

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 790**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.1998 E 01121719 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1177795**

54 Título: **Uso de etilenglicol ésteres de derivados de monohidrobenzoporfirina como agentes fotoactivos**

30 Prioridad:

07.05.1997 US 852494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.01.2014

73 Titular/es:

**QLT INC. (50.0%)
887 Great Northern Way
Vancouver British Columbia V5T 4T5, CA y
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOCH, RONALD E.;
STERNBERG, ETHAN;
DOLPHIN, DAVID;
LEVY, JULIA G.;
RICHTER, ANNA M.;
HUNT, DAVID W. C.;
ASHOK, JAIN;
WATERFIELD, ELIZABETH M. y
TOVEY, ANDREW N.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 790 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

Uso de etilenglicol ésteres de derivados de monohidrobenzoporfirina como agentes fotoactivos

Campo técnico

5 La invención se refiere a compuestos útiles en la terapia fotodinámica (PDT) y a aplicaciones relacionadas. En particular se refiere a ésteres de etilenglicol de monohidrobenzoporfirinas.

Fundamento de la técnica

10 La terapia fotodinámica (PDT) generalmente implica la administración de compuestos que son capaces de absorber luz, típicamente en el intervalo visible, pero también en el ultravioleta próximo, seguido por la irradiación de posiciones en el sujeto para el que se desea un efecto tóxico o inhibidor. La PDT se desarrolló inicialmente usando hemato-
toporfirina y compuestos relacionados en el tratamiento de tumores, puesto que parecía que estos compuestos "ani-
darían" en posiciones que contienen células que se dividen rápidamente. Entonces, podría irradiarse el tumor con
luz absorbida por la hematoporfirina produciendo la destrucción del tejido circundante. Desde entonces la PDT se
considera útil para el tratamiento de placas ateroscleróticas, restenosis, infecciones en la corriente sanguínea,
artritis reumatoide, psoriasis y en el tratamiento de condiciones oculares no limitadas necesariamente a tumores.

15 La Patente de EE.UU. N° 5.171.749 y las Patentes de EE.UU., sobre solicitudes relacionadas, N°s 5.283.255;
5.399.583; 4.883.790; 4.920.143; y 5.095.030; describen y reivindican un tipo de compuestos fotoactivos útiles en la
PDT, llamados monohidrobenzoporfirinas o "BPD". Esta clase se obtiene por reacción de Diels-Alder de un alquino
mono- o disustituido con protoporfirina-IX y los compuestos resultantes pueden además isomerizarse, reducirse y/o
derivarse para obtener una amplia clase de BPD. Como se describe en esas patentes, una subclase particularmente
20 útil de este grupo resulta de la hidrólisis o de la hidrólisis parcial de los grupos éster de las cadenas laterales de 2-
carboxietilo sobre los anillos C y D. La esterificación como protección de estos grupos durante la reacción de Diels-
Alder produce productos iniciales que contienen grupos 2-carbalcoxi. Se descubrió que la hidrólisis ligera de
estos ésteres podía realizarse fácilmente, dejando algunos grupos carbalcoxi asociados con el producto de Diels-
Alder obtenido de un dicarbalcoxialquino virtualmente no hidrolizado completamente. Esto produjo cuatro especies
25 de compuestos, BPD-MA, BPD-MB, BPD-DA y BPD-DB como se representa en la Figura 1; esta figura está tomada
de la Patente de EE.UU. N° 5.171.749. En esta representación, R¹ y R² son grupos carbalcoxi, típicamente carbome-
toxi o carboetoxi, y R es alquilo (1-6C).

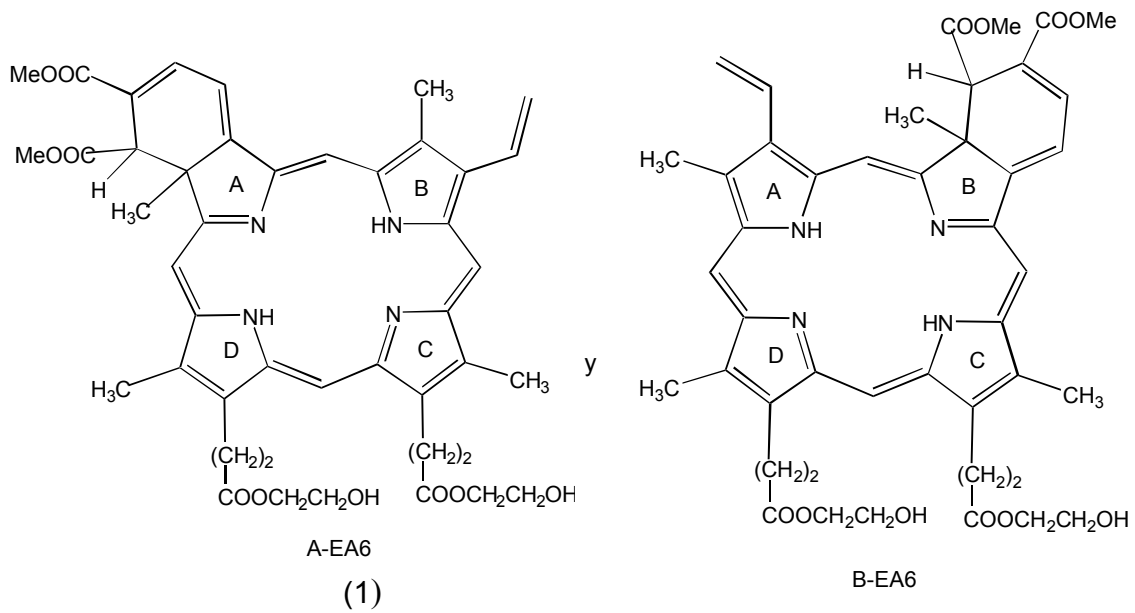
30 Se descubrió que BPD-MA tenía propiedades particularmente útiles para la PDT y está actualmente en desarrollo
clínico. Sin embargo, todavía se precisan formas específicas adicionales de agentes fotoactivos que expandan el
repertorio de compuestos fotoactivos para la variedad de indicaciones a las que se aplica la PDT, como se señaló
antes. Esta invención proporciona compuestos en los que los anillos C y D contienen ésteres de etilenglicol de los
sustituyentes carboxialquilo. Estos compuestos tienen propiedades farmacocinéticas que resultan ventajosas en
ciertos casos en los que se usa la PDT.

35 Levy JG et al han descrito el estado clínico de derivados de benzoporfirina. Obochi Mok et al han descrito la supervi-
vencia de tejido de aloinjerto de piel prolongada tras la terapia fotodinámica asociada con la modificación de la anti-
genicidad de la piel del donante. Waterfield JD et al han descrito la evaluación de la inmunotoxicidad del derivado de
benzoporfirina (BPDMA) en ratones.

Descripción de la Invención

40 Los compuestos para el uso según la invención son nuevas adiciones útiles al repertorio de compuestos que tienen
aplicación en la terapia fotodinámica y en las metodologías relacionadas que utilizan compuestos fotoactivos. La
presencia de ésteres de etilenglicol en estas moléculas les proporciona características que permiten la expansión del
alcance de las condiciones bajo las que tales compuestos fotoactivos se utilizan y la sintonización precisa del trata-
miento.

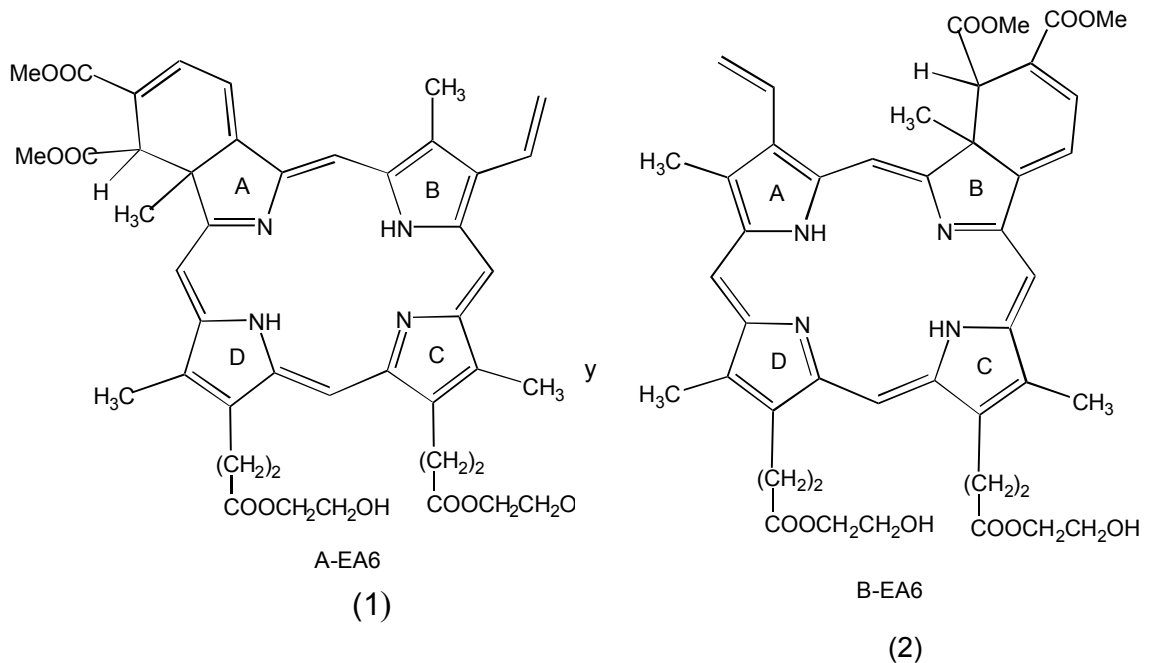
La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula



o sus formas metaladas o marcadas o conjugadas;

para usar en un método de terapia fotodinámica para modular una respuesta inmune.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula



o sus formas metaladas o marcadas o conjugadas;

5 en la fabricación de un compuesto fotoactivo para usar en terapia fotodinámica para modular una respuesta inmune.

Los compuestos de fórmulas 1 y 2 se derivan de protoporfirina IX. La invención también incluye el uso de isómeros de las diversas formas de fórmulas 1-2 que resultan de los productos de condensación Diels-Alder sin reordenar (es decir, el 1,4-dieno) como se describe en la patente de EE.UU n° 4.883.790.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra los compuestos de la técnica anterior, BPD-MA, BPD-MB, BPD-DA y BPD-DB.

La Figura 2 muestra la cinética de la captación de B-EA6 por células L1210.

La Figura 3 muestra la cinética de la liberación de B-EA6 por células L1210.

5 La Figura 4 muestra una representación gráfica de la farmacocinética de B-EA6 *in vivo*.

La Figura 5 muestra una comparación de la cinética de la captación de B-EA6 por células L1210 y esplenocitos normales.

La Figura 6 muestra el curso del tiempo de PDT utilizando B-EA6 en ratones comparado con ratones tratados con BPD-MA y BPD-MB.

10 La Figura 7 muestra el efecto de B-EA6 sobre la microvasculatura en ratones.

La Figura 8 muestra una comparación de los espectros en el plasma de BPD-MA y B-EA6.

Las Figuras 9A y 9B muestran el efecto citotóxico del tratamiento fotodinámico que utiliza A-EA6 en comparación con BPD-MA en células L1210 y en células dendríticas.

15 La Figura 10 muestra los efectos comparativos de A-EA6 y BPD-MA en la disminución de la expresión superficial de receptores MHC I.

La Figura 11 muestra el efecto de la terapia fotodinámica que utiliza A-EA6 y BPD-MA sobre las quinasas de ruta mitogénica y de estrés en células HL60.

La Figura 12 muestra el efecto comparativo de la PDT utilizando A-EA6 y BPD-MA sobre la activación de caspasa en células HL60.

20 La Figura 13 muestra el efecto comparativo de la PDT utilizando A-EA6 y BPD-MA sobre la fragmentación de ADN en células HL60.

Modos de Efectuar la Invención

25 Los compuestos para usar según la invención se refieren a aquellos descritos en las patentes de BPD antes citadas pero difieren de ellas en que contienen ésteres de etilenglicol en los sustituyentes sobre los anillos C y D. Estos compuestos pueden prepararse por simple hidrólisis de los sustituyentes carbalcoxilo o carbalcoxialquilo y reesterificación de los grupos carboxilo resultantes en los anillos C y D de las benzoporfirinas, o pueden obtenerse directamente por transesterificación.

30 Se advertirá que los compuestos 1 y 2 son especies individuales del género, descrito en las patentes de EE.UU. antes mencionadas, obtenidos a través de un proceso que comprende una reacción de Diels-Alder con protoporfirina IX. Puesto que la protoporfirina IX no es simétrica con respecto a los anillos A y B, resultan posibles dos productos según ocurra la adición Diels-Alder en el anillo A o B.

Como se usa aquí, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada que puede, si contiene un número suficiente de átomos de carbono, ser cíclico o contener una porción cíclica. Ejemplos típicos son metilo, etilo, t-butilo, ciclohexilo y similares.

35 Un "radical hidrocarbonado" se refiere a un sustituyente monovalente que contiene sólo carbono e hidrógeno que puede ser de cadena lineal o ramificada, saturado o no saturado, aromático o no aromático o ambos, y cíclico o no cíclico. Así, un radical hidrocarbonado de 1-10C puede incluir ciclopentiletilo, 2-pentenilo, 3-butinilo, 2,4-dimetilhexilo, y similares.

40 Las aminas cíclicas incluyen piridilo, pirimidilo, tiazolilo, quinolilo y así sucesivamente. Así, pueden incluir sistemas de anillo simple o de anillo condensado y pueden contener heteroátomos adicionales.

45 Se observará que los compuestos para usar según la invención contienen al menos un centro quiral y así puede existir en varias formas estereoisoméricas. Si se desea, dichos estereoisómeros, incluidos los enantiómeros, pueden separarse usando técnicas estándar en la técnica; sin embargo, las mezclas racémicas o las mezclas que contienen más de un diastereómero pueden también utilizarse. Los compuestos indicados en las fórmulas 1-2, por consiguiente, son representativos de los isómeros, enantiómeros o diastereómeros ópticos individuales como puede ser el caso, así como las mezclas de estos isómeros quirales individuales.

Si se desea, los compuestos para usar según la invención pueden prepararse en formas metaladas tratando el núcleo tipo tetrapirrol con un ion apropiado tal como ion magnesio, ion cinc, ion estannoso y similares, para obtener un complejo metálico. El ion metal puede ser también un marcador radioactivo. Generalmente, el ion metal se inserta

utilizando las sales apropiadas bajo condiciones estándar en la técnica. Por ejemplo, el ion cinc puede introducirse tratando el compuesto con acetato de cinc en cloruro de metileno:metanol 1:1.

5 Los compuestos pueden también contener marcador, incluyendo radioisótopos, cromóforos y marcadores fluorescentes. El marcado con radioisótopo es generalmente útil cuando los compuestos deben seguirse *in vivo* o utilizarse para marcar restos específicos. Restos catiónicos específicos que son radioisótopos incluyen tecnecio, galio e indio. Además, los radioisótopos de heteroátomos tales como ^{131}I o ^{32}P , en la propia molécula o la inclusión de ^{14}C puede usarse para marcar la molécula.

10 Como se describió además en las patentes relacionadas con la BPD expuestas antes, los compuestos para usar según la invención pueden acoplarse, si se desea, a un agente de diana que dirigirá la molécula a un tejido u órgano específico. Esos agentes de diana incluyen anticuerpos, receptores, ligando de receptor y similares. El enlace del agente de diana al compuesto se realiza utilizando técnicas estándar. Por una "forma conjugada" se entiende un compuesto de fórmula 1-2 acoplado a un agente de diana, como se ha descrito antes.

Se han preparado A-EA6 y B-EA6, compuestos ambos para usar en la invención. Ambos son efectivos fotosensibilizadores; parece que A-EA6 es el más fácil de formular.

15 Las diversas formas de los compuestos pueden utilizarse en las técnicas de terapia fotodinámica generalmente conocidas en la técnica, como se ha explicado en la anterior sección de Fundamentos, la terapia fotodinámica puede realizarse usando una plétora de protocolos y para una variedad de indicaciones. Además, compuestos de este tipo muestran actividad farmacológica en ausencia de luz en algunos casos. Composiciones farmacéuticas estándar, incluidas composiciones de liposomas como preferidas, se usan cuando se desea en esas aplicaciones.

20 Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención. Los Ejemplos ilustran y demuestran las sorprendentes propiedades farmacocinéticas de dos miembros de la especie de la invención, A-EA6 y B-EA6. Por lo tanto, la pequeña clase de compuestos contenida en esta invención ofrece adiciones válidas al repertorio de agentes fotodinámicos útiles en el tratamiento de las condiciones varias a las que se ha dirigido esta terapia.

25 En una realización de la invención, un compuesto de la invención es para usar en la prevención de una respuesta inmune.

En una realización de la invención, un compuesto de la invención es para usar en un método de terapia fotodinámica para modular una respuesta inmune en un sujeto afectado con artritis.

30 En una realización de la invención, un compuesto de la invención es para usar en un método de terapia fotodinámica, donde la terapia fotodinámica comprende la administración del compuesto a un sujeto, seguido por irradiación de una zona el sujeto para modular una respuesta inmune en el sujeto.

Ejemplo 1

Preparación de dos formas de EA6

A. Para preparar B-EA6, el material de partida es BPD-DB como el éster de dimetilo -- por ejemplo, BPD-DB como se muestra en la Figura 1 en que R^1 y R^2 son ambas COOMe y R^n es vinilo.

35 A 2,0g (2,7 mM) de BPD-DB en 50 ml de etilenglicol y 100 ml de diclorometano, se añadieron 1,0 ml de ácido sulfúrico. La reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Después se añadió la reacción a una mezcla en agitación de 10 ml de acetato de amonio acuoso al 5% y 100 ml de diclorometano. La capa orgánica se aisló y se lavó dos veces con 50 ml de agua. El disolvente se extrajo por evaporación rotatoria. El residuo verde oscuro se cromatografió entonces sobre 75g de alumina (desactivado con 5% de agua) y se eluyó con un gradiente de 0,5%-5,0% de metanol en diclorometano. El disolvente de las fracciones que contenían producto se extrajo por evaporación rotatoria. El residuo se secó *in vacuo* durante toda la noche para proporcionar 2,02 g (89%) del compuesto del título vendido verde analíticamente puro.

40 B. De una forma similar a la establecida en el apartado A, pero sustituyendo BPD-DB por BPD-DA, la forma isomérica, se preparó A-EA6.

45 Ejemplo 2

Comparación de captación y liberación de B-EA6 y BPD-MA por Células L1210.

50 BPD-MA o B-EA6 se incubaron a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en presencia de suero bovino fetal al 10% con 10/ml de células L1210, una línea celular de leucemia murina. El contenido intracelular de los fotosensibilizadores se midió por fluorescencia de los lisatos de células a distintos tiempos. La máxima concentración alcanzada fue 145,9 $\text{ng}/10^6$ células para B-EA6 y 145,5 $\text{ng}/10^6$ células para BPD-MA. La trayectoria del tiempo de captación se muestra en la Figura 2 como un porcentaje del contenido celular a 60 min. para cuyo tiempo la captación había alcanzado un máximo en ambos casos. Como se muestra, B-EA6 es captada más rápidamente y alcanza 80% de su concentración máxima después de sólo 5 min. y alcanzó su captación máxima dentro de 15 min.

La cinética de liberación de estos fármacos a partir de las células L1210 se midió por precarga de las células a 3 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h. y situando después las células en un medio libre de fármacos que contenía de suero bovino fetal al 10%. El contenido de fármaco intracelular de remanente), se midió en distintos momentos efectuando la lisis de las células y midiendo la fluorescencia. Como se muestra en la figura 3 (de nuevo como un porcentaje del contenido intracelular de partida), BPD-MA y B-EA6 mostraron cinéticas de liberación diferentes. La liberación inicial de B-EA6 fue mucho más rápida, pero la liberación fue más completa en el caso de BPD-MA.

No se esperaba que las farmacocinéticas *in vitro* de B-EA6 fueran más rápidas que las de BPD-MA. Aunque la retención más alta de B-EA6 podría atribuirse a su tamaño incrementado en comparación con BPD-MA, no se esperaba la transferencia más rápida a través de la membrana celular.

10 Ejemplo 3

Comparación de Farmacocinéticas *In Vivo*

Se administraron BPD-MA o B-EA6 por inyección intravenosa a un ratón DBA/2 a una dosis de 4 mg/kg usando 3 ratones por punto de tiempo. El contenido de fármaco de plasma, piel, hígado y riñón se determinó por fluorescencia en los extractos del tejido. La Figura 4 muestra los resultados trazados como un porcentaje de la concentración en el tejido relevante 15 minutos después de la inyección. Como se muestra en la Figura 4, ni BPD-MA ni B-EA6 se acumularon en el plasma, hígado o riñón; sin embargo, el BPD-MA se acumuló en la piel en las 3 primeras horas; el B-EA6 no.

La acumulación más rápida de B-EA6 comparado con BPD-MA, como se confirmó aquí *in vivo* por aclaramiento más rápido desde todos los tejidos, constituye una ventaja. El tratamiento con luz puede realizarse pronto después de la inyección del fotosensibilizador y debido al rápido aclaramiento no se mostrará fotosensibilidad ocular o dérmica prolongada. Así, los sujetos tratados pueden reanudar vidas normales sin precauciones especiales tales como evitar la luz brillante y llevar gafas de sol oscuras.

La semivida de B-EA6 y BPD-MA en varios tejidos se computó en la franja de tiempo de 15 min.-3 horas y los resultados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Semivida en tejido de B-EA6 y BPD-MA		
T _{1/2} * (15 min.-3 horas)		
Tejido	B-EA6	BPD-MA
Hígado	0,6	2,4
Bazo	0,8	10,9
Riñón	0,8	5,6
Piel	1,9	0**
Músculo	11,1	ND†
Plasma	0,6	2,0

* mostrado en horas
 ** concentración de BPD-MA en la piel incrementada hasta 3 horas.
 † ND = no determinado

La semivida de BPD-MA en esta franja de tiempo no pudo computarse en la piel puesto que su concentración aumenta durante el periodo de 3 horas. Como se muestra en la Tabla 1, generalmente, B-EA6 tiene una semivida mucho más corta que el BPD-MA en la mayoría de los tejidos. La ausencia de acumulación de B-EA6 en la piel normal comparado con BPD-MA fue inesperada e indica un aclaramiento más rápido que el de BPD-MA. Como se estableció antes, esto resulta ventajoso puesto que la fotosensibilidad de la piel es el único efecto secundario reconocido de la terapia fotodinámica que utiliza fotosensibilizadores.

Las farmacocinéticas se determinaron además usando un modelo de tumor de ratón *in vivo*. A grupos de 10 ratones DBA/2 con tumores de rhabdomyosarcoma M1 se les inyectó intravenosamente una formulación de liposomas de BPD-MA a varias dosis de 0,75-1,5 mg/kg. Los tumores se irradiaron con luz láser de 690 nm a 50 '0 150 J/cm² a distintos tiempos después de la inyección. Los resultados, como muestra la Tabla 2, se determinaron en términos del porcentaje de ratones en cada grupo que no tenía tumores el día 7 después de la inyección.

Tabla 2: Resultados del bioensayo

Condiciones PDT			Porcentaje libre de tumor el día 7*	
Dosis de Fármaco** (mg/kg)	Tiempo post IV (min.)	Dosis de luz** (J/cm ²)	BPD-MA	B-EA6
0,75	15	50	(4/5)	50%
	30	50	70%	0%
1,0	15	50	100%	90%
	30	50	90%	0%
1,5	180	150	70%	0%

* modelo tumor = tumor MI en ratones BDA/2 - cada condición de PDT se ensayó en 10 animales

** los fármacos se formularon liposómicamente y se inyectaron intravenosamente

*** luz láser de 690 nm

5 Como muestra la Tabla 2, los ratones tratados con BPD-MA mostraron tasas de supervivencia sustanciales cuando los tiempos postinyección estaban en el intervalo 15-180 min. Por el contrario, los ratones tratados con B-EA6 no mostraron respuesta a 30 min. ó 180 min.; sin embargo, se obtuvieron respuestas significativas cuando la irradiación se suministró después de sólo 15 min.

Estos datos demostraron que la PDT que usa B-EA6 será efectiva en el tratamiento precoz con luz. La ausencia de efecto de tiempos posteriores postinyección indica, de nuevo, aclaramiento rápido de B-EA6 lo que resulta ventajoso por las razones establecidas antes.

Ejemplo 4

10 Determinación de LD₅₀ con y sin Suero

B-EA6 o BPD-MA se incubaron durante 1 hora con células L1210 a un intervalo de concentraciones y se expusieron a una luz de ancho espectro de 9 J/cm². Esta determinación se hizo en ausencia de suero y en presencia de suero al 10%. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores LD ₅₀		
	Sin suero	Suero al 10%
BPD-MA	3,7 ng/ml	54,0 ng/ml
B-EA6	4,7 ng/ml	19,7 ng/ml

15 Como se ve, BPD-MA y B-EA6 tienen valores de LD₅₀ comparables en ausencia de suero; sin embargo, en presencia de suero, B-EA6 muestra una retención de efectividad sustancialmente mejor.

En la mayoría de los casos, la presencia de suero reduce grandemente la fotoactividad de los agentes usados en PDT, como BPD-MA. Sorprendentemente, B-EA6 muestra mayor afinidad para membranas celulares que para componentes del plasma y así le afecta muy ligeramente la presencia de suero en el entorno celular. Así, *in vivo*, su actividad puede ser más alta que la de BPD-MA y otros compuestos de esta familia.

20 Ejemplo 5

Eficacia *In Vitro* de B-EA6

25 La capacidad de B-EA6 para ejercer un efecto citotóxico sobre las células L1210 *in vitro* se ensayó además incubando las células con B-EA6 a varias concentraciones durante 1 hora en ausencia de suero. Después de retirar el exceso de fármaco, se expusieron las células a una luz de ancho espectro de (380-750 nm) y la supervivencia celular se determinó por el ensayo MTT (Mosmann, T. *et al. J. Immunol Meth* (1983) 65:55-63). El porcentaje de células matadas se calculó con referencia a la supervivencia de células expuestas a la luz solamente. A una concentración de aproximadamente 7 ng/ml, el 80% de las células murieron; a 15 ng/ml, casi el 100% de las células no sobrevivió. Como se estableció antes, la LD₅₀ para B-EA6 es aproximadamente 4,7 ng/ml.

El efecto algo inferior de B-EA6 comparado con BPD-MA *in vitro* hace aún más inesperada la actividad comparativamente más alta de B-EA6 comparado con BPD-MA *in vivo* en presencia de suero como se demostró en el Ejemplo 4.

Ejemplo 6

5 Selectividad de B-EA6 para células tumorales

La capacidad de las células L1210 para acumular B-EA6 se comparó con la capacidad de los esplenocitos para hacer lo mismo. B-EA6 a 3 µg/ml se incubó con cada tipo de célula y se determinó el contenido celular de B-EA6 por fluorescencia en los lisatos celulares. La Figura 5 muestra una comparación de la captación para los dos tipos de células, en ng/10⁶ de células. Como se ve, las células L1210 fueron capaces de captar aproximadamente 140 ng/10⁶ células que alcanzan este valor después de aproximadamente 20 min. Por el contrario, los esplenocitos acumularon menos de 20 ng/10⁶ de células después de una hora de incubación.

10 Ratonos DBA/2 que soportan tumor M1 (rabdomyosarcoma), crecido subcutáneamente en sus costados, se utilizaron como modelo para demostrar que B-EA6 demostraba selectividad para tumores. Se administró a los ratones 0,75 mg/kg de B-EA6 en una formulación liposomal, intravenosamente. Después de 15 min., un área de 1 cm que incluía un tumor de 5 mm de diámetro se expuso a 50 J/cm² de luz de 70 mW de longitud de onda de 690 nm de un láser colorante bombeado por argón. La exposición eliminó efectivamente el tumor, pero no afectó a la piel normal circundante. Así, B-EA6 demostró especificidad tumoral.

Ejemplo 7

Inmunomodulación por B-EA6

20 Ratonos Balb/C (5-8 ratones por grupo) se ensayaron utilizando el ensayo de fotosensibilidad de la piel retardada también llamado ensayo de hipersensibilidad al contacto (CHS). Se pintaron los ratones en el costado con el agente sensibilizador dinitrofluorobenceno (DNFB) y 5 días después, se provocó una oreja con DNFB, mientras que la otra servía de control. La hinchazón es un indicador de respuesta inmune. Se inyectó a los ratones intravenosamente 1 mg/kg de B-EA6 liposomal y se irradió con 15 J/cm² de luz sobre todo el cuerpo o se expuso a la luz ambiente. Se determinó la capacidad de este tratamiento para prevenir la respuesta inmune demostrada por inhibición de la hinchazón de la oreja. Los resultados mostraron que la administración de B-EA6 combinada después de la irradiación, con 15 J/cm² de luz en el cuerpo completo o con luz ambiente, disminuyó la hinchazón en la oreja ensayada comparado con los ratones sin tratar. La hinchazón en ambos casos fue sólo, aproximadamente del 60% de la mostrada en ratones sin tratamiento.

30 En un ensayo adicional para determinar la inmunomodulación, se aislaron macrófagos peritoneales murinos, se purificaron y activaron por interferon-γ recombinante (100 U/ml). Las células activadas se incubaron durante 1 hora a 37°C con B-EA6 a un intervalo de concentraciones y entonces se expusieron a luz LED de 690 nm de a 5 J/cm². Los niveles de expresión de MHCI, MHCII, CD54, CD80 Y CD86 se determinaron 24 horas más tarde usando anticuerpos conjugados FITC y un clasificador celular. Los resultados se muestran en la Tabla 4 para B-EA6 a 0,5 ng/ml en comparación con experimentos similares que usan BPD-MA a 2,5 ng/ml.

Tabla 4: Efecto de PDT de dosis baja con B-EA6 sobre niveles de expresión de antígenos de superficie celular por macrófagos de peritoneo murino

Compuesto	MHC Clase I	MHC Clase II	(ICAM-1) CD54	(B7-1) CD80	(B7-2) CD86
BPD-MA (2,5 ng/ml)	99,1 ± 4,3%	79,3 ± 10,1%	105,4 ± 3,0%	93,5%	99,2%
BPD-B-EA6 (0,5 ng/ml)	100,4%	71,8%	106,9%	102,3%	92,2%

Los resultados de la Tabla se dan como porcentaje de expresión comparado con las células tratadas sólo con luz. Como se ve, BPD-MA y B-EA6 son capaces ambos de reducir la expresión de MHC II, pero no los marcadores de superficie restantes. Así, aunque B-EA6 tiene farmacocinética ventajosa, retiene la actividad inmunomoduladora de BPD-MA y otros compuestos de este grupo.

40 Ejemplo 8

Efecto de B-EA6 en un modelo de artritis

Los ratones MRL-lpr desarrollan espontáneamente artritis; esto aumentó con la inyección intradérmica del Adyuvante de Freund. Varios ratones MRL-lpr se trataron con PDT los días 0, 10 y 20 después de la inyección del adyuvante. PDT consistió en 0,5 mg/kg de B-EA6 liposomal inyectado intravenosamente seguido de la exposición de la parte ventral del ratón a luz roja (560-900 nm) a 80 J/cm² a 1 hora después de la inyección de B-EA6. Se observaron los ratones y se anotaron los síntomas cada 5 días durante 30 días. Los resultados se muestran en la Figura 6, en com-

paración con los ratones tratados similarmente con BPD-MA y BPD-MB. Como se muestra en la Figura 6, medidos por la incidencia de los síntomas clínicos (por ejemplo, el porcentaje de ratones que mostraba estos síntomas) o por el cambio de la anchura del tobillo bimalleolar en milímetros, B-EA6 (mostrado como círculos continuos) fue efectivo en la prevención de las secuelas de la inyección del adyuvante.

5 De nuevo, se demostró la retención de la actividad inmunomoduladora de B-EA6.

Ejemplo 9

Efecto de B-EA6 sobre la microvasculatura

10 Se usó el modelo de músculo cremáster de ratón. Se administró intravenosamente B-EA6 a 2 mg/kg y comenzando a 5 y 15 minutos después de la inyección, las arteriolas y venillas expuestas quirúrgicamente se irradiaron con luz a una intensidad de 25 J/cm² cada 5 minutos comenzando a 5 y 15 minutos, después de inyección de B-EA6. Los vasos se midieron como diámetro de columna de sangre roja como porcentaje de los controles.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Mientras que el cierre transitorio del vaso pudo obtenerse cuando la irradiación comenzó a los 5 minutos, el cierre permanente se obtuvo cuando la radiación comenzó después de 15 minutos.

15 La capacidad aumentada de B-EA6 para constreñir u ocluir la vasculatura, como se demuestra en este ejemplo, en combinación con farmacocinética más rápida, hace B-EA6 particularmente ventajoso en el tratamiento de las enfermedades neovasculares del ojo.

Ejemplo 10

Espectro de absorción de B-EA6

20 BPD-MA y B-EA6 tienen espectros de absorción similares en el plasma antes y después de 4 horas de exposición a la luz fluorescente (380-750 nm). Una comparación de estos espectros se muestra en la Figura 8. La similitud del espectro de B-EA6 con el espectro de BPD-MA es ventajosa puesto que el uso de BPD-MA como agente terapéutico útil en PDT está bien desarrollado. La similitud en sus espectros indica que pueden utilizarse para B-EA6 las mismas fuentes de luz que son útiles en el tratamiento con BPD-MA.

25 Ejemplo 11

Citotoxicidad *In Vitro* de A-EA6

30 De una forma similar a la establecida en el Ejemplo 5, la citotoxicidad de A-EA6 *in vitro* sobre dos líneas celulares diferentes se ensayó y comparó con BPD-MA. Tanto las células L1210 como la línea celular dendrítica D25C/1 se incubaron durante una hora a 37°C con A-EA6 o con BPD-MA. Después de la extracción del fármaco en exceso, las células se expusieron a luz de 690 nm a 5 J/cm² de luz para células dendríticas y a 9° J/cm² de luz para las células L1210. La supervivencia celular se determinó 18-24 horas más tarde usando el ensayo colorimétrico MTT descrito en el Ejemplo 5. El porcentaje de células matadas se calculó con referencia a las células expuestas a la luz solamente. Como muestra la Figura 9A, A-EA6 mostró una citotoxicidad comparable a BPD-MA con respecto a las células L1210 en ausencia de suero, pero era marcadamente más tóxico en presencia de suero que BPD-MA. Los círculos vacíos representan A-EA6 más suero; los círculos llenos representan BPD-MA más suero; los cuadrados vacíos representan A-EA6 en ausencia de suero; y los círculos llenos representan BPD-MA en ausencia de suero.

40 Como se muestra en la Figura 9B, en las células dendríticas en las que BPD-MA tiene una LD₅₀ de 6 ng/ml y A-EA6 tiene una LD₅₀ de 2,7 ng/ml, A-EA6 era tóxico a concentraciones más bajas que BPD-MA en presencia de suero de ternero fetal al 5%. En la Figura 9B, los círculos llenos representan BPD-MA y los cuadrados vacíos representan A-EA6.

45 En una determinación similar, pero midiendo los receptores MHCI antes que la citotoxicidad, A-EA6 fue efectivo en la disminución de la expresión de estos receptores a concentraciones más bajas. En esta determinación, las células dendríticas se incubaron durante 1 hora a una concentración de fármaco menor que su LD₅₀; 2,5 ng/ml y 5 ng/ml para BPD-MA y 1 ng/ml y 2,5 ng/ml para A-EA6. Las células se trataron con luz de 690 nm a 5 J/cm² y después se marcaron con el anticuerpo apropiado 3 horas después del tratamiento y se evaluaron por citometría de flujo. Los resultados se midieron como el porcentaje de la intensidad de fluorescencia del canal media para las células de control tratadas con luz. Estos resultados se muestran en la Figura 10; BPD-MA dieron una reducción del 18% y del 29% respectivamente, a 2,5 ng/ml y 5 ng/ml; A-EA6 rebajó la fluorescencia del canal aproximadamente un 25% a las concentraciones de 1 ng/ml y 2,5 ng/ml.

50 Ejemplo 12

Efecto de A-EA6 en la señalización intracelular

5 Las condiciones del estudio establecidas en el Ejemplo 11 se repitieron usando células HL-60 como diana y comparando los efectos de A-EA6 y BPD-MA sobre la citotoxicidad, sobre la quinasa de ruta mitogénica p70 56k y sobre las quinasas de ruta de estrés c-jun y HSP27. Los resultados se muestran en la Figura 11. A concentraciones subletales, A-EA6 mostró una activación más fuerte de las quinasas de ruta de estrés y una inhibición más fuerte de las quinasas de ruta mitogénica.

El efecto sobre la activación de caspasa en las células HL-60 también se midió. A-EA6 mostró una activación más fuerte de caspasas que BPD-MA. Este efecto es deseable puesto que está asociado con la apoptosis. Utilizar apoptosis para extraer las células no deseadas causa el efecto mínimo sobre los tejidos y células normales circundantes. La comparación de A-EA6 con BPD-MA se muestra en la Figura 12.

10 La Figura 13 muestra una comparación similar cuando la fragmentación de ADN porcentual se midió en células HL-60. De nuevo, A-EA6 fue efectiva a concentraciones más bajas que BPD-MA.

Ejemplo 13

Terapia Fotodinámica *In Vivo* que usa A-EA6

15 En un protocolo similar al establecido en el Ejemplo 3, tanto A-EA6 como BPD-MA se inyectaron intravenosamente en ratones que tenían tumores M1 a una dosis de 1 mg/kg. A esto le siguió una irradiación de cuerpo completo con 50 J/cm² de luz láser de 690 nm a varios tiempos después de la administración del fármaco. Se determinó el número de animales sin tumores el día 7 y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5		
Fotosensibilizador	Tiempo de irradiación (post i.v.)	Animales sin tumor el día 7
BPD-MA	15 min.	10/10
	30 min.	9/10
A-EA6	15 min.	2/2
	30 min.	6/6

Estos resultados muestran que A-EA6 es al menos tan efectivo como BPD-MA en este ensayo.

Ejemplo 14

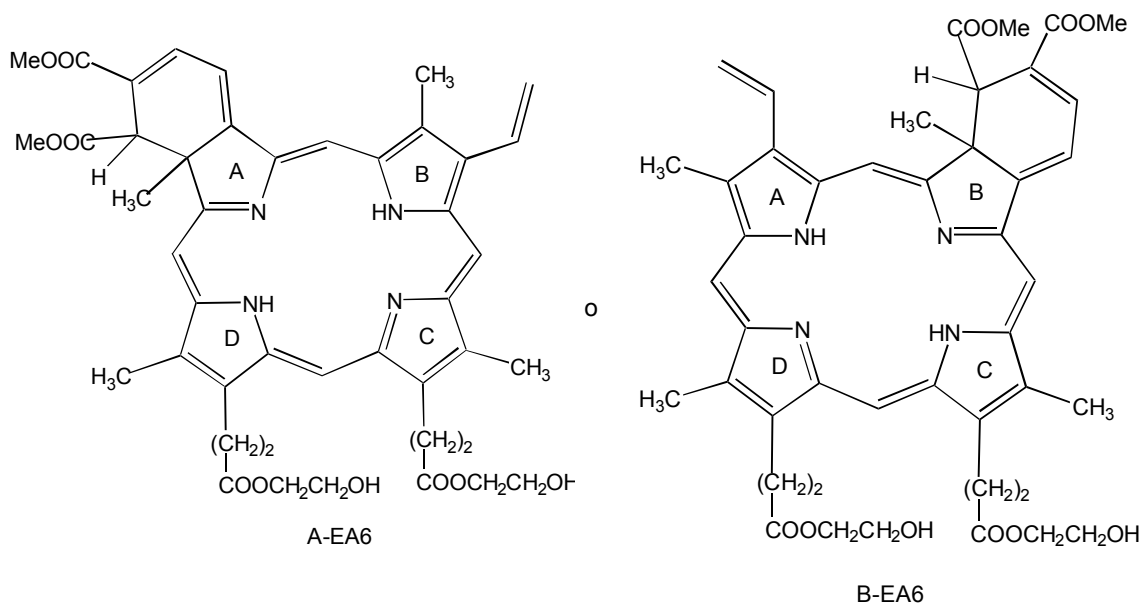
20 Actividad inmunomodulatoria

25 Costados de control y ratones de ensayo se pintaron con el antígeno DMFB y sus orejas se provocaron 5 días más tarde empleando el mismo compuesto. Los animales de ensayo se trataron con PDT de cuerpo completo usando BPD-MA o A-EA6, inyectando el fotosensibilizador intravenosamente y después se expusieron los animales a la luz LED roja a 15 J/cm². La supresión porcentual de la hinchazón de la oreja se calculó en comparación con los controles. Los resultados se muestran en la Tabla 6 e indican que A-EA6 tenía un efecto inmunomodulatorio más fuerte en este ensayo que BPD-MA.

Tabla 6		
Fotosensibilizador	Dosis (mg/kg)	Porcentaje de supresión
BPD-MA	1,0	49%
A-EA6	1,0	68%
A-EA6	0,3	59%

REIVINDICACIONES

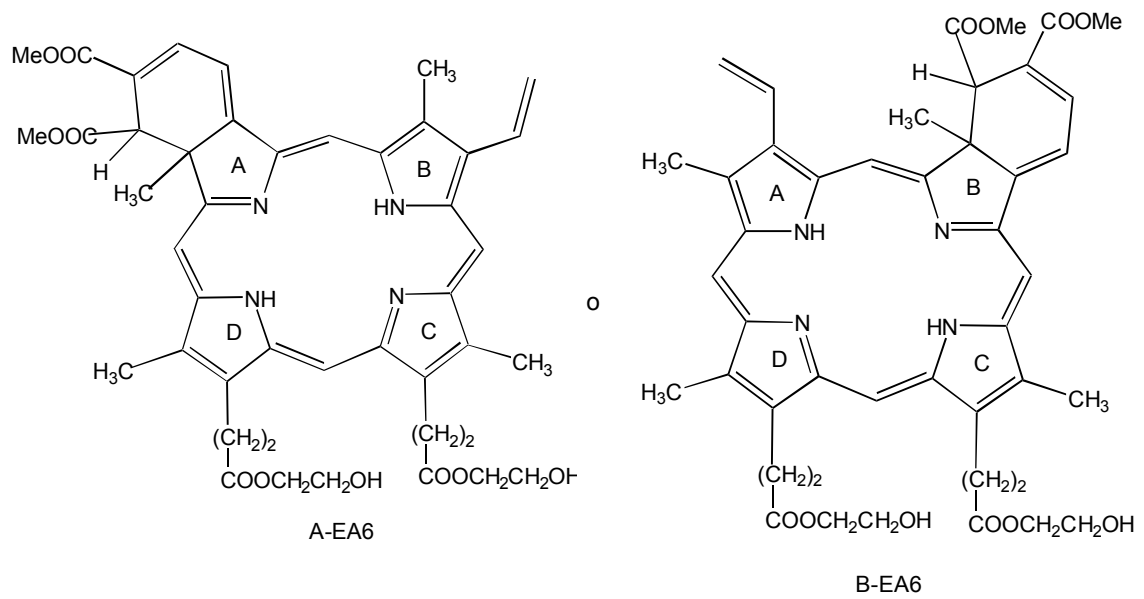
1. Un compuesto de fórmula



o sus formas metaladas o marcadas o conjugadas;

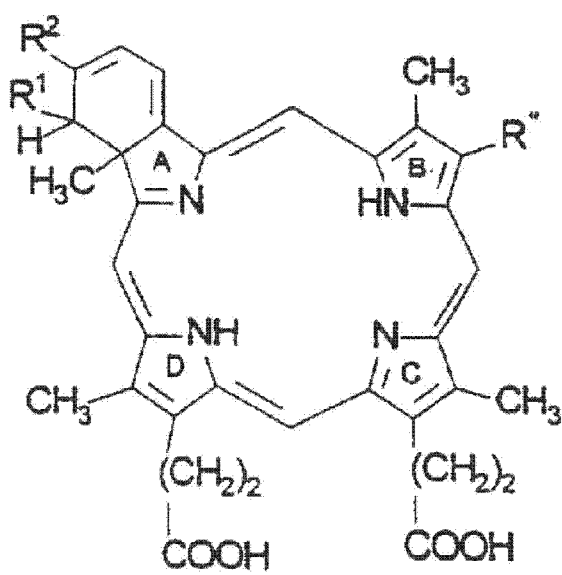
para uso en un método de terapia fotodinámica para modular una respuesta inmune.

- 5 2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, donde la modulación de una respuesta inmune es la prevención de dicha respuesta.
3. El compuesto para uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha respuesta inmune es en un sujeto afectado con artritis.
- 10 4. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está en forma metalada y/o en forma conjugada y/o está marcada.
5. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto no contiene un ión metálico.
- 15 6. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la terapia fotodinámica comprende la administración del compuesto a un sujeto, seguido de irradiación de una zona en el sujeto, para modular una respuesta inmune en el sujeto.
7. Uso de un compuesto de fórmula

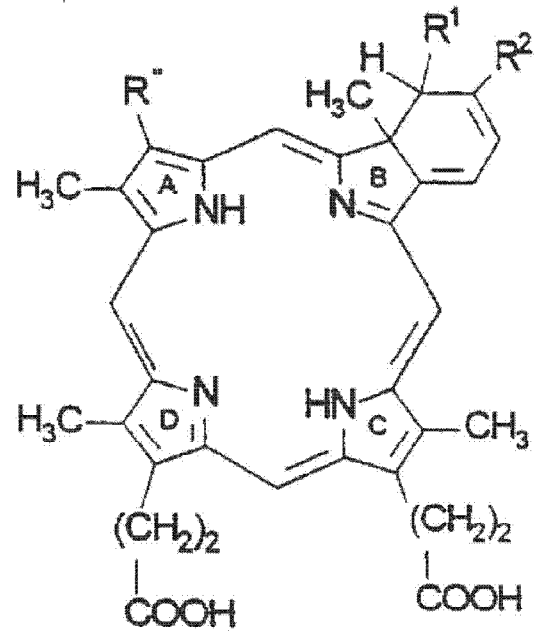


o sus formas metaladas o marcadas o conjugadas;

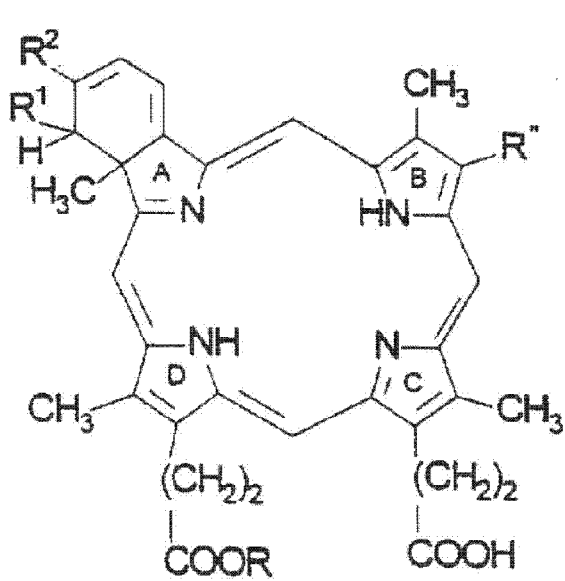
en la fabricación de un compuesto fotoactivo para usar en terapia fotodinámica para modular una respuesta inmune.



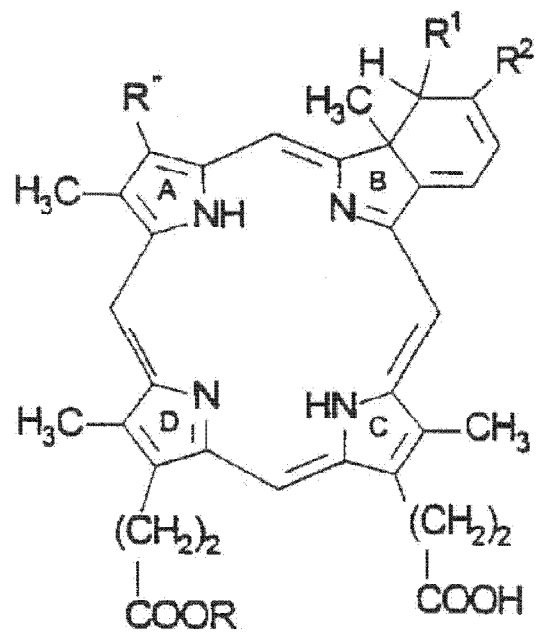
BPD-DA



BPD-DB



BPD-MA



BPD-MB

FIG. 1

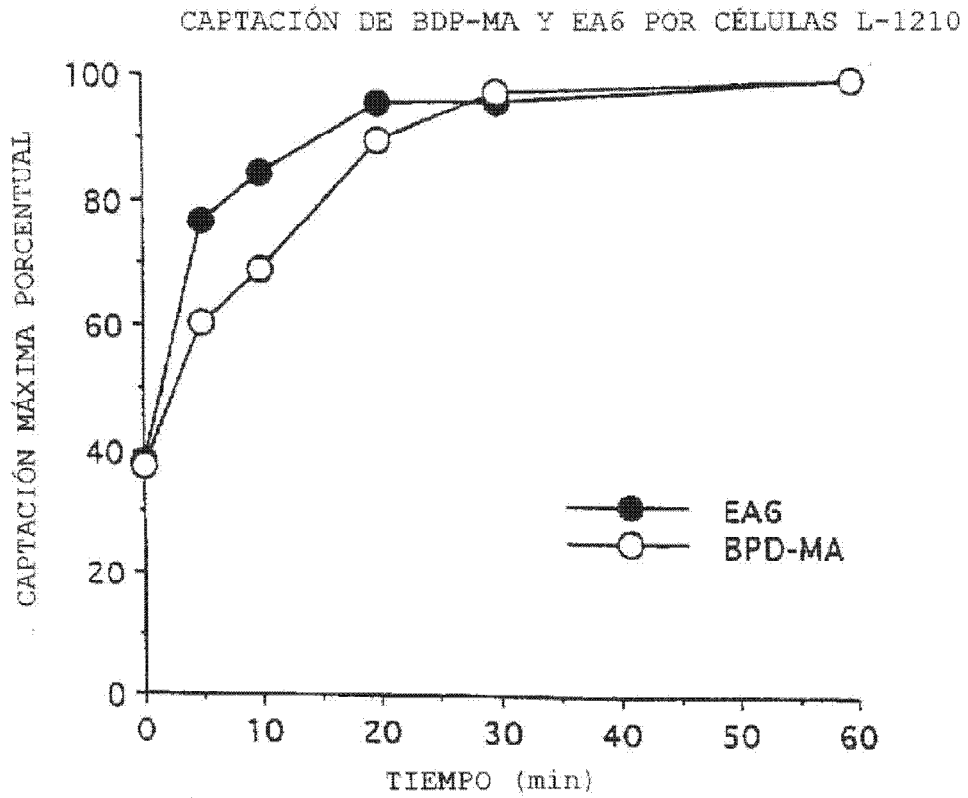


FIG. 2

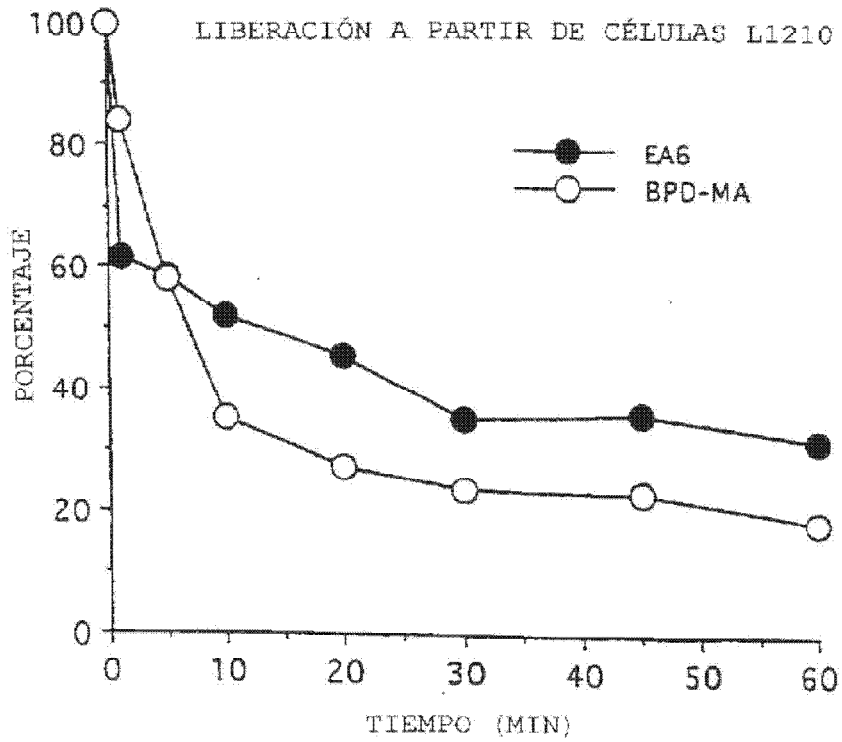
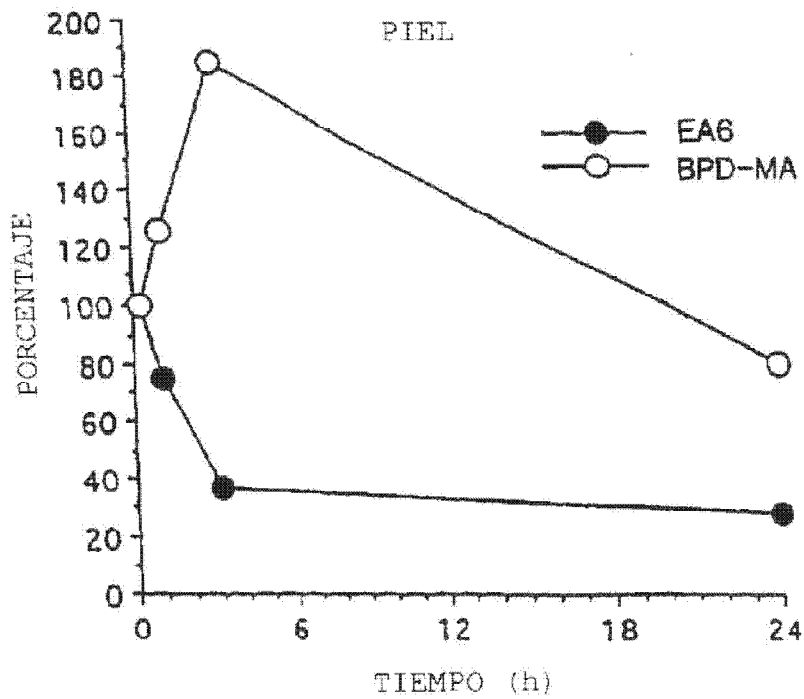
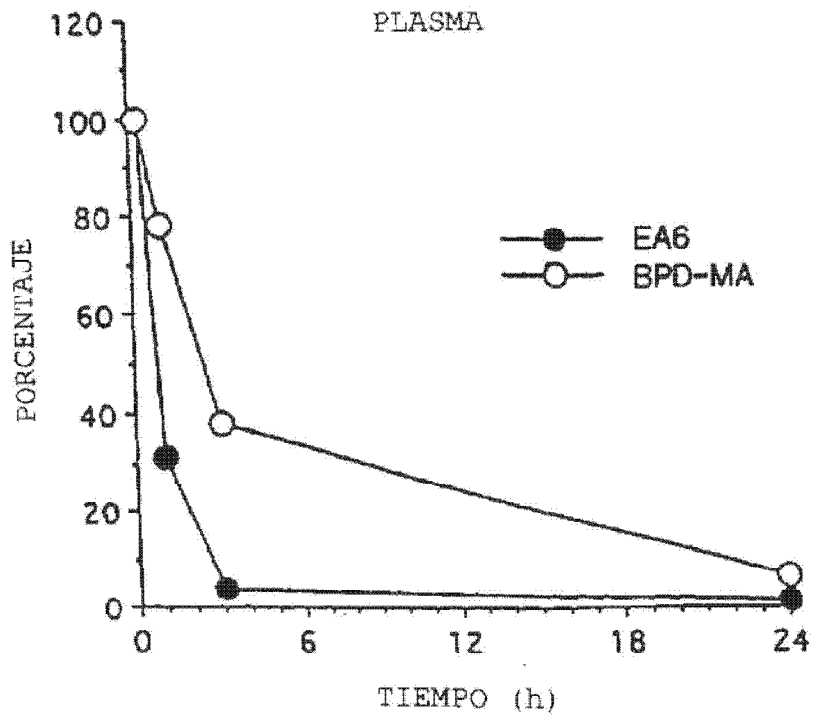


FIG. 3



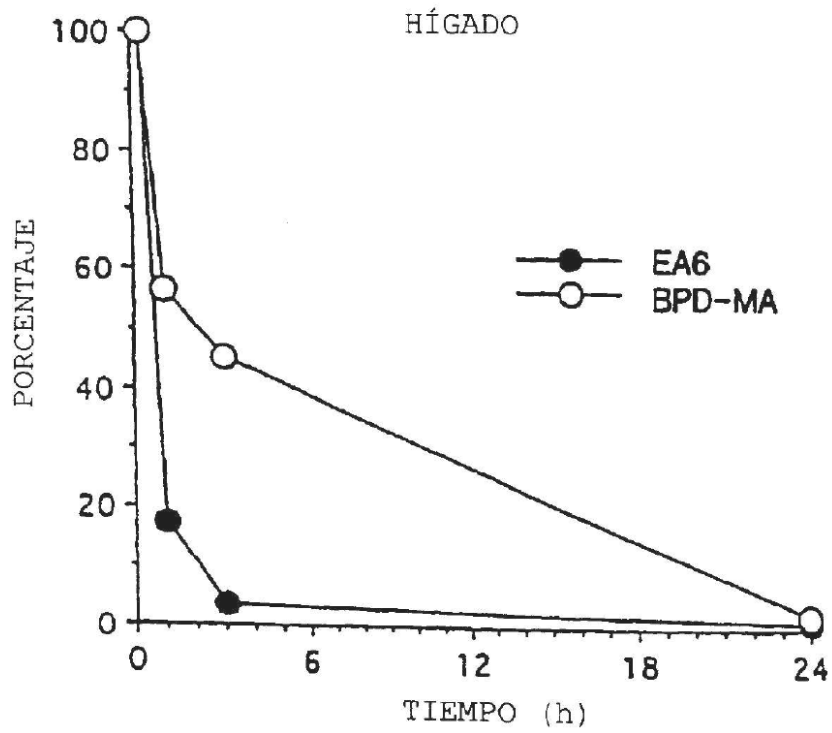


FIG. 4C

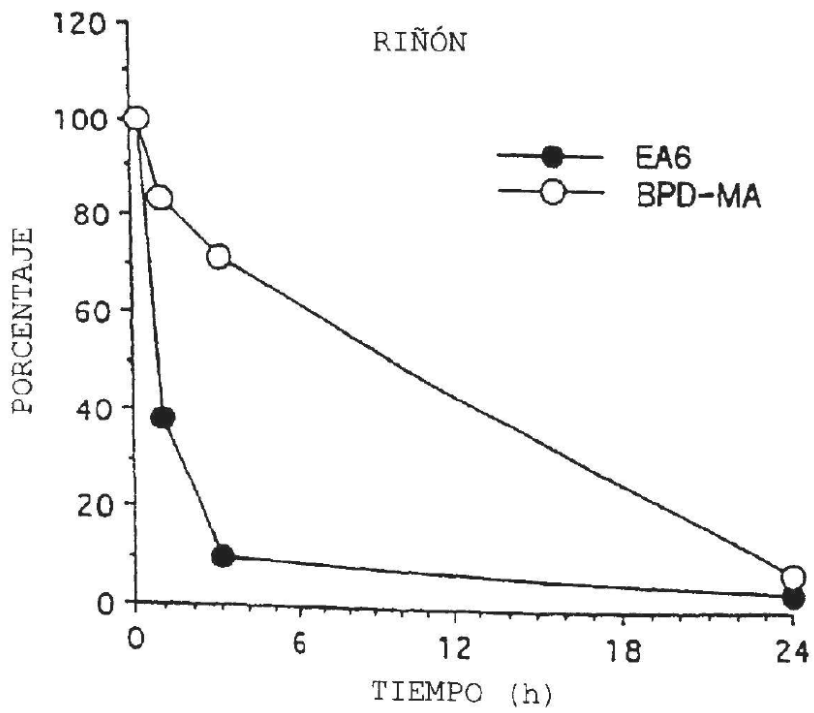


FIG. 4D

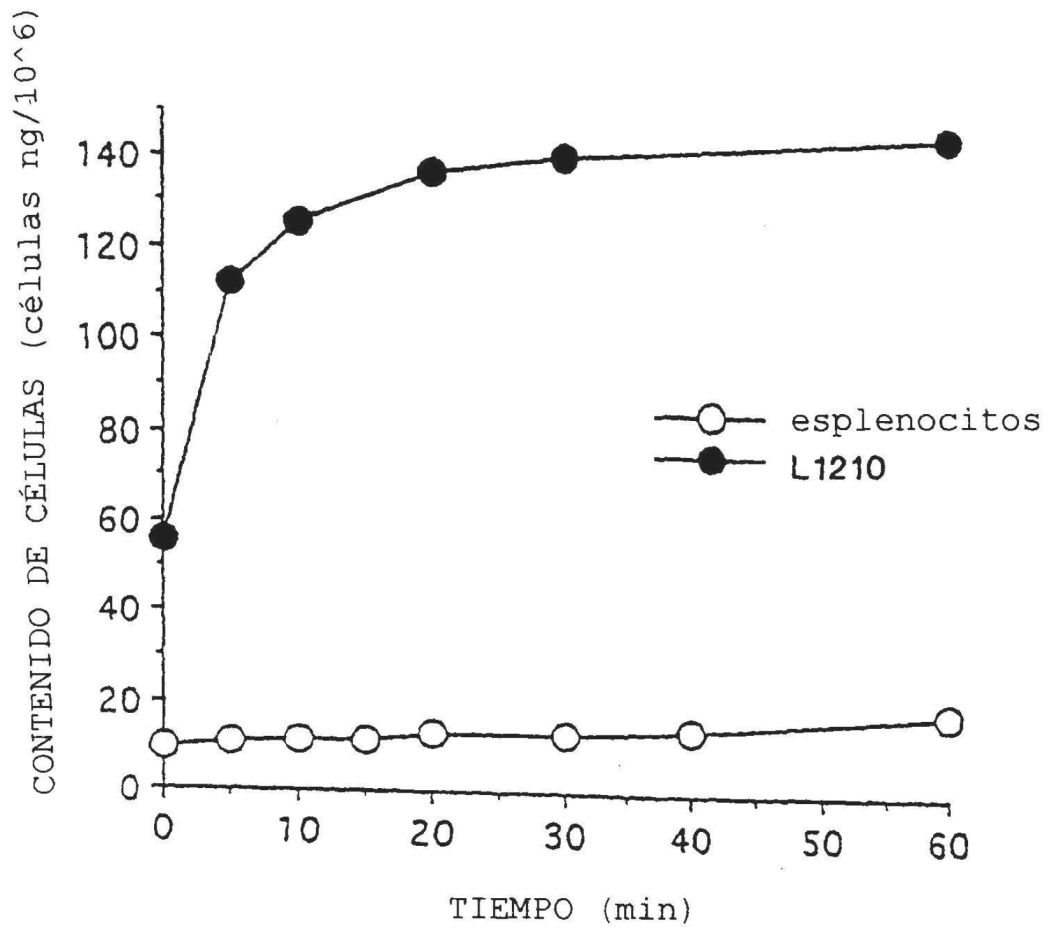
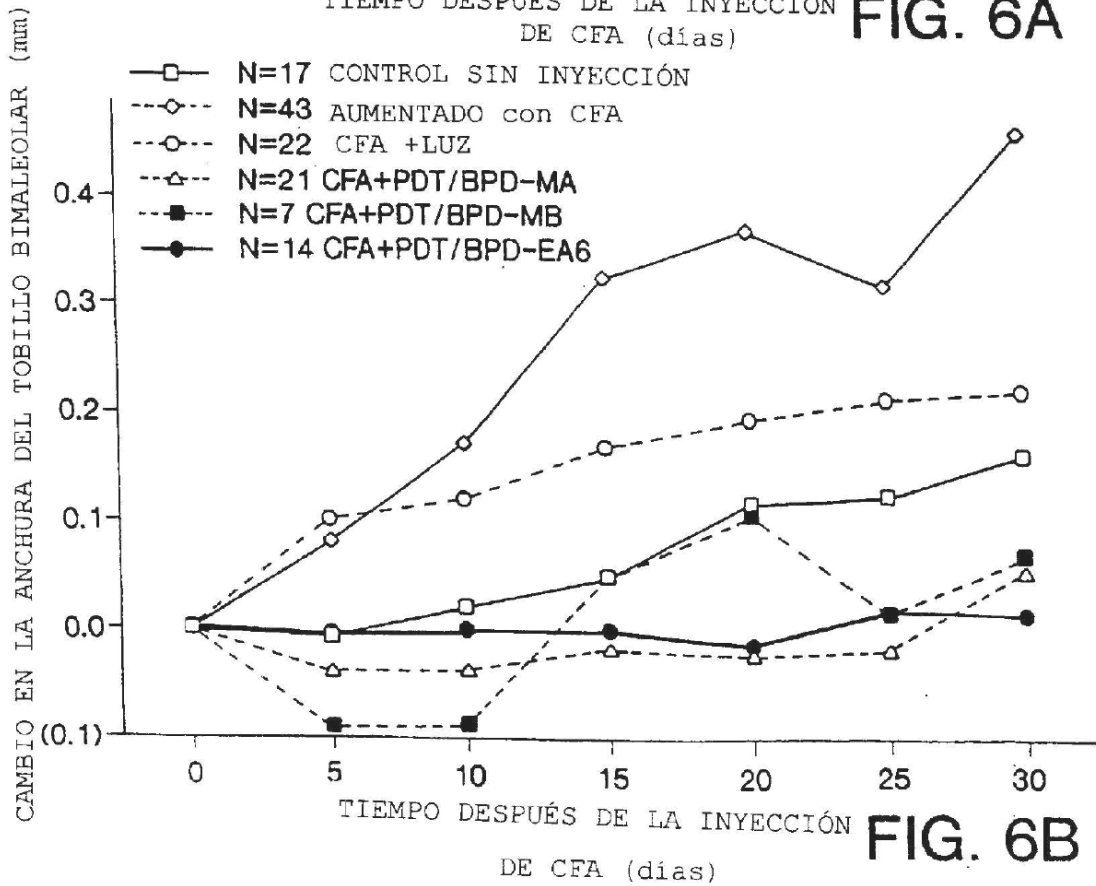
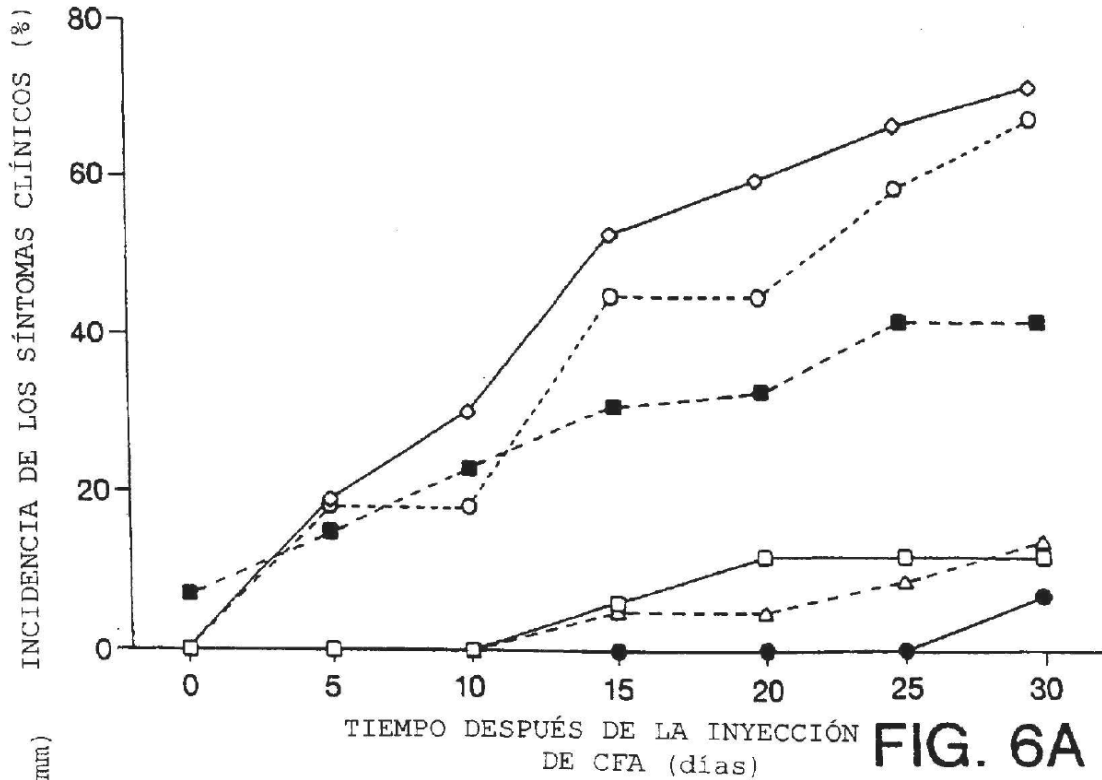


FIG. 5



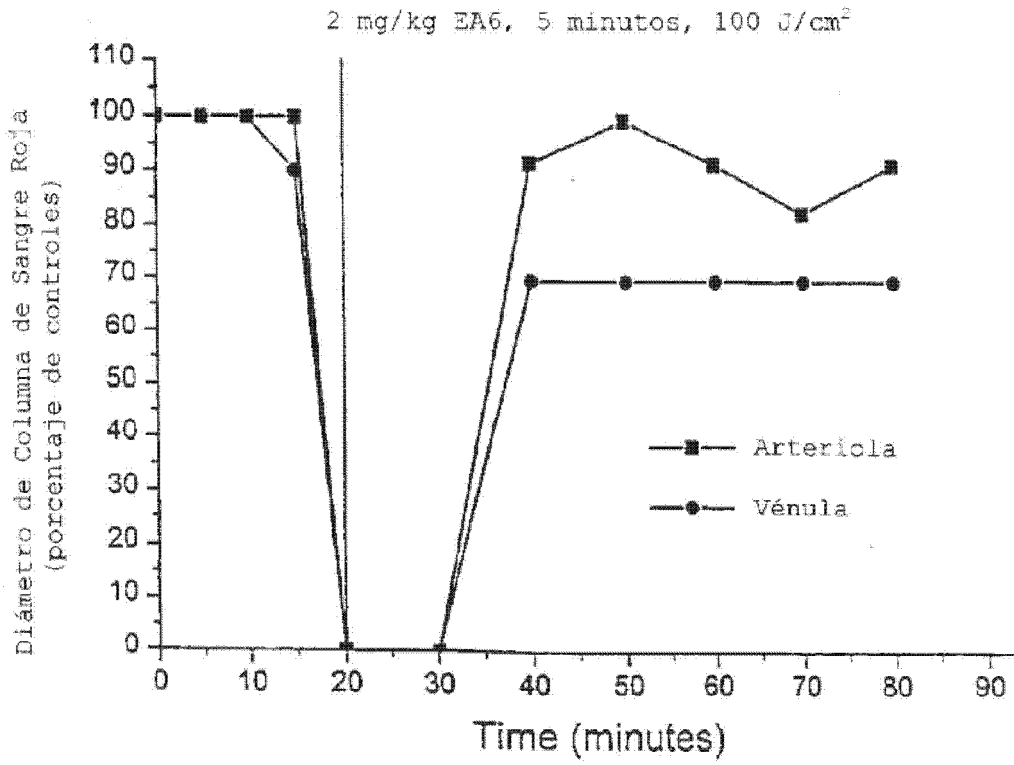


FIG. 7A

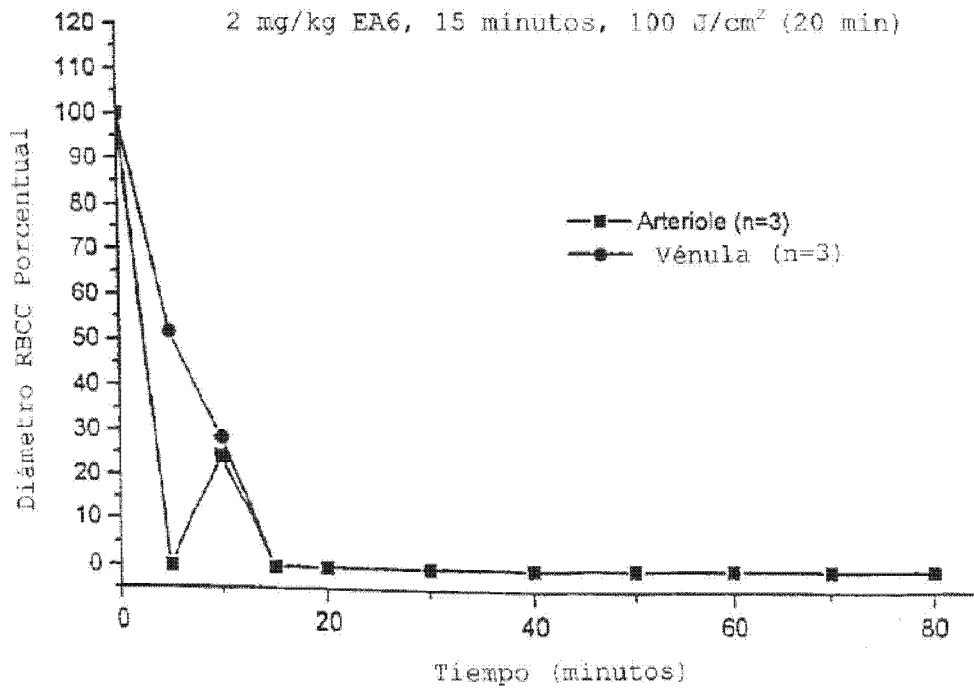


FIG. 7B

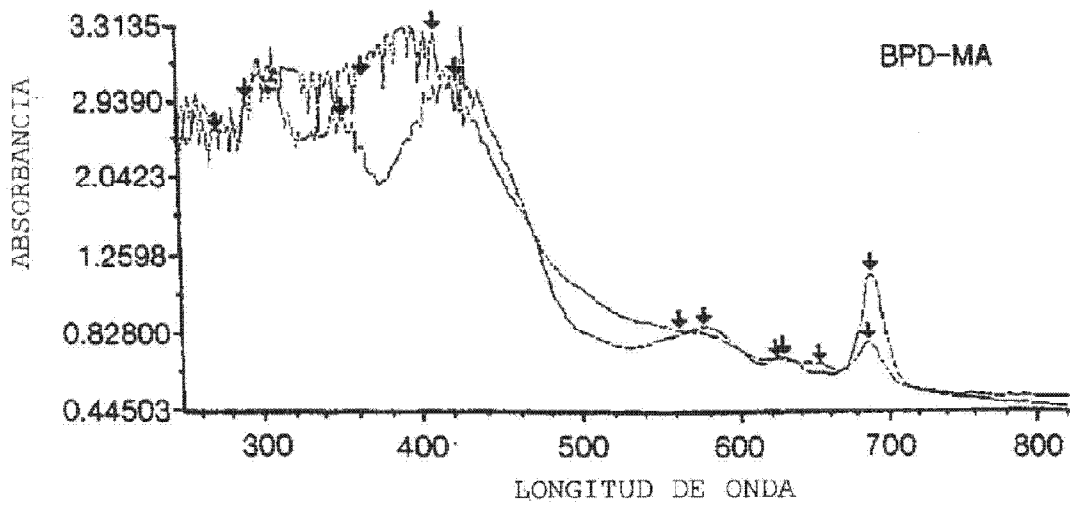


FIG. 8A

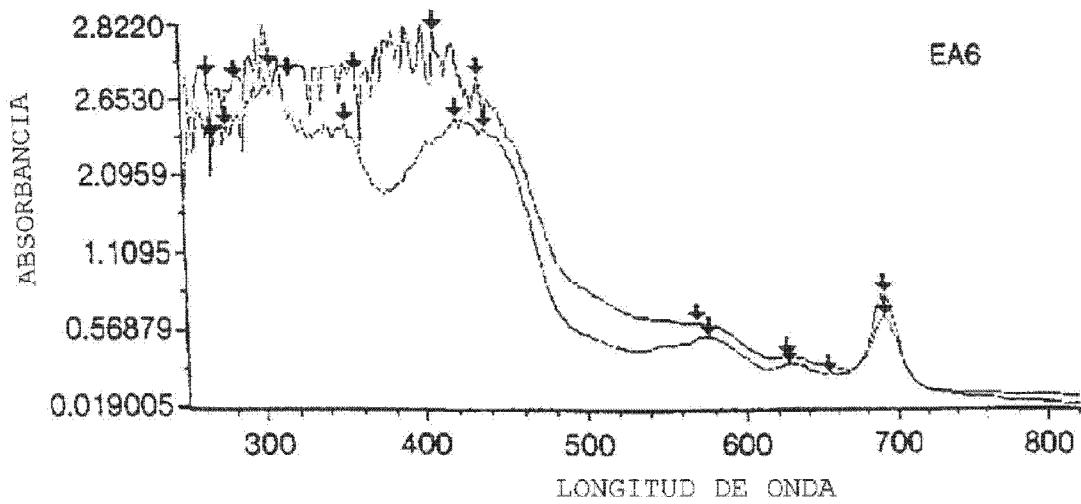


FIG. 8B

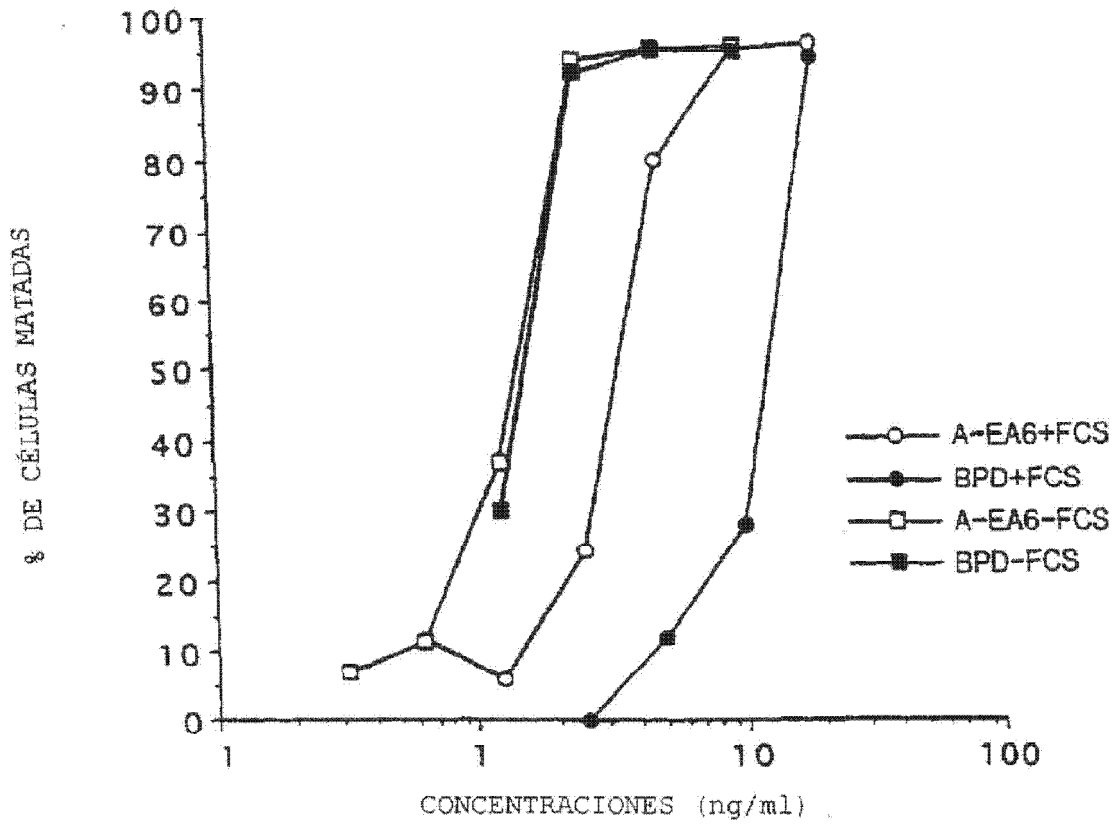


FIG. 9A

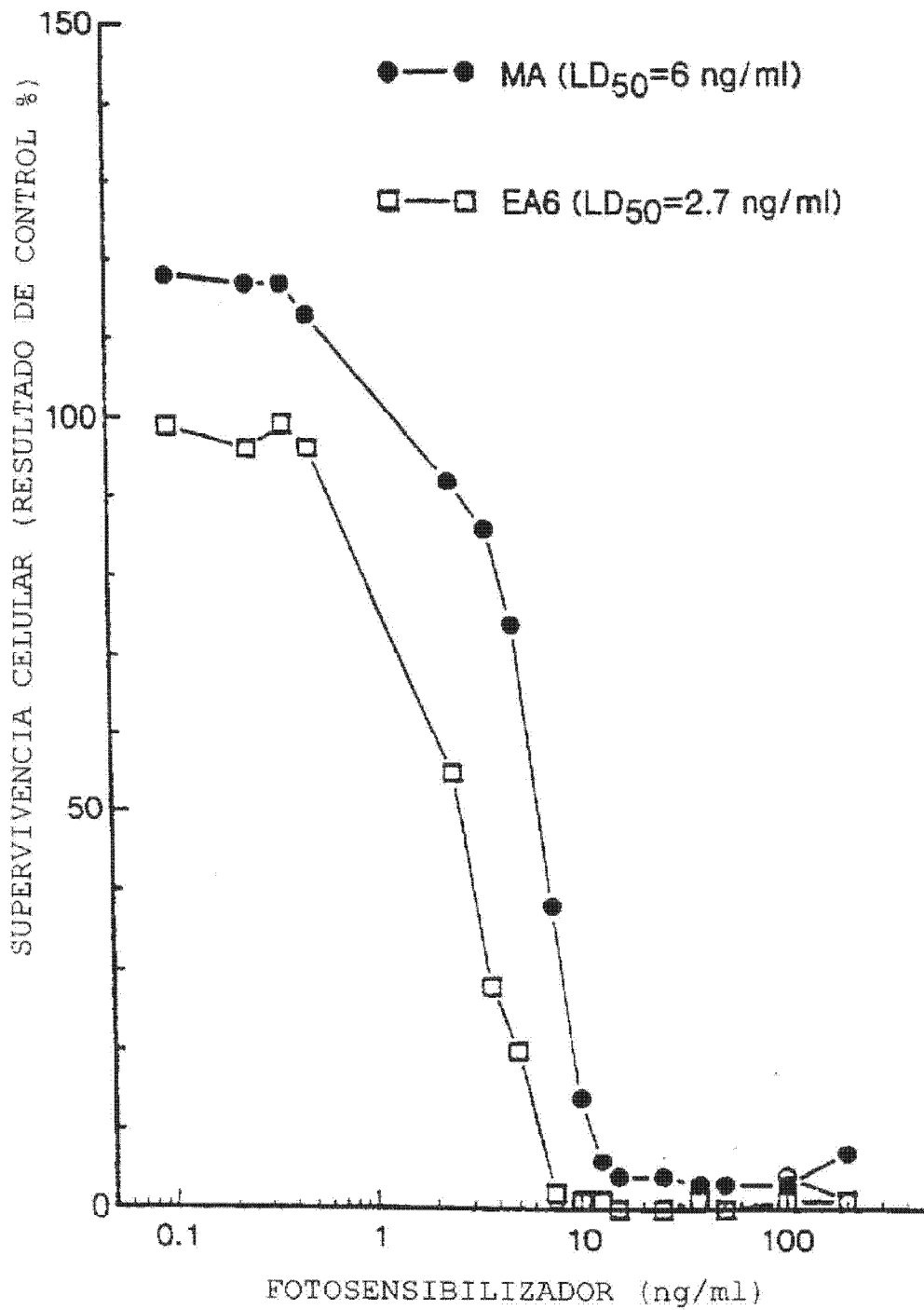


FIG. 9B

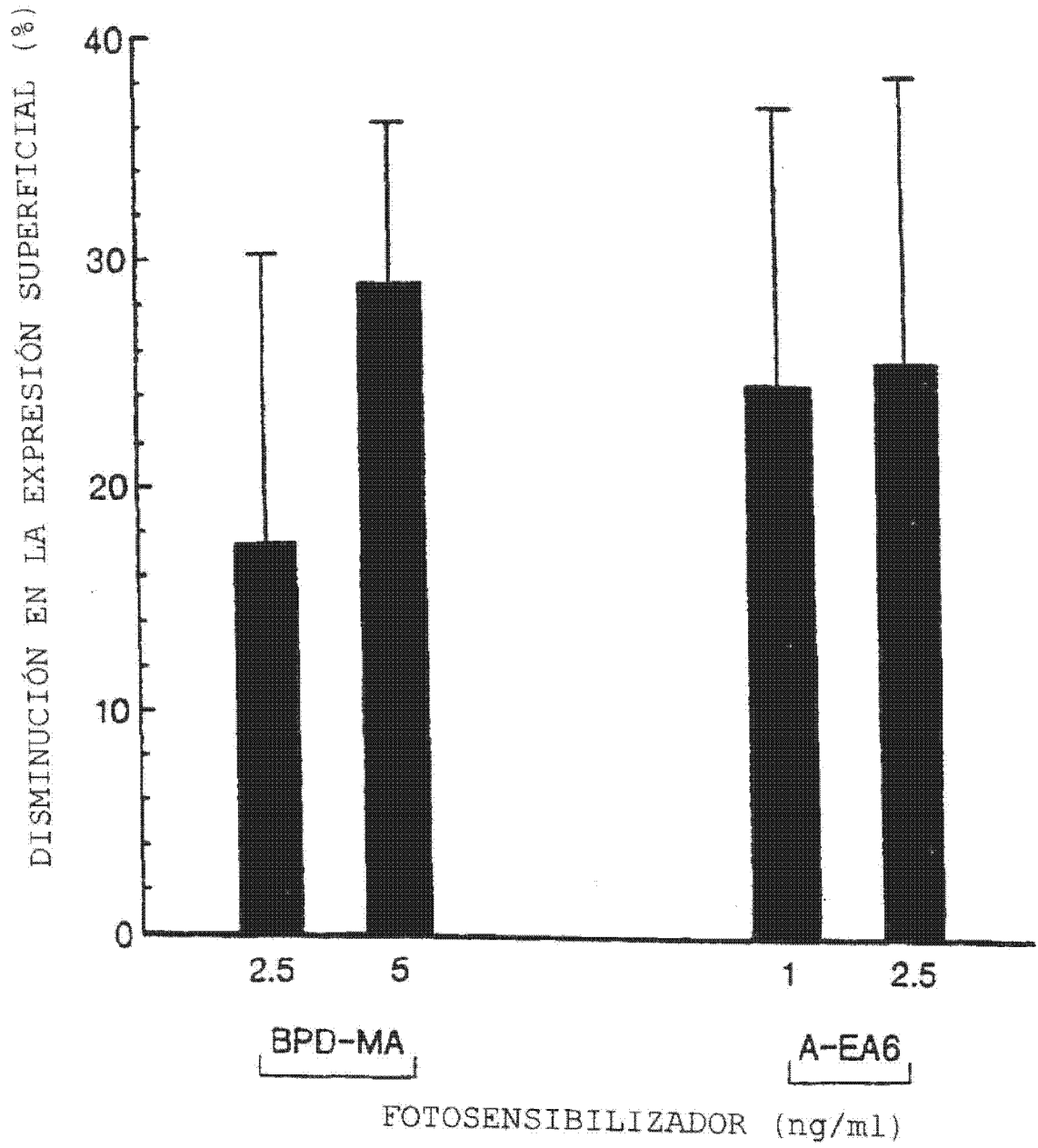


FIG. 10

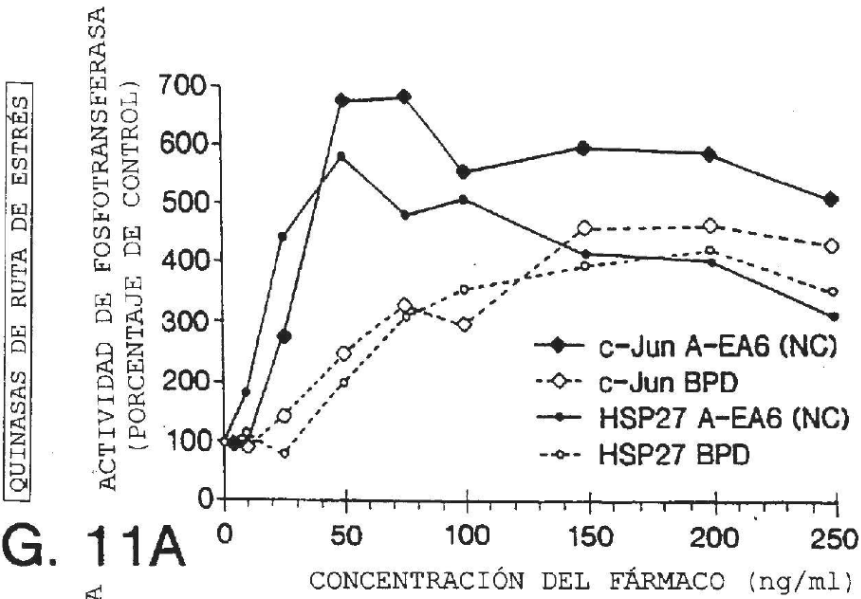


FIG. 11A

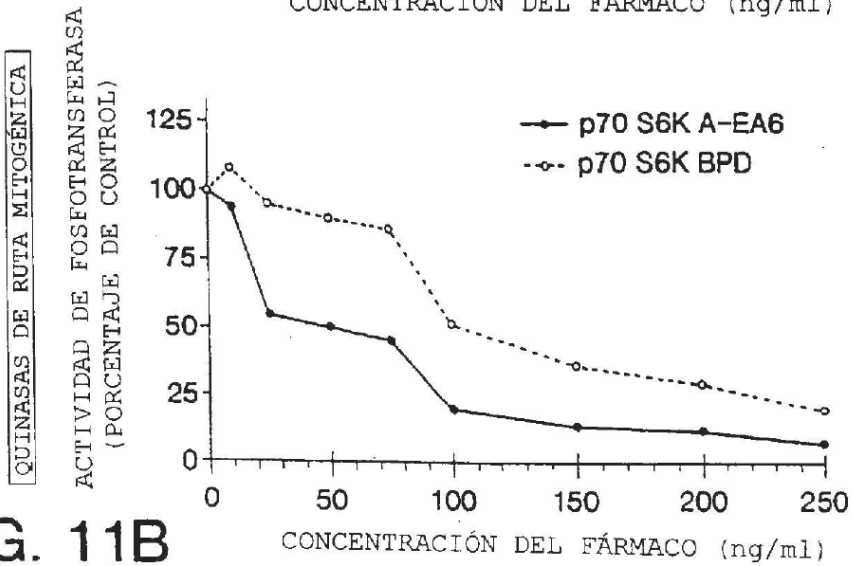


FIG. 11B

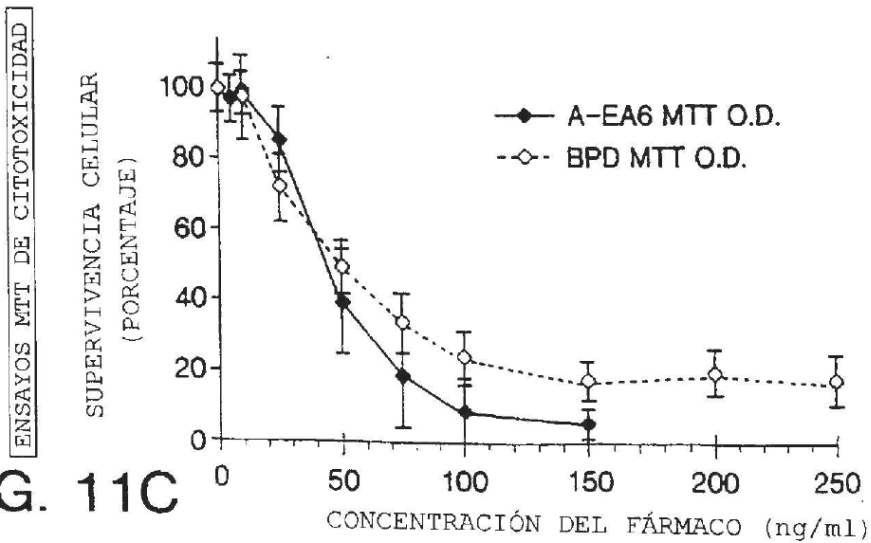


FIG. 11C

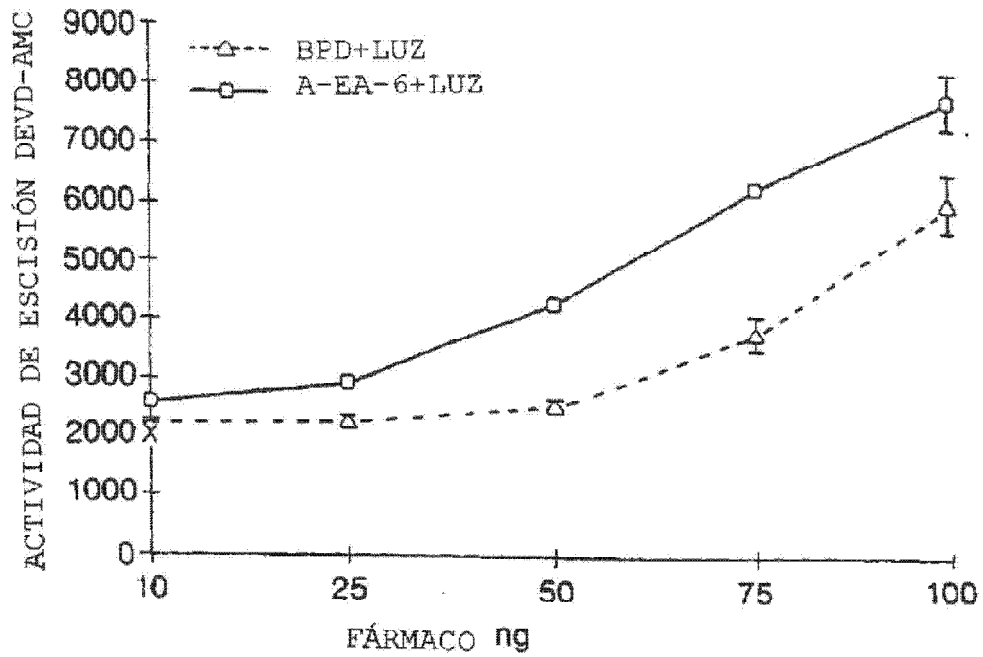


FIG. 12

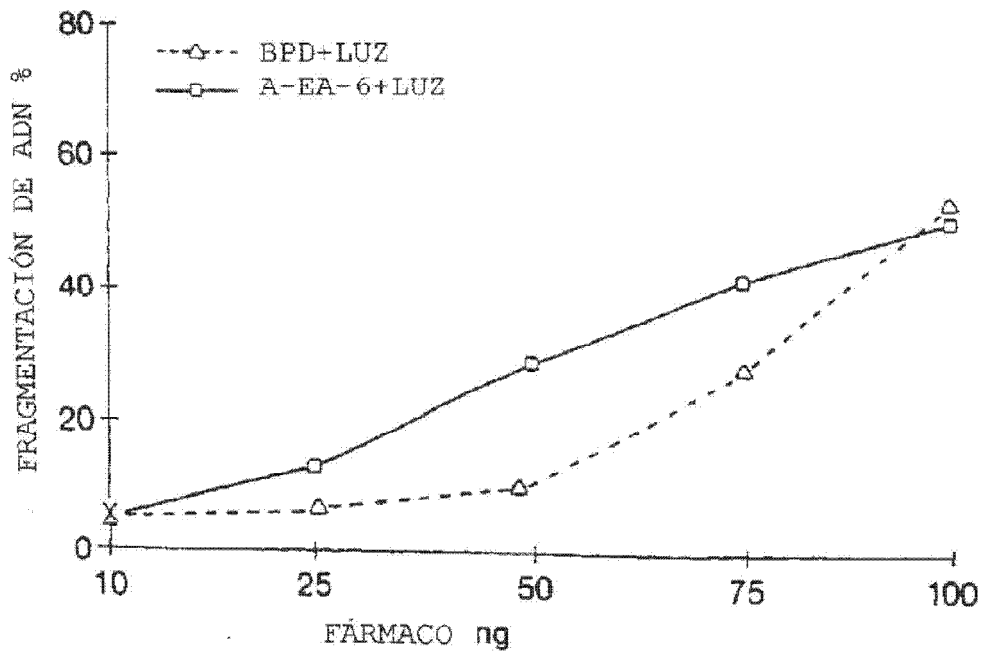


FIG. 13