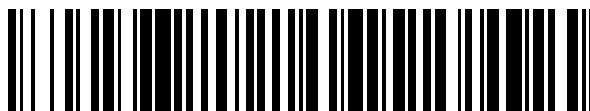


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 460**

51 Int. Cl.:

A61K 31/409 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2005** **E 10012927 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2322173**

54 Título: **Derivados de bacterioclorofila catiónicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

07.06.2004 US 577196 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

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;
SALOMON, YORAM;
EREN, DORON y
COHEN, AVRAHAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 460 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 de bacterioclorofila catiónicos y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados catiónicos solubles en agua de bacterioclorofila, a su preparación y a su uso en métodos de diagnóstico y terapia fotodinámica *in vivo* de tumores y diferentes enfermedades vasculares tales como degeneración macular asociada a la edad, así como a métodos *in-vivo* y *ex-vivo* para matar virus y microorganismos.

10 **Definiciones y abreviaturas:** **AMD:** degeneración macular asociada a la edad; **Bchl:** bacterioclorofila a (7,8,17,18-tetrahidroporfirina pentacíclica con un 5^o 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 metilo en las posiciones 2, 7, 12, 18, un grupo acetilo en la posición 3 y un grupo etilo en la posición 8); **Bclorin:** bacterioclorina (7,8,17,18-tetrahidroporfirina); **Bphe:** bacteriofeofitina a (Bchl en que el átomo central de Mg se reemplaza por dos átomos de H); **Bpheid:** bacteriofeoforbida a (el ácido carboxílico con C-17² libre derivado de Bphe); **Pd-Bpheid:** Pd-bacteriofeoforbida a (el ácido carboxílico con C-17² libre derivado de Bphe con un átomo central de Pd); **PDT:** 15 terapia fotodinámica; **Rodobacterioclorina:** Bclorina que tiene un grupo -CH₂CH₂COOH en la posición 17, un grupo COOH en la posición 13, grupos metilo en las posiciones 2, 7, 12, 18 y grupos etilo en las posiciones 3 y 8.

Se usa la numeración IUPAC de los derivados de Bchl a lo largo de la memoria descriptiva. Usando esta nomenclatura, las Bchl portan dos ésteres de ácido carboxílico en las posiciones 13² y 17², sin embargo, están esterificadas en las posiciones 13³ y 17³.

20 **Antecedentes de la invención**

La terapia fotodinámica (PDT) es una técnica no quirúrgica para el tratamiento de cánceres y otras enfermedades en las que la administración de un agente fotosensibilizante no tóxico (un fármaco que se activa mediante luz), que es captado por y retenido en un tumor u otro tejido que se vaya a tratar, va seguida de una irradiación no peligrosa con luz de una longitud de onda concreta que genera especies de oxígeno reactivo citotóxicas (oxígeno singlete) *in situ*. 25 Esta técnica es más selectiva que la quimioterapia y radioterapia convencional debido a la acumulación preferencial de compuestos fotoactivables en el tejido tumoral y debido al suministro controlado de luz dirigido hacia el tumor que da lugar a efectos fotodinámicos confinados espacialmente.

Las porfirinas se han empleado como los principales agentes fotosensibilizantes en la clínica. La penetración óptima en tejidos de la luz se produce aparentemente a entre 650-800 nm, pero el porfímero sódico (Photofrin®, una marca comercial de Axcan Pharma Inc.), el primer agente de terapia fotodinámica aprobado en el mundo que se obtiene a partir de hematoporfirina-IX por tratamiento con ácidos, y que ha recibido la aprobación de la FDA para los cánceres no microcíticos esofágicos y endobronquiales, absorbe solo débilmente a aproximadamente 620 nm y es una mezcla compleja e inseparable de monómeros, dímeros y oligómeros superiores. Además, Photofrin® y otros agentes fotosensibilizantes ensayados padecen de varias deficiencias que limitan su aplicación, incluyendo principalmente: 35 (1) una absorción relativamente débil en el intervalo espectral visible, lo que limita el tratamiento a tumores superficiales; (2) acumulación y retención del sensibilizante a largo plazo en la piel del paciente, dando lugar a una fototoxicidad prolongada en la piel (de días a meses); y (3) una diferenciación pequeña o incluso nula entre el efecto de la PDT en tejidos tumorales y no tumorales iluminados. Estos inconvenientes y problemas inherentes han dado como resultado grandes cantidades de trabajo dedicadas a la síntesis de compuestos puros individuales, los denominados sensibilizantes de "segunda generación", que absorben a una longitud de onda larga, tienen estructuras bien definidas y muestran una mejor diferenciación entre su retención en células tumorales y su retención en la piel u otros tejidos normales.

En la búsqueda de moléculas sensibles a la luz adecuadas, o fotosensibilizantes, la bacterioclorofila parece tener ciertas ventajas frente a Photofrin®, el fotosensibilizante más común para terapia PDT. La bacteriofilina, cuando se ilumina, puede hacer que la luz penetre más hondo en el tejido, siendo de este modo más eficaz para tumores mayores. El espectro, la fotofísica y la fotoquímica de Bchls nativa ha hecho que sean moléculas recolectoras de luz óptimas con ventajas claras frente a otros agentes fotosensibilizantes usados en la actualidad o ensayados en el tratamiento PDT. En particular, estas moléculas tienen un elevadísimo coeficiente de extinción a longitudes de onda largas ($\lambda_{\text{máx}}=760-780 \text{ nm}$, $\epsilon=(4-10)\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), donde la luz penetra profundamente en los tejidos. También 50 generan especies de oxígeno reactivo (ROS) con un elevado rendimiento cuántico (dependiendo del metal central).

Se han estudiado la captación biológica y la eficacia de la PDT de derivados sin metal de Bchl con el objetivo de manipular la afinidad de los sensibilizantes por el compartimento celular tumoral. Para esta estrategia, es crucial el uso de sustituyentes altamente lipófilos que, por un lado, pueden aumentar la acumulación del fármaco en las células tumorales pero que, por otra parte, pueden dificultar su suministro a las células tumorales. Además, se debe evitar la acumulación de niveles significativos de fármaco fototóxico en tejidos no tumorales durante periodos prolongados después de administrar el fármaco. 55

En las Patentes de los Estados Unidos anteriores de los solicitantes US 5.726.169, US 5.955.585 y US 6.147.195,

los inventores adoptaron un enfoque diferente. Se sintetizaron sensibilizantes antivasculares, que no se extravasan de la circulación después de la administración y que tienen una corta vida en la sangre. Se esperaba que la diferencia inherente entre vasos de tejidos normales y anormales, tales como los tumores u otros tejidos que se apoyan en neovasos, posibilitaría una destrucción relativamente selectiva del tejido anormal. Por lo tanto, se pretendía sintetizar derivados de Bchl que sean más polares y que por tanto tengan mayores probabilidades de permanecer en el compartimento vascular, donde transmiten el efecto fotodinámico primario. La manipulación en el sitio 17 del resto de ácido propiónico de la Bchl nativa proporcionó conjugados con diversos restos, tales como aminoácidos, péptidos o proteínas, que potencian la hidrofiliidad sensibilizante. Asimismo, se estudió la actividad de direccionamiento vascular de uno de estos derivados, la bacterioclorofilserina, debido a su rápida eliminación de la circulación y de todo el cuerpo del animal, la ausencia de fototoxicidad en la piel y su alto potencial curativo (Rosenbach-Belkin et al, 1996; Zilberstein et al., 1997; Zilberstein et al., 2001). Sin embargo, se observó que estos compuestos que contienen Mg son inadecuados para uso farmacéutico, debido a su baja estabilidad tras su almacenamiento prolongado.

Para aumentar la estabilidad de los derivados de Bchl, se reemplazó el átomo central de Mg por Pd en la última Publicación PCT WO 00/33833 y la correspondiente Patente de los Estados Unidos n.º 6.569.846 del solicitante. Previamente se había demostrado que este átomo aumenta de manera destacada el potencial de oxidación del macrociclo de Bchl y, a la vez, potencia en gran medida la tasa de cruzamiento intersistema (ISC) de la molécula con su estado de triplete. El reemplazo del metal se realizó mediante la incorporación directa del ión Pd²⁺ en una molécula de Bpheid, tal como se describe en el documento WO 00/33833. Se observó que el primer derivado de Bchl sustituido con Pd, paladio-bacteriofeoforbida o Pd-Bpheid (Tookad®, una marca comercial de Steba Biotech), era altamente eficaz frente a diversos tumores sólidos en estudios preclínicos (Schreiber et al., 2002; Gross et al., 2003; Koudinova et al., 2003; documento WO 03/094695) incluso contra tumores que comprenden células tumorales resistentes (Preise et al., 2003). La actividad antivascular de Pd-Bpheid posibilitó la destrucción del tejido glandular prostático en modelos de perro sin comprometer su continencia (Chen et al., 2002). Los ensayos clínicos de fase I/II demostraron que Pd-Bpheid es seguro para su uso en terapia fotodinámica de cáncer de próstata en pacientes que fracasaron en la radioterapia (Elhilali, 2004) e induce necrosis y la reducción del PSA (antígeno específico de próstata) del tejido glandular vascularizado en pacientes de próstata tratados con luz terapéutica y dosis de fármaco (Trachtenberg, 2003).

Debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas, el uso clínico de Pd-Bpheid requiere el uso de agentes solubilizantes, tales como Cremophor que pueden provocar efectos secundarios a altas dosis. Esto impulsó a los inventores a concebir una nueva familia de derivados de Bchl, descritos en el documento PCT/IL03/00973 (WO 2004/045492), que consisten en el macrociclo de Bclorina que contiene un átomo de metal central di o trivalente y al menos dos restos aniónicos. Estos compuestos de Bchl aniónicos pueden administrarse por vía intravenosa después de su solubilización en soluciones acuosas sin excipientes añadidos. Su corto tiempo de vida en la circulación, combinado con su acción relativamente rápida y una actividad antivascular elevadamente eficaz, demuestra su potencial como agentes de PTD antivasculares. De hecho, uno de estos derivados aniónicos de Bchl se encuentra actualmente en estudios preclínicos para la PTD de la degeneración macular asociada a la edad (AMD) y de tumores hepáticos, por ejemplo, hepatoma.

El documento DE 10154436 describe compuestos de pirobacteriofeoforbida para su uso en terapia fotodinámica, en que al menos uno de los grupos ceto en la posición 3a o 13' del sistema de porfirina está derivatizado a una imina correspondiente.

El documento WO 03/028629 describe derivados de clorofila que pueden contener grupos amonio o iminio cargados positivamente para terapia o diagnóstico fotodinámico.

El documento WO 03/028628 describe macrociclos tetrapirrólicos que están sustituidos con al menos un grupo funcional que comprende un grupo carbamato de la fórmula - OCON< u -OCON=C< y contienen opcionalmente grupos amonio o iminio cargados positivamente para terapia o diagnóstico fotodinámico. Aunque las fórmulas generales desveladas en dicha publicación incluyen derivados de bacterioclorofila, cabe destacar que no se han desvelado derivados de bacterioclorofila específicos y la memoria descriptiva tampoco enseña la preparación de derivados de bacterioclorofila.

El documento US 2003/0203888 desvela cromóforos de porfirina y basados en porfirina, tales como clorina y bacterioclorina. El documento WO 03/055887 desvela porfirina, clorina o bacterioclorina que contiene meso sustituyentes de conjugación. El documento US 5.744.598 desvela iminas o porfirinas. El documento US 5.864.035 desvela derivados de isoimida de clorinas y bacterioclorinas. El documento US 2003/0050296 desvela porfirinas cargadas positivamente con nitrógenos cuaternizados. El documento WO 01/40232 desvela derivados de clorofila y bacterioclorofila. El documento WO 97/19081 desvela bacterioclorofilas metaladas.

Sería elevadamente deseable proporcionar nuevos derivados de bacterioclorofila que pudieran ser estables y que pudieran tener una afinidad potenciada para las células endoteliales para su uso en terapia fotodinámica y, en particular, en la fototerapia vascular dirigida (VTP).

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un derivado de bacterioclorofila que contiene al menos un grupo cargado positivamente y/o al menos un grupo básico que se convierte a un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas, siempre que dicho derivado de bacterioclorofila no tenga un grupo funcional que comprenda un grupo carbamato y, cuando el derivado de bacterioclorofila es una pirobacteriofeoforbida, el al menos un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas no es un grupo imina en la posición 3a o 13¹ de la molécula de bacterioclorofila.

El derivado de bacterioclorofila de la presente invención es un compuesto de fórmula I desvelado anteriormente en la presente memoria en la memoria descriptiva.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de Bchl de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable, siendo estas composiciones útiles para terapia fotodinámica (PDT), particularmente para PDT vascular dirigida, por ejemplo para la PDT de tumores así como para usos no oncológicos en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (AMD), enfermedades cardiovasculares y enfermedades de la piel, tales como acné y psoriasis. Además, las composiciones pueden usarse para eliminar agentes infecciosos que comprenden bacterias Gram-negativas o Gram-positivas y virus *in vivo* o *in vitro*, así como para fines diagnósticos.

La presente invención se refiere además a un método mejorado de terapia fotodinámica usando un fotosensibilizante, en donde la mejora consiste en usar como fotosensibilizante un derivado de Bchl de fórmula I de la invención. De acuerdo con este aspecto, la memoria descriptiva desvela un método de tratamiento mediante PDT que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación local.

En una realización, el método de tratamiento mediante PDT puede comprender administrar a un individuo que padece un tumor una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación local.

En otra realización, el método de tratamiento mediante PDT puede comprender administrar a un individuo que padece degeneración macular asociada a la edad una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación local.

En una realización más, un método para prevenir o reducir la restenosis dentro de un stent puede comprender administrar a un individuo que padece una enfermedad cardiovascular que se ha sometido a angiografía coronaria una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación local.

La invención se refiere además a un método mejorado para el diagnóstico de tumores usando un fotosensibilizante, usando como fotosensibilizante un derivado de Bchl de la invención. De acuerdo con este aspecto, un método de diagnóstico de tumores puede comprender administrar a un individuo sospechoso de tener un tumor una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación local, por ejemplo, alteración con radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda, incluyendo corta (por ejemplo, rayos X), media (por ejemplo, UV/VIS/IR cercano) para permitir una radiación de frecuencia óptica, o larga (por ejemplo, radiación por radiofrecuencia) para posibilitar, por ejemplo, señales de resonancia paramagnética nuclear o electrónica.

La invención proporciona además un método mejorado para eliminar células o agentes infecciosos que comprenden bacterias y virus, usando como fotosensibilizante un derivado de Bchl de la invención. De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a un método de esterilización de productos biológicos, por ejemplo, sangre, que comprende añadir a dicho producto biológico, por ejemplo, sangre, una cantidad eficaz de un derivado de Bchl de la invención, seguido de irradiación.

Breve descripción de las figuras

Los diferentes compuestos ensayados en los Ejemplos de Referencia se representan en la siguiente descripción de los dibujos por un número en negrita y subrayado. Su identificación completa se encuentra en la Lista de compuestos, al inicio de la sección química en los ejemplos y en el apéndice posterior.

La **Fig. 1** muestra el espectro de emisión de fluorescencia del compuesto **5** en metanol.

La **Fig. 2** ilustra los espectros de absorción del compuesto **5** en suero salino tamponado con fosfato (PBS) con concentraciones crecientes de seroalbúmina humana (HSA). ($\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$).

Las **Figs. 3A-3C** son gráficas que muestran la fototoxicidad de los compuestos **5**, **7**, **9** y **11** en células endoteliales H5V. **Fig. 3A:** fototoxicidad después de 90 min de incubación de las células con concentraciones crecientes de los compuestos **5** y **11**. **Fig. 3B:** fototoxicidad después de 2 horas de incubación con concentraciones crecientes de los compuestos **5**, **7** y **9**. **Fig. 3C:** fototoxicidad después de 1-10 min de incubación con el compuesto **5** (50 μM). Las células se incubaron en la oscuridad con las concentraciones indicadas de los compuestos, se lavaron y se iluminaron durante 10 min (formas abiertas en las Fig. 3A-B, forma

cerrada en la Fig. 3C) o mantenidas en la oscuridad (control de oscuridad, formas cerradas en las Fig. 3A-B). Se efectuaron determinaciones por triplicado y se muestran los experimentos representativos.

La **Fig. 4** es una gráfica que muestra la farmacocinética del compuesto **5** en sangre de ratas Wistar. Después de la inyección intravenosa (i.v.) del compuesto **5** (0,6 mg/kg), se recogieron muestras de sangre de la misma rata a los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min y a las 1, 2, 6, 24 h después de la inyección y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia. Cada instante representa la media de tres ratas \pm DTM.

Las **Fig. 5A-5B** muestran la biodistribución del compuesto **5** en ratas Wistar. Las ratas se sacrificaron a los 30 min (**Fig. 5A**) o a las 24 horas (**Fig. 5B**) después de la inyección i.v. del compuesto **5** (0,6 mg/kg), y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de los órganos indicados y se normalizaron a los datos farmacocinéticos.

Las **Fig. 6A-6C** son fotografías que muestran el efecto local de la PDT en ratones que portan xenoinjertos de glioma C6 y se trataron por vía i.v. con el compuesto **5**. Se trató a ratones desnudos CD1 macho con 0,3 mg/kg de **5** y se les iluminó con un láser de 755 nm (80 mW/cm^2) durante 15 min. **Fig. 6A**: fotografías del sitio tumoral en un animal tratado con PDT en los días 0, 4, 14, 21 y 32. **Fig. 6B**: fotografías del sitio tumoral de ratones de control de oscuridad (a los que se inyecta **5** pero no se les ilumina) (n=3) en los días 0 y 10; **Fig. 6C**: fotografías del sitio tumoral de ratones de control iluminados (a los que se inyecta un volumen de suero salino equivalente a la solución de **5** y se les ilumina) (n=2) en los días 0 y 10.

La **Fig. 7** muestra la probabilidad de supervivencia de ratones que portan xenoinjertos de glioma C6 tratados mediante PDT con compuesto **5**. Se inyectó por vía i.v. a ratones portadores de xenoinjertos de glioma C6 (n=17) con compuesto **5** (0,3 mg/g) y se les iluminó durante 15 min con una intensidad de luz de 80 mW/cm^2 (grupo de tratamiento completo, n=12, cuadrados). Grupos de control: ratones portadores de tumores no tratados (n=2, círculos), control de oscuridad (n=3, rombos), control de luz (n=2, triángulos). * probabilidad de volumen tumoral $< 2 \text{ ml}$.

Las **Fig. 8A-8D** son gráficas que muestran la fototoxicidad de un derivado de bacterioclorofila cargado negativamente (véase el Ejemplo 22) y compuesto **5** en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se incubaron bacterias Gram-positivas (*St. albus*, **Fig. 8A, 8B**) y Gram-negativas (*E. coli*, **Fig. 8C, 8D**) durante 1 hora con las concentraciones indicadas del derivado de bacterioclorofila cargado negativamente (**Fig. 8A, 8C**) o con compuesto **5** (**Fig. 8B, 8D**), y se iluminaron durante 15 min con 70 mW/cm^2 . La supervivencia bacteriana se determinó mediante recuento de colonias. Se efectuaron determinaciones por triplicado y se muestran los experimentos representativos.

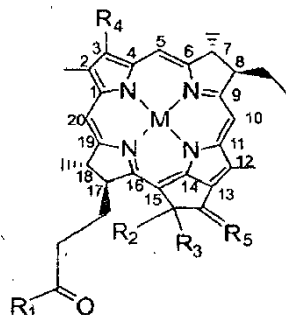
Las **Fig. 9A-9E** son gráficas que muestran la biodistribución de los compuestos **28, 32, 10, 36 y 75**, respectivamente, en varios órganos de ratones desnudos que portan xenoinjertos de carcinoma de células renales (RCC). Se inyectó a las ratas con una solución del compuesto de ensayo en manitol isotónico (1,5 mg/kg) en diferentes momentos.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención proviene de la observación por parte de los presentes inventores de que estudios preclínicos con Tookad® (Pd-Bpheid) y con un derivado hidrosoluble aniónico de Bchl (descrito en el documento WO 2004/045492) demostró una alta eficacia en la PDT de varios tumores sólidos, tales como xenoinjertos de melanoma, glioma y de próstata humana, próstata canina normal y sarcoma DS en modelos animales (Chen et al., 2002; Schreiber et al., 2002; Gross et al., 2003; Kelleher et al., 2003; Koudinova et al., 2003; Plaks et al., 2004) e indicaron que las células endoteliales, la matriz extracelular y posiblemente las plaquetas son candidatos probables para la acción fotodinámica primaria.

Con los derivados de Bchl anteriormente mencionados, no pudieron encontrarse pruebas de una acción directa de las especies de oxígeno reactivo (ROS) formadas durante la iluminación en las células tumorales (Gross et al., 2003). Por lo tanto, la elevada tasa de curación parecía indicar que la lesión fotodinámica del endotelio tumoral podría ser suficiente para proporcionar una respuesta tumoral completa. Siguiendo esta observación, los inventores investigaron cómo potenciar la afinidad del fotosensibilizante por las células endoteliales y, en particular, a las células neoendoteliales, que son características de enfermedades tumorales y otras enfermedades dependientes de la vasculatura. Las dianas adecuadas se identificaron como cargas negativas elevadamente densas en el endotelio, incluyendo en las fenestraciones endoteliales, vesículas recubiertas, la membrana plasmática en sí y vesículas (Simionescu et al., 1981; Ghinea y Simionescu, 1985; Hamblin et al., 1999), receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (Segev et al., 2002), el glucocáliz endotelial (una malla altamente hidratada de proteoglicanos, glucosaminoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos cargados negativamente unidos a membrana, conteniendo algunos grupos sulfónicos), y células endoteliales angiogénicas (Thurston et al., 1998; Dellian et al., 2000). Además, publicaciones recientes indicaron que la exposición aumentada de fosfolípidos aniónicos en la superficie del endotelio tumoral, por ejemplo, linfoma de Hodgkin, carcinoma de pulmón no microcítico humano, fibrosarcoma de ratón, carcinoma de mama humano y melanoma (Ran et al., 2002). El número aumentado de sitios aniónicos en el endotelio tumoral proporciona una diana atractiva para la terapia tumoral.

La presente invención proporciona un derivado de bacterioclorofila de fórmula I:



(I)

en donde

5 M representa 2H, un átomo de metal divalente seleccionado entre Pd, Pt, Co, Sn, Ni, Cu, Zn o Mn, o un átomo de metal trivalente seleccionado entre Fe, Mn, Co, Au, Al, Gd, Er, Yb o Cr;

R₁ y R₂ cada uno independientemente es Y-R₈, -NR₉R'₉ o -N⁺R₉R'₉R''₉A⁻;

Y es O o S; R₂ es H, OH o COOR₉;

R₃ es H, OH, alquilo C₁-C₁₂ o alcoxi C₁-C₁₂;

10 R₄ es -CH=CR₉R'₉, -CH=CR₉Hal, -CH=CH-CH₂-NR₉R'₉, -CH=CH-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -CHO, -CH=NR₉, -CH=N⁺R₉R'₉A⁻, -CH₂-OR₉, -CH₂-SR₉, -CH₂-Hal, -CH₂-R₉, -CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -CH₂-CH₂R₉, -CH₂-CH₂Hal, -CH₂-CH₂OR₉, -CH₂-CH₂SR₉, -CH₂-CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -COCH₃, C(CH₃)=CR₉R'₉, -C(CH₃)=CR₉Hal, -C(CH₃)=NR₉, -CH(CH₃)=N⁺R₉R'₉A⁻, -CH(CH₃)-Hal, -CH(CH₃)-OR₉, -CH(CH₃)-SR₉, -CH(CH₃)-NR₉R'₉, -CH(CH₃)-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻ o -C≡CR₉; R₅ es =O, =S, =N-R₉, =N⁺R₉R'₉A⁻, =CR₉R'₉ o =CR₉-Hal;

cada R₈, R₉, R'₉ y R''₉ es independientemente:

15 (a) H;

(b) hidrocarbilo C₁-C₂₅; preferiblemente alquilo C₁-C₂₅, más preferiblemente alquilo C₁-C₁₀ o alquilo C₁-C₆, sin sustituir o sustituido con uno o más radicales seleccionados entre:

20 (i) un grupo funcional seleccionado entre halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epitio, aziridina, -CONRR', -COR, COOR, -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -SO₂NRR', =N-OR, =N-NRR', -(CH₂)_n-NR-COR', -(CH₂)_n-CO-NRR', -O-(CH₂)_n-OR, -O-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R, -PRR', -OPO₃RR', -PO₂HR o -PO₃RR', en donde n es un número entero de 1 a 6;

25 (ii) unos grupos cargados positivamente seleccionados entre: un grupo onio; un catión derivado de un grupo que contiene N seleccionado entre O←N⁺(RR')-, >C=N⁺(RR'), -N⁺(RR'R''), -(R)N-N⁺(RR'R''), -(R)N-C(=HN)-N⁺RR'R'', -C(=NH)-N⁺(RR'R''); un catión derivado de un compuesto heteroaromático que contiene uno o más átomos de N y opcionalmente átomos de O o S;

(iii) un grupo cargado negativamente seleccionado entre COO⁻, COS⁻, -OSO₃⁻, -SO₃⁻, -OPO₃R⁻, -PO₂H⁻, -PO₃²⁻ o -PO₃R⁻;

30 (iv) un grupo básico que se convierte en unos grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas seleccionados entre -NRR', -C(=NR)-NR'R'', -NR-NR'R'', -(R)N-C(=NR)-NR'R'', O←NR-, >C=NR o un radical heteroaromático que contiene N;

(v) un grupo ácido que se convierte en unos grupos cargados negativamente en condiciones fisiológicas seleccionados entre -COOH, -COSH, -SO₃H y -PO₃H₂; o

(vi) un residuo de un aminoácido, un péptido, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido;

35 (c) hidrocarbilo C₁-C₂₅, preferiblemente alquilo C₁-C₂₅, más preferiblemente alquilo C₁-C₁₀ o C₁-C₆, que contiene uno o más heteroátomos y/o uno o más restos carbocíclicos o heterocíclicos y está sustituido con uno o más grupos funcionales como se ha definido en (b); o

(d) un residuo de un aminoácido, un péptido, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido o un

polisacárido;

5 en donde cada R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₂₅, más preferiblemente alquilo C₁-C₁₀ o C₁-C₆, o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S o N y están opcionalmente sustituidos adicionalmente en el átomo de N adicional con alquilo opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo o amino;

R₈ puede ser adicionalmente H⁺ o un catión R⁺₁₀ cuando R₁ es Y-R₈;

R⁺₁₀ es amonio, un catión de un metal, preferiblemente de un metal alcalino o alcalinotérreo, tal como Na, K, Li, Ca, Ba o un catión derivado de un grupo que contiene N como se ha definido en (ii) anteriormente;

10 A⁻ es un anión fisiológicamente aceptable;

m es 0 o 1; y

sales fisiológicamente aceptables e isómeros ópticos del mismo;

15 con la condición de que, cuando R₂ y R₃ son ambos H, R₅ no sea =N-R₉ y/o R₄ no sea -C(CH₃)=NR₉; y con la condición adicional de que el derivado de bacterioclorofila de fórmula I tenga al menos un grupo cargado positivamente y/o al menos un grupo básico que se convierta en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas.

Como se define en la presente memoria, A⁻ es un anión fisiológicamente aceptable, tal como cloruro, bromuro, yoduro, perclorato, sulfato, fosfato o un anión orgánico, tal como acetato, benzoato, caprilato, citrato, lactato, malonato, mandelato, mesilato, oxalato, propionato, succinato, tosilato, y similares.

20 El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

La expresión "hidrocarbilo C₁-C₂₅", como se define para R₈, R₉, R'₉ y R''₉, representa un radical hidrocarbilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, acíclico o cíclico, incluyendo aromático, de 1-25 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 6, átomos de carbono.

25 En una realización preferida, el hidrocarbilo C₁-C₂₅ es un radical alquilo C₁-C₂₅ lineal o ramificado, preferiblemente C₁-C₁₀, y más preferiblemente alquilo C₁-C₆, por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo. En otra realización, el grupo alquilo tiene 10 átomos de carbono o más, por ejemplo -C₁₀H₂₁, -C₁₅H₃₁, -C₁₆H₃₃, -C₁₇H₃₅, -C₁₈H₃₇, -C₂₀H₄₁ y similares. Cuando R₁ es -OR₈, entonces R₈ también puede ser el radical geranilgeranilo (2,6-dimetil-2,6-octadienilo) o fitilo (2,6,10,14-tetrametil-hexadec-14-en-16-ilo), grupos alqueno que están presentes en la posición 17³ de un compuesto de clorofila natural o bacterioclorofila.

30 El hidrocarbilo C₁-C₂₅ también puede ser un radical alqueno o alquino C₂-C₂₅ lineal o ramificado, preferiblemente de 2-6 átomos de carbono, por ejemplo vinilo, prop-2-en-1-ilo, but-3-en-1-ilo, pent-4-en-1-ilo, hex-5-en-1-ilo, etinilo, propargilo, y similares.

El hidrocarbilo C₁-C₂₅ puede ser adicionalmente un cicloalquilo C₃-C₂₅ monocíclico o policíclico, preferiblemente C₃-C₁₄, más preferiblemente cicloalquilo C₃-C₇, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo;

35 un radical arilo monocíclico o policíclico, preferiblemente un C₆-C₁₈, más preferiblemente un arilo C₆-C₁₄, tal como fenilo, naftilo, carbazolilo, antrilo, fluorenilo, indanilo y fenantrilo; o

un radical aralquilo, en el que el radical arilo radical es preferiblemente un arilo C₆-C₁₈, más preferiblemente un C₆-C₁₄, tal como fenilo o naftilo, y es más preferiblemente bencilo o fenetilo.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto carbocíclico" se refiere a un compuesto monocíclico o policíclico que contiene únicamente átomos de carbono en el anillo o anillos. El resto carbocíclico puede ser saturado, es decir un cicloalquilo como se ha definido anteriormente, o insaturado, es decir cicloalqueno, o aromático, es decir un arilo como se ha definido anteriormente.

45 El término "alcoxi", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquil (C₁-C₂₅)-O-, en donde alquilo C₁-C₂₅ es como se ha definido anteriormente. Son ejemplos de alcoxi, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexoxi, -OC₁₅H₃₁, -OC₁₆H₃₃, -OC₁₇H₃₅, -OC₁₈H₃₇, y similares. El término "ariloxi", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo aril (C₆-C₁₈)-O-, en donde arilo C₆-C₁₈ es como se ha definido anteriormente, por ejemplo, fenoxi y naftoxi.

50 Las expresiones "heteroarilo" o "resto heterocíclico" o "heteroaromático" o "heterociclilo", como se usa en la presente memoria, significan un radical derivado de un anillo heteroaromático mono o policíclico que contiene de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S y N. Son ejemplos particulares pirrolilo, furilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, pirimidinilo, 1,3,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,3,5-

triazinilo, benzofurilo, isobenzofurilo, indolilo, imidazo[1,2-a]piridilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo y benzoxazolilo.

Cualquier "carbocíclico", "arilo" o "heteroarilo" puede estar sustituido con uno o más radicales, tales como halógeno, arilo C₆-C₁₄, alquilo C₁-C₂₅, nitro, OR, SR, -COR, -COOR, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -NRR', -(CH₂)_n-NR-COR' y -(CH₂)_n-CO-NRR'. Debe apreciarse que cuando un anillo heteroaromático policíclico está sustituido, las sustituciones pueden estar en cualquiera de los anillos carbocíclicos y/o heterocíclicos.

Un "grupo cargado positivamente" como se usa en la presente memoria representa un catión derivado de un grupo que contiene N o de un grupo onio que no contiene N.

Un "catión derivado de un grupo que contiene N" como se emplea en esta memoria representa, por ejemplo, pero sin limitación, un grupo amonio -N⁺(RR'R''), hidrazinio -(R)N-N⁺(R'R''), amoniooxi O←N⁺(RR''), iminio >C=N⁺(RR'), amidinio -C(=RN)-N⁺R'R'' o guanidinio -(R)N-C(=NR)-N⁺R'R'', donde cada uno de R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆ según se define en la presente memoria, fenilo o bencilo, o heterociclilo, o en el grupo amonio uno de R, R' y R'' puede ser OH, o dos de R, R' y R'' en el grupo amonio o R y R' en los grupos hidrazinio, amoniooxi, iminio, amidinio o guanidinio, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional, o dicho catión se deriva de un compuesto que contiene uno o más átomos de N en un anillo heteroaromático.

En una o más realizaciones preferidas, el derivado de bacterioclorofila contiene un grupo amonio de la fórmula -N⁺(RR'R''), en donde cada uno de R, R' y R'' es independientemente H o hidrocarbilo opcionalmente sustituido o heterociclilo, según se define en la presente memoria, o uno de ellos puede ser OH. El -N⁺(RR'R''), grupo amonio puede ser un amonio secundario, en donde dos cualesquiera de los radicales R, R' o R'' son H; un amonio terciario, en donde solo uno de R, R' o R'' es H; o un amonio cuaternario, en donde cada uno de R, R' o R'' es un grupo hidrocarbilo o heterociclilo opcionalmente sustituido según se define en la presente memoria. Cuando uno de R, R' o R'' es OH, el grupo es un grupo hidroxilamónio. Preferiblemente, el grupo amonio es un grupo amonio cuaternario donde cada R, R' y R'' es alquilo C₁-C₆, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo. Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, el grupo amonio puede ser un grupo terminal en la molécula o puede encontrarse dentro de una cadena de alquilo en la molécula.

En los grupos hidrazinio -(R)N-N⁺(R'R''), amidinio -C(=NR)-N⁺R'R'' y guanidinio -(R)N-C(=NR)-N⁺R'R'', cada R, R' y R'' puede ser independientemente H o hidrocarbilo o heterociclilo, o R' y R'' junto con el átomo de N al que están unidos, forman un anillo saturado de 3-7 miembros, según se define en la presente memoria. Los ejemplos de tales grupos incluyen aquellos donde R es H, y cada R' y R'' es alquilo C₁-C₆, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo.

En los grupos amoniooxi O←N⁺(RR'') e iminio >C=N⁺(RR'), cada R y R' puede ser independientemente H o hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆ o heterociclilo, o R y R', junto con el átomo de N al que están unidos, forman un anillo saturado de 3-7 miembros, según se define en la presente memoria.

En otra realización preferida, el derivado de bacterioclorofila contiene un grupo amonio cíclico de la fórmula -N⁺(RR'R''), en donde dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 3-7 miembros definido más adelante en la presente memoria.

Según se define en esta memoria, "un anillo saturado de 3-7 miembros" formado por dos de los R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están unidos puede ser un anillo que contiene únicamente N, tal como aziridina, pirrolidina, piperidina, piperazina o azepina, o puede contener un heteroátomo adicional seleccionado entre O y S, tal como morfolina o tiomorfolina. El átomo de N adicional en el anillo de piperazina puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, por ejemplo alquilo C₁-C₆, que puede estar sustituido con halo, OH o amino. Los grupos onio derivados de dichos anillos saturados incluyen aziridinio, pirrolidinio, piperidinio, piperazinio, morfolinio, tiomorfolinio y azepinio.

Según se define en la presente memoria "un catión derivado de un radical heteroaromático que contiene N" representa un catión derivado de un compuesto N-heteroaromático que puede ser un compuesto mono o policíclico que contiene opcionalmente O, S o átomos de N adicionales. El anillo del cual se deriva el catión debe contener al menos un átomo de N y ser aromático, pero el otro anillo o anillos, si los hubiera, pueden estar parcialmente saturados. Los ejemplos de cationes N-heteroaromáticos incluyen pirazolío, imidazolío, oxazolío, tiazolío, piridinío, pirimidinio, quinolinío, isoquinolinío, 1,2,4-triazinío, 1,3,5-triazinío y purinío.

El al menos un grupo cargado positivamente también puede ser un grupo onio que no contiene nitrógeno, tal como, pero si limitación, un grupo fosfonio [-P⁺(RR'R'')], arsonio [-As⁺(RR'R'')], oxonio [-O⁺(RR')], sulfonio [-S⁺(RR')], selenonio [-Se⁺(RR')], teluronio [-Te⁺(RR')], estibonio [-Sb⁺(RR'R'')], o bismutonio [-Bi⁺(RR'R'')], en donde cada uno de R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, preferiblemente alquilo C₁-C₆, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo, o arilo, preferiblemente, fenilo.

Los ejemplos de grupos fosfonio de la fórmula -P⁺(RR'R'') incluyen grupos donde cada R, R' y R'' es metilo, etilo, propilo, butilo o fenilo, o R es metilo, etilo, propilo, butilo o hexilo y R' y R'' son ambos fenilo. Los ejemplos de grupos arsonio de la fórmula -As⁺(RR'R'') incluyen grupos donde cada R, R' y R'' es metilo, etilo, propilo, butilo o fenilo. Los ejemplos de grupos sulfonio de la fórmula -S⁺(RR') incluyen grupos donde cada R y R' es metilo, etilo, propilo, butilo,

fenilo, bencilo, fenetilo o un grupo hidrocarbilo sustituido.

Según se define en la presente memoria, "un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas" es, al menos teóricamente, cualquier grupo básico que generará en condiciones fisiológicas un grupo cargado positivamente según se define en la presente memoria. Debe señalarse que las condiciones fisiológicas, como se usan en la presente memoria, no se refieren únicamente al suero, sino a diferentes tejidos y compartimentos celulares en el cuerpo.

Los ejemplos de tales grupos básicos que contienen N incluyen, sin limitación, cualquier grupo amino que generará un grupo amonio, cualquier grupo imina que generará un grupo imino, cualquier grupo hidrazina que generará un grupo hidrazinio, cualquier grupo aminooxi que generará un grupo aminooxi, cualquier grupo amidina que generará un grupo amidinio, cualquier grupo guanidina que generará un grupo guanidinio, todos según se definen en la presente memoria. Otros ejemplos incluyen grupos fosfino y mercapto.

Por lo tanto, el derivado de bacterioclorofila de la invención puede contener al menos un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas, tal como $-NRR'$, $-C(=NR)-NR'R''$, $-NR-NR'R''$, $-(R)N-C(=NR)-NR'R''$, $O\leftarrow NR-$ o $>C=NR$, en donde cada uno de R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C_1-C_{25} , más preferiblemente alquilo C_1-C_{10} o C_1-C_6 , o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente un átomo de O, S o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional, o el grupo básico es un radical heteroaromático que contiene N.

El anillo saturado de 3-7 miembros puede ser aziridina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, azepina o piperazina opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional con alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo o amino, el radical heteroaromático que contiene N puede ser pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirimidilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinilo.

Según se define en la presente memoria, R^{+}_{10} puede ser amonio, un catión de un metal, preferiblemente de un metal alcalino o alcalinotérreo, tal como Na, K, Li, Ca, Ba, o un catión orgánico según se define en la presente memoria para "un catión derivado de un grupo que contiene N".

Según se define en la presente memoria, "un grupo cargado negativamente" es un anión derivado de un ácido e incluye carboxilato (COO^-), tiocarboxilato (COS^-), sulfonato (SO_3^-) y fosfonato (PO_3^{2-}), y el "grupo ácido que se convierte en un grupo cargado negativamente en condiciones fisiológicas" incluye los grupos de ácido carboxílico ($-COOH$), tiocarboxílico ($-COSH$), sulfónico ($-SO_3H$) y fosfónico ($-PO_3H_2$). Se han descrito derivados de bacterioclorofila con estos radicales en el documento WO 2004/045492 del mismo solicitante.

Según se define en la presente memoria, cada R_8 , R_9 y R'_9 puede ser independientemente un hidrocarbilo C_1-C_{25} que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos, restos carbocíclicos o heterocíclicos. Por ejemplo, el hidrocarbilo C_1-C_{25} puede ser un alquilo C_1-C_{25} o alqueno C_2-C_{25} lineal o ramificado que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S y/o N, y/o puede estar interrumpido y/o sustituido con uno o más restos carbocíclicos, por ejemplo cicloalquilo C_3-C_7 o ariilo C_6-C_{14} , o heterocíclicos, como se ha definido anteriormente.

Según se define en la presente memoria, el hidrocarbilo C_1-C_{25} definido para R_8 , R_9 y R'_9 puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos funcionales seleccionados entre halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epitio, aziridina, $-CONRR'$, $-COR$, $COOR$, $-OSO_3R$, $-SO_3R$, $-SO_2R$, $-NH_2SO_2R$, $-SO_2NRR'$, $-NRR'$, $=N-OR$, $=N-NRR'$, $-C(=NR)-NRR'$, $-NR-NRR'$, $-(R)N-C(=NR)-NRR'$, $O\leftarrow NR-$, $>C=NR$, $-(CH_2)_n-NR-COR'$, $-(CH_2)_n-CO-NRR'$, $-O-(CH_2)_n-OR$, $-O-(CH_2)_n-O-(CH_2)_n-R$, $-PRR'$, $-OPO_3RR'$, $-PO_2HR$, $-PO_3RR'$; uno o más grupos cargados negativamente, tales como COO^- , COS^- , $-OSO_3^-$, $-SO_3^-$, $-OPO_3R^-$, $-PO_2H^-$, $-PO_3^{2-}$ y $-PO_3R^-$; y/o uno o más grupos cargados positivamente, tales como $-P^+(RR'R'')$, $-As^+(RR'R'')$, $-O^+(RR')$, $-S^+(RR')$, $-Se^+(RR')$, $-Te^+(RR')$, $-Sb^+(RR'R'')$, $-Bi^+(RR'R'')$, $O\leftarrow N^+(RR')$, $>C=N^+(RR')$, $-N^+(RR'R'')$, $-(R)N-N^+(RR'R'')$, $-(R)N-C(=HN)-N^+(RR'R'')$, $-C(=NH)-N^+(RR'R'')$, o un catión N-heteroaromático, tal como pirazolio, imidazolio, oxazolio, tiazolio, piridinio, quinolinio, pirimidinio, 1,2,4-triazinio, 1,3,5-triazinio y purinio; en donde n es un número entero de 1 a 6, cada R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están unidos, forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional. El hidrocarbilo C_1-C_{25} definido para R_8 , R_9 y R'_9 también puede estar sustituido con el residuo de un mono, oligo o polisacárido, tal como glicosilo, o de un aminoácido, péptido o proteína. Además, cada R_8 , R_9 y R'_9 puede ser independientemente un residuo de un mono, oligo o polisacárido, tal como glicosilo, o de un aminoácido, péptido o proteína.

En los grupos OR y SR, cuando R es H, están representados los grupos hidroxilo y mercapto, respectivamente, y cuando R es distinto de H, están representados éteres y sulfuros. En el grupo $-PRR'$, se representa el grupo fosfino cuando R y R' son H. En el grupo $-COR$, cuando R es H, se representa el grupo formilo $-CHO$ de un aldehído, mientras que cuando R es distinto de H, este es el residuo de una cetona, tal como grupos alquilcarbonilo y arilcarbonilo. En el grupo $COOR$, cuando R no es H, este es un grupo éster de ácido carboxílico, tal como los grupos alcóxicarbonilo y arilóxicarbonilo. De forma análoga, se representan ésteres en los grupos $-OSO_3R$, $-SO_3R$, $-SO_2R$, -

OPO₃RR', -PO₂HR y -PO₃RR' cuando R y R' son distintos de H.

En una realización preferida, R₁ en el compuesto de fórmula I, es un grupo -OR₈ donde R₈ es un alquilo C₁-C₆ sustituido con un grupo funcional terminal cargado positivamente, más preferiblemente, un grupo -N⁺RR'R", lo más preferiblemente, -N⁺(CH₃)₃.

- 5 En una realización de la invención, R₈, R₉ y/o R'₉ pueden ser el residuo de un aminoácido, un péptido o una proteína. En una realización preferida, R₁ en la posición 17³ es -OR₈, donde R₈ es el residuo de un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo libre, tal como serina, treonina o tirosina o un alquilo, por ejemplo metilo, éster del mismo, o un péptido que contiene tal aminoácido o derivado del mismo, estando unidos dicho aminoácido hidroxilado o derivados del mismo o péptido al grupo -COO⁻ del derivado de Bchl a través de su grupo hidroxilo. Son ejemplos de tales derivados de aminoácidos y péptidos, metil éster de L-serina, metil éster de L-tirosina y metil éster de seril serina.
- 10

En otra realización preferida, el grupo -NR₉R'₉ es el residuo de un aminoácido que contiene un grupo amino libre, tal como arginina y lisina, o un péptido que los contiene, o un derivado de alquil éster de dicho aminoácido o péptido, unido al -CO en la posición 13³ y/o 17³ de la molécula de Bchl a través de un enlace de amida. En estos compuestos, el átomo de N del grupo -NR₉R'₉ se obtiene a partir del grupo amino libre del aminoácido.

- 15 En una realización más, el grupo hidrocarbilo C₁-C₂₅ puede estar sustituido con un residuo de aminoácido y, si el grupo amino terminal del aminoácido está libre, el residuo de aminoácido puede ser la fuente del grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas.

R⁺₁₀ puede ser un catión monovalente o divalente derivado de un metal alcalino o alcalinotérreo, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺, NH₄⁺, Ca⁺, más preferiblemente K⁺; o este es un catión derivado de una amina.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "derivado catiónico de bacterioclorofila" significa una bacterioclorofila que contiene uno o más grupos cargados positivamente y/o uno o más grupos básicos que se convierten en grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas. La molécula de bacterioclorofila también puede tener grupos neutros y/o uno o más grupos cargados negativamente y/o uno o más grupos ácidos que se convierten en grupos cargados negativamente en condiciones fisiológicas. La carga total de la molécula de bacterioclorofila no es importante.
- 25

En una realización más preferida, la invención proporciona un derivado de Bchl de la fórmula I en donde M es Pd, R₂ es -COOCH₃, R₃ es H, R₄ es -COCH₃, R₅ es =O, y R₁ es -OR₈, en donde R₈ es un residuo de un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo, preferiblemente serina, o un derivado del mismo, alquilo, preferiblemente, más preferiblemente metilo, éster o un péptido que contiene dicho aminoácido o derivado del mismo, residuo de aminoácido en el cual el grupo amino puede estar cuaternizado en forma de un grupo trimetilamonio. Un ejemplo de tal derivado de fórmula I es el compuesto designado en la presente memoria **13**.

30

Los compuestos de la invención; también denominados en la presente memoria algunas veces mediante los términos "pigmentos" y "sensibilizantes", presentan una polaridad lo suficientemente alta como para ser hidrosolubles e inyectarse en soluciones acuosas sin tensioactivos añadidos. Estos compuestos forman pequeños agregados en soluciones de H₂O/PBS pero sufren monomerización en presencia de seroalbúmina al ser adsorbidos sobre la proteína (Mazor et al, 2003). Por lo tanto, el tránsito de los compuestos al interior y exterior de diferentes células es dependiente de la seroalbúmina.

35

Como un ejemplo de referencia, se muestran en la presente memoria la farmacocinética y la biodistribución para el compuesto preferido **5** y, basándose en estas, se supone que estos y otros derivados de la invención permanecen en la circulación y durante un periodo de tiempo muy corto. Además, tal como se muestra en la Fig. 3C en la presente memoria, el compuesto **5** alcanza una eficacia de PDT muy elevada tras menos de 5 minutos de incubación con cultivos de células endoteliales. Por lo tanto, los derivados de la invención son buenos sensibilizantes para la PDT vascular dirigida. El tratamiento de xenoinjertos de glioma C6 en ratones, tal como se muestra en la presente memoria en las Fig. 6 y 7, demuestra que **5** es fotodinámicamente activo y provoca la erradicación tumoral a concentraciones 10 veces menores que Pd-Bpheid (desvelado en el documento WO 00/33833) o la sal de 13'-(2-sulfoetil)amida dipotásica de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rhodobacterioclorina cargada negativamente (desvelado en el documento WO 2004/045492). El protocolo sugerido con el compuesto **5** tomó en consideración el corto tiempo de eliminación del fármaco (Fig. 4). Basándose en su elevada fototoxicidad y su efecto selectivo en la vasculatura tumoral, estos compuestos pueden usarse para el tratamiento de tumores así como otras anomalías tisulares que dependen de la neovascularización y también contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

40

45

50

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un derivado de Bchl de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 55 Los nuevos compuestos de Bchl de la invención tienen características de absorción óptica y fotofísicas similares a las de Pd-Bchls cargado negativamente, desvelado en el documento PCT/IL03/00973 (WO 2004/045492) y muy similares a las de Pd-Bpheid (WO 00/33833) y por lo tanto, una vez que residen en el tejido tratado, se espera que sean agentes fotodinámicos eficaces. Por lo tanto, pueden ser útiles como fotosensibilizantes y como agentes

terapéuticos y diagnósticos en muchas indicaciones.

En una realización, los compuestos de la invención son útiles en el campo oncológico para el tratamiento mediante PDT de estados precancerosos y de varios tipos de cánceres, tales como, pero sin limitación, melanoma, de próstata, cerebro, colon, ovario, mama, tumores de la pared torácica que surgen a partir de cánceres de mama, piel, pulmón, esófago y vejiga y otros tumores sensibles a hormonas. Los compuestos son útiles para el tratamiento de tumores tanto primarios como metastásicos.

En otra realización, los compuestos de la invención son útiles en áreas no oncológicas. Aparte de la destrucción eficaz de células no deseadas, tales como neoplasias y tumores, mediante PDT, los compuestos de la invención también pueden usarse contra células y bacterias en proliferación. Las células en proliferación y los vasos sanguíneos son la causa principal de la arteriosclerosis, la artritis, la psoriasis y la degeneración macular. Además, los compuestos pueden usarse en el tratamiento de tumores no malignos, tales como la hipertrofia benigna de próstata.

En una realización preferida, los compuestos de la invención pueden usarse en PDT para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, principalmente para la oclusión de vasos y la trombosis en enfermedades de las arterias coronarias, la hiperplasia de la íntima, la restenosis y las placas ateroscleróticas. En una realización más preferida, los compuestos de la invención son para su uso para prevenir o reducir la restenosis dentro de un stent en un individuo que padece una enfermedad cardiovascular que se ha sometido a una angiografía coronaria. En otra realización preferida, los compuestos de la invención son para su uso en un método para el tratamiento de la aterosclerosis mediante la destrucción de la placa ateromatosa en un vaso sanguíneo enfermo.

En otra realización preferida, los compuestos de la invención pueden usarse en PDT para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones dermatológicas, tales como acné, cicatrices por acné, psoriasis, pie de atleta, verrugas, queratosis actínica y manchas en vino de Oporto (malformaciones de pequeños vasos sanguíneos que conectan las venas a las arterias (capilares) localizados en los niveles superiores de la piel).

En otra realización preferida, los compuestos de la invención pueden usarse en PDT para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones oftálmicas, tales como la neovascularización corneal y coroidal y, más preferentemente, en la degeneración macular asociada a la edad (AMD).

En una realización preferida adicional, los compuestos de la invención pueden usarse en PDT para la eliminación de microorganismos, incluyendo virus, hongos y bacterias en muestras y tejidos vivos. Por ejemplo, pueden usarse para la esterilización de productos biológicos, tales como la sangre y es plasma sanguíneo para transfusión, seguido de destrucción por irradiación de agentes infecciosos. Tal como se muestra en la presente memoria, el compuesto de referencia 5 es activo frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Fig. 8).

Los nuevos derivados de Bchl hidrosolubles según la invención sensibilizan a las células endoteliales y/o neoplásicas o a otros tejidos anormales y provocan su destrucción mediante la irradiación ya sea *in vivo* o *ex vivo* usando luz de una longitud de onda adecuada. Se cree que la energía de fotoactivación se transfiere al oxígeno endógeno y lo convierte en oxígeno singlete y/u otras especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales superóxido e hidroxilo, que se consideran responsables del efecto citotóxico. Además, las formas fotoactivadas de algunas de estas Bchl fluorescen, ayudando dicha fluorescencia en la localización de tumores u otros sitios a los que se administran las Bchl.

Debido a su tiempo de retención relativamente corto en la circulación, los compuestos de la invención son particularmente adecuados para la PDT vascular dirigida (VTP), tal como se ha descrito anteriormente para Pd-Bpheid (Tookad®, una marca comercial de Steba Biotech) por los inventores y por otros (documento WO 03/094695; Borle et al. 2003) y por los inventores para bacterioclorofila-serina (Zilberstein et al., 2001). En la VTP, la actividad antitumoral del derivado de bacteriofila no depende de la fotointoxicación directa de células endoteliales individuales sino de la respuesta del tejido vascular a la lesión por la VTP. Por lo tanto, con Tookad, los inventores han demostrado que la fotosensibilización de Tookad mediante iluminación transcutánea guiada por fibra óptica poco tiempo después de su inyección intravenosa da como resultado un daño vascular tumoral oxidativo y el agotamiento de oxígeno, dando lugar a la detención del suministro sanguíneo y a la erradicación del tumor.

En este aspecto, la invención también prevé el uso de los compuestos de la invención en hipertermia y PDT combinadas para el tratamiento de tumores, tal como se ha descrito anteriormente (Kelleher et al., 2003).

Las cargas positivas de los compuestos de la invención potencian significativamente la absorción de las nuevas Bchl en el endotelio tumoral tal como se conoce en la técnica para otros fármacos cargados positivamente que se usan para terapia o para la obtención de imágenes de tumores (Dellian et al. 2000; Hashizume et al. 2000; Campbell et al. 2002). La afinidad potenciada reduce drásticamente la concentración necesaria para la inducción de la muerte celular con tiempos cortos de incubación, según sea necesario para la PDT vascular dirigida. Por lo tanto, estos compuestos permiten la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) tras la excitación que están limitadas a los vasos internos y, de este modo, causan la respuesta selectiva de los vasos anormales, tales como aquellos presentes en tumores y en la degeneración macular asociada a la edad.

Los derivados de Bchl de la presente invención tienen elevada afinidad por la seroalbúmina. Un porcentaje significativo de las moléculas de compuesto están unidas de manera no covalente a seroalbúmina en el plasma. Por lo tanto, después de la purificación y antes de la inyección, les permiten interactuar con seroalbúmina a una relación de ~1:1 en solución acuosa.

5 Para la preparación de las composiciones farmacéuticas, las Bchl de la invención pueden estar liofilizadas, por ejemplo, con manitol y el polvo seco se solubiliza en suero salino o cualquier otra solución acuosa farmacéuticamente aceptable para la inyección i.v. a un paciente (en la sangre, el compuesto se adsorbe a la seroalbúmina) o para la aplicación en una muestra diana *in vitro*. La preparación de las composiciones se lleva a cabo mediante técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como se resume en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1990.

10 Para fines diagnósticos, los derivados de Bchl pueden usarse solos o pueden marcarse con un radioisótopo u otro medio de detección, tal como metales paramagnéticos, tal como se conoce en la técnica. En una realización, el derivado de Bchl se marca radiactivamente mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, usando ⁶⁷Ga, ¹¹¹In, ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc, y se administra al paciente, preferentemente, mediante inyección i.v. Pueden obtenerse imágenes de la ubicación del cáncer mediante procedimientos convencionales, durante un determinado intervalo de tiempo después de su administración.

15 La cantidad de derivado de Bchl que se va a administrar para la terapia PDT se establecerá por el médico experto según la experiencia acumulada con otros derivados de Bchl usados en PDT y variará dependiendo de la elección del derivado usado como principio activo, de la afección que se vaya a tratar, del modo de administración, de la edad y estado del paciente y del criterio del médico.

La longitud de onda de la luz irradiante se selecciona preferentemente para que coincida con la absorbancia máxima del fotosensibilizador de Bchl. Puede determinarse fácilmente la longitud de onda adecuada para cualquiera de los compuestos a partir de su espectro de absorción. En una realización preferida, se usa una fuente de luz fuerte, más preferiblemente láseres a 720-790 nm.

25 También se prevé por la presente invención la conjugación de proteínas, tales como seroalbúmina, seroalbúmina recombinante, incluyendo seroalbúmina humana y estructuras quiméricas de seroalbúmina humana (tal como se describe en Tuan et al. 2002), hormonas, factores de crecimiento o sus derivados, anticuerpos, péptidos que se unen específicamente a receptores de células diana, en particular, receptores de células endoteliales y nutrientes, por ejemplo, tirosina, al resto de Bchl, con el fin de aumentar sus tiempos de retención en tumores y sitios tratados.

30 Al tener los derivados de Bchl la absorción óptica máxima en el infrarrojo cercano se posibilita una mayor profundidad de penetración, a la vez que se mantiene la ubicuidad del sistema natural.

Se espera que el reemplazo del ión de Mg por otros iones metálicos optimice la estabilidad intrínseca y metabólica del resto de Bchl y su cruce intersistema al estado de triplete excitado, también expandiendo de este modo las posibilidades para nuevos procedimientos diagnósticos.

35 La combinación de grupos periféricos cargados positivamente y/o de anticuerpos neoendoteliales y/o de péptidos que tienen elevada afinidad para las células endoteliales dirigirá preferencialmente a los restos de Bchl al tumor o sitio tratado. Como resultado, se espera que la concentración del fotosensibilizante en el compartimento vascular del tejido maligno aumente drásticamente en relación a su concentración en el tejido normal, donde las células están más dispersas, asegurando de este modo la amplificación del efecto de la PDT en el sitio tumoral. Esto posibilita el uso eficaz de dosis de luz menores que el umbral de daño del tejido normal, reduciendo de este modo la necesidad de una irradiación espacialmente bien definida.

40 En una realización más preferida de la presente invención, la diana para el tratamiento con los sensibilizantes de la invención son los vasos sanguíneos anormales, en particular, vasos sanguíneos de tumores sólidos, de la degeneración macular asociada a la edad, la restenosis, la inflamación aguda o la aterosclerosis (Dougherty y Levy, 2003), debido a la diferencia inherente de la sensibilidad de los vasos normales y anormales a los protocolos de PDT sugeridos descritos en la presente memoria.

45 Los derivados de Bchl de la invención pueden usarse además en terapia fotodinámica como adyuvante para otra terapia actual usada para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, para hacerla más eficaz. Por ejemplo, pueden usarse de manera intraoperatoria en combinación con cirugía para ayudar a prevenir la recurrencia del cáncer en grandes áreas superficiales, tales como la pleura (revestimiento del pulmón) y el peritoneo (revestimiento del abdomen), sitios comunes de diseminación de algunos tipos de cáncer, en el tratamiento intraoperatorio de los carcinomas de cabeza y cuello recidivantes o después de la angioplastia de la arteria femoral para prevenir la restenosis. Los compuestos también pueden usarse en el diagnóstico tumoral de PDT intraoperatoria, por ejemplo, de tumores cerebrales.

55 Otra posibilidad según la invención es usar los compuestos de la invención en la PDT de grandes tumores sólidos mediante terapia intersticial, una técnica que implica introducir fibra óptica directamente en tumores usando agujas guiadas por tomografía computarizada (TC). Esto puede ser especialmente útil en áreas que requieran una cirugía extensa, tales como en tumores de cabeza y cuello.

La cantidad de compuesto que se va a administrar y la ruta de administración se determinarán según el tipo de enfermedad, el estado de la enfermedad, la edad y el estado de salud del paciente, pero será mucho menor que la dosificación usada actualmente de Photofrin II® (aproximadamente 5-40 mg HpD/kg de peso corporal) o Tookad® (aproximadamente 2-10 mg/kg de peso corporal).

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran al paciente mediante procedimientos convencionales usados en PDT, por ejemplo, de manera sistémica, particularmente mediante inyección, más preferentemente mediante inyección intravenosa, localmente mediante inyección directa en el tumor sólido o tópicamente para el tratamiento de enfermedades y afecciones cutáneas.

Ahora la invención se ilustrará mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

10 Ejemplos

Por conveniencia y mejor comprensión, la sección de los Ejemplos se divide en dos subsecciones: (I) la Sección Química, que describe la síntesis del derivado de Bchl catiónico y básico **13** y los compuestos de referencia e intermedios **4-12** y **14-75**, y (II) la Sección Biológica, que describe la actividad biológica de los nuevos derivados de Bchl.

15 I SECCIÓN QUÍMICA

En los Ejemplo en la presente memoria, los derivados (**4-75**) y los intermedios (**1-3**) se presentarán mediante sus números arábigos respectivos en negrita y subrayados de acuerdo con la siguiente Lista de Compuestos y el Apéndice. Las fórmulas de algunos de los compuestos aparecen en los Esquemas 1 y 2.

Lista de Compuestos

- 20 **1.** Bacterioclorofila a (Bchl a)
- 2.** Bacteriofeoforbida a (Bpheid)
- 3.** Pd-Bacteriofeoforbida a (Pd-Bpheid)
- 4.** 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-amino etil)amida [Ejemplo 1]
- 25 **5.** sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2=N³-tri-metilamonioetil)amida [Ejemplo 2]
- 6.** 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(3-aminopropil)amida [Ejemplo 3]
- 7.** sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(3-N³-trimetilamonioetil)amida [Ejemplo 4]
- 8.** 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(6-aminohexil)amida [Ejemplo 5]
- 30 **9.** sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(6-N³-trimetilamoniohexil)amida [Ejemplo 6]
- 10.** Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida [Ejemplo 7]
- 11.** Sal difosfato de paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-N³-trimetilamonioetil)amida [Ejemplo 8]
- 35 **12.** Sal cloruro de paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹-(2-N³-trimetilamonioetil)amida [Ejemplo 9]
- 13.** Sal yoduro de éster metílico de O-[Pd-Bpheid]-[N³-trimetilamonio-2-metil]-Serina [Ejemplo 11]
- 14.** Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-guanidinoetil)amida [Ejemplo 12]
- 40 **14a.** Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-trimetilguanidinoetil)amida [Ejemplo 12]
- 15.** Sal citrato de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹-(2-S²-dimetilsulfoniumetil)amida [Ejemplo 13]
- 16.** 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-hidroxi-etil)amida [Ejemplo 14]
- 45 **17.** Sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-P³-trimetilfosfonioetil)amida [Ejemplo 15]

18. 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-dimetilfosfinoetil)amida [Ejemplo 16]

19. Sal dicitrato de 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-As³-trimetilarsonioetil)amida [Ejemplo 17]

20. 3¹-(aminoetilimino)-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida

5 **21.** Paladio 3¹-(aminoetilimino)-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida

22. 3¹-(trimetilamonioetilimino)-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-trimetilamonioetil)amida

23. Paladio 3¹-(trimetilamonioetilimino)-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-trimetilamonioetil)amida

Materiales y Métodos

10 (i) Se preparó Bpheid, **2**, como se ha descrito previamente (Wasielewski y Svec, 1980).

(ii) Se preparó Paladio bacteriofeoforbida (Pd-Bpheid, **3**) como se ha descrito previamente (documento WO 00/33833) o se obtuvo de Steba Biotech Ltd. a través de Negma-Lerads, Francia.

15 (iii) Se adquirieron diaminas (etilendiamina, 1,3-propilendiamina, 1,6-hexilendiamina) y trimetilfosfina (solución 1 M) de Aldrich (Estados Unidos); Se adquirió N-hidroxisuccinimida (NHS) de Sigma (Estados Unidos); Se adquirieron 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e hidrocloreuro de 1-amidinopirazol de Fluka (Suiza); Se adquirió trimetil arsina de Sterm. Se preparó (2-aminoetil)dimetil fosfina de acuerdo con Suzuki et al. (1994) y Kinoshita et al. (1981). Se preparó diacetato de S,S-dimetilcisteamina de acuerdo con el documento US 3.793.370.

(iv) Generalmente se usaron productos químicos y disolventes de calidad analítica excepto al realizar HPLC, donde se aplicaron disolventes de calidad de HPLC.

20 (v) TLC: placas de sílice (Kieselgel-60, Merck, Alemania); cloroformo-metanol (4:1, v/v).

(vi) Se registraron espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H (RMN) en un instrumento Avance DPX 250 (Bruker, Francia) y se indicaron en ppm (δ) campo abajo a partir de tetrametilsilano, con picos de disolvente residual como patrones internos.

25 (vii) Los coeficientes de extinción de los derivados de Pd se determinaron correlacionando la concentración de Pd (usando fotometría de llama con PdCl₂ como patrón) con la densidad óptica de la solución examinada a la longitud de onda particular.

(viii) Se registraron espectros de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS) en un espectrómetro a Platform LCZ (Micromass, Inglaterra).

30 (ix) Se realizó espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para la determinación de concentraciones de Pd usando un instrumento ELAN-6000 (Perkin Elmer, CT).

(x) Se registraron espectros de absorción óptica (UV-VIS) de los diferentes complejo con espectrofotómetros Genesis-2 (Milton Roy, Inglaterra) y V-570 (JASCO, Japón).

(xi) Se realizó HPLC usando un instrumento LC-900 (JASCO, Japón) equipado con un detector de matriz de diodos UV-915.

35 Ejemplos químicos

Ejemplo 1. [Compuesto de referencia] 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida (compuesto 4)

40 Según se representa en el Esquema I, para la síntesis del compuesto **4** (un derivado de rodobacterioclorina en el que el átomo de metal central está ausente), se activó en primer lugar Bpheid **2** en el ácido carboxílico C-17³ mediante N-hidroxisuccinimida (NHS) de la siguiente manera: Se mezclaron 50 mg de Bpheid (compuesto **2**), 80 mg de NHS y 65 mg de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en cloruro de metilo durante una noche a temperatura ambiente. Después, el disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo seco se disolvió en cloroformo (aprox. 50 ml), se retiró por filtración del material y, después de la evaporación del disolvente, se obtuvo el producto, Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida). La conversión fue aproximadamente un 95 % (TLC).

45 Se disolvieron ocho mg (8 mg) de Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, v:v), para posibilitar la apertura del anillo isocíclico de Bpheid y se añadió etilendiamina (1 ml). La mezcla de reacción se trató con argón durante 10 min y se agitó a temperatura ambiente durante una noche a oscuridad, para posibilitar la unión de etilendiamina en ambas posiciones 13¹ y 17³. Después, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad al vacío, se redisolvió en cloroformo (50 ml) y se lavó una vez con agua (aproximadamente 50 ml) para desechar las

trazas de etilendiamina. La solución de cloroformo que contenía el producto se recogió y se evaporó, obteniendo así el compuesto **4**.

ESI-MS (+): 713,89 (M+1), 357,56 ([M+2]/2).

Absorción óptica en cloroformo, λ (absorción relativa): 753 (1,00), 522 (0,28), 354 (1,05) nm.

5 Ejemplo 2. [Compuesto de referencia] Sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-N³-trimetilamonioetil)amida (compuesto 5)

El Compuesto **5** se preparó a partir del compuesto **4**, como se representa en el Esquema I. Se añadieron diisopropiletilamina (DIEA) (27 μ l) y yoduro de metilo (30 μ l, CH₃I) a una solución de **4** (3 mg) en 2 ml de cloroformo. La mezcla de reacción se trató con argón durante 10 min y se agitó durante una noche a temperatura ambiente en la oscuridad. El producto se extrajo dos veces con agua (aproximadamente 50 ml). La capa acuosa se recogió y se evaporó, y el producto se purificó por HPLC (HPLC JASCO, Japón). Columna: C-8 250×20 (YMC, Japón). Disolvente A: tampón citrato 0,05 M, pH 4,0. Disolvente B: acetonitrilo. En la Tabla 1 se describe el perfil de elución del compuesto del título **5** en forma de la sal dicitrato. El espectro de emisión de fluorescencia del compuesto **5** en metanol se muestra en la Fig. 1.

15 Tabla 1. Perfil de purificación en gradiente del compuesto 5

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A	% de B
0	5	100	0
15	5	0	100
17	5	0	100
22	5	100	0
30	0,2	100	0

ESI-MS (+): 990,12 (M-citrato).

RMN en MeOH-d₄: 9,33 (5-H, s), 8,92 (10-H, s), 8,75 (20-H, s), 5,35 y 4,95 (151-CH₂, a), 4,0-4,4 (7,8, 1,7, 18-H, m), 3,80 (15³-Me, s a), 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), 1,91 (7¹-Me, d), 1,61 (18¹-Me, d), 1,09 (8²-Me, t), 3,62, 3,05 (CH₂ de NHCH₂CH₂NMe₃), 3,39 y 3,02 (Me de NHCH₂CH₂NMe₃).

Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 753 (1,00), 519 (0,30), 354 (1,25) nm. La proporción de reparto de octanol/agua es 40/60.

25 Ejemplo 3. [Compuesto de referencia] 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di (3-aminopropil)amida (compuesto 6)

El compuesto **6** se obtuvo como ha descrito en el Ejemplo 1 anterior por reacción de Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) con 1,3-propilendiamina.

ESI-MS (+): 813,86 (M+NH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 739,74 (M).

Absorción óptica en cloroformo, λ (absorción relativa): 753 (1,00), 522 (0,29), 354 (1,22) nm.

30 Ejemplo 4. [Compuesto de referencia] Sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di (3-N³-trimetilamoniopropil)amida (compuesto 7)

El compuesto **7** se obtuvo a partir del compuesto **6** por reacción con DIEA y CH₃I como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior.

ESI-MS (+): 413,62 ([M-2×citrato]/2). La proporción de reparto de octanol/agua es 50/50.

35 Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 753 (1,00), 519 (0,29), 354 (1,21) nm.

Ejemplo 5. [Compuesto de referencia] 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(6-aminohexil)amida (compuesto 8)

El compuesto **8** se obtuvo como ha descrito en el Ejemplo 1 anterior por reacción de Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) con 1,6-hexilendiamina. Características del compuesto **8**:

ESI-MS (+): 826,20 (M+2), 413,62 ([M+2]/2)

Ejemplo 6. [Compuesto de referencia] Sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(6-N³-trimetilamoniohexil)amida (compuesto 9)

5 El compuesto 9 se obtuvo a partir del compuesto 8 por reacción con DIEA y CH₃I como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior.

ESI-MS (+): 455,89 ([M-2xcitrato]/2). La proporción de reparto de octanol/agua es 75/25.

Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 753 (1,00), 519 (0,30), 354 (1,31) nm.

Ejemplo 7. [Compuesto de referencia] Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida (compuesto 10)

10 El compuesto 10 se obtuvo por reacción de Pd-Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) con etilendiamina como se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente.

ESI-MS (+): 817,59 (M+1), 409,26 ([M+2]/2)

Absorción óptica en MeOH (absorción relativa): 747 (1,00), 516 (0,13), 384 (0,41), 330 (0,50) nm.

15 **Ejemplo 8. [Compuesto de referencia] Sal difosfato de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-N³-trimetilamonioetil)amida (compuesto 11)**

El compuesto 11 se obtuvo a partir del compuesto 10 por reacción con DIEA y CH₃I como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior pero usando tampón fosfato (0,05 M, pH 5,0) como Disolvente A en la etapa de purificación de HPLC.

ESI-MS (+): 451,38 ([M-2 x fosfato]/2).

20 Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 747 (1,00), 516 (0,13), 384 (0,41), 330 (0,50) nm.

Ejemplo 9. [Compuesto de referencia] Sal cloruro de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹-(2-N³-trimetilamonioetil)amida (compuesto 12)

25 Según se representa en el Esquema I, el compuesto 3, Pd-Bpheid (10 mg), se agitó con sal hidrocioruro de cloruro de 2-N³-trimetilamonio-etilamina (15 mg) en DMF (2 ml), en presencia de trietilamina (0,5 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante una noche, abriendo así el anillo isocíclico de la molécula de Bpheid. Después, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el producto se extrajo con acetonitrilo. Después de la evaporación del disolvente, el compuesto 12 se purificó por HPLC en condiciones similares a la purificación de 5 en el Ejemplo 2.

ESI-MS (+): 839 (M-Cl + Na-H), 817,82 (M-Cl) m/z.

30 Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 747 (1,00), 516 (0,13), 384 (0,41), 330 (0,50) nm.

Ejemplo 10. Éster metílico de O-[Pd-Bpheid]-serina

35 Este compuesto se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento US 6.333.319, de la siguiente manera: El compuesto 3, Pd-Bpheid (50 mg), N-Tritil-L-Ser metil éster (200 mg), DCC (16 mg, 0,08 mmol) y N-dimetilaminopiridina (DMAP) (10 mg) se disolvieron en 20 ml de diclorometano y se agitaron durante una noche a temperatura ambiente en condiciones atmosféricas inertes (argón). El éster resultante se purificó por cromatografía en columna sobre sílice, con cloroformo como eluyente. El grupo protector de tritilo se retiró añadiendo ácido trifluoroacético a la solución de cloroformo (a una concentración final de 1 % vol) durante 1-3 min, la mezcla de reacción se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. El producto desprotegido se purificó en una columna de sílice de la siguiente manera: primero, el subproducto principal se retiró por elución con acetona a 5 % en cloroformo, y después el producto, O-[Pd-Bpheid]-Ser metil éster, se eluyó con metanol a 2 % en cloroformo.

45 ¹H RMN en CDCl₃: 9,21 (s, 1H, H-α), 8,54 (s, 1H, H-β), 8,48 (s, 1H, H-δ), 5,93 (s, 1H, H-10), 4,37 (m, 2H, H-3,8), 4,22 (m, 1H, Ser-CH), 4,10 (m, 2H, H-4,7), 3,88 (s, 3H, CH₃-10b), 3,67 (s, 3H, Ser-OCH₃), 3,63 (m, 2H, Ser-CH₂), 3,48 (s, 3H, CH₃-1a), 3,39 (s, 3H, CH₃-5a), 3,09 (s, 3H, CH₃-2b), 2,48 (m, 1H, Ser-OH), 2,15-2,30 (m, 4H, CH₂-7a,7b), 2,11 (m, 2H, CH₂-4a), 1,78 (d, 3H, CH₃-3a), 1,68 (d, 3H, CH₃-8a), 1,08 (t, 3H, CH₃-4b).

Ejemplo 11. Sal yoduro de éster metílico de O-[Pd-Bpheid]-[N³-trimetilamonio-2-metil]-serina (compuesto 13)

El éster metílico de O-[Pd-Bpheid]-Ser obtenido en el Ejemplo 10 anteriormente (4 mg) se disolvió en cloroformo (3 ml) y se agitó con yoduro de metilo (35 μl) y DIEA (30 μl) durante una noche a temperatura ambiente. El producto 13 se obtuvo mediante evaporación de la mezcla de reacción y purificación sobre una columna de sílice con cloroformo-

metanol (3:1, v:v) como eluyente.

ESI-MS (+): 872,75 (M-I) m/z.

Absorción óptica en agua, λ (absorción relativa): 747 (1,00), 516 (0,13), 384 (0,41), 330 (0,50) nm.

5 **Ejemplo 12. [Compuesto de referencia] Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-guanidinoetil)amida (compuesto 14).**

Según se representa en el Esquema I, se mezcló Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-aminoetil)amida, compuesto 10 (8 mg), con DIEA (30 μ l) y 1-amidinopirazol (6 mg) en cloroformo-metanol (1:1, 15 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 h, la mezcla de reacción se evaporó y el compuesto del título 14 se purificó por HPLC en condiciones similares a la purificación del 4 en el Ejemplo 1.

10 ESI-MS (+): 451,69 ([M-2×citrato]/2).

Mediante reacción del compuesto 14 con yoduro de metilo, se obtiene la paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-trimetilguanidinoetil)amida cargada positivamente (14a).

Ejemplo 13. [Compuesto de referencia] Sal citrato de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹-(2-S²-dimetilsulfoniumetil)amida (compuesto 15)

15 Se agitó Pd-Bpheid, 3 (12 mg) con diacetato de S,S-dimetilcisteamina (20 mg) en DMF (2 ml), en presencia de trietilamina (0,5 ml) y en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, y el compuesto del título 15 se purificó por HPLC, en condiciones como se han descrito para el compuesto 5 en el Ejemplo 2.

ESI-MS (+): 844,78 (M - citrato + Na - H), 820,62 (M - citrato) m/z.

20 **Ejemplo 14. [Compuesto de referencia] 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-hidroxietil)amida (compuesto 16)**

Se hizo reaccionar Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) (10 mg), obtenida como se describe en el Ejemplo 1, con etanolamina (1 ml) en una mezcla de cloroformo-metanol (6 ml). La mezcla de reacción se trató con argón durante 10 min y se agitó a temperatura ambiente durante una noche en la oscuridad. El compuesto 16 se obtuvo tras purificación sobre una columna de sílice y elución con cloroformo-metanol (10:1, vol/vol).

25 ESI-MS (+): 737,88 (M+Na), 715,42 (M+H) m/z.

Ejemplo 15. [Compuesto de referencia] Sal dicitrato de 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-P³-trimetilfosfonioetil)amida (compuesto 17)

30 El compuesto 16 (8 mg) se disolvió en anhídrido trifluoroacético (1 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad después de 30 min. El producto seco se disolvió en una solución de trimetilfosfina en tetrahidrofurano (0,5 mM, 2 ml), y la mezcla se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se evaporó para retirar el exceso de trimetilfosfina y el compuesto del título 17 se obtuvo tras purificación por HPLC, en las condiciones descritas para la purificación de 5 en el Ejemplo 2.

ESI-MS (+): 438,54 ([M-2 × citrato]/2+Na-H), 416,46 ([M-2 × citrato]/2) m/z.

35 **Ejemplo 16. [Compuesto de referencia] 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-dimetilfosfinoetil)amida (compuesto 18)**

Se hizo reaccionar Bpheid-17³-(1-oxi-succinimida) (10 mg), obtenida como se describe en el Ejemplo 1, con (2-aminoetil)dimetilfosfina (200 mg) en cloroformo (5 ml) a temperatura ambiente durante una noche. El compuesto del título 18 se purificó sobre una columna de sílice y se eluyó con cloroformo-acetona (15:1, vol/vol).

ESI-MS (+): 825,34 (M+Na), 803,88 (M+H) m/z.

40 El tratamiento del compuesto 18 con yoduro de metilo en presencia de DIEA condujo a un producto que tenía un grupo fosfonio cuaternario que, después de purificación por HPLC, se encontró idéntico al compuesto 17 obtenido en el Ejemplo 15 anteriormente.

Ejemplo 17. [Compuesto de referencia] Sal dicitrato de 3¹-Oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina 13¹,17³-di(2-As³-trimetilarsonioetil)amida (compuesto 19)

45 El compuesto 16 (8 mg) se disolvió en anhídrido trifluoroacético (1 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad después de 30 min. El producto seco se disolvió en una solución de trimetilarsina en tetrahidrofurano (solución 0,5 mM, 2 ml; preparado a partir de reactivo puro, N.º Cat. 33-3750, Strem), y la mezcla se agitó en una atmósfera de argón a 45 °C, durante 3 días. Después, la mezcla se evaporó para retirar el exceso de trimetilarsina, y el producto del título 19 se purificó por HPLC, en condiciones como se han descrito para la purificación de 5 en el Ejemplo 2.

ESI = MS (+): 1133,94 ([M-citrato]+Na-H), 460,40 ([M-2 × citrato]/2) m/z.

Ejemplo 18. [Compuesto de referencia] Acetato de paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N³-trimetilamonioetil)amida (sal) (compuesto 24)

La sal cloruro de este compuesto se describe en el Ejemplo 9 (compuesto 12).

- 5 Para la preparación del compuesto del título, se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, 3 (28 µmol), 24 mg de hidrocloreto de cloruro de (2-aminoetil)trimetilamonio (137 µmol) y ascorbato sódico (1 µmol) a temperatura ambiente en 1 ml de una mezcla desgasificada al vacío de 1:1 de trietilamina en DMF en una atmósfera de argón. Al final, la mezcla de reacción se evaporó al vacío a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de agua y el producto se cargó en una columna Sep-Pak RP-18 (Waters), se lavó en primer lugar con 20 ml de agua, después con 10 ml de una solución a 10 % de acetonitrilo en agua, después se luyó con una solución a 50 % de acetonitrilo en agua y se evaporó. Todo el tratamiento se realizó en la caja de guantes en una atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación.

Estructura de fórmula: C₄₀H₅₄N₆O₆Pd + 1 CH₃COO⁻

Peso molecular: 821,3 + 59,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

- 15 Tiempo de retención: 13,05 min.

M.S (+): m/z = 821

espectro UV-Vis: 756 nm, 532 nm, 386 nm, 328 nm

Ejemplo 19. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida (compuesto 25)

- 20 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, 3 (28 µmol) y 1 ml (8,66 mmol) de N,N-dimetil etilendiamina (95 %), a temperatura ambiente durante 2 horas en una atmósfera de argón. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 3 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min

- 25 Estructura de fórmula: C₃₉H₅₀N₆O₆Pd + 1 CH₃COOH

Peso molecular: 803,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,46 min.

M.S (+): m/z = 803

- 30 espectro UV-Vis (MeOH): 748 nm, 521 nm, 384 nm, 332 nm

Ejemplo 20. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(3-N²-dimetilaminopropil)amida (compuesto 26)

- 35 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, 3 (28 µmol) y 1 ml (7,88 mmol) de 3-dimetilamino-1-propilamina (99 %), a temperatura ambiente durante 2 horas en una atmósfera de argón. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 5 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₀H₅₂N₆O₆Pd + 1 CH₃COOH

Peso molecular: 817,30 + 60,0

- 40 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,26 min.

M.S (+): m/z = 817

espectro UV-Vis (MeOH): 749 nm, 516 nm, 380 nm; 334 nm

- 45 **Ejemplo 21. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-[(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 27)**

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 2 ml (18,35 mmol) de dietilenotriamina (99 %), a temperatura ambiente durante 3 horas en una atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con 5 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

5

Estructura de fórmula: $C_{39}H_{51}N_7O_6Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 818,3 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 12,91 min.

10

M.S (+): m/z = 818.

espectro UV-Vis (MeOH): 752 nm, 519 nm, 380 nm, 334 nm.

Ejemplo 22. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-([2-bis(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto **28)**

15

Se agitaron 20 mg (28 μ mol) de Pd-Bpheid, **3** con 1 ml (6,7 mmol) de tris-(2-aminoetil)amina en 1 ml de N-metil-2-pirrolidona a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 90 minutos. El producto se purificó por inyección en HPLC, que contenía una columna C-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{41}H_{56}N_8O_6Pd + 3 CH_3COOH$

Peso molecular: 861,4 + 180,1

20

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

M.S (+): m/z = 861.

espectro UV-Vis (MeOH): 750 nm, 516 nm, 354 nm.

Ejemplo 23. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-morfolino-N-etil)amida (compuesto **29)**

25

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 1 ml (7,5 mmol) de N-(2-aminoetil)morfolina (98 %), a temperatura ambiente durante 4 horas en una atmósfera de argón. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 3 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

30

Estructura de fórmula: $C_{41}H_{52}N_6O_7Pd + 1 CH_3COOH$

Peso molecular: 845,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 15,68 min.

M.S (+): m/z = 845.

35

espectro UV-Vis (MeOH): 749 nm, 516 nm, 383 nm, 331 nm.

Ejemplo 24. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-piperazino-N-etil)amida (compuesto **30)**

40

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 0,5 ml (3,7 mmol) de 1-(2-aminoetil)piperazina (97 %), a temperatura ambiente durante 19 horas en una atmósfera de argón. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 1 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 30 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{41}H_{53}N_7O_6Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 844,3 + 120,1

45

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,37 min.

M.S (+): m/z = 844

espectro UV-Vis (MeOH): 747 nm, 516 nm, 380 nm, 330 nm

5 **Ejemplo 25. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-[(2-N²-dietilaminoetil)amino]etil)amida (compuesto 31)**

10 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 µmol) y 1 ml (2,66 mmol) de N,N-dietildietilenotriamina (98 %), a temperatura ambiente durante 4 horas en una atmósfera de argón. Al final de la reacción, la mezcla se diluyó con 1 ml de agua y se neutralizó con ácido acético glacial. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 30 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₃H₅₉N₇O₆Pd + 2 CH₃COOH

Peso molecular: 874,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,77 min.

15 M.S (+): m/z = 874

espectro UV-Vis (MeOH): 742 nm, 513 nm, 380 nm, 330 nm

20 **Ejemplo 26. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(3-[(3-aminopropil)amino]propil)amida (compuesto 32)**

20 Se agitaron Pd-Bpheid **3** (30 mg, 420 µmol) y bis(3-aminopropil)amina (3 ml, 20,61 mmol) a temperatura ambiente durante 2 horas en una atmósfera de argón. Después de la finalización de la reacción (TLC) la mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y la solución se extrajo con n-butanol (dos veces, con 100 y 50 ml, respectivamente) en un embudo de separación. El extracto butanólico se lavó tres veces con 50 ml de agua. La separación de fases se mejoró añadiendo porciones de 10 ml de una solución acuosa a 25 % de NaCl. El extracto butanólico se secó con MgSO₄ y se evaporó a presión reducida. El sólido se redisolvió en ácido acético acuoso a 10 % (10 ml) y el producto se precipitó mediante la adición de un volumen de diez veces de acetona. El precipitado se redisolvió en ácido acético acuoso a 0,5 % (13 ml) y se liofilizó.

Estructura de fórmula: C₄₁R₅₃N₇O₆Pd + 2 CH₃COOH

Peso molecular: 846,5 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

30 Tiempo de retención: 13,63 min.

M.S (+): m/z = 846

espectro UV-Vis (MeOH): 752 nm, 519 nm, 380 nm, 334 nm.

35 **Ejemplo 27. [Compuesto de referencia] Sal diacetato de paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-N³-trimetilamonioetil)amida (compuesto 33)**

La sal difosfato de este compuesto se describe en el Ejemplo 8 (compuesto **11**)

40 Para la preparación del compuesto del título, se agitaron 101 mg de Pd-Bpheid, **3** (141 µmol) y 10 ml de etilendiamina (148 mmol), a temperatura ambiente durante 2 horas en una atmósfera de argón. Después, se introdujo en la reacción una solución de 659 mg de reactivo de acoplamiento hexafluorofosfato de bromo-trispirrolidino-fosfonio (PyBroP) (1,4 mmol) en 2,3 ml de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 5 ml de agua. La mezcla se diluyó con 250 ml de cloroformo y se lavó con 200 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. Se obtuvieron aproximadamente 245 mg del compuesto **10**.

45 El compuesto **10** (245 mg) se disolvió en 90 ml de cloroformo. La mezcla de reacción se desgasificó con argón durante aproximadamente 5 min antes de introducir diisopropil etil amina (DIEA) (2,6 ml, 14,88 mmol). Después de una agitación de 5 min, se introdujo CH₃I (2 ml, 31,8 mmol) en la reacción. Se pasó una corriente lenta de argón durante 2 min más. La reacción se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad durante una noche.

Después de este periodo se pasó una corriente moderada de argón a través de la solución de reacción para retirar el CH_3I sin reaccionar. El disolvente se evaporó y el producto restante se disolvió en 350 ml de agua y se lavó (4 x 100 ml) con acetato de etilo. La solución acuosa se concentró por evaporación de agua a un volumen final de 150 ml.

- 5 El producto se purificó con porciones de 50 ml de solución acuosa en una columna Sep-Pack, se prelavó inicialmente con 120 ml de agua y 200 ml de ácido acético acuoso a 1 %, mediante elución con 5 ml de acetonitrilo, que contenía soluciones a 2 % de ácido acético en acetonitrilo de varias separaciones, se combinaron y el disolvente se evaporó. El producto purificado se redisolvió en 3 ml de agua y se liofilizó.

Fórmula: $\text{C}_{45}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{O}_5\text{Pd} + 2 \text{CH}_3\text{COO}^-$

Peso molecular: 904,4 + 118,1

- 10 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 11,35min.

M.S (+): m/z = 904

espectro UV-Vis (MeOH): 747 nm, 514 nm, 382 nm, 330 nm

- 15 **Ejemplo 28. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(3-aminopropil)amida (compuesto 34)**

- Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μmol) y 2 ml (23,7 mmol) de 1, 3-diaminopropano recién destilado, a temperatura ambiente durante 75 min, en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 138,8 mg de PyBroP (297 μmol) en 200 μl de cloroformo. La mezcla se agitó durante 30 min más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla se diluyó con 50 ml de cloroformo y se lavó con 2 x 100 ml de agua: La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó. El producto final se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_5\text{Pd} + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$

- 25 Peso molecular: 845,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 10,81 min.

M.S (+): m/z = 845

espectro UV-Vis (MeOH): 745 nm, 514 nm, 380 nm, 330 nm

- 30 **Ejemplo 29. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(4-aminobutil)amida (compuesto 35)**

- Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μmol) y 2 ml (19,7 mmol) de 1,4-diaminobutano, a 30 °C durante 1 hora en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 133,4 mg de PyBroP (286 μmol) en 200 μl de cloroformo. La mezcla se agitó durante 60 min más a 30 °C en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. El exceso de amina se evaporó y el producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_3\text{Pd} + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$

- 40 Peso molecular: 873,2 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 5,11 min.

M.S (+): m/z = 873

espectro UV-Vis (MeOH): 748 nm, 516 nm, 384 nm, 332 nm

- 45 **Ejemplo 30. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-aminoetil)amida (compuesto 10)**

5 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 2 ml (29,6 mmol) de etilendiamina, a temperatura ambiente durante 40 min en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 136,8 mg de PyBroP (293 μ mol) en 200 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 2 ml de agua. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de cloroformo y se lavó dos veces con 100 ml de agua. El disolvente se evaporó y el producto final se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{39}H_{50}N_8O_5Pd + 2 CH_3COOH$

10 Peso molecular: 817,3 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 10,13 min.

M.S (+): m/z = 817

espectro UV-Vis (MeOH): 750 nm, 516 nm, 384 nm, 332 nm

15 **Ejemplo 31. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-N²-dimetilaminoetil)amida (compuesto **36**)**

20 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 1,5 ml (13 mmol) de N,N-dimetiletildiamina, a temperatura ambiente durante 1 hora en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 131 mg de PyBroP (281 μ mol) en 1,70 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de acetato de etilo y se lavó dos veces con 100 ml de agua. El disolvente se evaporó y el producto final se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

25 Estructura de fórmula: $C_{43}H_{58}N_8O_5Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 873,2 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 6,56 min.

M.S (+): m/z = 873

30 espectro UV-Vis (MeOH): 748 nm, 516 nm, 384 nm, 332 nm

Ejemplo 32. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(3-N²-dimetilaminopropil)amida (compuesto **37)**

35 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 1,5 ml (11,8 mmol) de 3-dimetilamino-1-propilamina, a temperatura ambiente durante 1 hora en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 130,6 mg de PyBroP (280 μ mol) en 170 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de acetato de etilo y se lavó dos veces con 100 ml de agua. Las capas acuosas se lavaron con 100 ml de acetato de etilo. Ambas capas orgánicas se juntaron y se evaporaron. El producto final se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{45}H_{62}NgO_5Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 901,2 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

45 Tiempo de retención: 12,9 min.

M.S (+): m/z = 901

espectro UV-Vis (MeOH): 746 nm, 516 nm, 384 nm, 332 nm

Ejemplo 33. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di-(2-[(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 38)

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 2 ml (18,3 mmol) de dietilenotriamina, a temperatura ambiente durante 90 minutos en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 130 mg de PyBroP (279 μ mol) en 700 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 90 min más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético glacial y se diluyó con agua. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{43}H_{60}N_{10}O_5Pd + 4 CH_3COOH$

Peso molecular: 904,1 + 240,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 1,95 min (agregado)

M.S (+): m/z = 904

espectro UV-Vis (MeOH): 745 nm, 514 nm, 382 nm, 330 nm

Ejemplo 34. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di-(2-[(2-N²-dietilaminoetil)amino]etil)amida (compuesto 39)

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 1 ml (5,33 mmol) de N,N-dietil-dietilenotriamina, a temperatura ambiente durante 4 horas en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 130 mg de PyBroP (279 μ mol) en 500 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2,5 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético glacial y se diluyó en agua. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{51}H_{76}N_{10}O_5Pd + 4 CH_3COOH$.

Peso molecular: 1015,5 + 240,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 5,3-6,6 min.

M.S (+): m/z = 1015

espectro UV-Vis (MeOH): 743 nm, 512 nm, 380 nm, 329 nm

Ejemplo 35. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-morfolino-N-etil)amida (compuesto 40)

Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 μ mol) y 2 ml (15,2 mmol) de N-(2-aminoetil)morfolina, a temperatura ambiente durante 2 horas en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 136 mg de PyBroP (291 μ mol) en 700 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético glacial y se diluyó en agua. La mezcla se disolvió en agua y se lavó con cloroformo, 3 x 100 ml. El disolvente orgánico se evaporó y el producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{47}H_{62}N_8O_7Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 958,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 11,6 min.

M.S (+): m/z = 958

espectro UV-Vis (MeOH): 745 nm, 513 nm, 381 nm, 330 nm.

Ejemplo 36. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-piperazin-N-etil)amida (compuesto 41)

5 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 µmol) y 1 ml (7,4 mmol) de N-(2-aminoetil)piperazina (97 %), a temperatura ambiente durante 22 horas en una atmósfera de argón. Después de este periodo, se introdujo en el recipiente de reacción una solución de 130 mg de PyBroP (279 µmol) en 500 µl de cloroformo. La mezcla se agitó durante 3,5 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético glacial y se diluyó en agua. El producto se purificó por HPLC preparativa, columna C-18, fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 40 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₇H₆₄N₁₀O₅Pd + 4 CH₃COOH

Peso molecular: 955,5 + 240,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

15 Tiempo de retención: 11,4 min.

M.S (+): m/z = 955

espectro UV-Vis (MeOH): 744 nm, 513 nm, 380 nm, 329 nm.

Ejemplo 37. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di-(3-[(3-aminopropil)amino]propil)amida (compuesto 42)

20 *Preparación de éster activo-* Típicamente, se disolvieron 25 mg de Pd-Bpheid, **3** (35 µmol) y 39,4 mg de N-hidroxisuccinimida (HOSu o NHS) (342 µmol) en 1 ml de DMF seca en una atmósfera de argón. Se añadieron 31 mg de 1;3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (150 µmol) en 500 µl de DMF seca. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la DMF se evaporó y el producto se purificó por cromatografía líquida de SiO₂ con CHCl₃ a 95 %:EtOH a 5 % como eluyente. Después, el disolvente se evaporó para producir 55 mg de éster activado. Los experimentos mostraron que no era necesario aislar y purificar el éster activo.

25 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid-OSu (24,7 µmol) a temperatura ambiente con 1 ml de bis(3-aminopropil)amina recién destilada durante 3 horas en una atmósfera de argón. Después, la mezcla de reacción se evaporó al vacío a temperatura ambiente. Después de la evaporación, se añadió 1 ml de agua al residuo y el producto se purificó por HPLC preparativa en una C-18, Fase móvil: A = ácido acético a 0,1 %, pH = 7,2, en agua. B = ácido acético a 0,1 %, pH = 7,2, en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-2 min) a 90 % de B (20-22 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₇H₆₈N₁₀O₅Pd + 4 CH₃COOH

Peso molecular: 959,4 + 240,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 12,83 min.

35 M.S (+): m/z = 959

espectro UV-Vis: 750 nm, 516 nm, 386 nm, 330 nm, 268 nm

Ejemplo 38. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di([2-bis(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 43)

40 Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid-OSu (24,7 µmol) preparado en el Ejemplo 38 anteriormente, a temperatura ambiente con 1 ml de tris(2-aminoetil)amina durante 3 horas en una atmósfera de argón. Después, la mezcla de reacción se evaporó al vacío a temperatura ambiente. Después, se añadió 1 ml de agua al residuo y el producto se purificó en una HPLC preparativa con una columna de sílice C-18, Fase móvil: A = ácido acético a 0,1 %, pH = 7,2, en agua. B = ácido acético a 0,1 %, pH = 7,2, en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-2 min) a 90 % de B (20-22 min). Caudal: 4 ml/min.

45 Estructura de fórmula: C₄₇H₇₀N₁₂O₅Pd + 6 CH₃COOH

Peso molecular: 989,4 + 360,3

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 114,15 min.

M.S (+): m/z = 989

espectro UV-Vis: 750 nm, 516 nm, 386 nm, 332 nm

5 **Ejemplo 39. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-N-(2'-piridil)aminoetil)amida (compuesto 44)**

1) Se disolvieron 500 mg de 2-cloropiridina (4,40 mmol) en 3,0 ml de etilendiamina (44,0 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 6 horas a 100 °C. Al final, el exceso de etilendiamina se evaporó al vacío a temperatura ambiente. El producto N-(2-piridil)etilendiamina se purificó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio.

10 Análisis de TLC sobre la lámina de Gel de Sílice 60 F₂₅₄ Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio. Fr de producto = 0,43.

2) Se añadieron 30 mg de Pd-Bpheid-OSu (0,037 mmol, preparado en el Ejemplo 38) a una solución de 110 mg de N-(2-piridil)etilendiamina (0,80 mmol) en dimetilformamida seca. La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón.

15 El producto se purificó por HPLC preparativa, usando una columna C-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₉H₅₆N₁₀O₅Pd + 4 CH₃COOH

Peso molecular: 971,5 + 240,2

20 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,96 min.

M.S (+): m/z = 971

espectro UV-Vis: 750 nm, 516 nm, 386 nm, 332 nm

25 **Ejemplo 40. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹,17³-di(2-N²-dietilaminoetil)amida (compuesto 45)**

1) Se agitaron 30 mg de Pd-Bpheid, **3** (42 μmol) en 300 μl de 2-(dietilamino)etilamina (2,11 mmol) a temperatura ambiente durante 3 horas en una atmósfera de argón. El producto de aminólisis se analizó por HPLC-MS.

Tiempo de retención: 15,49 min. M.S (+): m/z = 831

30 2) Una solución de 40 mg de PyBroP (0,086 mmol) en 200 μl de DMF se añadió a la mezcla de reacción previa. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas en una atmósfera de argón.

El producto se purificó por HPLC preparativa, usando una columna C-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₇H₆₆N₈O₅Pd + 2 CH₃COOH

35 Peso molecular: 931,5 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 12,81 min.

M.S (+): m/z = 931

espectro UV-Vis: 750 nm, 516 nm, 386 nm, 332 nm

40 **Ejemplo 41. [Compuesto de referencia] Sal acetato de paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxiopropil)amida-17³-(2-N³-trimetil amonioetil)amida (compuesto 46)**

45 1) Se disolvió Pd-Bpheid, **3** (100 mg, 0,140 mmol) en 1,0 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) y 3-amino-1,2-propanodiol (405 mg, 4,45 mmol). La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto obtenido (aducto de Pd-Bpheid-aminopropanodiol) se purificó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Fase móvil: 90 % de metanol - 10 % de solución de amonio.

Análisis de TLC sobre la lámina de Gel de Sílice 60 F₂₅₄ Fase móvil: 80 % de metanol, 20 % de solución de amonio. Fr de producto = 0,86.

El producto se analizó por HPLC-MS. Tiempo de retención: 18,42 min.

M.S (+): m/z = 805

- 5 2) El aducto de Pd-Bpheid-aminopropanodiol (37 mg, 0,052 mmol) se disolvió en 1,5 ml de NMP. Se añadieron un reactivo de acoplamiento hexafluorofosfato de benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) (200 mg, 0,52 mmol), trietilamina (110 µl, 0,78 mmol) e hidrocloreuro de cloruro de (2-aminoetil)trimetilamonio (46 mg, 0,26 mmol). La solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC, usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetoneitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₃H₆₁N₇O₇Pd + CH₃COO⁻

Peso molecular: 892,4 + 59,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,34 min.

- 15 M.S (+): m/z = 892

Ejemplo 42. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-aminoetil)amida (compuesto 47)

1) Se realizaron aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe en el Ejemplo 42 para el compuesto 46.

- 20 2) Se disolvieron 37 mg del aducto de Pd-Bpheid-aminopropanodiol (0,052 mmol) en 300 µl de NMP. Se añadieron 22 mg de PyBroP (0,046 mmol), 10 µl de etilendiamina (0,155 mmol). La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetoneitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

- 25 Estructura de fórmula: C₄₀H₅₃N₇O₇Pd + CH₃COOH

Peso molecular: 848,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,15 min.

M.S (+): m/z = 848

- 30 **Ejemplo 43. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-aminoetil)amida-17³-(2,3-dihidroxipropil)amida (compuesto 48)**

1) Se agitaron 30 mg de Pd-Bpheid, 3 (42 µmol) en 1 ml (15 mmol) de etilendiamina, durante 30 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Al final, el exceso de etilendiamina se evaporó al vacío a temperatura ambiente, y después la solución se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó para eliminar las trazas de etilendiamina.

- 2) El producto de aminólisis se hizo reaccionar con 80 mg (0,17 mmol) de PyBroP disuelto en 100 µl de cloroformo y 80 mg (0,88 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol disuelto en 2 ml de NMP a temperatura ambiente, en una atmósfera de argón durante 16 horas. El producto se purificó por HPLC, usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetoneitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₀H₅₃N₇O₇Pd + CH₃COOH

Peso molecular: 848,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 8,43 min.

- 45 M.S (+): m/z = 848

Ejemplo 44. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-N²-dimetil aminoetil)amida (compuesto 49)

1) Se realizaron aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para el compuesto **46** en el Ejemplo 42.

- 5 2) El aducto de Pd-Bpheid aminopropanodiol (25 mg, 0,031 mmol) se disolvió en 300 µl de NMP. Se añadieron HBTU (120 mg, 0,32 mmol), N,N-dimetiletilendiamina (14 mg, 0,16 mmol) y carbonato potásico (88 mg). Se añadió una solución tampón a pH = 7. La solución se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

10 Estructura de fórmula: C₄₂H₅₇N₇O₇Pd + CH₃COOH

Peso molecular: 876,3 +60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,74 min.

M.S (+): m/z = 876

15 Ejemplo 45. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(2,3-dihidroxipropil)amida (compuesto 50)

1) Se realizaron aminólisis de Pd-Bpheid con N,N-dimetil etilendiamina y purificación posterior como se describe para el compuesto **25** en el Ejemplo 20.

- 20 2) El producto de aminólisis se hizo reaccionar con 80 mg (0,17 mmol) de PyBroP disuelto en 100 µl de cloroformo y 80 mg (0,88 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol disuelto en 2 ml de NMP a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 16 horas. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₂H₅₇N₇O₇Pd + CH₃COOH

25 Peso molecular: 876,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 12,31 min.

M.S (+): m/z = 876

30 Ejemplo 46. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-[(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 51)

1) Se realizaron aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para **46** en el Ejemplo 42.

- 35 2) Se disolvieron 12 mg del aducto de Pd-Bpheid aminopropanodiol (0,015 mmol) en 400 µl de DMF. Se añadieron 34 mg de HBTU (0,64 mmol), 21 µl de trietilamina (0,15 mmol) y 16 µl de dietilenotriamina (0,15 mmol). La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: C₄₂H₅₈N₈O₇Pd + 2CH₃COOH

Peso molecular: 891,4 + 120,1

40 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 12,42 min.

M.S (+): m/z = 891

Ejemplo 47. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-[(2-N²-dietil aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 52)

- 45 1) Se realizaron aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para

46 en el Ejemplo 42.

- 2) Se disolvieron 20 mg del aducto de Pd-Bpheid aminopropanodiol (0,025 mmol) en 1,0 ml de NMP. Se añadieron 94 mg de HBTU (0,25 mmol), 52 μ l de trietilamina (0,375 mmol) y 23 μ l de N,N-dietildietilenotriamina (0,125 mmol). La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{46}H_{66}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 947,5 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

10 Tiempo de retención: 11,70 min.

M.S (+): m/z = 947

Ejemplo 48. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-morfolino-N-etil)amida (compuesto 53)

- 1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para **46** en el Ejemplo 42.

- 2) Se disolvieron 50 mg del aducto de Pd-Bpheid aminopropanodiol (0,07 mmol) en 800 μ l de DMF seca. Se añadieron 80 mg de HOSu (0,70 mmol) y 216 mg de DCC (1,04 mmol). La solución se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por inyección en HPLC, usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

- 3) Se disolvieron 7,0 mg del Pd-Bpheid-aminopropanodiol-OSu-compuesto activado $7,77 \times 10^{-3}$ mmol) en 200 μ l de DMF seca. Se añadieron 25 μ l de N-metil-morfolina seca (0,23 mmol) y 30 μ l de N-(2-aminoetil)morfolina (0,23 mmol). La solución se agitó durante 75 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min

Estructura de fórmula: $C_{44}H_{59}N_7O_8Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 918,4 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,05 min.

30 M.S (+): m/z = 918

Ejemplo 49. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxipropil)amida-17³-(2-piperazino-N-etil)amida (compuesto 54)

- 1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para **46** en el Ejemplo 42.

- 2) Se disolvieron 23 mg del aducto de Pd-Bpheid aminopropanodiol (0,032 mmol) en 200 μ l de DMF seca. Se añadieron 5,55 mg de HOSu (0,048 mmol) y 10,85 mg de DCC (0,048 mmol). La solución se agitó durante 22 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón.

- 3) En el recipiente de reacción de (2), se añadieron 4 μ l de 1-(2-aminoetil)piperazina (0,03 mmol) y 12 μ l de trietilamina (0,09 mmol). La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min

Estructura de fórmula: $C_{44}H_{60}N_5O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 917,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

45 Tiempo de retención: 13,03 min.

M.S (+): m/z = 917.

Ejemplo 50. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-[(2-aminoetil)amino]etil)amida-17³-(2,3-dihidroxi)propil)amida (compuesto 55)

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid con dietilenotriamina como se describe para el compuesto **27** en el Ejemplo 22. El producto se purificó en una columna de sílice con una solución corriente de metanol a 80 % y amonio a 20 %.

- 5 2) El producto de aminólisis de Pd-Bpheid se hizo reaccionar con 80 mg (0,17 mmol) de PyBroP disuelto en 100 µl de cloroformo y 80 mg (0,88 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol disuelto en 2 ml de NMP a temperatura ambiente, en una atmósfera de argón durante 16 horas. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

10 Estructura de fórmula: $C_{42}H_{58}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 890 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 11,90 min.

M.S (+): m/z = 890

15 Ejemplo 51. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxi)propil)amida-17³-(2-N-(2'-piridil)amino)etil)amida (compuesto 56)

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para **46** en el Ejemplo 42.

- 20 2) Se disolvieron 19 mg del producto de aminólisis de Pd-Bpheid (0,024 mmol) en 1,0 ml de NMP seca. Se añadieron 97 mg de N-(2-piridil)etilendiamina (0,142 mmol), preparada como se describe en el Ejemplo 40, 77 mg del reactivo de acoplamiento tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (0,24 mmol) y 50 µl de trietilamina (0,36 mmol). La solución se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min).
25 Caudal: 4 ml/min

Estructura de fórmula: $C_{45}H_{56}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 925,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,38 min.

30 M.S (+): m/z = 925

Ejemplo 52. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N-(2'-piridil)amino)etil)amida-17³-(2,3-dihidroxi)propil)amida (compuesto 57)

- 1) Se mezcló N-(2-piridil)etilendiamina preparada como se describe en el Ejemplo 40 anterior (200 mg), con 40 mg de Pd-Bpheid durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

2) El producto de aminólisis de Pd-Bpheid-2-(diamino)etil)piridina (35 mg, 0,042 mmol) se disolvió en 200 µl de DMF seca. Se añadieron 10 mg de HOSu (0,086 mmol) y 22 mg de DCC (0,105 mmol). La solución se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón.

40 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS. Tiempo de retención: 18,91 min.

M.S (+): m/z = 949

- 2) Se disolvieron 28 mg del Pd-Bpheid-2-(diamino)etil)piridina-OSu-éster activado (0,03 mmol) en 300 µl de dimetilformamida seca. Se añadieron 28 mg de 3-amino-1,2-propanodiol (0,31 mmol) y 41 µl de trietilamina añadieron. La solución se agitó durante 14 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{45}H_{56}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 925,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 14,53min.

M.S (+): m/z = 925

5 **Ejemplo 53. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxiopropil)-amida-17³-([2-bis(2-aminoetil)amino]etil)amida (compuesto 58)**

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para 46 en el Ejemplo 42.

10 2) Todos los disolventes se desgasificaron al vacío. El aminodiol purificado se disolvió en 2 ml de NMP y 200 µl de DMSO. A la solución, se añadieron 100 mg (0,21 mmol) de PyBroP en 200 µl de cloroformo, y 160 µl (1 mmol) de tris(2-etilamino)amina líquida. Los compuestos se agitaron en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 16 h. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

15 Estructura de fórmula: C₄₄H₆₃N₉O₇Pd+ 3CH₃COOH

Peso molecular: 933,2 + 180,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 10,86 min.

M.S (+): m/z = 933.

20 **Ejemplo 54. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-([2-bis(2-aminoetil)-amina]etil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 59)**

1) Se disolvieron 25 mg de Pd-Bpheid, 3 (35 µmol) y 39,4 mg de HOSu (342 µmol) en 1 ml de DMF seca en una atmósfera de argón. Se introdujeron 31 mg de DCC (150 µmol) disueltos en 500 µl de DMF seca. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La DMF se evaporó y el producto se purificó por cromatografía líquida usando SiO₂ como fase estacionaria y CHCl₃ a 95 %:EtOH a 5 % como eluyente. El producto se recibió en las primeras cuatro fracciones. El disolvente se evaporó; Se recibieron 55 mg de Pd-Bpheid-OSu.

2) Se disolvieron 25 mg del producto anterior, Pd-Bpheid-OSu, (30 µmol), en 1 ml de DMF seca. A esta solución se añadieron 13 µl de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (74 µmol). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante un par de minutos. Se añadió 3-amino-1,2-propanodiol (97 µl, 37 µmol) en 1 ml de DMF en el recipiente de reacción. La reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera inerte durante 5 horas. No se detectó producto de aminólisis.

3) Se añadieron 200 ml (1,28 mmol) de tris(aminoetil)amina al recipiente de reacción de (2). Se pasó argón a través del recipiente de reacción. La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El producto se purificó diluyendo la mezcla de reacción con 30 ml de agua y lavando la capa acuosa con 30 ml de n-butanol. Después, la capa orgánica se lavó con 3 x 30 ml de agua. El butanol se evaporó y el producto se disolvió en 1,5 ml de agua ácida y 300 µl de acetonitrilo. La solución se dividió en alícuotas y se liofilizó.

Estructura de fórmula: C₄₄H₆₃N₉O₇Pd 3CH₃COOH

Peso molecular: 933,2 + 180,2

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

40 Tiempo de retención: 12,46 min.

M.S (+): m/z = 934

Ejemplo 55. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorina-13¹-(3-aminopropil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 60)

1) Se agitaron 30 mg de Pd-Bpheid, 3 (42 µmol) en 1 ml (11,8 mmol) de 1,3-diaminopropano, durante 60 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El exceso de amina se evaporó a alto vacío durante 16 h.

2) El producto se disolvió en 1 ml de DMSO y 1 ml de DMF, y se agitó con una solución de 100 mg (0,21 mmol) de PyBroP en 500 µl de cloroformo y 100 mg de 3-amino-1,2-propanodiol a temperatura ambiente en una atmósfera de

argón, durante 16 h. La purificación del producto se realizó mediante precipitación con agua, seguido de purificación de HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{41}H_{55}N_7O_7Pd + CH_3COOH$

5 Peso molecular: 861,2 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,06 min.

M.S (+): m/z = 861

10 **Ejemplo 56. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina-13¹-(4-aminobutil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil) amida (compuesto 61)**

1) Se agitaron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 µmol) y 0,5 ml (4,9 mmol) de 1,4-diaminobutano (99 %), a 30 °C durante 4 horas en una atmósfera de argón, momento en el que se añadió 1 ml de agua al recipiente de reacción y se agitó durante un par de minutos. Después, la solución se liofilizó.

15 2) El producto de aminólisis de Pd-Bpheid se disolvió en 2 ml de DMF seca. Se añadió una solución de 414 mg (4,4 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol (97 %) en 400 µl de DMF a la mezcla. El recipiente de reacción se lavó abundantemente con argón. Se introdujeron 130 mg de PyBroP (279 µmol) en 500 µl de cloroformo en el recipiente de reacción. La mezcla se agitó durante 90 min más a 30 °C en una atmósfera de argón. Después, la reacción se enfrió y el exceso de reactivo de acoplamiento se destruyó añadiendo 1 ml de agua. La mezcla se diluyó con 100 ml de agua. El producto se extrajo cuatro veces con cloroformo, 100 ml y 3 x 50 ml. Los lavados orgánicos se combinaron y se evaporaron. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = A = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_7Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 876,4 + 60,0

25 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,32 min.

M.S (+): m/z = 876

Ejemplo 57. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dietilaminoetil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 62)

30 1) Se disolvieron 30 mg de Pd-Bpheid, **3** (0,042 mmol) en 300 µl de 2-(dietilaminoetil)amina (2,11 mmol). La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El exceso de 2-(dietilaminoetil)amina se evaporó a alto vacío.

El producto se analizó por HPLC-MS. Tiempo de retención: 15,49 min.

M.S (+): m/z = 831

35 2) Se añadieron 27 mg de 3-amino-1,2-propanodiol (0,3 mmol), 28 mg de PyBroP (0,06 mmol) y 300 µl de DMF a la solución en la sección 1. La solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{44}H_{61}N_7O_7Pd + CH_3COOH$

40 Peso molecular: 906,4 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,93 min.

M.S (+): m/z = 904

45 **Ejemplo 58. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-etilaminoetil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 63)**

1) Se agitaron 30 mg de Pd-Bpheid, **3** (42 μ mol) en 1 ml (9,5 mmol) de N-etiletilendiamina durante 60 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, el exceso de amina se evaporó a alto vacío.

2) Después, el producto se disolvió en 800 μ l de DMF y se agitó con una solución de 70 mg (0,77 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol en 200 μ l de DMF y una solución de 70 mg (0,15 mmol) de PyBroP en 200 μ l de cloroformo, a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 2 h. El producto se purificó por HPLC, usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_7Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 875,2 + 60,0

10 El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,16 min.

M.S (+): m/z = 875

Ejemplo 59. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(3-N-metilaminopropil)amida-17³-(2,3-dihidroxipropil)amida (compuesto **64)**

15 1) Se agitaron 30 mg de Pd-Bpheid, **3** (42 μ mol) en 1 ml (9,6 mmol) de N-metil-1,3-propanodiamina, durante 120 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después, el exceso de amina se evaporó a alto vacío.

2) Después, el producto se disolvió en 800 μ l de DMF y se agitó con una solución de 80 mg (0,88 mmol) de 3-amino-1,2-propanodiol en 200 μ l de DMF y una solución de 75 mg (0,16 mmol) de PyBroP en 200 μ l de cloroformo, a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 2 h. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_7Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 875,2 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

25 Tiempo de retención: 12,93 min.

M.S (+): m/z = 875

Ejemplo 60. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(2-hidroxietil)amida (compuesto **65)**

30 1) Se agitaron 300 mg de Pd-Bpheid, **3** (420 μ mol), 655 mg de PyBroP (1260 μ mol), 30,78 μ l de etanolamina (504 μ l), 0,6 ml de DMF y 0,1 ml de trietilamina a temperatura ambiente durante 1 h en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se evaporó al vacío, el producto se purificó por extracción con agua y cloroformo. La fase de cloroformo que contenía el producto se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se evaporó.

2) Después de la evaporación, se añadieron 460 μ l de N,N-dimetiletilendiamina (4,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h en una atmósfera de argón. El producto se purificó por extracción con agua y *n*-butanol. La fase de *n*-butanol que contenía el producto se secó ($MgSO_4$ anhidro), se filtró y se evaporó.

Estructura de fórmula: $C_{41}H_{55}N_7O_6Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 848,2 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

M.S (+): m/z (el más abundante) = 846

40 espectro UV-Vis: 750 nm, 516 nm, 386 nm, 332 nm, 264 nm

Ejemplo 61. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(3-hidroxi propil)amida (compuesto **66)**

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid como se describe para el compuesto **25** en el Ejemplo 20.

2) Después todo el producto obtenido en la etapa 1 anterior se disolvió en 6 ml de DMF. Se hizo reaccionar 1 ml de la solución con 20 μ l (0,26 mmol) de 3-amino-1-propanol, 70 mg (0,15 mmol) de PyBroP y 20 μ l (0,18 mmol) de N-

45

metil-morfolina. La mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC, usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_6Pd + CH_3COOH$

5 Peso molecular: 859,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 15,38 min.

M.S (+): m/z = 859

10 **Ejemplo 62. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(2-hidroxi propil)amida (compuesto 67)**

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid como se describe para el compuesto 25 en el Ejemplo 20.

15 2) Después, el producto se disolvió en 6 ml de DMF. Se hizo reaccionar 1 ml de la solución con 20 μ l (0,25 mmol) de 1-amino-2-propanol, 70 mg (0,15 mmol) de PyBroP y 20 μ l (0,18 mmol) de N-metil-morfolina. La mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_6Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 859,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

20 Tiempo de retención: 14,82 min.

M.S (+): m/z = 859.

Ejemplo 63. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-((R)-2-hidroxi propil)amida (compuesto 68)

25 La síntesis del compuesto 68 fue idéntica a la del compuesto 67 descrito en el Ejemplo 63 anterior, usando el isómero óptico R del aminoalcohol.

Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_6Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 859,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 15,52 min.

30 M.S (+): m/z = 859.

Ejemplo 64. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-((S)-2-hidroxi propil)amida (compuesto 69)

La síntesis del compuesto 68 fue idéntica a la del compuesto 67 descrito en el Ejemplo 63 anterior, usando el isómero óptico S del aminoalcohol.

35 Estructura de fórmula: $C_{42}H_{57}N_7O_6Pd + CH_3COOH$

Peso molecular: 859,3 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 15,50 min.

M.S (+): m/z = 859.

40 **Ejemplo 65. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxycarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(2-(2-hidroxi etilamino)etil)amida (compuesto 70)**

1) Se realizó aminólisis de Pd-Bpheid como se describe para el compuesto 25 en el Ejemplo 20.

2) Después, el producto se disolvió en 6 ml de DMF. Se hizo reaccionar 1 ml de la solución con de N-(2-hidroxi-etil)-etilendiamina (20 µl, 0,17 mmol), 70 mg (0,15 mmol) de PyBroP y 20 µl (0,18 mmol) de N-metil-morfolina. La mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{43}H_{60}N_8O_6Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 889,2 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,34 min.

M.S (+): m/z = 888.

Ejemplo 66. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(3-N-(2'-piridil)aminopropil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 71)

1) Se disolvieron 500 mg de 2-cloropiridina (8,73 mmol) en 3,6 ml de 1,3-diaminopropano (44 mmol). Se añadieron 100 mg de carbonato potásico y 200 µl de DMF. El compuesto se calentó a reflujo durante 22 horas a 102 °C. El producto N-(2-piridil)propilendiamina se purificó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio. El producto fue un aceite incoloro. Análisis de TLC sobre la lámina de Gel de Sílice 60 F₂₅₄ Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio. Fr de producto = 0,38.

2) Se disolvieron 20 mg de Pd-Bpheid, **3** (28 µmol) en 300 µl de NMP y se añadieron 125 mg (0,83 mmol) de N-(2-piridil)propilendiamina. La solución se agitó durante 23 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto de aminólisis se purificó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio.

El producto se analizó por HPLC-MS. Tiempo de retención: 8,02 min.

M.S (+): m/z = 864.

3) El producto de aminólisis de Pd-Bpheid (30 mg, 0,023 mmol) se disolvió en 400 µl de NMP. Se añadieron 90 mg de HBTU (0,24 mmol), 50 µl de trietilamina (0,35 mmol) y 20 mg de 3-amino-1,2-propanodiol (0,23 mmol). La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{46}H_{58}N_8O_7Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 941,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 18,89 min.

M.S (+): m/z = 941.

Ejemplo 67. Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(4-N-(2'-piridil)aminobutil)amida-17³-(2,3-dihidroxiopropil)amida (compuesto 72)

1) Se disolvieron 0,835 ml de 2-cloropiridina (8,8 mmol) en 8,8 ml de 1,4-diaminobutano (88 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas a 128 °C. El producto se purificó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm). Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio. El producto fue un aceite incoloro. TLC sobre lámina de Gel de Sílice 60 F₂₅₄. Fase móvil: 90 % de metanol, 10 % de solución de amonio. Butildiamina: Fr = 0, Fr de producto = 0,42.

2) Se disolvieron 30 mg de Pd-Bpheid, **3** (42 µmol) en 700 µl de NMP y se añadieron 80 mg (0,48 mmol) de N-(2-piridil)butilendiamina. La solución se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS

Tiempo de retención: 22,36 min.

M.S (+): m/z = 877.

- 3) Se disolvieron 17 mg del producto de aminólisis de Pd-Bpheid (0,019 mmol) en 400 µl de NMP y 100 µl de agua. Se añadieron 9 mg de HOSu (0,077 mmol), 17 mg de N-(3-dimetilamino propil)-N-etilcarbodiimida (EDC) (0,87 mmol) y 5 µl de solución de amonio. Después de 16 horas, se añadieron 200 mg de 3-amino-1,2-propanodiol (2,2 mmol). La solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC preparativa usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{47}H_{60}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 949,5 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

- 10 Tiempo de retención: 15,79 min.

M.S (+): m/z = 949

Ejemplo 68. Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxiopropil)amida-17³-(3-N-(2'-piridil) aminopropil)amida (compuesto 73)

- 15 1) Se realizó aminólisis con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para el compuesto 46 en el Ejemplo 42.

- 20 2) Se disolvieron 32 mg del producto de aminólisis de Pd-Bpheid (0,04 mmol) en 800 µl de NMP. Se añadieron 152 mg de HBTU (0,4 mmol), 56 µl de trietilamina y 60 mg de N-(2-piridil)propilendiamina (preparada como se ha descrito anteriormente para el compuesto 72). La solución se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{46}H_{58}N_8O_7Pd + 2 CH_3COOH$

Peso molecular: 939,4 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

- 25 Tiempo de retención: 15,28 min.

M.S (+): m/z = 939.

Ejemplo 69. Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2,3-dihidroxiopropil)amida-17³-(4-N-(2'-piridil)aminobutil)amida (compuesto 74)

- 30 1) Se realizó aminólisis con 3-amino-1,2-propanodiol y purificación posterior como se describe para el compuesto 46 en el Ejemplo 42.

- 35 2) Se disolvieron 25 mg del producto de aminólisis de Pd-Bpheid (0,031 mmol) en 600 µl de NMP. Se añadieron 120 mg de HBTU (0,31 mmol), 45 µl de trietilamina y 50 mg de N-(2-piridil)butilendiamina (preparada como se ha descrito anteriormente para el compuesto 72). La solución se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El producto se purificó por HPLC usando una columna RP-18. Fase móvil: A = ácido acético a 0,2 % en agua. B = ácido acético a 0,2 % en acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B (0-6 min) a 95 % de B (30-33 min). Caudal: 4 ml/min.

Estructura de fórmula: $C_{47}H_{60}N_8O_7Pd + 2CH_3COOH$

Peso molecular: 953,5 + 120,1

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

- 40 Tiempo de retención: 15,43 min.

M.S (+): m/z = 953

Ejemplo 70. [Compuesto de referencia] Paladio 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorin-13¹-(2-N²-dimetilaminoetil)amida-17³-(glicosil) amida (compuesto 75)

- 45 1) Se disolvieron 300 mg de Pd-Bpheid, 3 (420 µmol) y 476 mg de HOSu (4,14 mmol) en 4 ml de DMF seca en una atmósfera de argón. Se introdujeron 435,5 mg de DCC (2,1 mmol) disueltos en 2 ml de DMF seca. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La TLC (CHCl₃ a 92 %:MeOH a 8 %) no mostró ningún Pd-Bpheid sin reaccionar.

2) Se introdujeron 926 mg de hidrocloreuro de glicosilamina, 98 %, (4,28 mmol) y 2190 μ l de DIPEA (12,6 mmol) en el recipiente de reacción anterior que contenía el éster activo, Pd-Bpheid-OSu. La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 24 horas. La TLC (CHCl_3 a 8 %: MeOH a 92 %) no mostró ningún éster activo sin reaccionar restante en el recipiente de reacción.

5 3) Se añadieron 3 ml de N,N-dimetiletildiamina (26 mmol) en el recipiente de reacción de la etapa (2) y se agitó durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La HPLC-MS mostró que el producto deseado su base de Schiff eran los productos principales. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de agua y se lavó con 4 x 50 ml de n-butanol. Fue necesario añadir a cada lavado un pequeño volumen de NaCl acuoso saturado para conseguir la separación. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con 50 ml de agua. Después, el butanol se evaporó y la base de Schiff residual se hidrolizó usando ácido acético diluido. El producto evaporado se diluyó en 60 ml de agua que contenía ácido acético a 1 %. La solución ácida se agitó durante 1 hora en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La HPLC-MS mostró que la base de Schiff se había destruido por completo.

Estructura de fórmula: $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_9\text{Pd} + \text{CH}_3\text{COOH}$

15 Peso molecular: 948,4 + 60,0

El producto se analizó por HPLC y confirmación de identidad por MS.

Tiempo de retención: 13,81 min.

M.S (+): m/z = 948

20 Ejemplo 71. [Compuesto de referencia] Interacciones del compuesto dicatiónico **5** con seroalbúmina humana (HSA)

La actividad fotodinámica de los diferentes derivados de Bchl depende críticamente tanto de la biodisponibilidad de sus formas monoméricas (diméricas) como del tráfico transcelular, que puede modularse notablemente mediante unión a seroalbúmina.

25 Una solución de **5** en PBS ($3,2 \times 10^{-4}$ M, 100 μ l) se mezcló con diversas cantidades de seroalbúmina humana (0,1, 0,5, 1, 2 y 5 mg). La agregación, a altas concentraciones de **5** en soluciones acuosas, se refleja dividiendo el pico monomérico original a 747 nm en dos nuevos picos a 720 y 760 nm. El estado de agregación se siguió espectrofotométricamente a lo largo del intervalo de concentraciones de albúmina a temperatura ambiente en una cubeta de 0,1 mm. Los valores de intensidad de absorbancia a las longitudes de onda pico se tomaron como una indicación de la agregación.

30 La adición de la albúmina provocó la disgregación del sensibilizador **5** en PBS (**Fig. 2**). Los espectros de absorción de las soluciones que contiene cantidades crecientes de albúmina se parecen al espectro del pigmento monomérico **5** en metanol.

II. SECCIÓN BIOLÓGICA

Materiales y Métodos

35 (i) **Cultivo celular.** Se cultivaron células endoteliales de ratón H5V en forma de monocapas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F12 que contenía HEPES 25 mM, pH 7,4, suero fetal de ternero (FCS) al 10 %, glutamina (2 mM), penicilina (0,06 mg/ml) y estreptomycin (0,1 mg/ml) (en lo sucesivo citado como el "medio de cultivo"). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 8 %.

40 (ii) **Cultivos bacterianos.** Se cultivaron bacterias de las cepas St. albus y E. coli XL en medio LB líquido (E. coli en LB que contenía 12,5 μ g de tetraciclina/ml) a una densidad final $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,5-0,9$ (1 OD = 8×10^8 bacterias/ml). Las bacterias se centrifugaron (4000 \times g, 5 min.) y se resuspendieron en PBS.

(iii) **Preparación de sensibilizantes para experimentos in vitro.** Se prepararon soluciones madre de los compuestos **5**, **7**, **9** y **11** disolviendo los compuestos secos directamente en medio de cultivo a las concentraciones deseadas, antes de su uso.

45 (iv) **Ensayo de fototoxicidad.**

(a) **Células.** Para determinar la eficacia fotodinámica, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (40 x 10³/pocillo) y se incubaron en la oscuridad en medio de cultivo que contenía concentraciones crecientes de los sensibilizantes **5**, **7**, **9** y **11**, durante un periodo de 1 min a 8 h. El sensibilizante no unido se retiró lavando las células una vez con medio de cultivo reciente. Las placas se iluminaron a temperatura ambiente, por su lado inferior, durante 10 min ($650 < \lambda < 800$ nm, 12 J/cm²). La fuente de luz fue una lámpara halógena de 100 W (Osram, Alemania) equipada con un corte de <650 nm y un filtro de agua de 4 cm. Los cultivos se colocaron en la incubadora de cultivo y se determinó la supervivencia celular 24 h después de la iluminación,

mediante el ensayo de viabilidad Neutral Red. La supervivencia celular se calculó como el porcentaje de colorante acumulado en los controles no tratados. Se efectuaron determinaciones por triplicado y se muestran los experimentos representativos. Se usaron tres tipos de controles: (i) control de luz: células iluminadas en ausencia de pigmentos; (ii) control de oscuridad: células tratadas con pigmentos pero mantenidas en la oscuridad; y (iii) células no tratadas que se mantuvieron en la oscuridad.

(b) Bacterias. Para determinar la eficacia fotodinámica, se diluyeron bacterias en alícuotas de 300 μ l que contenían aproximadamente 10^7 bacterias, y se incubaron con concentraciones crecientes de sensibilizante en tubos de ensayo de plástico en la oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente, y después se iluminaron a 70 mW/cm² durante 15 min. Posteriormente se emplacaron las muestras de los cultivos bacterianos tratados a diferentes diluciones (50-200 bacterias/placa) en agar LB y se cultivaron durante 24 h a 37°C para la determinación de la supervivencia bacteriana mediante recuento de colonias. Se efectuaron determinaciones por triplicado y se muestran los experimentos representativos.

(v) Animales. Se mantuvo a ratones desnudos CD1 macho (28-32g) y a ratas Wistar macho (250-300 g) con libre acceso a comida y agua en las instalaciones para animales del departamento acuerdo con las guías del Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

(vi) Anestesia. Se anestesió a los ratones mediante inyección i.p. de 80 μ l de mezcla de ketamina (100 mg/ml, Rhone-Merieux, Francia) y xilazina (2 %, Vitamed, Israel) (85:15, v:v). A las ratas se les anestesió con gas (2 % de isoflurano en un 98 % de O₂).

(vii) Implante de tumores. Se desprendieron las monocapas de células de glioma C6 cultivadas en suero salino, se centrifugaron a 250 g durante 5 min, se resuspendieron en suero salino y se inyectaron por vía subcutánea (2×10^6 células/ratón) en el lomo de los ratones desnudos CD1. Los tumores alcanzaron un diámetro de tratamiento de 6-8 mm a las 2 semanas. Entonces se sacrificó a los ratones (según las guías del Weizmann Institute of Science) cuando los tumores alcanzaron un diámetro \geq 15 mm.

(viii) Preparación de sensibilizantes para inyección. Se prepararon soluciones madre de los compuestos **5** y **11** antes de su uso disolviendo los compuestos secos directamente en PBS a la concentración deseada para inyección.

(ix) Farmacocinética. Se inyectó por vía i.v. a ratas Wistar anestesiadas (n=3 por cada punto de tiempo) con el compuesto **5** de la invención (0,6 mg/kg). Se extrajeron muestras de sangre (~100-200 μ l) a los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 360 y 480 min después de la inyección, se transfirieron y pesaron en tubos de ensayo tarados de 2 ml que contenían 10 μ l de heparina, y se mezclaron cuidadosamente. Se recogieron muestras de sangre de control de tres ratas no tratadas y se trataron de igual modo. Los tubos que contenían las muestras de sangre se pesaron de nuevo para calcular la masa exacta de la muestra. Después, se congelaron las muestras de sangre en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Se extrajeron las muestras liofilizadas con metanol (1 ml cada una), se agitaron vorticialmente y se centrifugaron. El sobrenadante se recogió y se analizó mediante medición de la fluorescencia (Espectrofluorímetro SLM-8000, Aminco EE.UU.). Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia en un intervalo de 650-850 nm con excitación a 520 nm. Se usó como blanco la fluorescencia del metanol y de los extractos de sangre no tratados. Se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas del sensibilizante.

(x) Biodistribución. Se anestesió a ratas Wistar (n=2) y se inyectó en su vena caudal el compuesto **5** de la invención (0,6 mg/kg). El grupo de control (n=2) no fue tratado con sensibilizante. A los 30 min y 24 h después de la inyección, se sacrificó a las ratas (una para cada punto temporal), y se recogieron muestras de los órganos o tejidos indicados (corazón, hígado, pulmón, bazo, riñón, cerebro, testículos, piel, músculo y grasa) en viales tarados y se pesaron, inmediatamente se congelaron sobre hielo seco y se almacenaron a -20°C en la oscuridad hasta su análisis. Para su examen, se descongeló cada muestra, se pesó de nuevo y se homogeneizó (Polytron, Kinematica GmbH o Ultra-Turrax) en agua enfriada en hielo. Después, se congelaron los viales en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se extrajeron con metanol (5-10 ml) en una cantidad equivalente al peso del tejido y entonces se agitaron vorticialmente y se centrifugaron. Se recogió el sobrenadante y se analizó y se midió la fluorescencia tal como se ha descrito en (ix) anteriormente. Como blanco se usaron la fluorescencia del metanol y de los extractos de tejido de los animales de control.

(xi) Protocolo de PDT. Se anestesió a ratones desnudos CD1 portadores de glioma de C6 (n=17) y se inyectó el compuesto **5** (0,3 mg/kg) a través de la vena caudal. El área tumoral se iluminó inmediatamente (intervalo de tiempo de fármaco a luz (DLTI)=0) por vía transcutánea durante 15 min mediante un láser de diodo de 755 nm (CeramOptec, Alemania) con una dosis de luz de 80 mW/cm² (diámetro de campo de luz - 14 mm). Después de la iluminación se colocó a los ratones (n=12) de nuevo en su jaula. La respuesta tumoral (usando la necrosis local en el día 8 después de la PDT como criterio de valoración) se registró fotográficamente y se evaluó el volumen tumoral (Gleave et al., 1992). La respuesta se consideró parcial cuando solo una parte del tumor iluminado se volvió necrótica. Se consideró que los ratones estaban curados cuando se encontraban libres de tumores 90 días después del tratamiento. El crecimiento continuado del tumor después de la PDT se puntuó como ausencia de respuesta. Se sacrificó a los ratones cuando el diámetro tumoral alcanzó 15 mm. Se usaron

los siguientes controles: (i) control de oscuridad (n=3)- ratones portadores de tumores inyectados por vía i.v. con sensibilizante pero no iluminados; (ii) control de luz (n=2)- ratones portadores de tumores no inyectados con sensibilizante pero iluminados; (iii) control no tratado (n=2)- ratones portadores de tumores no inyectados con sensibilizante y no iluminados.

5 **Ejemplo 72. [Compuesto de referencia] Citofototoxicidad de los compuestos 5, 7, 9 y 11 en células endoteliales**

Se determinó la fototoxicidad de los compuestos 5, 7, 9 y 11 en células endoteliales H5V de ratón tal como se ha descrito en la sección (iv)(a) anterior. Las células se incubaron con concentraciones crecientes (0,001, 0,01, 0,1, 1 o 10 μM) de los compuestos durante 1, 6, 60, 90, 120, 240 y 480 min, se lavaron y después se iluminaron o se mantuvieron en la oscuridad. Los resultados se muestran en las Fig. 3A-3C: la fototoxicidad de los compuestos 5 y 11 tras 90 min de incubación se muestra en la Fig. 3A; la fototoxicidad de los compuestos 5, 7 y 9 después de 2 horas de incubación se muestra en la Fig. 3B; y la fototoxicidad del compuesto 5 (10 μM) después de incubación durante 1-10 min se muestra en la Fig. 3C. Tal como puede observarse en las figuras, los sensibilizantes son de rápida acción, su fototoxicidad es dependiente de la concentración y de la luz y su DL_{50} es aproximadamente la misma (3 y $\sim 0,2$ μM después de ~ 3 min y 2 h de preincubación, respectivamente). No se observó toxicidad en la oscuridad para el intervalo de concentración ensayado.

Ejemplo 73. [Compuesto de referencia] Farmacocinética y biodistribución del compuesto 5

Se determinaron la farmacocinética y la biodistribución del sensibilizante 5 *in vivo* en ratas Wistar tal como se ha descrito en las secciones (ix) y (x) anteriores.

Los resultados de la farmacocinética, tal como se ilustran en la Fig. 4, demuestran que aproximadamente un 60 % del sensibilizante 5 se eliminó a los 30 min tras la inyección i.v. (0,6 mg/kg). La cinética de eliminación indica una distribución bicompartimental 24 h después de la administración i.v. Los resultados de la biodistribución, tal como se ilustra en las Fig. 5A-5B, demuestran que 30 min después de la inyección, los niveles del sensibilizante 5 son relativamente elevados en la sangre, riñones y pulmones (Fig. 5A), y 24 h después de la inyección, el nivel del sensibilizante cae a un nivel prácticamente de fondo en la sangre, pero se encontraron niveles significativos en los riñones, el hígado y el bazo (Fig. 5B).

Ejemplo 74. [Compuesto de referencia] Tratamiento fotodinámico de xenoinjertos de glioma C6 en ratones desnudos CD1 con compuesto 5

Basándose en los datos farmacocinéticos descritos en el ejemplo 20 anterior, se ajustó el protocolo de tratamiento para el compuesto 5 a 15 min de iluminación inmediatamente después de la inyección del sensibilizante, usando un láser médico especializado coincidente con el pico de absorción de 5 (CeramOptec, Alemania, 755 nm). Para ensayar la eficacia del fármaco, se trató a ratones desnudos CD1 macho (n=12) con una dosis de 0,3 mg/kg de compuesto 5 y una intensidad de luz de 80 mW/cm^2 . Todos los animales en el grupo de tratamiento de luz y fármaco (completo) desarrollaron inflamación y edema en el día 1 después del tratamiento. La Fig. 6A muestra fotografías del sitio tumoral de un ratón tratado mediante PDT en los días 0, 4, 14, 21 y 32. El desarrollo tumoral se observó en el día 4 y la necrosis tumoral se observó en el día 14. En el día 21, se observó un aplanamiento del tumor con una costra cubriendo la herida. En el día 32, la herida había sanado y el animal estaba curado. Las Fig. 6B-6C son fotografías del sitio tumoral de un ratón inyectado con compuesto 5 pero no iluminado y de un ratón inyectado con suero salino e iluminado, respectivamente. En ambos casos, no se produjo necrosis del tumor.

La Fig. 7 ilustra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra una supervivencia del 80 % para ratones tratados con compuesto 5 e iluminados (tratamiento, cuadrados).

Ejemplo 75. [Compuesto de referencia] Fototoxicidad del compuesto 5 frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

Se ensayó la fototoxicidad del compuesto 5 cargado positivamente en bacterias Gram-positivas *St. albus* y Gram-negativas *E. coli* en comparación con la sal de 13¹-(2-sulfoetil)amida dipotásica de Pd 3¹-oxo-15-metoxicarbonilmetil-Rodobacterioclorina cargada negativamente (descrita en el documento PCT/IL03/00973). Las bacterias se inocularon con concentraciones crecientes de los sensibilizantes durante 1 h y se iluminaron o mantuvieron en la oscuridad. Los resultados, ilustrados en las Fig. 8A-8D, demuestran que el compuesto sensibilizante 5 cargado positivamente era fototóxico tanto frente a la bacteria Gram-positiva *St. albus* (Fig. 8B) (K_d 0,02 μM) y la Gram-negativa *E. coli* (Fig. 8D) (K_d 1,7 μM), mientras que el sensibilizador cargado negativamente de la técnica anterior fue eficaz frente a la bacteria Gram-positiva *St. albus* (Fig. 8A) (K_d 0,3 μM), pero no contra la Gram-negativa *E. coli* (Fig. 8C). Se observó una muerte de aproximadamente el 100 % de *E. coli* con 10 μM del compuesto 5 (Fig. 8D). La bacteria Gram-positiva *St. albus*, fue 100 veces más sensible al compuesto 5 que la Gram-negativa *E. coli*. No se observó fototoxicidad cuando se incubaron las bacterias y se trataron con el mismo intervalo de concentración del sensibilizante sin iluminación (controles de oscuridad).

Ejemplo 76. [Compuesto de referencia] Ensayo de fototoxicidad

Los materiales y métodos son como se han descrito en la sección biológica anterior.

Se cultivaron células H5V (40×10^3 /pocillo) en placas de 96 pocillos durante 24 h a una confluencia de ~80 %. Para determinar la fototoxicidad, se reemplazó el medio de cultivo con 100 μ l/pocillo de medio, en ausencia o presencia de sensibilizante de 10^{-8} a 10^{-6} M, y se incubaron en la oscuridad durante 15 min o 3 h en la incubadora de cultivos. Las placas (grupo de PDT) se colocaron entonces en el campo de luz a temperatura ambiente y se iluminaron desde el fondo durante 10 min ($800 > \lambda > 650$ nm, 12 J/cm^2). Después de la iluminación, se cambió el medio de cultivo a medio de cultivo reciente. Los cultivos se colocaron en la incubadora de cultivos y se determinó la supervivencia celular 24 horas después usando el ensayo de supervivencia Neutral Red descrito anteriormente.

Se usaron los siguientes controles:

1. Control de luz: las células se iluminaron en ausencia de sensibilizante.
 2. Control de oscuridad: las células se trataron con sensibilizante pero se mantuvieron en la oscuridad.
- No tratadas: las células se mantuvieron en la oscuridad sin tratamiento alguno.

En las 24 h siguientes después de la PDT, se reemplazó el medio de cultivo en los pocillos con 100 μ l de medio reciente que contenía 40 μ g/ml de Neutral Red. La placa se incubó durante 1,5 h en una incubadora de cultivos oscura. Se aspiró el medio y se lavaron las células con 100 μ l de solución que contenía un 1 % de CaCl_2 y un 0,5 % de formaldehído, que retira el colorante no incorporado y fija las células al sustrato. Entonces se extrajo el colorante de las células en el sobrenadante tras la adición de 100 μ l de ácido acético glacial al 1 % en etanol al 50 %. Después de 1-2 min a temperatura ambiente, se determinó la densidad óptica de los pocillos en un espectrofotómetro de microplacas usando un filtro de 570 nm. Después de restar los blancos del ensayo, se calculó la nueva densidad óptica como el valor medio de las determinaciones por triplicado. La supervivencia celular se calculó como el porcentaje del colorante acumulado en el control no tratado. Para determinar la supervivencia celular, los datos se representaron frente a la concentración de sensibilizante. Entonces se usaron estas curvas para calcular los valores de DL_{50} .

Después de la síntesis, los compuestos descritos en los ejemplos 23 a 75 anteriores se purificaron, se dividieron en alícuotas iguales y se liofilizaron para su almacenamiento (desechadas a -20°C). Se determinó el contenido exacto del material mediante HPLC-detección de matriz de diodo y se evaluó la eficacia de la PDT en dos tiempos de incubación, tal como se ha descrito en la sección experimental. Los resultados se presentan en las tablas 1-3 a continuación:

TABLA 1

Compuesto	CI_{50} (μM) 3 horas	CI_{50} (μM) 15 min
<u>24</u>	1,2	2,4
<u>25</u>	0,75	1,1
<u>26</u>	0,45	1,0
<u>27</u>	0,45	1,5
<u>28</u>	0,38	1,3
<u>29</u>	1,9	1,9
<u>30</u>	0,61	1,7
<u>31</u>	0,60	2,6
<u>32</u>	0,25	0,60

Todos los compuestos preparados según la invención mostraron una mejor solubilidad en comparación con Pd-Bpheid, **3**. La mayoría de los compuestos requieren bajos porcentajes de Cremophor en manitol isotónico para formar una solución 100 % monomérica a 2 mg/ml mientras que algunos de los compuestos requieren bajas concentraciones de propilenglicol o PEG-400 para obtener la misma solución monomérica (se considera que el uso de ambos aditivos es muy seguro). La naturaleza zwitteriónica de estos compuestos puede ser un factor que contribuye a la necesidad de Cremophor para generar una solución monomérica.

La síntesis de los compuestos **25** - **32** es mucho más simple que la del monocatión original tomado como referencia y reproducido en la presente memoria como **24**. Son destacables las actividades de PDT de los compuestos **26**, **28** y **32** (por ejemplo, **32** es aproximadamente 4-5 veces más activo que **24** a ambos tiempos de incubación).

TABLA 2

Compuesto	CI ₅₀ (µM) 3 horas	CI ₅₀ (µM) 15 min
33*	0,45	0,75
34	0,20	0,48
35	0,21	1,23
10	0,24	0,74
36	0,15	0,37
37	0,21	0,75
38	0,16	0,44
39	1,10	2,44
40	0,35	0,70
41	0,46	1,13
42	0,28	0,68
43	0,18	0,60
44	0,17	1,41
45	0,18	0,20

5

La síntesis de los compuestos **34** - **45** es mucho más simple que la del dicatión original tomado como referencia y reproducido en la presente memoria como **33**. Son destacables las actividad de PDT con un corto tiempo de incubación de **34**, **36**, **38** y **45** (por ejemplo, **36** es más activo a los 15 min. de tiempo de incubación que **33** a las 3 horas).

10 TABLA 3

Compuesto	CI ₅₀ 3 horas (µM)	CI ₅₀ 15 min (µM)
46	0,60	1,33
47	0,25	0,45
48	0,20	0,60
49	0,57	1,15
50	0,17	0,47
51	0,40	0,78
52	0,89	0,83
53	0,90	2,00
54	0,27	0,75
55	0,43	1,07
56	0,32	0,79
57	0,60	1,33

Compuesto	Cl ₅₀ 3 horas (µM)	Cl ₅₀ 15 min (µM)
<u>58</u>	0,37	0,64
<u>59</u>	0,19	0,45
<u>60</u>	0,24	0,62
<u>61</u>	0,21	0,69
<u>62</u>	0,19	0,63
<u>63</u>	0,21	0,66
<u>64</u>	0,17	0,56
<u>65</u>	0,22	0,43
<u>66</u>	0,20	0,55
<u>67</u>	0,18	0,50
<u>68(R)</u>	0,16	0,50
<u>69(S)</u>	0,16	0,50
<u>70</u>	0,16	0,55
<u>73</u>	0,30	0,38
<u>74</u>	0,29	0,74
<u>75</u>	0,16	0,50

Todos los compuestos de la tabla anterior mostraron una mejor solubilidad en comparación con Pd-Bpheid, 3. La mayoría de los compuestos solo requieren bajos porcentajes de propilenglicol o de PEG-400 para formar una solución monomérica al 100 % a 2 mg/ml. Aunque la síntesis de la mayoría de compuestos requiere dos o tres transformaciones químicas, la mayoría de los compuestos pueden prepararse en reacciones en un solo recipiente con mínimas purificaciones y aislamientos intermedios (en los ejemplos presentados en la presente memoria, se usó HPLC preparativa en muchas reacciones durante las etapas de purificación intermedias y finales, simplemente por conveniencia. También se han empleado extracciones y precipitaciones sencillas de manera satisfactoria para purificar estos compuestos, evitando de este modo la necesidad de la cara y tediosa purificación HPLC a gran escala.

5

10 **Ejemplo 77. [Compuesto de referencia] Biodistribución de los compuestos**

Los animales eran ratones desnudos CD1 macho que portaban xenoinjertos de RCC. Se usaron tres animales para cada punto temporal. Se usaron los compuestos 28, 32, 10, 36 y 75 en los experimentos.

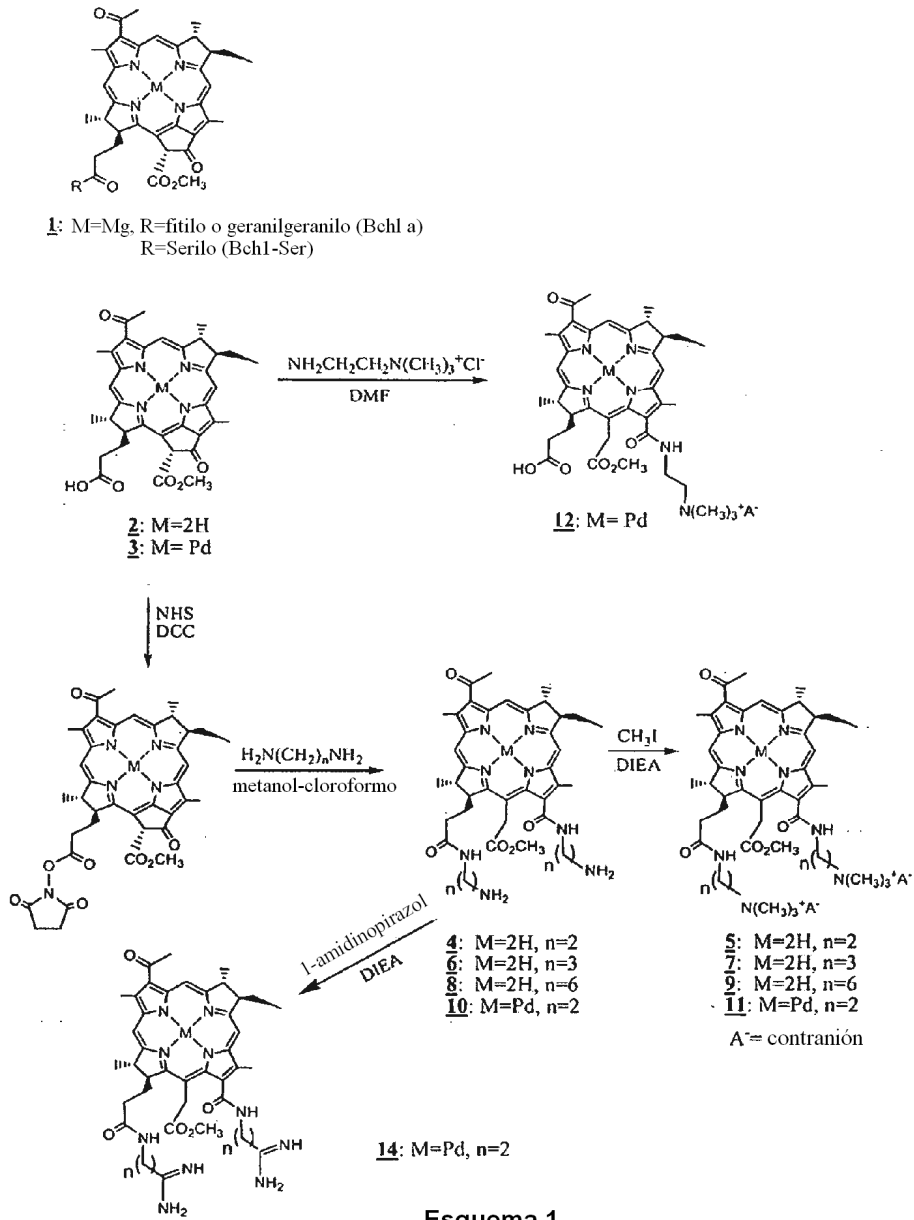
La anestesia se realizó con ketamina:xilazina (85:15, vol/vol).

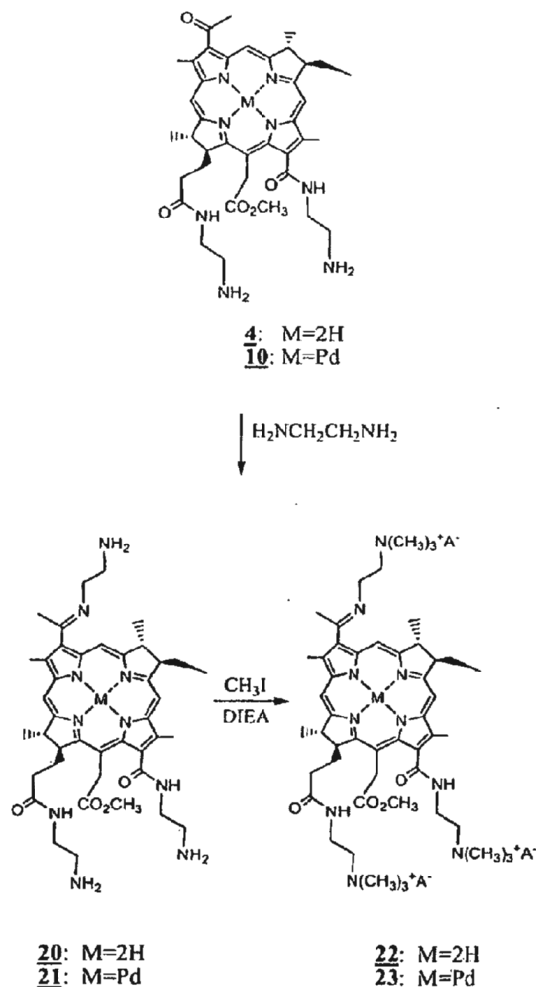
15

Se inyectó a los animales anestesiados una solución del compuesto de ensayo (2 mg/ml) en manitol isotónico a una dosis de 1,5 mg/kg. Se sacrificó a tres animales en cada punto de tiempo y se recogieron muestras de sangre, corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino, bazo, músculo, piel, tumor y cerebro. Los puntos de tiempo usados fueron 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 5 días y 7 días después de la inyección. Las muestras se pesaron con precisión, se disolvieron en ácido nítrico concentrado y se analizaron respecto de paladio mediante ICPMS.

20

Los resultados están representados en los gráficos anexos junto con la presente (Figs. 9A a 9E).





Esquema 2

Referencias

- 5 Borle, F, Radu A, Monnier P, van den Bergh H, Wagnieres, G. (2003). Evaluation of the photosensitizer tookad for photodynamic therapy on the syrian golden hamster cheek pouch model: Light dose, drug dose and drug-light interval effects. *Photochem Photobiol*, 78(4): 377-383.
- Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, Mazzola LM, Izumi Y, Jain RK, Torchilin VP, Munn LL. (2002). Cationic charge determines the distribution of liposomes entre the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Res* 62(23): 6831-6836.
- 10 Chen, Q, Huang, Z, Luck, D, Beckers, J, Brun, PH, Wilson, BC, Scherz, A, Salomon, Y y Hetzel, FW. (2002) Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers. *Photochem Photobiol*, 76: 438-445.
- Dellian M, Yuan F, Trubetsky VS, Torchilin VP, Jain RK. (2000). Vascular permeability in a human tumor xenografts; molecular charge dependence. *Br J Cancer* 82:1513-1518.
- 15 Dougherty, T. J. y J. G. Levy (2003). Photodynamic therapy (PDT) and clinical applications. *Biomedical Photonics Handbook*. V. Tuan. Boca Raton, CRC Press LLC. 38: 1-38.
- Elhilali, M. (2004). Results of a phase I/II trial of WST09-mediated photodynamic therapy (WST09-PDT) for recurrent localized prostate cancer following failed external beam radiation therapy (EBRT). XIXth EAU CONGRESS, Workshop 1 "Vascular targeted photodynamic therapy for the treatment of prostate cancer: first clinical results with

- palladium bacteriopheophorbide (WST09)", VIENNA.
- Ghinea, N. y N. Simionescu (1985). Anionized and cationized hemeundecapeptides as probes for cell-surface charge and permeability studies - differentiated labeling of endothelial plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol* 100(2): 606-612.
- 5 Gleave ME, Hsieh JT, Wu HC, von Eschenbach AC, Chung LW. (1992). Serum prostate specific antigen levels in mice bearing human prostate LNCaP tumors are determined by tumor volume and endocrine and growth factors. *Cancer Res.* 52:1598-1605.
- Gross, S., Gilead, A., Scherz, A., Neeman, M. y Salomon, Y. (2003) Monitoring photodynamic therapy of solid tumors online by BOLD-contrast MRI. *Nat Med*, 9: 1327-1331.
- 10 Hamblin MR, Rajadhyaksha M, Momma T, Soukos NS, Hasan T. (1999). In vivo fluorescence imaging of the transport of charged chlorin e6 conjugates in a rat orthotopic prostate tumour. *Br J Cancer*_81(2): 261-268.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156(4): 1363-1380.
- Kelleher, DK, Thews, O, Scherz, A, Salomon, Y y Vaupel, P. (2003) Combined hyperthermia and chlorophyll-based photodynamic therapy: tumour growth and metabolic microenvironment. *Br J Cancer*, 89: 2333-2339.
- 15 Kinoshita, I, Kashiwabara, K, Fujita, J, Matsumoto, K y Ooi, S. (1981). Preparation, resolution, and adsorption and circular dichroism spectra of $[\text{Co}(\text{en})_n\{\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{CH}_3)_2\}_{3-n}]^{3+}$ and the related complexes, and the absolute configuration of $(+)\text{}_{589}\text{-fac-}[\text{Co}\{\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{CH}_3)_2\}_3]^{3+}$ determined by X-Ray analysis." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54:2683-2690.
- 20 Koudinova, N. V., Pinthus, J. H., Brandis, A., Brenner, O., Bendel, P., Ramon, J., Eshhar, Z., Scherz, A. y Salomon, Y. (2003) Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int J Cancer*, 104: 782-789.
- Krammer B. (2001)Vascular effects of photodynamic therapy *Anticancer Res.* 21(6B):4271-7
- Mazor, O, Kostenich, G, Brandis, A, Orenstein, A, Salomon, Y. y Scherz, A. (2003) Selective tumor vascular destruction of colon carcinoma xenografts by the hydrophilic Pd-bacteriochlorophyll derivative, WST11 9th International Photodynamic Association, May 20-23, Miyazaki, Japan, Book of Abstracts, p. 19.
- 25 Plaks, V, Koudinova, N, Nevo, U, Pinthus, JH, Kanety, H, Eshhar, Z, Ramon, J, Scherz, A, Neeman, M y Salomon, Y. (2004) Photodynamic Therapy of Established Prostatic Adenocarcinoma with TOOKAD: A Biphasic Apparent Diffusion Coefficient Change as Potential Early MRI Response Marker. *Neoplasia*, In press.
- 30 Preise D, Mazor O, Koudinova N, Liscovitch M, Scherz A, Salomon Y. (2003). Bypass of tumor drug resistance by antivascular therapy. *Neoplasia* 5(6): 475-480.
- Ran S, Downes A, Thorpe PE. (2002). Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res* 62:6132-6140.
- Rosenbach-Belkin V, Chen L, Fiedor L, Tregub I, Paviotsky F, Brumfeld V, Salomon Y, Scherz A. (1996). Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: photocytotoxicity in vitro and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors. *Photochem Photobiol* 64:174-181.
- 35 Schreiber, S., Gross, S., Brandis, A., Harmelin, A., Rosenbach-Belkin, V., Scherz, A. y Salomon, Y. (2002) Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *Int J Cancer*, 99: 279-285.
- 40 Segev A, Aviezer D, Safran M, Gross Z, Yayon A. (2002). Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist. *Cardiovasc Res* 53(1): 232-241.
- Simionescu, N, Simionescu M, Palade GE. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. *J Cell Biol* 90(3): 605-613.
- 45 Suzuki, T., Rude, M., Simonsen, K.P., Morooka, M., Tanaka, H., Ohba, S., Galsbol, F. y Fujita, J. (1994). Preparation and characterization of Iridium(III) complexes containing (2-aminoethyl)dimethylphosphine (edmp). Structures of fac-[Ir(edmp)3]Cl3·5H2O and trans(Cl,Cl), cis(P,P)-[IrCl2(edpp)2]BF4 and comparisons of their properties with those of the Cobalt(III) and Rhodium(III) analogs." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67:1013-1023.
- Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM.. (1998). Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest* 101: 1401-1413.
- 50 Trachtenberg, J. (2003). Initial Phase I/II Trial of WST09-PDT Photodynamic Therapy Following Failed External

Beam for Prostate Cancer. CapCure Retreat, Washington DC.

Tuan, V. et al. (2002). Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm Res* 19: 569-577.

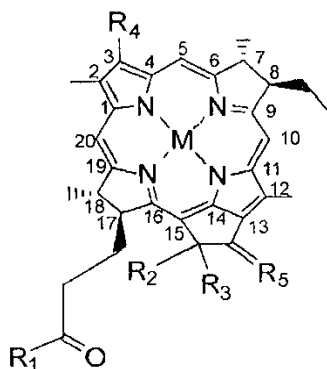
5 Wasielewski M. R. y Svec, W. A. (1980). "Synthesis of Covalently Linked Dimeric Derivatives of Chlorophyll a, Pyrochlorophyll a, Chlorophyll b, and Bacteriochlorophyll a." *J. Org. Chem.* 45: 1969-1974.

Zilberstein J, Bromberg A, Frantz A, Rosenbach-Belkin V, Kritzmann A, Pfefermann R, Salomon Y, Scherz A. (1997). Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor. *Photochem Photobiol* 65(6): 1012-1019.

10 Zilberstein J, Schreiber S, Bloemers MC, Bendel P, Neeman M, Schechtman E, Kohen F, Scherz A, Salomon Y. (2001). Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 73(3): 257-266.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de bacterioclorofila de la fórmula I:



(I)

en donde

5 M representa 2H, un átomo de metal divalente seleccionado entre Pd, Pt, Co, Sn, Ni, Cu, Zn o Mn, o un átomo de metal trivalente seleccionado entre el grupo que consiste en Fe, Mn, Co, Au, Al, Gd, Er, Yb y Cr;

R₁ es Y-R₈, -NR₉R'₉ o -N⁺R₉R'₉R''₉A⁻;

Y es O o S;

R₂ es H, OH o COOR₉;

10 R₃ es H, OH, alquilo C₁-C₁₂ o alcoxi C₁-C₁₂;

R₄ es -CH=CR₉R'₉, -CH=CR₉Hal, -CH=CH-CH₂-NR₉R'₉, -CH=CH-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -CHO, -CH=NR₉, -CH=N⁺R₉R'₉A⁻, -CH₂-OR₉, -CH₂-SR₉, -CH₂-Hal, -CH₂-R₉, -CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -CH₂-CH₂R₉, -CH₂-CH₂Hal, -CH₂-CH₂OR₉, -CH₂-CH₂SR₉, -CH₂-CH₂-NR₉R'₉, -CH₂-CH₂-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻, -COCH₃, C(CH₃)=CR₉R'₉, -C(CH₃)=CR₉Hal, -C(CH₃)=NR₉, -CH(CH₃)=N⁺R₉R'₉A⁻, -CH(CH₃)-Hal, -CH(CH₃)-OR₉, -CH(CH₃)-SR₉, -CH(CH₃)-NR₉R'₉, CH(CH₃)-N⁺R₉R'₉R''₉A⁻ o -C=CR₉;

15 R₅ es =O, =S, =N-R₉, =N⁺R₉R'₉A⁻, =CR₉R'₉ o =CR₉-Hal;

cada R₈, R₉, R'₉ y R''₉ es independientemente:

(a) H;

20 (b) hidrocarbilo C₁-C₂₅, preferiblemente alquilo C₁-C₂₅, más preferiblemente alquilo C₁-C₁₀ o C₁-C₆, sin sustituir o sustituido con uno o más radicales seleccionados entre:

(i) un grupo funcional seleccionado entre halógeno, nitro, oxo, OR, SR, epoxi, epitio, aziridina, -CONRR', -COR, COOR, -OSO₃R, -SO₃R, -SO₂R, -NHSO₂R, -SO₂NRR', =N-OR, =N-NRR', -(CH₂)_nNR-COR', -(CH₂)_n-CO-NRR', -O-(CH₂)_n-OR, -O-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-R, -PRR', -OPO₃RR', -PO₂HR o -PO₃RR', en donde n es un número entero de 1 a 6;

25 (ii) unos grupos cargados positivamente seleccionados entre: un grupo onio; un catión derivado de un grupo que contiene N seleccionado entre O←N⁺(RR'), >C=N⁺(RR'), -N⁺(RR'R''), -(R)N-N⁺(RR'R''), -(R)N-C(=HN)-N⁺RR'R'', -C(=NH)-N⁺(RR'R''); un catión derivado de un compuesto heteroaromático que contiene uno o más átomos de N y opcionalmente átomos de O o S;

30 (iii) un grupo cargado negativamente seleccionado entre COO⁻, COS⁻, -OSO₃⁻, -SO₃⁻, -OPO₃R⁻, -PO₂H⁻, -PO₃²⁻ o -PO₃R⁻;

(iv) un grupo básico que se convierte en unos grupos cargados positivamente en condiciones fisiológicas seleccionado entre -NRR', -C(=NR)-NR'R'', -NR-NR'R'', -(R)N-C(=NR)-NR'R'', O←NR-, >C=NR o un radical heteroaromático que contiene N;

35 (v) un grupo ácido que se convierte en unos grupos cargados negativamente en condiciones fisiológicas seleccionado entre -COOH, -COSH, -SO₃H y -PO₃H₂; o

(vi) un residuo de un aminoácido, un péptido, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido;

(c) hidrocarbilo C_1-C_{25} , preferiblemente alquilo C_1-C_{25} , más preferiblemente alquilo C_1-C_{10} o C_1-C_6 , que contiene uno o más heteroátomos y/o uno o más restos carbocíclicos o heterocíclicos, opcionalmente sustituido adicionalmente con uno o más radicales según se han definido en (b); o

(d) un residuo de un aminoácido, un péptido, una proteína, un monosacárido, un oligosacárido o un polisacárido;

en donde cada uno de R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo, preferiblemente alquilo C_1-C_{25} , más preferiblemente alquilo C_1-C_{10} o C_1-C_6 , o heterociclilo, o dos de R, R' y R'' junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S o N y está opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional con alquilo opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo o amino;

R_8 puede ser adicionalmente H^+ o un catión R^+_{10} cuando R_1 es $Y-R_8$;

R^+_{10} es amonio, un catión de un metal, preferiblemente de un metal alcalino o alcalinotérreo, tal como Na, K, Li, Ca, Ba o un catión derivado de un grupo que contiene N según se ha definido en (ii) anteriormente;

A es un anión fisiológicamente aceptable;

m es 0 o 1; y

sales farmacéuticamente aceptables e isómeros ópticos del mismo;

con la condición de que, cuando R_2 y R_3 sean ambos H, R_5 no sea $=N-R_9$ y/o R_4 no sea $-C(CH_3)=NR_9$; y con la condición adicional de que el derivado de bacterioclorofila de fórmula I tenga al menos un grupo cargado positivamente y/o al menos un grupo básico que se convierta en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas.

2. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 1, que contiene al menos un grupo cargado positivamente.

3. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 2, en donde dicho al menos un grupo cargado positivamente se selecciona entre: (i) un grupo onio seleccionado entre $-O^+(RR')$, $-S^+(RR')$, $-Se^+(RR')$, $-Te^+(RR')$, $-P^+(RR'R'')$, $-As^+(RR'R'')$, $-Sb^+(RR'R'')$ o $-Bi^+(RR'R'')$; (ii) un catión derivado de un grupo que contiene N según se ha definido en la reivindicación 1, preferiblemente un grupo amonio de la fórmula $-N^+(RR'R'')$; o (iii) un catión derivado de un compuesto heteroaromático que contiene uno o más átomos de N y opcionalmente átomos de O o S, seleccionado entre pirazolio, imidazolio, oxazolio, tiazolio, piridinio, quinolinio, isoquinolinio, pirimidinio, 1,2,4-triazinio, 1,3,5-triazinio o purinio; en donde cada R, R' y R'' es independientemente H, hidrocarbilo preferiblemente alquilo C_1-C_{25} , más preferiblemente o alquilo C_1-C_6 , o heterociclilo, o R y R' junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo saturado de 3-7 miembros, que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S o N y opcionalmente sustituido adicionalmente en el átomo de N adicional con alquilo opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo o amino; y en donde dicho grupo cargado positivamente es un grupo terminal o un grupo situado dentro de una cadena de hidrocarbilo de la molécula de bacterioclorofila.

4. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 1 o 3, en donde dicho anillo saturado de 3-7 miembros se selecciona entre aziridina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, azepina o piperazina opcionalmente sustituido en el átomo de N adicional con alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo o amino.

5. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 1, que contiene al menos un grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas.

6. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 5, en donde dicho grupo básico que se convierte en un grupo cargado positivamente en condiciones fisiológicas es un radical heteroaromático que contiene N seleccionado entre pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirimidilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo o purinilo.

7. El derivado de bacterioclorofila según la reivindicación 1, en donde cada R_8 , R_9 , R'_9 y R''_9 es independientemente hidrocarbilo C_1-C_{25} , preferiblemente una cadena de alquilo C_1-C_{25} o alqueno C_2-C_{25} lineal o ramificada, más preferiblemente alquilo C_1-C_{10} o C_1-C_6 , que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o uno o más restos carbocíclicos o heterocíclicos.

8. El compuesto sal yoduro de éster metílico de O-[Pd-Bpheid]-[N³-trimetilamonio-2-metil]-serina, designado en la presente memoria compuesto **13**.

9. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de bacterioclorofila de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en las siguientes indicaciones:

- (a) terapia fotodinámica;
- (b) terapia fotodinámica vascular dirigida (VTP);
- 5 (c) tratamiento de enfermedades cardiovasculares incluyendo oclusión de vasos y la trombosis en las enfermedades de la arteria coronaria, la hiperplasia de la íntima, la restenosis y las placas ateroscleróticas;
- (d) prevención o reducción en de restenosis dentro de stent tras angiografía coronaria;
- (e) tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones dermatológicas seleccionadas entre acné, cicatrices por acné, psoriasis, pie de atleta, verrugas, queratosis actínica y manchas en vino de Oporto;
- 10 (f) tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones oftálmicas seleccionadas entre neovascularización corneal y coroidal y degeneración macular asociada a la edad (AMD);
- (g) diagnóstico de tumores;
- (h) eliminación de células o agentes infecciosos que comprenden bacterias y virus, preferiblemente eliminación *in vitro* de bacterias y virus en un producto biológico tras la iluminación de dicho producto, preferiblemente en donde dicho producto biológico es sangre.

15 11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde dicha indicación es terapia fotodinámica o terapia fotodinámica vascular dirigida de tumores no malignos, tales como hipertrofia de próstata benigna o de tumores malignos incluyendo tumores primarios y metastásicos, seleccionados entre melanoma tumores de próstata, de cerebro, de cabeza, de cuello, de colon, de ovario, de mama, de la pared torácica que surgen a partir del cáncer de mama, cánceres de piel, de pulmón, de esófago y de vejiga y otros tumores sensibles a hormonas.

20 12. Uso de un derivado de bacterioclorofila de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de una composición farmacéutica para la siguiente indicación:

(a) terapia fotodinámica o terapia fotodinámica vascular dirigida (VTP) de:

- 25 (i) tumores malignos incluyendo tumores primarios y metastásicos, seleccionados entre melanoma tumores de próstata, de cerebro, de cabeza, de cuello, de colon, de ovario, de mama, de la pared torácica que surgen a partir del cáncer de mama, cánceres de piel, de pulmón, de esófago y de vejiga y otros tumores sensibles a hormonas;
- (ii) tumores no malignos, tales como hipertrofia de próstata benigna;
- (iii) degeneración macular asociada a la edad.

30 (b) prevención o reducción dentro de stent en un individuo que padece de una enfermedad cardiovascular que se sometió a angiografía coronaria;

(c) tratamiento de aterosclerosis;

(d) diagnóstico de tumores;

35 (e) eliminación de células o agentes infecciones que comprenden bacterias y virus, preferiblemente eliminación *in vitro* de bacterias y virus en un producto biológico tras iluminación de dicho producto biológico, preferiblemente en donde dicho producto biológico es sangre.

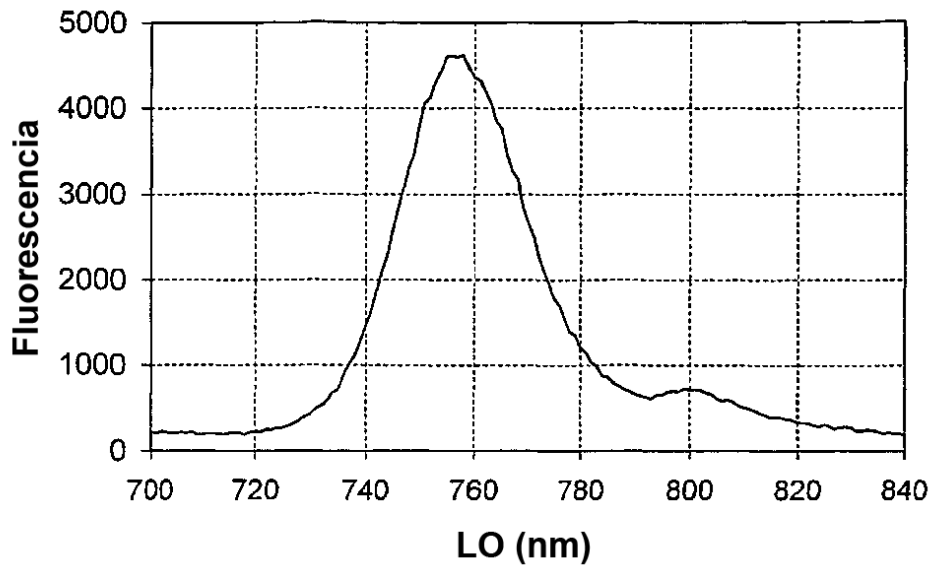


Fig. 1

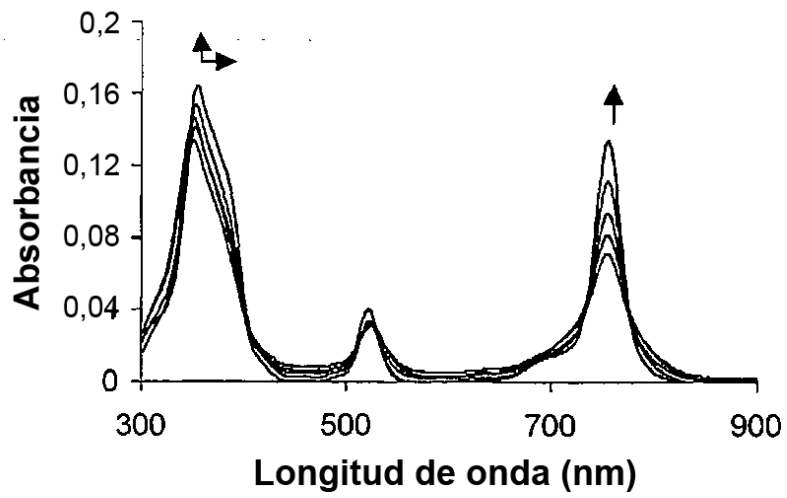


Fig. 2

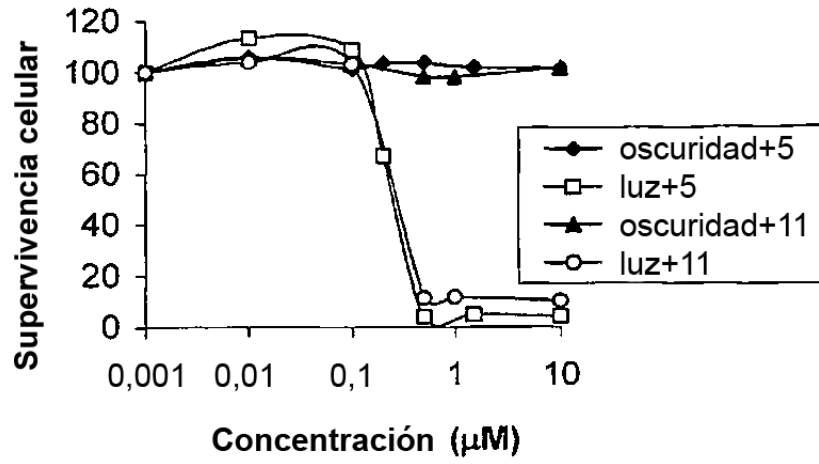


Fig. 3A

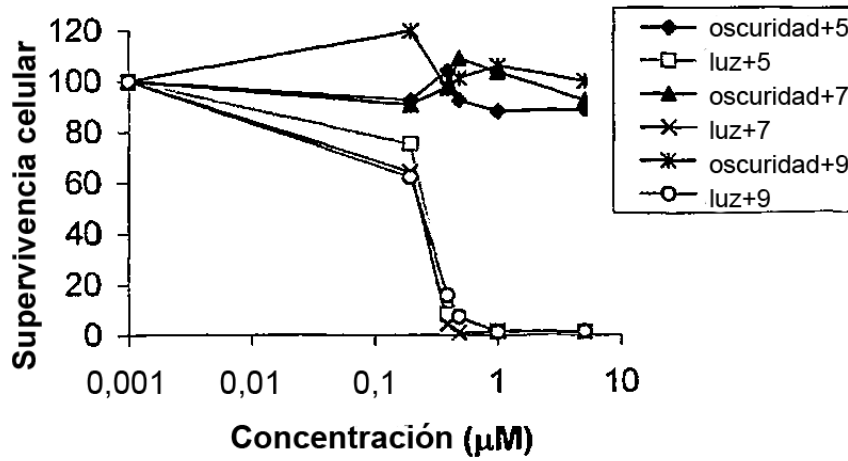


Fig. 3B

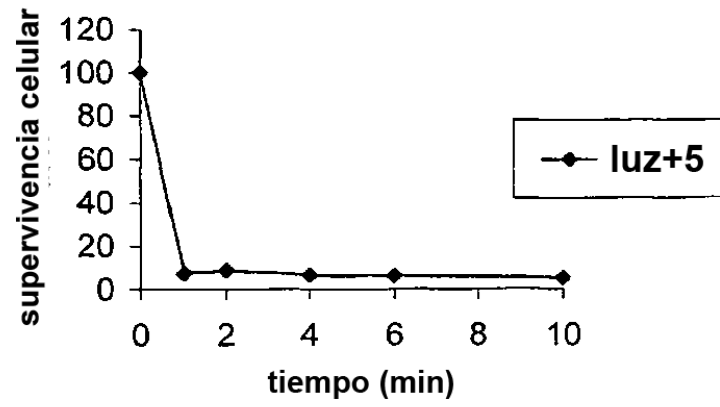


Fig. 3C

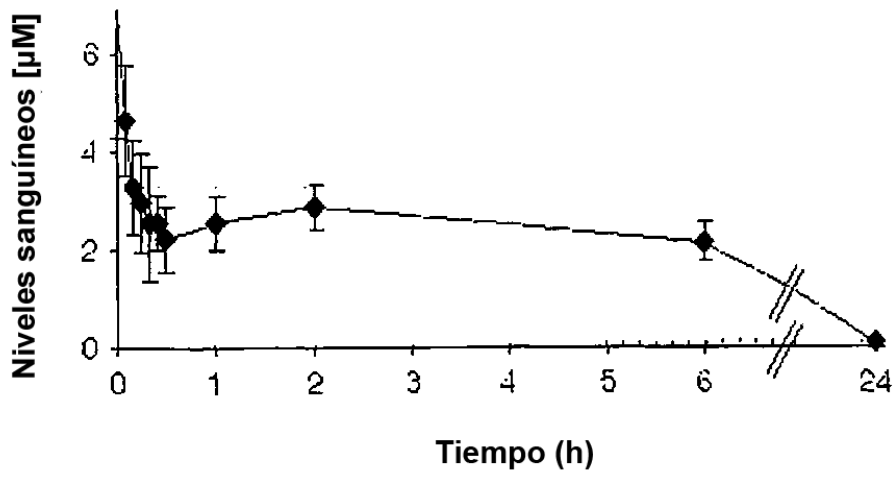


Fig. 4

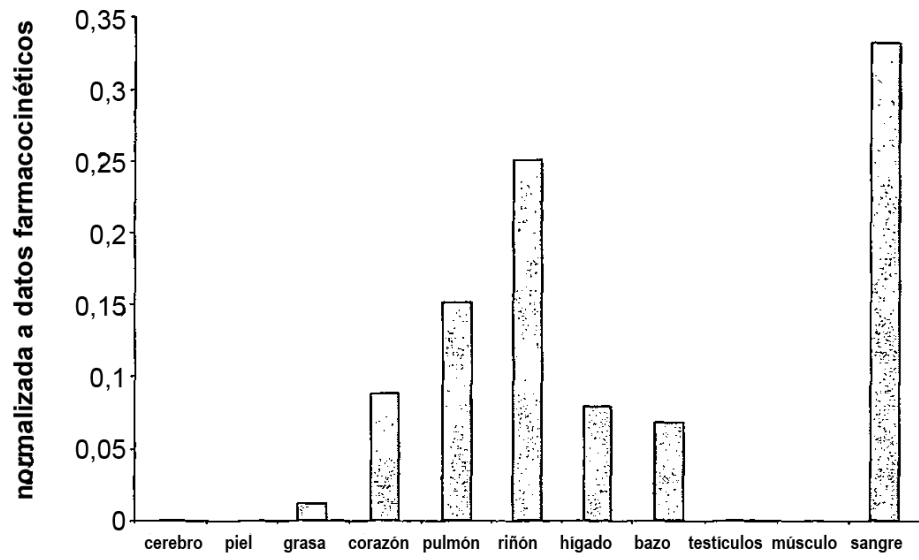


Fig. 5A

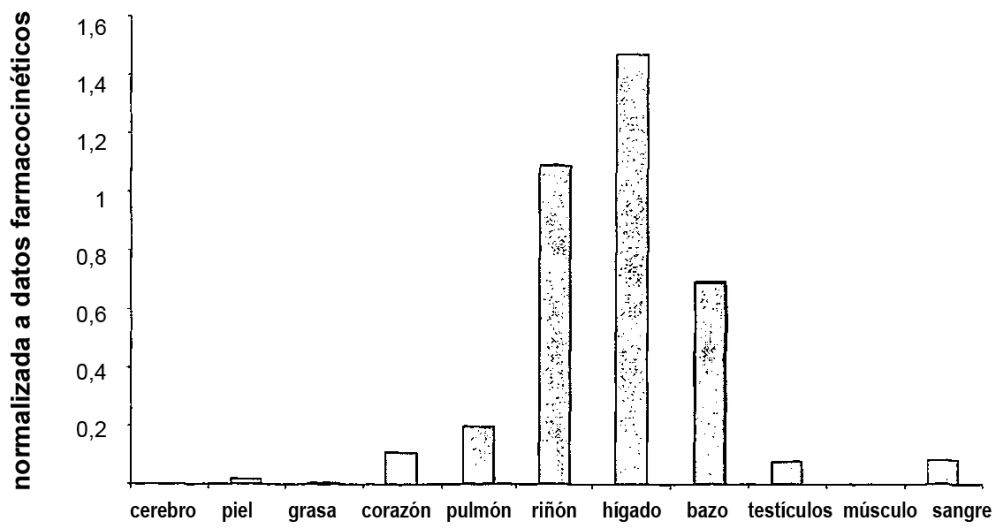


Fig. 5B

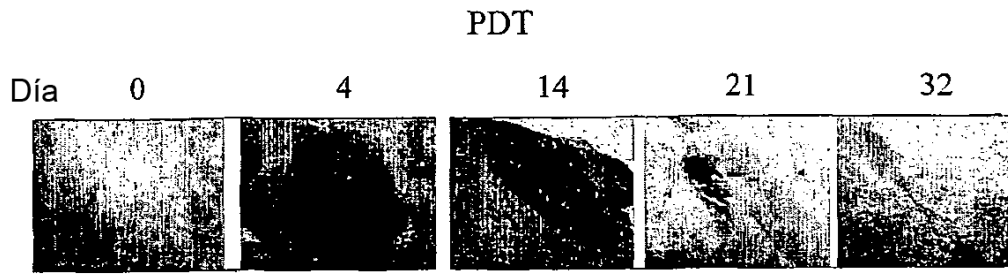


Fig. 6A

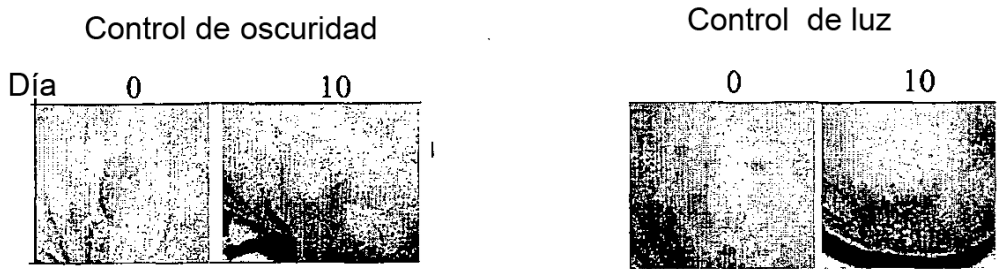


Fig. 6B

Fig. 6C

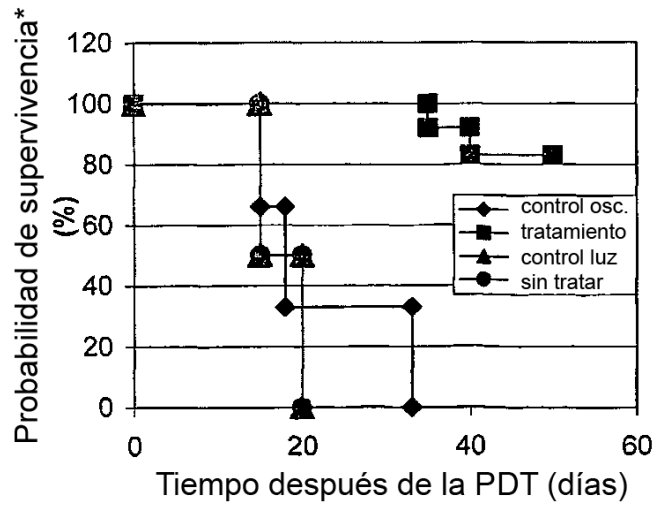


Fig. 7

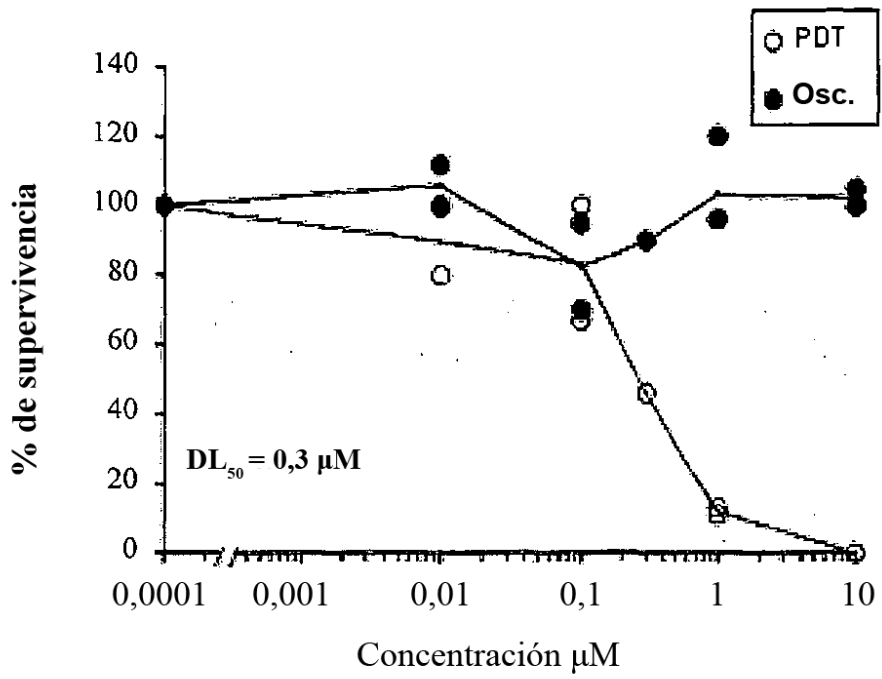


Fig. 8A

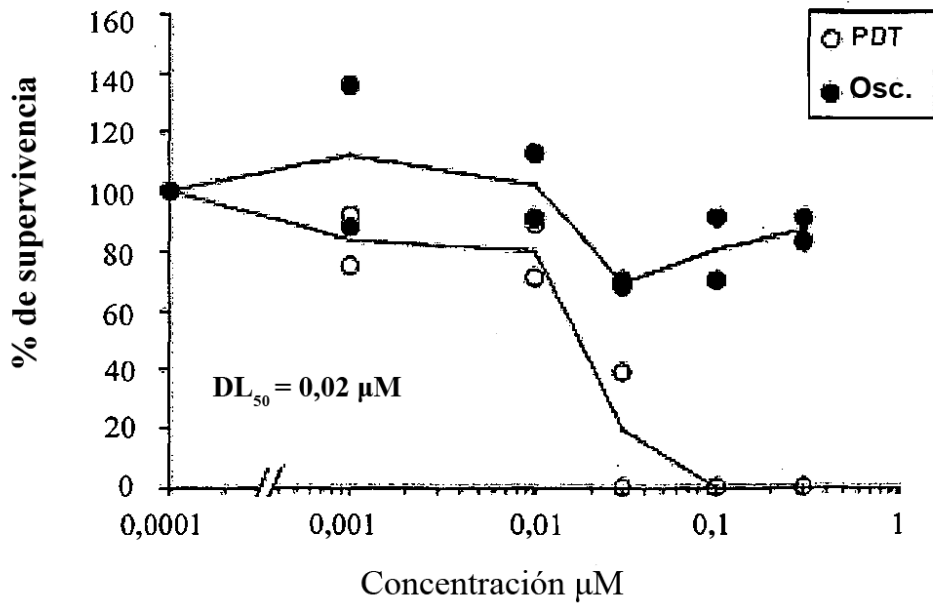


Fig. 8B

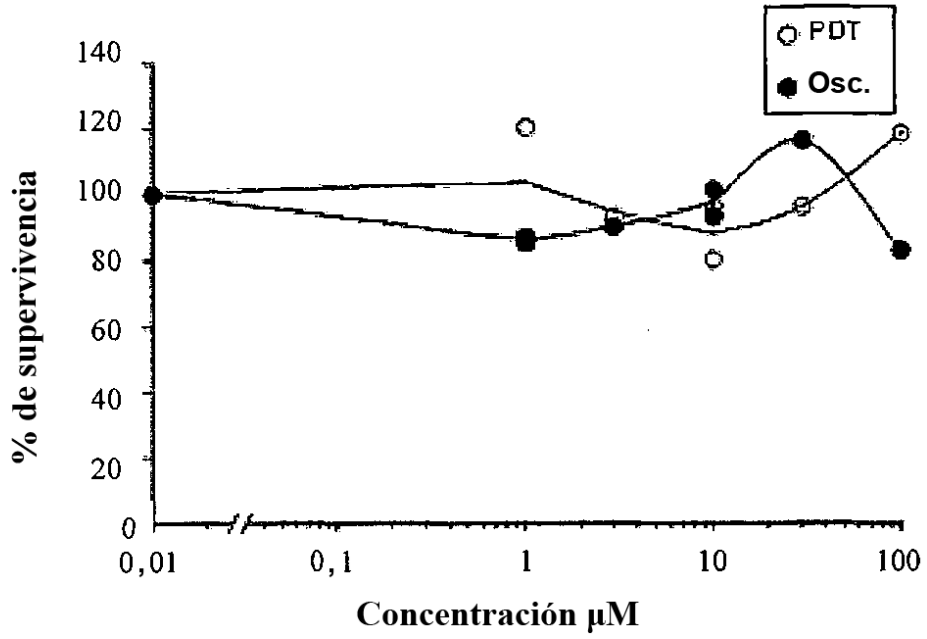


Fig. 8C

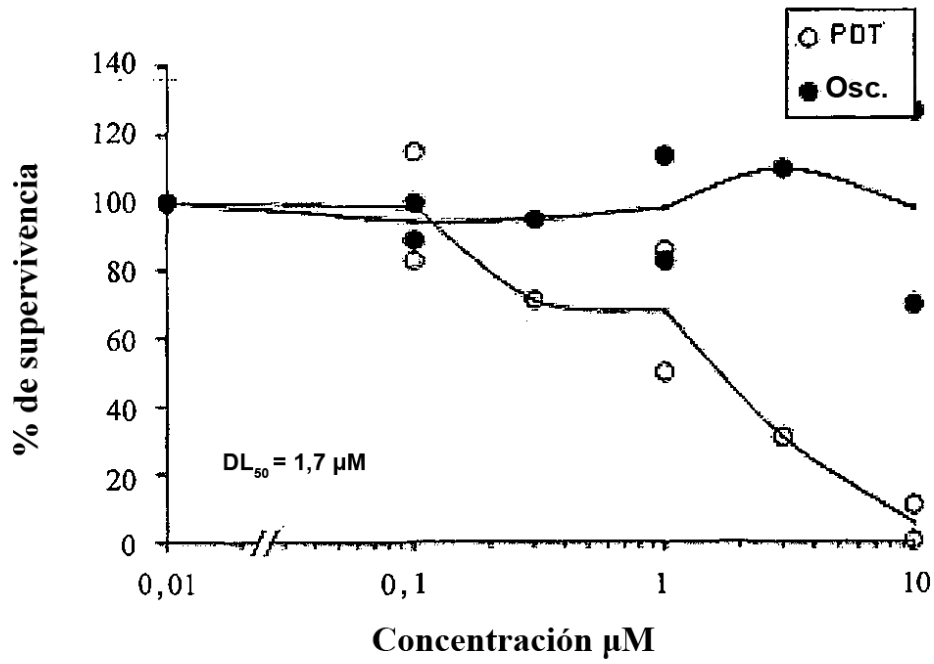


Fig. 8D

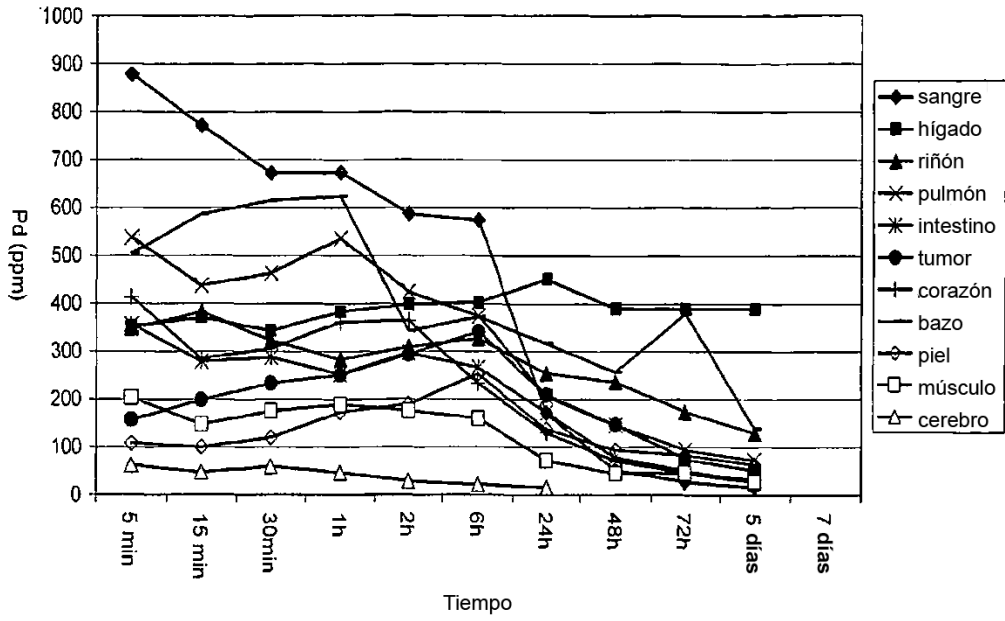


Fig. 9A

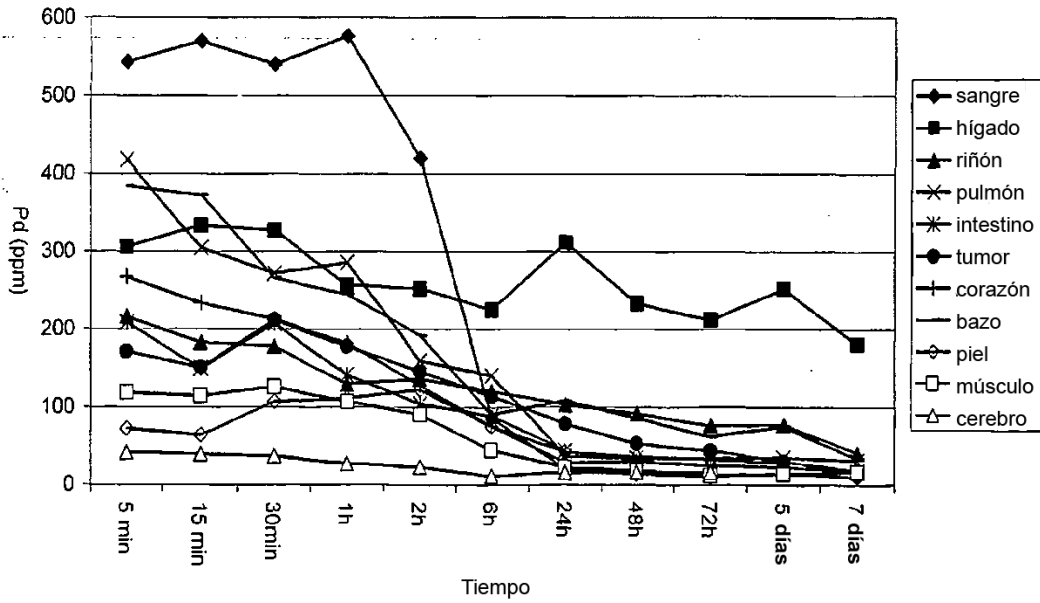


Fig. 9B

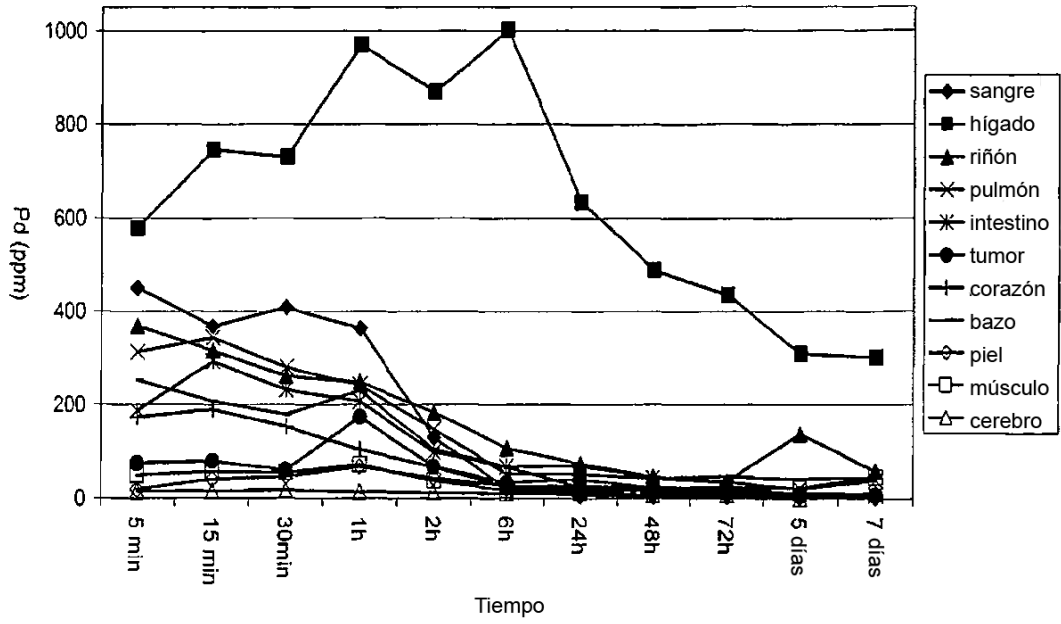


Fig. 9C

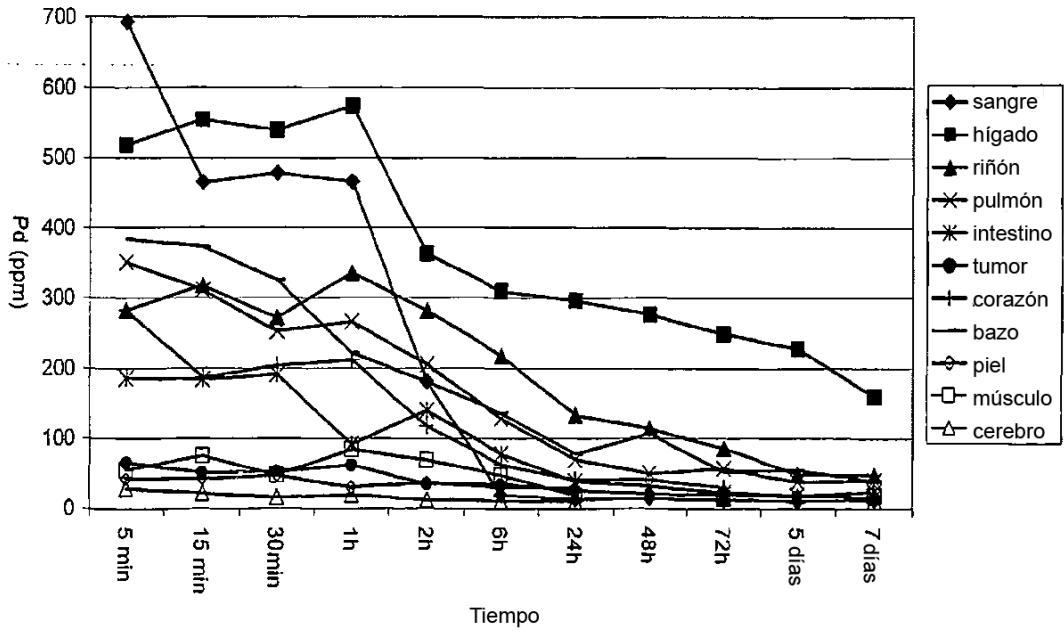


Fig. 9D

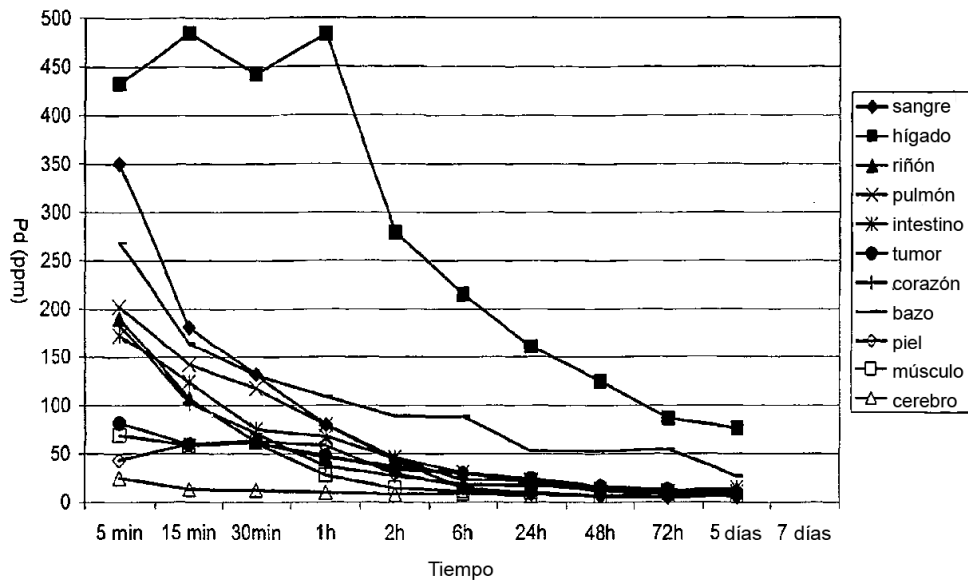


Fig. 9E