la finalización del cultivo, 2,0 ml de agua de agar blando mantenido a 45°C con antelación se añadieron a esto y se depositaron sobre un medio de placa de agar mínimo en glucosa. En este caso se dispusieron dos placas para cada dosificación. Sin embargo, se dispusieron 3 placas para un control de disolvente (control negativo). Después de cultivar a 37°C durante 48 horas se observó la presencia o ausencia de inhibición de desarrollo de cada cepa de ensayo bajo un microscopio estereoscópico y se contó el número de colonias de retromutación aparecidas. En la medición se midió un área interna de aproximadamente 80 mm de diámetro de una placa de 86 mm de diámetro (84 mm de diámetro interno) usando un analizador de colonias automático (CA-11: fabricado por System Science), y se calculó realizando una corrección de área y contando la corrección de pérdida usando un ordenador personal. Sin embargo, ya que la fiabilidad del analizador de colonias automático está reducida cuando el número de colonias es 1.500 o más, se midieron manualmente 5 puntos en la placa bajo el microscopio estereoscópico para realizar la corrección de área del valor promedio. Se realizó un ensayo de ajuste de dosificación en 7 dosificaciones diluidas a una proporción común de 4, usando una dosificación de 5.000 µg/placa como el máximo, que es la máxima dosificación definida por la directriz. Como resultado, independientemente de la presencia o ausencia de mezcla S9 no se observó un aumento del número de colonias de retromutación, en un factor de dos veces o más en comparación con el control de disolvente, en cada cepa. No se halló la inhibición del desarrollo de las cepas por esta sustancia a ensayar. Tampoco se halló la precipitación de la sustancia a ensayar. Por tanto, este ensayo se realizó ajustando 5 dosificaciones diluidas a una proporción común de 2, usando una dosificación de 5.000 µg/placa como el máximo, que es la dosificación máxima definida por la directriz. Como resultado, independientemente de la presencia o ausencia de actividad metabólica, no se observó aumento en el número de colonias de retromutación en un factor de 2 veces o más en comparación con el control de disolvente en cada cepa (Tabla 4), de tal forma que se confirmó que el fosfato del ácido 5-aminolevulínico no tiene la capacidad de inducción de mutación.

Tabla 4

Presencia o ausencia del sistema de activación de metabolismo	Dosificación de fosfato del ácido 5-aminolevulínico ($\mu\text{g/placa}$)	El número de retromutación (colonias/placa)									
		Tipo de sustitución de pares de bases		Tipo de cambio de fase							
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537					
mezcla S9(-)	Control de disolvente	92	108	7	7	28	26	23	24	4	6
		83	(94)	12	(9)	23	(26)	18	(22)	5	(6)
	313	87		10		25		9		3	
		82	(85)	10	(10)	36	(31)	7	(8)	1	(2)
	625	84		13		27		5		1	
		95	(90)	6	(10)	28	(28)	12	(9)	5	(3)
	1250	84		8		28		8		4	
		114	(99)	11	(10)	33	(31)	3	(6)	2	(3)
	2500	76		6		25		15		2	
		82	(79)	5	(6)	28	(27)	17	(16)	2	(2)
		115		11		25		9		4	
	5000	99	(107)	3	(7)	36	(31)	7	(8)	1	(3)
112		143	12	10	29	30	30	33	8	8	
Control de disolvente	90	(115)	11	(11)	27	(29)	23	(29)	9	(8)	
	146		11		31		13		2		
313	122	(134)	10	(11)	17	(24)	11	(12)	7	(5)	
	107		13		40		9		3		
625	96	(102)	6	(10)	24	(32)	9	(9)	9	(6)	

Presencia o ausencia del sistema de activación de metabolismo	Dosificación de fosfato del ácido 5-aminolevulínico (µg/placa)	El número de retromutación (colonias/placa)				
		Tipo de sustitución de pares de bases		Tipo de cambio de fase		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
	1250	128	10	34	14	6
		129 (129)	14 (12)	29 (32)	27 (21)	6 (6)
	2500	109	8	23	7	5
		102 (106)	8 (8)	27 (25)	15 (11)	3 (4)
	5000	130	6	25 (28)	20	6
		136 (133)	8 (7)	30	21 (21)	2 (4)
	Nombre	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
mezcla S9 no requerida	Dosificación (µg/placa)	0,01	0,5	0,01	0,1	1,0
	Colonias/placa	564	203	155	575	4068
mezcla S9 requerida	Nombre	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
	Dosificación (µg/placa)	1,0	2,0	10,0	0,5	2,0
	Colonias/placas	1275	137	1230	661	257
		1184 (1230)	138 (138)	1304 (1267)	668 (665)	267 (262)
Marcas sustancias de objeto positivo						
AF-2: 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida, NaN ₃ : azida sódica, ICR-191: diclorhidrato de 6-cloro-9-[3-(2-cloroetilamina)-propilamino]-2-metoxiacridina, 2-AA: 2-aminoantraceno						

ES 2 355 978 T3

Ejemplo 8

Ensayo de toxicidad oral aguda

5 Este ensayo se realizó de acuerdo con la Directriz de la OECD N° 423 “Acute Oral Toxicity-Acute Toxicity Grading Method” (adoptada el 17 de diciembre de 2001). Se trataron ratas hembra en ayunas (especie Sprague-Dawley CD) de 3 animales por grupo con fosfato del ácido 5-aminolevulínico a una dosis de 300 mg por kg de peso corporal. Además, otras ratas hembra en ayunas de dos o más grupos se trataron con una dosis de 2000 mg por kg de peso corporal. Se observaron después de la administración de forma continua durante 2 semanas. Como resultado no se encontró muerte en todas las ratas (Tabla 5), no había signos de toxicidad sistémica, se observó ganancia de peso corporal general en todas las ratas (Tabla 6) y se estimó que la dosis letal del 50% (DL50) oral aguda era mayor de 2.500 mg por kg de peso corporal.

TABLA 5

15

Dosis mg/kg	Animal N°	Animales muertos por hora después de la administración				Animales muertos por día después de la administración														
		Hembra	0,5	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
300	1-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	2-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

20

25

30

35

40

TABLA 6

45

Dosis mg/kg	Animal N°	Peso corporal (g) por el número de días		
		Hembra	0	7
300	1-0	205	242	263
	1-1	214	262	287
	1-2	221	250	289
2000	2-0	210	240	257
	2-1	221	258	274
	2-2	180	221	247
	3-0	208	244	260
	3-1	222	259	275
	3-2	214	252	271

50

55

60

65

ES 2 355 978 T3

Ejemplo 9

Ensayo de simulación cutánea aguda

5 Este ensayo se realizó de acuerdo con la Directriz de la OECD N° 404 “Acute Skin Stimulation/Corrosive Test” (adoptada el 17 de julio de 1992) y las Instrucciones del Comité de la UE 92/69/EEC B4 Método de Toxicidad Aguda (Estimulación Cutánea). Usando tres conejos blancos New Zealand (machos) se aplicó una solución preparada disolviendo 0,5 g de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en 0,5 ml de agua destilada (pH 3,1) durante 4 horas a 2,5 cm de área cuadrada de la piel no lesionada afeitada de cada animal que después se observó durante 1, 24, 48 y 72 horas. Como resultado se observaron puntos muy ligeramente rojos en el intervalo de 24 horas, pero se convirtieron en normales cuando se observaron después de 24 horas (Tablas 7 y 8). Además, cuando una solución preparada disolviendo 0,5 g de fosfato del ácido 5-aminolevulínico en 0,5 ml de agua destilada (pH 3,1) se aplicó durante 3 minutos o 1 hora a 2,5 cm de área cuadrada de la piel no lesionada afeitada de un conejo blanco New Zealand (macho) y el animal se observó durante 1, 24, 48 y 72 horas no se observó tampoco estimulación cutánea (Tablas 7 y 8). Basándose en esto, ya que el valor de P.I.I (índice de irritación cutánea primaria) fue 0,5, se confirmó que esta sal está fuera de la clasificación de la clasificación de estimulación de la recombinación actual de las Naciones Unidas de GHS y no se incluye en una sustancia estimulante. En este contexto, una solución preparada como un control disolviendo 0,5 g de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en 0,5 ml de agua destilada se consideró corrosiva por la Directriz de la OECD debido a que su pH era menor de 2,0 o inferior, de tal forma que el ensayo no se realizó.

TABLA 7

Estado de reacción cutánea	Periodo de observación (hora)	Conejo N° (números formados)			Total
		N° 33	N° 67	N° 68	
Formación de eritema y costra seca	1	1	1	1	3
	24	1	1	1	3
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
Formación de hidropesía y edema	1	0	0	0	0
	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
Números formados totales después de 24 horas y 72 horas: 3					
Índice de irritación primaria: $3/6 = 0,5$					

ES 2 355 978 T3

TABLA 8

Estado de reacción cutánea	Periodo de observación (hora)	Conejo N° (números formados)	
		N° 33	
		3 minutos de aplicación	1 hora de aplicación
Formación de eritema y costra seca	1	0	0
	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0
Formación de hidropesía y edema	1	0	0
	24	0	0
	48	0	0
	72	0	0

Ejemplo 10

Ensayo de permeación de epidermis animal

Usando una celda de diálisis (área efectiva 1,13 m², Figura 2), se agitaron 17 ml de solución salina fisiológica de pH 6,8 y se mantuvieron a 37°C en su capa aceptora. Se puso una capa total de piel de cerdo pretratada (epidermis + dermis) sobre un filtro de membrana y se dispuso sobre la celda de diálisis. A esta capa donadora se añadieron 0,5 ml de solución acuosa de fosfato del ácido 5-aminolevulínico 1 mM. Después se recogieron 0,2 ml de la solución en la capa aceptora en un periodo de tiempo predeterminado, la capa se complementó con una nueva solución salina fisiológica. Después se mezclaron 0,05 ml de la muestra recogida o líquido patrón con 3,5 ml de un líquido A (1 litro de una solución mixta de acetilacetona/etanol/agua = 15/10/75 (v/v/v) que contenía 4 g de cloruro sódico) y 0,45 ml de un líquido B (una solución preparada diluyendo 85 ml de formalina con 1 litro con agua) y la mezcla se trató térmicamente durante 30 minutos y después, tras 30 minutos, se enfrió con agua. Después de esto se midió la concentración del ácido 5-aminolevulínico mediante HPLC (esto se realizó en condiciones de análisis de caudal de 1,0 ml/minuto y temperatura de 25°C, usando un detector de fluorescencia de 473 nm en longitud de onda de excitación y 363 nm en longitud de onda de fluorescencia, usando una solución acuosa de metanol/ácido acético al 2,5% = solución de 40/60 (v/v) como la solución de elución y usando Wakosil-II 5C18HG, 4,6 mm x 150 mm, como la columna) y cada concentración se calculó a partir del área máxima del líquido patrón.

A continuación se realizó el mismo ensayo usando epidermis de cebolla en lugar de la piel de cerdo y cambiando la concentración de la solución acuosa de fosfato del ácido 5-aminolevulínico a 0,1 mM. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. Como se puede comprender a partir de las Figuras 3 y 4, el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico y el fosfato del ácido 5-aminolevulínico mostraron una permeabilidad similar en la piel de cerdo y en la epidermis de cebolla.

Ejemplos Comparativo 4

Se midió la permeabilidad del mismo modo que en el Ejemplo 10, excepto porque se usó clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en lugar del fosfato del ácido 5-aminolevulínico.

Se confirmó por esto que, aunque el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico causa una estimulación cuando se aplica directamente sobre la piel como se muestra en el Ejemplo 9, el fosfato del ácido 5-aminolevulínico no causa la estimulación cutánea y tienen la misma permeabilidad en la piel, mostrando de este modo que el fosfato del ácido 5-aminolevulínico es una sal más útil que el clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en ciertos tratamientos médicos (tratamiento fotodinámico y diagnóstico fotodinámico) y plantas.

ES 2 355 978 T3

Ejemplo 11

Ensayo sobre la generación de precipitación de cloruro de plata

5 En 10 ml de agua de intercambio iónico se disolvieron 0,5 g de fosfato del ácido 5-aminolevulínico y 0,5 g de nitrato de plata, se dejó que la mezcla reposara durante 5 minutos y se observó el estado del líquido. No se observó generación del precipitado. En este contexto se disolvieron 0,5 g del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico y 0,5 g de nitrato de plata en 10 ml de agua de intercambio iónico y se dejaron reposar durante 5 minutos y se observó el estado del líquido. Se observó generación del precipitado.

10

Ejemplo 12

Ensayo de coloración de manzana

15

El fosfato del ácido 5-aminolevulínico obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en agua de intercambio iónico hasta la concentración predeterminada mostrada en la siguiente tabla. Se añadió un dispersante ("Approach BI" fabricado por Maruwa Biochemical) al líquido a una concentración de 0,1% en peso. El pH se ajustó usando ácido fosfórico.

20

Se preparó una solución acuosa de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico del mismo modo, excepto porque el fosfato del ácido 5-aminolevulínico que se ha descrito anteriormente se cambió a clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico y el ácido fosfórico para el ajuste del pH se cambió a ácido clorhídrico.

25

El líquido preparado de este modo se pulverizó con una proporción de 2 litros por rama sobre tres ramas principales en las que había frutas jóvenes de una variedad de manzana "Fuji" pero que todavía no habían cambiado el color a rojo (15 de septiembre). Aproximadamente 2 meses más tarde (6 de noviembre) se recolectaron las manzanas y se examinó su grado de coloración. Se usó un colorímetro CR-200 fabricado por MINOLTA CAMERA para la medición del color. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

30

TABLA 9

35

40

45

50

55

	Lote	Coloración (valores L, a, b)		
		L	a	b
Fosfato del ácido 5-aminolevulínico	100 ppm (pH 5,0)	42,37	27,45	14,54
	200 ppm (pH 5,4)	42,43	31,06	14,63
	200 ppm (pH 2,0)	-	-	-
Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico	100 ppm (pH 5,0)	42,28	25,96	14,72
	200 ppm (pH 4,8)	42,34	30,92	14,41
	200 ppm (pH 2,0)	-	-	-
Sin tratamiento	Ácido 5-aminolevulínico (0)	42,03	25,16	14,66
-: Se observaron puntos grandes sobre las frutas				

60

En los valores L, a, b en la Tabla 9, L representa brillo, a representa rojo y b representa amarillo. Por consiguiente, un valor mayor de a significa un rojo más denso. La coloración de rojo fue más densa en el caso de fosfato del ácido 5-aminolevulínico que en el caso de clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

Ejemplo 13

65

Efectos de activación de plantas

Un total de 12 macetas, en las que se cargaron 600 g de tierra de cenizas volcánicas en una maceta de porcelana de 12 cm de diámetro interno y una planta de una comelinácea *Commelina communis* crecida hasta una altura de 15 cm

ES 2 355 978 T3

se plantó en la maceta, se prepararon y se pusieron bajo un entorno de temperatura constante de 20°C y se realizó el tratamiento de aplicación foliar una vez por día usando los siguientes líquidos de aplicación. Se observaron los estados de las hojas 21 días después de esto. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

5

TABLA 10

	Concentración (ppm)	0	1	2
Preparado disolviendo fosfato del ácido 5-aminolevulínico en agua corriente	1	6 plantas	5 plantas	1 planta
	10	7 plantas	3 plantas	2 plantas
	100	6 plantas	4 plantas	2 plantas
Preparado disolviendo clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en agua corriente	1	2 plantas	7 plantas	3 plantas
	10	5 plantas	5 plantas	2 plantas
	100	5 plantas	4 plantas	3 plantas
Preparado disolviendo fosfato sódico en agua corriente	1	4 plantas	3 plantas	5 plantas
	10	2 plantas	4 plantas	6 plantas
	100	3 plantas	2 plantas	7 plantas
Agua corriente		3 plantas	3 plantas	6 plantas
Criterios de valoración: 0: no se observó anomalía sobre la superficie de la hoja 1: se observó una región decolorada a amarillo sobre la superficie de la hoja 2: se observó una región necrótica sobre la superficie de la hoja				

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Basándose en los resultados de la Tabla 10 se observó un efecto de activación de planta similar o mayor al del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico en el fosfato del ácido 5-aminolevulínico.

60

Ejemplo 14

Efecto de regulación de crecimiento de planta

65

Se sumergieron semillas de arroz (*Akinishiki*) en solución acuosa de Benlate (fabricado por Sumika Takeda Engei) (200 veces) en durante un día entero y la noche y después se incubaron a 30°C en condición de oscuridad para realizar la aceleración de la germinación. Se seleccionaron semillas de estadio uniforme de pecho carinado, 10 semillas se

ES 2 355 978 T3

insertaron usando un par de pinzas en un surco en una lámina de polietileno expandido, que se realizó usando un cortador y esta lámina se dejó flotando sobre una placa de Petri alta llena con 150 ml de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de las concentraciones respectivas mostradas en la Tabla 11 y se incubaron a 25°C durante 24 horas con 5.000 lux de irradiación con luz continua. El número de repeticiones se ajustó en 3 repeticiones para cada concentración. El examen se realizó tres días después de esto y se midieron las longitudes de la primera vaina foliar y raíz seminal en cada lote para calcular sus proporciones con respecto a las del lote no tratado y para calcular los valores promedio de los mismos. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

Nombre del compuesto	Concentración (ppm)	Longitud de primera vaina foliar (%)	Longitud de raíz seminal (%)
Fosfato del ácido 5-aminolevulínico	1	102	106
	10	106	108
	100	101	101
Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico	1	107	103
	10	101	96
	100	98	109
Lote no tratado		100	100

El fosfato del ácido 5-aminolevulínico mostró un efecto de aceleración de crecimiento de planta similar o mayor al del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

Ejemplo 15

Efecto de mejora de tolerancia a salinidad

Una maceta de porcelana de 12 cm de diámetro interno que no tenía orificio de drenaje se llenó con 600 g de tierra de altura y se sembraron de 7 a 8 semillas de algodón (variedad; M-5 Acala), se cubrieron con 1 cm de espesor de la tierra y se dejaron crecer en un invernadero. Después de esto se realizó el tratamiento general y en el momento del desarrollo del foliolo se preparó un agente de mejora de la salinidad que contenía cada uno de los compuestos a ensayar con las respectivas concentraciones mostradas en la Tabla 12 y el 0,05% (v/v) de un dispersante (Neoesterin: fabricado por Kumiai Chemical Industry) y se aplicó al follaje a un volumen de aplicación de 100 litros por 10 áreas. Cada uno de los compuestos a ensayar se ajustó a la concentración mostrada en la Tabla 12. Cuatro días después de esto se disolvió cloruro sódico en una cantidad que se corresponde del 0 al 1,5% en peso por peso de tierra como se muestra en la Tabla 12 en 30 ml de agua y se añadió gota a gota a la tierra. Continuando el cultivo general se realizó el examen 23 días después de esto. El examen se realizó mediante observación a simple vista y los resultados del daño por sal se evaluaron basándose en las siguientes 6 etapas. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Etapas de evaluación:

0: no se observa absolutamente ningún daño por sal.

1: se observa un daño por sal muy débil.

2: se observa un daño por sal débil.

ES 2 355 978 T3

- 3: se observa un daño por sal obvio.
 4: se observa un fuerte daño por sal.
 5: el cuerpo vegetal se marchita debido al daño por sal.

TABLA 12

	Compuestos ensayados [concentración de tratamiento (ppm)]	Cantidad tratada con NaCl por peso de tierra (% en peso)				
		0	0,5	0,75	1	1,5
Ejemplo Comparativo	Sin tratamiento	0	1	2	3	5
Ejemplo	Fosfato del ácido 5-aminolevulínico (10)	0	0	1	2	3
	Fosfato del ácido 5-aminolevulínico (30)	0	0	0	1	2
	Fosfato del ácido 5-aminolevulínico (100)	0	1	2	3	4
	Fosfato del ácido 5-aminolevulínico (300)	0	1	1	2	3
Ejemplo Comparativo	Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico (10)	0	1	1	1	2
	Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico (30)	0	1	2	3	3
	Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico (100)	0	1	1	2	3
	Clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico (300)	0	0	1	1	2

Como se muestra en la Tabla 12, el fosfato del ácido 5-aminolevulínico mostró un efecto de mejora de la tolerancia a la salinidad similar o mayor al del clorhidrato del ácido 5-aminolevulínico.

Cuando la concentración de ión de cloruro en las soluciones acuosas de fosfato del ácido 5-aminolevulínico usadas en los ejemplos que se han descrito anteriormente se midió mediante cromatografía iónica en las siguientes condiciones, era igual o inferior al límite de detección (0,1 ppm) en cada muestra.

Las condiciones de medición son las siguientes; A: columna de separación (IonPacAS12A fabricada por Japan Dionex), B: precolumna (IonPac AG12A fabricada por Japan Dionex), C: solución de elución (una solución acuosa que contenía Na₂CO₃: 3,0 mmol/l y NaHCO₃: 0,5 mmol/l), D: caudal (1,5 ml/min), E: supresor (ASRS (modo de reciclaje, valor actual 50 mA)), F: cantidad de muestra introducida (25 µl), G: temperatura de horno de temperatura constante (35°C) y H: detector (detector de conductividad eléctrica).

Aplicabilidad industrial

La sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de la presente invención es una sustancia que es sencilla de manejar debido a que no desprende un olor desagradable o un olor estimulante. Además, esto muestra una naturaleza estimulante baja sobre la piel y la lengua y su permeabilidad a través de la piel y similares también es excelente, de tal forma que una composición que comprenda esto es útil como un agente para tratamiento o diagnóstico fotodinámico. Además, esto tiene un alto punto de descomposición y una alta resistencia térmica en comparación con su clorhidrato. De acuerdo con el método de producción de la presente invención, una sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico se puede producir de forma cómoda y eficaz. Además, ya que su concentración de ión de cloruro es baja cuando se prepara en una solución acuosa, el daño por cloro difícilmente tiene lugar al administrar la misma a plantas.

15

20

25

30

35

40

45

50

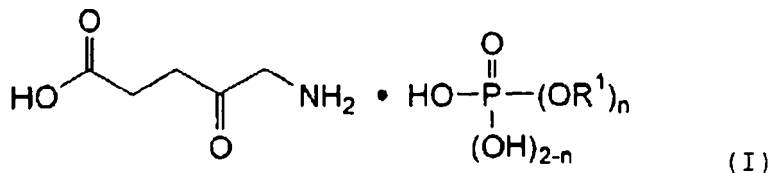
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de fórmula (I):



en la que R¹ individualmente es cada uno H, alquilo C₁₋₁₈, alqueno C₂₋₁₈, aralquilo C₇₋₂₆ o fenilo; y n es un número entero de 0-2.

2. La sal de la reivindicación 1, en la que R¹ es metilo, etilo, n-butilo, hexadecilo, 2-etilhexilo, oleilo, bencilo o fenilo.

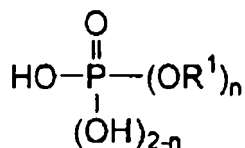
3. La sal de la reivindicación 1 ó 2, que está en forma de una solución acuosa.

4. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que está en forma de un sólido.

5. Un proceso para producir la sal de fosfato del ácido 5-aminolevulínico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende

(i) eluir ácido 5-aminolevulínico adsorbido sobre una resina de intercambio catiónico y

(ii) mezclar el eluato con un ácido fosfórico de la fórmula



en la que R¹ individualmente es cada uno H, alquilo C₁₋₁₈, alqueno C₂₋₁₈, aralquilo C₇₋₂₆ o fenilo; y n es un número entero de 0-2.

6. El proceso de la reivindicación 5, en el que el ácido 5-aminolevulínico se eluye en la etapa (i) con amonio acuoso.

7. Composición que comprende la sal del ácido 5-aminolevulínico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

8. Uso de la sal del ácido 5-aminolevulínico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un agente médico para tratamiento fotodinámico o diagnóstico fotodinámico.

9. Uso de la sal del ácido 5-aminolevulínico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 como un activador de plantas.

FIG. 1

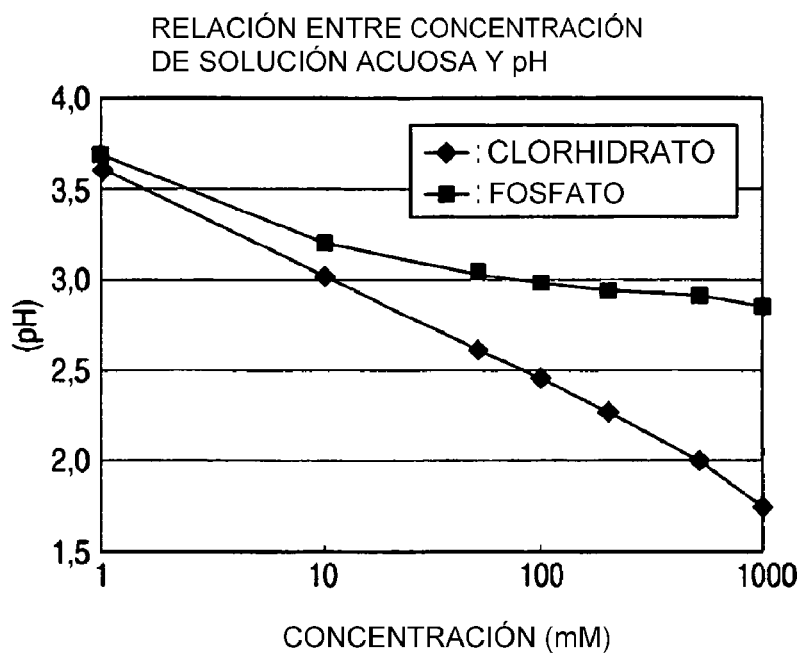


FIG. 2

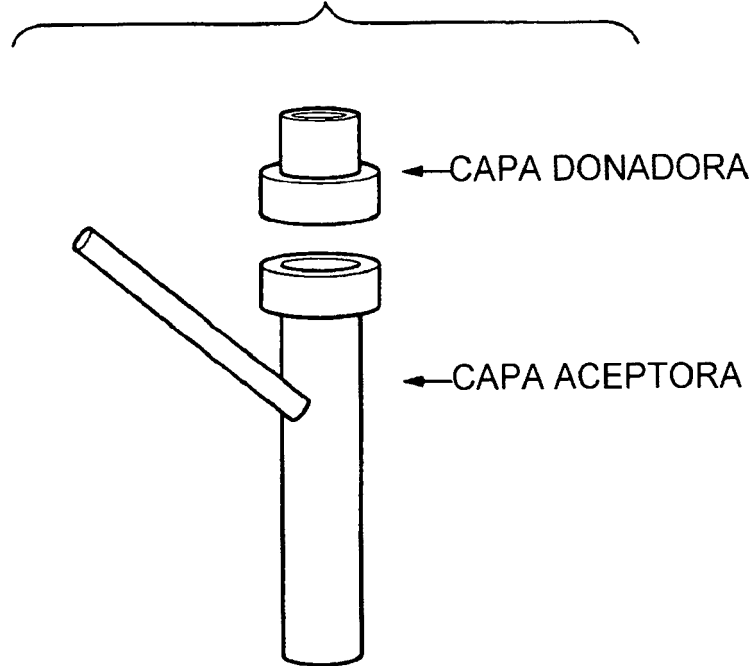


FIG. 3

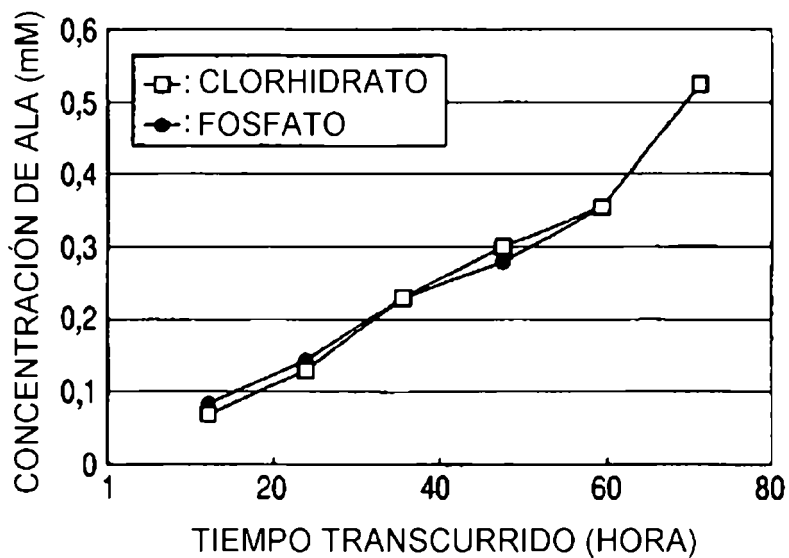


FIG. 4

