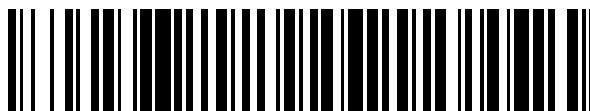


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 136**

51 Int. Cl.:

C07D 487/22 (2006.01)

A61K 31/409 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2009** **E 09768255 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 2346874**

54 Título: **Proceso para la preparación de clorinas y sus usos farmacéuticos**

30 Prioridad:

24.10.2008 GB 0819594

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2014

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE DE COIMBRA (50.0%)
Reitoria - Paço das Escolas
3004-531 Coimbra, PT y
BLUEPHARMA - INDUSTRIA FARMACÊUTICA,
S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

DA SILVA ARNAUT MOREIRA, LUÍS GUILHERME;
MIGUÉNS PEREIRA, MARIA;
FORMOSINHO SANCHES SIMÕES, SEBASTIÃO
JOSÉ;
MAGALHÃES SIMÕES, SÉRGIO PAULO;
URBANSKA, KRYSZYNA y
STOCHEL, GRAZYNA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 450 136 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

Proceso para la preparación de clorinas y sus usos farmacéuticos

OBJETO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención describe métodos de preparación, las propiedades y la composición farmacéutica para uso en terapia de clorinas y bacterioclorinas sulfonadas concebidas para la terapia fotodinámica (PDT, siglas en inglés de Photodynamic therapy) de los tejidos hiperproliferativos, tales como tumores, vasos sanguíneos hiperproliferativos y otros trastornos o anomalías que responden a la PDT. En particular, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la síntesis química a gran escala de clorinas y bacterioclorinas estables, que se caracteriza por la ausencia de disolventes y la ausencia de bases.

10 I.FUNDAMENTOS DE LA INVENCIÓN

I.A. Estado actual de la técnica

15 Varios compuestos macrocíclicos tetrapirrólicos, tales como las purpurinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas y benzoclorinas pueden acumularse preferentemente en los tejidos hiperproliferativos cuando se inyectan en un organismo y absorben la luz, originando un estado activado en respuesta a la luz. Estos compuestos macrocíclicos presentan entonces un efecto citotóxico en las células donde se encuentran otros tejidos que han sido irradiados con la longitud de onda apropiada. Además, estos compuestos emiten también energía a partir del tejido, fenómeno que puede utilizarse para detectar su ubicación.

20 En PDT, se le inyecta al paciente un fotosensibilizador (por lo general a una concentración de 0, 1 a 10 mg/kg de peso corporal), que presenta una cierta selectividad para causar daños fotoquímicos al tejido tumoral, y después de un tiempo determinado, se irradia la zona del tumor con luz visible o de la gama de infrarrojos cercana (aproximadamente 50 a 200 J/cm²). El fotosensibilizador absorbe la luz y emite fluorescencia, o reacciona con las moléculas presentes en los tejidos por medio de reacciones de transferencia de electrones o hidrógeno (procesos de Tipo I), o transfiere su energía al oxígeno molecular al estado fundamental generando oxígeno singlete O₂ (¹Δg) que ataca los tejidos (proceso de Tipo II). El principal contribuyente para el proceso de Tipo I es el ión superóxido (O₂⁻), formado por la transferencia de electrones que proceden del sensibilizador excitado electrónicamente. Existen pruebas a favor del proceso de foto-oxigenación Tipo II en relación al proceso Tipo I en células [1, 2], pero existen informes de aumento de la respuesta en PDT cuando también se genera el ión superóxido [3]. En caso de detección, la fluorescencia se determina por la exposición a la luz de la longitud de onda deseada, necesitando energías más bajas que aquellas utilizadas en el tratamiento. Generalmente, un tratamiento eficaz requiere la formación de grandes cantidades de oxígeno singlete en el tejido, que puede tener un efecto sinérgico con la formación simultánea de iones superóxidos u otras especies reactivas de oxígeno.

35 Las propiedades ideales de los sensibilizadores para su aplicación en PDT incluyen: (i) síntesis simple, eficiente y económica, (ii) estabilidad, la pureza y larga duración de almacenamiento, (iii) solubilidad en soportes o disolventes biocompatibles, (iv) coeficiente elevado de absorción en la "ventana fototerapéutica" (600-900 nm), (v) sensibilización de oxígeno molecular singlete y/o generación de iones superóxidos de alto rendimiento cuántico; (vi) toxicidad reducida o inexistente en ausencia de luz, (vii) acumulación selectiva y retención prolongada en los tejidos tumorales, (viii) baja fotosensibilidad de la piel bajo administración sistémica, (ix) fotoblanqueo controlado, (x) fácil metabolismo o excreción después del tratamiento. El sensibilizador sólo es el precursor de las especies citotóxicas, que incluye especialmente el oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno, tales como el ión superóxido. El precursor inmediato del oxígeno singlete y, a menudo, de iones superóxidos es el estado triplete del sensibilizador. Por lo tanto, para obtener un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete, o estado triplete del sensibilizador debe tener por lo menos tres propiedades: (i) rendimiento cuántico cercano a la unidad, (ii) energía electrónica de al menos 20 kJ/mol superior al oxígeno singlete (94 kJ/mol) y (iii) vida de larga duración (centenares de microsegundos). Se puede aumentar la acumulación y retención en los tejidos tumorales utilizando vectores específicos, pero una propiedad intrínseca pertinente del sensibilizador para tales fines es la hidrofilia/lipofilia del sensibilizador, y la capacidad de adaptar dichas propiedades para lograr los objetivos deseados es una propiedad muy apreciada.

50 El límite inferior de la ventana fototerapéutica se determina por la presencia de proteínas que contienen el grupo hemo, responsable en su mayoría de la absorción de la luz en la gama del espectro visible en los tejidos. La penetración de la luz en los tejidos disminuye rápidamente por debajo de 550 nm. Sin embargo, existe un aumento significativo en la penetración de 550 a 630 nm, que se duplica de nuevo a 700 nm. A esto, sigue un aumento del 10 % en la penetración del tejido a medida que la longitud de onda se desplaza hacia 800 nm. El límite superior de

la ventana fototerapéutica se determina por la absorción de la radiación de infrarrojos según las necesidades de agua y de energía para la transferencia eficiente de energía al oxígeno. De hecho, la transferencia de energía triplete controlada por difusión desde el sensibilizador para el oxígeno molecular requiere que la energía triplete del sensibilizador sea al menos de 115 kJ/mol. Además, el despliegue de energía singlete-triplete en compuestos macrocíclicos tetrapirrólicos es aprox. de 40 kJ/mol [4], que requiere que el sensibilizador tenga una energía singlete superior a 150 kJ/mol. Teniendo en cuenta que el desplazamiento de Stokes de estos sensibilizadores es generalmente pequeño, deberían absorber la luz por debajo de 800 nm. La conclusión es que un sensibilizador ideal debe absorber intensamente la luz de longitud de onda cercana a 750 nm. La fuerte absorción de bacterioclorinas en esta longitud de onda las hace candidatas ideales para los sensibilizadores en PDT. Para las aplicaciones en las que la penetración de la luz no es tan crítica, las clorinas también son candidatas adecuadas para su utilización en PDT.

Photofrin®, un derivado de hematoporfirina [5], es el fotosensibilizador más ampliamente utilizado y ha sido aprobado para el tratamiento de una variedad de tumores sólidos [6]. El derivado de hematoporfirina (HpD) se prepara mezclando la hematoporfirina con ácido acético glacial y ácido sulfúrico después de la hidrólisis y la precipitación en condiciones ácidas. Este método fue descrito parcialmente por Lipson *et al.* [7]. El HpD producido de esta manera es una mezcla compleja de porfirinas. Cuando el HpD se separa en sus dos fracciones principales por filtración en gel utilizando Sephadex LH-20, la porción con mayor peso molecular, denominada Photofrin®, es un agente más eficaz en PDT [8]. La dosis de Photofrin® recomendada en humanos es de 1-2 mg/kg de peso corporal. Los principales componentes de Photofrin® son dímeros y oligómeros de elevado peso molecular, unidos entre sí por el tipo de éter, éster y posiblemente carbono-carbono [9].

Photofrin® tiene ciertas características deseables, incluyendo una buena eficiencia, solubilidad en agua, rendimiento razonable de oxígeno singlete y facilidad de fabricación. No obstante, Photofrin® también tiene desventajas: (i) está compuesto de una mezcla compleja de dímeros de porfirina y oligómeros de elevado peso molecular, unidos entre sí por el tipo de éter, éster y / o carbono-carbono; (ii) muestra la fototoxicidad en la piel del paciente en las cuatro a seis semanas después de la administración; (iii) debido a su absorción relativamente débil en la gama del rojo (630 nm) y una falta de penetración de la luz a través de los tejidos, el uso actual de Photofrin® en clínica en el ámbito de aplicación de PDT está limitado a la destrucción del tejido canceroso situado a menos de 4 mm de la fuente de luz utilizada en la terapia. Así pues, se necesitan sensibilizadores más eficaces, químicamente puros, menos fototóxicos, que muestren una mejor ubicación y que absorban la luz con mayor intensidad en los infrarrojos.

Es conocido en la materia que la reducción química de los anillos tetrapirrólicos, que corresponde a la transformación de una porfirina en una clorina, provoca el desplazamiento de la banda de absorción de mayor longitud de onda hacia el rojo, al mismo tiempo que provoca el aumento de su coeficiente de absorción. Estas propiedades fueron exploradas en los fotosensibilizadores de segunda generación para PDT y 5, 10, 15, 20-tetraquis (3-hidroxifenil) clorina (m-THPC), comercializados como Foscan® presentado como uno de los más potentes de esta segunda generación de fotosensibilizadores [10]. La reducción posterior del anillo pirrólico opuesto, que corresponde a la transformación de clorina en bacterioclorina provoca el desplazamiento de la banda de absorción en los infrarrojos y el aumento adicional de su coeficiente de absorción. Sin embargo, hasta hace poco, se creía que las bacterioclorinas eran compuestos muy inestables [10] y los esfuerzos de investigación en los sensibilizadores para PDT se concentraban en las clorinas [11]. Posteriormente, se demostró que las bacterioclorinas estables pueden realmente sintetizarse. [12] Este hecho no se ha valorizado completamente en la literatura científica, donde se afirma que la síntesis de bacterioclorinas estables con este método se limita a la preparación de bacterioclorinas con funcionalidades inertes [13]. No obstante, se han preparado bacterioclorinas con otras características (véase PCT/EP2005/012212, WO/2006/053707).

El interés obvio en el uso de bacterioclorinas como sensibilizadores en PDT y los informes de que algunas bacterioclorinas de origen natural son fotosensibilizadores eficaces tanto *in vitro* como *in vivo* [14, 15] motivaron varios intentos para sintetizar las bacterioclorinas. Las bacterioclorinas sintéticas fueron preparadas por derivatización de las porfirinas correspondientes por dihidroxilación vecinal con tetróxido de osmio [16], la ciclización intramolecular [17], las reacciones de Diels-Alder usando porfirinas como dienófilos [18] o las reacciones de Diels-Alder con vinilporfirinas, donde el dieno es una porfirina [19] mediante cicloadiciones 1, 3-dipolar [20] e igualmente por autocondensación de derivados de desidrodipirino acetal [21] derivados. Además, existe un método clásico que Whitlock ha desarrollado durante muchas décadas para la preparación de bacterioclorinas mediante la reducción de posiciones pirrólicas 7, 8 a 17, 18 de la porfirina usando diimida [22]. Este fue el método utilizado por Bonnet para sintetizar el Foscan® y 5, 10, 15, 20-tetraquis (3-hidroxifenil) bacterioclorina [23]. Durante este tiempo, la investigación intensiva realizada sobre la síntesis de derivados de bacterioclorina dio lugar a un cierto número de patentes basadas en los métodos citados anteriormente (véase, por ejemplo, US2007/7166719, US2003/6624187, US2003/6569846, US2002/6376483, US1999/5864035, US1998/583108; WO90/12573, WO94/00118, WO95/32206, WO96/13504, WO97/32885, US2006/194 960).

Algunas de las nuevas bacterioclorinas sintetizadas tienen poca toxicidad en ausencia de luz y elevada selectividad por los tumores, son parcialmente solubles en agua y poseen fuertes bandas de absorción en la gama de 700 nm a 800 nm. Sin embargo, siguen persistiendo algunos inconvenientes, concretamente: (i) la síntesis complicada y costosa que implica etapas de purificación laboriosas, (ii) hidrosolubilidad limitada que, en el caso de la aplicación sistémica requiere la disolución en disolventes orgánicos, lo que representa una carga química adicional para el organismo, o requiere la conexión a un vehículo, aumentando el coste del tratamiento, (iii) inestabilidad química, especialmente en presencia de la luz, (iv) rendimientos cuánticos de oxígeno singlete bajos o desconocidos. Un interesante representante de la tercera generación de fotosensibilizantes es un complejo paladio-bacteriofeoforbídeo conocido en la actualidad como Tookad® y aprobado para los estudios clínicos de fase III. Tookad® se deriva de la bacterioclorofila y, como la mayoría de las bacterioclorinas de origen natural, es muy sensible al oxígeno, provocando su rápida oxidación en estado de clorina, que tiene un pico máximo de absorción en 660 nm o por debajo de este valor. Además, si se utiliza un láser para excitar la bacterioclorina *in vivo*, la oxidación podrá formar un nuevo cromóforo que absorbe el láser fuera de la ventana, reduciendo la eficiencia fotosensibilizante. La degradación fotoquímica de esta familia de compuestos se midió con iluminación a 778 nm (13 mW) en TX-100/PBS, revelando que el 90 % del compuesto se pierde irreversiblemente en 5 min (4J), con la aparición simultánea de la banda de clorina a 660 nm [3].

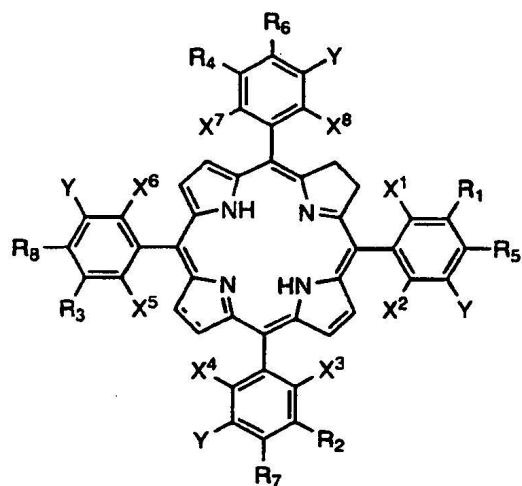
La PDT también fue probada ampliamente en el tratamiento de enfermedades de la piel, en particular, la queratosis actínica, carcinoma de células escamosas, la enfermedad de Bowen (carcinoma de células escamosas intraepiteliales) y carcinoma de células basales, pero existe muy poca información disponible del efecto en los melanomas malignos [24]. La alta pigmentación de los tejidos con melanoma limita la eficacia de la PDT cuando se utiliza luz visible, porque la melanina atenúa la penetración de la luz en longitudes de onda inferiores a 700 nm en los tejidos. También hay informes sobre el uso tópico de la PDT en enfermedades no tumorales, tales como la psoriasis. Los primeros estudios emplearon el derivado de hematoporfirina [25] y la sal tetrasódica del meso-sulfonato tetrafenilporfina [26] en formulaciones líquidas con potenciadores de penetración a través de la piel. Sin embargo, generalmente, cuando se aplica tópicamente HpD u otras porfirinas en una formulación (líquida, gel, crema, emulsión, etc.) con un vehículo destinado a mejorar su difusión a través del tejido, las porfirinas tienden a ser retenidas a medida que el potenciador de permeabilidad se diluye en los fluidos normales del tejido. En tales casos, las porfirinas ya no se pueden difundir a través del tejido (ni siquiera permanecer en solución). En consecuencia, la aplicación tópica de porfirinas se asocia a menudo con la pérdida de la especificidad para tejidos malignos, y los tejidos normales cercanos al lugar de aplicación pueden desarrollar una fotosensibilización permanente como resultado de la concentración localizada de porfirina.

Para superar estos problemas, se ha sugerido que, en vez de aplicar tópicamente una porfirina, sería ventajoso usar un agente que no fuera él mismo un fotosensibilizador, pero que indujese la síntesis de porfirinas endógenas *in vivo*, en particular, la protoporfirina IX (PpIX) [27]. Se sabe que el ácido 5-amino-4-oxopentanoico, también conocido como ácido 5-aminolevulínico (o ALA), es un precursor biológico de la protoporfirina - IX. Un exceso de ALA provoca una acumulación biológica de PpIX, que es el verdadero agente fotosensibilizante. Por lo tanto, aplicando tópicamente el ALA en los tumores cutáneos, y después de varias horas de exposición de estos tumores a la luz, se puede obtener un efecto fototerapéutico beneficioso (véase, por ejemplo WO91/01727). Teniendo en cuenta que el ALA penetra más fácilmente en los basilomas y carcinomas de células escamosas que en la piel sana, y puesto que la biosíntesis de PpIX es más eficiente en tumores cutáneos, se ha descubierto que la aplicación tópica de ALA aumenta la producción selectiva de PpIX en los tumores. Esta es la base de varias formulaciones dermatológicas de ALA o de algunos de sus derivados que fueron aprobados y son de uso clínico, sobre todo el Levulan® y el Metvix®.

No obstante, aunque el uso de ALA representa un avance significativo en la materia, la terapia fotodinámica con ALA no es totalmente satisfactoria. Los pacientes suelen informar en repetidas ocasiones de haber experimentado dolores durante la PDT con el ALA [28]. ALA es un profármaco y la eficiencia de la producción del principio activo varía de acuerdo con la biosíntesis del paciente. Sólo una cantidad muy pequeña de la PpIX puede ser biosintetizada por las células. Tiende a ser inestable en formulaciones farmacéuticas. No es capaz de penetrar en todos los tumores ni en otros tejidos con la suficiente eficacia, lo que impide el tratamiento de una serie de tumores u otras enfermedades. Su mejor longitud de onda fotoactivable es de 635 nm aprox., cuando se ha demostrado que sólo entre el 1 a 10% de la luz incidente roja (600-700 nm) puede atravesar una capa de tejido humano de 1 cm de espesor. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de mejores agentes terapéuticos fotodinámicos para aplicaciones tópicas.

I.B. Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención indica un proceso de preparación de un derivado de clorina o bacterioclorina que tiene la siguiente fórmula:



Fórmula (I)

en la que:

----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;

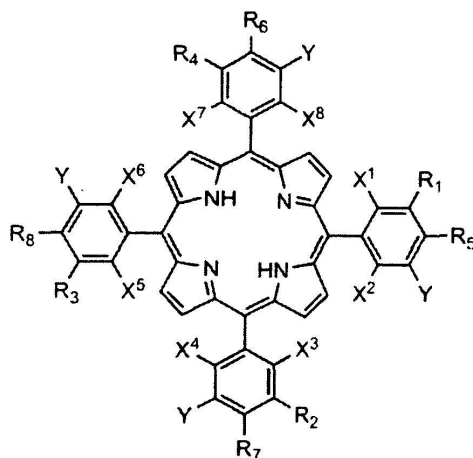
- 5 $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8$ son cada uno, halógenos (F, Cl, Br) y átomos de hidrógeno seleccionados independientemente, con la condición que simultáneamente X^2, X^4, X^6 , y X^8 o que simultáneamente, X^1, X^3, X^5 y X^7 sean halógenos, o que todos los X sean halógenos;

- 10 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ se seleccionan independientemente entre H, -OH y -SO₂R, en el que cada R se selecciona independientemente entre- Cl, -OH, - aminoácido, - ORⁿ, - NHRⁿ y -NR₂ⁿ-, donde Rⁿ es un alquilo con 1 a 12 átomos de carbono;

Y es un átomo de flúor o hidrógeno;

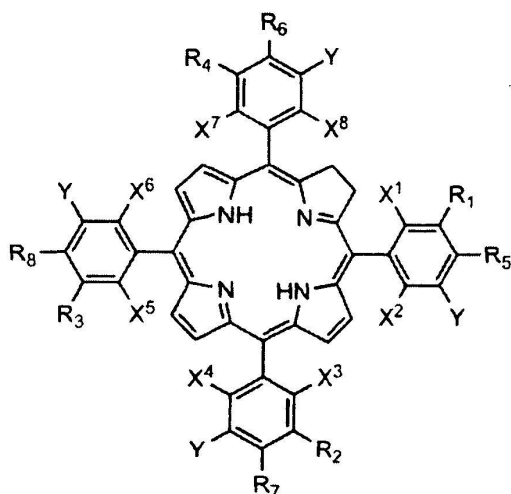
incluyendo la siguiente etapa:

- 15 (i) La reducción en estado sólido de la correspondiente porfirina sustituida en derivado clorina o bacterioclorina utilizando hidracidas en ausencia de disolventes y opcionalmente en ausencia de bases; en el que la correspondiente porfirina sustituida tiene la fórmula:



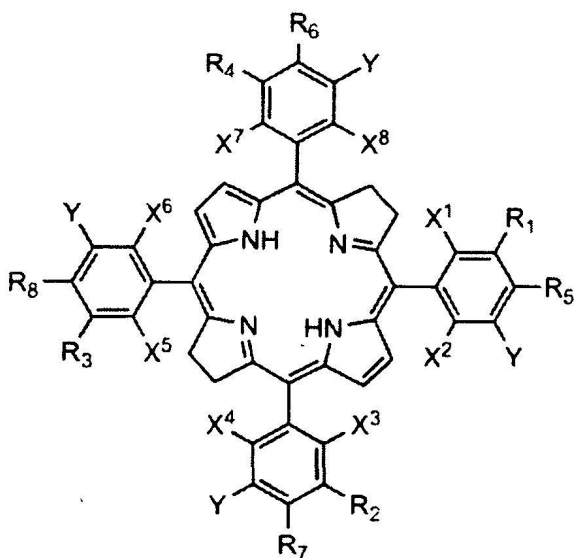
Fórmula (II).

Por lo tanto, el compuesto de fórmula (I) puede ser un derivado de clorina con la siguiente fórmula:



Fórmula (V).

Alternativamente, el compuesto de fórmula (I) puede ser un derivado de bacterioclorina con la siguiente fórmula:



Fórmula (VI).

De manera apropiada, X^2 , X^4 , X^6 , X^8 se seleccionan cada uno independientemente de los halógenos (F, Cl, Br).

De manera apropiada, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son H.

De manera apropiada, Y es H.

10 De manera apropiada, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , son $-SO_2R$, en el que cada R se selecciona independientemente entre- Cl, - OH, - aminoácido, - OR^n , - NHR^n y - NR_2^n , en el que R^n es un radical alquilo con 1 a 12 átomos de carbono.

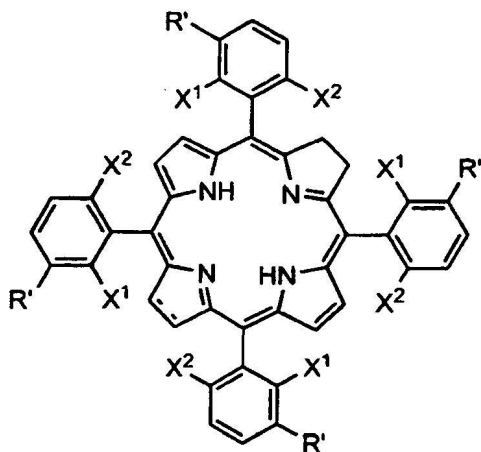
En otro aspecto, X^2 , X^4 , X^6 , X^8 se seleccionan cada uno independientemente de los halógenos (F, Cl, Br);

R₅, R₆, R₇, R₈ son H;

Y es H, y

R₁, R₂, R₃, R₄, son -SO₂R, en el que cada R se selecciona independientemente entre -Cl, -OH, -aminoácido, -ORⁿ, -NHRⁿ y -NR₂ⁿ, en el que Rⁿ es un radical alquilo con 1 a 12 átomos de carbono.

- 5 En otro aspecto, la presente invención indica un proceso de preparación de un derivado de clorina o de bacterioclorina que tiene la siguiente fórmula:



Fórmula (III)

en la que:

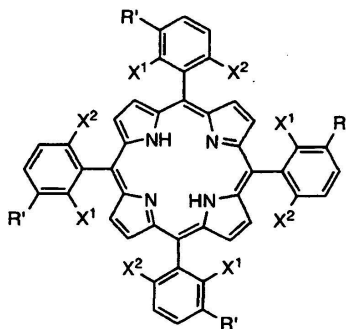
- 10 ----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;

X² se seleccionan a partir de halógenos (F, Cl, Br), X¹ se seleccionan entre hidrógeno o halógenos (F, Cl, Br) y

R' es -SO₂R, en el que cada R se selecciona independientemente entre -Cl, -OH, -aminoácido, -ORⁿ, -NHRⁿ y -NR₂ⁿ, en el que Rⁿ es un radical alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono,

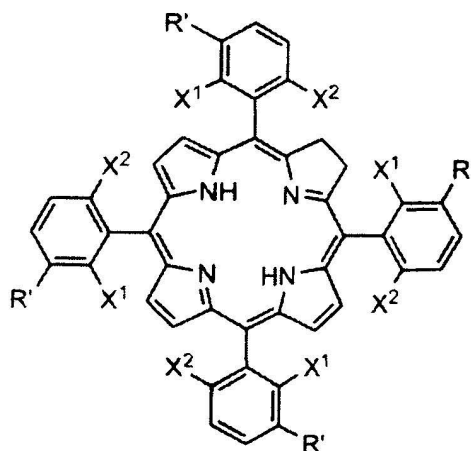
incluyendo el paso siguiente:

- 15 (i) La reducción en estado sólido de la correspondiente porfirina sustituida en derivado de clorina o de bacterioclorina usando hidracidas en ausencia de disolventes y, opcionalmente, en ausencia de bases, en el que la correspondiente porfirina sustituida tiene la fórmula:



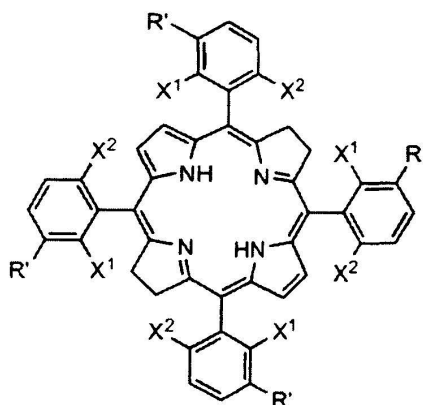
Fórmula (IV).

Por lo tanto, el compuesto de fórmula (III) puede ser un derivado de clorina que posee la fórmula:



Fórmula (VII).

Alternativamente, el compuesto de fórmula (III) puede ser un derivado de bacterioclorina con la fórmula:



Fórmula (VIII).

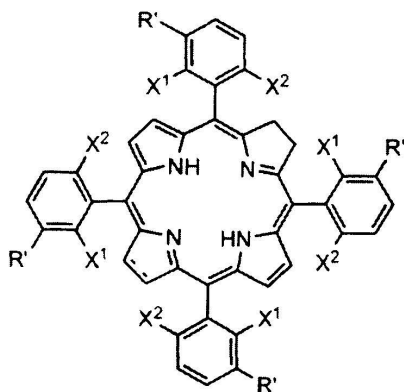
En otro aspecto, R' es $-SO_2R$, en el que R es $-Cl$ para la correspondiente porfirina sustituida de fórmula (IV), y el proceso incluye además la siguiente:

- 10 (ii) la unión del derivado de clorina o de bacterioclorina con una amina $H-NHR^n$ o $H-NR_2^n$, un aminoácido o un alcohol $H-OR^n$, en el que R^n es un radical alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono;

para proporcionar un derivado de clorina o de bacterioclorina en el que R' es $-SO_2R$, en el que R es un aminoácido, $-OR^n$, $-NHR^n$ o NR_2^n , en los que R^n es un radical alquilo que tienen de 1 a 12 átomos de carbono.

En otro aspecto, la presente invención describe una composición farmacéutica que comprende:

- (a) un derivado de clorina o de bacterioclorina con la fórmula:



Fórmula (III)

o una composición del derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico,

en la que :

5 ----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble ;

X^2 se selecciona a partir de halógenos (F, Cl, Br), X^1 se selecciona entre hidrógeno o halógeno (F, Cl, Br) y R' son $-SO_2R$;

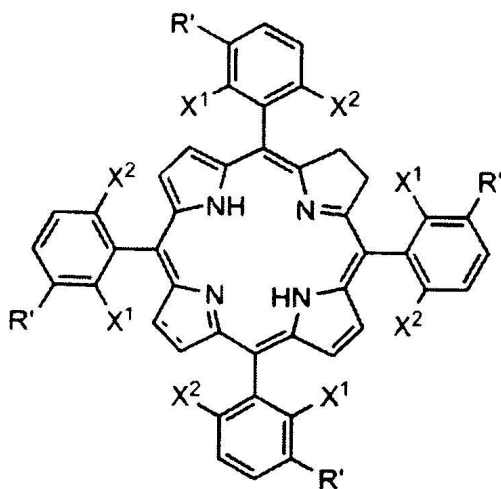
R se selecciona cada uno independientemente a partir de $-Cl$, $-OH$, $-aminoácido$, $-OR^n$, $-NHR^n$ y $-NR_2^n$, en el que R^n es un radical alquilo con 1 a 12 átomos de carbono,

10 en el que el derivado de clorina o de bacterioclorina es eficaz en un tratamiento de terapia fotodinámica para mejorar los síntomas de un trastorno hiperproliferativo, y

(b) un potenciador de la penetración de superficie.

Además, la presente invención describe el uso de un derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una
15 composición del derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en la detección de tejido hiperproliferativo;

en el que el derivado de clorina o de bacterioclorina tiene la fórmula:



Fórmula (III)

En la que:

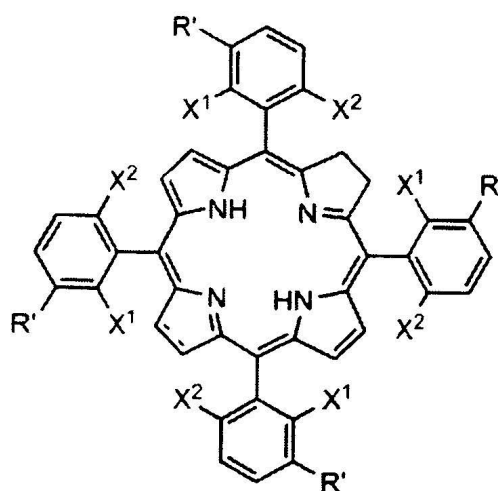
----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;

X^2 se selecciona a partir de halógenos (F, Cl, Br), X^1 se seleccionan entre hidrógeno o halógeno (F, Cl, Br) y R' son $-SO_2R$;

- 5 R se selecciona cada uno independientemente a partir de $-Cl$, $-OH$, $-aminoácido$, $-OR^n$, $-NHR^n$ y $-NR_2^n$, donde R^n es alquilo de 1 a 12 átomos de carbono,

Además, la presente invención describe un método para detectar la presencia de un tejido hiperproliferativo en un paciente e incluye:

- 10 (i) administrar al paciente una cantidad suficiente para diagnosticar un derivado de clorina o de bacterioclorina y la cantidad de la siguiente fórmula:



Fórmula (III)

En el que:

- 15 ----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;
 X^2 se seleccionan a partir de halógenos (F, Cl, Br), X^1 se seleccionan entre hidrógeno o halógenos (F, Cl, Br) y R' son $-SO_2R$;

R se seleccionan cada uno independientemente como $-Cl$, $-OH$, $-aminoácido$, $-OR^n$, $-NHR^n$ y $-NR_2^n$, donde R^n son radicales alquilo de 1 a 12 átomos de carbono,

- 20 o una composición de la derivada aceptable desde el punto vista farmacéutico que se asocia preferentemente con el objetivo,

(ii) esperar un tiempo suficiente para que el derivado de clorina o de bacterioclorina se una al objetivo y para cualquier derivado de clorina o de bacterioclorina que no se une preferentemente al tejido objetivo y deba ser eliminado del tejido no objetivo, y

(iii) la visualización del compuesto en el paciente.

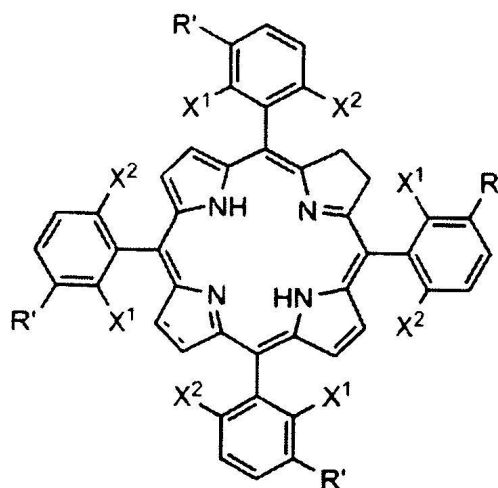
- 25 La etapa de visualización puede llevarse a cabo mediante la generación de una imagen de resonancia magnética (MRI) de al menos una parte del cuerpo del paciente.

Alternativamente, la visualización se puede realizar, exponiendo el compuesto a la luz suficiente para causar su poder de fluorescencia.

Además, la presente invención describe una composición aceptable desde el punto de vista farmacéutico para su uso en el tratamiento de un cáncer de piel o trastornos de la piel, incluyendo, queratosis actínica, carcinoma de células escamosas, la enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales, la psoriasis y el acné vulgar y rosácea;

5 en el que la composición comprende:

(i) un derivado de clorina o de bacterioclorina con la fórmula:



Fórmula (III)

En el que:

10 ----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;

X^2 se seleccionan a partir de halógenos (F, Cl, Br), X^1 se seleccionan entre hidrógeno o halógenos (F, Cl, Br) y R' son - SO_2R ;

R se seleccionan cada uno independientemente a partir de -Cl, -OH, -aminoácido, - OR^n , - NHR^n y - NR_2^n , donde R^n son radicales alquilo de 1 a 12 átomos de carbono;

15 y

(ii) un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico para suministro transdérmico o intradérmico de este compuesto, en el que el vehículo incluye un potenciador de penetración de la superficie que permeabiliza temporalmente la piel y facilita la penetración del compuesto a través de las diversas capas de la piel;

en el que

20 (a) la composición se administra a un paciente;

(b) se espera el tiempo suficiente para que el derivado de clorina o de bacterioclorina se acumule preferentemente en las proximidades del objetivo de tratamiento dermatológico, y

(c) el objetivo es irradiado para obtener la respuesta deseada en el cáncer de piel o en los trastornos cutáneos.

Proceso para la preparación de derivados

25 De manera apropiada, la hidrazina y el p-tolueno sulfonil hidrazida, de 4-clorobenzeno sulfónico hidrazida, de 4, 4'-oxi bis (benceno sulfonil) hidrazida, de benceno sulfonil hidrazida, de 4 - metoxibenceno sulfonil hidrazida o de hidrazida benzoico.

Las reacciones en estado sólido requieren el uso de temperaturas superiores al punto de fusión de uno de los reactivos, de modo que el (los) otro(s) reactivo(s) se encuentre(n) parcialmente disuelto(s) o dispersado(s) en el reactivo fundido. En el caso de reacciones en estado sólido entre derivados de porfirina e hidrazidas, la reacción en estado sólido se efectúa convenientemente por encima del punto de fusión de la hidrazida.

- 5 Pertinentemente, la etapa de reducción se realiza a una temperatura de al menos 70 °C. Pertinentemente, la etapa de reducción se realiza a una temperatura de al menos 100 °C. En otro aspecto, la etapa de reducción se lleva a cabo a temperaturas entre 70 y 200 °C. Pertinentemente, la etapa de reducción se lleva a cabo durante al menos 5 minutos.

Pertinentemente, la etapa de reducción se realiza al vacío o en atmósfera inerte.

10 Composiciones farmacéuticas

- 15 Pertinentemente, la composición farmacéutica contiene al menos 0,01% en peso del derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en base al peso total de la composición. Pertinentemente, la composición farmacéutica contiene de 0,01% a 30% en peso de del derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una sal del derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en base al peso total de la composición. La composición farmacéutica apropiada contiene de 0,01 % a 10 % en peso de derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en base al peso total de la composición. La composición farmacéutica apropiada contiene entre 0,1 % y 1 % en peso del derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en base al peso total de la composición.

- 20 Cuando un potenciador de penetración en superficie está presente en una composición farmacéutica, pertinentemente la composición contiene de 0,05 a 10 % en peso del potenciador de la penetración de superficie, en base al peso total de la composición. Pertinentemente, la composición contiene de 0,1 a 10 % en peso del potenciador de la penetración de la superficie. Pertinentemente, este potenciador de la penetración de la superficie puede seleccionarse entre dimetilsulfóxido y otros dialquilsulfóxidos, N-metilformamida, dimetilformamida, dimetilacetamida, glicoles, varios derivados de la pirrolidona, y diversas azacicloalcan-2-onas sustituidas en la posición 1.

Pertinentemente, los glicoles se pueden seleccionar entre polietilenoglicol, polietilenoglicol 425, trimetilenoglicol y propilenoglicol monolaureato.

- 30 Pertinentemente, los derivados de la pirrolidona se pueden seleccionar a partir de entre N-dodecil- pirrolidina-3, 5-diona, N-dodecil- pirrolidina-2-tiona, N-dodecil-2-pirrolidona, N-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona, N-ciclohexil-2-pirrolidona, 1-butil-3-dodecil-2-pirrolidona, 1, 5-dimetil-2-pirrolidona, 1-etil-2-pirrolidona, 1-hexil-4-metiloxycarbonil-2-pirrolidona, 1-hexil-2-pirrolidona, 1-(2-hidroxietil) pirrolidona, 3-hidroxi-N-metil-2-pirrolidinona, 1-lauril-4-metiloxycarbonil-2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona.

- 35 Pertinentemente, las azacicloalcan-2-onas sustituidas en posición 1, incluyendo 1-dodecilazacicloheptan -2-ona, en lo sucesivo, Azone®, se dan a conocer en las patentes US US. Pat. N° 4.562.075, 4.405.616, 4.326.893 y 3.989.816.

Detección de tejido hiperproliferativo

- 40 Cuando los derivados de clorina y de bacterioclorina, o sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, se utilizan para detectar tejidos hiperproliferativos, el tejido hiperproliferativo puede ser un tejido endotelial vascular, tejido neovascularizado, tejido neovascularizado localizado en el ojo, pared vascular anormal de un tumor, tumor sólido, tumor de cabeza, tumor de cuello, tumor en un ojo, tumores del tracto gastrointestinal, tumor del hígado, tumor de mama, tumor de próstata, tumor de pulmón, tumor no sólido, células malignas de un tejido hematopoyético y tejido linfático, lesiones del sistema vascular, una enfermedad de la médula ósea, y las células enfermas donde la enfermedad es autoinmune o de origen inflamatoria.

45 Tratamiento de enfermedades hiperproliferativas

En otro aspecto, la presente invención describe la utilización de un derivado de clorina o de bacterioclorina, o de una sal del derivado aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.

Cuando los derivados de clorina o de bacterioclorina, o derivados de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, se utilizan en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, pertinentemente los trastornos hiperproliferativos pueden ser cánceres o carcinomas, mielomas, psoriasis y degeneración macular. Los ejemplos pertinentes incluyen cáncer gástrico, cáncer entérico, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de útero, 5 cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer faríngeo, sarcomas, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer de la mandíbula superior, cáncer de conducto biliar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de lengua, tumor cerebral, cáncer de piel, tumor maligno de la glándula tiroides, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de la glándula parótida, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia y linfocitoma maligno.

10 Tales tratamientos incluyen pertinentemente la irradiación del derivado de clorina o de bacterioclorina, o de su derivado de composición aceptable desde el punto de vista farmacéutico, con luz de longitud de onda correspondiente a las bandas de absorción de clorina o de bacterioclorina. La longitud de onda apropiada de la luz es de 600 a 800 nm. Pertinentemente, cuando se utilizan clorinas, la luz debe tener una longitud de onda entre 630 y 690 nm. Pertinentemente cuando se utilizan bacterioclorinas, la luz debe tener una longitud de onda entre 720 nm 15 y 780 nm.

Pertinente, la dosis adecuada de la luz es de 1 a 250 J/cm². En algunos casos, la dosis apropiada de la luz es inferior a 50 J/cm², inferior a 20 J/cm², o inferior a 10 J/cm².

Pertinentemente, la dosis apropiada del derivado de clorina o de bacterioclorina, o de sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, es de 0,01 mg a 200 mg por kilogramo de peso corporal al día. Pertinentemente, la 20 dosis adecuada es de 0,01 mg a 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.

La presente invención se llevó a cabo con el conocimiento del estado de la técnica descrito anteriormente. La síntesis descrita en la patente WO 2006/053 707 (PCT/EP2005/012212) incluye sólo tres pasos semicuantitativos:

(i) funcionalización de tetraquis-fenilporfirinas halogenadas a través de la clorosulfonación del anillo fenílico,

25 (ii) síntesis de compuestos anfifílicos a través de la reacción con el grupo clorosulfónico con agentes nucleófilos, agua, concretamente, aminas, y alcoholes; (iii) reducción del compuesto macrocíclico tetrapirrólico con derivados de hidrazida en presencia de bases no nucleófilas inorgánicas u orgánicas. Sin embargo, como se muestra en la Figura 2 de la patente WO 2006/053707, la síntesis de las bacterioclorinas sulfonadas y halogenadas por este método está asociada a la contaminación por la clorina análoga, y la purificación requiere una separación laboriosa. El objeto de la presente invención consiste en proporcionar una síntesis económica, respetando el medio 30 ambiente y a gran escala de tetraquis fenilclorinas y tetraquis fenilbacterioclorinas puras, estables y funcionalizados con grupos extractores de electrones en las posiciones orto de los anillos fenílicos

Los bacterioclorinas tienen características específicas que los convierten en los fotosensibilizadores preferidos en PDT:

35 1) Los átomos de halógeno presentes en las posiciones orto de los grupos fenilo ejercen tres funciones. En primer lugar, producen un "efecto de átomo pesado" controlado, lo que aumenta el rendimiento del estado triplete del sensibilizador sin afectar la vida útil del triplete y su capacidad para transferir de manera eficiente la energía electrónica al oxígeno molecular [29]. En segundo lugar, estabilizan el estado reducido de los compuestos macrocíclicos tetrapirrólicos, ya sea por los efectos electrónicos y estéreo. En tercer lugar, incrementan la constante de velocidad de transferencia de energía para el oxígeno molecular mediante interacciones de 40 transferencia de carga, lo que conduce a elevados rendimientos de oxígeno singlete, iones superóxido y otras especies reactivas del oxígeno.

2) El ácido sulfónico presente en las posiciones meta de los grupos fenilo sirve para dos funciones. Primero, permite modificar de manera deseada la hidrofilia/lipofilia de los sensibilizadores, ya que los sensibilizadores muy hidrófobos parecen ser menos fototóxicos, probablemente debido a la baja solubilidad y su pequeña capacidad de reubicar la 45 membrana plasmática en otros compartimentos intracelulares, mientras que los tintes muy hidrófilos pueden estar ubicados principalmente en el estroma tumoral y mostrar una eficacia reducida en PDT [30]. En segundo lugar, el grupo sulfónico, especialmente vinculado a los sustituyentes voluminosos o largos, promueve la protección estérica adicional contra la oxidación del anillo bacterioclorina de los colorantes.

3) La presencia simultánea de átomos de halógeno en las posiciones orto y del grupo sulfónico en las posiciones meta de los grupos fenilo ejerce una función adicional. La modelización molecular y los datos experimentales indican que cuando no se limita la rotación alrededor del enlace sencillo en la posición meso en las 5, 10, 15, 20- 50

tetrafenilporfirinas con anillos de fenilo asimétricos, se observan isómeros geométricos (conocidos como atropisómeros) debido a la posición diferente de los sustituyentes en orto y/o meta con respecto al plano de la porfirina [31]. Los atropisómeros tienen polaridades significativamente diferentes y coeficientes de absorción de la banda de absorción a la longitud de onda más larga que pueden diferir en casi un orden de magnitud. Particularmente, el isómero $\square_4$ con los cuatro sustituyentes sulfamiloil del mismo lado del plano de la porfirina, tiene el coeficiente de absorción más alto y es el atropisómero más anfifílico.

El uso generalizado de clorinas y bacterioclorinas sulfonadas en PDT requiere una síntesis económica y compatible con el medio ambiente que se puede realizar a nivel industrial. Uno de los principales objetivos de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo método de preparación de tales compuestos, basado únicamente en una porfirina precursora y una hidrazida, y cuando esta última se añade en forma sólida y se calienta por encima de la temperatura de fusión en un reactor cerrado herméticamente con ausencia de oxígeno y la base, se obtiene el producto deseado después de un cierto tiempo.

La presente invención describe métodos de PDT por medio de la administración tópica de una determinada clorina o bacterioclorina sulfonada, en un vehículo adecuado. Los vehículos para administración tópica de los fotosensibilizadores pueden ser de varias formas, incluyendo soluciones líquidas, geles, cremas, emulsiones, pomadas, etc. Normalmente, la formulación de tales vehículos incluye por lo menos un potenciador de la penetración de superficie. Contrariamente a la sabiduría convencional en este campo, que afirma que los fármacos con pesos moleculares superiores a 500 Dalton no atraviesan bien la piel [32], proporcionamos formulaciones para el suministro intradérmico eficiente de las citadas clorinas o bacterioclorinas sulfonadas para enfermedades cutáneas, en las que las moléculas tienen pesos moleculares ligeramente superiores a 1 kD.

Esta invención describe compuestos para el tratamiento y la detección de tejidos hiperproliferativos tales como tumores, por medio de métodos fotodinámicos. Los compuestos también son útiles en el tratamiento de trastornos dermatológicos como la psoriasis y el acné vulgar y rosácea; trastornos ginecológicos tales como la hemorragia uterina disfuncional; trastornos urológicos tales como el virus de condiloma, trastornos cardiovasculares tales como la reestenosis y las placas ateroscleróticas; destrucción fotodinámica de bacterias o virus, depilación y cosmética, inhibición de la respuesta inmunológica después de un trasplante de órganos o tejidos.

Por último, la presente invención también tiene como objetivo describir métodos para el diagnóstico de tejidos hiperproliferativos usando clorinas o bacterioclorinas sulfonadas y halogenadas. A condición de que estos compuestos se acumulen en estos tejidos, la propiedad adicional que se requiere para fines de diagnóstico es la detección inequívoca de cantidades muy pequeñas de estos compuestos. Estos compuestos tienen bandas de absorción muy distintas en las gamas de rojo y de infrarrojos, para que los tejidos sean más transparentes. La excitación selectiva de estos compuestos causa una fluorescencia característica en longitudes de onda donde las moléculas biológicas no emiten. La detección de la fluorescencia se puede llevar a cabo con equipos de alta sensibilidad, y cantidades subnanomolares de clorinas sulfonadas o bacterioclorinas halogenadas que pueden medirse en los medios biológicos. La fuente de irradiación para fotodiagnóstico y la fototerapia no está restringida, pero se prefiere un rayo láser, ya que puede aplicar selectivamente intensos rayos de luz en la gama de longitudes de onda deseada. Es necesario que los rayos de luz tengan suficiente intensidad para que los compuestos emitan una fluorescencia apropiada para el diagnóstico y la terapia, ocasionando la muerte celular. Además, cuando se utilizan clorinas o bacterioclorinas sulfonadas y fluoradas, se puede detectar la acumulación de estos compuestos en pequeñas zonas del cuerpo y vigilar sus metabolitos formados durante la eliminación por el organismo mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) de flúor.

II. DESCRIPCIÓN DETALLADA

II. A. Definiciones

En el contexto de esta invención, "trastornos hiperproliferativos" se refiere a trastornos cuya patología implica la proliferación celular excesiva común causada por un crecimiento celular alterado o anormal e incluye la angiogénesis descontrolada. Los ejemplos de trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no están limitados a, cánceres y carcinomas, mielomas, psoriasis y degeneración macular.

En el contexto de esta invención, "tejido hiperproliferativo" se refiere a un tejido que crece de manera incontrolada, e incluye tumores, y crecimiento incontrolado de los vasos, tales como el crecimiento de los vasos sanguíneos observados en la degeneración macular relacionada con la edad.

En el ámbito de esta patente, "tumor" denota un neoplasma e incluye tanto los tumores benignos como malignos. Este término incluye especialmente los tumores malignos que pueden ser sólidos o no sólidos (por ejemplo, la

leucemia). Ejemplos de tumores son el cáncer gástrico, cáncer entérico, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer faríngeo, sarcomas, cáncer hepático, cáncer de la vejiga, cáncer de la mandíbula superior, cáncer del conducto biliar, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer de lengua, tumor cerebral, cáncer de piel, tumor maligno de la tiroides, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de la glándula parótida, la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia y linfocitoma maligno.

En el contexto de esta invención, "agente infeccioso" denota la invasión de microbios o parásitos. En el contexto utilizado en la presente memoria, "microbio" se refiere a virus, bacterias, rickettsias, micoplasmas, protozoos, hongos y otros microorganismos, y "parasitaria" se refiere a invertebrados multicelulares generalmente microscópicos o muy pequeños, o sus huevos o sus formas jóvenes, que son susceptibles a la eliminación mediante la inducción de anticuerpos o destrucción por lisis o fagocitosis.

Bajo esta patente, un "agente farmacéutico" o "medicamento" se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra a un paciente de la manera apropiada. El término incluye, pero no se limita a, fotosensibilizadores que absorben la luz y lo utilizan para actuar como un medicamento o para activar otros compuestos químicos que, posteriormente actúan como fármacos.

En el contexto de esta invención, "derivado de composición aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a composiciones en las que los fotosensibilizadores están vinculados a los grupos biológicamente activos, o en otras palabras, a cualquier grupo que promueva selectivamente la unión, la acumulación o la eliminación en un determinado medio biológico. Los ejemplos clásicos incluyen los sustituyentes derivados de azúcares, derivados de aminoácidos, y oligonucleótidos o enlaces específicos para receptores (hormonas esteroideas, factores de crecimiento, neurotransmisores y anticuerpos). También incluyen las sales de los fotosensibilizadores.

En el ámbito de esta invención, "vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos y cualesquiera de los disolventes, medios de dispersión, excipientes para la formulación de pastillas, píldoras, cápsulas, cremas, soluciones, suspensiones o emulsiones. Las técnicas implicadas en la formulación de estas composiciones farmacéuticas son bien conocidas.

En el contexto de esta invención, "potenciador de penetración de superficie" se refiere a un compuesto o a una composición química capaz de aumentar o acelerar el suministro del fármaco a través de una barrera, tal como la piel y otros tejidos, incluyendo el dimetilsulfóxido y otros dialquilsulfóxidos, la dimetilformamida, la dimetilacetamida, los glicoles, varios derivados de la pirrolidona, el Azone®, o cualquiera de los otros agentes que facilitan la penetración en la piel descritos en la literatura, o mezclas de los mismos.

En el contexto de esta invención, "irradiación" designa la exposición de un paciente a todas las frecuencias del espectro electromagnético. Preferiblemente, la longitud de onda seleccionada para la irradiación es igual a la (a las) longitud (es) de onda en la que el fármaco absorbe la luz.

En el contexto de esta patente "Luzitina" se refiere a cualquier tetraquis-fenilclorina o tetraquis-fenilbacterioclorina sulfonada que tiene grupos extractores de electrodos en las posiciones orto de los grupos fenilo, y las siguientes siglas se refieren a compuestos químicos específicos que son ejemplos no limitativos de esta amplia gama de moléculas:

- Luzitina-Cl-c es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-cloro-5-sulfonilfenil) de clorina,

- Luzitina-FMet-c es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-fluoro-5-N-metilsulfamoilfenil) clorina,

- Luzitina -F es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-fluoro-5-sulfonilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina -Cl es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-cloro-5-sulfonilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina -Cl₂ es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2, 6-dicloro-3-sulfonilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina-FMet es 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-fluoro-5-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina-F₂Met es 5, 10, 15, 20-tetraquis (2, 6-fluoro-3-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina Cl₂Et es 5, 10, 15, 20 -tetraquis-(2, 6-dicloro-3-N-etilsulfamoilfenil) bacterioclorina,

- Luzitina- Cl₂Hep es 5, 10, 15, 20 -tetraquis-(2, 6-dicloro-3-N-heptilsulfamoilfenil) bacterioclorina,
- Luzitina FMet₂ es 5, 10, 15, 20-tetraquis-(2-fluoro-5-N, N-dimetilsulfamoilfenil) bacterioclorina,

También se usan aquí los siguientes acrónimos:

- Cl₂PhB, que se refiere a 5, 10, 15, 20-tetraquis (2, 6-diclorofenil) bacterioclorina
- 5 - BMPO, que se refiere al 5-terc-butoxicarbonil-5-metil-1-pirrolino-N-óxido
- DMPO, que se refiere al 5-dimetil-1-pirrolino-N-óxido
- DMSO, que se refiere al dimetilsulfóxido

II. B. Compuestos precursores

- 10 Si los sintetizados 5, 10, 15, 20 –tetraquis (halógeno-fenil) porfirinas y las 5, 10, 15, 20-tetraquis (2-cianofenil)porfirinas, las 5, 10, 15, 20-tetraquis (2-trifluorometilfenil)porfirinas, las 5, 10, 15, 20-tetraquis (2-nitrofenil) porfirinas y las 5, 10, 15, 20 tetraquis (2-carboximetilfenil) porfirinas por el método de nitrobenzono [33], mezclando el pirrol con los fenilaldeídos halogenados deseados en una mezcla de ácido acético/nitrobenzono a 120 °C. Una vez enfriada, la porfirina en su forma pura cristaliza directamente desde el medio de reacción. Todos los datos de caracterización (obtenidos por RMN, FAB y microanálisis) concuerdan totalmente con las porfirinas descritas
- 15 anteriormente.

- La clorosulfonación de las dichas porfirinas se ha realizado según un procedimiento desarrollado anteriormente [34, 35]. La porfirina requerida (200 mg) y el ácido clorosulfónico (10 ml, 150 mmoles) se agitaron a temperaturas comprendidas entre 50 y 250 °C durante 1 a 3 horas. Después de este tiempo, se añadió el diclorometano (200 ml) a la solución. Se realizó la extracción continua de agua con agitación hasta la neutralización. A continuación, se lavó
- 20 la solución de diclorometano con bicarbonato de sodio y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Después de la purificación por cromatografía en columna en gel de sílice usando diclorometano como eluyente y posterior evaporación del disolvente, se obtuvieron las porfirinas clorosulfonadas deseadas en forma de cristales de color púrpura.

- La hidrólisis de las porfirinas clorosulfonadas anteriormente mencionadas se hizo mediante la suspensión de 100 mg del compuesto deseado en agua destilada (120 ml) y llevar a cabo el reflujo de la mezcla durante 12 h. Las
- 25 soluciones resultantes se concentraron en un evaporador rotatorio y el sólido obtenido se secó a 120 °C. Los derivados de ácido sulfónico de porfirina se obtuvieron con un rendimiento cuantitativo. La caracterización de los mismos por RMN, FAB y micro-análisis se corresponden bien con datos de las publicaciones [34, 35].

II. C. Equipamientos

- Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100 o con un
- 30 bioespectrofotómetro Carry 50 (Varian, Mulgrave, EEUU). Los espectros de fluorescencia fueron medidos con un espectrofotómetro Spex Fluorolog 3, con corrección de sistema de dependencia relativa a la longitud de onda (fotomultiplicador RCA C31034) o con un espectrofluorómetro PerkinElmer LS 50. Los espectros de absorción transitoria fueron medidos con un espectrómetro cinético de fotólisis por destello de láser modelo Applied Photophysics LKS 60 con una resolución de 60 nanosegundos, utilizando para la excitación el tercer armónico de
- 35 un láser Nd/YAG de Spectra Physics Quanta-Ray GCR 130-01, un fotomultiplicador Hamamatsu 1P28 y un osciloscopio Hewlett -Packard Infinium (1 GS/s). Las mediciones que utilizan fotólisis mediante destello fueron ejecutadas en presencia de aire y en soluciones saturadas de argón. Para los ensayos de calorimetría fotoacústica se utilizó el mismo láser Nd/YAG, una célula fotoacústica frontal de fabricación propia con un transductor de Panametrics de 2, 25 MHz (modelo 5676) y un osciloscopio Tektronix DSA 601 [36]. La fosforescencia de oxígeno
- 40 singlete a temperatura ambiente se midió a 1270 nm con un fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42, enfriado a 193 K en una cámara para nitrógeno líquido (Products for Research modelo PC176TSCE005) tras la excitación por láser a 355 nm de soluciones aireadas utilizando una adaptación del espectrómetro de Applied Photophysics [37]. La emisión de oxígeno singlete a 1270 nm también fue monitorizada con un detector de germanio enfriado con nitrógeno líquido (North Coast) acoplado a un osciloscopio Tektronix TDS (520B), después de la excitación de la
- 45 muestra con pulsos láser de 5 ns utilizando el tercer armónico (355 nm) generado por un láser Nd: YAG con el sistema Q-switched (Continuum Surelite II).

Los análisis elementales fueron realizados con un analizador elemental Fisons Instruments EA 1108 CHNS-O. Los puntos de fusión se midieron en un aparato de punto de medición de puntos de fusión en electrotérmica capilar. Los

espectros de ^1H -RMN, ^{19}F -RMN y los espectros de ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker AMX-300 MHz. Las atribuciones de las señales de ^1H se efectuaron de modo experimental con COSY 2D y NOESY, y las atribuciones de las señales se hicieron experimentalmente con HSQC 2D y HMBC. Los datos MALDI-TOFMS se obtuvieron utilizando un Applied Biosystems Voyager DE-STR (Framingham, MA, EEUU) equipado con un láser de nitrógeno ($\gamma = 337 \text{ nm}$).

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de las especies con, al menos un electrón no apareado se obtuvieron usando un espectrómetro Bruker ESP 300 (IBM Instruments Inc.). Los ajustes típicos de este equipamiento fueron los siguientes: potencia de microondas 10 mW, amplitud modulada 0, 8G, la modulación de amplitud 0, 8 g, alcance de exploración 60, 0 G. Los espectros de RPE fueron registrados bajo irradiación *in situ* con un láser de diodo de Hamamatsu. Los siguientes ajustes fueron utilizados para registrar los espectros: alta potencia (4 mW), baja amplitud modulada (0, 2 G) y alcance de exploración estrecha (60 G), registrándose 20 exploraciones para cada espectro.

Las irradiaciones en experimentos *in vitro* se realizaron con una lámpara halógena o fuente de láser. En el primer caso, una lámpara de halógeno de 500 W se colocó a 50 cm de la placa irradiada con el fin de garantizar una irradiación uniforme. Un filtro de agua enfriado ($d = 35 \text{ mm}$) y un filtro de corte a 600 nm se colocaron entre la lámpara y las muestras. La fluidez de luz que llegaba a las muestras fue de 3 mW/cm^2 . El espectro de emisión de la lámpara halógena se registró usando un espectrorradiómetro IL2000 (Spectrocube), Figura 1. En el segundo caso, se utilizaron tres diodos láseres de Lynx, de cavidad externa TEC 500, accionados por controladores de láser PilotPC 500 (Sacher Lasertechnik, Marburgo, Alemania). Las energías de los láseres eran estables a 40 mW para el láser de 748 nm, a 10 mW para el láser de 649 nm y a 10 mW para el láser de 633 nm. Las energías de los rayos láser se midieron regularmente con un LaserCheck de Coherent. En algunos experimentos *in vitro* la luz láser se centró en una fibra óptica mediante un colimador instalado en una microbanda óptica, y así distribuida por las células. Este sistema reduce la potencia de la luz láser de 748 nm a 30 mW.

Para la irradiación de bacterioclorinas en experimentos de fotoblanqueo utiliza el láser de diodo Lynx de 74/8 nm. Para los estudios con animales, se utilizó un láser de diodo Hamamatsu fabricado a medida, tipo LA0873, S/N M070301, con 140 mW a 748 nm. Este láser de diodo tiene como controlador un Thorlabs 500 mA ACC / APC Laser Diode Controller y los sistemas electrónicos instalados en nuestro laboratorio. Las energías de este láser y de otros láseres de alta energía empleados en este trabajo fueron verificados regularmente con un medidor de energía láser Ophir modelo AN/2E.

La absorción celular del fotosensibilizador en función del tiempo y la viabilidad de las células fue confirmada por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse TS-100F.

Las muestras de piel sometidas a fluorescencia se analizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX51M usando un espejo de fluorescencia U-MSWG2 (filtro de excitación 480-550, filtro de emisión de 590, filtro dicromático 570 nm). La microscopía confocal se realizó con un microscopio invertido (DMI6000) Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania) con objetivo apocromático de 63x de inmersión en agua (apertura óptica digital 1, 2). Antes de pasar al modo confocal, se observó la suspensión GUV (vesículas unilamelares gigantes) directamente a través de una lámpara de sodio como fuente de luz y un filtro para seleccionar la fluorescencia de Rhod-DOPE para evaluar la eficacia de la formación de GUVs. La fuente de excitación utilizada en microscopía de fluorescencia confocal fue la línea de 514 nm procedente del láser de Ar^+ o la línea de 745 nm de un láser de Ti: Sa. La emisión se recogió en el intervalo de 550-800 nm, aprovechando la ventaja de la fibra acústico-óptica sintonizable y del divisor de haz del sistema de Leica TCS SPC5. La cantidad de luz perdida es mínima de acuerdo con la "desviación inteligente" que siempre se mantiene por debajo de 0, 5% (generalmente entre -0, 1% y 0, 1%) y existe un número de fotones insignificante fuera de las estructuras lipídicas. Las secciones confocales de menos de 0, 5 mm de espesor se obtuvieron utilizando el motor de paso galvanométrico. Las proyecciones tridimensionales se obtuvieron mediante el software Leica Application Suite-Advanced Fluorescence.

II. D. Métodos

II.D.1. Los coeficientes de partición

Los coeficientes de partición (CP) n-octanol: agua fueron medidos usando una ligera modificación del método de agitación en frasco descrito en la bibliografía [35] por algunos de los autores de esta patente. La modificación incluye la excitación de la banda de absorción a 500 nm aprox. y la detección de fluorescencia en el espectro de la región rojo/IR.

II.D.2. Fotoquímica y fotofísica

Las experiencias de fotoblanqueo se llevaron a cabo en soluciones PBS, PBS: metanol (50: 50) y metanol. Las soluciones se irradiaron con el láser de diodo Lynx en una célula con paso óptico de 1 cm. La absorción inicial de las soluciones fue cercana a 0,8. El mecanismo de fotoblanqueo fue evaluado mediante la irradiación del sensibilizador utilizando el láser de diodo Hamamatsu de 80 mW. El sensibilizador se irradió en PBS y en presencia de ácido ascórbico o azida.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) fueron determinados en etanol tomando como referencia el rendimiento cuántico de fluorescencia de Cl_2PhB en tolueno [4]. Las absorbancias de las soluciones de referencia y de la muestra se ajustaron aproximadamente a 0,2 en una longitud de onda de excitación de 515,5 nm, diluyendo 10 veces las soluciones antes de la detección de fluorescencia. El rendimiento cuántico de fluorescencia se obtuvo a partir de la relación entre las bandas de fluorescencia de la muestra de referencia y se multiplica por el rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia de 0,012, tal y como se describe en la bibliografía [12], después de corregir la diferencia de los índices de refracción de etanol y de tolueno.

Los espectros de absorción del triplete-triplete y los tiempos de vida de los tripletes de los fotosensibilizadores (τ_T) se midieron con los espectros de absorción de transitorios descrito anteriormente, con excitación a 355 nm, en el que las soluciones tienen absorbancias entre 0,25 y 0,30.

La calorimetría fotoacústica de resolución temporal (PAC) se realizó con el equipo descrito anteriormente usando un procedimiento descrito por algunos de los autores de la patente [4]. Todas las mediciones se hicieron en etanol usando compuesto de manganeso 5, 10, 15, 20-tetrafenilporfirina como referencia fotoacústica.

Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete en etanol se obtuvieron por medio del procedimiento descrito por algunos de los autores de la patente [37] usando la fenalenona como referencia. La bibliografía indica que el rendimiento cuántico de oxígeno singlete obtenido con la fenalenona en etanol es $\Phi_\Delta = 0,95$ [38].

II.D.3. Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)

Las especies reactivas del oxígeno producidas por la irradiación de los fotosensibilizadores en PBS, concretamente el ión superóxido y el radical hidroxilo, forman aducciones con varios capturadores de spin. Estas aducciones se pueden identificar por EPR. El tampón PBS empleado en estas mediciones se trató previamente con una resina quelante, Chelex 100, para eliminar cualquier ión metálico contaminante que pudiera catalizar la descomposición de los peróxidos. Se utilizaron dos captosres de spin: BMPO y DMPO. El DMPO se purificó inicialmente con carbón activado/benceno y, a continuación, se determinó una concentración de partida por espectrofotometría utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon_{226} = 7.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las mediciones de RPE se realizaron a temperatura ambiente usando un espectrómetro Bruker descrito anteriormente con irradiación *in situ* y láser de diodo de Hamamatsu.

II.D.4. Pruebas de permeabilidad cutáneas

El mejor modelo animal para probar la permeabilidad cutánea es el cerdo miniatura (minipig), debido a las similitudes entre las características de la piel del cerdo miniatura y la piel humana [39]. Se emplearon diferentes formulaciones de cremas, ungüentos, geles y soluciones líquidas para aumentar la penetración del fotosensibilizador en las muestras de piel de los cerdos miniatura. Las formulaciones que contienen fotosensibilizadores en cantidades variables de 0,1 a 10 %, potenciadores de la permeabilidad, tales como Azone® y el DMSO, y diversos excipientes. Las pruebas *ex vivo* emplearon la piel cortada del dorso de los cerdos miniatura. Las pruebas *in vivo* se llevaron a cabo en la parte posterior de los cerdos miniatura. En cada prueba, la formulación se aplicó sobre un área de aprox. 1 cm^2 de la piel durante el tiempo deseado, bajo un vendaje oclusivo. Después del tiempo, la formulación se retiró con una espátula y se limpió con un bastoncito de algodón de uso médico empapado de etanol hasta que no se observasen residuos del sensibilizador. En pruebas *in vivo*, se retiraron con cirugía muestras de piel, y después se sacrificaron los animales.

El primer paso para fijar el tejido de las muestras de la piel consistió en sumergirlas en paraformaldehído (4 % en solución acuosa) durante al menos 24h. A continuación, las muestras se transfirieron a una solución de sacarosa al 25% durante al menos 48 h. Después de este tratamiento, las muestras de piel se vuelven más densas que la solución de sacarosa. Se extrajo una alícuota por punción biopsia y se congeló en hielo seco y luego se montó en soportes con Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Países Bajos) y cortada en rodajas de espesor controlado, seleccionadas de 25 a 100 μm en un criostato. Las rodajas de piel se transfirieron a láminas de microscopio y se mantuvieron frías hasta que se analizaron por microscopía de fluorescencia y microscopía confocal. Alternativamente, en lugar de utilizar paraformaldehído como fijador, las muestras de piel se congelaron directamente en hielo seco.

II.D.5. Ensayos *in vitro*

Los medicamentos descritos en esta invención fueron evaluados en los estudios *in vitro*. En una serie de ensayos *in vitro* se irradiaron con una lámpara de halógeno mezclado con varios filtros. En otro conjunto se empleó la irradiación láser de diodo para iluminar cada uno de los cultivos de células.

5 II.D.5.i) Ensayos *in vitro* con irradiación procedente de una lámpara halógena

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos de irradiación con la lámpara de halógeno eran células MCF7 (carcinoma humano de mama), SKMEL 188 (melanoma humano) y S91/I3 (melanoma de ratón). Fueron utilizadas tanto en ensayos referentes a toxicidad como a fototoxicidad. Las células MCF7 fueron cultivadas en medios suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS), 25 unidades/ml de penicilina y 25 µg/ml de estreptomicina. Las células de melanoma humano SKMEL-188 se cultivaron en medio F10 suplementado con 10 % de suero de bovino fetal (FCS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. La sublínea I3 de células de melanoma Cloudman S91 fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 5 % de suero de bovino fetal (FCS) (Gibco BRL). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en monocapas en placas de Petri de 60 mm de diámetro, y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Citotoxicidad. La viabilidad y la eficacia metabólica de las células se determinó por la absorción y la reducción del bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeni tetrazolio (MTT) en tinte de formazano insoluble por las enzimas microsomales de células. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI con 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomicina. Las células se mantuvieron en 5 % de CO₂, 95 % de aire y 100 % de humedad. Para determinar la citotoxicidad, estas células se transfirieron a placas de 96 pozos con una densidad de 1×10^4 células por pozo en medio completo. Después de 24 h, las células se incubaron con fotosensibilizadores a diferentes concentraciones (0, 25 a 50 µM) durante 18 horas a 37°C. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio de crecimiento a 37°C durante 24 h. Después de este período, el medio se reemplazó con 100 µl de medio fresco y 20 µl de MTT, y las células se incubaron con MTT a una concentración final de 0, 5 mg / ml durante 3 h. A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por la solución de DMSO: metanol (1: 1) para disolver los cristales de formazano azul. La placa de cultivo de 96 pozos se agitó durante 0, 5 min a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica a 560 nm inmediatamente usando un lector de ELISA (GENios Plus; Tecan Trading AG, Suiza). La supervivencia celular se expresó por la alteración de la absorción de la sal de formazano y la tasa de supervivencia fue indicada como la relación de porcentaje del número de células viables tratadas y el número de células viables no tratadas. El número de células se determinó por regresión lineal a partir de una curva de calibración.

Absorción celular dependiente del tiempo. Las células SKMEL 188, S91 y MCF7 se sembraron en placas de 96 pozos con 1×10^4 células por pozo y se expusieron a concentraciones de 20 µM de fotosensibilizadores de bacterioclorinas y clorinas en PBS durante diversos intervalos de tiempo de 10 min a 180 min, con el fin de probar la acumulación del fármaco en función del tiempo. Al final del intervalo de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se volvieron a suspender en 100 µL de PBS que contenía 0, 25 % de Triton X-100. La retención de fotosensibilizador en las células se detectó midiendo la fluorescencia de la fotosensibilizador acumulada usando un lector de ELISA. Además, la absorción de fotosensibilizador y la viabilidad de las células se confirmaron por microscopía de fluorescencia. En estos experimentos las células SKMEL 188, S91 y MCF7 fueron incubadas durante 2 horas con 20 µM de fotosensibilizador, se lavaron tres veces con PBS, se volvieron a suspender en PBS y se examinaron con microscopía de fluorescencia.

Fotosensibilización celular. Las células SKMEL 188, S91 y MCF7 fueron preparadas conforme se ha descrito anteriormente. Como base de los ensayos de citotoxicidad, se seleccionó la concentración de 5 µM de fotosensibilizador para las pruebas de fotosensibilización. Las células se incubaron durante 12 h a 37°C y luego se irradiaron a la tasa de 0, 53 mW/cm² y en dosis entre 0, 64 y 0, 1 J/cm². Debe tenerse en cuenta que el fotosensibilizador apenas utiliza 1/5 de velocidad del flujo disponible en la lámpara de halógeno filtrada. La prueba con MTT se realizó 24 h después de la irradiación. Los valores se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes y se expresaron como porcentaje de supervivencia de las células con referencia a las células de control que fueron tratadas de forma similar pero no se incubaron con el fotosensibilizador, ni fueron iluminadas.

50 II.D.5.ii) Ensayos *in vitro* con irradiación láser

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos con irradiación láser fueron HT-29 (carcinoma de colon humano), PC-3 (carcinoma de próstata humano), SW2 (cáncer humano de pulmón de pequeñas células), A-549 (cáncer humano de pulmón de no pequeñas células), S91/I3 (melanoma de ratón) y CT26 (carcinoma de colon de ratón). Estas

cepas fueron utilizadas para los experimentos relacionados tanto con la fototoxicidad como la citotoxicidad. Las células PC-3, SW2 y S91/13 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y las células HT-29, A-549 y CT26 fueron cultivadas en medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) (Cambrex Bioscience, Verviers, Bélgica). Ambos medios de cultivo se complementaron con 10 % de suero fetal bovino inactivado por el calor (FBS) (Cambrex Bioscience, Verviers, Bélgica), 100 UI de penicilina/ml y 100 µg/ml de estreptomicina (Cambrex Bioscience, Verviers, Bélgica). El medio DMEM utilizado para las células CT26 también se suplementó con HEPES de 10 mM. Las líneas celulares se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂. Para los estudios *in vitro*, las células con 85-90% de confluencia fueron desprendidas de la superficie del frasco de cultivo con una solución de tripsina-EDTA-Versene (Cambrex Bioscience, Verviers, Bélgica), se contaron y se sembraron en 96 placas de fondo plano a las densidades deseadas.

Ensayo de viabilidad celular. Al final de las experiencias de la viabilidad celular se evaluó por el ensayo de reducción de resazurina [40]. Brevemente, una solución madre (0, 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7, 4) de resazurina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) fue diluida al 10% en medio de cultivo sin FBS o antibióticos, y se añadieron 200 µl a las células en cada pozo. Las placas se incubaron durante 3-4 horas a 37°C. Los valores de absorbancia para cada pozo se midieron a 540 nm y 630 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan Ex (Thermo-Electron Corporation, Vantaa, Finlandia).

Citotoxicidad. Las células se sembraron en 96 pozos de fondo plano (Orange Scientific Braine-l'Alleud, Bélgica) con 100 µl de medio de cultivo y se dejaron adherir durante una noche. El fotosensibilizador se añadió a las células (diluido en 100 µl de medio de cultivo) en concentraciones finales entre 0, 01 y 1 mM. Cada concentración se analizó cuatro veces. Los períodos de incubación en la oscuridad a 37°C fueron dos veces superiores que el tiempo de duplicación de las células de la cepa del ensayo. Después de la incubación, se evaluó la viabilidad celular. En experimentos de control en paralelo, las células se incubaron sin el fármaco. La citotoxicidad se cuantificó mediante la expresión de la muerte celular relativa a las células no tratadas (% de células de control). Los resultados fueron indicados en gráfico en forma de curvas de respuesta de la dosis (% de muerte celular en función de la concentración del fármaco) que permiten la determinación de la concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular (CI₅₀).

Fotosensibilización celular. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos DB Falcon negros de fondo plano (DB Biosciences – Labware, NJ, EEUU) en 100 µl placas de medio de cultivo y se dejaron adherir durante una noche. El fármaco se añadió a las células (diluidas en 100 µl de medio de cultivo) a las concentraciones deseadas. Las células fueron incubadas con el fármaco en la oscuridad a 37°C durante un tiempo determinado. Este tiempo de incubación es generalmente denominado de intervalo de fármaco-luz. Después de la incubación, las células fueron lavadas una vez con 200 µl de PBS para eliminar el fármaco no internalizado y se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco. Las células fueron irradiadas (cada pozo por separado) con luz a 748 nm de láser de diodo Lynx, anteriormente descrito, a una potencia de 100, 7 mW/cm². El tiempo de irradiación fue elegido para obtener la dosis de luz deseada. Se probaron dos condiciones de control paralelas: las células fueron incubadas en la oscuridad con la dosis más alta de fármaco y no fueron irradiadas, y las células fueron irradiadas con una dosis más alta de luz sin el fármaco. Después de la irradiación, se añadieron 100 µl de medio de cultivo fresco. La viabilidad celular se evaluó aproximadamente 24h después de la irradiación.

II.D.6. Experimentos in vivo

Los ratones utilizados en el presente estudio procedían de dos fuentes. Para los estudios de toxicidad en la oscuridad, biodistribución y farmacocinética se emplearon ratones DBA/2 con un peso de 20-30 g procedentes del vivero de la Facultad de Bioquímica, Biofísica y Biotecnología de la Universidad Jagellónica de Cracovia. Los ratones fueron mantenidos bajo dieta estándar de laboratorio y tenían acceso al agua para beber en cualquier momento. La utilización de estos animales para fines experimentales fue aprobada por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Jagellónica (Resolución N° 384/99). Estos ratones también fueron utilizados en las pruebas en PDT.

Los otros ratones eran Balb/C y pesaban entre 20-25 g y procedían del vivero de los Laboratorios de Charles River (Barcelona). Los ratones fueron mantenidos bajo dieta estándar de laboratorio y tenían acceso al agua para beber en cualquier momento. La utilización de estos animales para fines experimentales fue aprobada por el Consejo del Centro de Neurociencia y Biología Celular (Coimbra).

Los cuatro cerdos miniatura utilizados en este estudio procedían de IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) en Aranjuez (Madrid). Todas eran hembras de 6-8 meses de edad, blancas con manchas marrones y pesaban por término medio 56, 8 kg (66, 2, 57, 1, 43, 5 y 60, 6 kg). Fueron recibidos en la

Estación Nacional de Zootecnia, Vale de Santarém, donde fueron alojados en cajas separadas de 1, 5 m², alimentados con una dieta estándar para cerdos y agua *ad libitum* durante un período de aclimatación de tres semanas. El estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones éticas portuguesas bajo licencia otorgada por la Dirección General de Sanidad y Protección de los Animales, ref. 0420/000/000/2007. El acceso a la alimentación fue suspendido 24h antes del tratamiento. Se afeitó el dorso de los animales 24 h antes de la aplicación de las formulaciones. La administración tópica de fotosensibilizadores se realizó bajo anestesia. La medicación preliminar utilizada 30 min. antes de las aplicaciones fue la siguiente: Azaperona (Stresnil ®-Veterinaria ESTEVE-España), inyección intramuscular de 2 mg/kg + sulfato de atropina, 50 mg de SC. La inducción se hizo con cetamina (Clorketam ®-Vétoquinol, Francia), 20 mg/kg, inyección intramuscular. La anestesia se mantuvo con intubación endotraqueal utilizando ventilación espontánea con 2-3 l /min de oxígeno + 3% isoflurano (Isoflo ®-Veterinaria FUE, España). Se recogieron muestras de tres cerdos miniatura bajo anestesia general conforme fue descrito más arriba. Las muestras de piel de 20x20x10 de dimensión (largo, ancho, profundidad) se obtuvieron mediante escisión quirúrgica. Después de la recogida de las muestras de piel, se sacrificaron los animales mediante la aplicación de una sobredosis de tiopental sódico (25 mg/kg) + 20 ml de cloruro de potasio 7, 5%. El cuarto cerdo miniatura se mantuvo vivo y se observó durante 3 semanas, fue alimentado con una dieta estándar para cerdos y agua *ad libitum*. Después de 3 semanas, la administración tópica de fotosensibilizadores se realizó de nuevo bajo anestesia. Se aplica un choque eléctrico para que el animal cayera inconsciente y fue sacrificado cortándole la vena yugular.

II. E. Propiedades de los compuestos

II.E.1. Propiedades físicas

Como se ha mencionado en los Fundamentos de la invención, las propiedades físicas y químicas más importantes de los fármacos relevantes para la PDT son de fuerte absorción en el rango de 600-800 nm, de elevada eficiencia de generación de oxígeno singlete, de estabilidad química, o fotoblanqueo controlado y coeficientes de reparto octanol: agua entre -2 y 5. Estas propiedades corresponden a la absorbancia de luz deseada en la ventana fototerapéutica y la generación eficaz de especies citotóxicas inducidas por la luz, y reducen los efectos secundarios, tales como la fotosensibilidad prolongada de la piel, y la facilidad de administración sistémica o transdérmica.

Las absorbancias de los compuestos se midieron en varias concentraciones, 1-20 µM, y en todos los casos se observó el cumplimiento con la ley de Beer-Lambert. Además, la longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) no varió de infrarrojos en el intervalo de concentración estudiado. Esto indica que hay poca agregación entre las moléculas, que se encuentran principalmente en forma de monómeros en los disolventes estudiados en estas concentraciones. La Tabla 1 muestra los coeficientes de absorción molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) típicos rojo e infrarrojos y los valores máximos de longitud de onda. Esta tabla también indica los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) representativos para las Luzitinas. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de estas moléculas disminuyen en presencia de sustituyentes tales como el cloro, una característica específica determinante del efecto de átomo pesado esperada de dichas moléculas.

Los espectros de absorción del triplete-triplete de las Luzitinas medidas en este estudio son conformes con aquellos indicados en la literatura para clorinas y bacterioclorinas. Todas las desintegraciones del triplete fueron claramente monoexponenciales. En soluciones desaireadas obtenidas por flujo de N₂ durante al menos 30 min, los tiempos de vida del triplete (τ_T) son del orden de milisegundos, lo que demuestra la fotoquímica ineficaz en ausencia de oxígeno. Los valores representativos se muestran en la Tabla 1. En el etanol saturado de aire la duración de vida del triplete disminuyó en 200-300 nanosegundos, valor significativamente más corto que los tiempos de vida de las porfirinas correspondientes. Estos valores son consistentes con la transferencia de energía limitada por difusión a partir del estado triplete del sensibilizador para el oxígeno molecular a través de una interacción de transferencia de carga.

Todas las emisiones de oxígeno singlete medidas en soluciones de etanol aireados están bien descritas por decaimientos monoexponenciales con tiempos de vida típicos para el oxígeno singlete (τ_A). Los valores Φ_A de la Tabla 1 fueron obtenidos por los métodos descritos anteriormente y son representativos para estos fotosensibilizadores.

Tabla 1. Rendimientos cuánticos de fluorescencia, tiempos de vida del triplete, rendimientos cuánticos de oxígeno singlete y tiempos de vida del oxígeno singlete para fotosensibilizadores representativos en soluciones de etanol saturadas de aire.

	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\varepsilon_{\max}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_F	τ_T (aire) (nseg)	Φ_Δ	τ_Δ (μseg)
Photofrin ®	630	3200		400 ^{a)}	^{b)}	10.6 ^{a)}
Luzitina -Cl -c ^{c)}	650	7000	0, 039	-	0, 69	—
Luzitina -Cl	746, 5	23000 ^{d)}	0, 0403	240	0, 43	13, 6
Luzitina-Cl ₂	745, 0	27000 ^{d)}	0, 0062	226	0, 85	15, 4
Luzitina-Fmet	742.5	62000 ^{d)}	0, 0589	-	0, 71	14, 1
Luzitina-F ₂ Met	742, 5	78000 ^{d)}	-	-	-	-
Luzitina-Cl ₂ Et	745, 5	96000	0, 0081	265	0, 66	13, 7
Luzitina-Cl ₂ Hep	746	75 000	0, 0082	295	0, 63	14, 3
Luzitina-FMet ₂	742, 5	78000 ^{d)}	0, 0585	-	-	-
Foscan ®	650	29600 ^{e)}	0, 089 ^{f)}		0, 43 ^{f)}	

a) [41]. b) Las unidades monoméricas HpD presentan $\Phi_\Delta = 0, 64$ en metanol, pero en agua están presentes principalmente en forma de dímeros con $\Phi_\Delta = 0, 11$ [42]. c) En solución acuosa. d) Corregido por el contenido de clorina. e) [43]. f) En metanol, pero se reduce de mitad de este valor en un 65 % de agua en metanol [44]. g) En metanol [45].

Normalmente, la suma de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de oxígeno singlete y Luzitinas es 0, 6-0, 8, y 20 a 40 % de la luz absorbida se utiliza para otros procesos. Estos casos fueron investigados por resolución fotoacústica calorimetría temporal (PAC) y resonancia paramagnética electrónica (RPE). El PAC mide la cantidad de energía liberada en los procesos no radioactivos (conversión interna, cruce entre sistemas, reacciones químicas) en la desintegración de los estados electrónicamente excitados. El RPE mide la cantidad de especies con electrones desapareados (radicales libres) presentes en la muestra y se utiliza aquí con irradiación de láser directa para medir la generación de iones superóxidos, el radical hidroxilo y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por la luz. La liberación de energía medida por PAC es consistente con la formación de estados triplete de bacterioclorina con rendimientos cuánticos cercanos a la unidad y la energía triplete de 105-125 kJ/mol, lo que concuerda con los datos de la bibliografía sobre bacterioclorinas halogenadas [12]. Los espectros RPE obtenidos durante la irradiación de Luzitinas en PBS y en presencia de DMPO y BMPO revelaron la existencia de iones superóxidos y el radical hidroxilo. Estos datos juntos de RPE y de PAC muestran sin equívoco que la irradiación de estos fotosensibilizadores a 748 nm conduce a la formación de iones superóxidos y, a continuación, del radical hidroxilo, que contribuye a la fototoxicidad de las Luzitinas. Por lo tanto, la fototoxicidad de sensibilizadores es más alta que aquella prevista a partir de sus rendimientos cuánticos de oxígeno singlete, que ahora son 5 veces mayores que los de Photofrin ®.

La estabilidad química de los compuestos se estudió exponiéndolos a la luz, al aire y a las alteraciones de pH. La degradación más significativa se produce en el caso de soluciones aireadas irradiadas con luz de longitud de onda apropiada. En tales circunstancias, el fotoblanqueo de los compuestos sigue una ley cinética de primer orden y es proporcional a la energía de la luz láser incidente. En general, también se observó que el fotoblanqueo aumenta de acuerdo con el contenido de agua presente en la solución. Bonnett informó de la fotoconversión de Foscan® (m-THPC) y de la bacterioclorina análoga (m-THPB) en PBS: metanol (50: 50) [46]. Scherz informó de la fotoconversión de Tookad® en acetona y Triton-X PBS [3]. Para comparar la fotoestabilidad de Luzitinas con la fotoestabilidad de Foscan® y Tookad®, presentamos en la Tabla 2 los tiempos de media vida ($t_{1/2}$) de fármacos representativos de los descritos aquí, juntamente con los de Foscan® y Tookad® estándar para una potencia de láser de 100 mW.

Tabla 2. Tiempo de media vida de bacterioclorinas irradiadas con láser de 100 mW a 748 nm y sus respectivos coeficientes de reparto n- octanol: agua (K_{ow}).

Fármaco	Disolvente	$t_{1/2}$ (seg)	log K_{ow}
Tookad® ^{a)}	Tensioactivo: PBS	1, 56	
Luzitina-F	PBS	58	-
Luzitina -Cl	PBS	174	-1, 70
Luzitina -Cl ₂	PBS	358	-1, 75
Luzitina -FMet	PBS: metanol	647	2, 3
	metanol	3553	
Luzitina -F ₂ Met	PBS: metanol	6.480	2, 7
Luzitina-Cl ₂ Et	PBS: metanol	4.013	1, 8
Luzitina FMet ₂	metanol	4.352	>4
Foscan® ^{b)}	PBS: metanol	8.582	
Luzitina-Cl ₂ Hep	metanol	164.105	>4

a) [3]. b) [46].

Distinguimos el fotoblanqueo de nuestras bacterioclorinas de la fotoconversión de m-THPB o Tookad®. Esta diferencia se basa en el hecho de que, después de una prolongada irradiación con láser, la mayoría de nuestras bacterioclorinas se transforman en productos sin absorción detectable visible y el proceso puede describirse apropiadamente como fotoblanqueo. Por otro lado, la irradiación de m-THPB o de Tookad® con láser produce grandes cantidades de las correspondientes clorinas que no absorben la luz láser, que se describe de forma más apropiada como una fotoconversión en otro colorante. El fotoblanqueo de nuestras bacterioclorinas es ventajoso, ya que causa menor fotosensibilidad de la piel, que no se observa en fotoconversión en otro colorante.

II.E.1. Propiedades Biológicas

El Photofrin® proporciona patrones de referencia importantes para la toxicidad en la oscuridad y para la eficacia de la PDT *in vitro*. La toxicidad de Photofrin® en la oscura línea celular H1299 de cáncer de pulmón de células no pequeñas se evaluó en varias concentraciones de Photofrin® y la viabilidad celular se redujo hasta el 50% para $IC_{oscuridad50} = 8, 0 \mu g/ml$ [47]. Un estudio similar sobre la toxicidad de Photofrin® en las células oscuras Colo-26, una línea celular de carcinoma de colon de ratón, proporcionó $IC_{oscuridad50} \approx 20 \mu g/ml$ (30 μM , suponiendo un monómero) [48]. Una línea celular de adenocarcinoma humano (HT29) ha sido una de las líneas celulares más estudiadas en PDT. Los estudios sobre el efecto de la concentración de la línea celular Photofrin® en la línea celular HT29 indicaron que la dosis letal que mata al 50 % de las células, con una dosis de 5 J/cm² de luz halógena filtrada, es de $CI_{50} = 7, 5 g / ml$. Para un 90% de muerte celular, esta concentración aumenta a $IC_{90} = 40 \mu g/ml$ [49]. Por la misma línea celular, Foscan® es mucho más fototóxico, con $CI_{50} = 0, 8 \mu g/ml$, cuando se utiliza un láser de colorante a 650 nm para proporcionar 10 J/cm²; sin embargo, a esta dosis de luz $CI_{90} > 10 \mu g/ml$ alcanza los límites de su toxicidad en la oscuridad, $IC_{oscuridad50} = 13 \mu g/ml$ [50]. A diferencia de Photofrin®, la composición molecular de Foscan® es conocida y es más conveniente para expresar sus ICs en unidades molares. En estas unidades, la citotoxicidad de Foscan® es de $IC_{oscuridad50} = 19 \mu M$ y la toxicidad de una dosis de luz de 10 J/cm² es de $CI_{50} = 1, 2 \mu M$. Por último, es interesante mencionar que la Tookad® causa una tasa de mortalidad del 50 % en las células HT29 a una dosis de 48 μM bajo irradiación de 25 J/cm² (patente US2003/ 6569846). Aunque los valores IC_{50} e IC_{90} dependen de los modos de administración, los tiempos de incubación, las fluencias de la luz y otros pormenores de los experimentos, los valores anteriores indican los mejores resultados en este campo.

La Tabla 3 compara la toxicidad de Photofrin® y Foscan® en la oscuridad acerca de la toxicidad en la oscuridad de las Luzitinas. La aplicación de los métodos descritos anteriormente y de acuerdo con los pormenores en los

siguientes ejemplos, la dosis de luz requerida para matar el 50 % y el 90 % de las diferentes líneas celulares bajo luz halógena filtrada en presencia de una clorina halogenada y sulfonada se indican en la Tabla 4, y los valores correspondientes para un bacterioclorina halogenada y sulfonada se muestran en la Tabla 5. La Tabla 6 muestra la fototoxicidad en función de la concentración de varias Luzitinas necesarias para matar el 90 % de las células con láser de 6 J/cm².

Tabla 3. Toxicidad de los fotosensibilizadores en la oscuridad para las líneas celulares de cáncer humano y del ratón.

Línea celular	Tiempo de incubación (h)	Photofrin® IC ₅₀ (µg/ml)	Foscan® IC ₅₀ (µM)	Luzitina-Cl ^{a)} IC ₅₀ (µM)
H1299		8, 0	-	
HT-29	48	-	19	500
SW2	48	-	-	400
PC-3	72	-	-	600
S9113	40	-	-	500

a) Las células se incubaron durante dos veces el tiempo requerido para duplicación de la población de células en medio de cultivo completo en la oscuridad y en presencia de diferentes concentraciones del fotosensibilizador.

Tabla 4. Dosis de luz en J/cm² requeridas para matar el 50 % y el 90 % de las células en las líneas celulares indicadas, para [Luzitina-Cl-c]=20 µM (≈20 µg/ml) bajo irradiación de lámpara de halógeno filtrada.

Línea celular	S91	SKMEL 188	MCF7
LD ₅₀	0,13	0,26	0,3
LD ₉₀	0,26	0,46	0,7

Tabla 5. Dosis de luz J/cm² requerida para matar el 50 % y el 90 % de las células en las líneas celulares indicadas, para [Luzitina Cl -] = 20 µM (≈20 µg/ml) bajo irradiación de la lámpara de halógeno filtrada.

Línea celular	S91	SKMEL 188	MCF7
LD ₅₀	0,15	0,1	0,08
LD ₉₀	0, 3	0,32	0,25

Tabla 6. La concentración del sensibilizador en µM necesaria para matar el 90 % de las células de las líneas celulares de carcinoma de próstata humano (PC-3), adenocarcinoma humano (HT-29), carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas (A- 549), melanoma de ratón (S9113) y carcinoma de colon de ratón (CT26) bajo irradiación con un láser de diodo de 6 J/cm² a 28, 5 mW.

Fotosensibilizador	PC-3	HT-29	A-549	S91I3	CT26
Luzitina-Cl ₂	20	50	--	40	-
Luzitina-Cl ₂ Et	5	10	10	--	5
Luzitina-FMet	0, 5	0, 5	0, 5	--	1, 0
Luzitina-F ₂ Met	0, 5	-	0, 5	--	1, 0

Las tablas 4-6 muestran la baja toxicidad de las Luzitinas en la oscuridad y su extremadamente alta fototoxicidad. La Tabla 6 muestra que las concentraciones de Luzitina necesarias para matar el 90% de las células de diversas líneas son hasta 100 veces menores que las requeridas por Photofrin® y hasta 20 menores que aquellas requeridas para Foscan®. Con dosis de láser 6 J/cm² (60 segundos de irradiación en las condiciones experimentales) es posible matar al 100% de las células en todas las líneas celulares estudiadas con concentraciones de Luzitina que presentan una citotoxicidad insignificante en la oscuridad.

II. F. Métodos de utilización de los compuestos y composiciones

Las Luzitinas pueden administrarse a través de formulaciones para aplicación tópica, oral, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, rectal, sublingual, nasal, ocular, auditiva o por inhalación, de acuerdo con la situación clínica. La formulación farmacéutica está adaptada para la vía de administración seleccionada. Las formulaciones contienen, además de la Luzitinas (aisladas o combinadas entre sí), un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Antes de preparar la formulación, se pueden obtener derivados de Luzitinas en sus correspondientes formas de sales, ésteres, éteres o ésteres enólicos, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos.

Después de la administración tópica o sistémica, o ambas, la zona tratada se expone a luz de la longitud de onda apropiada, preferiblemente entre 630 y 690 nm para clorinas o entre 720 y 780 nm para bacterioclorina, preferiblemente usando un láser. Los métodos de irradiación de varias zonas del cuerpo son bien conocidos en la materia. El intervalo fármaco-luz puede variar desde varios minutos a varios días, dependiendo del modo de administración. La dosis de luz depende de la vía de administración, de la fuente de luz y del objetivo de la terapia. En el caso de irradiación por láser continuo, la dosis de la luz debe ser de 10 a 250 Julios/cm² con una potencia del láser entre 20 y 200 mW/cm². También puede utilizarse irradiado con láser pulsado con energías entre 0, 001 y 10 mJ/cm² por pulso. La dosis de luz se puede aplicar en varias sesiones individuales. Para el diagnóstico, se puede reducir la dosis de luz. Cuando se emplean fuentes de luz de banda ancha de irradiación, las dosis de luz se aumentan para mantener la energía de la fuente de luz en las regiones espectrales donde las Luzitina absorben, al nivel determinado para la irradiación con láser.

Las Luzitinas pueden administrarse de una sola vez o se puede dividir en varias dosis pequeñas para ser administradas en intervalos de tiempo. Las Luzitinas pueden administrarse con otros fármacos para obtener efectos sinérgicos. Las dosis de luz administradas después del intervalo de fármaco-luz son aquellas de la gama de variación indicada anteriormente para una sola dosis. El tratamiento puede repetirse varias veces en distintos intervalos de tiempo. Se subentiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento dependen de la enfermedad que se está tratando y pueden determinarse empíricamente usando protocolos conocidos en la materia.

II.F.1. Administración sistémica (vía oral, inyectable, aerosol y rectal)

Un factor limitativo común asociado con la administración oral es la degradación putativa de la droga en las condiciones ácidas del estómago. Como muestra el siguiente ejemplo, las Luzitinas son relativamente estables en pH 1 durante 3 horas. Las alteraciones observadas del espectro en valores bajos de pH se deben a la protonación del anillo pirrólico, pero son reversibles cuando se neutraliza el ácido. Otra dificultad que se encuentra con frecuencia en la administración oral se refiere a la biodisponibilidad. Se pueden obtener Luzitinas que se aproximan a la regla de cinco de Lipinsky [51] para la absorción intestinal. Las Luzitinas pueden tener registro K_{ow} < 5, cuatro donantes para la formación de enlaces de hidrógeno, doce aceptores de enlaces de hidrógeno y el peso molecular de 1 kD. Sólo este último parámetro excede considerablemente los límites de la regla anteriormente indicada.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de las Luzitinas, pueden considerarse las formas de dosificación, sólidas, semi-sólidas y líquidas. En este contexto, hay que tener en cuenta la vanguardia en términos de adyuvantes farmacéuticos para las diversas formas de dosificación farmacéutica y modos de administración.

- 5 El intervalo de fármaco-luz preferido en la administración sistémica puede variar desde unos minutos hasta 3 días, dependiendo del modo de administración. Las composiciones farmacéuticas deberían proporcionar una dosificación de 0, 01 mg a 100 mg de Luzitina (o combinación de Luzitinas) por kilogramo de peso corporal al día. La mejor dosis diaria de Luzitinas es de 0, 1 a 10 mg por kilogramo de peso corporal.

II.F.2. Administración tópica

- 10 La administración tópica se puede hacer con formulaciones adecuadas que contienen uno o varios potenciadores de penetración y otros excipientes en forma líquida, gel, hidrogel, crema, pomada, spray o cualquier otra formulación dermatológica aceptable. Como se ha mencionado en los Fundamentos de la Invención, la permeación de la piel conseguida para el Photofrin® o para otros fotosensibilizadores de alto peso molecular es insuficiente para la PDT eficaz en los trastornos de la piel. Las Luzitinas tampoco reunieron la mayoría de los criterios para un buen suministro a través de la piel [32]. No obstante, nuestra capacidad para modular la anfifilicidad, la capacidad de enlace de hidrógenos de estos compuestos, y hasta cierto punto, su peso molecular, simplifica la tarea de encontrar formulaciones que promueva su difusión pasiva en la dermis. Para una formulación en gel presentada en el Ejemplo 21, se demostró un suministro tópico rápido y eficaz en la dermis.

- 20 El intervalo de fármaco-luz preferido en la administración tópica se sitúa entre 15 minutos y 3 horas. La formulación debe contener de 0, 01 a 10 % de Luzitina. Preferiblemente, el porcentaje del sensibilizador en la formulación es de 0, 1 a 1 %.

La administración tópica también contempla la aplicación en los ojos. Las aplicaciones destinadas para su uso oftálmico pueden formularse como soluciones isotónicas 0, 01 %-10 %, pH 5-7, con las sales adecuadas.

Los ejemplos incluidos en el ámbito de las reivindicaciones representan formas de realización preferidas de la invención, todos los demás son ejemplos de referencia.

- 25 Esta invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos, con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Densidad espectral de la lámpara halógena de 500 W con un filtro de corte de 600 nm y el espectro de absorción de infrarrojos de una clorina (línea de puntos) y de una bacterioclorina (línea discontinua).

- 30 Figura 2. Espectro de absorción de Luzitina-FMet-c obtenido a partir de la reducción de la porfirina correspondiente mediante síntesis caracterizada por la ausencia total de disolventes orgánicos y de bases.

Figura 3. Espectro de absorción de Luzitina-Cl₂Et obtenido a partir de la reducción de la porfirina correspondiente por medio de la síntesis caracterizada por la ausencia total de disolventes orgánicos y de bases.

Figura 4. Espectro de absorción de la fracción más polar ($\beta\alpha_3+\alpha_4$) de atropisómeros de Luzitina-Cl₂Et que indica el aumento de la absorbancia en el infrarrojo, estimado a $\epsilon_{\text{máx}} = 150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 748 nm.

- 35 Figura 5. Espectros de absorción de Luzitina-Cl₂ en una solución acuosa neutra (línea continua), después de 2 horas en un pH de 1 (línea de puntos) y después de la neutralización (línea discontinua). Los espectros se corrigieron para el efecto de dilución provocado por la adición de gotas de HCl y NaOH en una solución acuosa.

- 40 Figura 6. Espectros de absorción de Luzitina-FMet en PBS: metanol (3: 2) antes (a la izquierda) y después (a la derecha) de 65 min de irradiación con el láser diodo Lynxs a 748 nm y la potencia de 28, 8 mW (110 J) que muestra el fotoblanqueo controlado.

Figura 7. Intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete obtenida a 1.270 nm después de la excitación a 355 nm de Luzitina-Cl₂Hep o de fenalenona en etanol de aire saturado. Se utilizó la inclinación de la recta obtenida a partir de la relación de dependencia de la fosforescencia y la intensidad del láser para determinar el rendimiento cuántico de oxígeno singlete del sensibilizador.

- 45 Figura 8. Espectros de RPE obtenidos en la presencia de 80 μM de Luzitina-Cl bajo irradiación. A la izquierda: con

BMPO 40 mM en PBS, el espectro corresponde al del aducto de spin de BMPO con el radical hidroxilo. A la derecha: con DMPO 40 mM en DMSO, el espectro corresponde al del aducto de spin DMPO con el ión superóxido

Figura 9. Fracción de células S91 (porcentaje) supervivientes en diversas dosis de luz en la presencia de [Luzitina-Cl-c] = 20 μ M. El fotosensibilizador no internalizado no se ha eliminado antes de la irradiación. Insertar: Citotoxicidad de Luzitina-Cl-c en la oscuridad para líneas celulares de las células S91 en diferentes concentraciones de sensibilizador.

Figura 10. Fracción de células MCF7 sobrevivientes (porcentaje) en diversas dosis de luz en presencia de [Luzitina-Cl] = 5 μ M después de 12h de incubación. El fotosensibilizador no internalizado se retiró antes de la irradiación. Insertar: Citotoxicidad de Luzitina Cl-en la oscuridad para las células de la línea MCF en diferentes concentraciones del sensibilizador. La potencia efectiva de la luz es de 0, 53 mW/cm².

Figura 11. Efecto fototóxico de Luzitina-Cl₂ en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata después de un intervalo de fármaco-luz de 24 horas. Las células en medio de cultivo fueron irradiadas con láser a 748 nm durante 30 ó 60 segundos, que corresponde a la dosis de luz de 3 y 6 J/cm², respectivamente.

Figura 12. Porcentaje de supervivencia celular relativa al control para varias concentraciones de Luzitina-Cl₂Et en líneas celulares de carcinoma de colon de ratón después de un intervalo fármaco-luz de 18 horas. El fotosensibilizador no internalizado fue removido antes de la irradiación. Las células en medio de cultivo fueron irradiadas con láser a 748 nm durante 60 segundos, lo que corresponde a la dosis de luz de 6 J/cm².

Figura 13. Porcentaje de supervivencia celular relativa al control para varias concentraciones de Luzitina-FMet en líneas de células de adenocarcinoma humano después de un tiempo de incubación de 18 horas. El fotosensibilizador no internalizado fue removido antes de la irradiación. Las células en medio de cultivo fueron irradiadas con láser a 748 nm durante 60 segundos, lo que corresponde a la dosis de luz de 6 J/cm².

Figura 14. Porcentaje de supervivencia celular relativa al control para varias concentraciones de Luzitina-F₂Met en líneas celulares de cáncer humano pulmonar de células no pequeñas después de un tiempo de incubación de 18 horas. El fotosensibilizador no internalizado se retiró antes de la irradiación. Las células en medio de cultivo fueron irradiadas con láser a 748 nm durante 60 segundos, lo que corresponde a la dosis de luz de 6 J/cm².

Figura 15. Fluorescencia de Luzitina-Cl₂Et en concentraciones de 3, 26 nM (línea continua) y 0, 26 nM (línea de puntos) en el suero humano utilizadas para determinar el límite de detección. También se indica la línea de base (línea discontinua y de puntos) y la curva de Gauss (línea de puntos) que se utilizan para simular la concentración más baja para la determinación precisa de la fluorescencia de baja intensidad.

Figura 16. Fluorescencia de Luzitina Cl-c dividida por el peso del hígado, la sangre y el cerebro, respectivamente, en orden de intensidad, después de la administración intraperitoneal de 10 mg/kg en ratones DBA/2.

Figura 17. Farmacocinética y biodistribución de Luzitina-Cl después de la administración intraperitoneal de 10 mg/kg en ratones DBA/2. La intensidad de la fluorescencia en varios tejidos (sangre, tumores, corazón, pulmones, hígado, bazo, riñón, intestino, músculo, y la piel) se normalizó para sus respectivos pesos.

Figura 18. Fluorescencia de Luzitina-Cl₂Et dividida por el peso del tumor y la sangre, respectivamente, en orden de intensidad, después de la administración intraperitoneal de 10 mg/kg en ratones DBA/2.

Figura 19. Volumen de los tumores en ratones Balb/C con tumores CT26 implantados y tratados con Luzitina-FMet. La línea gruesa representa el tamaño medio del tumor en cuatro animales de control, en el que se administró la Luzitina-FMet, pero no irradiada. Las líneas delgadas representan distintos animales tratados con Luzitina-FMet y láser de 132 J/cm² a 748 nm.

Figura 20. Tamaño de los tumores S91 implantados en ratones DBA 2 tratados con Luzitina-Cl₂Et. Fueron empleadas dos dosis de láser a 748 nm.

Figura 21. Fluorescencia confocal de Luzitina-FMet 3 h después de la aplicación tópica en el dorso de un cerdo miniatura. Excitación multifotónica a 744 nm; eliminación completa del ruido, imágenes de fluorescencia en el plano generado por 6 imágenes, detector de 800 V @, abertura = 379 μ m. El fotosensibilizador se difunde a través de 50 micrones de la capa córnea (estrato córneo) y la epidermis.

Figura 22. Los espectros de absorción de Luzitina-FMet 3 h después de la aplicación tópica en el dorso de un cerdo

miniatura obtenido mediante espectroscopia confocal. Las diversas líneas corresponden a mediciones en diferentes partes de la muestra.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. PROCESO DE SÍNTESIS EN ESTADO SÓLIDO PARA OBTENER BACTERIOCLORINAS CON SUSTITUYENTES SACADORES DE ELECTRODOS

Este ejemplo ilustra la amplia gama de bacterioclorinas que pueden sintetizarse por un método caracterizado por la ausencia de un disolvente y de base, o en la que sólo una porfirina y una hidrazida (ambas en estado sólido) se utilizan como materiales de partida.

En una preparación, mezclamos 60 mg ($6,8 \times 10^{-5}$ moles) de 5, 10, 15, 20-tetraquis (2-trifluorometilfenil) porfirina con 500 mg ($2,7 \times 10^{-3}$ moles) de p-tolueno sulfonilhidrazida, ambas en forma de polvo muy fino. Se añadieron en un reactor al que se evacuó el aire, cerrado herméticamente en atmósfera de N_2 y calentado a una temperatura superior a $100^\circ C$ durante varios minutos. Después de enfriarse (temperatura ambiente), el sólido se removió y se añadieron varias porciones de 250 mg ($1,4 \times 10^{-3}$ moles) de p-tolueno sulfonilhidrazida hasta la desaparición completa de la banda de Soret de la porfirina. La bacterioclorina se extrajo con una pequeña cantidad de disolvente orgánico. El exceso de hidrazida se eliminó por filtración rápida en gel de sílice (altura de la columna de 8 cm y un diámetro interno de 2,5 cm) usando diclorometano/n-hexano como eluyente. Después de la evaporación del disolvente y recristalización en éter dietílico-pentano, se obtuvo un 90 % de CF_3PhB con menos de 5% de clorina contaminante.

La RMN del producto aislado son los siguientes:

1H -RMN: (400, 13 MHz, $CDCl_3$ δ ppm : 7, 47-7, 45 (m, 4H), 7.26-7.20 (m, 8H), 7, 15-7, 12 (m, 4H), 2, 42 (s, 4H), 2, 37 (s, 4H), -1, 27 (s, 2H).

EJEMPLO 2. PROCESO DE SÍNTESIS EN ESTADO SÓLIDO PARA OBTENER CLORINAS HALOGENADAS

Para la preparación de 5, 10, 15, 20-tetraquis (2-fluorofenil-5-N-metilsulfamoilfenil) clorina, Luzitina- FMet-c, mezclamos 50 mg ($4,72 \times 10^{-5}$ mol) de 5, 10, 15, 20 -tetraquis (2-fluorofenil-5-N-metilssulfamoilfenil) porfirina 18 mg ($9,44 \times 10^{-5}$ mol) de p-tolueno sulfonilhidrazida. El reactor fue evacuado de aire, cerrado herméticamente en atmósfera de N_2 y se calentó a una temperatura superior a $100^\circ C$ durante varios minutos. Después de enfriar (temperatura ambiente), se removió el sólido con una pequeña cantidad de disolvente orgánico y el exceso de hidrazida se eliminó por filtración rápida en gel de sílice usando acetato de etilo/hexano como eluyente. Se obtuvo una mezcla de clorina contaminado con aproximadamente 10 % de bacterioclorina. La mezcla de clorina y bacterioclorina se disolvió en diclorometano y se oxidó a la correspondiente clorina por calentamiento a $50^\circ C$ en presencia de aire.

Después de la recristalización en éter dietílico/pentano se observó un 90 % de Luzitina- FMet-c con menos de 1 % de contaminación por bacterioclorina. La Figura 2 muestra el espectro de absorción del producto final.

EJEMPLO 3. PROCESO DE SÍNTESIS EN ESTADO SÓLIDO PARA OBTENCIÓN DE BACTERIOCLORINAS HALOGENADAS

Este ejemplo describe un método claro, sencillo, económico y respetuoso con el medio ambiente para sintetizar bacterioclorinas amfifílicas halogenadas sin utilizar disolventes en un solo reactor.

La porfirina apropiada (en estado sólido) y el a p-tolueno sulfonilhidrazida (en estado sólido) se pulverizaron bien y se mezclaron completamente. A continuación, fueron introducidas en un reactor y evacuadas en alto vacío. El reactor se cerró herméticamente y se mantuvo al vacío o lavado repetidamente con un gas inerte. Por último, el reactor se calentó (70 - $200^\circ C$) durante 1-340 minutos, mientras permanecía cerrado herméticamente. Una vez terminada la reacción y enfriado el reactor a temperatura ambiente, se obtiene la bacterioclorina correspondiente con un rendimiento del 90 %. Después de una filtración rápida en una columna de gel de sílice, se obtiene una bacterioclorina con menos del 5 % de clorina contaminante correspondiente.

Para la preparación de 5, 10, 15, 20-tetraquis (2, 6-dicloro-3-N-etilsulfamoilfenil) bacterioclorina, Luzitina- Cl_2Et , con este método, mezclamos 50 mg ($3,8 \times 10^{-5}$ mol) de 5, 10, 15, 20-tetraquis (2, 6-dicloro-3-sulfoetilfenil) porfirina con 188 mg (10^{-3} mol) de p-tolueno sulfonilhidrazida, el reactor se evacuó con una bomba Edwards, se cerró herméticamente y se calentó el reactor a temperatura superior a $70^\circ C$ durante varios minutos. Una vez enfriado (a

temperatura ambiente) se retiró el sólido con una pequeña cantidad de éter dietílico y se retiró el exceso de hidrazida mediante filtración rápida en gel de sílice (altura de la columna de 4 cm y un diámetro interno de 2, 5 cm) usando acetato de etilo/éter dietílico como eluyente. El sólido resultante después de la evaporación del disolvente se recristalizó en éter dietílico/pentano, obteniendo un rendimiento del 90 % en Luzitina-Cl₂Et. Los espectros de absorción en la Figura 3 revela la existencia de menos del 5 % de la clorina correspondiente. El coeficiente de absorción molar de ésta y de otras bacterioclorinas se muestra en la Tabla 1, corregidos para la cantidad de clorina a veces presentes en las muestras. La comparación entre los espectros de la Figura 3 a continuación con los de la Figura 2 de la patente PCT/EP2005/012212, también de la Universidad de Coimbra revela una reducción de por lo menos 10 veces de impureza de clorinas por medio de este nuevo método de síntesis, que también es más económico, menos trabajoso y nada perjudicial para el medio ambiente. La RMN y MS del producto aislado indican los siguientes valores:

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ, ppm : 8, 42 (d, J = 8, 55 Hz, 4H, p-H), 7, 88 (d, J = 8, 55 Hz, 4H, m-H); 7, 84-7, 82 (m, 4H, β-H), 5, 01 (m, 4H, N-H), 3, 91 (s, 8H, β -H), 3, 22 (m, 8H, CH₂), 1, 24 (t, 12H, J = 6, 73 Hz, CH₃), -1, 29 (s, 2H, NH).

MS: (MALDI-TOF) m/z: 1322, 0 [M]⁺.

EJEMPLO 4. ATROPISÓMEROS DE BACTERIOCLORINAS HALOGENADAS

Este ejemplo indica la existencia de atropisómeros estables de bacterioclorinas halogenadas y sulfonadas y la posibilidad de separarlas fácilmente. También indica que los atropisómeros polares tienen coeficientes de extinción elevados en el infrarrojo.

Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, pero con una columna mayor (8 cm de altura, 2, 5 cm de diámetro interno) y con acetato de etilo/n-hexano (1: 1) como primer eluyente y acetato de etil/n-hexano (3: 1) como último eluyente, observamos la separación de 5, 10, 15, 20-tetraquis (2, 6-dicloro-3-N-etilsulfamoiifenil) bacterioclorina, la Luzitina-Cl₂Et en dos fracciones. Cada fracción mostró dos manchas en TLC, que se identificaron como una mezcla de atropisómeros menos polares αβ₁β₂+α₂β₁ o de más polares β₁α₃+α₄. La Figura 4 muestra el espectro de absorción de la mezcla de atropisómeros de mayor polaridad. Esta fracción presenta un aumento del 50 % en ε a 750 nm de banda, que alcanza 150.000 M⁻¹ cm⁻¹.

EJEMPLO 5. ESTABILIDAD Y BACTERIOCLORINAS HALOGENADAS Y SULFONADAS EN FUNCIÓN DEL pH

Este ejemplo demuestra la estabilidad de bacterioclorinas halogenadas y sulfonadas en pH 1 a 37°C, es decir, el grado de acidez del estómago.

La Luzitina-Cl₂ fue disuelta en una solución acuosa neutra y equilibrada a 37°C para obtener un espectro de absorción indicado en la Figura 5. Se añadieron gotas de solución acuosa de HCl para disminuir el pH 1 y 2 horas más tarde, se registró el espectro de absorción de Luzitina-Cl₂ en pH 1. Seguidamente, se añadió NaOH en la solución acuosa para neutralizar la solución y después de 3 horas se registró de nuevo el espectro de absorción. La Figura 5 muestra los espectros de absorción corregidos para la dilución que se produjo por la adición de HCl y NaOH en solución acuosa. Los cambios espectrales observados en pH bajo se deben a la protonación del anillo pirrólico, pero son reversibles con la neutralización de la acidez. En estas condiciones, se recupera casi la mitad de Luzitina-Cl₂, y la otra mitad se convierte en la clorina correspondiente.

EJEMPLO 6. ESTABILIDAD DE BACTERIOCLORINAS HALOGENADAS Y SULFONADAS EN PRESENCIA DE LUZ

Este ejemplo demuestra la gran estabilidad de las bacterioclorinas halogenadas y sulfonadas cuando se irradian con luz infrarroja, que resuelve los problemas de inestabilidad propios de otras bacterioclorinas de origen sintético, como en el caso de 5, 10, 15, 20-tetraquis (3-hidroxifenil) bacterioclorina o derivados de productos naturales, tales como en el caso de Tookad®.

La Luzitina- FMet se disolvió en PBS: metanol (02: 03), transferida a una celda de cuarzo de 1 cm y se registró su espectro de absorción (Figura 6). Seguidamente, la celda de cuarzo se colocó en el haz de láser de diodo Lynx de 748 nm inicialmente desenfocado con el fin de obtener un haz coincidente con el diámetro de la ventana de la celda de cuarzo. La potencia del láser medido bajo estas condiciones fue de 28, 8 mW. Cada 5 minutos, se interrumpía la irradiación y se registraba un nuevo espectro de absorción. Este procedimiento se realizó durante 65 minutos. El fotoblanqueo sigue la cinética de una reacción de primer orden en el intervalo de tiempo del experimento. La Figura 6 también muestra el espectro de absorción después de la irradiación. A medida que el pico de absorbancia de

bacterioclorina a 743 nm disminuyó de 1, 128 a 0, 337, la absorción de la clorina sólo aumentó de 0, 114 a 0, 151. Teniendo en cuenta los coeficientes de absorción molar de estos compuestos en estas longitudes de onda, se hace evidente que, mientras que el 70 % de bacterioclorina se destruye durante la irradiación, sólo se forma un pequeño porcentaje de clorina. Los productos restantes no presentan espectros bien resueltos en el rango visible/IR y el proceso de fotodegradación dominante puede ser descrito como fotoblanqueo.

La vida media de fotoblanqueo se midió a diferentes intensidades de láser y mostró ser proporcional a la potencia del láser. Las vidas medias de otras bacterioclorinas normalizadas para la irradiación láser de 100 mW a 748 nm se muestran en la Tabla 1, junto con los datos de la bibliografía referente a la fotodegradación de Foscan® y de Tookad® normalizada para la misma intensidad de luz. También se observó que la vida media de Luzitina-Cl aumenta 30 veces más cuando la solución del fotosensibilizador en PBS está saturada con argón, lo que reduce la concentración de oxígeno en la solución. Esto indica la participación de ROS en el fotoblanqueo.

EJEMPLO 7. GENERACIÓN EFICIENTE DE OXÍGENO SINGLETE POR LA LUZ

Este ejemplo describe la generación eficiente de oxígeno singlete en presencia de Luzitinas, luz de longitud de onda apropiada y oxígeno molecular disuelto en la solución.

Una solución de Luzitina-Cl₂Hep etanol saturada de aire con una absorbancia aproximada de 0, 2 a 355 nm fue excitada en una célula de cuarzo de 1 cm con un láser de Nd: YAG pulsado y la emisión de oxígeno singlete fue acompañada de 1270 nm utilizando equipos y métodos descritos anteriormente. La intensidad de fluorescencia de oxígeno singlete se estudió como una función de la intensidad del láser. Un estudio similar se llevó a cabo con fenalenona en etanol, con una concentración correspondiente a la absorbancia de Luzitina-Cl₂Hep a 355 nm. La Figura 7 muestra la dependencia de la intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm en función de la energía láser, después de la excitación Luzitina-Cl₂Hep o de fenalenona a 355 nm en etanol saturado de aire. Se utilizaron diferentes energías láser, y a partir de la inclinación de la curva de dependencia de la emisión de oxígeno singlete en función de la energía del láser y del valor de $\Phi_{\Delta} = 0, 95$ para la fenalenona en etanol obtuvimos $\Phi_{\Delta} = 0, 78$ para la Luzitina-Cl₂Hep. La Tabla 1 muestra los valores para otros bacterioclorinas.

La fotoestabilidad de estas bacterioclorinas, asociadas con su eficiencia cuántica de casi 70 % en la producción de oxígeno singlete, implica que una determinada molécula de bacterioclorina bajo irradiación continua producirá localmente una cantidad muy grande de moléculas de oxígeno electrónicamente excitadas antes de someterse a fotoblanqueo. Casi el 30 % de la energía absorbida por el sensibilizador se pierde en otros procesos, algunos de los cuales se identifican en el siguiente ejemplo.

EJEMPLO 8. FOTOGENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Este ejemplo describe la generación de especies reactivas de oxígeno, reactivas, concretamente, el ión superóxido y el radical hidroxilo utilizando Luzitina-Cl como sensibilizador.

Con el fin de determinar la fotogeneración del ión superóxido y de radical hidroxilo por Luzitina-Cl, se midieron espectros de RPE en presencia de 30-80 μ M de Luzitina-Cl y 40 mM de BMPO en las siguientes condiciones:

- a) Solución acuosa saturada con aire en la oscuridad.
- b) Solución acuosa saturada de nitrógeno e irradiada con láser de diodo de Hamamatsu durante 8 minutos.
- c) Solución acuosa saturada con aire e irradiada con el láser de diodo de Hamamatsu durante 4 minutos.
- d) Solución acuosa saturada de aire e irradiada con el láser de diodo de Hamamatsu durante 8 minutos.
- e) Solución acuosa saturada de aire e irradiada con el láser de diodo de Hamamatsu durante 16 minutos.
- f) Solución acuosa saturada de aire e irradiada con el láser de diodo Hamamatsu durante 16 minutos en presencia de superóxido dismutasa (50 mg / ml).
- g) Solución acuosa saturada de aire e irradiada con el láser de diodo Hamamatsu durante 16 minutos en presencia de catalasa (30 μ g/ml).

En las condiciones experimentales (a) y (b) no se detectó el aducto ROS-BMPO. Sin embargo, las condiciones

experimentales (c), (d) y (e) llevaron a la detección de un aducto BMPO formado entre BMPO y el radical hidróxilo (Figura 8). La presencia de luz es necesaria para la formación de este aducto. La condición experimental (f) no presenta signos, lo que significa que el superóxido dismutasa, enzima que cataliza la dismutación del ión superóxido, inhibe la formación del aducto BMPO-hidroxi. Además, la condición experimental (g) tampoco mostró signos y demuestra que la catalasa, enzima que degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular también inhibe la formación del aducto BMPO-radical hidroxilo. Estos resultados indican que los radicales hidróxilo no se forman directamente desde el fotosensibilizador y el oxígeno molecular, sino como subproductos. La inhibición observada en presencia del superóxido dismutasa ha demostrado la formación de iones superóxido. La inhibición observada en presencia de catalasa sugiere que el peróxido de hidrógeno también es un precursor del radical hidroxilo.

Se realizaron experimentos similares con DMPO en DMSO. Detectamos el aducto DMPO-superóxido en presencia de aire y luz (Figura 8). Sin embargo, en ausencia de aire o de luz o en presencia de superóxido dismutasa, este aducto no fue observado.

Estos datos juntos indican la formación de ión superóxido, seguido por la formación de peróxido de hidrógeno, y, posteriormente, del radical hidroxilo, que son especies reactivas de oxígeno muy bien caracterizadas en cuanto a la capacidad de causar daños celulares. Estas ROS completan la eficacia de la formación de oxígeno singlete del 70 % aproximadamente de estas bacterioclorinas y muestran que el 30 % restante de la energía absorbida por el sensibilizador no se pierde, sino que se utiliza en la formación de otras especie citotóxicas además de la de oxígeno singlete.

EJEMPLO 9. LA FOTOTOXICIDAD DE LUZITINA Cl-c *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA DE RATÓN BAJO IRRADIACIÓN CON LÁMPARA NORMAL

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para las células de melanoma de ratón irradiadas con una lámpara de halógeno filtrada a concentraciones en las que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad en la oscuridad y la actividad fotosensibilizante de la Luzitina Cl-c en la línea de células S91 (melanoma de ratón) se midieron de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente, excepto por el hecho, que después de la incubación, las células no se lavaron para eliminar el fotosensibilizador no internalizado antes de la irradiación. El inserto en la Figura 9 muestra la citotoxicidad en la oscuridad de diferentes concentraciones de Luzitina-Cl-c durante el tiempo de incubación de 120 minutos. La Figura 9 muestra la fracción de células S91 que sobreviven en diferentes dosis de luz cuando las células son irradiadas en presencia de [Luzitina-Cl-c]=20 μ M. Las dosis de luz necesarias para matar el 90 % (LD₉₀) o 50 % (DL₅₀) de las células en cultivo se dan en la Tabla 3.

EJEMPLO 10. LA FOTOTOXICIDAD DE LA Luzitina-Cl *IN VITRO* EN CARCINOMA HUMANO DE MAMA BAJO IRRADIACIÓN CON LÁMPARA NORMAL

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para las células de carcinoma de mama humano cuando se irradian con una lámpara de halógeno filtrada, en concentraciones en las que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad en la oscuridad y la actividad fotosensibilizante de la Luzitina-Cl en la línea celular MCF7 (carcinoma de mama humano) se midieron de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente. El inserto de la Figura 10 muestra la citotoxicidad en la oscuridad de diferentes concentraciones de Luzitina-Cl en un tiempo de incubación de 12 horas. La Figura 10 indica la fracción de células MCF7 que sobrevive a la presencia de [Luzitina-Cl]=5 μ M y varias dosis de luz. Claramente, la concentración de 5 μ M de Luzitina-Cl causó 100% de muerte en las células expuestas a la lámpara de halógeno filtrada de dosis 0, 6 J/cm². Las dosis de luz necesarias para matar el 90 % (LD₉₀) o 50 % (DL₅₀) de las células en cultivo se dan en la Tabla 4.

EJEMPLO 11. LA FOTOTOXICIDAD DE LA Luzitina-Cl₂ *IN VITRO* EN CARCINOMA HUMANOS DE PROSTATA IRRADIADO CON LASER

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para las células de carcinoma de próstata humano cuando se irradian con láser a concentraciones en las que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad de la Luzitina-Cl₂ en la oscuridad para la línea de células PC-3 (carcinoma de próstata humano) se midió de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente. De acuerdo con estos experimentos, 0, 05 mM es la mayor concentración de Luzitina-Cl₂ que causa relativamente pocos efectos en la viabilidad de las líneas

celulares en el ensayo en la oscuridad. Esta será la concentración de referencia en los siguientes estudios de fototoxicidad.

La actividad fotosensibilizante de la Luzitina-Cl₂ en líneas de células PC-3 se midió de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente. La fracción superviviente de células con dosis de luz 3 y 6 J/cm² y un tiempo de incubación 24 horas se muestran en la Figura 11 para diferentes concentraciones de este fotosensibilizador. De acuerdo con la Figura 11, la [Luzitina-Cl₂]=20 µM causa un 100% de la muerte en las células expuestas a la dosis de luz láser de 6J/cm².

EJEMPLO 12. LA FOTOTOXICIDAD DE LUZITINA-Cl₂Et IN VITRO EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE COLON DE RATÓN IRRADIADAS CON LÁSER

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para las células de carcinoma de colon en ratones cuando se irradian con láser a concentraciones en las que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad de la Luzitina-Cl₂Et en la oscuridad para las líneas de células CT26 (carcinoma de colon de ratón) no se puede medir en términos de IC₅₀ porque el compuesto se precipita en medio del cultivo antes de alcanzar este nivel de citotoxicidad. La concentración de 50 µM es la concentración más alta de Luzitina-Cl₂Et que causa un efecto relativamente pequeño sobre la viabilidad de esta línea celular en la oscuridad.

La actividad fotosensibilizante de la Luzitina-Cl₂Et en líneas de células CT26 se midió de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente. La fracción de células supervivientes a la dosis de luz de 6 J/cm² y el tiempo de incubación de 18 horas se muestra en la Figura 12 para diferentes concentraciones de este fotosensibilizador. Esta Figura indica que la Luzitina-Cl₂Et a una concentración de 5 µM causa un 90% de la muerte en las células expuestas a dosis de luz láser de 6 J/cm², LD₉₀ = 5 µM. De acuerdo con la Figura 12, la [Luzitina-Cl₂] = 10 µM causa el 100 % de la muerte de las células expuestas a dosis de luz láser de 6 J/cm². La Tabla 6 indica las concentraciones de Luzitina-Cl₂Et necesarias para alcanzar la LD₉₀ en varias otras líneas celulares de irradiación láser de diodo 6 J/cm² a 28, 5 mW.

EJEMPLO 13. LA FOTOTOXICIDAD DE LUZITINA FMet IN-VITRO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HUMANO DE COLÓN IRRADIADAS CON LÁSER

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para las células de carcinoma humano de colon irradiadas con láser, en concentraciones en las que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad de la Luzitina-FMet en la oscuridad para las líneas de células HT-29 (adenocarcinoma humano de colon) no se pudo medir en términos de CI₅₀ porque el compuesto precipita en medio del cultivo antes de alcanzar este nivel de citotoxicidad. La concentración de 50 µM es la concentración más alta de Luzitina-FMet que causa relativamente poco efecto en la viabilidad de las líneas celulares ensayadas en la oscuridad.

La actividad fotosensibilizante de la Luzitina-FMet en líneas de células HT-29 se midió de acuerdo con los materiales y métodos descritos anteriormente. La fracción de células supervivientes a la dosis de luz de 6 J/cm² y un tiempo de incubación de 18 horas se muestran en la Figura 13 para diferentes concentraciones de este fotosensibilizador. Esta figura indica que la Luzitina-FMet en una concentración de 0, 5 µM causa un 90 % de muerte en las células expuestas a dosis de luz láser de 6 J/cm², LD₉₀ = 1 µM. De acuerdo con la Figura 13, [Luzitina-FMet] = 1 µM causa la muerte celular en el 100 % expuesto a una dosis de luz láser de 6 J/cm². La Tabla 6 muestra las concentraciones de Luzitina-FMet necesarias para alcanzar LD₉₀ en varias otras líneas celulares de irradiación láser de diodo 6 J/cm² a 28, 5 mW.

EJEMPLO 14. LA FOTOTOXICIDAD DE LUZITINA -F₂Met IN VITRO EN CARCINOMA PULMONAR HUMANO DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS IRRADIADO CON LÁSER

Este ejemplo muestra que las Luzitinas son muy tóxicas para células no pequeñas de carcinoma humano de pulmón cuando se irradia con láser en las concentraciones en que su toxicidad en la oscuridad es insignificante.

La citotoxicidad en la oscuridad Luzitina-F₂Met para líneas de células A-549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) no se puede medir en términos de IC₅₀ porque el compuesto se precipita en el medio de cultivo antes de alcanzar este nivel de citotoxicidad. La concentración de 50 mM es la concentración más alta de Luzitina-F₂Met que causa un efecto relativamente pequeño sobre la viabilidad de las líneas celulares ensayadas en la oscuridad.

La fracción de células supervivientes a la dosis de luz de 6 J/cm² y un tiempo de incubación de 18 horas se

muestran en la Figura 14 para diferentes concentraciones de este fotosensibilizador. Esta figura indica que la Luzitina-F₂Met a una concentración de 0,5 mM causa un 90 % de muerte en las células expuestas a dosis de luz láser de 6 J/cm², LD₉₀ = 0,5 μM. De acuerdo con la figura 14, [Luzitina-F₂Met] = 0,5 μM causa el 100 % de muerte en las células expuestas a dosis de luz láser de 6 J/cm². La Tabla 6 muestra las concentraciones de Luzitina-F₂Met necesario para alcanzar la LD₉₀ en varias otras líneas celulares con irradiación láser de diodo 6 J/cm² a 28,5 mW.

EJEMPLO 15. LÍMITE DE DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA

Este ejemplo muestra la sensibilidad extrema y selectividad de la detección de Luzitinas en muestras biológicas.

Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones diluyendo en suero humano una solución stock de 1% de Luzitina-Cl₂Et en etanol. Las concentraciones variaron de 0,2 nM a 10 nM. Las muestras se excitaron a 514 nm en el espectrofluorómetro descrito anteriormente utilizando grietas 04: 05: 03: para la excitación y la emisión. La emisión fue capturada en el rango infrarrojo, como se muestra en la Figura 15.

El límite de detección se determinó mediante la ecuación

$$L.D. = \frac{3.3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la curva de calibración y b es su inclinación. Se obtuvo el límite de detección de 0,17 nM (o 0,2 ng/g).

EJEMPLO 16. TOXICIDAD *IN VIVO* EN LA OSCURIDAD

Este ejemplo indica que las Luzitinas no son tóxicas para los ratones a concentraciones mucho más altas que aquellas aprobadas para PDT con fotosensibilizadores disponibles en el comercio.

Los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

- a) 10 animales recibieron 2 mg/kg Luzitina –Cl
- b) 10 animales recibieron 5 mg/kg Luzitina-Cl
- c) 10 animales recibieron 10 mg/kg Luzitina-Cl
- d) 10 animales recibieron 15 mg/kg de Cl-Luzitina
- e) 10 animales recibieron 20 mg/kg Luzitina-Cl
- f) 10 animales se dejaron sin tratar y formaron el grupo de control.

Las soluciones de Luzitina-Cl (0,5 ml) fueron inyectadas por vía subcutánea y se observaron a los animales atentamente durante 30 días. En los primeros 6 días después de la inyección los animales del grupo (e) mostraban sensibilidad a la luz y algunos animales del grupo (d) también presentaban una pequeña sensibilidad. La sensibilidad de estos animales se manifestó en forma de aversión a la fuente de luz orientada directamente hacia ellos. Los animales se pesaron regularmente, pero no se observó ningún cambio significativo en el peso de alguno de ellos. Después de 30 días, los animales fueron anestesiados con Morbital (Biowet, Polonia), se retiraron sus órganos y muestras de tejido y se analizó la morfología de la sangre, así como la histología de los órganos seleccionados. No se observó cambio en la sangre ni en los órganos.

Las dosis utilizadas en estos ensayos de toxicidad en la oscuridad fueron 10 veces mayores que las recomendadas para su uso en el caso de Photofrin® y 100 veces mayores que las dosis empleadas con Foscan®. No obstante, no se alcanzó el límite de toxicidad en la oscuridad medible en las ratas. Esto demuestra que se pueden utilizar dosis más altas de Luzitinas en PDT que las dosis de Photofrin® o Foscan®.

EJEMPLO 17. BIODISTRIBUCIÓN DE LA CLORINA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN IP

Este ejemplo indica que las Luzitinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica dos horas después de la administración intraperitoneal.

La Luzitina-Cl-c se administró en una dosis de 10 mg/kg en ratones DBA/2 mediante inyección intraperitoneal. La distribución de clorina en los tejidos se examinó 2 h después de la administración. Los animales fueron anestesiados con Morbital (Biowet, Polonia) y algunos de sus órganos, incluyendo el cerebro, se extirparon, se pesaron, y luego se almacenaron a -30°C hasta la ejecución de análisis posteriores. El contenido de pigmentos en las muestras de tejido se analizó por espectrometría de fluorescencia. Para extraer los pigmentos, las muestras de tejido se homogeneizaron durante 1 min en 7 ml de acetona acuosa a 90%, helada, usando un homogeneizador de tejidos MPW-120 (Medical Instruments, Polonia) a la velocidad de 10.000 rpm. El material homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y el sedimento se extrajo de nuevo con acetona acuosa al 90 % para garantizar la recuperación total del pigmento. Los extractos se reunieron y se analizó su contenido en pigmentos. Las muestras se excitaron a 413 nm y los espectros de fluorescencia se registraron en un rango entre 600 y 800 nm. La Figura 16 muestra la intensidad de fluorescencia procedente del cerebro, la sangre y el hígado, normalizada para sus respectivos pesos.

La distribución del sensibilizador entre la sangre y el cerebro fue de 4: 1 dos horas después de la administración intraperitoneal en ratones DBA/2. Esta es una prueba del principio de que las Luzitinas apropiadas pueden cruzar la barrera hematoencefálica en cantidades significativas para convertirse en un fotosensibilizador en el cerebro. El siguiente ejemplo demuestra que esta clase de sensibilizadores tiende a acumularse en los tumores, lo que aumenta el número de fotosensibilizadores disponibles para el tratamiento de tumores cerebrales.

EJEMPLO 18. FARMACOCINÉTICA DE BACTERIOCLORINA DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL

Este ejemplo muestra que las Luzitinas después de la administración intraperitoneal se acumulan principalmente en los tumores, y luego se eliminan a tasas más bajas.

El modelo de tumor utilizado fue el de células de melanoma Cloudman S91 cultivadas en monocapa en medio RPMI con un 5 % de suero fetal bovino completado con antibióticos. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera humedecida con 5 % de CO₂. Las células de melanoma ($\sim 1 \times 10^6$) se suspendieron en 0, 1 ml de solución salina tamponada por fosfato (PBS) e implantadas por vía subcutánea en el lado derecho del dorso del animal. El tumor se pudo visualizar diez días después de la implantación. Los animales se trataron tres semanas después de la inyección.

La Luzitina-Cl se administró a una dosis de 10 mg/kg en ratones DBA/ 2 mediante inyección intraperitoneal. Se analizó la distribución tisular de la bacterioclorina en los siguientes intervalos: 2 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h después de la administración intraperitoneal. Los animales fueron anestesiados con ketamina y xilazina, sus órganos y muestras de tejidos se extirparon, se pesaron y se almacenaron a -30° C hasta realizar análisis posteriores. El contenido de pigmentos en las muestras de tejido se analizó por espectrometría de fluorescencia. Para extraer los pigmentos, las muestras de tejido se homogeneizaron durante 1 min en 7 ml de solución etanol/DMSO (75: 25), helada, usando un homogeneizador de tejidos MPW-120 (Medical Instruments, Polonia) a la velocidad de 10.000 rpm. El material homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 4°C, se recogió el sobrenadante y el sedimento se extrajo de nuevo con solución de etanol: DMSO para garantizar la recuperación completa del pigmento. Los extractos se reunieron y se analizó su contenido en pigmentos. Las muestras se excitaron a 517 nm y los espectros de fluorescencia se registraron en el rango entre 600 y 850 nm. La Figura 17 muestra la intensidad de fluorescencia del tumor y de varios órganos normalizada a sus respectivos pesos.

Existe una acumulación significativa de este fotosensibilizador en el tumor un día después de la administración intraperitoneal, cuando alcanza una concentración 3 veces superior de aquella en el músculo. Además, la acumulación en la piel es insignificante, lo que explica la ausencia de fotosensibilidad de los ratones en estudios de toxicidad en la oscuridad. Por último, el fotosensibilizador fue eliminado de la mayoría de los órganos en 24 h. Estas farmacocinéticas son muy favorables para la selección de la ventana temporal del tratamiento con PDT en la que los efectos secundarios se reducen y la eficacia del tratamiento alcanza el máximo.

Se realizaron estudios similares con otras Luzitinas y la Luzitina-Cl₂Et mostró una fuerte selectividad para el tumor en comparación con aquellas para el músculo (Figura 18).

EJEMPLO 19. PDT DE CARCINOMA DE COLON EN RATONES Balb/C USANDO Luzitina-FMet

Este ejemplo indica que las Luzitinas promueven la regresión/necrosis del tumor cuando se exponen a la luz de

longitud de onda apropiada.

El modelo de tumor fue el carcinoma de colon de ratón CT26 cultivado en monocapa en medio RPMI con un 5% de suero fetal bovino completado con antibióticos. Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera humedecida y con 5 % de CO₂. Las células de carcinoma (~ 1x10⁶) se suspendieron en 0, 1 ml de solución salina tamponada por fosfato (PBS) e implantadas por vía subcutánea en el lado derecho del dorso de los ratones Balb/C. El tumor creció hasta alcanzar 5 mm de diámetro aproximadamente una semana después de la implantación. No se observó ninguna necrosis espontánea. El tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó 5 mm de diámetro en cada uno de los animales. El día que los tumores alcanzaron el tamaño para el tratamiento se inyectó en los ratones una dosis de 10 mg/kg de Luzitina-FMet en PEG400 por vía intraperitoneal. 24 h después de la inyección, cuatro ratas se anestesiaron con cetamina y xilazina, y se trataron con el láser de diodo Hamamatsu de 748 nm descrito anteriormente a la tasa de fluencia de 100 mW/cm² durante 22 minutos (fluencia total de 132 J/cm²). Otras cuatro ratas se dejaron sin tratar y sirvieron de control. Los ratones fueron controlados diariamente, dos mediciones ortogonales L y W (perpendicular a L) se hicieron en los tumores y sus respectivos volúmenes se calcularon por medio de la fórmula $V = L \times W^2 / 2$ y se registraron.

La Figura 19 muestra el volumen relativo del tumor medido en diferentes días después de ser irradiados con láser. Los tamaños de los tumores en los animales tratados son más pequeños que los tamaños medios de los tumores de los animales de control y en uno de los casos, el tumor ha desaparecido por completo.

EJEMPLO 20. PDT DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA EN RATONES DBA/2 USANDO Luzitina-Cl₂Et

Este ejemplo indica que las Luzitinas promueven la regresión/necrosis del tumor cuando se exponen a la luz de la longitud de onda apropiada.

El modelo de tumor fue el de las células de melanoma Cloudman S91 cultivadas en monocapa en medio RPMI con un 5% de suero fetal bovino al que se añadieron antibióticos. Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera humedecida y con 5 % de CO₂. Las células de melanoma (~ 1x10⁶) se suspendieron en 0, 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se implantaron por vía subcutánea en el lado derecho del dorso de los ratones DBA/2. El tumor creció hasta alcanzar 5 mm de diámetro aproximadamente una semana después de la implantación. No se observó ninguna necrosis espontánea. El tratamiento se inició cuando el tumor alcanzó 5 mm de diámetro en cada uno de los animales. El día en que los tumores alcanzaron el tamaño para el tratamiento, se inyectó a los ratones una dosis de 10 mg/kg de Luzitina-Cl₂Et en PEG400 por vía intraperitoneal. 24 h después de la inyección, los ratones fueron anestesiados con cetamina y xilazina, inmovilizados en un soporte de plástico y luego tratados con diferentes dosis de luz con el láser de diodo Hamamatsu 748 nm descrito anteriormente. Pocos minutos después de la irradiación, la zona del tumor mostró signos evidentes de necrosis, que se extendieron por toda la zona irradiada horas después. Los ratones fueron controlados diariamente y el tamaño de los tumores se midió y registró. La Figura 20 muestra el tamaño del tumor medido en diferentes días después de ser irradiados con láser. Se puede observar claramente que una sola sesión de tratamiento promovió una regresión duradera del tumor.

EJEMPLO 21. FORMULACIONES PARA ADMINISTRACIÓN TÓPICA

Este ejemplo indica que la Luzitinas puede propagarse rápidamente a través de la piel cuando se aplican con una formulación transdérmica adecuada. Cuatro cerdos miniatura se utilizaron para probar la difusión a través de la piel del fotosensibilizador Luzitina-FMet y evaluar los posibles efectos secundarios de formulaciones para la administración tópica.

En primer lugar, el fotosensibilizador se disolvió en etanol absoluto (5 mg en 0, 556 ml). A continuación, se añadieron 1, 737 ml de propilenglicol y finalmente 0, 22 ml de Azone® y 0, 3 ml de agua. La mezcla se agitó vigorosamente en un mezclador de vórtice y se mantuvo en un baño de ultrasonidos para facilitar la solubilización y después se añadió a la base de gel compuesta de agua (76, 65 %), 96% de etanol (15 %), glicerina (6 %), trietanolamina (1, 35 %) y Carbopol 940 (1 %). La formulación se mezcló a fondo para lograr una buena homogeneización. En esta formulación, la concentración final del fotosensibilizador es de 0, 1% y de Azone® es de 4 %.

El tratamiento de los animales se ha descrito anteriormente. Las formulaciones se aplicaron a mano, protegidas con guantes quirúrgicos, en zonas determinadas de antemano y los animales estaban tranquilos bajo el efecto de la anestesia. Cada aplicación abarcó una zona circular de aprox. 3 cm de diámetro con algunos milímetros de espesor del gel. La aplicación fue cubierta con un apósito oclusivo. En algunos animales, se repitió el mismo procedimiento 3 horas más tarde en otra zona del dorso. En los animales, las formulaciones se retiraron 6 h después de la aplicación, el dorso del animal se limpió y se le mantuvo con vida durante 10 días para una evaluación adicional. Se

recogieron muestras de piel como fue descrito anteriormente. Cada muestra era aproximadamente rectangular con laterales de 2 cm y un espesor de 1 cm. Ninguno de los animales, particularmente el animal mantenido en vida, mostró evidencia de efectos secundarios causados por la formulación con o sin alguno de los sensibilizadores.

Después de procedimiento de fijación, cada muestra se cortó en rodajas para evaluarla en microscopía de fluorescencia y microscopía confocal. Se presenta un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas de las muestras en la Figura 21. Las imágenes revelan que en el intervalo de 3 h de la aplicación del gel, la Luzitina FMet se propagó a lo largo de la epidermis. La fluorescencia de Luzitina-FMet también fue confirmada por su espectro de absorción indicado en la Figura 22. Por lo tanto, se puede obtener una composición para aplicación tópica de Luzitinas que se difunde a través de la capa córnea de la epidermis en unas horas, lo cual es muy conveniente para PDT de trastornos cutáneos.

(1) K. Berg, in H. Hönigsmann, G. Jori, A.R. Young (Eds.), *The Fundamental Bases of Phototherapy*. OEMF spa, Milano, 1996, p. 181-207.

(2) R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott: *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1993.

(3) Y. Vakrat-Haglili, L. Weiner, V. Brumfeld, A. Brandis, Y. Salomon, B. McIlroy, B.C. Wilson, A. Pawlak, M. Rozanowska, T. Sarna, A. Scherz, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6487.

(4) M. Pineiro, A.L. Carvalho, M.M. Pereira, A.M.d.A.R. Gonsalves, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, *Chem. Eur. J.* 4 (1998) 2299.

(5) T.J. Dougherty, D.G. Boyle, K.R. Weishaupt: *Photodynamic Therapy--Clinical and Drug Advances*, Porphyrin Photosensitization, Plenum Press, New York, 1983.

(6) T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889.

(7) R.L. Lipson, E.J. Baldes, A.M. Olsen, *J. Natl. Cancer Inst.* 26 (1961) 1.

(8) T.J. Dougherty, D.G. Boyle, K.R. Weishaupt, B. Henderson, W. Potter, D.A. Bellnier, K.E. Wityk, *Adv. Exp. Biol. Med.* 160 (1983) 3.

(9) R.K. Pandey, M.M. Siegel, R. Tsao, J.M. McReynolds, T.J. Dougherty, *Biomed. And Environ. Mass Spectrometry* 19 (1990) 405.

(10) R. Bonnett, G. Martínez, *Tetrahedron* 57 (2001) 9513.

(11) E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brucker, *Tetrahedron* 54 (1998) 4151.

(12) M. Pineiro, A.M.d.A. Rocha Gonsalves, M.M. Pereira, S.J. Formosinho, L.G. Arnaut, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 3787.

(13) Y. Chen, G. Li, R.K. Pandey, *Current Org. Chem.* 8 (2004) 1105.

(14) E.M. Beems, T.M.A.R. Dubbelman, J. Lugtenburg, J.A.B. Best, M.F.M.A. Smeets, J.P.J. Bohegeim, *Photochem. Photobiol.* 46 (1987) 639.

(15) S. Schastak, B. Jean, R. Handzel, G. Kostenich, R. Hermann, U. Sack, A. Orenstein, Y. Wang, P. Wiedermann, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 78 (2005) 203.

(16) C.K. Chang, C. Sotiriou, W. Wu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1986) 1213.

(17) A.R. Morgan, D. Skalkos, G.M. Garbo, R.W. Keck, S.H. Selamn, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 2126.

(18) P. Yong-Hin, T.P. Wijesekera, D. Dolphin, *Tetrahedron Lett.* 32 (1991) 2875.

(19) G. Zheng, A. Kozyrev, T.J. Dougherty, K.M. Smith, R.K. Pandey, *Chemistry Lett.* (1996) 119.

- (20) A.C. Tome, P.S.S. Lacerda, M.G.P.M.S. Neves, J.A. S. Cavaleiro, *Chem Commun* (1997) 1199.
- (21) H.-J. Kim, J.S. Lindsey, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 5475.
- (22) H.W. Whitlock Jr., R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 7485.
- (23) R. Bonnett, R.D. White, U.-J. Winfield, M.C. Berenbaum, *Biochem. J.* 261 (1989) 277.
- 5 (24) F.S. De Rosa, M.V.L.B. Bentley, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1447.
- (25) J.L. McCullough, G.D. Weinstein, L.L. Lemus, W. Rampone, J.J. Jenkins, *J. Invest. Dermatol.* 81 (1983) 528.
- (26) O. Santoro, G. Bandieramonte, E. Melloni, R. Marchesini, F. Zunino, P. Lepera, G. De Palo, *Cancer Res.* 50 (1990) 4501.
- 10 (27) J.C. Kennedy, R.H. Pottier, D.C. Pross, *J. Photochem. Photobiol. B* 6 (1990) 143.
- (28) S.R. Wiegell, I.-M. Stender, R. Na, H.C. Wulf, *Arch. Dermatol.* 139 (2003).
- (29) E.G. Azenha, A.C. Serra, M. Pineiro, M.M. Pereira, J. Seixas de Melo, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, A.M.d.A.R. Gonsalves, *Chem. Phys* 280 (2002) 177.
- (30) R.W. Boyle, D. Dolphin, *Photochem. Photobiol.* 64 (1996) 469.
- 15 (31) A.S.M. Ressurreição, M. Pineiro, L.G. Arnaut, A.M.d.A.R. Gonsalves, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 11 (2007) 50.
- (32) B.M. Magnusson, W.J. Pugh, M.S. Roberts, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1047.
- (33) A.M.d.A.R. Gonsalves, J.M.T.B. Varejão, M.M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.* 28 (1991) 635.
- (34) A.M.D.R. Gonsalves, R.A.W. Johnstone, M.M. Pereira, A.M.P. deSantAna, A.C. Serra, A.J.F.N. Sobral, P.A. Stocks, *HETEROCYCLES* 43 (1996) 829.
- 20 (35) C.J.P. Monteiro, M.M. Pereira, S.M.A. Pinto, A.V.C. Simões, G.F.F. Sá, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, S. Simões, M.F. Wyatt, *Tetrahedron* 64 (2008) 5132.
- (36) C. Serpa, P.J.S. Gomes, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, J. Pina, J. Seixas de Melo, *Chem. Eur. J.* 12 (2006).
- 25 (37) J.M. Dabrowski, M.M. Pereira, L.G. Arnaut, C.J.P. Monteiro, A.F. Peixoto, A. Karocki, K. Urbanska, G. Stochel, *Photochem. Photobiol.* 83 (2007) 897.
- (38) R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 79 (1994) 11.
- (39) M.H. Qvist, U. Hoeck, B. Kreilgaard, F. Madsen, S. Frokjaer, *Eur. J. Pharm. Sc.* 11 (2000) 59.
- (40) J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5421.
- (41) M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 382-91.
- 30 (42) C. Tanielian, C. Schweitzer, R. Mechin, C. Wolff, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 208-12.
- (43) C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van der Bergh, G. Wagnières, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 45 (1998) 170-78.
- (44) R. Bonnett, B.D. Djelal, A. Nguyen, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 5 (2001) 652.
- (45) R. Bonnett, P. Charlesworth, B.D. Djelal, D.J. McGarvey, T.G. Truscott, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*

(1999) 325.

(46) R. Bonnett, B.D. Djelal, P.A. Hamilton, G. Martinez, F. Wierrani, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 53 (1999) 136-43.

5 (47) E. Crescenzi, A. Chiaviello, G. Canti, E. Reddi, B.M. Veneziani, G. Palumbo, Mol. Cancer Ther. 5 (2006) 776-85.

(48) D.G. Hilmey, M. Abe, M.I. Nelen, C.E. Stilts, G.A. Baker, S.N. Baker, F.V. Bright, S.R. Davies, S.O. Gollnick, A.R. Oseroff, S.L. Gibson, R. Hilf, M.R. Detty, J. Med. Chem. 45 (2002) 449-61.

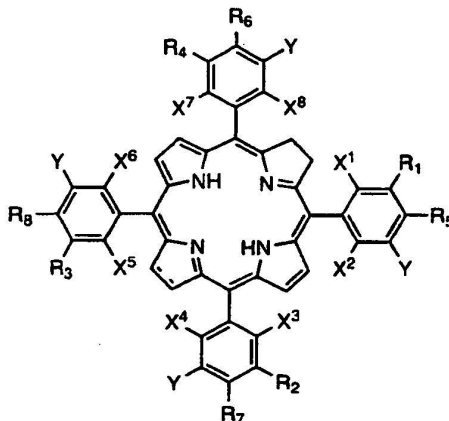
(49) Hajri, S. Wack, C. Meyer, M.K. Smith, C. Leberquier, M. Kedingier, M. Aprahamian, Photochem. Photobiol. 75 (2002) 140.

10 (50) H. Rezzoug, L. Bezdetnaya, O. A'amar, J.L. Merlin, F. Guillemin, Lasers Med. Sci. 13 (1998) 119.

(51) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Adv. Drug Del. Rev. 46 (2001) 3.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar un derivado de clorina o bacterioclorina que tiene la siguiente fórmula:



Fórmula (I)

5 en la que :

----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble ;

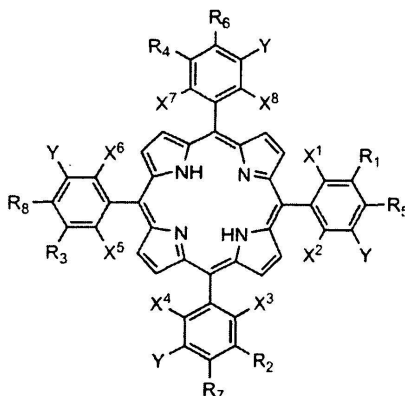
$X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8$ son cada uno, halógenos (F, Cl, Br) y átomos de hidrógeno seleccionados independientemente, siempre que simultáneamente X^2, X^4, X^6 , y X^8 o que simultáneamente X^1, X^3, X^5 y X^7 sean halógenos, o que todos los X sean halógenos ;

10 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ se seleccionan independientemente entre H, -OH y $-SO_2R$, en el que cada R se selecciona independientemente entre - Cl, -OH, -aminoácido, $-OR^n$, $-NHR^n$ y $-NR_2^n$ -, donde R^n es un alquilo con 1 a 12 átomos de carbono;

Y es un átomo de flúor o hidrógeno;

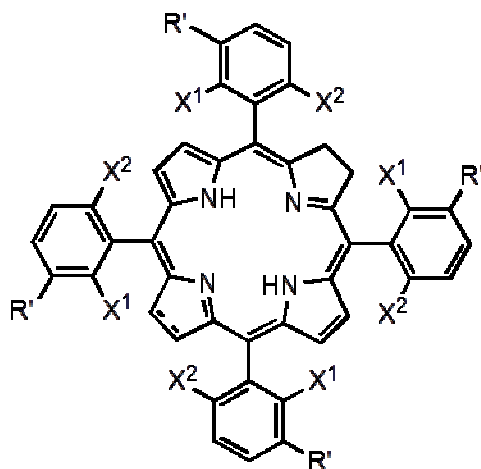
incluyendo el paso siguiente:

15 (i) La reducción en estado sólido de la porfirina substituida correspondiente en derivado y clorina o de bacterioclorina usando hidrazidas en ausencia de disolventes y opcionalmente en ausencia de bases; en el que la porfirina substituida correspondiente tiene la fórmula :



Fórmula (II).

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para la síntesis de un derivado de clorina o de bacterioclorina con la siguiente fórmula:



Fórmula (III)

5 en la que :

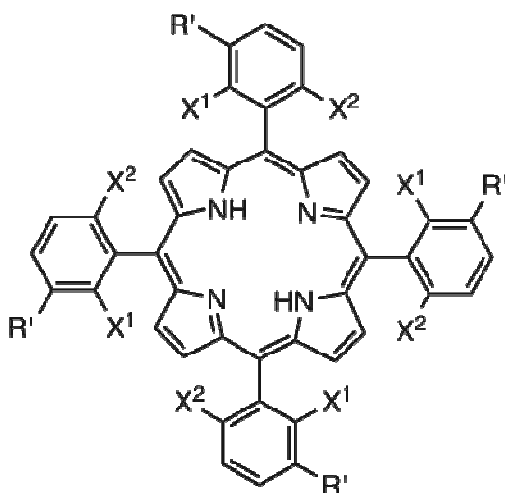
----- representa un enlace carbono-carbono simple o doble;

X^2 se seleccionan a partir de halógenos (F, Cl, Br), X^1 se selecciona entre hidrógeno o halógeno (F, Cl, Br) y R' son $-SO_2R$;

10 R se seleccionan cada uno independientemente entre - Cl, -OH, -aminoácido, $-OR^n$, $-NHR^n$ y $-NR_2^n$, donde R^n es un radical alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono;

incluyendo el siguiente paso:

(i) La reducción en estado sólido de la porfirina substituida correspondiente en derivado de clorina o de bacterioclorina usando hidrazidas en ausencia de disolventes y opcionalmente en ausencia de bases, en el que la porfirina substituida correspondiente tiene la fórmula:



Fórmula (IV).

15

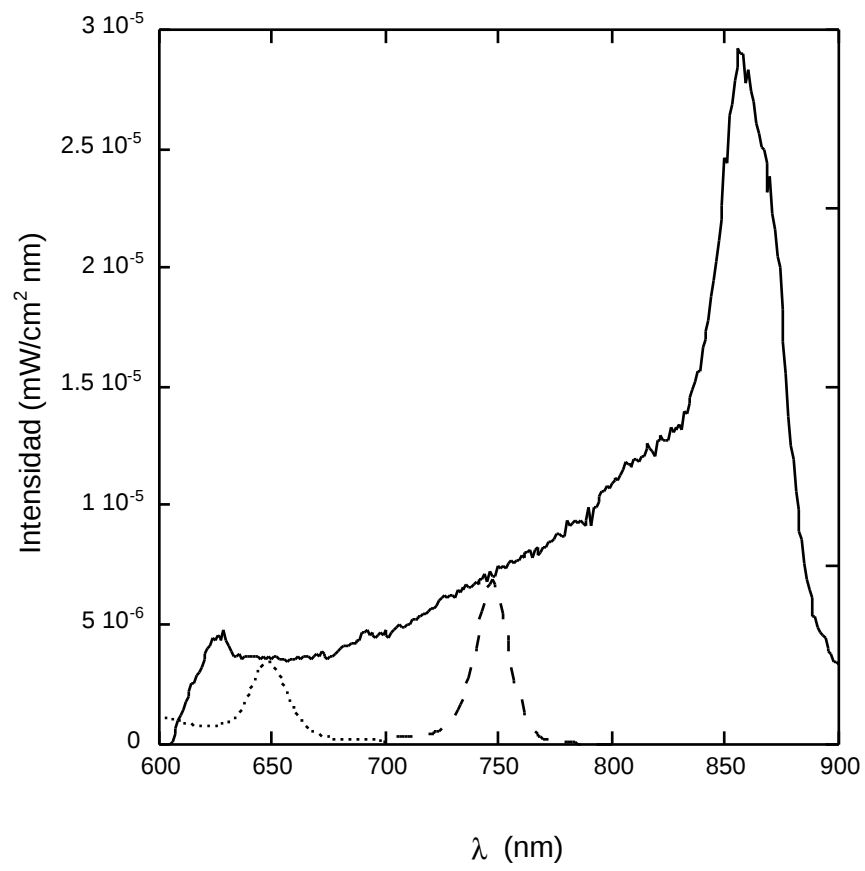


Figura 1

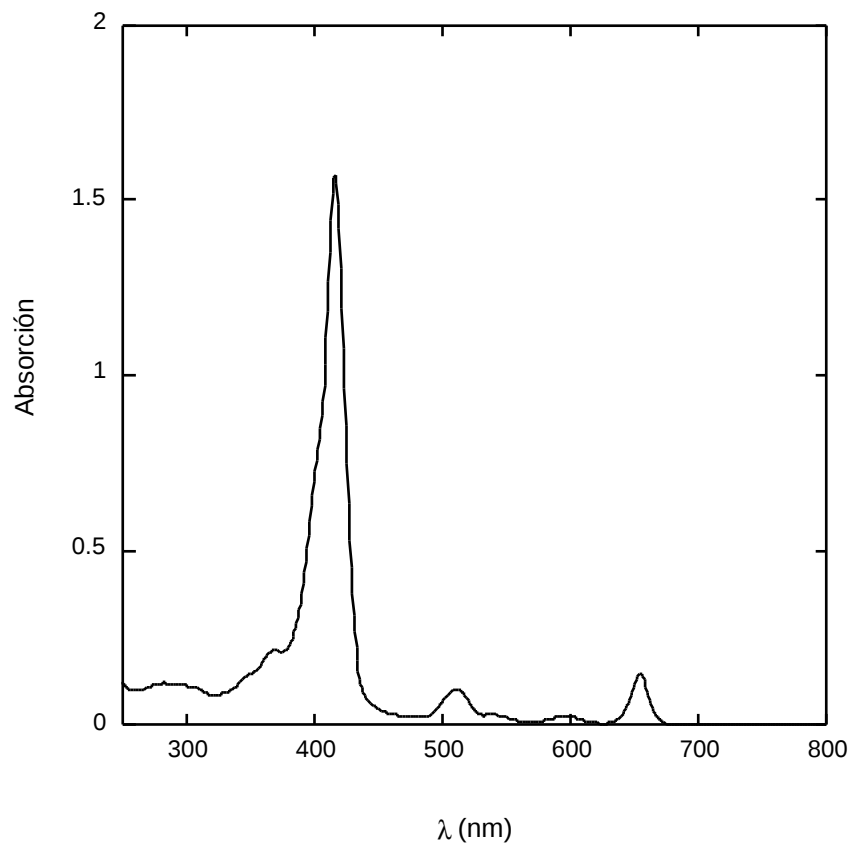


Figura 2

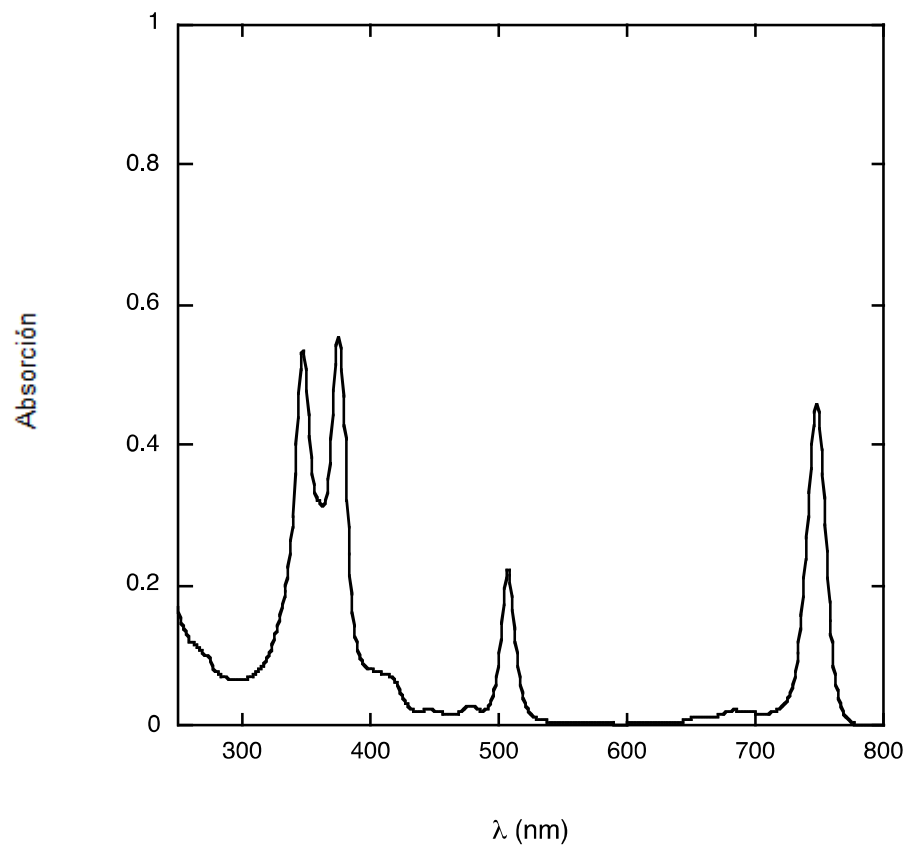


Figura 3

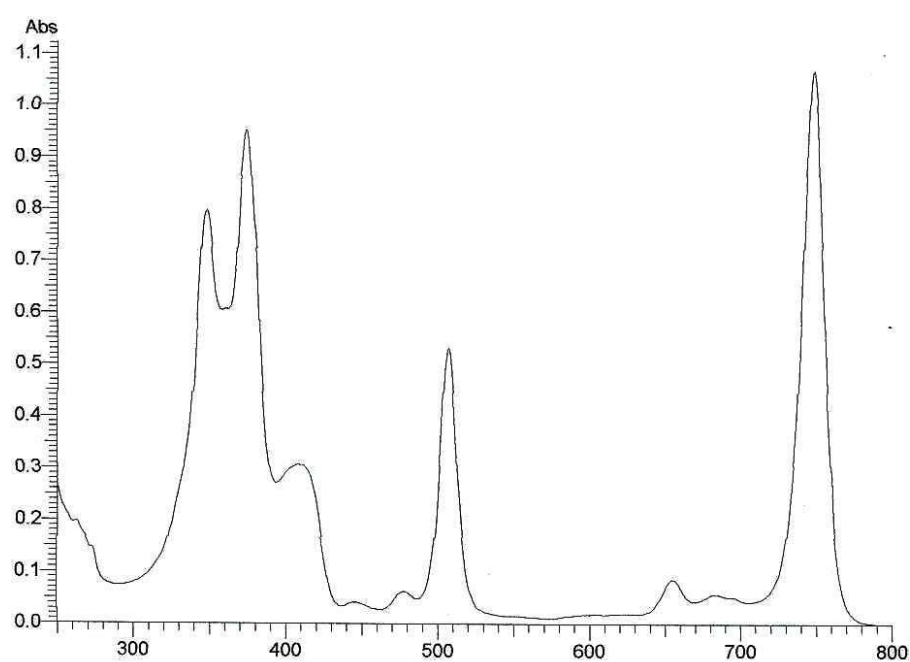


Figura 4

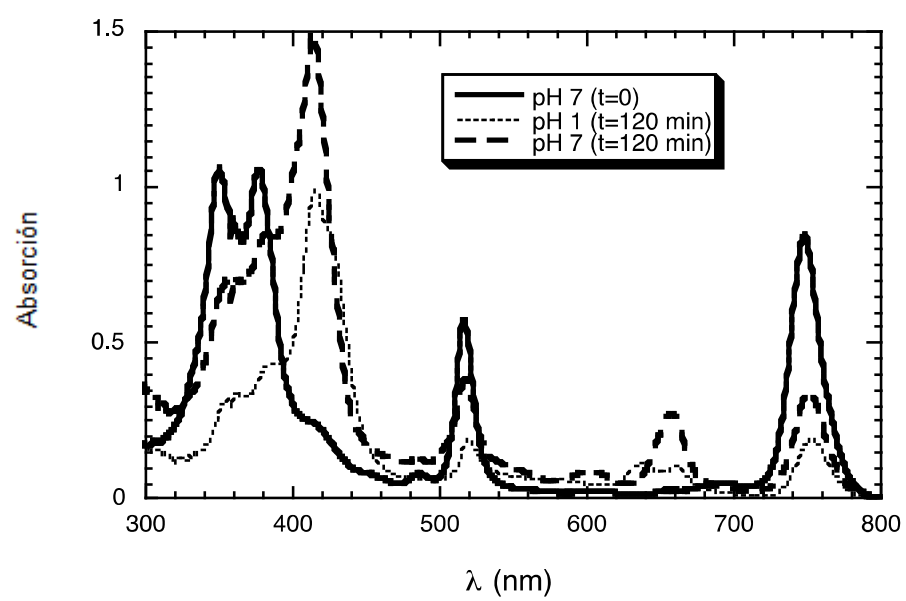


Figura 5

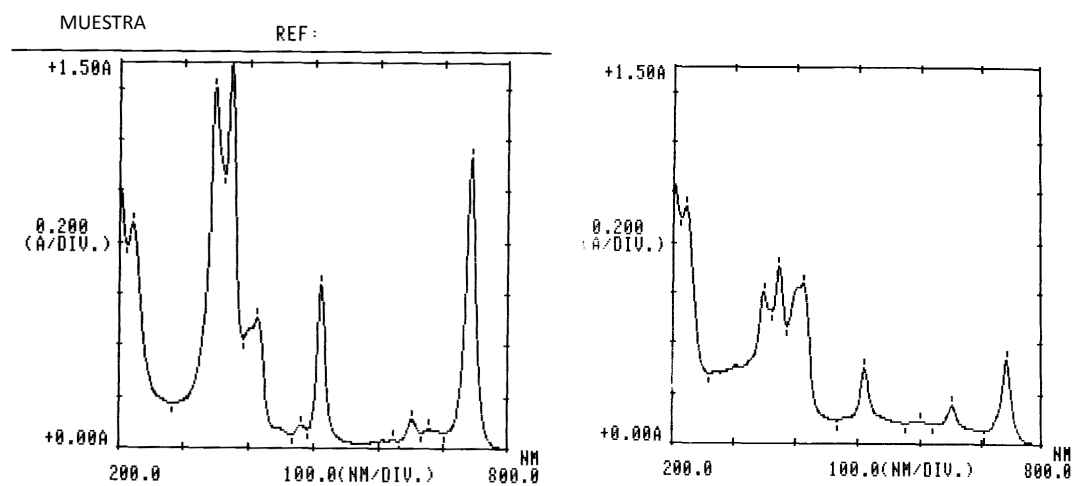


Figura 6

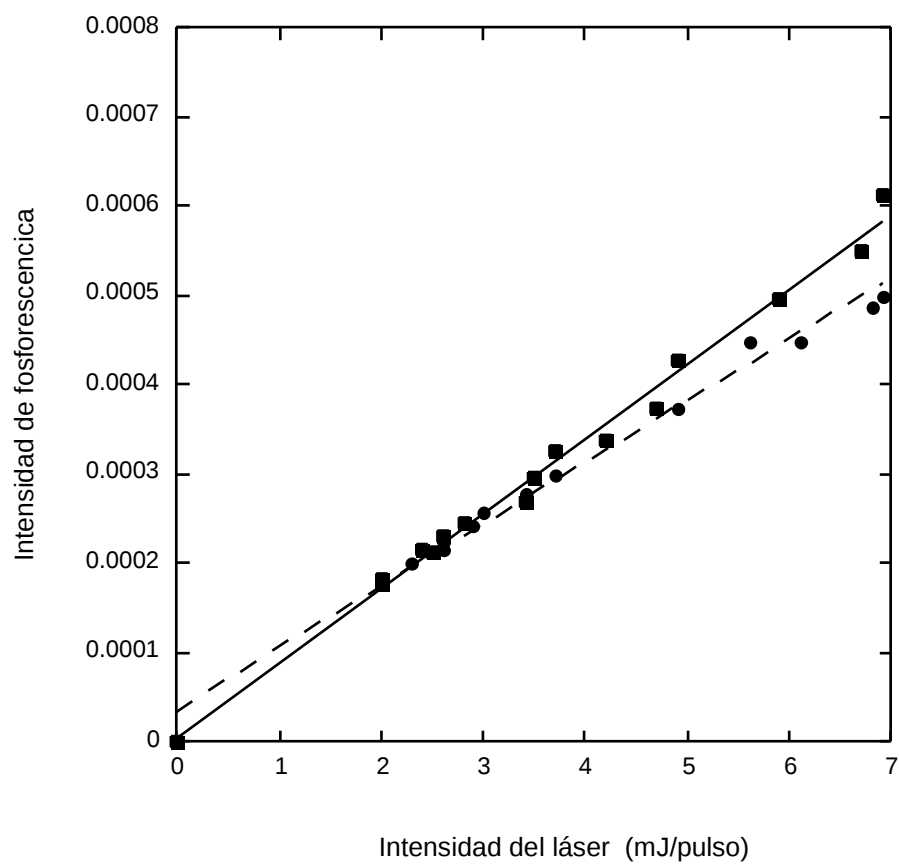


Figura 7

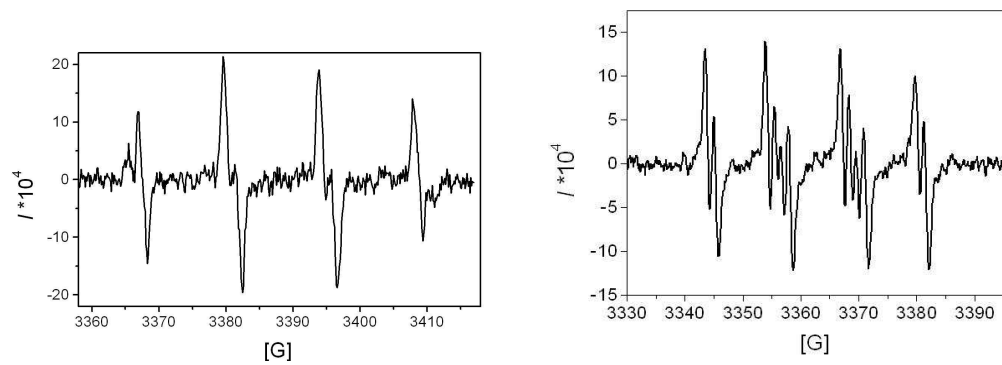


Figura 8

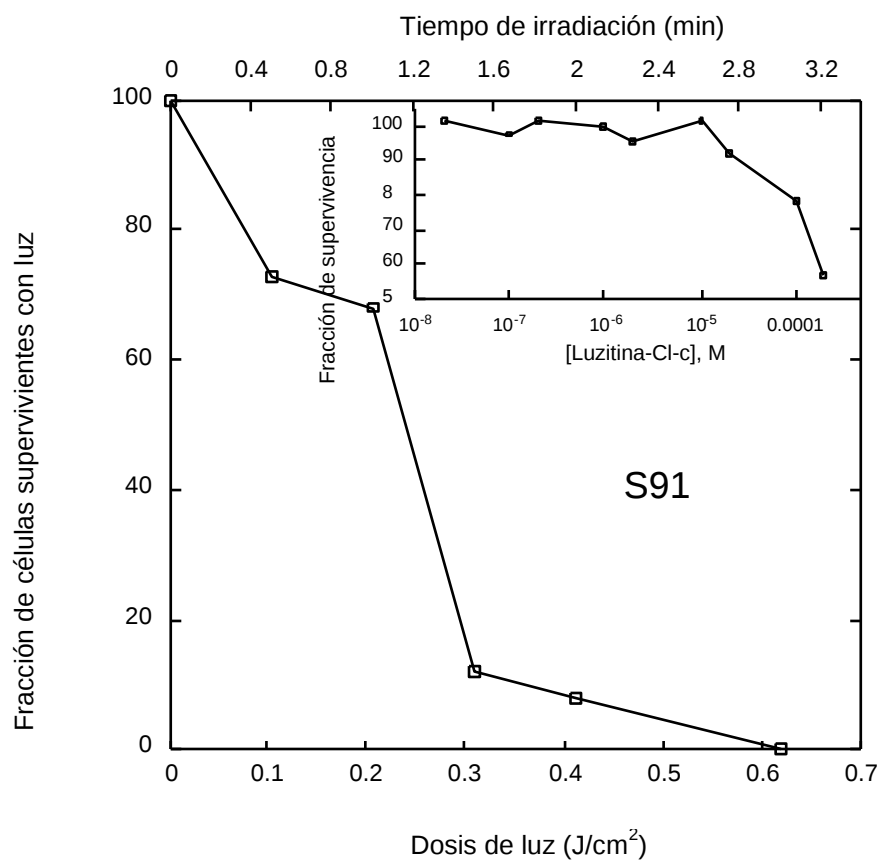


Figura 9

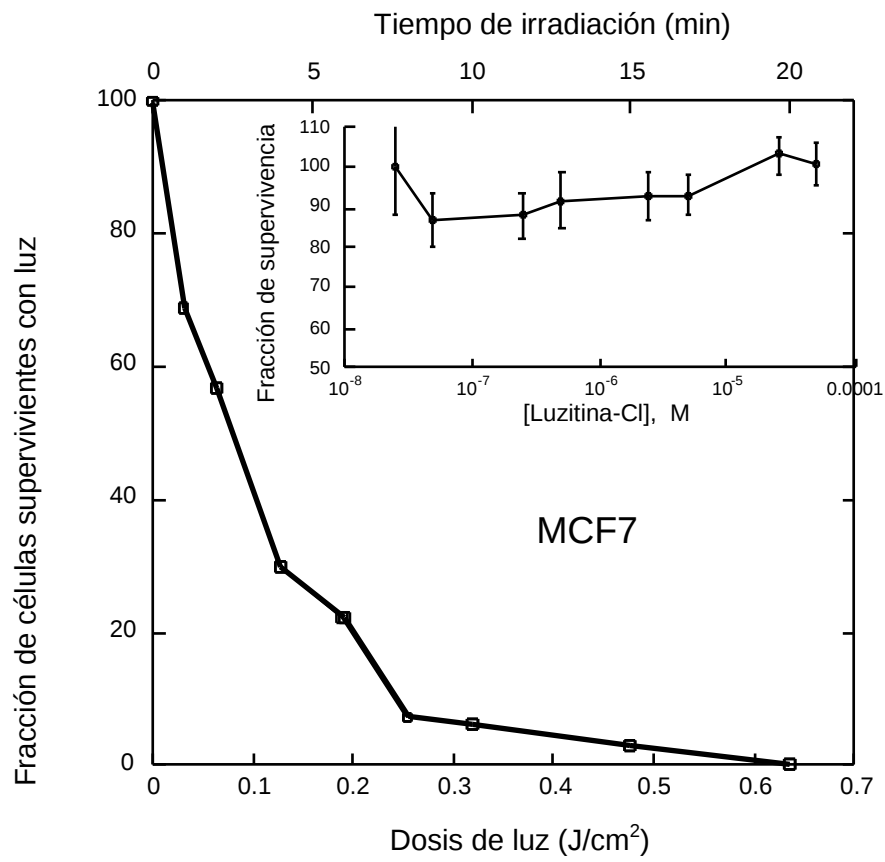


Figura 10

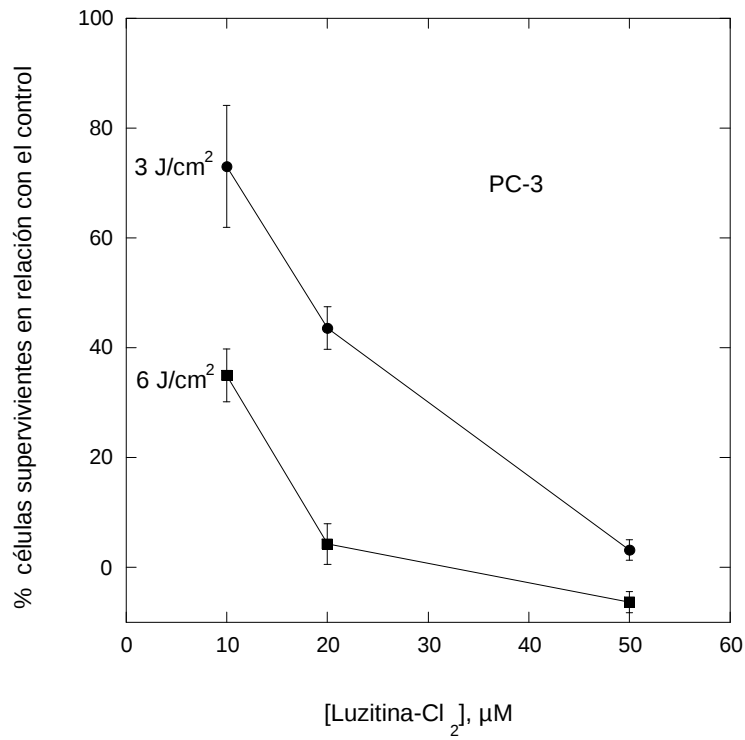


Figura 11

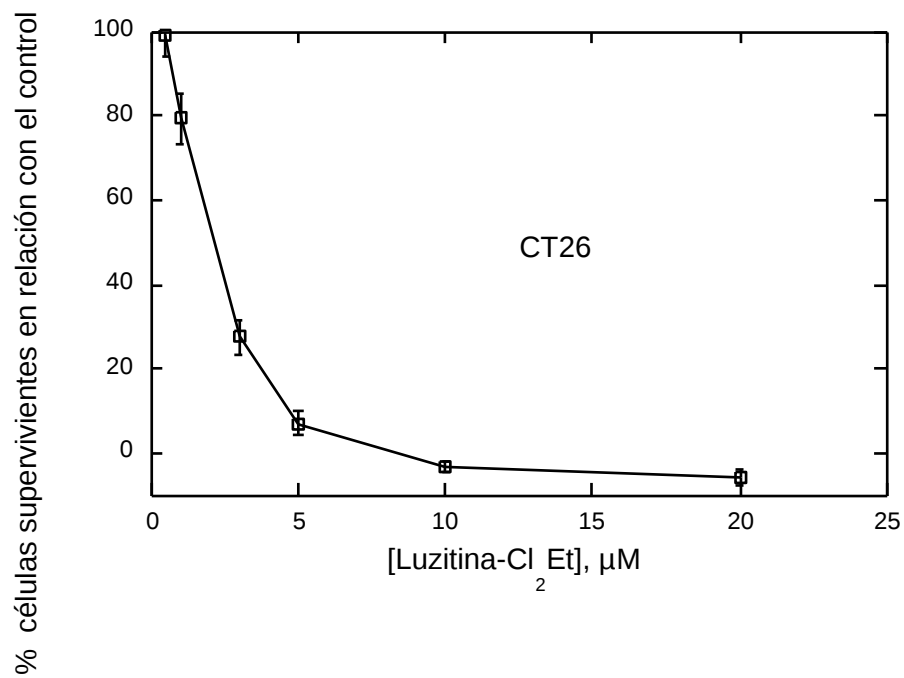


Figura 12

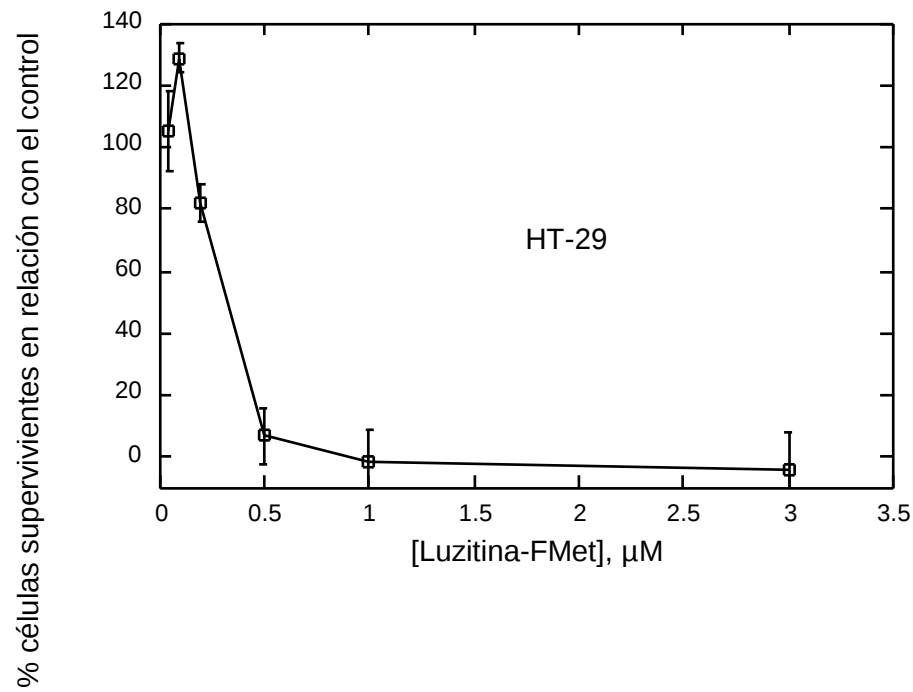


Figura 13

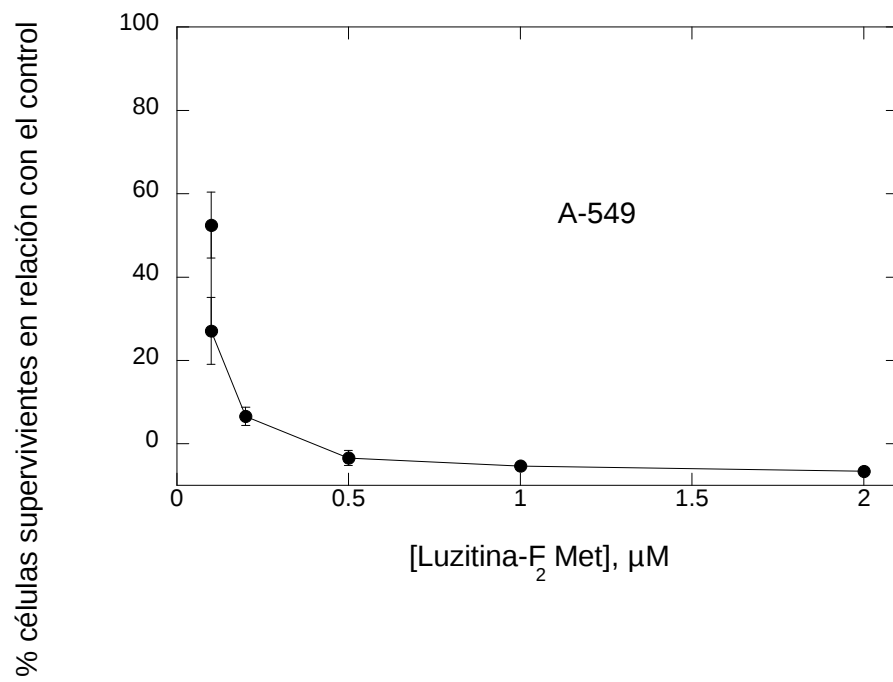


Figura 14

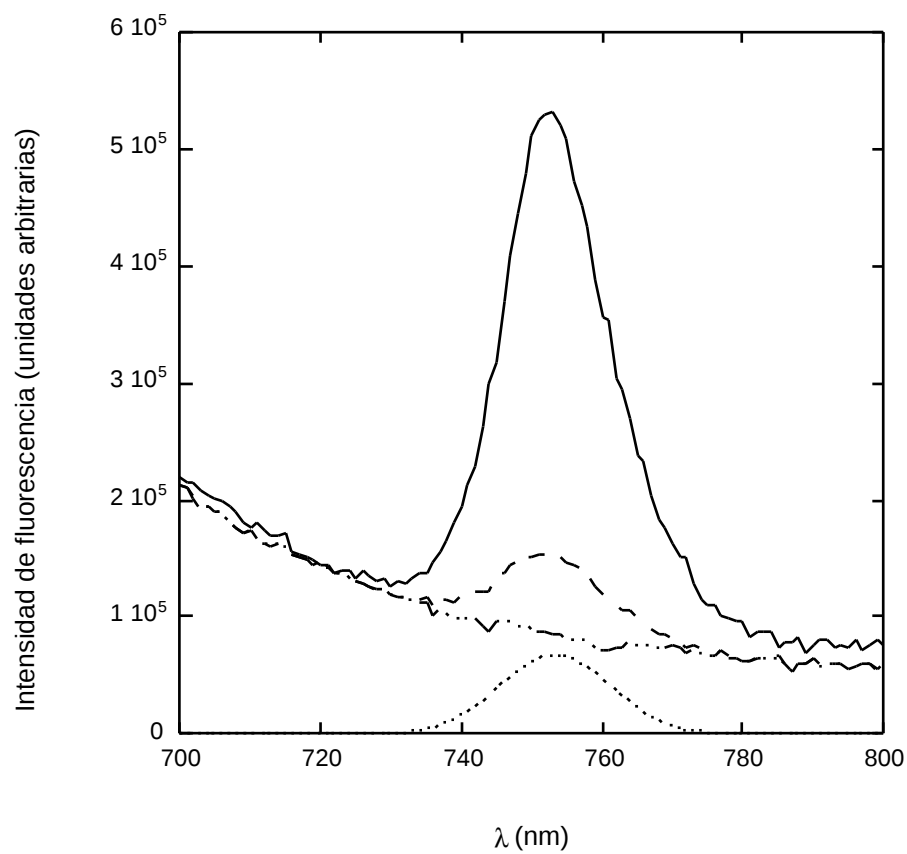


Figura 15

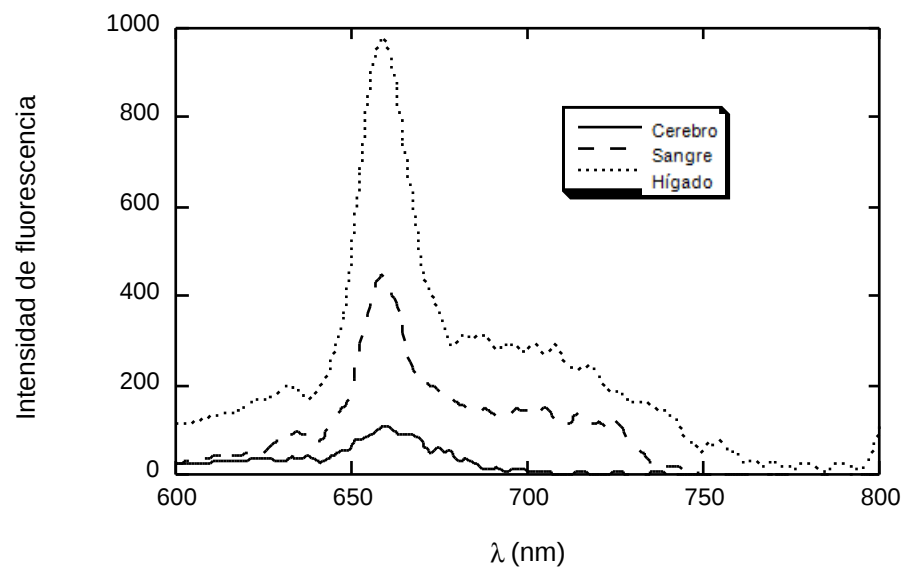


Figura 16

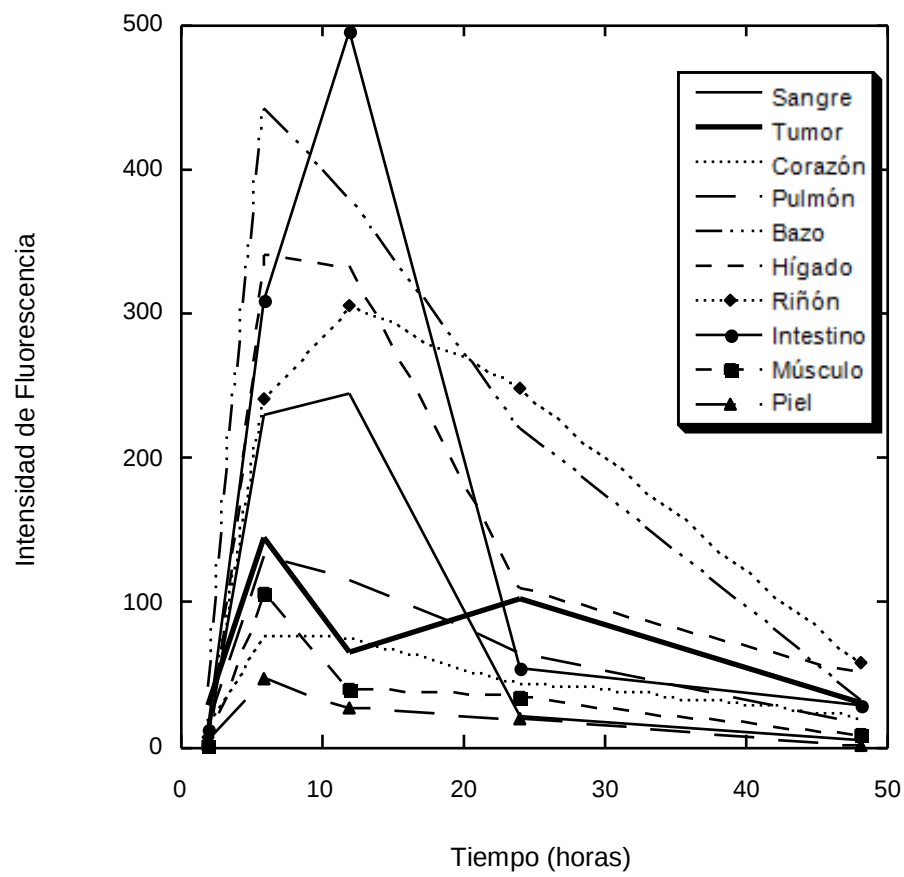


Figura 17

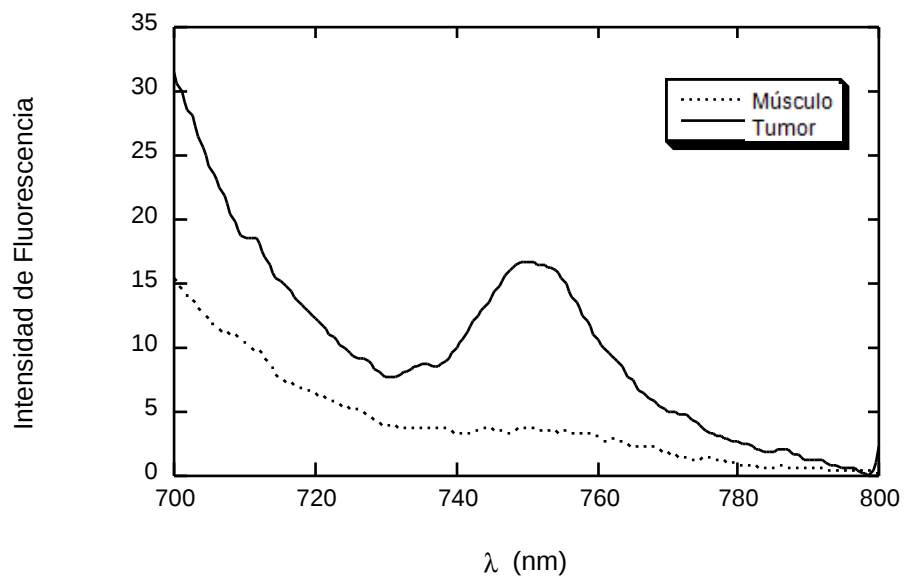


Figura 18

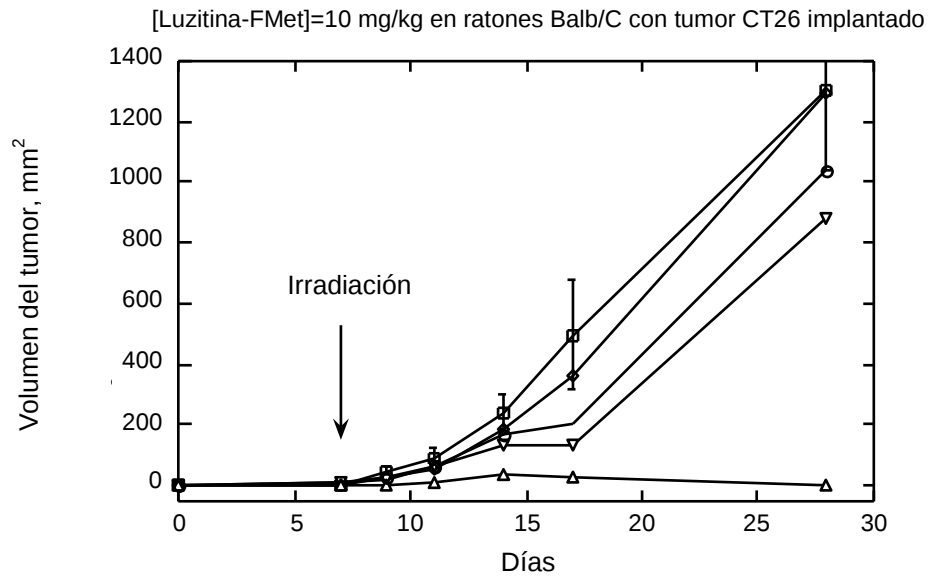


Figura 19

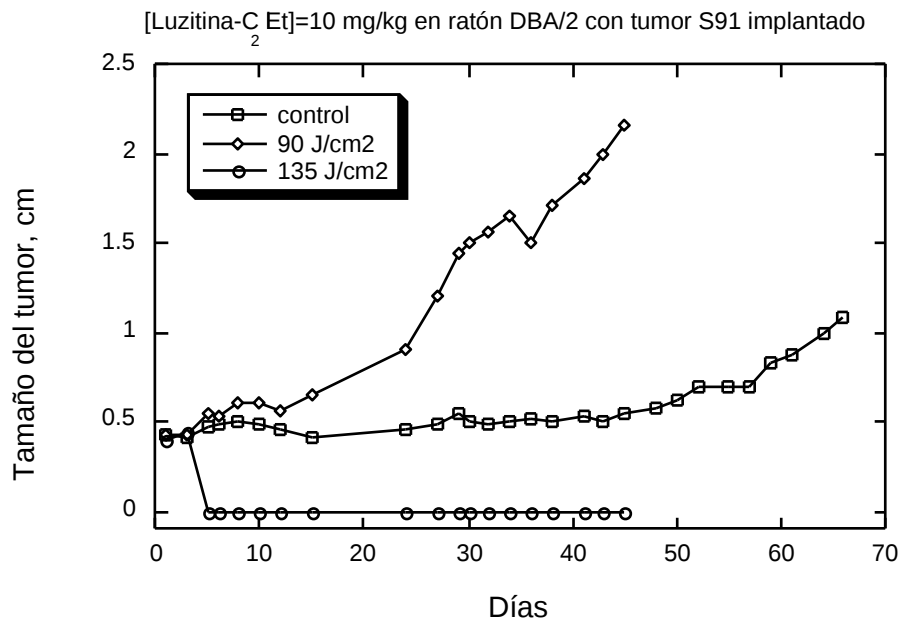


Figura 20



Figura 21

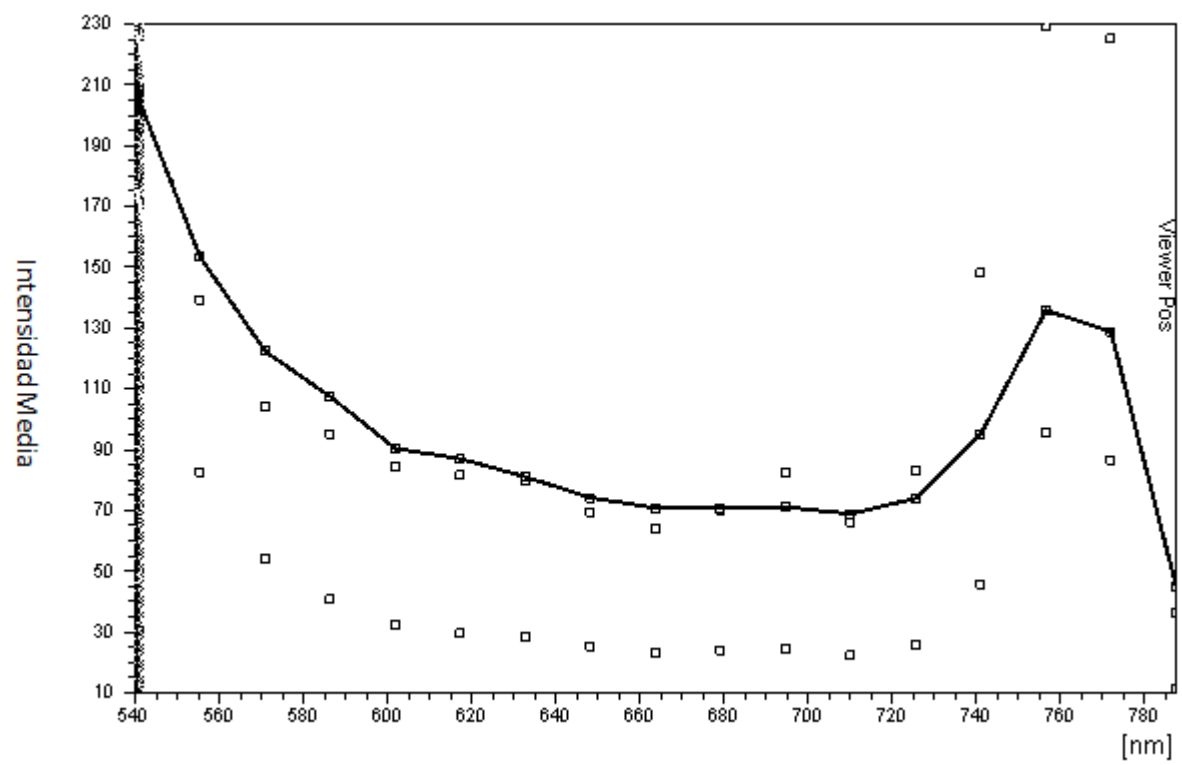


Figura 22