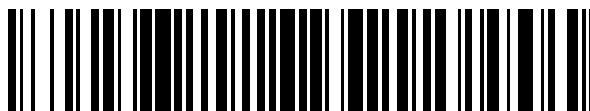


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 516**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2003** **E 03773967 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 1567147**

54 Título: **Derivados bacterioclorofílicos aniónicos solubles en agua y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

17.11.2002 IL 15290002

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.09.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**SCHERZ, AVIGDOR;
BRANDIS, ALEXANDER;
MAZOR, OHAD;
SALOMON, YORAM y
SCHEER, HUGO**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 489 516 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

Derivados bacterioclorofílicos aniónicos solubles en agua y sus utilizaciones

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos derivados aniónicos solubles en agua de bacterioclorofila, a su preparación y a su utilización en procedimientos de terapia fotodinámica *in-vivo* y diagnóstico de tumores y diferentes enfermedades vasculares, tales como degeneración macular relacionada con la edad, así como en procedimientos de exterminación *in-vivo* y *ex-vivo* de virus y microorganismos.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

AMD: degeneración macular relacionada con la edad;

15 **Bchl:** bacterioclorofila a, una 7,8,17,18-tetrahidroporfirina pentacíclica con un 5º anillo isocíclico, un átomo central de Mg, un grupo fitilo o geranilgeranilo en la posición 17³, un grupo COOCH₃ en la posición 13², un átomo de H en la posición 13², grupos metilos en las posiciones 2, 7, 12, 18, un grupo cetilo en posición 3, y un grupo etilo en posición 8;

Bphe: bacteriofeofitina a (Bchl en la que el Mg central está sustituido por dos átomos de H);

20 **Bpheid:** bacteriofeofórbido a (el ácido carboxílico libre de C-17² derivado de Bphe);

Pd-Bpheid: Pd-bacteriofeofórbido a;

PDT: terapia fotodinámica;

25 **Rodobacterioclorina:** 7,8,17,18-tetrahidroporfirina tetracíclica que tiene un grupo a- CH₂CH₂COOH en la posición 17, un grupo -COOH en la posición 13, grupos metilo en las posiciones 2, 7, 12, 8, y grupos etilo en las posiciones 3 y 8.

A lo largo de esta descripción se utiliza la numeración IUPAC de los derivados de bacterioclorofila. Utilizando esta nomenclatura, las bacterioclorofilas naturales presentan dos esteres de ácido carboxílico en las posiciones 13² y 17², no obstante están esterificados en posiciones 13³ y 17³.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento no quirúrgico de tumores en el que se combinan medicamentos no tóxicos e irradiación fotosensibilizante no peligrosa para generar especies de oxígeno reactivo citotóxico *in situ*. Esta técnica es más selectiva que las habitualmente utilizadas quimioterapia y radioterapia de tumores. Hasta el momento, se han utilizado las porfirinas como agentes fotosensibilizantes primarios en aplicaciones clínicas. No obstante, los sensibilizadores actuales adolecen de varias eficiencias que limitan su aplicación, incluyendo principalmente: (1) una absorción relativamente débil en el rango espectral visible, que limita el tratamiento de tumores de poca profundidad; (2) acumulación y retención durante largo tiempo del sensibilizante en la piel del paciente, conduciendo a fototoxicidad prolongada de la piel (desde días hasta meses); y (3) poca o ninguna diferenciación entre el efecto de PDT en tumores iluminados y tejidos no tumorales. Los inconvenientes de los medicamentos actuales inspirados en una búsqueda extensa de sensibilizadores de segunda generación absorbentes de longitudes de onda largas que muestran mejor diferenciación entre su retención en células tumorales y la piel u otros tejidos normales.

45 A efectos de optimizar el rendimiento de los medicamentos de porfirina en la terapéutica y el diagnóstico, se han propuesto varios derivados de porfirina en los que, por ejemplo, no existe átomo metálico central (distinto del Mg) formando complejo con cuatro anillos de pirrol, y/o los substituyentes periféricos de los anillos de pirrol son modificados y/o el macrociclo es dihidrogenado pasando a derivados de clorofila (clorinas) o tetrahidrogenado pasando a derivados bacterioclorofílicos (bacterioclorinas).

Debido a su intensa absorción en regiones espectrales favorales (650-850 nm) y su fácil degradación después de tratamiento, los derivados de clorofila y de bacterioclorofila han sido identificados como excelentes sensibilizadores para PDT de tumores y por tener propiedades superiores en comparación con las porfirinas, aunque su disponibilidad es menor y son más difíciles de manipular.

Los bacterioclorofílicos tienen potenciales ventajas en comparación con las clorofilas, porque muestran bandas intensas próximas a los infrarrojos, es decir, en longitudes de onda considerablemente más largas que los derivados de clorofila.

60 Los espectros, fotofísica, y fotoquímica de las bacterioclorofilas naturales (Bchls) las han hecho moléculas óptimas para cultivo a la luz con claras ventajas con respecto a otros sensibilizadores utilizados actualmente en PDT. En particular, estas moléculas tienen un coeficiente de extinción muy elevado para longitudes de onda larga ($\lambda_{\text{max}}=760-780 \text{ nm}$, $\epsilon=(4-10)\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), en las que la luz penetra profundamente en los tejidos. También generan especies de oxígeno reactivo (ROS) con un elevado rendimiento cuántico (dependiendo del metal central).

En condiciones de administración normales, es decir, en presencia de oxígeno a temperatura ambiente y bajo condiciones normales de luz, las fracciones Bchl son lábiles y tienen rendimientos cuánticos algo menores para formación de estado triplete, cuando se compara, por ejemplo, con derivados de hematoporfirina (HPD). No obstante, su posible iniciación de reacciones biológicas redox, favorables características espectrales y su fácil degradación *in vivo* resulta en la superioridad potencial de las bacterioclorofilas con respecto a otros compuestos, por ejemplo, porfirinas y clorofilas para terapia PDT y diagnóstico y para la exterminación de células, virus y bacterias en muestras y en tejidos vivos. La modificación química de las bacterioclorofilas se espera que mejore adicionalmente sus propiedades, pero esto ha quedado muy limitado debido a la falta de procedimientos adecuados para la preparación de dichas bacterioclorofilas modificadas.

La absorción biológica y eficacia en PDT de derivados libres de metal de Bchl ha sido estudiada con el objetivo de manipular la afinidad de los sensibilizadores al comportamiento celular del tumor. Es básico en este enfoque la utilización de medicamentos altamente lipofílicos, que pueden incrementar la acumulación del medicamento en las células del tumor, y que hace también difícil su administración. Además, la biodistribución que se ha indicado muestra niveles fototóxicos significativos del medicamento en tejidos no tumorales a lo largo de periodos prolongados (por lo menos días) después de la administración del medicamento.

En la anterior patente de Israel del solicitante No. 102645 y las correspondientes patentes EP 0584552, US 5.726.169, US 5.726.169, US 5.955.585 y US 6.147.195, se ha adoptado un enfoque diferente por los inventores. Se han estudiado sensibilizantes antivascuales muy eficientes que no se extrabasan de la circulación después de la administración y tienen un periodo de vida corto en la sangre. Se esperaba que la diferencia intrínseca entre vasos de tejidos normales y tejidos anormales, tales como tumores u otros tejidos que se basan en neovasos, posibilitaría la destrucción relativamente selectiva de los tejidos anormales. Por lo tanto, se pretendió sintetizar derivados de Bchl, que son más polares y por lo tanto, tienen más probabilidades de permanecer en el compartimiento vascular, donde conducen el efecto fotodinámico primario. Con este objetivo, el residuo de geranilgeranilo en posición C-17 de Bchl a (compuesto 1, mostrado en el adjunto esquema 1) ha sido sustituido por varios residuos, tales como aminoácidos, péptidos o proteínas que favorecen la hidrofiliidad del sensibilizador. Un derivado específico, Bchl-Ser (esquema 1, compuesto 1, en el que R es serilo), se descubrió que era soluble en agua y altamente fototóxico en cultivos de células. Después de inyección intraperitoneal, el Bchl-Ser desapareció de la sangre de ratón y tejidos, de manera bi-exponencial en un tiempo relativamente corto ($t_{1/2}$ ~2 y 16h, respectivamente). La desaparición de la circulación fue incluso más rápida después de inyección intravenosa. Bajo el protocolo de tratamiento seleccionado (aplicación de luz dentro de unos minutos después de la inyección del medicamento), se confirmó fototoxicidad predominantemente a la vasculatura del tumor (RosenbachBelkin y otros, 1996; Zilberstein y otros, 2001 y 1997). No obstante, desafortunadamente, igual que el Bchl natural, el derivado Bchl-Ser sufre una foto-oxidación rápida, formando el correspondiente éster 2-desvinil-2acetil-clorofilida y otros productos.

Para incrementar la estabilidad de los derivados Bchl, el átomo central de Mg fue sustituido por Pd en la publicación posterior PCT del solicitante WO 00/33833 y US 6.569.846. Este metal pesado se demostró previamente que incrementaba de manera notable, el potencial de oxidación del macrociclo Bchl y al mismo tiempo, que fomentaba en gran medida la tasa de cruzamiento intersistema (ISC) de la molécula pasando a su estado triplete. La sustitución del metal fue llevada a cabo por incorporación directa de ión Pd^{2+} en una molécula Bpheid, tal como se describe en WO 00/33833. Basándose en la biodistribución de pigmentos y en farmacocinética, se supuso que los derivados de Pd-Bpheid permanecían en circulación durante un tiempo muy corto sin prácticamente extravasado a otros tejidos y es, por lo tanto, un buen candidato para PDT de aplicación vascular que evita fototoxicidad de la piel. El efecto de tratamiento sobre los vasos sanguíneos fue demostrado por microscopía intravital de vasos sanguíneos tratados y tiñendo con Evans-Blue. Utilizando un protocolo de tratamiento con un intervalo mínimo medicamento-luz, se descubrió que la Pd-Bpheid (designada también Tookad) era efectiva en la erradicación de diferentes tumores en ratones, ratas y otros modelos de animales y está entrando actualmente en la Fase I/II de pruebas clínicas en pacientes con cáncer de próstata en los que ha fracasado la terapia de radiación (Chen y otros, 2002; Schreiber y otros, 2002; Koudinova y otros, 2003).

A causa de su baja solubilidad en soluciones acuosas, la utilización clínica de Pd-Bpheid requiere la utilización de agentes solubilizantes, tales como Cremophor que pueden provocar efectos secundarios para estas dosis. Sería muy deseable hacer que el Pd-Bpheid fuera soluble en agua conservando sus propiedades físico-químicas. De manera alternativa, sería deseable preparar derivados de Bchl que son citofototóxicos y, al mismo tiempo, más solubles en agua que la propia Pd-Bpheid. Esta solubilidad en agua se espera que aumente adicionalmente la retención del medicamento en la circulación y, por lo tanto, la selectividad antes mencionada. Además, al no tener necesidad de utilizar portadores, tales como detergentes o liposomas, puede impedir efectos secundarios.

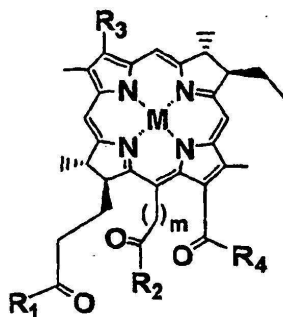
CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un derivado de bacterioclorofila que contiene dos grupos cargados negativamente y/o grupos ácidos que son convertidos en grupos cargados negativamente en el pH fisiológico, excluyendo derivados de bacterioclorofila pentacíclicos que tienen un grupo CH_2CH_2COOH o un grupo CH_2CH_2COO libre en la posición 17, y derivados de bacterioclorofila tetracíclica que carecen de átomo metálico central y que tienen un grupo $-CH_2CH_2COOH$ en la posición 17, un grupo $-CH_2COOH$ o $-COOH$ en posición 15, un grupo $-COOH$ en posición 13,

grupos metilo en posiciones 2, 7, 12, 18, y grupos etilo en posiciones 3 y 8.

Los grupos cargados negativamente de acuerdo con la invención incluyen carboxilato (COO^-) y sulfonato (SO_3^-), y los grupos ácidos de los que se originan dichos grupos cargados a pH fisiológico son los grupos de ácido carboxílico (COOH) y sulfónico (SO_3H) respectivamente.

El derivado de bacterioclorofila tiene la fórmula II:



(II)

en la que

M es Pd;

R_1 es $-\text{O}^-\text{R}_8^+$;

R_2 es metoxi;

R_3 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$;

R_4 es $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{SO}_3^--\text{R}_8^+$;

R_8^+ es un catión monovalente, tal como K^+ , Na^+ , Li^+ , NH_4^+ , más preferentemente K^+ ;

y m e 1, y n es 2.

La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, que comprenden un derivado de bacterioclorofila, tal como se ha definido anteriormente para terapia fotodinámica (PDT), particularmente para PDT direccionado a los vasos, por ejemplo PDT de tumores de degeneración macular relacionado con la edad (AMD), o para exterminar células o agentes infecciosos que comprenden bacterias y virus *in vivo* o *in vitro*, así como para objetivos diagnósticos.

La invención da a conocer un procedimiento para terapia fotodinámica que utiliza un fotosensibilizador, en el que la mejora consiste en que dicho fotosensibilizador es un derivado de bacterioclorofila, según la invención. De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento por PDT, que comprende la administración a un individuo que lo requiera, una cantidad efectiva de un derivado de bacterioclorofila de la invención seguido de irradiación local.

La invención da a conocer además un procedimiento para diagnóstico de tumores utilizando un fotosensibilizante, en el que la mejora consiste en que dicho fotosensibilizante es un derivado de bacterioclorofila, según la invención. De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de tumores que comprende la administración a un individuo que se sospeche que tiene un tumor, de una cantidad efectiva de un derivado de bacterioclorofila, según la invención seguido por irradiación local y con medición de la fluorescencia del área sospechosa, en el que una fluorescencia elevada indica lugares tumorales.

La invención da a conocer además, un procedimiento para exterminar células o agentes infecciosos, comprendiendo bacterias y virus, utilizando un fotosensibilizador consistiendo la mejora en que dicho fotosensibilizador es un derivado de bacterioclorofila, según la invención. De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para esterilización de productos biológicos, por ejemplo, sangre, que comprende la adición a dicho producto biológico, por ejemplo, sangre, de una cantidad efectiva de un derivado de bacterioclorofila, según la invención, seguido de irradiación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los diferentes compuestos de la invención se han representado en la siguiente descripción de los dibujos mediante un numeral en negritas y subrayado. Su identificación completa se encuentra en la Lista de Compuestos al inicio de la Sección Química de más adelante.

Las figuras 1A-1B son gráficos que muestran la fototoxicidad del compuesto sulfonado **4** sobre células endoteliales H5V de ratón (Figura 1A) y células de melanoma de ratón M2R (Figura 1B). Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de compuesto **4** durante 4 horas, lavadas e iluminadas (formas abiertas) o mantenidas en la oscuridad (control de oscuridad, con las formas cerradas). Los puntos son promedio de triplicados $\pm$ STD.

La figura 2 es un gráfico que muestra la farmacocinética del compuesto **4** en sangre de ratones CD1. Después de la inyección del compuesto **4** (6 mg/kg), se recogieron muestras de sangre del mismo ratón en los tiempos indicados y se determinó Pd. Cada punto de tiempo representa el promedio de tres ratones $\pm$ STD.

La figura 3 muestra la biodistribución del compuesto **4** en ratones CD1. Los ratones fueron sacrificados en diferentes momentos después de la inyección del compuesto **4** (6 mg/kg), y se determinó el contenido de Pd para los órganos indicados. Cada punto de tiempo representa el promedio de tres ratones $\pm$ STD.

La figura 4 muestra el PDT de xenoinjertos de melanoma con compuesto **4**. Ratones que llevaban xenoinjertos de melanoma M2R recibieron inyección intravenosa de compuesto **4** (6 mg kg⁻¹) y fueron sometidos a iluminación durante 5 minutos con una intensidad de luz de 30J/cm² (n=14, cuadrados llenos), 39J/cm² (n=8, diamantes llenos) o 45J/cm² (n=10, triángulos llenos). Los ratones que fueron inyectados con 9 mg kg⁻¹ de compuesto **4** fueron sometidos a iluminación durante 5 minutos con 30J/cm² (n=10, círculos llenos). Grupos de control: sin tratar (n=4, cuadrados vacíos), el control oscuro recibió 6 mg kg⁻¹ (n=4, círculos vacíos) o 9 mg kg⁻¹ (n=5, triángulos vacíos) de compuesto **4** y control de luz (n=6, diamantes vacíos, 45J/cm²).

Las figuras 5a-5h son fotografías que muestran el efecto selectivo de PDT en ratones que llevan xenoinjertos de glioma C6 de rata y que han sido tratados con el compuesto **4**, animales tratados con PDT (a-d); animal sin tratar (e-h). (a) antes de tratamiento; (b) 3 horas después de PDT e inyección de Evans-Blue (EB); (c) zona de piel del área tratada, 24 horas después de PDT; (d) corte axial del tumor tratado 24 horas después de PDT; (e) antes de inyección EB; (f) 3 horas después de inyección EB; (g) zona piel 24 horas después de inyección EB; (h) corte axial del tumor sin tratar, 24 horas después de inyección EB. T-tumor; S-piel; M-músculo; E-edema.

Figuras 6A-6D muestran secciones semidelgadas del centro de la lesión y TEM 2 horas después de PDT oclusivo en un modelo de ojo de conejo con compuesto **4**, (fluencia 50 J/cm², dosis de 5 mg/Kg, y DLI de 1 minuto). Se observa estasis y dilatación de vasos coroidales con células RPE relativamente bien conservadas y retina (6A y 6B). El TEM muestra hemólisis de células rojas de la sangre dentro del lumen cloriocapilar (puntas de flecha blancas de 6D) y monocitos alterados (punta de flecha blanca). La membrana de Bruch (Bm) está intacta alojando células epiteliales de pigmento retinal bien identificadas (RPE). Algunas de las células endoteliales cloriocapilares están muy alteradas demostrando cromatina condensada (estrella blanca en 6C). Abreviaturas: ONL: capa nuclear externa, ROS: segmentos externos de varillas, CC: Cloriocapilares, e: células endoteliales cloriocapilares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los ejemplos del derivado de bacterioclorofila de la invención con dos grupos cargados negativamente en posiciones 13 y 17 son los compuestos antes caracterizados de fórmula II e incluyen en el compuesto **4**, tal como se ha identificado en la lista de compuestos a continuación.

Los compuestos de la invención pueden ser preparados, por ejemplo, por los procedimientos mostrados en el Esquema 1 de esta descripción.

Por ejemplo, un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula II, en los que R₁ es -O⁻ R₈⁺; R₂ es -OCH₃; R₃ es acetilo; R₄ es un grupo -NH- (CH₂)_n-SO₃-R₈⁺; R₈⁺ es un catión monovalente, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺ o NH₄⁺; m es 1 y n es 2, comprende:

(i) hace reaccionar el correspondiente M-bacteriofeofórbido de fórmula I, en el que R₁ es OH con un ácido aminosulfónico de fórmula H₂N- (CH₂)_n-SO₃H en un tampón R₈⁺; y (ii) aislar el compuesto deseado de fórmula II.

Para la preparación del compuesto preferente **4**, el procedimiento comprende la reacción de Pd-bacteriofeofórbido a **3** con taurina de fórmula H₂N-(CH₂)₂-SO₃H en un tampón de K⁺, y aislar el compuesto deseado.

Los compuestos de la invención, que también se designan en algunos casos por el término "pigmentos", presentan polaridad suficientemente elevada para ser solubles en agua e inyectados en soluciones acuosas sin añadidura de tensioactivos. En una realización, para los compuestos 4, preferentes de Pd-Bchl sulfonados, se han mostrado también la biodistribución y farmacocinética y, basándose en ellas, se supone que este y otros derivados de la invención, permanecen en la circulación durante un tiempo muy corto. Por lo tanto, hay buenos sensibilizadores para direccionado vascular de PDT. El tratamiento de melanoma melanótico M2R y xenoinjertos de carcinoma de colon humano HT-29 en ratones que se muestran en esta descripción, demuestran el efecto selectivo del pigmento sobre la vasculatura del tumor. El protocolo sugerido con el Pd-Bchl 4 sulfonado ha considerado el reducido tiempo de eliminación del medicamento. En base a su efecto selectivo sobre la vasculatura del tumor estos compuestos pueden ser utilizados para tumor y también para degeneración macular relacionada con la edad y otras anomalías de tejidos que dependen de neovascularización.

De este modo, según otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica, que comprende el derivado II de bacterioclorofila de la invención, de modo más preferente el compuesto 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los derivados aniónicos de bacterioclorofila de la presente invención son formulados en composiciones farmacéuticas finales para administración al paciente o aplicados a una diana *in vitro* utilizando técnicas bien conocidas en el sector, por ejemplo, tal como se resume en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Penna, última edición.

Las composiciones pueden ser administradas de forma sistémica, en particular por inyección, o pueden ser utilizados de forma tópica.

Los compuestos de Bchl aniónicos, según la invención, tienen similar absorción óptica y características fotofísicas que los respectivos Bchls no aniónicos y, por lo tanto, una vez se encuentran dentro del tejido tratado, se espera que sean eficientes agentes fotodinámicos. De esta manera pueden ser útiles como fotosensibilizadores como agentes terapéuticos y de diagnóstico, por ejemplo para el tratamiento de varios tipos de cáncer tales como, sin que ello sea limitativo, melanoma, próstata, cerebro colon ovario, seno, piel, pulmón, esófago y vejiga y otros tumores sensibles a las hormonas, así como para tratamiento de degeneración vascular relativa a la edad, y para la exterminación de células, virus, hongos y bacterias en muestras y tejidos vivos, tal como es bien conocido en la técnica de PDT y otras aplicaciones fotosensibilizadoras.

Los nuevos derivados II de Bchl solubles en agua de la invención son útiles, por ejemplo, en la sensibilización de células neoplásicas u otros tejidos anormales a la reducción por irradiación *in vivo* o *ex vivo* utilizando luz de la longitud de onda apropiada. Se cree que la energía de la fotoactivación es transferida a oxígeno endógeno para convertirlo en oxígeno singlete y/u otras especies de oxígeno reactivo (ROS) tal como radicales superóxido e hidróxido, que se consideran responsables del efecto citotóxico. Además las formas fotoactivadas de los Bchls tienen fluorescencia, cuya fluorescencia puede contribuir a localizar tumores u otros lugares a los que se administran derivados de Bchl.

Entre los ejemplos de indicaciones, conocidas en el sector, que se pueden tratar con los derivados de bacterioclorofila de la presente invención, comprende la destrucción de tejidos tumorales en tumores sólidos y disolución de placas en vasos sanguíneos (ver por ejemplo, Patente US 4.512.762). Particularmente, estos derivados son adecuados para el PDT de direccionado vascular a causa de su retención mínima en la circulación y también porque son absorbidos solamente de forma mínima por tejidos no circulantes tales como piel y músculos. De este modo, estos compuestos activan la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) limitada a los vasos interiores después de excitación y, por lo tanto, provocan respuesta selectiva de vasos anormales tales como los presentes en tumores y en la degeneración macular relacionada con la edad. Además, los derivados de bacterioclorofila son útiles para destrucción selectiva en el tratamiento de condiciones tópicas tales como acné, pie de atleta, verrugas, papiloma y psoriasis para tratamiento de hipertrofia benigna de próstata y para esterilización de productos biológicos tales como sangre para transfusión por destrucción de agentes infecciosos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención serán administradas al paciente por procesos estándar utilizados en PDT. La cantidad de derivado Bchl aniónico de la invención a administrar a un individuo que lo necesite y la ruta de administración se establecerán de acuerdo con la experiencia acumulada con otras porfirinas utilizadas en PDT, y variará dependiendo de la selección del derivado utilizado como ingrediente activo, el estado, por ejemplo, el tipo de tumor a tratar, la etapa de la enfermedad, la edad y estado de salud del paciente y la evaluación del médico, pero será mucho más baja que la dosis actualmente utilizada de Photofrin II o aproximadamente 20-40 mg HPD/kg de peso corporal. Las rutas preferibles de administración son intravenosa o inyección directa en el tumor sólido de la solución acuosa del compuesto activo comprendiendo portadores convencionales farmacéuticamente aceptables y tratamiento tópico de tumores de la piel con composiciones tópicas adecuadas.

La longitud de onda de la luz de irradiación se escoge preferentemente para adaptarse a la absorbancia máxima del fotosensibilizador de bacterioclorofilo. La longitud de onda adecuada para cualquiera de los compuestos puede ser determinada fácilmente a partir de su espectro de absorción.

5 Además de la utilización *in vivo*, los derivados aniónicos de Bchl de la invención pueden ser utilizados en el tratamiento de materiales *in vitro* para exterminar virus dañinos o agentes infecciosos tales como bacterias peligrosas. Por ejemplo, la sangre y el plasma sanguíneo a utilizar para futuras transfusiones se puede trazar con un Bchl de la invención y se puede irradiar para llevar a cabo la esterilización.

10 La conjugación de proteínas, por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento o sus derivados, anticuerpos, péptidos que se unen específicamente a receptores de células diana y nutrientes de células por ejemplo tirosina a la fracción de Bchl está destinada a incrementar su retención en el tumor y sitios objeto de tratamiento. Al incrementar el desplazamiento al rojo permite una mayor profundidad de penetración, manteniendo simultáneamente la ubicuidad del sistema natural. La sustitución del Mg por otros metales está destinada a optimizar la estabilidad intrínseca y
15 metabólica de la fracción de Bchl y el cruce de su intersistema al estado triplete excitado y abre asimismo la posibilidad de nuevos procedimientos de diagnóstico.

Los anticuerpos específicos de tumor y péptidos que tienen alta afinidad a las células neoendoteliales direccionarán preferentemente las fracciones de Bchl al tumor o lugar objeto de tratamiento, mientras que las hormonas y
20 nutrientes de células pueden ser absorbidas también por las partes normales no transformadas. No obstante, las células seleccionadas como dianas para hormonas y nutrientes de las células tales como melanocitos y células neoendoteliales se reparten entre otras células en condiciones normales y cuando se transforman en células malignas se acumulan en forma de tumores sólidos. Como resultado, la concentración del fotosensibilizador en los compartimientos vasculares y/o celulares de las células malignas se espera que aumente notablemente con
25 respecto a su concentración en el tejido normal, en el que las células están más dispersadas, asegurando la amplificación del efecto PDT en el lugar del tumor. Esto posibilita la utilización efectiva de dosis de luz menores que el umbral perjudicial de los tejidos normales, reduciendo de este modo la necesidad de irradiación espacialmente bien definida. Además, al tener fluorescencia muy fuerte, el Bchl direccionado a un lugar puede ser utilizado para marcar por fluorescencia el lugar o lugares del tumor u otras dianas.

30 En una realización más preferente de la presente invención, la diana para el tratamiento con los sensibilizadores de la invención son vasos sanguíneos anormales, particularmente, vasos sanguíneos de tumores sólidos y de degeneración macular relacionada con la edad, debido a la diferencia intrínseca de sensibilidad de vasos sanguíneos normales y anormales a los protocolos de PDT sugeridos que se han descrito.

35 La invención se refiere además a un procedimiento de terapia fotodinámica que comprende la administración a un individuo que lo necesite, de una cantidad efectiva de un derivado de Bchl de la invención seguido de irradiación local.

40 En una realización, el procedimiento PDT de la invención es utilizado para el tratamiento de cáncer y comprende la administración a un paciente, afectado de un cáncer en forma de tumor sólido, una cantidad terapéuticamente efectiva de un derivado de Bchl de acuerdo con la invención, y a continuación irradiar el lugar del tumor con fuertes fuentes de luz a 670-780 nm.

45 Los derivados de Bchl de la invención son también útiles para la fotodestrucción de células animales normales o malignas así como microorganismos en cultivo, posibilitando la fotodestrucción selectiva de ciertos tipos de células en cultivo o agentes de infección; para direccionado de la fracción de porfirina a células seleccionadas por acoplamiento a polipéptidos específicos, tales como hormonas u otros ligandos receptores, a anticuerpos
50 específicos de células o de tejidos o a otros ligandos, por ejemplo, lectinas; para marcado fluorescente, etiquetado de moléculas para finalidades analíticas en laboratorio, diagnóstico y aplicaciones industriales y para marcado fluorescente de células de animales o microorganismos o partículas para aplicaciones de laboratorio, de diagnóstico o industriales. Pueden sustituir varias de las etiquetas fluorescentes habitualmente utilizadas tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina, debido a sus superiores coeficientes de extinción y mayor rendimiento de fluorescencia.

55 Para objetivos de diagnóstico, los derivados II de Bchl de la invención pueden ser utilizados solos o se pueden etiquetar con un radioisótopo u otros medios de detección, tal como se conoce en este sector. Por ejemplo, el derivado de Bchl puede ser radioactivado-etiquetado por procedimientos estándar, por ejemplo, con ⁶⁷Ga, ¹¹¹In, ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc, y el agente diagnóstico radioactivo es administrado al paciente preferentemente por inyección intravenosa.
60 Después de algunas horas el lugar del cáncer puede ser representado en la imagen por procesos estándar.

La invención da a conocer además la utilización de los derivados de Bchl de la invención para la exterminación *ex vivo* o *in vitro* de células de agentes infecciosos tales como bacterias, virus, parásitos y hongos en un producto biológico, por ejemplo, sangre, comprendiendo el tratamiento de la muestra infectada con el compuesto de la
65 invención seguido de proyección de luz sobre la muestra.

La invención se explicará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

- 5 Para mayor comodidad y mejor comprensión, la sección de los ejemplos es dividida en dos subsecciones: (I) la Sección Química, que describe la síntesis del derivado **4** soluble en agua y (II) la Sección Biológica, que describe la actividad biológica de los nuevos derivados antes definidos de Bchl II.

I SECCIÓN QUÍMICA

- 10 En los ejemplos, los derivados II de la invención (**preferentemente compuesto 4**) y los intermediarios (**1-3**) se presentarán por sus cifras árabes respectivas en negritas y subrayadas de acuerdo con la siguiente Lista de Compuestos. Las correspondientes fórmulas aparecen en el esquema al final de la descripción, antes de las reivindicaciones.

Lista de compuestos

- 15 **1.** Bacterioclorofila a (Bchl a)
2. Bacteriofeofóbido a (Bpheid a)
 20 **3.** Pd-Bacteriofeofóbido a (Pd-Bpheid a)
 4. Sal dipotásica de Palladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfo-etil)amida [Ejemplo 1]

Materiales y procedimientos

- 25 (i) Se extrajo Bchl a (**1**) y se purificó a partir de células liofilizadas de *Rhodovolum Sulfrdophilum* tal como se ha descrito anteriormente (WO 00/33833).
 (ii) Se preparó tal como se ha descrito anteriormente (WO 00/33833) o se obtuvo a partir de Steba Biotech Ltd. through Negma-Lerads, Francia, Paladio bacteriofeofóbido (Pd-Bpheid, **2**).
 30 (iii) Se adquirieron de Aldrich (USA) ácido 3-amino-1-propano sulfónico (homotaurina) y ácido 3-amino-1-propano fosfónico y se adquirió ácido 2-aminoetano sulfónico (taurina) y ácido 3-aminopropiónico (β -alanina) de Sigma (USA), se adquirió N-hidroxi-sulfosuccinimida (sulfo-NHS) de Pierce (USA), se adquirió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) de Fluka (Suiza).
 (iv) Se utilizaron productos químicos y disolventes de calidad analítica de modo general excepto cuando se llevó a cabo HPLC, en la que se aplicaron disolventes de calidad HPLC.
 35 (v) TLC: placas de sílice (Kieselgel-60, Merck, Alemania); cloroformo-metanol (4:1, v/v).
 (vi) Se registraron espectros ¹H de resonancia magnética nuclear (NMR) con instrumento Avance DPX 250 (Bruker, Francia) y se informó en ppm (δ) a partir de tetrametilsilano con picos de disolvente residual como normas internas.
 (vii) Los coeficientes de extinción de los derivados de Pd, se determinaron correlacionando la concentración de Pd (utilizando fotometría de llama con PdCl₂ como estándar) con la densidad óptica de la solución examinada a la longitud de onda específica.
 40 (viii) Se registraron espectros de ionización por electropulverización (ESI-MS) sobre un espectrómetro de plataforma LCZ (Micromass, Inglaterra).
 (ix) Se llevó a cabo espectrometría de masas de plasma inductivamente acoplado (ICP-MS) para determinación de concentraciones de Pd utilizando un instrumento ELAN-6000 de (Perkin Elmer, CT).
 45 (x) Se registró la absorción óptica de los diferentes complejos con espectrofotómetros Genesis-2 (Milton Roy, Inglaterra) y V-570 (JASCO, Japón).
 (xi) Se llevó a cabo HPLC utilizando un instrumento LC-900 (JASCO, Japón) dotado de un detector con conjunto de diodos UV-915.

EJEMPLOS QUÍMICOS

Ejemplo 1. Sal dipotásica de paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil)amida (Compuesto **4)**

- 55 Novecientos treinta y cinco (935) mg de Pd-Bpheid (**3**) se disolvieron en un matraz de fondo redondo de 1L con 120 ml de DMSO con agitación en atmósfera de argón (burbujeo en la solución). Se disolvió taurina (1288 mg) en 40 ml de tampón 1M K₂HPO₄, y se ajustó el pH de la solución a 8,2 (con HCl). Esta solución acuosa fue añadida a la solución de DMSO con agitación, y el argón se hizo burbujear en la solución durante otros 20 minutos. A
 60 continuación, la mezcla de reacción fue evaporada a 30°C durante 3,5 horas a una presión de -2 mbar y a continuación durante otras 2 horas a 37°C hasta sequedad completa. Los sólidos secos fueron disueltos en 300 ml de MeOH y la solución coloreada fue filtrada a través de lana de algodón para eliminar las sales del tampón y el exceso de taurina.

- 65 El avance de la reacción fue determinado por TLC (el R_f del Pd-Bpheid es de 0,8-0,85 y el del producto de la reacción (aminólisis) es de 0,08-0,1) y al hacer el seguimiento del espectro de absorción óptica de la mezcla de

reacción después de liofilización y resolubilización en MeOH. El espectro de absorción fue caracterizado por un desplazamiento de transición Q_y de 756 nm (para Pd-Bpheid) a 747 nm (para el producto **4**) y por un desplazamiento de Q_x de 534 nm de Pd-Bpheid a 519 nm (del producto **4**). El MeOH fue evaporado y el producto **4** fue purificado por HPLC con columna ODS-A 250x20 S10P μ m (YMC, Japón). Disolvente A: 95% de tampón fosfato 0,005 M pH 8,0 y 5% MeOH. Disolvente B: 100% MeOH. El sólido seco fue disuelto en 42 ml de agua destilada e inyectado en porciones de 1,5 ml cada una de ellas.

El perfil de elución se describe en la Tabla 1. El producto **4** (Esquema 1, ver más adelante) se eluyó y recogió en ~9-11 minutos. Las impurezas principales, recogidas después de 4-7 minutos (aproximadamente 5-10%), correspondían a subproductos con la estructura propuesta **7**. Los picos en 22-25 minutos (aproximadamente 2-5%) correspondían posiblemente a la isoforma del producto principal **4** y a residuos no tratados de Pd-Bpheid.

Tabla 1. Perfil de gradiente de purificación de compuesto 4

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	A%	B%
0	12	55	45
14	12	30	70
14,1	6	30	70
16	6	0	100
18	6	0	100
24	6	55	45
29	6	55	45
30	0,5	55	45

El disolvente (metanol acuoso) fue evaporado a presión reducida. A continuación, el producto purificado **4** fue redisoluto en ~150 ml MeOH y filtrado a través de lana de algodón. El disolvente fue evaporado nuevamente y el pigmento sólido **4** fue almacenado en atmósfera de Ar en la oscuridad a 20°C. El rendimiento de la reacción ~90% (en peso, con respecto a **3**).

La estructura del producto **4** fue confirmada por espectroscopia de masas con electropulverización. (ESI-MS, modalidad negativa, figura 2), (picos a 875 (M⁺-K-H), 859 (M⁺-2K-H+Na), 837 (M⁺-2K), 805 (M⁺-2K-H-OMe), 719) y espectro ¹H-NMR (figura 4 en MeOH-d₄). La tabla 4 proporciona los desplazamientos (en unidades ppm) de los picos NMR principales.

Espectro de absorción óptica (UV-VIS) (MeOH): λ , 747 (1,00), 516 (0,13), 384 (0,41), 330 (0,50); ϵ_{747} (MeOH) es $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

NMR (MeOH-d₄): 9,38 (5-H, s), 8,78 (10-H, s), 8,59 (20-H, s), 5,31 y 4,95 (15¹-CH₂, dd), 4,2-4,4 (7,8,17,18-H, m), 3,88 (15³-Me, s), 3,52 (2¹-Me, s), 3,19 (12¹-Me, s), 3,09 (3²-Me, s), 1,92-2,41, 1,60-1,75 (17¹, 17²-CH₂, m), 2,19 (8¹-CH₂, m), 1,93 (7¹-Me, d), 1,61 (18¹-Me, d), 1,09 (8²-Me, t), 3,62, 3,05 (CH₂ de taurina).

Proporción de división octanol/agua 40:60.

II SECCIÓN BIOLÓGICA

Materiales y procedimientos

Estudios *in vitro*

(i) Cultivo celular. Melanoma de ratón M2R, células endoteliales de ratón H5V y células de glioma de rata C6 se cultivaron como monocapas en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM)/F12 conteniendo 25 mM HEPES, pH 7,4, 10% de suero bovino fetal (FBS), glutamina (2mM), penicilina (0,06 mg/ml), y estreptomycin (0,1 mg/ml) (al que se hará referencia como "Medio de cultivo"). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 8% CO₂.

(ii) Ensayo de fototoxicidad. Para determinar la eficacia fotodinámica, se preincubaron células con concentraciones crecientes de los pigmentos en la oscuridad durante los tiempos y condiciones que se han indicado para los experimentos individuales. Se eliminó el sensibilizante no unido por lavado de las células una vez con medio de cultivo, y las placas fueron sometidas a iluminación a temperatura ambiente desde el fondo ($\lambda > 650 \text{ nm}$, 12 J/cm²). La fuente de luz era una lámpara de halógeno de 100W (Osram, Alemania) dotada de un filtro de 4 cm de agua. Los cultivos fueron situados en el incubador de cultivo y se determinó la supervivencia de las células 24h después de la iluminación, mediante ensayo de viabilidad con Rojo Neutro. Se utilizaron tres tipos de controles: (i) control de luz: células iluminadas en ausencia de pigmentos; (ii) control en oscuridad: células tratadas con pigmentos pero mantenidas en oscuridad; y (iii) células sin tratar mantenidas en la oscuridad.

Estudios *in vivo*

(iii) Implantación de tumor. Se implantaron células M2R o C6 (2×10^6) subcutáneamente en la espalda de los ratones; se desarrollaron tumores hasta el tamaño de tratamiento (6-8 mm) dentro de 2-3 semanas.

(iv) Preparación de sensibilizante. Se prepararon soluciones de los compuestos de la invención antes de utilización, disolviendo el pigmento seco directamente en PBS hasta la concentración deseada para inyección.

(v) Biodistribución y Farmacocinética. El pigmento 4 de la invención (6 mg/kg por cuerpo) fue inyectado en ratones atímicos ("nude mice") por medio de la vena de la cola. Se sacrificaron los ratones en los tiempos indicados, y se colocaron y pesaron en viales pesados previamente, órganos o tejidos que inmediatamente se congelaron sobre hielo seco. Para examen, cada muestra fue descongelada y homogeneizada (1:10 peso/volumen) en agua doblemente destilada. Se liofilizaron partes alícuotas del homogeneizado (0,5 ml) en tubos de ensayo Eppendorff. A continuación, se añadió a cada muestra 0,2 ml de HNO_3 (70%, TraceSelect, Fluka) se incubó durante una hora a 90°C y se diluyó en agua doblemente destilada hasta 10 ml. Se determinaron las concentraciones de Paladio por ICP-MS. Los valores de fondo fueron determinados para cada órgano/tejido sobre muestras idénticas tomadas de ratones sin tratar, y los valores fueron restados correspondientemente.

(vi) Protocolo PDT. Los ratones con tumor M2R fueron anestesiados y el pigmento fue inyectado por vía intravenosa (i.v.) por la vena de la cola. Los tumores fueron iluminados inmediatamente de forma transcutánea durante 5 minutos mediante un láser de diodo de 755 nm (CeramOptec, Alemania) con una dosis de luz de $30\text{J}/\text{cm}^2$ ($100\text{mW}/\text{cm}^2$), $39\text{J}/\text{cm}^2$ ($130\text{mW}/\text{cm}^2$) o $45\text{J}/\text{cm}^2$ ($150\text{mW}/\text{cm}^2$). Después del tratamiento los ratones fueron devueltos a la jaula. En el grupo de control en oscuridad, los ratones fueron inyectados i.v. con sensibilizador y colocados en una jaula en la oscuridad durante 24 h. En el grupo de control de luz, los ratones fueron iluminados con $45\text{J}/\text{cm}^2$.

(vii) Cierre vascular y permeabilidad. Se trataron ratones con xenoinjertos de tumor de glioma C6 con pigmento 4 (9 mg/kg) y luz ($100\text{mW}/\text{cm}^2$ durante 5 minutos). Inmediatamente después de tratamiento, se inyectó Evans Blue (EB; 1% en PBS) (0,5 ml, i.p.). Los ratones fueron fotografiados a las 3 y 24 horas después del tratamiento. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento y se preparó un segmento de piel para cada ratón y se fotografió. A continuación, el tumor fue retirado con la piel encima del mismo, fue congelado durante 1 hora a -20°C , y a continuación se hizo un corte axial y el corte fue fotografiado. Los ratones de control fueron inyectados con Evans Blue al mismo tiempo que los ratones tratados, y el protocolo se continuó, tal como se ha descrito anteriormente para todos los ratones conjuntamente.

Ejemplo 2. Citofototoxicidad de los derivados de bacterioclorofila sulfonados contra cultivos de células de tumor

Se determinó la fototoxicidad del compuesto 4, tal como se ha descrito en (ii) en lo anterior en melanoma de ratón M2R y células endoteliales de ratón H5V. Las células fueron preincubadas con concentraciones crecientes del compuesto durante 4 horas, lavadas e iluminadas o mantenidas en la oscuridad.

Los resultados se muestran en las figuras 2A-2B para el compuesto monosulfonado 4 en células H5V y MR2, respectivamente. Tal como se puede apreciar, la fototoxicidad del pigmento 4 depende de la concentración y de la luz sin toxicidad oscura en el rango comprobado. El LD_{50} de los pigmentos es $\sim 2\text{ }\mu\text{M}$, y es similar en ambas líneas de células.

Ejemplo 3. Farmacocinética y biodistribución del compuesto 4

La primera etapa antes de ensayar la fototoxicidad de 4 con respecto a PDT de xenoinjertos de melanoma sólido fue determinar la farmacocinética y biodistribución del pigmento *in vivo*, tal como se ha descrito en la anterior sección (vi). Tal como se puede apreciar en la figura 2, aproximadamente 90% del pigmento 4 desapareció dentro de los primeros 10 minutos después de inyección i.v. con un modelo cinético monofásico con un $t_{0,5}$ de 1,65 minutos (Tabla 2). La desaparición rápida de 4 de la sangre puede implicar que solamente una pequeña fracción (si existe en absoluto) está unida a los componentes del plasma, de otro modo la desaparición podría haber sido más lenta.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de 4 en la sangre de ratones.

Parámetro	
Ecuación	$y=1,64+90,6e(-0,42t)$
$T_{0,5}$ (min)	1,65
K_{e1} (min^{-1})	0,42
Vd (ml)	2,12
CL (ml/min)	0,89
K_{ei} – tasa de eliminación; Vd – volumen de distribución; CL - desaparición	

La biodistribución del compuesto 4 muestra que, en la mayor parte de los órganos de ratón examinados, los niveles de pigmento son altos inmediatamente después de la inyección y disminuyen casi a niveles de fondo dentro de 20-30 min, de manera similar a su tasa de desaparición de la sangre (figura 3). Estos resultados probablemente representan el nivel de pigmento en la sangre atrapado en los vasos del órgano, tal como se aprecia en el bazo, pulmón y corazón. Además, los resultados sugieren también que la difusión del pigmento en los órganos es despreciable. El pigmento 4 desaparece con rapidez del cuerpo del ratón y dentro de 30 minutos después de inyección se encuentra en niveles de fondo en todos los tejidos. La tasa de desaparición de 4 del cuerpo de ratón es mucho más rápida que la de Pd-Bpheid (3), que no alcanza niveles de fondo hasta 48 horas después de inyección (no mostrado).

Ejemplo 4. Tratamiento fotodinámico de xenoinjertos de melanoma M2R en ratones atímicos CD1 con pigmento 4 sulfonado

Basándose en los resultados farmacocinéticas del anterior Ejemplo 15, se dispuso el protocolo de tratamiento para el compuesto 4 a 5 min de iluminación inmediatamente después de la inyección del pigmento. En estos experimentos (ver sección (vii) anterior), se utilizó un láser médico especializado adaptado a la absorción pico de 4 (CeramOptec, Alemania, 755 nm). Para determinar el protocolo óptimo medicamento/luz, los ratos fueron tratados con una dosis de medicamento de 6 mg/kg e incrementando la intensidad de la luz (figura 4). Tal como se puede apreciar en la curva de supervivencia Kaplan-Meier, incrementando la intensidad de la luz se mejora la tasa de curación de los ratones de 43% a 60% con 30 y 45 J/cm², respectivamente. Cuando la dosis de medicamento se aumentó a 9 mg/kg con intensidad de luz de 30 J/cm², hubo un incremento significativo en la supervivencia de los ratones hasta 70% (figura 4). No se apareció toxicidad oscura en animales tratados con 6 ó 9 mg/kg y mantenidos en oscuridad.

Ejemplo 5. Efecto selectivo del tratamiento fotodinámico con el compuesto 4

El experimento fue llevado a cabo, tal como se ha descrito en la anterior sección (vii). La figura 5 muestra el efecto de tratamiento fotodinámico en perfusión de sangre en xenoinjertos C6 implantados en ratones (a, e). El animal tratado, que fue administrado con Evans Blue inmediatamente después de PDT mostro edema y fugas vasculares incrementadas de EB al interstitium demostrado por el color azul (debido a fugas de albúmina-Evans Blue) en el área iluminada en comparación con el área no iluminada en el mismo animal y a un animal sin tratar (b, f). Veinticuatro horas más tarde, se puede apreciar que en los ratones tratados, los alrededores del tumor están fuertemente coloreados de azul (edema; c), mientras que el tumor permanece blanco (sin color EB) debido al cierre vascular que ha tenido lugar inmediatamente después de PDT (d). Los tejidos musculares debajo del tumor, así como la piel por encima y alrededor del mismo (pero dentro del área tratada), tienen color azul indicando que no tubo lugar cierre vascular (c, d). En el animal sin tratar, el tumor está coloreado de color azul igual que otros tejidos (g, h). El cierre selectivo de nuevos vasos en el tumor indica que los compuestos de la invención pueden ser utilizados para tratamiento selectivo de vasculatura anormal igual que en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Ejemplo 6. Tratamiento PDT con compuesto 4 – modelo de animal de AMD

Se ha desarrollado terapia fotodinámica (PDT) dirigida a inducir oclusión vascular localizada en membranas vasculares de nueva formación emanando del corioide (neovascularización coroidal – CNV). En la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), PDT utilizando verteporfin reduce el riesgo de pérdida de vista como secundaria de CNV. El mecanismo de acción de PDT se cree que comporta la liberación de especies de oxígeno reactivo que dañan las células del endotelio y activan la cascada de coagulación del endotelio. Esos eventos conducen a la formación de trombos dentro del lumen del vaso.

Para el tratamiento de neovascularización coroidal, se han desarrollado parámetros altamente selectivos (densidad o fluencia de potencia láser dosis de fotosensibilizador y distancia a la iluminación de la luz (DLI)) posibilitando un enfoque preciso y direccionado a vasos patológicos y mínimos efectos secundarios perjudiciales a retina y tejidos coroides sanos. No obstante, utilizando el único fotosensibilizador actualmente disponible para uso clínico (verteporfin) se requieren en general, tratamientos repetidos para conseguir los efectos oclusivos CNV deseados. Por lo tanto, el peligro de daños colaterales en tejidos queda incrementado y puede ser un efecto secundario significativo del tratamiento.

En este experimento, los inventores han evaluado el potencial de tratamiento fotodinámico (PDT) del fotosensibilizador hidrosoluble que se designa WST11 o compuesto 4, y han comparado sus características a las del verteporfin.

El compuesto 4 es un derivado de bacterioclorofila puro y estable aislado como material en forma de polvo cristalino negro púrpura. Tiene un peso molecular de 916 y es soluble en una solución acuosa. Se caracteriza por las siguientes propiedades: (a) 4 picos principales de absorción (750, 530, 385 y 330 nm). La absorbancia más intensa de la luz se encuentra próxima de los infrarrojos (≈750nm) en la que la transmitancia de los tejidos es la más alta; (b) citotoxicidad muy baja en la oscuridad. Por lo tanto, se pueden controlar los daños en los tejidos por la dosis de luz y

el periodo de exposición; (c) se elimina rápidamente del cuerpo después de la administración. Por lo tanto, los daños potenciales por fotosensibilización de la piel en la exposición a luz ambiente o a la luz del sol son mínimos; (d) la generación de especies de oxígeno reactivos (ROS) es elevada a causa de un eficiente cruzamiento intersistema (ISC).

El material en polvo WST11 fue diluido en agua estéril libre de endotoxinas a una concentración de 10mg/mL y sometido a agitación hasta disolución completa. Esta formulación permanece estable durante 24 horas a 4°C protegida contra la luz. Para calcular el volumen a inyectar se hizo un ajuste de acuerdo con el peso del conejo. La solución de volumen apropiada fue inyectada de forma intravenosa como bolo a través de la vena marginal de la oreja.

El potencial del compuesto 4 para PDT de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) se comparó con verteporfina (Visudyne®, Novartis, Suiza) utilizando un modelo de ojo de conejo. Se utilizaron conejos pigmentados (136 conejos "Fauve de Bourgogne", de 10-12 semanas de edad, 2,5-3 kg; Elevage des Pins, Epeigne-sur-Dême, Francia). Se investigaron los efectos agudos y a largo plazo de PDT en el ojo del conejo para los siguientes parámetros: 1) fluencia láser 753nm (25 y 50J/cm²), dosis de compuesto 4 (designado también WST11) (2,5 y 5 mg/kg) y distancia a la luz de iluminación (DLI) de 1,5, 10 y 15 minutos. 2) fluencia láser 689 nm (10, 50, 100 J/cm²), dosis de verteporfina (3, 6 y 12mg/m²) y DLI constante de 5 min. Estos parámetros de PDT se correspondían con un conjunto de efectos en el corioide y en la retina superpuesta siendo suministrados durante 83 segundos para inducir eventos vasculares oclusivos, oclusivos subumbral y no oclusivos. Los ojos de ratón tratados fueron examinados y seguidos por oftalmoscopia indirecta, angiografía de fluoresceína (FA) e histología a varios intervalos después de PDT. El PDT de WST11 utilizando una fluencia de 50J/cm², 5 mg/kg de dosis de medicamento y DLI de 1 minuto indujo una oclusión coroidal total asociada con lesiones estructurales del RPE superpuesto y la retina en 100% de los ojos tratados (figuras 6A-6D). Parámetros más débiles, no oclusivos de PDT (25J/cm², dosis de medicamento de 5 mg/kg y DLI de 10 minutos) no indujeron oclusión de los coriocapilares ni lesiones de la retina. PDT de verteporfina utilizando 12mg/m² de dosis de medicamento a una fluencia de 100J/cm² y DLI de 5 minutos indujo eventos oclusivos (observados por FA) en 89% de los ojos, así como daños de histología de la retina superpuesta y capa RPE en todos los ojos. Los parámetros más débiles no oclusivos de PDT de verteporfina utilizando dosis de medicamento de 3mg/m², fluencia de 10 J/cm² y DLI de 5 minutos no indujeron oclusiones coriocapilares en FA. No obstante, en estos ojos se observaron en histología daños estructurales definidos de la retina y de los tejidos de la corioide. De manera similar a verteporfina, PDT de WST11 induce oclusión transitoria de los coriocapilares observada hasta una semana después de tratamiento. A diferencia de verteporfina, los parámetros de PDT de WST11 que no producían oclusión de vasos, no provocaron RPE o daños estructurales en la retina. Por lo tanto, a pesar de su capacidad de inducir obstrucción de vasos, el PDT de WST11 no provoca daños al RPE ni retina superpuesta cuando no tiene lugar oclusión de los coriocapilares. Las ventajas de estas características indican que el WST11 es un candidato adecuado para tratamiento PDT de CNV de degeneración macular relacionada con la edad.

Para la histología, los ojos enucleados fueron diseccionados bajo microscopio binocular. Se utilizó un punzón de biopsia de 4 mm para la excisión del grosor completo de las zonas tratadas. Estos tejidos fueron fijados en glutaraldehído, procesados en tampón de cacodilato y embebidos en plástico. Se obtuvieron secciones semidelgadas utilizando un microtomo y contratintado con hematoxilina-eosina. Estas secciones fueron analizadas utilizando microscopía de control de fase. Se procesaron adicionalmente sitios específicos de interés para TEM. Se obtuvieron secciones ultradelgadas utilizando un microtomo y contratintado con acetato de uranilo.

REFERENCIAS

Chen Q, Huang Z, Luck D, Beckers J, Brun PH, Wilson BC, Scherz A, Salomon Y, Hetzel FW. (2002) Estudios preclínicos en próstata canina normal de un nuevo fotosensibilizador (WST09) de paladio bacteriofotofórbido para terapia fotodinámica de cánceres de próstata. Photochem Photobiol. 76(4):438-45.

Koudinova NV, Pinthus JH, Brandis A, Brenner O, Bendel P, Ramon J, Eshhar Z, Scherz A, Salomon Y. (2003) Terapia fotodinámica con Pd-bacteriofotofórbido (TOOKAD): tratamiento satisfactorio in vivo de xenoinjertos de carcinoma de células pequeñas prostáticas humanas. Int J Cancer 104(6):782-9.

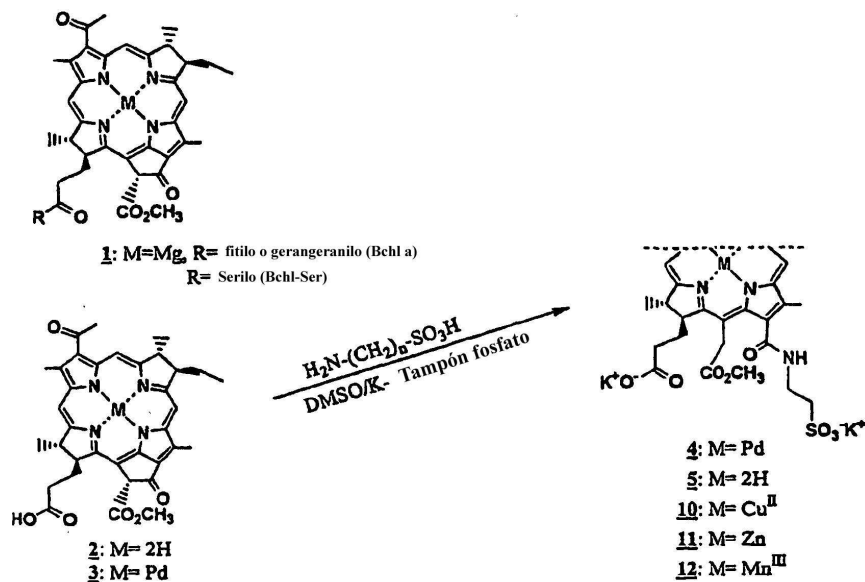
Rosenbach-Belkin, V., Chen, L., Fiedor, L., Tregub, I., Pavlotsky, F., Brumfeld, V., Salomon, Y., Scherz, A. (1996) Conjugados de serina de clorofila y bacterioclorofila: fotocitotoxicidad in Vitro y distribución de tejidos en ratones portadores de tumores de melanoma. Photocem. Photobiol. 64:174-181.

Schreiber S, Gross S, Brandis A, Harmelin A, Rosenbach-Belkin V, Scherz A, Salomon Y. (2002) Terapia fotodinámica local (PDT) de xenoinjertos de glioma C6 de rata con Pd-bacteriofotofórbido conduce a reducción de metástasis y aumenta curaciones de animales en comparación con cirugía. Int J Cancer. 99(2):279-85.

Zilberstein, J., Schreiber, S., Bloemers, MCWM, Bendel, P., Neeman, M., Schechtman, E., Kohen, F., Scherz, A. Salomon, Y. (2001) Tratamiento antivascolar de tumores de melanoma sólidos con terapia fotodinámica basada en bacterioclorofila-serina. Photochem. Photobiol. 73:257-266.

Zilberstein, J., Bromberg, A., Franz, A., RosenbachBelkin, V., Kritzmann, A., Pfefermann, R., Salomon, Y., Scherz, A. (1997) Consumo de oxígeno dependiente de la luz en tumores de melanoma tratados con bacterioclorofila-serina: Determinación en línea utilizando microsensores de oxígeno insertados en los tejidos. Photochem. Photobiol. 65: 1012-1019.

5



REIVINDICACIONES

1. Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil) amida en forma de su sal farmacéuticamente aceptable con un catión monovalente, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺ o NH₄⁺.
2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que dicho catión es K⁺.
3. Compuesto, según la reivindicación 1, que es sal dipotásica de Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil) amida.
4. Composición farmacéutica, que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para utilización en terapia fotodinámica de direccionado vascular (VTP).
6. Compuesto o composición farmacéutica según la reivindicación 5, para utilización en terapia fotodinámica de direccionado vascular de tumores, incluyendo tumores metastáticos.
7. Compuesto o composición farmacéutica según la reivindicación 6, a utilizar en terapia fotodinámica de direccionado vascular de melanoma o cánceres de colon, seno, pulmón, cerebro, ovario, piel, esófago, vejiga o próstata.
8. Compuesto o composición farmacéutica según la reivindicación 7, en el que la terapia fotodinámica de direccionado vascular comprende irradiación local del tumor con luz, de manera que la longitud de onda de irradiación se aproxima a un máximo de absorción del compuesto.
9. Compuesto o composición farmacéutica, según la reivindicación 8, en el que la longitud de onda es aproximadamente de 670-780 nm.
10. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para terapia fotodinámica de direccionado vascular de degeneración macular relacionada con la edad.
11. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para utilización en terapia fotodinámica de direccionado vascular de hipertrofia benigna de próstata.
12. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para utilización en diagnóstico de tumores.
13. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, para utilización en la exterminación de células o agentes infecciosos comprendiendo bacterias y virus.
14. Compuesto para utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, o composición farmacéutica para utilización de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el compuesto es sal dipotásica de Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil) amida.
15. Procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-rodobacterioclorina 13¹-(2-sulfoetil) amida, que comprende: (i) hacer reaccionar Pd-bacteriofeofóbido a con taurina de fórmula H₂N-(CH₂)₂-SO₃H en un tampón, que contiene un catión farmacéuticamente aceptable, tal como se ha definido en las reivindicaciones 1 ó 2; y (ii) aislar el compuesto.
16. Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que el catión farmacéuticamente aceptable es K⁺.

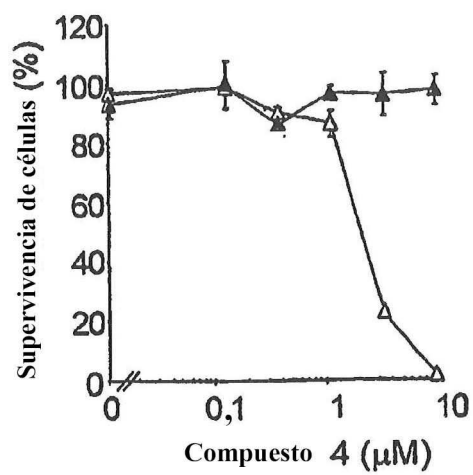


Fig. 1A

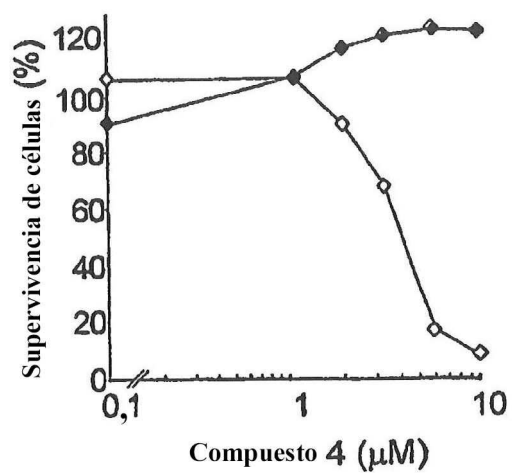


Fig. 1B

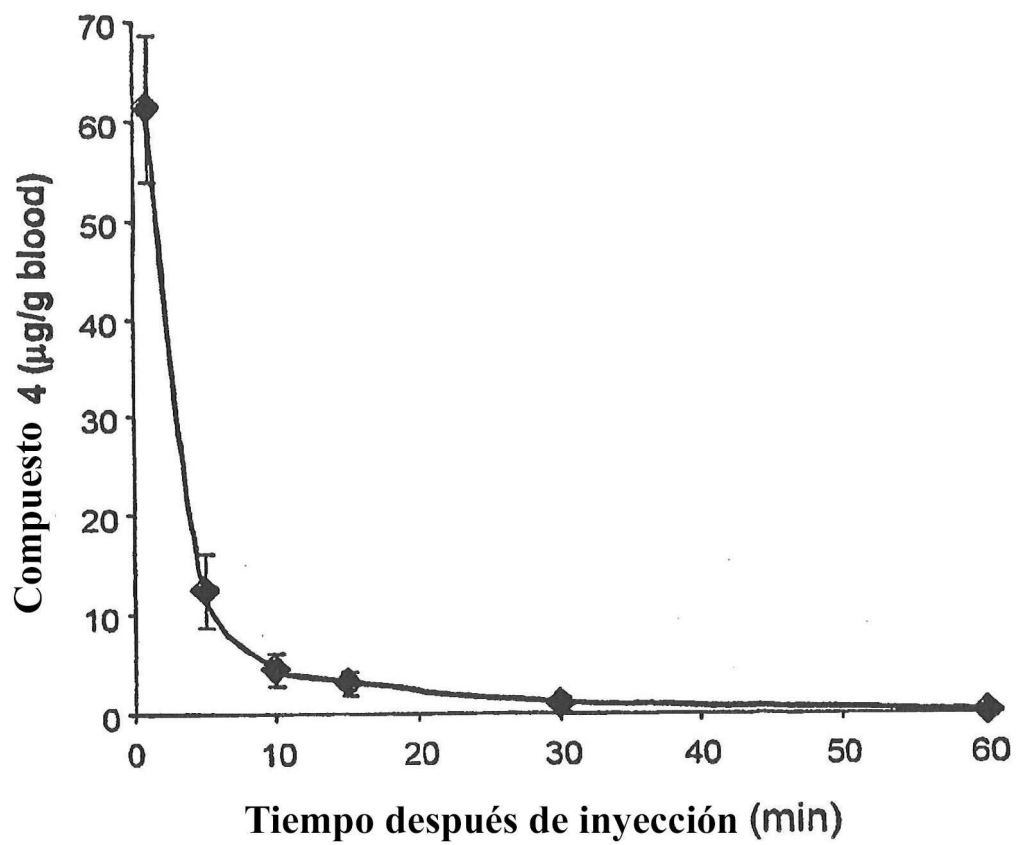


Fig. 2

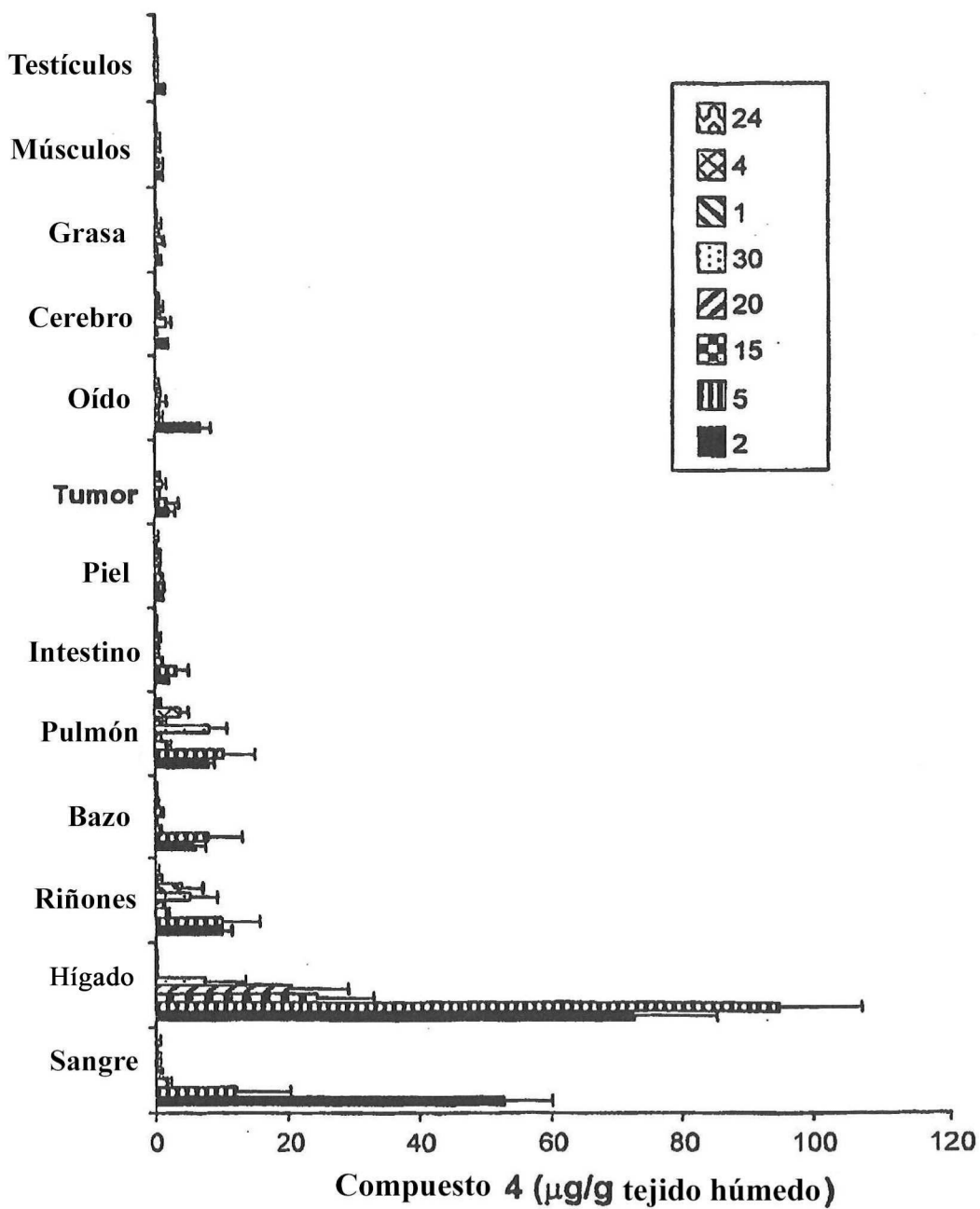


Fig. 3

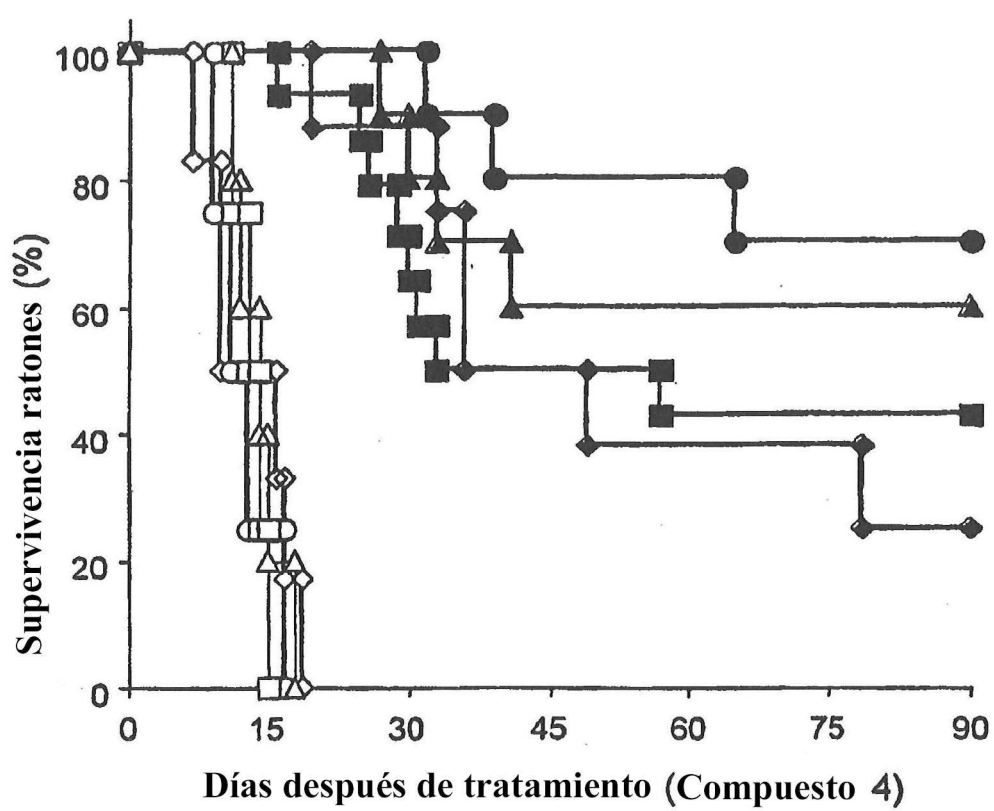


Fig. 4

Fig. 5A

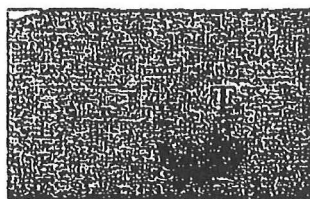


Fig. 5E

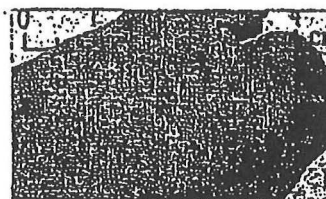


Fig. 5B

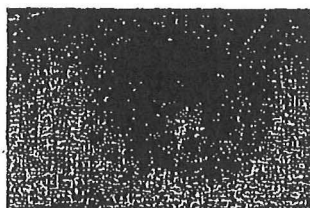


Fig. 5F

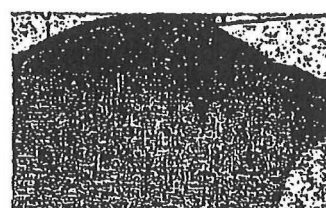


Fig. 5C

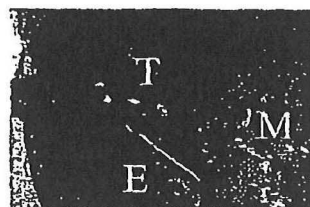


Fig. 5G



Fig. 5D

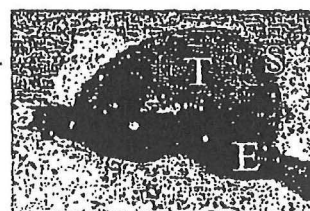
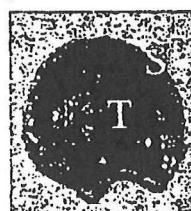


Fig. 5H



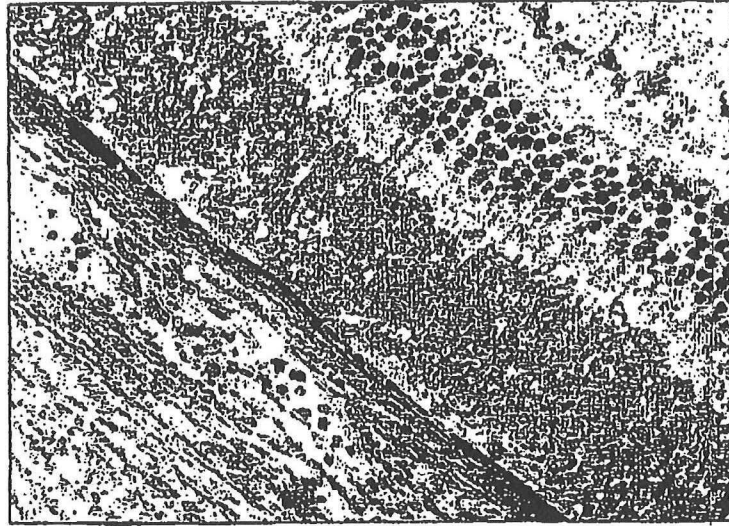


Fig. 6A

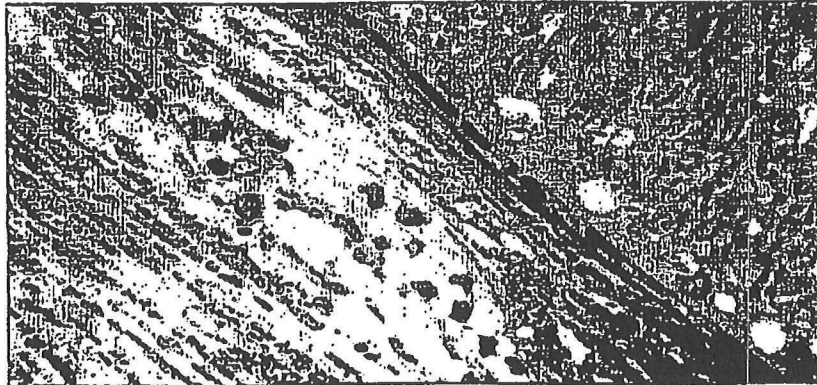


Fig. 6B

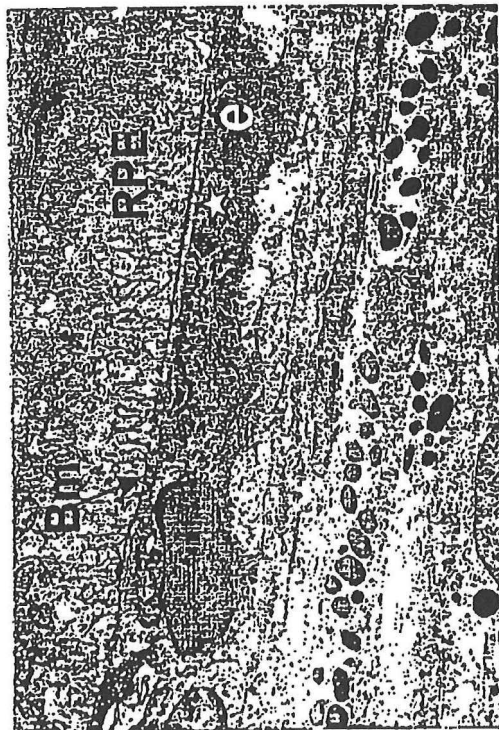


Fig. 6C

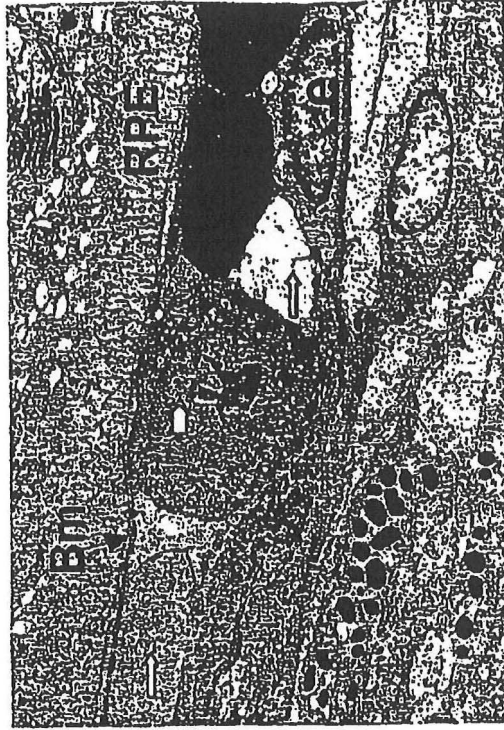


Fig. 6D